

LC/Q-TOF および LC-QQQ による ヒト全血中の薬物 102 種類のスクリーニング、 同定、および定量

著者

Limian Zhao and Hui Zhao,
Agilent Technologies, Inc.

概要

液体クロマトグラフィー / 四重極飛行時間型質量分析 (LC/Q-TOF) とトリプル四重極質量分析 (LC-QQQ) を組み合わせて使用し、全血中の 102 種類の薬物をスクリーニング、同定、定量するための包括的なワークフローを開発して検証しました。対象とする薬物は、15 クラスで構成される 66 種類の依存性薬物とその代謝物の一部、および 12 クラスで構成される 36 種類の医薬品です。カートリッジ内タンパク処理 (PPT) 抽出を用いてサンプルを前処理した後、Agilent Captiva EMR-Lipid クリーンアップを実施しました。抽出したサンプルは、分析の目的に応じて LC/Q-TOF でスクリーニングおよび同定するか、LC-QQQ で定量しました。Agilent All Ions MS/MS (データ独立型取り込み) と化合物データベースを組み合わせて、10 および 50 ng/mL で薬物を添加した全血サンプルに対してサスペクトスクリーニングを実施しました。検証したスクリーニングメソッドでは、10 および 50 ng/mL において 102 種類の薬物を 100 % スクリーニングすることが可能です。このワークフローでは、70 ~ 120 % の回収率枠内で 95 % の分析対象物、相対標準偏差 (RSD) < 20 % で 98 % の分析対象物、および 60 ~ 130 % のマトリックス効果枠内で 93 % の分析対象物が定量されるという優れた結果が得られています。定量メソッドは真度および精度分析によって検証されました。大部分の分析対象物で全スパイク濃度において優れた真度 ($100 \pm 20\%$) および精度 ($RSD < 20\%$) を示し、全血の定量下限 (LOQ) は 0.5 ~ 5 ng/mL の範囲であり、検量線の直線性は $R^2 > 0.99$ を示しました。

はじめに

法中毒学においては、生体検体中の依存性薬物 (DoA) および誤用されている処方薬の迅速かつ確実なスクリーニングおよび定量への需要が着実に増大しています。これは、依存性薬物数が増え、同時に分析対象のサンプル数も増加しているためです。従来、スクリーニングや同定のために最適なサンプルは尿でした。しかし、依存性薬物の代謝物を追加で同定しなければならず、さらには代謝物のみの同定も必要となったことから、スクリーニングと定量試験の複雑さと不確実性が増大しました。そのため、毒物分析においては、全血中の DoA のスクリーニングと定量が重要であり、必須となっています。

法中毒学では、幅広い生体サンプルに対して LC/Q-TOF や LC-QQQ などの LC/MS 技術が、有望な手法として盛んに使用されてきました。¹この技術が幅広く受け入れられているのは、誘導体化しなくてもサンプル前処理が容易であり、分析時間が短いという大きなメリットがあるためです。現在、依存性薬物の定量分析では、主に LC-QQQ とマルチプルリアクションモニタリング (MRM) が採用されています。^{2~4}MRM はサスペクト化合物の定量分析の手法ですが、薬物のスクリーニングに対しては限界があります。法中毒学のハイスループットスクリーニングで新たに注目を集めている手法は、TOF-MS のような高分解能質量分析です。^{5, 6}質量精度が高いため、薬物化合物の同定で正確なモノアイソトピック質量と同位体比が使用できます。サスペクトスクリーニングで使用できるのは、質量および同位体の精密なパターンマッチングが可能な毒性サンプルの TOF-MS 分析のみです。フラグメントイオン情報を追加することにより、さらに偽陽性を防止し、スクリーニングの真度を向上させることができます。最近では、QTOF-MS によるスクリーニングと同定の統合に関する調査も実施されています。^{7~9}

Agilent Captiva EMR-Lipid 充填剤は、法医学試験アプリケーションの複雑な生体マトリックスに対して、効率的で選択的なクリーンアップを実施できることがわかっています。^{9~14} SPE カートリッジ/プレートフォーマットに充填された EMR-Lipid 充填剤を使用すれば、充填剤にサンプルを通すだけでクリーンアップすることができます。この研究では、ヒト全血中の 100 種類を超える依存性薬物および誤用されている処方薬のスクリーニング、同定、定量に対する包括的なワークフローについて調査しました。サンプルをカートリッジ内タンパク処理によって前処理した後、Captiva EMR-Lipid カートリッジクリーンアップを実施しました。次に、前処理したマトリックスサンプルを LC/Q-TOF でスクリーニングおよび同定するか、LC-QQQ で同定し正確に定量しました。表 1 に、LC-QQQ で試験した薬物とその化学分類、リテンションタイム、および MRM パラメータを示します。

実験方法

試薬

分析対象物と同位体標識内部標準 (IS) はすべて、Sigma-Aldrich (セントルイス、ミズーリ州、米国) および Agilent Technologies (サンタクララ、カリフォルニア州、米国) から、混合標準原液、個別原液、または標準粉末として購入しました。その他の試薬と溶媒はすべて、LC/MS、HPLC、または分析グレードのものを使用しました。アセトニトリル (ACN) およびメタノール (MeOH) は Honeywell (マスキーゴン、ミシガン州、米国) から購入しました。試薬グレードのギ酸 (FA) は Agilent Technologies から入手しました (p/n G2453-85060)。酢酸アンモニウムおよび水酸化アンモニウムは Sigma-Aldrich (セントルイス、ミズーリ州、米国) から入手しました。ヒト全血は、BIOIVT (ウェストベリー、ニューヨーク州、米国) から購入しました。

標準および溶液の調製

市販の個別標準原液は、MeOH または ACN 中で 1 mg/mL または 100 µg/mL でした。市販の混合標準原液は、MeOH または ACN 中で 100 µg/mL または 250 µg/mL でした。残りの標準粉末については、MeOH 中 1 mg/mL で原液を調製しました。原液はすべて、-20 °C の冷凍庫に保管しました。化合物数が多いため、分析対象物 1 グループを含んだ 6 種類の中間スパイク溶液を、1:1 の MeOH/H₂O 中 10 µg/mL で調製しました。次に、すべての分析対象物を含む混合標準スパイク溶液を、1:1 の MeOH/H₂O 中 250 ng/mL で調製しました。このスパイク溶液を使用して、標準溶液と品質管理 (QC) サンプルを前処理しました。内部標準 (IS) スパイク溶液は、個別 IS 原液を 20/80 の MeOH/H₂O で 1 µg/mL に希釈して作成し、サンプルに直接スパイクするために用いました。すべての標準溶液を茶色のガラス製バイアルに入れ、-20 °C の冷凍庫で 1 か月保管しました。

移動相 A は、0.125 % ギ酸添加 10 mM 酢酸アンモニウム水溶液としました。移動相 B は、0.125 % ギ酸添加 95/5 の ACN/H₂O の 10 mM 酢酸アンモニウム溶液としました。ニードル洗浄液は、1:1:1:1 の ACN/MeOH/IPA/H₂O に 0.2 % ギ酸を加えた溶液としました。抽出溶媒である 95/5 の ACN/MeOH は新たに調製し、使用するまで -20 °C の冷凍庫に保管しました。80/20 の ACN/H₂O を、追加の溶出溶液として使用しました。再溶解溶液は、90/10 の 5 mM 酢酸アンモニウム緩衝液/ACN (v/v) としました。

機器と材料

サンプル前処理に使用した機器および材料は、次のとおりです。

- Agilent 加圧式マニホールド SPE カートリッジ 48 本用 (PPM-48) (p/n 5191-4101)
- PPM-48 用 6 mL カートリッジラック (p/n 5191-4103)
- コレクションラック、13 × 100 mm チューブ、PPM-48 用 (p/n 5191-4107)
- Agilent Captiva EMR-Lipid 3 mL カートリッジ (p/n 5190-1003)
- Agilent Captiva フィルタバイアル、再生セルロース (RC)、0.2 μm (p/n 5191-5940)
- マルチチューブ vortexer (VWR、ペンシルベニア州、米国)
- ガラスチューブ、13 × 100 mm および 13 × 85 mm (VWR、ペンシルベニア州、米国)
- エッペンドルフピペットおよびリピーター
- SPE TurboVap エバポレータ

分析条件

サンプルの分析には、Agilent 1290 Infinity II バイナリポンプ (G4220A)、Agilent 1290 Infinity II 高性能オートサンプラ (G4226A)、Agilent 1290 Infinity II サーモスタットカラムコンパートメント (G1316C) を搭載した Agilent 1290 Infinity II システムを使用しました。この LC システムを、Agilent Jet Stream iFunnel エレクトロスプレーイオンソースを搭載した Agilent トリプル四重極 LC/MS システム (G6490) に連結しました。データの取得と分析には、MassHunter ワークステーションソフトウェアを用いました。別の LC システムを、Jet Stream 技術採用の ESI ソースを搭載した Agilent 6545 LC/Q-TOF システムに連結しました。データ処理は、アジレントのカスタマイズ済み法中毒学パーソナル化合物データベースライブラリ (PCDL) B.07.01 に基づき、MassHunter Quantitative Analysis ソフトウェア (Q-TOF 用) バージョン 10.1 の Agilent SureMassdata フォーマットで実行しました。

すべての定量処理に対して、ダイナミックマルチプルリアクションモニタリング (dMRM) モードでデータを取り込みました。プリカーサとプロダクトイオン (定量イオンと定性イオン)、コリジョンエネルギー (CE)、化合物ごとに最適化した極性を表 1 に示します。すべて

の分析対象物に対して、次の設定は同じです。MS1 および MS2 分解能：ユニット、デルタ RT ウィンドウ：2 分、セル加速電圧：4 V。

LC の分析条件			
カラム	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18、100 × 2.1 mm、1.8 μm (p/n 959758-902) Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 ガード、2.1 × 5 mm、1.8 μm (p/n 821725-901)		
流量	0.4 mL/min		
カラム温度	40 °C		
注入量	5 μL		
移動相	A) 0.125 % 酢酸含有 10 mM 酢酸アンモニウム緩衝水溶液 B) 0.125% 酢酸含有10mM 酢酸アンモニウム95/5 ACN/H ₂ O 溶液		
ニードル洗浄	1 : 1 : 1 : 1 の ACN/MeOH/IPA/H ₂ O と 0.2 % 酢酸		
ニードル高さ	3 mm		
グラジエント	時間 (分)	%B	流量 (mL/min)
	0	10	0.4
	0.5	10	0.4
	8.0	80	0.4
	8.01	100	0.5
ストップタイム	11 分		
ポストタイム	2 分		
QQQ の分析条件			
ガス温度	220 °C		
ガス流量	18 L/min		
ネプライザ	22 psi		
シースガスヒーター	400 °C		
シースガス流量	12 L/min		
キャピラリー	3,500 V (正)、3,500 (負)		
ノズル電圧	0 (正)、0 (負)		
iFunnel パラメータ	高圧 RF : 120 V (正)、110 V (負) 低圧 RF : 60 V (正)、60 V (負)		
データ取り込み	ダイナミックマルチプルリアクションモニタリング (dMRM)		
取り込み極性	ポジティブおよびネガティブ		

Q-TOF の分析条件	
ドライガス (N ₂) 温度	250 °C
ドライガス流量	13 L/min
ネプライザ圧力	30 psig
シースガス温度	375 °C
シースガス流量	12 L/min
ノズル電圧	0 V (ESI+ の場合) および 2,000 V (ESI- の場合)
キャピラリー電圧	3,500 V (ESI+ の場合) および 5,000 V (ESI- の場合)
スキマ電圧	65 V
オクタポール高周波 (RF)	750 V
フラグメンタ	125 V

