

生体サンプル中のバスソルト (ピロバレロン類縁体) の測定

アプリケーションノート

法医学

著者

Joe Crifasi
Saint Louis University
Forensic Toxicology Laboratory
Saint Louis, Mo. USA

Ron Honnold
Agilent Technologies, Inc.
Santa Clara, CA, USA

Robert Kubas
Agilent Technologies, Inc.
Wood Dale, IL, USA

概要

Agilent 220 イオントラップ GC/MS の EI-MS/MS モードを用いて、生体サンプル中のピロバレロン類縁体の同定および定量メソッドを開発しました。ピロバレロン類縁体の定量では、直線性が、50~1,000 µg/mL という範囲に示されています。

はじめに

ピロリジノペンチオフェノン (PVP)、メチレンジオキシピロバレロン (MDPV)、ナフチルピロバレロン (ナフィロン) は、バスソルトとして販売されているデザイナードラッグです。これらの薬物はピロバレロンの類縁体で、コカインや MDMA などの薬物に代わる合法薬物として乱用されています。これらの薬物を使用すると、頻脈、血圧上昇、興奮、強度のパニック発作、興奮による幻覚症状が生じることが知られています。

このアプリケーションノートでは、血清全血、尿、組織ホモジネートといった検体を分析するメソッドを紹介します。分析に必要なサンプルの最少量は 3 mL です。

液-液抽出手法を用いて、ピロリジノペンチオフェノン (PVP)、ピロバレロン、MDPV、ナフィロン、および内部標準のロピバカインを、アルカリ性サンプルから有機溶媒へ抽出しました。抽出物を酢酸エチルに再溶解し、イオントラップ GC/MS/MS に注入して分析しました。



Agilent Technologies

実験手法

標準と試薬

試薬

- N-クロロブタン、酢酸エチル、濃縮アンモニア (NH₄OH)、炭酸ナトリウム/重炭酸ナトリウムバッファ pH = 9.8 (Na₂CO₃ 100 g と NaHCO₃ 50 g を脱イオン水 1,000 mL 中で混合し、pH を 9.8 に調整)。室温保管で 1 年間安定。
- 濃縮 HCl、メタノール (HPLC グレード)、0.1 % HCl を含むメタノール (濃縮 HCl 0.1 mL をメタノール 100 mL で希釈)。室温保管で 1 年間安定。
- MDPV、ナフィロン、ピロバレロン原液 (メタノール中で 1 mg/mL) を Cerilliant から購入 (冷凍庫で保管)。
- PVP 原液を Cayman Chemical から購入し (10-mg ボトル)、内容物を 10-mL フラスコに移し、定量までメタノールを追加。冷凍庫保管で 2 年間安定。
- ロピバカイン原液を Sigma から購入し (R0283)、メタノールで 11.9 mg を 10 mL に希釈。冷凍庫保管で 2 年間安定。
- MDPV QC 原液を Cayman Chemical から購入し、5 mg を酢酸メチル 50 μ L で希釈 (メタノール中で 5 mL に希釈)。冷凍庫保管で 1 年間安定。
- ナフィロン QC 原液 (メタノール中で 1 mg/mL) を Cerilliant から購入。冷凍庫で保管可能。
- ピロバレロン QC 原液を Cayman Chemical から購入し (メタノール 100 μ L 中で 5 mg)、内容物を 5-mL フラスコに移し、定量までメタノールを追加。冷凍庫保管で 2 年間安定。
- PVP QC 原液を 10-mg ボトルで Cayman Chemical から購入 (内容物を 10-mL フラスコに移し、メタノールで定量まで希釈)。冷凍庫保管で 2 年間安定。

分析用標準

- MDPV、ナフィロン、ピロバレロン、PVP キャリブレーション中間体標準 15 μ g/mL (各原液標準 150 μ L を 10-mL フラスコに入れ、メタノールを 10 mL 目盛りまで追加)。
- MDPV、ナフィロン、ピロバレロン、PVP QC 中間体標準 15 μ g/mL (各原液標準 150 μ L を 10-mL フラスコに入れ、メタノールを 10 mL 目盛りまで追加)。
- 分析用内部標準ロピバカイン 15 μ g/mL (原液 150 μ L を 10-mL フラスコに入れ、メタノールを 10 mL 目盛りまで追加)。2~8 °C で保管。1 年間安定。

対照およびキャリブレーション用標準

ブランク対照 - 薬物の含まれない全血を米国赤十字から、また、ブランク尿もあわせて入手しました。使用前にマトリックスを検査し、薬物が含まれていないことを確認する必要があります。-20 °C で保管すれば、1 年間安定が保たれます。

低濃度対照 (125 ng/mL) - 必要に応じて血液または尿中で新たに作成しました。QC 中間体標準 25 μ L を 3 mL ブランク血液または尿に加えしました。

