

米国 SAMHSA ガイドラインに従った 尿中フェンシクリジンの LC/MS/MS および GC/MS 分析

アプリケーションノート

法医学・毒性学

著者

Mike Chang
Agilent Technologies, Inc.

概要

米国乱用薬物精神衛生局 (SAMHSA) ガイドラインでは、尿中フェンシクリジン (PCP) のカットオフ値は 25 ng/mL とされています。SAMHSA の新ガイドラインでは、ガスクロマトグラフィー/質量分析法 (GC/MS) に代わる手法として、液体クロマトグラフィー/質量分析法 (LC/MS/MS) の選択肢が提示されています。この研究では、LC/MS/MS および GC/MS による PCP 分析のサンプル前処理法として、Agilent Bond Elut Certify ミックスモード固相抽出 (SPE) を使用しました。Bond Elut Certify は、直線性、検出下限 (LOD)、確度、精度の要件をすべて満たすため、尿サンプルからの PCP 抽出に最適です。また、LC/MS/MS と GC/MS に同じサンプル前処理法を適用できるため、ラボにおける機器選択の利便性が高まります。GC/MS はスプリットレスおよびスプリット注入モードで使用しました。



Agilent Technologies

はじめに

Agilent Bond Elut Certify ミックスモード SPE は、きわめて汎用性が高く、きわめてバランスの良い逆相特性とカチオン交換機能を備えています。このカチオン交換ケミストリを使えば、フェンシクリジン (PCP、 $pK_a = 8.29$) などの塩基性化合物をヒトの尿から抽出することができます。それ以外の夾雑成分はカラム内に残されます。Bond Elut Certify ミックスモード SPE を用いて新たに改良したサンプル前処理法は、環境に配慮した溶媒が求められる多くのラボのニーズに対応しています。溶媒使用量とサンプル量についても、他の多くの手法より少なくなります [1,2]。また、LC/MS/MS や、スプリットおよびスプリットレス注入モードを用いた GC/MS のアプリケーションデータは、法医学ラボで幅広く適用することができます。

材料とメソッド

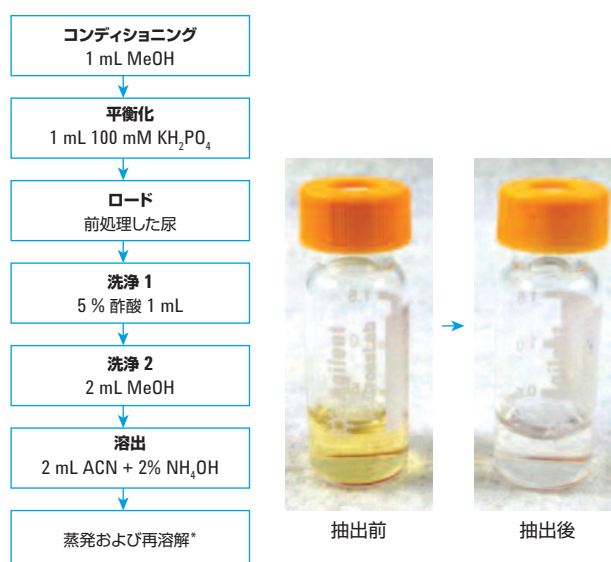
アセトニトリル、メタノール、ギ酸、水:	LC/MS グレード
KH_2PO_4 、 NH_4OH :	Milli-Q ろ過または LC/MS グレード
KH_2PO_4 、 NH_4OH :	試薬グレード
酢酸:	特級
標準物質:	PCP および PCP-d5、Sigma-Aldrich から入手
サンプル前処理法:	Agilent Bond Elut Certify、130 mg、3 mL、50/pk (p/n 12102051)
QC サンプル:	Liquichek 尿毒性分析用対照試料、レベル C2、Bio-Rad Laboratories から入手 (PCP 濃度 19 ng/mL)

LC/MS/MS および GC/MS 機器のパラメータの詳細を付録 A に示しています。

Agilent Bond Elut Certify ミックスモード SPE を用いたサンプル前処理

PCP および内部標準を必要な濃度でヒトの尿 1 mL にスパイクし、100 mM KH_2PO_4 0.5 mL を加え、pH を 6.0 ± 0.5 に調整しました。ダブルブランク尿サンプルについては、ヒトの尿に化合物をいっさい添加せずに作成しました。QC サンプルおよびブランク尿サンプルについては、内部標準のみを添加して作成しました。

