

生体サンプル中の γ -ヒドロキシ酪酸 (GHB) の測定

アプリケーションノート

法医学/毒物学

著者

Joe Crifasi
Saint Louis University Forensic
Toxicology Laboratory
Saint Louis, MO, USA

Ron Honnold
Agilent Technologies, Inc.
Santa Clara, CA, USA

Robert Kubas
Agilent Technologies, Inc.
Wood Dale, IL, USA

概要

EI-MS を用いた Agilent 220 イオントラップ GC/MS をベースに、生体サンプル中の GHB の同定および定量メソッドを開発しました。10~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ という分析範囲が、GHB の直線性を示しています。GHB の分析では、サンプルマトリックス干渉の低減、シグナル/ノイズ比の向上、および優れた感度と選択性という点で、イオントラップ GC/MS により多くの利点が得られます。



Agilent Technologies

はじめに

γ -ヒドロキシ酪酸 (GHB) は、ほとんどの哺乳類組織にナノモル濃度で存在する内因性代謝物です。過去には、スポーツショップや健康食品店で不法に販売され、筋肉増強のためのステロイドや、体重管理および鎮静のためのトリプトファンの代替品として売り込まれていました。GHB を違法に使用する場合、しばしば水に溶解させて経口摂取する方法が用いられます。GHB は 1,4-ブタンジオールの代謝副生成物で、1,4-ブタンジオールはある種のプラスチックや繊維の製造において溶媒として用いられています。また、娯楽目的の麻薬としても使われます。

このアプリケーションノートでは、血清、全血、硝子体液、尿、組織ホモジネートといった検体中の GHB を分析するメソッドを紹介します。分析に必要なサンプルの最少量は 0.5 mL です。

タンパク質沈殿を用いて、生体サンプルから GHB を抽出しました。その後、乾燥させた抽出物を BSTFA により誘導体化してから、GC/MS で分析しました。GHB および内部標準 GHB d-6 に特有なイオンの質量を含む狭い範囲をスキャンして MS データを採取しました。

実験手法

標準と試薬

試薬

アセトニトリル、メタノール – 試薬グレード。BSTFA (United Chemical Technologies)。

標準

GHB (G-001) および内部標準 GHB d-6 (G-006) を Cerilliant から購入しました。

4-ヒドロキシ酪酸、ナトリウム塩を Sigma Chemical (H-3635) から購入しました。

分析用標準は調製、または購入時のまま使用しました。GHB-1mg/mL、GHB d-6 -25 μ g/mL (標準原液 1 mL をアセトニトリル 40 mL と混合)、GHB QC -1 mg/mL (GHB ナトリウム塩 12.2 mg (Sigma) をメタノールに添加) (総体積 10 mL)。

2~8 °C で保管、2 年間安定。

コントロール試料

陰性コントロール - 薬物の含まれないパック入り赤血球を米国赤十字から入手し、生理食塩水 (0.9 %) で 1:1 に希釈しました。-20 °C で保管、1 年間安定。

低濃度コントロール - (20 μ g/mL) 16 \times 100 mm 培養試験管中で分析用 GHB QC 標準 20 μ L をブランク血液 980 μ L に添加しました。

高濃度コントロール 1 - (80 μ g/mL) 16 \times 100 mm 培養試験管中で分析用 GHB QC 標準 80 μ L をブランク血液 920 μ L に添加しました。

高濃度コントロール 2 - (150 μ g/mL) 16 \times 100 mm 培養試験管中で分析用 GHB QC 標準 150 μ L をブランク血液 850 μ L に添加しました。

サンプル前処理およびキャリブレーション用標準

16 \times 100 mm 培養試験管中で標準溶液と薬物の含まれていない血液を用いて以下のキャリブレーション用標準を調製し、検量線を作成しました。

- 10 μ g/mL - 10 μ L 標準と薬物の含まれない血液 990 μ L を混合
- 25 μ g/mL - 25 μ L 標準と薬物の含まれない血液 975 μ L を混合
- 50 μ g/mL - 50 μ L 標準と薬物の含まれない血液 950 μ L を混合
- 100 μ g/mL - 100 μ L 標準と薬物の含まれない血液 900 μ L を混合
- 200 μ g/mL - 200 μ L 標準と薬物の含まれない血液 800 μ L を混合