表 1. LC-QQQ での分析対象薬物の分類とデータ取り込みメソッドのパラメータ

薬物化合物	薬物クラス	RT (分)	ESI 極性	プリカーサイオン	プロダクトイオン				
					定量イオン	CE (V)	定性イオン	CE (V)	
エクゴニンメチルエステル	アルカロイド	0.78	陽	200.1	182.1	19	81.9	23	
ストリキニーネ		3.56	陽	335.2	184.1	40	156.1	40	
コカエチレン		5.00	陽	318.2	196.1	19	82.0	39	
リドカイン	アミノエチルアミド	3.67	陽	235.2	86.1	23	58.1	39	
フェニルプロパノールアミン	アンフェタミン	1.62	陽	152.1	117.0	19	134.1	7	
エフェドリン		2.18	陽	166.1	148.1	11	115.2	35	
アンフェタミン		2.83	陽	136.1	91.1	20	65.0	40	
MDA		3.07	陽	180.1	163.1	4	105.1	24	
フェンジメトラジン		3.11	陽	192.1	115.0	35	91.0	43	
メタンフェタミン		3.15	陽	150.1	91.1	20	119.1	8	
MDMA		3.30	陽	194.1	163.1	8	105.1	24	
ジエチルプロピオン		3.34	陽	206.2	105.0	19	77.0	55	
フェンテルミン		3.40	陽	150.1	91.0	40	65.1	48	
MDEA		3.65	陽	208.1	163.1	8	105.1	24	
プリミドン		抗けいれん剤	3.90	陽	219.1	162.1	11	91.0	39
カルバマゼピン			5.89	陽	237.1	194.0	23	192.1	23
シタロプラム			5.59	陽	325.2	109.1	35	262.1	23
クロルフェニラミン	抗ヒスタミン剤	4.89	陽	275.1	230.0	15	167.1	55	
ジフェンヒドラミン		5.51	陽	256.2	167.1	19	165.1	51	
リスベリドン	抗精神薬	4.85	陽	411.2	191.1	43	69.0	71	
ケチアピン		5.42	陽	384.2	253.1	23	221.1	55	
フェノバルビタール	バルビツール酸塩	4.98	陰	231.1	41.9	19	132.9	15	
ブタバルビタール		5.14	陰	211.1	42.0	27	—		
ブタルビタール		5.44	陽	223.1	41.9	27	180.0	11	
アモバルビタール		5.97	陰	225.1	42.0	27	—		
セコバルビタール		6.30	陰	237.1	42.0	19	—		
7-アミノクロナゼパム	ベンゾジアゼピン	4.09	陽	286.1	121.0	31	222.1	27	
クロルジアゼポキシド		5.03	陽	300.1	282.1	31	227.1	35	
ミダゾラム		5.44	陽	326.1	291.1	31	223.1	47	
フルラゼパム		5.47	陽	388.2	315.1	31	134.0	55	
デモキセパム		5.68	陽	287.1	105.0	23	179.9	23	
オキサゼパム		6.14	陽	287.1	241.1	20	104.1	40	
ニトラゼパム		6.22	陽	282.1	236.1	24	180.1	40	
ロラゼパム		6.30	陽	321.0	275.0	20	229.1	32	
アルプラゾラム		6.35	陽	309.1	205.1	55	281.1	23	
2-ヒドロキシエチルフルラゼパム		6.37	陽	333.1	109.0	39	119.0	80	
クロナゼパム		6.41	陽	316.1	214.0	51	270.0	27	
トリアゾラム		6.44	陽	343.1	239.1	51	308.0	31	
デスアルキルフルラゼパム		6.67	陽	289.1	225.9	35	140.0	39	
ノルジアゼパム		6.76	陽	271.1	140.0	31	165.1	35	
テマゼパム		6.80	陽	301.2	255.1	16	177.0	44	
クロバザム		6.97	陽	301.1	259.1	23	224.0	39	
ジアゼパム		7.49	陽	285.1	193.1	32	154.1	24	

薬物化合物	薬物クラス	RT (分)	ESI 極性	プリカーサイオン	プロダクトイオン				
					定量イオン	CE (V)	定性イオン	CE (V)	
アテノロール	ベータブロッカー	1.34	陽	267.2	190.1	19	145.1	23	
メトプロロール		4.13	陽	268.2	56.1	31	77.0	75	
プロプラノロール		5.16	陽	260.2	56.0	31	116.1	15	
ノルブプレノルフィン	ブプレノルフィン	4.78	陽	414.3	55.1	79	101.0	47	
ブプレノルフィン		5.71	陽	468.3	55.1	67	100.9	47	
メプロバメート	カリソプロドール	4.72	陽	219.1	158.1	7	54.9	23	
カリソプロドール		6.36	陽	261.2	55.0	31	176.1	7	
ベンゾイルエクゴニン	コカイン	3.60	陽	290.1	168.1	19	77.0	71	
コカイン		4.51	陽	304.2	182.1	16	82.0	48	
m-ヒドロキシベンゾイルエクゴニン	コカイン代謝物	3.20	陽	306.1	168.1	19	65.0	79	
ゾピクロン	シクロピロロン	5.47	陽	389.1	174.9	80	254.7	35	
ノルフェンタニル	フェンタニル	3.77	陽	233.2	84.1	23	55.4	43	
フェンタニル		5.40	陽	337.2	188.1	23	105.1	43	
ドキシラミン	ヒスタミンH1拮抗剤	3.78	陽	271.2	182.0	19	167.0	39	
ヒドロキシジン		6.10	陽	375.2	201.0	19	165.3	80	
ブレドニゾン	ホルモン	5.41	陽	359.1	147.2	33	341.2	9	
クロニジン	イミダゾール	2.47	陽	230	74.0	79	72.9	80	
ゾルピデム	イミダゾピリジン	4.66	陽	308.2	235.5	39	65.0	80	
ノルメペリジン	メペリジン	4.50	陽	234.2	160.1	15	56.1	31	
メペリジン		4.55	陽	248.2	174.1	16	220.1	20	
メサドン		6.38	陽	310.2	105.0	28	265.2	12	
ケタミン	NMDA拮抗剤	3.74	陽	238.1	125.0	31	89.0	71	
モルヒネ	麻酔薬	1.02	陽	286.2	152.1	79	153.0	47	
ヒドロモルフォン		1.39	陽	286.2	184.9	31	157.1	51	
ジヒドロコデイン		2.27	陽	302.2	199.1	35	128.1	79	
ナロキソン		2.44	陽	328.2	310.2	19	212.2	51	
コデイン		2.48	陽	300.2	128.1	60	165.1	40	
6-アセチルモルフィン		3.12	陽	328.2	211.0	31	165.0	59	
ヒドロコドン		3.24	陽	300.2	128.1	60	171.1	40	
デキストロメトルファン		5.31	陽	272.2	171.1	47	128.1	80	
EDDP		5.94	陽	278.2	234.1	35	115.0	80	
オキシモルフォン		オキシコドン	1.15	陽	302.1	284.0	19	227.1	31
オキシコドン			3.01	陽	316.2	241.1	28	256.1	24
プロアジフェン		P450阻害剤	7.20	陽	354.2	91.1	40	167.1	40
PCP	フェンシクリジン	5.17	陽	244.2	91.1	36	86.2	8	
アセプロマジン	フェノチアジン	5.78	陽	327.2	86.0	21	58.0	45	
プロメタジン		5.85	陽	285.1	71.0	47	86.0	19	
クロルプロマジン		6.57	陽	319.1	58.1	45	86.0	21	
リタリン酸	フェニル酢酸	3.44	陽	220.1	84.0	31	56.1	59	
ベラパミル	フェニルエチルアミン	6.26	陽	455.3	165.1	28	150.1	48	
ノルプロキシフェン	プロキシフェン	6.15	陽	326.2	252.2	3	91.0	51	
プロキシフェン		6.29	陽	340.2	58.1	15	266.2	7	
バロキセチン	選択的セロトニン再取り込み阻害薬	5.91	陽	330.2	70.1	31	192.1	19	
フルボキサミン		6.06	陽	319.2	200.0	23	71.1	19	
フルオキセチン		6.38	陽	310.1	117.0	59	91.0	80	
セルトラリン		6.51	陽	306.1	159.0	31	275.0	11	

薬物化合物	薬物クラス	RT (分)	ESI 極性	プリカーサイオン	プロダクトイオン			
					定量イオン	CE (V)	定性イオン	CE (V)
メチルフェニデート	刺激剤	4.21	陽	234.2	84.1	27	56.1	67
cis-トラマドール	トラマドール	4.17	陽	264.2	56.1	75	58.1	35
N-デスマチル-cis-トラマドール		4.21	陽	250.2	232.1	7	121.1	31
トラゾドン	トリアゾピリジン	4.98	陽	372.2	176.1	23	148.1	36
クロザピン	三環系 ジベンゾジアゼピン	5.28	陽	327.1	270.1	23	192.0	55
ドキシセピン		5.66	陽	280.2	107.0	27	77.0	59
ドチエピン		6.01	陽	296.2	202.0	63	222.6	31
デシプラミン		6.01	陽	267.2	72.0	19	44.1	55
シクロベンザプリン		6.12	陽	276.2	215	51	58.1	19
イミプラミン		6.13	陽	281.2	86.1	19	58.1	43
ノルトリプチリン		6.17	陽	264.2	91.0	27	105.0	23
アミトリプチリン		6.28	陽	278.2	91.0	27	105.1	35
クロミプラミン		6.73	陽	315.2	86.1	15	58.1	51
アンフェタミン-D5		2.81	陽	141.1	124.1	5	93.0	13
オキシコドン-D6		2.98	陽	322.2	304.2	19	262.0	27
ヒドロコドン-D6		3.18	陽	306.2	202.1	35	128.1	80
コカイン-D3		4.51	陽	307.2	185.1	30	82.0	48
ブタルピタール-D5		5.42	陰	228.1	42.0	23	185.0	7
アルプロゾラム-D5		6.32	陽	314.1	286.2	31	210.0	55
ジアゼパム-D3		7.45	陽	290.1	198.1	32	154.1	24

図 1 に、ヒト全血抽出物中 DoA の、LOQ での LC/QQQ クロマトグラムを示します。

SureMass 最適化を有効にして、高分解能および低質量範囲のダイナミックレンジ拡張 (m/z 1,700) を同時に実現するように、Q-TOF をチューニングしてキャリブレーションしました。サンプル中の薬物のサスペク

スクリーニングにおいて、MS モードでのフルスペクトルの All Ions MS/MS データ取り込み (ESI+ では m/z 50 ~ 1,000、ESI- では m/z 40 ~ 1,000) およびスキャン速度 4 スペクトル/秒での 4 個のスキャンセグメント (コリジョンエネルギー 0、10、20、および 40 V) を使用して、データ独立型取り込

み (DIA) を実行しました。精密質量測定 of イオン取得手段としては、ポジティブモードで m/z 121.05087 (プロトン化プリン) と 922.00980 (プロトン化 HP-0921)、ネガティブモードで m/z 119.03632 (脱プロトン化プリン) と 966.00072 (ギ酸イオン付加 HP-0921) のリファレンスイオンを選択しました。流量を 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ に設定した Agilent 1200

