

血中の薬物検査における LC/MS 手法の比較

アプリケーション

毒物検査

著者

Michael Zumwalt
Agilent Technologies, Inc.
9780 S. Meridian Blvd.
Englewood, CO 80112
USA

John Hughes
Agilent Technologies, Inc.
6612 Owens Drive
Pleasanton, CA 94588
USA

Greg Kilby
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808
USA

Jeri Roper-Miller and Peter Stout
RTI International
3040 Cornwallis Road
Raleigh-Durham, NC 27709
USA

H. Chip Walls
University of Miami School of Medicine
1611 NW 12th Avenue
Miami, FL 33136
USA

概要

血中の違法/合法薬物をさまざまな液体クロマトグラフィ/質量分析 (LC/MS) 機器を用いて分析し、その結果を比較しました。分析した血液サンプルは、検視血液と薬物服用運転 (DUID) 検査血液です。対象サンプルに薬物が含まれていることは、ガスクロマトグラフィ/質量分析 (GC/MS) によって事前に確認してあります。この分析では、LC の条件はいずれの質量分析計でも同じものです。比較検討した質量分析計は、シングル四重極質量分析装置 (SQ)、飛行時間型 (TOF)、イオントラップ (IT)、トリプル四重極 (QQQ)、および四重極飛行時間 (QTOF) 質量分析計です。LC、MS 装置は、いずれもアジレントの製品です。

複数のサンプルを分析して数種類の薬品化合物を同定するという作業を行いながら、各機器の長所と短所を示します。たとえば、IT、TOF、QTOF 質量分析計は定性的なスクリーニングや同定に優れた装置です。一方、SQ および QQQ 質量分析計はターゲットの定量的な確認に優れた装置です。ただし、逆の利用ができないわけではありません。TOF および QTOF は、QQQ ほどの感度はありませんが、定量作業にも有用です。

血液サンプルの分析でターゲットとなる薬物には、ベンゾジアゼピン類、メタドン、コカイン代謝物などです。



Agilent Technologies

はじめに

従来、違法/合法を問わず乱用薬物のスクリーニングには免疫測定法を、定量的な確認には GC/MS を用いてきました。しかし、免疫測定法には、ターゲットを完全には絞り込めない、試薬のコストが大きいというデメリットがあります。一方 GC/MS には、極性サンプルや不揮発性サンプルを誘導体化しなければならないという手間がかかります。DeBoeck らのレポート [1] では、LC/MS は「新製品の登場により、装置の選択肢が広がったことで、分析に伴う数々の問題、特に、不揮発性の化合物や、不安定な化合物、分子量の大きな化合物の分析に伴う問題が解決できるようになった」と述べられています。

この結果、生体サンプルに含まれる薬物分析や定量分析だけでなく、スクリーニング作業にも LC/MS を利用するラボが増えてきています [2]。これまで、LC/MS では、本調査で分析した薬物分類 (ベンゾジアゼピン類、コカイン、代謝産物など) をはじめとした主要な薬物分類についてメソッドが解説・発表されてきました [3]。しかしながら、LCMS にどのようなタイプがあって、毒物検査にはどの LC/MS が最適であるかをまとめた文献は見あたりません。

アジレントは、幅広い LC/MS ポートフォリオを有しており、ラボの用途に応じた最適な機器を提供することができます。同じ LC 条件で注入した同じサンプル/キャリブレーションをさまざまな質量分析手法で分析し、各機器の比較を行いました。

本調査は、アジレントのアプリケーション・ケミスト 3 名と法医学の専門家 3 名による共同作業の成果をまとめたものです。用意したサンプル、キャリブレーション、およびブランクは合わせて 50 種類です。(検視サンプルは RTI International 社、DUID 検査サンプルはマイアミ大学より提供いただきました)。アメリカデラウェア州ウィルミントンにあるアジレントの施設で、5 種類 (SQ、IT、TOF、QQQ、および QTOF) の LC/MS 装置でサンプルを分析しました。

RTI 社の検視血液サンプルは、NIJ 補助金制度 2006-DN-BX-K014 による助成研究プロジェクトの一環として提供されたものです。

それぞれのサンプルには 1 mL の全血を使用し、定量用に 5 点の検量線を作成しました。検視血液と DUID 検査血液で分析した化合物をそれぞれ図 1a と図 1b に示します。

検視血液サンプルでは、コカイン、ベンゾイルエクゴニン (BE)、コカエチレン (CE)、およびメタドンを分析しました。その際、それぞれの重水素化 D3 類似体を内部標準として使用しました。DUID 検査サンプルでは、アルプラゾラム、ジアゼパム、およびノルジアゼパムを分析しました。その際、それぞれの重水素化 D5 類似体を内部標準として使用しました。ただし、DUID のサンプルについては、コカイン、BE、および CE の有無も調べました。

5 種類のどの LC/MS 装置でも、同じ移動相/カラム/カラム温度/流量/オートサンブラ温度を使用し、LC 条件に差異が出ないようにしました。ほとんどの作業は、2 台の LC システムをカートに載せて機器の間を移動しながら行いました。

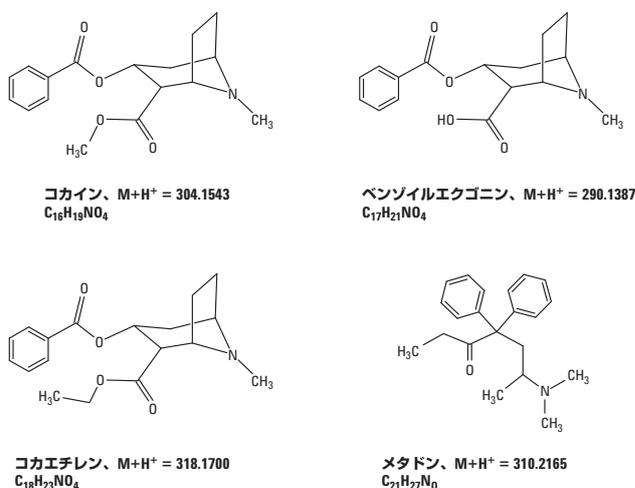


図 1a. 検視血液で分析した化合物 (プロトン化された状態) の構造式/化学式/精密質量

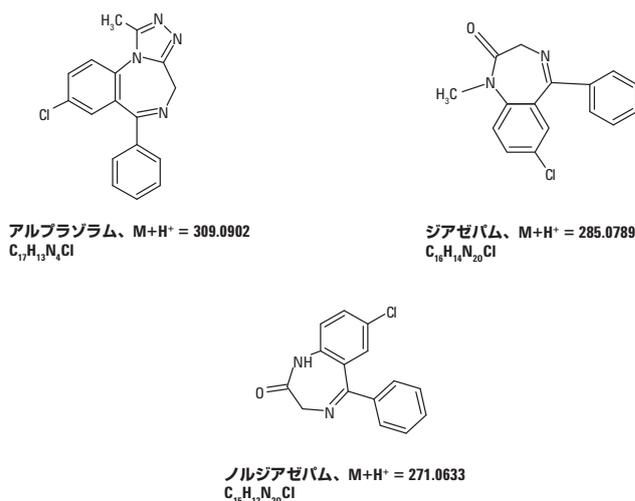


図 1b. DUID 検査血液で分析した化合物 (プロトン化された状態) の構造式/化学式/精密質量

実験手法

サンプル前処理

サンプル量はそれぞれ 1 mL の全血です。それぞれに適した固定相抽出を行いました。(カリフォルニア州ボールドウィンの SPEware 社から購入)。検視サンプルは RTI International 社で、DUID 検査サンプルはマイアミ大学で前処理しました。最終溶出液を乾固させてアメリカデラウェア州ウィルミントンの Agilent Center of Excellence へ冷蔵輸送し、分析の直前に LC グラジエントの開始組成 (5 % B) と同様の 100 μ L の固定相溶媒で再構成しました。唯一の例外は、SQ に使用したサンプルです。この場合、100 μ L ではシグナルが飽和してしまうと判断したため、固定相溶媒を 100 μ L 追加しました。この結果、SQ のみ、オンカラム注入量は半分です。

各化合物の 5 点の検量線レベルを表 1 に示します。本アプリケーションノートでは、以後、ベンゾイルエクゴニンおよびコカエチレンをそれぞれ BE および CE と略します。

LC/MS メソッドの詳細

表 1. 各化合物を定量するための検量線レベル

化合物 (検視サンプルの場合)	レベル (ng/mL)
コカイン	25, 50, 100, 500, および 1000
ベンゾイルエクゴニン (BE)	25, 50, 100, 500, および 1000
コカエチレン (CE)	10, 25, 50, 250, および 500
メタドン	25, 100, 500, 1000, および 2000
化合物 (DUID の場合)	レベル (ng/mL)
アルブラゾラム	5, 10, 25, 100, および 500
ジアゼパム	25, 50, 100, 250, および 500
ノルジアゼパム	25, 50, 100, 250, および 500

LC 条件 (全 MS 分析機器に共通)

Agilent 1200 シリーズバイナリポンプ SL、デガッサ装備、ウェルプレートサンプラ、カラムコンパートメント

カラム:	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 2.1 mm x 100 mm, 1.8 μ m (部品番号 959764-902)
カラム温度:	50 °C
移動相:	A = 5 mM のギ酸アンモニウムと 0.05% のギ酸の 混合水溶液 B = 0.05% のギ酸を混合したアセトニトリル
流量:	0.25 mL/min
注入量:	5 μ L (SQ, QQQ, IT)、2 μ L (TOF)、 および 0.1 μ L (QTOF)
グラジエント:	時間 (分) B 溶液の濃度
	1.0 5
	6.0 40 ストップタイム: 10 min
	8.0 95 ポストラン: 2 min

共通の MS 条件 (イオン源に関する条件)

モード:	ポジティブ ESI (エレクトロスプレーイオン化) モード
ネブライザ:	30 psig
ドライガス流量:	10 L/min
ドライガス温度:	350 °C
V _{cap} :	3000 V

LC の流量は、上記の設定が最も効率的でした。

イオン源の設定に加えて、マス軸較正を行うイオン送給光学系/分析計の電圧値は、各分析計に装備されたオートチューン (自動調整プログラム) によって自動的に最適化されました。オートチューンによる最適化には、ポジティブ ESI モードにおいて次のような m/z 値をとるイオンを使用しました (* TOF と QTOF についてのみ使用) :

118.08625, 322.04812, 622.02896, 922.00979, 1221.99064*, 1521.97148*, 1821.95231*, および 2121.93315。

上記のイオンを含んだキャリブントは、オートチューンルーチンによって自動的に投入されました。イオン質量の幅が広い
ため、マス較正の幅も広がります。これにより分析対象化合物
にとって最適なイオンが供給されます。

個別の MS 条件 (分析計に関する条件)

すべての装置について、フラグメンター電圧というパラメータを使用しました。この電圧は、イオン源に発生した非選択的なイオンフラグメントに対して適用されますが、本調査では、イオン源から質量分析計への各標的化合物イオンの送給を最適化するための手段として使用しました。

Agilent 6140A シングル四重極 LC/MS システム

各化合物に関する取り込み設定値を表 2 に示します。本調査で分析したすべての化合物について、125 V のフラグメンター電圧を使用しました。

表 2. 各化合物に関する選択イオンモニタリング (SIM) の取り込み設定値 (括弧内の数字は検出器ゲイン)

時間 (分)	化合物	SIM イオン (ゲイン)	Dwell (msec)
0.0	コカイン	304.1 (5)	75
	コカイン-D3	307.1	
	BE	290.1	
	BE-D3	293.1	
	CE	318.1	
7.0	メタドン	310.2	235
	メタドン-D3	313.2	
	CE-D3	321.1	
8.0	アルブラゾラム	309.0 (10)	50
	アルブラゾラム-D5	314.0	
	ジアゼパム	285.0	
	ジアゼパム-D5	290.0	
	ノルジアゼパム	271.0	
	ノルジアゼパム-D5	276.0	

SQ は、本調査で使用した機器中で最も安価です。また、通常はそれぞれの SIM に合わせて最適化するパラメータの数が 1 つ (フラグメンター電圧) しかないので、最も使いやすい装置でもあります。上で述べたとおり、イオン源の設定は LC の流量に基づいて自動的に決定され、イオン送給光学系や質量分析計の設定値はオートチューンルーチンによって自動的に最適化されます。

• Agilent 6410A トリプル四重極 LC/MS システム

QQQ で、データ取り込みを最適化するためのパラメータには、フラグメンター電圧とコリジョンエネルギー (CE_n) があります。この電圧を最適化して、マルチプルリアクションモニタリング (MRM) 用のプロダクトイオンのレスポンスを最大限に高めました。どの対象化合物についても、レスポンスの最も高い MRM イオンを定量用のモニタリングイオンとして、2 番目に高いイオンを確認用のクォリファイアとして使用しました。サンプルに含まれている化合物を特定するためには、クォリファイアとクオンティファイア MRM とのピーク面積比をキャリブレーションのそれと一致させ、± 20% の許容誤差の範囲内に維持しておく必要があります。MRM の条件を表 3 に示します。クォリファイアイオンとそれぞれの電圧は角カッコ ([]) 中に示します。

QQQ は、5,400 amu/sec の速度でスキャンで使用することもできますが、これはこの機器の最も感度の良い取り込みモードではありません。SQ と同じように、分析対象イオンに合わせてフラグメンター電圧を最適化する必要があります。さらに、クオンティファイア/クォリファイアプロダクトイオンのレスポンスを最大限に高めるためにコリジョンエネルギーの最適化も必要です。スキャンを行う場合を除いて、SQ の場合と同様、イオン源 (ESI) の設定値は LC の流量に基づいて自動的に計算されます。また、イオン送給光学系/質量分析計の電圧値はチューニング添加イオンによって自動的に最適化されるため、メソッド開発に必要な設定値はすでに決定されています。

表 3. 各化合物に関する MRM 取り込み設定値 (角括弧内の数字はクォリファイアイオンの値、「Frag」はフラグメンター電圧、「CE_n」はコリジョンエネルギー)

時間 (分)	化合物	MRM	Frag (V)	CE _n (V)	Dwell (msec)
0.0	コカイン	304.1 > 182 [82]	130 [130]	15 [30]	40
	コカイン-D3	307.1 > 185	130	15	
	BE	290.1 > 168 [105]	110 [110]	15 [30]	
	BE-D3	293.1 > 171	110	15	
	CE	318.1 > 196 [82]	130 [130]	15 [30]	
	CE-D3	321.1 > 191	130	15	
	8.0	メタドン	310.2 > 265.1 [105]	110 [110]	
メタドン-D3		313.2 > 268	110	15	
アルブゾラム		309.0 > 205 [281.1]	170 [170]	40 [25]	
アルブゾラム-D5		314.0 > 286	170	25	
ジアゼパム		285.0 > 193 [154]	170 [170]	30 [30]	
ジアゼパム-D5		290.0 > 198	170 [170]	30	
ノルジアゼパム		271.0 > 140 [165]	170 [170]	25 [30]	
ノルジアゼパム-D5		276.0 > 213	170 [170]	30	

• Agilent 6330A イオントラップ LC/MS システム

イオントラップは、予想化合物の登録リスト (Include List) を用いて、標的を絞った AutoMS (3) というスクリーニングモードで使用しました。この登録リストには、対象化合物の予想イオン質量 (M + H)⁺ に対応した m/z 値を指定します。このリストには、表 2 の SIM イオンの値と同じ m/z 値を指定しました。

イオントラップを AutoMS (3) モードで使用すると、MS モードでスキャンが行われます。登録リストに指定されているイオン質量のいずれかの強度がユーザ定義のスレッシュホールドを超えた場合にはそのイオンがフルスキャン MS/MS モードでフラグメント化されることとなります。また、イオントラップはプロダクトイオンの強度もモニタします。いずれかのプロダクトイオンが所定のユーザ定義スレッシュホールドを超えた場合にはそのイオンがフルスキャン MS/MS/MS モード、つまり MS (3) モードでフラグメント化されることとなります。

MS/MS/MS モードでの取り込みは、化合物の構造に対して高い選択性があります。しかし、MS/MS モードにおけるシグナル強度が十分ないと、うまく取り込みができません。取り込まれた MS/MS および MS (3) スペクトルは、アジレントの提供するライブラリ (約 400 の化合物に関するライブラリ) 内の同タイプのスペクトルと照合されます。スコアリングマッチは、下の式に示すように、MS/MS および MS (3) レベルでの一致スコアの加重平均です。

$$Score' = \left(\frac{\sum_{i=1}^M Score \times Match}{M \times 10^6} \right)^{\frac{1}{N}} \times 1000$$

有効スコア (Score') は、ライブラリのスペクトルデータとの一致度に応じた MS/MS と MS (3) の各レベルにおける個々のスコア (Score) を基準としたものです。「Score」は、産業標準の NIST ベース検索アルゴリズムに基づいて算出される「Fit (F)」と「Reverse Fit (RF)」と「Purity (P)」です。ライブラリには MS スペクトルのデータがないため、MS レベルでの突き合わせは行われません。MS レベルでのライブラリマッチングには、共溶出化合物が干渉することがあります。

上の式で、M は同定された化合物スペクトルの数、N はスペクトルの総数です。Match は、レベルの異なる MS スペクトルを比較するとき使用するパラメータです。たとえば、取り込んだ MS スペクトルを、ライブラリの MS/MS スペクトルデータと比較して同定するというようなことが可能です。この場合、Match = 500 と指定します。すべての Match パラメータは「Forbidden (禁止)」に設定されているため、どのスコアリングインスタンスの Match 値も 1,000 になっています。

このため、有効スコアは、「Fit'」、「RFit'」、「Purity'」と表示されます。

フラグメント化は、SmartFrag という特異なモードで行います。これは、0.3 ~ 2.0 V の範囲で勾配を付けて適用されるコリジョンエネルギーで、装置によるプロダクトイオンスペクトルのばらつきを抑え、フラグメント化されるイオンの質量範囲を広げます。ライブラリのスペクトルも SmartFrag によって取り込まれたものです。

その他の取り込みパラメータとして、Smart Parameter Settings (SPS) をオン、スキャン範囲を 150 ~ 300、Maximum Accumulation Time を 200 msec、Smart Target を 500,000、Averages を 5 に設定しました。SPS は、イオントラップ分析計へのプリカーサイオンの送給やトラップ自体によるプリカーイオンの捕集を最適化するための電圧値です。Maximum Accumulation Time は、イオントラップでイオンの蓄積を続ける最大時間数です。この時間を過ぎると、別のスキャンが開始されるか、もしくは選択したプリカーサのフラグメント化サイクルが実行されます。

Smart Target の設定は、イオンをイオントラップの容量までめいっぱい溜め、なおかつ容量を超えないようにするためのものです。イオンの溜めすぎは、分離能や質量の帰属判定能力を低下させる原因になります。Averages を 5 に設定した場合、フルスキャンが 5 回分取り込まれると、その平均値が 1 回分のデータスキャンとして記憶されます。

フルスキャン MS/MS モードの取り込みは、イオントラップで最も感度の良い取り込み方法です。イオントラップは定量にも使用できますが、通常、きれいなサンプルに限られます。これは、イオントラップが、プリカーサを選択してフラグメント化する前に、イオン源に発生したイオンをすべて捕集してしまうためです。マトリックスイオンが混在している場合には、分析対象物をトラップする場所が塞がれるため、感度が落ちることになります。

SQ および QQQ 質量分析計の場合と同様、イオン源の設定値は LC の流量に基づいて自動的に決定されます。マス軸較正はチューニング添加イオンの注入によって行われます。イオン光学系/質量分析計の電圧値については、標的プリカーサイオンのトラップに最適な値がオートチューン機能によって自動的に決定されます。AutoMS (3) の動作モードでは、メソッド開発は最小限で済みます。

• Agilent 6220 Accurate-Mass Time-of-Flight LC/MS システム

取り込み時にフラグメンター電圧を設定する必要があります。この値は 150 V に設定します。スキャン範囲は m/z 100 ~ 1,000 で、スキャン 1 回あたり約 10,000 トランジェントが取り込まれます。トランジェントは、ひとかたまりのイオンを励起して TOF 質量分析計へ送給するパルスのことです。 m/z 比 121.0509 および 922.0098 のリファレンスイオンを各スキャンのリアルタイム質量補正に使用し、各スペクトルを更新してからデータファイルに記録しました。

質量補正溶液を 2 本目のスプレー装置から注入し、QTOF の MS モードで 2 ppm 以上、MS/MS モードで 5 ppm 以上の質量精度が出るようにしました。2 本のスプレー装置を使い分けることにより、イオンサプレッションを防止できます。同じスプレー装置を使用した場合、イオン化の前に LC の流路ヘリファレンス化合物を注入するとイオンサプレッションの可能性がります。

注入量は 2 μ L に減らしました。SQ、QQQ、および IT で使用した 5 μ L という注入量ではサンプルに含まれる一部の化合物についてエレクトロスプレーまたは MS 検出器の感度飽和をまねくおそれがあるためです。乾固したサンプルの還元濃度を決定する際に SQ と TOF の感度を低く想定しすぎていました。

アジレントの TOF にはアジレントの他の LC/MS 製品と同じイオン源やイオン光学系が使用されているため、イオン源の設定値は流量に基づいて自動的に決定され、イオン送給光学系や質量分析計の電圧値は前述のオートチューン機能によって自動的に最適化されます。これによりメソッド開発の手間はかかりません。本調査で使用した 150 V というフラグメンター電圧値は、質量分析計へ広範囲の質量のイオンを効率的に送給できる有効なイオン送給光学系電圧値でした。5 台の質量分析計のイオン光学系に若干の相違があるため、最適なフラグメンター電圧は LC/MS システムによって多少異なります。

