

법의학 길거리 약물 분석을 위한 수소 운반 가스 및 Agilent Hydrolnert 소스 평가

저자

Kirk Lokits 및 Alexis Willey
Agilent Technologies, Inc.

개요

의심되는 약물 시료에 규제 물질의 존재 여부를 확인하기 위한 일반적인 스크리닝 단계에서는 주요 성분을 개별 화합물로 분리할 수 있어야 합니다. 법의학 화학자들은 이러한 목적을 위해 질량 선택적 검출기(MSD)와 함께 모세관 가스 크로마토그래피(GC)를 일상적으로 사용해 왔습니다. 헬륨(He)은 역사적으로 가스 크로마토그래피/질량 분석법(GC/MS)에 운반 가스로 주로 사용된 불활성 가스입니다. 헬륨의 화학적 및 물리적 특성으로 인해 분석물질과의 상호 작용을 최소화하면서 고분리능 크로마토그래피 분리를 얻을 수 있습니다. 최근 몇 년 동안 GC 및 GC/MS 사용자를 위해 일상적으로 초고순도(UHP) 헬륨을 공급하는 데 어려움이 있었고 비용이 증가했습니다. 수소(H₂)는 GC/MS를 위한 차선택이 되었습니다. 그러나 수소는 일부 분석물질과의 반응, 감도 감소, 피크 테일링 증가, 그리고 헬륨으로 생성된 기준 스펙트럼과 비교할 때 스펙트럼 충실도 감소 등의 단점이 있습니다. 이 연구의 목적은 Agilent Hydrolnert 소스를 기존 GC/MS 시스템의 현재 법의학 워크플로에 성공적으로 통합할 수 있는지 입증하는 것입니다. 이 응용 자료에서는 Agilent Hydrolnert 소스를 적용하여 GC/MS 법의학 약물 스크리닝 분석법을 헬륨 운반 가스 사용에서 수소 운반 가스 사용으로 전환하는 과정을 간략하게 설명합니다. 이 과정에서 이러한 전환과 관련된 권장 방식과 어려움이 함께 제시됩니다.

서론

지난 10년 동안 전체 실험실 운영에 필요한 양의 UHP 헬륨을 조달하기가 어려워졌을 뿐만 아니라 UHP 헬륨 탱크의 전체 비용도 급격히 증가했습니다. 대기압 검출기를 사용하는 GC는 질소, 아르곤, 수소와 같은 대체 운반 가스를 사용하는 경우가 많습니다. 그러나 GC가 고진공 하에서 MS에 결합되면 이온 분자의 평균 자유 경로, 불활성, 진공, 낮은 백그라운드 및 높은 감도를 기반으로 하는 파라미터가 수면 위로 떠오릅니다. 이러한 파라미터의 견지에서 질소와 아르곤은 한계가 있기 때문에 수소가 실용적인 대안입니다. 하지만 수소의 경우에도 GC/MS 분석가가 수소 운반 가스 시스템으로 전환해야 하는 긴급성을 재고하게 만드는 단점이 있습니다. 이 연구는 알려지지 않은 요인 중 일부를 줄이고 HydroInert 소스와 수소 운반 가스를 사용하여 불법 길거리 약물을 선별하고 식별하기 위한 효과적인 기반을 제공합니다.

수소 분석법으로 전환하고 컬럼 구성을 선택하는 첫 단계 중 하나는 GC/MS 시스템이 효과적이고 안전하게 처리할 수 있는 수소의 유량을 결정하는 것입니다. 터보 펌프에 권장되는 최대 수소 컬럼 유량은 ~2.0mL/min이며, 수소 운반체 또는 추출기 소스에는 확산 펌프가 지원되지 않습니다.¹ 수소는 헬륨만큼 점성이 있지 않아 헬륨과 유사한 유량을 생성하기 위해

더 낮은 헤드 압력이 사용됩니다. 이로 인해 일반적으로 더 작은 직경, 더 두꺼운 필름, 더 긴 길이 또는 세 가지 모두의 다양한 조합을 갖춘 컬럼으로의 변경이 이루어집니다. 이상적으로, 컬럼 상 비율을 원래 헬륨 분석법에서 새로운 수소 분석법으로 전달할 수 있다면 유사한 크로마토그래피 패턴과 분석물질 용리 순서가 얻어질 것입니다.² 그러면 관심 분석물질의 용리 순서나 공통 간섭의 분리를 결정하고 다시 이해할 필요가 없습니다. 최적의 MS 감도를 위한 유량 범위는 일반적으로 0.8~1.2mL/min입니다.¹ 이러한 파라미터 변경을 지원하기 위해 애질런트는 컬럼 치수를 변경하려고 할 때 결과적인 유량과 컬럼 파라미터를 결정하는데 도움을 주는 온라인 도구를 제공합니다. 애질런트 압력 유량 계산기 및 분석법 변환기 도구를 애질런트 웹사이트에서 무료로 다운로드할 수 있으며, Agilent OpenLab 소프트웨어 또는 Agilent MassHunter Acquisition 소프트웨어에서도 사용할 수 있습니다.

성능을 최적화하기 위해 애질런트는 수소를 운반 가스로 사용할 때 소스 버전에 따라 9mm(또는 6mm) 드로아웃 또는

추출기 렌즈를 소스 본체에 설치할 것을 권장합니다.¹ 열, 수소의 존재 및 금속 소스 성분이 결합되어 소스 내 반응이 일어날 수 있습니다. 드로아웃 또는 추출기 렌즈의 구멍을 확장하면 렌즈의 표면적이 줄어들고 금속 표면에서 분석물 반응이 발생할 가능성을 줄이는 데 도움이 됩니다. 애질런트 스테인레스 스틸, 불활성 및 불활성 추출기 소스에는 대부분의 헬륨 응용 분야에 표준으로 3mm 렌즈가 함께 제공됩니다. 표 1에는 기존 기기의 소스 유형에 따라 다양한 렌즈에 대한 각각의 애질런트 품목 번호가 나열되어 있습니다. 또한 HydroInert 소스는 독점적인 재료를 사용하여 촉매 활성과 소스의 테일링을 줄여 반응성을 최소화합니다. 수소 운반체를 사용할 때의 일반적인 내부 반응의 예는 그림 1에 설명된 것처럼 수소화 반응으로 니트로벤젠이 아닐린으로 전환되는 것입니다. 구조적 유사성과 원소 조성으로 인해 두 스펙트럼 모두에서 유사한 이온 조각이 발견되지만 이온 비율이 다르기 때문에 라이브러리 매치 스코어(LMS)에 문제가 발생합니다. 이 반응은 9mm 드로아웃 렌즈나 추출기 렌즈를 사용해도 지속됩니다.

표 1. 드로아웃 및 추출기 렌즈에 대한 애질런트 소스별 품목 번호입니다.

소스 설계	품목 번호		
	3mm	6mm	9mm
스테인레스 스틸 소스 - 드로아웃	05971-20134	G3163-20530	-
불활성 소스 - 드로아웃	G2589-20100	G2589-20045	G3440-20022
불활성 추출기 소스 - 추출기	G3870-20444	G3870-20448	G3870-20449
HydroInert 소스 - 추출기	G7078-20906	G7078-20908	G7078-20909

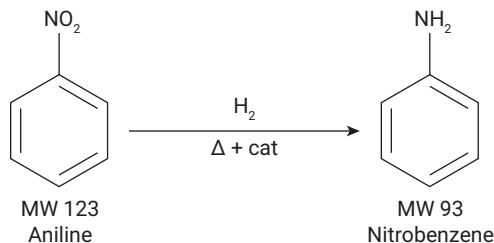


그림 1. 니트로벤젠의 아닐린에 대한 수소화 내부 반응.

