

# 高分解能 2-D GC/MS を使用した口腔液中の THC の確認 アプリケーション

法医学

## 著者

Dean F. Fritch, Ph.D., DABFT, DABCC-TC  
Orasure Technologies, Inc.  
150 Webster Street  
Bethlehem, PA 18015  
USA

Bruce D. Quimby, Ph.D.  
Agilent Technologies, Inc.  
2850 Centerville Road  
Wilmington, DE 19808-1610  
USA

## 概要

雇用、薬物治療、臨時入国許可、薬物服用下での運転の疑いに関連した薬物検査に用いられる尿の代替品として、口腔液が使用されつつあります。口腔液は溶解能が低く、尿サンプルよりも混ぜ物を入れにくいと考えられています。口腔液のサンプルは一般的に ELISA 免疫検定法でスクリーニングされます。陽性と検出されたサンプルは、質量分析法でさらに分析、確認する必要があります。

この確認法は、尿検査で使用されるサンプルよりも低濃度のものまで、口腔液中の依存性薬物 (DOA) を検出する必要があります。たとえば、口腔液を Intercept® 口腔液コレクタで採取した場合、テトラヒドロカンナビノール (THC) は希釈口腔液中で 0.5 ng/mL のレベルまで測定する必要があります。分析は複雑なサンプルマトリックスの干渉により難しいものとなります。これらのサンプルに対して、ガスクロマトグラフィー/マススペクトロメトリー/マススペクトロメトリー (GC/MS/MS) と液体クロマトグラフィー/マススペクトロメトリー/マススペクトロメトリー (LC/MS/MS) のような技術が使用されてきました。干渉の問題を克服するために、MS/MS 法によってもたらされる高いレベルの選択性が用いられます。

GC/MS は THC を確認するために必要な感度を持っていますが、マトリックスによる干渉のため選択性が足りません。このアプリケーションでは、THC が無極性の DB-1ms カラムから極性の DB-17ms カラムまでハートカットされる場合の 2 次元 (ハートカット) GC/MS システムを説明します。分解能と感度を向上するために、空冷フォーカシングトラップが使用されます。高分解能 2 次元 (2D) GC と標準的な卓上型の四重極質量分析計と組み合わせたガスクロマトグラフ/質量選択検出器 (GC/MSD) は、THC 確認に必要な選択性と感度が得られます。

## はじめに

四重極型質量分析計を装備した GC/MS は幅広く使用されている分析装置です。その選択性、感度、費用効率、同定のためにライブラリサーチを使用できる能力により、永年の間、最適な装置でした。しかしながら、マトリックスの干渉により目的とする測定対象化合物分析がうまくいかない種類のサンプルがいくつかあります。これらのサンプルに対して、GC/MS/MS や LC/MS/MS のような技術が使用されてきました。干渉の問題を克服するために、MS/MS 法によってもたらされる高いレベルの選択性が使用されます。多くの分析、特に測定対象化合物の数が限られている分析に、標準的な四重極 MS 付き 2 次元 (ハートカット) GC を使用することは、よりシンプルでより費用のかからない代替案になる可能性があります。

このアプリケーションでは 2 次元 (ハートカット) GC/MS システムを説明します。装置構成は、空冷フォーカシングトラップが追加された Deans スイッチと標準的な四重極 GC/MS システムです。一般的に、1 番目の GC カラムは無極性の DB-1ms で、2 番目のカラムは極性の DB-17ms です。まず GC に注入がされると、測定対象化合物は 1 番目のカラムで分離します。Deans スイッチは、空冷トラップ行われて 1 番目のカラムから測定対象化合物が溶出し、その部分を含むフラクションが 2 番目のカ



Agilent Technologies

ラムへ移行するのに必要な時間範囲をハートカットするようにタイムプログラムされます。測定対象化合物は、2 番目のカラムにおいて 1 番目のカラムで共溶出するマトリックス化合物からさらに分離されます。分解能と感度を向上するために、フォーカシングトラップが使用されます。MS/MS 法の代わりに、2 次元 (2D) GC 分離が使用されます。測定対象化合物の溶出後に、カラムの中のキャリアガスを逆流させてバックフラッシュを行い、不要な重いサンプル成分を注入口のスプリットベントから外に排出できます。これにより、分析時間が節約され、カラムのメンテナンスや交換の頻度が減ります。少量の注入サンプルだけが MS のイオン源に入るため、イオン源クリーニングも減ります。数の限られた測定対象化合物に対して (一般的には 5 種類以下)、高分解能 2D GC/MS が MS/MS 法の適切な代替案になる可能性があります。

口腔液中の依存性薬物の検出は、高分解能 2D GC/MS を適用できる良い例です。

最近の薬物服用および障害の検査で、尿の代替品として、口腔液はますます使用されつつあります。この技術により、採取の容易さ、混ぜ込みの最小化、そして採取、スケジューリング、損失時間に伴うコスト削減を含むいくつかの利点が提供されます。

