

Application News

No. C167

LC/MS

コカイン、コカイン関連興奮剤、アンフェタミン、オピノイドおよびベンゾジアゼピンを対象としたライブラリサーチによるマルチターゲットスクリーニング法の開発

■ 要旨

32種類の内部標準試料を含む90成分の乱用薬物一斉分析法を開発しました。対象化合物は、コカイン、コカイン関連興奮剤、アンフェタミン、オピノイドおよびベンゾジアゼピンです。上記化合物に加えて、抗精神病剤のスクリーニングに応用することができます。本報告で詳述するマルチターゲットスクリーニング法（以下、MTS法と記述）は当社の薬毒物データベースを用いて開発しました。

血液サンプルはQuEChERS法で処理し、MTS法をロードしたLCMS™-8060を用いて測定しました。MTS法で得られた結果は、LCMS-8050によるMRM測定結果（リモージュ大病院で開発したメソッドを使用）と比較しました。MTS法は1つの化合物につき2つのMRMトランジションとその閾値に応じて実行されるプロダクトイオンスキャン（3種類のコリジョンエネルギー）の2つの動作モードを組み合わせています。MTS法で得られた各コリジョンエネルギーのプロダクトイオンスペクトルは一つのマージスペクトルに統合され、ライブラリサーチに利用することができます。

MRMの強度を閾値として実行されるプロダクトイオンスキャンは2つの特長を有します。まず、ライブラリサーチ結果による化合物同定の信頼性の高さです。次に、通常のMRM法と同程度の定量結果を得ることができることです。MTS法の評価および検証は、未知サンプルに含まれる化合物の検出と同定を実施する臨床毒物学ラボにおいて行われました。

■ はじめに

法医学や毒物学分野においては、違法および合法化された快楽を目的とする薬剤の使用が増加しています。これはLC-MS/MSの測定を実施する現場において問題視されています。測定範囲や内容が増加することで、測定がより複雑になることは、臨床中毒学の現場から偽陽性・偽陰性のある結果をレポートとして報告する原因になりえます。測定の正確性、精度および検出限界を妥協することなく誤検出を防ぐには、MRM検出による感度とフルスキャンプロダクトイオンスペクトルによる同定能力を両立させたメソッドが必要です。当社が開発したメソッドは、プリカーサーおよびプロダクトイオンの両方を同時に使い、精密かつ正確な定量とライブラリサーチによる化合物同定が可能です。共著者が過去に発表した手法¹⁾と同様に、閾値により実行されるプロダクトイオンスキャン測定メソッドには3つのコリジョンエネルギーでのプロダクトイオンスキャンを全て反映した絶対強度合成スペクトルを採用しています。この絶対強度合成スペクトルは3つの異なるコリジョンエネルギー（10、35および55V）によるプロダクトイオンスキャン測定イベントを含んでいます。例として図1にミダゾラムのMRMを閾値として自動的に実行したプロダクトイオンスペクトルを示します。低・中・高それぞれのコリジョンエネルギーで統合されたマージスペクトルはライブラリサーチすることができます。このMTS法を用いることでより多くのフラグメント情報を得ることができ、誤同定を低減することができます。

臨床中毒分析におけるジェネリックなサンプル前処理方法を開発するにあたり、QuEChERS法（"Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe"からの頭文字）を採用しました。QuEChERSは食の安全分野や農業分析で幅広く使用されており、臨床中毒分析においても活用されています。本報告では、アセトニトリルによる血液サンプルの初期抽出とMgSO₄/NaCl/NaOAcなどの塩による液-液分配を用いました。

分離条件は別々の分析で測定される4つの化合物パネルを対象とし、単一のメソッドで測定可能とすることを目標に最適化しました。これらのメソッドには、コカインやコカイン関連興奮剤、アンフェタミン類、オピオイド類やベンゾジアゼピン類に加えて、それらの化合物に対する重水素化した内部標準物質を用いました。

本手法の実現性を評価するために4つの化合物パネルの定量・定性を行いました。同じ血液サンプルを用いてMRMトリガープロダクトイオンスペクトルの測定を行いました。この測定結果と通常利用されているMRMによる測定法（1つの化合物につき2個のMRMトランジション）を比較しました。

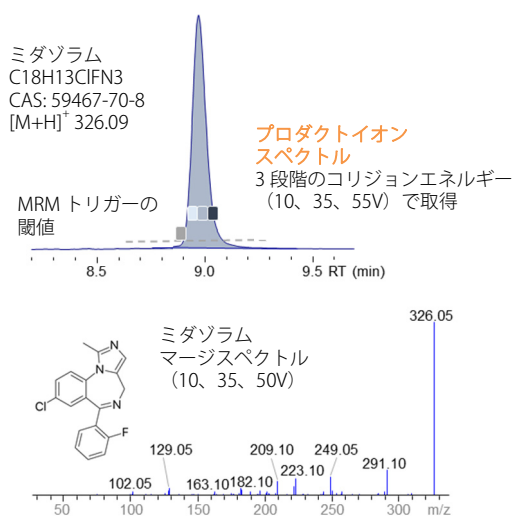


図1 ミダゾラムのMRMクロマトグラムおよびプロダクトイオンスペクトル (CE: 10、35、55 V)

