

TOF または Q-TOF LC/MS とパーソナル法医学/毒物学データベースを用いた 法医学および毒物学の分析対象物に対する スクリーニング用アプリケーションキット

アプリケーションノート

法医学および毒物学

著者

Peter Stone and Jerry Zweigenbaum
Agilent Technologies, Inc.
5301 Stevens Creek Blvd.
Santa Clara, CA 95051
USA

概要

Agilent TOF および Q-TOF 質量分析計とともに使用する、約 6700 件の分析対象物コンテンツを収録した精密質量データベースの法医学および毒物学用スクリーニングアプリケーションキットを開発しました。この MassHunter パーソナル法医学および毒物学データベースキットの目的は、分析対象物を大量に検出および同定する機能が欠かさない法医学や毒物学のサンプル分析の出発点となることです。統合されたシステムにより、具体的な要件に従って分析対象物を絞り、分析対象化合物の保持時間を収録したカスタムデータベースを作成できます。法医学の分析対象物を含む試験混合液を使用して、MassHunter パーソナル法医学および毒物学データベースキットの機能とよく知られた乱用薬物の一般的なスクリーニングメソッドの応用例を紹介します。



Agilent Technologies

はじめに

飛行時間型 (TOF) および四重極飛行時間型 (Q-TOF) などの高精度質量分析計は、どのような分析対象に対してもスペクトルデータを十分に捉える能力を持つため、法医学および毒物学の分野においてスクリーニング、探索、確認への応用価値が高まっています。最新の TOF および Q-TOF 機器 (2 ppm 未満の質量精度、pg のオンカラム感度、および高分解能) と強力なデータ検索ツールを組み合わせた高精度で高感度の質量分析により、収集後のスクリーニングをより簡単かつ確実に実行でき、1 回の分析メソッドで大量の分析対象物を処理できます。潜在的な毒物の数は膨大で、職場の薬物検査、ドーピング検査、検死時の薬物検査、爆発物の分析など分野によって分析対象となる毒物は異なります。

シングルステージ精密質量分析法 (MS) により測定した質量であれば、モノアイソトピック付加体を高い確度で同定でき、法医学および毒物学におけるさまざまな分析対象物を登録したデータベースを構築できます。これは、TOF および Q-TOF LC/MS 機器のどちらでも実現できます。対照的に、トリプル四重極 MS を使用する LC/MS/MS の場合は、最も感度のよいマルチリアクションモニタリング (MRM) で、対象を限定したスクリーニングおよび確認のみが可能で、[1]

本アプリケーションノートでは、法医学および毒物学に関するスクリーニングと同定のための Agilent MassHunter パーソナル法医学および毒物学データベースキットについて解説します。このキットには、法医学および毒物学における約 6700 件の分析対象物に関する精密質量 (AM) の詳細データが収録されています。そのコンテンツは、世界中の多くの主要研究機関と知識ベースから収集したもので、一般名称、モノアイソトピック質量、化学式、CAS 番号、Chemspider ID、化学構造式、および多くの場合、IUPAC 命名法による学名が含まれています。精密質量に加えて、補助的な検索確認のために、分析対象物ごとにクロマトグラムの保持時間を追加する機能が、MassHunter パーソナル化合物ライブラリ (PCDL) プログラムインタフェースに内蔵されています。これにより、精密質量保持時間 (AMRT) データ検索ルーチンを実現しています。さらに、分析者は、データベースコンテンツを現状のまま使用して、対象を限定しないスクリーニングが可能です。あるいは、読み取り専用の同梱データベースから小規模のカスタムデータベースや対象を絞ったデータベースを作成できます。カスタムデータベースでは、エントリの変更、追加、削除が可能で、さらに、特定の分析対象物およびメソッドに対する保持時間を半自動的に更新できます。[2] 分析者は、LC条件 ごとに異なる保持時間を登録したカスタムデータベースを必要なだけ作成できます。

本アプリケーションノートでは、分析スクリーニングワークフローのいくつかの例を通して、MassHunter パーソナル法医学および毒物学データベースキットの典型的な使用例を紹介します。

実験

本アプリケーションノートで説明する分析結果は、Agilent 1200 SL シリーズ LC システムと組み合わせた Agilent 6230 飛行時間型 LC/MS を使用して得られたものです。この LC システムは、バイナリポンプ (G1312B)、真空デガッサ (G1379B)、オートサンブラ (G1367D)、カラム恒温槽 (G1316B)、および [G6855AA] MassHunter パーソナル法医学および毒物学データベースキットを搭載した MassHunter ワークステーションで構成しました。

サンプル調製

MassHunter パーソナル法医学および毒物学データベースキット [G6855AA] に同梱の LC/MS 毒性試験混合液 [部品番号 5190-0470] のアンプルを開け、990 μ L の LC/MS グレードのメタノールを使用して、10 μ L の 1 μ g/mL (1 ppm) 溶液を濃度 100 ng/mL (100 ppb) に希釈し、メソッドチェックアウト用のクリーンな溶媒標準液を作成しました。

表 1 に、法医学上の代表的な分析対象物を広く網羅する LC/MS 毒性試験混合液 [部品番号 5190-0470] の組成をまとめます。

表 1. LC/MS 毒性試験混合液のコンポーネント (1 μ g/ml)

化合物名	化学式	質量
3,4-メチレンジオキシアニフェタミン (MDA) 179.09463		C ₁₀ H ₁₃ NO ₂
3,4-メチレンジオキシエタンフェタミン (MDEA) 207.12593		C ₁₂ H ₁₇ NO ₂
アルプラゾラム	C ₁₇ H ₁₃ ClN ₄	308.08287
クロナゼパム	C ₁₅ H ₁₀ ClN ₃ O ₃	315.04107
コカイン	C ₁₇ H ₂₁ NO ₄	303.14706
コデイン	C ₁₈ H ₂₁ NO ₃	299.15214
Δ 9-テトラヒドロカンナビノール (THC)	C ₂₁ H ₃₀ O ₂	314.22458
ジアゼパム	C ₁₆ H ₁₃ ClN ₂ O	284.07164
ヘロイン	C ₂₁ H ₂₃ NO ₅	369.15762
ヒドロコドン	C ₁₈ H ₂₁ NO ₃	299.15214
ロラゼパム	C ₁₅ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O ₂	320.01193
メペリジン (ペチジン)	C ₁₅ H ₂₁ NO ₂	247.15723
メタドン	C ₂₁ H ₂₇ NO	309.20926
メタアンフェタミン	C ₁₀ H ₁₅ N	149.12045
メチレンジオキシメタンフェタミン (MDMA) 193.11028		C ₁₁ H ₁₅ NO ₂
ニトラゼパム	C ₁₅ H ₁₁ N ₃ O ₃	281.08004
オキサゼパム	C ₁₅ H ₁₁ ClN ₂ O ₂	286.05091
オキシコドン	C ₁₈ H ₂₁ NO ₄	315.14706
フェンシクリジン (PCP)	C ₁₇ H ₂₅ N	243.1987
フェンテルミン	C ₁₀ H ₁₅ N	149.12045
プロアジフェン	C ₂₃ H ₃₁ NO ₂	353.23548
ストリキニン	C ₂₁ H ₂₂ N ₂ O ₂	334.16813
テマゼパム	C ₁₆ H ₁₃ ClN ₂ O ₂	300.06656
トラゾドン	C ₁₉ H ₂₂ ClN ₅ O	371.15129
ベラパミル	C ₂₇ H ₃₈ N ₂ O ₄	454.28316

試薬および化学薬品類

Burdick and Jackson 社製の LC/MS グレードのアセトニトリルを脱イオン水 (実験室で作成した 18.1 MΩのもの) と共に移動相に使用しました。緩衝液は、高純度のギ酸とギ酸アンモニウムを使用して新たに準備しました。

機器設定および MS 取り込みメソッドパラメータ

LC 条件

カラム:	ZORBAX Eclipse Plus C18、2.1 mm x 100 mm、1.8 μm [部品番号 959764-902]		
カラム温度:	60 °C		
移動相	A: 5 mM ギ酸アンモニウム/0.01 % ギ酸水溶液 B: 0.01 % ギ酸を含むアセトニトリル溶液		
流量:	0.5 mL/min		
グラジエントプログラム:			
時間	A	B	流量
初期	90%	10%	0.5 mL/min
0.5 分	85%	15%	0.5 mL/min
3.0 分	50%	50%	0.5 mL/min
4.0 分	5%	95%	0.5 mL/min
6.0 分	5%	95%	0.5 mL/min
注入量:	1 μL (フラッシュポートで 5 秒間ニードル洗浄)		
分析時間:	6.0 分		
ポストタイム:	2.0 分		
合計サイクル時間:	8.0 分		

6230 TOF MS 条件

イオン源条件:

Electrospray AP-ESI (Agilent Jet Stream Technology を使用):

ポジティブイオン化極性	
シーガス温度および流量:	380 °C、12 L/min
ノズル電圧:	500 V
乾燥ガス温度および流量:	320 °C、8 L/min
ネブライザガス圧力:	27 psi
キャピラリー電圧:	3750 V
フラグメンター電圧:	150 V

Electrospray AP-ESI:

ポジティブイオン化極性	
乾燥ガス温度および流量:	350 °C、12 L/min
ネブライザガス圧力:	30 psi
キャピラリー電圧:	2000 V
フラグメンター電圧:	150 V

MS 取り込みメソッドパラメータ

リファレンスイオン質量:	121.050873, 922.009798
取り込みモード:	MS1
最小質量値:	50 m/z
最大質量値:	1050 m/z
スキャン速度:	3 Hz

この他の機器操作パラメータは、Agilent オートチューン機能とそれに続く質量キャリブレーションの標準設定ですべて設定処理しました。

結果と検討

Agilent LC/MS 毒性試験混合液を用いた素早く簡単な作業開始

LC/MS 毒性試験混合液 [部品番号 5190-0470] は、MassHunter パーソナル法医学および毒物学データベースキット [G6855AA] に同梱されていて、メソッドを素早く実装し、取り込みとデータ解析のメソッドが正しく設定されているかを確認できます。LC/MS 毒性試験混合液には、25 種類の法医学の分析対象物のうち代表的なコンポーネントが含まれています。(表 1 を参照)。MS スクリーニングは、TOF または Q-TOF の精密質量の結果に左右されます。そのため、実験条件のセクションに記載したように、適切なリファレンスイオンを使用すると、最も正確な結果が得られます。