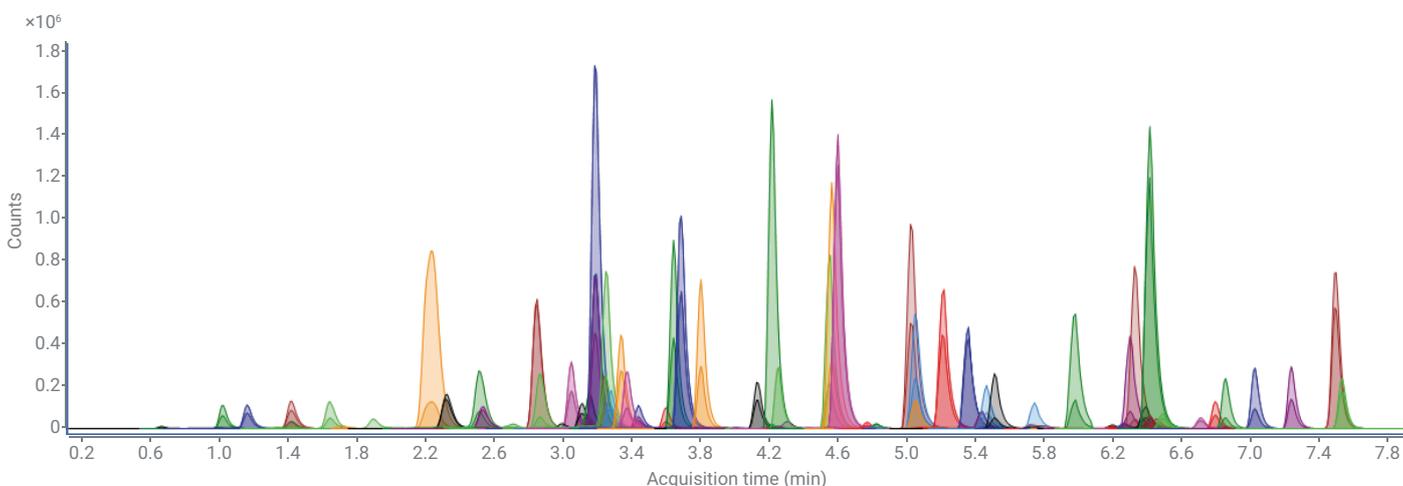


図 1. ヒト全血中に DoA 1 ng/mL に添加したヒト全血サンプルの LC-QQQ クロマトグラム (dMRM)。カートリッジ内タンパク処理とその後の Agilent Captiva EMR-Lipid クリーンアップによりサンプルを抽出しました。

アイソクラティックポンプと 100 : 1 スプリッタを使用して、リファレンス溶液をデュアル ESI ソースに導入しました。

サンプル前処理

サンプルマトリックスコントロールとしてヒト全血と K₃EDTA を使用して、メソッド開発と検証試験を実施しました。法医学ラボで使用される一般的なサンプルサイズに倣い、サンプル前処理には 0.5 mL の全血を使用しました。抽出の前に、ラベル付けしたコレクションチューブを下部に取り付けた PPM-48 プロセッサに EMR-Lipid 3 mL カートリッジを設置しました。ヒト全血を冷凍庫から取り出して、10 分間室温に置きました。次に、コントロールの血液サンプルに、標準および内部標準溶液を適量スパイクしました。抽出の前に、サンプルを 2 分間ボルテックスしました。さらに、次の手順によりサンプルを前処理しました。

1. 0.5 mL の全血サンプルを EMR-Lipid カートリッジに移し、2 mL の冷却変性溶媒である 95/5 の ACN/MeOH を添加しました。ここで重要なのは、変性溶媒を添加の直前に冷凍庫から取り出すことでした。全血で冷却変性溶媒を使用することにより、タンパク処理の効率が向上しました。全血は非常に粘性が高く多量のタンパク質が含まれているため、サンプルは通常、自然落下せずカートリッジ内に保持されます。
2. サンプル混合物を 5 ~ 10 分間沈殿させ、次に低圧 (2 ~ 5 psi) を加えてサンプルを徐々に溶出させました。ここで重要なのは、1 滴あたり 3 ~ 5 秒になるように流量を制御することでした。一度に複数のカートリッジを取り扱う際には、流量が最高レベルになるように常に圧力を調整して、突然高圧のスパイクが加わらないように注意する必要があります。

3. すべてのカートリッジを乾燥させた後、80/20 の ACN/H₂O 625 μL を追加してさらに溶出させました。カートリッジ内の液体が目視で確認できなくなるまで低圧により流量を制御し、高圧 (6 ~ 12 psi) を加えて充填剤ベッドを完全に乾燥させました。
4. コレクションチューブを取り外して、溶出液を 10 秒間ゆるやかにボルテックスしてよく混合させました。2 mL の溶出液を別のチューブに移して、35 °C で N₂ 乾燥させました。
5. 乾燥させたサンプルを、640 μL の再溶解溶液に再溶解させました。サンプルを 2 分間ボルテックスし、10 分間超音波処理してから、RC フィルタバイアルに移してろ過しました。その後、フィルタバイアル内のろ過物を注入して分析しました。

標準溶液と QC

全血マトリックスにスパイクした標準の影響を最小限に抑えるために、250 ng/mL の中間スパイク溶液を全血で調製しました。次に、この中間溶液を使用して、すべての検量線標準と QC サンプルをスパイクしました。検量線のダイナミックレンジは 0.5 ~ 50 ng/mL で、含まれる濃度は 0.5、1、5、10、20、40、50 ng/mL でした。5 種類のバルビツール酸塩薬物については、ダイナミックレンジを 5 ~ 250 ng/mL に調整しました。これは各濃度の 5 倍に相当する濃度です。調整を実施したのは、この薬物のクラスのイオン化およびフラグメンテーションが不十分で、機器感度が低かったためです。また、フェンタニルのダイナミックレンジは 0.05 ~ 5 ng/mL としました。これは各濃度の 10 分の 1 に相当し、混合標準原液中のフェンタニルの濃度が 10 分の 1 だったことが理由です。これらの標準溶液は、全血ブランクに中間標準スパイク溶液を適量スパイクした後、十分ボルテックスして作成しました。

メソッド検証試験のために、各分析対象物のキャリブレーション範囲に応じて、プレススパイクした QC サンプルを分析対象物ごとに低 QC、中 QC、高 QC 濃度で分析しました。これらの QC サンプルは、サンプル全血ブランクに中間スパイク溶液を適量スパイクすることで作成しました。次に、適量の IS スパイク溶液 (20/80 の MeOH/H₂O 中 1 μg/mL) を標準溶液と QC サンプルにスパイクし、最終的に全血中 50 ng/mL の IS 濃度となるようにしました。すべてのサンプルをゆるやかにボルテックスして完全に混合させ、サンプル前処理の準備を完了しました。

サスペクトスクリーニングおよび同定 (LC/Q-TOF)

開発したサンプル前処理メソッドにより、依存性薬物標準をスパイクした全血サンプルを前処理し、LC/Q-TOF 分析を実施しました。LC-QQQ 定量用に前処理した QC サンプルの場合と同じ方法で、全血ブランクをスパイクしました。同じ中間標準スパイク溶液により全血マトリックスコントロールをスパイクし、10 および 50 ng/mL の濃度としました。ただし、5 種類のバルビツール系薬物では 50 および 250 ng/mL、フェンタニルでは 1 および 5 ng/mL の濃度としました。また、低濃度スクリーニングの要件に合わせて、濃度 1 ng/mL の別のサンプルをスパイクし、ブプレノルフィン用のデータを収集しました。この標準スパイクの結果、全血サンプル中の 102 種類の薬物すべてに対して陽性所見が得られました。次に、スパイクしたすべてのサンプルを前述のメソッドにより前処理しました。

開発したスクリーニングメソッドを実際に検証するために、別の科学者が全血ブランクサンプルを前処理しました。LC/Q-TOF でサンプルをスクリーニングおよび同定した科学者に対しては、薬物数、薬物タイプ、薬物濃度などのサンプルスパイクの情報はまったく伝えませんでした。これらのサンプルを未知サンプルとして取り扱い、この未知サンプルのうち 8 種類をコントロールブランクとともに前処理しました。LC/Q-TOF でスクリーニングおよび同定した後、サンプルを前処理した科学者が結果を検証しました。

定量メソッドの検証 (LC-QQQ)

メソッドの分析感度と選択性、回収率とマトリックス効果、真度と精度を評価して、定量メソッドを検証しました。標準溶液および QC は、適切にプレスパイクしました。サンプルとブランクを EMR-Lipid 3 mL カートリッジに分注しました。この中には、ダブルマトリックスブランク、マトリックスブランク (IS でスパイク)、標準溶液 1 セット、3 個のマトリックスブランク、各スパイク濃度での QC サンプルの複製物 6 個がそれぞれ含まれていました。

分析対象物の回収率とマトリックス効果の実験では、全血中にプレスパイクした濃度 10 および 50 ng/mL のサンプル、再溶解ステップ時にポストスパイクした同等濃度のマトリックス適合サンプル、および希釈していない同等濃度の標準について、それぞれ 6 回の繰り返し分析を実施しました。回収率とマトリックス効果の評価には、分析対象物のピーク面積を用いました。プレスパイクしたサンプルとマトリックス適合サンプルでの分析対象物のピーク面積の比を用いて分析対象物の回収率を算出すると同時に、マトリックス適合サンプルと希釈のない標準での分析対象物のピーク面積の比を用いてマトリックス効果を算出しました。

結果と考察

サンプル前処理の最適化

サンプル前処理は、ワークフロー全体を成功させるために重要な役割を果たしています。サンプル前処理メソッドには、分析対象物の良好な回収率と再現性、並びに効率的なマトリックスクリーンアップが期待されています。メソッドは分析者間およびラボ間で確実に移管されるべきです。そのため、シンプルで堅牢なサンプル前処理メソッドは重要です。EMR-Lipid 製品は、従来の PPT 後のパススルークリーンアップにより、効率的にマトリックスを除去できることが示されています。この研究では、分析対象物の回収率、再現性、およびマトリックス効果に基づいて、サンプルワークフローを詳細に調査しました。

カートリッジ内 PPT とオフライン PPT

カートリッジ内 PPT とオフライン PPT で、ワークフローの有効性と利便性、および分析対象物の回収率を比較しました。

カートリッジ内 PPT は、オフライン PPT と比較してサンプル移送ステップが少なく、操作がシンプルという点でメリットがありました。全血は粘性が高いため、EMR-Lipid カートリッジは、全血をカートリッジに追加した後も完全な状態で保持していました。試験した多数のカートリッジにおいて、全血の流出は認められませんでした。カートリッジ内に大量の沈殿物が生成されている場合でも、重大な詰まりが発生したカートリッジはありませんでした。カートリッジごとに流量の変動が認められる場合がありますが、これは PPT に差があり沈殿物の粒子サイズが変動していたことが原因です。通常、これらの変動は問題にはならず、流量が最高レベルのカートリッジをベースにして真空または陽圧制御を調整することにより、流量は適切に制御できます。回収率の結果を比較することにより、今回のカートリッジ内 PPT では大部分の分析対象物で回収率が 20 ~ 25 % 改善されていることもわかりました。102 種類の分析対象物の平均回収率は、オフライン PPT の 62 % からカートリッジ内 PPT では 86 % まで増大し、平均 RSD はオフライン PPT の > 20 % からカートリッジ内 PPT では < 10 % まで減少しました。結果的に、カートリッジ内 PPT はサンプル前処理ワークフローでの有効性と性能を向上させたことが確認されたため、最適化したメソッドに選択されました。

EMR-Lipid の溶出

EMR-Lipid カートリッジは、不要なマトリックス干渉、特に脂質に対して、効率的なパススルークリーンアップを実現します。分析対象物全体で溶出を改善して高回収率を実現するためには、追加の溶出ステップが推奨されていました。^{10~13}この追加の溶出の影響について調査し、分析対象物の回収率と再現性を比較しました。その結果、多数の薬物化合物において、追加の溶出により回収率が 10 ~ 20 % 改善されていることがわかりました。これは特に、6-アセチルモルフィン、リタリン酸、ベンゾイルエクゴニン、ドキシラミン、リスベリドン、クロルフェニラミン、ミダゾラム、アセプロマジン、トリアゾラムで顕著であり、回収率は 50 % 超増大していました。最終的な最適化メソッドでは、EMR-Lipid カートリッジで追加の溶出を実施しました。

