Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

Ostroサンプル前処理プレートおよびCORTECS UPLCカラムを用いた法中毒学研究における全血中の合成カンナビノイド分析

Jonathan P. Danaceau, Erin E. Chambers, and Kenneth J. Fountain
Waters Corporation, Milford, MA, USA

アプリケーションの利点

- 合成カンナビノイドおよび代謝物分析のための単一汎用分析法
- 全ての分析種および代謝物に対して良好な直線性
- ほとんどの分析種に対して90%以上の回収率
- ほとんどの化合物に対してマトリックス効果15% 以下
- マススペクトルが同じ構造異性体をベースライン分離

ウォーターズのソリューション

Ostro™ サンプル前処理プレート

CORTECS™ UPLC® カラム

ACQUITY UPLC® システム

Xevo® TQD 質量分析計

キーワード

合成カンナビノイド、デザイナードラッグ、スパイス、UPLC、法中毒学、全血、サンプル前処理、CORTECSS

はじめに

合成カンナビノイド（多くの場合“スパイス”と称されるまたは商品名で販売される）は、法執行機関や法中毒ラボにとってますます大きな課題となっています。これらデザイナードラッグは天然のカンナビノイドの精神活性作用を模倣しています。通常“人が摂取するものではありません”と表示されて天然のカンナビノイドの合法代替品として市販され、その反響および利用はこの数年で大幅に上昇しています。[1, 2] 最近の法律ではこれら化合物のいくつかについて使用を禁止していますが、既存構造に微小な変更を加え、既存の法律を回避するために設計された物質が蔓延しています。本アプリケーションノートでは、法中毒学研究において全血中からいくつか異なるグループの代表的な合成カンナビノイドを良好に抽出、分析するためストラテジーについて詳述しています。効果的なサンプルクリーンアップを提供し、異なる化学的特性をもつ様々な化合物に対してジェネリックに十分使用可能な、迅速で汎用性の高いサンプル前処理ストラテジーを用いて、合成カンナビノイドおよびその代謝物 22 種類を全血サンプルから抽出しました。抽出の回収率は平均 92%で、73% から 105% の範囲となり、ほとんどの化合物に対してマトリックス効果 15% 以下でした。検量線は 2-500 ng/mL の範囲で直線性を示し、品質管理サンプルでも正確で精度の高い結果が得られました。分離には粒子径 2 µm 以下のソリッドコアパーティクルを充填した Waters® CORTECS カラムを用い、最適な性能と分離効率が得られました。これらいくつか異なるグループのドラッグについての分析から、この分析法は新規開発類縁化合物に対し、例え必要であったとしても最低限の修正で適用できると考えられます。

実験方法

UPLC 条件

システム：	ACQUITY UPLC
カラム：	CORTECS C_{18} 1.6 µm 2.1 × 100 mm （製品番号 186007095）
カラム温度：	30 ℃
注入量：	10 µL
流速：	0.6 mL/min
移動相 A：	0.1% ギ酸水溶液
移動相 B：	0.1% ギ酸アセトニトリル溶液

グラジエント：

時間（分）	%A	%B
0	70	30
2	50	50
3	50	50
7	10	90
7.2	70	30
8.0	70	30

MS 条件

質量分析計：	ACQUITY® TQD
イオン化モード：	ESI ＋
取込みモード：	MRM（トランジションは表 1 記載）
キャピラリー電圧：	1 kV
コリジョンエネルギー(eV)：	化合物毎に最適化（表 1）
コーン電圧（V）：	化合物毎に最適化（表 1）

データ管理

MassLynx® ソフトウェア

サンプル詳細

AM2233、JWH-015、RCS-4、JWH-203、RCS-8、JWH-210、JWH-073、JWH-018 は Cerilliant（RoundRock, TX）から購入しました。それ以外の全ての化合物および代謝物は Cayman Chemical（Ann Arbor, MI）から購入しました。

各ストックソリューション（1 mg/mL）はメタノール、DMSO、または 50:50　DMSO / メタノールで調製しました。全ての化合物を混合したストックソリューション（10 µg/mL）はメタノールで調製しました。ワーキングソリューションは毎日マトリックス（全血）にスタンダードを溶解して調製し、目標とする濃度を得るために一連の希釈を行いました。検量線用標準溶液は全ての分析種に対し 2-500 ng/mL の濃度範囲で、品質管理サンプルは全血中に 7.5 ng/mL、75 ng/mL、300 ng/mL の濃度で調製しました。

