

固相抽出と LC/MS/MS による 毛髪中のコカイン、ベンゾイルエクゴニン、 コカエチレン、ノルコカインの同定

アプリケーション

法医学

著者

Christine Moore, Cynthia Coulter, and Katherine Crompton
Immunoanalysis Corporation
829 Towne Center Drive
Pomona, CA 91767
USA

Michael Zumwalt
Agilent Technologies, Inc.
9780 S. Meridian Blvd.
Englewood, CO 80112
USA

要旨

毛髪からコカイン、ベンゾイルエクゴニン、コカエチレン、ノルコカインを測定、評価する定量分析方法を紹介します。毛髪サンプルを洗浄、培養し、残存する薬品を混合モード固相抽出と HPLC と LC/MS/MS (APCI モード) で定性しました。確認のために、イオントランジションをモニタリングしてその比を求め、既知のキャリブレーション用標準液で測定した同様のものの 20% 以内に収まっていることを確認しました。クオリファイイングイオンのトランジションをモニタリングし、定量イオンに対して特定の比率内に存在しなければいけないという条件は、評価分析の感度の低下につながります。それは特にベンゾイルエクゴニンには顕著です。一方、最終結果の信頼性の高さは法医学の弁護力と同様に非常に重要です。この分析は同時測定した場合でも、米国連邦ガイドラインに記載されている濃度を満足しています。定量限界は 50 pg/mg で、検出下限は 25 pg/mg でした。また、

コカイン、ベンゾイルエクゴニン、コカエチレン、ノルコカインの日内精度 ($n = 5$) はそれぞれ、1.3%、8.1%、0.8%、0.4% で、日間精度 ($n = 10$) は 4.8%、9.2%、15.7%、12.6% でした。このメソッドを習熟試料と米国での調査研究に得られたサンプルの両方に適用しました。

緒言

コカイン (COC) とその代謝物は、毛髪分析の米国連邦規制対象物です。提示された代謝物の限界濃度は 50 pg/mg で、ガスクロマトグラフ/質量分析計 (GC/MS) を用いてルーチンに分析することは非常に困難です [1,2]。それは、レスポンスを改善するためにコカエチレン (CE) を誘導体化することができないからです。また、ノルコカイン (NC) と CE が共溶出したり、NC、ベンゾイルエクゴニン (BZE) 誘導体のイオンポテンシャルが類似していることも原因として挙げられます。そこで、要求された検出を実現するためのプロセスを開発しました。ポジティブ化学イオン化 GC/MS [3]、直列質量スペクトロメトリーを搭載した GC を使用します [4]。

ここで紹介するアプローチに類似したもので、LC/MS/MS (APCI モード) 用いた毛髪中の COC とその代謝物の分析報告が 2 つあります [5,6]。これらの分析では、まず COC と BZE を分析しますが、いずれの手順でも MRM モードで 1 つのイオントランジションがモニターされているだけです。近年、2 つ目のトランジションをモニターする必要性に着目する研究者がでてきています。彼らは、第 1 イオンと第 2 イオンのアバンダンスを計算し、最終結果の信頼性が向上するように努めています。Maralikhova と Weinmann は、LC/MS/MS によ



Agilent Technologies

る確証分析のガイドラインは未だに確立されたものではなく、十分に信頼できる薬物同定のためには少なくとも2種類のトランジションをモニターする必要があると主張しています[7]。Johansen と Bhatia は、LC/MS/MSを用いた血液、尿中のCOCとその代謝物の分析について発表しました[8]。そこで2つのMRM遷移とその比、リテンションタイムに基づいた同定基準の開発に着目しています。これは、生成イオンが共通する場合があります

め、特に質量数や化学特性が類似したものが含まれている化合物の評価分析では非常に重要です。

この指摘を直列質量分析にも反映させ、LC/MS/MSを用いた毛髪中のCOCとその代謝物の分析手法を開発、実証しました。これにより得られた結果の信頼性がさらに向上しました。本メソッドを適用して分析した化合物の構造を図1に示します。