LC/Q-TOF でのスクリーニングおよび同定

データ取り込み

Agilent All Ions MS/MS データ独立型取り込み (DIA) を用いて、データを取り込みました。コリジョンセルにより、0、10、20、40 V というそれぞれ異なるコリジョンエネルギー (CE) 設定を用いてすべてのイオンを断片化し、ESI+ では m/z 50 ~ 1,000、ESI- では m/z 40 ~ 1,000 の規定質量範囲で、擬分子イオンごとに多数のフラグメントイオンを生成しました。その上で、Agilent PCDL とすべてのイオン (擬分子イオンとフラグメントイオン) の精密質量、同位体忠実度、リテンションタイム、擬分子イオンとフラグメントイオンの共溶出を用いて、個別の化合物を同定しました (表 2)。分析対象物の同重体ペアであるメタンフェタミン/フェンテルミン、メチルフェニデート/ノルメペリジン、ヒドロモルフォン/モルヒネ、およびコデイン/ヒドロコドンの場合、化合物の識別で重要な要素はクロマトグラフィー分離であり、同定で重要なパラメータはリテンションタイム (RT) でした (表 2 の D 列を参照)。

表 2. LC/Q-TOF での分析対象物の同定パラメータ

化合物名	分子式	付加物	RT (分)	RT 差、 10 ng/mL	ターゲット 擬分子イオン	正確な フラグメント 1	正確な フラグメント 2	正確な フラグメント 3	正確な フラグメント 4	プリカーサ 質量精度 (ppm)、 10 ng/mL	検証した イオン数、 10 ng/mL
A1	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
2-ヒドロキシエチルフルラゼパム	C ₁₇ H ₁₄ ClFN ₂ O ₂	[M+H] ⁺	5.61	0.004	333.08006	211.07918	109.04481	140.02567	140.02567	1.15	5
6-アセチルモルフィン	C ₁₉ H ₂₁ N ₃ O ₄	[M+H] ⁺	2.42	0.008	328.15433	165.06988	211.07536	181.06479	58.06513	0.70	3
7-アミノクロナゼパム	C ₁₅ H ₁₂ ClN ₃ O	[M+H] ⁺	3.51	0.008	286.07417	121.07603	250.09749	222.10257	94.06513	0.36	3
アセプロマジン	C ₁₉ H ₂₂ N ₂ O ₅	[M+H] ⁺	4.99	0.012	327.15256	58.06513	86.09643	222.09134	254.06341	1.30	4
アルプラゾラム	C ₁₇ H ₁₃ ClN ₄	[M+H] ⁺	5.62	0.001	309.09015	205.07603	281.07143	240.04488	219.09168	0.07	4
アミトリプチリン	C ₂₀ H ₂₃ N	[M+H] ⁺	5.45	0.004	278.19033	91.05423	233.13248	105.06988	117.06988	0.70	1
アモバルビタール ²	C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O ₃	[M-H] ⁻	5.13	0.006	225.12447	41.99854	182.11865	68.99820	85.00435	-1.90	1
アンフェタミン	C ₉ H ₁₃ N	[M+H] ⁺	2.32	0.007	136.11208	91.05423	65.03858	119.08553	63.02293	0.98	3
アテノロール	C ₁₄ H ₂₂ N ₂ O ₃	[M+H] ⁺	1.18	0.003	267.17032	145.06479	56.04948	190.08626	74.06004	0.32	2
ベンゾイルエクゴニン	C ₁₆ H ₁₉ NO ₄	[M+H] ⁺	2.97	0.005	290.13868	105.03349	168.10191	77.03858	82.06513	0.53	3
ブプレノルフィン ³	C ₂₉ H ₄₁ N ₃ O ₄	[M+H] ⁺	5.02	0.007	468.31084	55.05423	396.21803	414.26389	84.08078	-2.32	2
ブタバルビタール ²	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₃	[M-H] ⁻	4.35	0.009	211.10882	41.99854	168.10300	85.00435	124.11317	-0.26	1
ブタルビタール ²	C ₁₁ H ₁₆ N ₂ O ₃	[M-H] ⁻	4.61	0.014	223.10882	41.99854	180.10300	85.00435	136.11317	1.96	1
カルバマゼピン	C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O	[M+H] ⁺	5.10	0.002	237.10224	194.09643	193.08860	179.07295	192.08078	1.39	5
カリソプロドール	C ₁₂ H ₂₄ N ₂ O ₄	[M+H] ⁺	5.58	0.004	261.18088	55.05423	62.02366	176.12812	97.10118	0.51	5
クロルジアゼボキシド	C ₁₆ H ₁₄ ClN ₃ O	[M+H] ⁺	4.68	0.004	300.08982	282.07925	247.11040	227.04963	283.08708	-0.48	5
クロルフェニラミン	C ₁₈ H ₁₉ ClN ₂	[M+H] ⁺	4.29	0.010	275.13095	230.07310	167.07295	201.03398	118.06513	0.36	4
クロルプロマジン	C ₁₇ H ₁₉ ClN ₂ S	[M+H] ⁺	5.70	0.002	319.10302	58.06513	86.09643	214.04180	246.01387	1.64	5
cis-トラマドール	C ₁₆ H ₂₅ N ₂ O ₂	[M+H] ⁺	3.54	0.002	264.19581	58.06513	246.18524			-0.01	3
シタロプラム	C ₂₀ H ₂₁ FN ₂ O	[M+H] ⁺	4.78	0.002	325.17107	109.04481	262.10265	234.07135	116.04948	0.43	5
クロバザム	C ₁₆ H ₁₃ ClN ₂ O ₂	[M+H] ⁺	6.05	0.004	301.07383	224.09441	259.06327	105.03349	153.02092	0.28	4
クロミプラミン	C ₁₉ H ₂₃ ClN ₂	[M+H] ⁺	5.86	0.016	315.16225	58.06513	86.09643	227.04963	242.07310	0.48	5
クロナゼパム	C ₁₅ H ₁₀ ClN ₃ O ₃	[M+H] ⁺	5.51	0.003	316.04835	214.04180	241.05270	270.05544	207.09166	-0.19	5
クロニジン	C ₈ H ₉ Cl ₂ N ₃	[M+H] ⁺	1.99	0.010	230.02463	159.97153	144.96063	123.99485	132.96063	-0.37	5
クロザピン	C ₁₈ H ₁₉ ClN ₄	[M+H] ⁺	4.65	0.003	327.13710	270.07925	192.06820	227.03705	84.08078	0.79	4
コカエチレン	C ₁₈ H ₂₃ N ₃ O ₄	[M+H] ⁺	4.26	0.006	318.16998	82.06513	196.13321	105.03349	91.05423	1.33	4
コカイン	C ₁₇ H ₂₁ N ₃ O ₄	[M+H] ⁺	3.79	0.003	304.15433	82.06513	182.11756	105.03349	77.03858	0.48	3
コデイン	C ₁₈ H ₂₁ NO ₃	[M+H] ⁺	1.89	0.011	300.15942	165.06988	153.06988	199.07536	181.06479	0.56	1
シクロベンザプリン	C ₂₀ H ₂₁ N	[M+H] ⁺	5.30	0.008	276.17468	215.08553	216.09335	231.11683	58.06513	0.58	3
デモキセパム	C ₁₅ H ₁₁ ClN ₂ O ₂	[M+H] ⁺	4.90	0.001	287.05818	241.02999	207.06835	77.03858	123.99485	-0.51	3
デスアルキルフルラゼパム	C ₁₅ H ₁₀ ClFN ₂ O	[M+H] ⁺	5.82	0.005	289.05385	140.02567	226.09008	165.02092	214.04180	0.64	5
デシプラミン	C ₁₈ H ₂₂ N ₂	[M+H] ⁺	5.21	0.003	267.18558	72.08078	44.04948	193.08860	208.11208	0.67	3
デキストロメトルファン	C ₁₈ H ₂₅ NO	[M+H] ⁺	4.57	0.006	272.20089	171.08044	147.08044	213.12739	173.09609	1.20	5
ジアゼパム	C ₁₆ H ₁₃ ClN ₂ O	[M+H] ⁺	6.59	0.007	285.07892	193.08860	154.04180	91.05423	222.11515	1.54	3
ジエチルプロピオン	C ₁₃ H ₁₉ NO	[M+H] ⁺	2.79	0.007	206.15394	105.06988	77.03858	100.11208	79.05423	0.22	3
ジヒドロコデイン	C ₁₈ H ₂₃ NO ₃	[M+H] ⁺	1.81	0.054	302.17507	199.07536	171.08044	201.09101	183.08044	-1.32	3
ジフェンヒドラミン	C ₁₇ H ₂₁ NO	[M+H] ⁺	4.72	0.001	256.16959	167.08553	152.06205	165.06988	166.07770	0.07	5
ドチエピン	C ₁₉ H ₂₁ NS	[M+H] ⁺	5.18	0.002	296.14675	203.08553	221.04195	223.05760	217.10118	0.08	5
ドクセピン	C ₁₉ H ₂₁ NO	[M+H] ⁺	4.86	0.005	280.16959	107.04914	115.05423	91.05423	77.03858	0.45	3
ドキシラミン	C ₁₇ H ₂₂ N ₂ O	[M+H] ⁺	3.51	0.009	271.18049	167.07295	182.09643	90.09134	72.08078	0.52	5
エクゴニンメチルエステル	C ₁₀ H ₁₇ NO ₃	[M+H] ⁺	0.66	0.013	200.12812	82.06513	182.11756	68.04948	91.05423	-2.34	1
EDDP	C ₂₀ H ₂₃ N	[M+H] ⁺	5.10	0.003	278.19033	234.12773	186.12773	219.10425	249.15120	1.34	5

