

サーマルセパレーションプローブと 5975T LTM GC/MS を用いた 血液サンプル中乱用薬物の 高速検出メソッド

アプリケーションノート

法医学

著者

Suli Zhao
Agilent Technologies, Inc.
Shanghai
China
Runsheng Zhang
Institute of Forensic Science
Municipal Public Security Bureau,
Shanghai
China

概要

可搬型 Agilent 5975T LTM GC/MS で革新的なサーマルセパレーションプローブ (TSP) サンプル導入テクニックを用いて、全血中薬物を検出する新たな高速定性メソッドを開発しました。サンプル精製は不要で、デコンボリューションレポート作成ソフトウェア (DRS) を用いてデータ処理を能率化しました。分析した薬物のうち熱的に安定な 56 種類については、94 % 以上でメソッド検出下限は 5 ng/ μ L でした。

はじめに

乱用薬物に関する臨床および法医学上の疑問点は、尿サンプルの分析に加えて血液サンプルでも定量測定をおこなえば、より効率的に解消することができます。しかし、死体血中の乱用薬物の検出および定量には、常に難しい問題が伴います。これは、血液マトリックスが複雑で、調べなければならない薬物の範囲が広いからです。スクリーニングすべきターゲット化合物の数は、数百種類にものぼります。さいわい、ほとんどの薬物とその代謝物は、GC/MS で分析できる構造をもっており、GC/MS スペクトルによる乱用薬物の同定結果は、法廷での証拠として認められています。



Agilent Technologies

このアプリケーションノートでは、TSP と Agilent 5975T LTM GC/MS を用いて、63 種類の全血中乱用薬物を定性的に検出する高速かつ低コストのメソッドを紹介します。サンプル前処理は不要で、血液の不揮発性成分は、薬物化合物の揮発後に TSP マイクロバイアル内にとどまります。簡単な抽出手順により時間が短縮され、コストが削減されるだけでなく、人の手によるミスも低減されます。また、GC の低熱容量 (LTM) 技術により、きわめて効率的にカラムを加熱冷却して分析時間を短縮できるため、従来のエアバス GC オープンよりも分析サイクル時間が大幅に短くなります。

実験手法

試薬と標準

すべての試薬は、分析または HPLC グレードを使用しました。薬物スタンダードを上海市公安局 (中国) から入手しました。このスタンダードを 0.1~40 ng/μL の濃度で全血に添加し、各薬物におけるメソッドの感度を調べました。

使用機器

このメソッドは、スプリット/スプリットレス注入口と TSP を用いて、Agilent 5975T LTM GC/MS システムで開発しました。使用した機器条件を表 1 に示しています。

データ解析

化合物同定には、GC/MS 用 Agilent デコンボリューションレポート作成ソフトウェア (DRS) を使用しました。Agilent MSD Productivity ChemStation、NIST 自動質量スペクトルデコンボリューションおよび同定ソフトウェア (AMDIS)、NIST 2008 質量スペクトル検索プログラム (NIST08) で得られた結果も併せて使用しました。

サンプル

血液サンプルは上海市公安局から入手しました。

サンプル前処理

TSP マイクロバイアルに容量の半分以下の無水 Na₂SO₄ を入れ、そこに薬物添加血液サンプルと薬物濃度がきわめて高いと予想される薬物乱用者の全血 3~5 μL を Na₂SO₄ に直接スポッティングしました。