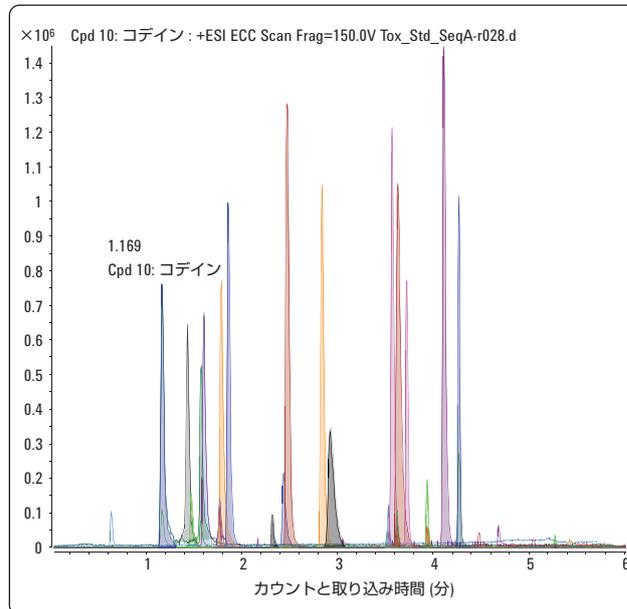


図 1. LC/MS 毒性試験混合液の抽出化合物のマスクロマトグラム

実験のセクションで説明した方法に従い、100 ng/ml の LC/MS 毒性試験混合液を 1- μ l 注入すると、100 pg のオンカラム注入となります。図 1 に、LC/MS 毒性試験混合液について期待される抽出化合物のマスキロマトグラムの重ね描きを示します。MassHunter パーソナル法医学および毒物学データベースキットの一部として、TOF および Q-TOF 用の標準的なメソッドが含まれています。これらをロードすると、条件をすべて正しく設定し、分析を再現できます。

これらのメソッドは取込みに関するメソッドのみで、本アプリケーションノートの実験のセクションで説明した機器設定に対応します。別の機器設定を使用する場合には、適切な設定を手動で行う必要があります。同じような結果が得られれば、システムが正常に機能していることが分かります。

パーソナル化合物データベースおよびライブラリ (PCDL) ソフトウェアのインタフェース

概要

デスクトップ上のアイコンから PCDL インタフェースを起動すると、「open database」ダイアログが表示されます。ここで、インストール済みの Forensic.cdb を MassHunter\database ディレクトリから選択します。図 2 に、単一検索ビューのインタフェースを示します。この画面では、「amphetamine」を検索した結果の一覧が表示されています。ビューは 7 つありますが、本アプリケーションノートでは、AMRT 機能で直接利用できる最初の 4 つのビュー (左側の 4 つのタブ) についてのみ説明します。これらのビューは、ユーザーインタフェース内で、Single Search、Batch Search、Batch Summary、または Edit Compounds のタブをクリックして切り替えます。

Single Search Results: 33 hits

Compound Name	Formula	Mass	Anion	Cation	RT (min)	CAS	ChemSpider	IUPAC Name
N-Isopropylamphetamine	C12H19N	177.15175	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		66470-73-3	165142	N-Isopropyl-1-phenyl-2-propanamine
▶ 3,4-Methylenedioxyamphetamine (MDA)	C10H13NO2	179.09463	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		4754-17-4	1555	1-(1,3-Benzodioxol-5-yl)-2-propanamine
4-Methylthioamphetamine	C10H15NS	181.09252	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		14116-06-04	130893	1-(4-(Methylsulfanyl)phenyl)-2-propanamine
N-Acetyl-N-methylamphetamine	C12H17NO	191.13101	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		82494-42-6	459093	N-Methyl-N-(1-phenyl-2-propyl)acetamide
N-(1-methylpropyl)Amphetamine	C13H21N	191.16740	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		74257-24-2	457701	N-(1-Phenyl-2-propyl)-2-butanamine
N-Butylamphetamine	C13H21N	191.16740	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		57378-21-9	85320	N-(1-Phenyl-2-propyl)-1-butanamine
N,N-Diethylamphetamine	C13H21N	191.16740	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		59313-90-5	454776	N,N-Diethyl-1-phenyl-2-propanamine
N-Methyl-N-propylamphetamine	C13H21N	191.16740	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		59313-91-6	457703	N-Methyl-N-(1-phenyl-2-propyl)-1-propanamine
Methylenedioxymethamphetamine (MDMA)	C11H15NO2	193.11028	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		69610-10-2	1556	1-(1,3-Benzodioxol-5-yl)-N-methyl-2-propanamine
p-Methoxyamphetamine	C12H19NO	193.14666	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		4302-88-9	21476712	1-(4-(1-Methoxyethyl)phenyl)-2-propanamine
p-Nitromethamphetamine	C10H14N2O2	194.10553	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		2275-67-4	96527	N-Methyl-1-(4-nitrophenyl)-2-propanamine
Dimethoxyamphetamine (DMA)	C11H17NO2	195.12593	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		2801-68-5	56526	1-(2,5-Dimethoxyphenyl)-2-propanamine
p-chloro-N-Ethylamphetamine	C11H16CN	197.09713	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		2275-67-4	459094	1-(4-Chlorophenyl)-N-ethyl-2-propanamine
N-Butyl-N-methylamphetamine	C14H23N	205.18305	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		59313-92-7	457702	N-Methyl-N-(1-phenyl-2-propyl)-1-butanamine
3,4-Methylenedioxyethamphetamine (MDEA)	C12H17NO2	207.12593	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		14089-52-2	94775	1-(1,3-Benzodioxol-5-yl)-N-ethyl-2-propanamine

図 2. PCDL ソフトウェアインタフェースの手動の Single Search ビュー

読み込んだデータベースを手動で検索するには、Single Search ビュー (図 2) の上側にあるフィールドを使用します。表 2 に、PCDL の Single Search ビューで利用できる検索フィールドをまとめます。強力な検索アルゴリズムにより、名前の一部でも処理できます (たとえば、「amph」と入力すると、この文字列を含むすべてのデータベースエントリを返します)。

注意：読み込み済みデータベースの全コンテンツを表示するには、検索フィールドをすべて空にした状態で Single Search を実行します。

表 2. PCDL の Single Search で利用できるすべての検索フィールド

利用可能な検索フィールド (Single Search ビュー) 値	
Mass	測定した質量 (m/z)
Retention time	(分)
Formula	化学式
Name	化合物の一般名称 (またはその一部)
Notes	化合物の分類または説明
IUPAC	IUPAC または一般に認められている化合物名
CAS	一意の CAS 番号
ChemSpider	一意の ChemSpider ID

ワークフロー A. 手動による検索 (単一の質量検索)

PCDL プログラムの使用

単一検索を手動で実行するには、MassHunter 定性分析プログラムで測定または観測されたスペクトルの測定質量を質量検索フィールドに入力します。図 3 に、MassHunter 定性分析プログラムと測定質量を検索する PCDL の機能を手動で実行する例を示します。

この例では、ポジティブモードの TOF データから MassHunter 定性分析プログラムで化合物ピークを特定し、スペクトルを抽出します。そして質量の許容誤差を 10 ppm とした $[M+H]^+$ 付加体 (陽イオンを含む) として、PCDL データベースで測定質量 244.205770 m/z を検索します。

検索を実行すると、フェンシクリジン (PCP) と一致する精密質量および測定値とデータベース上の理論値のずれ (またはデルタ質量) として 0.85 ppm を返します。

単一検索機能の詳細は、Agilent G6855AA MassHunter パーソナル法医学および毒物学データベースキットのクイックスタートガイドにあります。[3、4]

