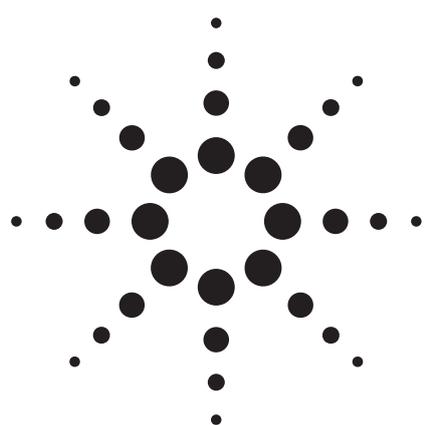


抽出ベンゾイル化と LC/MS/MS による アンフェタミン系薬物の定量分析



アプリケーション

法医学

著者

Neil Campbell, B. Sc.
Forensic Science Laboratory
Chemistry Centre (WA)
125 Hay Street
East Perth, Western Australia
Australia

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

概要

血中のアンフェタミン系薬物の存在を確認するため、Agilent 6410A トリプル四重極質量分析計(QQQ)を用いた、高速、高感度な分析方法を紹介します。濃度範囲 15 ~ 1,000 ng/mL で優れた直線性を示しました。本研究で分析されるアンフェタミン系薬物には、血中のアンフェタミン、メタンフェタミン、メチレンジオキシアンフェタミン (MDA)、メチレンジオキシメタンフェタミン (MDMA) が含まれます。サンプルは、抽出アルキル化法で前処理しました。サンプル前処理後、高速分離で高い分解能を得るために、粒径 1.8 μm C18 カラムを用いて逆相 LC/MS/MS 分析を行いました。測定対象成分と内部標準ともに 3.6 分以内に溶出しました。

緒言

アンフェタミン類は、中枢神経系に強い刺激を与える交感神経刺激薬群です。このグループの化合物はアンフェタミン (フェニルイソプロピルアミン) を基本構造とし、構造的に類似しています。他の化合物は、エフェドリン、偽エフェドリン、メチルアンフェタミン、フェンテルミン、フェンフルラミン、クロルフェンテルミン、MDA、MDMA (エクスタシー) です。本研究で使用される LC/MS/MS メソッドは、生前と死後両方の血液や尿、死後の肝臓や内臓中のアンフェタミン系薬物を定量するときに使用します。1 級と 2 級の脂肪族アミンはアルカリ条件でペンタフルオロベンゾイルクロライドと反応し、それぞれアミドを形成します。この反応と抽出アルキル化の原理を利用して、薬物によって形成された生成物を血液や尿から分離します。

薬物は、エレクトロスプレー液体クロマトグラフ/直列質量分析計とマルチリアクションモニタリング (LC/MS/MS-MRM) で定量します。定量にあたり、各測定対象化合物の定量生成物イオンをモニターします。確証をとるために、さらに、クォリファイアイオンを追加でモニターします。クォンティファイアイオンに対するクォリファイアイオンの全体的なイオン比をメソッドで固定し、その比率を化合物の存在を確認するためにすべてのサンプルに適用します。この比率の許容範囲は $\pm 20\%$ です。



Agilent Technologies

関連する D5 内部標準は、確証をとる必要がないので、クオンティファイアイオンだけをモニターします。

化合物の構造式を図 1 に示します。

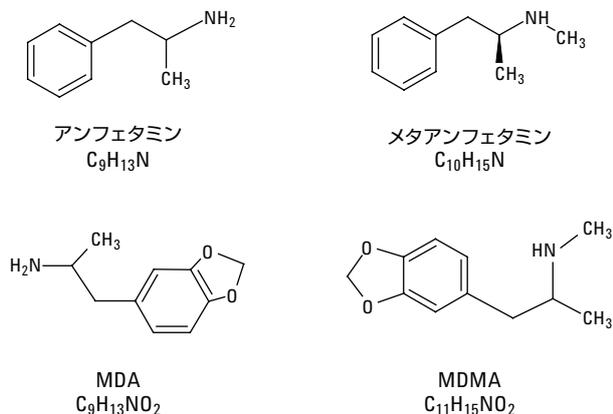


図 1. 本研究で分析した化合物の構造式

実験

試薬 (Sigma-Aldrich、Castle Hill、NSW、Australia)

