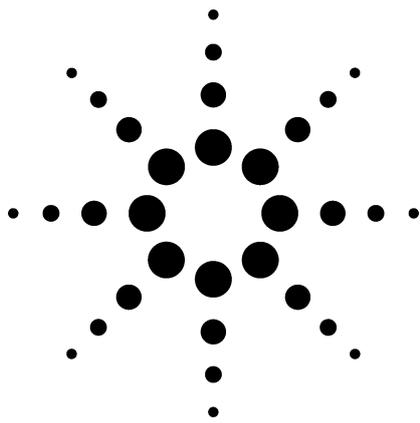


LC/三連四重極質量分析計による濫用薬物の迅速分析 アプリケーション



法科学

著者

Michael C. Zumwalt, PhD
Agilent Technologies, Inc.
Englewood, CO
USA

Christine Moore, PhD
Immunalysis, Corp.
Pomona, CA
USA

要旨

Agilent G6410AA 三連四重極質量分析計 (QQQ) を使用した唾液 (OF) に含まれる濫用薬物 (DOA) の存在を確認する迅速、高感度、かつ高再現性の方法について説明します。QQQ の感度は、米国濫用薬物・精神衛生管理庁 (SAMHSA) が規定した職域検査に必要とされるカットオフレベルを満たしています。本実験で分析する DOA は、唾液に含まれる THC、コカイン、アンフェタミン、メタンフェタミン、および MDMA (エクスタシー) で、あらかじめ固相抽出法 (SPE) によって調製しました。試料調製後、1.8 μm の C18 カラムを使用した高速かつ高分離能クロマトグラフィーにより逆相 LC/MS/MS で分析しました。結果として、対象化合物および内部標準ともに溶出時間が、THCでは4.2分以内、残りの薬物では1.5分以内でした。この方法は、品質管理用試料の定量に有効に適用できます。

はじめに

米国 SAMHSA は 2004 年に、現在は尿のみを検査する連邦政府機関による薬物検査プログラムにおいて、汗、

唾液、毛髪を用いることができるようにする新規則を提唱しました [1]。この提案によって、職域における体内薬物濃度を測定する可能な検査マトリックスとして唾液の分析による確認が有効になりました。そのため、薬物影響 (DUID) 下で運転しているかどうかについて違反をチェックする検問所など、他の場所での検査へと必然的に適用範囲を拡大できます。

唾液に DOA が存在するかどうかの確認に液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析計 (LC/MS/MS) を使用すると、ガスクロマトグラフィー/質量分析計 (GC/MS) の場合に比べてより迅速な分析ができます。これは、GC/MS 分析では通常必要となる試料の誘導体化処理が、必要とされる感度を犠牲にすることなく省略できるためです。液体クロマトグラフィー (LC) に粒径 1.8 μm の C18 カラムを使用することで、優れた分離の対称形ピークが高流量で分離できます。QQQ のマルチプルリアクションモニタリング (MRM) 機能によって、定量用に強度の高いプロダクトイオンを、確認用に強度の低いプロダクトイオンをクオリファイアイオンとして測定しながら、共溶出する対象化合物およびそれらに対応した内部標準化合物を高い選択性で MS/MS 分析できます。MRM では、唾液などの複雑なマトリックスに含まれる化合物を極めて特異的に検出できます。

本実験では、5 種類の DOA を 2 種類の方法で分析し、THC (テトラヒドロカナビノール) では 4.2 分未満、コカイン、アンフェタミン、メタンフェタミン、および MDMA (3,4-メチレンジオキシメタンフェタミン) では 1.5 分以内でした。これらの薬物について SAMHSA が規定した感度の要件は、容易に満たされました。表 1 に、それぞれの薬物のカットオフレベルを示します。