表 1. GC/MS 分析条件

| GC 分析条件 | |
|---------------|--|
| ガードカラム | 1 m カラム、分析カラムと同じ相、インジェクタに接続 |
| 分析カラム | Agilent HP-5ms LTM 10 m × 0.18 mm、0.18 μm、カスタム p/n 100-2000LTM として注文 |
| 注入量 | 1 μL |
| 注入口温度 | 280 °C 一定 |
| 注入モード | スプリット、10:1 |
| LTM 温度グラジエント | 90 °C で 12 秒保持 60 °C/min で 90 °C~320 °C、 320 °C で 2.75 分保持 |
| アイソサーマルオープン温度 | 280 °C |
| キャリアガス | ヘリウム |
| トランスファーライン温度 | 280 °C |
| MS 条件 | |
| イオン源温度 | 230 °C |
| 四重極温度 | 150 °C |
| イオン化 | EI モード |
| スキャンモード | フルスキャン、m/z 30~500 |
| EMV モード | ゲインファクター |
| ゲインファクター | 5.00 |
| EM 電圧 | 1129 V |
| ソルベントディレイ | 0.5 分 |

結果と考察

高速メソッド選択

Agilent GC MXLATOR メソッド変換ソフトウェアツールを用いて、薬毒物用 Agilent デコンボリューションレポート作成ソフトウェア (DRS) ソリューション (文書 G1674-90000 参照) と Agilent HP-5ms LTM 10 m × 0.18 mm、0.18 μm カラムを用いて得られたメソッドを高速化するための分析条件を特定しました。変換後のメソッドでは、オリジナルメソッドでは 28 分以上かかっていた分析時間が 6.5 分に短縮されました。分離能も、30 メートルの標準カラムを使ったメソッドに比べて、大きくは損なわれませんでした。表 2 に記載の薬物について、良好なピーク形状が得られ、ピークディスクリミネーションは生じませんでした (図 1)。LTM カラムモジュールの使用は、分離時間を短くするためのポイントです。最高 1200 °C/min までの高速温度プログラミングレートを設定できます。また、リテンションタイムの再現性は従来の GC と同等です。

表 2. 図 1 の高速メソッドを用いて分析した薬物

| リテンションタイム (分) | 薬物 |
|---------------|---|
| 1.8765 | バルビタール |
| 2.3049 | アモバルビタール |
| 2.4384 | セコバルビタール |
| 3.1265 | コカイン |
| 3.2050 | 1-ピペリジンプロパノール、 α-シクロフェニル-α-フェニル- プロメタジン |
| 3.2407 | |
| 3.2788 | SKF525 |
| 3.3232 | オキサゼパム |
| 3.4365 | ロラゼパム |
| 3.4782 | ジアゼパム |
| 3.563 | クロルプロマジン |
| 3.5645 | クロルプロチキセン |
| 3.5950 | クロルジアゼポキシド |
| 3.9862 | パパベリン |
| 4.024 | クロザピン |
| 4.0243 | クロナゼパム |
| 4.0971 | エスタゾラム |