スクリーニングの陽性結果の確認で、口腔液検査により示された課題が 1 つあります。たとえば、口腔液に THC が 0.5 ng/mL 以下に含まれている場合には、その確認が必要です。このレベルでの THC の定量は、測定対象化合物に保持時間が重なり、同じ  $m/z$  値を持つイオンマトリックス中の非薬物化合物の干渉があるため複雑となります。この問題のため、LC/MS/MS や GC/MS/MS といった手法が確認のためによく使用されます。このアプリケーションでは、高分解能 2D GC/MS を使用して口腔液中の THC を分析できることを検証します。2D 法により生じた極めて高いクロマトグラフ分解能により、THC のマトリックス干渉の問題は解決されます。これにより、MS/MS 法に相当する検出レベルを実現させます。

## 分析条件

### GC/MSD 構成

使用された GC/MSD の構成図は図 1 のとおりです。システム構成は次のとおりです。

G1540N	6890N ネットワーク GC システム、以下のオプション付き 652 口腔液分析キット (Cryo-Trap、PCM、15m DB-1ms カラム、15m DB-17ms カラムを含む) 112 スプリット/スプリットレス注入口、EPC (112) 付き 201 MSD インタフェース (201) 211 キャピラリ FID、EPC (211) 付き 888 マイクロ流体 Deans スイッチ 002 (240 V 高速オープン電源) または 003 (198 ~ 231 V 高速オープン電源)
G3243A	5975B inert MSD/DS パフォーマンススターボ EI バンドル
G3397A	イオンゲージ/コントローラ、5975 MSD 用
G2913A	7683B オートインジェクタモジュール
G2614A	7683 オートサンプラトレイモジュール

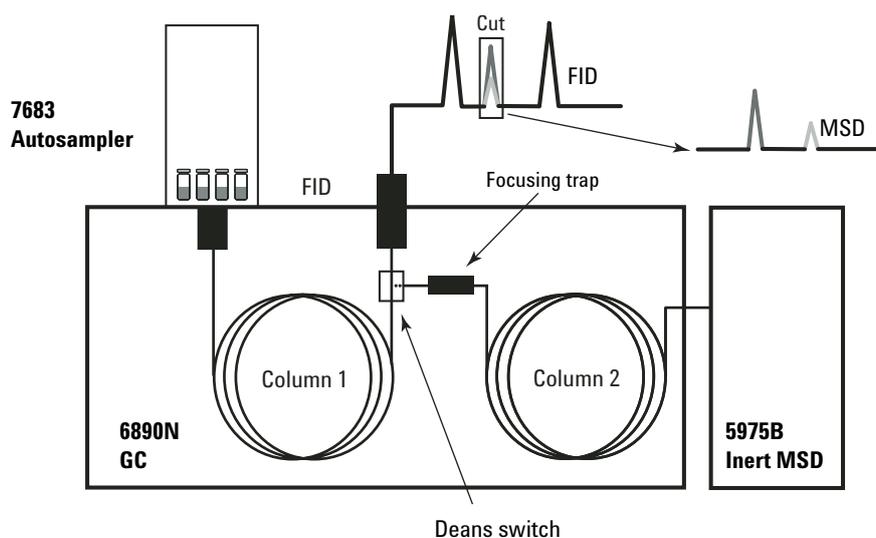


図 1 2D ハートカット GC/MSD システムのハードウェアの構成図

ガスクロマトグラフと質量分析計の操作条件は表 1 に記載してあります。

**表 1 ガスクロマトグラフと質量分析計の条件**

<b>GC</b>		<b>カラム 1</b>	
Agilent Technologies 6890N 7683 オートインジェクタおよびトレイ		注入口	スプリット/スプリット レス (フロント)
<b>オートインジェクタ</b>		タイプ	DB-1 ms
サンプル洗浄	0	Agilent 部品番号	122-0112
サンプルポンプ	0	長さ (m)	15
注入量 (μL)	4	直径 (mm)	0.25
シリンジサイズ (μL)	10	膜厚 (μm)	0.25
プレインジェクション溶媒 A 洗浄	0	<b>カラム 2</b>	
プレインジェクション溶媒 B 洗浄	0	注入口	Deans スイッチ (バック)
ポストインジェクション溶媒 A 洗浄	10	タイプ	DB-17 ms
ポストインジェクション溶媒 B 洗浄	10	Agilent 部品番号	122-4712
粘度ディレイ	2	長さ (m)	15
プランジャスピード	低速	直径 (mm)	0.25
プレインジェクションドゥエル (分)	0	膜厚 (μm)	0.25
ポストインジェクションドゥエル (分)	0	<b>FID</b>	
<b>フロント注入口</b>		温度 (°C)	250
タイプ	EPC スプリット/スプリットレス	水素流量 (mL/min)	50
モード	コンスタントプレッシャ	空気流量 (mL/min)	450
注入口温度 (°C)	250	モード: 一定メークアップ流量	一定メークアップ流量
注入法	パルスドスプリット	窒素メークアップ流量 (mL/min)	45
パルス圧 (psig)	45	取込速度 (Hz)	10
パルス時間 (分)	0.5	<b>Deans スイッチ</b>	
パージ時間 (分)	1	FID リストリクタ長 (m)	0.31
パージ流量 (mL/min)	50	FID リストリクタ内径 (mm)	0.10
圧力、公称 (psig)	26.59	キャリアガス供給	Cryotrap の PCM
ガスセーバ	オフ	Deans 圧力 (psig)	19.60
ガスタイプ	ヘリウム	THC カット時間開始 (分)	6.33
<b>バック注入口</b>		THC カット時間終了 (分)	6.44
タイプ	PCM/フォーカシング トラップ	<b>MSD</b>	
初期温度 (°C)	300	Agilent Technologies	5975B inert MSD
初期時間 (分)	5.3	溶媒ディレイ (分)	4
ランプ速度 1 (°C/min)	799	チューンファイル	Atune.U
最終温度 1 (°C)	100	モード	SIM
最終ホールド 1 (分)	2	EM 電圧	Atune 電圧
ランプ速度 2 (°C/min)	799	四重極温度 (°C)	150
最終温度 2 (°C)	300	イオン源温度 (°C)	230
最終ホールド 2 (分)	10	トランスファライン温度 (°C)	280
<b>オープン</b>		取込モード	SIM
電圧 (VAC)	240	デュエルタイム (msec)	10
初期オープン温度 (°C)	130	THC-TMS SIM イオン	371, 386, 303
初期オープンホールド (分)	0.5	THC-D3-TMS SIM イオン	374, 389, 306
ランプ速度 1 (°C/min)	35	<b>ポストランバックフラッシュ条件</b>	
最終温度 1 (°C)	250	ポスト時間 (分)	3
最終ホールド 1 (分)	0	オープン温度 (°C)	300
ランプ速度 2 (°C/min)	10	カラム 1 圧力 (psig)	1.0
最終温度 2 (°C)	280	カラム 2 圧力 (psig)	65
最終ホールド 2 (分)	2.5		
平衡化時間 (分)	0.5		