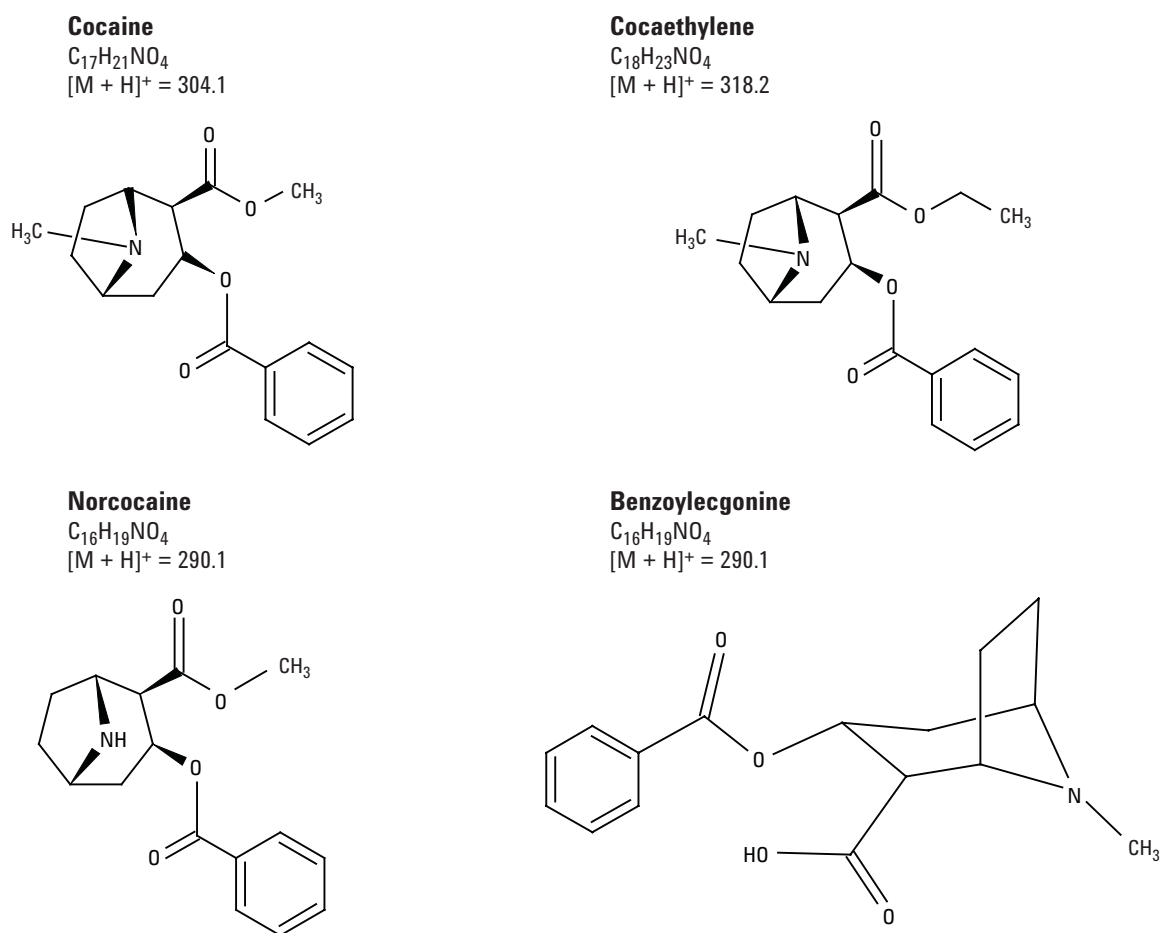


図1. この研究で分析したコカインと代謝物の構造式

実験

サンプル調製

標準と試薬

重水素化内部標準 (BZE-d3、COC-d3、NC-d3、CE-d8) と各々の薬物について、ラベルされていない標準物を Cerilliant (Round Rock, TX) から、固相抽出カラム (Clin II, 691-0353T) は SPEWare (San Pedro, CA) から、入手しました。すべての溶媒は HPLC クラスと同等、あるいはそれ以上のグレードで、薬品は ACS グレードです。