高濃度対照 (500 ng/mL) - 必要に応じて血液または尿中で新たに作成しました。QC 中間体標準 100 μ L を 3 mL ブランク血液または尿に加えしました。

サンプル前処理

分析用標準および薬物の含まれない血液または尿を以下のよう
に用いて、検量線を作成しました。

50	ng/mL	~10	μ L 標準および 3 mL 血液/尿
100	ng/mL	~20	μ L 標準および 3 mL 血液/尿
250	ng/mL	~50	μ L 標準および 3 mL 血液/尿
500	ng/mL	~100	μ L 標準および 3 mL 血液/尿
1,000	ng/mL	~200	μ L 標準および 3 mL 血液/尿

ピペットを用いて、サンプル、ブランク対照、添加対照 3 mL を、ラベルを貼った 16 × 100 mm 培養試験管に入れます。分析用内部標準 50 μ L と pH 9.8 炭酸バッファ 2 mL を加え、各試験管に NH₄OH 2 滴を加えたのち、穏やかにボルテックスして混合します。各試験管に塩化 n-ブチル 7.0 mL を加え、ふたをして、すべての試験管を 10 分以上回転させます。すべての試験管を 3,000 RPM で 10 分間遠心分離します。有機 (上) 層を、ラベルを貼った清潔な 16 × 100 培養試験管に移します。0.1 % メタノール HCl 2 滴を加え、窒素を用いて 37 °C で蒸発させて乾燥させます。乾燥した抽出物を酢酸エチル 200 μ L に再溶解し、インサート付きオートサンブラバイアルに移してふたをして、GC/MS/MS で分析します。

GC/MS イオントラップ分析

カラム	DB-5MS または同等の 25 m × 200 mm、0.33 μm
注入量	0.5 μL
注入モード	スプリットレス
注入温度	250 °C
キャリアガス	ヘリウム
カラム流速	1.3 mL/min
オープンプログラム	70 °C、1 分保持 25 °C/min で 70~310 °C、4.4 分保持

イオントラップ MS 条件

チューン	オートチューン
採取	EI-MS/MS 50–200 da
溶媒カット時間	7.0 分
MS 温度	トラップ 210 °C、マニフォールド 50 °C、トランスファーライン 310 °C

化合物	Rt (分)	プレカーサ	定量イオン	クオリファイ	励起電圧	フィラメント	マルチプライ	ターゲット
PVP	8.1	126	84	124/97	0.5 V	50 μA	+50 V	3,000
ピロバレロン	8.6	126	84	124/97	0.5 V	50 μA	+50 V	3,000
MDPV	9.68	126	84	124/97	0.5 V	50 μA	+50 V	3,000
ロピバカイン IS	9.95	126	84	98/56	0.5 V	50 μA	+50 V	3,000
ナフィロン	10.38	126	84	124/97	0.5 V	50 μA	+50 V	3,000

結果と考察

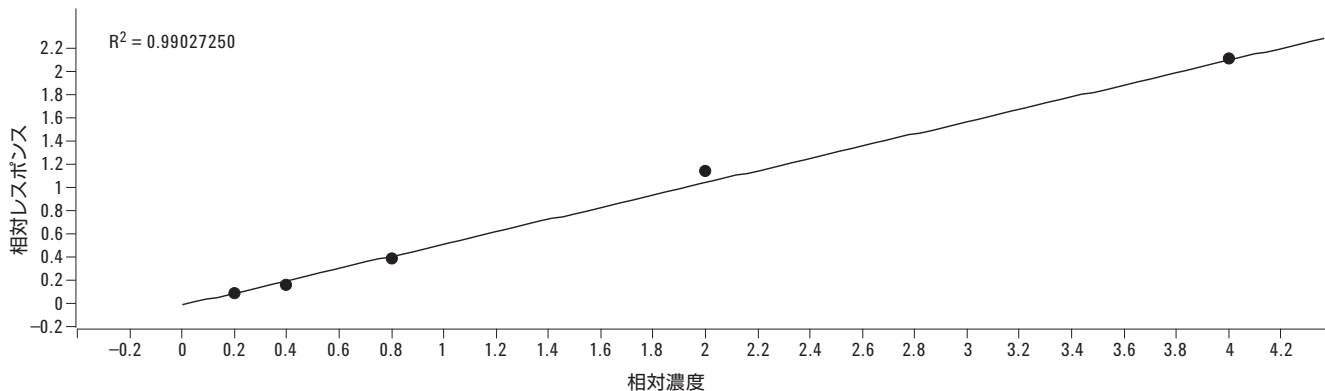
以下の基準を用いて、ピロバレロン類縁体の有無と存在量を測定しました。

- クロマトグラフィが許容範囲内であること (ピーク分離能、ピーク対称性、キャリアオーバーがないこと)。定量および定性に選択したイオンが存在すること。検体から想定されるピロバレロン類縁体のリテンションタイムが、直近の保持指標成分のリテンションタイムの ±2 % であること。
- 定量分析には、類縁体および内部標準の定量イオンの面積を使用。定量にあたっては、各キャリブレーション標準濃度の相対レスポンスから得られた検量線を用いて、未知物質および対照の相対レスポンスを比較しました。ブランク対照はターゲット範囲内であればならず、添加対照についてはピロバレロン類縁体が存在しない必要があります。