• Agilent 6520A 四重極 Time-of-Flight 質量分析計

QTOF では、TOF で使用したものと同一設定値を使用し、AutoMS/MS というイオントラップに似た取り込みモードを利用しました。QTOF は、 m/z 100 ~ 1,000 をスキャンします。いずれかのイオンの強度がユーザーが定義したスレッシュホールドを超えた場合にはそのイオンがフラグメント化され、フルスキャン MS/MS モードで取り込まれることになります。プリカーサの m/z が大きくなれば、(構造式を決定できるだけの十分なフラグメント化とプロダクトイオン生成を行うために) 必要とされるコリジョンエネルギーも大きくなります。したがって、コリジョンエネルギーは、プリカーサイオンの質量に基づいて決定しました。

同じリファレンスイオンを使用し、これも 2 本目のスプレー装置から注入しました。本調査で使用したアジレントの他の LC/MS 装置と同じように、イオン源の設定は LC の流量に基づいて自動的に決定され、イオン送給光学系や質量分析計の電圧値は前のイオン質量リストに基づいて自動調整/キャリブレーションアルゴリズムによって自動的に最適化されました。TOF と同様、フラグメンター電圧は 150 V に設定しました。

結果と考察

シングル四重極質量分析計

検視血液

低濃度キャリブレータを用いたコカインの分析対象物質に関する選択イオンモニタリングクロマトグラムを図2に示します。この濃度は、コカインと BE 25 ng/mL、CE 10 ng/mL に相当します。老化全血では、各分析対象物が優れたシグナル/ノイズ (S/N) を示しています。

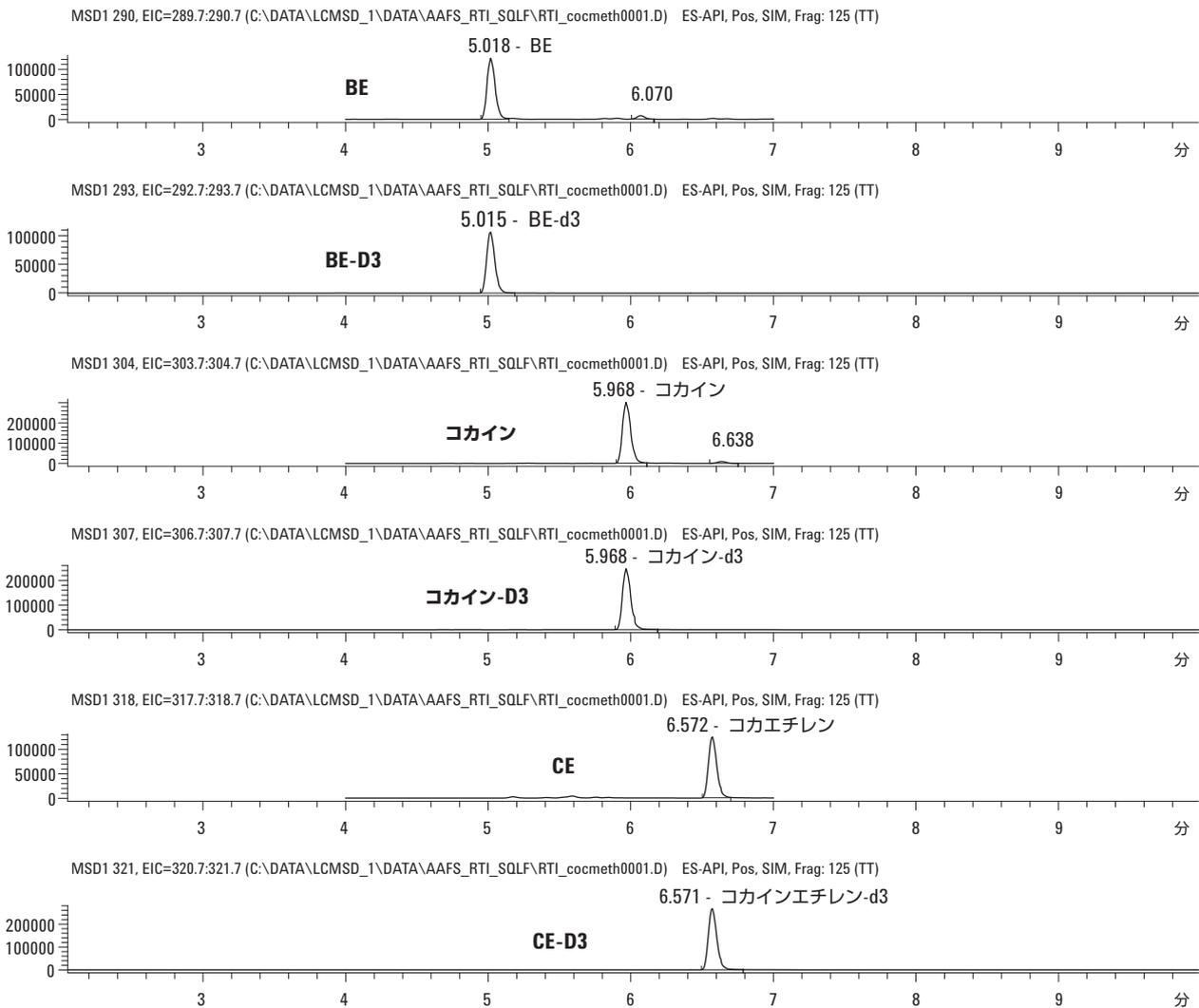


図2. 25 ng/mL (BE とコカイン) および 10 ng/mL (CE) の低濃度キャリブレータ時の化合物クロマトグラム (選択イオンモニタリング使用時)

各化合物の検量線を図 3 に示し、各化合物の検量範囲と相関係数を示します。これらは、それぞれのケースサンプルにおける各化合物の定量範囲です。コカインのケースサンプルを図 4 に示し、定量濃度を付記します。3 つの化合物がすべてそれぞれの検量範囲外で定量されている点に注目してください。

また、検視サンプルにはメタドンが検出されています。検量線を図 3 に示し、25 ng/mL の低濃度キャリブレーションを図 5 に、メタドンのケースサンプルを図 6 に示します。

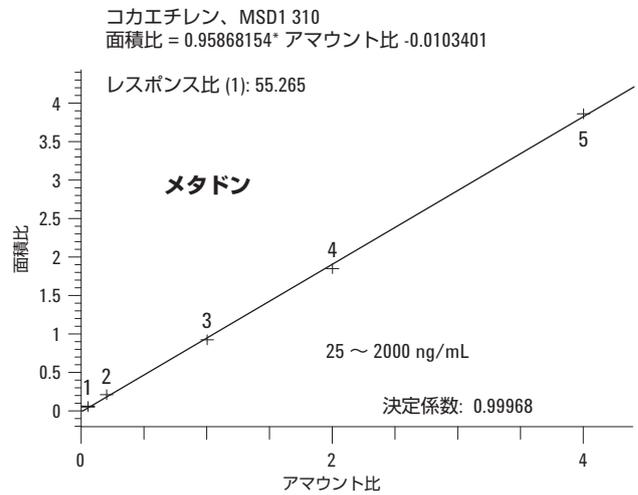
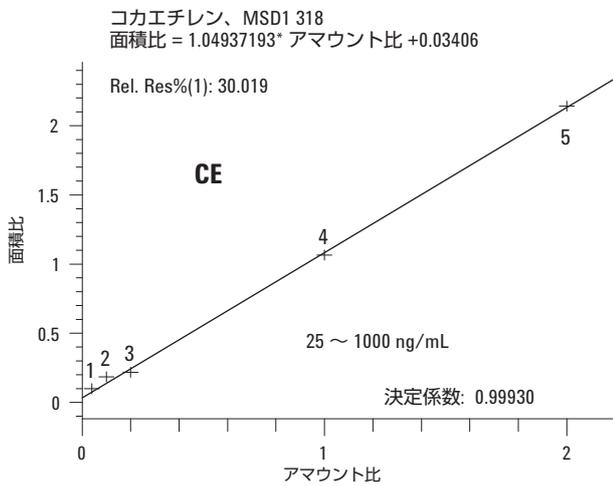
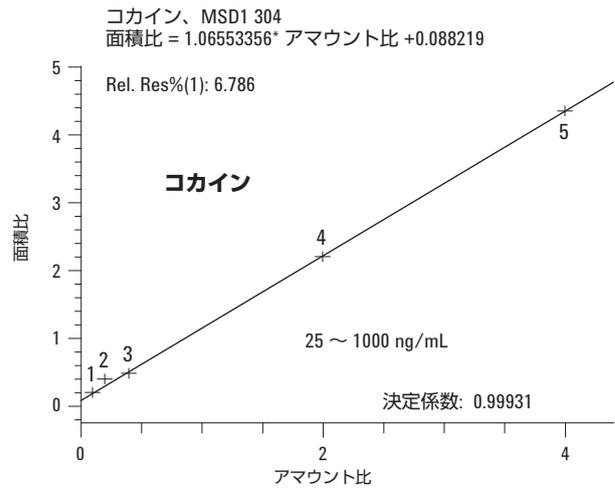
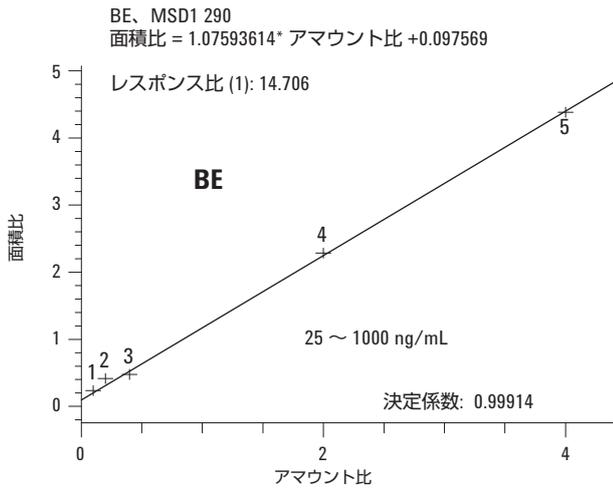


図 3. 検視サンプルで分析した化合物の検量線: BE およびコカイン (25 ~ 1,000 ng/mL)、CE (10 ~ 500 ng/mL)、メタドン (25 ~ 2,000 ng/mL)

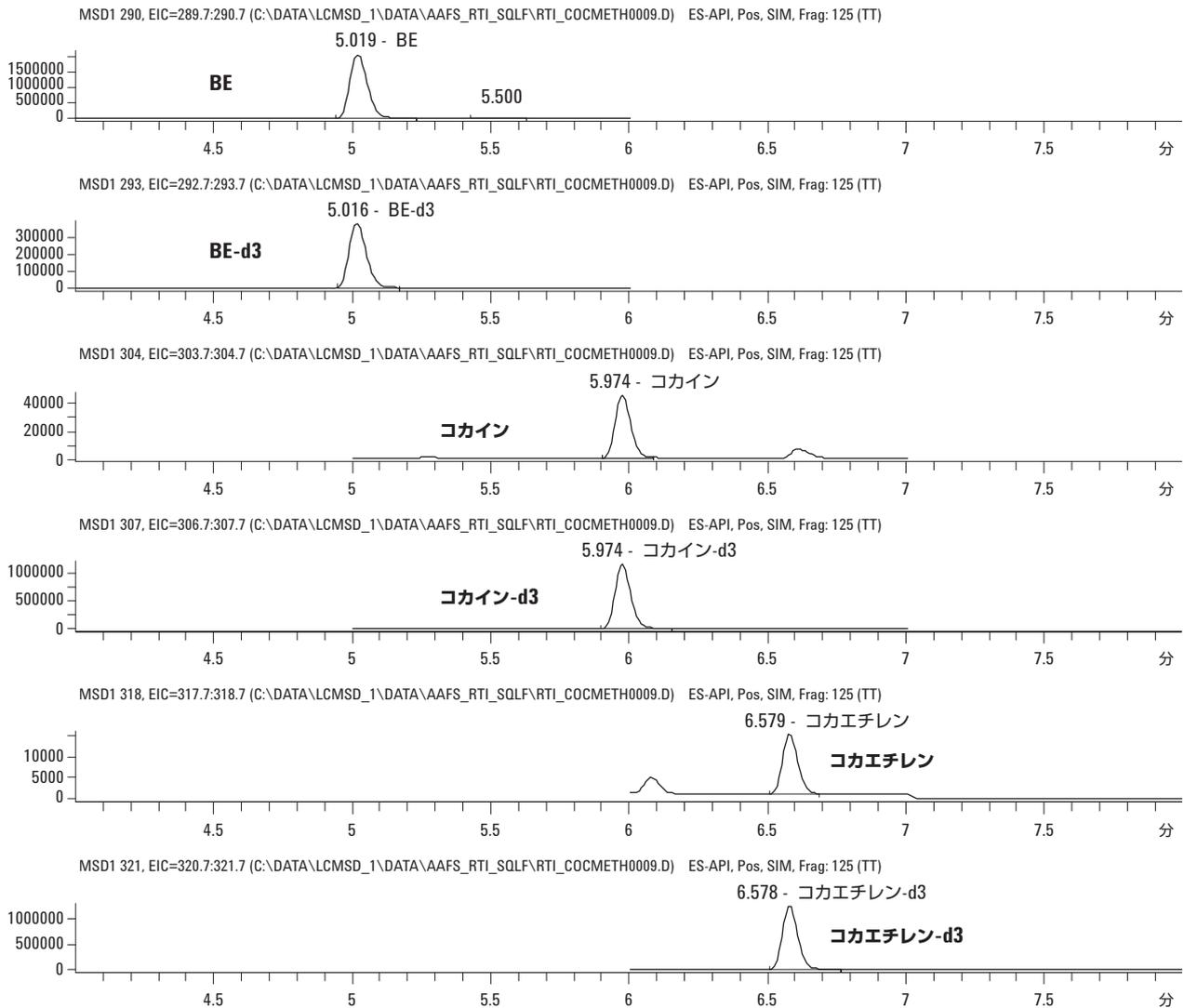


図 4. 検視コカエチレンのケースサンプル : BE 1,253 ng/mL、コカイン 8.8 ng/mL、および CE 2.7 ng/mL

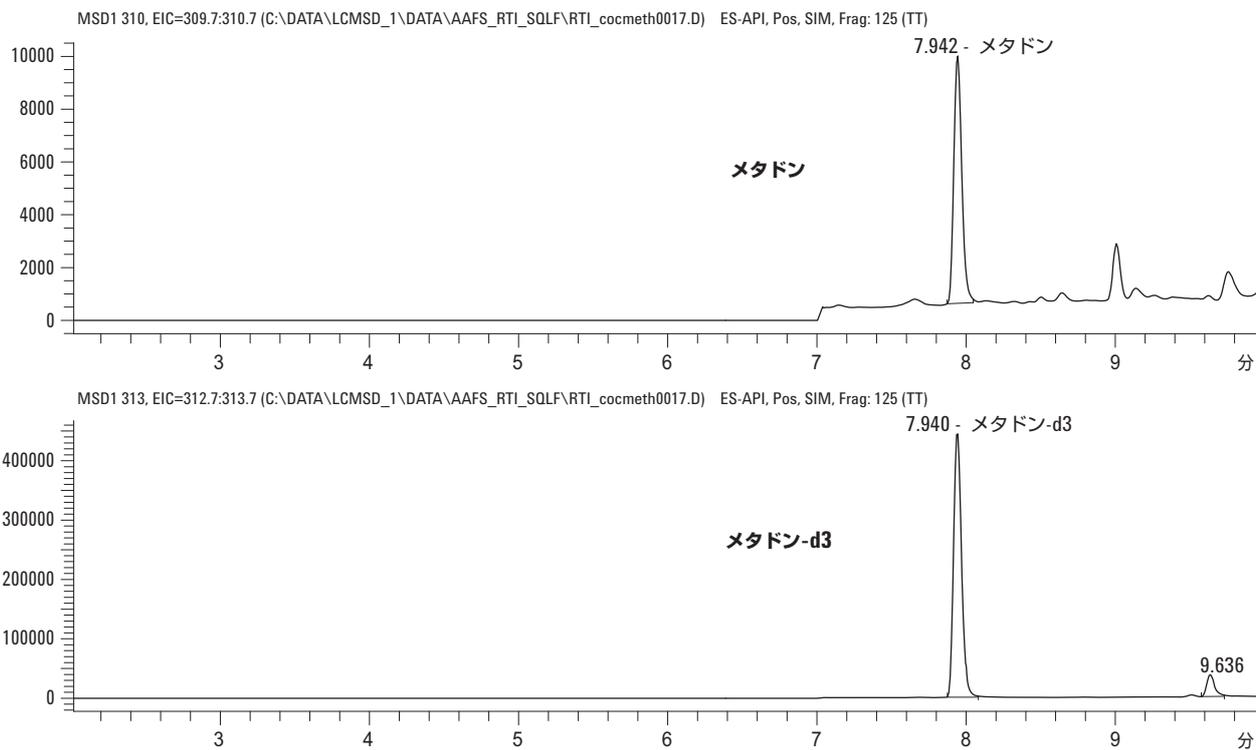


図 5. 検視メタドンの低濃度キャリブレーション (25 ng/mL)

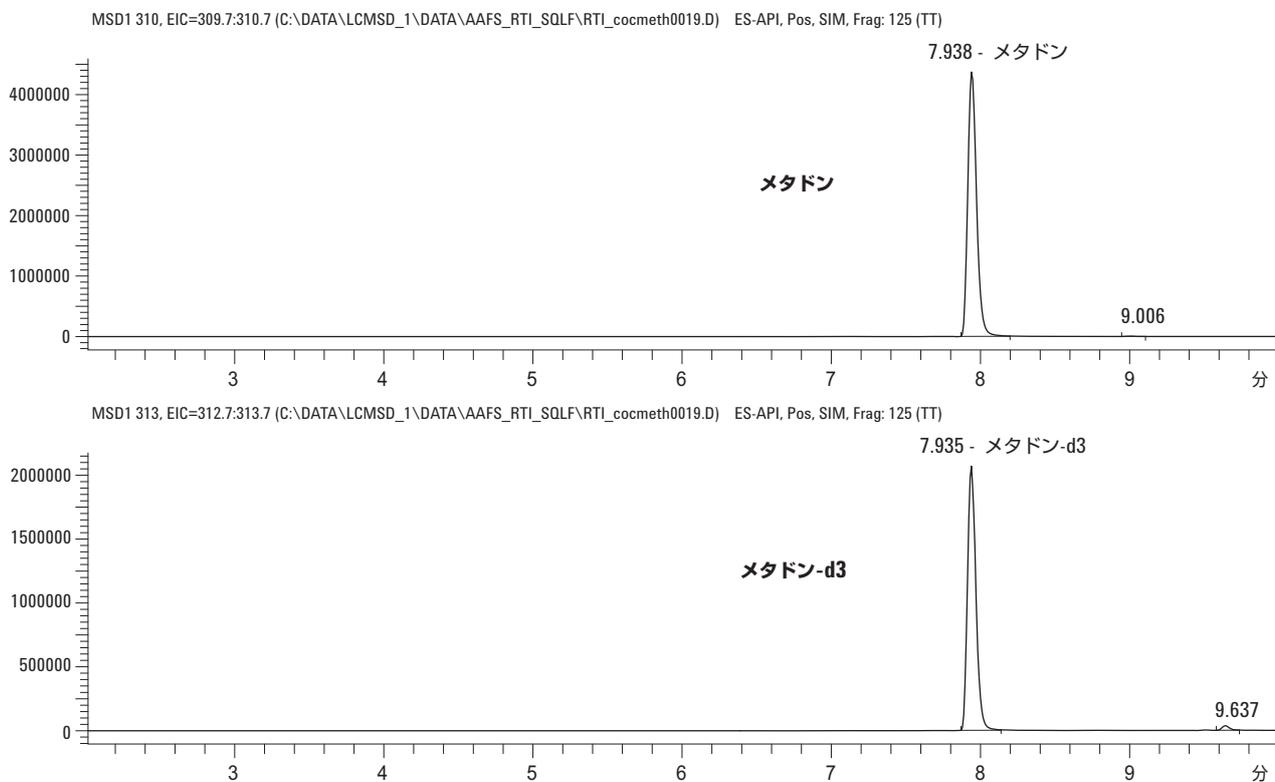


図 6. 検視メタドンのケースサンプル : 1,156 ng/mL

DUID 検査血液

低濃度ベンゾジアゼピン類に関する選択イオンモニタリング (SIM) クロマトグラムを図 7 に、5 ~ 500 ng/mL の検量線を図 8 に示します。サンプル 0024 のクロマトグラムを図 9 に示し、定量の結果を表 4 にまとめました。

