

ストリートドラッグの法医学分析に用いる 水素キャリアガスと Agilent HydroInert イオン源の評価

著者

Kirk Lokits and Alexis Willey
Agilent Technologies, Inc.

概要

不審な薬物サンプル中の規制物質の有無を判定する一般的なスクリーニング手順では、主要成分を個々の化合物に分離する必要があります。法化学者は、この目的のために、質量選択型検出器 (MSD) とキャピラリガスクロマトグラフィー (GC) を日常的に使用してきました。ヘリウム (He) は不活性ガスであり、歴史的にガスクロマトグラフィー / 質量分析 (GC/MS) のキャリアガスとして推奨されてきました。その化学的および物理的特性により、分析対象物との相互作用を最小限に抑えると同時に、高分離能のクロマトグラフィー分離を達成することができます。近年、GC および GC/MS ユーザーにとって超高純度 (UHP) ヘリウムの定期的な供給を確保することは困難になっており、コストも増加しています。水素 (H₂) は、GC/MS の第 2 の選択肢となっています。ただし、水素には、一部の分析対象物との反応性、感度の低下、ピークテーリングの増加、ヘリウムで得られた参照スペクトルと比較した場合のスペクトル忠実度の低下といった欠点があります。この実験の目的は、Agilent HydroInert イオン源を、既存の GC/MS システムの現在の法医学ワークフローに適切に組み込めることを実証することです。このアプリケーションノートでは、Agilent HydroInert イオン源を利用して、GC/MS 法医学薬物スクリーニングメソッドで使用するキャリアガスを、ヘリウムから水素に移行するプロセスについて説明します。メソッドには、この移行に関連するベストプラクティスや課題も含まれています。

はじめに

過去 10 年の間に、ラボ全体の運用に必要な量の UHP ヘリウムを調達することがますます困難になり、UHP ヘリウムポンベの全体的なコストも大幅に上昇しました。大気圧検出器を用いる GC では、多くの場合、窒素、アルゴン、水素などの代替キャリアガスを使用します。しかし、GC を高真空下で MS に結合する場合、イオン分子の平均自由行程、不活性度、真空度、低バックグラウンド、高感度に関するパラメータに注意する必要があります。窒素とアルゴンではこのようなパラメータに制約があるため、水素が実用的な代替キャリアガスとなります。それでも、水素にはいくつかの欠点もあり、水素キャリアガスシステムへの転換を急ぐ必要があるかどうかを再評価することになる場合があります。この実験では、いくつかの未知の要因を減らし、Hydrolnert イオン源と水素キャリアガスを使用した、違法なストリートドラッグのスクリーニングと同定を実施するための基礎を提供します。

水素メソッドへの移行とカラム構成の選択における最初の手順の 1 つは、GC/MS システムが効果的かつ安全に処理できる水素流量を決定することです。ターボポンプで推奨される水素の最大カラム流量は約 2.0 mL/min ですが、ディフュージョンポンプは、水素キャリアおよびエクストラクタイオン源には対応していません。¹水素はヘリウムほど粘性が高くないため、ヘリウムと同程度の流量を得るには、ヘッド圧をより低くする必要があります。このため、通常、カラムの直径を小さくするか、膜厚を厚くするか、長さを長くするか、またはこれら 3 つをさまざまに組み合わせたカラム構成に変更します。理想的には、カラム相比を元のヘリウムメソッドから新しい水素メソッドに引き継ぐことができれば、同様のクロマトグラフィーパターンと分析対象物の溶出順序が達成できると考えられます。²こうすることにより、目的の分析対象物の溶出順序や、一般的な干渉物との分離方法を決定したり、再学習したり

する必要がなくなります。MS 感度を最適化するために、流量は通常 0.8 ~ 1.2 mL/min の範囲で設定します。¹このようなパラメータの変更を支援するために、アジレントでは、カラム寸法を変更する際に、最終的な流量とカラムのパラメータを決定するのに役立つオンラインツールを用意しています。Agilent 圧力/流量カリキュレータおよびメソッドトランスレータツールは、アジレントのウェブサイトから無料でダウンロードすることができます。また、Agilent OpenLab ソフトウェアまたは Agilent MassHunter Acquisition ソフトウェアでも利用できます。

性能を最適化するため、アジレントでは、キャリアガスとして水素を使用する場合、イオン源のバージョンに応じて、イオン源本体に 9 mm (または 6 mm) のドローアウトレンズまたはエクストラクタレンズを取り付けることも推奨しています。¹熱、水素、金属イオン源コンポーネントが組み合わさると、イオン源内で反応を引き起こす可能性があります。ドローアウトレンズまたはエクストラクタレンズの開口部を大

きくすることにより、レンズの表面積が小さくなり、金属表面で分析対象物が反応する可能性を低減することができます。アジレントのステンレス、不活性、不活性エクストラクタの各イオン源には、ほとんどのヘリウムアプリケーションで標準となっている 3 mm レンズが付属しています。表 1 に、既存の機器のイオン源タイプに応じた、さまざまなレンズの Agilent 部品番号を示します。また、Hydrolnert イオン源は独自の材料を使用することにより、イオン源内の触媒活性とテーリングを低減し、反応性を最小限に抑えています。水素キャリアを使用した一般的なイオン源内反応の例として、図 1 に示すような、ニトロベンゼンの水素化反応によるアニリンへの変換があります。構造的な類似性と元素組成により、両スペクトルには類似したイオンフラグメントが存在しますが、イオン比が異なるため、ライブラリー一致スコア (LMS) に問題が生じます。この反応は、9 mm のドローアウトレンズまたはエクストラクタレンズを使用した場合でもなくなりません。

表 1. ドローアウトレンズとエクストラクタレンズの Agilent イオン源固有の部品番号

イオン源の設計	部品番号		
	3 mm	6 mm	9 mm
ステンレスイオン源 - ドローアウト	05971-20134	G3163-20530	-
不活性イオン源 - ドローアウト	G2589-20100	G2589-20045	G3440-20022
不活性エクストラクタイオン源 - エクストラクタ	G3870-20444	G3870-20448	G3870-20449
Hydrolnert イオン源 - エクストラクタ	G7078-20906	G7078-20908	G7078-20909