## 口腔液サンプルの採取と調製

Intercept® 口腔液コレクタ (OraSure Technologies) を使用して、薬物診療所の 20 人の患者から口腔液を採取しました。採取された約 400  $\mu\text{L}$  の唾液のサンプルは 800  $\mu\text{L}$  の保存緩衝液で希釈しました。

OraSure Technologies, Inc. (OTI) 製 Intercept マイクロプレート EIA スクリーンを使用して、サンプルの THC をスクリーニングしました。THC が陽性のサンプルは以下で説明しますように TMS 誘導体として調製して、2D GC/MSD システムで分析しました。

口腔液希釈剤 (OTI) を使用してサンプルマトリックスを模擬実験したことを除き、口腔液と同じ手順で校正用標準を調製しました。

2D GC/MSD のサンプルは以下のとおり調製します。

- サンプル 400  $\mu\text{L}$  を 50 mM リン酸 4 mL で希釈します
- 希釈 THC 内部標準 (2 ng/mL) を加えます
- カラムをメタノール 500  $\mu\text{L}$  で洗浄します
- 希釈サンプルをカラム (Varian SPEC DAU 30 mg) にロードします
- メタノール/水 (50/50) 2 mL で洗浄します
- 2 分間乾燥します
- 塩化メチレン/イソプロパノール/アンモニア (78/20/2) 1 mL で溶出します
- 乾燥させ、75 °C で 15 分間、BSTFA+1%TMCS 25  $\mu\text{L}$  で誘導体化します
- アセトニトリルを 25  $\mu\text{L}$  加えます

THC の標準と重水素化した THC-D3 は Cerilliant から購入しました。  
BSTFA+1%TMCS は Pierce から購入しました。

## Deans スイッチの操作

Deans スイッチは 1 番目のカラムから 2 番目のカラムまでのピークをハートカットするために使用される流体用デバイスです。質量分析計で検出される微量の測定対象化合物に関する分析では、厳しい必要条件がサンプル流路の各コンポーネントに課されます。この必要条件とは、空気漏れがないこと、サンプルに接触する表面の不活性さ、最小デッドボリューム、使いやすさ、長期的にわたる信頼性などです。Agilent マイクロ流体 Deans スイッチはこれらすべての必要条件を満足しています。このデバイスとそのアプリケーションのさらに詳しい説明は参考文献 1 に記載されています。

ソレノイドバルブが作動していない状態の Deans スイッチの図解を図 2a に示します。バルブがこの状態の場合、DB-1 ms カラムからの溶出物はリストリクタを通して FID に到達します。図 2b のようにソレノイドバルブが作動した場合、今度はカラム溶出物が DB-17 ms カラムに向かって流れます。そのため、ピークの溶出直前にソレノイドバルブを作動して、ピークの溶出直後に切るようにタイムプログラミングすることで、1 番目のカラムから 2 番目のカラムまでのピークのハートカットが達成されます。

Deans スイッチのもう 1 つの用途は、1 番目のカラムをバックフラッシュすることです。分析終了時にはオープン温度は 300 °C に上昇し、スプリット/スプリットレス注入口の圧力は 1 psig に落ち、PCM 圧力は 65 psig に上昇します。注入口圧力のこの変化により、カラム 1 へ逆流するキャリアガスの流れが生じます。この逆流により、カラム 1 の先端にある重い成分をスプリットベントラップにバックフラッシュします。バックフラッシュすることでカラムの寿命が延び、結果としてクロマトグラムの