キャリブレーター

クロマトグラフのキャリブレーション標準には、メタノール中に濃度 200 ng/mL の重水素化内部標準を含む溶液を用いました。ラベルなしの薬物標準物質も、同じ濃度をメタノールに添加しました。すべての溶液は使用しないときは、-20 °C で保管しました。各々のバッチについて、薬物が添加されていない毛髪 10 mg で 8 種類のキャリブレーション標準を調製しました。さらに濃度 25、50、100、200、500、1,000、2,000、10,000 pg/mg の薬物を含む毛髪を調製しました (内部標準の濃度は 1,000 pg/mg)。

サンプル調整とクロマトグラフィー分析

毛髪片 (10 mg) を塩化メチレン (1.5 mL) で簡単にすすぎ、付着している整髪料 (ムース、スプレー、ジェル等) を洗い落として乾燥しました。試料を小さくカットして内部標準 (50 µL) を添加しました。0.025 M リン酸緩衝液 (pH 2.7, 1.5 mL) を加え、75 °C で 2 時間超音波にかけました。緩衝液は清潔なガラス試験管にデカントし、0.1 M のリン酸ナトリウム緩衝液をキャリブレーター、コントロール、毛髪サンプルに加えました。さらに固相抽出カラムに毛髪の繊維が付着しないように、混合物を 10 分間遠心分離しました。固相混合モード抽出カラム (Clin II, 691-0353T) はポジティブプレッシャーマニホールドに設置しました。それぞれのカラムは、塩化メチレン:メタノール:水酸化アンモニウム (78:20:2 v,v 2 mL)、酢酸エチル (2 mL)、メタノール (2 mL)、0.1 M 塩酸 (1 mL) でコンディショニングしました。サンプルの通過後、カラムを脱イオン水 (2 mL)、0.1 M 塩酸 (2 mL)、メタノール (2 mL)、酢酸エチル (2 mL) で洗い流し、各洗浄の間、カラムを窒素ガス (30 psi, 2 分) で

乾燥させました。最後に新しく調製した塩化メチレン:メタノール:水酸化アンモニウム (78:20:2 v,v 3 mL) で薬物を溶出させました。抽出液は 40 °C の窒素ガスで蒸発乾燥させ、メタノール (50 µL) 中に再度溶解しました。

データ解析

重水素化内部標準を用いて、すべての薬物について濃度範囲 25 ~ 10,000 pg/mg の回帰直線キャリブレーションを作成しました。ターゲット検体のピーク面積比と各々の重水素化標準はアジレント MassHunter ソフトウェアで計算しました。データは、原点を含まず、1/x の重みをつけた線形最小二乗回帰曲線にはまりました。

選択性

薬物を含まない毛髪はボランティアから提供され、抽出物やマトリクス、ポテンシャルイオンのサブプレッションからの干渉を評価するために前述の手順で抽出、分析しました。イオンサブプレッションは、APCI モードで分析する場合、ESI モードほど効果が期待できません。また、一般的な薬物干渉物を無添加の毛髪に加え、同様の抽出、分析を行いました。次の薬物 (濃度 20,000 pg/mg) を前述の方法で分析しました: モルヒネ、6-アセチルモルヒネ、コデイン、ヒドロコドン、ヒドロモルホン、オキシコドン、オキシモルホン、トラマドール、デスマチルトラマドール、フェンタニル、ガンマ-ヒドロキシブチル酸 (GHB)、テトラヒドロカンナビノール (THC)、9-カルボキシ-THC、アンフェタミン、メタンフェタミン、メチレンジオキシメタンフェタミン (MDMA)、メチレンジオキシアンフェタミン (MDA)、メチレンジオキシエチルアンフェタミン (MDEA)、カリソプロドール、メタドン、フェンシクリジン、ジアゼパム、ノルジアゼパム、オキサゼパム、アルプラゾラム、クロルジアゼポキシド、プロマゼパム、テマゼパム、ロラゼパム、フルラゼパム、7-アミノフルニトラゼパム、 α -ヒドロキシアルプラゾラム、ニトラゼパム、トリアゾラム、 α -ヒドロキシトリアゾラム、アミトリプチリン、ノルトリプチリン、イミプラミン、プロトリプチリン、ドクサピン、ノルドクサピン、トリミプラミン、セコバルビタール、ペントバルビタール、ブタルビタール、フェノバルビタール。