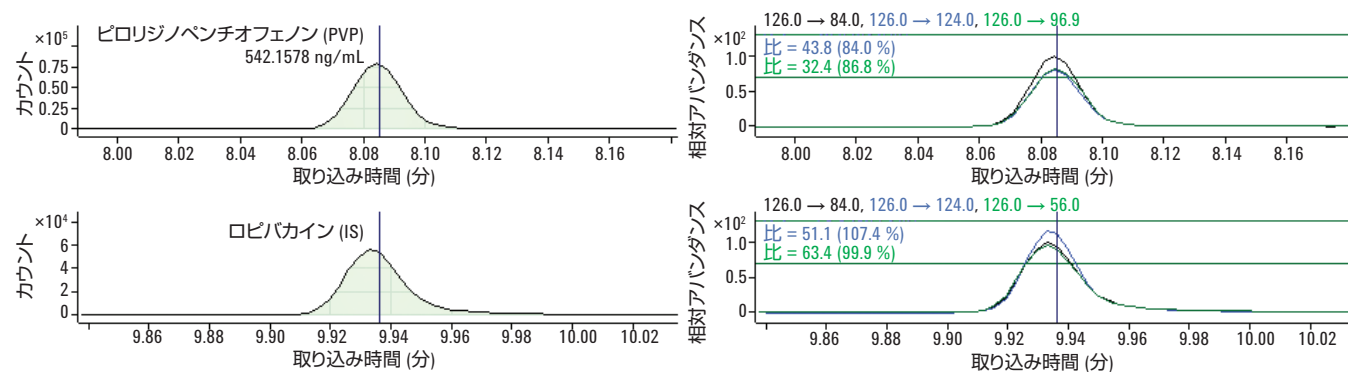
- 適切な m/z イオンを観察する必要があります。検体および添加対照は、ピロバレロン、MDPV、PVP、ナフィロン、ロピバカイン、内部標準の各リテンションタイムにおいて、126 m/z のイオン化から生じる m/z イオンを示す必要があります。
- 同定にあたっては、2 つのイオン比手法を使用しました。ピロバレロン、PVP、MDPV、ナフィロンについては、m/z イオンピーク 124 および 97 のアバンダンスを、ベースイオンピーク 84 のイオンアバンダンスで減算します。算出したイオン比は、キャリブレーションから得られたターゲット値の 20 % 以内とします。