그러나 그림 2에서 볼 수 있듯이 Hydrolnert 소스의 개선으로 인해 소스 내 수소화 반응이 최소화되어 니트로벤젠에 대한 스펙트럼 충실도가 증가하고 테일링이 감소하며 LMS가 더 높아집니다. 불활성 추출기와 Hydrolnert 소스 간의 스펙트럼 차이를 보여주는 또 다른 예가 두 가지 일반적인 남용 약물에 대한 그림 3과 4에 나와

있습니다. LMS의 변동 정도는 화합물과 소스에 따라 다릅니다. Hydrolnert 소스는 6mm 및 3mm 추출기 렌즈를 수용할 수 있으므로 표적 분석물질의 신호대 잡음비(S/N)를 높일 수 있지만 다른 화합물과 반응할 가능성도 높아집니다.¹ 권장되는 9mm 추출기 렌즈와 비교하여 표적 화합물의 반응 및 반응성을 기반으로 최상의

구성을 결정하려면 더 많은 테스트를 수행해야 합니다. 비반응성 Hydrolnert 소스를 기반으로, 헬륨이 일상적으로 사용되는 여러 응용 작업이 Hydrolnert 소스를 사용하는 수소 운반 가스 조건으로 개발되었습니다.^{3~6}

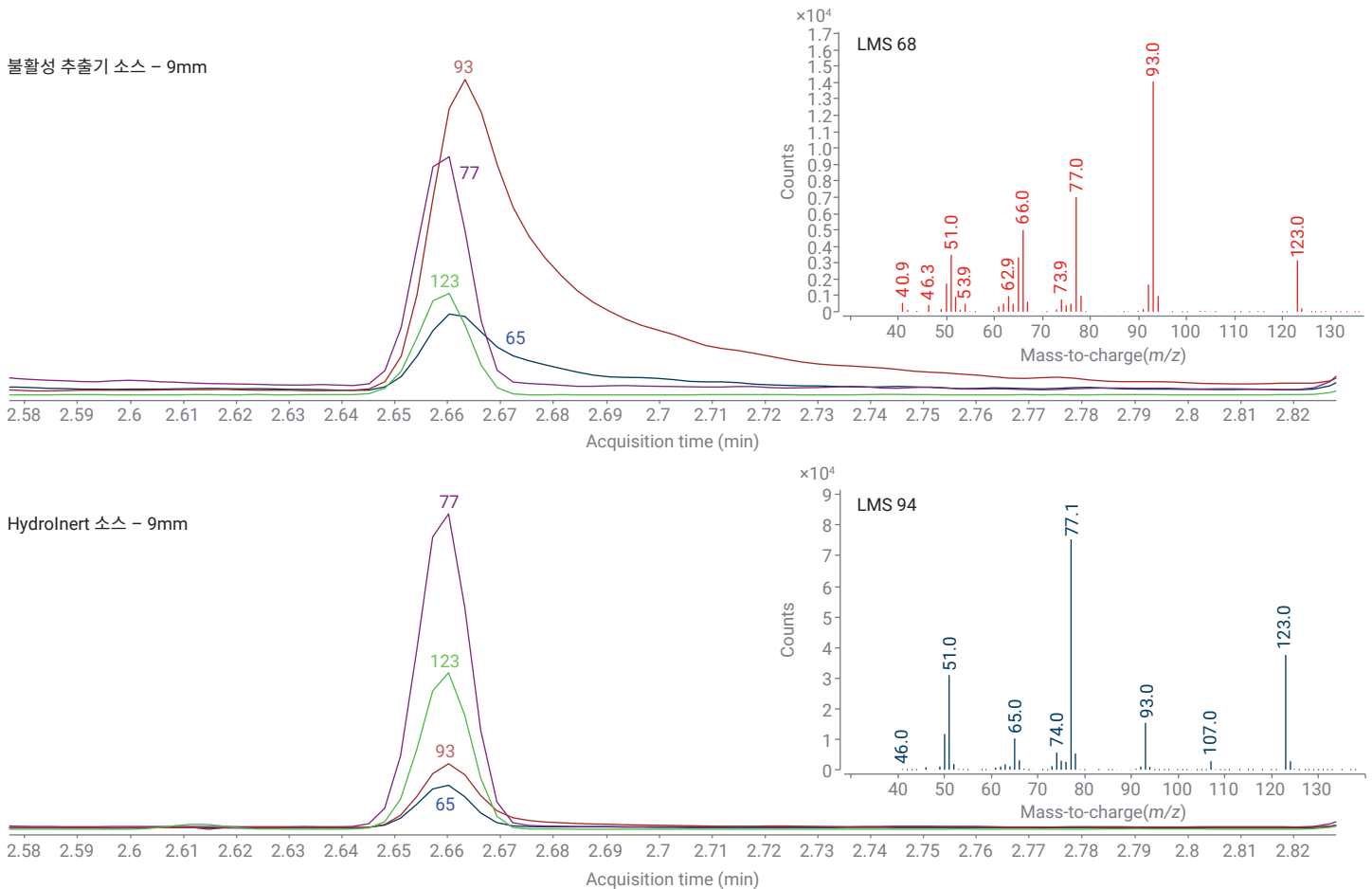


그림 2. 수소 운반 가스 사용 시 애질런트 불활성 추출기 소스와 Hydrolnert 소스에서 생성된 니트로벤젠 스펙트럼(NIST20 라이브러리 검색 결과에 기초한 LMS).

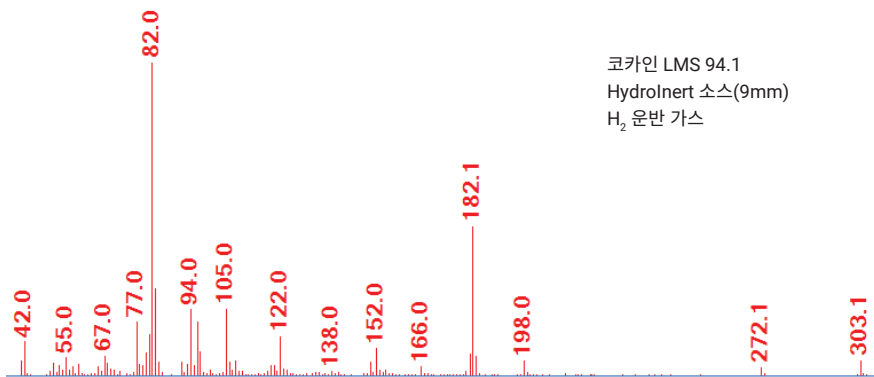
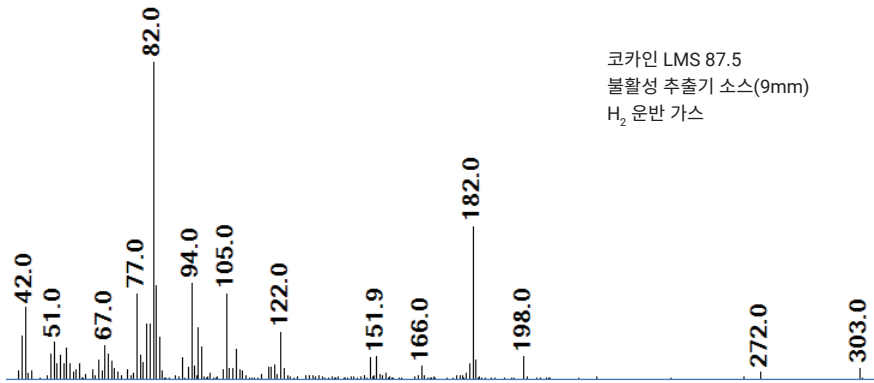


그림 3. 수소 운반 가스 사용 시 애질런트 불활성 추출기 소스와 Hydrolnert 소스에서 코카인의 스펙트럼 차이.
(컬럼에서 1ng, atune, 디콘볼루션 추출 스펙트럼, NIST20 라이브러리)

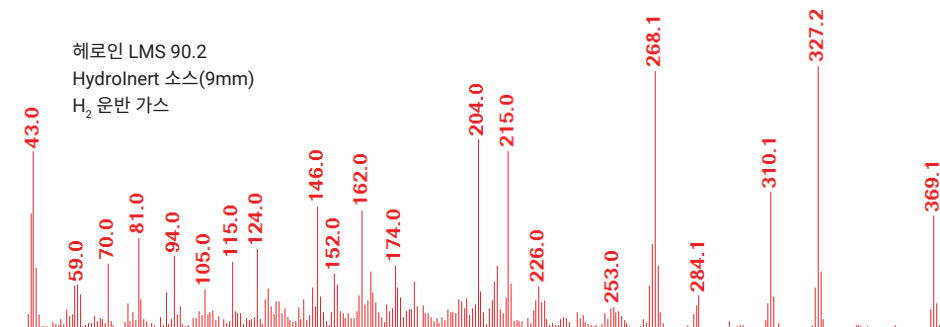
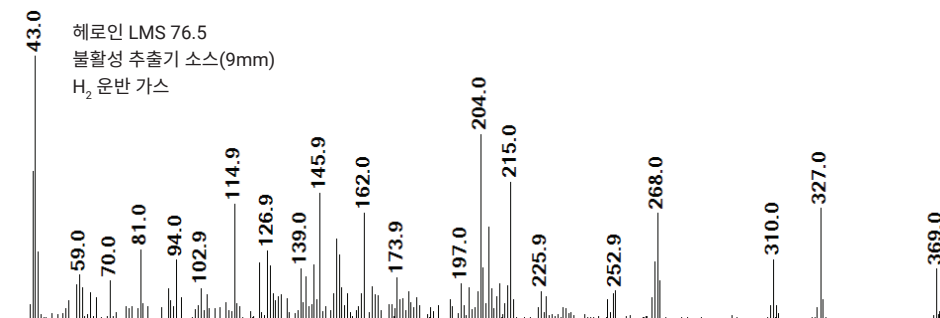


그림 4. 수소 운반 가스 사용 시 애질런트 불활성 추출기 소스와 Hydrolnert 소스에서 헤로인의 스펙트럼 차이
(컬럼에서 1ng, atune, 디콘볼루션 추출 스펙트럼, NIST20 라이브러리)

이 연구에서는 기존 Agilent 5977B GC/MSD 및 Agilent 8890 GC 시스템에 Hydrolnert 소스를 적용하여 약물 스크리닝 분석법을 헬륨 운반 가스 사용에서 수소 운반 가스 사용으로 전환하는 과정을 간략하게 설명합니다. 약 120개의 법의학 길거리 약물 시료를 ~120개의 추가 약물 표준물질과 함께 수소 분석법으로 분석했습니다. GC/MS 데이터 수집은 Agilent MassHunter 수집 소프트웨어로 제어했으며 데이터 분석은 디콘볼루션을 사용하여 MassHunter Unknowns Analysis 소프트웨어에서 수행했습니다. LMS ≥ 70을 생성한 성분 식별에 NIST20 및 SWGDRUG 3.8 질량 스펙트럼 라이브러리를 사용했습니다.

