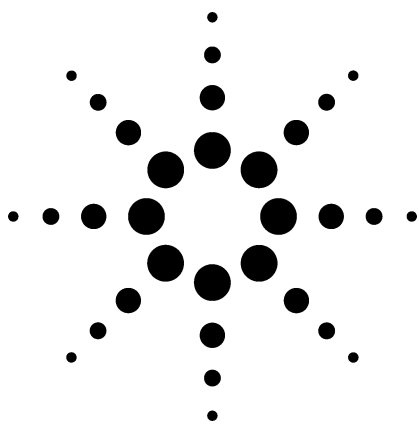


LC/TOFMSによる依存性薬物スクリーニング 分析メソッドの開発 アプリケーション



法科学

著者

Courtney Milner and Russell Kinghorn
Baseline Separation Technologies Pty Ltd.

要旨

ヒトサンプル中に含まれる依存性薬物のスクリーニングは、現代社会と密接に関連しています。雇用者、警察官、刑務官、法科学者たちは皆、薬物スクリーニングの正確さを頼りにしています。現在、この分析には簡易な免疫測定法がごく一般的です。これらのメソッドでは、多数のサンプルを迅速にスクリーニングできますが、その後確認検査が必要で、サンプルの誘導体化とガスクロマトグラフ/マススペクトロメトリー (GC/MS) による検出に多くの時間が掛かります。

このアプリケーションノートでは、Agilent 飛行時間型マススペクトロメータ (LC/MSD TOF) をスクリーニングと確認検査の両方のツールとして使用し、1回の分析が30分で可能になる方法について記述しています。

はじめに

これまでの歴史から、人類は長い間、肉体や精神を昂揚させる物質の消費や体験に魅了されてきました。従来こ

うした物質はすべて、天然起源の物質でした。現在でもこのような用途に好まれる多くの薬物は、天然物を原料として製造したものです。これらの最もよく知られた薬物のひとつは大麻 *cannabis* で、米国人口のおよそ 32% が1回以上使用した経験があり、若年層のあいだではハイスクール高学年の 56% が使用経験を持っています。このような大きな割合の数字から、また各種関連法規の制定により、多くの州や地域で大麻の私的使用の合法化が行われていますが、これによって、職場での作業能力低下や自動車の運転能力欠如についての潜在的な影響が解消されるわけではありません。米国内の主要 25 都市における違法薬物市場について実施された広域調査が、全米麻薬撲滅対策室 (ONDCP) により “Pulse Check” レポートとしてまとめられています [1]

これまでの 100 年のあいだ、現在は違法とされている多くの薬物の生理的作用が評価・検討された結果、こうした薬物は社会から締め出されてきました。その間にも非常に多くの様々な新薬が開発され、その多くは特定の病気に対する治療薬剤として医学界に広く承認されています。しかし残念ながら、こうした薬剤の使用に際して、依存性や長期乱用による好ましくない副作用がしばしば発生します。アヘン剤は、数多くの患者に疼痛の緩和をもたらすなどの優れた点がある一方で、高い嗜癖や乱用の危険性があります。



Agilent Technologies

依存性薬物の分析に対する関心は多くの分野で存在し、得られる結果に対する関心もそれぞれに異なっています。これらの主要な分野には、以下があります。

- 職場でのスクリーニング
- 治療のモニタリング
- 法医学病態生理
- 事故の調査
- 犯罪現場の調査

現在、依存性薬物のスクリーニングは、様々な手法により実施されていますが、その中でも最も広く使用されている検査室手法は EMIT (競合的酵素免疫分析法) で、必要に応じて GC/MS による確認検査を実施します。この免疫測定法ではスクリーニングと書類作成の作業に要する時間は僅か 2 時間しか掛りませんが、結果が判明するまでに、多くの場合 36~48 時間のターンアラウンド時間を要します。この EMIT 法の欠点としてはさらに、化合物特異性が低いため検出薬物クラス以外の薬物も誤って同定されてしまうことです。

現行の GC/MS 分析確認技術は、免疫測定法で分類された薬物クラスの範囲内で、正確な薬物の種類を正確に定量するために必要な感度および特異性を達成するよう開発されています。この GC/MS による検出を行うには、ガスクロマトグラフ (GC) 分析に適するよう揮発性や温度安定性を確保するため、多くの薬物では誘導体化が必要で、表 1 をご覧ください。

最近発表された Agilent アプリケーションノートでは、

表 1 国立薬物乱用研究所 (NIDA) による化合物クラスと検出下限の概要

化合物クラス	検出下限 (ng/mL)	確認メソッド
アンフェタミン類	1000	EMIT/GC/MS
バルビツレート類	300-3000	EMIT/GC/MS
コカイン	300	EMIT/GC/MS
メタドン	300	EMIT/GC/MS
アヘン類	300	EMIT/GC/MS
フェンシクリジン	25	EMIT/GC/MS
プロポキシフェン	300	EMIT/GC/MS
ベンゾジアゼピン類	300	EMIT/GC/MS
メタカロン	300	EMIT/GC/MS
カンナビノイド類	50	EMIT/GC/MS

1 台の四重極型装置を使用した依存性薬物のスクリーニング分析や治療薬モニタリングを行うための LC/MS の可能性について報告されています [2, 3]。また、別の多くの発表では、特定の依存性薬物、または薬物クラスの分析について考察しており、現行の GC/MS による確認検査を置き換えて 1 日で検査を終わらせる方法や、スクリーニングと確認検査を 1 回の分析で両方行うツールとしての可能性について示されています。

Agilent LC/MSD TOF などによる精密質量測定では、候補となる化合物の数が特定の薬物に限定されているため、同定の確実性が大幅に増加します。質量測定の精度と正確さが高まると、検出された精密質量について理論的に考えられる化合物の数が少なくなります。これは特に、爆発物の残痕分析などで発生する干渉の可能性を有する物質の種類が多いため、そうした物質が含まれているサンプルの分析に有用です。

このアプリケーションノートでは、依存性薬物のスクリーニング検査と確認検査に使用する Agilent の飛行時間型 (TOF) マススペクトロメータの能力について概説します。飛行時間型 (TOF) マススペクトロメータを使用すると、直線性が高い精密質量測定 (相対質量誤差 3 ppm 未満) が可能になり、さまざまな薬物クラスの検出、確認、および定量を行うための優れたツールとして使用できます。ここで紹介するメソッドの意図は、特定の化合物や化合物クラスを検出下限レベルで測定を行うのではなく、スクリーニング分析で一度により多くの化合物を分析できるよう、その守備範囲を拡大することです。

研究対象とした化合物とその分子式を表 2 に示します。

Table 2. Compounds Included in Study

化合物	分子式	薬物クラス
α -ヒドロキシアルプラゾラム	C ₁₇ H ₁₃ N ₄ OCl	ベンゾジアゼピン類
7-アミノクロナゼパム	C ₁₅ H ₁₂ N ₃ OCl	ベンゾジアゼピン類
ジアゼパム	C ₁₆ H ₁₃ N ₂ OCl	ベンゾジアゼピン類
オキサゼパム	C ₁₅ H ₁₁ N ₂ O ₂ Cl	ベンゾジアゼピン類
テマゼパム	C ₁₆ H ₁₃ N ₂ O ₂ Cl	ベンゾジアゼピン類
7-アミノフルニトラゼパム	C ₁₆ H ₁₄ N ₃ OF	ベンゾジアゼピン類
7-アミノニトラゼパム	C ₁₅ H ₁₃ N ₃ O	ベンゾジアゼピン類
dl-11-ノル-9-カルボキシ- δ -9-THC	C ₂₁ H ₂₈ O ₄	カンナビノイド類
コデイン	C ₁₈ H ₂₁ NO ₃	アヘン類
モルヒネ 3 β -d-グルクロニド	C ₂₃ H ₂₇ NO ₉	アヘン類
6-アセチルモルヒネ		C ₁₉ H ₂₁ NO ₄ アヘン類
EDDP パークロレート	C ₂₀ H ₂₄ NO ₄ Cl	アヘン類
(+)-エフェドリン	C ₁₀ H ₁₅ NO	興奮剤
フェンフルラミン	C ₁₂ H ₁₆ NF ₃	興奮剤
dl-塩酸 MBDB	C ₁₂ H ₁₈ NO ₂ Cl	興奮剤
(\pm) 塩酸 BDB	C ₁₁ H ₁₆ NO ₂ Cl	興奮剤
dl-MDEA	C ₁₂ H ₁₇ NO ₂	興奮剤
dl-MDA	C ₁₀ H ₁₃ NO ₂	興奮剤
dl-MDMA	C ₁₁ H ₁₅ NO ₂	興奮剤
dl-メタンフェタミン	C ₁₀ H ₁₅ N	興奮剤
dl-アンフェタミン	C ₉ H ₁₃ N	興奮剤
フェンテルミン	C ₁₀ H ₁₅ N	興奮剤
(+)-ブソイドエフェドリン	C ₁₀ H ₁₅ NO	興奮剤
(-)-コチニン	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O	その他
4'-ヒドロキシノルジアゼパム	C ₁₅ H ₁₁ ClN ₂ O ₂	ベンゾジアゼピン類
ノルジアゼパム	C ₁₅ H ₁₁ N ₂ OCl	ベンゾジアゼピン類
フルニトラゼパム	C ₁₆ H ₁₂ N ₃ O ₃ F	ベンゾジアゼピン類
フルラゼパム	C ₂₁ H ₂₃ N ₃ OClF	ベンゾジアゼピン類
デスアルキルフルラゼパム	C ₁₅ H ₁₀ N ₂ OClF	ベンゾジアゼピン類
(-)- δ -9-THC	C ₂₁ H ₃₀ O ₂	カンナビノイド類
(\pm)-11-ヒドロキシ δ -9-THC	C ₂₁ H ₃₀ O ₃	カンナビノイド類
コカイン	C ₁₇ H ₂₁ NO ₄	コカイン
ベンゾイルエクゴニン	C ₁₆ H ₁₉ NO ₄	コカイン
ブブレノルフィン	C ₂₉ H ₄₁ NO ₄	アヘン類
モルヒネ	C ₁₇ H ₁₉ NO ₃	アヘン類
ノルモルヒネ	C ₁₆ H ₁₇ NO ₃	アヘン類
メペリジン	C ₁₅ H ₂₁ NO ₂	アヘン類
ノルメペリジン	C ₁₄ H ₁₉ NO ₂	アヘン類
dl-メタドン	C ₂₁ H ₂₇ NO	アヘン類
EMPD	C ₁₉ H ₂₁ N	アヘン類
ナロキソン	C ₁₉ H ₂₁ NO ₄	アヘン類
オキシコドン	C ₁₈ H ₂₁ NO ₄	アヘン類
LSD	C ₂₀ H ₂₅ N ₃ O	幻覚剤
Iso-LSD	C ₂₀ H ₂₅ N ₃ O	幻覚剤
(\pm)-塩酸フェニルプロパノールアミン	C ₉ H ₁₃ NO:HCl	興奮剤
塩酸フルオキセチン	C ₁₇ H ₁₈ F ₃ NO:HCl	プロザック
GHB	C ₄ H ₇ O ₃ Na	その他
(-)-ニコチン	C ₁₀ H ₁₄ N ₂	その他

