



## 前処理方法

血清試料(添加血清および実試料) 500  $\mu\text{L}$ に10%塩酸を20  $\mu\text{L}$ 滴下して酸性とした後、クロロホルム-イソプロパノール(3:1, v/v) 混合液1000  $\mu\text{L}$ を添加して激しく混和後、15分間遠心分離を行い、有機層(酸性画分)を分取しました。この操作を2回繰り返した後、水層に28%アンモニア水20  $\mu\text{L}$ を添加して塩基性とし、クロロホルム-イソプロパノール(3:1, v/v) 混合液1000  $\mu\text{L}$ を添加して、

## 機器

GC-MSにはGCMS-QP2010 Ultraを、データ処理にはGCMSsolutionをそれぞれ用いました。分析条件はTable 1に示します。保持時間の修正は、GCMSsolution再解析に搭載されている AART (Automatic Adjustment of Retention Time) 機能を利用して保持指標から精神神経病用薬の遊離体分析用メソッドに含まれる162成分の保持時間を

上記と同様の操作で有機層(塩基性画分)を分取しました。得られた酸性画分および塩基性画分を合わせた後、無水硫酸ナトリウムによる脱水を行い、窒素気流下、40 $^{\circ}\text{C}$ で蒸発乾固しました。得られた残渣を酢酸エチル 250  $\mu\text{L}$ に溶解し、GC/MS用の分析試料としました。

計算し、同定基準の保持時間としました。同定許容幅は $\pm 0.2$ 分に設定し、自動同定機能を利用して試料に含まれていた成分を同定しました。また、定量を行うための内部標準試料は、AOC-20i+sの内部標準自動添加機能を利用して試料と同時にGCの注入口に導入しました。

Table 1 分析条件  
Analytical Conditions

Instruments	
GC-MS	: GCMS-QP2010 Ultra
Auto-injector	: AOC-20i + s
Column	: Rxi <sup>®</sup> -5Sil MS(30 m x 0.25 mm I.D. df=0.25 $\mu\text{m}$ , Restek Corporation)
GC condition	
Column Temp.	: 60 $^{\circ}\text{C}$ (1 min)-10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ -320 $^{\circ}\text{C}$ (10 min)
Carrier Gas	: He (Constant Linear Velocity Mode)
Carrier Gas Velocity	: 45.6 cm/sec
Injection Mode	: Splitless
Sample injection volume	: 1 $\mu\text{L}$
IS injection volume	: 1 $\mu\text{L}$
MS condition	
Interface Temp.	: 280 $^{\circ}\text{C}$
Ion Source Temp.	: 200 $^{\circ}\text{C}$
Scan Interval	: 0.3 sec
Monitor ion for semi-quantitation	: $m/z$ 204 for phenobarbital : $m/z$ 318 for chrolpromazine : $m/z$ 72 for promethazine

## ▶ 結果と考察

### 添加血清の半定量結果

添加血清を上記方法で分析して得られたトータルイオンクロマトグラム(TIC)をFig. 1に示します。添加した3成分は、予測計算された保持時間 $\pm 0.03$ 分以内に全て検出されており、保持時間による正確な同定が行われました(Fig. 2)。各成分は予め設定された複数の $m/z$ の抽出イオンクロマトグラム(EIC)により検出されているため、濃度が微量の場合やマトリッ

クスの影響などでTICでは確認できない場合でも、クロマトグラムが検出可能です。検出されたクロマトグラムは、標準のマスペクトルとの類似度確認を経て、正確に自動同定されます(Fig. 3)。また定量値は、得られた対象成分と内部標準の成分とのピーク面積の比率と相対レスポンスファクターにより算出しました。このようにして、「GC/MS法薬毒物データベース」の自動

検索システムにより、フェノバルビタール、クロルプロマジンおよびプロメタジンが自動的に検出され、これら3成分の半定量値が得られました。「GC/MS法薬による半定量値と使用した相対レスポンスファクター(標準液の分析から求めたもの)をTable 2に示します。