수소 조건에서 가스 크로마토그래피/질량 분석 파라미터

고성능 터보 펌프가 장착된 5977B GC/MSD 시스템이 MS로 사용되었습니다. 수소의 펌핑 용량은 헬륨의 약 절반이므로 컬럼 선택과 달성 가능한 선형 속도가 제한됩니다 (수소의 평균 선형 속도는 30~55cm/s). 분석법 개발 프로세스를 최소화하기 위해 애질런트 분석법 변환기 도구를 사용하여 기존 약물 스크리닝 분석법을 헬륨 운반 가스 사용에서 수소 운반 가스 사용으로 전환했습니다. 그림 5는 분석법 변환에 필요한 프로세스와 결과적인 파라미터 계산을 보여줍니다. 헬륨에서 수소로의 유량 변환으로 유량이 1.2mL/min의 수소 (빨간색 상자)로 증가되었습니다. 이는 최적 MS 유량의 상한이며 수소의 평균 선형 속도를 초과했기 때문에 유량을 1.0mL/min으로 감소시켰습니다. 오븐 승온 속도는 각각 33°C/min과 44°C/min으로 변환되었습니다. 그러나 초기에 용출되는 페네틸아민과 나중에 용출되는 특정 아편류, 벤조디아제핀 및 부프레노르핀의 분리능을 최적화하기 위해 초기 오븐 온도를 55°C로 낮추고 두 번째 오븐 승온 속도를 40°C/min으로 줄였습니다. 이러한 변경으로 인해 표 2에 표시된 것처럼 최종 실행 시간은 10.23분이었습니다. 원래의 분석법 변환에서 경미하게 벗어난 변경이 있었지만 분석법 변환기 도구를 사용한 결과 시행착오 방식의 주입에 들었을 시간을 몇 시간(또는 며칠까지) 절약할 수 있었습니다. 수소 분석법이 완결된 후에 펜시클리딘 (PCP)에 대한 머무름 시간 고정(RTL)은 5.94분이었습니다. 두 분석법에 대한

데이터는 8890 GC 분할/비분할 주입구 (비 불활성)에서 생성되었으며 Agilent J&W DB-5ms Ultra Inert(UI) 20m×0.18mm, 0.18µm 분석 컬럼(품목 번호 121-5522UI)에서 수집되었습니다. 헬륨 운반체에서

획득한 MS 데이터는 3mm 추출 렌즈가 있는 불활성 추출기 소스에서 생성되었으며, 모든 수소 질량 스펙트럼 데이터는 9mm 추출기 렌즈가 장착된 HydroInert 소스를 사용하여 생성되었습니다.

Method Translator

Speed gain: 1.6599

Translate

Best Efficiency

Last file imported:

Original Method Parameters

Gas: He

Calculated Method Parameters

Gas: H2

Parameter	Original Method Parameters	Calculated Method Parameters
Length (m)	20 m	20 m
Inner Diameter (µm)	180 µm	180 µm
Film Thickness (µm)	0.18 µm	0.18 µm
Phase Ratio	249.25	249.25
Inlet Pressure (gauge)	22.324 psi	13.182 psi
Outlet Flow (mL/min)	1 mL/min	1.25 mL/min
Average Velocity (cm/s)	45.066 cm/sec	74.808 cm/sec
Outlet Pressure (abs)	0 psi	0 psi
Holdup Time	0.73965 min	0.44559 min
Outlet Velocity (cm/s)	∞ cm/sec	∞ cm/sec

Pressure Units: psi

Original Column Capacity: 0.61

Translated Column Capacity: 0.61

Apply To Method

Done

Help

Table 1: Ramp Data

#	Ramp Rate (°C/min)	Final Temp (°C)	Final Time (min)
Init		70	0
1	20	170	0
2	27	320	3.5

Total Run Time: 14.06 min

Table 2: Ramp Data

#	Ramp Rate (°C/min)	Final Temp (°C)	Final Time (min)
Init		70	0
1	33.199	170	0
2	44.819	320	2.11

Total Run Time: 8.47 min

그림 5. 헬륨 분석법을 수소 분석법으로 변환하는 애질런트 분석법 변환기 도구.

표 2. Agilent Hydrolnert 소스를 사용하는 수소 분석법에 대한 분석법 파라미터.

파라미터	값
주입 소스	자동 시료 주입기 타워/트레이
주입량	0.5~1µL
GC 분할/비분할 주입구	260°C, 분할 모드 10:1 및 20:1
주입구 라이너	애질런트 비분할 UI 프릿 주입구 라이너, 단일 테이퍼, 바닥 프릿(품번 5190-5112)
셀타 퍼지	3mL/min
온도 프로그램	55°C(0.2분 유지) 33°C/min 속도로 170°C까지 승온(0.2분 유지) 40°C/min 속도로 320°C까지 승온(2.3분 유지) 실행 시간 10.23분
분석 컬럼	Agilent J&W DB-5ms UI, 20m×0.18mm, 0.18µm(품번 121-5522UI)
컬럼 유속	1mL/min 일정 유량의 H ₂
초기 주입구 압력	9.3psi
선형 속도	66cm/s
MS 이송 라인 온도	285°C
이온화원 온도	285°C; 230°C에서 atune, etune 및 stune
사중극자 온도	150°C
스캔 범위	40~550m/z
게인	etune: 1; atune: 2; stune: 3
임계값	0
A/D 시료	2 ¹

Hydrolnert 소스 비활성화의 안정성 조정

NIST20 및 SWDRG 라이브러리를 사용하여 LMS를 비교하기 위해 atune, etune 및 stune 알고리즘에서 모든 시료 데이터와 표준물질 데이터가 생성되었습니다. 이 연구 전에 소스 온도와 분석물 반응 및 피크 모양의 초기 비교가 수행되었으며 (데이터는 제시되지 않음) atune 및 etune을 사용하여 285°C가 최적의 전체 온도인 것으로 결정되었습니다. 그러나 일부 법의학 실험실에서 사용되는 Stune은 일관성과 레거시를 이유로 230°C에서 실행되었습니다. 이 연구를 수행하는 동안 세 가지 조정 알고리즘을 모두 한 주가 시작될 때 실행하고 그 주 동안 시료를 실행했습니다.

비 Hydrolnert 소스에 대한 니트로벤젠 수소화 반응과 Hydrolnert 소스에서 나타난 환원 반응(그림 2)을 바탕으로, 50~100회 주입마다 0.5µL 니트로벤젠(0.5mg/mL)을 주입하여 소스 비활성화가 연구 기간 동안 안정되고 일관되게 유지되는지

결정했습니다. 전체적으로 1,800회 이상의 사례 시료와 표준물질 주입이 이루어졌습니다.

헬륨과 수소의 스펙트럼 충실도 및 분석물 반응 비교

앞서 언급한 바와 같이, 수소 분석법은 기존의 헬륨 분석법에서 전환한 것입니다. 모든 표준 및 사례 시료는 세 가지 조정 알고리즘에 따라 불활성 추출기 소스의 헬륨 분석법으로 실행되었습니다. 이는 LMS를 Hydrolnert 소스에서 생성된 스펙트럼과 비교할 때 알고리즘에 따라 발생할 수 있는 스펙트럼 비교 및 변화에 대한 기초를 다지기 위해 수행되었습니다.