実験

本研究では、以下の構成による Agilent 1100 システムを使用しました。

バイナリポンプ
標準オートサンプラ
温度調節カラムコンパートメント
ダイオードアレイ検出器 (DAD)
G1969 LC/MSD TOF

装置の設定

ポンプ

タイム (min)	水 (%) (0.1% ギ酸)	メタノール (%) (0.1% ギ酸)	流量 (mL/min)
0	90	10	0.4
4	90	10	0.4
22	0	100	0.4
29	0	100	0.4
29.6	90	10	0.4
30	90	10	0.4

ポストタイム	5 分
トータル分析時間	35 分
注入量	10 μ L (ニードル洗浄を行う)
カラム温度	30 $^{\circ}$ C
カラム	150 mm \times 2.1 mm \times 3.5 μ m (ZORBAX SB-AQ)

マスペクトル (MS) 検出

イオン化	ポジティブ ESI
ガス温度	350 $^{\circ}$ C
乾燥ガス	10 L/min
ネブライザ圧	40 psig
キャピラリ電圧	3500 V

MS (マスペクトル) の条件

スキャン m/z 範囲	100-1000
フラグメンタ電圧	125 V
データ保存モード	Profile
スキマー電圧	60 V
Oct RF	200 V

LC-TOF へのリファレンス質量の導入

Agilent の飛行時間型マスペクトロメータ (以下、TOF MS) では、信頼性のある高精度の精密質量を測定するためにリファレンス質量が使用されます。この TOF のエレクトロスプレーソースは、独特のデュアルスプレーアセンブリになっており、リファレンス質量化合物を同時活連続的に導入することが可能です。

今回の実験で使用するリファレンスマックス 1 は、purine 2 mL と HP-0921 0.8 mL を混合したものです。このミックスを、メタノール：水 (90 : 10) 1 L に溶解し移動相と同じ物性に調製しました。

このコントロールソフトウェアでは、以下のリファレンス質量を使用できます。

正イオン検出
121.050873
922.009798

LC-TOF MS による依存性薬物の分析

何らかの化合物の微量検出に TOF MS を使用する圧倒的な利点としては、精密質量によって化合物同定の確認情報が得られることです。この精密質量の例を表 3 に示します。この表では、各化合物で検出された観測質量、およびそのアダクトにおける観測質量の理論質量との偏差が示されています。

計算による質量と観測した質量は殆ど一致しているため、分析者は、クロマトグラム上にあるピークの帰属に対してより強固な自信を持つことができます。薬物のような化合物のスクリーニング結果は、被験者の人生に重大な影響を与える可能性があります。こうした確実性があることは非常に意味のあることです。この能力によって、より広い範囲の化合物をスクリーニングするツールとして TOF MS を応用することも可能になります。

表3 理論精密質量、観測質量、質量誤差

化合物	モノアイソトピック 質量	リテンション タイム	付加イオン	観測 質量	付加イオン 精密質量	質量誤差 (ppm)
α -ヒドロキシアルプラゾラム	324.0778	17.76	[M+H] ⁺	325.0852	325.0850	0.41
7-アミノクロナゼパム	285.0669	13.32	[M+H] ⁺	286.0739	286.0741	-0.93
ジアゼパム	284.0716	19.15	[M+H] ⁺	285.0796	285.0789	2.39
オキサゼパム	286.0509	17.4	[M+H] ⁺	287.0579	287.0581	-0.98
テマゼパム	300.0666	18.2	[M+H] ⁺	301.0741	301.0738	0.89
7-アミノフルニトラゼパム	283.1121	15.3	[M+H] ⁺	284.1191	284.1093	-0.94
7-アミノニトラゼパム	251.1059	8.82	[M+H] ⁺	252.1134	251.1131	1.04
dl-11-ノル-9-カルボキシ- δ -9-THC	344.1988	21.38	[M+H] ⁺	345.2061	345.2060	0.18
コデイン	299.1521	5.5	[M+H] ⁺	300.1592	300.1594	-0.73
モルヒネ 3 β -d-グルクロニド	461.1686	1.7	[M+H] ⁺	462.1764	462.1758	1.17
6-アセチルモルヒネ	327.1471	8.9	[M+H] ⁺	328.1542	328.1543	-0.41
EDDP パークロレート	377.1394	15.42	[M-O ₄ Cl] ⁺	278.1909	278.1903	2.06
(+)-エフェドリン	165.1154	2.46	[M+H] ⁺	166.1225	166.1226	-0.85
フェンフルラミン	231.1235	12.9	[M+H] ⁺	232.1303	232.1307	-1.98
dl-塩酸 MBDB	243.1026	10.63	[M-Cl] ⁺	208.1337	208.1332	2.37
(±) 塩酸 BDB	229.087	9.5	[M-Cl] ⁺	194.1181	194.1175	2.81
dl-MDEA	207.1259	9.6	[M+H] ⁺	208.1332	208.1332	-0.03
dl-MDA	179.0946	4.9	[M+H] ⁺	180.1019	180.1191	-0.03
dl-MDMA	193.1103	6.4	[M+H] ⁺	194.1174	194.1175	-0.08
dl-メタアンフェタミン	149.1204	3.85	[M+H] ⁺	150.1281	150.1277	2.49
dl-アンフェタミン	135.1048	3.05	[M+H] ⁺	136.1125	136.112	3.11
フェンテルミン	149.1204	5.34	[M+H] ⁺	150.1278	150.1277	0.49
(+)-プソイドエフェドリン	165.1154	2.76	[M+H] ⁺	166.1231	166.1226	2.76
(-)-コチニン	176.095	2.56	[M+H] ⁺	177.1023	177.1022	0.34
4'-ヒドロキシノルジアゼパム	286.0509	14.23	[M+H] ⁺	287.0582	287.0581	0.06
ノルジアゼパム	270.056	18.1	[M+H] ⁺	271.0634	271.0632	0.49
フルニトラゼパム	313.0863	18.1	[M+H] ⁺	314.0924	314.0935	-3.65
フルラゼパム	387.1514	15.23	[M+H] ⁺	388.1591	388.1586	1.17
デスアルキルフルラゼパム	288.0466	18.2	[M+H] ⁺	289.0535	289.0538	-1.19
(-)- δ -9-THC	314.2246	22.31	[M+H] ⁺	315.2328	315.2318	2.99
(±)-11-ヒドロキシ- δ -9-THC	330.2195	21.07	[M+H] ⁺	331.2267	331.2267	-0.22
コカイン	303.1471	12.6	[M+H] ⁺	304.1545	304.1543	0.54
ベンゾイルエクゴニン	289.1314	12.1	[M+H] ⁺	290.1386	290.1386	-0.29
ブプレノルフィン	467.3036	16.11	[M+H] ⁺	468.3107	468.3108	-0.29
モルヒネ	285.1365	2.2	[M+H] ⁺	286.1438	286.1437	-0.1
ノルモルヒネ	271.1208	2	[M+H] ⁺	272.1286	272.1281	1.7
メペリジン	247.1572	12.4	[M+H] ⁺	248.1652	248.1645	2.8
ノルメペリジン	233.1416	12.5	[M+H] ⁺	234.1493	234.1488	1.9
dl-メタドン	309.2093	16.72	[M+H] ⁺	310.2166	310.2165	0.19
EMPD	263.1674	16.4	[M+H] ⁺	264.1754	264.1746	2.7
ナロキソン	327.1471	5.74	[M+H] ⁺	328.1541	328.1543	-0.72
オキシコドン	315.1471	7.2	[M+H] ⁺	316.1547	316.1543	1.15
LSD	323.1998	14.7	[M+H] ⁺	324.2073	324.207	0.8
iso-LSD	323.1998	14.55	[M+H] ⁺	324.2078	324.207	2.34
(±)塩酸フェコルプロピノールアミン	187.0764	1.95	[M-Cl] ⁺	152.1069	152.1069	-0.59
塩酸フルオキセチン	345.1107	16.3	[M-Cl] ⁺	310.1412	310.1413	1.85
GHB	126.0293	1.72	[M+H] ⁺	127.0369	127.0365	2.63
(-)-ニコチン	162.1157	1.6	[M+H] ⁺	163.1233	163.1229	1.99
2-オキソ-3-ヒドロキシ-LSD	355.1896	n.d.			+veESI で検出できない	

質量抽出ウィンドウを狭めることによって、複数の化合物の感度が2倍を超えることが示されています。図1では、フルニトラゼパム(ロヒプノール：デートレイブ・ドラッグとして悪用される)のピークについて、抽出する質量範囲が狭くなるほど測定ノイズが減少していることを示しています。ロヒプノールなどの化合物が微量濃度で存在することを正確に測定できるTOF MSの能力は、違法物質の乱用が通報された場合の捜査に役立つ可能性があり、複雑なマトリックスの試料を扱う際の確証における重要な決め手であることが示されています。