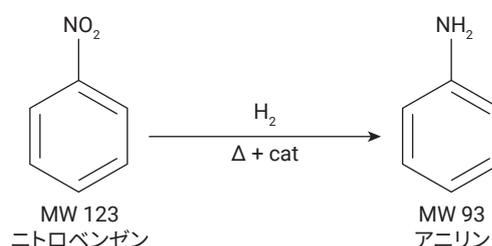
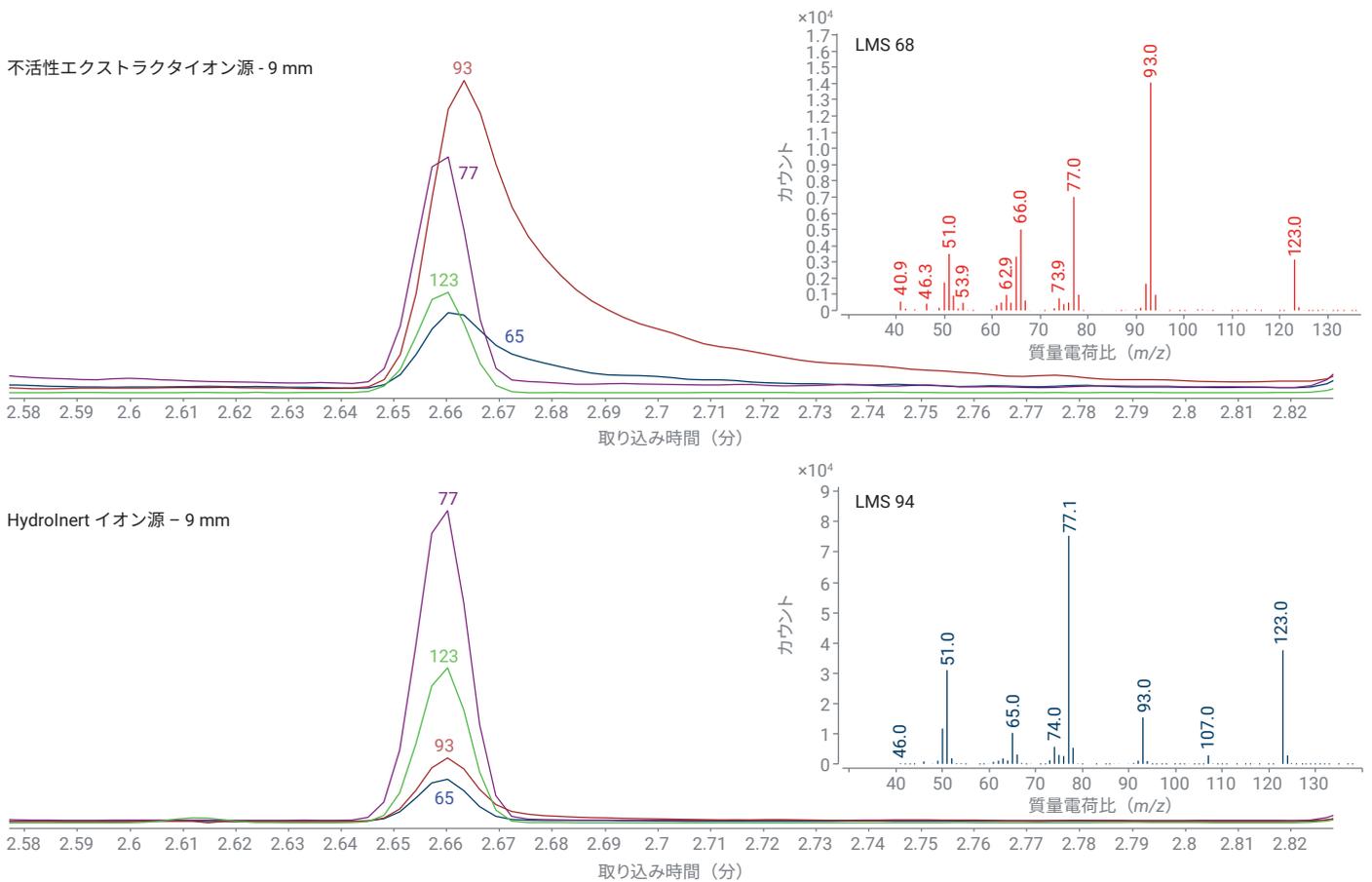


図 1. イオン源内での、ニトロベンゼンのアニリンへの水素化反応

しかし、図 2 が示すように、HydroInert イオン源にすることにより、イオン源内での水素化反応が最小限に抑えられ、スペクトル忠実度が向上し、ニトロベンゼンでの高い LMS とテーリングの減少が得られます。不活性エクストラクタイオン源と HydroInert イオン源のスペクトルの違いの他の例として、2 種類の一般的な依存性薬物について図 3 と 4 に示しま

す。LMS のばらつきは、化合物とイオン源に依存します。HydroInert イオン源は、6 mm と 3 mm のエクストラクタレンズにも対応しており、これらを使用するとターゲット化合物の S/N 比が上昇する可能性があります。¹推奨される 9 mm エクストラクタレンズと比較した場合のターゲット化合物のレ

スポンズと反応性に基づいて、最適な構成を決定するためのさらなる試験を実施する必要があります。一般的にヘリウムを使用する複数のアプリケーションが、HydroInert イオン源と水素キャリアガスを用いて開発されています。^{3~6}



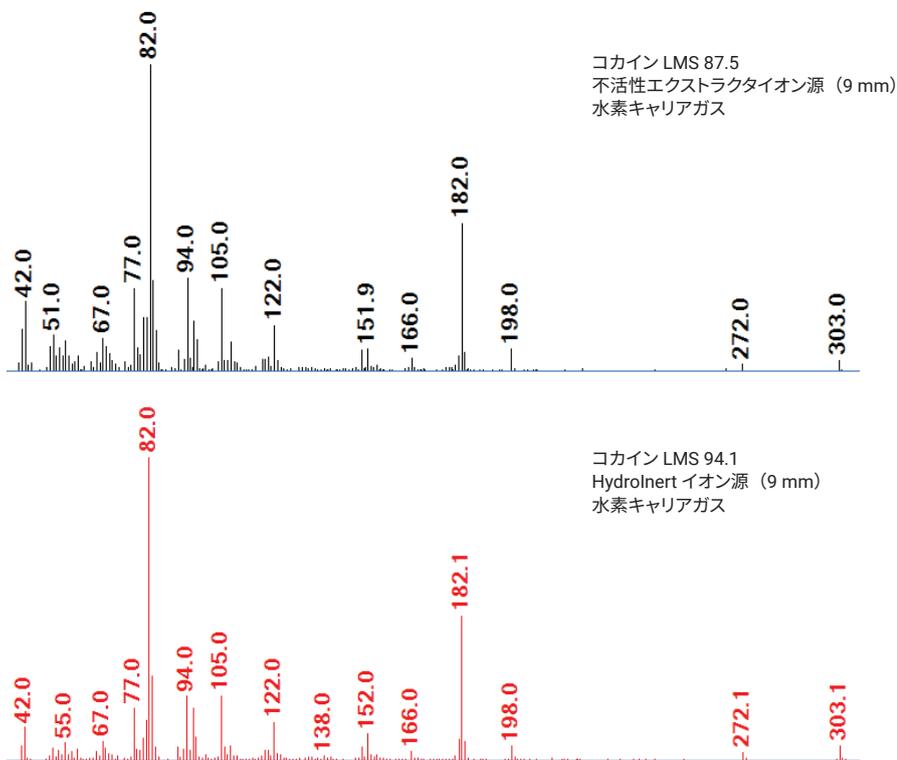


図 3. 水素キャリアガスをを使用した場合の、Agilent 不活性エクストラクタイオン源と Hydrolnert イオン源でのコカインのスペクトルの違い (1 ng オンカラム、atune、デコンボリュートした抽出スペクトル、NIST20 ライブラリ)

この実験では、既存の Agilent 5977B GC/MSD および Agilent 8890 GC システムで Hydrolnert イオン源を利用し、薬物スクリーニングメソッドでキャリアガスをヘリウムから水素に移行するプロセスについて説明します。約 120 のストリートドラッグの法医学サンプルを、水素メソッドを使用して分析しました。GC/MS によるデータ取り込みは Agilent MassHunter Acquisition ソフトウェアで制御し、データ解析は、MassHunter Unknowns Analysis ソフトウェアでデコンボリューションを使用して実施しました。LMS ≥ 70 を示す成分の同定には、NIST20 および SWGDRUG 3.8 質量スペクトルライブラリを使用しました。

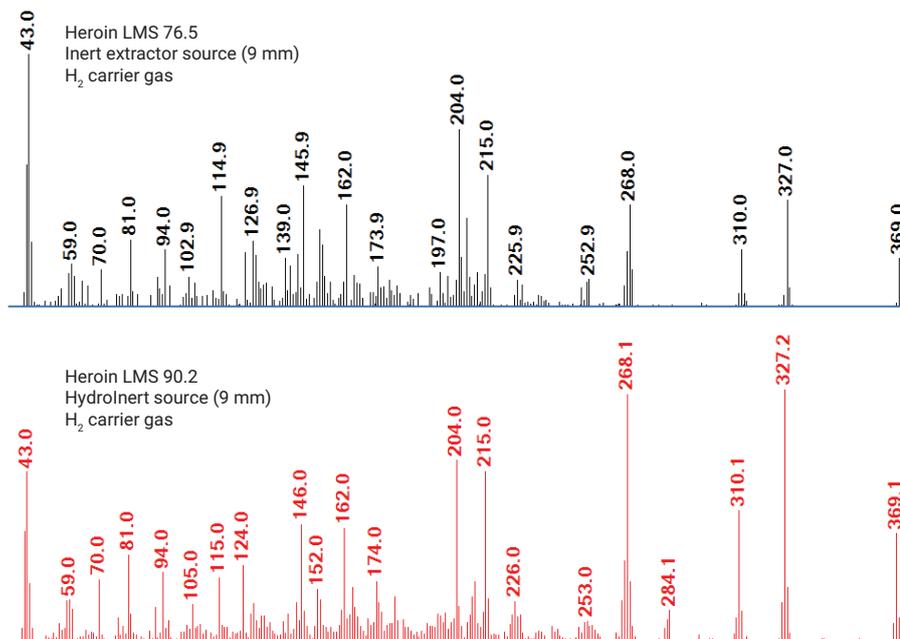


図 4. 水素キャリアガスをを使用した場合の、Agilent 不活性エクストラクタイオン源と Hydrolnert イオン源でのヘロインのスペクトルの違い (1 ng オンカラム、atune、デコンボリュートした抽出スペクトル、NIST20 ライブラリ)

