

法医学および毒物学ワークフロー向け トリプル四重極 GC/MS 用法医学 MRM データベース



著者

Celine Gys¹,
Anna Klimowska^{1,2}, and
Adrian Covaci¹

¹ Toxicological Center,
University of Antwerp,
Universiteitsplein 1, Wilrijk,
2610, Belgium

² Department of Toxicology,
Medical University of Gdansk,
Al. Gen. Hallera 107, Gdansk,
80-416, Poland

Remko van Loon and
Anastasia Andrianova
Agilent Technologies, Inc.

概要

法医学ラボでは体系的な毒物分析が重要であり、堅牢で信頼性の高い分析メソッドが求められます。ガスクロマトグラフィーとトリプル四重極質量分析装置を組み合わせた手法（GC/TQ）は汎用性が高く、広く用いられています。この手法では機器やラボが異なっても一貫した結果が得られます。本研究の目的は、GC/MS が適し、毒物学に関連する化合物に利用できる、マルチプルリアクションモニタリング（MRM）トランジションのデータベースを確立することです。最終的な精査済みデータベースは 154 化合物、176 の登録からなり、トランジションは 1 化合物あたり最大 12 種類です。このデータベースを利用することで、GC が適する法医学および毒物学に関連する化合物のターゲットスクリーニングや確実な定量を行うことができるメソッドを短時間で作成できます。

データベースは本アプリケーションノートの付録 1 で CSV ファイルとしてダウンロードできます。

はじめに

法医学調査における体系的な毒物分析では、変化し続ける毒物の状況に継続的に適応する必要があります。主な 3 つの課題として、毒物の濃度の低さ、増え続ける監視・定量対象の成分数、標準物質の入手の制約があります。こうした多様性のため、メソッド開発は複雑になります。これまで、法医学ラボでは主にシングル四重極 GC/MS を利用して未知化合物の同定や定量を行ってきました。¹ 近年は、液体クロマトグラフィー (LC) が適する化合物に関しては、LC/MS、特に LC/TQ ワークフローによる分析がよく行われています。² 分析性能を最大化するため、トリプル四重極 LC/MS 用の Agilent 法中毒学 tMRM データベース³ が確立され、これによって時間やコストのかかる手動でのメソッド開発プロセスが効率化されています。

GC が適する揮発性および半揮発性化合物については、フルスキャン取り込みモードでの GC/MS が引き続き法医学薬物および毒物を分析する際に最適なメソッドとなります。^{4, 5} また、GC/MS による法中毒学のワークフローでは、GC/TQ による MRM アプローチで高い選択性と感度が実現し、大きなメリットがあります。このため、本研究では、毒物研究者がスクリーニングおよび定量メソッドを作成する際のメソッド開発の簡便化に役立つ MRM データベースの開発を目指します。

関連する毒物の MRM トランジションのデータベースを確立し実際のサンプル分析に用いる GC/TQ メソッドの作成に適用したところ、正常に使用でき、従来の GC/MS アプローチよりも高い感度と信頼性を得られました。

実験方法

GC/TQ 分析

Agilent 7000 シリーズトリプル四重極 GC/MS (GC/TQ) を用いて、154 化合物の 176 の MRM トランジションを開発し、未誘導化体、トリメチルシリル誘導化体およびアセチル誘導化体を分析しました。GC/TQ 用 Agilent MassHunter Optimizer ソフトウェア (MassHunter データ取り込みソフトウェア、バージョン 10.0 以上で利用可能) を使用して、1,803 種類の MRM トランジションを開発しました。

Agilent J&W DB-5ms キャピラリカラム、30 m × 0.25 mm、0.25 μm (部品番号 122-5532) を使用し、リテンションタイムをコカインに合わせて 12.26 分間でロックするメソッドで、クロマトグラフィーによる分離を実現しました。本物の死後検体の毒物の同定をフルスキャンと MRM 取り込みで行い、比較しました。機器の操作パラメータを表 1 に示します。

表 1. 法中毒学分析の GC および MS および条件

パラメータ	設定値
注入口	マルチモード MMI 注入口
モード	バルブスプリットレス
注入バルス圧力	25 psi、1.5 分まで
スプリットベントへのバージ流量	1.5 分で 50 mL/min
注入量	2 μL
注入口温度	275 °C
注入口ライナ	Agilent ウルトライナート、スプリットレス、ダブルテーパ (部品番号 5190-4007)
カラム	Agilent J&W DB-5ms、30 m × 0.25 mm、0.25 μm (部品番号 122-5532)
カラム温度プログラム	80 °C (1 分間保持) 20 °C/min で 290 °C まで昇温 (8 分間保持) 分析時間 19.5 分
キャリアガスと流量	ヘリウム、1.027 mL/min 定流量 コカインに合わせて 12.26 分でリテンションタイムロック
トランスファーライン温度	300 °C
トリプル四重極質量分析計	Agilent 7000 シリーズ GC/TQ とエクストラクタ EI イオン源
イオン化エネルギー	70 eV
クエンチガスヘリウム	2.25 mL/min
コリジョンガス窒素	1.5 mL/min
イオン源温度	230 °C
四重極温度	150 °C
EM 電圧ゲインモード	15
モード	dMRM MRM トランジション開発時： スキャン (m/z 100 ~ 450)、プロダクトイオンスキャン、MRM
チューニング	atunes.eiex.tune.xml

データベースの精査

MassHunter Optimizer ソフトウェアでは、MRM トランジションの開発および最適化において、以下のようなワークフローを活用できます。^{6, 7}

- スキャンデータから開始
- SIM イオンから開始
- MRM から開始

データベースの開発では、[スキャンデータから開始] ワークフローを使用しました。このワークフローでは開発プロセス全体に対応できます。開始する GC 取り込みメソッドは、毒物の GC 分析で成果を上げられるよう、最適化したものを用いました。[スキャンデータから開始] のワークフローによって、MS がフルスキャンモードで動作して、化合物の同定とブリッカーサイオンの選択に使用するスキャンデータファイルを取得し、100 ms のスキャン時間で m/z 100 ~ 450 の範囲でスキャンを実行しました。

[スキャンデータから開始] のワークフローでは、次のステップを連続して実行します。

1. ターゲット化合物を同定するためのフルスキャンデータの取り込みまたはインポート
2. プリカーサイオンの同定
3. プロダクトイオンの同定
4. コリジョンエネルギーの最適化