Agilent Technologies

表1 SAMHSAによる濫用薬物(DOA)のカットオフレベル

化合物	カットオフレベル (唾液中の ng/mL)
THC	2
コカイン	8
アンフェタミン	50
メタンフェタミン	50
MDMA	50

実験

試料調製

各試料については、FDA 認可の採取器具 Quantisal™ を使用して 1 mL の唾液を採取しました。次に、この試料採取器具にあらかじめ封入されている特製緩衝液 3 mL に溶かしました。この試料 1 mL を以降の分析に用いました。この 1 mL は、唾液 250 μL に相当します。品質管理 (QC) 試料には、薬物を含まない唾液に、各化合物のリファレンス溶液と内部標準(ISTD)を検量線の最低濃度及び中間濃度で添加しました。未知試料には内部標準のみを添加し、キャリブレーション標準には規定濃度の対象化合物と ISTD を抽出後に添加しました。

この抽出メソッドは、これらの薬物を GC/MS で分析する場合と同様ですが、誘導体化の手順は省略し、最終残渣は通常の GC 用溶媒でなく LC の初期移動相に再溶解しました。

唾液/緩衝液の一部に、0.1 M のリン酸カリウム 2 mL を追加して攪拌しました。SPE (部品番号 691-0353T、SPEWare, San Pedro, CA) は、THC ではメタノール 0.5 mL で、コカインその他ではメタノール 3 mL であらかじめコンディショニングしておき、次に THC では 0.1 M 酢酸 100 μL、コカインその他では 0.1 M リン酸塩緩衝液 2 mL を通液しました。SPE による精製は、SPE カラムに試料を負荷した後メタノールとイオン交換水で洗浄し、溶出には THC では 98:2 のヘキサン:酢酸、コカインでは 78:20:2 の CH₂Cl₂/IPA/NH₄OH、アンフェタミン、メタンフェタミン、MDMA では 2% NH₄OH の酢酸エチル溶液を通液しました。

溶出液は蒸発乾燥後に、LC の初期移動相 (0.1% ギ酸水溶液) で再溶解しました。キャリブレーション標準用には、対象化合物、ISTD、および移動相を加えて 1 mL 容にしました。

ここで注意すべき点は本実験の目的が、QQQ 装置の性能を評価することであり、抽出法を検討することではない

ことです。したがって、抽出操作後にブランクの唾液抽出物に標準物質と ISTD を添加することが、目的化合物の回収率の変動を排除すると判断いたしました。ただし、QC 用試料は抽出前に目的化合物と ISTD の両方を添加し、未知試料は抽出前に ISTD のみ添加しました。

分析した化合物

図 1 に、目的化合物とその化合物のプロトン化分子の質量を示しました。

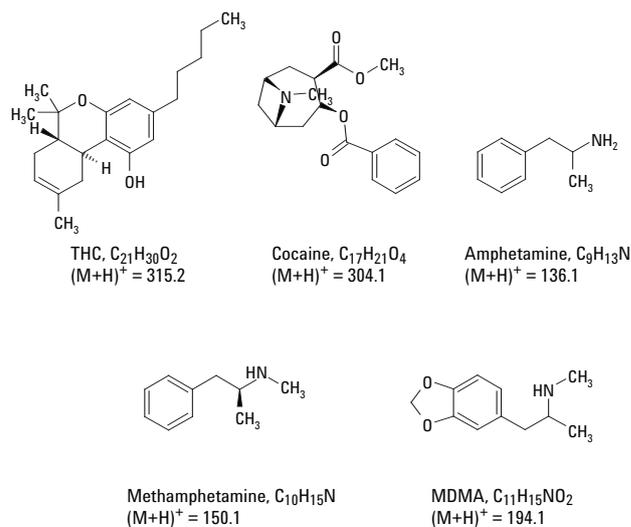


図1 目的化合物の構造とその化合物のプロトン化分子の質量

LC/MS/MS 装置

本実験で使用した LC/MS/MS システムの構成は、1100 シリーズデガッサ、バイナリポンプ、ウェルプレートオートサンプラ、温度調節カラムコンパートメント、Agilent G6410AA 三連四重極質量分析計、およびエレクトロスプレーイオン源(ESI)です。システムの制御とデータの解析は、Agilent QQQ コントロール (R&D バージョン) と、定性および定量データ解析ソフトウェアプログラムで行いました。LC および MS 条件の詳細を以下に示します。

本メソッド開発の目的は、唾液に含まれる濫用薬物の存在について定量と確認を行うための迅速かつ高感度な分析手法を確立することです。クロマトグラフィーの優れた分離とピークの対称性を維持しながらスピードを確保するため、さまざまな溶媒、流速、カラムパラメータを最適化しました。水、アセトニトリル、ギ酸を使用した