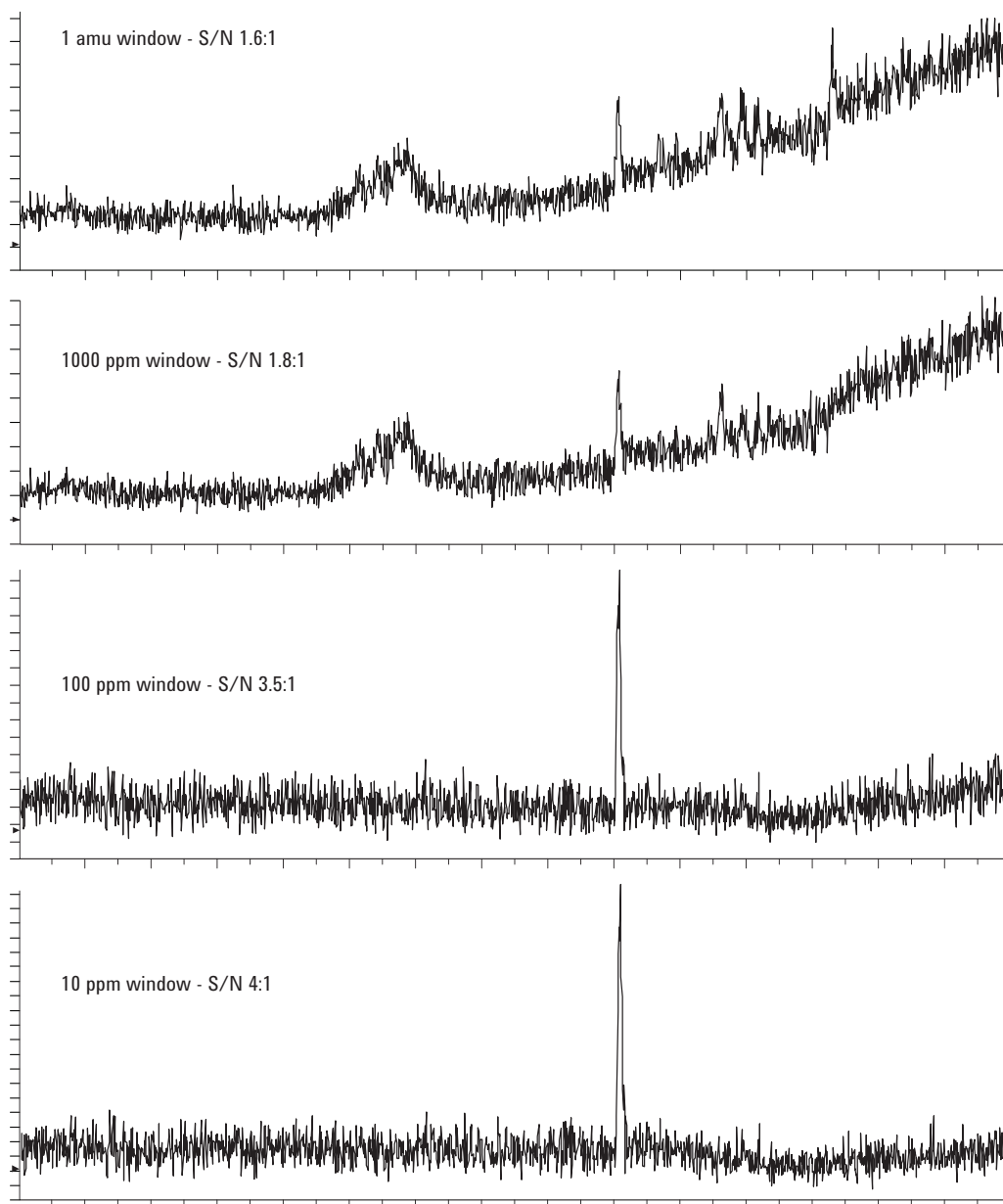


図1 1 ng/mL フルニトラゼパムにおける抽出イオン範囲のノイズへの影響

TOFの直線性

TOF MS は従来より、データの時間-デジタル変換を使用するため定量には適さないと考えられています。AgilentのTOF MS で使用されるアナログ-デジタル変換では、他のアナログ-デジタル変換技術よりもはるかに良好な定量データを得ることができます。本研究の一環として、TOF によって分析される化合物の幾つかについて、その

直線性をテストしました。図 2~5 に、4 種類の化合物の直線性を示します。1 ng/mL~1000 ng/mL の 3 桁の範囲にわたって直線性が示されています。しかし、 δ -9-THC やフルオキセチンなど一部の化合物では、それらのイオン化挙動のため直線性の範囲が狭くなっています(図 6、図 7)。それでも、これらの各化合物の回帰値は 0.999 を超えています。