直線性	50~1,000 ng/mL
検出下限 (LOD)	20 ng/mL
定量下限 (LOQ)	50 ng/mL
干渉	観察されず

PVP キャリブレーション



メソッド下限

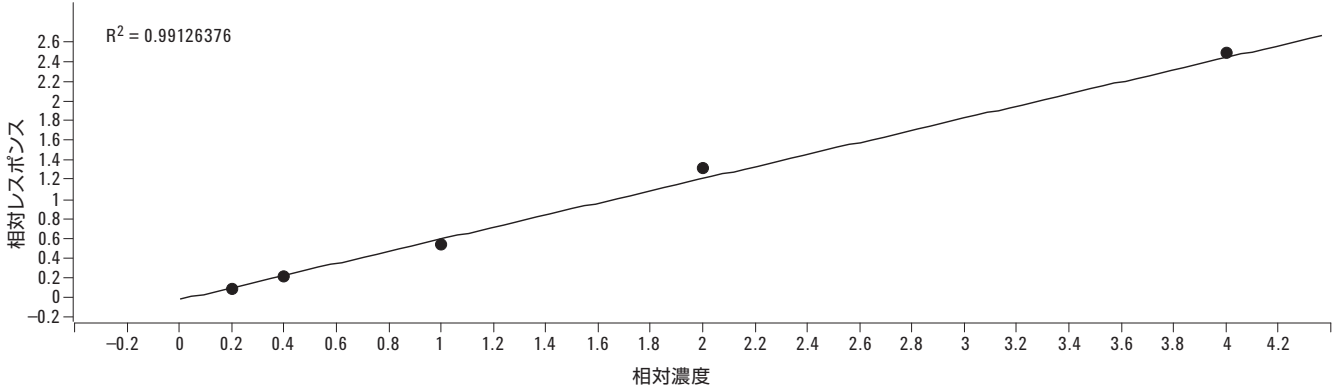


バッチの結果

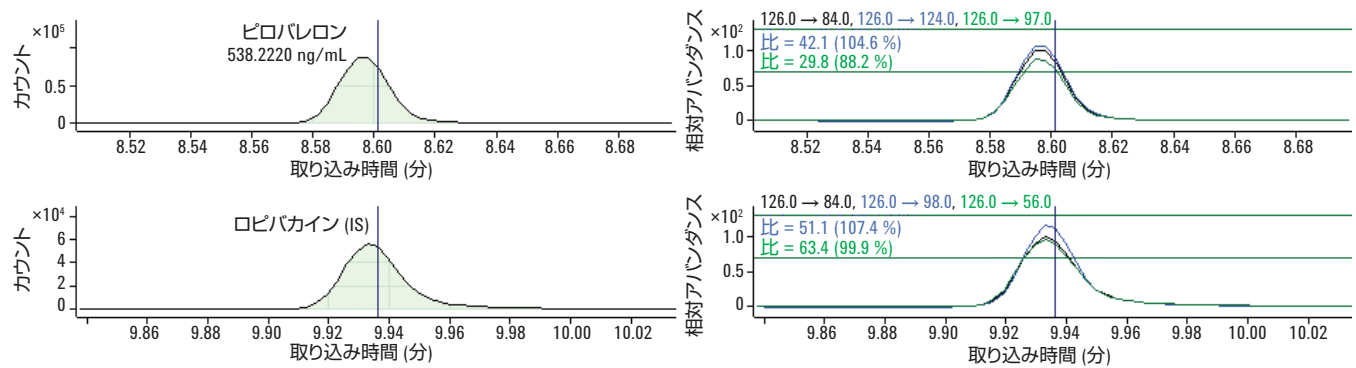
Sample				Pyrrolidin...										Qualifier...		Ropivacaine(I.S.) (ISTD...)		Qualifier...					
①	▽	Name	Data File	Type	Level	Acq. Date-Time	Exp. Conc.	RT	Resp.	MI	Calc. Conc.	Final Conc.	Accuracy	Ratio	MI	Ratio	MI	RT	Resp.	Ratio	MI	Ratio	MI
		CAL1	CAL1 3-5-2012 3-12-22 PM SMS D	Cal	1	3/5/2012 1:12 PM	50.0000	8.086	7373		39.8945	39.8945	79.8	48.5		35.8		9.935	87567	53.7		60.2	
		CAL2	CAL2 3-5-2012 3-34-07 PM SMS D	Cal	2	3/5/2012 1:34 PM	100.0000	8.083	12688		76.8121	76.8121	76.8	52.1		35.6		9.934	78265	52.1		57.5	
		CAL3	CAL3 3-5-2012 3-55-54 PM SMS D	Cal	3	3/5/2012 1:55 PM	200.0000	8.084	32611		183.7979	183.7979	91.9	48.4		32.7		9.931	84069	50.9		59.8	
		CAL4	CAL4 3-5-2012 4-17-44 PM SMS D	Cal	4	3/5/2012 2:17 PM	500.0000	8.084	77431		544.7069	544.7069	108.9	44.1		32.1		9.935	67355	54.6		64.6	
		CAL5	CAL5 3-5-2012 4-39-40 PM SMS D	Cal	5	3/5/2012 2:39 PM	1000.00...	8.084	193270		1004.7886	1004.7886	100.5	47.0		27.2		9.932	91140	55.1		60.0	
		NEG	NEG 3-5-2012 5-01-23 PM SMS D	Sample		3/5/2012 3:01 PM												9.933	77787	51.2		62.3	
		LOW	LOW 3-5-2012 5-23-10 PM SMS D	Sample		3/5/2012 3:23 PM		8.085	19223		115.5457	115.5457		47.8		36.3		9.931	78828	52.0		60.7	
		HIGH	HIGH 3-5-2012 5-44-59 PM SMS D	Sample		3/5/2012 3:45 PM		8.085	92200		542.1578	542.1578		43.8		32.4		9.933	80580	51.1		63.4	
		BLK	BLK 3-5-2012 9-01-38 PM SMS D	Sample		3/5/2012 7:01 PM																	
		208 BLOOD	208 BLOOD 3-5-2012 9-23-28 PM SMS D	Sample		3/5/2012 7:23 PM												9.932	69336	55.1		64.9	
		1027 BLOOD	1027 BLOOD 3-5-2012 9-45-10 PM SMS D	Sample		3/5/2012 7:45 PM		8.085	2074		14.6005	14.6005		54.9		34.9		9.934	67319	52.0		61.0	
		1027 URINE	1027 URINE 3-5-2012 10-07-10 PM SMS D	Sample		3/5/2012 8:07 PM		8.085	15466		81.4251	81.4251		47.0		34.2		9.933	89998	56.1		58.9	