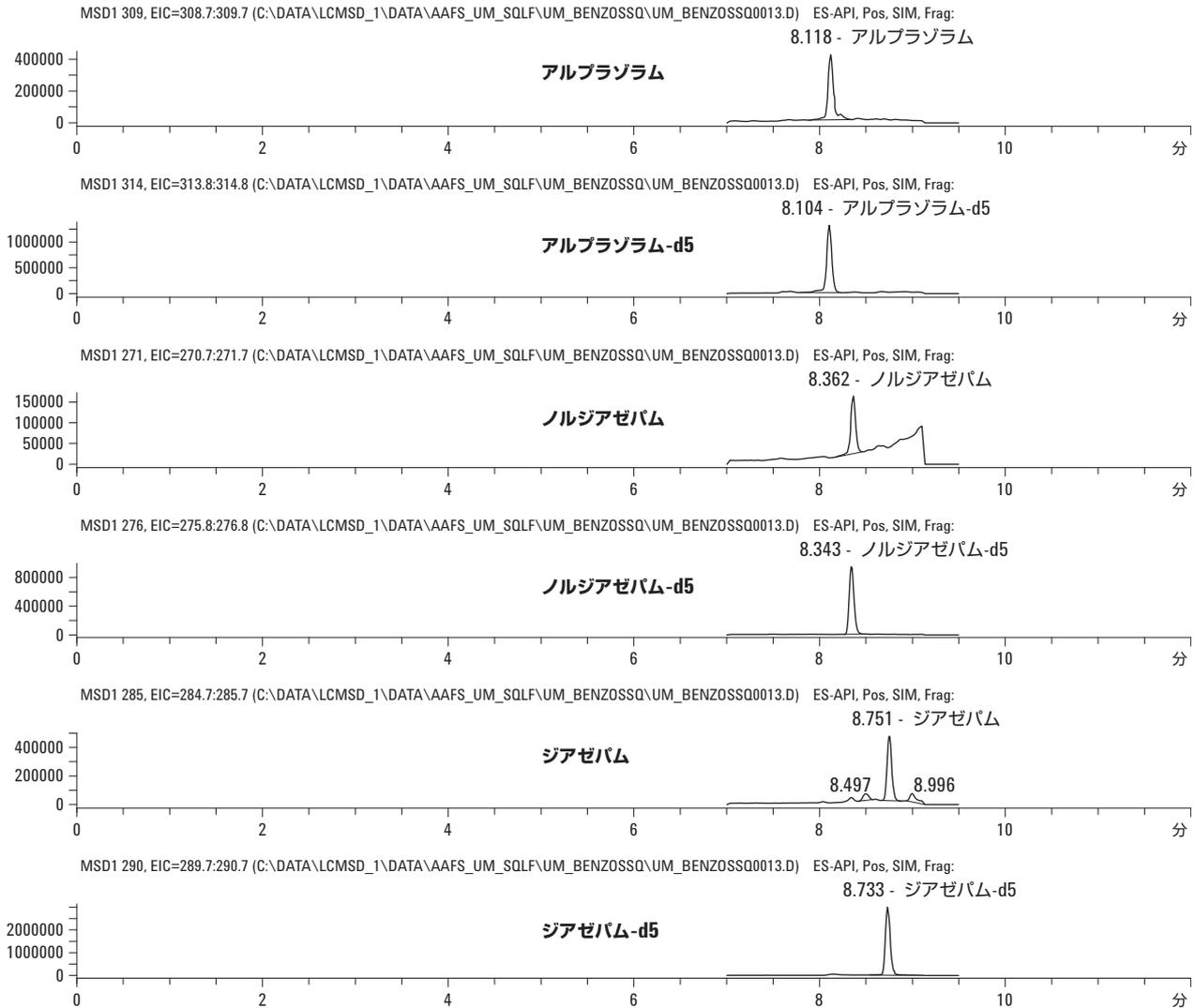


図 7. DUID 検査ベンゾジアゼピン類の低濃度キャリブレーション (5 ng/mL)

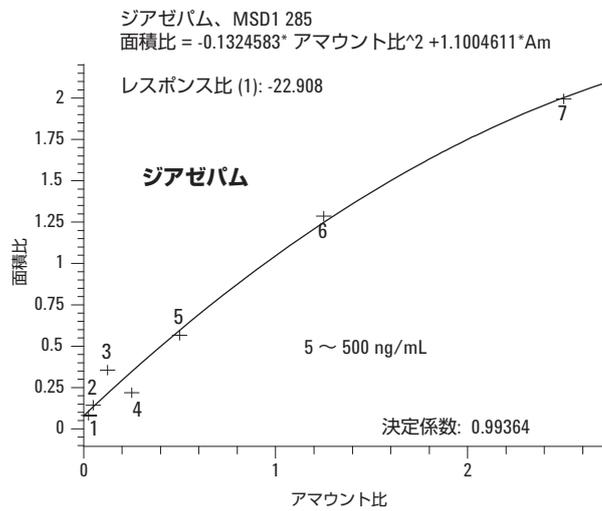
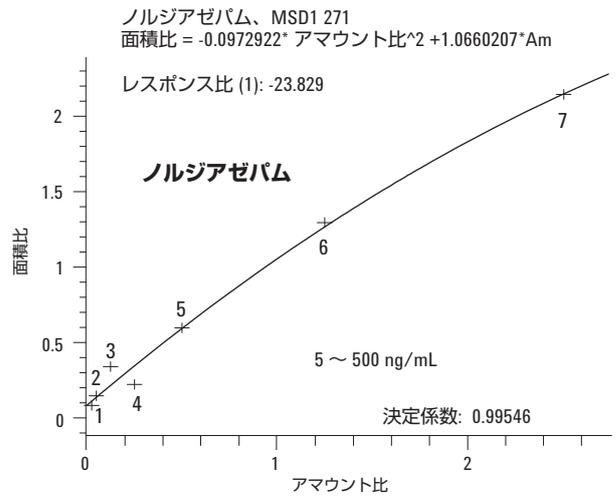
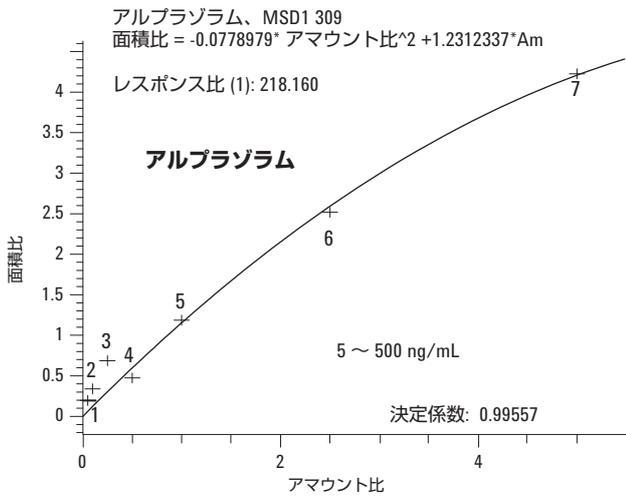


図 8. DUID 検査ベンゾジアゼピン類の検量線 (5 ~ 500 ng/mL)。エレクトロスプレーイオン化過程での飽和により非線形ですが、これは MS 検出器に起因するものではありません。

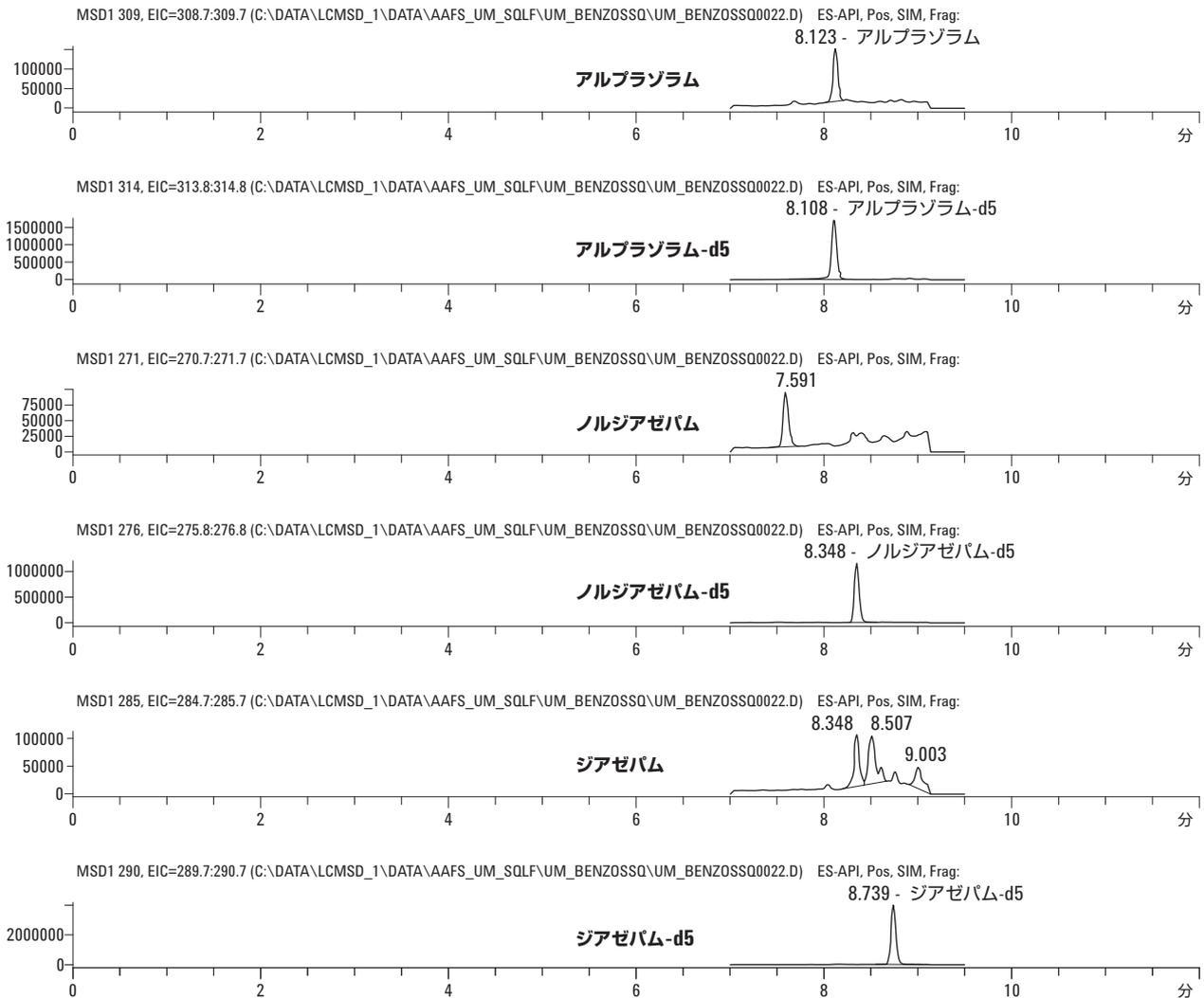


図 9. DUID 検査ベンゾジアゼピン類のサンプル 0024 : アルプラゾラム 5.6 ng/mL

表 4. SQ によって定量された各サンプルのベンゾジアゼピン類含有濃度 (各サンプルからノルジアゼパムとジアゼパムを検出できましたが、定量可能な濃度範囲に達しない量でした)

DUID 検査ベンゾジアゼピン類の ケースサンプル (SQ)	定量結果 (ng/mL)		
	アルプラゾラム	ノルジアゼパム	ジアゼパム
0024	5.6	< 5	< 5
0062	34.5	< 5	< 5
0083	13.6	< 5	< 5
0476	95.7	< 5	< 5
0531	67.5	< 5	< 5
0580	17.5	< 5	< 5

トリプル四重極質量分析計

検視血液と DUID 検査血液

中間領域キャリブレータを用いたコカイン代謝産物のマルチプルリアクションモニタリングクロマトグラムを図 10 に示します。この濃度は、コカインと BE は 100 ng/mL に相当し、CE は 50 ng/mL に相当します。分析対象物に関して、クオンティ

ファイアとクオリファイアの両方のイオンを測定しました。サンプルの中に存在する化合物を特定するためには、対応する面積値の比を一定に保つ必要があります。面積比の一例を $\pm 20\%$ の許容誤差範囲とともに図 11 に示します。内部標準 (IStd) 用のクオリファイアイオンは捕集しませんでした。

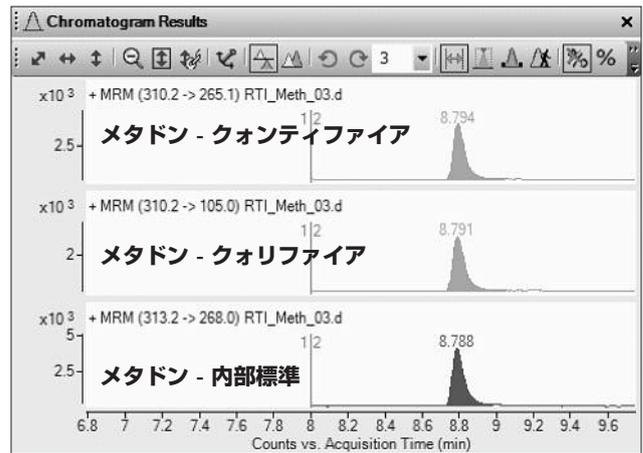
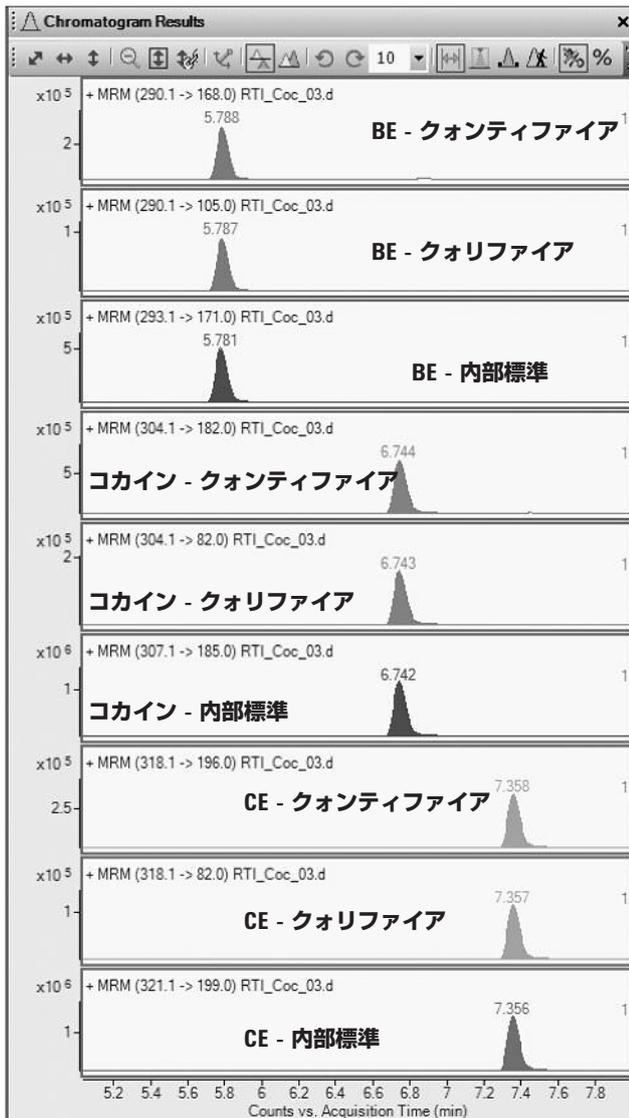


図 10. マルチプルリアクションモニタリングを使用した中間領域 100 ng/mL (BE およびコカイン) および 50 ng/mL (CE) における化合物クロマトグラム。化合物ごとに、クオンティファイア、クオリファイア、内部標準 (IStd) イオンが示されています。

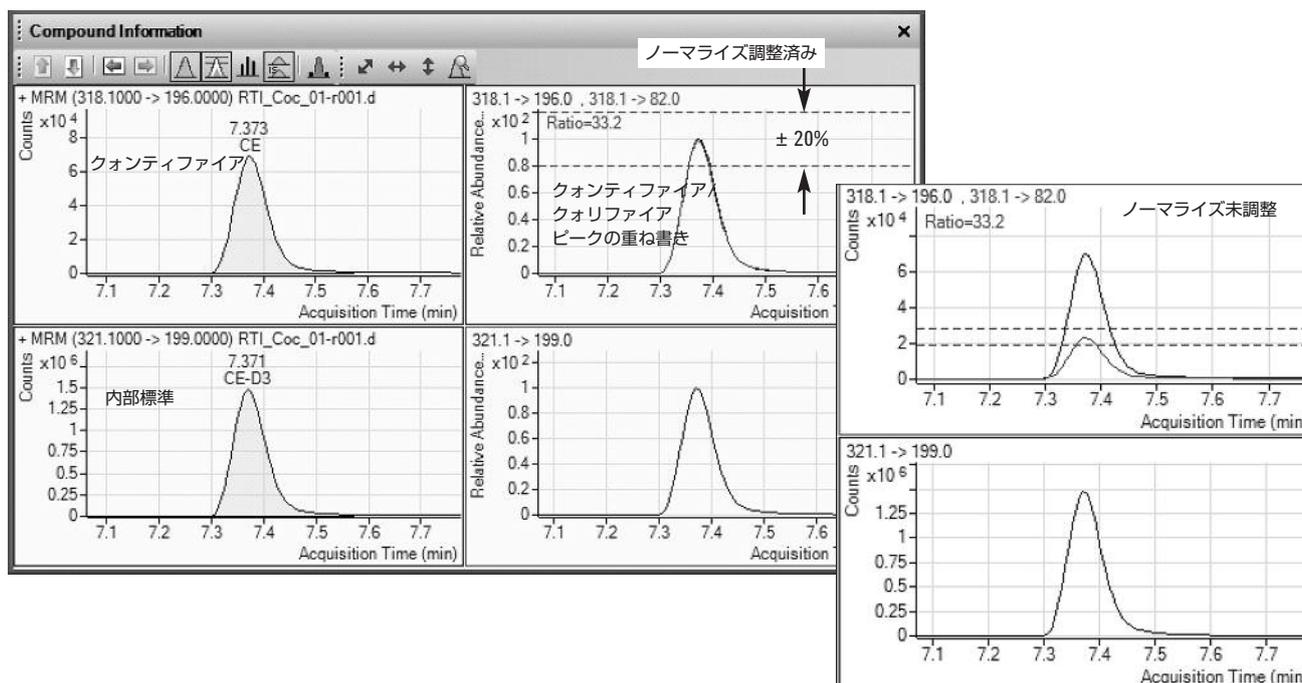


図 11. 確認用のクオリファイアピーク面積イオン比

図 11 の左側は、分析対象物のクオリファイアの積分ピークと内部標準の積分ピークです。そのすぐ右横は、クオリファイアイオンの上にクオリファイアイオンを重ね書きしてピーク面積で正規化したものです。右端は、正規化前の重ね書きです。破線は、イオン比の $\pm 20\%$ の許容誤差を表しています。

QQQ 質量分析計は、定量と確認を 1 回のランで同時に行う機能を備えています。SQ においてイオンの数を 1 つでも増やして確認を行おうとすれば、フラグメンターの電圧を上げて衝突によるフラグメンテーションを誘発するしか方法がありません。しかし、これは非選択的なプロセスであるため、SQ では共溶出化合物による干渉を受けやすくなります。

検視サンプルでコカイン、CE、BE、およびメタドンを定量する際の検量線を図 12 に示します。これらの検量範囲およびキャリブレーションは SQ 分析の場合と同じです。

検量線の間領域における DUID 検査サンプルの化合物クロマトグラムを表 13 に示します。検視サンプルの化合物の場合と

同様、分析対象物についてクオリファイアとクオリファイアの両方イオンが測定されています。対応する検量線を図 14 に示しますが、これは SQ 分析で使用したものと同じです。

低濃度のサンプルをトリPLICATEで注入しました。その結果を下の表 5 に示します。

表 5. トリPLICATE注入のピーク面積から低濃度定量の再現性

低濃度化合物での再現性	レベル (ng/mL)	レスポンスの相対標準偏差 (%)
コカイン	25	0.4
BE	25	1.0
CE	10	0.6
メタドン	25	0.2
アルプラゾラム	5	2.2
ノルジアゼパム	5	0.5
ジアゼパム	5	2.5

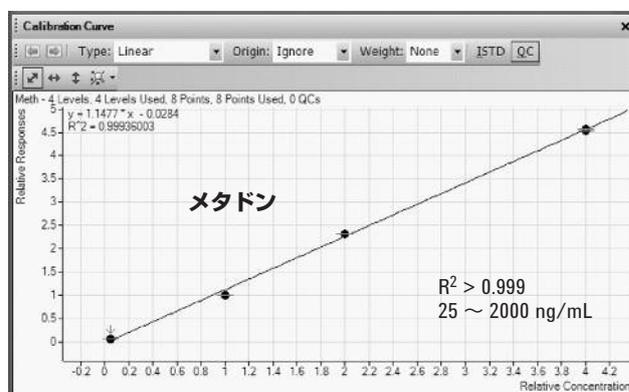
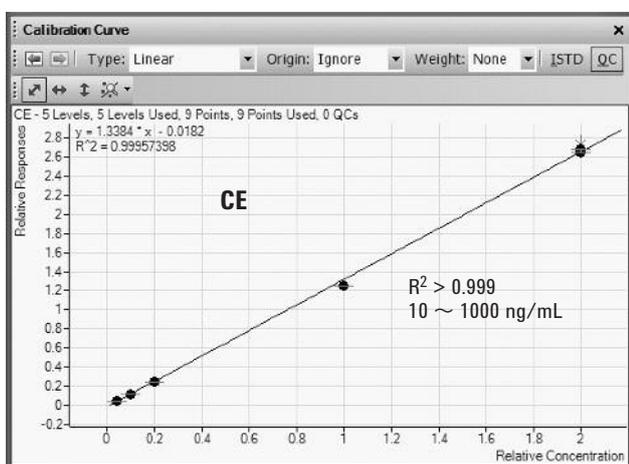
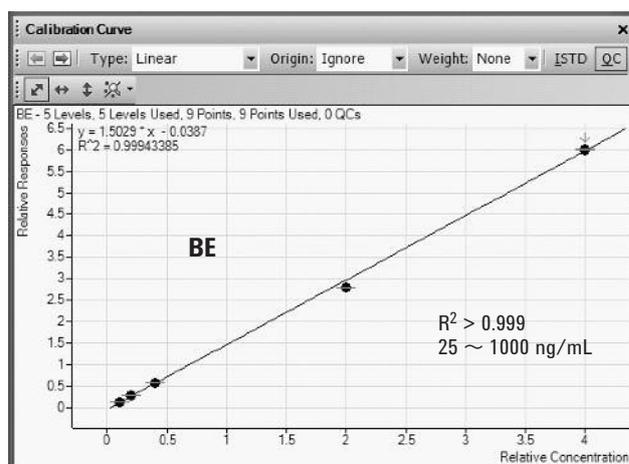
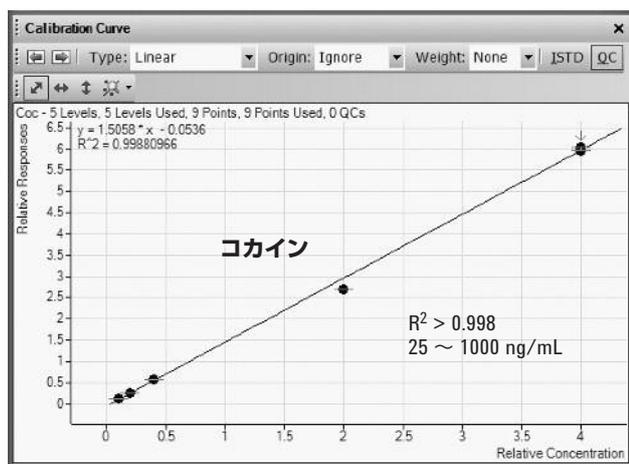