固相抽出ワークフローを図 1 に示しています。プロセス全体をつうじて加圧マニホールドを使用し、洗浄 2 および溶出ステップのあいだに、2 分間にわたって高圧をかけました。明らかなサンプルクリーンアップ効果が得られました。



*LC/MS/MS の場合は 30:70 ACN:H₂O + 0.1% ギ酸 0.5 mL に再溶解、GC/MS の場合はヘキサン 0.5 mL に再溶解

図 1. サンプル前処理手順 (左) と、Agilent Bond Elut Certify ミックスモード固相抽出による抽出前後の尿サンプル (右)。

結果と考察

LC/MS/MS および GC/MS により、優れた検量線直線性が得られました。1~500 ng/mL の濃度範囲において、 R^2 は 0.9996 以上でした (図 2)。定量下限 (LOQ) は LC/MS/MS で 1 ng/mL、GC/MS で 5 ng/mL でした。LC/MS/MS と GC/MS で得られたデータを表 1 にまとめています。優れた確度と精度が得られた

ことは、Bond Elut Certify ミックスモード SPE の高い性能を証明しています。バッチの最初、中間、最後に分析したすべての QC サンプルは、 $\pm 20\%$ の確度範囲内に収まりました。この結果は、メソッドの堅牢性をさらに裏づけるものです。LC/MS/MS と、スプリットおよびスプリットレス注入モードを用いた GC/MS で得られたクロマトグラムを図 3 に示しています。

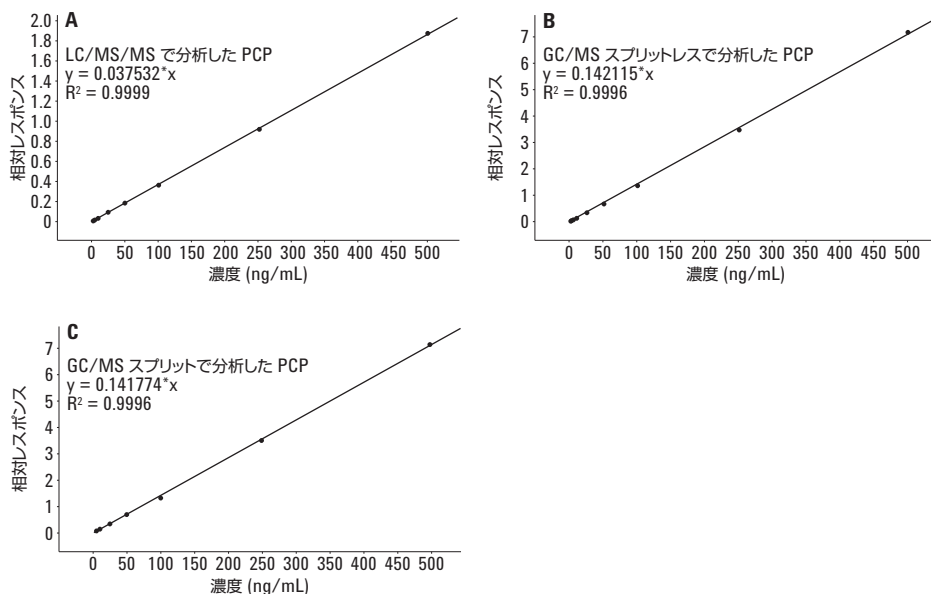


図 2. 尿中濃度 1~500 ng/mL の検量線。A) LC/MS/MS、B) パルスドスプリットレス注入モードを用いた GC/MS、C) パルスドスプリット注入モードを用いた GC/MS。

表 1. 尿中 PCP 分析における LC/MS/MS および GC/MS の確度および精度データのまとめ。

LC/MS/MS データ

R^2	LOQ	確度 (% 回収率)*(ng/mL)				精度 (% RSD)*(ng/mL)			
		5	10	25	500	5	10	25	500
0.9999	1 ng/mL	101 %	92.9 %	100 %	100 %	2.6 %	0.7 %	0.4 %	0.2 %

GC/MS データ (パルスドスプリットレス注入モード)

R^2	LOQ	確度 (% 回収率)*(ng/mL)			精度 (% RSD)*(ng/mL)		
		10	25	500	10	25	500
0.9996	5 ng/mL	95.2 %	96.0 %	97.4 %	3.6 %	1.6 %	2.6 %

GC/MS データ (パルスドスプリット注入モード)