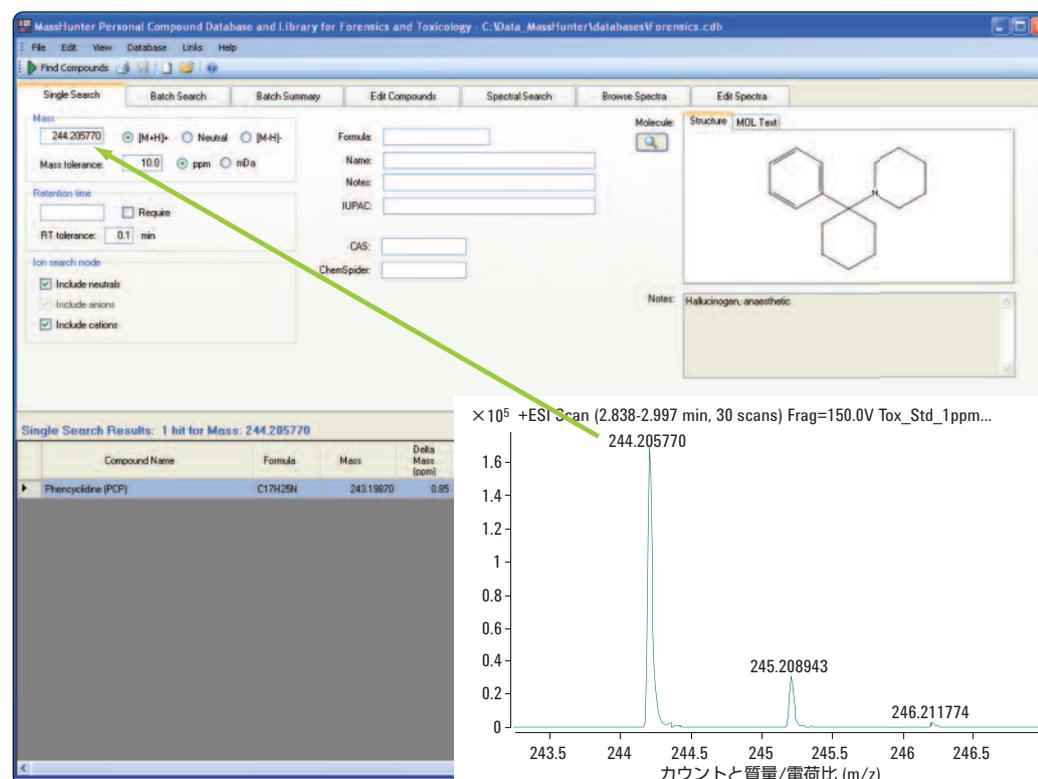


図 3. 測定された質量の手動検索

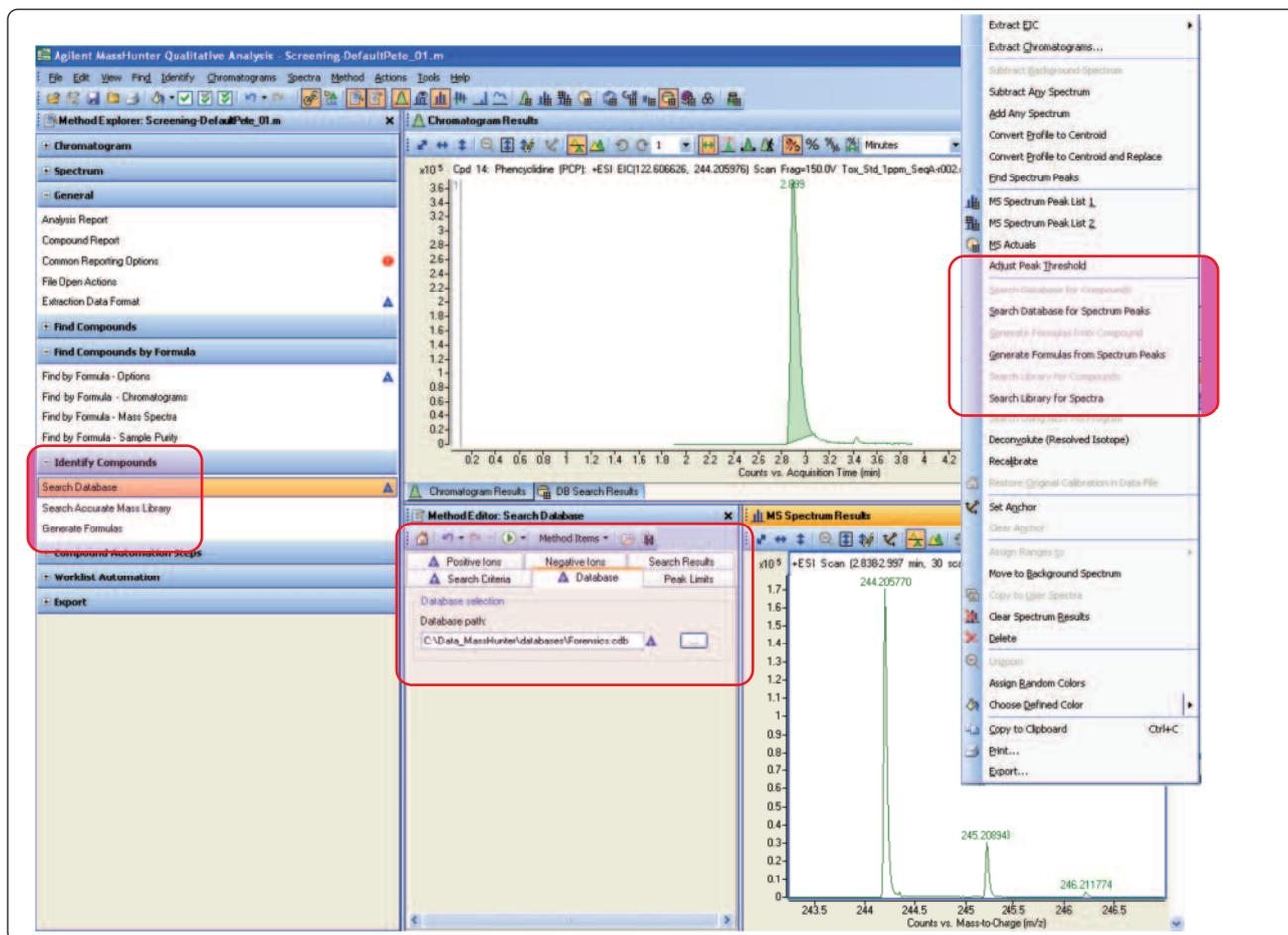


図 4a. MassHunter 定性分析プログラムを使用した測定質量の手動検索

MassHunter 定性分析プログラムを使用したデータベースの単一手動検索

MassHunter 定性分析プログラムによりシームレスなスペクトルピークデータベースの単一手動検索を行うには、定性分析メソッドエディタでデータベースを指定する必要があります。互換性のあるソフトウェアバージョンは、B.03.01 以降です。図 4a ~ 4d に、この例で使用した設定を示します。

図 4a に、対象のクロマトグラムピークと手で抽出したスペクトルを含む MassHunter 定性分析プログラムの典型的な表示例を示します。スクリーンショットの左側で「Identify Compounds」メソッドエクスプローラオプションを展開し、「Search Database」メソッドエディタを選択しています。メソッドエディタで、使用する AMRT データベースとして「forensic.cdb」を指定しています。

図 4b に、質量の許容誤差ウィンドウおよび「mass only」または「mass with retention time」などの選択可能な検索条件を示します。

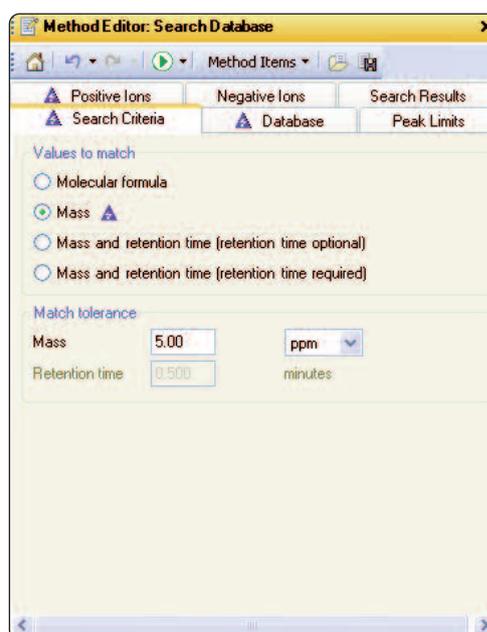


図 4b. 手動検索条件の設定

図 4c に、データベース検索に必要な付加体および価数のオプションを示します。

スペクトルウィンドウを右クリックすると、指定した AMRT データベースのショートカットメニューが表示されます (図 4a)。このメニューには「Search database for spectrum peaks」などのさまざまなオプションが含まれています。このオプションを選択すると、自動的にデータベース検索が呼び出されます。図 4d では、スペクトルピークは PCP と特定され、質量のずれが 0.87 ppm、最高 100 のスペクトル複合スコアが 99.36 であることから、一致していることが確認できます。

このスコアを計算する際、Mass Match、Abundance Match、および Spacing Match の 3 つのスコアコンポーネントを考慮します。この例では、それぞれの値は、99.61、98.61、および 99.79 です。これらはそれぞれ図 4d に表示されています。

信頼できる結果を得るために、同位体質量 (Mass Match)、同位体比 (Abund Match)、同位体間隔 (Spacing Match)、およびオプションで保持時間 (RT Match) の類似度に基づいて、ソフトウェアがデータベースの一致度のスコアを計算します。

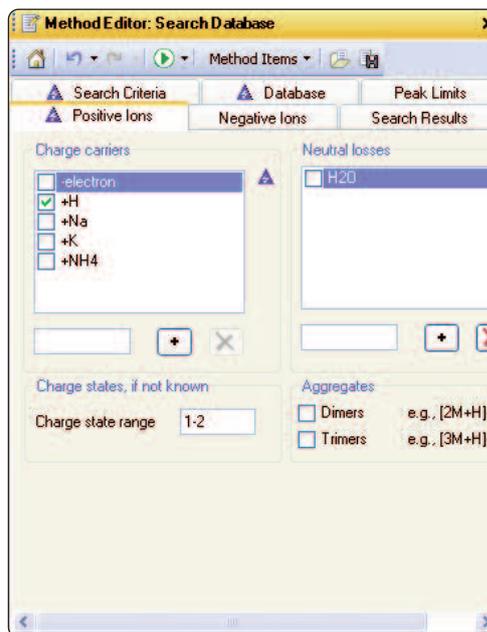


図 4c. 手動検索用の付加体の選択

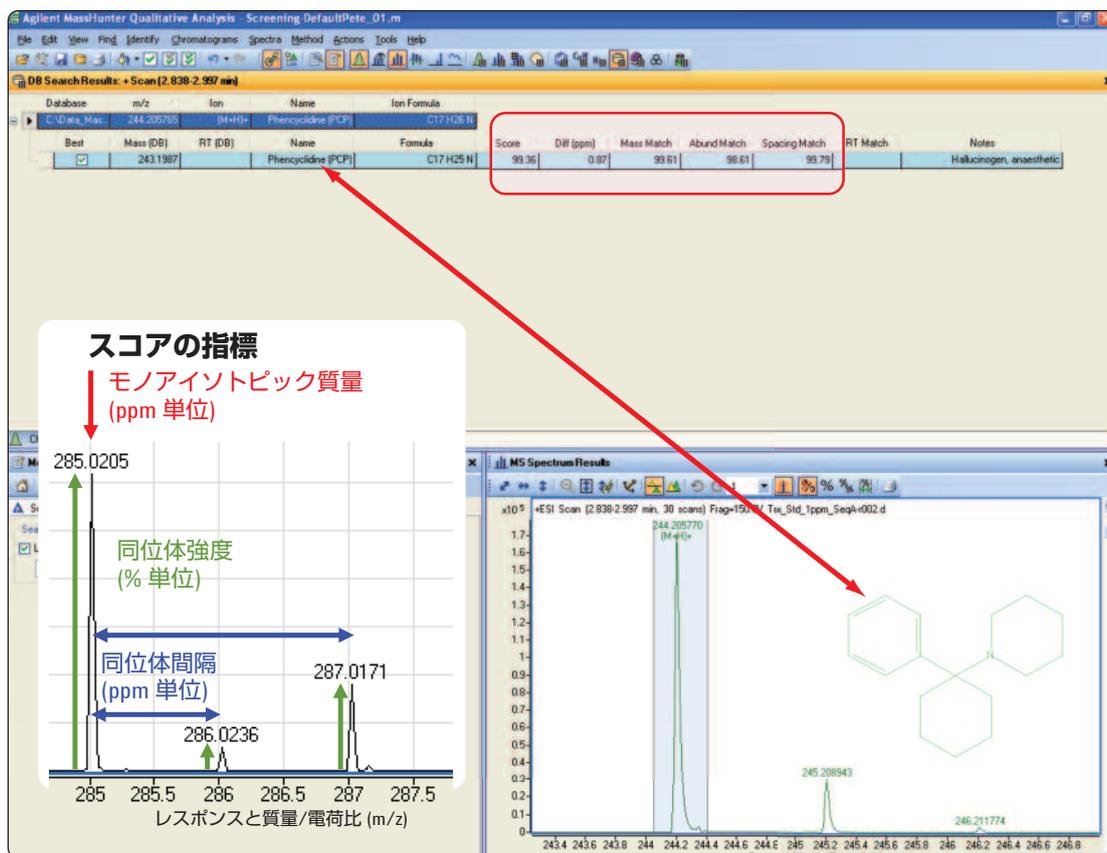


図 4d. MassHunter 定性分析プログラムを使用した手動データベース検索の結果

同位体間隔は、スコアを決定するアルゴリズムのもう 1 つの重要なコンポーネントです。M 同位体から M+1 および M+2 同位体までの質量間隔は、数 ppm の精度で測定できます。質量のわずかなずれは、すべての同位体に同等に影響するので、この指標は、質量軸がずれても影響を受けません。これを図 4d に示します。

