Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

Oasis PRiME HLBを用いた 全血中合成カンナビノイドの簡単で迅速かつ高純度な抽出

Xin Zhang, Jonathan P. Danaceau, and Erin E. Chambers
Waters Corporation, Milford, MA, USA

アプリケーションのメリット

- コンディショニングと平衡化を省いた迅速な固相抽出プロトコール
- 全ての試験物質に対して有効な回収率と低いマトリックス効果
- 全血中の合成カンナビノイドならびにその代謝物にむけた迅速で汎用的な抽出メソッド
- タンパク質沈澱法と比べてリン脂質を 95% 以上除去
- 幅広い合成カンナビノイドおよびその代謝物に対して卓越した定量精度と真度

ウォーターズのソリューション

Oasis® PRiME HLB 30mg プレート

CORTECS® C_{18}、90Å、1.6 µm、
2.1 × 100 mm (製品番号 186007095)

ACQUITY UPLC® I-Class システム

Xevo® TQD 質量分析計

2mL 96-ウェルコレクションプレート
(製品番号 186002482)

キーワード

合成カンナビノイド、UPLC、法中毒学、
全血、固相抽出、CORTECS、ソリッドコア、
Oasis PRiME HLB、リン脂質除去

はじめに

Oasis PRiME HLB カートリッジは新たに発売された逆相固相抽出 (SPE) 用充填剤であり、固相抽出を簡単で短時間に終わらせることを可能にし、同時に他の前処理手法よりもサンプル抽出液をきれいに精製します。Oasis PRiME HLB を用いることで、コンディショニングと平衡化の工程を省いたサンプルロード - 洗浄 - 溶離の 3 ステップ固相抽出プロトコールを採用して 22 種類の合成カンナビノイドとその代謝物を全血中サンプルから抽出することに成功しました。全ての分析種において優れた回収率と少ないマトリックス効果 (ME) が達成されました。これらの結果は全ての分析種に対して少ない変動で一貫していました。加えて、Oasis PRiME HLB は全血中サンプルにおいて、タンパク質沈殿法 (PPT) と比べて 95% 以上のリン脂質除去能を示しました。22 種類の合成カンナビノイドとその代謝物は Oasis PRiME HLB 30 mg プレートを用いて抽出しました。全ての化合物の検量線は 0.2-100 ng/mL の範囲で直線性を示し、品質管理サンプルの定量結果も上記検量線範囲の全てにおいて高い真度と精度を与えました。中性、酸性、塩基性を含む異なるいくつかのグループのドラッグの分析結果から、本分析法は新規開発類縁化合物に対しても有効で、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

LC条件

LC システム： ACQUITY UPLC I-Class

カラム： CORTECS C_{18}、90Å、1.6 µm、2.1×100 mm（製品番号 186007095）

カラム温度： 30℃

注入量： 5 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
8.5	70	30

MS条件

MS システム： Xevo TQD 質量分析計

イオン化モード： ESI ポジティブ

取り込みモード： MRM（トランジッションは表2と3参照）

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 2 参照）

コーン電圧（V）： 化合物毎に最適化（表 2 参照）

データ管理

全てのデータは Waters® MassLynx® ソフトウェア v4.1（scn855）を使用して読み取りと分析、TargetLynx™ ソフトウェアを使用して定量しました。MS 条件は IntelliStart™ により最適化しました。

サンプル詳細

AM2233、JWH-015、RCS-4、JWH-203、RCS-8、JWH-210、JWH-073、JWH-018 は Cerilliant 社（Round Rock,TX）から購入しました。他の全ての化合物とその代謝物は Cayman Chemical 社（Ann Arbor, MI）から購入しました。

各分析種はメタノール、DMSO または、メタノール/DMSO 50:50 の混液で 1 mg/mL の濃度でストックソリューションを調製しました。全ての分析種を混合したストックソリューションは 10 µg/mL になるようにメタノールを用いて調製しました。ワーキングソリューションは 40% メタノールを用いて用時調製しました。検量線用標準溶液と品質管理（QC）サンプルはマトリックスである全血に様々な濃度でワーキングスタンダードを添加したものを用いました。検量線濃度は全ての分析種に対して 0.2-100 ng/mL の濃度範囲で作成しました。品質管理サンプルは全血中に 2.5、7.5、75 ng/mL の濃度で添加し調製しました。