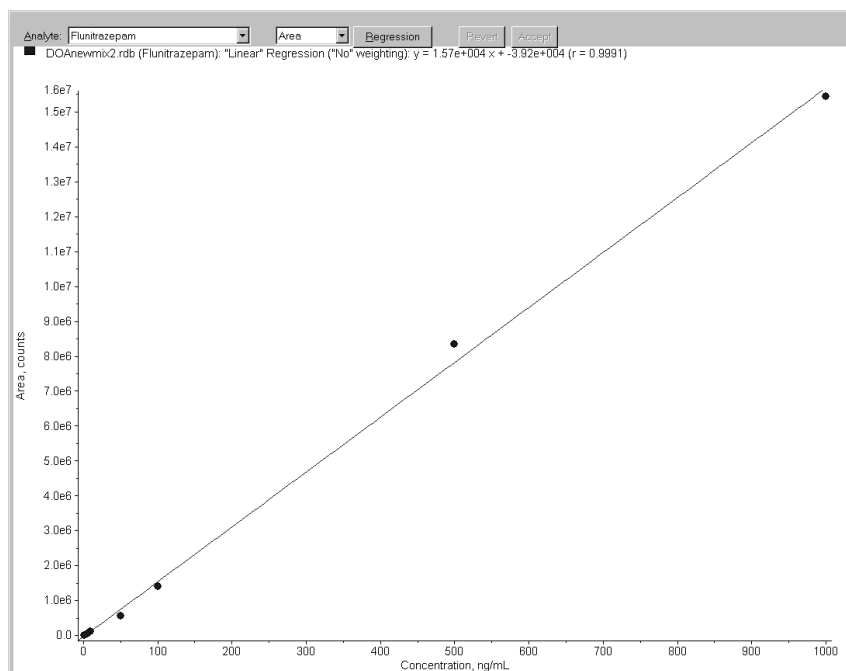


図 2 TOF-MS による 1 ng/mL~1000 ng/mL でのフルニトラゼパム検量線

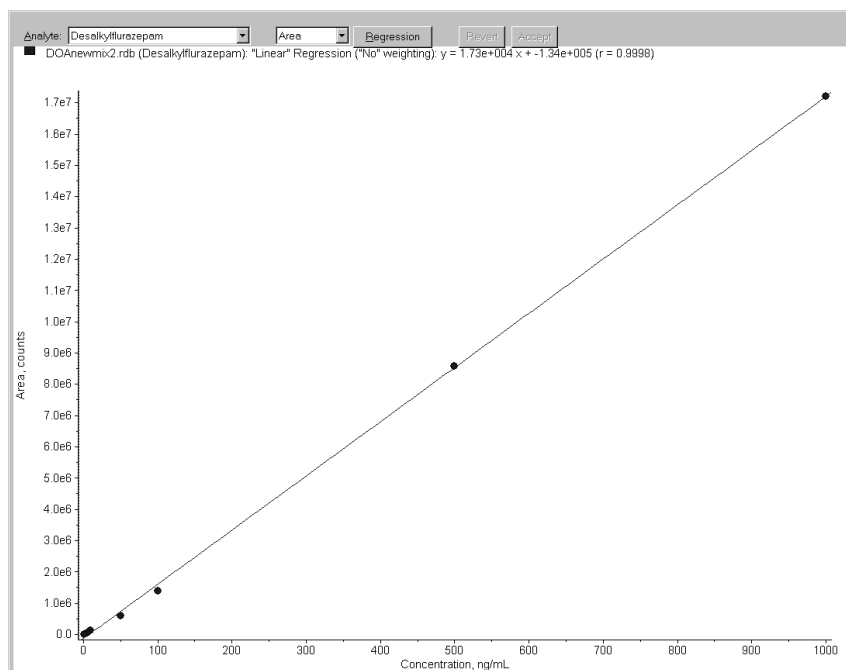


図 3 TOF-MS による 1 ng/mL~1000 ng/mL でのデスアルキルフルラゼパム検量線

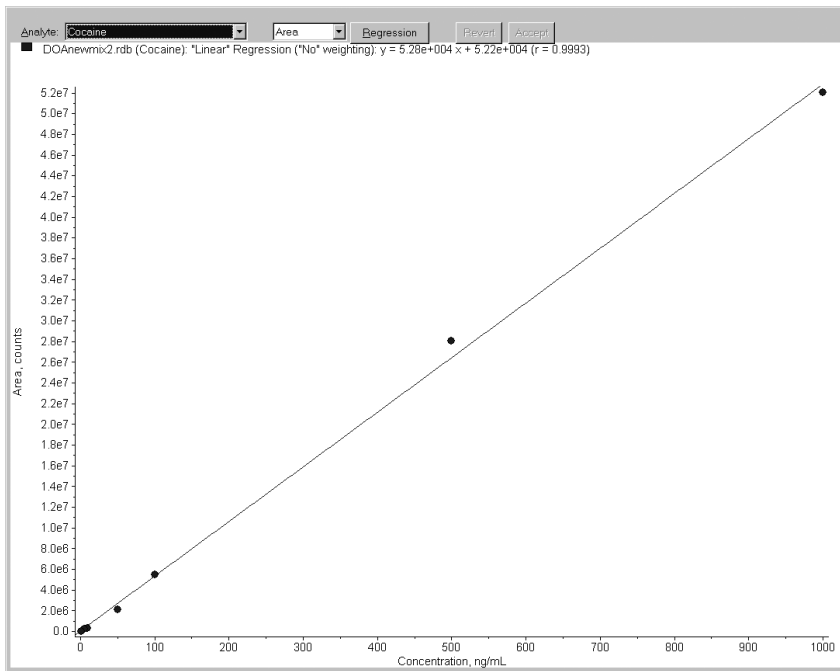


図 4 TOF-MS による 1 ng/mL~1000 ng/mL でのコカイン検量線

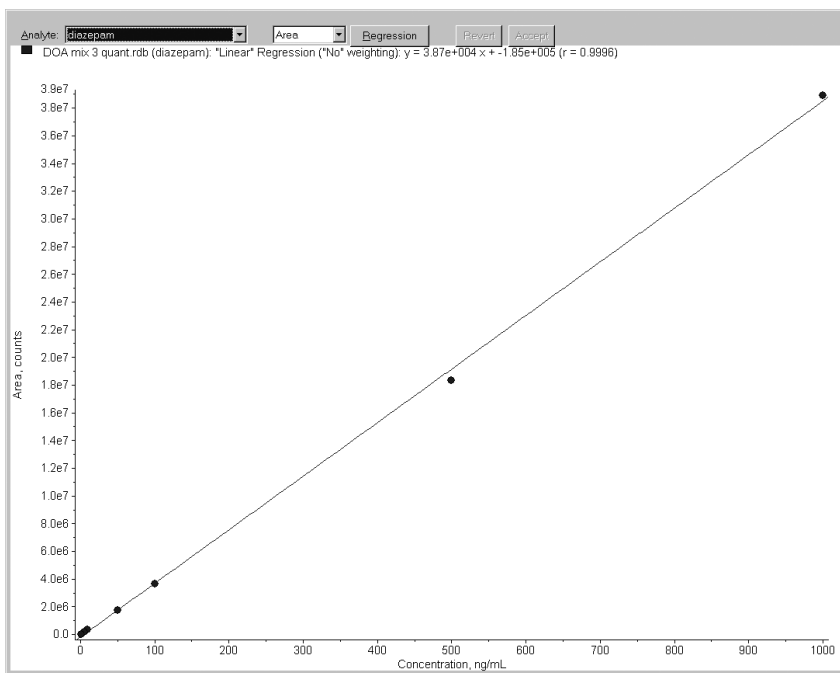


図 5 TOF-MS による 1 ng/mL~1000 ng/mL でのジアゼパム検量線

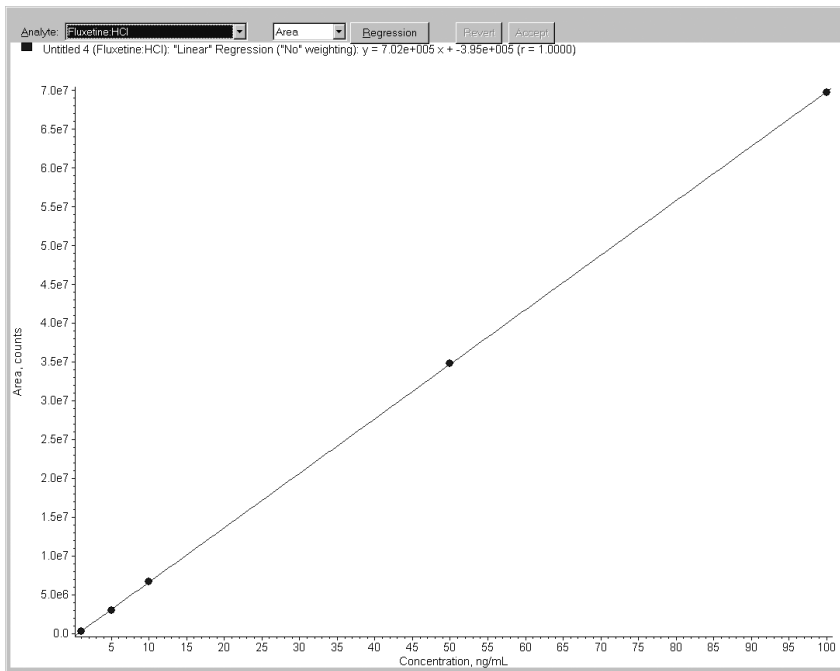


図 6 TOF-MS による 1 ng/mL~100 ng/mL での (-)- δ -9-THC 検量線

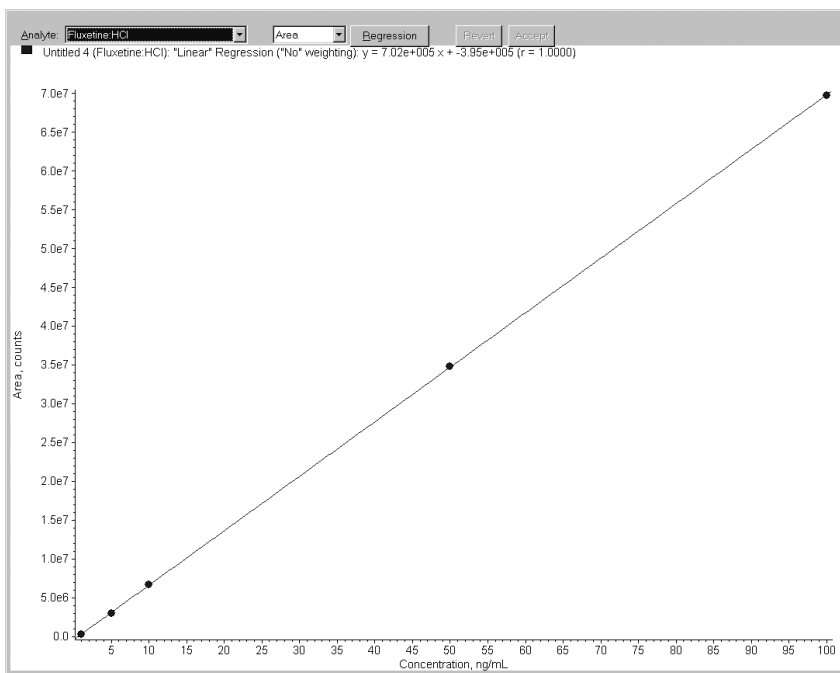
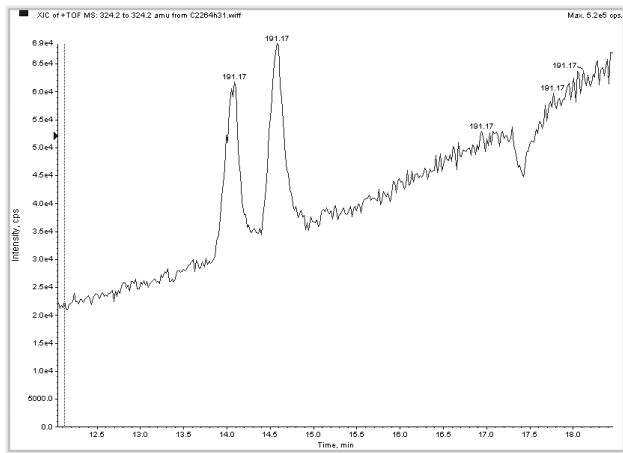
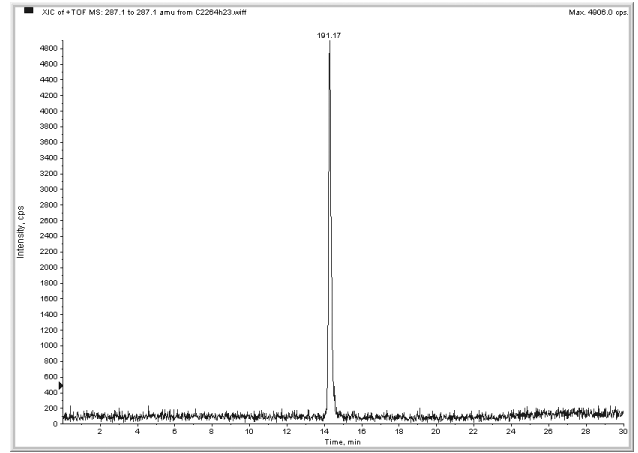


図 7 TOF-MS による 1 ng/mL~100 ng/mL でのフルオキサセチン検量線

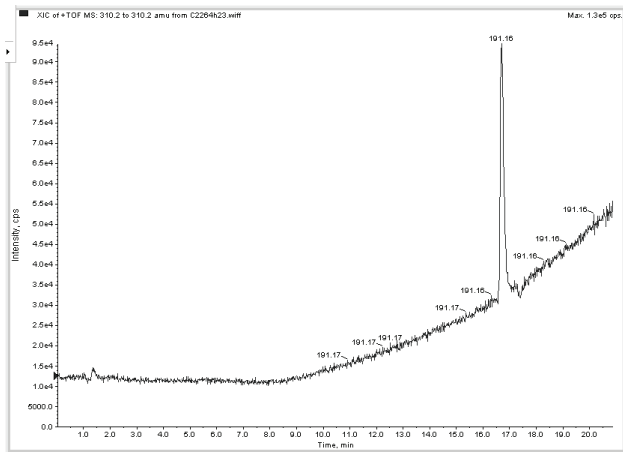
1 ng/mL における 4 化合物のクロマトグラムを、以下の図 8 に 10 ppm 抽出ウィンドウにて示します。



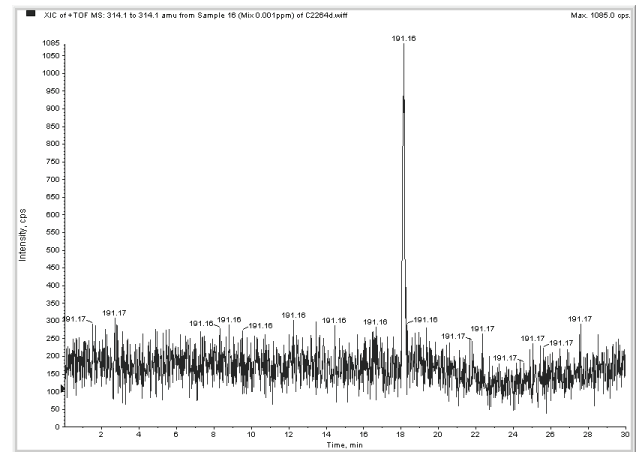
1 ng/mL iso-LSD と LSD (それぞれ)



1 ng/mL 4'-ヒドロキシノルジアゼパム



1 ng/mL dl-メタドン



1 ng/mL フルニトラゼパム (ロヒプノール : Rohypnol)

図 8 4 種類の依存性薬物 1 ng/mL 溶液の 10 ppm 抽出ウィンドウ

表 4 には、このメソッドで分析した各化合物についての検出限界 (LOD) をまとめています。注意すべき点は、このメソッドは単独の化合物に対して最適化されていませんが、依存性薬物全般のスクリーニングツールとして広範囲に使用できるようにデザインされていることです。

表 4 LC/MSD TOF による化合物の検出限界 (LOD)

化合物	精密質量	LOD (ng/mL)
α-ヒドロキシアルプラゾラム	325.085	5
7-アミノクロナゼパム	286.0741	1
ジアゼパム	285.0789	1
オキサゼパム	287.0581	5
テマゼパム	301.0738	5
7-アミノフルニトラゼパム	284.1093	5
7-アミノニトラゼパム	251.1131	1
dl-11-ノル-9-カルボキシ-δ-9-THC	345.206	5
コデイン	300.1594	50
モルヒネ 3β-d-グルクロニド	462.1758	5
6-アセチルモルヒネ	328.1543	10
EDDP パークロレート	278.1903	1
(+)-エフェドリン	166.1226	20
フェンフルラミン	232.1307	1
dl-塩酸 MBDB	208.1332	5
(±) 塩酸 BDB	194.1175	10
dl-MDEA	208.1332	10
dl-MDA	180.1191	50
dl-MDMA	194.1175	50
dl-メタアンフェタミン	150.1277	20
dl-アンフェタミン	136.112	50
フェンテルミン	150.1277	20
(+)-ブソイドエフェドリン	166.1226	20
(-)-コチニン	177.1022	20
4'-ヒドロキシノルジアゼパム	287.0581	0.5
ノルジアゼパム	271.0632	0.5
フルニトラゼパム	314.0935	1
フルラゼパム	388.1586	1
デスアルキルフルラゼパム	289.0538	1
(-)-δ-9-THC	315.2318	1
(±)-11-ヒドロキシ-δ-9-THC	331.2267	1
コカイン	304.1543	1
ベンゾイルエクゴニン	290.1386	5
ブプレノルフィン	468.3108	1
モルヒネ	286.1437	10
ノルモルヒネ	272.1281	10
メペリジン	248.1645	1
ノルメペリジン	234.1488	1
dl-メタドン	310.2165	1
EMPD	264.1746	1
ナロキソン	328.1543	5
オキシコドン	316.1543	20
LSD	324.207	1
Iso-LSD	324.207	1
(±)-塩酸フェニルプロパノールアミン	152.1069	1
塩酸フルオキセチン	310.1413	1
GHB	127.0365	20
(-)-ニコチン	163.1229	5
2-オキシ-3-ヒドロキシ-LSD	+veESI で検出できない	ND

体液中に含まれる依存性薬物の検出

尿は、雇用および職場でのスクリーニングなどの分野での依存性薬物の検出に選択されるマトリックスであるため、今回開発した LC/TOF MS メソッドの評価に採用しました。“最悪の事態”を避けるため、この分析には尿に何も添加せず、サンプルのクリーンアップを行わずに直接実施しました。この方法は通常は実施されませんが、クリーンアップを行わなくても本メソッドのスクリーニング結果を迅速に得られることを示すために行いました。