ピペットを用いて、標準、サンプル、陰性コントロール、陽性コントロール 20 μ L を、ラベルを貼った 1.5-mL 遠心分離管に入れます。分析用内部標準 100 μ L を加えます。ふたをしてボルテックスします (約 15 秒)。微量遠心機を用いて、3,000 rpm で 10 分以上遠心分離します。上澄みを清潔な 16 \times 100 mm 使い捨て培養試験管に移し、窒素を用いて 70 °C で乾燥させます。1 % TMS を含む BSTFA 100 μ L を乾燥した各抽出物に加えます。ふたをしてボルテックスします。70 °C で 20 分インキュベーションします。BSTFA 混合液をインサート付きオートサンプリャルに移し、ふたをして、GC/MS で分析します。

イオントラップ GC/MS 分析

GC 条件

カラム	DB-5MS または同等の 25 m × 0.2 mm、0.33 μm
注入量	1 μL
注入モード	スプリットレス
注入温度	250 °C
キャリアガス	ヘリウム
カラム流速	1.2 mL/min.
オープンプログラム	60 °C、1 分保持 10 °C/min で 60~200 °C、 200 °C/min で 200~280 °C、1 分保持

イオントラップ MS 条件

チューン	オートチューン
データ取得	EI-スキャン 200~250 da
溶媒ディレイ	7.0 分
MS 温度	トラップ 210 °C、マニフォールド 50 °C、 トランスファーライン 310 °C
ターゲット	5,000
フィラメント電流	5 μA