化合物名	分子式	付加物	RT (分)	RT 差、 10 ng/mL	ターゲット 擬分子イオン	正確な フラグメント 1	正確な フラグメント 2	正確な フラグメント 3	正確な フラグメント 4	プリカーサ 質量精度 (ppm)、 10 ng/mL	検証した イオン数、 10 ng/mL
A1	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
エフェドリン	C ₁₀ H ₁₅ NO	[M+H] ⁺	1.79	0.019	166.12264	148.11208	91.05423	115.05423	133.08860	0.08	5
フェンタニル ³	C ₂₂ H ₂₈ N ₂ O	[M+H] ⁺	4.63	0.001	337.22744	105.06988	188.14338	216.13829	132.08078	0.98	3
フルオキセチン	C ₁₇ H ₁₈ F ₃ NO	[M+H] ⁺	5.59	0.004	310.14133	44.04948	148.11208			1.27	2
フルラゼパム	C ₂₁ H ₂₃ ClFN ₃ O	[M+H] ⁺	4.78	0.004	388.15864	315.06950	317.08515	287.06038	271.04279	1.06	4
フルボキサミン	C ₁₅ H ₂₁ F ₃ N ₂ O ₂	[M+H] ⁺	5.33	0.007	319.16279	71.05028	258.11003	200.06816	55.05537	0.25	4
ヒドロコドン	C ₁₈ H ₂₁ NO ₃	[M+H] ⁺	2.57	0.001	300.15942	199.07536	171.08044	141.06988	181.06479	0.20	3
ヒドロモルフォン	C ₁₇ H ₁₉ NO ₃	[M+H] ⁺	1.15	0.000	286.14377	185.05971	157.06479	153.06988	181.06479	0.70	2
ヒドロキシジン	C ₂₁ H ₂₇ ClN ₂ O ₂	[M+H] ⁺	5.36	0.001	375.18338	166.07770	201.04655	165.06988	173.12845	0.00	5
イミプラミン	C ₁₉ H ₂₄ N ₂	[M+H] ⁺	5.31	0.005	281.20123	58.06513	86.09643	193.08860	208.11208	1.52	3
ケタミン	C ₁₃ H ₁₆ ClNO	[M+H] ⁺	3.14	0.007	238.09932	125.01525	179.06221	207.05712	220.08875	1.34	3
リドカイン	C ₁₄ H ₂₂ N ₂ O	[M+H] ⁺	3.11	0.005	235.18049	86.09643	58.06513			0.64	3
ロラゼパム	C ₁₅ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O ₂	[M+H] ⁺	5.49	0.003	321.01921	275.01373	229.05270	303.00865	163.00527	0.87	3
MDA	C ₁₀ H ₁₃ NO ₂	[M+H] ⁺	2.44	0.006	180.10191	105.06988	163.07536	77.03858	135.04406	0.52	4
MDEA	C ₁₂ H ₁₇ NO ₂	[M+H] ⁺	2.98	0.003	208.13321	163.07536	77.03858	135.04406	105.06988	0.70	5
MDMA	C ₁₁ H ₁₅ NO ₂	[M+H] ⁺	2.65	0.005	194.11756	105.06988	163.07536	77.03858	135.04406	0.44	5
メペリジン	C ₁₈ H ₂₁ NO ₂	[M+H] ⁺	3.85	0.012	248.16451	70.06513	220.13321	174.12773	91.05423	0.95	4
メプロバメート	C ₉ H ₁₈ N ₂ O ₄	[M+H] ⁺	3.99	0.006	219.13393	55.05423	158.11756	97.10118	69.06988	2.43	3
メサドン	C ₂₁ H ₂₇ NO	[M+H] ⁺	5.56	0.005	310.21654	105.03349	265.15869	77.03858	91.05423	0.38	5
メタンフェタミン	C ₁₀ H ₁₅ N	[M+H] ⁺	2.59	0.004	150.12773	91.05423	119.08553	65.03858	63.02293	0.85	5
メチルフェニデート	C ₁₄ H ₁₈ NO ₂	[M+H] ⁺	3.55	0.022	234.14886	84.08078	56.04948	91.05423	55.05423	0.91	2
メトプロロール	C ₁₈ H ₂₅ NO ₃	[M+H] ⁺	3.53	0.008	268.19072	56.04948	103.05423	74.06004	116.10699	0.23	5
m-ヒドロキシベンゾイルエクゴニン	C ₁₆ H ₁₉ NO ₅	[M+H] ⁺	2.51	0.006	306.13360	121.02841	168.10191	93.03349	82.06513	-0.22	4
ミダゾラム	C ₁₈ H ₁₃ ClFN ₃	[M+H] ⁺	4.84	0.004	326.08548	291.11663	249.08225	223.07918	209.06353	1.12	5
モルヒネ	C ₁₇ H ₁₉ NO ₃	[M+H] ⁺	0.94	0.018	286.14377	165.06988	153.06988	157.06479	181.06479	2.67	3
ナロキソン	C ₁₉ H ₂₁ NO ₄	[M+H] ⁺	1.78	0.022	328.15433	310.14377	212.07061	253.10973	268.13321	0.36	5
N-デスマチル-cis-トラマドール	C ₁₉ H ₂₃ NO ₂	[M+H] ⁺	3.57	0.002	250.18016	58.06513	232.16959			0.63	1
ニトラゼパム	C ₁₅ H ₁₁ N ₃ O ₃	[M+H] ⁺	5.36	0.002	282.08732	180.08078	207.09168	236.0944	190.06513	-1.02	5
ノルプレノルフィン	C ₂₅ H ₃₅ NO ₄	[M+H] ⁺	4.11	0.005	414.26389	101.09609	83.08553	57.06988	187.07536	-0.66	3
ノルジアゼパム	C ₁₅ H ₁₁ ClN ₂ O	[M+H] ⁺	5.94	0.004	271.06327	140.02567	165.02092	208.09950	91.05423	-0.50	4
ノルフェンタニル	C ₁₄ H ₂₀ N ₂ O	[M+H] ⁺	3.16	0.006	233.16484	84.08078	55.05423	56.04948	94.06513	0.78	3
ノルメペリジン	C ₁₄ H ₁₉ NO ₂	[M+H] ⁺	3.81	0.000	234.14886	42.03383	160.11208	56.04948	91.05423	0.58	2
ノルプロキシフェン	C ₂₁ H ₂₇ NO ₂	[M+H] ⁺	5.38	0.010	326.21146	44.04948	91.05423			0.61	2
ノルトリプチリン	C ₁₉ H ₂₁ N	[M+H] ⁺	5.36	0.003	264.17468	91.05423	105.06988	233.1325	117.06988	-0.37	4
オキサゼパム	C ₁₅ H ₁₁ ClN ₂ O ₂	[M+H] ⁺	5.35	0.003	287.05818	104.04948	241.05270	269.04762	163.00527	-2.18	4
オキシコドン	C ₁₈ H ₂₁ NO ₄	[M+H] ⁺	2.36	0.009	316.15433	241.10973	298.14377	212.10699	226.08626	0.75	5
オキシモルフォン	C ₁₇ H ₁₉ NO ₄	[M+H] ⁺	1.02	0.005	302.13868	227.09408	284.12812	198.09134	199.09649	1.11	4
バロキセチン	C ₁₉ H ₂₀ FNO ₃	[M+H] ⁺	5.08	0.003	330.15000	70.06513	192.11830	135.06046	109.04481	0.86	3
PCP	C ₁₇ H ₂₅ N	[M+H] ⁺	4.45	0.006	244.20598	86.09643	91.05423	159.11683	81.06988	-0.10	4
フェンジメトラジン	C ₁₂ H ₁₇ NO	[M+H] ⁺	2.54	0.017	192.13829	91.05423	115.05423	144.08078	146.09643	0.14	4
フェノバルビタール ²	C ₁₂ H ₁₂ N ₂ O ₃	[M-H] ⁻	4.14	0.007	231.07752	188.07170	85.00435			0.61	1
フェンテルミン	C ₁₀ H ₉ N	[M+H] ⁺	2.84	0.007	150.12773	91.05423	65.03858	133.10118	105.06988	1.00	4
フェニルプロパノールアミン	C ₉ H ₁₃ NO	[M+H] ⁺	1.42	0.031	152.10699	91.05423	117.06988	134.09643	115.05423	-0.38	2
ブレドニゾン	C ₂₁ H ₂₆ O ₅	[M+H] ⁺	4.68	0.004	359.18530	147.08044	237.12739	171.08044	341.17474	0.32	2
プリミドン	C ₁₂ H ₁₄ N ₂ O ₂	[M+H] ⁺	3.26	0.003	219.11280	91.05423	162.09134	119.08553	117.06988	-0.42	2

化合物名	分子式	付加物	RT (分)	RT 差、 10 ng/mL	ターゲット 擬分子イオン	正確な フラグメント 1	正確な フラグメント 2	正確な フラグメント 3	正確な フラグメント 4	プリカーサ 質量精度 (ppm)、 10 ng/mL	検証した イオン数、 10 ng/mL
A1	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
プロアジフェン	C ₂₃ H ₃₁ NO ₂	[M+H] ⁺	6.33	0.004	354.24276	91.05423	209.13248	105.06988	167.08553	-0.02	3
プロメタジン	C ₁₇ H ₂₀ N ₂ S	[M+H] ⁺	5.03	0.004	285.14200	86.09643	198.03720	71.07295	56.04948	0.26	4
プロボキシフェン	C ₂₂ H ₂₉ NO ₂	[M+H] ⁺	5.49	0.007	340.22711	58.06513	266.19033	91.05423	143.08553	0.64	3
プロプラノロール	C ₁₆ H ₂₁ NO ₂	[M+H] ⁺	4.42	0.004	260.16451	56.04948	116.10699	183.08044	74.06004	0.72	4
ケチアピン	C ₂₁ H ₂₅ N ₃ O ₂ S	[M+H] ⁺	4.76	0.001	384.17402	221.10733	253.07940	210.03720	247.12298	0.22	5
リスベリドン	C ₂₃ H ₂₇ FN ₄ O ₂	[M+H] ⁺	4.25	0.006	411.21908	191.11789	110.05984	69.03349	82.06513	-0.49	2
リタリン酸	C ₁₃ H ₁₇ NO ₂	[M+H] ⁺	2.82	0.000	220.13321	84.08078	56.04948	85.08860	91.05423	0.27	2
セコバルピタール ²	C ₁₇ H ₁₈ N ₂ O ₃	[M+H] ⁻	5.39	0.007	237.12447	41.99854	194.11865	85.00435	150.12882	-2.02	1
セルトラリン	C ₁₇ H ₁₇ Cl ₂ N	[M+H] ⁺	5.67	0.006	306.08108	158.97628	275.03888	129.06988	122.99960	-0.70	5
ストリキニーネ	C ₂₁ H ₂₂ N ₂ O ₂	[M+H] ⁺	2.87	0.000	335.17540	184.07569	156.08078	264.10191	222.09134	0.13	3
テマゼパム	C ₁₆ H ₁₃ ClN ₂ O ₂	[M+H] ⁺	5.95	0.002	301.07383	255.06835	283.06327	177.02092	193.08860	0.41	5
トラゾドン	C ₁₉ H ₂₂ ClN ₅ O	[M+H] ⁺	4.24	0.007	372.15856	148.05237	176.08184	78.03383	133.07603	0.40	5
トリアゾラム	C ₁₇ H ₁₂ Cl ₂ N ₄	[M+H] ⁺	5.70	0.005	343.05118	239.03888	315.03245	308.08233	253.06345	-0.30	5
ベラパミル	C ₂₇ H ₃₈ N ₂ O ₄	[M+H] ⁺	5.47	0.002	455.29043	165.09101	150.06753	303.20671	105.06988	0.85	4
ゾルピデム	C ₁₉ H ₂₁ N ₃ O	[M+H] ⁺	4.03	0.006	308.17574	235.12298	263.11789	236.13080	92.04948	1.32	5
ゾピクロン	C ₁₇ H ₁₇ ClN ₃ O ₃	[M+H] ⁺	3.38	0.006	389.11234	217.02706	245.02198	111.99485	139.00527	0.19	5

¹ カラム記号。

² アモバルピタール、プタバピタール、プタルピタール、フェノバルピタール、およびセコバルピタールのデータは、全血に 50 ng/mL をスパイクしたものです。

³ プレネロフィンおよびフェンタニルのデータは、全血に 1 ng/mL をスパイクしたものです。

サスペクトスクリーニングの パラメータと同定基準

Agilent MassHunter Quantitative Analysis 10.1 と Agilent SureMass を組み合わせて、スクリーニング分析を実施しました。¹⁵スクリーニングのパラメータは、擬分子イオンとそのフラグメントイオンの質量精度、リテンションタイム、検証したイオンの最小数、擬分子イオンとフラグメントイオンのクロマトグラフィー共溶出、およびレスポンスの最小閾値でした。擬分子イオンの質量精度 ≤ 5 ppm、リテンションタイム ±0.4 分、レスポンスの最小閾値 S/N > 3 により、スクリーニングの陽性所見を達成できます。同定基準は、擬分子イオンとそのフラグメントイオンの質量精度 ≤ 5 ppm、リテンションタイム ±0.4 分、1 個の擬分子イオンと最低 1 個のフラグメントイオンを含む最小 2 個の検証済みイオン、抽出された SureMass クロマトグラムでの完全なオーバーラップ、擬分子イオンまたはフラグメントイオンの存在が疑われる分析対象物のピーク、およびレスポンスの最小閾値 S/N > 3 でした。擬分子イオ

ンを定量イオンとして設定し、最低 1 個のフラグメントイオンを各化合物の定性イオンとして設定して、追加のスクリーニングパラメータとしてイオン比 (≤ 30 %) も評価しました。