この例では、単一の AMRT データベースの結果としてフェンシクリジン (PCP) が得られ、さらに、図 4d に示すように、オプションで構造式をピークスpekトルに重ね描きしています。また、レポート作成オプションの選択により、構造式をレポートに表示できます。

MassHunter 定性分析プログラムのデータベース検索の詳細は、MassHunter 定性分析プログラムのヘルプファイルまたはユーザーガイドにあります [5]。

ワークフロー B. 「Molecular Feature Extractor」(MFE) を使用したデータマイニング

バッチ PCDL 検索 (2 番目と 3 番目のタブ) は、Agilent Molecular Feature Extractor (MFE) などの自動化されたデータ検索アルゴリズムにより作成される精密質量一覧を使用したデータベース検索および同定用に設計されています。このようなアルゴリズムは、特に血液抽出物などの厄介なサンプルマトリックスから得られた複雑なデータに対して、優れた威力を発揮します。以下では、MassHunter 定性分析プログラムインターフェースから呼び出したバッチ検索についてのみ説明します。PCDL インターフェース内でのバッチ検索の実行方法については、PCDL のアプリケーションノートを参照してください [2]。

MFE などのデータ探索アルゴリズムは、複雑なシングル MS データセットについて自動的に検索と探索を行い、連続的なバックグラウンドの干渉からもっとも確からしい「本物」の化合物ピークを識別します。付加体の組み合わせを成分同定プロトコルの一部として指定できるので、化合物の妥当性を補足します。

その他の「find by MS/MS」および「find by Targeted MS/MS」などのデータ探索アルゴリズムは、MassHunter 定性分析プログラムソフトウェアの一部として組み込まれている重要なオプションです。これらのアルゴリズムは、測定モードと使用する機器の特性に依存します。化合物検索ルーチン「Find by Formula」は、本アプリケーションノートの「ワークフロー C」のセクションで説明します。

説明上の理由から、実験のセクションに示した条件で LC/MS 毒性試験混合液を分析しました。そのデータファイルを MassHunter 定性分析プログラムに読み込みます。メソッドエクスプローラの「Find Compounds」セクションから「Find Compounds by Molecular Feature」のメソッドエディタを開きます (図 5a および 5b 参照)。

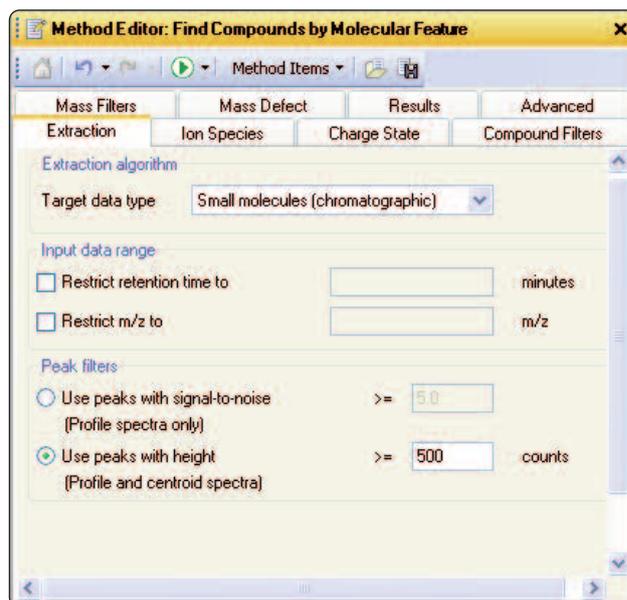


図 5a. MFE 抽出パラメータ

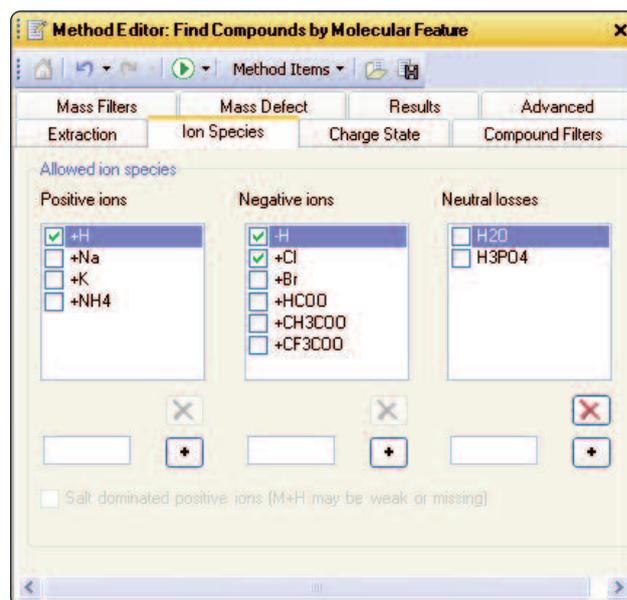


図 5b. MFE 用のイオンの種類の設定

この例では、ピーク高さの絶対しきい値を非常に厳しく設定し (500 カウント超、図 5a 参照)、低分子用アルゴリズム (クロマトグラム用) を用いて 3000 を超えるヒットを得ました。このしきい値を大きくすると、感度の低い分析対象物は検出されません。しきい値が大きいと、逆に言えば、潜在的な偽陽性検出の件数が大きく減ります。この例では [M+H]⁺ 付加体のみを検索しましたが、Na⁺ や NH₄⁺ などの別の付加体も選ぶと、さらに信頼性が高まります (図 5b 参照)。

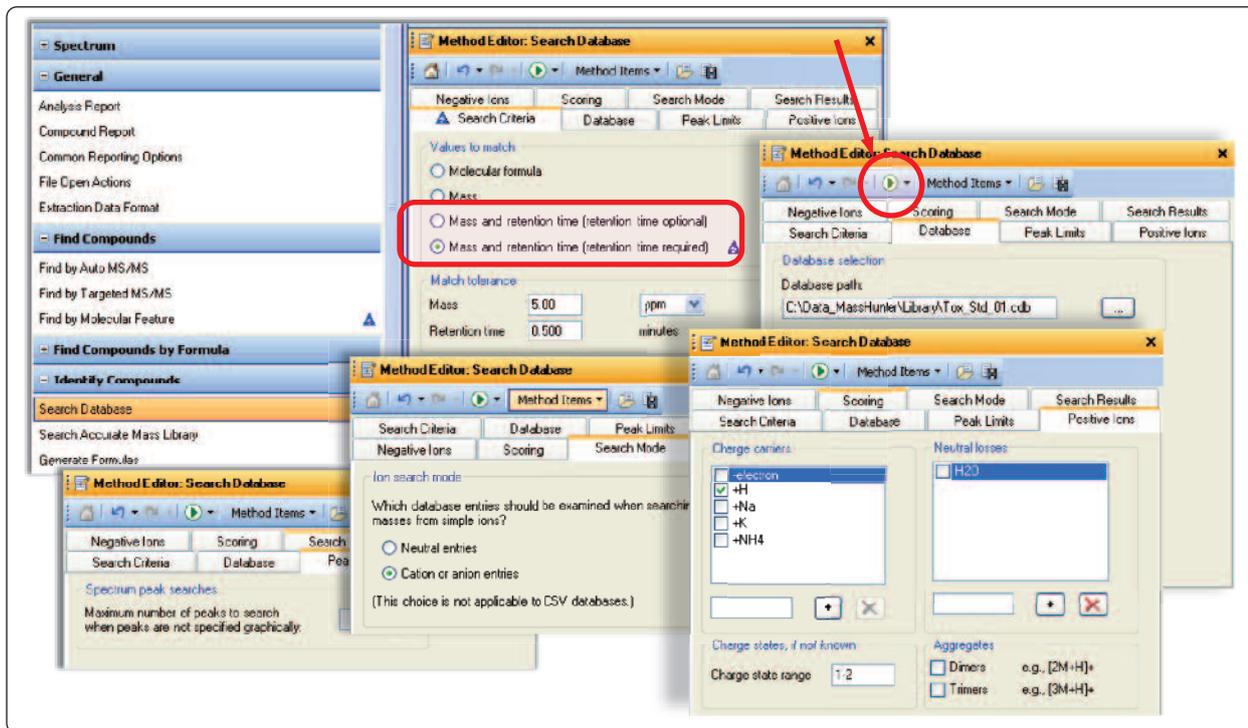


図 6. MFE 化合物データベースの検索設定

この検索では、化合物、質量フィルタ、マスディフェクトフィルタを指定せず、MFE メソッド設定で最大価数を 1 に指定しました。MFE での検索に続いて、法医学 AMRT データベースを「Identify Compound」/「Search Database」メソッドエディタで指定し (図 6 参照)、MFE で見つかった化合物をすべてハイライトして、各化合物を検索します。あらかじめ各標準試料を分析して RT を決定し、カスタムの化合物データベースにその RT 値を登録しておき、マッチ条件に質量と保持時間 (RT) を指定しました。

MFE メソッドエディタのタイトルバーに強調表示されている緑色の「process」ボタン (図 6) をクリックすると、MFE が実行され、図 7 に示す結果が得られます。

