

Agilent 7200 GC/Q-TOF を使用した 違法薬物押収物中のヘロインの 特性解析および分類

アプリケーションノート

法医学

著者

Koluntaev Dmitry
InterLab Inc.
Moscow, Russia
Sergei Syromyatnikov and
Igor Sarychev
Federal Drug Control Service of Russian
Federation
Moscow, Russia
Sofia Aronova
Agilent Technologies, Inc.
Santa Clara, CA

概要

ノンターゲット GC/Q-TOF 分析アプローチを使用して、ストリートヘロインサンプルの識別に成功しました。Agilent Mass Profiler Professional ソフトウェアの統計分析ツールを使用して、未知サンプルが所属するサンプルグループを 90 % を超える真度で確認するサンプル予測モデルを構築しました。



Agilent Technologies

はじめに

違法薬物の取引に立ち向かうことは、法執行機関の主要な責務の1つです。麻薬密売に関連する刑事事件の捜査では、主な業務の1つに麻薬を国内に持ち込んだ犯罪組織の特定があります。押収した薬物の組成および品質に関する情報を得るための法医学試験は、そのような犯罪集団を特定し、解体するために非常に重要です。

違法薬物サンプルの化学組成を使用してその由来を調べるためには、さまざまな押収物から得られた麻薬の比較研究が必要です。最も一般的な違法薬物はヘロイン、いわゆるストリートヘロインです。通常、ストリートヘロインは、ヘロインだけではなく、薬理活性化化合物や中性基質などのさまざまな添加物が含まれる多成分混合物です。そのような不純混合物の組成を調べるには、複雑なマトリックス中の大量の化学成分を正確に同定し、定量できるメソッドが必要です。

Q-TOF 質量分析装置の精密質量機能は、このように複雑なストリートヘロインサンプルの特性解析に特に有効です。このアプリケーションノートでは、Agilent 7200 GC/Q-TOF を使用したストリートヘロインサンプルの比較研究について説明します。ヘロインサンプルの特性プロファイルが、Mass Profiler Professional (MPP) で実行される詳細な統計解析の基礎となりました。2つの主要なヘロインサンプルグループが特定され、特定のサンプルが所属するグループを正確に確認するサンプルクラス予測モデルが構築されました。このようなモデルは、ストリートヘロインサンプルの由来を確認し、それを広めた犯罪組織を特定するための貴重な法医学ツールを提供できます。

実験方法

装置

この実験には、Agilent 7890B GC システムと Agilent 7200 シリーズ GC/Q-TOF システムを使用しました。機器の設定条件を表 1 に示します。

サンプル前処理

ストリートヘロインのサンプルを 22 個の押収物から取得しました。ヘロインサンプルを最初にクロロホルムで抽出し、次にエチルアミン処理を行って増量剤を除去しました。下相を収集し、詳細に分析しました。

表 1. Agilent 7890 GC および Agilent 7200 GC/Q-TOF 質量分析装置の条件

条件	主要成分	微量成分
カラム	HP-5MS 30 m × 0.25 mm、0.25 μm 膜	
注入量	0.3 μL	0.5 μL
スプリット比	400:1	30:1
スプリット/スプリットレス 注入口温度	280 °C	
オープン温度プログラム	100 °C で 1 分間 10 °C/min で 100~280 °C (3 分間) 10 °C/min で 280~300 °C (5 分間)	
キャリアガス	ヘリウム、1.2 mL/min 定流量	
トランスファライン温度	290 °C	
イオン化モード	EI	
イオン源温度	230 °C	
四重極温度	150 °C	
スキャン範囲	50~500 <i>m/z</i>	
スペクトル採取レート	5 Hz、セントロイドとプロファイルの両方	
イオン化電流	12 μA	35 μA

微量化合物に使用したイオン化パラメータ

時間セグメント	イオン化エネルギー (eV)	時間範囲 (分)
1	12	11.9-12.4
2	12	15.0-15.8
3	12	19.3-19.8

データ処理と統計解析

データ処理にあたっては、MassHunter Quantitative Analysis ソフトウェアパッケージ (B.07) の Unknowns Analysis ツールを用いてクロマトグラフィーピークをデコンボリューションした後、NIST11 MSライブラリと比較して化合物を同定しました。化合物の同定は、精密質量および相対同位体アバundance情報に加えて、分子式ジェネレータ (MFG) や Fragment Formula Annotation (FFA) などの MassHunter 定性分析ツールを使用して確認しました。