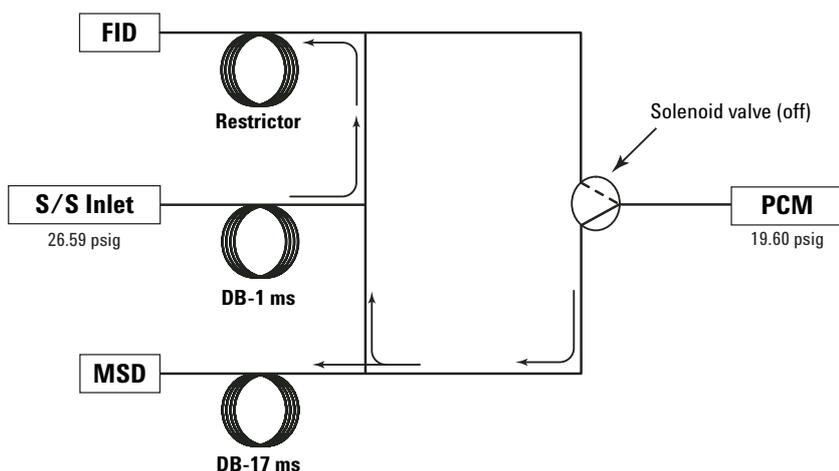


図 2a 「カットなし」ポジションの Deans スイッチバルブ。カラム 1 からの溶出物は FID に流れます。

ベースラインがよりきれいになります。バックフラッシュモードは図 2c のとおりです。

### 温度設定とカット時間

2D クロマトグラフ法のパラメータ決定では、オープン温度プログラムを最初に行います。初期オープン温度は、測定対象物ピークが広がったり、形が崩れたりしないような条件で最高値になるように設定します。10 ng/mL の濃度に調製された THC 標準は、FID (カットなし) でのピーク形状をモニタリングしながら 100 ~ 150 °C の初期温度で分析しました。この方法では、130 °C でうまくいくことが分かりました。130 °C から 250 °C までの昇温ではオープン制御警告が出ない可能な限り最高の昇温速度になるように設定し、その結果 35 °C/分の昇温速度が選択されました。一番目のカラムでのその他のマトリッ

クス成分からの THC の分離を良くするためには、THC の溶出 約 2 分前に 10 °C/分に昇温速度を落とします。THC の溶出後、温度は 280 °C で定温に保ちます。

図 3a は、患者サンプルの 1 番目のカラムでの FID クロマトグラムを示しています。多量のマトリックス成分がはっきりと分かります。図 3b は、THC の溶出範囲の拡大図です。同じく図 3b には、10 ng/mL の THC 標準のクロマトグラムが示されています。THC のカット時間は、THC ピーク直前に開始して、直後に終了するように選択します。この例では、カット時間範囲は 6.33 ~ 6.44 分でした。

カット時間決定後、フォーカシングトラップ温度プログラムを選択します。トラップは最初 300 °C に保たれ (つまり、トラッピングなし)、カット時間の約 1 ~ 2 分前に 100 °C に冷却するようにプログラムします。これは、

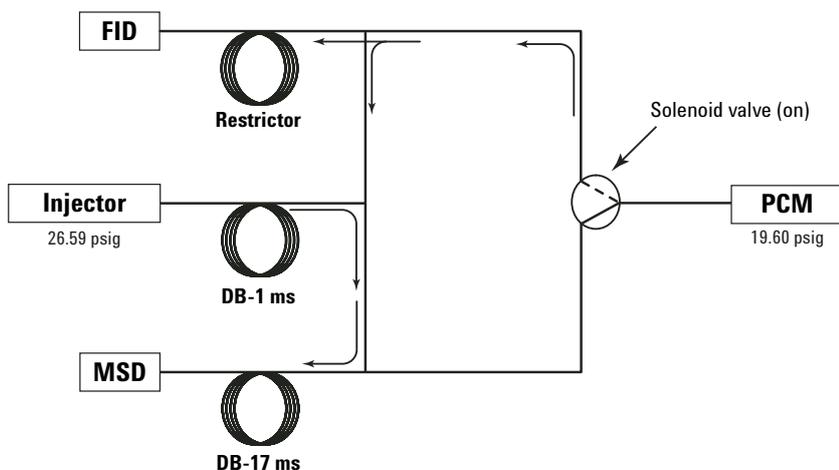


図 2b 「カット」ポジションの Deans スイッチバルブ。カラム 1 の溶出物はカラム 2 に流れます。

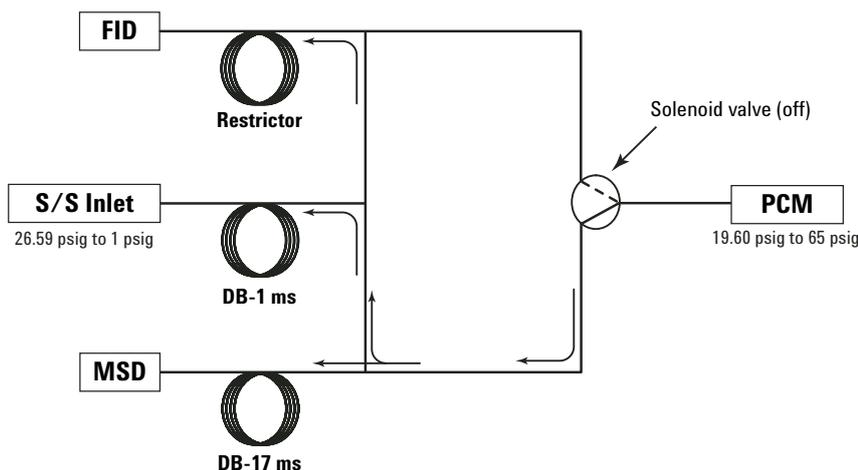


図 2c カラム 1 のバックフラッシュ。最後の測定対象化合物がカラム 2 から溶出した後、注入口圧力を 1 psig まで下げ、PCM を 60 psig にして、重い成分をスプリットベントの外にバックフラッシュするようプログラムします。