R^2	LOQ	確度 (% 回収率)*(ng/mL)			精度 (% RSD)*(ng/mL)		
		10	25	500	10	25	500
0.9996	5 ng/mL	101 %	99.0 %	101 %	2.5 %	4.4 %	3.9 %

* 確度および精度データは 6 データポイントをもとに算出。

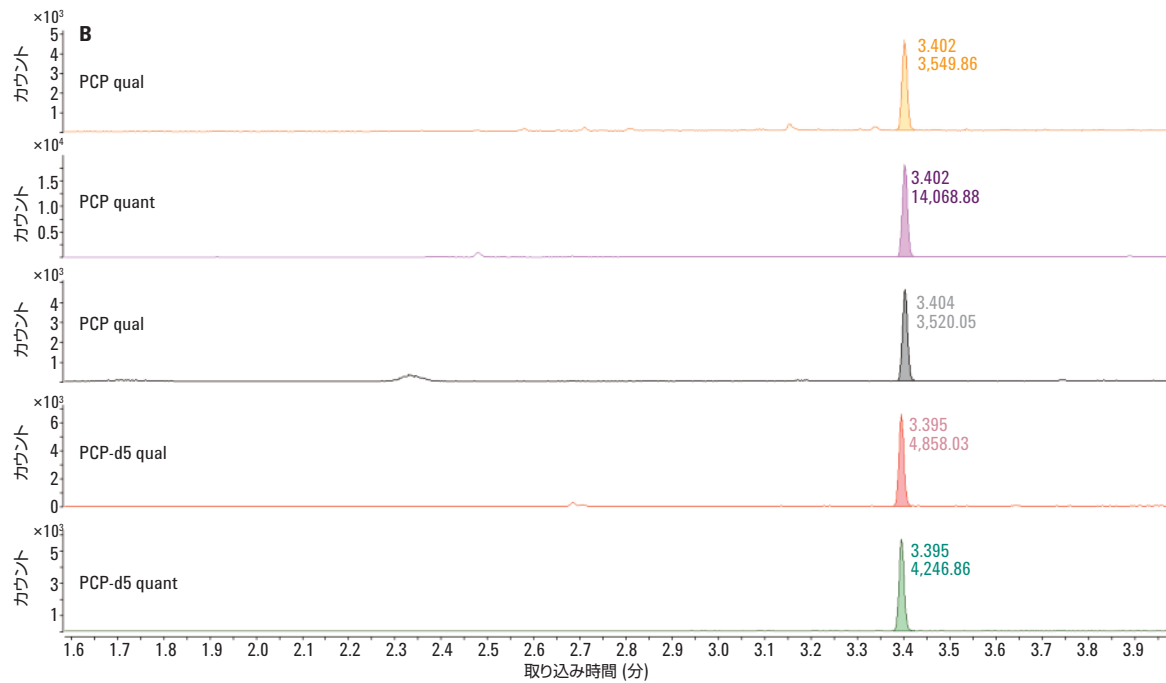
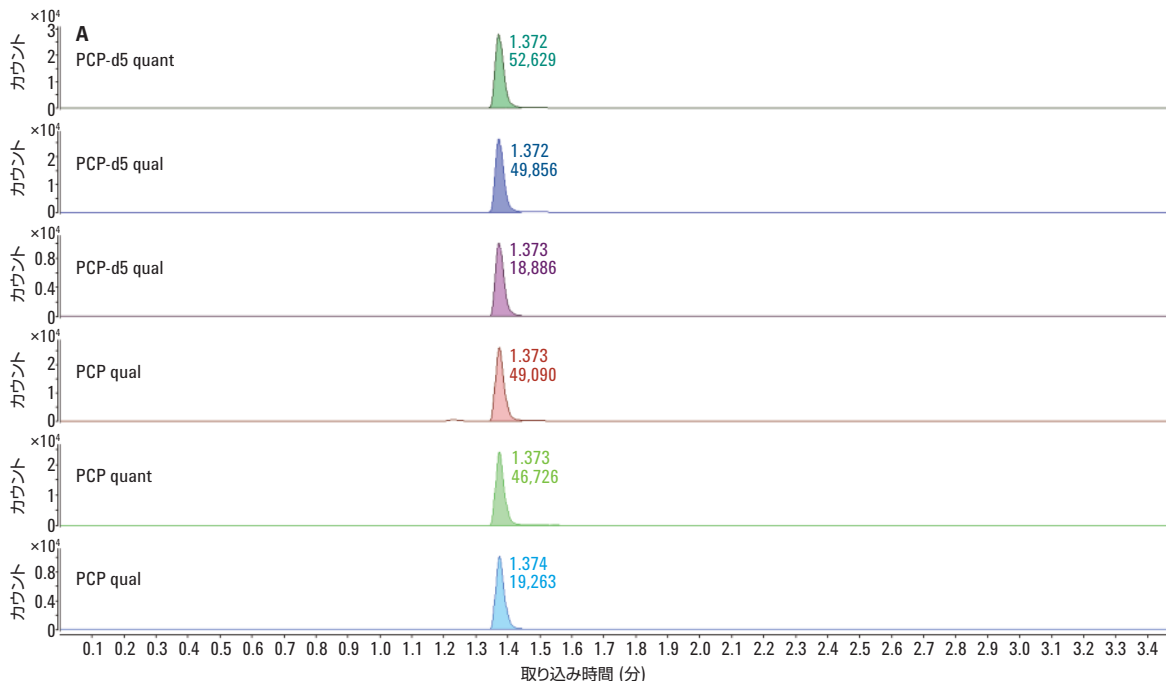