1. 5% ペンタフルオロベンジルクロライド (PFBCI) (PFBCI 0.25 mL を塩化ブチル 5 mL に添加します。)
2. トリエタノールアミン/シクロヘキサン (TEA/CH) (TEA/CH 0.5 mL を 500 mL メスシリンダに取り、シクロヘキサンをメスアップします。溶液を十分混合し、分離するまで放置します。)
3. アンモニア緩衝液 (水 100 mL に、飽和溶液が得られるまで塩化アンモニウムを溶解します。濃縮アンモニア溶液で pH を 9.4 に調整します。)
4. 無水硫酸ナトリウム

標準試料 (Cerilliant、Round Rock、TX、USA)

1. 分析対象薬物の標準試料 (メタノール溶液) は固形物質から調製しました。実際の量は測定対象化合物と他の化合物ではわずかに異なり、後述の濃度範囲に反映されます。メタノールで標準試料を希釈し、血液に添加して約 15 ~ 1,000 ng/mL の濃度範囲にします。

2. 内部標準 - 10 µg/mL の D5-アンフェタミン、D5-メチルアンフェタミン、D5-MDMA、D5-MDA 混合物。標準試料は民間のサプライヤーから購入し、密閉されたアンプルとして入手します。各アンプルには、薬物約 100 µg を含むメタノール溶液 1 mL が入っています。
3. レスポンスファクタは、適切な分析結果を得られる予想濃度範囲で標準試料を血液に添加して決定します。血液の場合、それを 0.05、0.1、0.25、0.5、1 µg/mL と同等に調整します。各分析バッチにはブランク測定が必要です。

サンプル前処理

1. 血液 0.2 mL を 15 mL の使い捨て試験管に移し、水で希釈して 1 mL にします。D5-アンフェタミン標準混合物をスパイクした TEA/CH 溶液 5 mL を、濃度 50 ng/5 mL のアンモニア溶液 0.2 mL と新しく調製した 5% PFBCI 溶液 0.01 mL に添加します。あるいは、自動希釈装置 (Hamilton Microlab シリーズ 500) で 0.2 ~ 1 mL 希釈プログラムを用いて、より便利に血液のサンプリングや希釈を行えます。
2. 希釈した標準試料に添加したブランク血液 0.2 mL で、上記のように標準溶液を処理します。
3. 3 分間、ボルテックスミキサーで攪拌し、60 °C で 10 分間加熱した後、遠心分離します (注記 4 を参照)。
4. 有機層を取り除き、無水硫酸ナトリウムを充填したパスツールピペット中で乾燥させ、乾固するまで蒸発させます。
5. メタノール 100 µL に残留物を再溶解し、少量オートサンプリングバイアルに移して密閉した後、LC/MS/MS-MRM で分析します。

注記:

1. 上記の ISTD (内部標準) は 250 ng/mL で、濃度範囲 10 ~ 1,000 ng/mL に適しています。
2. 重水素化された類似物質が入手できない測定対象化合物に対しては、選択した内部標準と測定対象化合物の化学的性質が一致しなければいけません。つまり、1 級アミンには 1 級アミンを使用し、2 級アミンには 2 級アミンを使用します。

3. ボルテックスミキサーでの混合中に、エマルジョンが生じることがあります。その場合はパスツールピペットでかき混ぜ、再び遠心分離します。
4. アンフェタミン、メチルアンフェタミン、MDMA、MDA は、加熱なしで反応が進みます。エフェドリンを含めて定量する場合は、加熱する必要があります。

LC/MS/MS 機器構成

本研究で使用される LC/MS/MS システムの構成は、Agilent 1200 シリーズデガッサ、バイナリポンプ、オートサンブラ、カラム恒温槽、G6410A トリプル四重極質量分析計 (QQQ)、G1948B エレクトロスプレーイオン源 (ESI) です。システムコントロールとデータ解析は Agilent MassHunter B.01.01 ソフトウェアで行いました。LC と MS の詳細条件を以下に示します。

LC/MS メソッドの詳細

LC 条件

カラム:	Agilent ZORBAX XDB-C18、4.6 × 50 mm、1.8 μm (p/n 922975-902)		
カラム温度:	60 °C		
移動相:	A = アンモニア緩衝液 (pH = 9)、試薬を参照 B = メタノール		
流量:	0.7 mL/min		
グラジエント:	時間 (分)	%B	
	0–0.2	50	
	3.0–4.0	100	ポストラン = 1 分
	4.1–6.0	50	
注入量:	2 μL		