まず、Agilent MassHunter Unknowns Analysis ソフトウェアを使用して、薬物、毒物、農薬、汚染物質、それぞれの代謝物のマススペクトルライブラリに対する検索を実行して、ターゲット化合物を同定しました。⁸ 同定された化合物のデコンボリュートしたスペクトルを MassHunter ライブラリエディタにエクスポートして、176 種類のターゲット項目から成るスペクトルライブラリを作成しました。

次に、GC/TQ 用 MassHunter Optimizer で MRM を開発しました。先ほど説明したとおり、最初に MassHunter ライブラリエディタで作成したスペクトルライブラリに対するデコンボリュートしたスペクトルのライブラリ検索を行い、成分の同定を行いました。これによって、カラムのブリード、共溶出する成分やマトリックスに起因する干渉など、クロマトグラフィー上の干渉がある場合であっても、対象成分の正確な同定が可能になり、プリカーサイオンを高い信頼性で選択することができました。

次に MassHunter Optimizer で、プリカーサイオンの同定、プロダクトイオンの同定、コリジョンエネルギーの最適化の 3 つの MRM 開発ステップを実行しました。これらのステップは、高度に自動化してユーザーによる操作なしで行うことができます。また、本研究で行ったように、次のステップに進む前に各ステップの結果を確認することも可能です。

MRM の開発とコリジョンエネルギーの最適化が完了した後、最終的な 1,803 種類の MRM トランジションを CSV ファイルとしてエクスポートしました。

データベースの使用法

本研究で作成されたデータベースを使用することで、Agilent GC/TQ を用いた dMRM データ取り込みメソッドを簡単に作成できます。後述のとおり、GC/TQ 用 MassHunter Optimizer を使用してメソッドの作成プロセスを簡素化できます。MassHunter Optimizer は、MassHunter GC/MS データ取り込みのバージョン 10.0 以上で自動インストールされます。データベースを CSV ファイルとしてダウンロードし、コンピュータに保存する必要があります。

次のような簡単な手順で、データベースを用いたデータ取り込みメソッドを作成できます。

1. MassHunter データ取り込みソフトウェアで、表 1 に示す条件を使用し、リテンションタイムをコカインに合わせて 12.26 分間でロックする GC/MS データ取り込みメソッドを作成し、保存します。コカイン標準を使用できない場合は、データベースに含まれる他の化合物のリテンションタイムに合わせてロックするメソッドでかまいません。
2. MassHunter Optimizer の **設定** で手順 1 で作成した取り込みメソッドを指定し、GC パラメータは維持します (図 1)。
3. **設定** の [化合物情報のインポート] セクションで **CSV ファイル** をクリックして、データベースを指定します (図 1)。

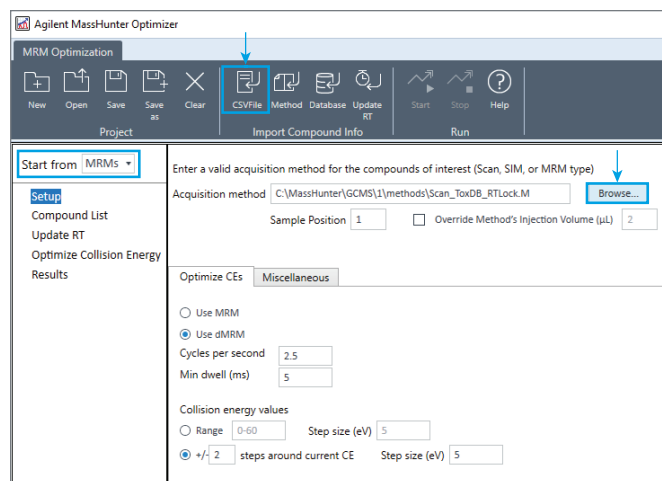


図 1. GC/TQ 用 Agilent MassHunter Optimizer の設定ウィンドウ

4. 化合物情報のインポートが完了すると、図 2 に示すように、化合物リストタブに 176 種類の項目がすべて表示されます。デフォルトでは、すべての化合物にチェックが付きます。

Agilent MassHunter Optimizer

MRM Optimization

Project: [New] [Open] [Save] [Save as] [Clear] [CSV File] [Method] [Database] [Update RT] [Start] [Stop] [Help]

Start from: MRM's

Setup

Compound List ←

Update RT

Optimize Collision Energy

Results

Compound Table

Highlighted compound(s) are separated less than specified limit. Unselect compound(s) or see Setup Miscellaneous for more options.