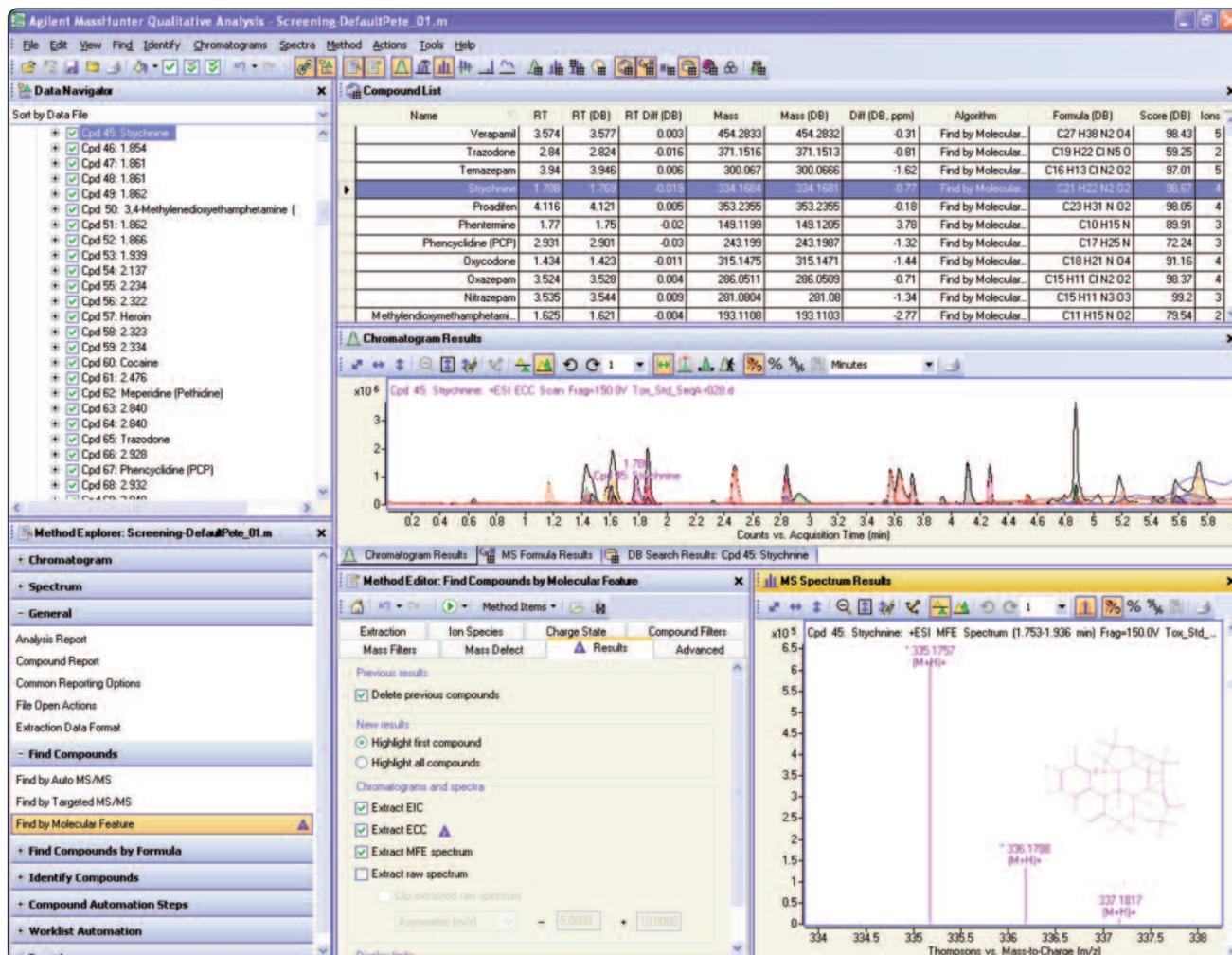


図 7. MassHunter 定性分析プログラムを使用した MFE 化合物データベースの検索結果

これらの結果を表 3 にまとめます。このサンプル注入に対して、LC/MS 毒性試験混合液の 25 種類の化合物すべてを同定できたことが分かります。これは、検索および同定の手順に対して行ったデータ解析設定が、同定プロセスに適切であることを意味します。MFE で同定可能な 3000 を超える化合物の多くは、予想通り PCDL の検索で見つからなかったため、誤検出を排除するデータ解析オプションを使用して、データベースヒット数だけをレポートするよう設定しました。

Agilent G6855AA MassHunter パーソナル法医学および毒物学データベースキットのクイックスタートガイド [3] に記載されているように、PCDL データベースの保持機能を使用し、このクロマトグラフメソッドに対して事前に決定した各分析対象物の保持時間を入力することで、コデインとヒドロコドン、メタアンフェタミンとフェンテルミンなどの同重体化合物も正しく同定され自動的に識別できました。

表 3. MFE 化合物およびデータベース検索結果

名称	RT	RT (DB)	RT 差 (DB)	質量	質量 (DB)	差 (DB, ppm)	化学式 (DB)	スコア (DB)
ベラパミル	3.574	3.577	0.003	454.2833	454.2832	-0.31	C ₂₇ H ₃₈ N ₂ O ₄	98.43
トラゾドン	2.84	2.824	-0.016	371.1516	371.1513	-0.81	C ₁₉ H ₂₂ ClN ₅ O	59.25
テマゼパム	3.94	3.946	0.006	300.067	300.0666	-1.62	C ₁₆ H ₁₃ ClN ₂ O ₂	97.01
ストリキニン	1.788	1.769	-0.019	334.1684	334.1681	-0.77	C ₂₁ H ₂₂ N ₂ O ₂	98.67
プロアジフェン	4.116	4.121	0.005	353.2355	353.2355	-0.18	C ₂₃ H ₃₁ N ₂ O ₂	98.05
フェンテルミン	1.77	1.75	-0.02	149.1199	149.1205	3.78	C ₁₀ H ₁₅ N	89.91
フェンシクリジン (PCP)	2.931	2.901	-0.03	243.199	243.1987	-1.32	C ₁₇ H ₂₅ N	72.24
オキシコドン	1.434	1.423	-0.011	315.1475	315.1471	-1.44	C ₁₈ H ₂₁ N ₂ O ₄	91.16
オキサゼパム	3.524	3.528	0.004	286.0511	286.0509	-0.71	C ₁₅ H ₁₁ ClN ₂ O ₂	98.37
ニトラゼパム	3.535	3.544	0.009	281.0804	281.08	-1.34	C ₁₅ H ₁₁ N ₃ O ₃	99.2
メチレンジオキシメタンフェタミン (MDMA)	1.625	1.621	-0.004	193.1108	193.1103	-2.77	C ₁₁ H ₁₅ N ₂ O ₂	79.54
メタアンフェタミン	1.606	1.593	-0.013	149.1197	149.1205	4.82	C ₁₀ H ₁₅ N	81.88
メタドン	3.638	3.638	0	309.2094	309.2093	-0.61	C ₂₁ H ₂₇ N ₂ O	99.67
メペリジン (ベチジン)	2.477	2.456	-0.021	247.1577	247.1572	-1.7	C ₁₅ H ₂₁ N ₂ O ₂	97.91
ロラゼパム	3.616	3.621	0.005	320.012	320.0119	-0.19	C ₁₅ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O ₂	98.27
ヒドロコドン	1.575	1.56	-0.015	299.1525	299.1521	-1.2	C ₁₈ H ₂₁ N ₂ O ₃	85.2
ヘロイン	2.322	2.297	-0.025	369.1579	369.1576	-0.63	C ₂₁ H ₂₃ N ₂ O ₅	98.97
ジアゼパム	4.272	4.275	0.003	284.072	284.0716	-1.36	C ₁₆ H ₁₃ ClN ₂ O	58.97
Δ9-テトラヒドロカンナビノール (THC)	5.275	5.292	0.017	314.2243	314.2246	0.94	C ₂₁ H ₃₀ O ₂	94.83
コデイン	1.169	1.16	-0.009	299.1524	299.1521	-0.72	C ₁₈ H ₂₁ N ₂ O ₃	72.49
コカイン	2.44	2.418	-0.022	303.1475	303.1471	-1.29	C ₁₇ H ₂₁ N ₂ O ₄	98.03
クロナゼパム	3.625	3.638	0.013	315.0412	315.0411	-0.42	C ₁₅ H ₁₀ ClN ₃ O ₃	98.72
アルプラゾラム	3.726	3.726	0	308.083	308.0829	-0.33	C ₁₇ H ₁₃ ClN ₄	96.77
3,4-メチレンジオキシエタンフェタミン (MDEA)	1.862	1.846	-0.016	207.1263	207.1259	-1.8	C ₁₂ H ₁₇ N ₂ O ₂	97.4
3,4-メチレンジオキシアンフェタミン (MDA)	1.474	1.473	-0.001	179.095	179.0946	-2.23	C ₁₀ H ₁₃ N ₂ O ₂	86.15

ユーザーの追加した保持時間を登録したカスタムデータベース
 Agilent パーソナル法医学および毒物学データベースのメリットの1つは、ユーザーのカスタム形式でデータベースを保存できることです。読み取り、書き込み、カスタマイズが可能なデータベースを作成するには、PCDLのファイルメニューから「New Database」を選択します。PCDLプログラム上で、既存のデータベースを選択し、新しいデータベースの名前を付けることができます。説明を記載することも可能です。「Create」を選択すると、選択したデータベースの全エントリが新しい名前のデータベースに格納されます。このようにして、分析対象に合わせて、複数のカスタムデータベースまたはもっと小さい、対象を絞ったデータベースを作成できます。農薬のPCDに関するテクニカルノート [2] では、特殊なクロマトグラフ条件で標準試料を分析する方法およびそれらのカスタムデータベースの保持時間を簡単に更新または登録する方法を説明しています。

PCDL AMRT 化合物データをカスタマイズおよび更新するには、PCDLプログラムインタフェースの(左から)4番目のタブを使用します。図8に示すように、「Add New」、「Save as New」、「Update Selected」、「Delete Selected」の各オプションが存在します。「Database/Library」プルダウンメニューで「Allow Editing」を有効にすると、ユーザーのカスタムデータベースに表示されている情報フィールドを変更、追加、または削除できます。さらに、「Edit Compounds」タブでは「*.mol」形式の分子構造図を新規データベースエントリに挿入する機能を使用できます。