直線性と選択性

直線性の評価は、薬物を含まないサンプルを除いた 8 キャリブレーションポイントで行いました。メソッドの感度は、定量限界 (LOQ) - 定量できる最低濃度 - と、キャリブレーション標準のリテンションタイム 0.2 分以

内で最低 S:N 比を 10 として検証しました。検出下限 (LOD) は検出可能な最低濃度で、S/N 比を 3 としています。

精度

日間精度と日中精度は、すべての薬物に関してキャリブレーションポイント 100 pg/mg で検証しました。日内精度は同日に測定した 5 回分のデータから、日間精度は 5 日間の間に測定した合計 10 の試料 (1 日あたり 2 サンプル、5 日間; n = 10) から求めました。

安定性

薬物抽出物の安定性は、濃度 50 pg/mg でオートサンプリングを液体クロマトグラフチャンバの中に 48 時間放置し、その後再分析して決定しました。装置は 4 °C に保ちました。レスポンスは、分析初日のものと比較しました。

実物標本への適用

継続中の調査研究の一環として、調査目的の他、習熟試料としても、毛髪試料を受け取っています。

LC/MS メソッド詳細

LC 条件

Agilent 1200 シリーズバイナリポンプ、デガッサ、冷却機能付きウェルプレートサンプリング、カラムコンパートメント

カラム:	Agilent ZORBAX XDB-C18、 4.6 x 50 mm、1.8 µm (部品番号 922975-902)
カラム温度:	40 °C
移動相:	A = 20 mM 酢酸アンモニウム (pH 6.4) B = メタノール
流量:	0.9 mL/min
注入量:	2 µL

グラジエント:

時間 (分)	%B	流量 (mL/min)	
0.0-1.5	30	0.9	
4.5	55	1	
5	60	1	ストップタイム: 7 分
7	75	1	ポストタイム: 6 分

ニードル洗浄 (75:25 メタノール/水): ポート洗浄 2 秒

MS 条件

Agilent 6410 トリプル四重極質量分析計

モード:	Agilent G1947B イオン源を 用いたポジティブ APCI
蒸発温度:	400 °C
ドライガス流量:	5 L/min
ドライガス温度:	350 °C
ネブライザ:	50 psig
V _{cap} :	4500 V
コロナニードル:	4 µA
分解能 (FWHM):	Q1 = 2.5 amu; Q2 = 0.7 amu
すべての MRM 遷移のデュエルタイム = 50 msec	

フローインジェクション分析を用いて、各薬物に対して 2 つのトランジションを選択、最適化しました。最適化に必要なパラメータは、イオン源とトリプル四重極質量アナライザの間のフラグメント電圧です。この電圧は、プリカーサイオンがマス部の最初の四重極に最大限移動するように、最適化する必要があります。すべての化合物で 120 V が最適な値でした。

表 1 には、定量イオンと定性イオンを生成する各プリカーサイオン (M+1) の最適な衝突エネルギー電圧を示します。その後の各分析では、陽性確認の基準を満たすには定量イオンと定性イオンの比率が ± 20% 以内に収まる必要があります。各薬物のイオン比は濃度 100 pg/mg で求めました。

表 1. MRM モードパラメータ (カッコ内はクオリファイアの値)