MPP (12.6)、つまり多変量統計解析パッケージを使用して統計分析を実行し、さまざまなサンプルグループに異なるレベルで存在する化合物を検出しました。次に、このデータを MPP で使用し、サンプルクラス予測モデルを構築しました。

結果と考察

データ取り込みと化合物の同定

2つの異なる取り込みメソッドを使用して、サンプルの主要成分と微量成分のデータを取り込みました。主要成分のメソッドでは、飽和を避けるためにフィラメントにおけるエミッション電流を下げました。微量成分のデータは高いエミッション電流を使用して取得しましたが、主要成分の溶出時にはイオン化エネルギーを下げました。

Unknowns Analysis ツールを使用してクロマトグラフのデコンボリューションを行い、次に NIST11 MS ライブラリとの比較により化合物を同定しました。ヘロインサンプルの最も一般的な成分は、モルヒネアルカロイドとモルヒネ誘導体でした。1つを除くすべてのサンプルには、6-モノアセチルモルヒネおよびアセチルコデインを含むモルヒネのモノアシル誘導体が含まれていました。他の一般的なアルカロイドの多くや薬理活性物質もほとんどのサンプルで検出されました (表 2)。

表 2. ストリートヘロインで検出された一般的な化合物

アルカロイド

化合物	その化合物が含まれるサンプルの数
ノスカピン	50
パバベリン	50
メコニン	43
モルヒネ	40
ヒドロコタルニン	13
コデイン	10

偽和物

化合物	その化合物が含まれるサンプルの数
カフェイン	55
デキストロメトルファン	27
トリカイン	18
パラセタモール	5

ストリートヘロインサンプル中のアヘンアルカロイド含有物の特性解析時に、次の式を使用してアルカロイドの相対比を求めました。

$$U_n = \frac{S_n}{S_{ac} \times \Sigma n_j}$$

U_n = アルカロイド n の相対比、
 S_n = アルカロイド n のピーク面積、
 S_{ac} = アセチルコデインのピーク面積、
 Σn_j = 検出されたアルカロイドの全ピーク面積の合計

20個のサンプルの相対アルカロイド比を図1のグラフに示しました。これは、アルカロイドの組成に基づいてサンプルを2つの主要なグループに分類できることを示します。

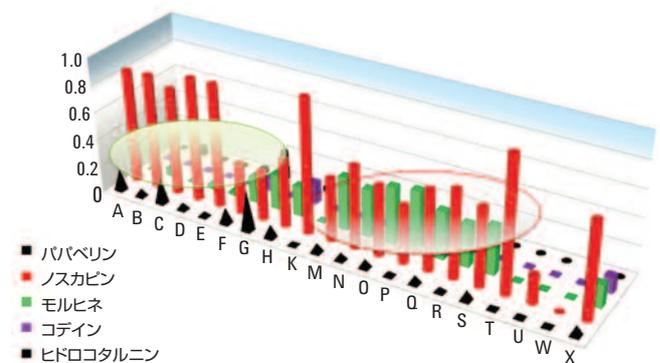


図 1. ストリートヘロインサンプルで同定された天然アルカロイドのアセチルコデインを基準にした比較

高いライブラリマッチスコアを示さない、いくつかの化合物では、精密質量情報と、分子式ジェネレータ (MFG) とライブラリ検索および Fragment Formula Annotation (FFA) などの MassHunter 定性分析構造解析ツールを使用して追加の確認手順を実行しました。図 2 に、55 個のうち 36 個のサンプルに存在する酢酸 6-アセチルクロトノシンとして仮に同定された 1 つの化合物の質量スペクトルを示します。

ライブラリヒットが検出されると、分子イオンがソフトウェアにより同定されます。ヒットの実験式と精密質量スペクトルデータに基づき、MFG および FFA は実験式の一部であるフラグメント式を割り当てます。これらのアノテーションが付いたイオンを緑色で示します (図 2)。化合物に属さない干渉イオンにより、または不十分なイオン統計により特定のフラグメントイオンについて良好なマッチが検出されない場合は、イオンを元の赤色で示します。分子イオンとその同位体に理論上の同位体分布を重ねました (ピンク色の四角形)。MS/MS を使用してこの化合物の同定を詳細に確認することで、イオン m/z 282.1081 が m/z 367.1418 イオンのプロダクトイオンであるかどうかを確認できました。