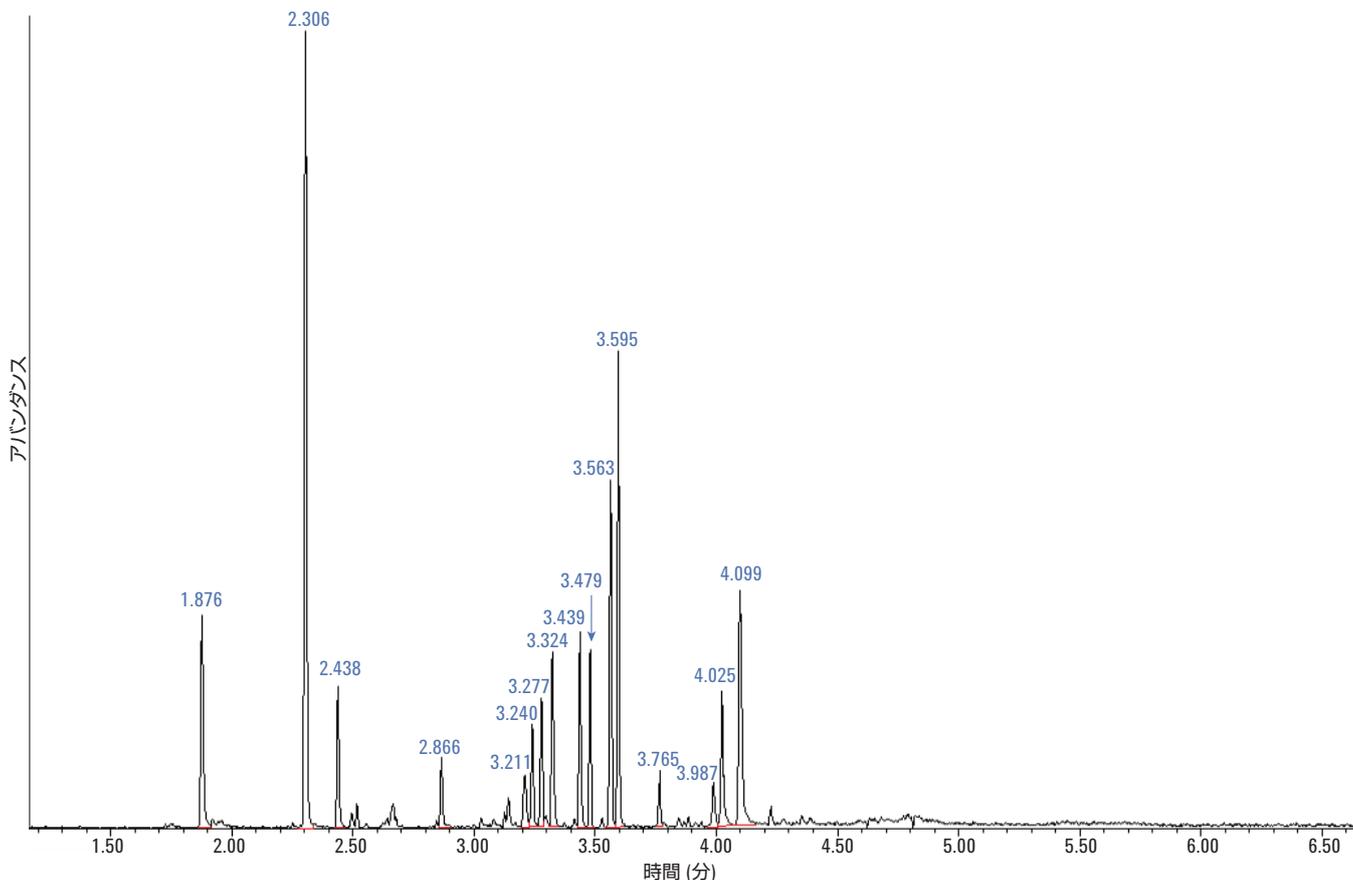


図 1. TSP を用いた新高速メソッドで分析した薬物スタンダード添加溶液のトータルイオンクロマトグラム (TIC)

全血中薬物の検出

過剰摂取により死亡した被験者から得たサンプル 3 μ L を用いて、メソッドをテストしました (図 2)。ベースラインは低く、温度プログラムの後半でもきわめて滑らかでした。このことは、このメソッドにより、血液中の揮発性成分が完全に溶出することを示しています。サンプル中、もっとも大きなピークはコレステロールで、別の目立って大きなピークは、おもに長鎖脂肪酸です。乱用薬物は、これらの大きなピークに隠されています。DRS と NIST AMDIS により、このサンプル中の乱用薬物を正確に同定できました。図 3 は、クロルプロマジンのデコンボリューション結果を示しています。