Alan J. Barnes^{*1}, Tiphaine Robin^{*2}, Neil Loftus^{*1}, Pierre Marquet^{*2}, Souleiman El Balkhi^{*2}, Sylvain Dulaurent^{*2}, Franck Saint-Marcoux^{*2}

*1 Shimadzu Corporation, Manchester, UK

*2 CHU Limoges, France

■実験方法

測定に用いた血液サンプルは、一般的な病理学ラボの検体である過剰摂取急患、薬物テスト、薬服用中の運転といった多様な背景を持つ患者から採取しました。サンプルは精神科的治療法を受ける予定の患者から提供して頂きました。全ての血液サンプルは開発した QuEChERS 法を基本とした手法^{2),3)}を用いて抽出しました。

100 μ L の全血に内部標準を含む 200 μ L のアセトニトリルを加えました。5 秒間ボルテックスした後、10 分間室温に放置しました。40 mg の QuEChERS 塩を加え、もう一度 5 秒間ボルテックスしました。遠心分離 (16,000 g、10 分) 後、50 μ L の上清を採取し、150 μ L の移動相を加えました。検量線用のサンプルはベンゾジアゼピン類で 5-2000 μ g/L、コカインおよび関連興奮剤、アンフェタミン類、オピノイド類で 5-5000 μ g/L に調製しました。LC、MS の取得パラメータは表 1、2 に示します。

データはそれぞれの化合物に対してあらかじめ設定した MRM をモニターし取得しました。MRM 信号が 10000 カウントの閾値を越えると、2 つの連続した MS/MS スキャンの後、3 秒間同じスキャンを選択しない自動排除設定を用い、3 つのコリジョンエネルギー (10、35、55 V) で一連のプロダクトイオンスキャンを取得しました。図 2 にヒドロモルフォンの MS/MS スペクトルを示します。それぞれのコリジョンエネルギーで取得したプロダクトイオンスペクトルは、ライブラリサーチに利用するため、情報量の多い一つのマージスペクトルに統合しました。表 3 にヒドロモルフォンとモルヒネ-6-グルコニドの MS/MS 測定パラメータを示します。MRM の信号閾値を 10000 カウントに設定し、閾値を越えた場合、プロダクトイオンスキャンが実行されます。

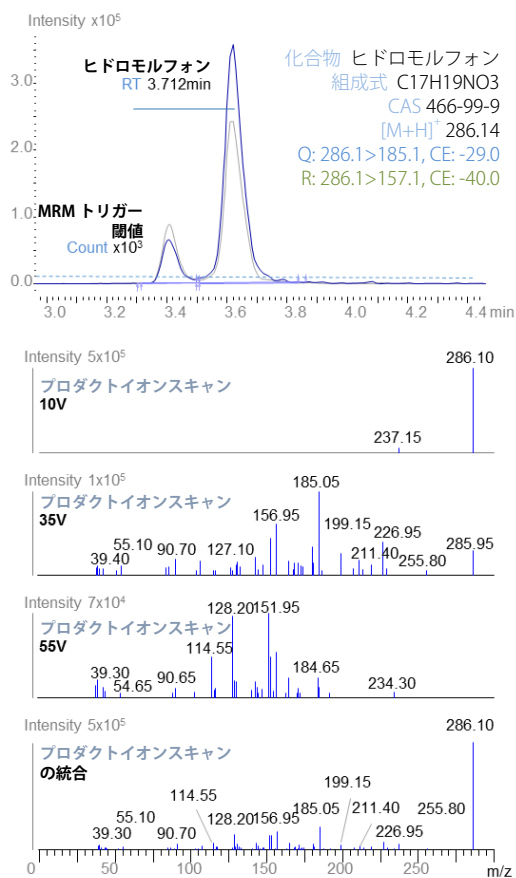


図 2 ヒドロモルフォンの MRM クロマトグラム、MS/MS スペクトル (CE: 10、35、55 V) およびマージスペクトル

表 1 LC 取得パラメータ

<液体クロマトグラフィ>

UHPLC	Nexera™ LC システム	
分析カラム	Restek Raptor™ Biphenyl (2.7 μ m 100 \times 2.1 mm)	
カラム温度	40 °C	
流速	0.3 mL/min	
移動相 A	2 mmol/L ギ酸アンモニウム (0.002 %ギ酸水)	
移動相 B	2 mmol/L ギ酸アンモニウム (0.002 %ギ酸メタノール)	
グラジエントプログラム	時間 (min)	%B
	1.0	5
	2.0	40
	10.5	100
	13.5	100
	13.51	5
	17.0	STOP
カラムコンディショニング	11-16.2 min	0.5 mL/min
注入量	5 μ L	

表 2 MS 取得パラメータ

<LC-MS/MS 質量分析計>

対象化合物数	122 (内部標準物質 32)
Pause Time/Dwell Time	1 msec/3 msec
イオン化モード	ESI +/-
極性切替時間	5 msec
インターフェイス温度	300 °C
ヒートブロック温度	400 °C
DL 温度	250 °C
ネブライザーガス	3 L/min
ヒーティングガス	10 L/min
ドライビングガス	10 L/min