Compound Name	Formula	Mass	Mass Submitted	Delta Mass (ppm)	Anion	Cation	RT (min)	RT Submitted	Delta RT	CAS	ChemSpider	IUPAC Name
Methamphetamine	C10H15N	149.12045	149.11970	5.03	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	1.593	1.606	-0.013	537-46-2	10379	[2S]-N-Methyl-1-phenyl-2-propanamine
Codeine	C18H21N...	299.15214	299.15240	-0.87	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	1.160	1.169	-0.009	76-57-3	4447447	[5alpha,6alpha]-3-Methoxy-17-methyl-7,8-c...
Hydrocodone	C18H21N...	299.15214	299.15290	-1.20	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	1.560	1.575	-0.015	126-29-1	4447623	[5alpha]-3-Methoxy-17-methyl-4,5-epoxy...
Phentermine	C10H15N	149.12045	149.11990	3.69	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	1.750	1.770	-0.020	122-09-8	4607	2-Methyl-1-phenyl-2-propanamine
Clonazepam	C15H10Cl...	315.04107	315.04120	-0.41	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	3.638	3.625	0.013	1622-61-3	2700	5-(2-Chlorophenyl)-7-nitro-1,3-dihydro-2H-1...
delta9-Tetrahydrocannabinol (THC)	C21H30O2	314.22458	314.22430	0.89	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	5.292	5.275	0.017	1972-08-3	15266	[6aR,10aR]-6,6,9-Trimethyl-3-pentyl-6a,7,8...
Oxycodone	C18H21N...	315.14706	315.14750	-1.40	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	1.423	1.434	-0.011	76-42-6	4447649	[5alpha]-14-Hydroxy-3-methoxy-17-methyl...
Lorazepam	C15H10Cl...	320.01193	320.01200	-0.22	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	3.621	3.616	0.005	846-49-1	3821	7-Chloro-5-(2-chlorophenyl)-3-hydroxy-1,3-d...
Stychnine	C21H22N...	334.16913	334.16940	-0.81	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	1.769	1.788	-0.019	57-24-9	289877	Stychnidin-10-one
Verapamil	C27H38N...	454.28316	454.28330	-0.31	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	3.577	3.574	0.003	52-53-9	2426	2-(3,4-Dimethoxyphenyl)-5-[2-(3,4-dimeth...
Trazodone	C19H22Cl...	371.15129	371.15160	-0.84	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	2.824	2.840	-0.016	19794-93-5	5332	2-(3-[4-(3-Chlorophenyl)-1-piperazinyl]prop...
Heroin	C21H23N...	369.15762	369.15790	-0.76	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	2.297	2.322	-0.025	561-27-3	4575379	[5alpha,6alpha]-17-Methyl-7,8-didehydro-4...
Proadifen	C23H31N...	353.23548	353.23550	-0.06	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	4.121	4.116	0.005	302-33-0	4741	2-(Diethylamino)ethyl 2,2-diphenylpentano...
Methadone	C21H27NO	309.20926	309.20940	-0.45	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	3.638	3.638	0.000	76-99-3	3953	6-[Dimethylamino]-4,4-diphenyl-3-heptano...
Alprazolam	C17H13Cl...	308.08287	308.08300	-0.42	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	3.726	3.726	0.000	28981-97-7	2034	8-Chloro-1-methyl-6-phenyl-4H-(1,2,4)triaz...

図 8. PCDL インタフェースの Edit Compounds タブ

ワークフロー C. 「Find by Formula」 (FBF) を使用したデータ検索

MassHunter 定性分析プログラムの「Find by Formula」データ検索アルゴリズムでは、事前に定義された実験式 (または実験式リスト) を使用して、TOF および Q-TOF (MS) データファイルを検索して、ピークが存在する証拠を検索します。実験式リストとして PCDL フォーマットのデータベースも指定できます。データベースのサイズとコンテンツに応じて、FBF では MFE の方法よりも多少時間がかかる場合があります。しかし、特に低濃度の分析対象物に対して、FBF は高精度で高感度です。

図 9 に、LC/MS 毒性試験混合液のデータファイルを使用して「Find by Formula」の検索を実行した後に表示される結果画面を示します。25 種類の化合物すべてで、保持時間を含めた総合

スコアで示した精密質量、アバンダンス、および同位体間隔がマッチしました。この FBF 分析で使用した DA メソッドエディタの設定を図 10 に示します。ここで、「Tox_std_01.cdb」はカスタム PCDL フォーマットのデータベースです。

結果をレポートする際、同じ質量を持つ抽出化合物のクロマトグラムに複数のピークが表示されている場合でも、FBF はクロマトグラムのピーク形状および同位体のマッチスコアを評価し、最良のマッチ結果を返します。

この FBF データ画面では、更に付加体として $[M+Na]^+$ 、 $[M+NH_4]^+$ 、および $[2M+H]^+$ を使用しました。この付加情報はスペクトルビューと結果表に表示され、一致する証拠の裏付けをします。図 9 に、 $[M+H]^+$ および $[M+Na]^+$ の 2 つの付加体を表示するテマゼパムのスペクトルを示します。

