

Application News

ヒト全血中の薬毒物一斉スクリーニング および簡易定量

Brian Waters¹, 荒尾 洋平, 井本 英志

¹福岡大学医学部法医学教室

ユーザーベネフィット

- ◆ Micro Volume QuEChERS kitによる簡便な前処理方法で分析が可能です。
- ◆ LabSolutions Insight Library Screeningにより簡単にライブラリ検索結果の確認が可能です。
- ◆ 標準試薬が手元に無くても15分の分析で簡易的な定量結果が得られます。

はじめに

法医学や死因究明において、法医中毒学は重要なツールとなっています。薬物分析は迅速性が求められることが多いため、中毒学者や法医学者に結果をタイムリーに提供できる分析システムが有益となります。その中でもLC/MS/MSは、近年の頑健性、感度の向上に加えて価格の低下により、法医学分野での応用に注目が高まっています。今回、筆者らはトリプル四重極質量分析計をベースとした一斉分析法LC/MS/MS薬毒物迅速スクリーニングシステム Ver. 3.01を開発しました。本メソッドパッケージには、231種の法医中毒関連化合物の同定および半定量が可能な分析条件が収載されています。また、Micro Volume QuEChERS kitを用いた前処理を実施することで、わずか100 μLの全血から安定したデータを取得することが可能です。本報では、ヒト全血に対しMicro Volume QuEChERS kitを用いて前処理を実施し、LC/MS/MS薬毒物迅速スクリーニングシステムVer.3.01を使用し法医学分野で頻繁に検出される薬毒物231成分の一斉スクリーニングおよび検出化合物の簡易定量を行った事例をご紹介します。



図1 LC/MS/MS薬毒物迅速スクリーニングシステム

試料の前処理

前処理はMicro Volume QuEChERS kitを使用しました。前処理フローを図2に、前処理手順詳細を以下に示します。抽出塩が入ったMicro Volume QuEChERS kitに300 μLのアセトニトリルと200 μLの超純水を加えて十分に撹拌しました。次に、4 ng/μL Diazepam-d5と200 ng/μL Phenobarbital-d5となるように調整した混合溶液5 μLを加えました。100 μLの全血を加えて直ちに撹拌し、遠心分離(15,000 x g, 10 min, 室温)を行いました。その後、上澄み液100 μLを新しい1.5 mLのプラスチックチューブに移しました。そこへ20 μLの0.1%TFA-アセトニトリルを添加し撹拌しました。吹付け式の濃縮装置を使用し、窒素ガスで溶液を乾燥させました。乾燥後、メタノール500 μLを加えて再溶解させました。遠心分離(15,000 x g, 10 min, 室温)を行った後、HPLC用バイアルに移し、測定を行いました。