単純な溶媒システムが有効に働くだけでなく、粒径が 1.8 μm の C 18 カラムを使った、僅か 1 分の超高速グラジエントで時間内に化合物を溶出させることで、LC/MS のみならず GC/MS による大部分の方法に比肩できます。

LC の条件

カラム	Agilent ZORBAX SB-C18, RRHT (2.1 \times 50 mm、1.8 μm) (部品番号 822700-902)
カラム温度	40 $^{\circ}\text{C}$
移動相	A = 0.1% ギ酸水溶液 B = 0.1% ギ酸アセトニトリル溶液
流量	0.5 mL/min
グラジエント	0 分で 5% B 1 分で 95% B 6 分で 95% B ポストランタイム = 2.5 分
注入量	80 μL (THC)、20 μL (コカインその他)

MS の条件

モード:	ポジティブ ESI Agilent G1948A イオン源使用
ネブライザガス圧	40 psig
乾燥ガス流量	5 L/min
乾燥ガス温度	350 $^{\circ}\text{C}$
V_{cap} :	4000 V
Q1 分解能	0.7 amu
Q2 分解能	0.7 amu
衝突エネルギー	23 V (THC)、5 V (その他の全化合物)
MRM	THC では 4 トランジション; コカイン、アンフェタミン、メタンフェタミン、MDMA では 16 トランジション(表 2)

LC/MS メソッドの詳細

定量イオンとクオリファイアイオンの両方にとって最適な MEM トランジションを決定するために、約 1 ng/ μL の濃度で個々の化合物標準品をインフュージョンで注入しました。定量イオンは最も強度の高いプロダクトイオン、クオリファイアイオンは 2 番目に強度の高いプロダクトイオンを選択しました。

本ノート執筆時点では、ソフトウェアが試作バージョンであることにより、1 回のクロマトグラフ分析の中で使用できる衝突エネルギーと時間セグメントはともに 1 つのみでした。そのため、各トランジションで最適なエネルギー値でなくても、THC とその ISTD の全トランジションに対して 23 V の衝突エネルギーを、コカイン他の化合物とそれらに対応する ISTD では全トランジションに対して 5 V を使用しました。さらに MRM トランジションを、分析全体にわたって持続的にモニタリングしました。結果としては、本実験でのデータは SAMHSA の要件を満たしているものの、MRM イベントをタイムプログラムして衝突エネルギーを最適化することにより、さらに高い感度を得られる余地があります。

表 2 MRM トランジションに関するデータ取込パラメータ

化合物	RT (min)	擬分子イオン (M+H) ⁺	定量プロダクトイオン (m/z)	クオリファイアプロダクトイオン (m/z)
THC	4.2	315.3	193.1	295.1
D3-THC	4.2	318.3	196.1	262.1
コカイン	1.5	304.1	182.0	82.0
D3-コカイン	1.5	307.1	185.1	85.1
アンフェタミン	1.3	136.1	93.0	119.0
D5-アンフェタミン	1.3	141.1	93.0	124.0
メタンフェタミン	1.3	150.1	91.0	119.0
D5-メタンフェタミン	1.3	155.1	92.0	121.0
MDMA	1.4	194.1	163.0	135.0
D5-MDMA	1.4	199.1	165.0	135.0

結果と考察

図2に、THCのカットオフ値の半分、すなわち1 ng/mLでのクロマトグラムを示します。カラムへの注入量が20 pgに相当するこの濃度では、ピークを容易に確認できます。3回の注入での面積の再現性は3.6%でした。二乗平均平方根 (RMS) のシグナル対ノイズ (S/N) 比は、RMS S/N の5倍としてひかえめに推定しました。これは、S/N値32.1に相当します。定量限界 (LOQ) はこの値の約半分で0.5 ng/mLに相当し、より少ない注入量で確認できます。