分析対象物データベース

102 種類の薬物化合物に関する情報 (プリカーサの精密質量、アバダンスの最も高い 4 個のフラグメント、[M+H]⁺ または [M-H]⁻ のフラグメントイオン、異なる CE で収集した MS/MS スペクトル、リテンションタイムなど) をベースにして、サスペクトスクリーニング分析対象物データベースとなる Agilent パーソナル化合物データベースライブラリ (PCDL) を作成しました。すべての情報を表 2 に示しています。

データ分析ワークフローと結果

自動化ワークフローによる最初の評価では、50 ng/mL で添加したサンプルは ESI+ モードで 97 種類の薬物うち 93 種類が許容基準を満たすとして同定され、4 種類の薬物についてはさらに詳しく調査しました。ESI- モードでは、5 種類の薬物のうち 4 種類が基準を満たすとして同定され、1 種類の薬物についてはさらに詳しく調査しました。10 ng/mL で添加したサンプルは、ESI+ モードで 97 種類の薬物のうち 89 種類が基準を満たすとして同定され、8 種類の薬物についてはさらに詳しく調査しました。ESI- モードでは、5 種類すべての薬物についてさらに調査が必要となりました。1 ng/mL で添加したプレネロフィンとフェンタニルが、基準を満たすとして同定されました。

同定基準を満たした薬物には、質量精度、リテンションタイム、共溶出、および S/N 比の基準を満たす擬分子イオンと最低 1 個のフラグメントイオンが存在することを確認しました。さらに詳しく調査した薬物は、適格なフラグメントイオンが欠如しているか、擬分子イオンまたはフラグメントイオンのピーク統合が不良でした。統合を修正した後、これらの薬物は基準を満たすとして同定され、スクリーニングおよび同定基準が、偽陰性が最小となる最適な検出シナリオであることを確認しました。手作業で確認したところ、このメソッドは 102 種類の薬物をスクリーニングして 50 ng/mL

では 100 種類の薬物を同定でき (98 %)、10 ng/mL では 93 種類の薬物を同定できていました (91 %)。ブプレノルフィンとフェンタニルの場合、このメソッドは 1 ng/mL で同定できました。全血抽出物中の 10 および 50 ng/mL のいずれにおいても、自動化ワークフローで偽陰性はありませんでした。

ブライนด์スパイク

ブライนด์スパイク実験により、サスペクトスクリーニングメソッドを詳細に評価しました。別の科学者が前処理した未知のサンプルを、開発した Q-TOF でのスクリーニングメソッド

で分析し、陽性の結果を示した薬物を同定しました。これは、実際の分析における薬物スクリーニングの実状を再現したものです。提供されたサンプル中の 16 種類の薬物すべてが、偽陰性や偽陽性ではなく、陽性所見を得て同定されました。10 および 50 ng/mL でスパイクしたサンプルのいずれにおいても、15 種類の薬物が正常に同定され、ブタルピタールは 250 ng/mL で同定されました。ブライนด์スパイクしたサンプルの薬物スクリーニングの結果については、表 3 を参照してください。

表 3. LC-QTOF によるブライนด์スパイクしたヒト全血の薬物スクリーニング結果

化合物名	付加物	BS1 ¹ 10 ng/mL	RT 差、 10 ng/mL	プリカーサ質量精度 (ppm)、10 ng/mL	検証したイオン数、 10 ng/mL	BS2 50 ng/mL	RT 差、 50 ng/mL	プリカーサ質量精度 (ppm)、50 ng/mL	検証したイオン数、 50 ng/mL
クロルジアゼポキシド	[M+H] ⁺	陽性	0.001	1.60	5	陽性	0.001	2.19	5
シクロベンザプリン	[M+H] ⁺	陽性	0.011	1.63	4	陽性	0.000	0.40	4
モルヒネ	[M+H] ⁺	陽性	0.021	0.87	2	陽性	0.001	0.23	5
ケチアピン	[M+H] ⁺	陽性	0.002	1.93	5	陽性	0.001	1.71	5
		BS2 10 ng/mL				BS2 50 ng/mL			
3-ヒドロキシエチルフルラゼパム	[M+H] ⁺	陽性	0.002	-0.65	3	陽性	0.003	1.10	5
7-アミノクロナゼパム	[M+H] ⁺	陽性	0.001	-0.80	3	陽性	0.001	0.81	4
エフェドリン	[M+H] ⁺	陽性	0.031	0.74	3	陽性	0.011	1.71	5
ケタミン	[M+H] ⁺	陽性	0.002	0.90	3	陽性	0.001	0.14	3
		BS3 10 ng/mL				BS3 50 ng/mL			
デモксеパム	[M+H] ⁺	陽性	0.001	0.93	4	陽性	0.002	0.25	4
ドキシラミン	[M+H] ⁺	陽性	0.020	1.02	4	陽性	0.005	1.61	4
プロプラノロール	[M+H] ⁺	陽性	0.004	1.30	4	陽性	0.003	1.33	4
ブタルピタール	[M-H] ⁻	陽性	0.005	0.53	1	陽性	0.000	2.27	2
		BS4 10 ng/mL				BS4 50 ng/mL			
cis-トラマドール	[M+H] ⁺	陽性	0.007	1.37	3	陽性	0.004	1.24	3
ジエチルプロピオン	[M+H] ⁺	陽性	0.010	1.30	3	陽性	0.005	0.98	5
ミダゾラム	[M+H] ⁺	陽性	0.000	0.44	5	陽性	0.002	0.62	5
ナロキソン	[M+H] ⁺	陽性	0.045	0.24	5	陽性	0.012	0.80	5

¹ BS、ブライนด์スパイク。

LC-QQQ での定量

LC-QQQ での定量メソッドに対して、分析対象物の回収率とマトリックス効果、感度と選択性、キャリブレーション範囲、真度と精度を評価しました。図 2 に、全血中に 10 ng/mL および 50 ng/mL でプレスパイクしたサンプルでの、102 種類の化合物の平均回収率を示します。回収率の一般的な許容範囲は 70 ~

120 % ですが、102 種類の分析対象物のうち 2 種類のみ（リタリン酸とストリキニーネ）が回収率 < 70 % を示しました。また、1 種類の分析対象物（アモバルビタール）が回収率 > 120 % を示しました。これは、最適化したワークフローを使用した場合、97 % の薬物が許容範囲内の回収率を達成したことを示しています。回収率が許容範囲を外れた 3 種類の化

合物では、回収率は RSD < 20 % で許容値に近い値でした。このため、回収率の相対的な低さまたは高さは、これら 3 種類の化合物の定量には影響しませんでした。

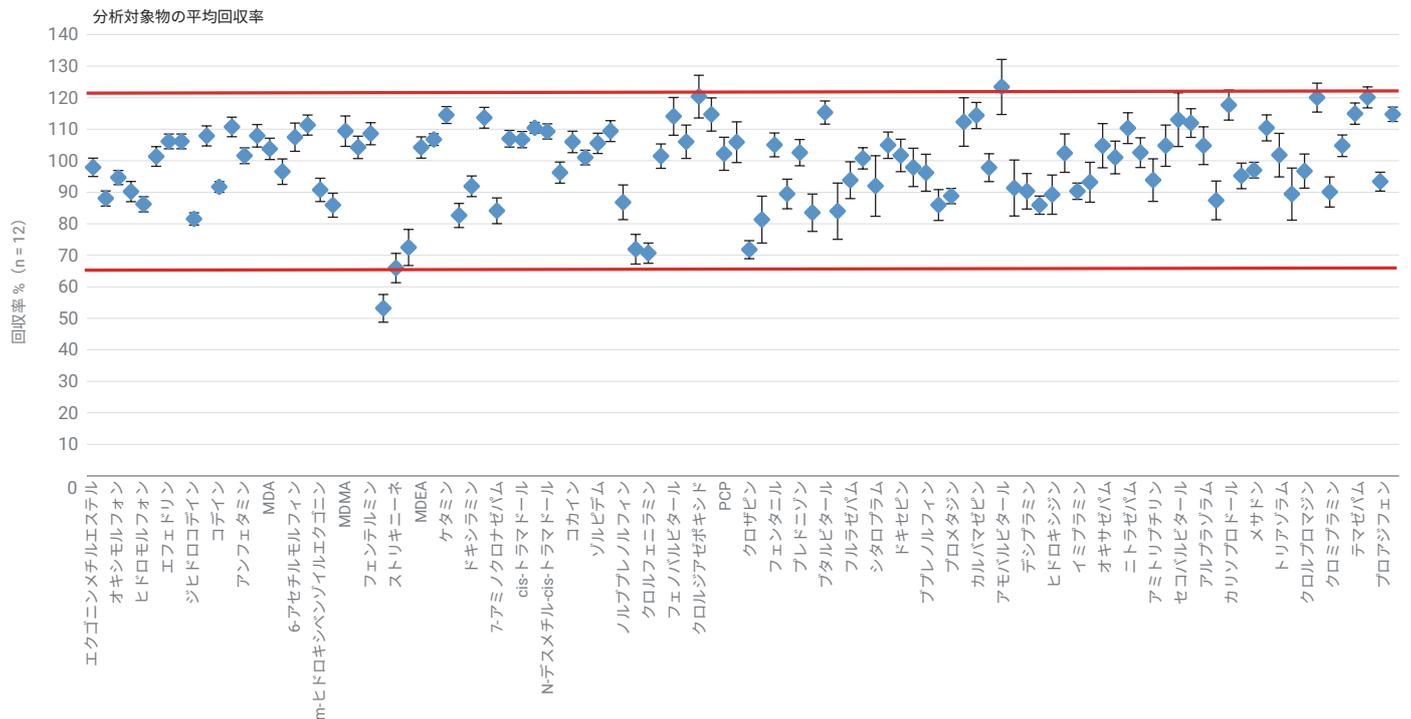


図 2. 10 ng/mL および 50 ng/mL で添加したヒト全血サンプル中の 102 種類の分析対象物の平均回収率。平均回収率は、各濃度で添加したサンプルの 6 回の繰り返し分析に基づいて、プレスパイクしたサンプルでのピーク面積と対応する濃度のマトリックス適合サンプルでのピーク面積の比を用いて算出しました。

ド真度および精度が実証され、スパイク濃度はすべて許容基準（真度 100 ±20 %、および RSD ≤ 20 % として規定）を満たしていました。大部分の分析対象物において、全血で LOQ 0.5 ng/mL を達成しました。ただし、ロラゼパム、フェノバルビタール、ブタバルビタール、ノルトリプチリン、ゾピクロンについては化合物の感度の低さが原因で、またアンフェタミン、メタンフェタミン、デキストロメトルファンについてはマトリックスの影響または干渉が原因で、LOQ が高くなりました（≥ 1 ng/mL）。複数の分析対象物に対するさまざまな線形を考慮し、定量検証では使用したスパイク濃度に複数のキャリブレーション範囲を確立しました。キャリブレーション範囲と、対

応する QC サンプルのスパイク濃度が異なる各グループを、表 4 に注釈として示します。直線回帰と $1/x^2$ の重み付けを、相関係数 $R^2 > 0.99$ の大部分の分析対象物の検量線に対して使用しました。5 種類のバルビツール系分析対象物（ブタルビタール、アモバルビタール、セコバルビタール、フェノバルビタール、ブタバルビタール）の検量線は、 $R^2 > 0.99$ の $1/x^2$ で重み付けした二次回帰線によく一致しています。メソッドの選択性は、マトリックスの影響の LOQ が 20 % 未満である全血マトリックスブランクで評価しました。ただし、マトリックスブランクで陽性を示したアンフェタミン、メタンフェタミン、デキストロメトルファンは除外しました。これら 3 種類の薬物の LOQ は、マ