水素下でのガスクロマトグラフィー / 質量分析パラメータ

MSは、高性能ターボポンプを搭載した 5977B GC/MSD システムを使用しました。水素に対するポンプ能力はヘリウムの場合の約半分であるため、カラムの選択肢と達成可能な線速度が制限されます（水素の平均線速度は 30 ~ 55 cm/s です）。メソッド開発プロセスを最小限に抑えるため、Agilent メソッドトランスレータツールを使用して、既存の薬物スクリーニングメソッドで使用するキャリアガスを、ヘリウムから水素に移行しました。図 5 に、メソッド変換に必要なプロセスと最終的なパラメータ計算値を示します。ヘリウムから水素への流量変換により、水素の流量が 1.2 mL/min に増加しました（赤色のボックス）。この値は最適な MS 流量の上限であり、水素の平均線速度を超えているため、流量を 1.0 mL/min に減少させました。オープン昇温は、それぞれ 33 °C /min と 44 °C /min に設定しました。ただし、溶出の早いフェネチルアミンおよび特に溶出の遅いオピエート、ベンゾジアゼピン、ブプレノルフィン の分離を最適化するために、初期オープン温度を 55 °C に下げ、2 回目のオープン昇温を 40 °C /min に下げました。これらの変更により、表 2 に示すように、最終的な分析時間は 10.23 分になりました。元のメソッドからのわずかな変更ですが、メソッドトランスレータツールを使用することにより、試行錯誤していた時間を数時間（場合によっては数日）短縮することができました。水素メソッドを確定してから、フェンシクリジン (PCP) について 5.94 分でリテンションタイムロック (RTL) しました。データは 8890 GC スプリット/スプリットレス注入口（活性）、Agilent J&W DB-5ms ウルトラライナート (UI)

20 m × 0.18 mm、0.18 μm 分析カラム（部品番号 121-5522UI）を用いて取得しました。MS データは、ヘリウムキャリアでは 3 mm エクストラクタレンズを備えた不活性エクス

トラクタイオン源を用い、また、水素キャリアでは 9 mm エクストラクタレンズを搭載した HydroInert イオン源を使用して取得しました。

Method Translator

Speed gain: 1.6599

Translate

Best Efficiency

Last file imported:

Original Method Parameters: Gas He

Calculated Method Parameters: Gas H2

Parameter	Original Method Parameters	Calculated Method Parameters
Length (m)	20 m	20 m
Inner Diameter (μm)	180 μm	180 μm
Film Thickness (μm)	0.18 μm	0.18 μm
Phase Ratio	249.25	249.25
Inlet Pressure (gauge)	22.324 psi	13.182 psi
Outlet Flow (mL/min)	1 mL/min	1.25 mL/min
Average Velocity (cm/s)	45.066 cm/sec	74.808 cm/sec
Outlet Pressure (abs)	0 psi	0 psi
Holdup Time	0.73965 min	0.44559 min
Outlet Velocity (cm/s)	∞ cm/sec	∞ cm/sec

#	Ramp Rate (°C/min)	Final Temp (°C)	Final Time (min)
Init		70	0
1	20	170	0
2	27	320	3.5

Total Run Time: 14.06 min

#	Ramp Rate (°C/min)	Final Temp (°C)	Final Time (min)
Init		70	0
1	33.199	170	0
2	44.819	320	2.11

Total Run Time: 8.47 min

Pressure Units: psi

Original Column Capacity: 0.61

Translated Column Capacity: 0.61

Apply To Method Done Help

図 5. ヘリウムメソッドを水素メソッドに変換する Agilent メソッドトランスレータツール

表 2. Agilent HydroInert イオン源を使用した水素メソッドのメソッドパラメータ

パラメータ	値
注入ソース	オートサンブラタワー /トレイ
注入量	0.5 ~ 1 µL
GC スプリット/スプリットレス注入口	260 °C、スプリットモード 10:1 および 20:1
注入口ライナ	Agilent スプリットレス UI フリット注入口ライナ、シングルテーパー、底フリット (部品番号 5190-5112)
セブタムパージ	3 mL/min
温度プログラム	55 °C (0.2 分間保持) 33 °C /min で 170 °C まで昇温 (0.2 分間保持) 40 °C /min で 320 °C まで昇温 (2.3 分間保持) 分析時間 10.23 分
分析カラム	Agilent J&W DB-5ms UI、20 m × 0.18 mm、0.18 µm (部品番号 121-5522UI)
カラム流量	H ₂ 、定流量 1 mL/min
初期注入口圧力	9.3 psi
線速度	66 cm/s
MS トランスファライン温度	285 °C
イオン源温度	285 °C (atune、etune)、230 °C (stune)
四重極温度	150 °C
スキャン範囲	40 ~ 550 m/z
ゲイン	etune : 1、atune : 2、stune : 3
スレッシュホールド	0
A/D サンプル	2 ¹

チューニングと HydroInert イオン源の安定性

すべてのデータを、atune、etune、および stune で取得し、NIST20 と SWDRG ライブラリを使用した際の LMS を比較しました。この実験の前に、イオン源温度と分析対象物のレスポンスおよびピーク形状の初期比較を実施し (データは示されていません)、atune および etune を使用する場合は 285 °C が最適な温度であると決定しました。ただし、一部の法医学ラボで使用されている stune は、これまでの慣例により 230 °C で実施しました。この実験で、3 種類のチューニングはすべてその週のはじめに実施しました。

非 HydroInert イオン源でのニトロベンゼン水素化反応、および HydroInert イオン源で示された反応の減少 (図 2) に基づいて、0.5 µL ニトロベンゼン (0.5 mg/mL) を 50 ~ 100 回ごとに注入し、サンプルと標準の約 1,800 回を超える注入を含むこの実験の期間中、不活性化したイオン源が安定を維持しているかどうかを判定しました。

ヘリウムと水素キャリア使用時のスペクトル忠実度とレスポンスの比較

前述したように、水素メソッドは既存のヘリウムメソッドを変換したものです。すべての標準とサンプルを、不活性エクストラクタイオン源を使用したヘリウムメソッドのもと、3 種類のチューニングアルゴリズムを用いて分析しました。この分析は、HydroInert イオン源で取得されたスペクトルと LMS を比較する際に、チューニングアルゴリズムに基づいて発生する可能性のある違いを明らかにするために実施しました。

ヘリウム環境と水素環境での分析対象物のレスポンスのばらつきを調べるために、一連のサンプルと標準を、ヘリウム (不活性エクストラクタイオン源) と水素 (HydroInert イオン源) の両方のメソッドで分析しましたが、この際それぞれのエレクトロンマルチプライアゲインを 1 に設定しました。¹

ガスクロマトグラフィー / 質量分析システムに対する塩素系溶媒の影響

ジクロロメタンとクロロホルムは、多くの薬物を溶解するため、ストリートドラッグの法医学分析におけるサンプル前処理に一般的に使用される溶媒です。粉末、残留物、微量サンプルは、多くの場合、迅速かつ簡単なサンプル前処理として、メタノール (MeOH) で希釈されます。実際のサンプルを反映して、法医学のワークフローおよびサンプル前処理プロセスを再現するために、36 種類のメタノール希釈液と 80 種類のジクロロメタン (DCM) 酸/塩基抽出液を得ました。サンプルは、DCM 1 ~ 80 および MeOH 1 ~ 36 として個別に確認されました。各サンプルを 3 回注入し、HydroInert イオン源の各チューニングアルゴリズムにおいて、約 120 種類の医薬品標準および混合物を計 1,800 回以上測定しました。