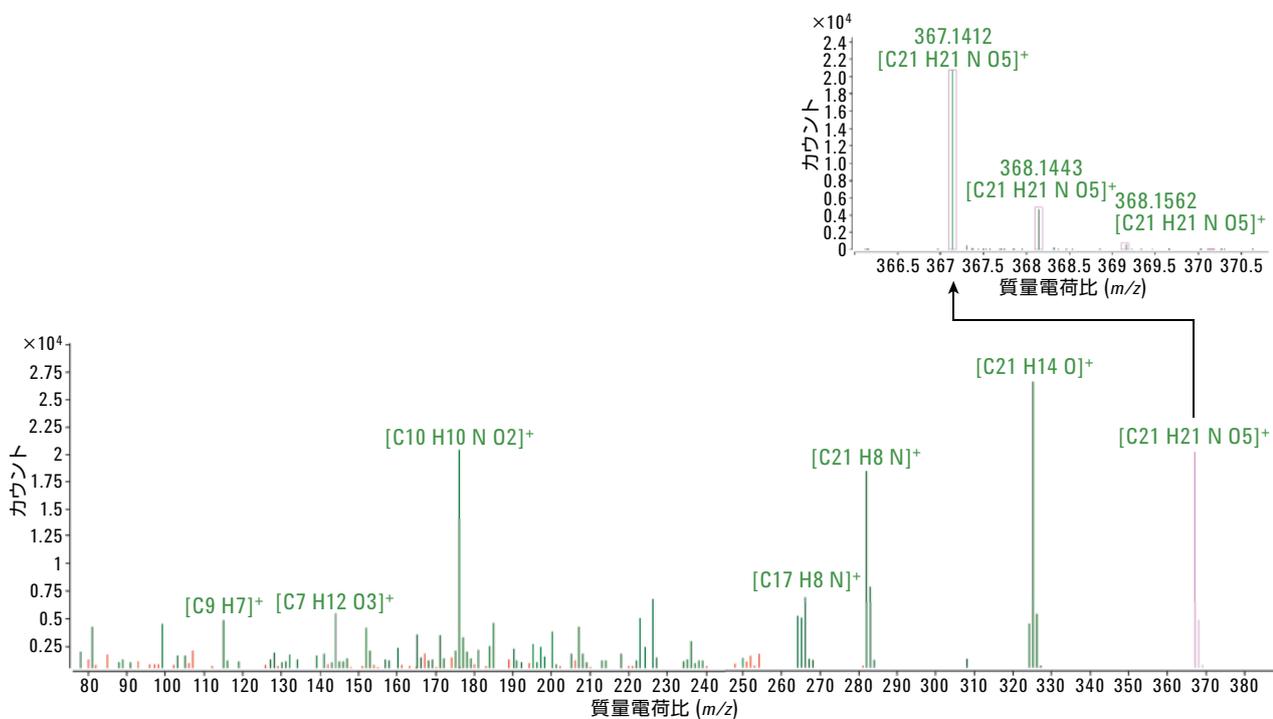


図 2. MFG と FFA およびライブラリ検索を使用して酢酸 6-アセチルクロトノシンと仮に同定された化合物のアノテーション付きの質量スペクトル。分子イオンとその同位体 (右上隅に拡大) に理論上の同位体分布を重ねて表示し (ピンク色の四角形)、観察された比の真度を示します。

主成分分析

主成分分析 (PCA) を使用して、主要成分と微量成分の両方のデータのクラスター化を観察しました。図 3 の PCA プロットでは、主要成分用の GC/Q-TOF メソッドを適用しても分析したサンプルグループは大きく分離されません (A)。微量成分用のメソッドを使用して取得したデータは、少なくとも 2 つの主要なグループに大きく分離されました (B)。