化合物	Rt (分)	定量イオン	クオリファイア
GHB	9.38	233	234/204
GHB d-6	9.33	239	240/206

結果と考察

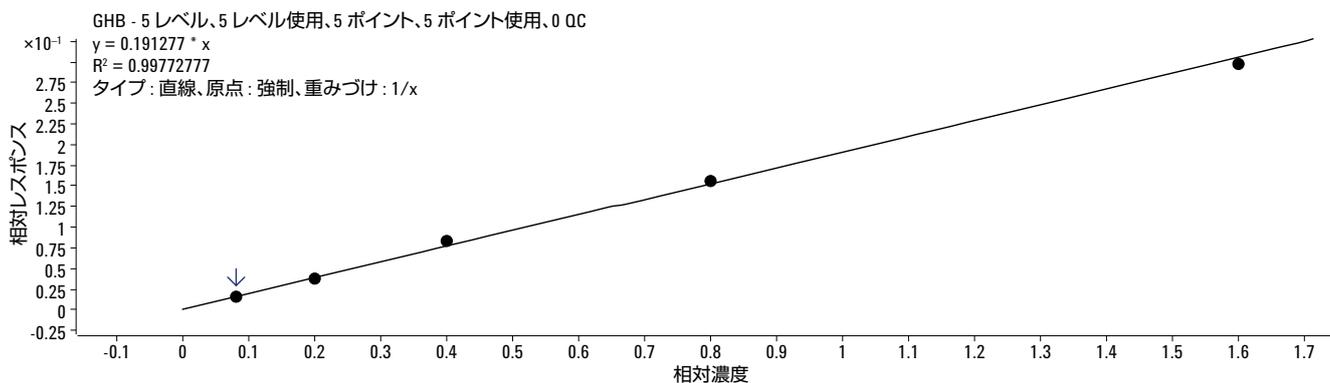
以下の基準を用いて、GHB の有無と存在量を測定しました。

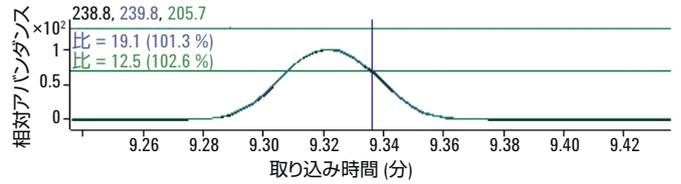
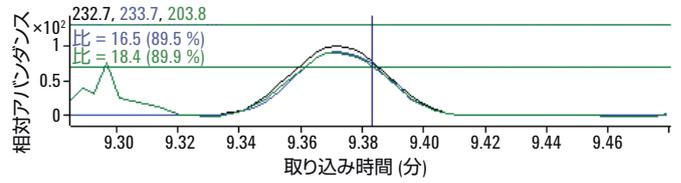
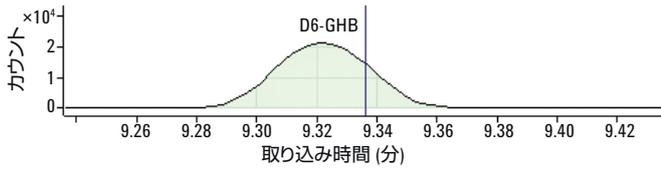
- クロマトグラフィーが許容範囲内であること (ピーク分離能、ピーク対称性、キャリアオーバーがないこと)。定量および定性に選択したイオンが存在すること。イオン比がキャリブレーションから得られたターゲット値の 20 % 以内であること。検体から想定される GHB のリテンションタイムが、直近のキャリブレーションにおけるリテンションタイムの ± 2 % であること。
- 定量分析には、GHB および内部標準の定量イオンの面積を使用。定量にあたっては、各キャリブレーション標準濃度の相対レスポンスから得られた検量線を用いて、未知物質およびコントロールの相対レスポンスを比較しました。陽性コントロールはターゲット範囲内であればならず、陰性コントロールについては GHB が存在しない必要があります。

メソッド限界

直線性	10~200 μg/mL
検出下限 (LOD)	5 μg/mL
定量下限 (LOQ)	10 μg/mL
キャリアオーバー	濃度 200 μg/mL 測定後はキャリアオーバーは観察されず
干渉	陰性であることが判明しているサンプルの血液および尿を無作為に分析した際には、干渉は観察されず

GHB キャリブレーション





低濃度キャリブレーション標準-10 µg/mL

Sample						GHB Method		GHB Results						Qualifier		D6-GHB (ISTD)		Qualifier		Qualifier			
ID	▼	Name	Data File	Type	Level	Acq. Date-Time	Exp. Conc.	RT	Resp.	MI	Calc. Conc.	Final Conc.	Accuracy	Ratio	MI	Ratio	MI	RT	Resp.	Ratio	MI	Ratio	MI
▶		10STD	10STD 3-28-2012 11-58-19 AM.SMS.D	Cal	1	3/28/2012 9:58 AM	10.0000	9.372	796		10.7335	10.7335	107.3	16.5	18.4	9.321	48482	19.1		12.5			
		25STD	25STD 3-28-2012 12-25-23 PM.SMS.D	Cal	2	3/28/2012 10:25 AM	25.0000	9.377	1337		24.1522	24.1522	96.6	17.8	18.0	9.325	36165	18.1		12.7			
		50STD	50STD 3-28-2012 12-52-31 PM.SMS.D	Cal	3	3/28/2012 10:52 AM	50.0000	9.379	3205		53.8446	53.8446	107.7	18.4	19.8	9.330	38895	18.7		12.6			
		100STD	100STD 3-28-2012 1-19-37 PM.SMS.D	Cal	4	3/28/2012 11:19 AM	100.0000	9.382	7580		101.5021	101.5021	101.5	18.5	20.5	9.329	48802	18.9		12.2			
		200STD	200STD 3-28-2012 1-46-44 PM.SMS.D	Cal	5	3/28/2012 11:46 AM	200.0000	9.376	10603		194.7676	194.7676	97.4	18.5	18.3	9.329	35577	18.7		12.6			
		NEG	NEG 3-28-2012 2-13-52 PM.SMS.D	Sample		3/28/2012 12:13 PM											9.330	38058	19.6		13.2		
		LOW	LOW 3-28-2012 2-41-05 PM.SMS.D	Sample		3/28/2012 12:41 PM		9.375	1384		21.0558	21.0558		20.7	22.6	9.327	42959	20.1		13.1			
		HIGH1	HIGH1 3-28-2012 3-08-10 PM.SMS.D	Sample		3/28/2012 1:08 PM		9.379	6791		97.2311	97.2311		18.9	19.2	9.331	45646	19.6		12.8			
		HIGH2	HIGH2 3-28-2012 3-35-21 PM.SMS.D	Sample		3/28/2012 1:35 PM		9.378	9480		166.8828	166.8828		19.1	20.6	9.330	37125	20.2		12.6			
		BLANK	BLANK 3-28-2012 4-02-33 PM.SMS.D	Sample		3/28/2012 2:02 PM																	
		1972B	1972B 3-28-2012 4-29-48 PM.SMS.D	Sample		3/28/2012 2:29 PM		9.376	113		1.9509	1.9509				9.324	37765	20.5		13.0			
		2051B	2051B 3-28-2012 4-56-59 PM.SMS.D	Sample		3/28/2012 2:57 PM		9.380	224		3.2764	3.2764				9.328	44747	20.8		13.3			
		2132B	2132B 3-28-2012 5-24-07 PM.SMS.D	Sample		3/28/2012 3:24 PM		9.379	2289		80.0402	80.0402		21.3	21.3	9.331	18690	20.2		14.9			
		2132UR	2132UR 3-28-2012 5-51-14 PM.SMS.D	Sample		3/28/2012 3:51 PM		9.374	938		16.9244	16.9244		18.4	19.4	9.326	36205	20.7		13.2			