正確で再現性の高いデータを維持して、HydroInert イオン源のメンテナンスを実施するタイミングを決定するために、J&W DB-1 および DB-5 カラム用 Agilent テスト標準試薬 (部品番号 200-0310) を使用しました。8 種類の分析対象物により、カラムの分離能特性、効率、不活性度を詳細に調査し、全流路を調整しました。⁷このテスト標準試薬は、各シーケンスの最初に分析し、ニトロベンゼン標準とともに 100 回の注入ごとに挿入しました。活性点が存在する場合、または流路が汚染された場合は、ピーク幅の広がり、レスポンスの低下、ピークテーリング、リテンションタイムのシフト、分析対象物の完全な損失が発生します。

注入モードの違い (スプリット/スプリットレス)

各地域のさまざまな法化学者との個人的なやり取りにより、水素キャリアガスを使用して、スプリットレスモードでオピエートを注入した際に、注入口で反応し分解物が生成する場合があります。この現象を検出するために、モルヒネ (Cayman Chemical、部品番号 ISO60147) とコデイン (Cayman Chemical、部品番号 ISO60141) を、ヘリウムメソッドのスプリットモードとスプリットレス

モードの両方で注入し、そのデータを水素メソッドで実施した同一の注入の場合と比較しました。注入口に 1 μ L のコデイン (1 mg/mL) と 1 μ L のモルヒネ (1 mg/mL) を注入しながら、ヘリウムメソッドと水素メソッドの両方を、スプリット比 20:1 のスプリットモード (約 50 μ g オンカラム)、スプリットレスモード (約 1,000 μ g オンカラム)、およびパルススプリットレスモードで実施しました。ほとんどの法医学ラボは未知サンプルの濃度を把握しておらず、1 回の注入で高濃度サンプルを注入することが多いため、意図的に高濃度を使用しました。

結果と考察

ヘリウム下でのガスクロマトグラフィー / 質量分析パラメータ

メソッドトランスレータツールにより、分析時間が元のヘリウムメソッドより約 1.7 倍高速の水素キャリアメソッドを作成しました。しかし、キャリア流量を最適化して、オープン昇温をわずかに調整した後の最終的な水素メソッドは、図 6 に示すように、ヘリウムメソッドより約 1.4 倍高速になり、分析時間を約 3 分短縮しながら、同様の溶出パターンとピーク分離能を維持しました。また、水素メソッドでは、フェニルアミン (アンフェタミン、フェンテルミン、メタンフェタミン) のベースライン分離も実施し、分析終了前にストリキニーネとブプレノルフィンを捕捉するのに十分な分析時間で、複数の合成オピオイド、ベンゾジアゼピン、フェンタニル類似体を高い信頼性で分離しました。

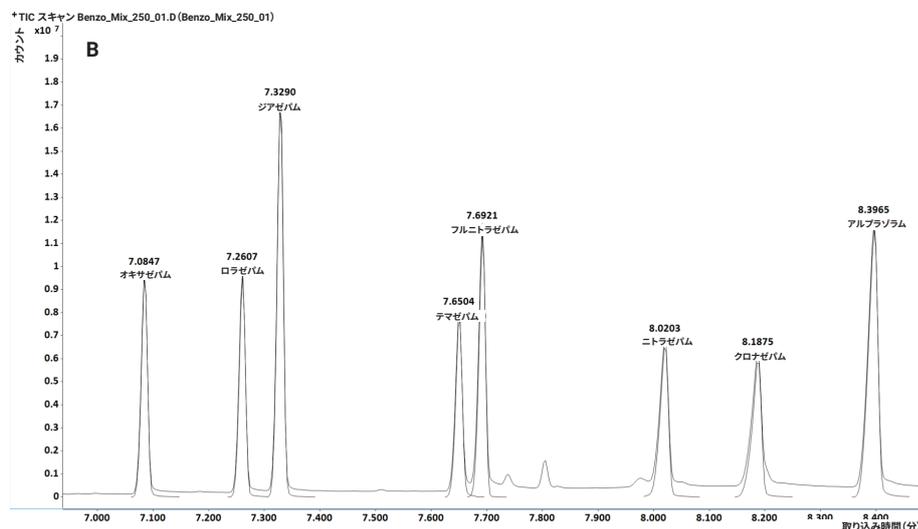
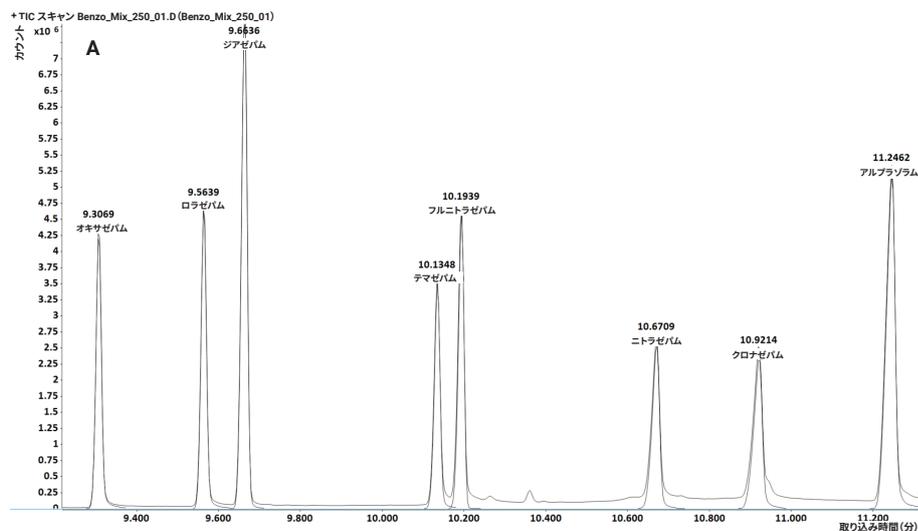


図 6. ベンゾジアゼピン混合物 (Cerilliant、部品番号 B-033)。(A) Agilent 不活性エクストラクトイオン源を使用したヘリウムメソッド下での分離能、(B) Agilent HydroInert イオン源を使用した水素メソッド下での分離能

チューニングの安定性および HydroInert イオン源の安定性

前述したように、すべての標準とサンプルを、atune、etune、および stune パラメータで分析しました。再現性の高い結果を得るためには、サンプルの分析またはバリデーションプロセスを実施する前に、システムを水素キャリア下で平衡化する必要があります。この時間は、チューニング値がそれぞれのチューニング基準を満たしている場合でも、システムの状態（古い既存のシステム、新しく購入したシステム）によって異なります。この実験は 7 月に開始して、同年 11 月に完了しました。表 3 に示したチューニングパラメータの変動が最も少なかったのは、9 月から 11 月にかけてでした。LMS とスペクトル忠実度は実験全体を通して再現可能であったため、このことは 7 月と 8 月に生成されたデータを無効にするものではありません。ただし、チューニングパラメータは、この実験データのように時間の経過とともに変化し、安定します。これは予想されることです。なぜなら、水素は還元性ガスであり、溶媒、マトリックス、ターゲット化合物など、接触するすべての表面と相互作用するためです。¹

表 3. Agilent HydroInert イオン源を 7 か月間使用し、約 1,800 回の注入を行った後のチューニングパラメータの範囲

チューニングパラメータ	atune	etune	stune
リペラー	34.9	4.7 ~ 0.5*	19.96
エクストラクタ	該当なし	-1.9 ~ -0.4	該当なし
EM 電圧	998 ~ 867*	912 ~ 782*	1,037 ~ 976*
同位体忠実度**	1.3 ~ 1.1、 4.4 ~ 4.3、 10.9 ~ 9.3**	1.1 ~ 1.2、 4.4 ~ 4.6、 9.6 ~ 10.4**	1.1 ~ 1.2、 4.2 ~ 5、 9.1 ~ 12.9**
ゲイン係数	0.33 ~ 0.47	0.10 ~ 0.19	0.4 ~ 1.8