	<input checked="" type="checkbox"/>	Compound Name	RT (min)	CAS #	Formula	Molecular Weight	Left RT Delta (min)	Right RT delta (min)	Sample Position	Injection Volume (µL)	Peak Area
1	<input checked="" type="checkbox"/>	Valproic acid, TMS	5.605	997259-55-1	C11H24O2Si	216	0.10	0.23	1	2	
2	<input checked="" type="checkbox"/>	p-Methoxyamphetamine	7.475	23239-32-9	C10H15NO	165.12	0.15	0.34	1	2	
3	<input checked="" type="checkbox"/>	Mephedrone	7.983	1189805-46-6	C11H15NO	177	0.19	0.41	1	2	
4	<input checked="" type="checkbox"/>	EME	8.251	23693-34-7	C10H17NO3	199	0.14	0.26	1	2	
5	<input checked="" type="checkbox"/>	4-Methoxyamphetamine TMS	8.438	910022-08-1	C13H23NO5i	237.42	0.11	0.21	1	2	
6	<input checked="" type="checkbox"/>	MDMA	8.525	910029-62-8	C11H15NO2	193.25	0.19	0.31	1	2	
7	<input checked="" type="checkbox"/>	Pseudoephedrine, 2TMS derivative	8.531	54965-14-9	C16H31NO5i2	309	0.14	0.14	1	2	
8	<input checked="" type="checkbox"/>	Paracetamol 2TMS	8.906	55530-61-5	C14H25NO2Si2	295	0.19	0.32	1	2	
9	<input checked="" type="checkbox"/>	Ibuprofen TMS P770	8.923	996004-55-4	C16H26O2Si	278.17	0.27	0.34	1	2	
10	<input checked="" type="checkbox"/>	Bupropion P552	8.932	34911-55-2	C13H18ClNO	239.11	0.15	0.27	1	2	
11	<input checked="" type="checkbox"/>	Ibuprofen	8.961	15687-27-1	C13H18O2	206.29	0.44	0.55	1	2	
12	<input checked="" type="checkbox"/>	PMMA, N-trimethylsilyl-	8.968	997385-63-5	C14H25NO5i	251	0.10	0.10	1	2	
13	<input checked="" type="checkbox"/>	Mephedrone TMS	9.070	996008-32-7	C14H23NO5i	249	0.14	0.24	1	2	
14	<input checked="" type="checkbox"/>	Acetaminophen	9.331	103-90-2	C8H9NO2	151.17	0.20	0.37	1	2	
15	<input checked="" type="checkbox"/>	(+/-)-MDMA, N-trimethylsilyl-	9.544	997435-46-1	C14H23NO2Si	265	0.11	0.22	1	2	
16	<input checked="" type="checkbox"/>	Paracetamol TMS	9.640	41571-82-8	C11H17NO2Si	223.35	0.12	0.28	1	2	
17	<input checked="" type="checkbox"/>	Amobarbital	9.642	57-43-2	C11H18N2O3	226	0.14	0.25	1	2	
18	<input checked="" type="checkbox"/>	Pentobarbital	9.826	76-74-4	C11H18N2O3	226	0.32	0.29	1	2	
19	<input checked="" type="checkbox"/>	Pethidine	9.831	57-42-1	C15H21NO2	247.34	0.14	0.24	1	2	
20	<input checked="" type="checkbox"/>	1-(3-Chlorophenyl)piperazine	9.847	6640-24-0	C10H13ClN2	196.68	0.16	0.20	1	2	
21	<input checked="" type="checkbox"/>	Paracetamol AC	9.875	996000-18-8	C10H11NO3	193	0.20	0.54	1	2	
22	<input checked="" type="checkbox"/>	Ketamine TMS	9.938	996004-55-6	C16H24ClNO5i	309.13	0.10	0.19	1	2	
23	<input checked="" type="checkbox"/>	Secobarbital	10.079	76-73-3	C12H18N2O3	238	0.17	0.31	1	2	
24	<input checked="" type="checkbox"/>	2C-B	10.080	66142-81-2	C10H14BrNO2	259.02	0.11	0.10	1	2	
25	<input checked="" type="checkbox"/>	Pheniramine	10.182	86-21-5	C16H20N2	240.35	0.12	0.17	1	2	
26	<input checked="" type="checkbox"/>	Secobarbital 2TMS P1367	10.201	52937-71-0	C18H34N2O3Si2	382.21	0.13	0.24	1	2	
27	<input checked="" type="checkbox"/>	Norfluoxetine	10.292	130194-43-3	C16H16F3NO	295.3	0.10	0.17	1	2	
28	<input checked="" type="checkbox"/>	Bupropion-M (HO-) P632	10.318	996007-66-0	C13H18ClNO2	255.1	0.15	0.14	1	2	
29	<input checked="" type="checkbox"/>	Norketamine	10.345	65452-72-4	C12H14ClNO	223.7	0.15	0.25	1	2	
30	<input checked="" type="checkbox"/>	Caffeine	10.368	58-08-2	C8H10N4O2	194.08	0.29	0.22	1	2	
31	<input checked="" type="checkbox"/>	Fluoxetine	10.388	54910-89-3	C17H18F3NO	309.33	0.12	0.16	1	2	
32	<input checked="" type="checkbox"/>	Fluoxamine	10.435	54739-18-3	C15H21F3N2O2	318.34	0.10	0.13	1	2	
33	<input checked="" type="checkbox"/>	Diphenhydramine P634	10.453	58-73-1	C17H21NO	255.16	0.14	0.24	1	2	
34	<input checked="" type="checkbox"/>	Ketamine	10.505	6740-88-1	C13H16ClNO	237	0.14	0.17	1	2	
170	<input checked="" type="checkbox"/>	Hydroxyzine	18.026	68-88-2	C21H27ClN2O2	374.18	0.24	0.48	1	2	
171	<input checked="" type="checkbox"/>	Clozapine	18.310	5786-21-0	C18H19ClN4	326.83	0.59	0.42	1	2	
172	<input checked="" type="checkbox"/>	Hydroxyzine, TMS derivative	18.863	959101-75-8	C24H35ClN2O2Si	446	0.26	0.28	1	2	
173	<input checked="" type="checkbox"/>	Alfentanil	19.009	71195-58-9	C21H32N6O3	416.52	0.26	0.59	1	2	
174	<input checked="" type="checkbox"/>	Clozapine-M (Nor)	19.054	910008-51-4	C17H17ClN4	312.8	0.30	0.69	1	2	
175	<input checked="" type="checkbox"/>	Naltrexone 2AC P1520	19.184	996004-31-1	C24H27NO6	425.18	0.27	0.39	1	2	
176	<input checked="" type="checkbox"/>	Alprazolam	19.296	28981-97-7	C17H13ClN4	308.77	0.26	0.60	1	2	

Show full names

図 2. データベースからインポートされた化合物が表示されている GC/TQ 用 Agilent MassHunter Optimizer の化合物テーブルウィンドウ

5. 次に、化合物テーブルで、取り込みメソッドに含める化合物のみチェックを残す必要があります。ターゲット化合物のみにチェックを残すには、化合物テーブルの上部にあるチェックボックス（図2の青色矢印の先）をダブルクリックしてすべての化合物の選択を解除し、取り込みメソッドに含める必要がある化合物を1つずつ選択するのが最も時間がかかりません。化合物テーブルの**化合物名**の表見出しをクリックすると、テーブルをアルファベット順にソートできます。

図3は化合物テーブルの例で、ターゲットがアルファベット順にソートされ、フェンタニル群の化合物のみが選択されています。

6. 異なる GC カラムの構成やオープンプログラムを使用するためにリテンションタイムを更新する必要がある場合や、開始する GC メソッドでリテンションタイムがロックされていない場合は、**RT の更新**をクリックします。MassHunter Optimizer で、ターゲット化合物を含むサンプルの分析を実行するように促すプロンプトが表示され、リテンションタイムが自動的に更新されます。