表 3 ヒドロモルフォンとモルヒネ-6-グルコニドの MS/MS 測定パラメータ

<MS/MS メソッド>

データ取得時間	2.962-4.462 (mins)	
化合物名	ヒドロモルフォン	
MS/MS 取得モード	イベント	データ取得パラメータ
MRM	36	
Channel 1	CE: -29.0, 286.15 > 185.10	
Channel 2	CE: -40.0, 286.15 > 157.10	
プロダクトイオンスキャン	37	CE: -10.0, 30.00:291.50
プロダクトイオンスキャン	38	CE: -35.0, 30.00:291.50
プロダクトイオンスキャン	39	CE: -55.0, 30.00:291.50
データ取得時間	2.971-4.471 (mins)	
化合物名	モルヒネ	
MS/MS 取得モード	イベント	データ取得パラメータ
MRM	40	
Channel 1	CE: -31.0, 286.15 > 185.10	
Channel 2	CE: -45.0, 286.15 > 157.10	
プロダクトイオンスキャン	41	CE: -10.0, 30.00:467.20
プロダクトイオンスキャン	42	CE: -35.0, 30.00:467.20
プロダクトイオンスキャン	43	CE: -55.0, 30.00:467.20

CAO 化合物の測定結果 (表 4)、MRM クロマトグラム (図 3) およびベンゾジアゼピン類の測定結果 (表 5)、MRM クロマトグラム (図 4、青) を示します。10 分の分析でこれらの化合物を分離することが可能です。ポジティブ、ネガティ

ブのそれぞれの極性でイオン化⁴⁾する様々な化合物に対応するために、既に報告されている移動相を用いて分析を行いました。図 4 には比較としてオレンジの CAO 化合物を重ねています。

表 4 CAO 化合物の測定結果まとめ：標準物質 (100 ug/L) のライブラリ検索結果、類似度、検量線の R² 値

化合物名	ライブラリ検索結果	類似度	保持時間 (min)	精度 (%)	R ² 値
Ecgonine methylester	Ecgonine methylester	77	1.06	102.7	0.9995
Norephedrine	Norephedrine	48	3.25	107.2	0.9967
Norpseudoephedrine	Norephedrine	81	3.32	98.2	0.9999
Anhydroecgonine methyl ester	Anhydroecgonine methyl ester	32	3.40	97.6	0.9925
Morphine	Morphine	74	3.41	102.3	0.9989
Ephedrine	Ephedrine	71	3.51	109.9	0.9992
Pseudoephedrine	Pseudoephedrine	80	3.58	95.8	0.9997
Hydromorphone	Hydromorphone	85	3.62	97.0	0.9956
Methiopropamine	Methiopropamine	82	3.68	103.2	0.9998
Amphetamine	Phenylpropylamine	82	3.70	100.1	0.9993
Methcathinone	Methcathinone	93	3.71	93.3	0.9995
Noroxycodone	Noroxycodone	73	3.93	120.5	0.9949
Methamphetamine	Methamphetamine	79	3.96	94.8	0.9981
MDA	MDA	76	3.98	110.3	0.9975
Naloxone	Naloxone	61	3.98	115.0	0.9960
Dihydrocodeine	Dihydrocodeine	76	4.09	110.9	0.9957
Naltrexone	Naltrexone	77	4.11	99.8	0.9973
Ritalinic acid	Ritalinic acid	84	4.21	98.2	0.9990
Codeine	Codeine	90	4.11	114.3	0.9948
Pholcodine	Pholcodine	80	4.47	98.4	0.9940
Oxycodone	Oxycodone	71	4.20	108.1	0.9988
MDMA	MDMA	89	4.24	92.2	0.9927
6-MAM	6-MAM	81	4.24	98.4	0.9972
Mephedrone	Mephedrone	84	4.43	89.5	0.9989
BDB	BDB	82	4.45	104.0	0.9983
Norfenfluramine	Norfenfluramine	94	4.51	93.9	0.9990
MDEA	MDEA	96	4.55	102.3	0.9987
Benzoylcegonine	Benzoylcegonine	94	4.64	99.1	0.9985
Hydrocodone	Hydrocodone	75	4.52	112.0	0.9919
MBDB	MBDB	97	4.74	96.4	0.9995
Ethylmorphine	Ethylmorphine	93	4.71	104.6	0.9998
4-MTA	4-MTA	84	4.89	101.2	0.9980
M-CPP (meta-Chlorophenylpiperazine)	M-CPP (meta-Chlorophenylpiperazine)	86	4.89	99.0	0.9969
2-CB	2-CB	42	5.03	103.9	0.9993
Methylphenidate	Methylphenidate	45	5.20	89.2	0.9977
Cocaine	Cocaine	93	5.53	97.4	0.9997
2-Cl	2-Cl	83	5.53	91.9	0.9989
3,4-Methylenedioxypropylvalerone	3,4-Methylenedioxypropylvalerone	92	5.81	89.7	0.9983
Cocaethylene	Cocaethylene	96	6.11	98.3	0.9998
Dextromethorphan	Dextromethorphan	90	7.35	92.9	0.9897
EDDP	EDDP	88	7.66	97.1	0.9990
Methadone	Methadone	90	8.32	100.4	0.9999