図 3. A) LC/MS/MS、B) パルスドスプリットレス注入を用いた GC/MS、C) パルスドスプリット注入を用いた GC/MS によるカットオフ値 (25 ng/mL) における尿中 PCP のクロマトグラム (続く)。

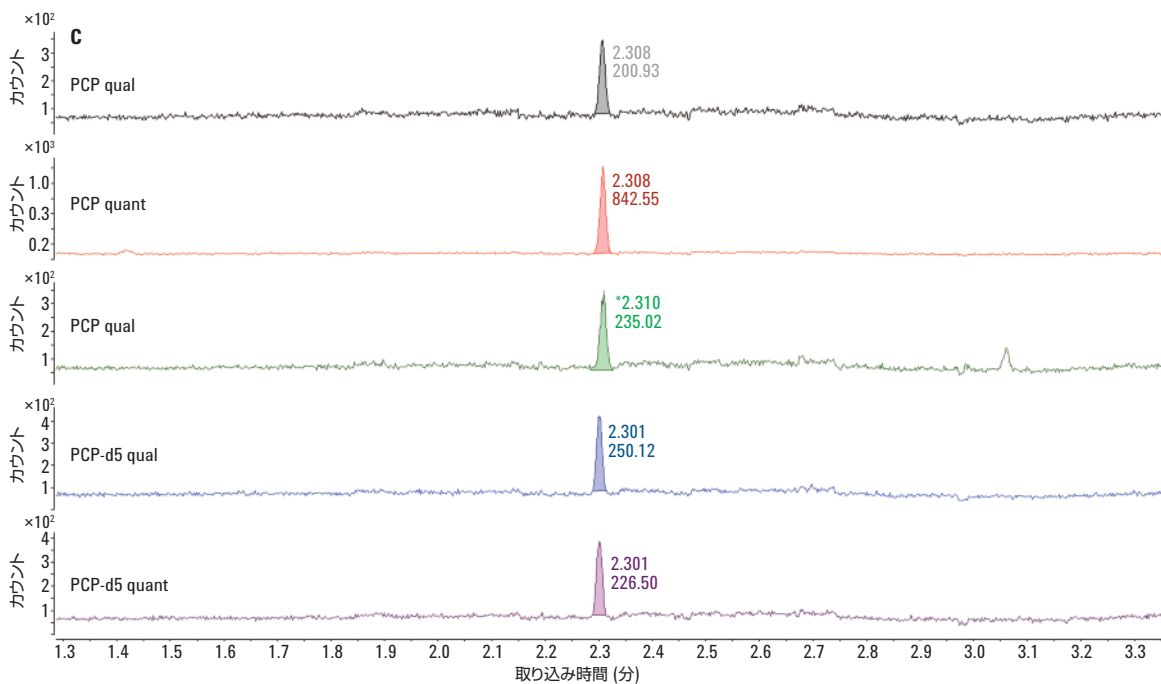


図 3. A) LC/MS/MS、B) パルスドスプリットレス注入を用いた GC/MS、C) パルスドスプリット注入を用いた GC/MS によるカットオフ値 (25 ng/mL) における尿中 PCP のクロマトグラム。