	<input type="checkbox"/>	Compound Name	RT (min)	CAS #	Formula	Molecular Weight	Left RT Delta (min)	Right RT delta (min)	Sample Position	Injection Volume (µL)	Peak #
1	<input type="checkbox"/>	(+/-)-MDMA, N-trimethylsilyl-	9.544	997435-46-1	C14H23NO2Si	265	0.11	0.22	1	2	
2	<input type="checkbox"/>	1-(3-Chlorophenyl)piperazine	9.847	6640-24-0	C10H13ClN2	196.68	0.16	0.20	1	2	
3	<input type="checkbox"/>	11-Hydroxy-DELTA-9-tetrahydrocannabinol, bis(trimethylsilyl) ether	14.448	997929-56-4	C27H46O3Si2	474	0.11	0.14	1	2	
4	<input type="checkbox"/>	11-Nor-delta-9-tetrahydrocannabinol carboxylic acid 2TMS	15.713	910035-82-4	C27H44O4Si2	488.82	0.15	0.18	1	2	
5	<input type="checkbox"/>	2C-B	10.080	66142-81-2	C10H14BrNO2	259.02	0.11	0.10	1	2	
6	<input type="checkbox"/>	2C-B TMS P1098	10.742	996006-92-5	C13H22BrNO2Si	331.06	0.13	0.17	1	2	
7	<input checked="" type="checkbox"/>	4-Fluoroisobutyrylfentanyl II	15.452	910264-33-4	C23H29FN2O	368.49	0.14	0.15	1	2	
8	<input type="checkbox"/>	4-Methoxyamphetamine TMS	8.438	910022-08-1	C13H23NOSi	237.42	0.11	0.21	1	2	
9	<input type="checkbox"/>	6-Monoacetylmorphine	14.357	2784-73-8	C19H21NO4	327.38	0.17	0.35	1	2	
10	<input type="checkbox"/>	6-Monoacetylmorphine TMS	14.466	910138-32-8	C22H29NO4Si	399.56	0.18	0.31	1	2	
11	<input type="checkbox"/>	Acetaminophen	9.331	103-90-2	C8H9NO2	151.17	0.20	0.37	1	2	
12	<input type="checkbox"/>	Acetylcodeine	14.194	6703-27-1	C20H23NO4	341.41	0.16	0.20	1	2	
13	<input type="checkbox"/>	Acetyldihydrocodeine	13.989	3861-72-1	C20H25NO4	343.42	0.16	0.27	1	2	
14	<input checked="" type="checkbox"/>	Acetylfentanyl	15.542	3258-84-2	C21H26N2O	322.45	0.19	0.31	1	2	
15	<input type="checkbox"/>	Agomelatine P568	12.448	138112-76-2	C15H17NO2	243.13	0.27	0.30	1	2	
16	<input type="checkbox"/>	AH-7921	14.830	55154-30-8	C16H22Cl2N2O	328	0.20	0.36	1	2	
17	<input checked="" type="checkbox"/>	Alfentanil	19.009	71195-58-9	C21H32N6O3	416.52	0.26	0.59	1	2	

図3.フェンタニル群のターゲットが選択されている化合物テーブル。

7. 次に [結果] タブで、メソッドに含まれる MRM トランジションの最終的なリストを確認できます。デフォルトでは、化合物で利用可能な MRM トランジションがすべて選択されます。ただし、データベースの一部のターゲットでは、MRM トランジションが 12 種類まで登録されています。このため、ターゲットのトランジションの選択を一部解除して、最終的なメソッドの 1 化合物あたりの MRM の数を制限したほうがよい場合があります。選択した化合物の MRM トランジションを確認するには、その化合物が先頭になるようにテーブルをソートするのが最も簡単です。[結果] テーブルの上部にあるグレーの四角 (図 4 の青色矢印の先) をダブルクリックすると、選択した化合物が

先頭になるようにリストがソートされます。そして、必要に応じて一部の MRM トランジションの選択を解除できます。図 4 の例では、化合物ごとに最もアバンドンスが高い 4 つの MRM トランジション以外は選択が解除されています。% 列は、レスポンスが最も高い MRM に対する各 MRM の相対アバンドンスを示しています。