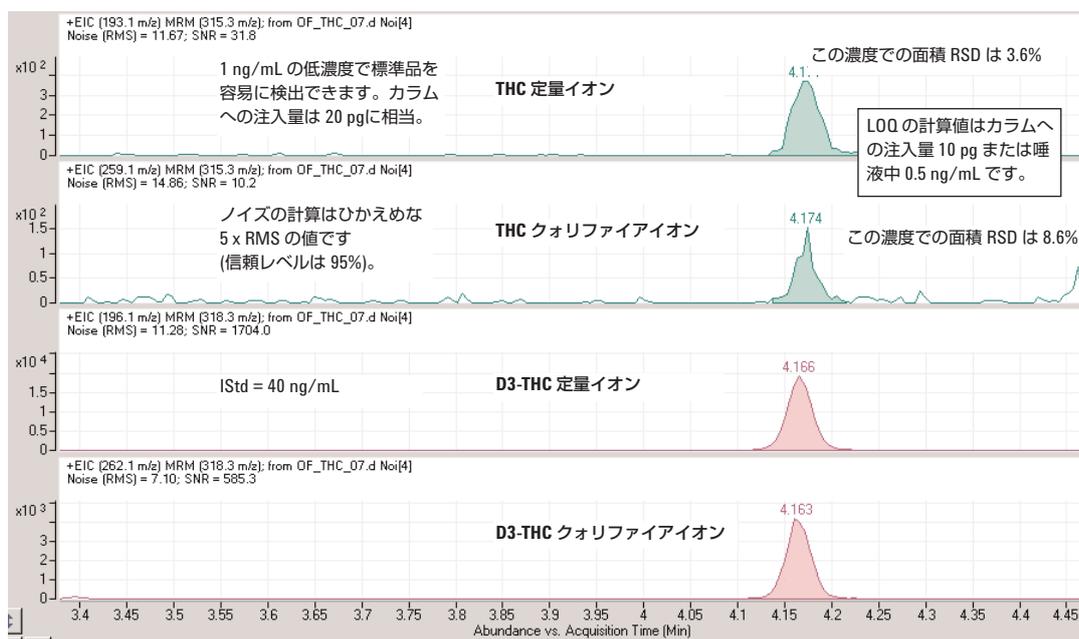


図2 THC および D3-THC のプロダクトイオンのクロマトグラム。クロマトグラムの描画とピークの積分は Agilent 定性分析ソフトウェアによってデータファイルが開かれると自動的に実行されます。ピーク溶出時間は 4.2 分以内でした。スムージングは適用していません。

図3より、THCの場合と同じ計算を使用して、コカイン(coc)、MDMA、メタンフェタミン(meth)、およびアンフェタミン(amp)のLOQの推定を行い、それぞれ唾液中で0.2、0.5、0.6、および2.5 ng/mLを得ました。

