

법의학 및 독성학 워크플로를 위한 법의학 QQQ GC/MS MRM 데이터베이스



저자

Celine Gys¹,
Anna Klimowska^{1,2},
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, Anastasia
Andrianova
Agilent Technologies, Inc.

개요

법의학 실험실에서는 체계적인 독성 분석이 중요하기 때문에 강력하고 신뢰할 수 있는 분석법이 필요합니다. QQQ 질량 분석기와 결합된 기체 크로마토그래피(GC/TQ)는 여러 기기와 실험실에서 균일한 결과를 제공하는 널리 사용되는 다용도 기술입니다. 이 연구의 목적은 GC/MS 분석이 가능한 독성학적으로 관련된 화합물에 대한 다중 반응 모니터링 (MRM) 전이 데이터베이스를 구축하는 것입니다. 그 결과 큐레이션된 데이터베이스에는 154개의 고유한 화합물과 화합물당 최대 12개의 전이를 포함한 176개의 항목이 포함되어 있습니다. 이 데이터베이스를 사용하면 GC로 분석이 가능하고, 법의학 및 독성학적으로 관련된 화합물의 표적 스크리닝과 확실한 정량화를 위한 분석법을 즉시 구축할 수 있습니다.

데이터베이스는 이 응용 자료의 Appendix 1에서 CSV 파일로 다운로드할 수 있습니다.

소개

법의학 연구에서 체계적인 독성학 분석은 끊임없이 진화하는 독성 분야에 지속적으로 적응할 수 있어야 합니다. 세 가지 주요 과제는 낮은 농도의 독성 물질, 계속 증가하는 모니터링하고 정량화해야 하는 분석 물질의 수, 모든 화학 물질에 대한 분석 표준을 확보하는 데 한계가 있다는 점입니다. 이러한 변수는 분석법 개발을 복잡하게 만듭니다. 역사적으로 법의학 실험실에서는 미지의 물질을 식별하고 정량화하기 위해 주로 SQ GC/MS에 의존해 왔습니다.¹ 최근에는 액체 크로마토그래피(LC)로 분석 가능한 화합물을 LC/TQ 워크플로에 중점을 두고 LC/MS로 분석하고 있습니다.² 분석 성능을 극대화하기 위해 **QQQ LC/MS용 애질런트 법독성학 tMRM 데이터베이스**³가 구축되어 수동으로 분석을 개발하는 시간과 비용이 많이 드는 과정을 간소화했습니다.

휘발성 및 준휘발성 GC 분석 가능 화합물의 경우, 법의학 약물 및 독성 물질을 분석할 때 전체 스캔 수집 모드의 GC/MS가 여전히 선택되는 분석법입니다.^{4,5} GC/MS 법독성학 워크플로는 또한 GC/TQ로 활성화된 MRM 접근법의 선택성과 감도의 이점을 크게 누리고 있습니다. 따라서 이 연구의 목적은 독성학 연구자들이 스크리닝 및 정량 분석법을 구축하는 데 도움이 되는 MRM 데이터베이스를 개발하여 분석법 개발을 단순화하는 것입니다.

관련 독성 물질에 대한 MRM 전이 데이터베이스를 구축하고 성공적으로 적용하여 기존 GC/MS 접근법보다 더 높은 민감도와 신뢰도로 실제 정품 시료를 분석하는 GC/TQ 분석법을 개발했습니다.

실험

GC/TQ 분석

Agilent 7000 시리즈 QQQ GC/MS(GC/TQ)는 유도체화되지 않은 154개의 고유 화합물과 트리메틸실릴화 및 아세틸화 유도체를 포함한 176개 항목에 대한 MRM 전이를 개발하는 데 사용되었습니다. 1,803개의 MRM 전이를 개발하기 위해 GC/TQ용 Agilent MassHunter Optimizer 소프트웨어(버전 10.0 이상의 MassHunter 데이터 수집 소프트웨어와 함께 사용 가능)가 사용되었습니다.

크로마토그래피 분리는 코카인에 고정된 분석법 머무름 시간을 12.26분으로 설정한 Agilent J&W DB-5ms 캐필러리 컬럼, 30m × 0.25mm, 0.25µm(부품 번호 122-5532)를 사용하여 수행했습니다. 전체 스캔과 MRM 획득 간에 실제 사후 시료에서 독성 물질의 식별을 비교했습니다. 기기 작동 파라미터는 표 1과 같습니다.

표 1. 법의학 독성 분석을 위한 GC 및 MS 및 조건.

파라미터	값
주입구	멀티모드 MMI 주입구
모드	펄스 비분할
주입 펄스 압력	1.5분까지 25psi
분할 배출구 퍼지 유속	1.5분에서 50mL/분
주입량	2µL
주입구 온도	275°C
주입구 라이너	Agilent Ultra Inert, splitless, double taper (부품 번호 5190-4007)
컬럼	Agilent J&W DB-5ms, 30m × 0.25mm, 0.25µm (부품 번호 122-5532)
컬럼 온도 프로그램	80°C(1분 유지) 20°C/분으로 290°C까지(8분 유지) 실행 시간 19.5분
운반 가스 및 유속	헬륨, 1.027mL/분 일정 유속 코카인에 고정된 머무름 시간 12.26분
이송 라인 온도	300°C
QQQ 질량 분석기	Agilent 7000 시리즈 GC/TQ, extractor EI 이온화원 포함
전자 에너지	70eV
퀀칭 가스 헬륨	2.25mL/분
충돌 가스 질소	1.5mL/분
이온화원 온도	230°C
사중극자 온도	150°C
EM 전압 게인 모드	15
모드	dMRM MRM 전이 개발 시: 스캔(m/z 100-450), 생산 이온 스캔, MRM
튜닝	atunes.eiex.tune.xml