分析を行った 22 種類の化合物は表 1 に示しましたが、いくつか異なるグループの法医学的に関連のある合成カンナビノイド（AM1248 や AKB48 などの adamantoylindole、JWH022 などの napthoylindole、RCS-4 や RCS-8 などの phenylacetyl indole、tetramethylcyclopropylindole（UR-144、XLR11））で構成されます。JWH-073 および JWH-018 の主要な代謝物も含まれますが、そのいくつかは全く同じ質量およびプロダクトイオンをもつ構造異性体で、正確に定量するためにはクロマトグラフィーで十分に分離する必要があります。

サンプル前処理

サンプルは Ostro 96 ウェルサンプル前処理プレートを用いて抽出しました。0.1 M $ZnSO_4/NH_4CH_3COOH$ 水溶液 150 µL を入れたウェルに 50 µL の全血を添加し、5 秒間攪拌して全血を溶血させました。アセトニトリル 600 µL を各ウェルに添加し、全てのサンプルを 3 分間攪拌して十分にタンパクを沈殿させました。全てのサンプルは 2 mL 96 ウェルコレクションプレートに溶出し、10 µL を LC/MS/MS に注入しました。

分析種の回収率は以下の式に従って計算しました。

$$\%\ 回収率 = \left(\frac{面積\ A}{面積\ B}\right) \times 100\%$$

A：抽出したサンプルのピーク面積、B：ブランクマトリックスを抽出後に化合物を添加したサンプルのピーク面積

マトリックス効果は以下の式に従って計算しました。

$$マトリックス効果 = \left(\left(\frac{マトリックス有りのピーク面積}{マトリックス無しのピーク面積}\right) - 1\right) \times 100\%$$

マトリックス有りのピーク面積：ブランクマトリックスを抽出後に化合物を添加したサンプルのピーク面積
マトリックス無しのピーク面積：スタンダード溶液のピーク面積

結果および考察

クロマトグラフィー

20 ng/mL キャリブレーションスタンダードによる全ての化合物についての代表的なクロマトグラムを図 1 に、ピークの帰属を表 1 に示しました。CORTECS UPLC C_{18} 1.6 µm、2.1 × 100 mm カラムを用い、全ての分析種は 7.5 分以内で、トータルサイクルタイム 8.0 分で分析しました。全ての化合物に対し卓越したピーク形状で、顕著なテーリングや非対称性は見られず、全てのピークの幅は 3 秒以内でした。全く同じプリカーサーとプロダクトイオンをもつイソバリック（同重体）な代謝物同士のピーク 9 と 10 はほぼベースライン分離し（計算した分離度 1.04）、2 成分が共溶出していた場合には不可能である、明確な同定が可能となりました。同じ化合物の混合品を UPLC BEH C_{18} カラムで分析した場合、これら 2 成分は十分な分離を達成できませんでした（データは記載無し）。化合物ペア 5/6、7/8 の共溶出も BEH C_{18} カラムでは見られました。CORTECS UPLC カラムと 2 種類の全多孔性 UPLC カラム（BEH C_{18} & HSS T3）を用いたより詳細な比較によって、全多孔性カラムでのピーク幅は CORTECS UPLC カラムで見られるピーク幅と同等から 2 倍以上の幅にまで渡ることが明らかになりました。平均すると、BEH C_{18} および HSS T3 カラムでのピーク幅は、CORTECS UPLC カラムでのピーク幅よりも、それぞれ 15%、30% 大きい値を示していました。