外れ値およびキャリブレーション以下にタグをつけています。

ピロバレロンキャリブレーション



500 ng/mL 標準

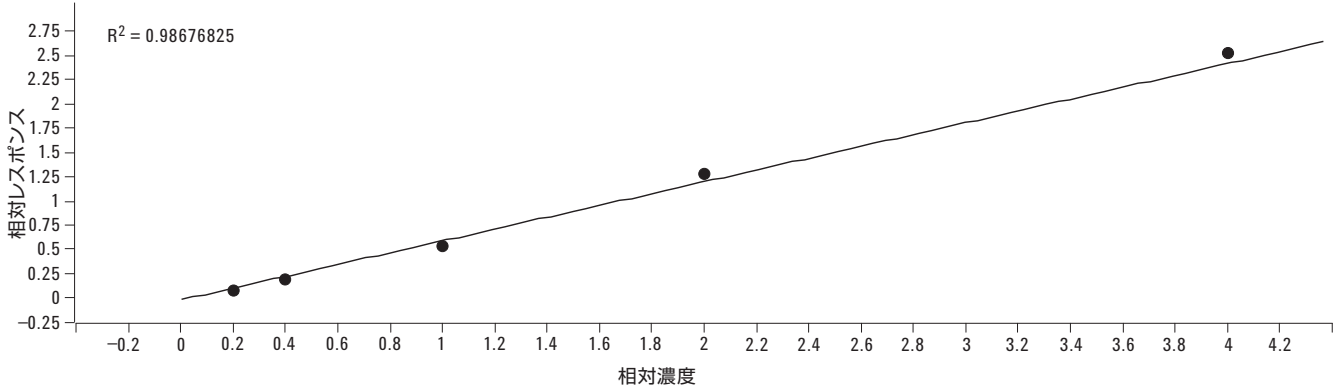


バッチの結果

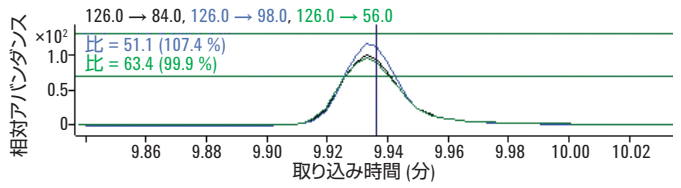
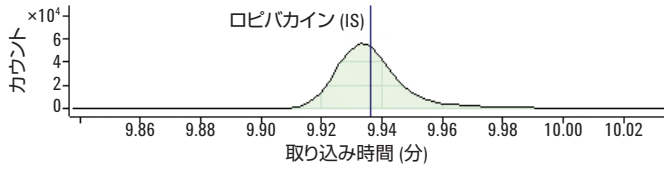
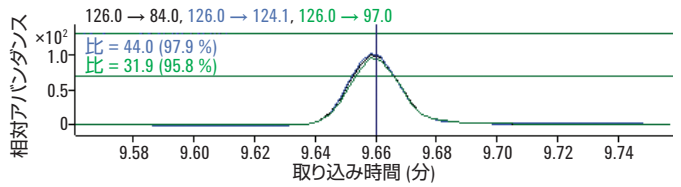
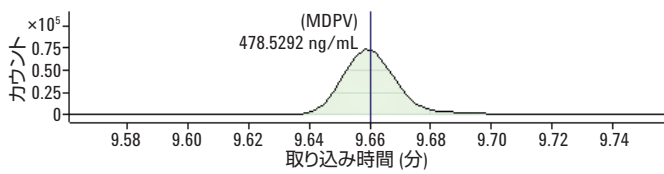
Sample						Pyrovalerone Results						Qualifier..		Qualifier..		Ropivacaine(..)		Qualifier..		Qualifier..			
①	▽	Name	Data File	Type	Level	Acq. Date-Time	Exp. Conc.	RT	Resp	MI	Calc. Conc.	Final Conc.	Accuracy	Ratio	MI	Ratio	MI	RT	Resp	Ratio	MI	Ratio	MI
		CAL1	CAL1 3-5-2012 3-12-22 PM.SMS.D	Cal	1	3/5/2012 1:12 PM	50.0000	8.598	8074		37.5523	37.5523	75.1	48.2		34.0		9.935	87567	53.7		60.2	
		CAL2	CAL2 3-5-2012 3-34-07 PM.SMS.D	Cal	2	3/5/2012 1:34 PM	100.0000	8.595	16529		86.0177	86.0177	86.0	48.4		37.2		9.934	78265	52.1		57.5	
		CAL3	CAL3 3-5-2012 3-55-54 PM.SMS.D	Cal	3	3/5/2012 1:55 PM	250.0000	8.594	45618		221.0053	221.0053	88.4	48.2		35.5		9.931	84069	50.9		59.8	
		CAL4	CAL4 3-5-2012 4-17-44 PM.SMS.D	Cal	4	3/5/2012 2:17 PM	500.0000	8.596	89135		538.9924	538.9924	107.8	45.2		29.2		9.935	67355	54.6		64.6	
		CAL5	CAL5 3-5-2012 4-39-40 PM.SMS.D	Cal	5	3/5/2012 2:39 PM	1000.0000	8.599	227447		1016.4323	1016.4323	101.6	45.0		27.0		9.932	91140	55.1		60.0	
		NEG	NEG 3-5-2012 5-01-23 PM.SMS.D	Sample		3/5/2012 3:01 PM												9.933	77787	51.2		62.3	
		LOW	LOW 3-5-2012 5-23-10 PM.SMS.D	Sample		3/5/2012 3:23 PM		8.596	23061		119.1517	119.1517		44.6		32.7		9.931	78828	52.0		60.7	
		HIGH	HIGH 3-5-2012 5-44-59 PM.SMS.D	Sample		3/5/2012 3:45 PM		8.595	106484		538.2220	538.2220		42.1		29.8		9.933	80580	51.1		63.4	
		BLK	BLK 3-5-2012 9-01-38 PM.SMS.D	Sample		3/5/2012 7:01 PM												9.932	69336	55.1		64.9	
		208 BLOOD	208 BLOOD 3-5-2012 9-23-28 PM.SMS.D	Sample		3/5/2012 7:23 PM												9.934	67319	52.0		61.0	
		1027 BLOOD	1027 BLOOD 3-5-2012 9-45-10 PM.SMS.D	Sample		3/5/2012 7:45 PM												9.933	89998	56.1		58.9	
		1027 URINE	1027 URINE 3-5-2012 10-07-10 PM.SMS.D	Sample		3/5/2012 8:07 PM																	