데이터베이스 큐레이션

MassHunter Optimizer 소프트웨어는 다음을 포함하는 MRM 전이를 개발하고 최적화할 때 사용할 수 있는 몇 가지 워크플로를 제공합니다^{6,7}:

- 스캔 데이터에서 시작
- SIM 이온에서 시작
- MRM에서 시작

데이터베이스를 개발할 때 “스캔 데이터에서 시작” 워크플로가 사용되었습니다. 이 워크플로에서는 전체 개발 프로세스를 다룹니다. 시작 GC 수집 분석법은 독성 물질의 성공적인 GC 분석을 위해 최적화되었습니다. 스캔 데이터에서 시작 워크플로에서 MS는 전체 스캔 모드로 작동시켜 화합물 식별 및 전구 이온 선택을 위한 스캔 데이터 파일을 얻었습니다. 이때 100ms의 스캔 시간으로 m/z 100-450 범위에서 스캔을 수행했습니다.

“스캔 데이터에서 시작” 워크플로에는 순차적으로 실행되는 다음 단계가 포함됩니다.

1. 표적 화합물을 식별하기 위한 전체 스캔 데이터의 수집 또는 가져오기
2. 전구 이온 식별
3. 생성 이온 식별
4. 충돌 에너지 최적화

먼저 약물, 독극물, 농약, 오염물질 및 그 대사산물에 대한 질량 스펙트럼 라이브러리를 검색하여 표적 화합물을 식별하는 데 Agilent MassHunter Unknowns Analysis 소프트웨어를 사용했습니다.⁸ 식별된 화합물의 디콘볼루션 스펙트럼을 MassHunter 라이브러리 편집기로 내보내 176개의 표적 항목으로 구성된 스펙트럼 라이브러리를 생성했습니다.

다음으로 GC/TQ용 MassHunter Optimizer에서 MRM 개발을 수행했습니다. 첫 번째 단계는 앞서 설명한 대로 MassHunter 라이브러리 편집기를 사용하여 생성한 스펙트럼 라이브러리와 비교하여 디콘볼루션 스펙트럼의 라이브러리 검색을 사용하여 분석 물질을 식별하는 것입니다. 이를 통해 컬럼 블리딩 또는 동시 용리 분석물질 또는 매트릭스 간섭과 같은 크로마토그래피 간섭이 있는 경우에도 표적 분석물질을 올바르게 식별하고 전구 이온을 안정적으로 선택할 수 있습니다.

전구 이온 식별, 생성 이온 식별, 충돌 에너지 최적화 등 MRM 개발의 다음 세 단계는 MassHunter Optimizer에서 수행되었습니다. 이러한 단계는 사용자 개입 없이도 고도로 자동화할 수 있습니다. 또는, 이 작업에서 수행한 것처럼 다음 단계로 진행하기 전에 각 단계의 결과를 검토할 수 있습니다.

MRM 개발과 충돌 에너지 최적화가 완료된 후 1,803개의 MRM 전이가 CSV 파일로 내보내졌습니다.

데이터베이스 사용 방법

이 연구에서 생성된 데이터베이스를 사용하여 Agilent GC/TQ로 dMRM 데이터 수집 분석법 생성을 간소화할 수 있습니다. GC/TQ용 MassHunter Optimizer를 사용하면 이후 설명하는 대로 분석법 생성 프로세스를 간소화할 수 있습니다. MassHunter Optimizer는 MassHunter GC/MS Data Acquisition 버전 10.0 이상에 자동으로 함께 설치됩니다. 데이터베이스는 CSV 파일로 다운로드하여 컴퓨터에 저장해야 합니다.

데이터베이스를 사용하여 데이터 수집 분석법을 생성하는 방법은 다음과 같이 간단하게 설명할 수 있습니다:

1. MassHunter 데이터 수집 소프트웨어에서 표 1에 제공된 조건으로 GC/MS 데이터 수집 방법을 생성하여 저장하고, 머무름 시간을 12.26분으로 코카인에 고정합니다. 코카인 표준을 사용할 수 없는 경우, 이 분석법은 해당 머무름 시간에 데이터베이스에 포함된 다른 화합물로 머무름 시간을 고정할 수 있습니다.
2. MassHunter Optimizer의 **Setup(설정)**에서 1단계에서 생성한 수집 분석법과 유지될 GC 파라미터를 지정합니다 (그림 1).
3. **Setup(설정)**에서 화합물 정보 가져오기 섹션의 **CSVFile**을 클릭하고 데이터베이스를 지정합니다(그림 1).

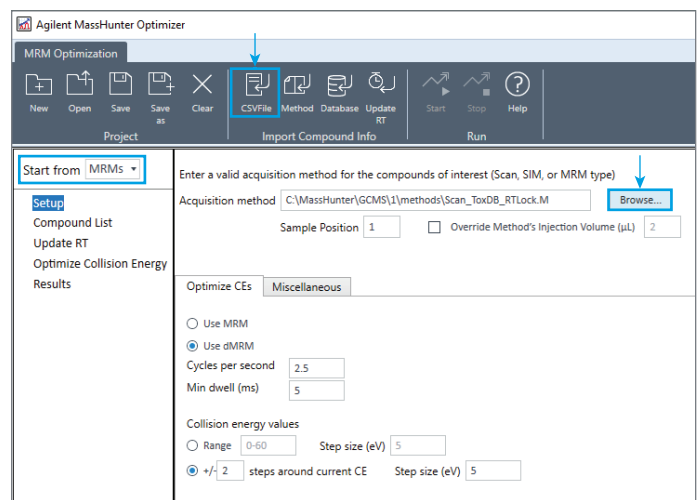


그림 1. GC/TQ용 Agilent MassHunter Optimizer Setup(설정) 창.