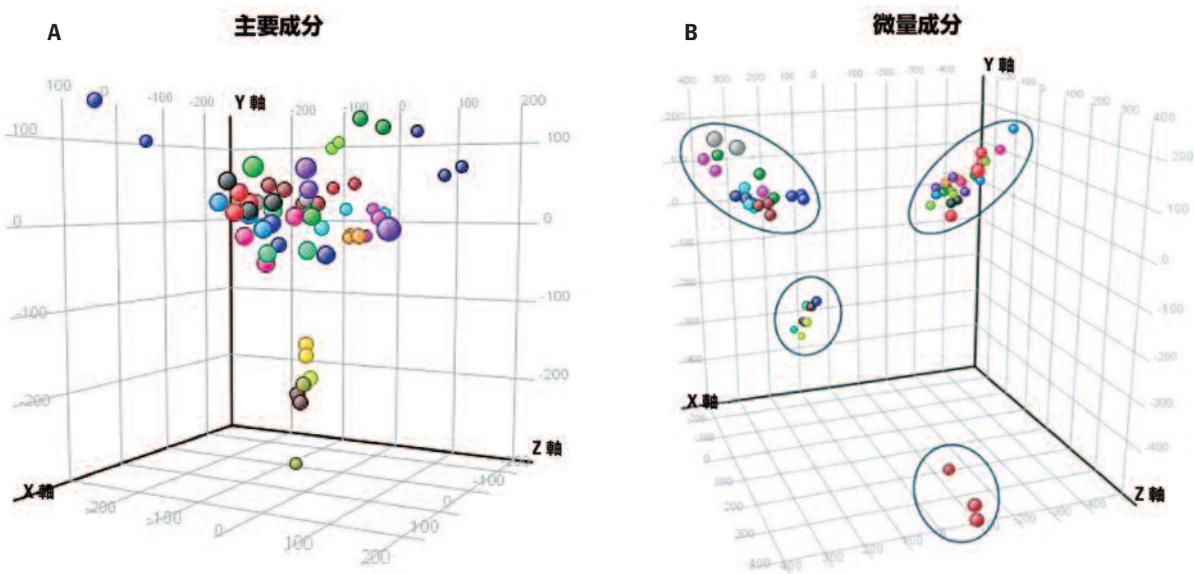


図 3. GC/Q-TOF 分析により同定された成分の PCA プロットでは、主要成分用の GC/Q-TOF メソッドを適用しても分析したサンプルグループは大きく分離されません (A)。微量成分用のメソッドを使用して取得したデータは、少なくとも 2 つの主要なグループに大きく分離されました (B)。

階層的クラスター分析

階層クラスター分析 (HCA) を使用して微量成分をさらに詳細に視覚化しました (図 4)。これにより 2 つの主要なサンプルグループの存在が確認されました。複数のヘロインアルカロイドに加えて、トリカイン、デキストロメトルファン、*p*-イソプロポキシアニリンなどの他の薬理活性物質や有機化合物が両方のグループに存在していました。

さまざまなヘロインアルカロイドの相対濃度の違いが、この 2 つのサンプルグループの分離に大きく寄与しています。HCA グラフの 2 つの小さい垂直のセクションをすべてのサンプルについて

拡大すると、これらのアルカロイドの寄与がわかります。例えば、7,8-ジヒドロ-3-デオキシ-モルフィノンおよびヒドロコタルニンの高い相対濃度 (赤で示す) が右側のサンプルグループを示し、メコニンやパパベリンの低い相対濃度 (青で示す) が左側のサンプルグループを示します。

ヘロイン由来ではない化合物を使用して 2 つの主要なサンプルグループを特長付けることもできます。例えば、*p*-イソプロポキシアニリンの低い相対濃度は左側のサンプルグループの特長を、高い相対濃度は右側のサンプルグループの特長を示します (図 4)。