* 高電圧で開始、7 か月の間に低下。

** それぞれ m/z 比 69/70、219/220、および 502/503。

stune アルゴリズムは、複数世代の機器にわたり、基本的なチューニングパラメータとして使用されてきました。ただし、stune アルゴリズムは、高い再現性でスペクトル忠実度とイオン比は維持していますが、多くの分析対象物に対する全体的なイオン源感度が低下します。この実験では、stune の下で得られたサンプルデータにより、主なターゲット化合物をすべて同定しました。しかし、図 7 および 8 のデータベーススプレッドシートに示されているように、atune または etune アルゴリズムの下で生成された同じデータと比較すると、低反応性の分析対象物の多くは検出されませんでした。低濃度成分が検出されない場合、クロマトグラムで検出された他の同定化合物（例えば、4-ANPP、フルオロフェンタニル異性体、フェネチル 4-ANPP）の存在を立証できない可能性があります。

この実験では、すべてのデータ解析に、デコンボリューションを備えた MassHunter Unknowns Analysis ソフトウェアを使用し、LMS カットオフを ≥ 70 に設定しました。図 7 で検出されたすべての分析対象物について、atune 基準下で取り込まれたヘリウムおよび水素メソッドにおいて LMS ≥ 70 でした。メドトミジン、フルオロフェンタニル異性体、またはフェネチル 4-ANPP の存在を確認するための標準の分析は実施しませんでした。atune および etune アルゴリズム下で分析された約 120 のサンプルの多くにおいて、対応するリテンションタイムでこれらの分析対象物が同様に検出されました。各アルゴリズムでは、異なるゲイン係数を使用しました（表 2 を参照）。

Sample ID	Atune		Hydrogen Carrier Data Set										Difference	
	Compound RT	Internal Standard	Helium GC/MS Method		NIST20 LMS			SWGDRUG LMS			NIST20 Average	SWGDRUG 3.8 Average		
			NIST20 LMS	SWGDRUG LMS	Injection 1 Match (%)	Injection 2 Match (%)	Injection 3 Match (%)	Injection 1 Match (%)	Injection 2 Match (%)	Injection 3 Match (%)				
DCM_14	Compounds	X=O												
	Caffeine	7.363	X O	99.3	98.7	99.2	99.1	99.2	98.6	98.8	98.8	99.2	98.7	0.4
	Benadryl	7.514		94	93	92.6	91.9	89.9	91.8	90.4	88.2	91.5	90.1	1.3
	Medetomidine	7.793		85.7	88.4	81.8	66.4	64.4	85.6	73.9	71.3	70.9	76.9	-6.1
	Xylazine	7.991		99.1	98.4	99.2	98.9	98.9	98.9	98.6	98.5	99.0	98.7	0.3
	Cocaine	8.830		92.9	92.6	94.6	90.8	87.7	94.9	91.7	88.2	91.0	91.6	-0.6
	4-Anilino-N-Phenethylpiperidine	9.694		89.4	86.7	90.2	87.4	85.8	89.1	86.8	87.5	87.8	87.8	0.0
	Diacetylmorphine	10.213		81.5	80.3	86.2	77.8	76.5	86.2	79.5	77.7	80.2	81.1	-1.0
	Fluorofentanyl isomer	10.364		69.8	70.7	86.9	80	76.9	87.3	80.5	76.5	81.3	81.4	-0.2
	Fentanyl	10.476		94.4	93.2	93.8	95.3	93.5	92.8	95.3	92.6	94.2	93.6	0.6
	Quinine	10.758		79.5	81.8	81	70.9	74.3	78.3	74.4	74.7	75.4	75.8	-0.4
	Phenethyl 4-ANPP	11.943		NE	85.8	NE	NE	NE	85.8	74	75		78.3	

図 7. データベーススプレッドシートから DCM サンプル番号 14 のエンTRIES を抽出し、検出された分析対象物とそれぞれの LMS を atune 基準に基づいてリストしたもの (NE = エンTRIES なし)

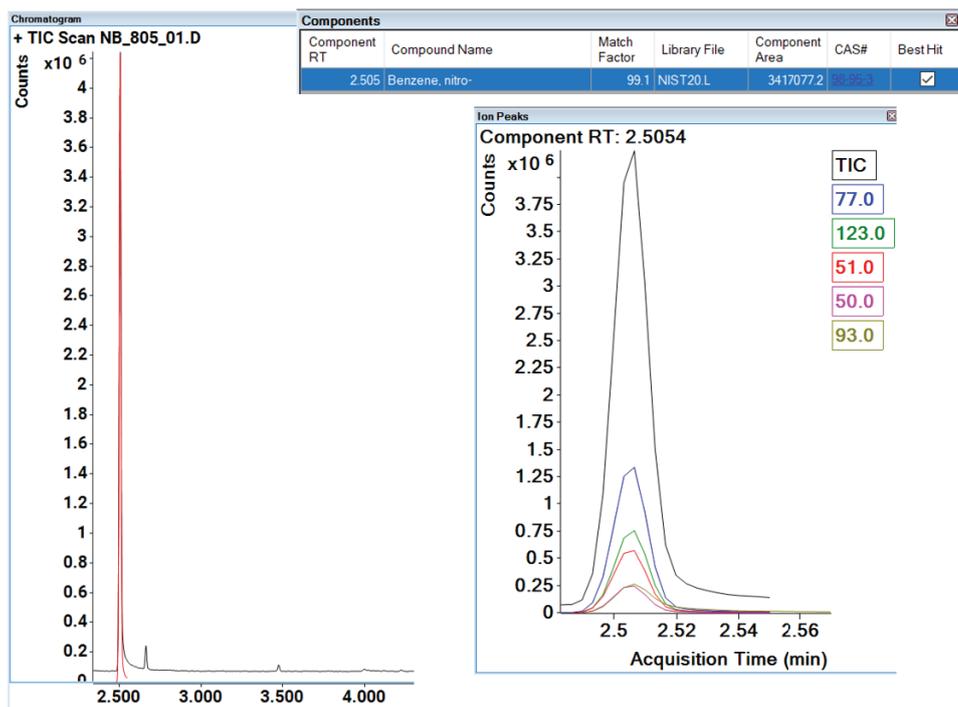
Sample ID	Stune	Compound RT	Internal Standard X=DH O=PA	Hydrogen Carrier Data Set										NIST20 Average	SWGDRUG 3.8 Average	Difference
				Helium GC/MS Method		NIST20 LMS			SWGDRUG LMS							
				NIST20 LMS	SWGDRUG LMS	Injection 1 Match (%)	Injection 2 Match (%)	Injection 3 Match (%)	Injection 1 Match (%)	Injection 2 Match (%)	Injection 3 Match (%)					
				Compounds												
DCM_14	Caffeine	7.367	X O	99.6	99.4	97.9	98	98.1	97.4	97.7	97.7	98.0	97.6	0.4		
	Benadryl	7.516		96	96	80.9	77	79.2	77.9	80.3	77.2	79.0	78.5	0.6		
	Medetomidine	7.793		71.2	74.6	ND	ND	ND	ND	ND	ND					
	Xylazine	7.994		98.4	98.8	95	93.9	96	95	93.9	95.9	95.0	94.9	0.0		
	Cocaine	8.835		92.7	93.2	ND	ND	70.6	ND	ND	69.9	70.6	69.9	0.7		
	4-Anilino-N-Phenethylpiperidine	9.698		85.5	85.7	70.2	ND	ND	70	ND	ND	70.2	70.0	0.2		
	Diacetylmorphine			ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND					
	Fluorofentanyl isomer			ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND					
	Fentanyl	10.482		94.3	93.5	85.1	84.8	86.4	85	83.4	85.4	85.4	84.6	0.8		
	Quinine	10.770		75.5	78.3	ND	ND	ND	ND	ND	ND					
	Phenethyl 4-ANPP			ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND					

図 8. データスプレッドシートから DCM サンプル番号 14 のエンTRIES を抽出し、検出された分析対象物とそれぞれの LMS を stune 基準に基づいてリストしたもの (ND = 不検出)

HydroInert イオン源を使用して、実際のストリートドラッグサンプルを分析しましたが、不活性化が持続する時間の長さや、時間の経過とともに変化するかどうかは不明です。これらの疑問に対する短期的な回答を得るために、水素キャリアの下で、既知の反応性化合物で