4. 화합물 정보 가져오기가 완료되면 그림 2와 같이 176개의 모든 항목이 Compound List(화합물 리스트) 탭 아래에 표시됩니다. 기본적으로 모든 화합물이 체크되어 있습니다.

Agilent MassHunter Optimizer

MRM Optimization

Project Import Compound Info Run

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.

	Compound Name	RT (min)	CAS #	Formula	Molecular Weight	Left RT Delta (min)	Right RT delta (min)	Sample Position	Injection Volume (µL)	Peak Area
1	Valproic acid, TMS	5.605	997259-55-1	C11H24O2Si	216	0.10	0.23	1	2	
2	p-Methoxyamphetamine	7.475	23239-32-9	C10H15NO	165.12	0.15	0.34	1	2	
3	Mephedrone	7.983	1189805-46-6	C11H15NO	177	0.19	0.41	1	2	
4	EME	8.251	23693-34-7	C10H17NO3	199	0.14	0.26	1	2	
5	4-Methoxyamphetamine TMS	8.438	910022-08-1	C13H23NO5i	237.42	0.11	0.21	1	2	
6	MDMA	8.525	910029-62-8	C11H15NO2	193.25	0.19	0.31	1	2	
7	Pseudoephedrine, 2TMS derivative	8.531	54965-14-9	C16H31NOSi2	309	0.14	0.14	1	2	
8	Paracetamol 2TMS	8.906	55530-61-5	C14H25NO2Si2	295	0.19	0.32	1	2	
9	Ibuprofen TMS P770	8.923	996004-55-4	C16H26O2Si	278.17	0.27	0.34	1	2	
10	Bupropion P552	8.932	34911-55-2	C13H18CINO	239.11	0.15	0.27	1	2	
11	Ibuprofen	8.961	15687-27-1	C13H18O2	206.29	0.44	0.55	1	2	
12	PMMA, N-trimethylsilyl-	8.968	997385-63-5	C14H25NOSi	251	0.10	0.10	1	2	
13	Mephedrone TMS	9.070	996008-32-7	C14H23NOSi	249	0.14	0.24	1	2	
14	Acetaminophen	9.331	103-90-2	C8H9NO2	151.17	0.20	0.37	1	2	
15	(+/-)-MDMA, N-trimethylsilyl-	9.544	997435-46-1	C14H23NO2Si	265	0.11	0.22	1	2	
16	Paracetamol TMS	9.640	41571-82-8	C11H17NO2Si	223.35	0.12	0.28	1	2	
17	Amobarbital	9.642	57-43-2	C11H18N2O3	226	0.14	0.25	1	2	
18	Pentobarbital	9.826	76-74-4	C11H18N2O3	226	0.32	0.29	1	2	
19	Pethidine	9.831	57-42-1	C15H21NO2	247.34	0.14	0.24	1	2	
20	1-(3-Chlorophenyl)piperazine	9.847	6640-24-0	C10H13ClN2	196.68	0.16	0.20	1	2	
21	Paracetamol AC	9.875	996000-18-8	C10H11NO3	193	0.20	0.54	1	2	
22	Ketamine TMS	9.938	996004-55-6	C16H24ClNOSi	309.13	0.10	0.19	1	2	
23	Secobarbital	10.079	76-73-3	C12H18N2O3	238	0.17	0.31	1	2	
24	2C-B	10.080	66142-81-2	C10H14BrNO2	259.02	0.11	0.10	1	2	
25	Pheniramine	10.182	86-21-5	C16H20N2	240.35	0.12	0.17	1	2	
26	Secobarbital 2TMS P1367	10.201	52937-71-0	C18H34N2O3Si2	382.21	0.13	0.24	1	2	
27	Norfluoxetine	10.292	130194-43-3	C16H16F3NO	295.3	0.10	0.17	1	2	
28	Bupropion-M (HO-) P632	10.318	996007-66-0	C13H18ClNO2	255.1	0.15	0.14	1	2	
29	Norketamine	10.345	65452-72-4	C12H14ClNO	223.7	0.15	0.25	1	2	
30	Caffeine	10.368	58-08-2	C8H10N4O2	194.08	0.29	0.22	1	2	
31	Fluoxetine	10.388	54910-89-3	C17H18F3NO	309.33	0.12	0.16	1	2	
32	Fluvoxamine	10.435	54739-18-3	C15H21F3N2O2	318.34	0.10	0.13	1	2	
33	Diphenhydramine P634	10.453	58-73-1	C17H21NO	255.16	0.14	0.24	1	2	
34	Ketamine	10.505	6740-88-1	C13H16ClNO	237	0.14	0.17	1	2	
170	Hydroxyzine	18.026	68-88-2	C21H27ClN2O2	374.18	0.24	0.48	1	2	
171	Clozapine	18.310	5786-21-0	C18H19ClN4	326.83	0.59	0.42	1	2	
172	Hydroxyzine, TMS derivative	18.863	959101-75-8	C24H35ClN2O2Si	446	0.26	0.28	1	2	
173	Alfentanil	19.009	71195-58-9	C21H32N6O3	416.52	0.26	0.59	1	2	
174	Clozapine-M (Nor)	19.054	910008-51-4	C17H17ClN4	312.8	0.30	0.69	1	2	
175	Naltrexone 2AC P1520	19.184	996004-31-1	C24H27NO6	425.18	0.27	0.39	1	2	
176	Alprazolam	19.296	28981-97-7	C17H13ClN4	308.77	0.26	0.60	1	2	

그림 2. 데이터베이스에서 가져온 화합물을 표시하는 GC/TQ Compound Table(화합물 표) 창에 사용되는 Agilent MassHunter Optimizer.