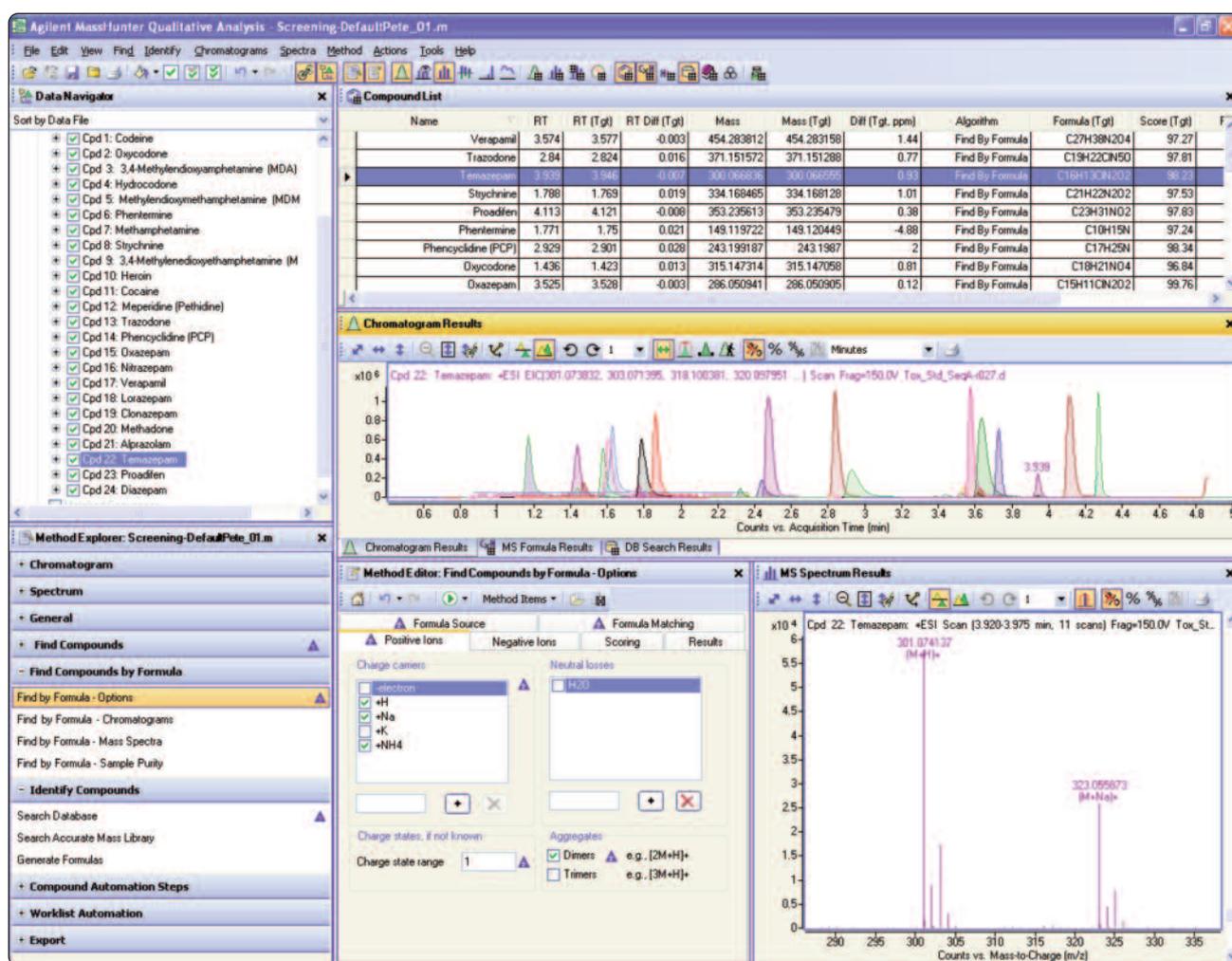


図 9. MassHunter 定性分析プログラムによる Find By Formula データベース検索の結果

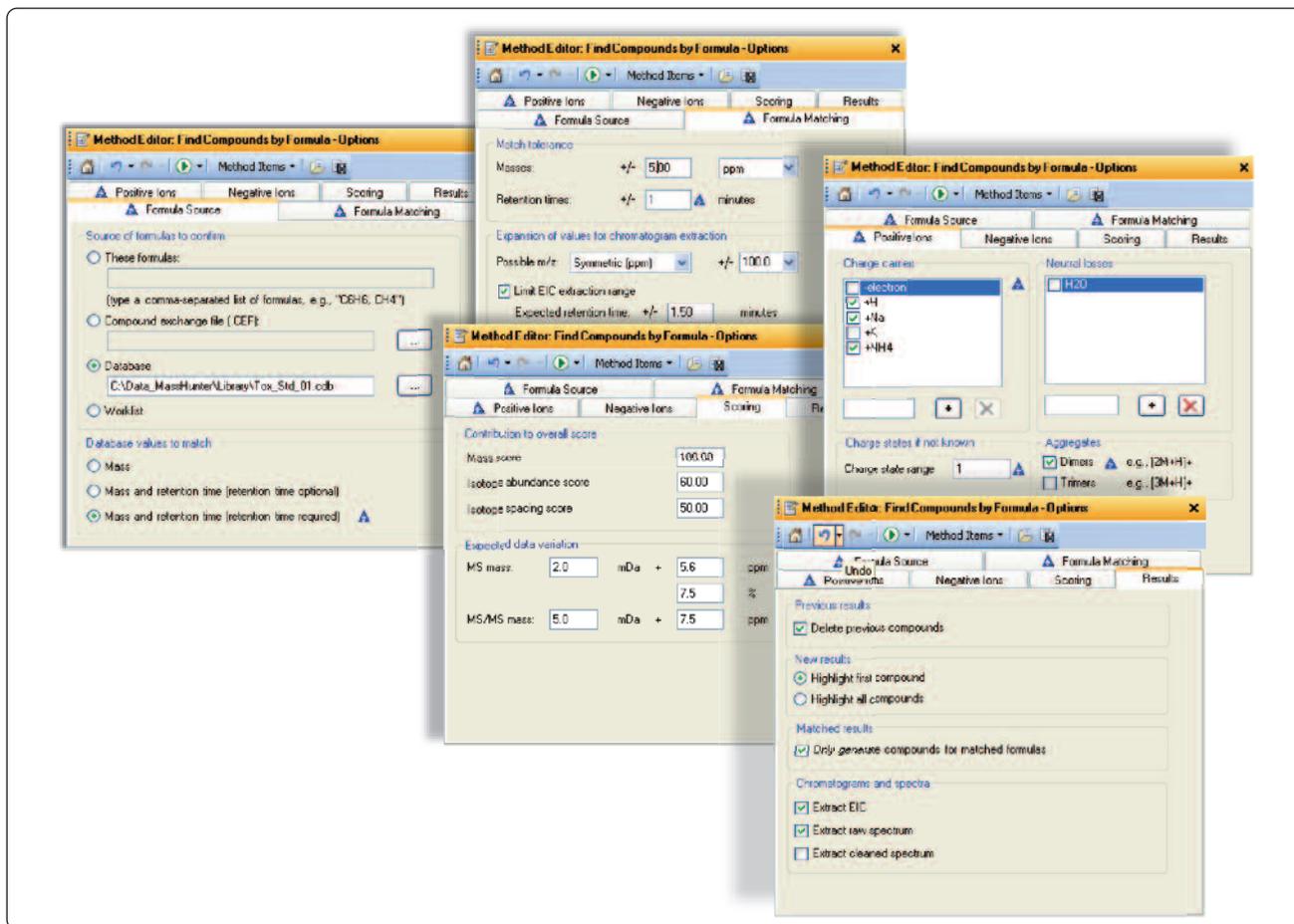


図 10. Find By Formula データベース検索 - メソッドエディタの設定

より詳しい情報は、MassHunter 定性分析プログラムのヘルプファイルまたは Agilent MassHunter Workstation Software Qualitative Analysis Familiarization Guide にあります [5]。

レポート作成

手動、MFE、FBF のいずれのデータベース検索でも、MassHunter 定性分析プログラムインタフェースの化合物レポート作成オプションで設定する同一のメソッドを使用します。図 11 は、標準の化合物レポートテンプレート「CompoundReportWithIdentificationHits.xlsx」に基づくレポート作成オプションの詳細です。メソッドエクスプローラの「General」セクションの下にある「Common reporting options」のリンクを開くと、図 11 の左側に示すような対応するメソッドエクスプローラ領域が開きます。MassHunter 定性分析プログラムは、検索アルゴリズムデータおよびデータベース検索を化合物中心のデータとして処理します。そのため、結果レポートを作成するには、適切な化合物レポートテンプレートを選ぶ必要があります。この例では、正しいレポートテンプレートが表示されています。

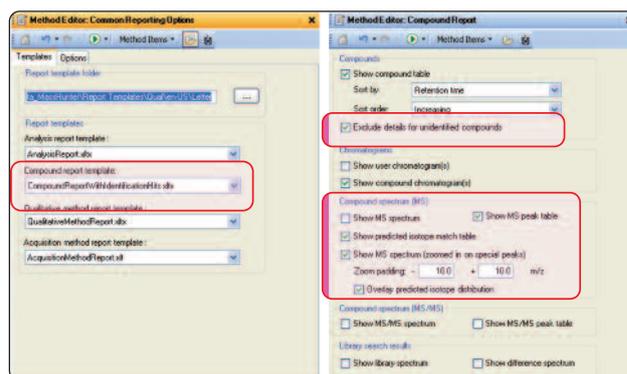


図 11. 手動、MFE、FBF による PCDL 検索に共通の化合物レポート作成オプション

メソッドエディタの「Compound Report」オプションを使用し、毒物検査の画面レポートに必要な情報を選択すると、コンテンツをより具体的に指定できます (図 11 の右側参照)。

レポートのコンテンツをここで決定します。たとえば、「Exclude Details for Unidentified Compounds」のチェックボックスを選択すると、正常に検出された PCDL 同定結果のみがレポートされます。抽出化合物のクロマトグラム、各 MS スペクトル、サマリ結果、各化合物テーブルをレポートするオプションを化合物レポートのメソッドエディタから選択できます。

結果のレポート作成に関する設定をすべて正しく行った後で、図 12 で丸く囲んだ緑色のボタンをクリックすると、「printing dialogue」ウィンドウが表示されます。そのウィンドウには、結果データファイルの出力先を指定する各種オプションがあります。ユーザーは、指定したプリンタに結果を直接送信することもできますし、Excel 形式または PDF 形式で結果を保存することもできます。または、「File」メニューの「Print Compound Report」オプションを選んだ場合も、結果レポートを処理できます。

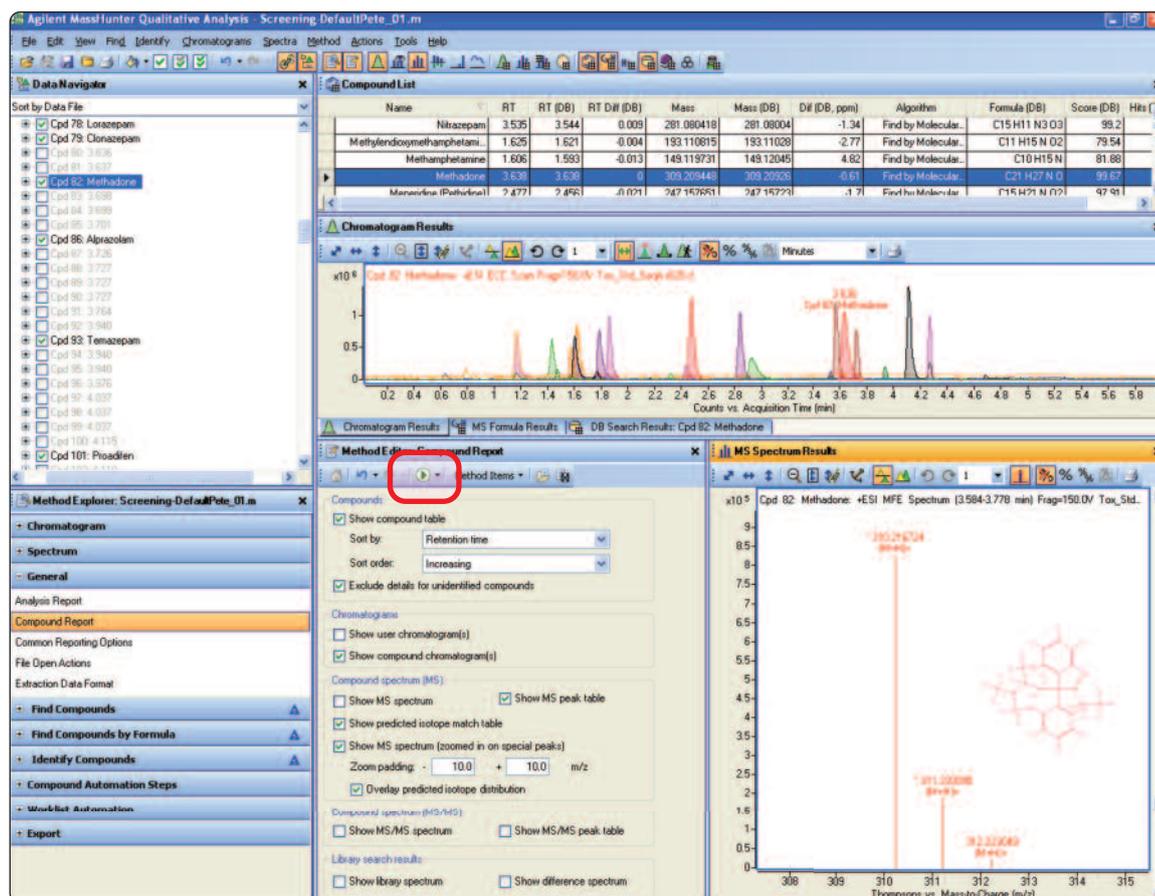


図 12. 手動、MFE、FBF による PCDL 検索に対する化合物レポートの作成

図 13 は、LC/MS 毒性試験混合液に関するレポートサマリの表紙ページの典型例です。

Qualitative Compound Report

Data File	Tox_Std_SeqA-r028.d	Sample Name	Tox_Std_100pg
Sample Type	Sample	Position	Vial 2
Instrument Name	SEIKO-90500107	User Name	Pete Stone
Acq Method	PStone_ToX_Std_01.m	Acquired Time	7/17/2009 9:41:03 PM
IRM Calibration Status	Success	DA Method	Screening-DefaultPete_01.m
Comment			