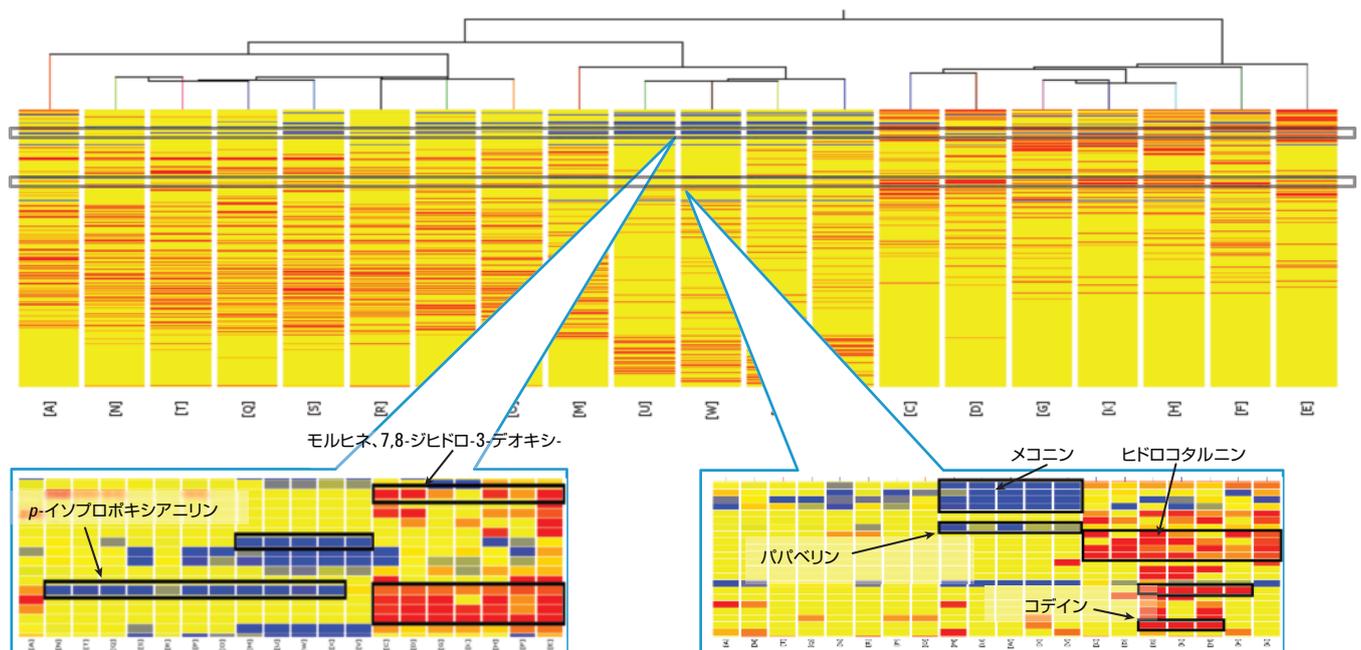


図 4. 階層クラスター分析 (HCA) は、サンプルが 2 つの主要なグループに分離されたことを示します。2 つのサンプルグループの分離に寄与する可能性の高いいくつかの特徴的な化合物を示します。

サンプルクラス予測モデル

PCA および階層プロットを使用した 2 つの主要な化合物クラスターの存在が、サンプルで同定された不純物の半定量分析の結果と一致しました (図 1)。これらの 2 つの主要クラスターをさらに使用して、MPP でサンプルクラス予測モデルを構築しました。これまでに 2 つの大きなグループに分割されたサンプルを第 2 の PCA プロットを使用して詳細に評価し、これらの 2 つの主要サンプルグループだけが含まれるときの化合物のクラスター化を確認しました (図 5)。図 5 では Volcano プロットも使用して、この分離に特に寄与する化合物を視覚化しました。Volcano プロットは、2 つのサンプルグループ間のアバダンスの倍率変化を示しています。± 2 倍変化のカットオフと 0.05 の p 値を使用することで、2 つのサンプルグループの違いが統計的に有意であることがわかりました。

サンプルクラス予測モデルの構築のために複数の技術が開発されてきました。MPP ソフトウェアにより、そのようなモデルを構築するための 5 つのアルゴリズム、PLS 判別分析 (PLS-DA)、サポートベクターマシン (SVM)、単純ベイズ (NB)、決定木 (DT)、およびニューラルネットワーク (NN) が提供されます。教師なし分類学習に最も適したアルゴリズムの 1 つである DT アルゴリズムを使用して、31 個のサンプルから得られたデータの 2 つのサンプルグループについてクラス予測モデルを構築しました (図 6)。このモデルがサンプルグループ 1 については真度 91.7 %、サンプルグループ 2 については真度 100 % であることが証明されました。次に、これらの 31 個のサンプルと、モデルの構築に使用しなかった 6 個の追加サンプルを使用して、このサンプルクラス予測モデルをテストしました。2 つを除くすべてのサンプルが正しく分類され、これが合理的な統計手順であることが証明されました。