外れ値およびキャリブレーション以下にタグをつけています。

MDPV キャリブレーション



500 ng/mL 標準

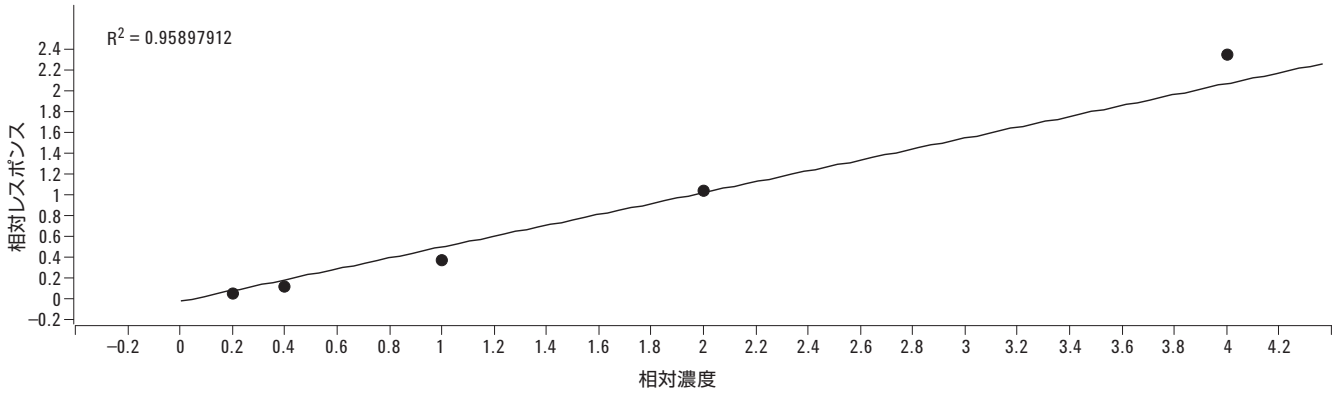


バッチの結果

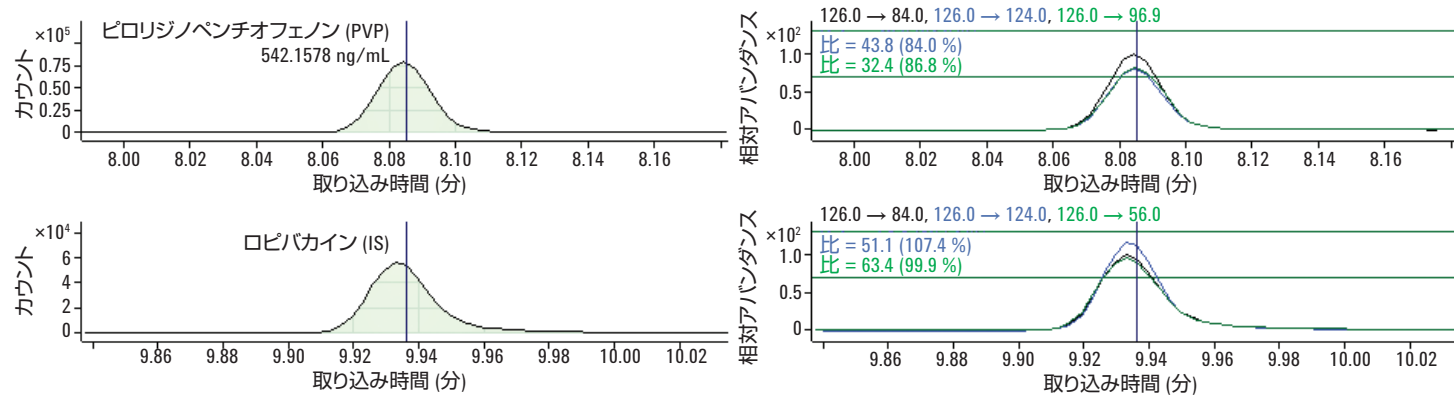
Sample							MDPV Me...				MDPV Results				Qualifier...		Ropivacaine(...		Qualifier...		Qualifier...			
①	▽	Name	Data File	Type	Level	Acq. Date-Time	Exp. Conc.	RT	Resp.	MI	Calc. Conc.	Final Conc.	Accuracy	Ratio	MI	Ratio	MI	RT	Resp.	Ratio	MI	Ratio	MI	
		CAL1	CAL1 3-5-2012 3-12-22 PM.SMS.D	Cal	1	3/5/2012 1:12 PM	50.0000	9.663	6576		30.8638	30.8638	61.7	49.6		37.5		9.935	87567	53.7		60.2		
		CAL2	CAL2 3-5-2012 3-34-07 PM.SMS.D	Cal	2	3/5/2012 1:34 PM	100.0000	9.659	15315		80.4290	80.4290	80.4	43.3		34.9		9.934	78265	52.1		57.5		
		CAL3	CAL3 3-5-2012 3-55-54 PM.SMS.D	Cal	3	3/5/2012 1:55 PM	250.0000	9.660	44714		218.6051	218.6051	87.4	45.2		34.7		9.931	84069	50.9		59.8		
		CAL4	CAL4 3-5-2012 4-17-44 PM.SMS.D	Cal	4	3/5/2012 2:17 PM	500.0000	9.660	86729		529.2326	529.2326	105.8	45.3		33.3		9.935	67355	54.6		64.6		
