

# 生体サンプル中のプロポフォールの測定

## アプリケーションノート

法医学/毒物学

### 著者

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

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

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

### 概要

EI-MS/MS を用いた Agilent 220 イオントラップをベースに、生体サンプル中のプロポフォールの同定および定量メソッドを開発しました。プロポフォールのメソッド直線性が 0.1~2.0 µg/mL という対応範囲になっています。プロポフォールの分析では、サンプルマトリックスの干渉の低減、シグナル/ノイズ比の向上、および優れた感度と選択性という点で、GC イオントラップ MS/MS より多くの利点が得られます。

### はじめに

プロポフォールは、全身麻酔の導入にしばしば用いられる睡眠鎮静麻酔薬です。麻酔導入に一般的に用いられる投与量は約 2~2.5 mg/kg で、麻酔を維持するためには約 0.2 mg/kg/hr の注入が必要です。

このアプリケーションノートでは、血清、全血、硝子体液、尿、組織ホモジネートといった検体を分析するメソッドを紹介します。分析に必要なサンプルの最少量は 1.0 mL です。

生体サンプルを塩基性 pH にまでアルカリ化したのち、ヘプタンで抽出し、サンプルからプロポフォールを分離しました。



**Agilent Technologies**

## 実験手法

### 標準と試薬

**試薬** - ヘプタンおよび水酸化アンモニウム – 試薬グレード。

**標準** - プロポフォル (P-076 1 mg/mL) およびプロポフォル d-17 (P-077 100 µg/mL) 内部標準を Cerilliant から購入。

**プロポフォル QC 標準原液** - (1 g - MP Biomedical) を用いて、メタノール中で 1 mg/mL の分析用 QC 標準原液を作成。

**炭酸ナトリウム/重炭酸ナトリウムバッファ** - pH = 9.8 ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  100 g と  $\text{NaHCO}_3$  50 g を脱イオン水 1,000 mL 中で混合。5 N NaOH または 10 % リン酸を滴下し、pH を 9.8 に調整)。

その後、分析用標準を作成しました。

**プロポフォル- 10 µg/mL** (容量フラスコ中で Cerilliant 原液 0.1 mL をメタノールで 10 mL に希釈)。

**プロポフォル d-17 -10 µg/mL** (容量フラスコ中で Cerilliant 原液 1.0 mL をメタノールで 10 mL に希釈)。

**プロポフォル分析用 QC 標準 -10 µg/mL** (容量フラスコ中で MP Biomedical 分析用 QC 原液 0.1 mL をメタノールで 10 mL に希釈)。

すべての標準を、2 年間安定を保てる 2~8 °C で保管しました。

### コントロールおよびキャリブレーション用標準

**ネガティブコントロール** - 薬物の含まれない全血を米国赤十字から入手し、生理食塩水 (0.9 %) で 1:2 に希釈し、-20 °C で保管。1 年間安定。

**ローコントロール** - (0.25 µg/mL) 16 × 100 mm スクリューキャップ培養試験管中で、分析用プロポフォル QC 標準 (10 µg/mL) 25 µL を 975 µL ブランク血液に添加。

**ハイコントロール 1** - (0.75 µg/mL) 16 × 100 mm スクリューキャップ培養試験管中で、分析用プロポフォル QC 標準 (10 µg/mL) 75 µL を 925 µL ブランク血液に添加。

**ハイコントロール 2** - (1.5 µg/mL) 16 × 100 mm スクリューキャップ培養試験管中で、分析用プロポフォル QC 標準 (10 µg/mL) 150 µL を 850 µL ブランク血液に添加。

## サンプル前処理

- 16 × 100 mm 培養試験管中で分析用標準および薬物の含まれない血液を以下のように用いて、検量線を作成しました。
  - 0.1 µg/mL-10 µL 標準および 990 µL 血液
  - 0.2 µg/mL-20 µL 標準および 980 µL 血液
  - 0.5 µg/mL-50 µL 標準および 950 µL 血液
  - 1.0 µg/mL-100 µL 標準および 900 µL 血液
  - 2.0 µg/mL-200 µL 標準および 800 µL 血液
- ピペットを用いて、サンプル、ネガティブコントロール、ポジティブコントロール 1 mL を、ラベルを貼った 16 × 100 mm スクリューキャップ培養試験管に入れます。
- 各試験管に分析用内部標準 100 µL を追加します。
- pH 9.8 バッファ 2 mL を加え、ヘプタン 0.5 mL を加えます。
- ふたをしてボルテックス攪拌します (約 15 秒)。
- 15 分間回転させ、3,000 rpm で 10 分以上遠心分離します。
- ヘプタン層約 200 µL を、300 µL インサートを備えた ALS バイアルに移します。
- キャップをしめ、GC/MS へ移して分析します。