図 12. 25 ~ 1,000 ng/mL (ココインと BE)、10 ~ 1,000 ng/mL (CE)、および 25 ~ 2,000 ng/mL (メタドン) で検視サンプルから検出した各化合物の直線性

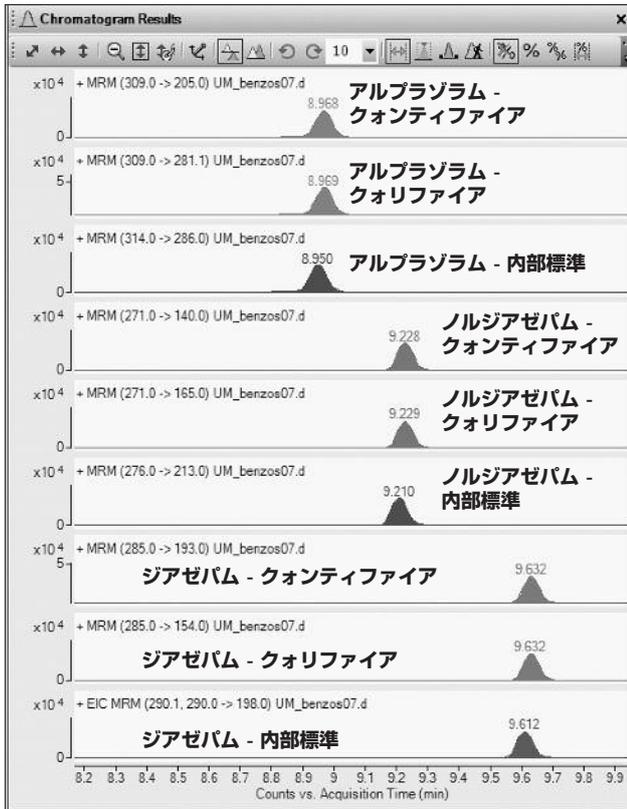


図 13. 50 ng/mL という中間領域でのアルプラゾラム、ノルジアゼパム、およびジアゼパムに関する化合物クロマトグラム。化合物ごとに、コントロールファイア、クオリファイア、内部標準 (IStd) イオンが示されています。

各サンプルの定量結果を表 6 にまとめます。DUID 検査サンプルにはコカインとその代謝産物も含まれると考えられるため、それに適した化合物の分析も行いました。

SQ および QQQ では検量線の低濃度域での定量を行いました。QQQ では、MS/MS 機能に選択性があるため、SQ よりも粗い前処理でも良好な分析結果が得られるものと考えられます。

イオントラップ質量分析計

検視血液のみ

DUID 検査サンプルは他の分析調査で使い切ってしまったため、イオントラップ質量分析計では検視サンプルのみを分析しました。

IT 質量分析計での定量に使用できる検量線の作成を試みましたが、約 4 秒間のピークでは十分な数のデータ点で捕捉するには短すぎたため、ピークの全幅を正確に再現できるだけのデータが得られませんでした。通常、イオントラップによる定量には最低 10 秒のピーク幅が必要とされます。

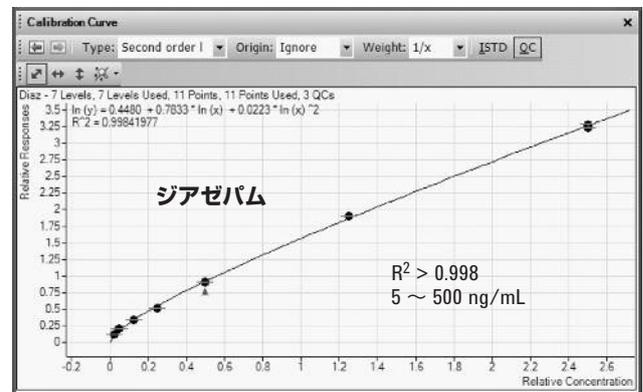
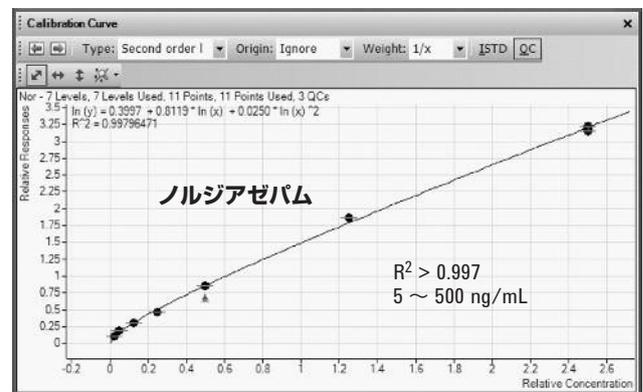
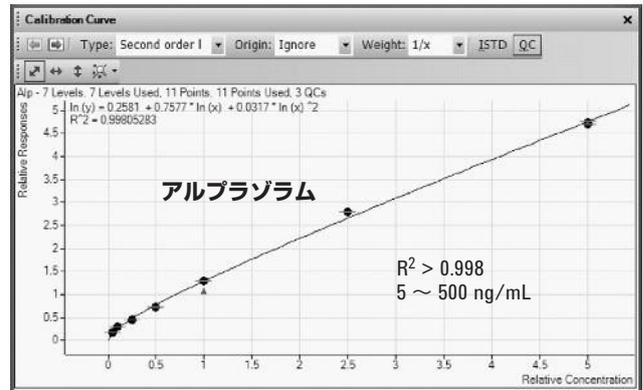


図 14. 検視ベンゾジアゼピンの各化合物に関する検量線 (5 ~ 500 ng/mL)

その半面、イオントラップでは、フルスキャン MS_n 感度を利用することにより、固有なフラグメンテーションパターン (別名「フィンガープリント」) に基づく化合物の特定を行うことができます。本調査では、検視/DUID 検査ケースサンプルに含まれる化合物の特定に、MS/MS と MS₃ の両方のスペクトルデータが収録されたアジレントのライブラリ (400 種以上の化合物に関するライブラリ) を利用しました。一例としてベンゾイルエクゴニンのライブラリエントリを図 15 に示します。この

薬物ライブラリには、CAS 番号 (Chemical Abstracts Service Number) と化学式と構造式も表示されます。

表 6. 検視/DUID 検査の各ケースサンプルに関する OOO による定量結果 (ハイフンはサンプルから検出できなかった化合物)

検視サンプル	定量結果 (ng/mL)						
	コカイン	BE	CE	メタドン	アルプラゾラム	ジアゼパム	ノルジアゼパム
ケースサンプル - コカイン	1.1	1448.1	0.1	-	-	-	-
ケースサンプル - メタドン	-	-	-	1134.7	-	-	-
DUID 検査サンプル							
ケース 0024	-	699.0	286.5	93.6	0.8	-	-
ケース 0062	-	25.6	37.8	390.9	36.5	-	-
ケース 0083	-	9.5	1.0	1465.4	3.9	-	-
ケース 0476	223.9	424.4	211.5	447903.6	96.4	-	-
ケース 0531	-	123.4	1.0	1057.8	58.5	-	-
ケース 0580	-	57.0	10.01	-	5.2	-	-

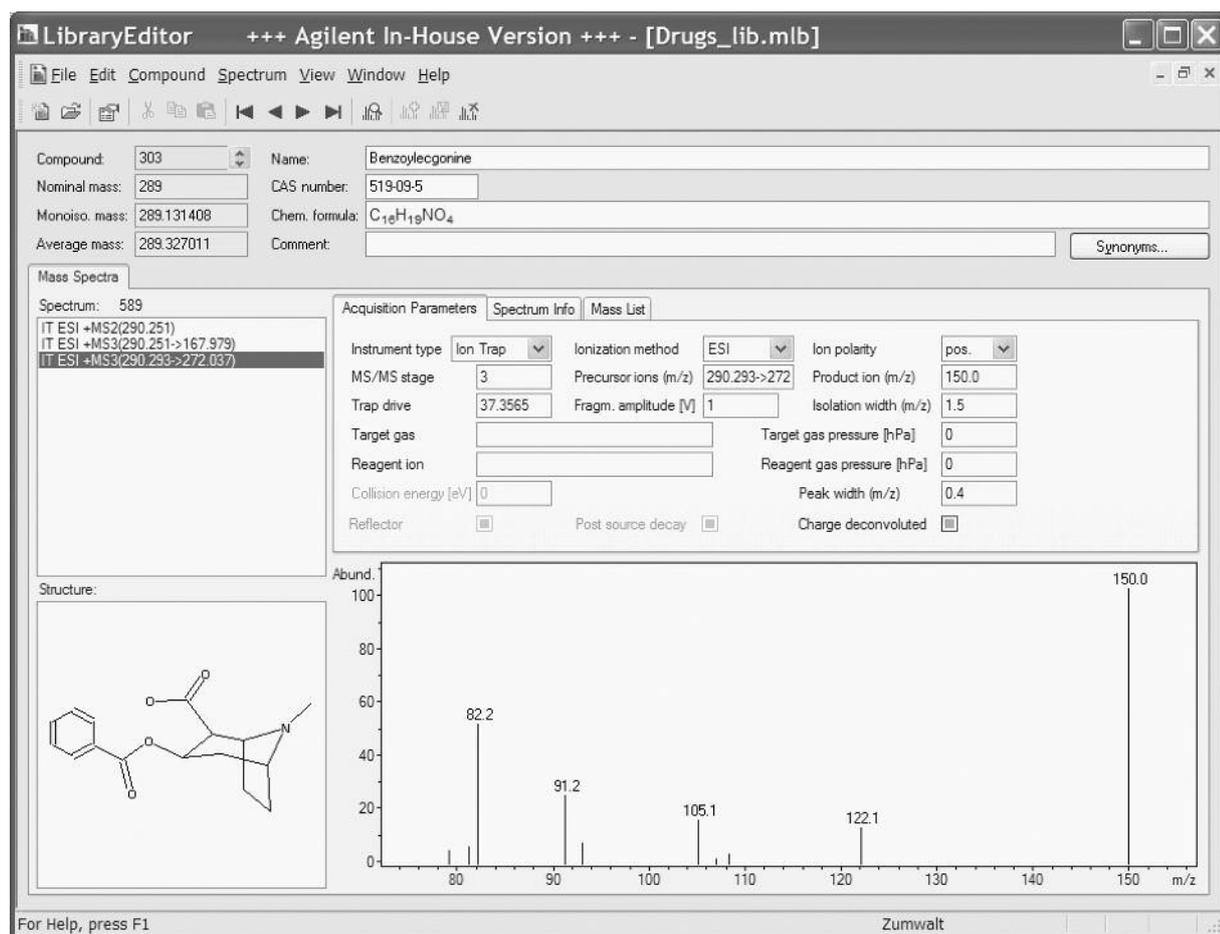


図 15. ベンゾイルエクゴニンに関するライブラリエントリー (MS/MS と MS3 のスペクトル、CAS #、化学式、構造式が記録されています)。ライブラリ内のスペクトルはすべて SmartFrag によって取り込まれたものです。

必要な感度を確認するために、検視血液サンプルのキャリブレーションを最低濃度で分析したときの例を図 16 に示します。検視分析用の低濃度キャリブレーションから、それぞれ 25、25、10、および 25 ng/mL で存在する BE、コカイン、CE、およびメタドンが正確に検出されています。

検視コカインのケースサンプルでは、図 17 のライブラリサーチレポートに示されているとおり、BE とアルブラゾラムを同定しました。BE の含有濃度は、以前、QQQ による分析で 1448

ng/mL と計算されています。QQQ では、コカインと CE もそれぞれ 1.1 ng/mL と 0.1 ng/mL で検出されています。これは、イオントラップ、少なくとも AutoMS3 モードで十分な検出や同定を行うには低すぎる濃度と考えられます。

コカインサンプルで使用した QQQ メソッドはアルブラゾラムを分析対象としたものではありませんでしたが、アルブラゾラムも同定されました。BE およびアルブラゾラムに関するスペクトル対照グラフをそれぞれ図 18a と図 18b に示します。

ライブラリサーチレポート - AutoMS(n)

分析名:	DOA_RT1000013.D	機器名:	Agilent 6340 Ion Trap	印刷日時:	11/16/2007 7:54:16 AM
メソッド:	DOA_MZ_AUTOMS1.M	オペレータ名:	Administrator	取り込み日時:	11/16/2007 1:28:28 AM
サンプル名:	Coc_Cal1				

#	RT [分]	MS(n) 隔離 m/z	化合物名	Fit'	RFit'	Purity'	濃度 (ng/mL)
1	5.3	290.4	ベンゾイルエクゴニン	1000	999	999	25
2	6.0	304.9	コカイン	1000	1000	1000	25
3	6.7	318.3	コカエチレン	999	995	995	10
4	7.3	310.3	メタドン	986	957	955	25

図 16. 低濃度キャリブレーションから検出された BE、コカイン、CE、メタドンと、判明している濃度 (右側) を示すライブラリサーチレポート

ライブラリサーチレポート - AutoMS(n)

分析名:	DOA_RT1000019.D	機器名:	Agilent 6340 Ion Trap	印刷日時:	11/16/2007 8:28:06 AM
メソッド:	DOA_MZ_AUTOMS1.M	オペレータ名:	Administrator	取り込み日時:	11/16/2007 2:45:36 AM
サンプル名:	Case Sample Coc				

#	RT [分]	MS(n) 隔離 m/z	化合物名	Fit'	RFit'	Purity'	濃度 (ng/mL)
1	5.0	290.4	ベンゾイルエクゴニン	962	957	932	1448
2	8.1	309.3	アルブラゾラム	998	974	974	未分析 (QQQ)

図 17. 検視コカインのケースサンプルから検出された BE およびアルブラゾラムと、QQQ による分析によって判明している濃度を示すライブラリサーチレポート

ライブラリサーチレポート - AutoMS(n)

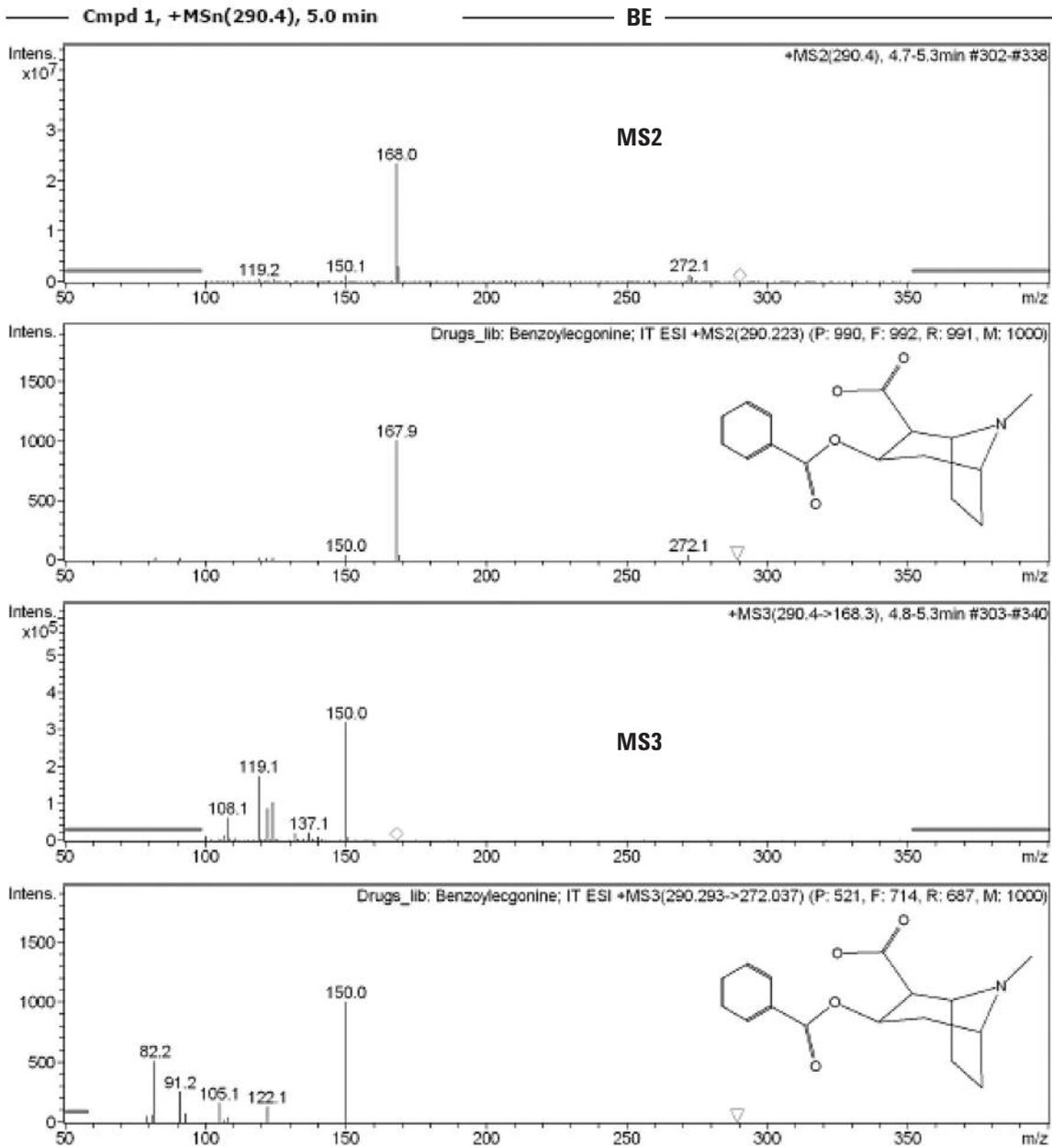


図 18a. 検視コカインのケースサンプルから MS/MS および MS3 レベルで検出された BE に関するスペクトル対照グラフを示すライブラリサーチレポート。ライブラリのスペクトルには構造式が含まれています。

ライブラリサーチレポート - AutoMS(n)

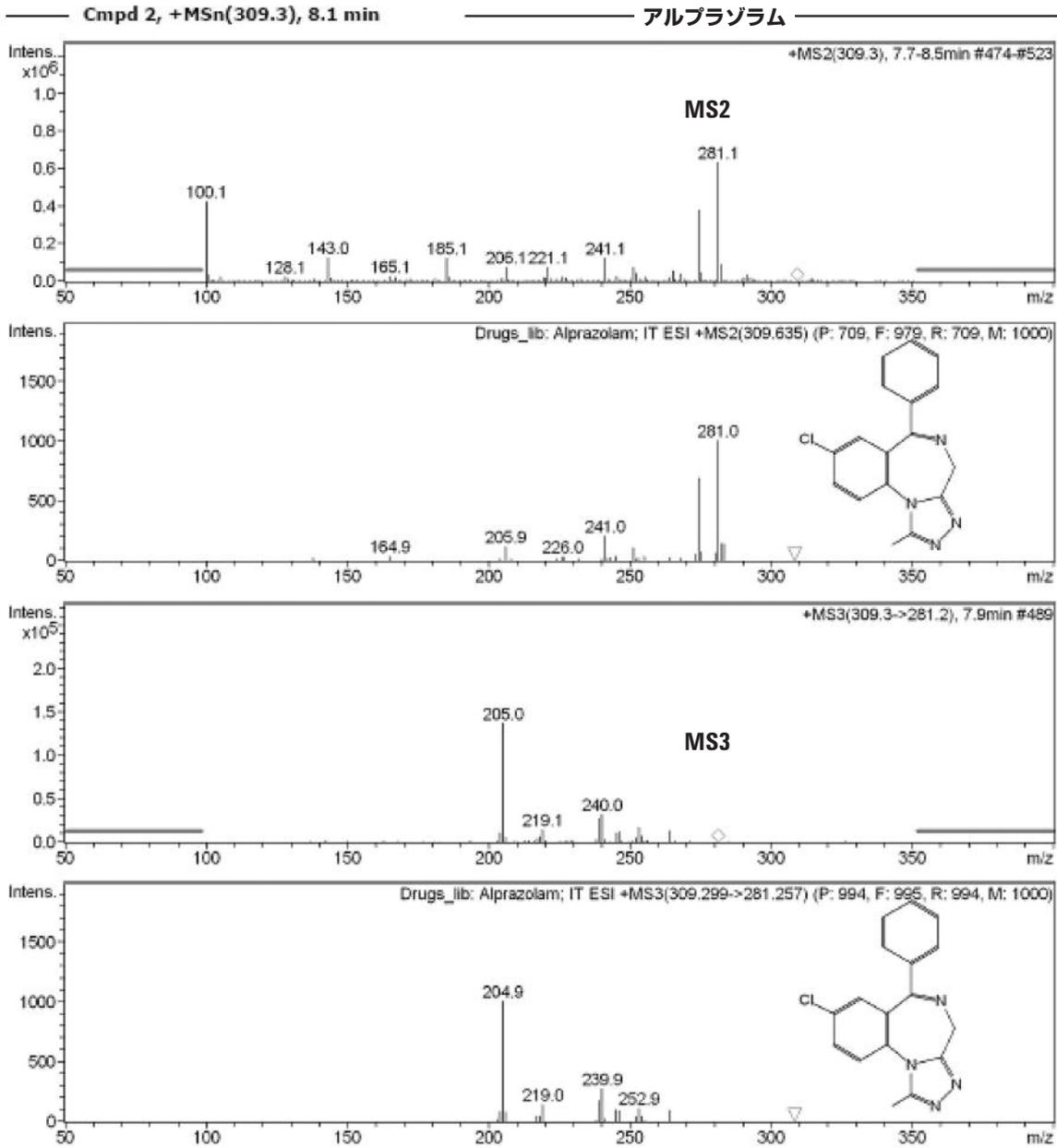


図 18b. 検視コカインのケースサンプルから MS/MS および MS3 レベルで検出されたアルプラゾラムに関するスペクトル対照グラフを示すライブラリサーチレポート。ライブラリのスペクトルには構造式が含まれています。