헬륨 및 수소 환경에 따른 분석물 반응의 변동성을 확인하기 위해 일련의 사례 시료와 표준물질을 헬륨(불활성 추출기 소스) 및 수소(Hydrolnert 소스) 분석법으로 분석했으며 각각의 전자 승수 게인은 1로 설정했습니다.¹

염소화 용매가 가스 크로마토그래피/질량 분석 시스템에 미치는 영향

디클로로메탄과 클로로포름은 많은 약물과 용해되는 성질로 인해 법의학 길거리 약물 분석을 위한 시료 준비에 일반적으로 사용되는 용매입니다. 빠르고 간편한 시료 준비를 위해 분말, 잔류물 및 미량 시료를 메탄올(MeOH)로도 자주 희석합니다. 실제 시료를 반영하고 법의학 워크플로 및 시료 준비 프로세스를 재현하기 위해 36개의 메탄올 희석액과 80개의 디클로로메탄(DCM) 산/염기 추출물을 얻었습니다. 시료는 DCM 1~80 및 MeOH 1~36으로 개별적으로 확인되었습니다. 각 시료는 3회 반복 주입되었으며, Hydrolnert 소스의 각 조정 알고리즘에 따라 데이터가 생성되었습니다. 여기에 약 120개의 약물 표준 및 혼합물이 사용되었고 Hydrolnert 소스 및 GC 주입구에서 1,800회 이상 주입이 이루어졌습니다.

정확하고 재현 가능한 데이터를 유지하고 Hydrolnert 소스에 대한 유지 관리를 수행할 시기를 결정하기 위해 J&W DB-1 및 DB-5 컬럼에 대한 애질런트 테스트 표준(품목 번호 200-0310)을 채택했습니다. 8개 분석물 조성으로 컬럼의 분리능 특성, 효율성 및 불활성을 조사하고 전체 유로를 실행합니다.⁷ 테스트 표준은 각 시퀀스의 시작 부분에서 분석되었으며 니트로벤젠 표준과 함께 매 100회 주입마다 삽입되었습니다. 활성 부위나 오염된 유로가 나타나면 피크 확대, 분석물 반응 손실, 피크 테일링, 머무를 시간 이동 또는 분석물의 완전 손실이 발생할 수 있습니다.

주입 모드 차이(분할/비분할)

지역 전역의 다양한 법의학 화학자들과 개인적으로 소통한 결과, 수소 운반 가스를 사용하는 동안 비분할 모드로 불편함을 주입할 때 주입구 반응과 분해 생성물이 발생했다는 사실이 드러났습니다. 이러한 현상을 감지하기 위해 분할 모드와 비분할 모드 모두에서 헬륨 분석법으로 모르핀

(Cayman Chemical, 품목 번호 ISO60147)과 코데인(Cayman Chemical, 품목 번호 ISO60141)을 주입하고 데이터를 수소 분석법에서 수행한 동일한 주입과 비교했습니다. 헬륨 및 수소 분석법 모두 20:1 분할비의 분할 모드(컬럼에서 ~50 μ g), 비분할 모드(컬럼에서 ~1,000 μ g) 및 펄스 비분할 모드에서 실행되었으며, 동시에 1 μ L의 코데인(1mg/mL)과 1 μ L의 모르핀(1mg/mL)을 주입구에 주입했습니다. 대부분의 법의학 실험실에서는 미지 시료의 농도 수준을 모르고 한 번의 주입으로 큰 농도를 주입하는 경우가 많기 때문에 고농도를 의도적으로 사용했습니다.

결과 및 토의

헬륨 사용 시 가스 크로마토그래피/질량 분석 파라미터

분석법 변환기 도구는 원래 헬륨 분석법보다 실행 시간이 ~1.7배 빠른 수소 운반체 분석법을 생성했습니다. 그러나 운반체 유량을 최적화하고 오븐 승온 속도를 약간 조정한 후 최종 수소 분석법은 헬륨 분석법보다 ~1.4배 더 빨랐으며 유사한 용출 패턴과 피크 분리능을 유지하면서 그림 6에 나타난 대로 실행 시간을 ~3분 줄였습니다. 또한 수소 분석법은 페닐아민(암페타민, 펜터민, 메스암페타민)의 베이스라인 분리를 생성했으며, 실행이 끝나기 전에 스트리키닌과 부프레노르핀을 포착할 수 있는 적절한 실행 시간을 통해 여러 합성 아편제, 벤조디아제핀 및 펜타닐 유사체에 신뢰할 수 있는 분리능을 제공했습니다.

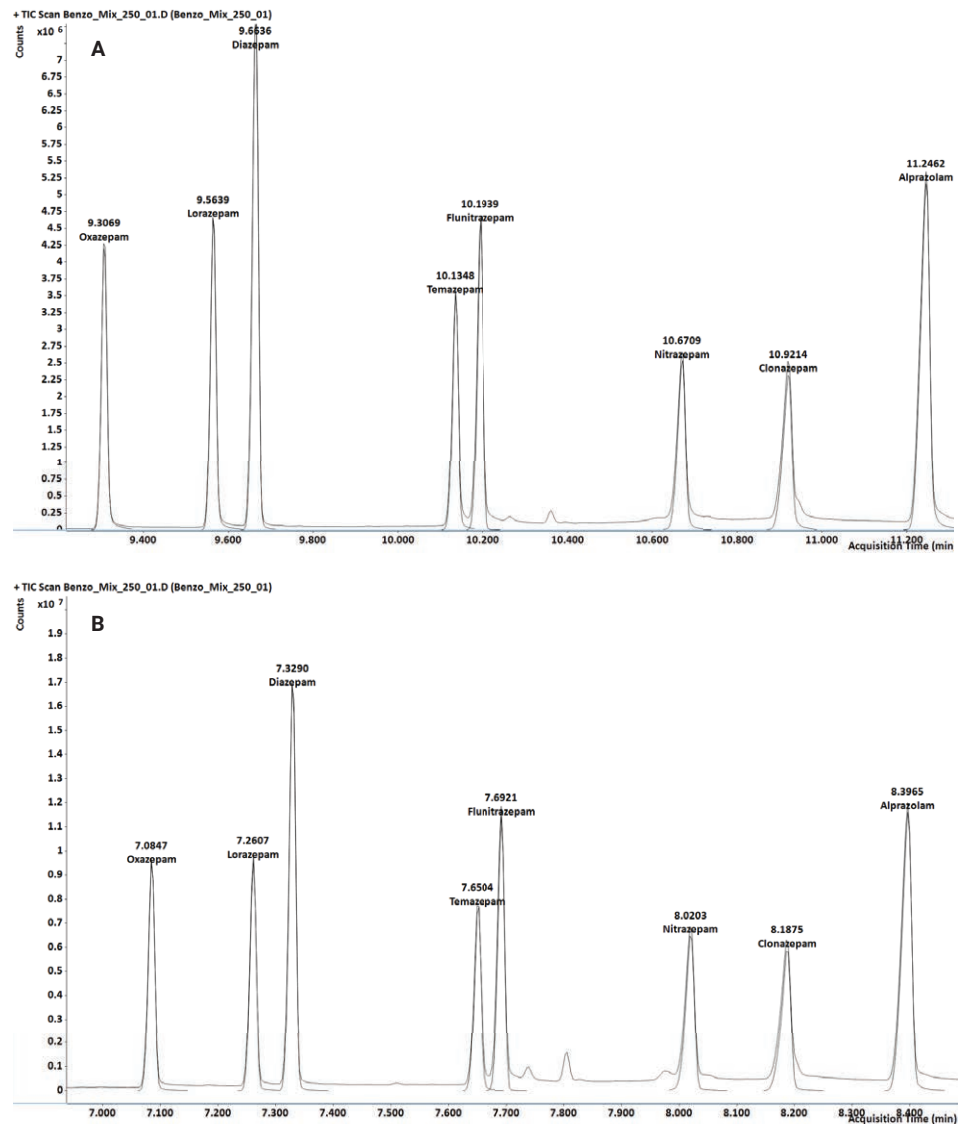


그림 6. 벤조디아제핀 혼합물(Cerilliant, 품목 번호 B-033). (A) 애질런트 불활성 추출기 소스를 사용한 헬륨 분석법의 분리능; (B) Agilent HydroInert 소스를 사용한 수소 분석법의 분리능.

Hydrolnert 소스 비활성화의 안정성 조정

이전에 설명한 대로 모든 표준물질과 사례 시료는 atune, etune 및 stune 파라미터 하에서 실행되었습니다. 일관되고 재현 가능한 결과를 생성하려면 시료를 실행하거나 검증 프로세스를 수행하기 전에 수소 운반체에서 시스템이 평형을 이루어야 합니다. 조정이 해당 조정 기준을 통과하더라도 시스템 상태(기존 시스템, 새로 구입한 시스템)에 따라 시간이 달라집니다. 이번 연구는 지난 7월에 시작되어 같은 해 11월에 완료되었습니다. 표 3에 표시된 조정 파라미터의 변화 수가 가장 적은 기간은 9월부터 11월까지였습니다. LMS와 스펙트럼 충실도가 연구 전반에 걸쳐 재현 가능했기 때문에 이것이 7월과 8월에 생성된 데이터가 무효라는 의미는 아닙니다. 그러나 조정 파라미터는 이 연구의 데이터를 기반으로 할 때 변화하고 시간이 지남에 따라 안정화됩니다. 이는 수소가 환원 가스이고 용매, 매트릭스 및 표적 분석물을 포함하여 접촉하는 모든 표면과 상호 작용하기 때문에 예상할 수 있는 내용입니다.¹

표 3. ~1,800회 주입 후 애질런트 Hydrolnert 소스에서 7개월 동안 조정 파라미터 범위.