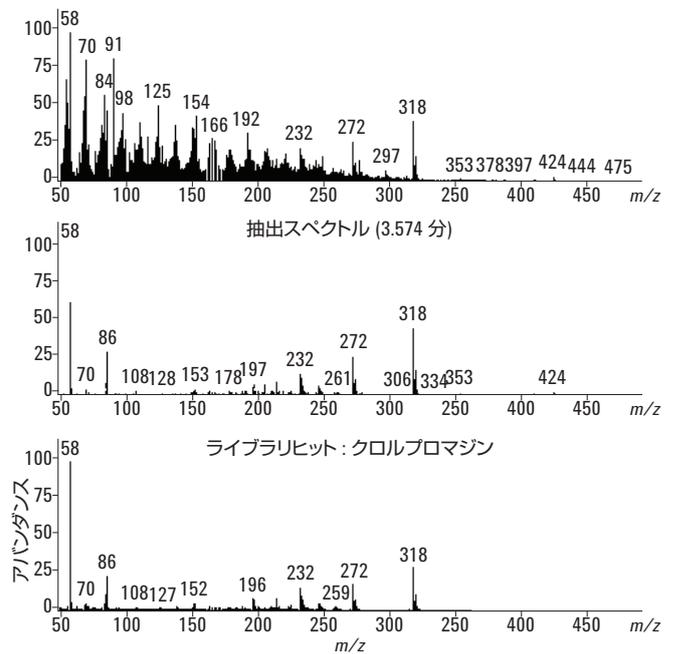


図 3. 3.574 分のピークのデコンボリューションと、クロルプロマジンの同定。上段のスペクトルはリテンションタイム 3.574 分のサンプルスペクトル、中段のスペクトルは DRS によるデコンボリューション後のサンプルスペクトル、下段のスペクトルは、クロルプロマジンの NIST ライブラリスペクトルであり、クロルプロマジン陽性を示しています。