Table 2に示すように、今回の結果では、クロルプロマジンおよびプロメタジンでは、概ね良好な結果が得られましたが、フェノバルビタールが添加量よりも約1.8倍高い値を示しました。「GC/MS法薬毒物データベース」の半定量機能は、予め標準液から求めたレスポンスファクターを使用して”最終試料中の薬物濃

度”を半定量値として概算するものです。従って、試料前処理の薬物回収率や試料濃縮率、マトリックス効果などによっても半定量値は大きく変動すると考えられます。特に、全血試料の場合であれば、脂溶性の高い薬物の回収率が大きく低下し、得られた半定量値の真値からのずれが大きくなることも予想されます。このように、算出される定量値は利用する前処理やGCの注入口やカラムの状況により変動することが予測されるため、あくまで概算値として取り扱う必要があり、鑑定に利用する定量分析では標準試料を利用した方法が求められます。

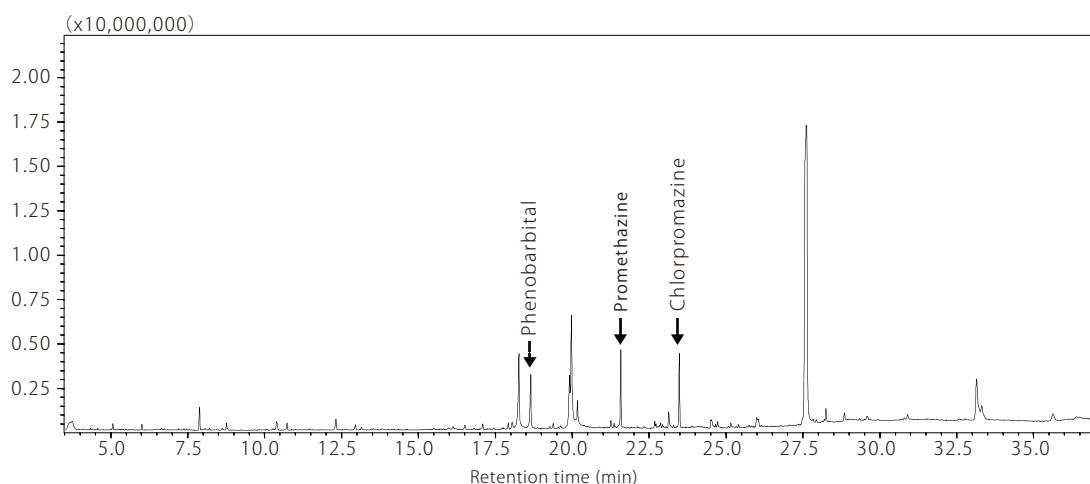


Fig.1: 添加血清より得られたトータルイオンカレントクロマトグラム

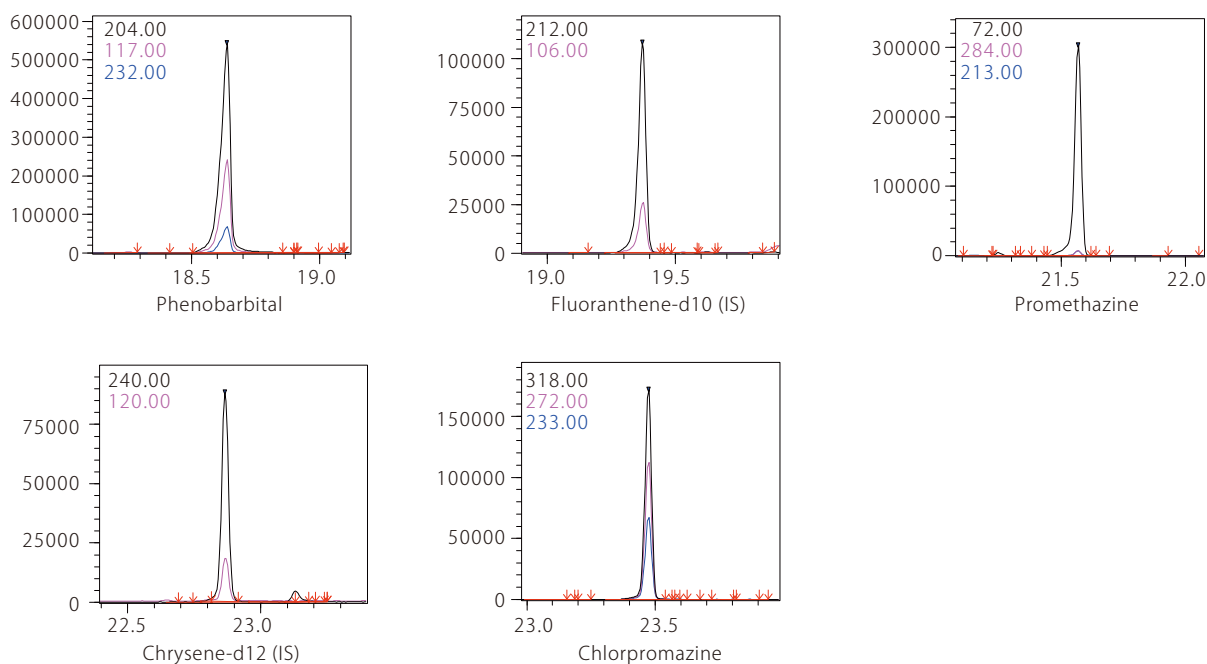