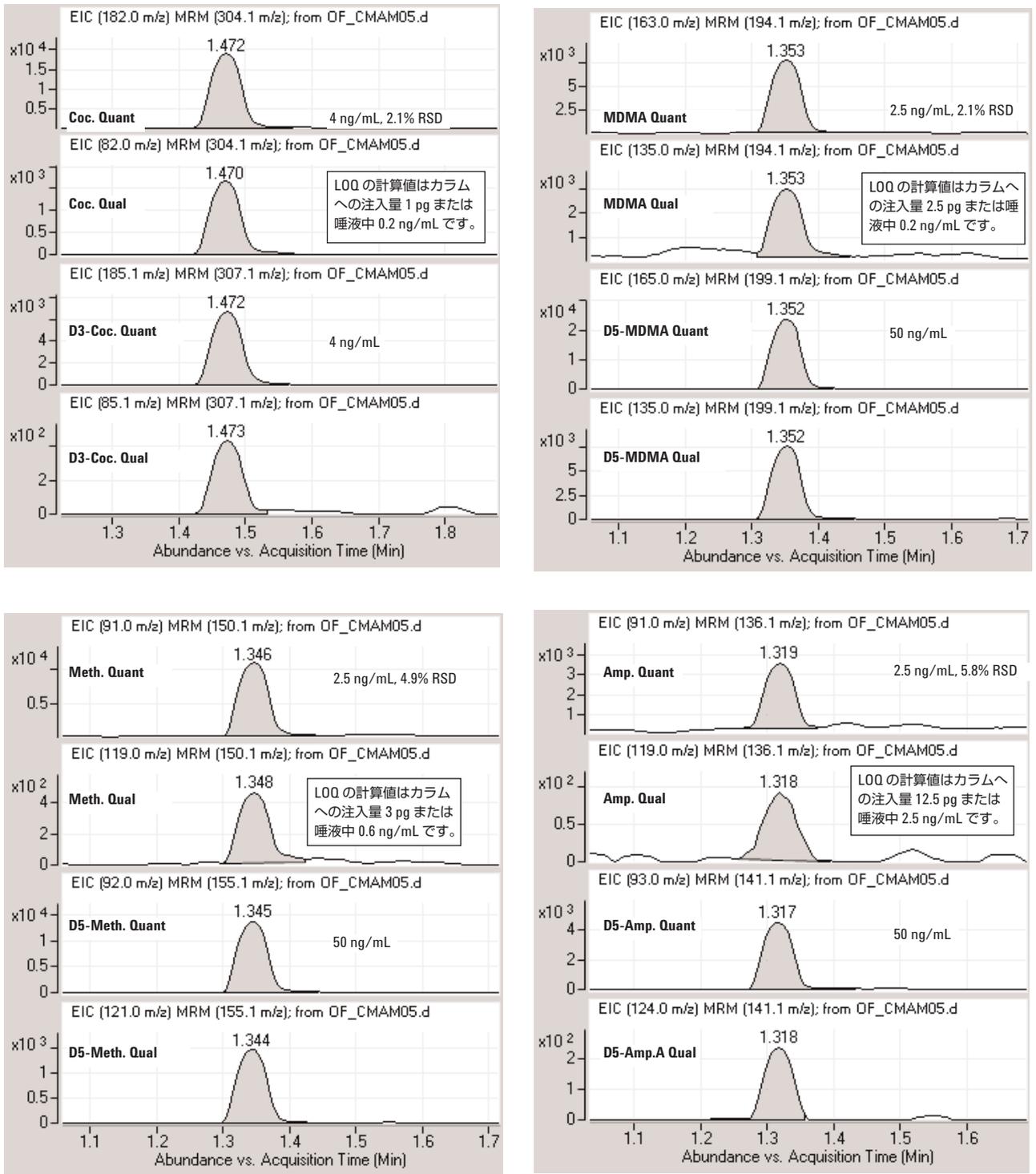


図3 コカイン、D3-コカイン、MDMA、D5-MDMA、アンフェタミン、D5-アンフェタミン、メタンフェタミン、D5-メタンフェタミンを含有した最も低濃度の標準試料でのプロダクトイオンのクロマトグラム。ピーク溶出時間は1.5分以内でした。スムージングは適用していません。

図4には、各化合物と対応する ISTD での定量イオンとクオリファイアイオンを示しました。各クオリファイアイオンの必要条件は、その面積測定値が定量イオンの面積に対して指定された比率の範囲内に収まっていることです。例えば、Agilent G6410AA 装置によって実測された THC のクオリファイアイオンでは、そのイオンの面積測定値の THC 定量イオン面積に対する比率が 22% でなければなりません。±20%の許容範囲を適用すると、その全範囲は 17.6%~26.4% となります。面積の比率がこの範囲内にある限り、確認の合格基準を満たすことが

できます。すべての THC 化合物では、キャリブレーション標準および QC とともに、基準を満たしました。同様の基準を、ISTD に対しても設けました。

残りの化合物では、クオリファイアイオンの面積比の基準をコカインでは 4%、MDMA では 95%、メタンフェタミンでは 95%、アンフェタミンでは 26% に設定しました。THC の場合と同様、対応する ISTD にも基準を設けました。すべてのキャリブレーション標準と QC が、これらの基準を満たしました。