カットが行われ際にトラップが 100 °C になるようにするためです。カット終了後、最高速度 (799 °C/分) で 300 °C に戻すようにトラップをプログラムします。これにより、トラップされた成分を脱着します。通常、脱着はカット終了後約 0.2 分に設定されます。この例では、脱着はカット後約 1 分で開始します。

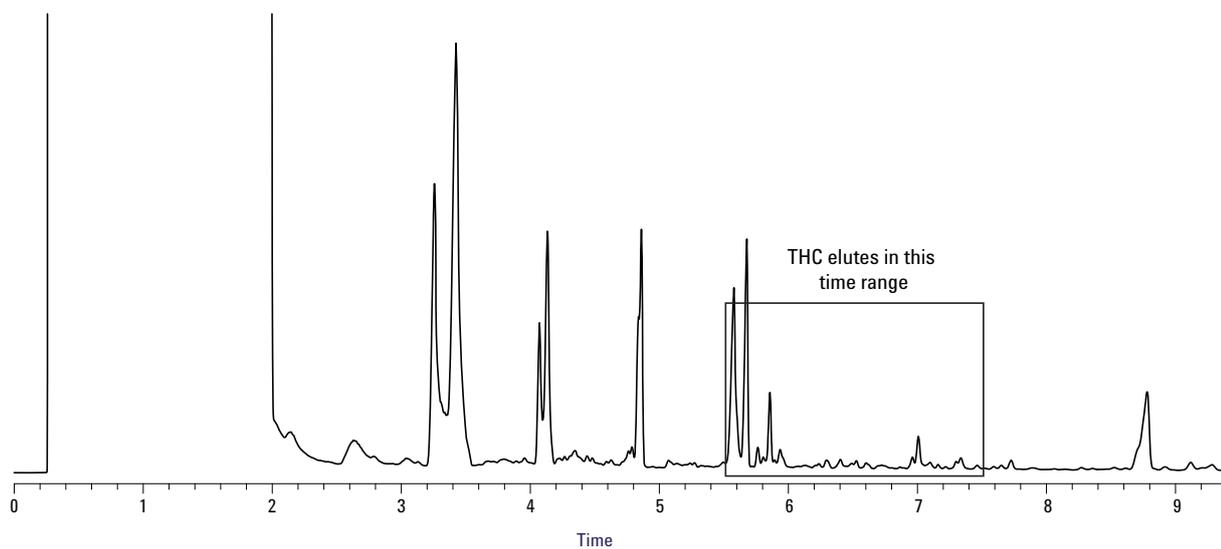


図 3a マトリックスの複雑さを示す患者サンプルの 1 番目のカラムにおける FID クロマトグラム (2 番目のカラムへカットなし)