MS 条件

モード:	G1948B イオン源を用いたポジティブ ESI		
ネブライザ:	50 psig		
ドライガス流量:	6 L/min		
ドライガス温度:	350 °C		
V _{cap} :	4,000 V		
Q1 分解能:	0.7 amu (FWHM)		
Q2 分解能:	0.7 amu (FWHM)		

MRM を表 1 に示します。各 MRM のフラグメンター電圧とデュエルトタイムは、それぞれ 140 V と 40 msec で固定されています。

表 1. 本研究で分析した化合物の MRM 設定 (確認のために、クオリファイアイオンも括弧付きで示します)

化合物	プリカーサイオン	生成物イオン (クオリファイア)	衝突エネルギー
アンフェタミン	330	119 (91)	15
D5-アンフェタミン	335	124	15
メチルアンフェタミン	344	119 (91)	15
D5-メチルアンフェタミン	349	121	15
MDMA	388	163 (135)	20
D5-MDMA	393	165	20
MDA	374	163 (135)	20
D5-MDA	379	168	20

結果と考察

約 15 ~ 1,000 ng/mL での各化合物の直線性を、図 2a ~ 2d に示します。2 次曲線近似を適用しました。重み付けはなく、原点は含みません。4 つの曲線近似すべてにおいて相関係数 (R^2) は、0.999 以上です。また、2 次相関係数はすべて 0.007 以下でしたので (図 2a ~ 2d を参照)、曲線近似への寄与が極めて少なくなり、結果として生じた曲線を線形と考えることができます。

化合物が存在することの確認を得るためには、クオリファイアイオンのクオンティファイアイオンに対するピーク面積比が、メソッド中に設定した予想値の ± 20% 以内に収まる必要があります。キャリブレーションや品質管理サンプル (QC) を含むバッチ内のすべてのサンプルで、この基準が満たされる必要があります。満たされない場合は陰性と考えられます。