分析を行った 22 種の分析種を表 1 に示します。これらは法医学的に関連するいくつかのグループの合成カンナビノイド（AM1248 や AKB48 などの adamantoylindole 類、JWH022 などの napthoylindole 類、RCS-4 や RCS-8 などの phenylacetyl indole 類、UR-144 や XLR11 などの tetramethlcycopropylindole 類）を含んだもので構成されています。JWH-073 と JWH-081 の主要な代謝物も含まれているように、この中のいくつかの化合物は全く同じプロダクトイオンを持つ構造異性体で、正確な定量を行う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 Oasis PRiME HLB 30 mg サンプル前処理プレートを用いて抽出しました。0.1 M 硫酸亜鉛／酢酸アンモニウム溶液 0.1 mL を 0.1 mL の全血に加え 5 秒間強く撹拌して溶血処理を行いました。続けて 400 µL のアセトニトリルを加えてタンパクを沈殿させた後、10 秒間強く撹拌し 7000 rcf で 5 分間遠心分離を行いました。得られた上清はサンプルロードの前に、1.2 mL の水で希釈します。サンプルはコンディショニングや平衡化を行わずに、直接 Oasis PRiME HLB 30 mg プレートにロードしました。全てのウェルは 500 µL のメタノール / 水 25:75 混合液で 2 回洗浄し、500 µL のアセトニトリル / メタノール　90:10 混合液で 2 回溶離操作を行いました。溶出液は窒素ガスを穏やかに吹きつけて乾固し、100 µL の 30% アセトニトリル溶液で再溶解し、その 5 µL を UPLC システムに注入しました。

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 は抽出サンプルのピーク面積、B は抽出後に化合物を添加して調合したマトリックスサンプルのピーク面積になります。

マトリックス効果は以下の式に従って計算しました。

$$マトリックス効果 = \left\{\left(\frac{マトリックスありのピーク面積}{マトリックスなしのピーク面積}\right) - 1\right\} \times 100\%$$

マトリックスありのピーク面積はブランクマトリックス抽出後に分析種を添加したサンプルのピーク面積を示します。マトリックスなしのピーク面積はスタンダード溶液のピーク面積になります。

結果および考察

クロマトグラフィー

最適なカラムへの充填法とソリッドコアタイプのCORTECS パーティクルを合わせることで、卓越したクロマトグラフィー性能がもたらされます。図 1 には 20 ng/mL の校正用スタンダードから得られた全ての化合物についての代表的なクロマトグラムを示しています。CORTECS UPLC C_{18} カラム（90Å、1.6 µm、2.1 × 100 mm）を用いることにより、全ての分析種は 7.5 分以内、トータルサイクルタイムは 8.5 分で分析できました。全ての分析種について、きわめて良好なピーク形状を示し、特に顕著なテーリングや非対称性は見られず、また全てのピークは 5% ピーク高さにおいて 3 秒以内でした。

Time (min.)	Flow (mL/min.)	%A	%B
0	0.6	70	30
2.0	0.6	50	50
3.0	0.6	50	50
7.0	0.6	10	90
7.2	0.6	70	30
8.5	0.6	70	30