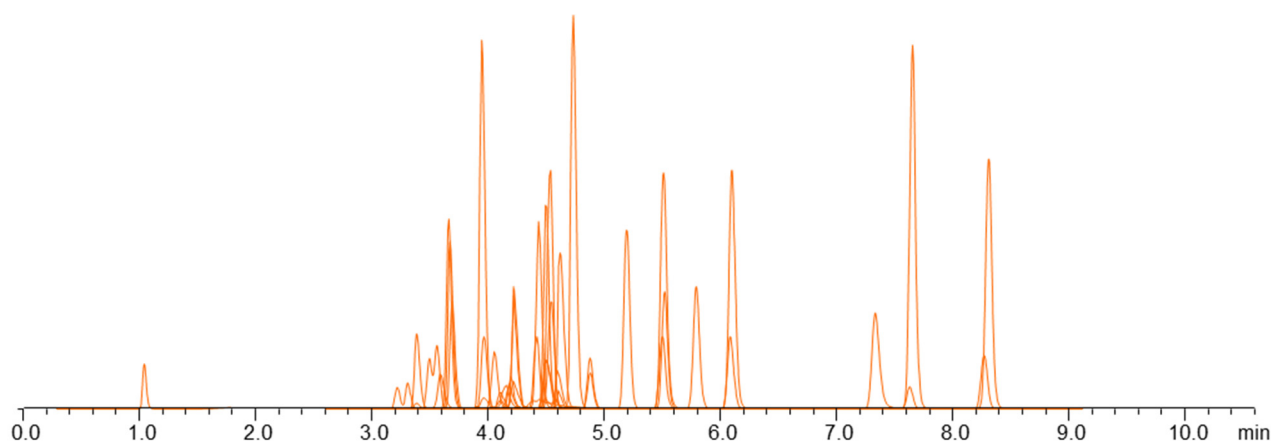


図 3 Biphenyl カラムを用いて分離した CAO 化合物 (表 3 参照) の MRM クロマトグラム

表5 ベンゾジアゼピンの測定結果まとめ：標準物質（100 ug/L）のライブラリ検索結果、類似度、検量線の R² 値

化合物名	ライブラリ検索結果	類似度	保持時間 (min)	精度 (%)	R ² 値
7-aminonitrazepam	7-aminonitrazepam	96	5.27	95.3	0.9969
7-aminoclonazepam	7-aminoclonazepam	79	5.32	103.8	0.9986
7-aminoflunitrazepam	7-aminoflunitrazepam	95	5.99	99.8	0.9989
3-Hydroxybromazepam	3-Hydroxybromazepam	54	6.19	103.1	0.9994
Zopiclone	Zopiclone	75	6.72	107.6	0.9992
Desmethylflunitrazepam	Desmethylflunitrazepam	58	7.16	112.9	0.9988
Bromazepam	Bromazepam	68	7.19	105.1	0.9969
Flurazepam	Flurazepam	85	7.22	87.7	0.9974
N-desmethyloclobazam	N-desmethyloclobazam	63	7.25	108.3	0.9972
Lorazepam	Lorazepam	70	7.26	100.0	0.9997
3-hydroxy-flunitrazepam	3-hydroxy-flunitrazepam	61	7.41	118.8	0.9943
Oxazepam	Oxazepam	63	7.44	102.9	0.9941
Clonazepam	Clonazepam	62	7.46	92.2	0.9943
2-(2-amino-5-bromobenzoyl)pyridine	2-(2-amino-5-bromobenzoyl)pyridine	89	7.47	112.4	0.9961
Nitrazepam	Nitrazepam	81	7.49	102.9	0.9996
Zolpidem	Zolpidem	87	7.56	93.9	0.9990
Desalkylflurazepam	Desalkylflurazepam	63	7.65	112.3	0.9852
Hydroxyalprazolam	Hydroxyalprazolam	83	7.85	86.1	0.9985
Chlordiazepoxide	Chlordiazepoxide	70	7.94	102.5	0.9993
4-hydroxymidazolam	4-hydroxymidazolam	64	8.07	91.3	0.9973
1-hydroxymidazolam	1-hydroxymidazolam	88	8.07	89.1	0.9967
Clobazam	Clobazam	87	8.11	100.6	0.9990
Nordiazepam	Nordiazepam	79	8.13	112.4	0.9951
Flunitrazepam	Flunitrazepam	83	8.23	100.7	0.9991
Lormetazepam	Lormetazepam	80	8.25	97.3	0.9953
Estazolam	Estazolam	88	8.30	104.3	0.9992
Triazolam	Triazolam	85	8.33	99.1	0.9994
Temazepam	Temazepam	76	8.40	104.5	0.9998
Ethyl loflazepate	Ethyl loflazepate	86	8.49	100.3	0.9994