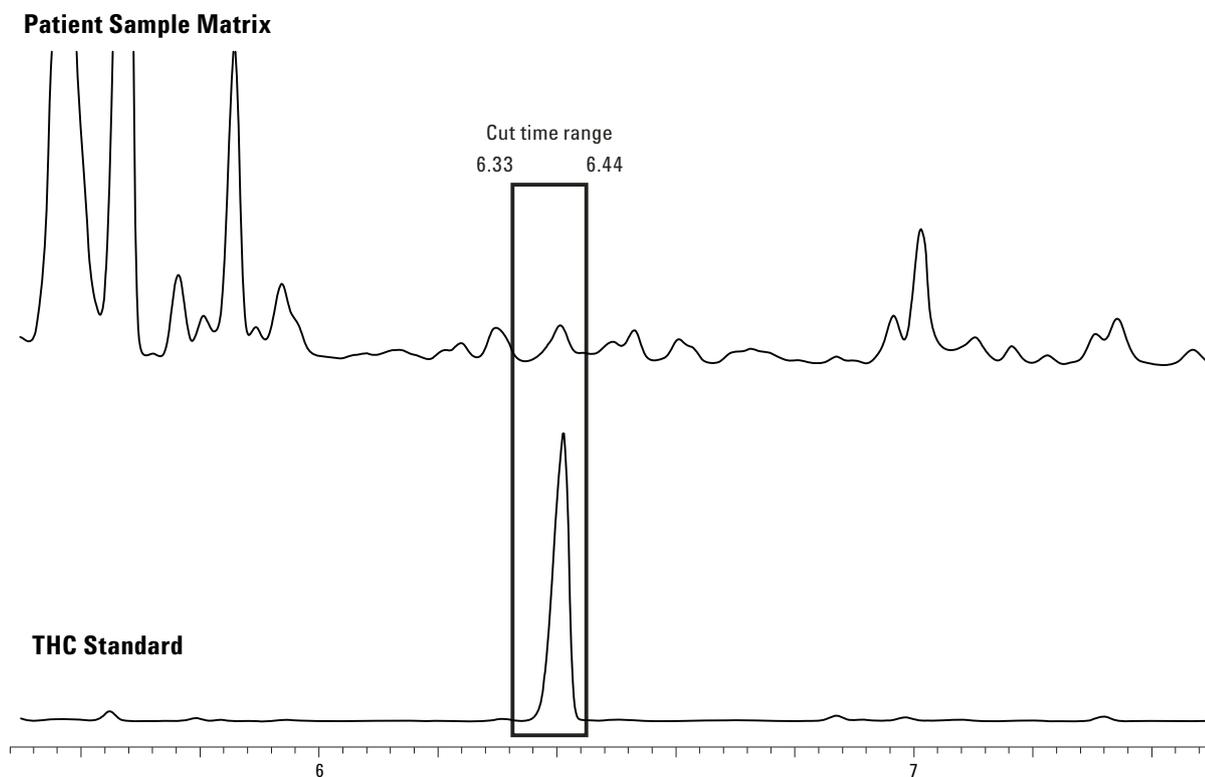


図 3b 図 3a の THC 溶出範囲の拡大図

図 4 は、トラップ温度、オープン温度、Denas スイッチバルブの関係を示すタイミングダイヤグラムです。

## 結果と考察

図 5a には、2 ng/mL でスパイクされた内部標準 (THC-D3) の SIM クロマトグラムを示しています。内部標準の保持時間は THC の保持時間と非常に近く、0.002 分早いだけです。保持時間が極めて近いため、THC のために選択されたカット時間は内部標準にも上手く機能します。

図 5b には、カットオフレベル 0.5 ng/mL で調製された非抽出 THC 標準の SIM クロマトグラムを示しています。カットオフレベルは、サンプルが陰性と考えられるより低い唾液中 THC 濃度です。図 5b のサンプルは、サンプルクリーンアップ操作を行わずに、THC を直接、誘導体化することで得られます。これは、サンプル調製操作を経てからの回収率をみるためのリファレンスとして使用されます。

代替の唾液を用い、サンプル調製操作全体を経て得られたカットオフレベル標準は、図 5c のとおりです。このレスポンスと 5b の非抽出標準を比較すると、回収率が 70 % 以上であることが分かります。カットオフレベルでの定量を干渉するであろう THC のリテンションタイム

範囲に、サンプル調製で生じる深刻な影響はないことも分かります。

THC が陽性と検出された患者のサンプルは図 5d のとおりです。測定された濃度 0.64 ng/mL はカットオフレベルのわずかに上です。THC のリテンションタイム範囲に、大きな干渉の痕跡はありません。

陰性の患者サンプルは図 5e のとおりです。この THC の濃度は、キャリブレーションされた最低のレベルよりも低く、THC 0.17 ng/mL と推定されました。

図 6 は MSD ケミステーションの THC 検量線を示します。0.2 ~ 32 ng/mL の THC のキャリブレーション範囲全体にわたり、ほぼ良好な直線性があることが分かりました。図 6 のプロットはカットオフレベルを挟み込む範囲を示します。