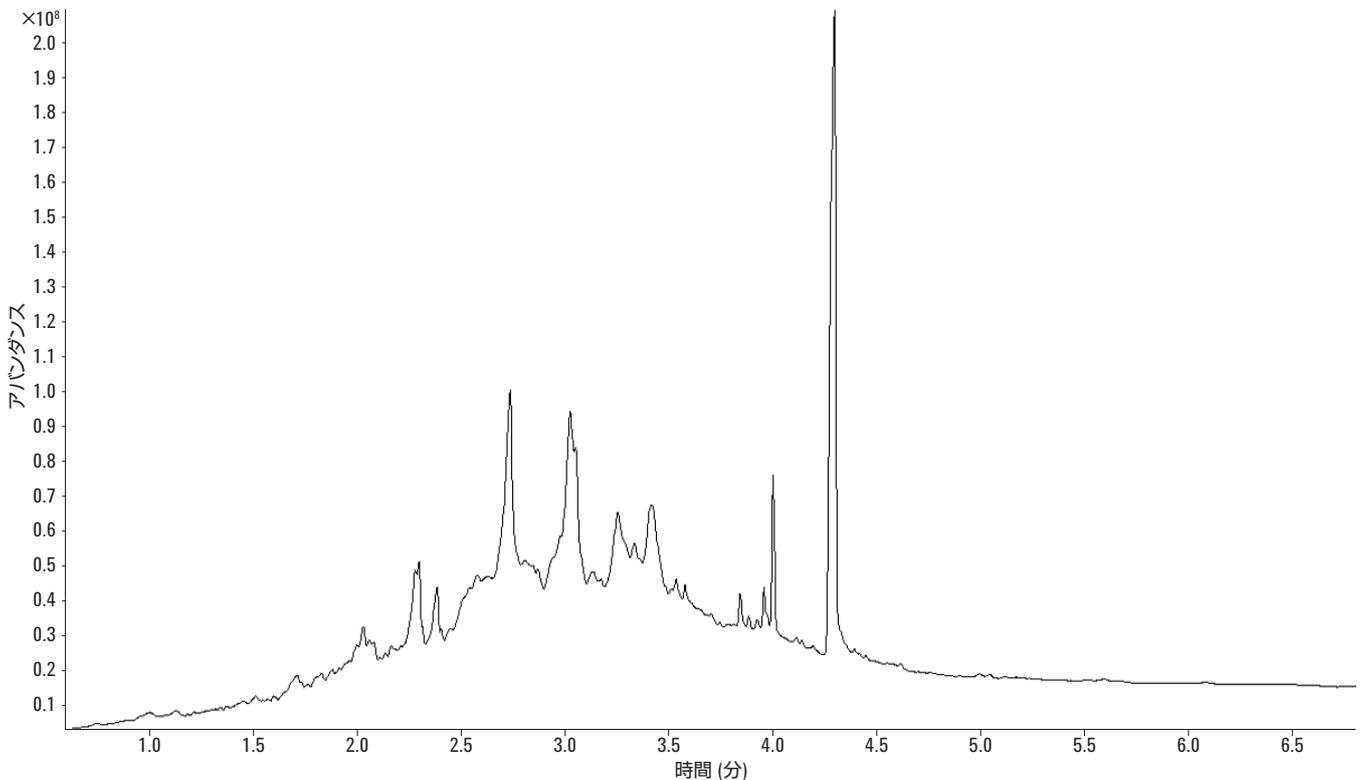


図 2. 過剰摂取被験者から得た血液サンプルの TIC クロマトグラム

メソッド確認

63種類の薬物(表3)をターゲットとして選択し、メソッドの検出下限を調べました。各薬物を0.1、0.5、1.0、5.0、20.0、40.0 ng/μLで全血に添加し、分析しました。DRSライブラリを用いて、ターゲットを確認しました。この結果から、イソ-LSD、メラトニン、2C-B、アミノレックス、ペルフェナジンなどの一部の薬物は分解しやすいことがわかりました(図4)。これらの薬物のターゲットピークはきわめて弱く、目立ったテーリングが見られました。

また、分解を示す多くの小さなピークも見られました。これらの化合物については、ターゲットを確認するには、高濃度(≥ 20 ng/μL)が必要でした。2つの化合物(ペモリンとベンゾイルエクゴニン)は著しく分解し、どちらについてもターゲットピークが見られませんでした。しかし、80%を超える化合物が、濃度5 ng/μLでこのメソッドにより確認できました。この濃度を、メソッド検出下限(MDL)として設定しました。

表3. 高速メソッドを用いて同定された63種類の全血中薬物のメソッド検出下限

| 化合物名 | 0.1 ng/μL | 0.5 ng/μL | 1 ng/μL | 5 ng/μL | 20 ng/μL | 40 ng/μL |
|----------------------|-----------|-----------|---------|---------|----------|----------|
| コデイン | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 |
| モルヒネ | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 |
| リドカイン | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 |
| アミトリプチン | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 |
| イミプラミン | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 |
| クロルプロマジン | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 |
| クロザピン | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 |
| エスタゾラム | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 |
| ドキセピン | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 |
| アプロバルピタール | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 |
| トリフルオペラジン | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 |
| ミダゾラム | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 |
| クロルジアゼポキシド | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 |
| フェンフルラミン | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 |
| フェニルプロパノールアミン | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 |
| イブプロフェン | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 |
| ナブシル酸デキストロプロポキシフェン | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 |
| イソ-LSD | 白 | 白 | 白 | 白 | 白 | 白 |
| ペモリン | 白 | 白 | 白 | 白 | 白 | 白 |
| プロパフェノン | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 |
| 硫酸アンフェタミン | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 |
| エクゴニンメチルエステル | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 |
| 3,4-メチレンジオキシ-アンフェタミン | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 |
| ケタミン | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 |
| ブプレノルフィン | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 |
| メタドン | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 |
| フェンタニル | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 |
| カフェイン | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 |
| トラマドール | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 |
| フルニトラゼパム | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 |
| フルラゼパム | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 |
| カルバマゼピン | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 |
| ジヒドロコデイン | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 |
| アミノレックス | 白 | 白 | 白 | 白 | 白 | 白 |
| ノルコカイン | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 |
| プラゼパム | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 |
| フェニラミン | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 | 緑 |