## GC/MS イオントラップ分析

カラム	Restek Rxi-5ms または相当品の 25 m × 200 µm、0.33 µm
注入量	2 µL
注入モード	スプリットレス
注入温度	250 °C
キャリアガス	ヘリウム
カラム流速	1.3 mL/min
オープンプログラム	70 °C、1 分維持 25 °C/min で 70~310 °C、4.4 分維持

## イオントラップ MS 条件

チューン	オートチューン
採取	EI-MS/MS スキャン 60-180 da
溶媒ディレイ	5.0 分
MS 温度	トラップ 210 °C、マニフォルド 50 °C、 トランスファーライン 310 °C

化合物	Rt (分)	プレカーサ	定量イオン	クオリファイア	励起電圧	フィラメント	マルチプライア	ターゲット
プロポフェール	6.007	163	121	107/135	0.31 V	50 $\mu$ A	+50 V	3,000
プロポフェール d-17	5.944	177	129	113/145	0.37 V	50 $\mu$ A	+50 V	3,000

## 結果と考察

以下の基準を用いて、プロポフェールの有無と存在量を測定しました。

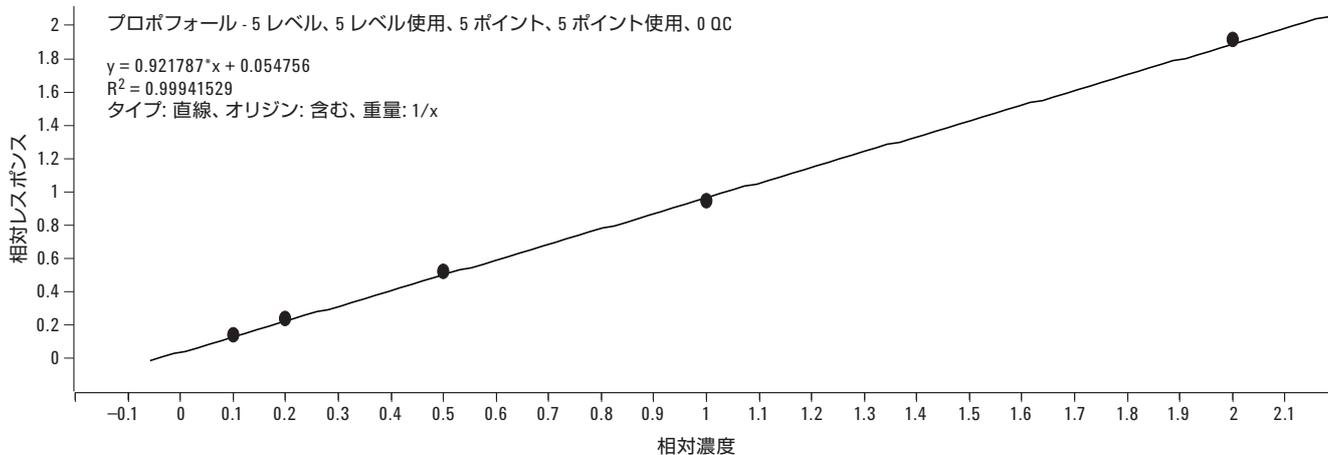
- クロマトグラフィが許容範囲内であること (ピーク分離能、ピーク対称性、キャリアオーバーがないこと)。
- 定量および定性に選択したイオンが存在すること。
- イオン比がキャリブレーションから得られたターゲット値の 20 % 以内であること。
- 検体から想定されるプロポフェールのリテンションタイムが、直近のキャリブレーションにおけるリテンションタイムの  $\pm 2\%$  であること。