最後に、図 4 の [結果] ウィンドウで dMRM の左右の範囲を指定できます。最初はデフォルト値の 0.2 分が適しています。

Start from	MRMs	Optimized MRM Transitions										
Setup Compound List Update RT Optimize Collision Energy Results		Select number of top ranked transitions: All Left RT Delta (min): 0.20 Right RT delta (min): 0.20 Overwrite RT Delta										
		<input type="checkbox"/> Nested View										
		Compound Name	RT (min)	Precursor Ion	MS1 Resolution	Product Ion	MS2 Resolution	CE	Dwell time	Abundance	%	CAS #
<input checked="" type="checkbox"/>	583	Norcarfentanil	11.916	140.9	Unit	126.1	Unit	9	6		1.00	61085-87-8
<input checked="" type="checkbox"/>	584	Norcarfentanil	11.916	140.9	Unit	80	Unit	29	6		0.66	61085-87-8
<input checked="" type="checkbox"/>	585	Norcarfentanil	11.916	125.9	Unit	80	Unit	19	6		0.59	61085-87-8
<input checked="" type="checkbox"/>	586	Norcarfentanil	11.916	140.9	Unit	52.9	Unit	41	6		0.26	61085-87-8
<input type="checkbox"/>	587	Norcarfentanil	11.916	125.9	Unit	53.1	Unit	31	6		0.25	61085-87-8
<input type="checkbox"/>	588	Norcarfentanil	11.916	177.8	Unit	118.1	Unit	11	6		0.22	61085-87-8
<input type="checkbox"/>	589	Norcarfentanil	11.916	177.8	Unit	77.1	Unit	37	6		0.16	61085-87-8
<input type="checkbox"/>	590	Norcarfentanil	11.916	125.9	Unit	107.9	Unit	11	6		0.16	61085-87-8
<input type="checkbox"/>	591	Norcarfentanil	11.916	177.8	Unit	91	Unit	31	6		0.03	61085-87-8
<input type="checkbox"/>	592	Norcarfentanil	11.916	212.8	Unit	177.8	Unit	21	6		0.01	61085-87-8
<input type="checkbox"/>	593	Norcarfentanil	11.916	212.8	Unit	150.8	Unit	29	6		0.01	61085-87-8
<input type="checkbox"/>	594	Norcarfentanil	11.916	212.8	Unit	141.8	Unit	41	6		0.00	61085-87-8
<input checked="" type="checkbox"/>	914	Norfentanyl, N-acetyl-	13.209	231	Unit	158.1	Unit	9	6		1.00	997469-16-3
<input checked="" type="checkbox"/>	915	Norfentanyl, N-acetyl-	13.209	132	Unit	117.1	Unit	17	6		0.37	997469-16-3
<input checked="" type="checkbox"/>	916	Norfentanyl, N-acetyl-	13.209	132	Unit	76.9	Unit	29	6		0.29	997469-16-3
<input checked="" type="checkbox"/>	917	Norfentanyl, N-acetyl-	13.209	132	Unit	51	Unit	39	6		0.20	997469-16-3
<input type="checkbox"/>	918	Norfentanyl, N-acetyl-	13.209	158	Unit	115	Unit	35	6		0.19	997469-16-3
<input type="checkbox"/>	919	Norfentanyl, N-acetyl-	13.209	158	Unit	143.1	Unit	21	6		0.15	997469-16-3
<input type="checkbox"/>	920	Norfentanyl, N-acetyl-	13.209	158	Unit	91	Unit	29	6		0.13	997469-16-3
<input type="checkbox"/>	921	Norfentanyl, N-acetyl-	13.209	231	Unit	91	Unit	39	6		0.10	997469-16-3
<input type="checkbox"/>	922	Norfentanyl, N-acetyl-	13.209	231	Unit	141.1	Unit	37	6		0.07	997469-16-3
<input type="checkbox"/>	923	Norfentanyl, N-acetyl-	13.209	274	Unit	158	Unit	13	6		0.05	997469-16-3
<input type="checkbox"/>	924	Norfentanyl, N-acetyl-	13.209	274	Unit	217.3	Unit	3	6		0.04	997469-16-3
<input type="checkbox"/>	925	Norfentanyl, N-acetyl-	13.209	274	Unit	132	Unit	23	6		0.03	997469-16-3
<input checked="" type="checkbox"/>	1111	Despropionylfentanyl	13.809	188.8	Unit	146.1	Unit	9	6		1.00	39742-60-4
<input checked="" type="checkbox"/>	1112	Despropionylfentanyl	13.809	145.8	Unit	131.1	Unit	15	6		0.69	39742-60-4
<input checked="" type="checkbox"/>	1113	Despropionylfentanyl	13.809	145.8	Unit	77.1	Unit	39	6		0.63	39742-60-4
<input checked="" type="checkbox"/>	1114	Despropionylfentanyl	13.809	188.8	Unit	44.1	Unit	23	6		0.60	39742-60-4
<input type="checkbox"/>	1115	Despropionylfentanyl	13.809	145.8	Unit	118	Unit	13	6		0.31	39742-60-4
<input type="checkbox"/>	1116	Despropionylfentanyl	13.809	117.9	Unit	91	Unit	13	6		0.22	39742-60-4

図 4. MRM トランジションを示す [結果] テーブル。選択されたトランジションが最終的なデータ取り込みメソッドに含まれます。

8. [結果] テーブルの上部にある**メソッドの作成**アイコンをクリックすると、データ取り込みメソッドの保存を促すポップアップウィンドウ (図 5) が表示されます。

開発した MRM 取り込みメソッドは、タイムセグメント MRM メソッドまたは dMRM メソッドとして保存できます。メソッドの保存時に、最少ドwellタイムと 1 秒あたりのサイクル数を定義できます。

また、開発したトランジションを CSV ファイルとしてエクスポートし、MassHunter データ取り込みソフトウェアで既存の GC/MS データ取り込みメソッドにインポートできます。

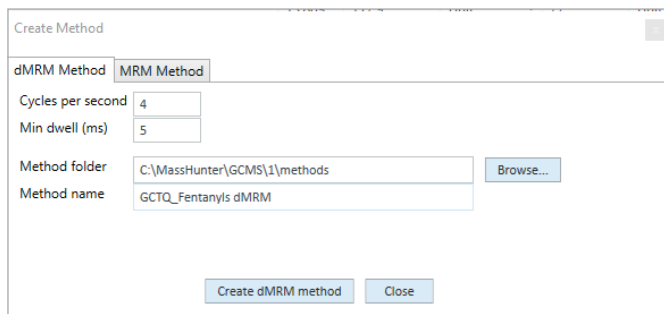


図 5. GC/TQ 用 Agilent MassHunter Optimizer によるメソッドの作成

9. メソッドは、保存した後に MassHunter データ取り込みソフトウェアで開いて確認できます。図 6 は、データベースを使用して作成された、化合物あたり 4 つのトランジションからなる 15 種類のフェンタニルの、メソッドを示しています。これで取り込みメソッドの使用準備が完了しました。

なお、Agilent 7000 GC/TQ モデル E 以上または 7010 GC/TQ モデル C 以上を使用する場合は、dMRM メソッドでフルスキャンデータを同時に測定することができます。このモードを有効にするには、[フルスキャンパラメータ] の横の **Enable (有効)** を選択します (図 6)。このデータ取り込みモードを使用すると、MRM トランジションに加えてフルスキャンデータを測定できます。レトロスペクティブ分析や MS スペクトルによる追加の化合物の同定が可能になり、マトリックス成分やイオン源への負荷を把握できます。