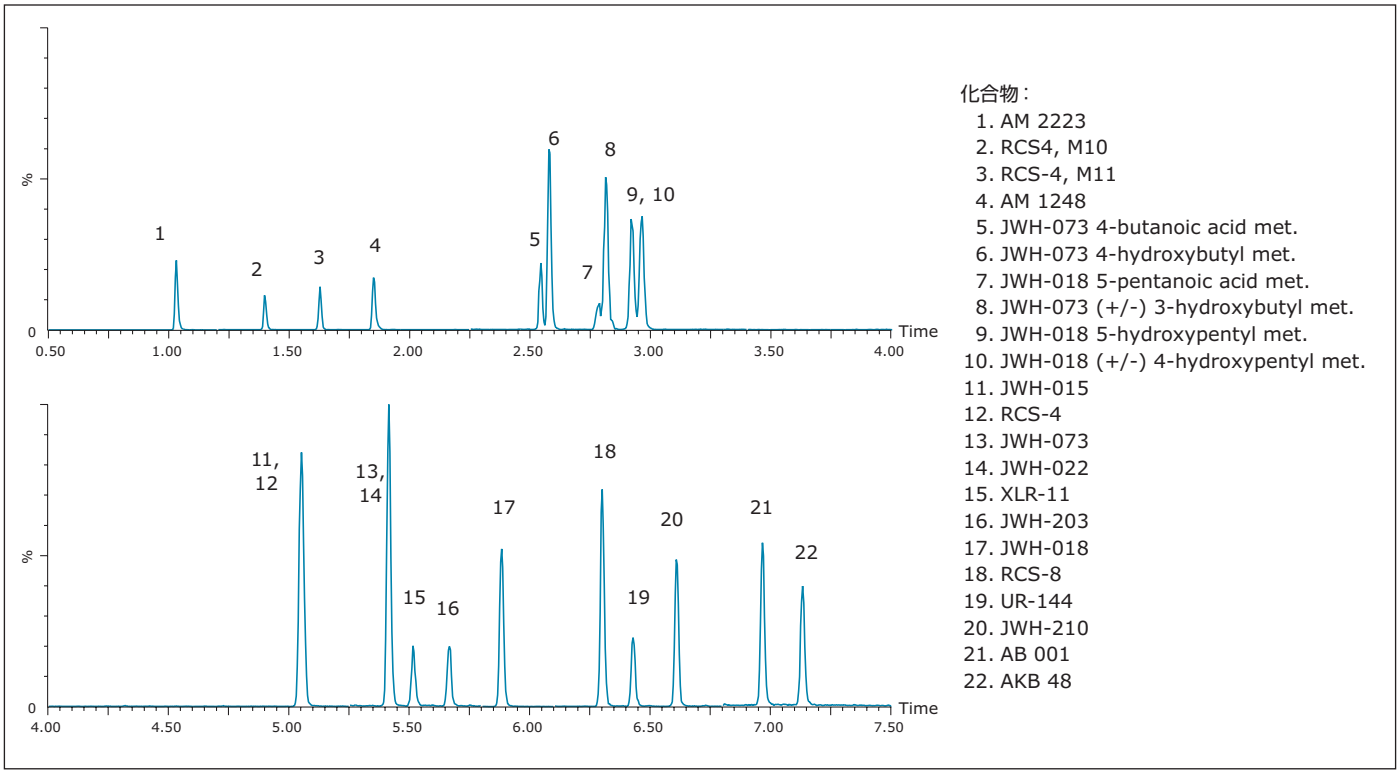

図 1.　合成カンナビノイドおよび代謝物 22 種類の UPLC/MS/MS クロマトグラム、ピークの帰属は表 1 に記載

No.	化合物	保持時間	分子式	コーン電圧	MRM トランジション	コリジョン エネルギー
1	AM2233	1.04	$C_{22}H_{23}IN_2O$	40 40	459.2→98.05 459.2→112.1	34 22
2	RCS-4, M10	1.40	$C_{20}H_{21}NO_3$	40 40	324.2→121.0 324.2→93.0	22 46
3	RCS-4, M11	1.62	$C_{20}H_{19}NO_3$	36 36	322.2→121.0 322.2→93.0	22 46
4	AM 1248	1.87	$C_{26}H_{34}N_2O$	56 56	391.4→135.1 391.4→112.1	28 30
5	JWH-073 4-butanoic acid met.	2.54	$C_{23}H_{19}NO_3$	50 50	358.2→155.1 358.2→127.1	26 48
6	JWH-073 4-hydroxybutyl met.	2.57	$C_{23}H_{21}NO_2$	50 50	344.2→155.1 344.2→127.1	22 40
7	JWH-018 5-pentanoic acid met.	2.77	$C_{24}H_{21}NO_3$	46 46	372.2→155.1 372.2→127.1	24 50
8	JWH-073 (+/-) 3-hydroxybutyl met.	2.81	$C_{23}H_{21}NO_2$	44 44	344.2→155.1 344.2→127.1	26 46
9	JWH-018 5-hydroxypentyl met.	2.91	$C_{24}H_{23}NO_2$	40 44	358.2→155.1 358.2→127.1	24 48
10	JWH-018 (+/-) 4-hydroxypentyl met.	2.96	$C_{24}H_{23}NO_2$	40 44	358.2→155.1 358.2→127.1	24 48
11	JWH-015	5.04	$C_{23}H_{21}NO$	42 42	328.2→155.1 328.2→127.1	24 42
12	RCS-4	5.05	$C_{21}H_{23}NO_2$	44 44	322.2→135.1 322.2→92.0	26 64