このような試料で考えられる固相抽出 (SPE) による試料調製メソッドの詳細については、Agilent Technologies のアプリケーションノート 5989-2260EN に記されています [4]。

第 1 の事例として、無添加尿および添加尿について、コカインおよびコカイン代謝物であるベンゾイルエクゴニンの両方をスキャンしました。添加サンプル (従来の EMIT 画面よりも低いレベルである 100 ng/mL) の回収率は 2 物質ともに、約 100% でした。

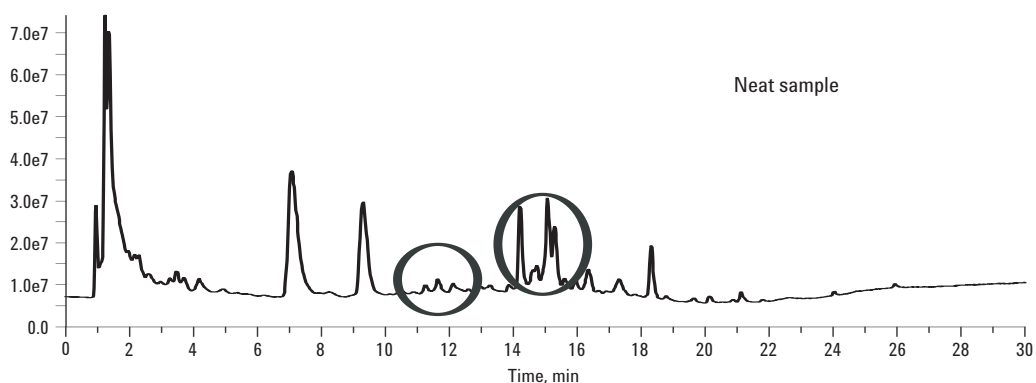


図 9 無添加尿の全イオンクロマトグラム (TIC)。円の部分は、測定対象化合物の予測リテンションタイムを示します。

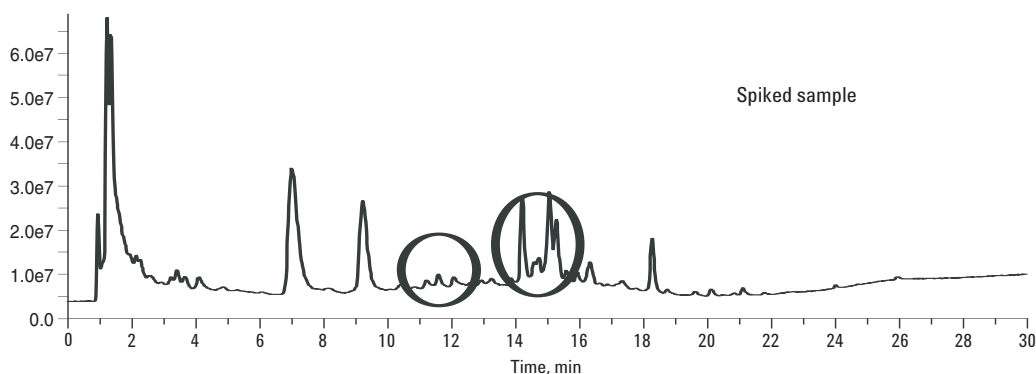


図 10 コカイン、ベンゾイルエクゴニン、フルニトラゼパム、および 7-アミノフルニトラゼパムを 100 ng/mL で添加した尿の全イオンクロマトグラム (TIC)

図 11 および図 12 より、質量抽出ウィンドウを狭めることができる、所与の質量におけるノイズを大幅に低減でき、さらにリテンションタイム情報により、化合物の同定に強い確信を持つことができます。

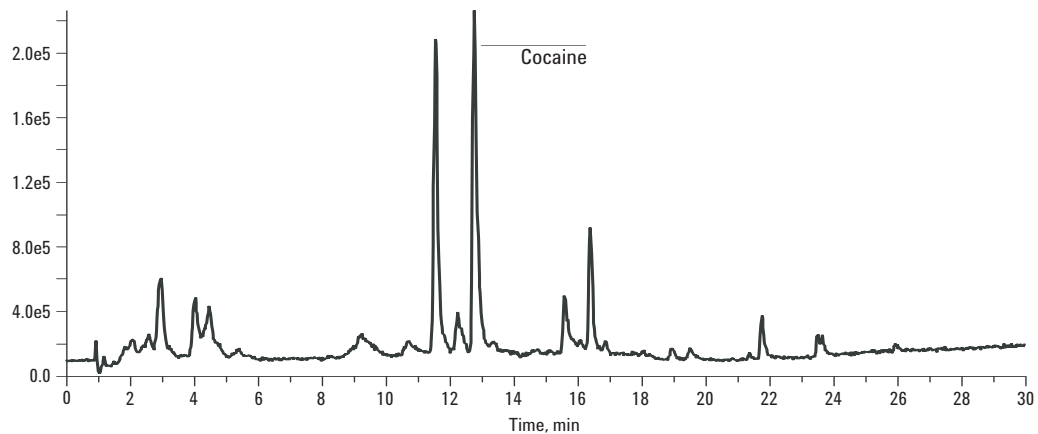


図 11 スキャンされたターゲット質量が 304.1543 であるコカインの 1 amu 抽出ウィンドウ

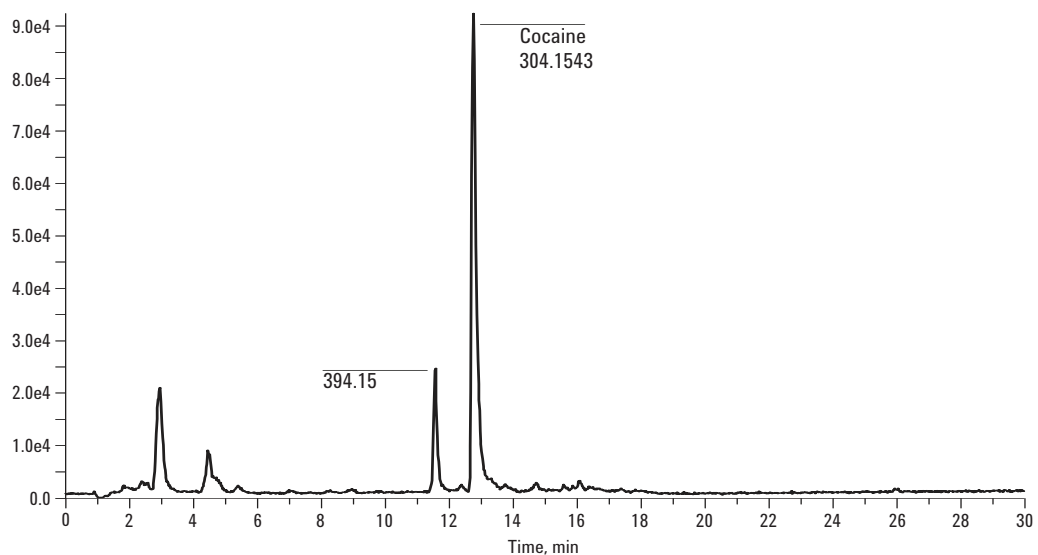


図 12 スキャンされたターゲット質量が 304.1543 であるコカインの 10 ppm 抽出ウィンドウ

図 12 の例では、約 12.9 min のより高いピークがコカインとの優れた一致 (質量誤差およそ0.2 ppm) を示します。その前にある 11.5 min のピークは、その抽出ウィンドウで 394.15 の質量と開裂生成物を持っています (図 13、図 14)。

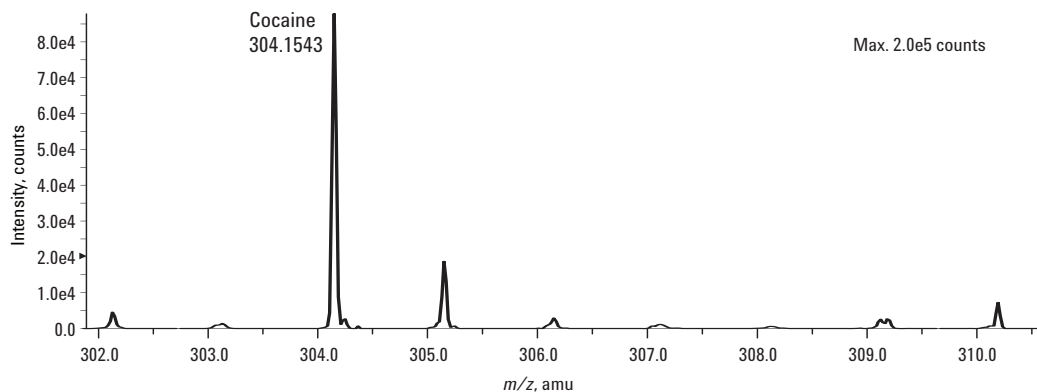


図 13 コカイン精密質量の確認

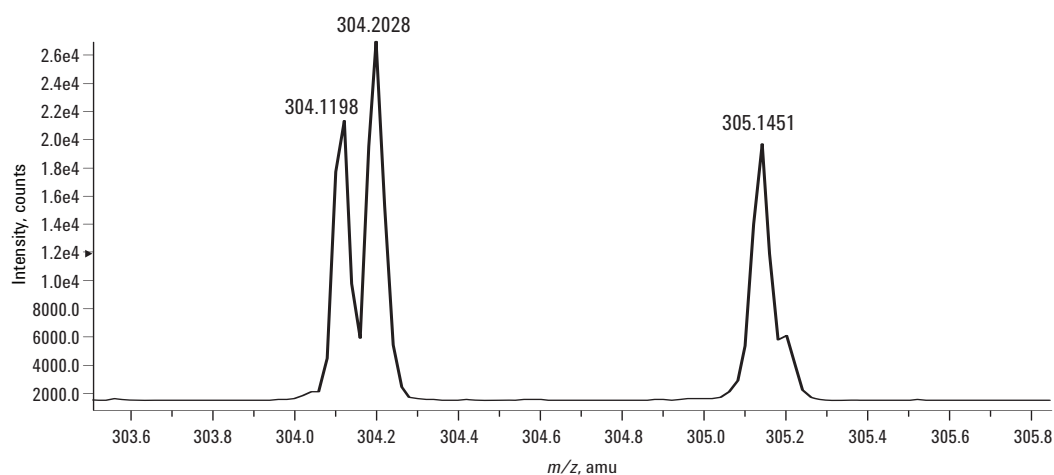


図 14 11.9 min におけるピークについてのマススペクトル 304~305 amu 抽出ウィンドウ。コカインの質量とは一致していません。

第2の対象薬物は、フルニトラゼパム（ロヒプノール：デートレイブ・ドラッグとして悪用される）およびその代謝物の1つである7-アミノフルニトラゼパムです。さらに、これらの化合物を100 ng/mLで無添加尿サンプルに添加して、直接注入しました。この2成分の回収率は約40%で、イオンソース内でのイオンサプレッションによる影響と思われます。しかしながら、最大で60%のイオンサプレッションがあるシグナルでも優れた検出限界での検出が可能のため、100 ng/mL (EMIT スクリーニング限度値よりもはるかに低い)においても、狭い質量ウィンドウで抽出した場合に両化合物ともに明瞭なピークが認められます (図15、図16)。