結論

Agilent Bond Elut Certify ミックスモード SPE を用いて、法医学アプリケーションにおいて尿中 PCP の抽出とクリーンアップを確実に起こすことができました。この結果は、LC/MS/MS およびスプリットまたはスプリットレス注入モードを用いた GC/MS において、使用機器にかかわらず優れた性能が得られることを実証しています。いずれの機器構成についても、1~500 ng/mL の範囲で優れた直線性が得られました (R^2 ; 0.9996)。このシンプルで堅牢なサンプル前処理法では、カットオフ値において優れた確度 ($100 \pm 4\%$) と精度 (% RSD~4.4%) が得られました。サードパーティが提供するすべての QC サンプルの分析結果は確度 $\pm 20\%$ の範囲内に収まり、メソッドの妥当性が裏づけられました。単一のサンプル前処理法手順を複数の機器プラットフォームおよび構成に使用できるため、使用機器にかかわらず、ラボのニーズに対応することが可能です。

参考文献

1. A. Ishii, *et al. Int. J. Legal Med.* **108**, 244 (1996).
2. C. Moore, C. Coulter, K. Crompton. Detection of Phencyclidine in Human Oral Fluid Using Solid Phase Extraction and Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometric Detection. Application note, Agilent Technologies Publication 5989-8084EN (2008)
<http://www.chem.agilent.com/library/applications/5989-8084en.pdf>

付録 A

機器条件

LC/MS/MS 条件

システム:	Agilent 1260 Infinity LC と Agilent 6460 トリプル四重極 LC/MS、Agilent JetStream ESI 搭載	
カラム:	Agilent Pursuit XRs Ultra Diphenyl、 2.0 × 50 mm、2.8 μm (p/n A7521050X020)	
A:	0.1 % ギ酸	
B:	ACN + 0.1 % ギ酸	
流量:	0.6 mL/min	
注入量:	5 μL	
サンプル溶媒:	30:70 ACN:H ₂ O + 0.1 % ギ酸	
ガス温度:	300 °C	
ガス流量:	7 L/min	
シースガス温度:	250 °C	
シースガス流量:	8 L/min	
キャピラリ:	3,500 V (+)	
ノズル電圧:	0 V	
グラジエント:	時間 (分)	% B
	0	5
	1	95
	1.5	95
	1.6	5
	3.5	5

MRM

化合物	プリカーサ	プロダクト
PCP	244.2	86.1
		91.1*
		159.1
PCP-d5	249.2	86.1*
		96.1
		164.2

*定量 MRM トランジション

パルスドスプリットレス注入の GC/MS 条件

GC/MS:	Agilent 7890A GC と Agilent 5975C シリーズ GC/MSD
カラム:	Agilent J&W DB-5ms ウルトライナート、 15 m × 0.25 mm、0.25 μm (p/n 122-5512UI)
セプタム:	ブリード/温度最適化ノンスティック、 11-mm セプタム、2 パック、50/pk (p/n 5183-4757)
ライナ:	Agilent ウルトライナートスプリットレスシングル テーバ、ガラスウール入り、25/pk (p/n 5190-3167)
キャリアガス:	He
流量:	1.0 mL/min、定流量
注入口温度:	250 °C
セプタムパージ:	3 mL/min、切り換えモード
注入モード:	パルスドスプリットレス
注入量:	1 μL
パルス圧力:	35 psi、0.5 分まで
スプリットベントへの パージ流量:	0.75 分で 50 mL/min
サンプル洗浄:	最大、2 回
サンプルポンピング:	5
オープン温度:	最初に 100 °C で 0.5 分維持、80 °C/min で 100~300 °C、 300 °C で 1 分維持 ランタイム: 4 分

SIM

	m/z	デュエルタイム
PCP	186	20
	200*	20
	242	20
PCP-d5	246	20
	248*	20

*定量イオン

パルスドスプリット注入の GC/MS 条件

パラメータはパルスドスプリットレス注入の GC/MS 条件と同じで、以下のみ変更。

注入モード:	パルスドスプリット
スプリット比:	10:1
スプリット流量:	10 mL/min
オープン温度:	最初に 150 °C で 0.5 分維持、80 °C/min で 150~300 °C、 300 °C で 1 分維持 ランタイム: 3.375 分

詳細情報

これらのデータは一般的な結果を示したものです。アジレントの製品とサービスの詳細については、アジレントの Web 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

Printed in Japan

May 15, 2014

5991-4575JAJP



Agilent Technologies