あるニトロベンゼンを使用しました。図 9 は、約 1,400 回の注入にわたる 18 回のニトロベンゼンの注入の結果を示しています。LMS スコアとスペクトルデータのレビューを基にすると、HydroInert イオン源の不活性度は、実験全体を通して安定していたと考えられます。

LMS が最も低い 94 になったのは、ライナを交換して、カラムへの入口を切断 (約 6 cm、ライナ交換後にカラムテスト標準試薬がピーク形状とレスポンスの基準を満たさなかったため) する直前でした。



All Tunes	
H ₂ HydroInert	Method
NIST20 LMS	Injection Number
99.2	50
96.3	101
96.9	153
98.9	200
99.4	295
99.1	378
99.3	490
98.7	592
98.9	681
99.1	773
97.8	860
94	929
95.6	1031
99.4	1034
99.4	1112
98.9	1194
99.5	1268
99.5	1326

図 9. 最小 LMS ≥ 94 で、約 1,300 回の注入全体から得られたニトロベンゼンの注入結果

ヘリウムと水素キャリアにおける スペクトル忠実度とレスポンスの比較

表 4 および 5 は、DCM およびメタノール抽出物から得られたさまざまな分析対象物で構成されており、サンプルデータベースのスプレッドシートからランダムに選択しました。データ取り込みの比較アプローチを維持するために、両表ともに、atune のゲイン設定 1 で取り込んだ分析対象物を表しており、MassHunter Unknowns Analysis ソフトウェアのデコンボリューションと Agile2 インテグレーターを使用して積分しています。ヘリウムメソッドと水素メソッド下で、Agilent 検索アルゴリズムを使用した同一化合物の NIST20 ライブラリと SWGDRUG 3.8 ライブラリ間の最大の LMS のばらつきは 2.4 でした。HydroInert イオン源を使用した水素メソッドは、不活性エクストラクタイオン源を使用した標準的なヘリウムメソッドと比較して、ほとんどの分析対象物で同等以上の LMS を示しました。スペクトル忠実度の低下に関して、HydroInert イオン源では、市販の NIST20 ライブラリまたは一般に公開されている SWGDRUG 3.8 ライブラリのスペクトルエントリと比較して、スペクトル忠実度が維持されているか、またはわずかに向上していました。また、不活性エクストラクタヘリウムメソッドと比較して、HydroInert イオン源では、同程度のシグナルレスポンスが得られる分析対象物もあれば、不活性エクストラクタイオン源よりも 2～3 倍高いレスポンスが得られる分析対象物もありました。

表 4. 3 mm Agilent 不活性エクストラクタイオン源を使用した、ヘリウムキャリアガスメソッド下での分析対象物の LMS とレスポンス

分析対象物	NIST20 LMS	SWGDRUG 3.8 LMS	成分の面積カウント
メペリジン	98.9	97.4	4,915,190
メサドン	95.2	92.9	5,384,547
コデイン	98.3	97.3	5,166,966
ヒドロコドン	99.1	97.2	6,063,934
オキシコドン	98.5	96.9	5,248,754
4-ANPP	97.3	95.7	2,175,883
コカイン	99.0	98.6	6,066,265
コカエチレン	98.7	96.3	6,200,280
ベンゾイルエクゴニン	95.9	96.1	1,424,026
エチロン	87.6	90.0	2,024,200
ブプレノルフィン (HCl)	98.7	97.6	11,668,192

表 5. 9 mm Agilent HydroInert イオン源を使用した、水素キャリアガスメソッド下での分析対象物の LMS とレスポンス

分析対象物	NIST20 LMS	SWGDRUG 3.8 LMS	成分の面積カウント
メペリジン	99.4	98.5	8,308,348
メサドン	96.2	93.8	8,772,967
コデイン	99.3	98.2	5,710,259
ヒドロコドン	99.4	97.7	6,877,950
オキシコドン	98.5	97.6	4,282,091
4-ANPP	98	97	3,629,448
コカイン	99.2	98.9	11,626,484
コカエチレン	99.0	97.0	12,131,391
ベンゾイルエクゴニン	97.9	97.9	4,241,150
エチロン	96.6	96.1	1,969,345
ブプレノルフィン (HCl)	99.0	97.4	12,633,590

ガスクロマトグラフィー/質量分析システムに対する塩素系溶媒の影響

DCM のような塩素系溶媒を使用する場合、注入口温度を $< 280\text{ }^{\circ}\text{C}$ に設定することにより、HCl が生成される可能性を低減できます。この実験では、水素メソッドにおいて、注入口温度を $260\text{ }^{\circ}\text{C}$ に設定しました。クロマトグラフィーとスペクトルの品質は、多くのサンプルの溶媒として DCM を使用した場合でも、影響を受けなかったと考えられます。ただし、実験の終了間際に興味深い現象が観察されました。約 1,030 回の注入で、最初にライナを交換した後においても、クロマトグラフィーを元の状態に戻すために、カラムの入口をトリミングする必要がありました。これは、カラムで分析したサンプル数からすると、異常な現象です。対面での調査によると、多くの法医学薬物化学分析者は、数か月間、または数千サンプルが注入口とカラムを通過するまで、カラムの入口を切断していません。早い時点でこのメンテナンス作業が必要になったのは、塩素系溶媒と水素キャリアガスが高温の金属製注入口に結合して、HCl または他の活性化化合物を生成した結果であると考えられますが、この実験では断定はできませんでした。今回のライナ交換は、ストリートドラッグサンプルでは、マトリックスとサンプル前処理に応じて、約 600 回の注入ごとに交換されているという以前の実験結果とほぼ一致しています (図 10 を参照)。⁷ セプタムには、Agilent プレホールド注入口セプタム (部品番号 5183-4757) を使用しており、300~350 回の注入ごとに交換しました。

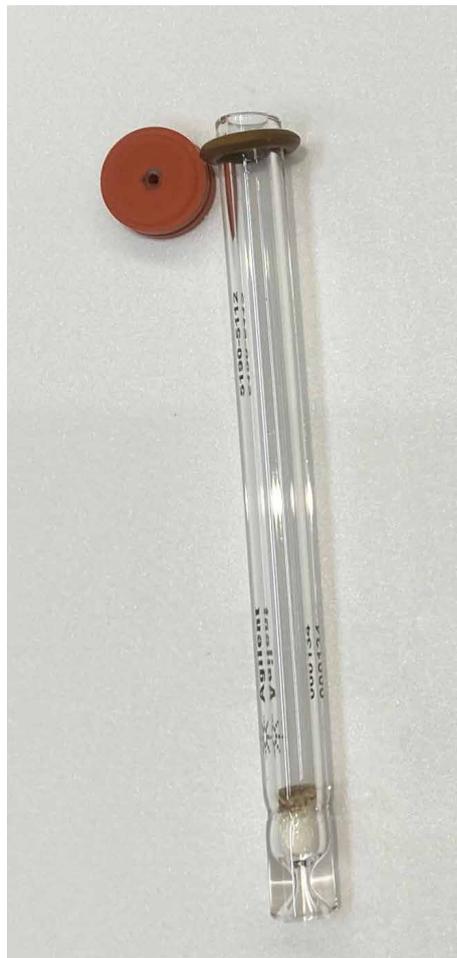


図 10. DCM およびメタノール抽出物で構成されているサンプルを約 700 回注入した後の Agilent UI スプリットレスライナ (部品番号 5190-5112)。Agilent プレホールド注入口セプタム (部品番号 5183-4757) は、約 300 ~ 350 回注入した後の状態で示しています。

注入モードの違い (スプリット/スプリットレス)