14	JWH-022	5.41	$C_{24}H_{21}NO$	50 50	340.2→155.1 340.2→127.1	26 54
13	JWH-073	5.41	$C_{23}H_{21}NO$	48 48	328.2→155.1 328.2→127.1	26 48
15	XLR-11	5.52	$C_{21}H_{28}FNO$	48 48	330.3→125.1 330.3→97.1	26 32
16	JWH-203	5.66	$C_{21}H_{22}ClNO$	46 46	340.2→125.0 340.2→188.1	26 20
17	JWH-018	5.88	$C_{24}H_{23}NO$	44 44	342.2→155.1 342.2→127.1	26 42
18	RCS-8	6.30	$C_{25}H_{29}NO_2$	42 42	376.3→121.1 376.3→91.0	26 50
19	UR-144	6.43	$C_{21}H_{29}NO$	46 46	312.3→125.1 312.3→214.2	24 25
20	JWH-210	6.61	$C_{26}H_{27}NO$	48 48	370.2→183.1 370.2→155.1	26 38
21	AB 001	6.97	$C_{24}H_{31}NO$	52 52	350.3→135.1 350.3→93.0	30 46
22	AKB 48	7.13	$C_{23}H_{31}N_3O$	38 38	366.3→135.1 366.3→93.1	22 50

表 1.　本アプリケーションにおける合成カンナビノイドおよび代謝物の分子式、保持時間、MS/MS 条件

回収率およびマトリックス効果

回収率およびマトリックス効果は実験方法の項に記載した式に従って計算し、図 2 に結果を示しました。全ての化合物は優れた回収率を示し、1 成分を除いて全ての化合物は 80% 以上の回収率で、全ての化合物に対する平均回収率は 92% でした。マトリックス効果は最小限に抑えられており、3 種類の化合物では 16%、それ以外の化合物では 15% 未満でした。試験を行った全ての化合物に対し使用した抽出プロトコールによりほぼ完全な回収率が得られ、マトリックス効果を最小限に抑えることができました。これら多様な合成カンナビノイドに対し高い回収率が得られマトリックス効果を最小限に抑えられることは、本メソッドが他の関連化合物にも同様の結果をもたらす可能性を示唆しています。