検視メタドンのケースサンプルでは、図 19 のライブラリサーチレポートに示されているとおり、メタドンとセルトラリンを同定しました。メタドンの含有濃度は、以前、QQQ による分析で 1,135 ng/mL と計算されています。セルトラリンの存在は、RTI 社のレポート執筆者によって示唆されていましたが、今回、イオントラップライブラリの使用によって確認されました。

メタドンおよびセルトラリンに関するスペクトル対照グラフをそれぞれ図 20a と図 20b に示します。

Time-of-Flight 質量分析計

検視血液

Agilent の TOF 装置は、質量精度 2 ppm よりも高い精度で質量スペクトルを取り込むことができます。さらにこの装置は、

m/z 118 において半値全幅 10,000 以上の仕様分解能という優れたスペクトル分解能を備えています。この分解能は 12 mDa 未満のピーク幅に相当します。本調査で測定したイオン質量の範囲 (m/z 300 前後) は、ピーク幅は 25 mDa 前後です。このような狭いピークに関しては、S/N を高めて SQ と同じような定量を行うために、抽出イオンクロマトグラム (EIC) を ± 10 ppm まで幅を絞った抽出ウィンドウで生成できます。

こうした EIC で検視分析の低濃度キャリブレーションに関する分析結果を表示した例を図 21 に示します。EIC には質量精度も表示され、その質量精度を中心として ± 10 ppm の EIC が生成されます。たとえば、コカインの場合、化学式は $C_{17}H_{21}NO_4$ で、プロトン化イオン分子 $(M+H)^+$ の精密質量は 304.1543 です。図 21 のコカインの EIC では、304.1543 というイオン質量が中心に置かれ、S/N が良好であるため優れた質量精度が出ています。

ライブラリサーチレポート - AutoMS (n)

分析名:	DOA_METHCASE002.D	機器名:	Agilent 6340 Ion Trap	印刷日時:	11/16/2007 10:15:29 AM
メソッド:	DOA_MZ_AUTOMS1.M	オペレータ名:	Administrator	取り込み日時:	11/16/2007 9:35:58 AM
サンプル名:	Meth Case Sample				

#	RT [分]	MS (n) 隔離 m/z	化合物名	Fit'	RFit'	Purity'	濃度 (ng/mL)
1	7.4	310.7	メタドン	991	934	932	1135
2	8.5	307.6	セルトラリン	978	989	972	キャリブレーションなし

図 19. 検視メタドンのケースサンプルから検出されたメタドンおよびセルトラリンと、QQQ による分析によって判明しているメタドンの濃度を示すライブラリサーチレポート

ライブラリサーチレポート - AutoMS (n)

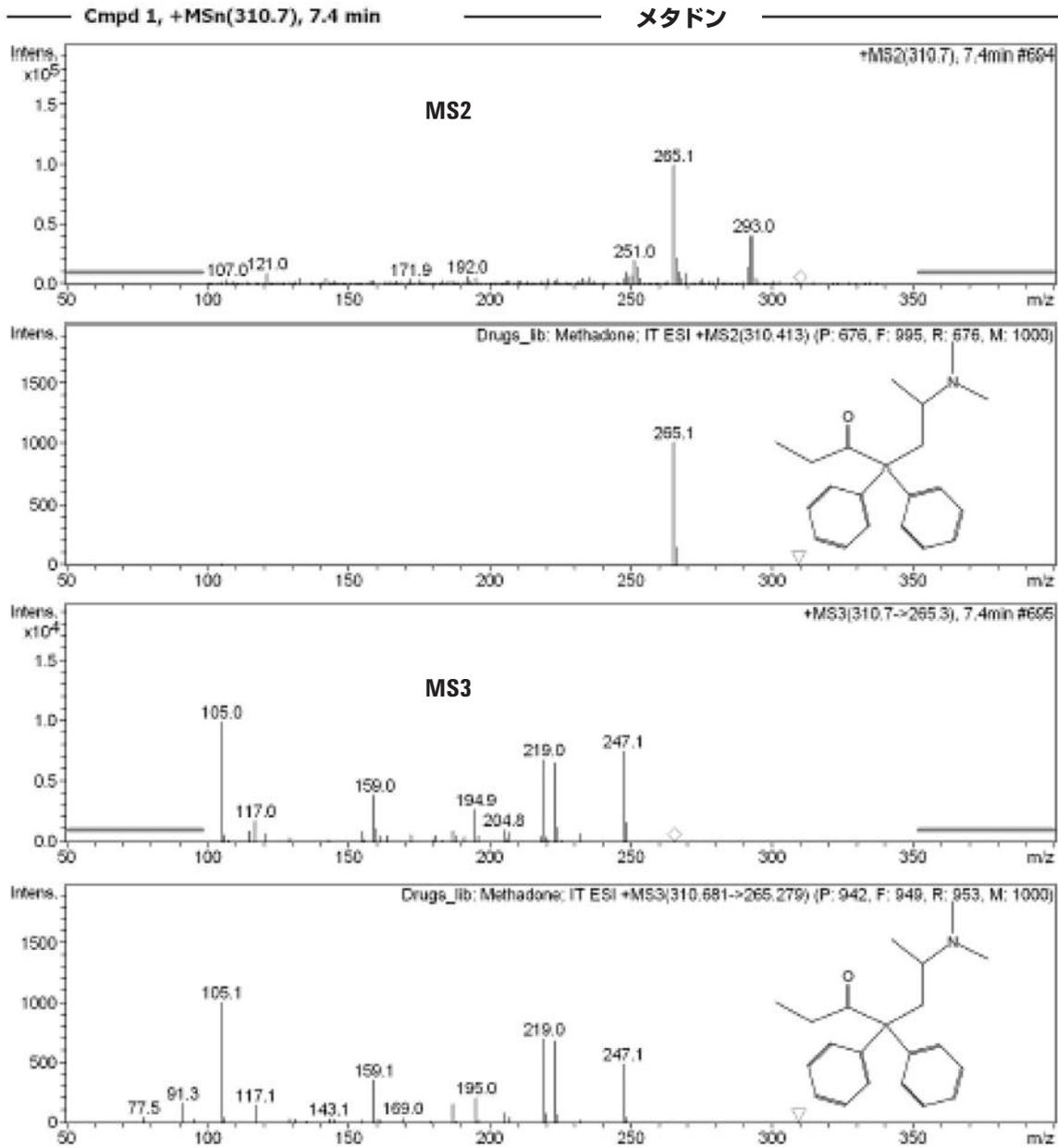


図 20a. 検視メタドンのケースサンプルから MS/MS および MS3 レベルで検出されたメタドンに関するスペクトル対照グラフを示すライブラリサーチレポート。ライブラリのスペクトルには構造式が含まれています。

ライブラリサーチレポート - AutoMS (n)

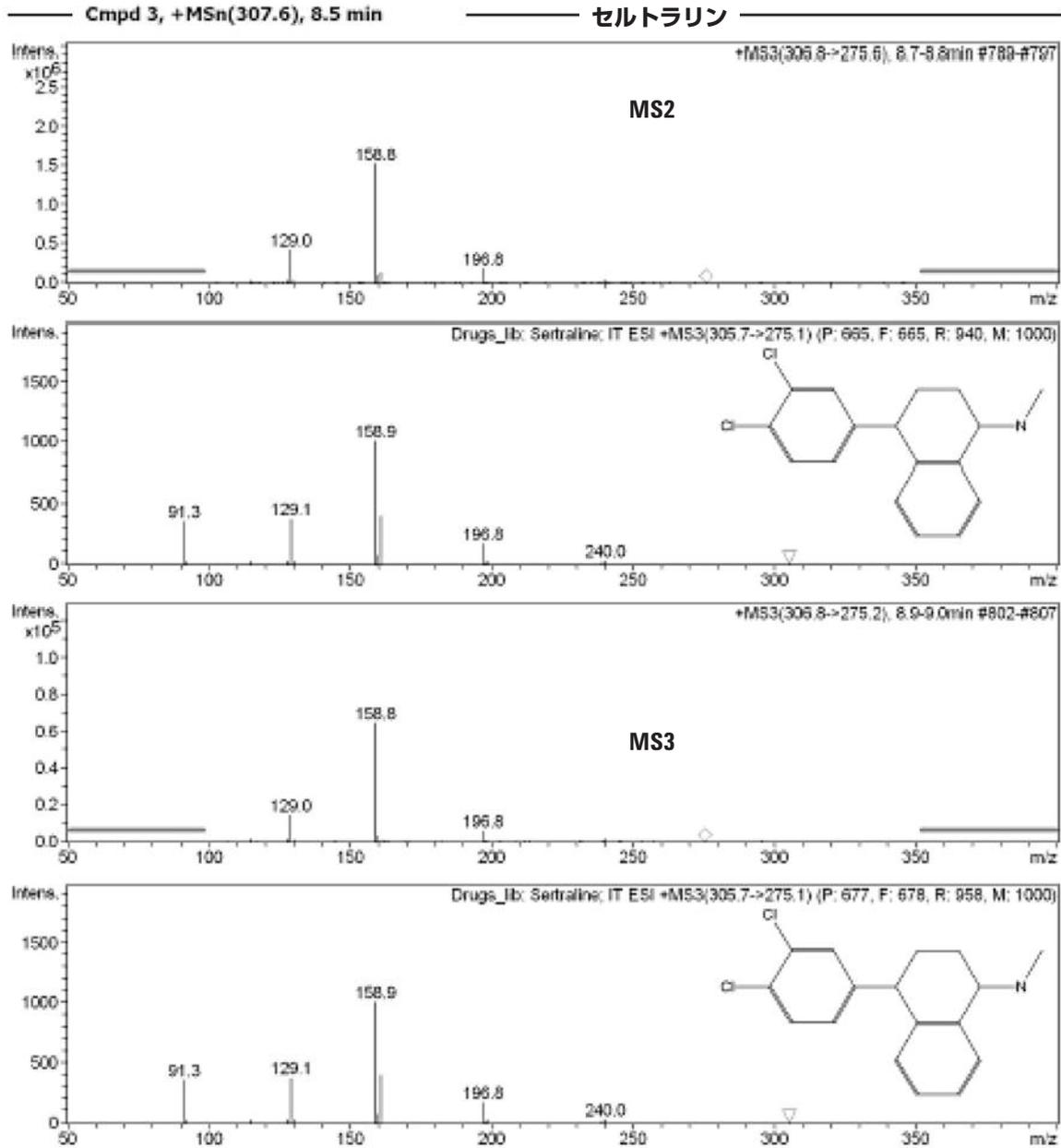


図 20b. 検視メタドンのケースサンプルから MS/MS および MS3 レベルで検出されたセルトラリンに関するスペクトル対照グラフを示すライブラリサーチレポート。ライブラリのスペクトルには構造式が含まれています。

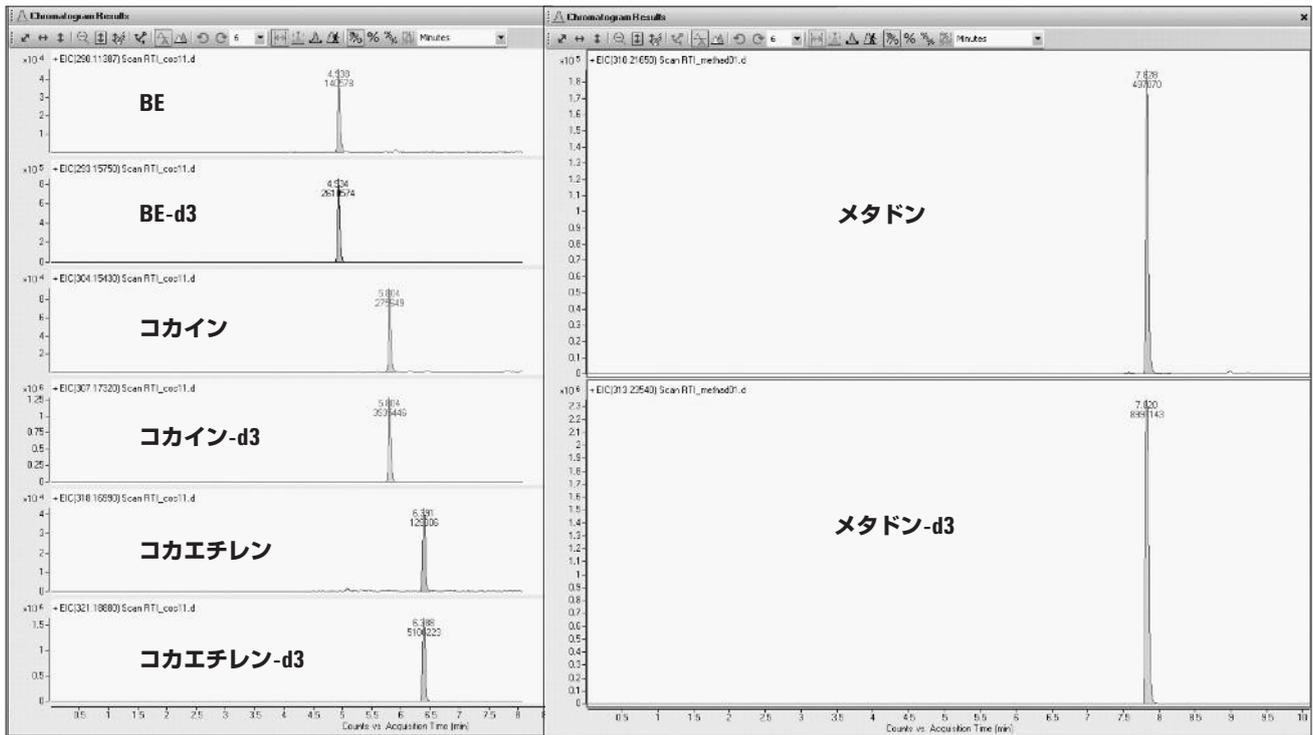


図 21. BE、コカイン、メタドン (25 ng/mL)、および CE (10 ng/mL) からなる低濃度検視キャリブレーションに関する± 10 ppm の抽出イオンクロマトグラム

表 1 の各レベルで測った検量線を図 22 に示します。コカインおよび CE に見られる非線形性は検出器の飽和に起因するものです。これまでの各機器では注入量を 5 μ L ですが、それを 2 μ L にまで減らしても飽和してしまいました。図 21 の低濃度キャリブレーションの結果は、TOF 機器の感度がいかに良いかを示すものです。図 22 では、コカインと CE の場合でも低濃度域に直線性が見られます。こうした検量線は定量にも十分使用できますが、詳細な分析には希釈物を使用することをお勧めします。

この後に行ったコカインのケースサンプルに関する定量結果を図 23 に示します。BE = 1,632 ng/mL、コカイン = 12.5 ng/mL、CE = 6.4 ng/mL という結果が得られました。図 24 に示したとおり、メタドンは少なくとも 1,200 ng/mL のレベルで飽和していました。

検視血液

DUID 分析については、5 ng/mL の低濃度キャリブレーションの EIC を図 25 に示します。このレベルでは、3 つの化合物がどれも定量限界の近くにあることがわかります。それぞれの検量線を図 26 に示します。各検量線は表 1 に示されている濃度域を超えています。ノルジアゼパムとジアゼパムのグラフには検出器飽和に起因する非線形性が見られます。注入量は 5 μ L ですが、今後の作業では量を減らすか、希釈することをお勧めします。前述のとおり、乾固サンプルの還元濃度や注入量を決定するときに見積もった TOF の感度は低過ぎました。

この後で行った DUID のケースサンプルの定量結果を表 7 にまとめ、DUID のケースサンプル 0024 のクロマトグラムを図 27 に示します。いずれのサンプルからもノルジアゼパムとジアゼパムは検出できませんでした。これに対して、SQ では、定量できなかったとはいえ、少なくともその存在を確認することはできました。

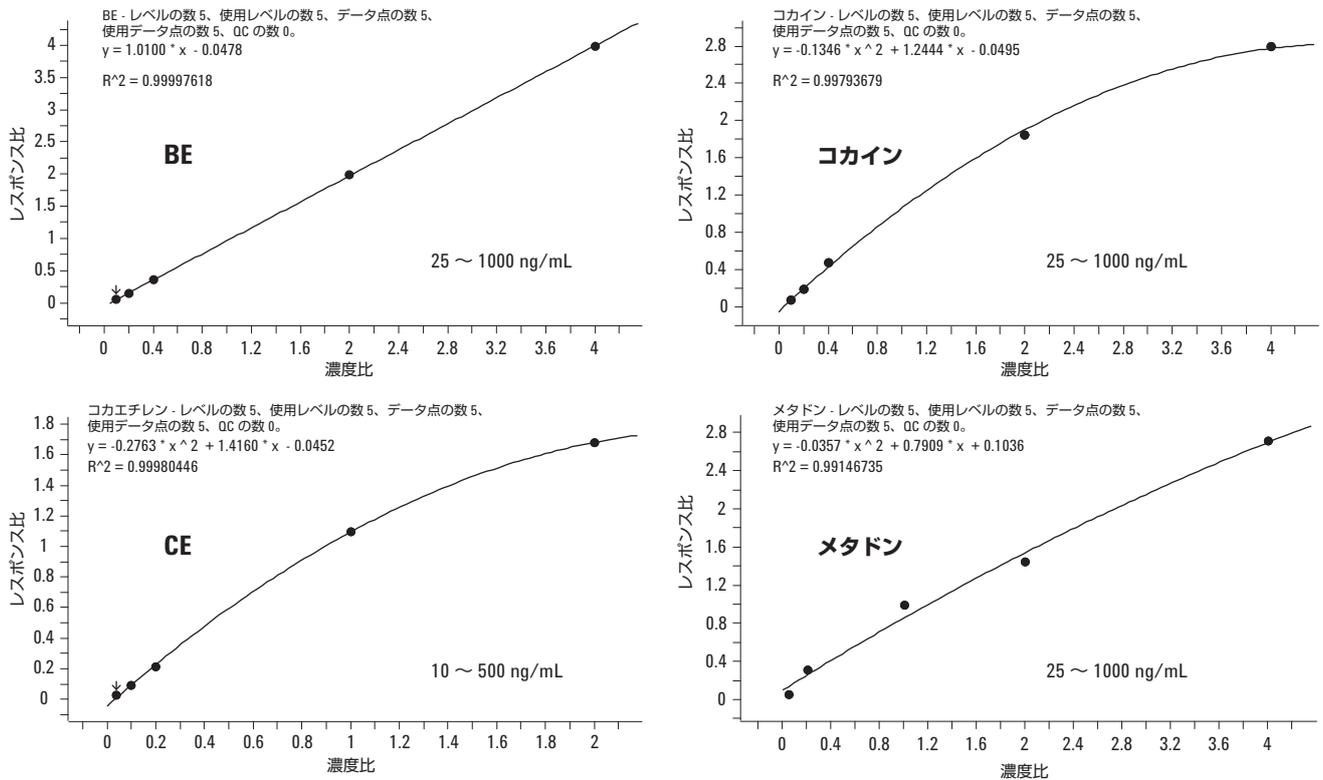


図 22. 検視サンプルの各化合物に関する検量線。コカインと CE では検出器飽和が見られたため非線形となりましたが、注入量を 2 μ L に減らしても解消しませんでした。