各化合物のイオン比確認の例を図 3a ~ 3d を示します。

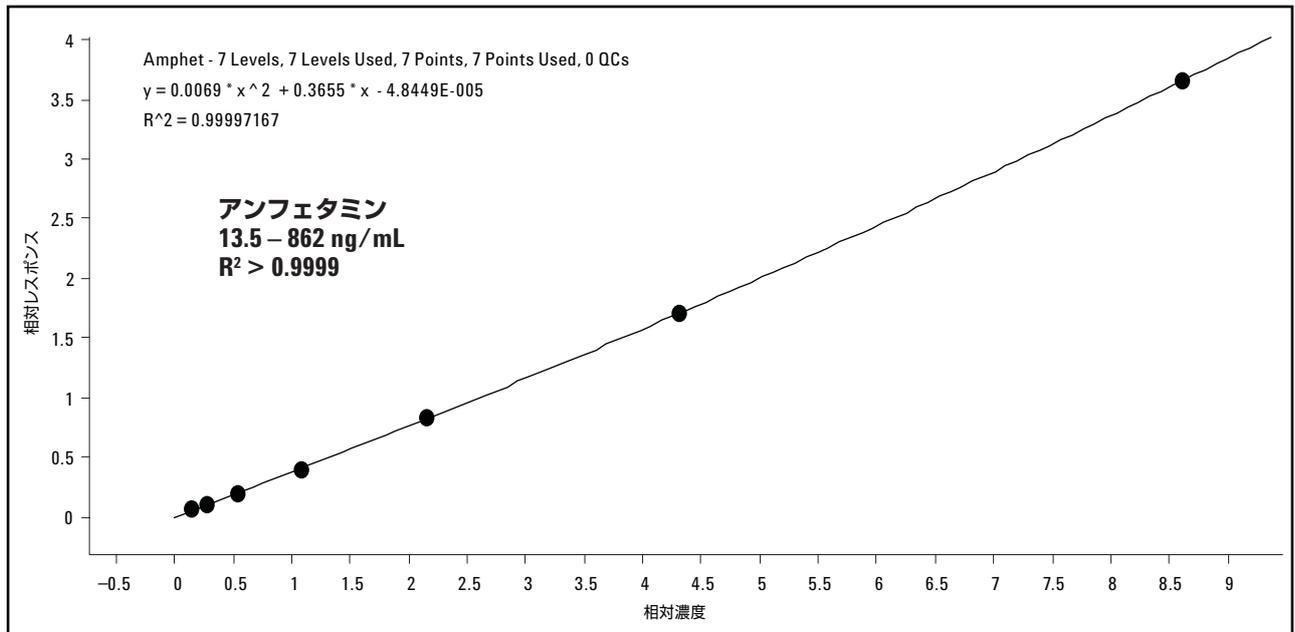


図 2a. 血中アンフェタミンの直線性

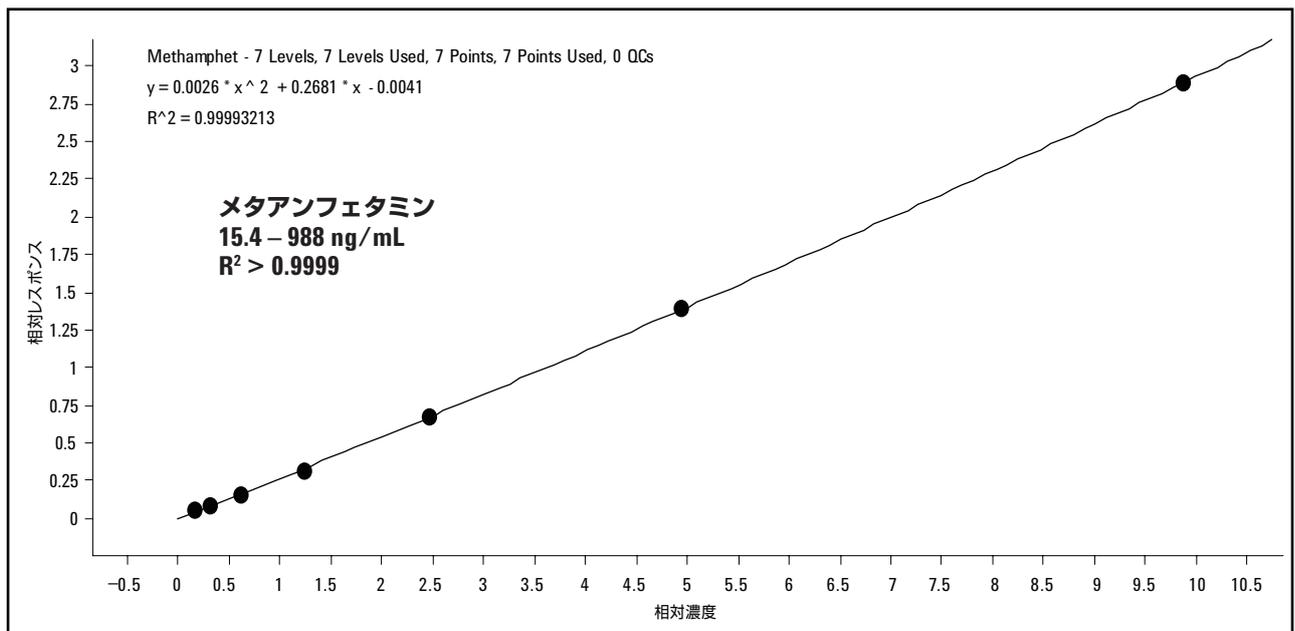


図 2b. 血中メタアンフェタミンの直線性

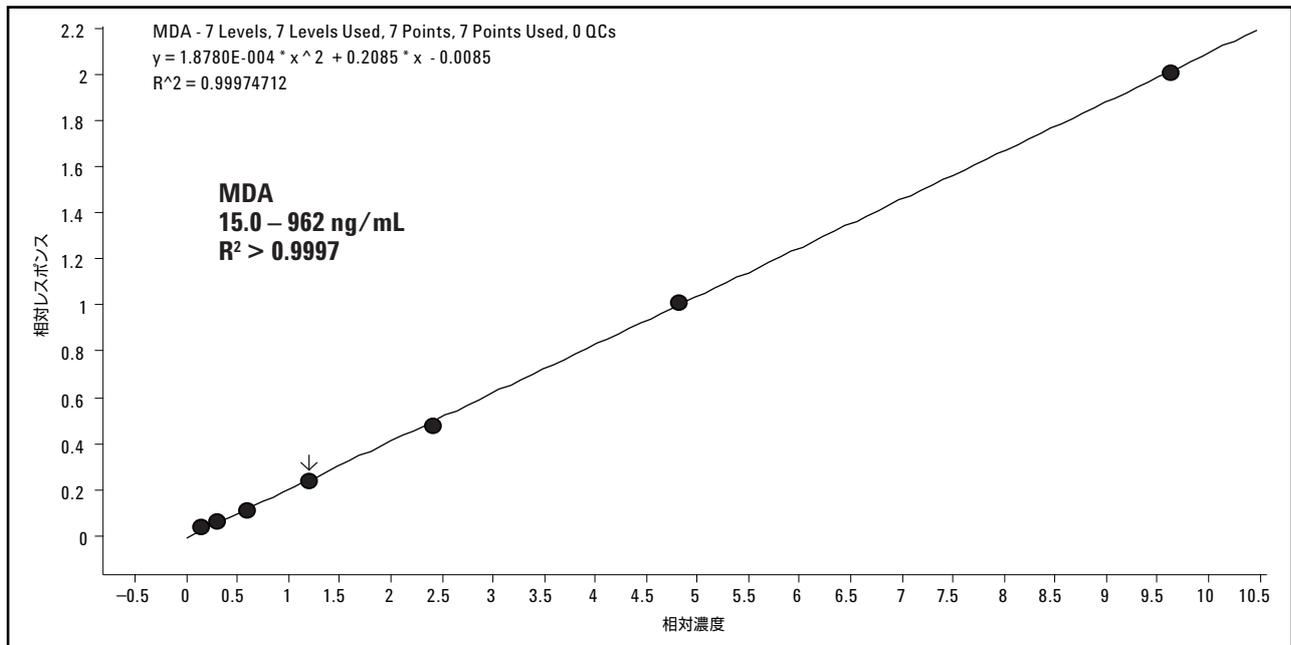


図 2c. 血中 MDA の直線性

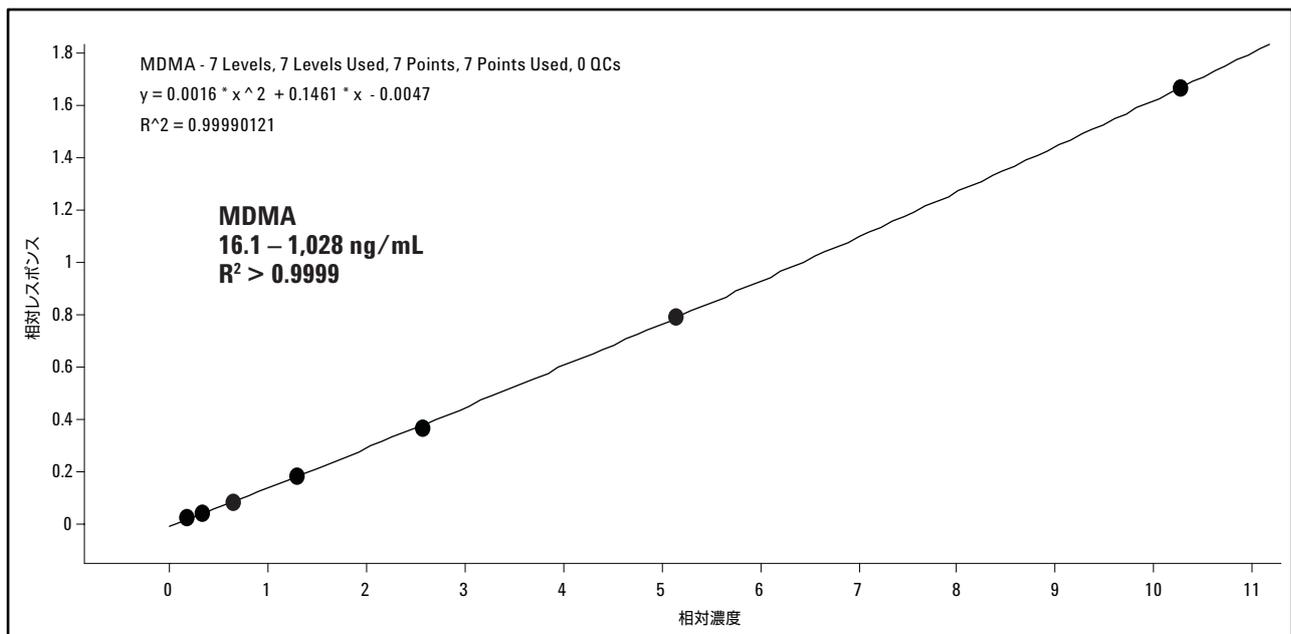


図 2d. 血中 MDMA の直線性

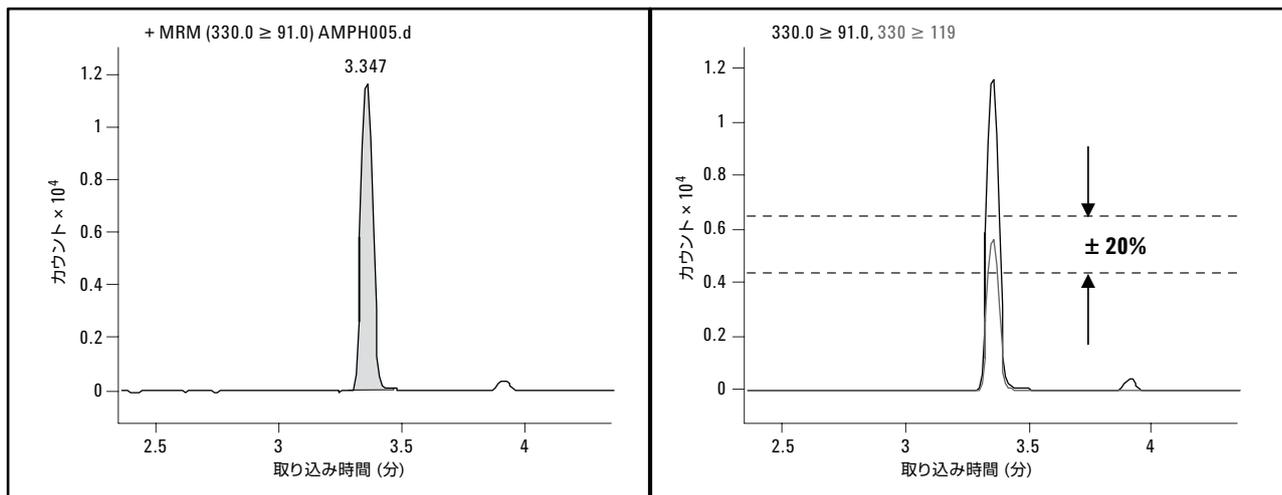


図 3a. 血中アンフェタミンのイオン比確認。3.35 分のリテンションタイムを記録

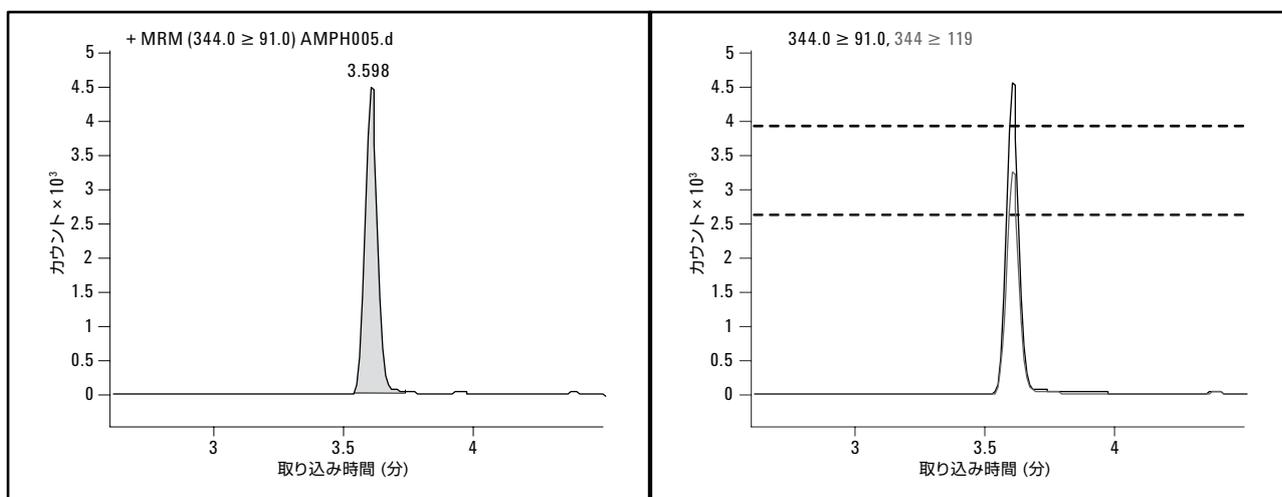


図 3b. 血中メタンフェタミンのイオン比確認。3.60 分のリテンションタイムを記録

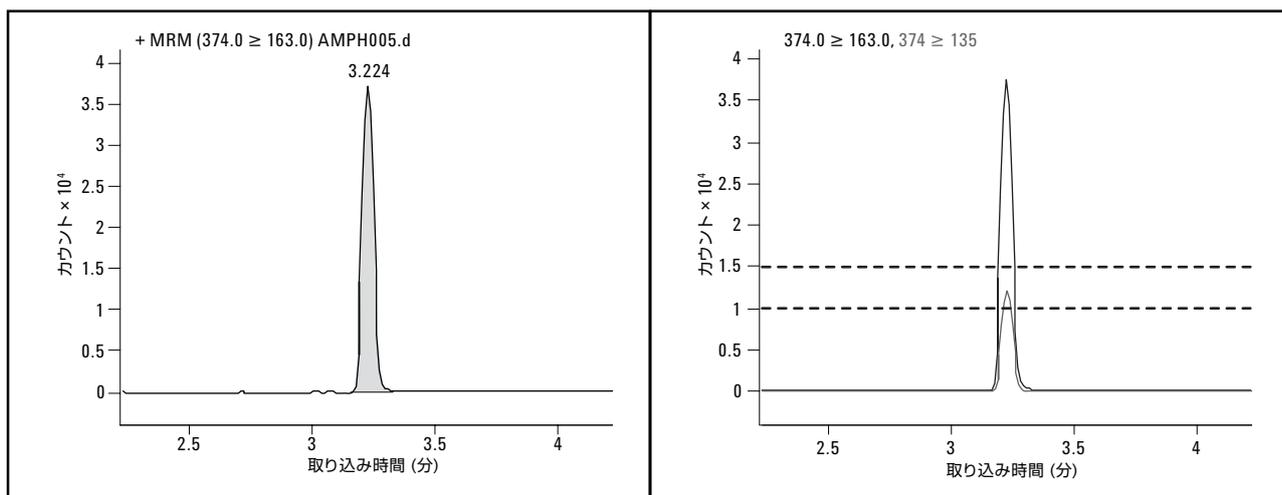


図 3c. 血中 MDA のイオン比確認。3.22 分のリテンションタイムを記録

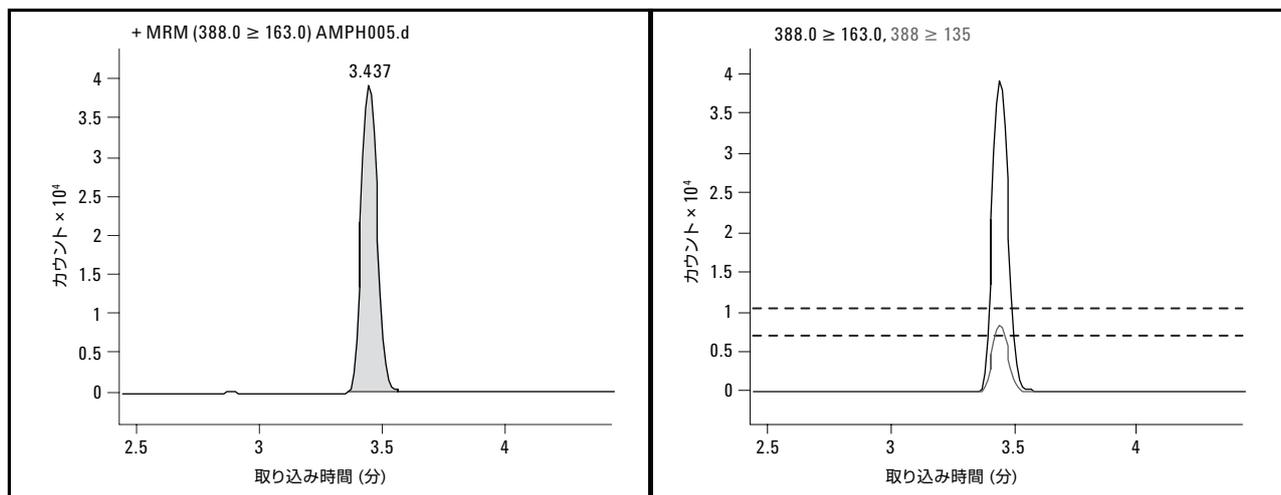