表 1. 移動相のグラジエント条件（移動相 A と移動相 B の組成は実験方法に記載）

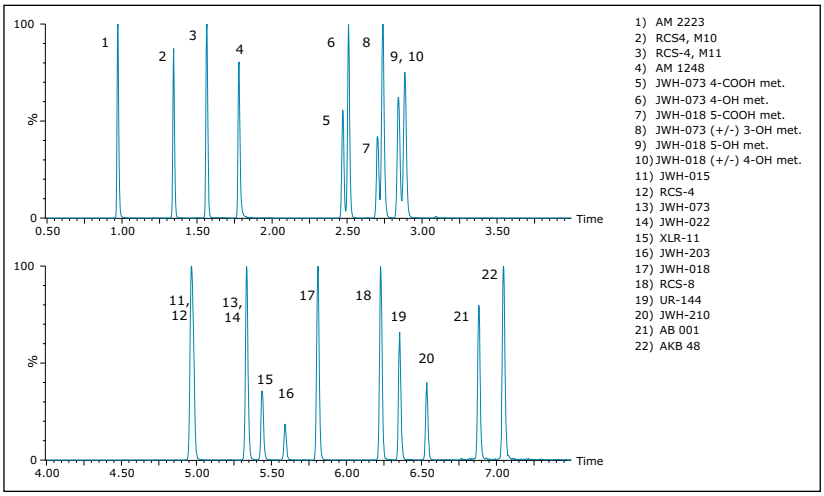

図 1. 22 種の合成カンナビノイドとその代謝物の UPLC-MS/MS クロマトグラム

回収率とマトリックス効果

本アプリケーションで分析している合成カンナビノイドとその代謝物は、中性、酸性、塩基性の化合物を含んでいます。Oasis PRiME HLB を使うことで、それぞれの化合物の官能基に関わらず、分析した全ての化合物とその代謝物を同時に抽出可能でした。回収率とマトリックス効果は実験方法に示した式に従って算出し、その結果を図 2 に示しました。この Oasis PRiME HLB を用いた抽出プロトコールはすべての分析種に対しほぼ完全な回収率を示し、主要な分析種において最小のマトリックス効果を示す結果を与えました。1 つを除くすべての化合物は回収率 80% 以上を示し、平均回収率は 91% でした。全ての分析種で回収率の相対標準偏差（%RSD）値は 5% 以内に収まりました。マトリックス効果の結果は全ての分析種において良好で、2 つの化合物のみ若干 40% を超えており、残りの化合物では 25% 以下でした。平均マトリックス効果は 17% と低い値でした。合成カンナビノイドに対する高い回収率と最小のマトリックス効果は、Oasis PRiME HLB によるサンプルロード - 洗浄 - 溶離のシンプルな 3 ステッププロトコールで他の類縁化合物でも同様の結果が得られる可能性を示しています。

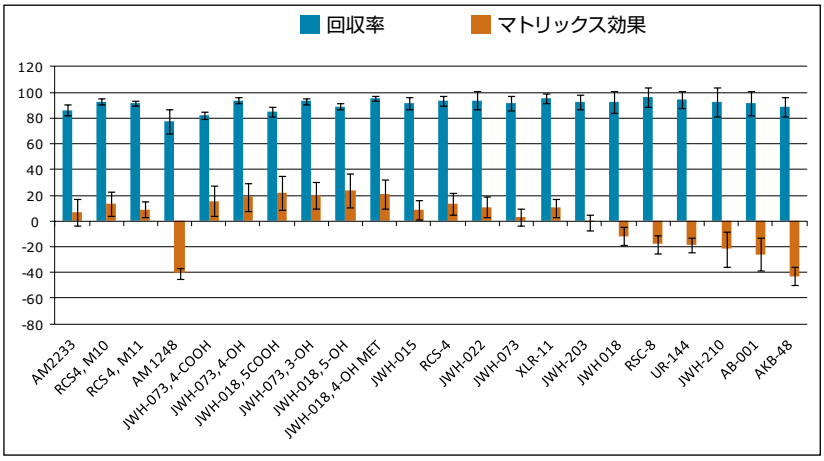

図 2. Oasis PRiME HLB uElution プレートを用いた全血サンプルからの合成カンナビノイド抽出の回収率およびマトリックス効果（棒グラフは平均値、エラーバーは標準偏差（n=6）を示す）

リン脂質除去

Oasis PRiME HLB の重要な特性として、その他のサンプル前処理法と比べてよりきれいなサンプルをもたらす能力があげられます。そのうちのひとつは内因性のリン脂質除去で示されます。図 3 には Oasis PRiME HLB 抽出液とタンパク質沈殿処理サンプルのクロマトグラムを示しました。タンパク質沈殿と比べて、Oasis PRiME HLB をもちいたものは 95% 以上もリン脂質を除去し、よりきれいな抽出液を得られました。このことは、マトリックス効果を減少させ、カラムの寿命を延長し、質量分析計のイオン源のメンテナンスを少なくすることができることを示唆しています。