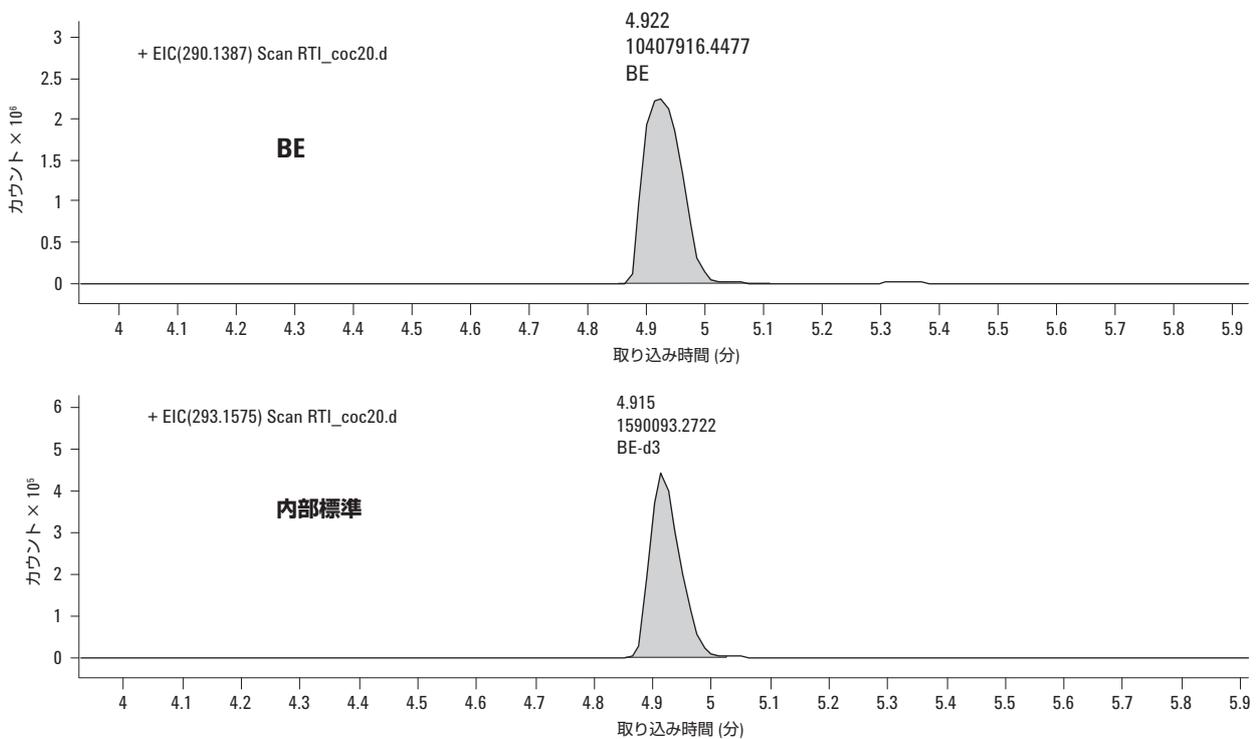


図 23. TOF で分析したコカインのケースサンプル: BE 1,632 ng/mL、コカイン 12.5 ng/mL、および CE 6.4 ng/mL

(続く)

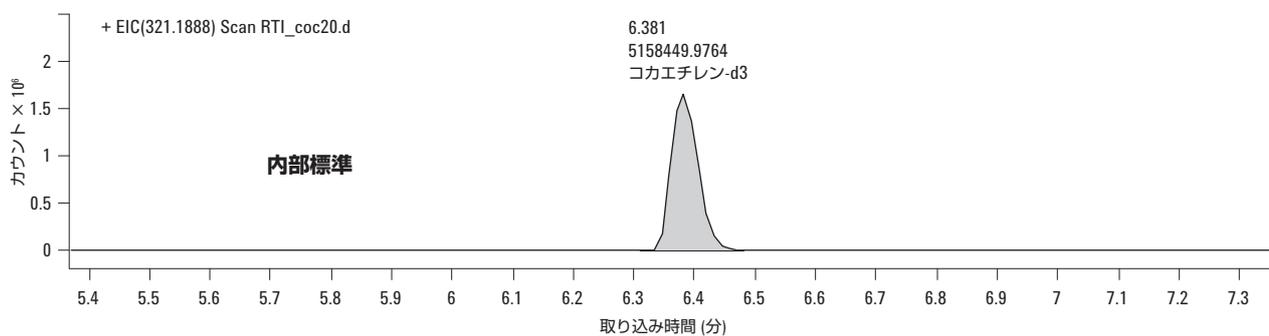
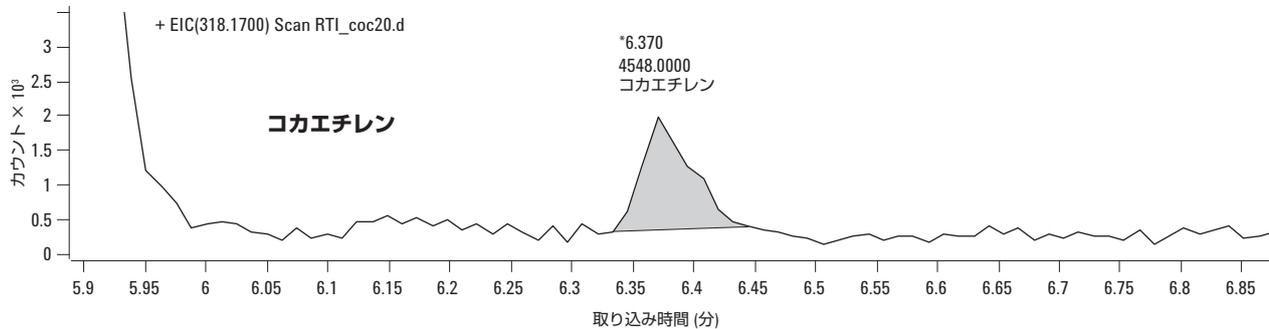
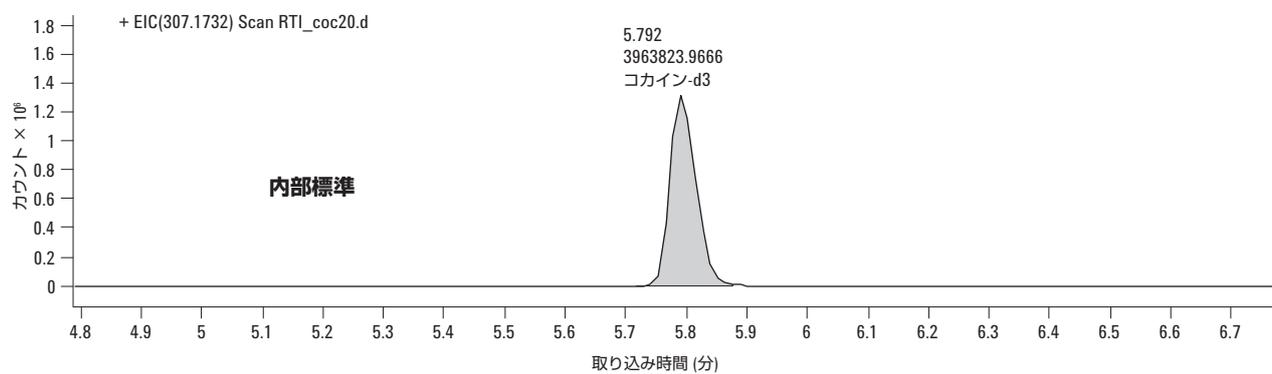
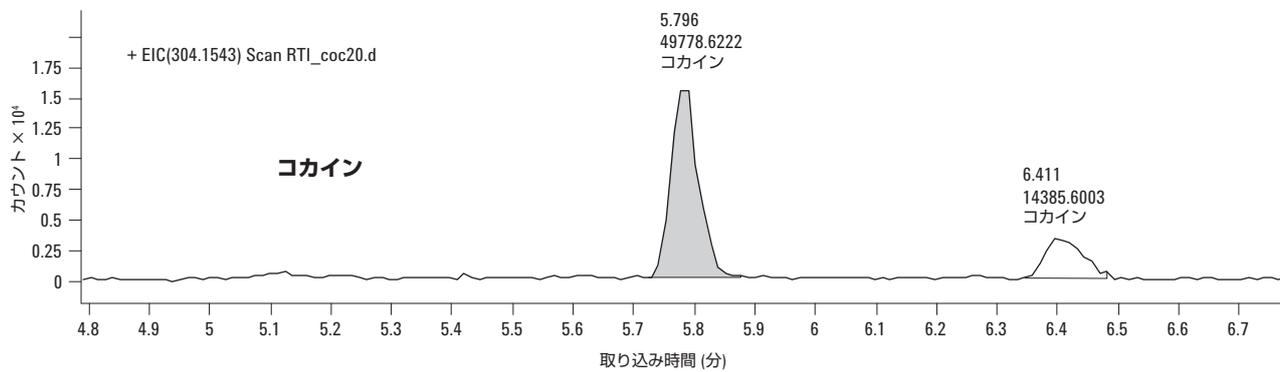


図 23. TOF で分析したココインのケースサンプル : BE 1,632 ng/mL、ココイン 12.5 ng/mL、および CE 6.4 ng/mL

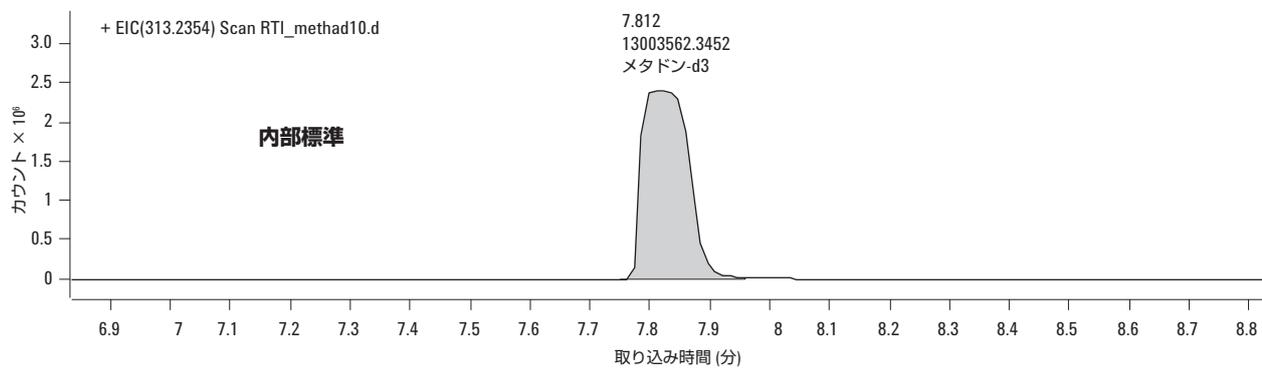
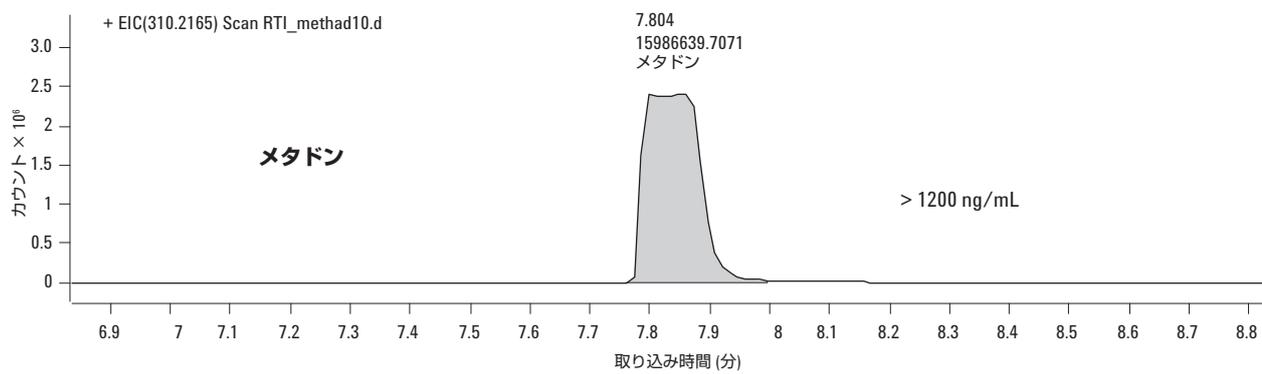


図 24. TOF で分析したメタドンのケースサンプルに見られる検出器飽和 (レベル > 1,200 ng/mL)

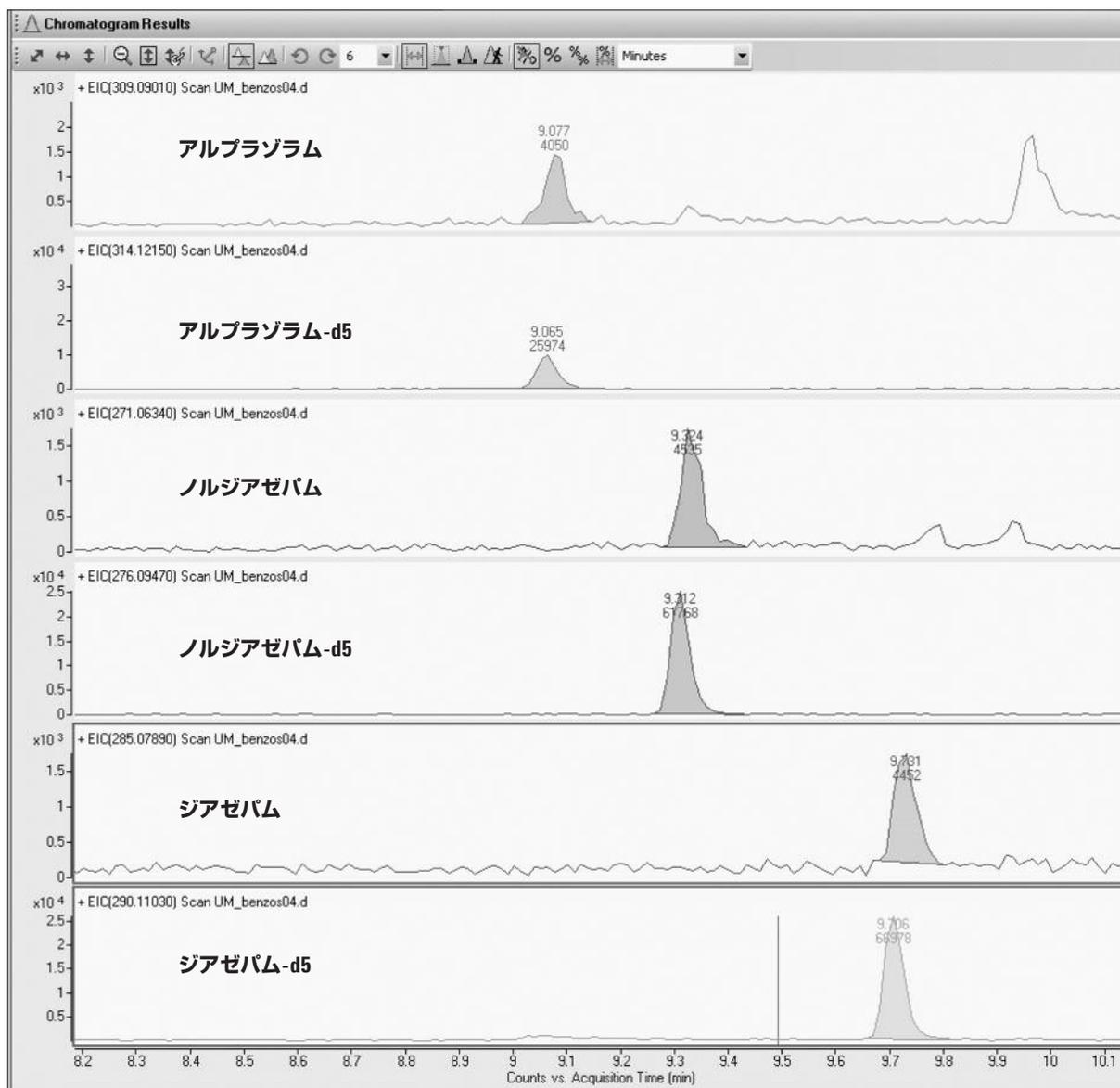


図 25. アルプラゾラム、ノルジアゼパム、ジアゼパム (5 ng/mL) からなる DUID 低濃度キャリブレータに関する ± 10 ppm の抽出イオンクロマトグラム

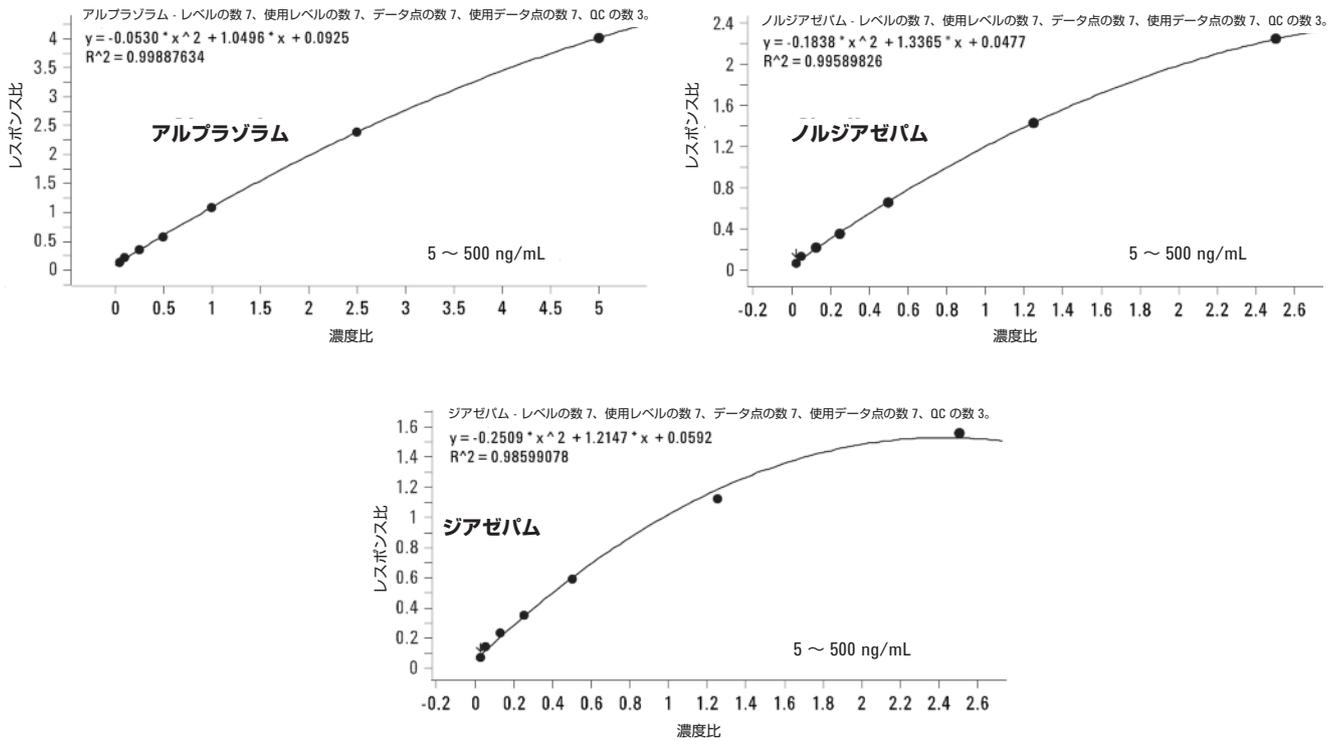


図 26. DUID 検査サンプルの各化合物に関する検量線。ノルジアゼパムとジアゼパムでは検出器飽和のために非線形になりました。

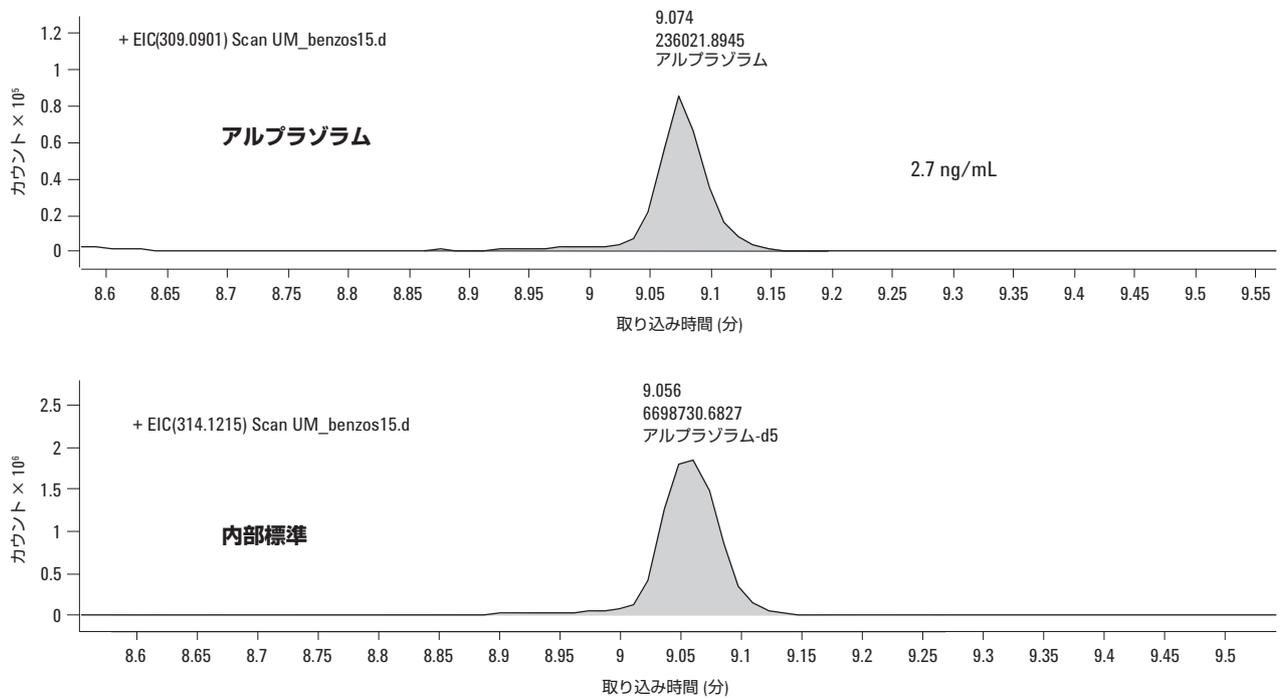


図 27. DUID 検査のケースサンプル 0024 について定量されたアルプラゾラムの濃度 (2.7 ng/mL)

表 7. TOF によって定量された各ケースサンプルのベンゾジアゼピン類含有濃度 (いずれのサンプルからもノルジアゼパムとジアゼパムは検出不能)