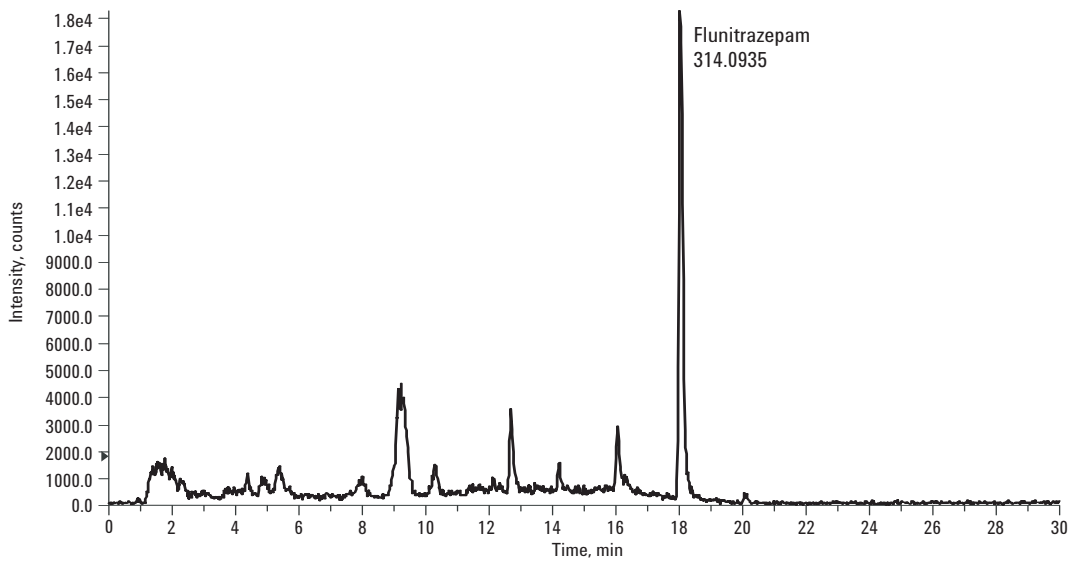


図15 スキャンしたターゲット質量が314.0935である無添加尿中フルニトラゼパムの10 ppm抽出ウィンドウ。リテンションタイムにより、18.1 minでの存在が考えられます。

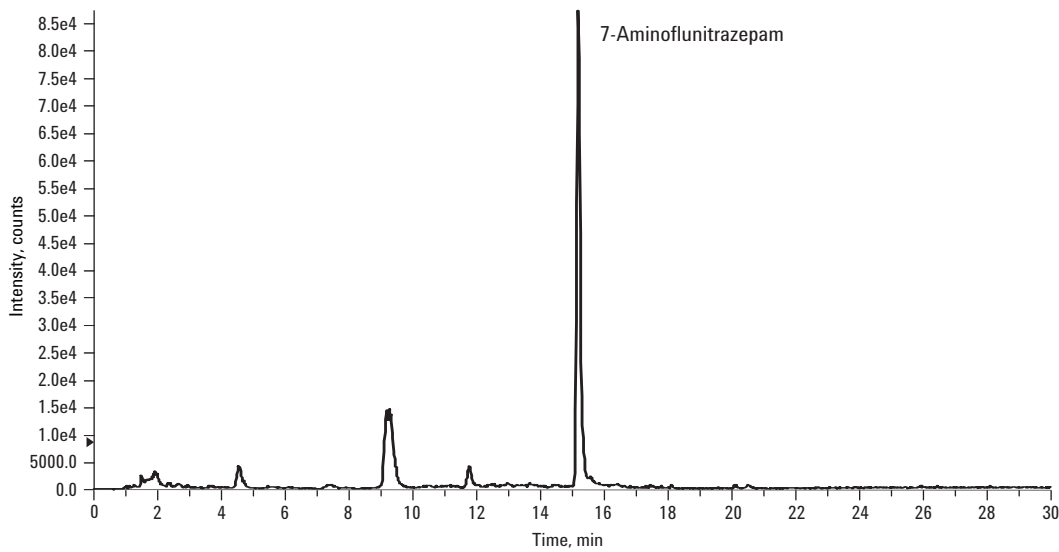


図16 スキャンしたターゲット質量が284.1191である無添加尿中7-アミノフルニトラゼパムの10 ppm抽出ウィンドウ。リテンションタイムにより、15.3 minでの存在が考えられます。

依存性薬物スクリーニングの一般的な試料マトリックスとして、2番目に血液と血漿をテストしました。血漿分析メソッドをテストするため、サンプルにデスアルキルフルラゼパムを添加しました。サンプルの調製は尿の場合と同様に最小限に抑え、注入前にサンプルに簡単なアセトニトリル沈降を実施するのみにしました。ピーク検出における質量抽出ウィンドウの効果、図 17~20 に示します。添加された血漿サンプルで干渉ピークが除かれていることがわかります。

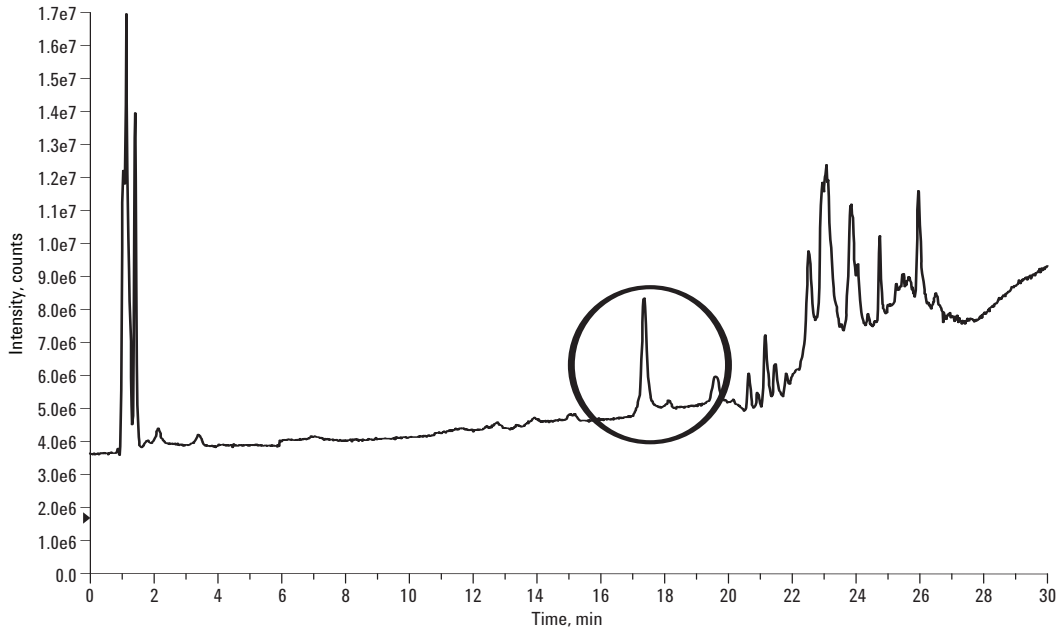


図 17 無添加血漿の全イオンクロマトグラム (TIC)

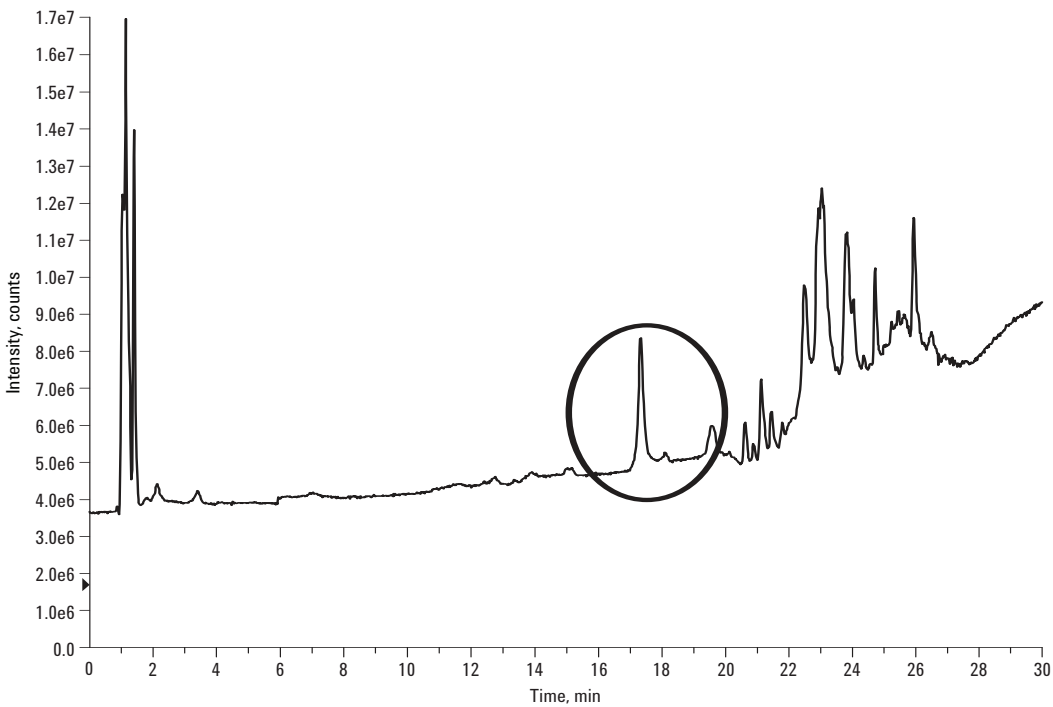


図 18 デスアルキルフルラゼパム 200 ng/mL を添加した血漿の全イオンクロマトグラム (TIC)