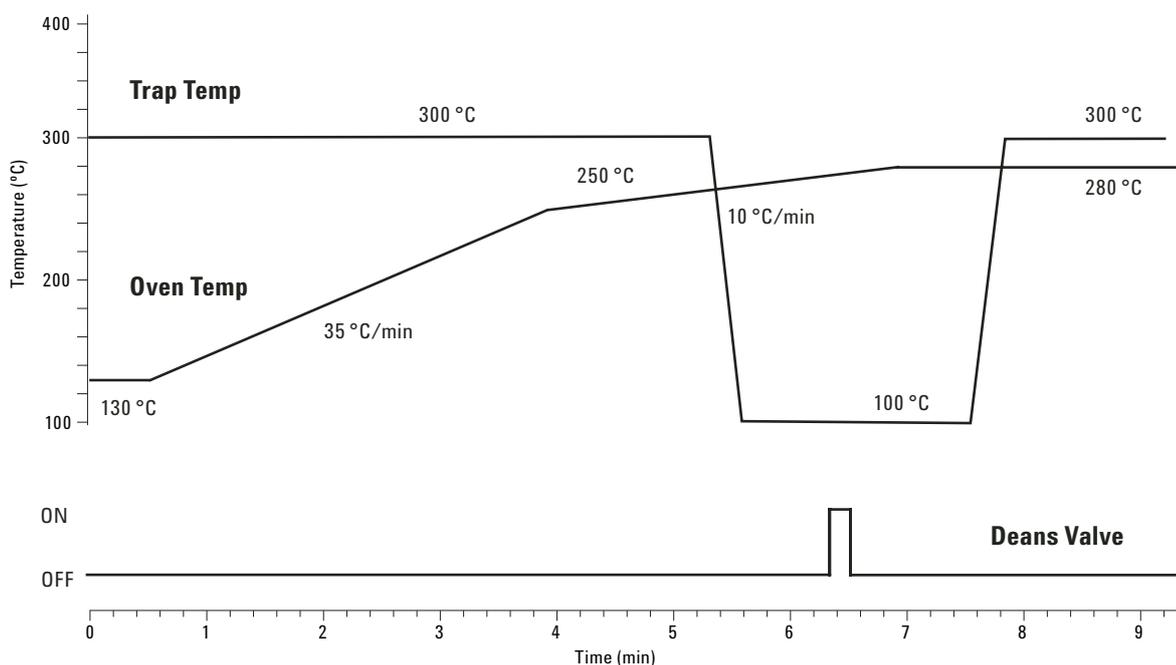


図 4 THC 分析の温度とバルブのタイミング

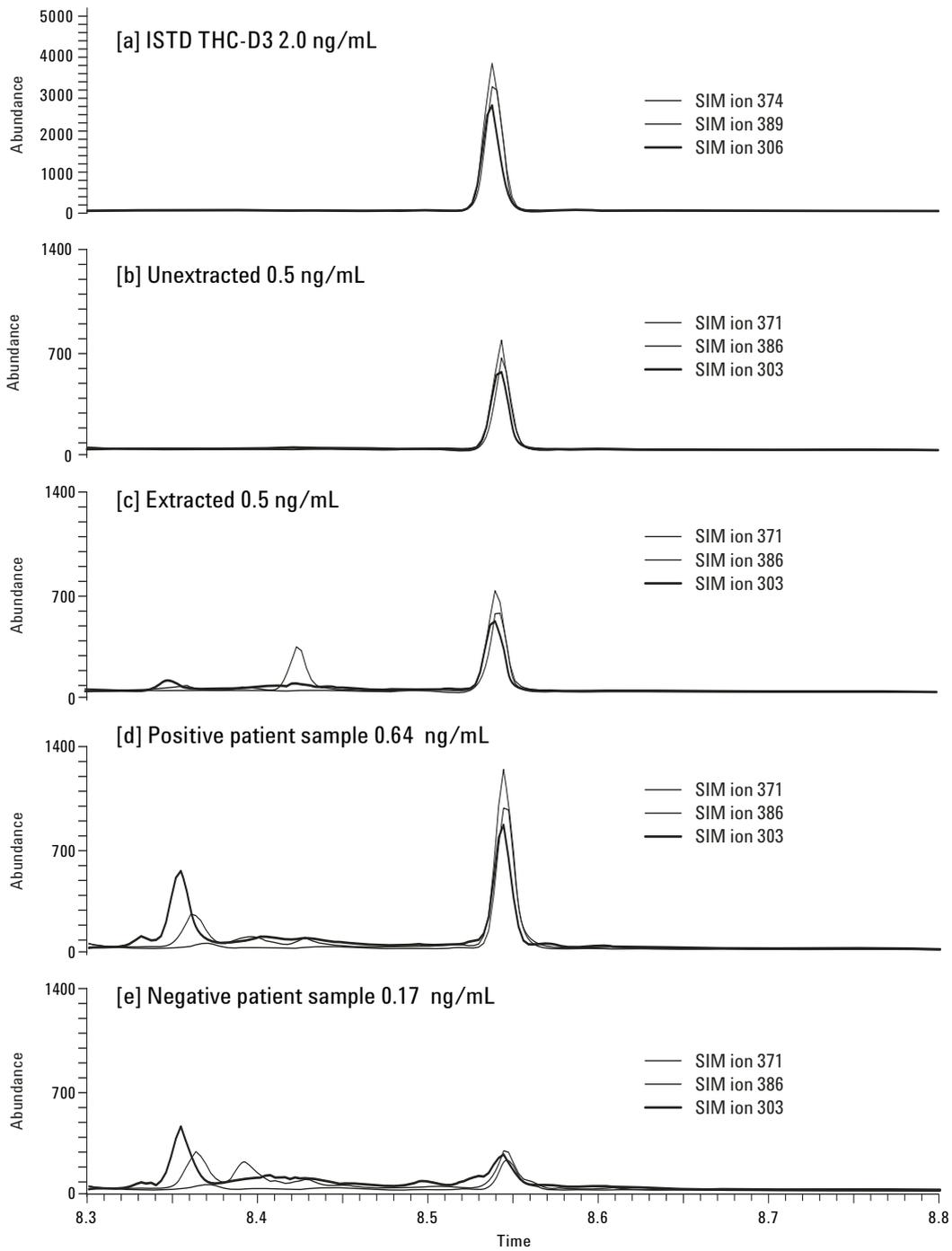


図5 SIM クロマトグラム、a) 内部標準 THC-D3 (2 ng/mL)、b) 非抽出 THC カットオフ (0.5 ng/mL)、c) 抽出 THC カットオフ (0.5 ng/mL)、d) 陽性患者の THC サンプル (0.64 ng/mL)、e) 陰性患者のサンプル (0.17 ng/mL)