5. 다음으로, 수집 분석법에 포함할 화합물만 Compound Table (화합물 표)에 체크된 상태로 유지하면 됩니다. 표적 화합물만 선택된 상태로 두는 가장 빠른 방법은 화합물 표 상단의 확인란(그림 2의 파란색 화살표 표시)을 두 번 클릭하여 모든 화합물의 선택을 해제하고 수집 분석법에 포함해야 하는 화합물을 하나씩 선택하는 것입니다. Compound Table (화합물 표)은 **Compound Name**(화합물 명칭)표 헤더를 클릭하여 알파벳 순서로 정렬할 수 있습니다.

그림 3은 표적 물질이 알파벳 순서로 정렬되고 펜타닐 그룹의 화합물만 선택된 화합물 표의 예시를 보여줍니다.

6. 다른 GC 컬럼 구성 또는 오븐 프로그램을 사용하거나 시작 GC 분석법이 머무름 시간을 잠그지 않아 머무름 시간을 업데이트해야 하는 경우 **Update RT**(RT 업데이트)를 클릭합니다. MassHunter Optimizer는 사용자에게 표적 화합물이 포함된 시료 분석을 수행하라는 메시지를 표시하고 자동으로 머무름 시간을 업데이트합니다.

	<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	

그림 3. 펜타닐 그룹의 표적물질이 선택된 Compound Table(화합물 표).

7. 다음으로 분석법에 포함될 MRM 전이의 최종 목록은 결과 탭에서 검토할 수 있습니다. 기본적으로 화합물에 대해 사용 가능한 모든 MRM 전이가 선택됩니다. 데이터베이스에는 일부 표적물질에 대해 최대 12개의 MRM 전이가 있습니다. 따라서 사용자는 최종 분석법에서 화합물당 MRM 수를 제한하기 위해 선택한 표적물질에 대한 일부 전이를 선택 해제하는 것을 선호할 수 있습니다. 선택한 화합물의 MRM 전이를 검토하는 가장 빠른 방법은 선택한 화합물이 맨 위에 오도록 표를 정렬하는 것입니다. Results(결과) 표의 맨 위에 있는 회색 사각형을 두 번 클릭합니다(그림 4에서 파란색 화살표로 표시).

그러면 선택한 화합물이 맨 위에 오도록 목록이 정렬됩니다. 원하는 경우 일부 MRM 전이를 선택 해제할 수 있습니다. 그림 4에 나와 있는 예시에서, 선택된 화합물 각각에서 존재비가 가장 높은 4개의 MRM 전이는 선택되지 않은 상태로 유지됩니다. % 컬럼은 가장 높은 반응을 보인 MRM과 비교한 각 MRM의 상대적 존재비를 보여줍니다.

마지막으로, 그림 4에 표시된 Results(결과) 창에서 왼쪽 및 오른쪽 dMRM 창을 지정할 수 있습니다. 0.2분의 기본값이 적합한 시작점입니다.

Agilent MassHunter Optimizer

MRM Optimization

Start from: MRM5

Optimized MRM Transitions

Select number of top ranked transitions: All | Left RT Delta (min): 0.20 | Right RT delta (min): 0.20 | Overwrite RT Delta

Nested View

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

그림 4. MRM 전이를 보여주는 Results(결과) 표. 선택된 전이는 최종 데이터 수집 분석법에 포함됩니다.

8. 결과 표 상단의 분석법 생성하기(Create a method) 아이콘을 클릭하면 팝업 창(그림 5 참조)이 나타나 데이터 수집 방법을 저장할 수 있습니다.

개발된 MRM 수집 분석법은 시간 세그먼트 MRM 분석법 또는 dMRM 분석법으로 저장할 수 있습니다. 분석법을 저장할 때 최소 머무름 시간과 초당 사이클 수를 정의할 수 있습니다.

또는, 개발된 전이를 CSV 파일로 내보내어 MassHunter 데이터 수집 소프트웨어의 기존 GC/MS 데이터 수집 분석법으로 가져올 수 있습니다.

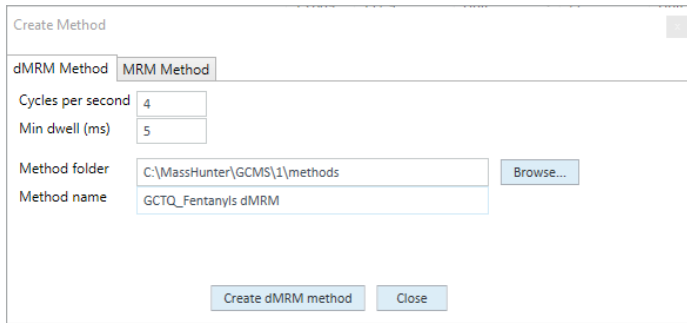


그림 5. GC/TQ용 Agilent MassHunter Optimizer로 분석법 생성.

9. 해당 분석법이 저장되면 MassHunter 데이터 수집 소프트웨어에서 열어서 검토할 수 있습니다. 그림 6에서는 화합물당 4개의 전이가 선택된 데이터베이스를 사용하여 15가지 펜타닐에 대해 생성된 분석법의 MS 구성 요소를 보여줍니다. 수집 분석법을 사용할 준비가 되었습니다.