直線性、真度、精度、感度

直線性と分析感度を評価するために、全ての成分について検量線は 0.2-100 ng/mL の範囲で作成しました。品質管理用サンプルは 2.5 ng/mL、7.5 ng/mL、75 ng/mL から抽出し (N=4)、分析しました。表 2 はすべての分析種について検量線の R^2 と品質管理用サンプルから得られたサマリーデータを示しています。品質管理 (QC) サンプルの結果は低、中、高濃度の全ての濃度で正確な結果が得られました。低濃度の QC サンプル (2.5 ng/mL) の真度は 95-110% (AM2233 を除く) の範囲で、平均は 102% でした。中、高濃度の QC サンプルについては、1 つを除く全ての分析腫において良好ですべての真度は期待値の 15%以内でした。分析精度はほとんどの分析種で %RSD 10% 以下であり、15% を超えるものはありませんでした。すべてのレベル (低、中、高濃度) における真度を評価したところ、平均値は 93% から 104% の範囲内でした。検出限界は 0.1 ng/mL で 1 ng/mL を超えるものはありませんでした。これらの結果は重水素化した内標準を用いないで達成しており、Oasis PRiME HLB による結果の一貫性を示しています。

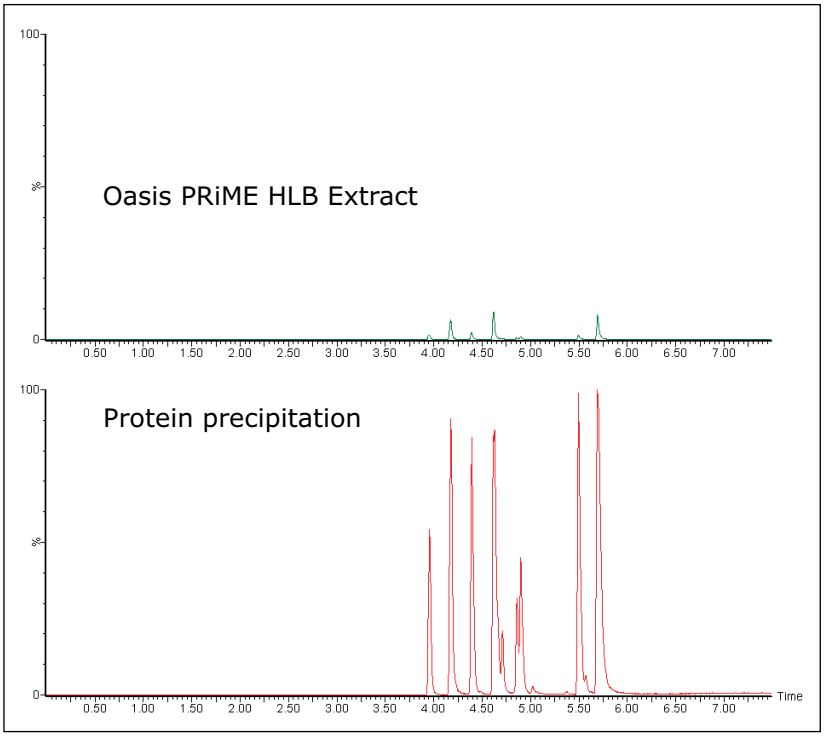

図 3. Oasis PRiME HLB 抽出とタンパク質沈殿法による残存リン脂質のクロマトグラム (同一スケール)