		CAL5	CAL5 3-5-2012 4-39-40 PM.SMS.D	Cal	5	3/5/2012 2:39 PM	1000.0000	9.662	230809		1040.8694	1040.8694	104.1	43.3		27.9		9.932	91140	55.1		60.0		
		NEG	NEG 3-5-2012 5-01-23 PM.SMS.D	Sample		3/5/2012 3:01 PM												9.933	77787	51.2		62.3		
		LOW	LOW 3-5-2012 5-23-10 PM.SMS.D	Sample		3/5/2012 3:23 PM		9.661	19252		100.3791	100.3791		43.8		33.9		9.931	78828	52.0		60.7		
		HIGH	HIGH 3-5-2012 5-44-59 PM.SMS.D	Sample		3/5/2012 3:45 PM		9.658	93817		478.5292	478.5292		44.0		31.9		9.933	80580	51.1		63.4		
		BLK	BLK 3-5-2012 9-01-38 PM.SMS.D	Sample		3/5/2012 7:01 PM																		
		208 BLOOD	208 BLOOD 3-5-2012 9-23-28 PM.SMS.D	Sample		3/5/2012 7:23 PM													9.932	69336	55.1		64.9	
		1027 BLOOD	1027 BLOOD 3-5-2012 9-45-10 PM.SMS.D	Sample		3/5/2012 7:45 PM													9.934	67319	52.0		61.0	
		1027 URINE	1027 URINE 3-5-2012 10-07-10 PM.SMS.D	Sample		3/5/2012 8:07 PM													9.933	89998	56.1		58.9	