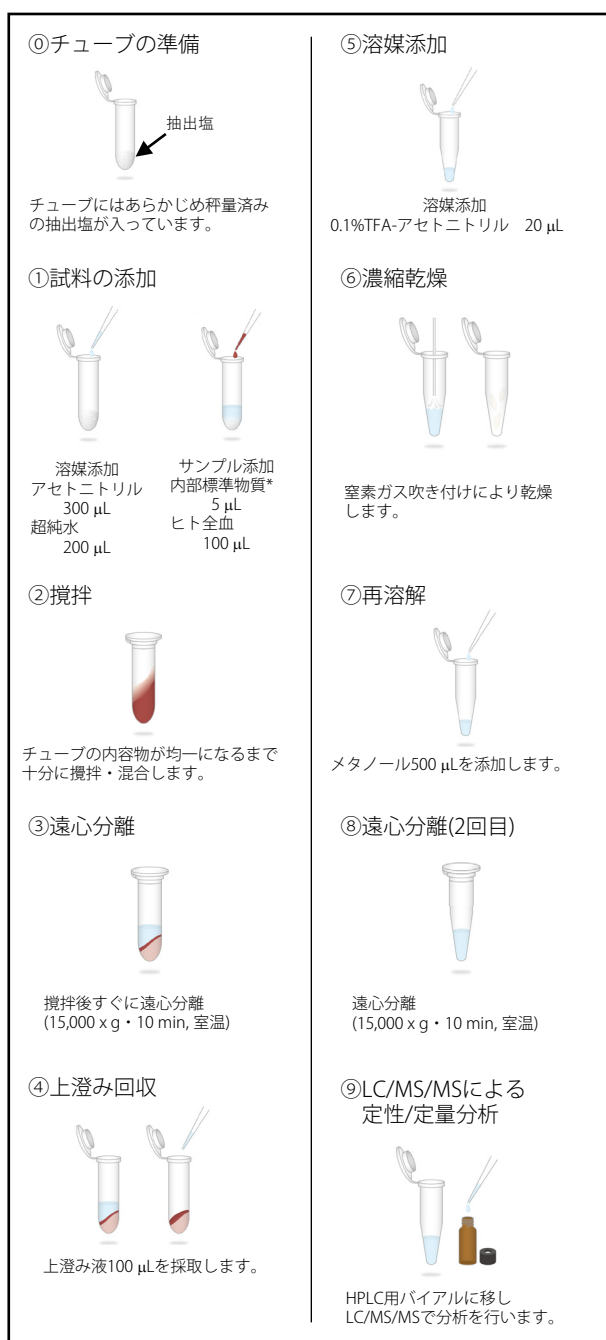


図2 Micro Volume QuEChERS kitによる前処理方法

■ 分析条件

前処理されたサンプルはNexera™ X2システムとLCMS-8045を使用して分析しました。分析カラムはShim-pack Velox™ SP-C18 column (2.1 mm I.D. x 100 mm L., 2.7 μm)を使用しました。今回、化合物の定性にシンクロナイズドサーベイスキャン(SSS)、定量にMRMメソッドを使用しました。表1に各メソッド共通のHPLC条件、表2に各メソッドのMS条件を示しました。

表1 HPLCの分析条件

UHPLC (Nexera™ X2 system)	
Column	: Shim-pack Velox SP-C18 (2.1 mm I.D. x 100 mm L., 2.7 μm, Shimadzu) P/N: 227-32003-03
Mobile phase	: A) 10mM ammonium formate and 0.1% formic acid in water B) 10mM ammonium formate and 0.1% formic acid in methanol
Mode	: Gradient elution (15 min)
Flow rate	: 0.3 mL/min
Injection volume	: 5 μL

表2 MSの分析条件

SSSメソッド	
Ionization	: ESI (Positive/Negative switching)
Mode	: MRM and Product Ion Scan (231 Compounds)
Nebulizing gas flow	: 3.0 L/min
Drying gas flow	: 10.0 L/min
Heating gas flow	: 10.0 L/min
DL temp.	: 250 °C
Block heater temp.	: 400 °C
Interface temp.	: 300 °C

MRMメソッド	
Ionization	: ESI (Positive/Negative switching)
Mode	: MRM (229 Compounds)
Nebulizing gas flow	: 3.0 L/min
Drying gas flow	: 10.0 L/min
Heating gas flow	: 10.0 L/min
DL temp.	: 250 °C
Block heater temp.	: 400 °C
Interface temp.	: 300 °C

■ 剖検試料

検体は福岡大学医学部法医学教室の剖検例の全血を使用しました。使用した検体は本報に先立ち、LC/MS/MSを用いて血液中に含まれる化合物の同定および検出された化合物に対して検量点9点で作成した検量線を用いて定量値を算出しました。1)検出された化合物とその定量値を表3に示しました。

表3 先行研究により検体から検出された化合物と定量結果

化合物名	定量結果(濃度, ng/μL)
7-Aminoflunitrazepam	0.0059
Biperiden	0.002
Haloperidol	0.0033

■ SSSメソッドによるスクリーニング結果

LC/MS/MS薬毒物迅速スクリーニングシステムには2種類(SSSとMRM)のメソッドファイルが含まれています。両メソッドには各成分の検量線情報が含まれており、標準試料を準備せずに簡易的な定量結果を算出することが可能です。この内、SSSメソッドは各成分についてMRM分析を行い、設定された強度閾値を超えた化合物に対してプロダクトイオンスキャンを走査します。結果はLabSolutions Insight Library Screeningにより簡単に確認することができます。剖検血液試料をSSSメソッドで分析した結果、3種類(7-Aminoflunitrazepam、Biperiden、Haloperidol)の化合物が高いライブラリ類似度で試料中に存在することが確認できました。

各成分のライブラリ検索結果を表4に示します。また、LabSolutions Insight Library Screeningソフトウェアによって処理されたライブラリ検索結果の一例を図3に示します。