図 3d. 血中 MDMA のイオン比確認。3.44 分のリテンションタイムを記録

さらに、2 つの異なる血中濃度でのアンフェタミン (amp) とメタアンフェタミン (meth) の再現性を検討しました。血中濃度 0.5 と 0.25 $\mu\text{g/mL}$ で、それぞれ 10 回ずつ繰り返し測定を行った結果を、下記の表 2a と 2b に示します。0.5 $\mu\text{g/mL}$ の D5 ISTD に対して、アンフェタミンとメタアンフェタミンの相対レスポンス値のピーク面積パーセント標準偏差 (%RSD) は、それぞれ 0.48 と 0.89 です。濃度 0.25 $\mu\text{g/mL}$ の場合、対応する値はそれぞれ 1.12 と 2.27 です。

バリデーション

1. このメソッドは、既報のバリデーション済みメソッドを改定した「社内」GC/MS メソッドです。LC/MS/MS-MRM は、バリデーションを必要としない方法です。
2. 分析内精度は、複製サンプルの統計解析で算出しました。
3. 市販のコントロールサンプルやラボ間の習熟試験から得られた既知濃度のアンフェタミンとメチルアンフェタミンは、このメソッドで分析ができました。

表 2a. 濃度 0.5 $\mu\text{g/mL}$ の血中アンフェタミンとメタアンフェタミンの再現性