外れ値およびキャリブレーション以下にタグをつけています。

ナフィロンキャリブレーション



500 ng/mL 標準



バッチの結果

Sample						Naphyro...				Naphryrone Results			Qualifier...		Ropivacaine(...)		Qualifier...		Qualifier...				
ID	Name	Data File	Type	Level	Acq. Date-Time	Exp. Conc.	RT	Resp.	MI	Calc. Conc.	Final Conc.	Accuracy	Ratio	MI	Ratio	MI	RT	Resp.	Ratio	MI	Ratio	MI	
	CAL1	CAL1 3-5-2012 3-12-22 PM.SMS.D	Cal	1	3/5/2012 1:12 PM	50.0000	10.364	4481		24.5910	24.5910	49.2	43.8		34.1		9.935	87567	53.7		60.2		
	CAL2	CAL2 3-5-2012 3-34-07 PM.SMS.D	Cal	2	3/5/2012 1:34 PM	100.0000	10.360	10230		62.8105	62.8105	62.8	39.1		36.5		9.934	78265	52.1		57.5		
	CAL3	CAL3 3-5-2012 3-55-54 PM.SMS.D	Cal	3	3/5/2012 1:55 PM	250.0000	10.360	31518		180.1532	180.1532	72.1	43.2		37.5		9.931	84069	50.9		59.8		
	CAL4	CAL4 3-5-2012 4-17-44 PM.SMS.D	Cal	4	3/5/2012 2:17 PM	500.0000	10.361	70525		503.1422	503.1422	100.6	41.3		33.1		9.935	67355	54.6		64.6		
	CAL5	CAL5 3-5-2012 4-39-40 PM.SMS.D	Cal	5	3/5/2012 2:39 PM	1000.0000	10.360	214191		1129.3030	1129.3030	112.9	35.4		26.1		9.932	91140	55.1		60.0		
	NEG	NEG 3-5-2012 5-01-23 PM.SMS.D	Sample		3/5/2012 3:01 PM													9.933	77787	51.2		62.3	
	LOW	LOW 3-5-2012 5-23-10 PM.SMS.D	Sample		3/5/2012 3:23 PM		10.360	15449		94.1742	94.1742		41.4		34.8		9.931	78828	52.0		60.7		
	HIGH	HIGH 3-5-2012 5-44-59 PM.SMS.D	Sample		3/5/2012 3:45 PM		10.362	85630		510.6440	510.6440		41.4		30.5		9.933	80580	51.1		63.4		
	BLK	BLK 3-5-2012 9-01-38 PM.SMS.D	Sample		3/5/2012 7:01 PM													9.932	69336	55.1		64.9	
	1027 BLOOD	1027 BLOOD 3-5-2012 9-23-28 PM.SMS.D	Sample		3/5/2012 7:23 PM													9.934	67319	52.0		61.0	
	1027 URINE	1027 URINE 3-5-2012 10-07-10 PM.SMS.D	Sample		3/5/2012 8:07 PM													9.933	89998	56.1		58.9	

外れ値およびキャリブレーション以下にタグをつけています。

結論

このアプリケーションノートでは、ロピバカインを内部標準として用いて、生体サンプル中のピロバレロン類縁体を測定する、選択性と堅牢性の優れた高感度メソッドを紹介しています。ピロバレロン類縁体の分析では、GC イオントラップ MS/MS を使用することにより少なからぬ利点が得られます。サンプルマトリックス干渉の低減、シグナル/ノイズ比の向上、優れた感度と選択性を備えた GC イオントラップ MS/MS は、ピロバレロン類縁体分析に対応する信頼性の高いソリューションとなります。GC イオントラップ MS/MS 分析では、偽陽性および偽陰性の可能性が低くなるほか、分析結果の信頼性も向上します。上述のような最適化したメソッドを用いた高速ターゲット GC/MS/MS メソッドを使えば、法医学ラボが直面しているピロバレロン類縁体分析に伴う既存の問題を解消することが可能です。添加対照とブランク対照を組み合わせて用いることで、正確な定量を確保し、未知生体サンプルにおける偽陰性を排除できました。各種サンプルマトリックス中のピロバレロン類縁体について、低 ng/mL 域の検出下限が得られました。

参考文献

1. Baselt, R.C., Cravey, R.H., Disposition of Toxic Dugs and Chemicals in MAN, Seventh Edition, Biomedical Publications, Inc., Chicago, IL. **2004**.
2. Moffat, A.C., Clarke's Isolation and Identification of Drugs, Third Edition, Volume 2, The Pharmaceutical Press, London, **2004**.
3. Yohannan, J.C., Bonszenko J.S., The Characterization of 3,4-Methylenedioxypropylvalerone (MDPV), Microgram Journal, Volume 7, Number 1, March **2010**.
4. Brandt, S.D., Sumnall, H.R., Measham, f., Cole, J., Analyses of Second-Generation "Legal Highs" in the UK: Initial Findings, Drug Testing and Analysis, **2010**, Volume 2, pp 377-382.
5. Saint Louis University Forensic Toxicology-Standard Operation Procedures: Blood Drug Screen by GCNPD.

謝辞

本研究で用いたデータを提供してくださったセントルイス大学法医学毒物学研究所に感謝します。

詳細情報

本文書のデータは代表的な結果を記載したものです。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。

www.agilent.com/chem/jp

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。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。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc.,
2012 Printed in Japan
December 6, 2012
5991-1607JAJP



Agilent Technologies