Fig.2: 添加3成分と主な内部標準試料のマスクロマトグラム

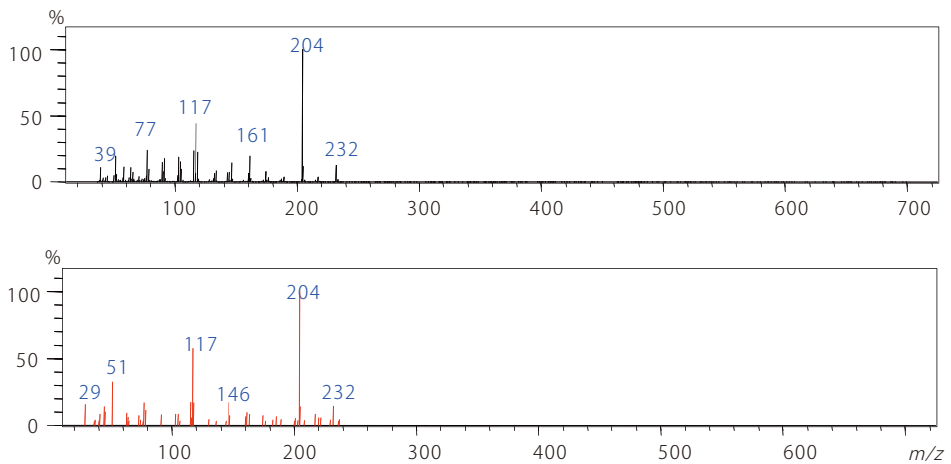


Fig.3: フェノバルビタールの測定マススペクトル(上)と標準マススペクトル(下)の比較

Table 2 添加血清の半定量値  
Semi-quantitated results of spiked plasma

compounds	additive amount (µg/mL)	Semi-quantitated (µg/mL)	response factor
Phenobarbital	10.0	17.6	0.175
Chlorpromazine	10.0	11.3	0.144
Promethazine	10.0	11.4	1.782

### 実試料の半定量結果

実試料の場合も添加血清の場合と同様に、自動検索システムにより3成分が自動的に検出され、半定量値が得られました。実試料の分析より得られたクロマトグラムをFig. 4に示します。また、実試料について内部標準法を用いて求めた定量値と、「GC/MS 法薬毒物データベース」から算出された半定量値を