Agilent 7000 GC/TQ 모델 E 이상 또는 7010 GC/TQ 모델 C 이상을 사용하는 경우, dMRM 분석법으로 전체 스캔 데이터를 동시에 수집할 수 있습니다. 이 모드를 활성화하려면 전체 스캔 파라미터 옆의 **Enable**(활성화)을 선택합니다(그림 6). 이 데이터 수집 모드를 사용하면 MRM 전이 외에도 전체 스캔 데이터를 수집하여 회고적 분석과 MS 스펙트럼을 통한 추가 화합물 확인이 가능하고 매트릭스 구성 요소와 소스 내 로딩에 대한 이해가 제공됩니다.

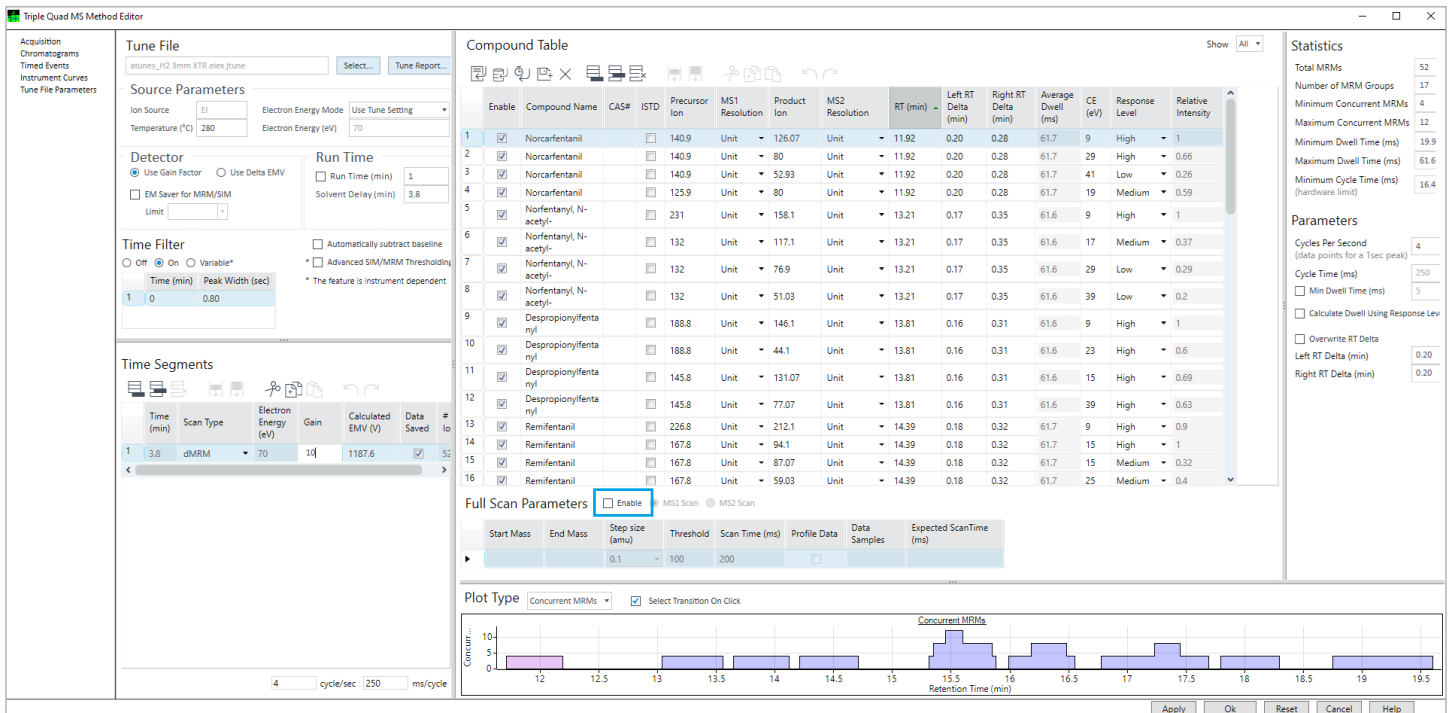


그림 6. 데이터베이스에서 생성된 분석법의 dMRM 표를 보여주는 Agilent MassHunter GC/MS 데이터 수집 소프트웨어의 Triple Quad MS 분석법 편집기 창.

결과 및 토의

법의학 GC/TQ 데이터베이스

데이터베이스는 이 응용 자료의 Appendix 1에서 CSV 파일로 다운로드할 수 있습니다.

이 연구에서 생성된 데이터베이스에는 총 176개 항목이 포함되어 있고, 여기에는 154개의 고유 화합물이 포함되어 있으며, 그 중 124개는 유도체화되지 않은 항목, 32개는 트리메틸실릴화된 항목, 20개는 아세틸화된 항목입니다(그림 7). 이 화합물에는 벤조디아제핀, 항우울제, 오피오이드 및 약물 남용이 포함됩니다. 데이터베이스 항목의 전체 목록은 Appendix 2에 나와 있습니다.

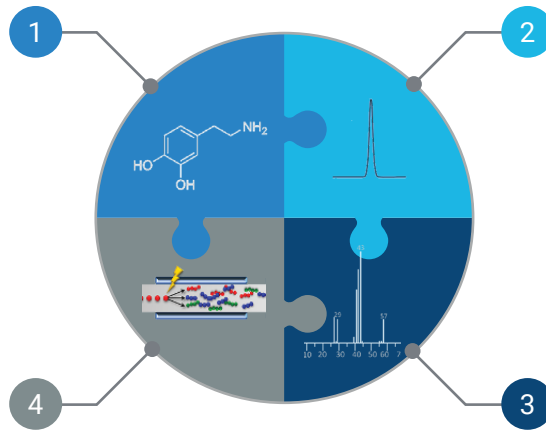
실제 시료에 대한 데이터베이스 적용

개발된 데이터베이스를 활용한 개념 증명에는 보관된 사후 혈액 시료 분석이 포함되었습니다. 전체 스캔 데이터 수집 모드와 MRM을 비교했으며, 특히 화합물 식별에 초점을 맞췄습니다. MRM 분석법은 "실험" 섹션에 설명된 대로 데이터베이스에서 생성되었습니다.