## メソッド下限

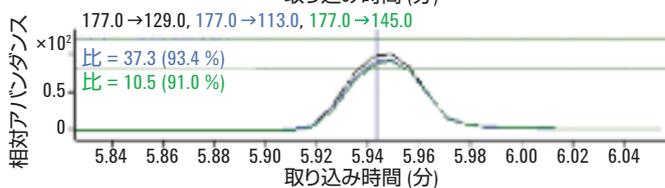
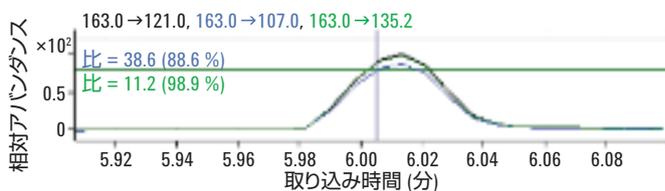
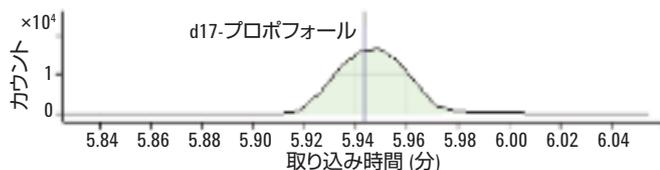
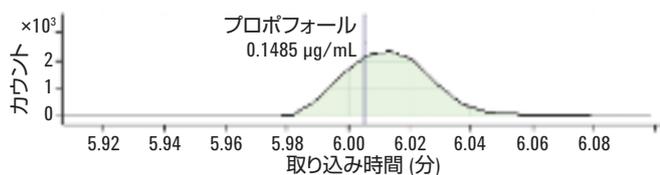
定量分析には、プロポフェールおよび内部標準の定量イオンの面積を使用しました。定量にあたっては、各キャリブレーション標準濃度の相対レスポンスから得られた検量線を用いて、未知物質およびコントロールの相対レスポンスを比較しました。ポジティブコントロールはターゲット範囲内でなければならず、ネガティブコントロールについてはプロポフェールが存在しない必要があります。

直線性	0.1~2.0 $\mu$ g/mL
検出下限 (LOD)	0.05 $\mu$ g/mL
定量下限 (LOQ)	0.10 $\mu$ g/mL
キャリアオーバー	濃度 2.0 $\mu$ g/mL 測定後は キャリアオーバーは観察されず
干渉	観察されず