比較したものをTable 3に示します。

添加血清の場合と同様、クロルプロマジンおよびプロメタジンについては、検量線から求めた定量値に比較的近い値が得られましたが、フェノバルビタールの半定量値は、3倍程度高い値を示しました。

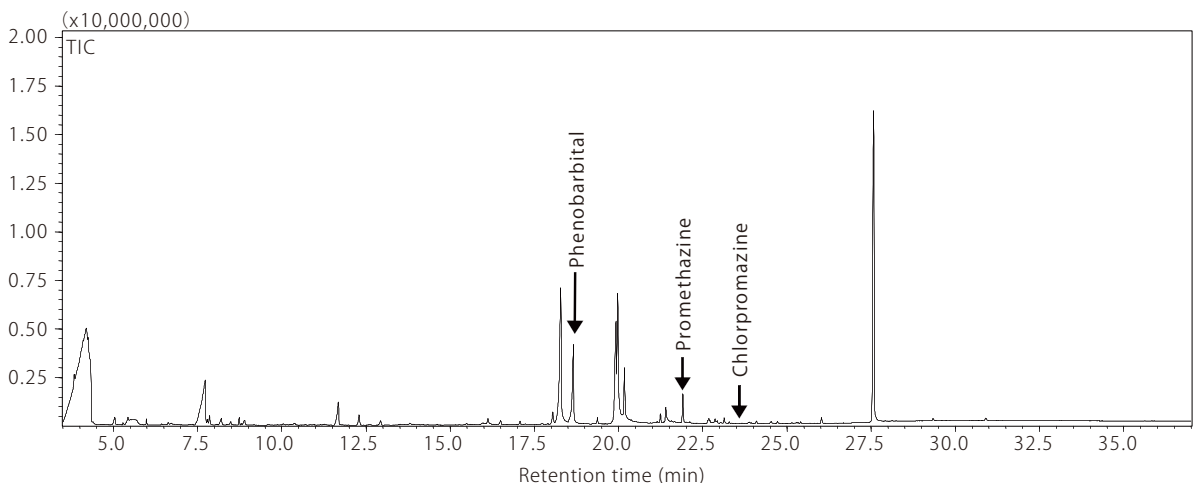


Fig. 4: 実試料より得られたトータルイオンカレントクロマトグラム

Table 3 実試料の定量値と半定量値の比較  
Comparison of semi-quantitated and quantitated results of real specimen

compounds	quantitation* ( $\mu\text{g/mL}$ )	semi-quantitation ( $\mu\text{g/mL}$ )
Phenobarbital	11.6	33.2
Chlorpromazine	0.03	0.02
Promethazine	0.13	0.15

\* 添加血清を用いて作成した検量線より求めた値。

## ▶ 結論

血清中向精神薬3成分（フェノバルビタール、クロルプロマジンおよびプロメタジン）について、「GC/MS法薬毒物データベース」による自動同定・半定量分析を行い、その結果について検証しました。今回の結果では、162成分の精神神経病用薬の情報が登録されたメソッドを使用し、AART機能による保持時間修正によって、フェノバルビタール、クロルプロマジンおよびプロメタジンの3成分が標準試料を利用することなく自動同定可能でした。また、半定量分析については、クロルプロマジンおよびプロメタジンについては、比較的良好的な結果が得られましたが、フェノバルビタールについては2～3倍程度高

い値を示す傾向がありました。本データベースの半定量機能より得られる半定量値は、最終試料中の濃度を概算するものであるため、分析前処理における薬物回収率や試料濃縮率の誤差、マトリックス効果や装置の状態などによっても、半定量値は大きく変動することを常に考慮に入れておく必要があります。しかし、本データベースを用いた自動半定量分析は、データベース自動検索と同時に実行することが可能ですので、定性分析と同時に薬物濃度を概算したい場合や、特に標準試料が直ぐに準備できない場合に、迅速におおまかな薬物濃度を把握するためには有用な方法であるといえます。