MRM 접근법을 사용하면 모든 화합물을 발견할 수 있었지만, 전체 스캔 접근법을 사용한 경우 시료에 낮은 농도로 존재하는 일부 독성 물질이 누락되었습니다. 예를 들어, MRM 접근법을 사용하면 시료에서 펜타닐이 검출되어 1.7ng/mL로 정량화되었지만, 전체 스캔 데이터 수집 모드에서는 검출되지 않았습니다(그림 8).

총 176개 항목

- 154개의 고유 화합물:
 - 124개의 유도체화되지 않은 항목
 - 32개의 트리메틸실릴화 항목
 - 20개의 아세틸화 항목



모든 항목의 머무름 시간

- 코카인에 고정된 머무름 시간
- 새로운 컬럼 또는 기기가 데이터베이스에 제공된 머무름 시간과 일치하는 머무름 시간을 가질 수 있도록 허용

1,803 MRM 전이

- 화합물당 3-12개의 전이
- 최적화된 충돌 에너지

상대 이온 존재비

- 추가 확인 및 최적의 머무름 시간 분포의 경우

그림 7. 법의학 데이터베이스에 포함된 항목과 정보의 개요.

예: 펜타닐

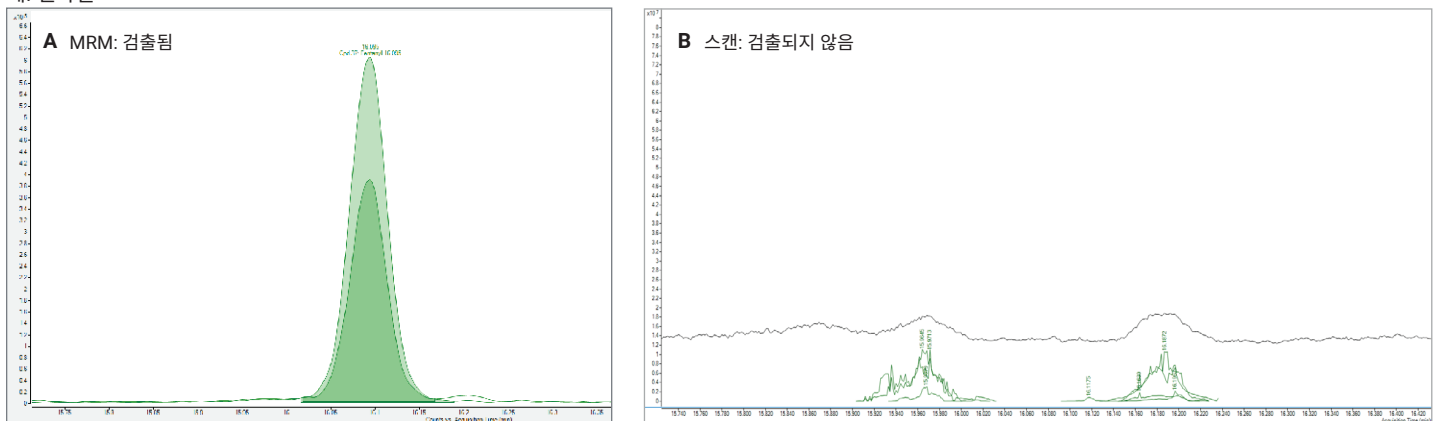


그림 8. MRM GC/TQ 데이터 수집 모드(A)에서 검출되었지만, 전체 스캔 데이터(B)의 스펙트럼 디콘볼루션 접근법에서는 검출되지 않은 보관된 사후 혈액 시료 내 펜타닐.

결론

176가지 독성학적으로 관련 있는 화합물에 대한 1,803개의 MRM 전이를 정리한 법독성학 데이터베이스가 성공적으로 개발되었습니다. 이 화합물에는 벤조디아제핀, 항우울제, 오피오이드 및 약물 남용이 포함되었습니다. 이 MRM 분석법을 실제 시료에 적용한 결과, MS/MS 접근법의 높은 감도와 선택성 덕분에 미량 수준의 독성 물질을 검출하고 정량화할 수 있는 능력이 입증되었습니다. 이 접근법은 전체 스캔 데이터 수집 모드에만 의존할 때 발생하는 한계를 해결합니다.

개발된 MRM 데이터베이스는 간소화된 데이터 수집 분석법 생성에 사용할 수 있으며, 법의학 연구실에서 스크리닝 및 정량화 방법을 개발하는 데 귀중한 리소스를 제공합니다. 개발된 MRM 큐레이션 워크플로는 데이터베이스에 새로운 화학 물질을 추가하는 데 있어 균일하고 실용적인 접근법을 제공함으로써 지속적인 확장이 가능하다는 가능성을 보여주었습니다.

부록 1

CSV 파일 형식의 데이터베이스는 [여기](#)에서 다운로드할 수 있습니다.

데이터베이스를 사용하여 데이터 수집 분석법을 생성하는 방법을 설명하는 간단한 단계는 이 응용 자료의 "데이터베이스 사용 방법" 섹션에 나와 있습니다.

부록 2

법의학 데이터베이스에 포함된 대상의 전체 목록. 명명법은 MPW 데이터베이스를 따릅니다.⁸

표 A1. 법의학 데이터베이스에 포함된 대상 목록.