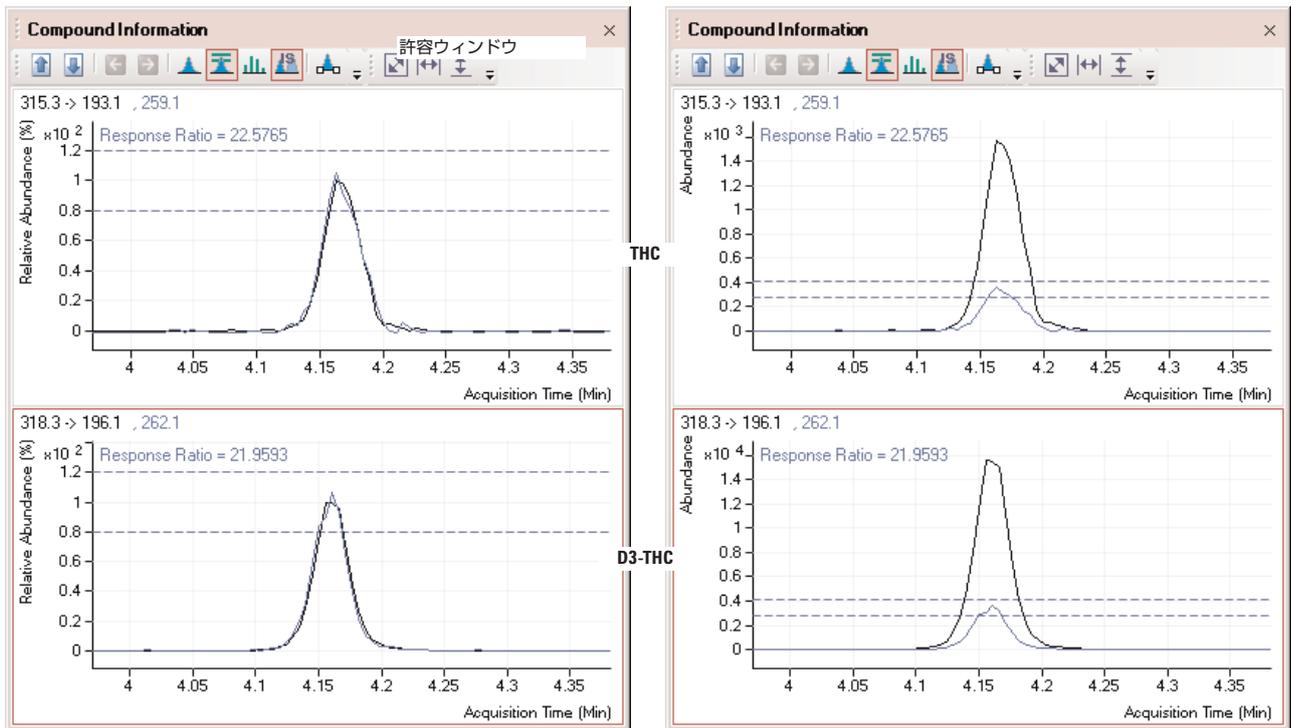


図4 THCの確認。クオリファイアイオンの面積は、定量イオン面積の22%でなければならず、その値の±20%以内、つまり全体で17.6%~26.4%の許容範囲に入っていなければなりません。これを定量分析ソフトウェアによる迅速確認用に表示する方法には、面積でノーマライズ(左)する方法とノーマライズを行わない(右)方法の2つがあり、両者とも定量イオンの上にクオリファイアイオンが重なっていることが分かります。イオン比が許容範囲から外れている場合には、クオリファイアイオンの積分領域は青色となりますが、重なりが分かるように透過で表示されます。

図 5 に、すべての化合物の検量線を示します。検量線の近似には、最も簡単な近似オプション、つまり重み付けと原点処理を行わない直線近似を用いました。各直線は、ほぼ 2 桁分の範囲に拡張されたキャリブレーションレベルに基づいています。