セグメント	化合物	遷移	衝突エネルギー (V)
1 (0 分)	ベンゾイルエクゴニン	290.3 > 168.3 (105.3)	15 (15)
	D3-ベンゾイルエクゴニン	293.3 > 171.4	20
2 (3.2 分)	不使用		
3 (4 分)	コカイン	304.3 > 182.3 (82.2)	20 (25)
	D3-コカイン	307.3 > 185.3	20
4 (4.9 分)	コカエチレン	318.3 > 196.4 (82.2)	25 (25)
	D8-コカエチレン	326.3 > 204.4	20
	ノルコカイン	290.3 > 168.3 (136.3)	15 (25)
	D3-ノルコカイン	293.3 > 171.4	15

結果と考察

メソッド開発

毛髪中の COC と代謝物を LC/MS/MS で簡単に検出する分析方法を紹介しました。これらの薬物は今までも毛髪中で検出されてきましたが、LC/MS/MS がより利用されるようになり、メソッド開発が必要になりました。COC 毛髪分析で 2 番目の定性イオンをモニタリングした例を初めて紹介しましたが、これは分析対象化合物同定の信頼性を高めるためには必要です。例を図 2 に示します。

メソッドバリデーション

COC、BXE、NC のために開発されたクロマトグラフの手順を、承認済みプロトコルに従ってバリデーションしました。各薬物の定量限界と検量線は、実験のセクションで説明したとおりです。濃度範囲 25 ~ 10,000 pg/mg で、すべての薬物に対して平均相関係数 $R^2 > 0.99$ という良好な直線性が確認できました。CE の例を図 3 に示します。

表 2 に平均相関係数、検量線の勾配、モニタリングしたイオンのクオリファイイング比を示します。BZE の 2 番目の遷移の強度が低かったため (6.7 ~ 10%) 一部の薬物に対するメソッド感度は制限されましたが、感度よりもクオリファイイングイオンでモニタリングしてできる法医学同定の方が重要であると考えます。