図 11 は、不活性エクストラクタイオン源 (ヘリウムメソッド) に、スプリット比 20:1 のスプリットモードでコデインを注入した結果を示しており、コデインのピークは 1 つです。図 12 は、同じシステムへのスプリットレスモード注入の結果を示しており、追加のバックグラウンドピークと、ケシに見られるモルフィナンアルカロイド異性体が検出されましたが、追加のコデインやオピエート異性体は検出されませんでした。圧力パルスドスプリットレス注入においても、同様の結果が得られました。図 13 は、HydroInert イオン源 (水素メソッド) での 20:1 スプリット注入の結果を示しており、ヘリウムメソッドのスプリットモードの場合と同等の結果が得られました。ただし、HydroInert イオン源下でコデインをスプリットレス注入すると、図 14 に示されているように、モルフィナンアルカロイド異性体ピークが増加するとともに、大きなヒドロコドンピーク (コデインの構造異性体) が生成されました。この際、コデインが異性化反応を起こし、注入口でヒドロコドンが生成された可能性があります。ただし、この実験の目的は、生成経路を探ることではなく、単に注入モード間の違いを特定することでした。圧力パルスドスプリットレス注入では、同様に強度のヒドロコドンおよびモルフィナン異性体ピークが生成されました。HydroInert イオン源にスプリットレスモードでモルヒネを注入すると、ヒドロモルフォン (モルヒネの構造異性体) が生成されましたが、これは水素化反応によって生じた可能性があります。注入口パラメータは最適化しておらず、特定の注入口パラメータ設定を決定することにより、スプリットレスモードで反応/生成が発生するポイントを評価しました。さらに、すべてのスプリット流量設定を調査したわけではなく、最適化したわけでもありません。分析者は、水素キャリアガスを使用した薬物メソッドを開発して検証する際には、イオン源での反応だけでなく、注入口での反応の可能性にも注意する必要があります。

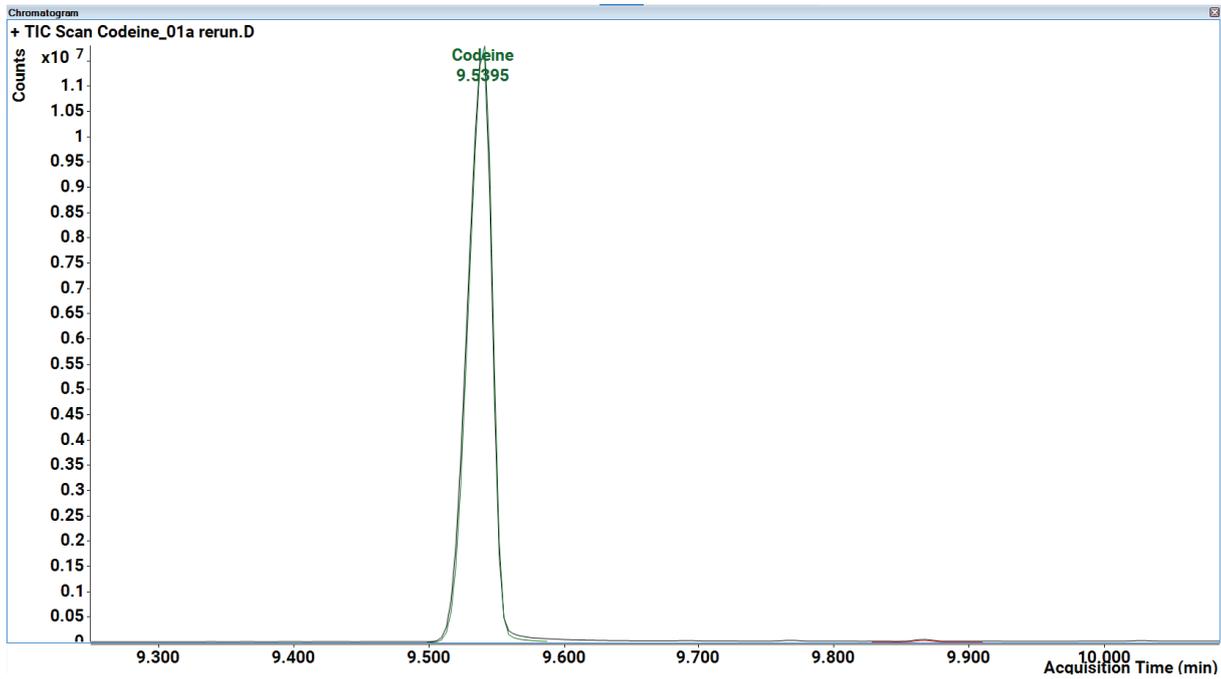


図 11. Agilent 不活性エクストラクタイオン源を使用したヘリウムメソッドにおける、1 mg/mL コデイン標準 (50 μ g オンカラム) のスプリット注入 (20:1)

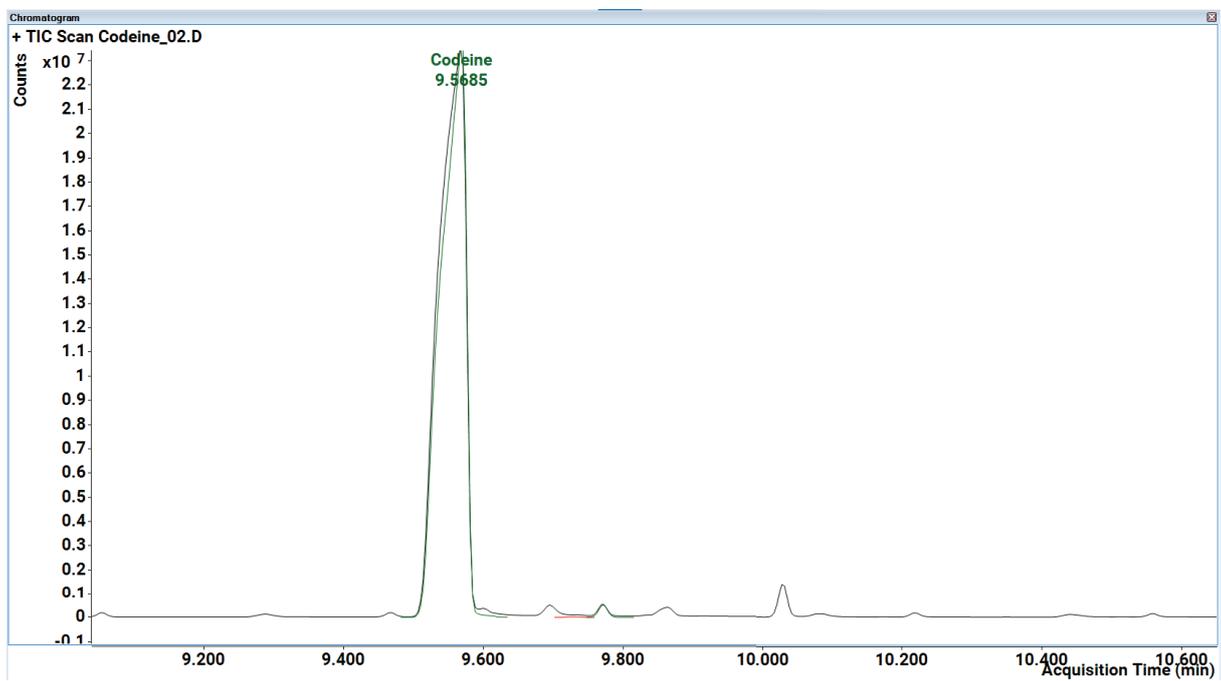


図 12. Agilent 不活性エクストラクタイオン源を使用したヘリウムメソッドにおける、1 mg/mL コデイン標準 (約 1,000 μ g オンカラム) のスプリットレス注入