トリックスブランクの陽性の影響で大幅に高くなっていました。完全に薬物のない全血コントロールブランクの場合は、これらの分析対象物はより低い LOQ で広いキャリブレーション範囲を達成できたと考えられます。

表 4. LC-QQQ によるヒト全血中の 102 種類の分析対象物の定量結果の概要

薬物化合物	定量グループ	内部標準	LOQ (ng/mL)	キャリブレーション範囲 (ng/mL)	検量線 R^2	低 QC		中 QC		高 QC	
						真度	RSD	真度	RSD	真度	RSD
フェンタニル	5	コカイン-D3	0.05	0.05 ~ 20	0.9922	104	7.1	93	4.5	92	9.0
エクゴニンメチルエステル	1	アンフェタミン-D5	0.5	0.5 ~ 200	0.9947	100	2.4	100	3.6	86	5.3
モルヒネ	1	アンフェタミン-D5	0.5	0.5 ~ 200	0.9939	111	3.2	112	3.6	104	5.6
オキシモルフォン	1	アンフェタミン-D5	0.5	0.5 ~ 200	0.9928	104	5.1	98	5.3	95	7.2
アテノロール	1	アンフェタミン-D5	0.5	0.5 ~ 200	0.9912	113	3.8	101	4.4	105	4.9
ヒドロモルフォン	1	アンフェタミン-D5	0.5	0.5 ~ 200	0.9936	112	4.8	98	3.9	103	4.4
フェニルプロパノールアミン	1	アンフェタミン-D5	0.5	0.5 ~ 100	0.9946	101	5.9	109	5.0	95	5.0
エフェドリン	1	アンフェタミン-D5	0.5	0.5 ~ 100	0.999	109	4.2	103	3.1	99	4.7
ジヒドロコデイン	1	アンフェタミン-D5	0.5	0.5 ~ 200	0.9935	110	4.7	98	5.6	112	3.0
ナロキソン	1	アンフェタミン-D5	0.5	0.5 ~ 200	0.9972	109	3.7	102	3.2	93	7.0
クロニジン	1	アンフェタミン-D5	0.5	0.5 ~ 200	0.9958	113	6.5	96	4.6	104	6.5
コデイン	1	アンフェタミン-D5	0.5	0.5 ~ 100	0.9947	114	3.0	110	4.0	101	5.8
オキシコドン	2	オキシコドン-D6	0.5	0.5 ~ 50	0.9954	113	7.1	107	7.0	97	10.4
MDA	2	アンフェタミン-D5	0.5	0.5 ~ 50	0.9922	99	6.3	114	8.1	103	7.7
フェンジメトラジン	1	アンフェタミン-D5	0.5	0.5 ~ 200	0.9951	109	5.9	101	8.9	115	7.9
6-アセチルモルフィン	2	アンフェタミン-D5	0.5	0.5 ~ 50	0.9926	110	2.9	115	9.4	100	5.3
m-ヒドロキシベンゾイルエクゴニン	1	アンフェタミン-D5	0.5	0.5 ~ 100	0.9956	137	10.1	102	9.7	100	6.7
ヒドロコドン	1	ヒドロコドン-D6	0.5	0.5 ~ 200	0.991	102	12.3	97	8.9	100	6.5
MDMA	1	ヒドロコドン-D6	0.5	0.5 ~ 200	0.9932	118	10.4	101	11.7	96	7.1
ジェチルプロピオン	2	ヒドロコドン-D6	0.5	0.5 ~ 50	0.9981	114	8.6	109	6.9	101	7.3
フェンテルミン	1	ヒドロコドン-D6	0.5	0.5 ~ 200	0.9967	101	10.0	100	10.4	91	8.1
リタリン酸	1	ヒドロコドン-D6	0.5	0.5 ~ 200	0.9947	113	10.4	95	7.0	101	10.6
ストリキニーネ	1	ヒドロコドン-D6	0.5	0.5 ~ 100	0.9976	111	10.5	101	7.4	126	7.5
ベンゾイルエクゴニン	1	ヒドロコドン-D6	0.5	0.5 ~ 100	0.9931	111	8.1	109	4.8	105	8.3
MDEA	2	ヒドロコドン-D6	0.5	0.5 ~ 50	0.9923	110	9.1	108	5.5	100	9.2
リドカイン (リグノカイン)	2	コカイン-D3	0.5	0.5 ~ 50	0.9954	102	4.6	102	2.5	107	5.9
ケタミン	2	コカイン-D3	0.5	0.5 ~ 50	0.9991	104	4.6	95	6.7	91	6.7

薬物化合物	定量グループ	内部標準	LOQ (ng/mL)	キャリアブレーション 範囲 (ng/mL)	検量線 R ²	低 QC		中 QC		高 QC	
						真度	RSD	真度	RSD	真度	RSD
ノルフェンタニル	2	コカイン-D3	0.5	0.5 ~ 50	0.9998	94	3.5	108	3.7	111	6.9
ドキシラミン	2	コカイン-D3	0.5	0.5 ~ 50	0.9933	100	5.9	107	3.4	106	5.1
プリミドン	1	コカイン-D3	0.5	0.5 ~ 200	0.9971	98	9.0	89	4.8	91	4.8
7-アミノクロナゼパム	2	コカイン-D3	0.5	0.5 ~ 50	0.9929	100	6.4	103	8.3	88	9.6
メトプロロール	2	コカイン-D3	0.5	0.5 ~ 50	0.9956	95	9.5	106	2.3	104	9.3
cis-トラマドール	1	コカイン-D3	0.5	0.5 ~ 100	0.9949	97	10.8	96	6.0	95	9.0
メチルフェニデート	2	コカイン-D3	0.5	0.5 ~ 20	0.9919	98	6.6	105	8.5	100	8.5
N-デスマチル-cis-トラマドール	2	コカイン-D3	0.5	0.5 ~ 50	0.9952	100	11.4	110	6.8	98	3.8
ノルメペリジン	2	コカイン-D3	0.5	0.5 ~ 20	0.9937	92	7.9	92	5.4	94	9.4
コカイン	2	コカイン-D3	0.5	0.5 ~ 50	0.9906	109	4.2	111	5.7	113	9.7
メペリジン	2	コカイン-D3	0.5	0.5 ~ 50	0.9974	95	11.5	103	6.4	107	8.5
ゾルピデム	2	コカイン-D3	0.5	0.5 ~ 50	0.9857	101	6.1	105	9.3	97	10.7
メプロバメート	1	コカイン-D3	0.5	0.5 ~ 200	0.9965	103	9.8	102	5.7	100	7.1
ノルプレノルフィン	1	コカイン-D3	0.5	0.5 ~ 200	0.9959	56	18.7	113	6.2	103	9.6
リスベリドン	1	ヒドロコドン-D6	0.5	0.5 ~ 100	0.9993	95	10.5	97	11.6	112	4.3
クロルフェニラミン	1	ヒドロコドン-D6	0.5	0.5 ~ 100	0.9931	105	7.9	101	5.0	114	4.5
トラゾドン	2	コカイン-D3	0.5	0.5 ~ 50	0.9916	91	13.3	97	7.1	106	5.7
コカエチレン	2	コカイン-D3	0.5	0.5 ~ 50	0.9924	130	16.3	131	17.0	115	16.0
クロルジアゼボキシド	2	コカイン-D3	0.5	0.5 ~ 50	0.9958	103	11.9	99	14.0	96	12.0
PCP	1	コカイン-D3	0.5	0.5 ~ 100	0.9909	85	4.0	116	10.5	98	7.3
プロプラノロール	2	コカイン-D3	0.5	0.5 ~ 50	0.9955	85	13.8	100	19.7	100	8.8
クロサピン	1	コカイン-D3	0.5	0.5 ~ 100	0.9926	101	9.0	102	10.0	110	4.3
ブレドニゾン	2	コカイン-D3	0.5	0.5 ~ 50	0.9926	91	12.2	105	12.9	96	8.5
ケチアピン	2	コカイン-D3	0.5	0.5 ~ 50	0.9979	98	7.1	105	12.8	98	8.3
ミダゾラム	2	コカイン-D3	0.5	0.5 ~ 50	0.9909	101	8.7	103	13.0	94	15.5
ブタルビタール	1	コカイン-D3	0.5	0.5 ~ 200	0.9913	93	7.7	96	4.2	96	14.0
フルラゼパム	2	コカイン-D3	0.5	0.5 ~ 50	0.9913	107	9.9	106	9.1	104	16.9
ジフェンヒドラミン	2	コカイン-D3	0.5	0.5 ~ 50	0.9939	103	7.4	104	9.1	103	10.9
シタロプラム	2	コカイン-D3	0.5	0.5 ~ 50	0.9923	106	13.2	99	10.4	85	8.2
ドクセピン	2	コカイン-D3	0.5	0.5 ~ 50	0.987	94	4.3	94	7.3	92	14.4
デモクセパム	2	コカイン-D3	0.5	0.5 ~ 50	0.9973	113	4.1	94	9.9	93	10.6
ブプレノルフィン	2	コカイン-D3	0.5	0.5 ~ 50	0.9963	104	11.2	103	11.8	92	18.6
アセプロマジン	2	コカイン-D3	0.5	0.5 ~ 50	0.9856	87	14.2	102	9.1	110	7.7
プロメタジン	1	コカイン-D3	0.5	0.5 ~ 100	0.995	100	13.8	97	10.2	105	15.9
カルバマゼピン	2	コカイン-D3	0.5	0.5 ~ 50	0.9906	88	10.2	92	5.8	107	11.5
パロキセチン	1	コカイン-D3	0.5	0.5 ~ 200	0.9922	101	11.6	98	13.6	105	14.0
EDDP	2	コカイン-D3	0.5	0.5 ~ 50	0.9901	114	5.6	114	15.6	95	12.4
アモバルビタール	1	ブタルビタール-D5	0.5	0.5 ~ 200	0.9909	79	16.1	100	12.4	111	4.0
ドチエピン (ドスレピン)	1	コカイン-D3	0.5	0.5 ~ 100	0.9941	103	9.0	77	11.5	92	10.8
デシプラミン	2	コカイン-D3	0.5	0.5 ~ 50	0.9928	86	7.7	89	13.6	101	8.8
フルボキサミン	2	コカイン-D3	0.5	0.5 ~ 50	0.992	99	9.0	96	7.8	93	6.4
ヒドロキシジン	2	コカイン-D3	0.5	0.5 ~ 20	0.9882	109	11.2	98	15.7	97	14.2
シクロベンザプリン	2	ジアゼパム-D3	0.5	0.5 ~ 50	0.9992	92	10.6	102	15.0	118	6.5
イミプラミン	2	コカイン-D3	0.5	0.5 ~ 20	0.9918	75	12.8	101	6.3	103	9.2
オキサゼパム	2	コカイン-D3	0.5	0.5 ~ 50	0.9971	114	10.7	112	8.2	107	11.4
ノルプロボキシフェン	2	コカイン-D3	0.5	0.5 ~ 20	0.9892	55	22.2	104	14.5	97	16.1