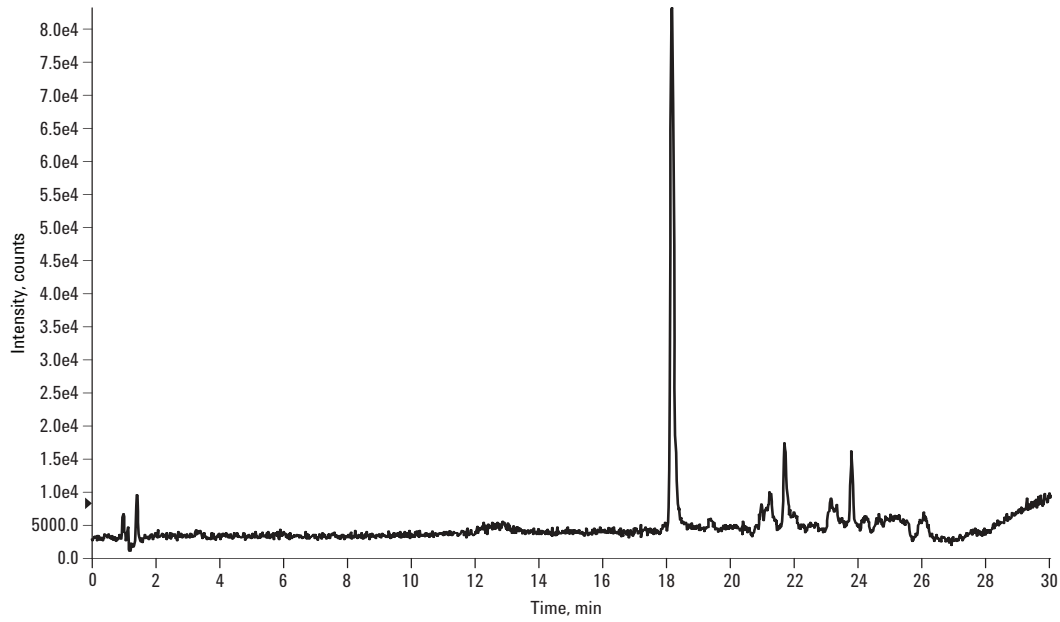


図 19 添加血漿サンプル の 0.1 amu 質量抽出ウィンドウ(346ppm 質量ウィンドウ)

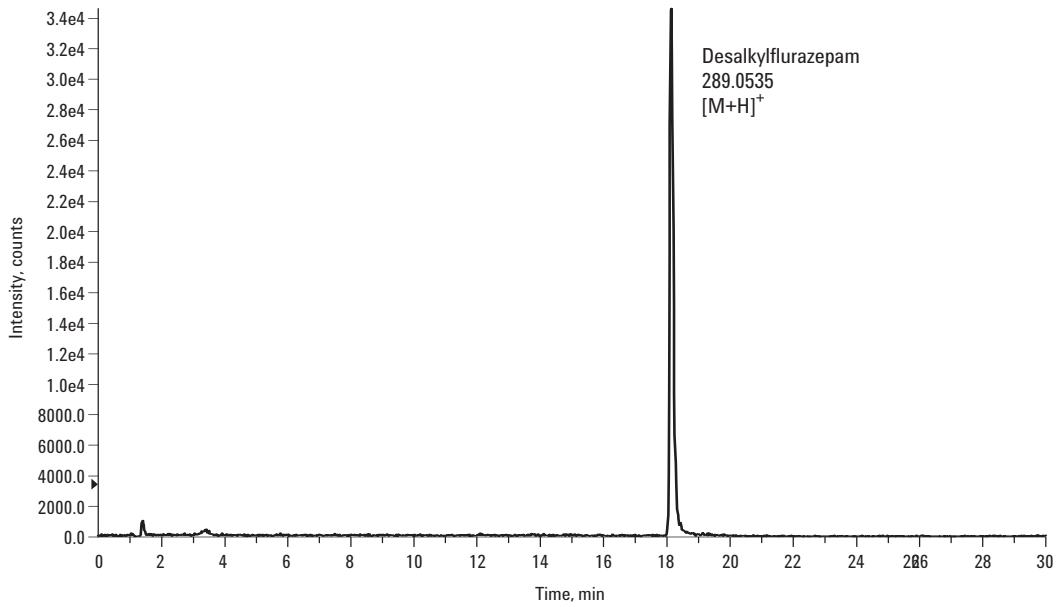


図 20 添加血漿サンプルの 10 ppm (0.003 amu) 質量抽出ウィンドウ。ノイズが極めて少なくなっています。

スクリーナーデータベースを使用する検死体サンプルの分析

本装置とソフトウェアでは、すべての対象化合物についてのスクリーナーデータベースを作成して、自動化スクリーニングを実行することができます。このデータベースに最低限必要なものは、対象とする化合物についての組成式と名前です。さらに、リテンションタイムも追加すると、同定はより確実なものになり、解析に要する時間も短縮できます。

幾つかのサンプルを地元の検死所から入手して、開発済みの手順をテストしました。これらのサンプルは、開発済みメソッドでのスクリーニング用に、死体から得られた血液サンプルの塩化ブチル抽出物として提供されています。

提供された検死体サンプルは、このメソッドで分析した48化合物から作成したデータベースを使用してスクリーニングしました。

サンプルの調製

サンプルは1 mLの血液から6~8 mL塩化ブチルで液液抽出した後、遠心分離しました。その有機層を蒸発乾固してから100 µL移動相で再溶解し、最終的に10倍に濃縮しています。

サンプル 1

サンプル 1 は、検死所での従来法の分析により、アンフェタミン、コデイン、ジアゼパム、ノルジアゼパムを含有していることが分かっています。今回のスクリーニングではこれら4種類の化合物に加えて、以下の化合物の存在を確認しました。

- ニコチン
- コチニン
- アセチルモルヒネ
- エフェドリン
- メタアンフェタミン
- プソイドエフェドリン

このサンプルの全イオンクロマトグラム (TIC) を図 21 に示します。

コチニンの詳細を示すスクリーニング結果の抜粋を図 22 に示します。スクリーニングの結果には、化合物データベース内の各化合物についての抽出イオンクロマトグラム、検出ピークのスペクトル、およびターゲット質量の拡大スペクトルが表示されます。さらには、質量とリテンションタイムの誤差の概略表も付きます。この事例では、質量とリテンションタイムはともに優れた一致を示しています。

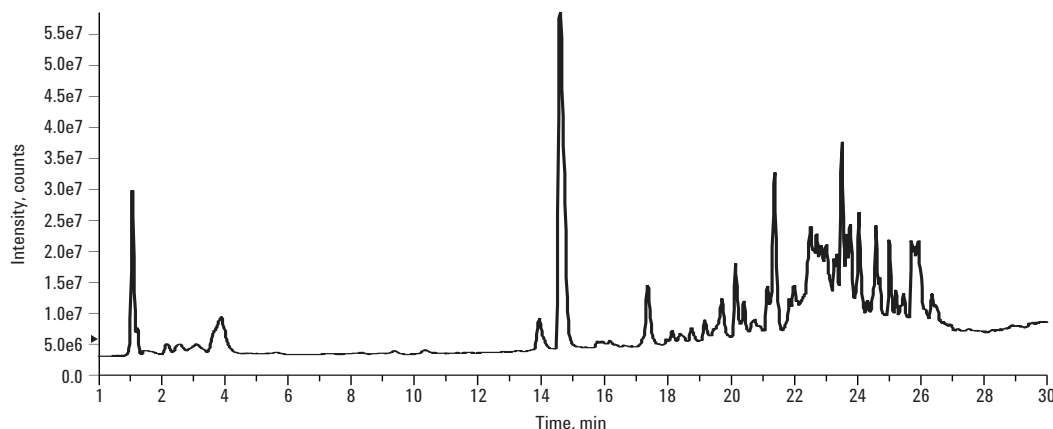
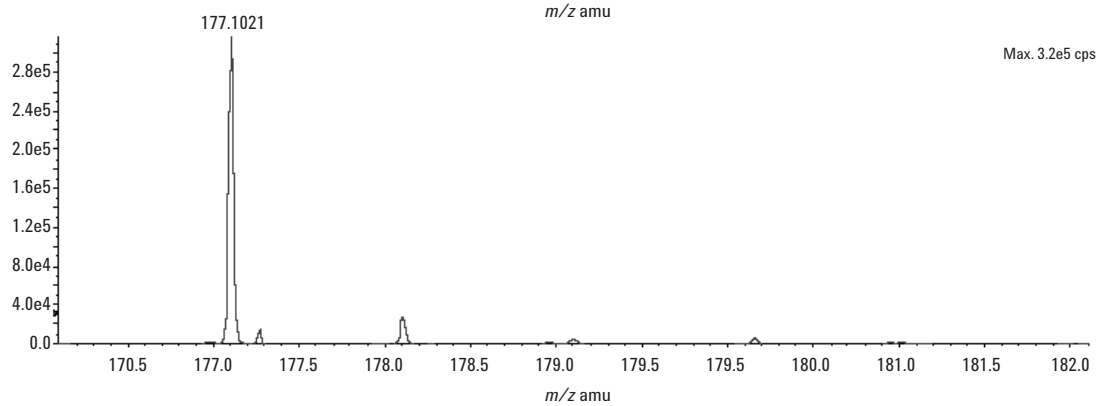
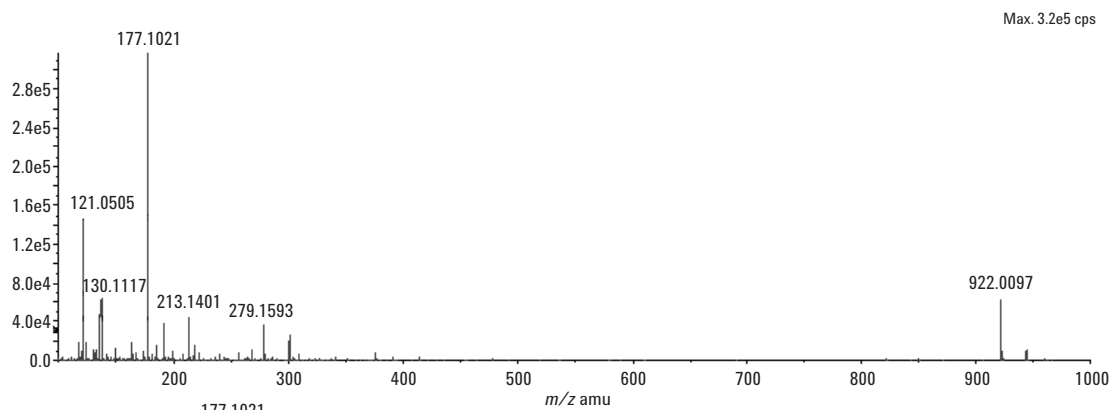
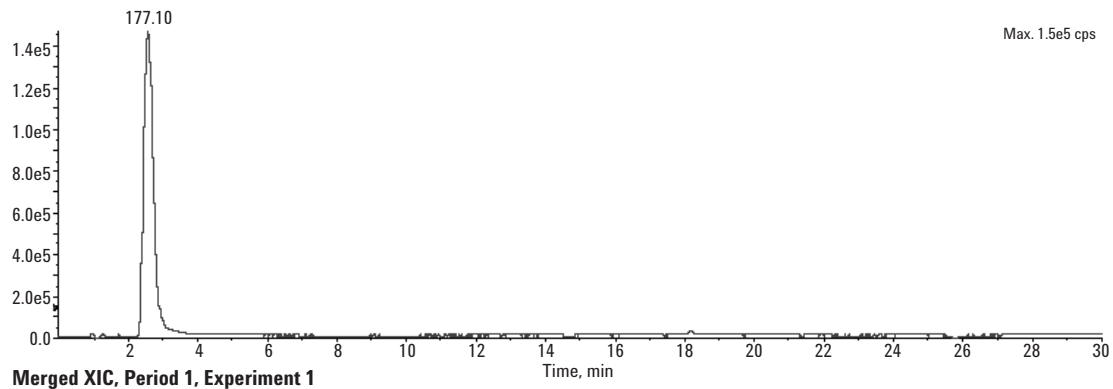