緑の部分は、表示の濃度で陽性と同定できた薬物を示しています。

表 3. 高速メソッドを用いて同定された 63 種類の全血中薬物のメソッド検出下限 (続き)

| 化合物名 | 0.1 ng/μL | 0.5 ng/μL | 1 ng/μL | 5 ng/μL | 20 ng/μL | 40 ng/μL |
|--------------|-----------|-----------|---------|---------|----------|----------|
| 塩酸ロフェキシジン | | | | | | |
| ジフェニルヒドラミン | | | | | | |
| メラトニン | | | | | | |
| メスカリン | | | | | | |
| ベンゾイルエクゴニン | | | | | | |
| エクゴニンエチルエステル | | | | | | |
| ノルケタミン | | | | | | |
| ヒドロコドン | | | | | | |
| ロラゼパム | | | | | | |
| 2C-B | | | | | | |
| PCP | | | | | | |
| フェノバルビタール | | | | | | |
| アモバルビタール | | | | | | |
| バルビタール | | | | | | |
| セコバルビタール | | | | | | |
| アルプラゾラム | | | | | | |
| メタンフェタミン | | | | | | |
| ペルフェナジン | | | | | | |
| ニトラゼパム | | | | | | |
| ロラゼパム | | | | | | |
| ノスカピン | | | | | | |
| ジアゼパム | | | | | | |
| オキサゼパム | | | | | | |
| エスタゾラム | | | | | | |
| MDMA | | | | | | |
| トリアゾラム | | | | | | |

緑の部分は、表示の濃度で陽性と同定できた薬物を示しています。

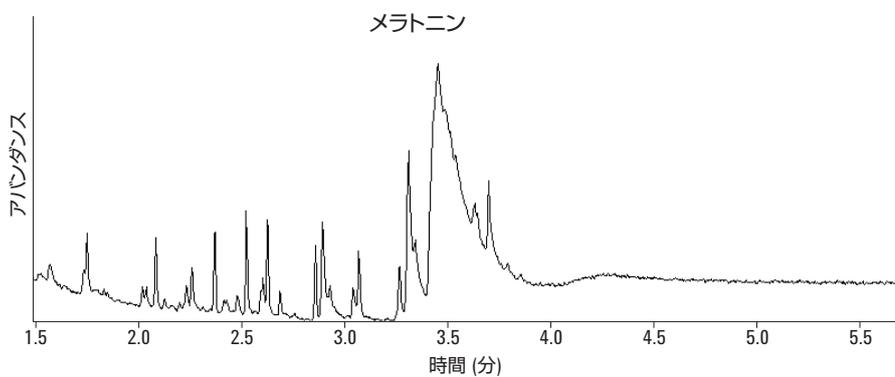


図 4. 薬物の著しい分解を示す濃度 1,000 µg/mL のメラトニンの TIC クロマトグラム

結論

可搬型 Agilent 5975T LTM GC/MS の LTM 技術と TSP サンプル導入テクニックを用いて、全血中薬物を検出する革新的な高速定性メソッドを開発しました。このメソッドでは、時間と費用がかかるうえに、遠隔地での実行が難しく、エラーの原因になる手動でのサンプル精製が不要です。DRS ソフトウェアを使えば、複雑な全血マトリックス中でデコンボリューションと同定が可能になるため、サンプル前処理を省くことができます。分析した 63 種類の薬物のうち、56 種類は熱による影響を受けず、94 % で 5 ng/µL というメソッド検出下限が得られました。

詳細情報

本書に記載したデータは代表的なものです。アジレント製品とサービスの詳細については、アジレントのウェブサイト www.agilent.com/chem/jp をご覧ください。

www.agilent.com/chem/jp

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。

本文書に記載の情報、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。著作権法で許されている場合を除き、書面による事前の許可なく、本文書を複製、翻案、翻訳することは禁じられています。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc., 2012

Printed in Japan

April 17, 2012

5991-0333JAJP



Agilent Technologies