表4 各成分のライブラリ検索結果

化合物名	ライブラリ類似度(最大 100)
7-Aminoflunitrazepam	61
Biperiden	84
Haloperidol	95

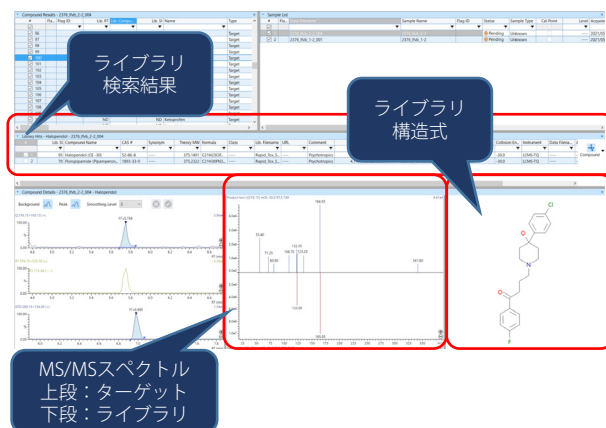


図3 Library Screeningによるライブラリ検索結果の一例

■ MRMメソッドによる簡易定量結果

MRMメソッドはSSSと比較して特に低濃度において、より良好な定量精度で分析が可能です。SSSメソッドで同定された3種類(7-Aminoflunitrazepam、Biperiden、Haloperidol)の化合物についてMRMで分析を実施しました。その結果得られたクロマトグラムを図4に、半定量結果と表3の定量結果との誤差を表5に示しました。

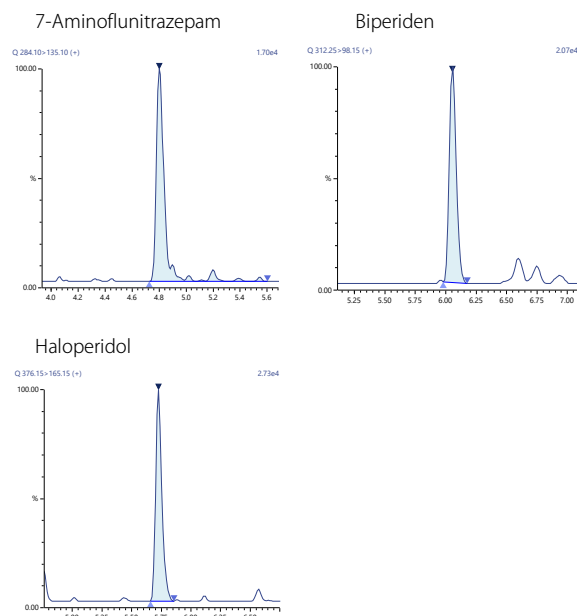


図4 剖検試料から検出された化合物のクロマトグラム

表5 MRMメソッドによる半定量結果

化合物名	半定量結果 (ng/μL)	定量結果からの誤差(%)
7-Aminoflunitrazepam	0.0051	14
Biperiden	0.0007	65
Haloperidol	0.0034	3

■まとめ

本メソッドパッケージに保存された検量線によって得られた7-AminoflunitrazepamおよびHaloperidolの剖検試料から取得した半定量結果は、先行論文¹⁾で得られた結果と非常に近い結果となりました。Biperidenは薬毒物迅速スクリーニングシステムの条件としては定量下限値(LLOQ)未満であり、半定量結果と先行論文との間で誤差が大きくなったものと考えられます。一方で、定量範囲内であれば、実試料中で非常に低濃度の化合物であっても標準試料を用意することなく、高感度に検出・同定を行い妥当な半定量結果を算出できることがわかりました。以上より、剖検血液試料のスクリーニングLC/MS/MS薬毒物迅速スクリーニングシステムの有用性および利便性を示すことができました。