		QC濃度 (ng/mL)						
		2.5		7.5		75		
	R^2	真度 (%)	%RSD	真度 (%)	%RSD	真度 (%)	%RSD	真度の平均値
AM2233	0.994	74.53	7.78	85.52	5.29	93.18	4.96	84.41
RCS4, M10	0.995	107.75	6.91	95.72	5.43	95.93	3.33	99.80
RCS 4, M11	0.993	106.60	3.15	92.52	5.09	92.92	3.34	97.34
JWH-073, 4-COOH	0.998	108.00	2.44	96.00	5.43	107.07	3.20	103.69
JWH-073, 4-OH	0.996	106.90	5.01	95.88	3.76	94.12	2.15	98.97
JWH-018, 5COOH	0.996	107.58	5.98	97.98	2.32	99.30	2.65	101.62
JWH-073, 3-OH	0.996	110.00	6.22	94.43	2.24	91.95	2.38	98.79
JWH-018, 5-OH	0.996	103.17	9.39	83.55	4.01	101.77	3.90	96.16
JWH-018, 4-OH MET	0.996	106.40	5.45	85.15	2.87	104.70	4.17	98.75
JWH-015	0.998	108.85	6.19	99.57	3.49	100.95	2.48	103.12
RCS-4	0.998	109.80	4.06	94.63	3.47	94.62	5.25	99.68
JWH-022	0.999	107.32	3.23	97.27	4.95	96.90	5.65	100.50
JWH-073	0.999	111.28	3.11	97.38	4.96	99.62	7.47	102.76
XLR-11	0.998	101.32	8.07	98.90	4.12	103.78	5.71	101.33
JWH-203	0.999	101.60	4.34	99.72	6.55	101.24	7.13	100.85
JWH 018	0.998	102.30	9.31	99.08	8.86	102.00	7.62	101.13
RSC-8	0.995	95.92	8.61	93.02	9.10	100.98	11.55	96.64
UR-144	0.997	99.22	9.81	99.58	9.55	104.60	7.24	101.13
JWH-210	0.993	110.60	10.42	94.02	12.92	100.35	8.71	101.66
AB-001	0.995	107.02	7.82	92.54	11.04	101.98	6.22	100.51
AKB-48	0.974	97.07	11.76	89.95	13.76	107.63	13.50	98.21
	Mean	**102.43**		**92.27**		**98.24**		

表 2. すべての分析種に対する R^2 の値および品質管理結果、一番下の平均値は特定の濃度におけるすべての分析種の平均値、右端の値はすべての QC サンプルにおける個々の分析種の平均値

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	0.97	$C_{22}H_{23}IN_2O$	48	459.2⇒98.05	50
				48	459.2⇒112.1	40
2	RCS-4, M10	1.34	$C_{20}H_{21}NO_3$	40	324.2⇒121.0	36
				40	324.2⇒93.0	72
3	RCS-4, M11	1.57	$C_{20}H_{19}NO3$	42	322.2⇒121.0	32
				42	322.2⇒93.0	60
4	AM 1248	1.78	$C_{26}H_{34}N_2O$	62	391.4⇒135.1	42
				62	391.4⇒112.1	50
5	JWH-073 4-butanoic acid met.	2.47	$C_{23}H_{19}NO_3$	52	358.2⇒155.1	32
				52	358.2⇒127.1	70
6	JWH-073 4-hydroxybutyl met.	2.51	$C_{23}H_{21}NO_2$	52	344.2⇒155.1	32
				52	344.2⇒127.1	70
7	JWH-018 5-pentanoic acid met.	2.71	$C_{24}H_{21}NO_3$	54	372.2⇒155.1	32
				54	372.2⇒127.1	72
8	JWH-073 (+/-) 3-hydroxybutyl met.	2.74	$C_{23}H_{21}NO_2$	54	344.2⇒155.1	36
				54	344.2⇒127.1	64
9	JWH-018 5-hydroxypentyl met.	2.84	$C_{24}H_{23}NO_2$	50	358.2⇒155.1	24
				50	358.2⇒127.1	48
10	JWH-018 (+/-) 4-hydroxypentyl met.	2.89	$C_{24}H_{23}NO_2$	50	358.2⇒155.1	34
				50	358.2⇒127.1	64
11	JWH-015	4.97	$C_{23}H_{21}NO$	48	328.2⇒155.1	32
				48	328.2⇒127.1	62
12	RCS-4	4.98	$C_{21}H_{23}NO_2$	48	322.2⇒135.1	40
				48	322.2⇒92.0	68
14	JWH-022	5.34	$C_{24}H_{21}NO$	52	340.2⇒155.1	34
				52	340.2⇒127.1	60
13	JWH-073	5.34	$C_{23}H_{21}NO$	48	328.2⇒155.1	36
				48	328.2⇒127.1	56
15	XLR-11	5.44	$C_{21}H_{28}FNO$	52	330.3⇒125.1	34
				52	330.3⇒83.0	42
16	JWH-203	5.59	$C_{21}H_{22}ClNO$	44	340.2⇒188.1	32
				44	340.2⇒125.0	42
17	JWH-018	5.82	$C_{24}H_{23}NO$	50	342.2⇒155.1	34
				50	342.2⇒127.1	60
18	RCS-8	6.23	$C_{25}H_{29}NO_2$	44	376.3⇒121.1	36
				44	376.3⇒91.0	66
19	UR-144	6.36	$C_{21}H_{29}NO$	48	312.3⇒214.2	35
				48	312.3⇒125.1	34
20	JWH-210	6.54	$C_{26}H_{27}NO$	54	370.2⇒214.2	34
				54	370.2⇒183.1	36
21	AB 001	6.88	$C_{24}H_{31}NO$	62	350.3⇒135.1	44
				62	350.3⇒93.0	62
22	AKB 48	7.05	$C_{23}H_{31}N_3O$	36	366.3⇒135.1	28
				36	366.3⇒93.1	68