Enable	Compound Name	CAS#	ISTD	Precursor Ion	MS1 Resolution	Product Ion	MS2 Resolution	RT (min)	Left RT Delta (min)	Right RT Delta (min)	Average Dwell (ms)	CE (eV)	Response Level	Relative Intensity
<input checked="" type="checkbox"/>	Norcarfentaniil	140.9	Unit	126.07	Unit	11.92	0.20	0.28	61.7	9	High	1		
<input checked="" type="checkbox"/>	Norcarfentaniil	140.9	Unit	80	Unit	11.92	0.20	0.28	61.7	29	High	0.66		
<input checked="" type="checkbox"/>	Norcarfentaniil	140.9	Unit	52.93	Unit	11.92	0.20	0.28	61.7	41	Low	0.26		
<input checked="" type="checkbox"/>	Norcarfentaniil	125.9	Unit	80	Unit	11.92	0.20	0.28	61.7	19	Medium	0.59		
<input checked="" type="checkbox"/>	Norfentanyl, N-acetyl-	231	Unit	158.1	Unit	13.21	0.17	0.35	61.6	9	High	1		
<input checked="" type="checkbox"/>	Norfentanyl, N-acetyl-	132	Unit	117.1	Unit	13.21	0.17	0.35	61.6	17	Medium	0.37		
<input checked="" type="checkbox"/>	Norfentanyl, N-acetyl-	132	Unit	76.9	Unit	13.21	0.17	0.35	61.6	29	Low	0.29		
<input checked="" type="checkbox"/>	Norfentanyl, N-acetyl-	132	Unit	51.03	Unit	13.21	0.17	0.35	61.6	39	Low	0.2		
<input checked="" type="checkbox"/>	Despropionifentaniil	188.8	Unit	146.1	Unit	13.81	0.16	0.31	61.6	9	High	1		
<input checked="" type="checkbox"/>	Despropionifentaniil	188.8	Unit	44.1	Unit	13.81	0.16	0.31	61.6	23	High	0.6		
<input checked="" type="checkbox"/>	Despropionifentaniil	145.8	Unit	131.07	Unit	13.81	0.16	0.31	61.6	15	High	0.69		
<input checked="" type="checkbox"/>	Despropionifentaniil	145.8	Unit	77.07	Unit	13.81	0.16	0.31	61.6	39	High	0.63		
<input checked="" type="checkbox"/>	Remifentaniil	226.0	Unit	212.1	Unit	14.39	0.18	0.32	61.7	9	High	0.9		
<input checked="" type="checkbox"/>	Remifentaniil	167.8	Unit	94.1	Unit	14.39	0.18	0.32	61.7	15	High	1		
<input checked="" type="checkbox"/>	Remifentaniil	167.8	Unit	67.07	Unit	14.39	0.18	0.32	61.7	15	Medium	0.32		
<input checked="" type="checkbox"/>	Remifentaniil	167.8	Unit	59.03	Unit	14.39	0.18	0.32	61.7	25	Medium	0.4		

図 6. データベースから作成されたメソッドの dMRM テーブルを示す Agilent MassHunter GC/MS データ取り込みソフトウェアのトリプル四重極 MS メソッド編集画面

結果と考察

GC/TQ 法医学用データベース

データベースは本アプリケーションノートの付録 1 で CSV ファイルとしてダウンロードできます。

本研究で作成されたデータベースには全部で 176 項目の登録があり、154 化合物が含まれています。そのうち 124 項目は誘導体化されておらず、32 項目がトリメチルシリル化、20 項目がアセチル化されています (図 7)。該当する化合物はベンゾジアゼピン、抗うつ剤、オピオイド、乱用薬物などです。データベース項目の詳細な一覧は付録 2 のとおりです。

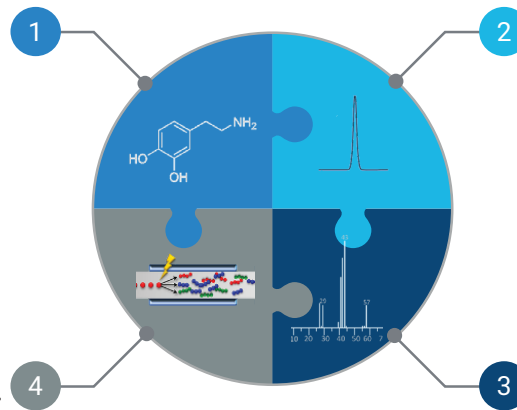
実際のサンプルへのデータベースの適用

合計 176 項目

- 154 化合物：
 - 124 の未誘導体化
 - 32 のトリメチルシリル誘導体化
 - 20 のアセチル誘導体化

1,803 の MRM トランジション

- 1 化合物あたり 3~12 のトランジション
- 最適化されたコリジョンエネルギー



すべての項目のリテンションタイム

- コカインに合わせたリテンションタイムロック
- 新しいカラムや機器のリテンションタイムをデータベースで提供されるものと一致させることができる

相対イオンアバンドンス

- 追加確認および最適なドウェルタイム分布のため

図 7. 法医学用データベースに含まれる項目と情報の概要

Example: fentanyl

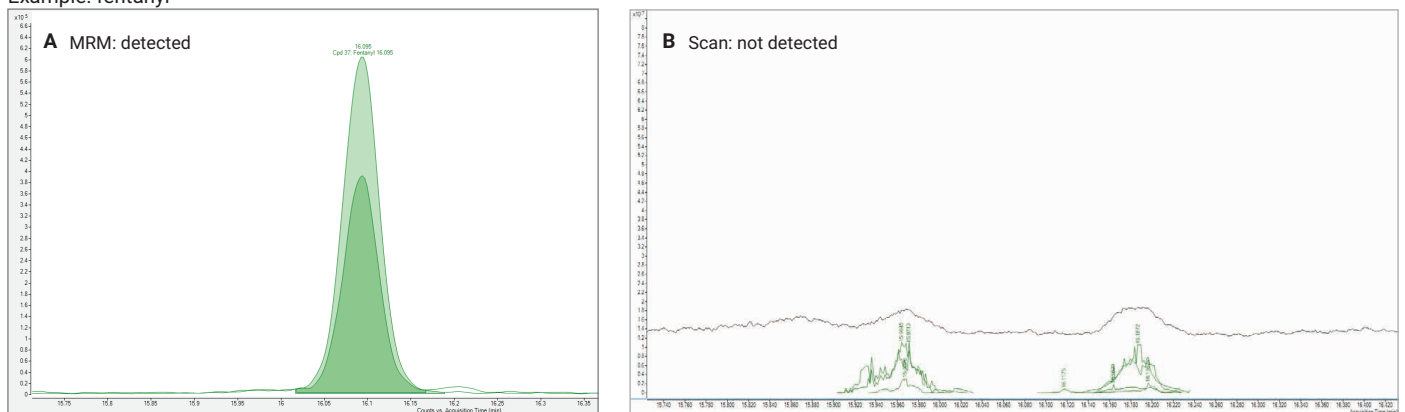


図 8. アーカイブされた死後血液サンプル中のフェンタニル。MRM GC/TQ データ取り込みモードでは検出されたが (A)、フルスキャンデータのスペクトルデータのデコンボリューションアプローチでは検出されなかった (B)

結論

176 種類の毒物学に関連する化合物について、精査済みの 1,803 の MRM トランジションを含む法中毒学用データベースを開発できました。該当する化合物はベンゾジアゼピン、抗うつ剤、オピオイド、乱用薬物などです。この MRM メソッドを実際のサンプルに適用した結果、MS/MS アプローチの高い感度と選択性によって、微量濃度の毒物を検出および定量できることが示されました。このアプローチを利用することで、フルスキャンデータ取り込みモードのみを利用した場合の制約に対応できます。