■登録化合物一覧

表6にLC/MS/MS薬毒物迅速スクリーニングシステムに登録されている成分一覧を示しました。

表6 LC/MS/MS薬毒物迅速スクリーニング登録化合物一覧

7-Aminoclonazepam	7-Aminoflunitrazepam	7-Aminonimetazepam
7-Aminonitrazepam	8-Hydroxyetizolam	Acetaminophen
Aconitine	Alfa-methyltryptamine	Allylisopropylacetylurea
alpha-Hydroxyalprazolam	alpha-Hydroxyimidazolam	alpha-Hydroxytriazolam
Alprazolam	Amitriptyline	Amlodipine
Amobarbital	Amoxapine	Amphetamine
Ampicillin	Aripiprazole	Atenolol
Atomoxetine	Atorvastatin	Atropine
Azelnidipine	Azilsartan	Barbital
Benzoyl ecgonine	Biperiden	Blonanserin
Brexpiprazole	Bromazepam	Bromocriptine
Bromovalerylurea	Bromperidol	Brotizolam
Bupivacaine	Caffeine	Candesartan
Carbamazepine	Carbazochrome	Carpipramine
Carvedilol	Chlordiazepoxide	Chlorpheniramine
Chlorpromazine	Chlorpromazine-M	Cibenzoline
Clobazam	Clocapramine	Clomipramine
Clonazepam	Clotiazepam	Clozapine
Clozapine	Cocaine	Codeine
Colchicine	DDVP	Delorazepam
DEP	Desipramine	Desmethylclotiazepam
Desmethyldiazepam	Dextromethorphan	Diazepam
Dibucaine	Diclofenac	Dihydrocodeine
Diltiazem	Diphenhydramine	Diprophyline
Diquat	Domperidone	Donepezil
Dosulepin	Droperidol	Duloxetine
Ecgonine methyl ester	Ephedrine	Escitalopram
Estazolam	Ethenzamide	Ethyl loflazepate
Etizolam	Famotidine	Fludiazepam
Flufenamic acid	Flunitrazepam	Fluphenazine
Flurazepam	Fluvoxamine	Furosemide
Gabapentin	Glibenclamide	Gliclazide

Glimepiride	Haloperidol	Haloxazolam
Hydroxymethylbrotizolam	Hydroxyzine	Ibuprofen
Imidapril	Imipramine	Irbesartan
Isopropylantipyrine	Ketamine	Ketoprofen
Lamotrigine	Levetiracetam	Levomepromazine
Lidocaine	Lorazepam	Lormetazepam
Losartan	Loxoprofen	Malathion
Maprotiline	MDA	MDMA
Medazepam	Mefenamic acid	Memantine
Mepivacaine	Mequitazine	Metformin
Methamphetamine	Methomyl	Methylephedrine
Methylphenidate	Mexazolam	Mexiletine
Mianserin	Midazolam	Milnacipran
Mirtazapine	Morphine	Mosapramine
Naftopidil	N-Desmethyl clobazam	N-Desmethyl zopiclone
N-Desmethyilmirtazapine	Nemonapride	Nicardipine
Nicotine	Nicotine-M	Nifedipine
Nimetazepam	Nitrazepam	Norephedrine
Nortriptyline	Noscapine	Olanzapine
Olmestartan	Oxazepam	Oxypertine
Paliperidone	Papaverine	Paroxetine
Pemoline	Pentazocine	Pentobarbital
Perospirone	Perphenazine	Phenobarbital
Phenytoin	Pimozide	Pioglitazone
Pipamperone	Piroxicam	Pitavastatin
Pranlukast	Primidone	Procaine
Prochlorperazine	Promethazine	Propericiazine
Propofol	Propranolol	Quazepam
Quetiapine	Risperidone	Ropivacaine
Rosuvastatin	Salicylamide	Salicylic acid
Secobarbital	Sertraline	Setipiline
Sildenafil	Silodosin	Sitagliptin
Solfenacin	Spiperone	Spironolactone
Sulfamethoxazole	Sulpiride	Sultopride
Suvorexant	Tadalafil	Tandospirone
Telmisartan	Temazepam	Tetracaine
THC	THC-COOH	Thiamylal
Timiperone	Tofisopam	Topiramate
Tramadol	Trandolapril	Trazodone
Triazolam	Trihexyphenidyl	Trimethoprim
Trimipramine	Urapidil	Valproic acid
Valsartan	Vardenafil	Venlafaxine
Verapamil	Warfarin	Zaleplon
Zolpidem	Zolpidem_M-1	Zonisamide
Zopiclone	Zopiclone-N-oxide	Zotepine

■参考文献

1) Waters B et al., "Tissue distribution of suvorexant in three forensic autopsy cases", J. Anal. Toxicol. 42 (2018) 276-283.

LCMS、NexeraおよびShim-pack Veloxは株式会社 島津製作所の日本およびその他の国における商標です。

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

01-00255-JP 初版発行：2021年11月

島津コールセンター ☎ 0120-131691

本書に記載されている製品は、医薬品医療機器等法に基づく医療機器として承認・認証等を受けた機器ではありません。
本書に記載されている分析手法を診断目的で使用することはできません。

本文中に記載されている会社名および製品名は、各社の商標および登録商標です。
本文中では「TM」、「®」を明記していない場合があります。

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。
改訂版は会員制サイト Solutions Navigator で閲覧できます。
<https://solutions.shimadzu.co.jp/solnav/solnav.htm>
閲覧には、会員制情報サービス Shim-Solutions Club に登録してください。
<https://solutions.shimadzu.co.jp/>

© Shimadzu Corporation, 2021