화합물 명칭	CAS 번호	RT
Valproic Acid TMS	997259-55-1	5.605
p-Methoxyamphetamine	23239-32-9	7.475
Mephedrone	1189805-46-6	7.983
EME	23693-34-7	8.251
4-Methoxyamphetamine TMS	910022-08-1	8.438
MDMA	910029-62-8	8.525
Pseudoephedrine, 2TMS Derivative	54965-14-9	8.531
Paracetamol 2TMS	55530-61-5	8.906
Ibuprofen TMS P770	996004-55-4	8.923
Bupropion P552	34911-55-2	8.932
Ibuprofen	15687-27-1	8.961
PMMA, N-trimethylsilyl-	997385-63-5	8.968
Mephedrone TMS	996008-32-7	9.070
Acetaminophen	103-90-2	9.331
(+/-)-MDMA, N-Trimethylsilyl-	997435-46-1	9.544
Paracetamol TMS	41571-82-8	9.640
Amobarbital	57-43-2	9.642

화합물 명칭	CAS 번호	RT
Pentobarbital	76-74-4	9.826
Pethidine	57-42-1	9.831
1-(3-Chlorophenyl)piperazine	6640-24-0	9.847
Paracetamol AC	996000-18-8	9.875
Ketamine TMS	996004-55-6	9.938
Secobarbital	76-73-3	10.079
2C-B	66142-81-2	10.080
Pheniramine	86-21-5	10.182
Secobarbital 2TMS P1367	52937-71-0	10.201
Norfluoxetine	130194-43-3	10.292
Bupropion-M (HO-) P632	996007-66-0	10.318
Norketamine	65452-72-4	10.345
Caffeine	58-08-2	10.368
Fluoxetine	54910-89-3	10.388
Fluvoxamine	54739-18-3	10.435
Diphenhydramine P634	58-73-1	10.453
Ketamine	6740-88-1	10.505
Thiopental P565	76-75-5	10.508
Brallobarbital P812	561-86-4	10.553
2C-B TMS P1098	996006-92-5	10.742
N-Acetyl-3,4-methylenedioxymethamphetamine	181765-92-4	10.864
Phenobarbitone 2TMS	910187-11-0	10.944
Tramadol	27203-92-5	10.977
Cyclobarbital 2TMS P1358	996005-49-6	11.020
MDEA AC P597	996003-27-1	11.066
Phenobarbital	50-06-6	11.094
Cyclobarbital	52-31-3	11.136
Ketamine-M (nor-) AC P685	996007-82-6	11.180
Levamisole	14769-73-4	11.185
Tramadol-M (HO-) -H2O P666	996006-75-6	11.201
Chlorpheniramine	132-22-9	11.236
Metoprolol	37350-58-6	11.320
Metoprolol TMS	910252-91-4	11.330
O-Desmethyl-tramadol	80456-81-1	11.364
Methadone-M (EDDP) P764	996000-24-2	11.370
Naproxen TMS	74793-83-2	11.438
Naproxen	22204-53-1	11.564
Heroin	561-27-3	11.600
Venlafaxine	93413-69-5	11.625
Fluconazole P943	86386-73-4	11.802
Propranolol, TMS Derivative	959081-18-6	11.864
Methadone	76-99-3	11.879
Norcargentanil	61085-87-8	11.916
Propranolol	525-66-6	11.999
Dextromethorphan	125-71-3	12.025
Norcocaine	18717-72-1	12.093
Venlafaxine-M (O-Desmethyl)	910048-23-6	12.111
Cannabidiol 2TMS	910233-55-5	12.148

화합물 명칭	CAS 번호	RT
Ketamine AC	910019-83-9	12.178
Amitriptyline	50-48-6	12.241
Cocaine	478-73-9	12.262
Trimipramine	739-71-9	12.327
Imipramine	50-49-7	12.399
Fluconazole, Trimethylsilyl Ether	166173-18-8	12.434
Agomelatine P568	138112-76-2	12.448
Diclofenac TMS	910107-54-9	12.524
Cocaethylene @P1013	996000-46-6	12.537
Benzoylcegonine, O-TMS Derivative	864281-94-7	12.537
Nordoxepin	1225-56-5	12.549
Moclobemide	71320-77-9	12.615
Mirtazapine	61337-67-5	12.627
Diclofenac	15307-86-5	12.634
Desomorphine	427-00-9	12.636
Norcocaine TMS	910160-82-6	12.646
Pentazocine	359-83-1	12.657
Melitracen	5118-29-6	12.682
Bisoprolol TMS	910251-41-1	12.725
Promethazine	60-87-7	12.731
Mianserin-M (nor-) P606	996002-24-5	12.769
Delta-9-tetrahydrocannabinol, TMS Derivative	55449-68-8	12.879
Pentazocine AC	910038-20-9	12.916
Maprotiline-M (Nor)	910068-96-1	13.021
Oxazepam	604-75-1	13.037
Reboxetine	98769-81-4	13.044
Prothipendyl	303-69-5	13.148
Maprotiline	10262-69-8	13.168
Norfentanyl, N-acetyl-	997469-16-3	13.209
Desomorphine AC	910171-95-8	13.216
Cannabidiol	13956-29-1	13.247
Sertraline P935	79617-96-2	13.268
Dosulepin	113-53-1	13.402
Cannabidiol 2AC P1439	996000-64-9	13.419
Cannabinol TMS P1367	996004-53-2	13.437
Citalopram	59729-33-8	13.439
Codeine	76-57-3	13.484
Dihydrocodeine	125-28-0	13.505
Lorazepam	846-49-1	13.527
Clomipramine P995	303-49-1	13.528
U-47700	82657-23-6	13.543
Tetrazepam	10379-14-3	13.630
Codeine, TMS Derivative	74367-14-9	13.642
Ethylmorphine	76-58-4	13.697
Citalopram-M (Nor)	910126-73-7	13.698