## ガスクロマトグラフ質量分析計 GCMS-QP2010 Ultra

GCMS-QP2010 Ultraの特長

1. 高感度
2. 保守メンテナンスが容易
3. 保持指標を用いた化合物同定が可能

弊社のGCMS-QP2010シリーズは法薬毒物分析に最適な機能と性能を有します。

1. GCMS-QP2010シリーズは非常に高感度で、法薬毒物が低濃度まで測定できる感度を有しています。
2. 尿や血液試料はきょう雑物を多く含みます。そのような試料をGC/MSで測定すると、イオン源の汚染が問題となります。



本データベースには、分析条件、マススペクトル、保持指標などを登録したメソッドファイルと、CAS番号などを含む化合物情報、マススペクトル、保持指標を含むライブラリ、ハンドブック(ライブラリ情報の印刷物)から構成されています。

メソッド/ライブラリには、乱用薬物 591、精神神経病用薬 274、その他医薬品 110、農業 36スペクトルが登録されています。



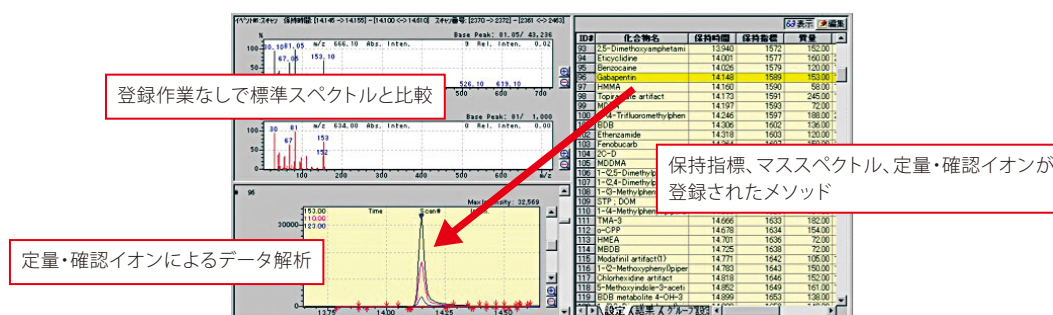
GCMS-QP2010シリーズは汚れにくく、しかもイオン源が汚染されても容易に洗浄できます。

3. 法薬毒物は標準試料の入手が困難ですが、GCMS-QP2010シリーズ用GC/MS法薬毒物データベースには、500以上の薬毒物の情報が最適な分析条件と共にメソッドファイルに登録されています。

### GC/MS法薬毒物データベース(乱用薬物・医薬品・農業)

「GC/MS法薬毒物データベース」は、ガスクロマトグラフ質量分析計GCMS-QP2010シリーズ ワークステーション GCMSsolution専用です。乱用薬物、精神神経病用薬、その他医薬品、農業など、法薬毒物分析で必要となる502の化合物について、それぞれのFree体、TMS体、TFA体を含めた1011種類のマススペクトルが登録されています。

本データベースを用いれば、保持指標を用いた保持時間自動修正(AART:Automatic adjustment of retention time)機能と、標準マススペクトルと比較、定量・確認イオンによるマスクロマトグラムから精度の高い同定が可能です。



・このデータ集は弊社が得た情報および内容のままにご提供するものであり、その正確性および特定の目的における有用性について保証するものではありません。弊社は、このデータ集の使用により直接的または間接的に生じたいかなる損害に対しても責任を負えないものであり、その使用により生じた結果および現象についてはお客様の責任とします。このデータ集の著作権は、株式会社島津製作所が所有しています。当社の許可なく内容の一部または全部を転載・複製することはできません。このデータ集の内容は将来予告なしに変更することがあります。このデータ集の内容は作成にあたり万全を期しておりますが、万一、誤りや記載もれなどが発見されても、ただちに修正できないことがあります。



分析計測事業部 <http://www.an.shimadzu.co.jp/>