조정 파라미터	atune	etune	stune
Repeller	34.9	4.7~0.5*	19.96
Extractor	NA	-1.9~0.4	NA
EM 전압	998~867*	912~782*	1,037~976*
동위원소 충실도**	1.3~1.1, 4.4~4.3, 10.9~9.3**	1.1~1.2, 4.4~4.6, 9.6~10.4**	1.1~1.2, 4.2~5, 9.1~12.9**
게인 계수	0.33~0.47	0.10~0.19	0.4~1.8

* 높게 시작되었으며, 7개월에 걸쳐 떨어졌습니다.

** m/z 비율은 각각 69/70, 219/220 및 502/503입니다.

Stune 알고리즘은 여러 세대의 기기에서 기본 조정 파라미터로 사용되었습니다. 그러나 Stune 알고리즘은 재현 가능한 스펙트럼 충실도와 이온 비율을 유지하면서 많은 분석물에 대한 전체적인 소스 감도를 감소시킵니다. 이 연구에서는 stune 하에서 생성된 사례 시료 데이터를 통해 모든 주요 표적 분석물을 식별했습니다. 그러나 그림 7과 8의 데이터베이스 스프레드시트에 나타난 것처럼 atune 또는 etune 알고리즘에서 생성되는 동일한 데이터와 비교할 때 반응이 낮은 분석물 중 다수가 검출되지 않았습니다. 낮은 수준의 성분을 검출하지 못하면 크로마토그램에서 검출된 다른 확인된 화합물(예: 4-ANPP, 플루오로펜타닐 이성질체 및 페네틸 4-ANPP)의 존재를 입증하는 데 도움이 되지 않을 수 있습니다.

이 연구의 모든 데이터 분석에는 디콘볼루션 기능이 있는 MassHunter Unknowns Analysis 소프트웨어를 사용했으며 LMS 컷오프는 70 이상이었습니다. 그림 7에서 검출된 모든 분석물은 atune 기준에 따라 획득한 헬륨 및 수소 분석법에 대해 LMS가 70 이상이었습니다. 메데토미딘, 플루오로펜타닐 이성질체 또는 페네틸 4-ANPP의 유무를 확인하기 위한 표준물질은 실행되지 않았지만, 이러한 분석물은 해당 머무름 시간과 함께 atune 및 etune 알고리즘으로 분석된 ~120개의 사례 시료 중 다수에서 유사하게 검출되었습니다. 각 알고리즘 유형에 대해 서로 다른 게인 계수가 사용되었습니다(표 2 참조).

				수소 운반체 데이터 세트										
시료 ID	Atune			헬륨 GC/MS 분석법		NIST20 LMS			SWGDRUG LMS					
	화합물	화합물 RT	내부 표준물질 X=DH O=PA	NIST20 LMS	SWGDRUG LMS	주입 1 일치율(%)	주입 2 일치율(%)	주입 3 일치율(%)	주입 1 일치율(%)	주입 2 일치율(%)	주입 3 일치율(%)	NIST20	SWGDRUG 3.8	
DCM_14	Caffeine	7.363	X O	99.3	98.7	99.2	99.1	99.2	98.6	98.8	98.8	99.2	98.7	0.4
	Benadryl	7.514		94	93	92.6	91.9	89.9	91.8	90.4	88.2	91.5	90.1	1.3
	Medetomidine	7.793		85.7	88.4	81.8	66.4	64.4	85.6	73.9	71.3	70.9	76.9	-6.1
	Xylazine	7.991		99.1	98.4	99.2	98.9	98.9	98.9	98.6	98.5	99.0	98.7	0.3
	Cocaine	8.830		92.9	92.6	94.6	90.8	87.7	94.9	91.7	88.2	91.0	91.6	-0.6
	4-Anilino-N-Phenethylpiperidine	9.694		89.4	86.7	90.2	87.4	85.8	89.1	86.8	87.5	87.8	87.8	0.0
	Diacetylmorphine	10.213		81.5	80.3	86.2	77.8	76.5	86.2	79.5	77.7	80.2	81.1	-1.0
	Fluorofentanyl isomer	10.364		69.8	70.7	86.9	80	76.9	87.3	80.5	76.5	81.3	81.4	-0.2
	Fentanyl	10.476		94.4	93.2	93.8	95.3	93.5	92.8	95.3	92.6	94.2	93.6	0.6
	Quinine	10.758		79.5	81.8	81	70.9	74.3	78.3	74.4	74.7	75.4	75.8	-0.4
	Phenethyl 4-ANPP	11.943		NF	85.8	NF	NF	NF	85.8	74	75		78.3	

그림 7. 감지된 분석물과 atune 기준에 따른 해당 LMS를 나열하는 데이터 스프레드시트에서 DCM 사례 시료 번호 14 항목을 추출했습니다. (NE = 항목 없음)

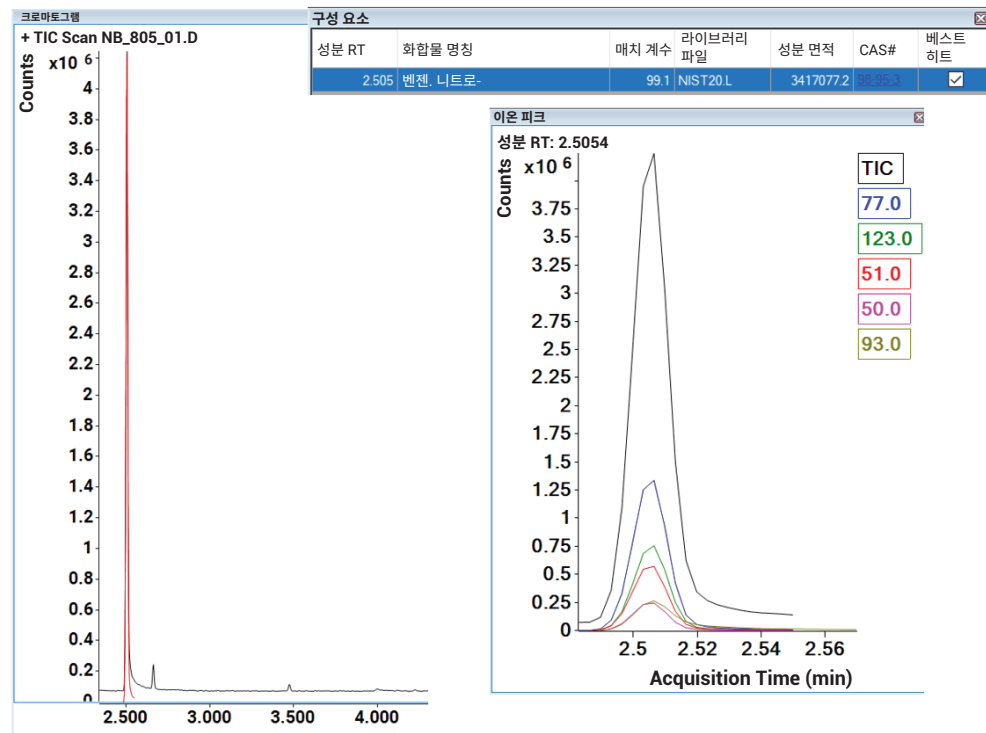
시료 ID				수소 운반체 데이터 세트												
	Stune	화합물 RT	내부 표준물질	헬륨 GC/MS 분석법		NIST20 LMS			SWGDRUG LMS			NIST20	SWGDRUG 3.8	평균	평균	차이
	화합물		X=DH O=PA	NIST20 LMS	SWGDRUG LMS	주입 1	주입 2	주입 3	주입 1	주입 2	주입 3					
						일지율(%)	일지율(%)	일지율(%)	일지율(%)	일지율(%)	일지율(%)					
DCM_14	Caffeine	7.367	X O	99.6	99.4	97.9	98	98.1	97.4	97.7	97.7	98.0	97.6	0.4		
	Benadryl	7.516		96	96	80.9	77	79.2	77.9	80.3	77.2	79.0	78.5	0.6		
	Medetomidine	7.793		71.2	74.6	ND	ND	ND	ND	ND	ND					
	Xylazine	7.994		98.4	98.8	95	93.9	96	95	93.9	95.9	95.0	94.9	0.0		
	Cocaine	8.835		92.7	93.2	ND	ND	70.6	ND	ND	69.9	70.6	69.9	0.7		
	4-Anilino-N-Phenethylpiperidine	9.698		85.5	85.7	70.2	ND	ND	70	ND	ND	70.2	70.0	0.2		
	Diacetylmorphine			ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND					
	Fluorofentanyl isomer			ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND					
	Fentanyl	10.482		94.3	93.5	85.1	84.8	86.4	85	83.4	85.4	85.4	84.6	0.8		
	Quinine	10.770		75.5	78.3	ND	ND	ND	ND	ND	ND					
	Phenethyl 4-ANPP			ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND					

그림 8. 감지된 분석물과 stune 기준에 따른 해당 LMS를 나열하는 데이터 스프레드시트에서 DCM 사례 시료 번호 14 항목을 추출했습니다. (ND = 감지되지 않음)

Hydrolnert 소스를 사용하고 실제 길거리 약물 시료를 실행할 때는 비활성화가 지속되는 시간과 시간에 따른 변화 여부는 알 수 없습니다. 이러한 질문에 대한 단기적인 대담을 결정하기 위해 수소 운반체 하에서 반응성이 있는 것으로 알려진 화합물인

니트로벤젠이 사용되었습니다. 그림 9는 약 1,400회 주입 과정에서 18회 니트로벤젠 주입의 결과를 보여줍니다. LMS 점수와 스펙트럼 데이터 검토에 기초했을 때 Hydrolnert 소스 비활성화는 연구 전반에 걸쳐 안정적으로 유지된 것으로 보입니다.