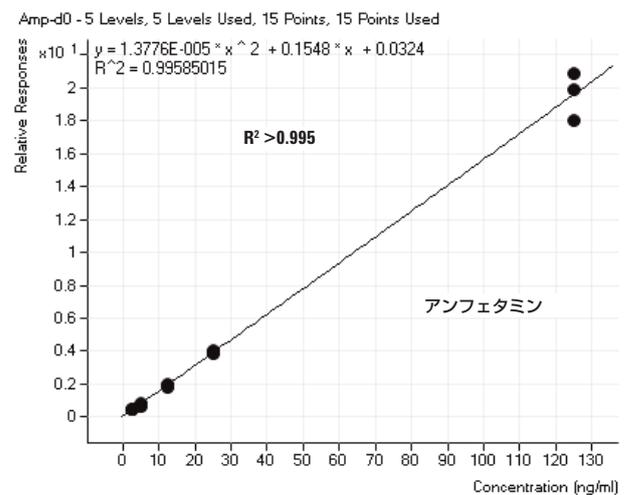
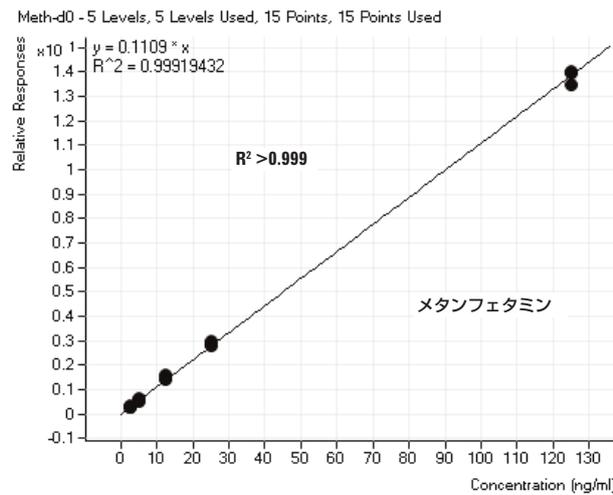
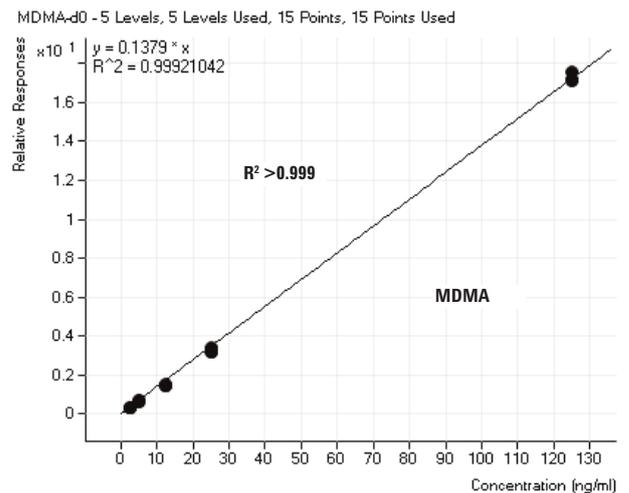
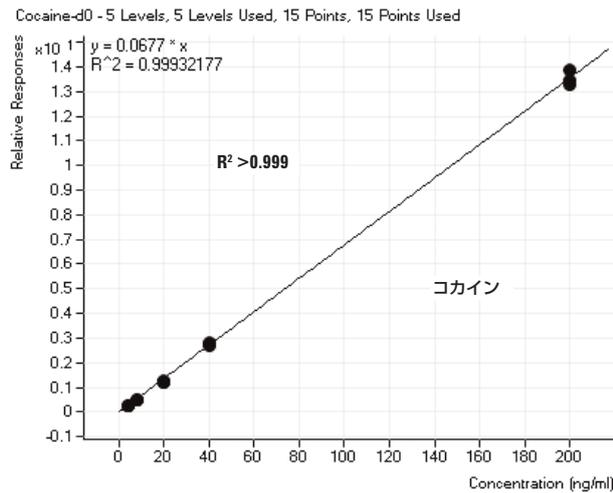
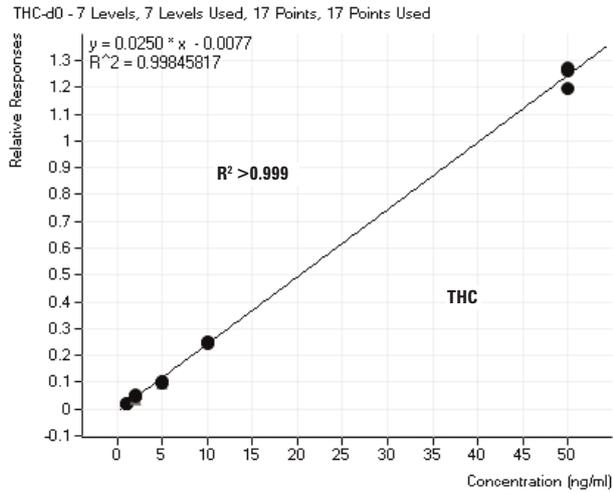