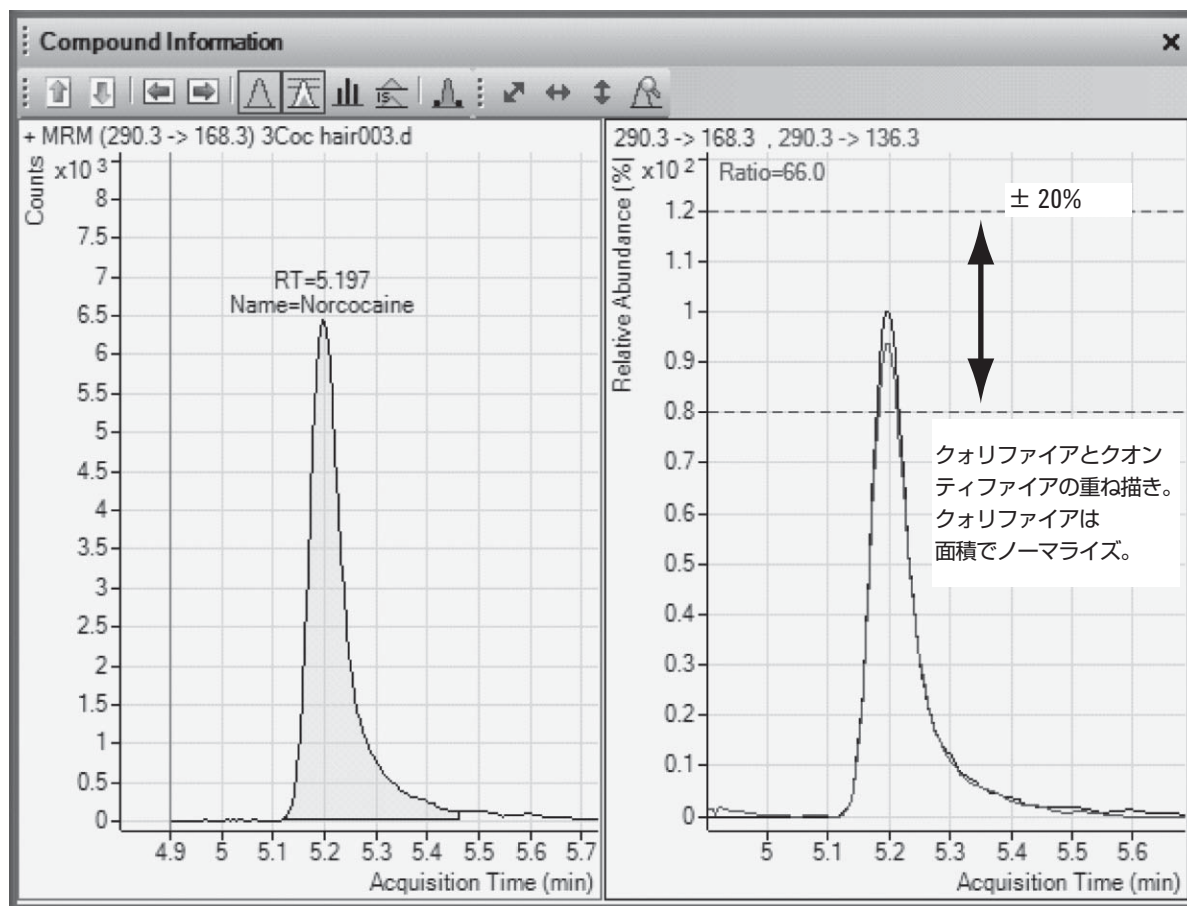


図 2. 100 pg/mg ノルコカインのイオン比

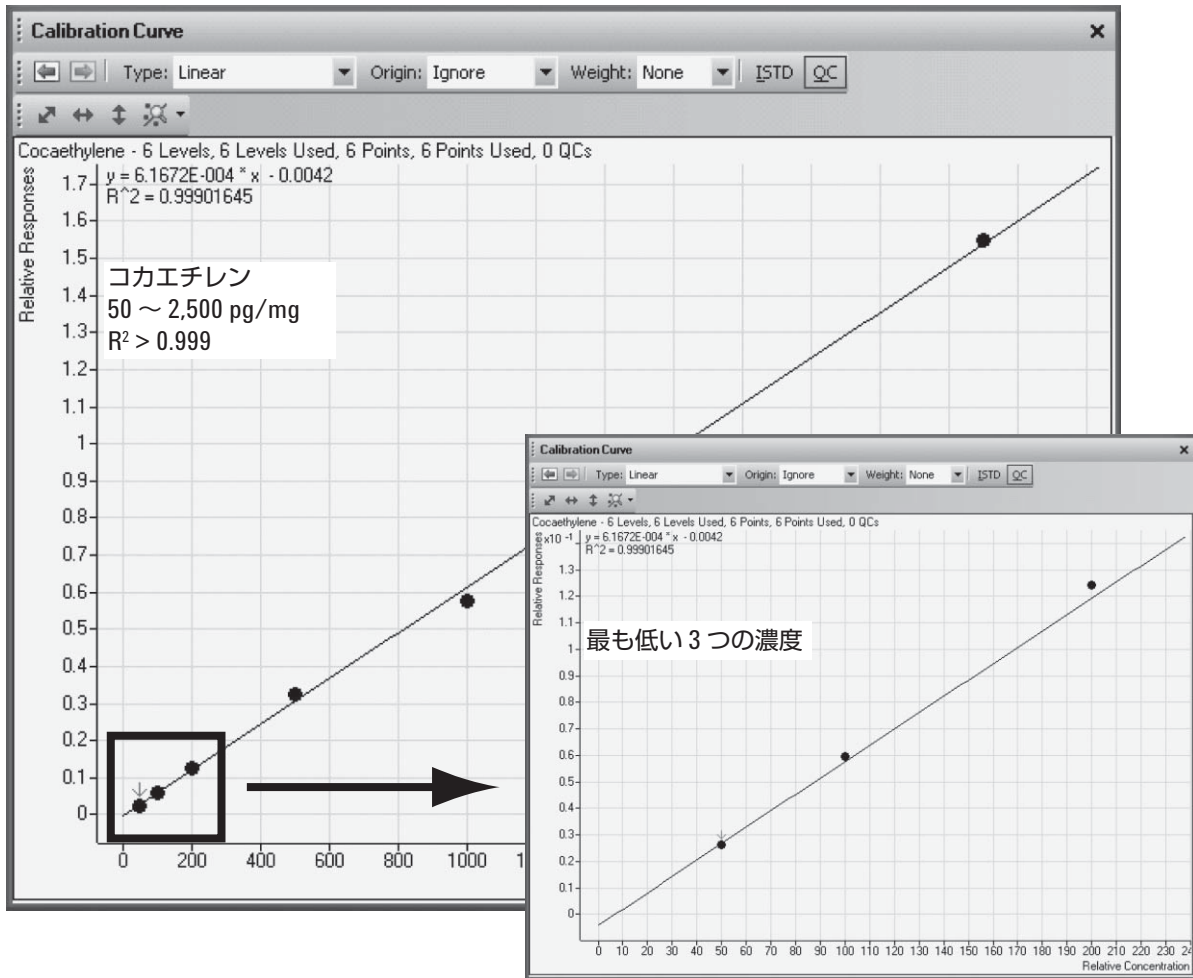


図 3. 最低濃度のコカエチレンの優れた直線性

表 2. 平均相関係数、検量線の勾配、イオンのクオリファイング比

薬物	平均相関係数 (n = 3)	検量線の 方程式	クオリファイ イオン強度の 許容範囲
ベンゾイルエクグニン	0.9989	$y = 0.00116x$	6.7–10%
コカイン	0.9995	$y = 0.00106x$	37.8–56.8%
ココエチレン	0.9987	$y = 0.00061x$	49.3–74%
ノルコカイン	0.9992	$y = 0.00096x$	52.8–79.2%

薬物を摂取していない人から収集した毛髪サンプルでは、どの分析でも干渉がみられませんでした。毛髪の成分がこれらの薬物と類似する傾向があるのでこの結果は予想に反するものでした。外因的な干渉は一般的に薬物乱用ですが、それは実験の欄に記載されているとおりです。これらのトランジション経路ではクロマトグラフ上の干渉は見られませんでした。

図 4 に、抽出した 50 pg/mg の毛髪サンプルの例を示します。分析の日間、日内精度は前述のとおりに繰り返し分析を行って求めました。BZE、COC、CE、NC の日間精度は順に 9.2%、4.8%、15.7%、12.6% でした (n = 10)。日内精度 (n = 5) は順に 8.1%、1.3%、0.8%、0.4% でした。最後に、捕集システム中の薬物と抽出物の

安定性を評価しました。7 °C に維持したオートサンプラ内で保管した場合、抽出物は少なくとも 2 日間安定でした。48 時間後の抽出物の定量値は、その差は 5% 未満でした。