開発した MRM データベースを利用することでデータ取り込みメソッドの作成が簡素化され、法医学ラボにおけるスクリーニングと定量メソッドの開発に貴重なリソースを充てることができます。開発した MRM 精査ワークフローは、継続的な拡張に対応でき、データベースに新たな化学物質を追加する際の統一かつ実践的なアプローチになります。

付録 1

こちらで CSV ファイル形式のデータベースをダウンロードできます。

このデータベースを使用したデータ取り込みメソッドの作成方法の簡単な手順については、本アプリケーションノートの「データベースの使用法」セクションをご覧ください。

付録 2

法医学用データベースに含まれるターゲットの詳細な一覧です。用語は MPW データベースに従っています。⁸

表 A1. 法医学用データベースに含まれるターゲットの一覧

化合物名	CAS 番号	RT
バルプロ酸 TMS	997259-55-1	5.605
p-メトキシアンフェタミン	23239-32-9	7.475
メフェドロン	1189805-46-6	7.983
EME	23693-34-7	8.251
4-メトキシアンフェタミン TMS	910022-08-1	8.438
MDMA	910029-62-8	8.525
偽エフェドリン、2TMS 誘導体	54965-14-9	8.531
パラセタモール 2TMS	55530-61-5	8.906
イブプロフェン TMS P770	996004-55-4	8.923
ブプロピオン P552	34911-55-2	8.932
イブプロフェン	15687-27-1	8.961
PMMA、N-トリメチルシリル-	997385-63-5	8.968
メフェドロン TMS	996008-32-7	9.070
アセトアミノフェン	103-90-2	9.331
(+/-)-MDMA、N-トリメチルシリル-	997435-46-1	9.544
パラセタモール TMS	41571-82-8	9.640
アモバルビタール	57-43-2	9.642

化合物名	CAS 番号	RT
ベントバルビタール	76-74-4	9.826
ベチジン	57-42-1	9.831
1-(3-クロロフェニル)ピペラジン	6640-24-0	9.847
パラセタモール AC	996000-18-8	9.875
ケタミン TMS	996004-55-6	9.938
セコバルビタール	76-73-3	10.079
2C-B	66142-81-2	10.080
フェニラミン	86-21-5	10.182
セコバルビタール 2TMS P1367	52937-71-0	10.201
ノルフルオキサセチン	130194-43-3	10.292
ブプロピオン-M (HO-) P632	996007-66-0	10.318
ノルケタミン	65452-72-4	10.345
カフェイン	58-08-2	10.368
フルオキサセチン	54910-89-3	10.388
フルボキサミン	54739-18-3	10.435
ジフェンヒドラミン P634	58-73-1	10.453
ケタミン	6740-88-1	10.505
チオベンタール P565	76-75-5	10.508
ブラロバルビタール P812	561-86-4	10.553
2C-B TMS P1098	996006-92-5	10.742
N-アセチル-3, 4-メチレンジオキシメタンフェタミン	181765-92-4	10.864
フェノバルビタール 2TMS	910187-11-0	10.944
トラマドール	27203-92-5	10.977
シクロバルビタール 2TMS P1358	996005-49-6	11.020
MDEA AC P597	996003-27-1	11.066
フェノバルビタール	50-06-6	11.094
シクロバルビタール	52-31-3	11.136
ケタミン-M (ノル-) AC P685	996007-82-6	11.180
レバミゾール	14769-73-4	11.185
トラマドール-M (HO-) -H2O P666	996006-75-6	11.201
クロルフェニラミン	132-22-9	11.236
メトプロロール	37350-58-6	11.320
メトプロロール TMS	910252-91-4	11.330
O-デスマチル-トラマドール	80456-81-1	11.364
メサドン-M (EDDP) P764	996000-24-2	11.370
ナプロキセン TMS	74793-83-2	11.438
ナプロキセン	22204-53-1	11.564
ヘロイン	561-27-3	11.600
ベンラファキシン	93413-69-5	11.625
フルコナゾール P943	86386-73-4	11.802
プロパノール、TMS 誘導体	959081-18-6	11.864
メサドン	76-99-3	11.879
ノルカルフェンタニル	61085-87-8	11.916
プロプラノロール	525-66-6	11.999
デキストロメトルファン	125-71-3	12.025
ノルコカイン	18717-72-1	12.093
ベンラファキシン-M (O-デスマチル)	910048-23-6	12.111
カンナビジオール 2TMS	910233-55-5	12.148

化合物名	CAS 番号	RT
ケタミン AC	910019-83-9	12.178
アミトリプチリン	50-48-6	12.241
コカイン	478-73-9	12.262
トリミプラミン	739-71-9	12.327
イミプラミン	50-49-7	12.399
フルコナゾール、トリメチルシリルエーテル	166173-18-8	12.434
アゴメラチン P568	138112-76-2	12.448
ジクロフェナク TMS	910107-54-9	12.524
コカエチレン @P1013	996000-46-6	12.537
ベンゾイルエクゴニン、O-TMS 誘導体	864281-94-7	12.537
ノルドキシセピン	1225-56-5	12.549
モクロベミド	71320-77-9	12.615
ミルタザピン	61337-67-5	12.627
ジクロフェナク	15307-86-5	12.634
デソルモルヒネ	427-00-9	12.636
ノルコカイン TMS	910160-82-6	12.646
ベンタゾシン	359-83-1	12.657
メリトラセン	5118-29-6	12.682
ピソプロロール TMS	910251-41-1	12.725
プロメタジン	60-87-7	12.731
ミアンセリン-M (ノル-) P606	996002-24-5	12.769
デルタ-9-テトラヒドロカンナビノール、TMS 誘導体	55449-68-8	12.879
ベンタゾシン AC	910038-20-9	12.916
マプロチリン-M (ノル)	910068-96-1	13.021
オキサゼパム	604-75-1	13.037
レボキセチン	98769-81-4	13.044
プロチベンジル	303-69-5	13.148
マプロチリン	10262-69-8	13.168
ノルフェンタニル、N-アセチル-	997469-16-3	13.209
デソルモルヒネ AC	910171-95-8	13.216
カンナビジオール	13956-29-1	13.247
セルトラリン P935	79617-96-2	13.268
ドスレピン	113-53-1	13.402
カンナビジオール 2AC P1439	996000-64-9	13.419
カンナビノール TMS P1367	996004-53-2	13.437
シタロプラム	59729-33-8	13.439
コデイン	76-57-3	13.484
ジヒドロコデイン	125-28-0	13.505
ロラゼパム	846-49-1	13.527
クロミプラミン P995	303-49-1	13.528
U-47700	82657-23-6	13.543
テトラゼパム	10379-14-3	13.630
コデイン、TMS 誘導体	74367-14-9	13.642
エチルモルヒネ	76-58-4	13.697
シタロプラム-M (ノル)	910126-73-7	13.698