表 3. 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その代謝物の分子式、保持時間、MS/MS 条件（定量用トランジッションを上、確認用トランジッションを下に記載）

プリカーサーイオン (m/z)	プロダクトイオン (m/z)	コーン電圧 (V)	コリジョンエネルギー (eV)
496.40	184.40	35	30
520.40	184.40	35	30
522.40	184.40	35	30
524.40	184.40	35	30
704.40	184.40	35	30
758.40	184.40	35	30
760.40	184.40	35	30
784.40	184.40	35	30
786.40	184.40	35	30
806.40	184.40	35	30
808.40	184.40	35	30

表 4. リン脂質の MS/MS 条件

結論

本アプリケーションノートは、シンプルで迅速な固相抽出プロトコールでほぼ完全に内因性リン脂質を除去するように新規開発された逆相 SPE である Oasis PRiME HLB の使用に焦点をあてたものです。コンディショニングや平衡化を用いず、シンプルなサンプルロード - 洗浄 - 溶離の 3 ステッププロトコールにより、全血サンプル中から 22 種類の合成カンナビノイドを抽出しました。抽出物の回収率は平均で 91% を示し、平均マトリックス効果は 17% にとどまりました。すべての分析種における平均% RSD は 5% と一貫したものでした。加えて、タンパク質沈殿法と比べて 95% 以上のリン脂質を除去しました。定量結果もまた優れたものでした。重水素化内標準の使用なしでも、検量線は高い直線性を保ち、22 化合物中 21 種の R^2 値は 0.99 でした。品質管理サンプルの定量結果は 97% のサンプルで期待値の 15% 以内に収まり、全ての分析精度は% RSD が 15% 以下でした。結論として、Oasis PRiME HLB は、全血サンプルからほとんどの内因性のリン脂質を除去し、高い回収率と低いマトリックス効果を一貫して与えました。繰り返しになりますが、この卓越した定量性は重水素化内標準を使用しないでも達成されたものです。

参考文献

1. Danaceau, J. P, Chambers, E. E., and Fountain, K. J, Analysis of synthetic cannabinoids from urine for forensic toxicology using Oasis HLB µElution Plates and CORTECS UPLC Columns, Waters Application note p/n 720004780EN

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 新大阪トヨタビル11F TEL 06-6304-8888 FAX 06-6300-1734
ショールーム 東京 大阪
サービス拠点 東京 大阪 札幌 福島 静岡 富山 名古屋 徳島 福岡

Waters、ACQUITY UPLC、UPLC、Oasis、MassLynx、Xevo、CORTECS および The Science of What's Possible は Waters Corporation の登録商標です。
TargetLynx および Intellistart 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。

©2015 Waters Corporation. Produced in Japan. 2015年8月 720005417JA PDF