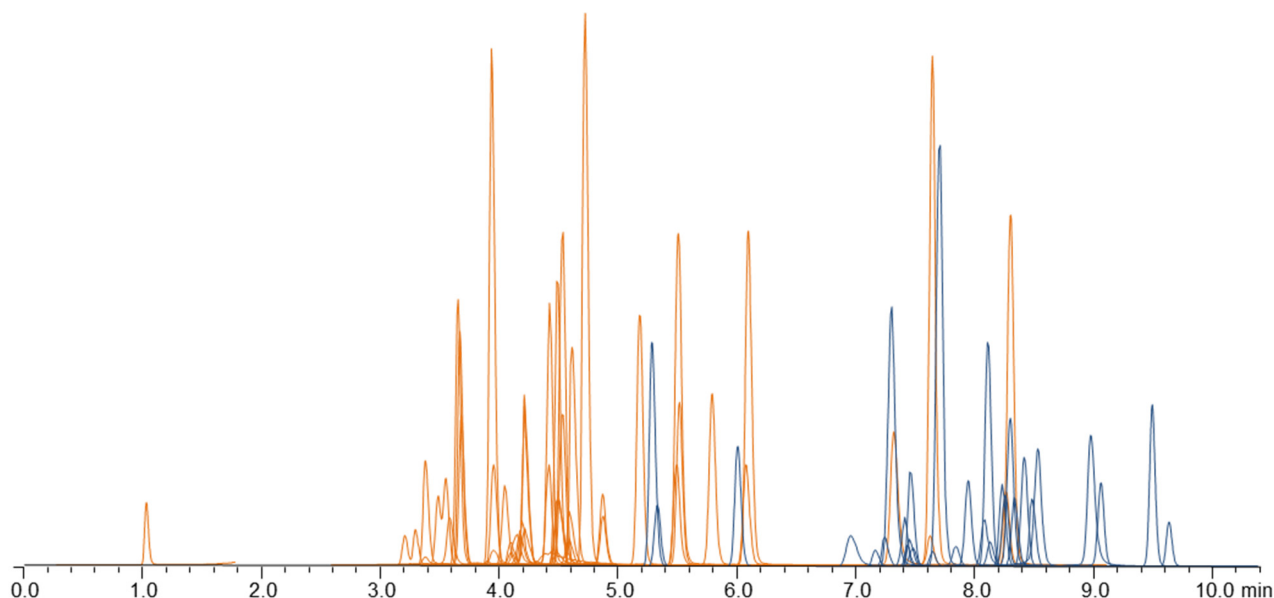


図4 35種のベンゾジアゼピン類（青）およびCAO化合物（オレンジ）のMRMクロマトグラム

前述した QuEChERS 法を用いて血液サンプルから抽出したモルヒネとヒドロモルフォンのMRMトリガープロダクトイオンスキャンの測定結果を図5に示します。モルヒネとヒドロモルフォンのような同じ質量の化合物を血液中において同定する場合においても、実サンプルで取得したプロダクトイオンスペクトルと標準試料で取得したライブラリスペクトル

ルとの類似度検索で確認することができます。また、図6に血液サンプルから抽出したモルヒネとヒドロモルフォンの検量線データ (5-500 ug/L) を示します。対象化合物の検量線作成にはMRMトリガープロダクトイオンスキャンに用いた定量イオンを採用しました。