Compound Table

Compound Label	RT	Mass	Name	DB Formula	DB Diff (ppm)	HITS (DB)
Cpd 10: Codeine	1.169	299.1524	Codeine	C18 H21 N O3	-0.72	2
Cpd 17: Oxycodone	1.434	315.1475	Oxycodone	C18 H21 N O4	-1.44	1
Cpd 23: 3,4-Methylenedioxyamphetamine (MDA)	1.474	179.095	3,4-Methylenedioxyamphetamine (MDA)	C10 H13 N O2	-2.23	1
Cpd 29: Hydrocodone	1.575	299.1525	Hydrocodone	C18 H21 N O3	-1.2	2
Cpd 34: Methamphetamine	1.606	149.1197	Methamphetamine	C10 H15 N	4.82	2
Cpd 39: Methylenedioxymethamphetamine (MDMA)	1.625	193.1108	Methylenedioxymethamphetamine (MDMA)	C11 H15 N O2	-2.77	1
Cpd 41: Phenentermine	1.77	149.1199	Phentermine	C10 H15 N	3.78	2
Cpd 45: Strychnine	1.788	334.1684	Strychnine	C21 H22 N2 O2	-0.77	1
Cpd 50: 3,4-Methylenedioxyethamphetamine (MDEA)	1.862	207.1263	3,4-Methylenedioxyethamphetamine (MDEA)	C12 H17 N O2	-1.8	1
Cpd 57: Heroin	2.322	369.1579	Heroin	C21 H23 N O5	-0.63	1
Cpd 60: Cocaine	2.44	303.1475	Cocaine	C17 H21 N O4	-1.29	1
Cpd 62: Meperidine (Pethidine)	2.477	247.1577	Meperidine (Pethidine)	C15 H21 N O2	-1.7	1
Cpd 65: Trazodone	2.84	371.1516	Trazodone	C19 H22 Cl N5 O	-0.81	1
Cpd 67: Phencyclidine (PCP)	2.931	243.199	Phencyclidine (PCP)	C17 H25 N	-1.32	1
Cpd 73: Oxazepam	3.524	286.0511	Oxazepam	C15 H11 Cl N2 O2	-0.71	1
Cpd 74: Nitrazepam	3.535	281.0804	Nitrazepam	C15 H11 N3 O3	-1.34	1
Cpd 76: Verapamil	3.574	454.2833	Verapamil	C27 H38 N2 O4	-0.31	1
Cpd 78: Lorazepam	3.616	320.012	Lorazepam	C15 H10 Cl2 N2 O2	-0.19	1
Cpd 79: Clonazepam	3.625	315.0412	Clonazepam	C15 H10 Cl N3 O3	-0.42	1
Cpd 82: Methadone	3.638	309.2094	Methadone	C21 H27 N O	-0.61	1
Cpd 86: Alprazolam	3.726	308.083	Alprazolam	C17 H13 Cl N4	-0.33	1
Cpd 93: Temazepam	3.94	300.067	Temazepam	C16 H13 Cl N2 O2	-1.62	1
Cpd 101: Proadifen	4.116	353.2355	Proadifen	C23 H31 N O2	-0.18	1
Cpd 110: Diazepam	4.272	284.072	Diazepam	C16 H13 Cl N2 O	-1.36	1
Cpd 243: delta9-Tetrahydrocannabinol (THC)	5.275	314.2243	delta9-Tetrahydrocannabinol (THC)	C21 H30 O2	0.94	1

Compound Label	Name	RT	Algorithm	Mass
Cpd 10: Codeine	Codeine	1.169	Find by Molecular Feature	299.1524

図 13. MFE/データベース検索から出力したレポート

ワークリストの自動化:

分析者またはオペレータは、データマイニングルーチンの属性をすべて正しく設定した後、PCDL の検索オプションとレポート作成オプション (本アプリケーションノートに記載したもの) を適切なデータ解析メソッドとして保存できます。毎週繰り返すデータ操作に、このメソッドを使用できます。この設定を行うには、MassHunter 定性分析プログラムインタフェースの「Method」ドロップダウンメニューから「Save As」オプションを選択します。他の DA メソッドを保存または読み込まない限り、MassHunter 定性分析プログラムを開いたときに、デフォルト DA メソッドとしてこのメソッドが開きます。

繰り返し利用できるオプションを保存するもう 1 つの利点は、MassHunter 定性分析プログラムに内蔵された「ワークリスト自動化」機能にあります。ワークリスト自動化の設定例を図 14 に示します。データファイルへの問い合わせを自動的に実行し、MFE および PCDL データベース検索を使用し、指定したプリンタまたはデータファイルの場所に結果レポートを出力するルーチンをここで具体的に設定します。

この例では、手動実行と同じ操作順に自動データ解析手順のリストを定義しています。

最初に、サンプルデータファイルを読み込み、前回の結果が残っていればすべてクリアします。次に、保存した DA メソッドの設定に従って「Find by MFE」ルーチンを実行し、DA メソッドに指定されている PCDL データベースを検索して化合物の結果を探します。最後に、結果を自動送信し、DA メソッドに保存されている定義済みのフォーマットで最終レポートを作成します。

こうしたワークリスト自動化ルーチンをサンプルデータ取り込み中に自動的に実行するには、さらに 2 つの手順が必要です。

まず、DA 分析メソッドとワークリスト自動化ルーチンを取り込みメソッドに保存しておく必要があります。そのためには、「Method」メニューの「Save As」オプションを使用して、MassHunter 取り込みメソッド名を選択します。「OK」を選択すると、データ解析メソッドが取り込みメソッドの一部として統合されます。

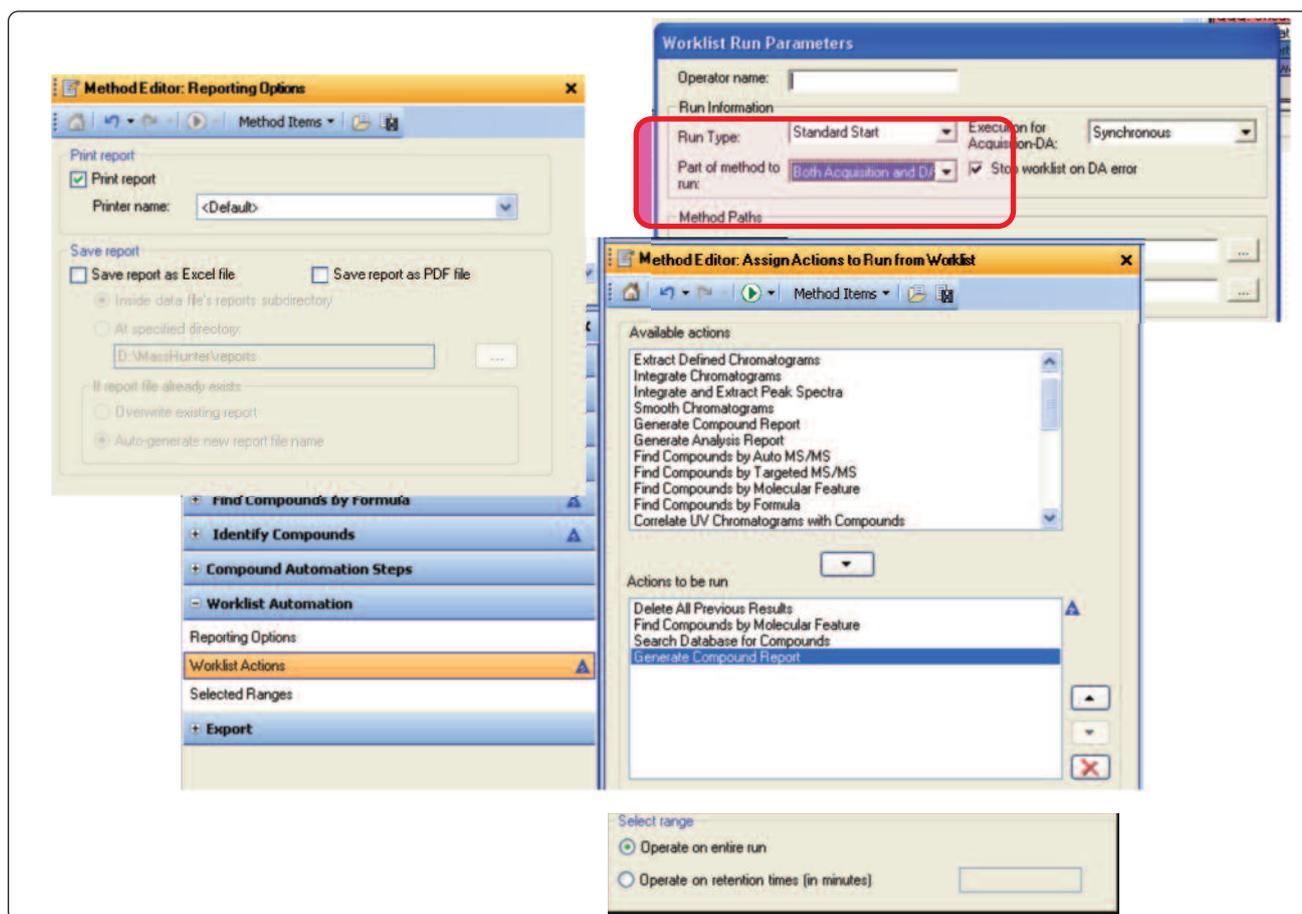


図 14. ワークリスト自動化メソッドの設定

最後に、データ取り込み中にワークリストデータ解析を自動的に実行するため、MassHunter 取り込みソフトウェアの「Worklist」メニューから「Worklist Run Parameters」ウィンドウを開く必要があります。図14はこのウィンドウのスクリーンキャプチャであり、強調表示してあるとおり、DA ルーチンで「Parts of method to Run」を「Both Acquisition and DA」と設定しています。データ解析の実行オプションには、「Synchronous」または「Asynchronous」を設定できます。

結論

分析対象を設定する方法と設定しない方法の両方で、サンプルを包括的にスクリーニングできる Agilent MassHunter パーソナル法医学および毒物学データベースキットを開発しました。そのデータベースには、潜在的な分析対象である約 6700 種類の化合物の精密質量データが含まれており、ユーザーは柔軟に活用できます。

MassHunter パーソナル法医学および毒物学データベースキットには以下の特徴があります。

- 複雑な分析を素早く簡単に開始できます。
- 約 6700 種の化合物の包括的データベースに、次の項目と機能が備わっています。
 - 化学構造式、化学式、および精密質量
 - PUBCHEM および ChemSpider のサイトへの直接リンク
 - IUPAC 名称
 - MS/MS スペクトルライブラリ作成機能
 - ユーザーの開発したクロマトグラフ条件に対する保持時間の追加や削除が可能な完全なカスタマイズ
- PCDL ソフトウェアインターフェースから、または直接 MassHunter 定性分析プログラムから結果を検索できます。
- Molecular Feature Extractor や Find by Formula などの強力な検索ツールを使用して結果のデータ検索をすることができます。
- MassHunter 定性分析プログラムおよび MassHunter 取り込みワークリストを使用してデータベースの検索を部分的または完全に自動化できます。

参考文献

1. "Multi-Residue Pesticide Analysis with Dynamic Multiple Reaction Monitoring and Triple Quadrupole LC/MS/MS" Agilent application note publication 5990-4253EN.
2. "Pesticide Personal Compound Database for Screening and Identification" Agilent technical note publication 5990-3976EN.
3. "Agilent Personal Forensics and Toxicology Database Quick Start Guide." Agilent Technologies Publication G6855-90003.
4. "Agilent G6855AA MassHunter Personal Forensics and Toxicology Database Kit Quick Start Guide" Agilent Technology Publication 5990-4264EN
5. "Agilent MassHunter Workstation Software Qualitative Analysis Familiarization Guide" Agilent Technologies Publication G3335-90060.

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., 2009
Published in Japan
August 3, 2009
5990-4252JAJP



Agilent Technologies