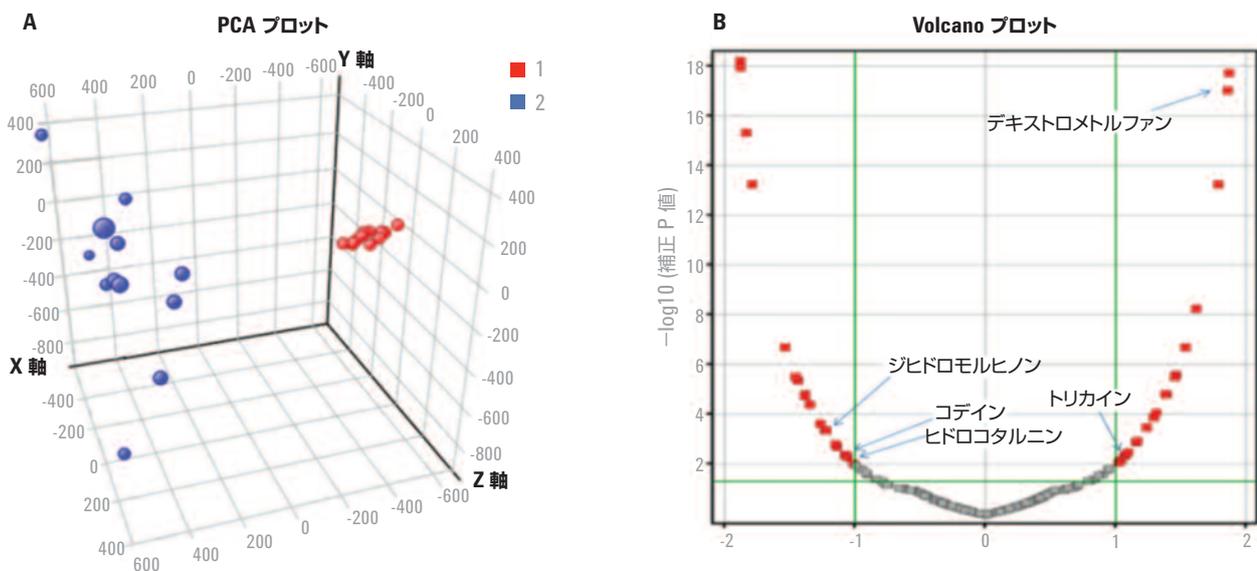


図 5. A) サンプル分類モデルを構築するために選択したサンプルの 2 つの評価済みサブグループの PCA プロット、および (B) 2 つのサンプルサブグループ間に大きく異なるレベルで存在する化合物を示す Volcano プロット

	[1] (Predicted)	[2] (Predicted)	Accuracy
Sample Group 1	11	1	91.667
Sample Group 2	0	12	100.000
Overall Accuracy			95.833

図 6. ストリートヘロインサンプルの GC/Q-TOF 分析から得られたデータで構築された決定木サンプルクラス予測モデルのパリデーショナルアルゴリズム出力。このモデルは、サンプルグループ 1 に所属するサンプルの予測については真度 91 %、サンプルグループ 2 に所属するサンプルでは 100 % の真度を示しました。

結論

ノンターゲット GC/Q-TOF 分析アプローチを使用して、ストリートヘロインサンプルの識別に成功しました。Agilent 7200 シリーズ GC/Q-TOF によって提供される精密質量情報は、複数のアヘンアルカロイドに加えて、他の非オピエート薬理活性物質の同定と定量に不可欠でした。Mass Profiler Professional ソフトウェアによってデータの自動マイニングおよび処理が可能になり、最も特徴的な化合物を検出して、非常に真度の高いサンプルクラス予測モデルを構築することができます。このモデルにより、法執行機関によって押収された不明ヘロインサンプルを、この実験で同定された 2 つのストリートヘロインサンプルグループの 1 つに割り当てることができます。

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。

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。

本資料に記載の情報、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。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2014

Published in Japan

May 2, 2014

5991-4369JAJP



Agilent Technologies