図 21 検死体サンプル 1 の全イオンクロマトグラム (TIC)



Formula	Compound name	Mass	Peak RT (min)	Peak area	Description	
$C_{10}H_{12}N_2O$	(-)-colinine	176.09496	2.57	2.78259 E7	-	
Species	Abundance (counts)	Ion mass	Measured mass	Error (mDa)	Error (ppm)	Ret. time error (min)
$[M + H]^+$	316885.14	177.10224	177.10215	-0.00009	-0.51	0.01

図 22 検死体サンプル 1 のスクリーナーレポートの抜粋。コチニンの存在確認が示されます。

サンプル 1 の分析結果では、サンプル中にニコチンとコチニンが存在していたことから検死体は喫煙者であることが分かります。

サンプル 2

サンプル 2 は、検死所での従来法の分析により、シタロプラム、コデイン、トラマドールを含有していることが分かっています。今回のデータベースによるスクリーニングではこれら 4 種類の化合物に加えて、以下の化合物の存在を確認しました。

- ジアゼパム
- 6-アセチルモルヒネ
- MDMA
- メタアンフェタミン
- コチニン
- メペリジン
- ニコチン

このサンプルの TIC を図 23 に示します。この事例でも、この患者が喫煙者であったことが推察されます。

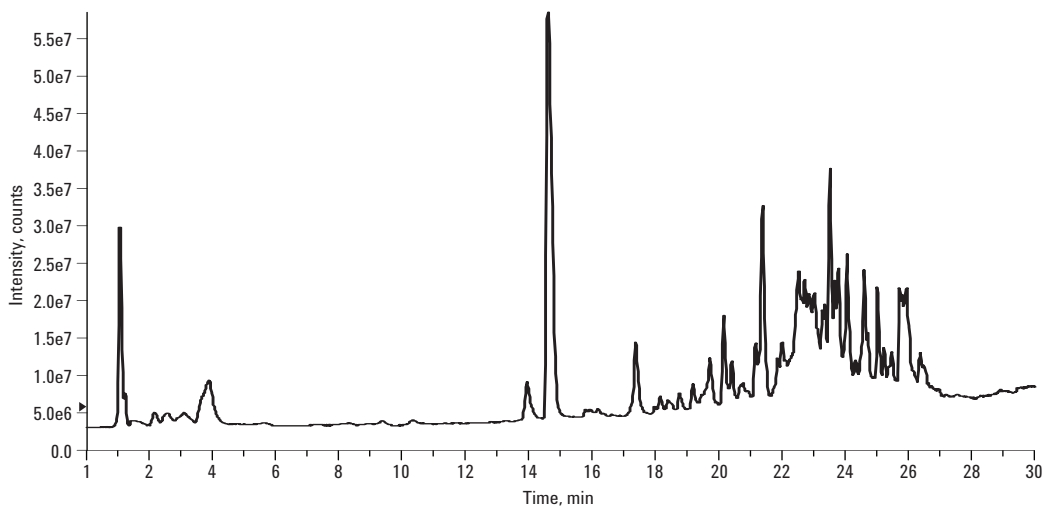
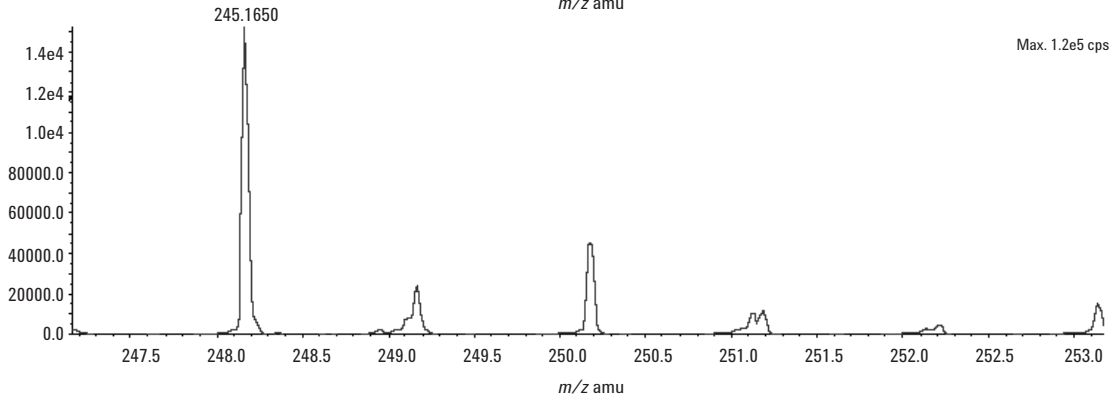
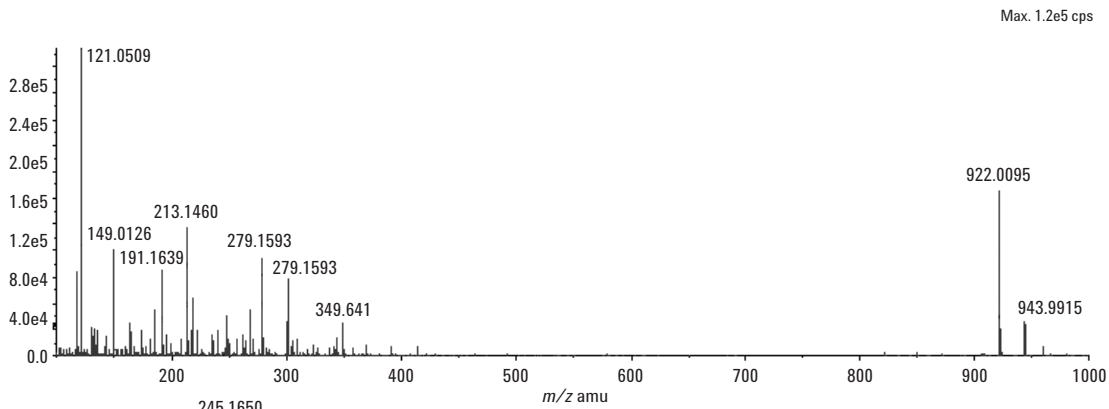
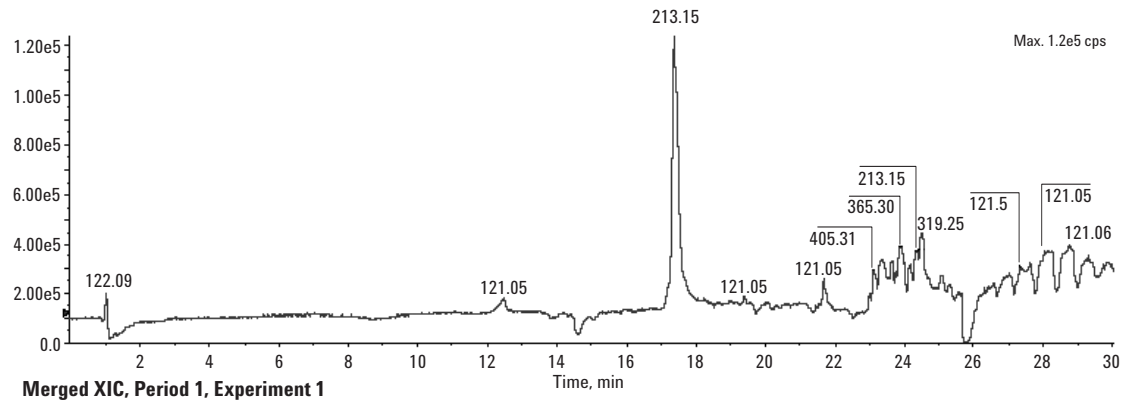


図 23 検死体サンプル 2 の全イオンクロマトグラム (TIC)

図 24 は、メペリジン確認事例としてのスクリーナーレポートの抜粋です。この場合も、リテンションタイムと質量はともに、優れた一致を示しています。



Formula	Compound name	Mass	Peak RT (min)	Peak area	Description	
C ₁₅ H ₂₁ NO ₂	Meperidine	247.15723	12.47	4.20401 E5	-	
Species	Abundance (counts)	Ion mass	Measured mass	Error (mDa)	Error (ppm)	Ret. time error (min)
[M + H] ⁺	15313.85	248.16451	248.16498	0.00047	1.90	0.07

図 24 メペリジンの存在を示すスクリーナーレポートの抜粋

結論

依存性薬物の分析は、法的取締りから薬剤投与モニタリングまで、現代社会における多くの分野で重要となっています。現行の分析技法では、2段階のスクリーニングと確認検査により、必要とされる化合物の特異的検出と基準感度を達成しています。このアプリケーションノートでは、一般的な 48 種類の依存性薬物について、それらの LC-TOF MS による測定の実用可能性を検討しました。本研究は、考えられるすべての化合物についての包括的な研究ではありませんが、あらゆる可能性を包括する足掛かりを提供することを意図したものです。

このアプリケーションノートでは、スクリーニング分析と確認分析の両方に使用できる 1 つのツールとして Agilent 液体クロマトグラフ飛行時間型マスマスペクトロメータ (LC-TOF-MS) の可能性を記述しています。また、現行の分析技法ではしばしば感度が不足している定量情報ツールとしても使用されます。さらに、実際の検死体サンプルをスクリーニングプロトコルにより評価して、検死所で検出される従来の化合物以外にも 7 種類の化合物が検出されました。

参考文献

1. Executive Office of the President – Office of National Drug Control Policy “Pulse Check – Drug Markets and Chronic Users in 25 of Americas Largest Cities” January 2004.
2. Kolbjorn Zahlse, Trond Aamo, and Jerry Zweigenbaum, 「LC/MSによる濫用薬物のスクリーニング」, Agilent Technologies, publication 5989-1541JAJP www.agilent.com/chem
3. Kolbjorn Zahlse, Trond Aamo, and Jerry Zweigenbaum, “Therapeutic Drug Monitoring by LC/MSD – Clozapine, an example”, Agilent Technologies, publication 5989-1267EN www.agilent.com/chem
4. Jerry Zweigenbaum, 「LC/MSD TOF精密質量分析を用いた尿中麻酔薬成分の定量」, Agilent Technologies, publication 5989-2206JAJP www.agilent.com/chem

詳細情報

弊社製品とサービスについて更に詳しい情報をご希望のお客様は弊社Webサイト (www.agilent.com/chem/jp) をご覧ください。

お問い合わせは： 0120-477-111
横河アナリティカルシステムズ株式会社
〒192-0033 東京都八王子市高倉町9-1

Agilent は、万一この資料に誤りが発見されたとしても、また、本資料の使用により付随的または間接的に損害が発生する事態が発生したとしても一切免責とさせていただきます。

本資料に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

© Agilent Technologies, Inc. 2005

Printed in Japan
July 28, 2005
5989-3157JAJP