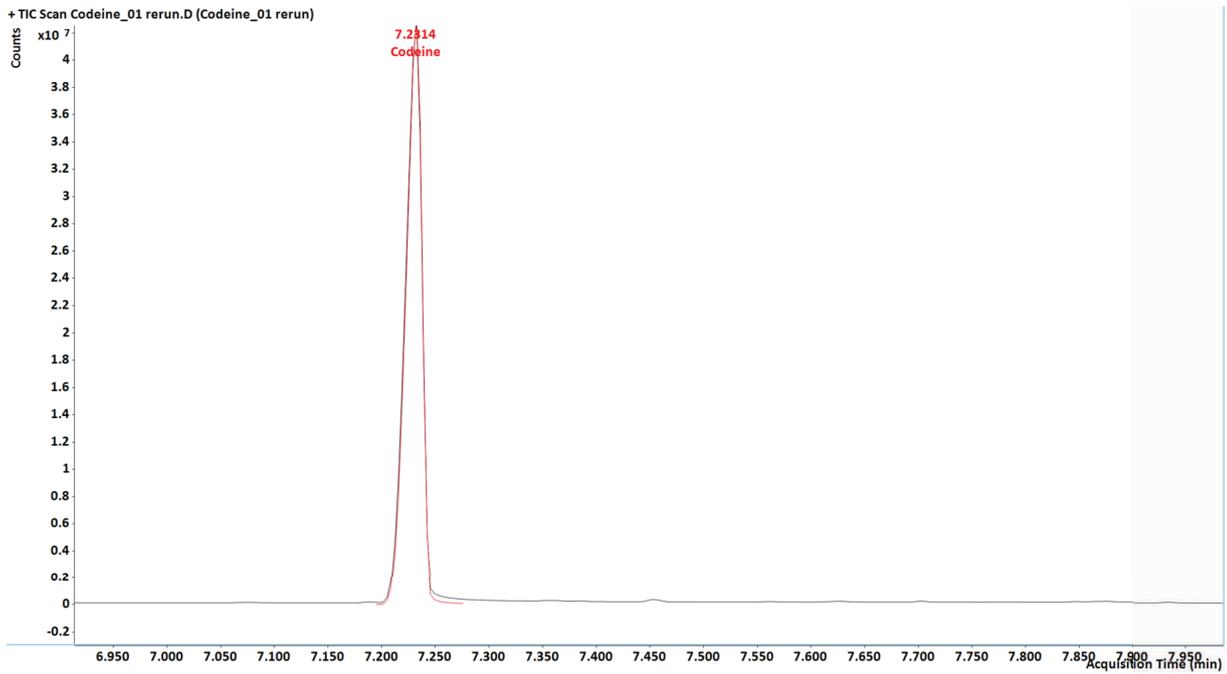


図 13. Agilent HydroInert イオン源を使用した水素メソッドにおける、1 mg/mL コデイン標準 (50 µg オンカラム) のスプリット注入 (20:1)

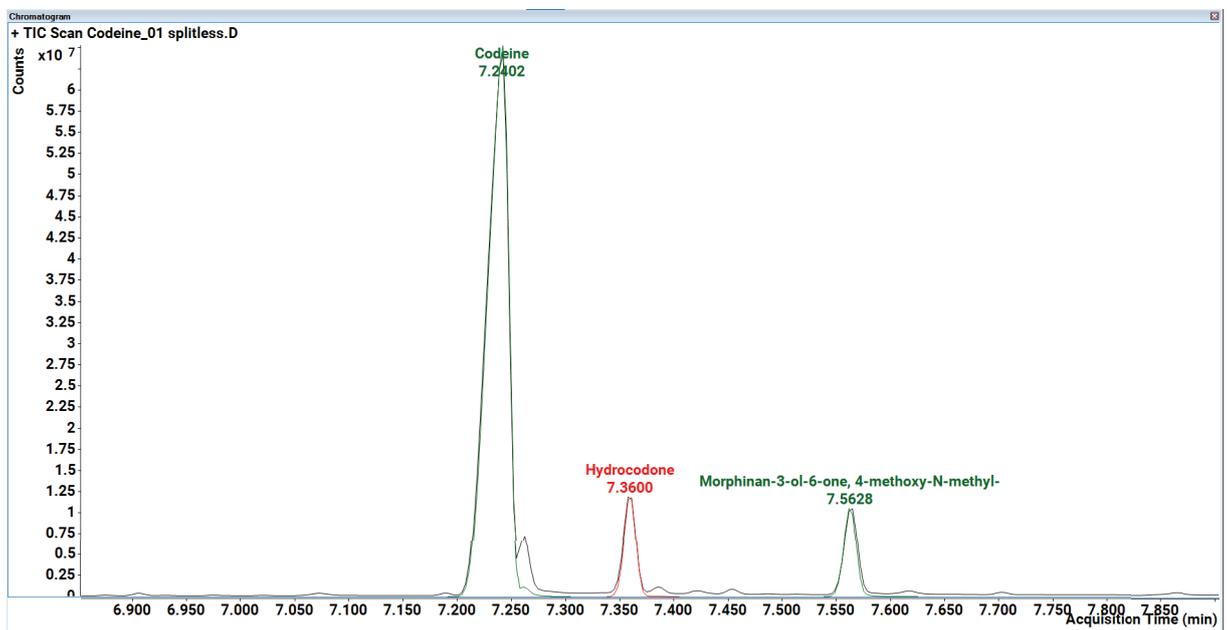


図 14. Agilent HydroInert イオン源を使用した水素メソッドにおける、1 mg/mL コデイン標準 (約 1,000 µg オンカラム) のスプリットレス注入

結論

キャリアガスとしてはヘリウムが推奨されますが、この実験では、Agilent HydroInert イオン源を使用する場合は、水素もキャリアガスとして考慮できることを実証しました。HydroInert イオン源を使用した場合、Agilent 不活性エクストラクタシステムを使用したヘリウムキャリアガスメソッドと比較して、多くの化合物のスペクトル忠実度が向上し、同等の LMS が得られることを示しました。HydroInert イオン源は、実験全体を通して不活性化表面を維持し、非常に反応性の高い化合物であるニトロベンゼンに対して、優れたスペクトル品質を達成しました。ジクロロメタンおよびメタノール溶媒は、クロマトグラフィーやクロマトグラフィーシステム全体の安定性に悪影響は及ぼさなかったと考えられます。しかし、約 1,000 回の注入後にカラムの入口を約 6 cm 切断したことは、ほとんどのヘリウム GC/MS システム環境において、サンプル導入時に予想よりも早く反応が発生することを示しています。この実験では、水素キャリアガスへの移行を成功させるために必要な、特定の MS イオン源に関する考慮事項や取り込みパラメータを含む、全体的なベストプラクティスを示しました。真の未知化合物を分析する際には、水素で生成された GC/MS データによる二次的なオーソゴナル手法を使用することを強く推奨します。水素キャリアガスは、溶媒、サンプルマトリックス、およびサンプル中に含まれるあらゆる分析対象

物と反応するため、従来とは異なるスペクトルを生成したり、クロマトグラフィーシステムと相互作用したりするリスクが常に伴います。水素 GC/MS メソッドを開発する際には、バリデーションプロセスを通して、このような課題に対応するための時間を確保する必要があります。

参考文献

1. Agilent EI GC/MS 機器でのヘリウムから水素へのキャリアガス切り替え, Agilent Technologies ユーザガイド, publication number 5994-2312JAJP, **2022**.
2. Agilent Technologies support document, <https://www.agilent.com/cs/library/support/documents/f39250232446.pdf>
3. Godina, L. 水素キャリアガスと Agilent HydroInert イオン源を用いた GC/MS による香料と香気成分の分析, Agilent Technologies application note, publication number 5994-6015JAJP, **2023**.

4. Haddad, S. P.; Patel, S. U.; Westland, J. L. Analysis of Terpenes in Cannabis with Hydrogen Carrier Gas and the Agilent HydroInert Source on the Agilent 8890/5977C GC/MS, Agilent Technologies application note, publication number 5994-6511EN, **2023**.
5. Smith, A. H. 水素キャリアガスと Agilent HydroInert イオン源を用いた GC/MS による半揮発性有機化合物の分析, Agilent Technologies application note, publication number 5994-4890JAJP, **2022**.
6. Quimby, B. D.; Andrianova, A. A. 水素キャリアガスと HydroInert イオン源を用いたヘッドスペース GC/MSD による飲料水中の揮発性有機化合物の分析, Agilent Technologies application note, publication number 5994-4963JAJP, **2023**.
7. Fortener, S.; Gowins, K.; Strainic, L.; Lokits, K. E. A Standard Workflow and Troubleshooting Process to Maintain and Troubleshoot the Flow Paths of the Agilent Intuvo GC and Conventional GCs, Agilent Technologies application note, publication number 5994-6847EN, **2023**.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンター

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。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。

RA45216.3967476852

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2023

Printed in Japan, December 20, 2023

5994-6982JAJP