DUID 検査 ベンゾジアゼピン類の ケースサンプル (TOF)	定量結果 (ng/mL)		
	アルプラゾラム	ノルジアゼパム	ジアゼパム
0024	2.7	-	-
0062	39.0	-	-
0083	7.8	-	-
0476	89.1	-	-
0531	69.2	-	-
0580	9.0	-	-

四重極 Time-of-Flight 質量分析計

検視血液

Agilent QTOFの MS モードでは、TOF の場合とまったく同じ挙動が観察されました。SQ および TOF でイオン源 (ESI) や検出器が飽和していたので、TOF の調査で見られた非線形性を解消するためにサンプルの注入量を 0.1 μ L にまで減らしました。QTOF

では、MS モードでのみ定量を行いました。MS/MS モードで定量を行うこともできますが、MS モードほどの感度は得られません。一般に、分離能の高い MS モードでは、共溶出干渉物の影響が排除され、イオン抑制もありません。

TOF の場合と同じように、低濃度検視サンプルキャリブレーションの各含有化合物の抽出イオンクロマトグラム (EIC) を図 28 (コカイン、BE、および CE) と図 29 (メタドン) に示します。各 EIC は、各化合物のプロトン化分子の精密質量を中心とした ± 10 ppm のウィンドウで作成したものです。

対応する検量線を図 30 に示します。各検量線は表 1 に示されている濃度域を超えています。注入量を 5 μ L から 0.1 μ L へ 50 分の 1 に減らすと、良好な直線性が得られました。こうした検量線に基づいてサンプルを定量した結果を図 31 および 32 に示します。コカインのサンプルには、コカイン = 26.1 ng/mL、BE = 1539.6 ng/mL、CE = 10.4 ng/mL が含まれているという結果が出ました。メタドンのサンプルでは、メタドンの定量値が 898.1 ng/mL でした。

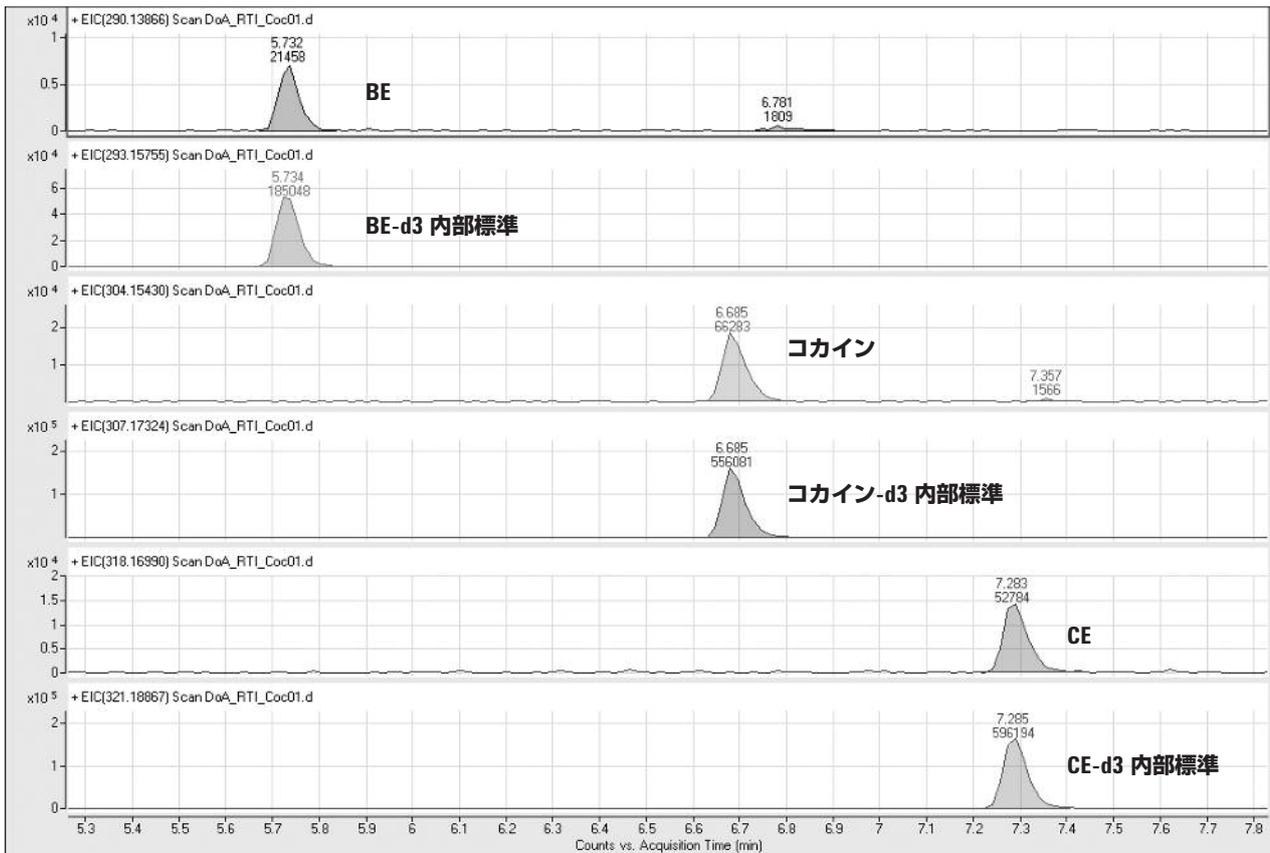


図 28. 検視サンプルで分析された低濃度キャリブレーションに関する EIC (± 10 ppm) : 0.1 μ L の注入量で BE およびコカイン (25 ng/mL)、CE (10 ng/mL)

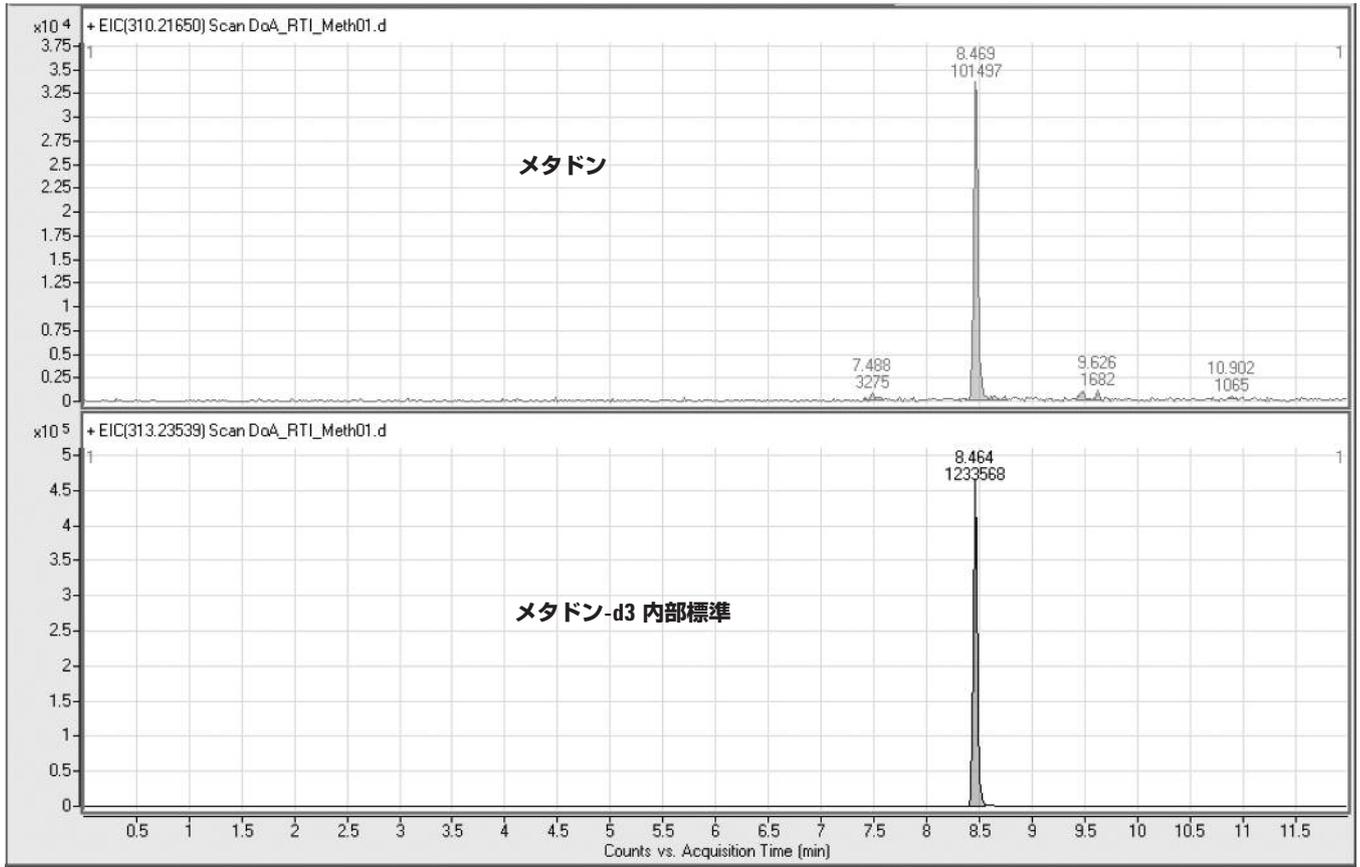


図 29. 0.1 μ L の注入量で検視サンプルの低濃度キャリブレーションに 25 ng/mL の濃度で含まれるメタドンの EIC (± 10 ppm)

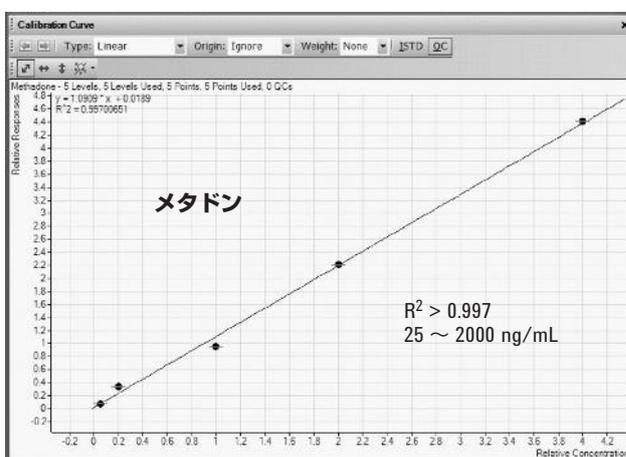
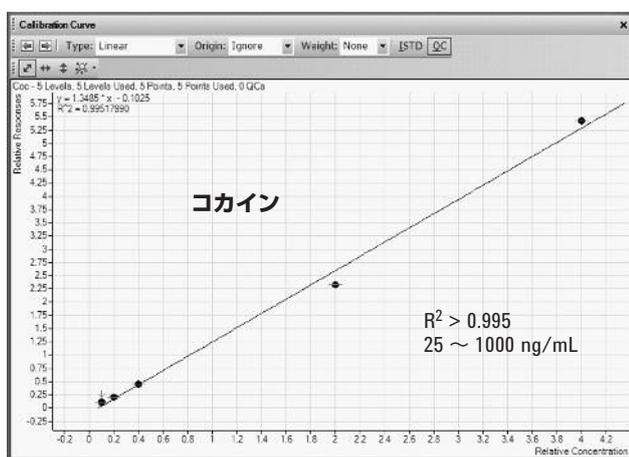
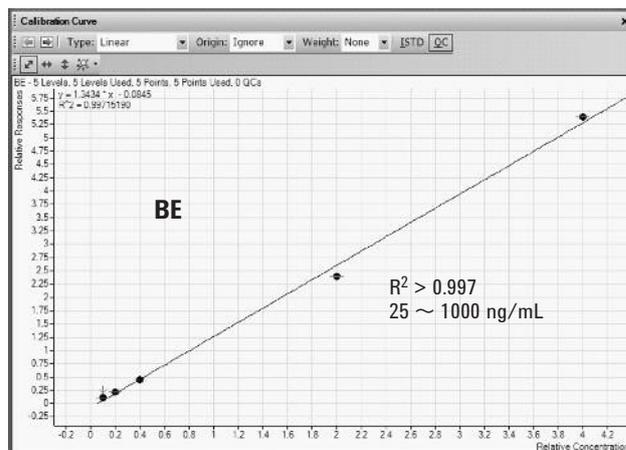
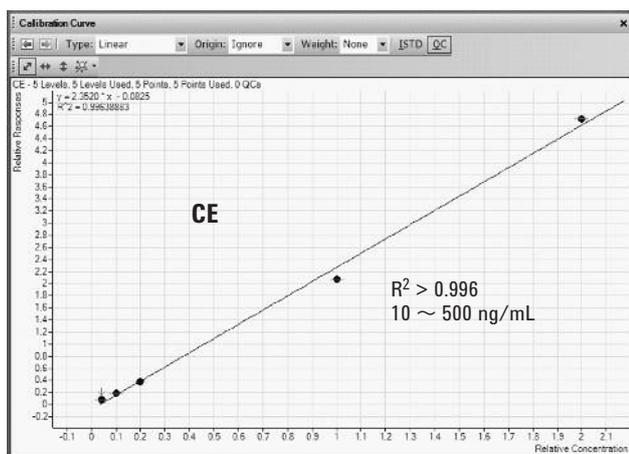


図 30. 検視サンプル分析時の各化合物に関する検量線

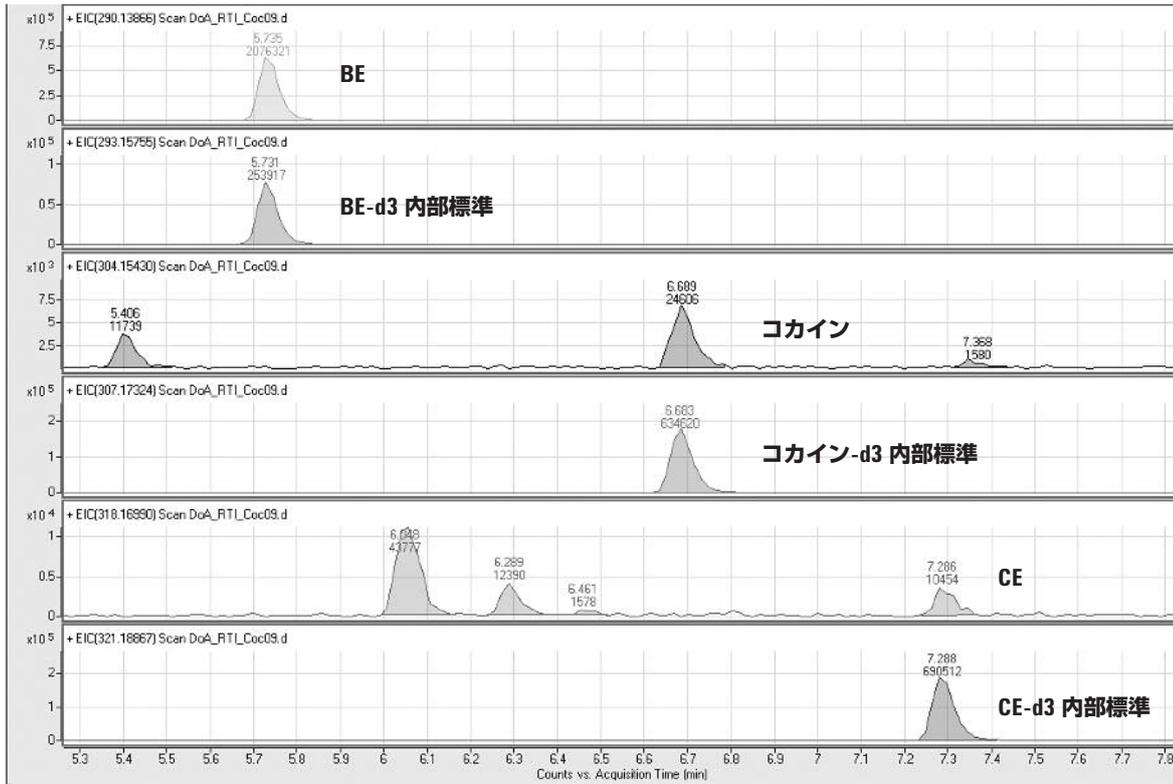


図 31. コカインのサンプルの EIC (± 10 ppm) に表示された各化合物の定量結果 (BE = 1539.5 ng/mL、コカイン = 26.1 ng/mL、CE = 10.4 ng/mL)

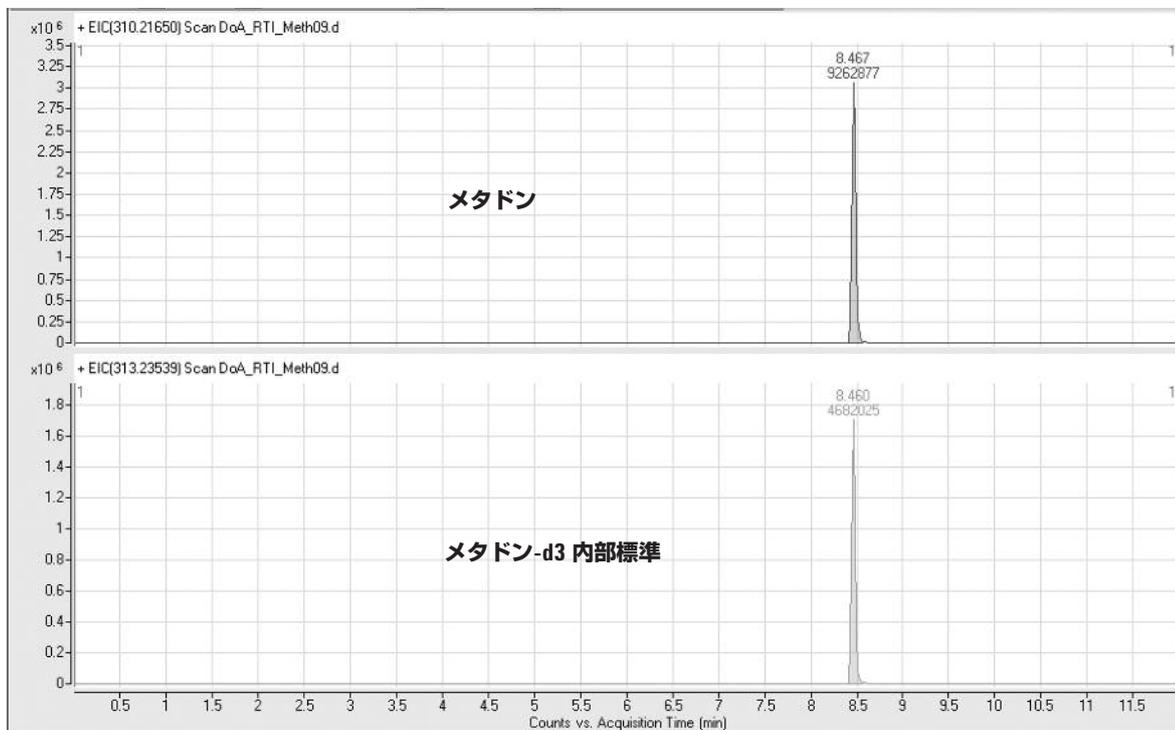


図 32. メタドンのケースサンプルの EIC (± 10 ppm) に表示されたメタドンの定量結果 (898.1 ng/mL)

DUID 検査血液

QTOF による DUID 検査サンプルの分析でも、注入量は 0.1 μ L にしました。5 ng/mL の低濃度キャリブレータに含有されるアルプラゾラム、ノルジアゼパム、およびジアゼパムの定量結果を図 33 に示します。良好な S/N が観察されることから、さらに低い濃度でも定量可能と考えられます。

5 ng/mL から 500 ng/mL までの各化合物に関する検量線と、サンプル 0024 でのアルプラゾラムの定量結果 (0.5 ng/mL) を図 34 に示します。他の 2 つの化合物はこのサンプルから検出できませんでした。すべての DUID 検査ケースサンプルに関する定量結果を表 8 にまとめます。

表 8. QTOF の MS モードで定量された各ケースサンプルのベンゾジアゼピン類含有濃度 (いずれのサンプルからもノルジアゼパムとジアゼパムは検出不能)

DUID 検査ベンゾジアゼピン類のケースサンプル (QTOF の MS モード)	定量結果 (ng/mL)		
	アルプラゾラム	ノルジアゼパム	ジアゼパム
0024	0.5	–	–
0062	35.8	–	–
0083	3.6	–	–
0476	62.7	–	–
0531	70.9	–	–
0580	1.3	–	–