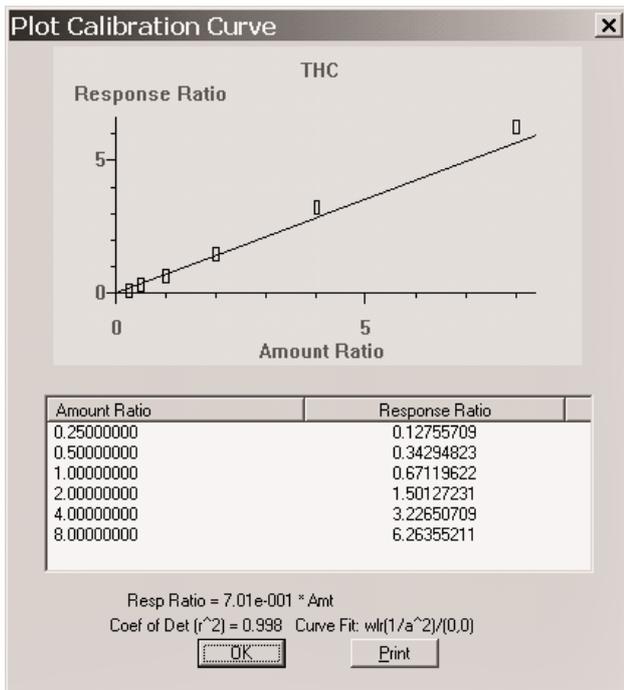


図6 THC 検量線

この方法の評価をしめす結果は表2に要約されています。データは各レベルでの3回の分析に基づいています。LODの行は検出限界です。LOQの行は定量限界です。平均と記された列は、検量線を使用し、標準を3回分析して得られた平均濃度です。STDEVの列は平均値の標準偏差で、%CVはパーセント変動係数です。%Accuracyの列は、既知数値と測定数値の一致を表し、完全一致で100%になります。

表3には、EIAによるスクリーニング結果と2D GC/MSメソッドによる結果の比較を表します。表3の左側には、20個の患者サンプルに対する結果の分布を示した行列で

表2 THCのキャリブレーション結果

	ng/mL	平均*	STDEV	%CV	%Accuracy
LOD (0.2X)	0.1	0.22	0.03	12.86	220.00
LOQ (0.4X)	0.2	0.29	0.01	3.94	146.67
カットオフ (X)	0.5	0.46	0.08	16.58	91.33
2X	1	1.03	0.04	4.23	103.00
4X	2	1.95	0.04	2.07	97.67
8X	4	4.08	0.17	4.17	102.08
陽性のコントロールサンプル	2	1.86	0.06	2.99	93.00
回収率			70%		
直線性			0.2 ~ 32 ng/mL		
キャリーオーバー			0 ~ 32		

\*3回の分析

す。行列の4分割の左上にあるように、両方の手法で4つのサンプルが陽性と検出されました。1つのサンプルはGC/MSでは陰性で、EIAでは陽性でした。GC/MSはリファレンス技術と考えられるため、サンプルはEIAに対して偽陽性であると考えられます。4分割の左下の値は、GC/MSで陽性で、EIAで陰性であると検出されたサンプルはないことを示しています。つまり、EIAに対して偽陰性は検出されませんでした。残りの15個のサンプルは両方の手法に対して陰性であると検出されました。

表3 EIAと2D GC/MSの結果比較

EIA	GC/MS		N	Deans スイッチ	EIAキット 添付文書
	+	-			
+	4	1	感度	20	200
-	0	15		100%	97.62%
			特異性	93.75	91.67
			確認カットオフ	0.5	0.5

表3の右側は、GC/MS法とEIAスクリーニング法での感度と特異性の比較を表します。この比較では、感度は真陽性の数を真陽性と偽陰性の合計で割った数として定義されます。真陽性は、両方の手法で陽性と検出されたサンプルとして定義されます。特異性は真陰性の数を真陰性と偽陽性の合計で割った数として定義されます。

表3の一番右の列のデータは、Intercept EIAキットの添付文書に記載された200個の患者サンプルの研究からのものです。この結果から、2D GC/MS技術と添付文書に使用された200個のサンプル研究が良く一致することが分かります。

## 結論

口腔液の THC をスクリーニングする確認法として、高分解能 2D GC/MS を使用できます。Intercept® コレクタで採取されたサンプルには分析を妨げる大きな干渉はありません。THC 2 ng/mL の「吸引」SAMHSA ガイドラインのカットオフに対応するサンプル量 0.4 mL で、適切な結果が得られました。

注: Intercept コレクタでサンプル採取時に生じる口腔液の保存用緩衝液による希釈を補うために、THC 0.5 ng/mL のカットオフがこのアプリケーションで使用されました。

薬物診療所の患者 20 人に関して行った測定における、Intercept EIA キットと 2D GC/MS の間の感度と特異性データは、添付文書に発表されたデータと類似していました。

## 参考文献

1. James D. McCurry, “sing a New Gas Phase Micro-Fluidic Deans Switch for the 2-D GC Analysis of Trace Methanol in Crude Oil by ASTM Method D7059,” Agilent Technologies publication 5989-1840EN

## 詳細情報

Agilent 製品およびサービスの詳細は、Agilent のウェブサイト [www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp) をご覧ください。

Agilent は、本資料に誤りが発見された場合、また、本資料の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。

本資料に記載の情報、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。また、本資料掲載の機器類は薬事法に基づく登録を行っておりません。

アジレント・テクノロジー株式会社  
© Agilent Technologies, Inc. 2006

Printed in Japan  
September 25, 2006  
5989-5668JAJP