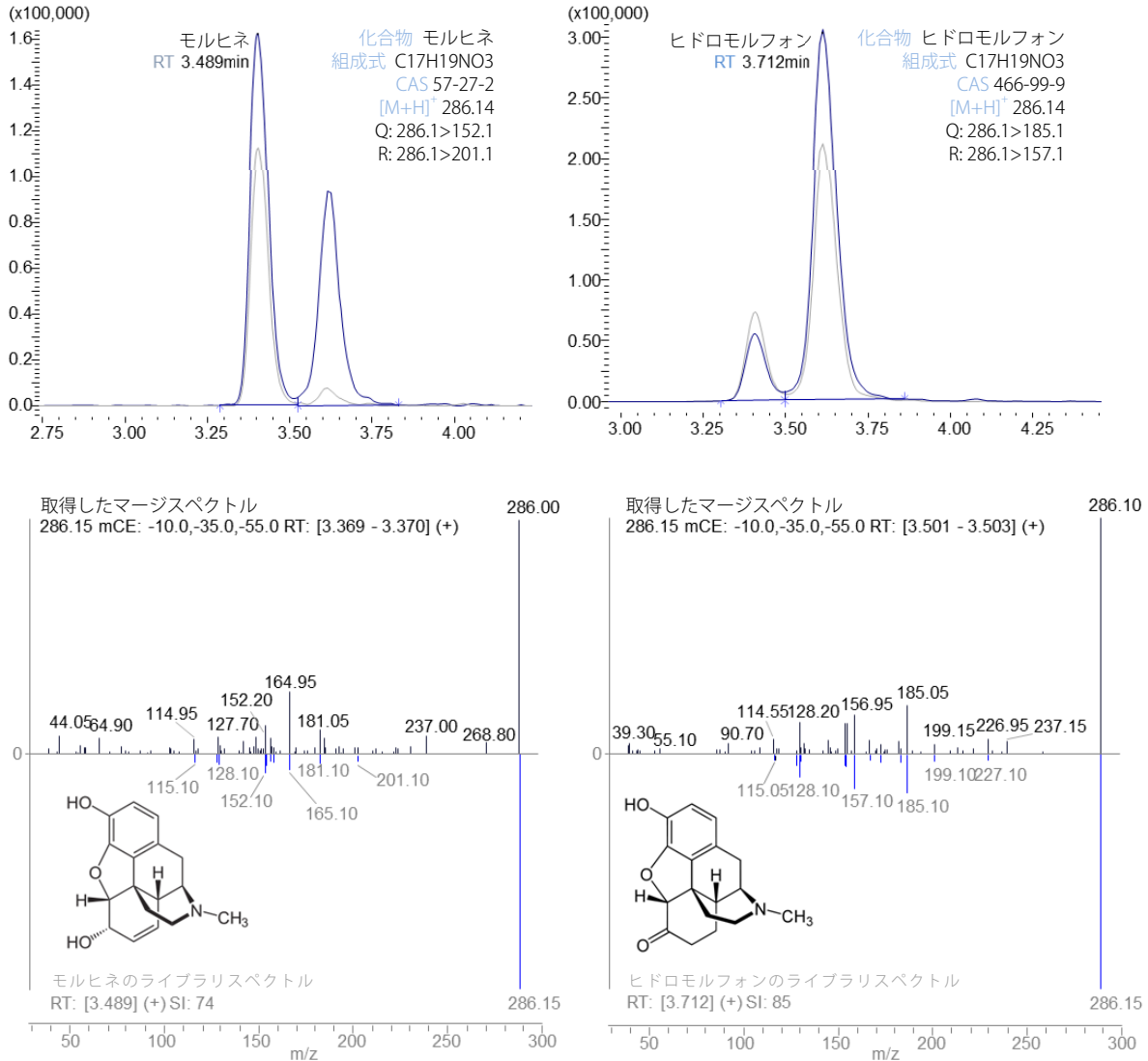


図5 血液サンプルから抽出したモルヒネとヒドロモルフォンのMRMトリガープロダクトイオンスキャン測定結果

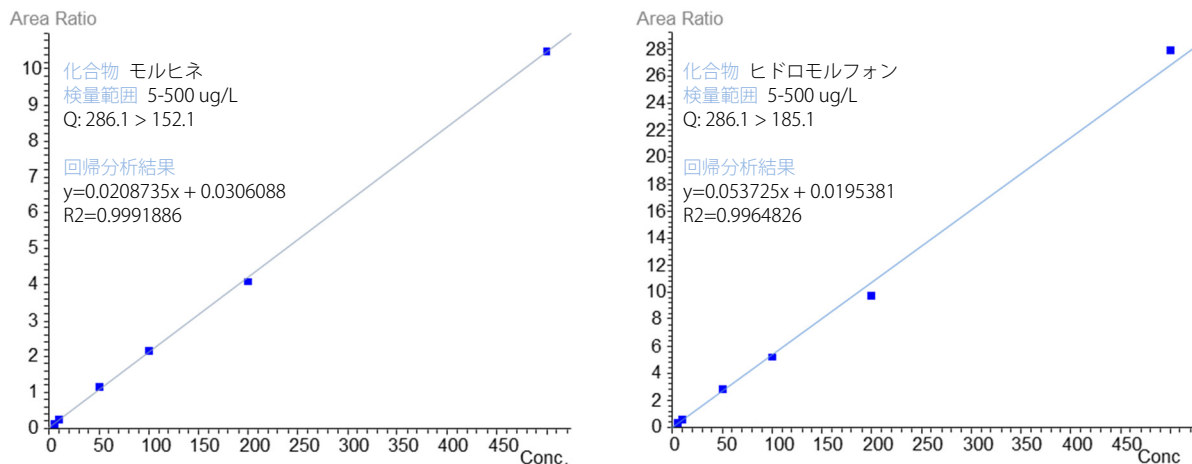


図6 血液サンプルから抽出したモルヒネとヒドロモルフォンの検量線データ (範囲: 5-500 ug/L)

■ メソッドのパフォーマンス

ここでは解析用ソフトウェア LabSolutions Insight™ の機能を紹介します。LabSolutions Insight では例外を抽出する機能（フラグging機能）を用いることでデータ確認を効率良く行うことができます。図7においてフラグging機能を基準値以上の薬物濃度を抽出するように設定しました。実測したプロダクトイオンスキャンと保持時間が、ライブラリと

マッチしたため、MDA が同定されました。（類似度；98、保持時間変動；0.1分）。また、図8ではデータレビューに対する様々な要求に対応するために「データビューを任意で表示、非表示」などデータブラウザを編集することができます。ここではエクゴニンメチルエステルの類似度；96でし