外れ値およびキャリブレーション以下の値にタグをつけています。

結論

このアプリケーションノートでは、GHB d-6 を内部標準として用いて、生体サンプル中の GHB を測定する、選択性と堅牢性の優れた高感度メソッドを紹介しています。GHB の分析では、イオントラップ GC/MS により多くの利点が得られます。サンプルマトリックス干渉の低減、シグナル/ノイズ比の向上、優れた感度と選択性を備えた GC 四重極イオントラップ MS は、GHB 分析に対応する信頼性の高いソリューションとなります。イオントラップ GC/MS 分析では、偽陽性および偽陰性の可能性が低くなるほか、分析結果の信頼性も向上します。上述のような最適化したメソッドを用いた高速ターゲット GC/MS メソッドを使えば、法医学ラボが直面している GHB 分析に伴う既存の問題を解消することが可能です。3 つの濃度の陽性コントロールと陰性コントロールを組み合わせることで、正確な定量を確保し、未知生体サンプルにおける偽陰性を排除できました。各種サンプルマトリックス中の GHB について、低 $\mu\text{g/mL}$ 域の検出下限が得られました。

参考文献

1. Baselt, R.C., Cravey, RH, Disposition of Toxic Dugs and Chemicals in man, 4th Edition, pages 348-349.
2. Analysis of Gamma-Hydroxybutyrate (GHB) in Urine by Gas Chromatography, *JAT*, Vol 23, Sept **1999**, pages 301-304.
3. "A Solid Phase Extraction Method for the Determination of Gamma-Hydroxybutyrate (GHB) in Urine without conversion to Gamma-Butyrolactone (GBL)", United Chemical Technologies, Inc., Bristol, PA, **1999**.
4. "Determination of Hydroxybutyrate (GHB) in Bioplogical Specimens by Gas Chromatography-Mass Spectrometry", *JAT*, Vol 24, January/February **2000**, pages 1-7.
5. "Gamma-Hydroxybutyric Acid (GHC, Liquid X, Goop, Georgia Home Boy)", *Microgram*, Vol 33, No 4, April **2000**, pages 58-62.
6. R. Paul, L. Tsanaclis, R. Hingston, A. Berry, and A. Guwy. GC-MS-MS Determination of Gamma-Hydroxybutyrate in Blood and Urine, *Journal of Analytical Toxicology*. 30:375-379. (**2006**)
7. P.Kintz, M. Villain, A. Pelissier, V. Cirimele, and G. Leonetti. Unusually High Concentrations in Fatal GHB Case. *Journal of Analytical Toxicology*. 29: 582-585. (**2005**)

謝辞

本研究で用いたデータを提供して下さったセントルイス大学法医学研究所に感謝します。

詳細情報

本文書のデータは代表的な結果を記載したものです。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

December 10, 2012

5991-1610JAJP



Agilent Technologies