## プロポフェールキャリブレーション



## 低濃度標準 0.1 $\mu$ g/mL



## バッチの結果

Sample							Propofol...				Propofol Results				Qualif...		Qualif...		D17 Propofol (...)		Qualif...		Qualif...	
ID	▼	Name	Date File	Type	Level	Acq. Date-Time	Exp. Conc.	RT	Resp.	MI	Calc. Conc.	Final Conc.	Accuracy	Ratio MI	Ratio MI	RT	Resp.	Ratio MI	Ratio MI	Ratio MI	Ratio MI			
		.10STD	.10STD 2-10-2012 1:24:12 PM SMS.D	Cal	1	2/10/2012 11:24 AM	0.1000	6.014	5033		0.1485	0.1485	148.5	38.6	11.2	5.949	34101	37.3			10.5			
		.20STD	.20STD 2-10-2012 1:46:03 PM SMS.D	Cal	2	2/10/2012 11:46 AM	0.2000	6.013	6423		0.2386	0.2386	119.8	43.4	12.4	5.941	26970	38.9			11.1			
		.50STD	.50STD 2-10-2012 2:07:51 PM SMS.D	Cal	3	2/10/2012 12:07 PM	0.5000	6.012	13168		0.5274	0.5274	105.5	46.8	11.1	5.941	29124	39.7			11.0			
		1.0STD	1.0STD 2-10-2012 2:29:51 PM SMS.D	Cal	4	2/10/2012 12:29 PM	1.0000	6.005	24141		0.9533	0.9533	95.3	45.0	11.7	5.941	25480	40.0			11.8			
		2.0STD	2.0STD 2-10-2012 2:51:46 PM SMS.D	Cal	5	2/10/2012 12:51 PM	2.0000	6.005	45371		1.9312	1.9312	96.8	42.5	10.5	5.941	23640	44.2			13.5			
		NEG	NEG 2-10-2012 3:13:40 PM SMS.D	Sample		2/10/2012 1:13 PM										5.941	21533	45.7			12.8			
		LOWQC	LOWQC 2-10-2012 3:35:34 PM SMS.D	Sample		2/10/2012 1:35 PM		6.006	6433		0.2861	0.2861		48.5	12.4	5.941	22524	37.5			11.5			
		HIGHQC	HIGHQC 2-10-2012 3:57:28 PM SMS.D	Sample		2/10/2012 1:57 PM		6.009	18310		0.8419	0.8419		42.7	11.2	5.941	21894	38.2			13.3			
		HIGHQC	HIGHQC 2-10-2012 4:19:26 PM SMS.D	Sample		2/10/2012 2:19 PM		6.004	41853		1.7010	1.7010		42.3	10.4	5.941	23476	37.6			12.0			
		BLANK	BLANK 2-10-2012 4:41:22 PM SMS.D	Sample		2/10/2012 2:41 PM																		
		663AM	663AM 2-10-2012 5:03:22 PM SMS.D	Sample		2/10/2012 3:03 PM		6.014	1460		0.0594	0.0594		46.8	11.3	5.941	24752	33.1			10.4			
		663PM	663PM 2-10-2012 5:25:20 PM SMS.D	Sample		2/10/2012 3:25 PM		6.004	74428		3.3371	3.3371		42.8	11.6	5.941	22442	38.8			12.4			
		BLANK	BLANK 2-10-2012 6:09:23 PM SMS.D	Sample		2/10/2012 4:09 PM																		
		0.05STD	0.05STD 2-10-2012 6:31:18 PM SMS.D	Sample		2/10/2012 4:31 PM		6.006	1499		0.0721	0.0721		40.7	13.3	5.941	20290	38.2			13.0			

外れ値およびキャリブレーション以下にタグをつけています。

## 結論

このアプリケーションノートでは、プロポフォル d-17 を内部標準として用いて、生体サンプル中のプロポフォルを測定する、選択性と堅牢性の優れた高感度メソッドを紹介しています。プロポフォルの分析では、GC イオントラップ MS/MS により少なからぬ利点が得られます。サンプルマトリックス干渉の低減、シグナル/ノイズ比の向上、優れた感度と選択性を備えた GC イオントラップ MS/MS は、プロポフォルに対応する信頼性の高いソリューションとなります。GC イオントラップ MS/MS 分析では、偽陽性および偽陰性の可能性が低くなるほか、分析結果の信頼性も向上します。上述のような最適化したメソッドを用いた高速ターゲット GC/MS/MS メソッドを使えば、現代の法医学ラボが直面しているプロポフォル分析に伴う既存の問題を解消することが可能です。3つのポジティブコントロールとネガティブコントロールを組み合わせて用いることで、正確な定量を確保し、未知生体サンプルにおける偽陰性を排除できました。各種サンプルマトリックスにおいて、低  $\mu\text{g/mL}$  域の検出下限が得られました。

## 参考文献

- Baselt, R.C., Cravey, R.H, Disposition of Toxic Dugs and Chemicals in MAN, 7th Edition, pages 949-951.
- Hikiji, W., Kudo, K., Usumoto, Y., Tsuji, A., Ikeda, N., A Simple and Sensitive Method for the Determination of Propofol in Human Solid Tissues by Gas Chromatography-Mass Spectrometry, Journal of Analytical Toxicology, Vol. 34, September 2010.

## 謝辞

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

## 詳細情報

本文書のデータは代表的な結果を記載したものです。アジレント製品とサービスの詳細については、アジレントのウェブサイト [www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp) をご覧ください。

[www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp)

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

本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。著作権法で許されている場合を除き、書面による事前の許可なく、本文書を複製、翻案、翻訳することは禁じられています。

アジレント・テクノロジー株式会社  
© Agilent Technologies, Inc., 2012, 2016  
Printed in Japan  
January 6, 2016  
5991-1608JAJP



Agilent Technologies