94의 가장 낮은 LMS는 라이너가 교체되기 직전에 발생했으며, 라이너 교체 후 컬럼 테스트 표준의 피크 모양과 반응 기준이 충족되지 않아 컬럼 입구가 절단되었습니다 (~6cm).



모든 조정	
H2 Hydrolnert	분석법
NIST20 LMS	주입 수
99.2	50
96.3	101
96.9	153
98.9	200
99.4	295
99.1	378
99.3	490
98.7	592
98.9	681
99.1	773
97.8	860
94	929
95.6	1031
99.4	1034
99.4	1112
98.9	1194
99.5	1268
99.5	1326

라이너가 교체됨
라이너가 교체됨
컬럼이 잘림

그림 9. 최소 LMS ≥ 94로 ~1,300회 주입 전반에 걸쳐 니트로벤젠 주입이 생성되었습니다.

헬륨과 수소의 스펙트럼 충실도 및 분석물 반응 비교

표 4와 5는 DCM 및 메탄을 추출물의 다양한 분석물로 채워져 있으며 사례 시료 데이터베이스의 스프레드시트에서 무작위로 선택되었습니다. 두 표 모두 atune, 게인 설정 1, MassHunter Unknowns Analysis 소프트웨어 디콘볼루션 및 Agile2 적분기를 사용하여 획득한 분석물을 나타내므로 데이터 수집 중 비교가 가능합니다. 헬륨 및 수소 분석법에서 애질런트 검색 알고리즘을 사용하여 동일한 화합물에 대해 NIST20과 SWGDRUG 3.8 라이브러리 사이에서 얻어진 가장 큰 LMS 변화는 2.4였습니다. Hydrolnert 소스를 사용한 수소 분석법은 대부분의 분석물에 대해 불활성 추출기 소스를 사용한 표준 헬륨 분석법과 동등하거나 더 나은 LMS를 보여주었습니다. 이전에 논의한 스펙트럼 충실도 손실과 비교하여, 불활성 추출기 수소 운반체 분석법에서 생성된 경우 Hydrolnert 소스는 상용 NIST20 또는 공개적으로 사용 가능한 SWGDRUG 3.8 라이브러리의 스펙트럼 항목 대비 스펙트럼 충실도를 유지하거나 약간 향상시켰습니다. 또한 일부 분석물은 불활성 추출기 헬륨 분석법과 비교하여 Hydrolnert 소스에서 유사한 신호 반응을 보인 반면, 다른 분석물은 불활성 추출기 소스보다 Hydrolnert 소스에서 2~3배 더 많은 반응을 보였습니다.

표 4. 3mm Agilent 불활성 추출기 소스를 사용하여 헬륨 운반 가스 분석법으로 얻은 분석물 LMS 및 반응.

분석물	NIST20 LMS	SWGDRUG 3.8 LMS	성분 면적 카운트
Meperidine	98.9	97.4	4,915,190
Methadone	95.2	92.9	5,384,547
Codeine	98.3	97.3	5,166,966
Hydrocodone	99.1	97.2	6,063,934
Oxycodone	98.5	96.9	5,248,754
4-ANPP	97.3	95.7	2,175,883
Cocaine	99.0	98.6	6,066,265
Cocaethylene	98.7	96.3	6,200,280
Benzoylcegonine	95.9	96.1	1,424,026
Ethylone	87.6	90.0	2,024,200
Buprenorphine(HCl)	98.7	97.6	11,668,192

표 5. 9mm Agilent Hydrolnert 소스를 사용하여 수소 운반 가스 분석법으로 얻은 분석물 LMS 및 반응.

분석물	NIST20 LMS	SWGDRUG 3.8 LMS	성분 면적 카운트
Meperidine	99.4	98.5	8,308,348
Methadone	96.2	93.8	8,772,967
Codeine	99.3	98.2	5,710,259
Hydrocodone	99.4	97.7	6,877,950
Oxycodone	98.5	97.6	4,282,091
4-ANPP	98	97	3,629,448
Cocaine	99.2	98.9	11,626,484
Cocaethylene	99.0	97.0	12,131,391
Benzoylcegonine	97.9	97.9	4,241,150
Ethylone	96.6	96.1	1,969,345
Buprenorphine(HCl)	99.0	97.4	12,633,590

염소화 용매가 가스 크로마토그래피/질량 분석 시스템에 미치는 영향

DCM과 같은 염소화 용매를 사용할 때 HCl이 형성될 가능성은 주입구 온도를 280°C 미만으로 유지하여 줄일 수 있습니다. 본 연구에서 수소 분석법은 주입구에 260°C 설정점을 사용했습니다. 크로마토그래피 및 스펙트럼 품질은 많은 시료에 대해 DCM을 용매로 실행해도 영향을 받지 않는 것으로 나타났습니다. 그러나 연구가 끝날 무렵 흥미로운 관찰이 이루어졌습니다. 약 1,030회 주입에서는 먼저 라이너를 교체한 후에도 크로마토그래피를 다시 얻기 위해 컬럼 입구를 잘라야 했습니다. 이는 컬럼에서 실행되는 시료 수를 기준으로 볼 때 특이한 이벤트입니다. 대면 토론에 근거했을 때, 많은 법의학 약물 화학 분석가들은 몇 달 동안 또는 수천 개의 시료가 주입구와 컬럼을 통과할 때까지 컬럼 입구를 자르지 않습니다. 이러한 초기 유지 관리 작업은 염소화 용매와 수소 운반 가스를 뜨거운 금속 주입 포트에 결합하여 HCl 또는 기타 활성 화합물을 생성한 결과일 수 있지만 이 연구에서는 이를 확인할 수 없습니다. 라이너 교체는 그림 10에 설명된 것처럼 매트릭스 및 시료 준비에 따라 약 600회 주입마다 변경되는 길거리 약물 시료에 관한 이전 연구와 일치하는 것으로 보입니다.⁷ 셉타는 애질런트의 사전 천공된 주입구 셉타(품목 번호 5183-4757)를 사용해 300~350회 주입마다 교체되었습니다.

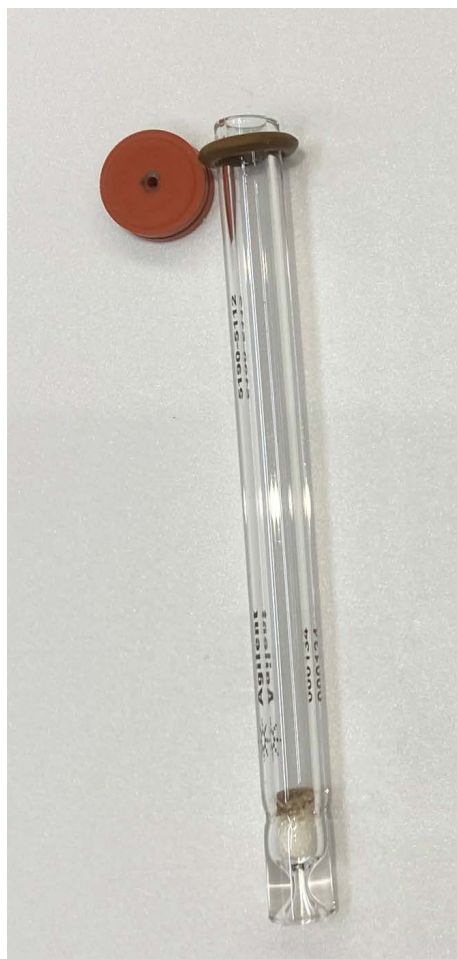


그림 10. DCM 및 메탄을 추출물로 구성된 사례 시료를 ~700회 주입한 후 Agilent UI 비분할 라이너(품목 번호 5190-5112)의 모습. 약 300~350회 주입 후 애질런트 사전 천공 주입구 셉타(품목 번호 5183-4757)를 보여줍니다.