図 5 重み付けと原点処理は行わない直線近似による各 DOA の検量線

表 3 に、THC の繰り返し再現性を示しました。%RSD は予想されるとおり、高い濃度では低い値になっています。%RSD の計算は、3 回の注入での面積カウントから計算しました。

表 3 THC の再現性

濃度 (ng THC/mL 唾液)	% RSD
1	3.6
2	2.5
5	2.3
10	1.0
50	1.7

表 4 は、検量線に基づいて QC 試料と未知試料を定量した結果です。ここで、QC の予測濃度は Immunalysis Corporation により調製された数値で、THC 未知試料の予測濃度は GC/MS による測定値です。

表 4 QC 試料と未知試料の濃度測定値

試料	予測濃度 (ng/mL)	実測濃度 (ng/mL)	真度 (%)
THC QC1	2	1.81	9.5
THC QC2	5	4.21	16.0
THC 未知	10*	9.39	6.1
Coc QC1	8	7.51	6.1
Coc QC2	8	7.68	4.0

* GC/MS による測定値

今後の研究

別の実験によって、大気圧化学イオン化 (APCI)、さらには大気圧光イオン化 (APPI) を使用する THC の分析が、ESI よりも感度の高い方法であることが示されています [2]。本ノート執筆時では、Agilent G6410AA 三連四重極質量分析計はまだプロトタイプ段階であり、Agilent G1948A の APCI ソース、もしくは ESI と APCI の同時測定機能を備える Agilent G1978A マルチモードソースをサポートしていませんでした。THC に関しては APCI ソースを使用することでより高い感度を得ることができるでしょう。さらに、マルチモードソースを使用して、分析の最初の 2 分間を ESI モードにより、コカイン、MDMA、メタンフェタミン、およびアンフェタミンを分析し、その後 APCI に切り替えることで、2 分以降に溶出する THC の分析が可能となるでしょう。

本ノートで前述したとおり、各 MRM トランジションに最適な衝突エネルギーを使用する機能によって、感度が上がると考えられます。しかしながら、G6410A では衝突エネルギーやイオン化モードを最適化しなくても、SAMHSA の要件を簡単に満たすことができます。

結論

ここで記載した LC/MS/MS メソッドによって、唾液に含まれる複数の DOA をきわめて短い分析時間で同定することができます。SAMHSA で規定する職域検査の感度レベルを満たし、また指定の定量イオンによる定量だけでなく、指定のクオリファイアイオンによる確認用に複数のフラグメンテーション トランジションの MRM を行うことができます。粒径が 1.8 μm で内径が 2.1 mm の Agilent C18 カラムと ESI インタフェースを使用することで、比較的速い流量の 500 $\mu\text{L}/\text{min}$ で優れた分離能とピーク形状を得ることができます。

参考文献

1. "Rules Proposed for Workplace Drug Testing", *SAMHSA News*, 12 (3) May/June 2004; a publication of the United States Department of Health and Human Services.
2. J. M. Hughes, D. M. Andrenyak, D. J. Crouch, and M. Slawson, "Comparison of LC-MS Ionization Techniques for Cannabinoid Analysis in Blood", Society of Forensic Toxicologists, 2002 Annual Meeting, Dearborn, MI.

詳細について

弊社の製品およびサービスに関する詳細については、ウェブサイト www.agilent.com/chem/jp をご覧ください。

本資料の詳細については、Agilent Technologies, Inc. の Michael Zumwalt までご連絡ください。

謝辞

貴重なレビューとコメントをいただいた John M. Hughes 氏には、同じ Agilent の社員として多大なる感謝を申し上げます。

AAgilent は、万一この資料に誤りが発見されたとしても、また、本資料の使用により付随的または間接的に損害が発生する事態が発生したとしても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。

© Agilent Technologies, Inc. 2006

Printed in Japan
February 22, 2006
5989-4856JAJP