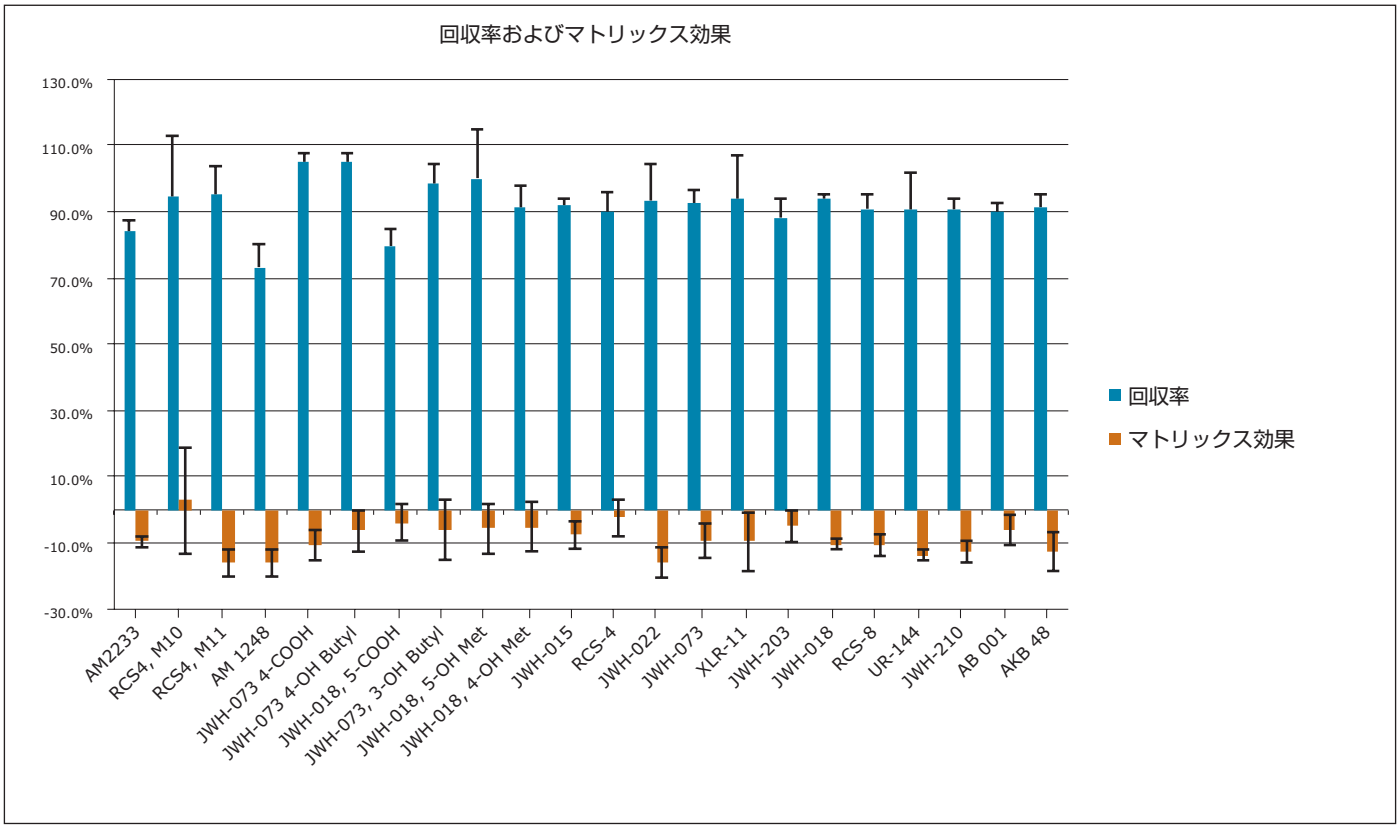

図 2　Ostro サンプル前処理プレートを用いた全血からの合成カンナビノイド抽出の回収率およびマトリックス効果。棒グラフは平均、エラーバーは標準偏差（n=4）をそれぞれ表しています。

直線性および分析感度

直線性および分析感度を評価するため、全ての化合物に対し 2-500 ng/mL の濃度範囲で検量線を作成しました。品質管理サンプル（N = 4）は 7.5、75.0、300.0 ng/mL で作成し分析しました。表 2 には全ての化合物に対して検量線の R^2 の値および QC サマリーデータをまとめました。全ての化合物は検量線範囲全体に渡って良好な直線性を示し、R^2 の値は 22 種類の化合物のうち 21 種類で >0.99 でした。S/N 比についても、直線性の得られている 2 ng/mL まで良好な値が得られました。品質管理（QC）結果は低、中、高濃度で正確かつ精度の高い結果でした。低濃度 QC サンプル（7.5 ng/mL）に対する真度は 79.0% から 104.4% の範囲で、平均値は 89.4% でした。中および高濃度の QC サンプルの結果は全ての化合物に対し優れており、真度は期待値 10% 以内でした。分析精度も優れ、%RSD はほぼ 10 % 以下で、13% を越えるものはありませんでした。全て（低、中、高）の濃度で回収率を評価すると、平均値は 89.5-101.7% の範囲でした。