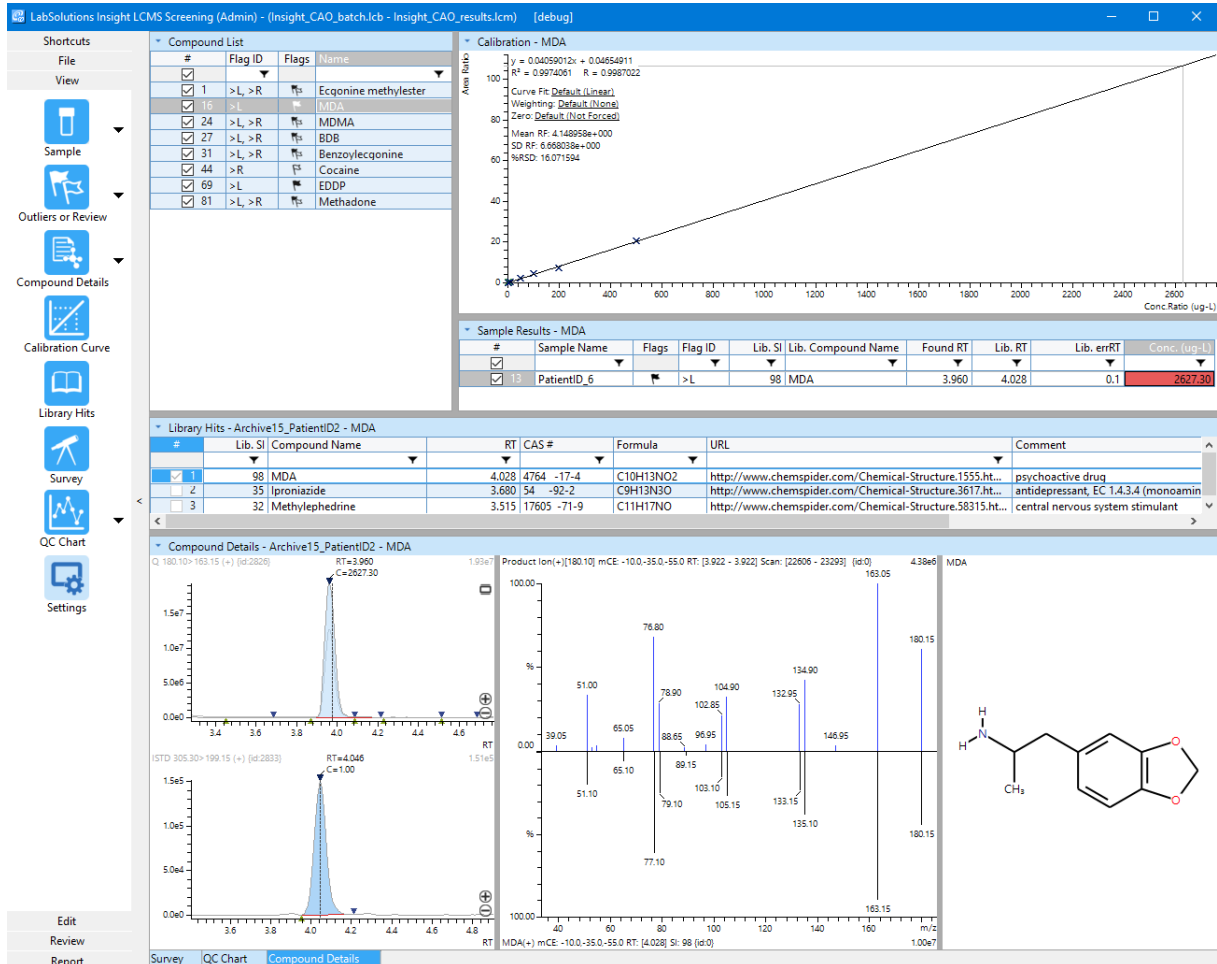


図7 解析用ソフトウェア LabSolutions Insight を用いた MDA の同定結果（類似度スコア；98、保持時間変動；0.1分）

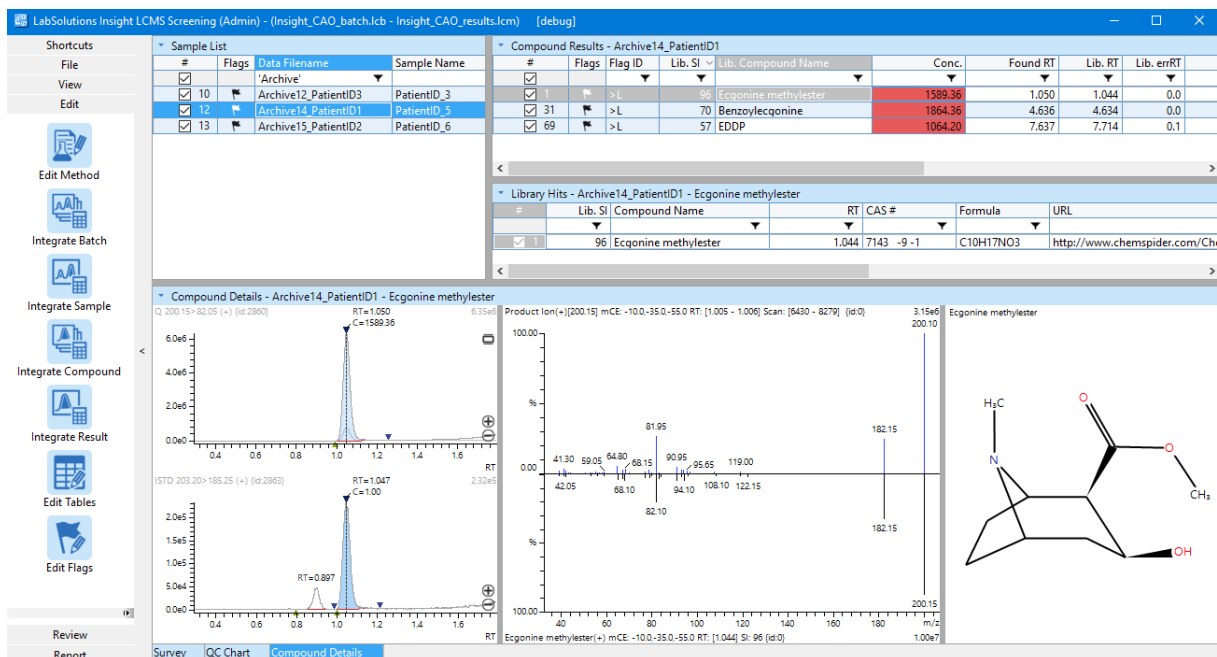


図8 エクゴニンメチルエステルのライブラリサーチの結果（類似度スコア；96）

■ 通常のMRM測定との比較

図9にて、24の患者血液をMTS法と従来法のMS/MSメソッドで測定した結果を示します。多くの患者サンプルから少なくとも一つ以上のターゲット化合物が検出され、54サンプル点を回帰分析に用いました。その結果、MTS法と従来法が十分一致していることが分かります。（スロープ=0.9996、回帰係数 $r^2 > 0.99$ ）

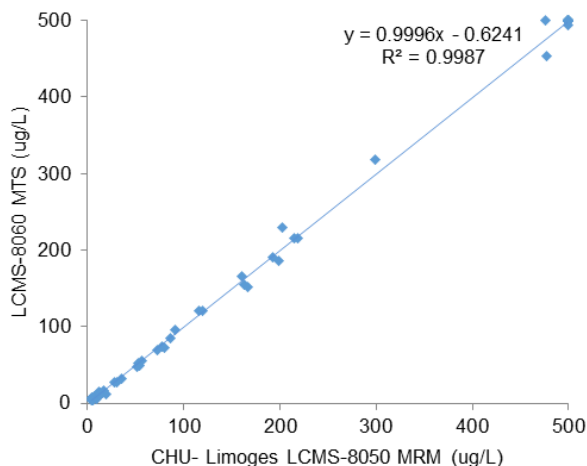


図9 MTS法 (LCMS-8060) と従来のMRM法 (LCMS-8050) による24患者血液サンプルの測定の回帰分析結果

■ 結論

QuEChER法によるサンプル前処理、様々な化合物を対象とした単一のLC分離条件、MRMトリガープロダクトイオンスキャン測定を用いた臨床中毒と法医学向けのジェネリックメソッドを開発しました。本メソッドは、臨床中毒ラボや法医学ラボから要望があった多様な対象化合物パネルの分析に対して、単一の分析条件を提供することで、コストのみでなく、誤同定の低減に貢献することを目的としました。プロダクトイオンスキャン測定とMRM測定を組み合わせた本メソッドは、ライブラリサーチによる化合物同定による高い信頼性と頑健な定量結果を併せ持っています。ライブラリによる同定はイオン比が許容範囲内に入らなかった場合や測定濃度がLLOQ、ULOQの範囲を超えた場合においても化合物同定の信頼性を損なうことはありません。

<Reference>

- 1) Sauvage, F.L., Gaulier, J.M., Lachatre, G., Marquet, P. (2008) Pitfalls and Prevention Strategies for Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry in the Selected Reaction-Monitoring Mode for Drug Analysis, *Clinical Chemistry*, 54:9, 1519-1527
- 2) Poncelet L., El Bakhia, S., Dulaurenta, S., Saint-Marcoux, F. (2016) QuEChERS sample preparation prior to LC-MS/MS determination of benzodiazepines, *Toxicologie Analytique et Clinique*, 28(3), 201-210