薬物化合物	定量グループ	内部標準	LOQ (ng/mL)	キャリブレーション 範囲 (ng/mL)	検量線 R ²	低 QC		中 QC		高 QC	
						真度	RSD	真度	RSD	真度	RSD
ニトラゼパム	1	コカイン-D3	0.5	0.5 ~ 100	0.992	95	10.7	102	16.6	88	17.2
ベラパミル	1	コカイン-D3	0.5	0.5 ~ 100	0.9915	81	12.5	94	8.7	98	7.0
アミトリプチリン	2	コカイン-D3	0.5	0.5 ~ 50	0.9891	108	11.2	99	7.1	96	8.4
プロボキシフェン	2	コカイン-D3	0.5	0.5 ~ 20	0.9987	106	11.5	92	9.4	97	11.8
セコバルピタール	4	ブタルピタール-D5	0.5	1 ~ 200	0.9905	102	9.6	108	10.1	111	8.7
アルプラゾラム	2	アルプラゾラム-D5	0.5	0.5 ~ 50	0.9919	100	11.3	94	18.8	85	13.0
カリソプロドール	2	ジアゼパム-D3	0.5	0.5 ~ 20	0.9927	116	19.6	114	9.7	97	18.4
2-ヒドロキシエチルフルラゼパム	2	アルプラゾラム-D5	0.5	0.5 ~ 50	0.9974	99	10.6	101	18.9	108	10.5
メサドン	2	ジアゼパム-D3	0.5	0.5 ~ 50	0.9978	129	13.5	113	11.1	116	9.7
フルオキセチン	2	ジアゼパム-D3	0.5	0.5 ~ 50	0.9946	78	14.6	83	11.8	98	8.7
クロナゼパム	2	アルプラゾラム-D5	0.5	0.5 ~ 50	0.9935	114	5.6	98	6.3	97	9.7
トリアゾラム	2	ジアゼパム-D3	0.5	0.5 ~ 50	0.9957	93	15.9	104	13.0	107	14.7
セルトラリン	1	ジアゼパム-D3	0.5	0.5 ~ 100	0.9943	96	13.6	96	9.2	108	14.5
クロルプロマジン	1	ジアゼパム-D3	0.5	0.5 ~ 200	0.9955	98	9.3	88	6.8	109	15.0
デスアルキルフルラゼパム	2	ジアゼパム-D3	0.5	0.5 ~ 50	0.9941	119	5.2	110	4.8	107	6.5
クロミプラミン	2	ジアゼパム-D3	0.5	0.5 ~ 50	0.9866	84	3.6	96	8.8	113	10.9
ノルジアゼパム	2	ジアゼパム-D3	0.5	0.5 ~ 50	0.9922	105	11.7	109	10.7	104	4.0
テマゼパム	1	ジアゼパム-D3	0.5	0.5 ~ 100	0.991	110	5.7	106	6.4	103	3.9
クロバザム	1	ジアゼパム-D3	0.5	0.5 ~ 200	0.9962	108	3.4	96	1.9	107	6.9
ブロアジフェン	1	ジアゼパム-D3	0.5	0.5 ~ 100	0.9983	102	2.2	95	1.7	104	5.6
ジアゼパム	2	ジアゼパム-D3	0.5	0.5 ~ 50	0.9984	108	1.6	105	2.4	104	2.9
ロラゼパム ²	4	ジアゼパム-D3	1	1 ~ 100	0.9876	122	5.3	91	6.6	102	17.8
アンフェタミン ¹	3	アンフェタミン-D5	5	5 ~ 200	0.9942	104	7.0	N6	4.2	101	4.0
メタンフェタミン ¹	3	アンフェタミン-D5	5	5 ~ 100	0.9884	96	12.3	93	17.2	94	8.0
フェノバルピタール ²	3	コカイン-D3	5	5 ~ 200	0.9904	104	11.9	96	5.4	99	10.5
ブタルピタール ²	3	ブタルピタール-D5	5	5 ~ 200	0.9913	108	4.4	96	11.0	97	6.9
デキストロメトルファン ¹	3	コカイン-D3	5	5 ~ 100	0.9977	139	24.7	111	15.0	91	12.9
ノルトリプチリン ²	3	コカイン-D3	5	5 ~ 100	0.9957	91	17.0	86	13.1	77	3.8
ゾピクロン ²	6	コカイン-D3	20	20 ~ 200	0.9972	99	10.9	103	8.2	95	6.3

定量グループ1：キャリブレーション範囲 = 0.5 ~ 200 または 0.5 ~ 100 ng/mL、低 QC = 0.5 ng/mL、中 QC = 5 ng/mL、高 QC = 50 ng/mL

定量グループ2：キャリブレーション範囲 = 0.5 ~ 50 または 0.5 ~ 20 ng/mL、低 QC = 0.5 ng/mL、中 QC = 1 ng/mL、高 QC = 10 ng/mL

定量グループ3：キャリブレーション範囲 = 5 ~ 200 または 5 ~ 100 ng/mL、低 QC = 5 ng/mL、中 QC = 10 ng/mL、高 QC = 50 ng/mL

定量グループ4：キャリブレーション範囲 = 1 ~ 200 または 1 ~ 100 ng/mL、低 QC = 1 ng/mL、中 QC = 5 ng/mL、高 QC = 50 ng/mL

定量グループ5：キャリブレーション範囲 = 0.05 ~ 20 ng/mL、低 QC = 0.05 ng/mL、中 QC = 0.5 ng/mL、高 QC = 5 ng/mL

定量グループ6：キャリブレーション範囲 = 20 ~ 200 ng/mL、低 QC = 20 ng/mL、中 QC = 50 ng/mL、高 QC = 200 ng/mL

¹ ターゲット化合物がマトリックスブランクで陽性であり、これにより LOQ が高くなっていたか、または検量線が完全に誤っていました。

² ターゲット化合物は、マトリックスにおいて感度または選択性が低下しており、これにより LOQ が高くなっていました。

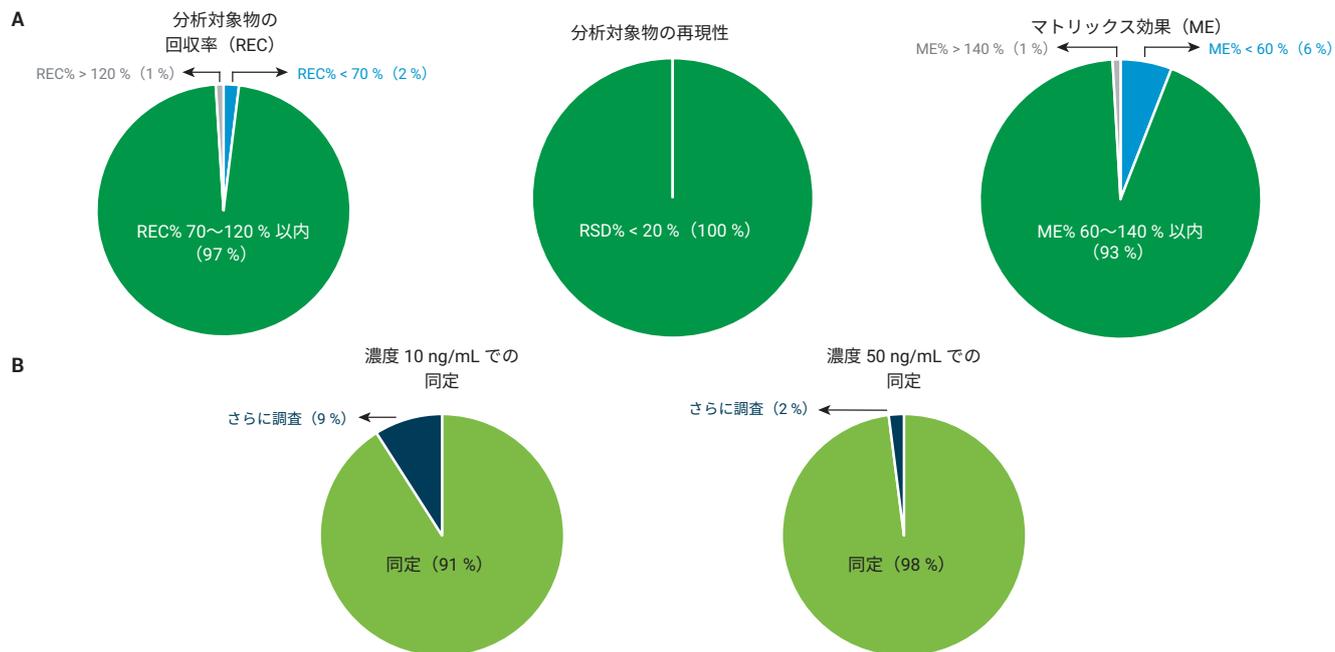


図 4. LC-QQQ での定量分析 (A) および LC/Q-TOF でのスクリーニング分析 (B) の統計結果

結論

ヒト全血中の 100 種類を超える依存性薬物および医薬品の LC/Q-TOF でのスクリーニングと同定並びに LC-QQQ での定量に対して、サンプル前処理、機器分析、データ処理を含む包括的なワークフローを開発して検証しました。カートリッジ内 PPT ベースのサンプル前処理メソッドとその後の EMR-Lipid クリーンアップにより、シンプルで効率的な分析対象物の抽出とマトリックスクリーンアップを実現しました。また、分解能とダイナミックレンジを向上させた LC/Q-TOF ワークフローが、ルーチン分析でのサスペクトスクリーニングの作業負担を低減させることを実証しました。今回のメソッドでは、この研究で使用した同定基準に基づいて、ヒト全血中の 102 種類の薬物をスクリーニングし、濃度 10 および 50 ng/mL でそれぞれ 91 % および 98 % を同定しました。さらに、ブプレノルフィンとフェンタニルを 1 ng/mL で同定しました。LC-QQQ での定量は、ダイナミック MRM 検出に基づいて実施しました。これらの結果から、定量の真度と精度が確認され、分析対象物の回収率とマトリックス効果、およびキャリブレーション範囲と直線性は許容範囲内でした。

参考文献

1. Maurer, H. H. Advances in analytical toxicology: the current role of liquid chromatography-mass spectrometry in drug quantification in blood and oral fluid, *Analytical Bioanalytical Chemistry* **2005**, *381*, 110–118.
2. Moretti, M. *et al.* Drug screening of whole blood by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Journal of Analytical Toxicology* **2011**, *35*, 280–293.
3. Øiestad, E. L. *et al.* Drug Screening of Whole Blood by Ultra-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, *J. Analytical Toxicology* **2011**, *35*, 280–293.
4. Verplaetse, R. *et al.* Screening of urine and blood using limited sample preparation and information dependent acquisition with LC-MS/MS as alternative for immunoassays in forensic toxicology, *Journal of Forensic Toxicology & Pharmacology* **2013**, *2*, 2.
5. Broecher, S. *et al.* Screening and quantitation of multiclass drugs of abuse and pharmaceuticals in hair by fast liquid chromatography electrospray time-of-flight mass spectrometry, *Journal of Chromatography B* **2011**, *879*, 2034–2042.
6. Marin, S. J. *et al.* Rapid Screening for 67 drugs and metabolites in serum or plasma by accurate-mass LC-TOF-MS, *Journal of Analytical Toxicology* **2012**, *36*, 477–486.
7. Roemmelt, A. T. *et al.* Liquid chromatography, in combination with quadrupole time-of-flight instruments, with sequential window acquisition of all theoretical fragment-ion spectra acquisition: validated quantification of 39 antidepressants in whole blood as part of simultaneous screening and quantification procedure, *Analytical Chemistry* **2015**, *87*, 9294–9301.
8. Broecher, S. *et al.* Development and practical application of a library of CID accurate mass spectra of more than 2,500 toxic compounds for systematic toxicological analysis by LC-QTOF-MS with data-dependent acquisition, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2011**, *400*, 101–117.
9. Yannell K. E.; Gomez M. Drug Screening in Whole Blood Using the Agilent 6546 LC/Q-TOF and the LC Screener Tool with Automated Sample Preparation, *Agilent Technologies application note*, publication number 5994-1744EN, **2020**.
10. Zhao, L. Quantitative Determination of Drugs of Abuse in Human Whole Blood by LC/MS/MS Using Agilent Captiva EMR—Lipid Cleanup, *Agilent Technologies application note*, publication number 5991-9251EN, **2018**.
11. Zhao, L. Quantitative Determination of Drugs of Abuse in Human Plasma and Serum by LC/MS/MS Using Agilent Captiva EMR—Lipid Cleanup, *Agilent Technologies application note*, publication number 5991-9312EN, **2018**.