標準試料

入手した試料を前述の手順で評価しました。すべての定量値は、プログラム管理者が同定したグループ平均の 10% 以内に収まりました。

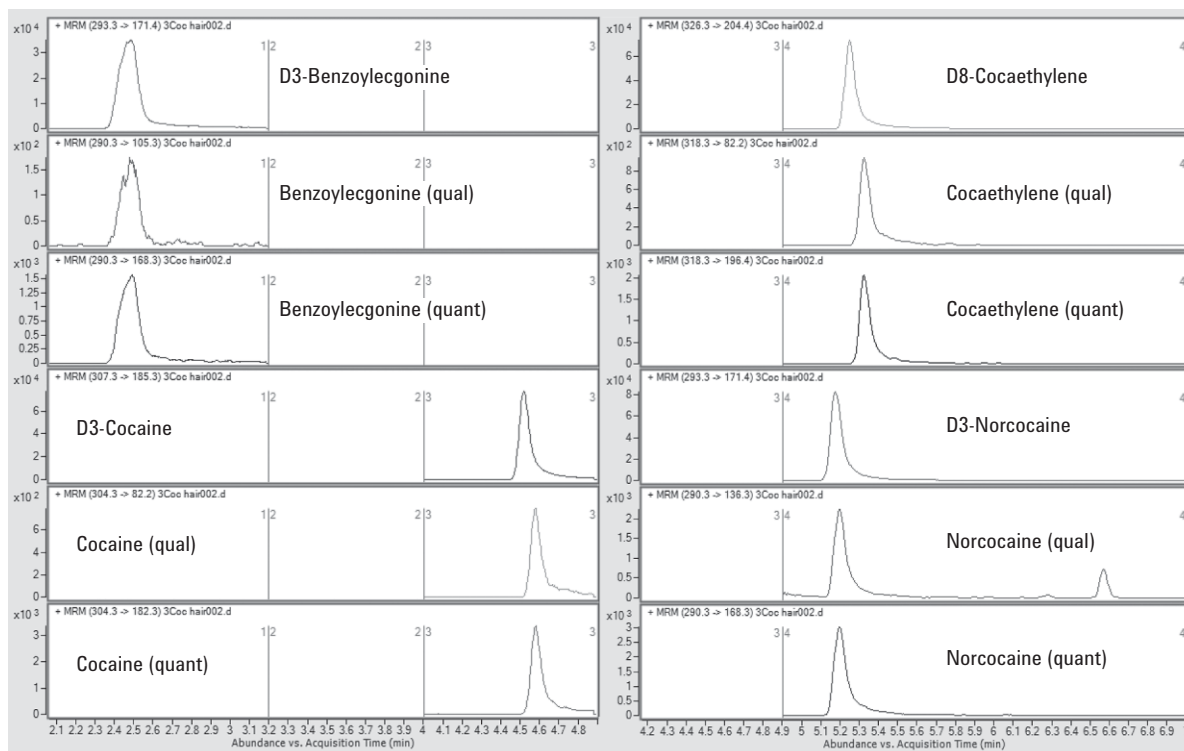


図 4. 毛髪で分析されたすべての化合物のクロマトグラフ (50 pg/mg)

結論

毛髪中の COC、BZE、CE、NC の測定について説明しました。LC/MS/MS 分析は再現性が高く、堅牢で、精密な測定が可能な装置です。クオリファインゲイオンのトランジションをモニタリングし、信頼のおける同定を行うため、比率の計算は既知キャリブレーション標準の 20% 以内に収まるものとししました。このメソッドは、メソッドはルーチン分析を行うラボでも簡単に組み入れることができます。

参考文献

1. F. S. Romolo, M. C. Rotolo, I. Palmi, R. Pacifici, A. Lopez, *Forens Sci Int* 138 (103) (2003) 17
2. P. Kintz, P. Mangin, *Forens Sci Int* 73 (2) (1995) 93
3. E. Cognard, S. Rudaz, S. Bouchonnet, C. Staub, *J Chromatogr B* 826 (2005) 17

4. J. A. Bourland, E. F. Hayes, R. C. Kelly, S. A. Sweeney, M. M. Hatab, *J Anal Toxicol* 24 (7) (2000) 489
5. M. Klys, S. Rojek, J. Kulikowska, E. Bozek, M. Scislowski, *J Chromatogr B* 854 (2007) 299
6. K. B. Scheidweiler, M. H. Huestis, *Anal Chem* 76 (2004) 4358
7. B. Maralikova, W. Weinmann, *J Chromatogr B* 811 (2004) 21
8. S. S. Johansen, H. M. Bhatia, *J Chromatogr B* 852 (1-2) (2007) 338

詳細情報

アジレント製品とサービスの詳細については、アジレントのウェブサイト www.agilent.com/chem/jp をご覧ください。

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。また、本文書掲載の機器類は薬事法に基づく登録を行っておりません。

本文書に記載の情報、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。著作権法で許されている場合を除き、書面による事前の許可なく、本文書を複製、翻案、翻訳することは禁じられています。

© Agilent Technologies, Inc. 2008

Printed in Japan
August 31, 2008
5989-7212JAJP