화합물 명칭	CAS 번호	RT
Diazepam @P799	439-14-5	13.738
Clomipramine-M (nor-) P908	303-48-0	13.782
Despropionylfentanyl	39742-60-4	13.809
Flurazepam-M (Desalkyl)	2886-65-9	13.837
Cannabinol, Acetate	997724-40-7	13.887
Hydrocodone	125-29-1	13.912
Morphine, 2TMS Derivative	55449-66-6	13.918
Acetyldihydrocodeine	3861-72-1	13.989
Hydromorphone	466-99-9	14.060
Acetylcodeine	6703-27-1	14.194
Chlorpromazine	50-53-3	14.202
Nordazepam	1088-11-5	14.282
N-Acetylnorcocaine	0-00-0	14.294
Clotiazepam	33671-46-4	14.294
Levomepromazine	60-99-1	14.300
6-Monoacetylmorphine	2784-73-8	14.357
Cannabinol	521-35-7	14.362
Remifentanyl	132875-61-7	14.389
Oxycodone, Acetate	997736-63-7	14.394
Ethylmorphine, Acetate	997731-61-8	14.445
11-Hydroxy-delta-9-tetrahydrocannabinol, Bis(trimethylsilyl) Ether	997929-56-4	14.448
U-49900	67579-76-4	14.450
6-Monoacetylmorphine TMS	910138-32-8	14.466
O ⁶ -Acetylmorphin, TMS Derivative	997830-22-7	14.478
Oxycodone	76-42-6	14.524
Clobazam	22316-47-8	14.568
Benzoylcegonine	519-09-5	14.768
AH-7921	55154-30-8	14.830
Paroxetine	61869-08-7	14.883
Midazolam	59467-70-8	14.906
Temazepam	846-50-4	14.921
Loxapine @P1074	27833-64-3	14.957
Hydromorphone AC	910018-11-0	15.001
Delorazepam	2894-67-9	15.047
Flunitrazepam	1622-62-4	15.066
Diacetylmorphine	561-27-3	15.162
Quetiapine-M (N-dealkyl-) P876	996006-43-8	15.197
Bromazepam	1812-30-2	15.336
Prazepam	2955-38-6	15.394
4-Fluoroisobutyrylfentanyl II	910264-33-4	15.452
Acetylfentanyl	3258-84-2	15.542
Para-fluorofentanyl	90736-22-4	15.631
11-Nor-delta-9-tetrahydrocannabinol Carbocyclic Acid 2TMS	910035-82-4	15.713

화합물 명칭	CAS 번호	RT
Naloxone	465-65-6	15.910
Clotiapine P1173	2058-52-8	15.958
Fentanyl	437-38-7	16.211
para-Fluorobutyryl Fentanyl	244195-31-1	16.301
Olanzapine	132539-06-1	16.353
Flurazepam	17617-23-1	16.582
Nitrazepam	146-22-5	16.742
Naloxone, O,O'-Diacetyl-	997851-29-6	16.840
Ocfentanil	101343-69-5	17.018
Zolpidem	82626-48-0	17.034
Tiapride	51012-32-9	17.055
Papaverine	58-74-2	17.326
Cyclopropyl Fentanyl	910257-05-5	17.465
Clonazepam	1622-61-3	17.799
Valeryl fentanyl	122882-90-0	18.006
Naltrexone	16590-41-3	18.011
Hydroxyzine	68-88-2	18.026
Clozapine	5786-21-0	18.310
Hydroxyzine, TMS Derivative	959101-75-8	18.863
Alfentanil	71195-58-9	19.009
Clozapine-M (Nor)	910008-51-4	19.054
Naltrexone 2AC P1520	996004-31-1	19.184
Alprazolam	28981-97-7	19.296

참고 문헌

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.; Bruijn, 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. QQQ LC/MS 용 법독성학 tMRM 데이터베이스 <https://www.agilent.com/ko-kr/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 응용 자료*, 발행 번호 **5994-6889EN, 2023**.
5. Lokits, K.; Willey, A. 법의학 길거리 약물 분석을 위한 수소 운반 가스 및 Agilent HydroInert 소스 평가 *Agilent Technologies 응용 자료*, 발행 번호 **5994-6982KO, 2023**.
6. Andrianova, A.; Liu, H.; Graettinger, A.; Churley, M. GC/TQ용 Agilent MassHunter Optimizer를 이용한 미국 EPA 분석법 8270을 따른 자동화된 MRM 분석법 개발. *Agilent Technologies 응용 자료*, 발행 번호 **5994-2086KO, 2020**.
7. Andrianova, A.; Liu, H.; Graettinger, A. GC/TQ용 Agilent MassHunter Optimizer를 이용한 대마초 내 농약 분석을 위한 자동화된 MRM 분석법 개발. *Agilent Technologies 응용 자료*, 발행 번호 **5994-2087KO, 2020**.
8. Maurer, H. H.; Pfleger, K.; Weber, A. A. Mass Spectral Library of Drugs, Poisons, Pesticides, Pollutants, and Their Metabolites, **2007** (3rd Edition).

www.agilent.com

연구용으로만 사용하십시오. 진단 용도로는 사용하지 않습니다.

RA45433.6567824074

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2024
2024년 8월 14일 한국에서 발행
5994-7594KO

한국에질런트테크놀로지스(주)
대한민국 서울특별시 서초구 강남대로 369,
A+ 에셋타워 9층, 06621
전화: 82-80-004-5090 (고객지원센터)
팩스: 82-2-3452-2451
이메일: korea-inquiry_lsca@agilent.com