- 3) Dulaurent, S., El Bakhia, S., Poncelet, L., Gaulier, J.M., Marquet, P., Saint-Marcoux, F. (2016) QuEChERS sample preparation prior to LC-MS/MS determination of opiates, amphetamines, and cocaine metabolites in whole blood, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408(5), 1467-1474
- 4) Marquet, P., Venisse, M., Lacassie, É., Lachâtre, G. (2000) In-source ID mass spectral libraries for the "general unknown" screening of drugs and toxicants, *Analysis*, (28), 925-934
- 5) Dalsgaard, P.W., Rasmussen, B.S., Muller, I.B., Linnet, K. (2012) Toxicological screening of basic drugs in whole blood using UPLC-TOF-MS, *Drug Test. Analysis*, 4, 313-319
- 6) Sauvage, F.L., Saint-Marcoux, F., Duretz, B., Deporte, D., Lachatre, G., Marquet, P. (2006) Screening of Drugs and Toxic Compounds with Liquid Chromatography-Linear Ion Trap Tandem Mass Spectrometry, *Clinical Chemistry*, 52:9, 1735-1742

LCMS、Nexera、およびLabSolutions Insightは、株式会社 島津製作所の商標です。
Raptorは、Restek Corporationの登録商標です。

株式会社 島津製作所 分析計測事業部
グローバルアプリケーション開発センター

初版発行：2018年3月

島津コールセンター ☎0120-131691
(075) 813-1691

※本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。
改訂版は下記の会員制 Web Solutions Navigator で閲覧できます。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm>

会員制情報サービス「Shim-Solutions Club」にご登録ください。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/>

会員制 Web の閲覧だけでなく、いろいろな情報サービスが受けられます。