		QC 濃度（ng/mL）						
		7.5		75		300		
	R^2	真度	%RSD	真度	%RSD	真度	%RSD	真度の平均値
AM2233	0.997	100.5	2.0	103.6	3.3	100.5	2.0	**101.5**
RCS4, M10	0.986	97.5	3.9	106.1	5.7	101.7	8.4	**101.7**
RCS4, M11	0.991	91.3	16.3	108.8	5.1	96.8	12.0	**98.9**
AM 1248	0.993	83.1	10.0	106.1	5.7	105.4	6.4	**98.2**
JWH-073 4-COOH	0.991	96.1	9.8	99.3	7.4	106.2	9.1	**100.5**
JWH-073 4-OH Butyl	0.996	88.7	21.3	98.1	3.5	102.2	3.9	**96.3**
JWH-018, 5-COOH	0.992	90.7	15.2	97.8	3.8	103.7	10.6	**97.4**
JWH-073, 3-OH Butyl	0.993	79.0	8.6	92.9	8.3	96.6	2.9	**89.5**
JWH-018, 5-OH Met	0.995	82.8	10.3	100.0	10.4	100.1	3.4	**94.3**
JWH-018, 4-OH Met	0.992	82.3	17.9	103.1	6.3	96.0	1.9	**93.8**
JWH-015	0.993	87.1	4.3	101.8	3.9	101.3	2.1	**96.8**
RCS-4	0.993	92.5	8.1	99.6	5.0	97.3	3.6	**96.4**
JWH-022	0.993	85.3	4.9	100.3	4.8	97.8	4.2	**94.5**
JWH-073	0.994	89.6	6.5	99.4	6.6	97.6	4.9	**95.5**
XLR-11	0.993	101.4	10.4	99.6	2.8	99.7	5.0	**100.2**
JWH-203	0.990	82.1	12.2	96.1	12.2	94.6	9.3	**91.0**
JWH-018	0.994	88.4	2.9	97.2	3.9	98.8	3.6	**94.8**
RCS-8	0.992	94.3	2.6	101.9	4.6	99.4	4.7	**98.5**
UR-144	0.994	85.1	5.4	97.0	6.7	99.2	3.7	**93.8**
JWH-210	0.994	92.7	6.4	96.3	4.5	95.6	5.3	**94.8**
AB 001	0.992	84.4	8.1	101.0	4.7	100.2	10.6	**95.2**
AKB 48	0.992	92.8	9.9	98.5	4.8	97.7	8.4	**96.4**
	真度の平均値	**89.4**		**100.2**		**99.5**		

表 2.　全ての化合物に対する R^2 の値および品質管理結果

結論

合成カンナビノイドおよびその代謝物 22 種類を全血から抽出して UPLC/MS/MS で分析しました。Ostro サンプル前処理プレートを使用した結果、全ての化合物に対し最小限のマトリックス効果で優れた回収率が得られました。全ての化合物は 2-500 ng/mL の範囲で卓越した直線性を示しました。CORTECS UPLC カラムを用いることで、分離の難しいイソバリック（同重体）のピーク同士のベースライン分離も含め、全ての化合物の分離を短時間で達成しました。分離効率とピーク幅は同じサイズの全多孔性カラムに比べて優れていました。本メソッドにより、法中毒学研究において重要な分類の化合物を迅速で確実に抽出し分析できます。幅広い化合物に対する卓越した性能と抽出メソッドの汎用性により、他の合成カンナビノイドや代謝物にも使用することができ、新規関連化合物に対する迅速な分析法開発が行えるという大きな利点があります。

参考文献

1. Seely KA, *et al*. Spice drugs are more than harmless herbal blends: A review of the pharmacology and toxicology of synthetic cannabinoids. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2012; 39(2):234-243.
2. Wohlfarth A, Weinmann W. Bioanalysis of new designer drugs. *Bioanalysis*. 2010; 2(5):965-979.

研究用としてのみ利用できます。
臨床診断用ではありません。

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

日本ウォーターズ株式会社 www.waters.com
東京本社 〒140-0001 東京都品川区北品川1-3-12第５小池ビル TEL 03-3471-7191 FAX 03-3471-7118
大阪支社 〒532-0011 大阪市淀川区西中島5-14-10 サムティ新大阪フロントビル11F TEL 06-6304-8888 FAX 06-6300-1734
ショールーム 東京 大阪
テクニカルセンター 東京 大阪 名古屋 福岡 札幌

Waters、ACQUITY、UPLC、Xevo、ACQUITY UPLC、MassLynx および The Science of What's Possible は Waters Corporation の登録商標です。CORTECS および Ostro は Waters Corporation の商標です。
その他すべての登録商標はそれぞれの所有者に帰属します。

©2013 Waters Corporation. Printed in Japan.

2013年9月 720004726JA PDF