주입 모드 차이(분할/비분할)

그림 11은 20:1 분할비의 분할 모드에서 불활성 추출기 소스(헬륨 분석법)에 코데인을 주입하여 단일 코데인 피크를 생성하는 모습을 보여줍니다. 그림 12는 동일한 시스템에 비분할 모드로 주입했을 때 추가 배경 피크와 아편 양귀비에서 발견되는 모르핀산 알칼로이드 이성질체가 생성되지만 추가 코데인이나 아편 이성질체는 생성되지 않은 것을 보여줍니다. 압력 펄스 비분할 주입 시에도 비슷한 결과가 얻어졌습니다. 그림 13은 HydroInert 소스(수소 분석법)에 대한 20:1 분할 주입을 보여주며, 헬륨 분석법 분할 모드로 얻은 결과와 동일합니다. 그러나 HydroInert 소스에서 코데인을 비분할 주입했을 때 그림 14에서 볼 수 있듯이 증가된 모르핀산 알칼로이드 이성질체 피크와 함께 큰 하이드로코돈 피크(코데인의 구조 이성질체)가 생성되었습니다. 코데인이 이성질체화 반응을 일으켜 주입구에서 하이드로코돈을 생성했을 가능성이 있습니다. 그러나 이 연구의 목적은 형성 경로의 탐구보다는 주입 모드 간의 차이점을 확인하는 것이었습니다. 압력 펄스 비분할 주입도 마찬가지로 강한 하이드로코돈 및 모르핀산 이성질체 피크를 생성했습니다. 비분할 모드로 모르핀을 HydroInert 소스에 주입하면 수소화 반응을 통해 생성될 수 있는 하이드로모르핀(모르핀의 구조 이성질체)이 생성됩니다. 비분할 모드에서 반응/형성이 이루어지는 지점을 측정하기 위한 특정한 주입구 파라미터 설정을 결정하기 위해 주입구 파라미터가 최적화되지 않았습니다. 또한 모든 분할 흐름 설정을 조사 및/또는 최적화하지도 않았습니다. 분석가는 수소 운반 가스를 사용하는 약물 분석법을 개발하고 검증할 때 주입구 반응과 소스 반응의 가능성을 알고 있어야 합니다.

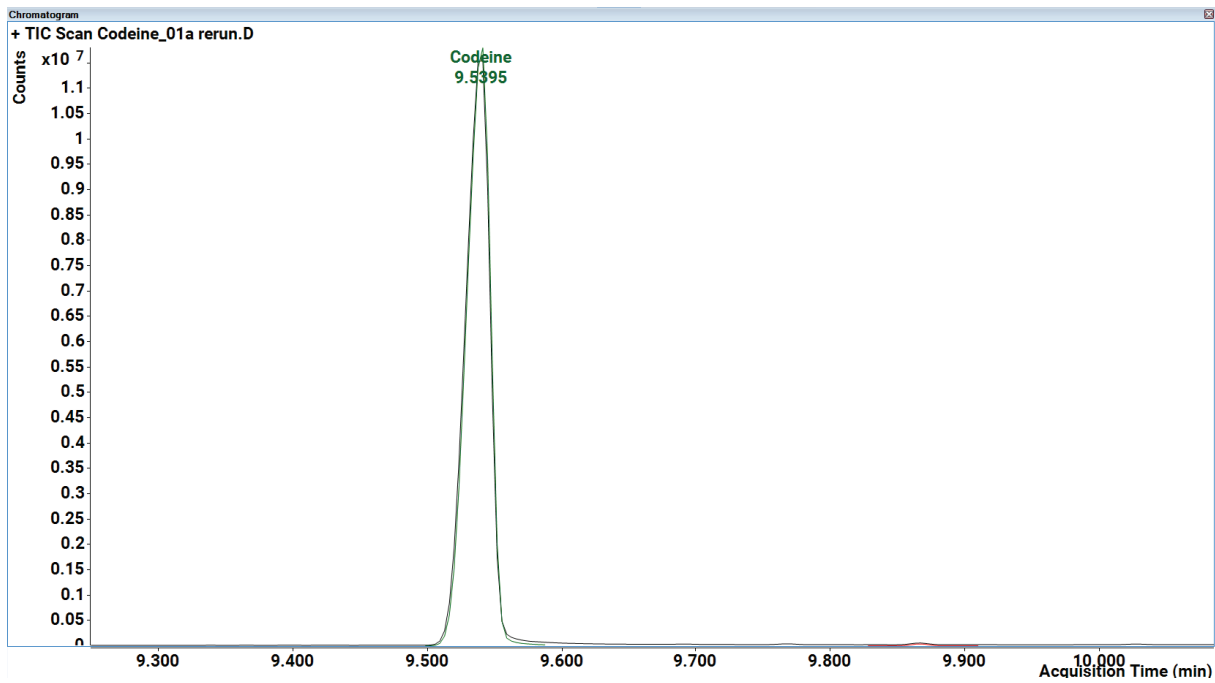


그림 11. 애질런트 불활성 추출기 소스를 사용한 헬륨 분석법에서 1mg/mL 코데인 표준물질(컬럼에 50 μ g)의 분할 주입(20:1).

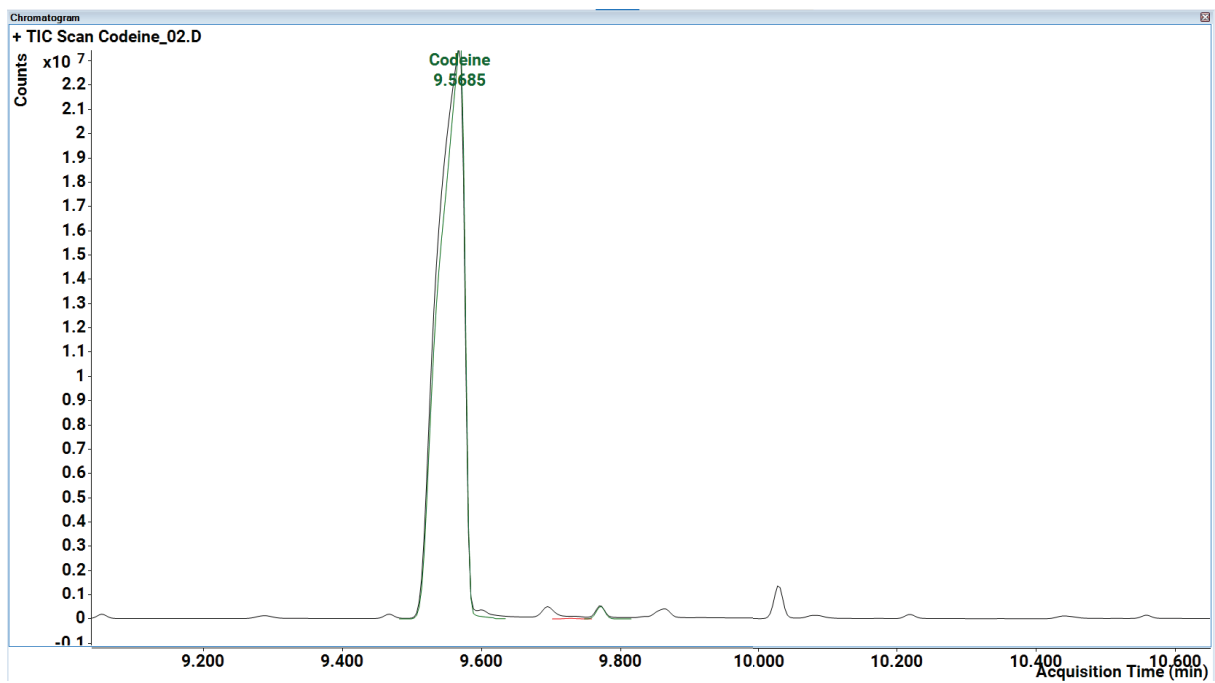


그림 12. 애질런트 불활성 추출기 소스를 사용한 헬륨 분석법에서 1mg/mL 코데인 표준물질(컬럼에 ~1,000 μ g)의 비분할 주입.