注入回数	Amp (面積カウント* 1000)	D5-Amp (面積カウント* 1000)	相対 レスポンス	Meth (面積カウント* 1000)	D5-Meth (面積カウント* 1000)	相対 レスポンス
1	918	1844	0.498	1060	1600	0.663
2	933	1887	0.494	1599	1599	0.674
3	938	1875	0.500	1620	1620	0.671
4	949	1904	0.498	1627	1627	0.661
5	948	1909	0.497	1648	1648	0.657
6	949	1911	0.497	1641	1641	0.659
7	967	1924	0.503	1650	1650	0.672
8	980	1963	0.499	1689	1689	0.670
9	986	1969	0.501	1678	1678	0.672
10	1006	2011	0.500	1720	1720	0.666
		標準偏差	0.002		標準偏差	0.006
		%RSD	0.484		%RSD	0.889

表 2b. 濃度 0.25 µg/mL の血中アンフェタミンとメタアンフェタミンの再現性

注入回数	Amp (面積カウント* 1000)	D5-Amp (面積カウント* 1000)	相対 レスポンス	Meth (面積カウント* 1000)	D5-Meth (面積カウント* 1000)	相対 レスポンス
1	236	966	0.244	167	515	0.324
2	243	957	0.254	173	506	0.336
3	247	972	0.254	173	513	0.342
4	246	972	0.253	166	518	0.324
5	246	973	0.253	175	516	0.338
6	245	978	0.251	173	514	0.335
7	250	994	0.252	176	512	0.342
8	248	989	0.251	178	526	0.348
9	254	1004	0.253	175	536	0.333
10	253	1005	0.252	179	536	0.334
		標準偏差	0.003		標準偏差	0.008
		%RSD	1.126		%RSD	2.270

4. 各濃度の標準アンフェタミンをブランクの血液や尿に添加し、分析バッチごとに検量線を作成しました。濃度範囲 15 ~ 1,000 ng/mL で直線性があることが分かりました。この濃度範囲外に関しては、結果を「以上」または「以下」と報告する必要があります。一方、概算として報告する場合、目的の濃度を含めて拡張した標準範囲でサンプルを再分析する場合があります。
5. コントロールデータと精度の研究から測定されたメソッドの不確か性は、95% の信頼水準で 10% です。

結論

本書では、非常に速い分析時間で全血中の複数の依存性薬物を定量および確認するための LC/MS/MS メソッド及び分析手順を説明しました。指定したクオンティファアイオンで定量するだけでなく、クオリファイアイオンで存在を確認するためにも、マルチリアクションモニタリングを行います。粒径 1.8 µm の Agilent C18 カラムを用いたことで、内径 4.6 mm と ESI インタフェースと比べて相対的に 700 µL/min 程度高い流量で、優れた分解能とピーク形状を得られました。血液中の濃度 0.5 µg/mL のアンフェタミンとメタアンフェタミンの両方に対して、相対レスポンスはいずれも 1% RSD 以下でした。

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。

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。

© Agilent Technologies, Inc. 2008

Printed in Japan
October 2, 2008
5989-7527JAJP