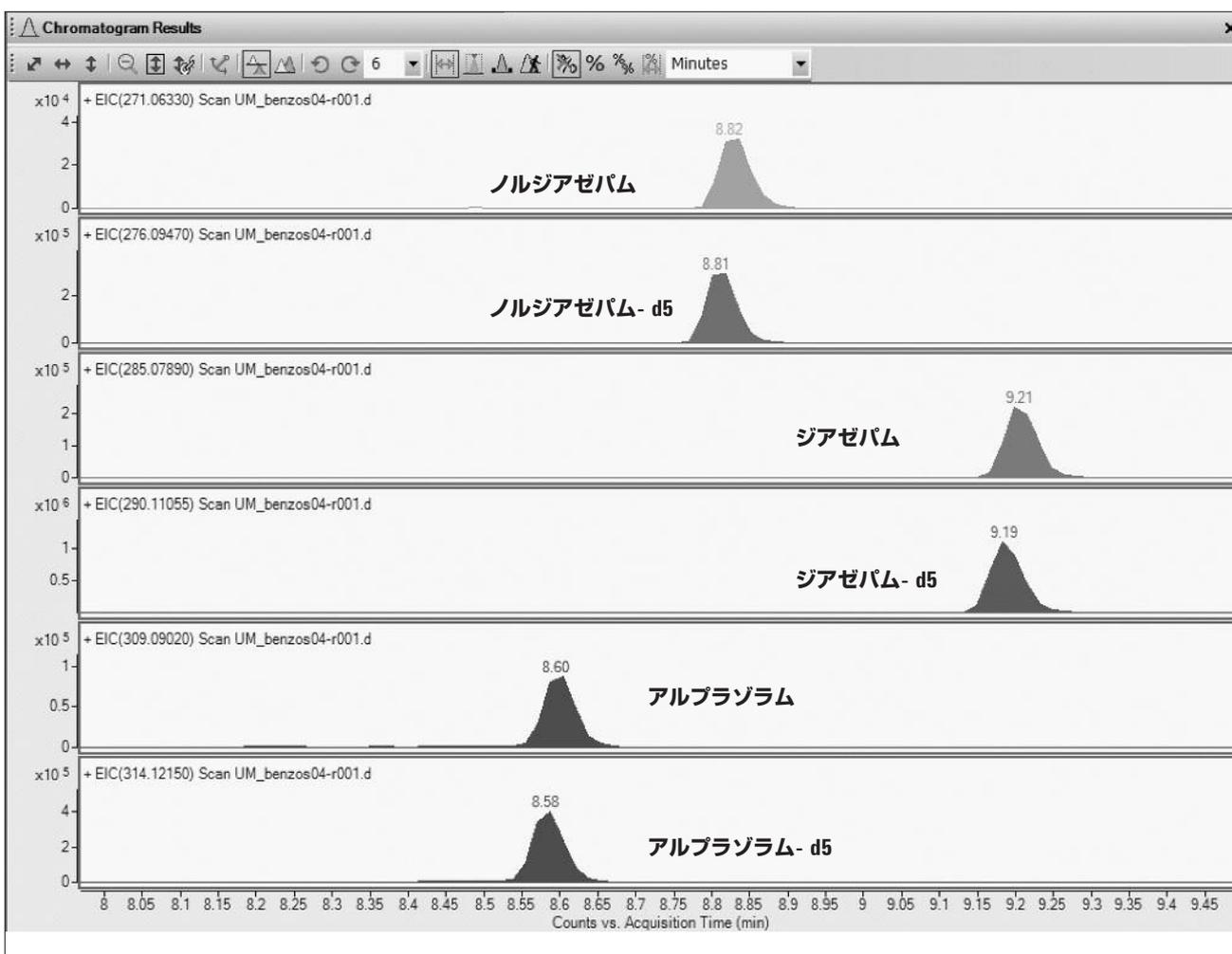


図 33. アルプラゾラム、ノルジアゼパム、ジアゼパム (5 ng/mL) からなる DUID 検査分析用低濃度キャリブレータの EIC (± 10 ppm)

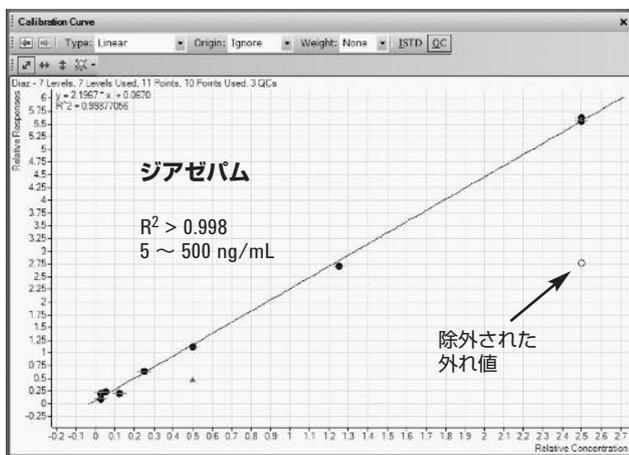
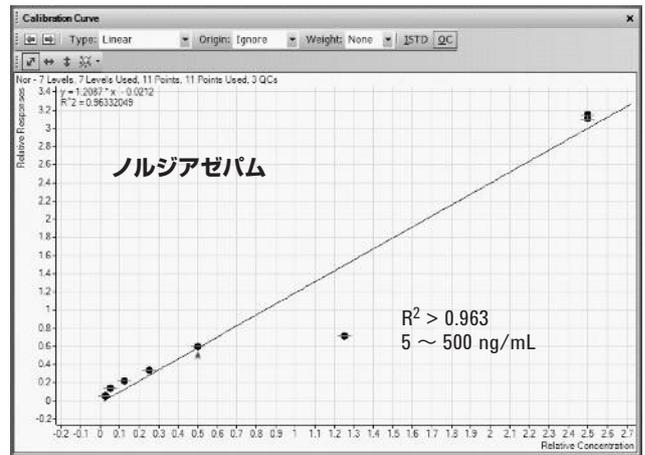
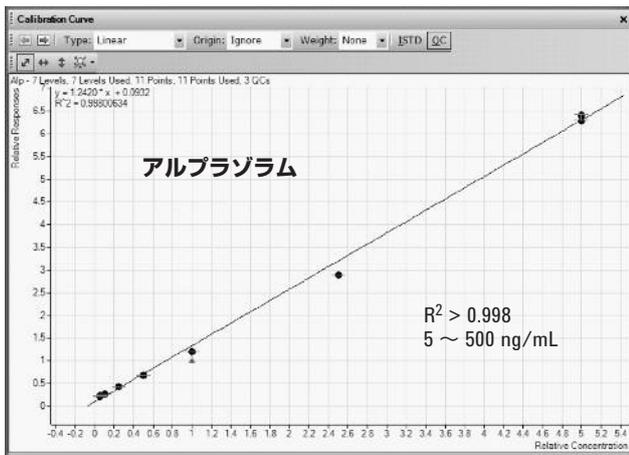


図 34. 5 ~ 500 ng/mL の濃度範囲を超えた DUID 検査分析対象アルプラゾラム、ノルジアゼパム、およびジアゼパムの検量線

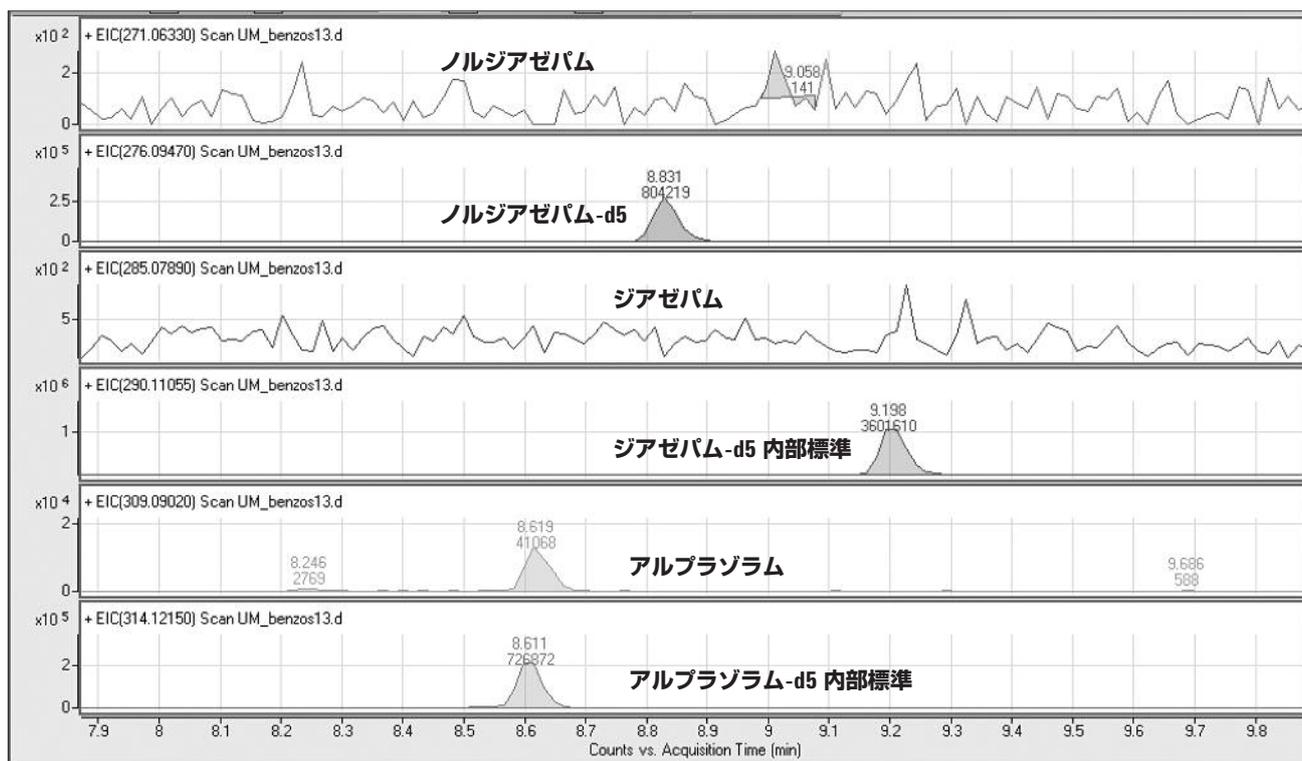


図 35. DUID 検査ケースサンプル 0024 に関するアルプラゾラムの定量結果 (0.5 ng/mL)。ノルジアゼパムとジアゼパムは検出不能。

TOF の場合と同様、サンプルの同定は使用機器の質量精度に大きく依存しているため、分子式を完全には絞り込めない場合も多く、分子量の僅かに異なる化学式が、1 つ、または 2 つ最後まで候補として残されることもあります。同位体分布や窒素ルールも大きな影響を与えます。たとえば、窒素ルールによれば、分子量が偶数のプロトンは、奇数個の窒素原子を含む構造でなければなりません。同位体分布は分子内の同位体の自然存在比によって決まります。化合物の存在を確認するには、こうした要因がすべて重要な意味を持ちます。

図 36 は、化学式に基づいたコカエチレンの確認に分子式判定プログラムというデータ処理ソフトウェアのアルゴリズムを使用した例です。質量精度、同位体分布、窒素ルールのいずれに関する考慮が欠けても、このプログラムで $C_{18}H_{23}NO_4$ という化学式に基づいたコカエチレンを確認することはできません。

唯一の問題は、1 つの化学式が何通りかの構造をとることがあるということです。このため、存在の予想される化合物の標準物質を購入し、同じ LC 条件で分析してリテンションタイムが一致するかどうかを調べるというのが一般的なやり方です。

リテンションタイムの確認に加えて、精密な質量の MS/MS 測定を行えば、構造の特定が上がります。こうした実験では、プロダクトイオンの化学式を調べ、その上で、どのプリカーサイオンがそのプロダクトイオンの生成に最も有用であるかを決定することができます。

QTOF の MS モード (つまり、TOF MS モード) の質量精度は、TOF と同じで、2 ppm 未満です。MS/MS レベルでは、通常、質量精度は 5 ppm 未満です。図 37 は、コカインの精密な MS/MS スペクトルを示したものです。候補として表示されている構造と比較してみると、MS/MS スペクトル内の各ピークは良好な精密質量 (分子量) を示しています。この図に示されている各プロダクトイオン構造は、1998 年発行の『Journal of Mass Spectrometry』の記事 [4] に記載されていたものです。 m/z 121.05058 という低質量リファレンスイオンよりも下の質量範囲では質量誤差が 5 ppm を超えます。これは、リファレンスイオンの質量範囲から外れているということ以外に、S/N にも原因があります。つまり、バックグラウンドノイズから分析対象物のシグナルを拾い出しているということです。さらに、精密質量 (分子量の正確な値) が誤差計算の分母になるため、精密質量 (分子量) が小さくなるほど、質量誤差は大きくなります。

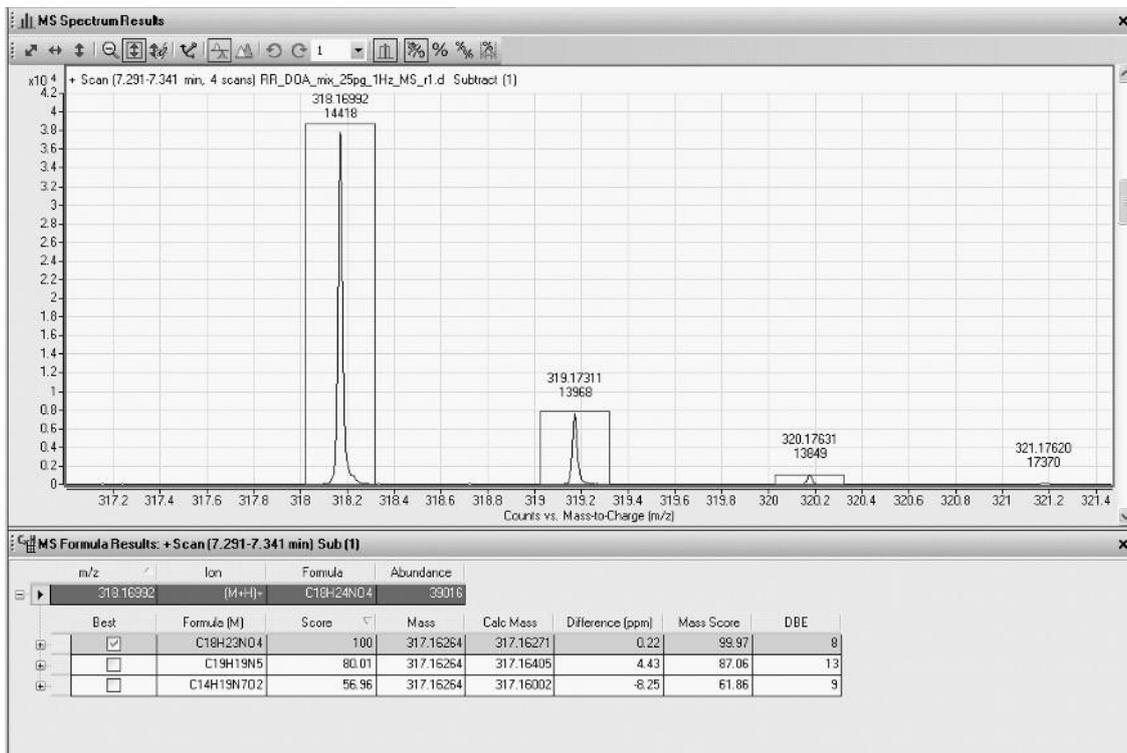


図 36. 分子式判定プログラムによるコカエチレンの特定

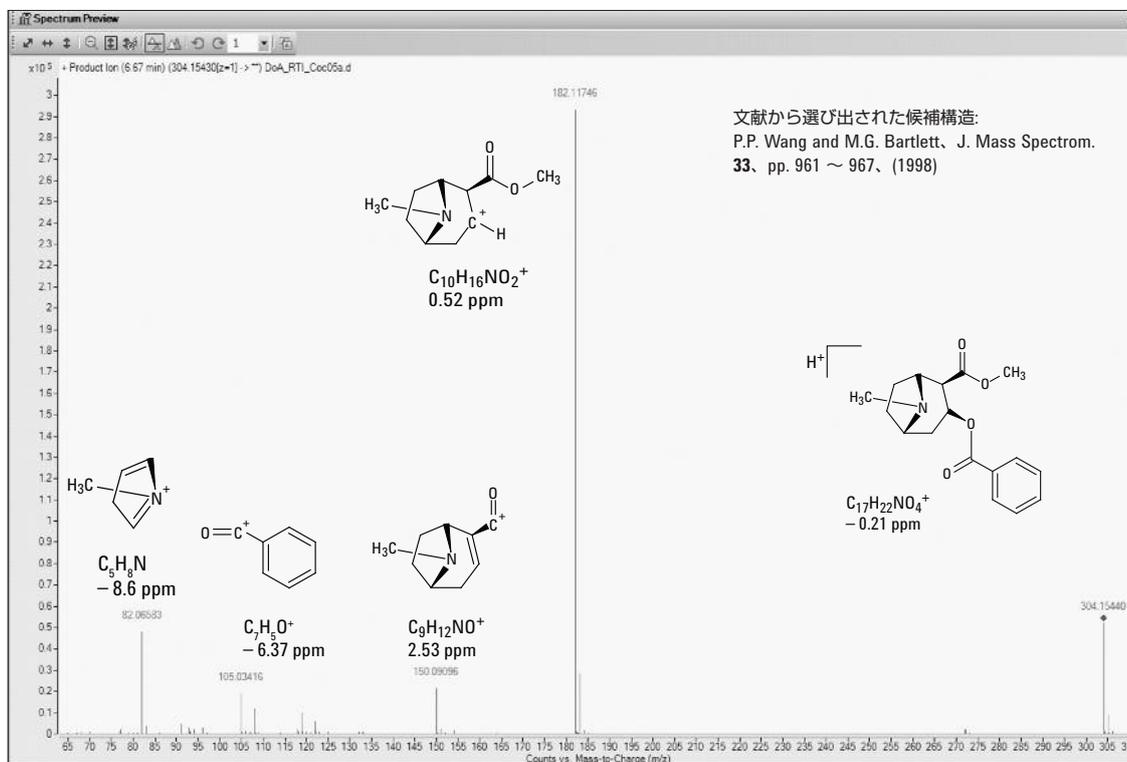


図 37. コカインに標的を絞った MS/MS

結論

本調査で使用したすべての装置で、最低濃度のキャリブレーションレベルですべての分析対象物質を検出できました。定量については、結果に示したとおり、QQQ が最も優れた性能を示し、それに次ぐ装置が SQ でした。どちらも低濃度で良好な再現性があり、それは QQQ では特に顕著でした。この種の分析に QQQ を使用する利点には、SQ と比較してサンプル前処理の手間が省けるということも挙げられます。SQ で最も感度の良い動作モードは SIM であり、QQQ の場合は MRM がそれに当たります。どちらの装置も毒物検査で主定量機として使用します。

感度はイオントラップ、フルスキャン MS/MS と MS3 モードで高い値を示しましたが、共溶出干渉物の影響を受けやすく、必ずしも定量用途での最適な選択肢にはなりません。定量の再現性を確保するためには、通常、10 秒というオーダのピーク幅が必要とされます。このピーク幅は、本調査で最新式のサブ 2 ミクロン高速分離 LC 装置とカラムを使用して取り込んだピーク幅の 2 倍を超える長さです。

TOF と QTOF は、それぞれ MS モードと MS/MS モードにおいて EIC の幅を絞るという形で定量感度を上げることのできる装置です。ただし、本調査では、QTOF での定量を MS モードで行いました。MS モードには多くのアプリケーションで MS/MS モードに劣らぬ感度があることがわかりました。これはおそらく、このモードの分解能によって目的的分析対象物が共溶出干渉物から上手に切り分けられる結果と考えられます。

化合物の同定を目的とした定性作業の場合、MS/MS と MS3 モードの感度に優れたイオントラップが、ライブラリを利用した化合物の同定において良好な結果を示しました。たとえば、メタドンのサンプルからセルトラリンが発見されました。同定作業におけるフルスキャン・スペクトルライブラリの利用は、GC/MS における NIST ベースライブラリの検索に似通ったものです。

TOF および QTOF 機器は、ライブラリにない化合物を同定するためにフルスキャンの MS や MS/MS モードの精密質量を使用します。実際、どちらの機器による化合物同定にも、化合物名

や、化学式、精密質量、および (もし判明していれば) リテンションタイムからなる精密質量データベースを使用することができます。しかし、本調査では分析の対象となる化合物群がすでに分かっていたため、こうしたデータベースは不要でした。

MS と MS/MS の両レベルの質量精度を持つ QTOF は未知化合物を分析する際の最終的な装置です。MS レベルで化学式を決定しても、化合物の分子構造は必ずしも 1 つに決まるわけではありません。イオントラップと同様、QTOF はフルスキャン MS/MS のプロダクトイオンスペクトルを作成することによって化合物構造のフィンガープリントを作成します。選択 MS/MS レベルの精密質量は、各フラグメントの化学式、つまり、プロダクトイオンとニュートラルロスの両方の化学式を決定し、どの下位構造から遡ってゆけば特定の化合物の同定にたどりつけるかを示します。

どのタイプの分析計も、メソッド開発の手間は最小限に抑えられています。QQQ では、フラグメンターやコリジョンエネルギーの設定をそれぞれの MRM 遷移に合わせて最適化する必要がありますが、イオン源の設定値は LC の流量に基づいて自動的に決定されます。また、イオン送給光学系や質量分析計の電圧値はすべて自動調整/較正プログラムによって自動的に最適化されます。

参考文献

1. G. De Boeck, M. Wood, and N. Samyn, "Recent Applications of LC-MS in Forensic Science," LCGC Europe, Nov 2, 2002.
2. K. Zahlisen, T. Aamo, and J. Zweigenbaum, "Screening Drugs of Abuse by LC/MS," Agilent Technologies publication 5989-1541EN, Aug 23, 2004.
3. J. van Bocxlaer, K. Clauwaert, W. Lambert, D. Deforce, E. van den Eeckhout, and A. DeLeenheer, "Liquid Chromatography – Mass Spectrometry in Forensics Toxicology," Mass Spectrom. Reviews, (19) 4, Sep 6, 2000, pp 165–214.
4. P.M. Jeanville, E.S. Estapé, S.R. Needham, and M.J. Cole, "Rapid confirmation/quantification of cocaine and benzoylecgonine in urine utilizing high performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry," J. Mass Spectrom, 11 (3) 257–263.

謝辞

本プロジェクトの企画・遂行にご助力いただいたアジレントの Tom Gluodenis 氏に謝意を表します。

詳細情報

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。

本ノートに関する詳細については、アジレントの Michael Zumwalt までお問い合わせください。

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., 2011
Published in the Japan
January 13, 2011
5990-3450JAJP



Agilent Technologies