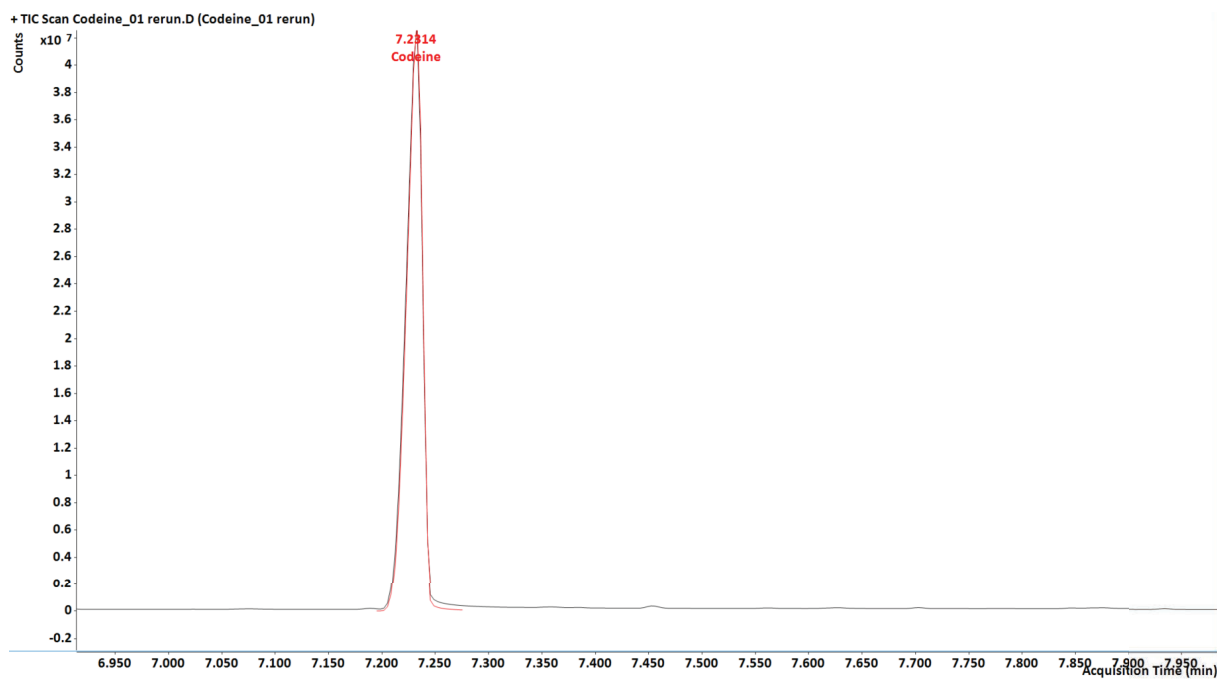


그림 13. Agilent HydroInert 소스를 사용한 수소 분석법에서 1mg/mL 코데인 표준물질(컬럼에 50 μ g)의 분할 주입(20:1).

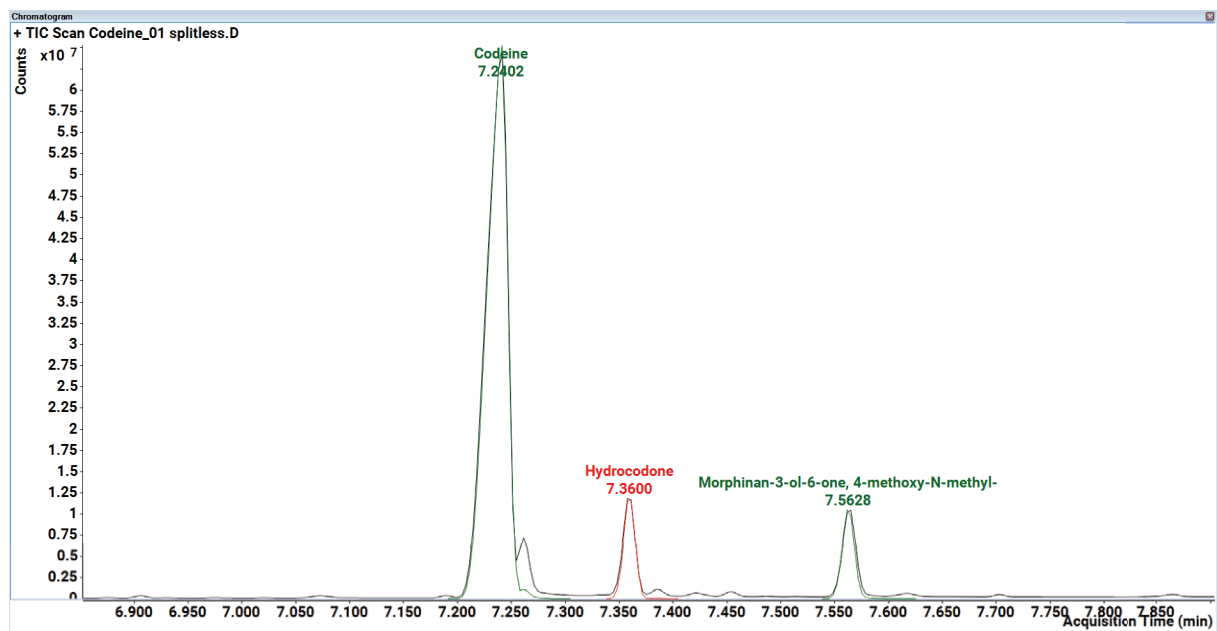


그림 14. Agilent HydroInert 소스를 이용한 수소 분석법에서 1mg/mL 코데인 표준물질(컬럼에 ~1,000 μ g)의 비분할 주입.

결론

헬륨이 운반 가스로 선호되지만, 이 연구는 Agilent Hydrolnert 소스를 사용할 경우 수소를 운반 가스로 고려할 수 있음을 보여줍니다. Hydrolnert 소스는 애질런트 불활성 추출기 시스템을 사용하는 헬륨 운반 가스 분석법과 비교할 때 많은 화합물에서 스펙트럼 충실도를 높이고 유사한 LMS를 생성하는 것으로 나타났습니다. Hydrolnert 소스는 연구 전반에 걸쳐 비활성화된 표면을 유지했으며 반응성이 매우 높은 화합물인 니트로벤젠에서 탁월한 스펙트럼 품질을 제공했습니다. 디클로로메탄과 메탄을 용매는 크로마토그래피나 전체 크로마토그래피 시스템의 안정성에 부정적인 영향을 미치지 않는 것으로 보입니다. 그러나 ~1,000회 주입 후 컬럼 입구에서 ~6cm를 자르면 대부분의 헬륨 GC/MS 시스템 환경에서 예상되는 것보다 빨리 시료 주입 시 반응이 나타나는 것을 알 수 있었습니다. 본 연구는 수소 운반 가스로 보다 성공적으로 전환하는 데 필요한 특정 MS 소스 고려 사항과 획득 파라미터를 포함하여 전반적인 모범 사례를

보여줍니다. 실제 미지 물질을 분석할 때는 수소 생성 GC/MS 데이터를 사용한 2차 직교 기법을 사용하는 것이 좋습니다. 수소 운반 가스는 용매, 시료 매트릭스 및 시료에 포함된 분석물과 반응하여 일반적이지 않은 스펙트럼을 생성하거나 크로마토그래피 시스템과 상호 작용할 위험을 항상 가지고 있습니다. 검증 프로세스를 통해 수소 GC/MS 분석법을 개발할 때 이러한 문제를 해결하기 위한 시간을 배정해야 합니다.

참고 문헌

1. Agilent EI GC/MS 기기에서 운반 가스를 헬륨에서 수소로 전환, *애질런트 사용자 가이드*, 발행 번호 5994-2312KO, **2022**.
2. 애질런트 지원 문서, <https://www.agilent.com/cs/library/support/documents/f39250232446.pdf>
3. Godina, L. 수소 운반 가스 및 Agilent Hydrolnert 소스를 사용한 조미료 및 향료 GC/MS 분석, *애질런트 응용 자료*, 발행 번호 5994-6015KO, **2023**.
4. Haddad, S. P.; Patel, S. U.; Westland, J. L. Analysis of Terpenes in Cannabis with Hydrogen Carrier Gas and the Agilent Hydrolnert Source on the Agilent 8890/5977C GC/MS, *애질런트 응용 자료*, 발행 번호 5994-6511EN, **2023**.
5. Smith, A. H. 가스 크로마토그래피/질량 분석으로 수소 운반 가스 및 Agilent Hydrolnert 소스를 사용해 준휘발성 유기 화합물 분석, *애질런트 응용 자료*, 발행 번호 5994-4890KO, **2022**.
6. Quimby, B. D.; Andrianova, A. A. 수소 운반 가스 및 Hydrolnert 이온화원을 사용하는 헤드스페이스 GC/MSD로 먹는물의 휘발성 유기 화합물 분석, *애질런트 응용 자료*, 발행 번호 5994-4963KO, **2023**.
7. Fortener, S.; Gowins, K.; Strainic, L.; Lokits, K. E. A Standard Workflow and Troubleshooting Process to Maintain and Troubleshoot the Flow Paths of the Agilent Intuvo GC and Conventional GCs, *애질런트 응용 자료*, 발행 번호 5994-6847EN, **2023**.

www.agilent.com

RA45216.3967476852

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2023
2023년 12월 20일, 한국에서 발행
5994-6982KO

한국애질런트테크놀로지스(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