化合物名	CAS 番号	RT
ジアゼパム @P799	439-14-5	13.738
クロミプラミン-M (ノル-) P908	303-48-0	13.782
デスプロピオニルフェンタニル	39742-60-4	13.809
フルラゼパム-M (デスアルキル)	2886-65-9	13.837
カンナビノール、酢酸	997724-40-7	13.887
ヒドロコドン	125-29-1	13.912
モルヒネ、2TMS 誘導体	55449-66-6	13.918
アセチルジヒドロコデイン	3861-72-1	13.989
ヒドロモルフォン	466-99-9	14.060
アセチルコデイン	6703-27-1	14.194
クロルプロマジン	50-53-3	14.202
ノルダゼパム	1088/11/05	14.282
N-アセチルノルコカイン	0-00-0	14.294
クロチアゼパム	33671-46-4	14.294
レボプロマジン	60-99-1	14.300
6-モノアセチルモルヒネ	2784-73-8	14.357
カンナビノール	521-35-7	14.362
レミフェンタニル	132875-61-7	14.389
オキシコドン、酢酸	997736-63-7	14.394
エチルモルヒネ、酢酸	997731-61-8	14.445
11-ヒドロキシ-デルタ-9-テトラヒドロカンナビノール、ビス(トリメチルシリル)エーテル	997929-56-4	14.448
U-49900	67579-76-4	14.450
6-モノアセチルモルヒネ TMS	910138-32-8	14.466
O ⁶ -アセチルモルフィン、TMS 誘導体	997830-22-7	14.478
オキシコドン	76-42-6	14.524
クロバザム	22316-47-8	14.568
ベンゾイルエクゴニン	519-09-5	14.768
AH-7921	55154-30-8	14.830
パロキセチン	61869-08-7	14.883
ミダゾラム	59467-70-8	14.906
テマゼパム	846-50-4	14.921
ロキサピン @P1074	27833-64-3	14.957
ヒドロモルフォン AC	910018-11-0	15.001
デロラゼパム	2894-67-9	15.047
フルニトラゼパム	1622-62-4	15.066
ジアセチルモルヒネ	561-27-3	15.162
クエチアピン-M (N-脱アルキル化-) P876	996006-43-8	15.197
プロマゼパム	1812-30-2	15.336
ブラゼパム	2955-38-6	15.394
4-フルオロイソブチリルフェンタニル II	910264-33-4	15.452
アセチルフェンタニル	3258-84-2	15.542
パラフルオロフェンタニル	90736-22-4	15.631
11-ノル-デルタ-9-テトラヒドロカンナビノールカルボン酸 2TMS	910035-82-4	15.713

化合物名	CAS 番号	RT
ナロキソン	465-65-6	15.910
クロチアピン P1173	2058-52-8	15.958
フェンタニル	437-38-7	16.211
パラ-フルオロプロチリルフェンタニル	244195-31-1	16.301
オランザピン	132539-06-1	16.353
フルラゼパム	17617-23-1	16.582
ニトラゼパム	146-22-5	16.742
ナロキソン、O、O'-ジアセチル-	997851-29-6	16.840
オクフェンタニル	101343-69-5	17.018
ゾルピデム	82626-48-0	17.034
チアプリド	51012-32-9	17.055
ババベリン	58-74-2	17.326
シクロプロピルフェンタニル	910257-05-5	17.465
クロナゼパム	1622-61-3	17.799
バレリルフェンタニル	122882-90-0	18.006
ナルトレキソン	16590-41-3	18.011
ヒドロキシジン	68-88-2	18.026
クロザピン	5786-21-0	18.310
ヒドロキシジン、TMS 誘導体	959101-75-8	18.863
アルフェンタニル	71195-58-9	19.009
クロザピン-M (ノル)	910008-51-4	19.054
ナルトレキソン 2AC P1520	996004-31-1	19.184
アルブラゾラム	28981-97-7	19.296

参考文献

1. Lehrer, M. The Role of Gas Chromatography/Mass Spectrometry. Instrumental Techniques in Forensic Urine Drug Testing. *Clin. Lab Med.* **1998** Dec, 18(4), 631-49.
2. Wood, M.; Laloup, M.; Samyn, N.; Ramirez Fernandez, M.; Buijn, E. A.; Maes, R. A. A.; Boeck, G. D. Recent Applications of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in Forensic Science. *J. Chromatogr.A.* **2006** Oct 13, 1130(1), 3-15.
3. Forensic Toxicology tMRM Database for Triple Quadrupole LC/MS <https://www.agilent.com/en/product/liquid-chromatography-mass-spectrometry-lc-ms/lc-ms-application-solutions/forensic-toxicology-tmrm-database-for-triple-quadrupole-lc-ms>
4. Lokits, K.; Ciotti, R.; Diaz, H. QuickProbe Dual Configurations for Forensic Workflows: Providing Flexibility and Robustness on a Single GC/MS System. *Agilent Technologies application note*, publication number 5994-6889EN, **2023**.
5. Lokits, K.; Willey, ストリートドラッグの法医学分析に用いる水素キャリアガスと Agilent HydroInert イオン源の評価. *Agilent Technologies application note*, publication number 5994-6982JAJ, **2023**.
6. Andrianova, A.; Liu, H.; Graettinger, A.; Churley, M. Agilent MassHunter Optimizer を用いた US EPA 8270 準拠の GC/TQ MRM メソッドの開発. *Agilent Technologies application note*, publication number 5994-2086JAJ, **2020**.
7. Andrianova, A.; Liu, H.; Graettinger, A. Agilent MassHunter Optimizer を用いた大麻中農薬の GC/TQ MRM メソッドの開発. *Agilent Technologies application note*, publication number 5994-2087JAJ, **2020**.
8. Maurer, H. H.; Pflieger, K.; Weber, A. A. Mass Spectral Library of Drugs, Poisons, Pesticides, Pollutants, and Their Metabolites, **2007** (3rd Edition).

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンタ

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報、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。

RA45433.6567824074

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2024

Printed in Japan, August 14, 2024

5994-7594JAJ