

唾液中の合成カンナビノイド

アプリケーションノート

法医学および毒性学

著者

Cynthia Coulter, Margaux Garnier,
Christine Moore
Toxicology Research and Development,
Immunoanalysis Corporation,
829 Towne Center Drive,
Pomona, California 91767
USA

はじめに

2011年に、「合成カンナビノイド」グループ、すなわち「スパイス」化合物のうちの5種類が米国で禁止されました。禁止された物質は次のとおりです。

- 1-ペンチル-3-(1-ナフトイル)-インドール (JWH-018)
- 1-ブチル-3-(1-ナフトイル)-インドール (JWH-073)
- 1-[2-(4-モルホリニル)エチル]-3-(1-ナフトイル)-インドール (JWH-200)
- 5-(1,1-ジメチルヘプチル)-2-[(1R,3S)-3-ヒドロキシシクロヘキシル]-フェノール (CP-47, 497)
- 5-(1,1-ジメチルオクチル)-2-[(1R,3S)-3-ヒドロキシシクロヘキシル]-フェノール (カンナビシクロヘキサノール、CP-47, 497 C8 同族体)

これらの薬物は、大麻に類似した効果を持つことが報告されており、一部の化合物はカンナビノイド受容体に強固に結合することがわかっています。11-ヒドロキシ- Δ^8 -テトラヒドロカンナビノール、(1,1-ジメチルヘプチル-11-ヒドロキシテトラヒドロカンナビノール)の(-)-1,1-ジメチルヘプチル誘導体はHU-210と呼ばれ、2009年のアメリカ合衆国税関・国境警備局による「スパイスゴールド」、「スパイスシルバー」、および「スパイスダイヤモンド」の押収で見つかったことが報告されています。HU-210は Δ^9 -テトラヒドカンナビノール(Δ^9 -THC)の100倍を超える効果があると考えられ、マリファナの類似物として、すでに指定薬物に分類されています。またJWH-250も広く使用されているため、この物質も実験対象に含めました。



Agilent Technologies

唾液は、路上での薬物検出や職場におけるテストの標本として使用が広まりつつあります。唾液は収集が容易で、最近の薬物摂取に関する情報が得られます。ここで説明する実験では、Quantisal デバイスを唾液の収集に使用しました。このアプリケーションノートでは「スパイス」成分の検出について説明します。

収集用デバイス、試薬、および標準物質

唾液標本収集用の Quantisal デバイスには、口に入れる綿製の収集パッドが含まれています。1 mL の唾液 (± 10 %) が収集されると、適量インジケータの色が青に変わります。このパッドを輸送用緩衝液 (3 mL) に入れ、標本の総量を 4 mL (緩衝液 3 mL + 唾液 1 mL) にします。検出される薬物の濃度はこれに合わせて調整されます。

固相抽出カラム (Bond Elut Plexa) と液体クロマトグラフィーカラム (ZORBAX RRHT) をアジレントから入手しました。標準化合物 JWH-018、JWH-073、JWH-200、JWH-250、HU-210、CP-47、497 および CP-47、497 C8 同族体に加え、重水素で標識した *d9*-JWH-018 および *d7*-JWH-073 を Cayman Chemicals から購入しました。

キャリブレーションおよび対照

重水素で標識した内部標準 (*d9*-JWH-018 および *d7*-JWH-073) と無標識の薬物標準を、メタノールを使用して 100 µg/mL の濃度で前処理しました。作業用溶液を原液から希釈し、メタノールで 10 µg/mL の濃度にしました。不使用時には、この溶液を -20 °C で保管しました。対照は、薬物が含まれない合成唾液をさまざまな濃度の化合物を使用して強化することにより前処理しました。薬物を含まない陰性の標本と、濃度 4 ng/mL および 40ng/mL の陽性対照をすべてのバッチに含めました。

サンプル前処理

すべての分析用に 7 つのキャリブレーション標準を、唾液中の濃度が 0.5、2、5、10、20、50、および 100 ng/mL になるように前処理し、重水素で標識した内部標準を加えました (10 ng/mL)。

Agilent Bond Elut Plexa (30 mg/1 mL、p/n 12109301) 固相抽出カートリッジを使用しました。

1. コンディショニング: メタノール (0.5 mL)、0.1 M 酢酸 (0.1 mL)
2. それぞれ 1 mL のキャリブレーション、対照、または標本に酢酸 (0.1 M、pH 4、1 mL) を加えます。
3. サンプルをロードします。
4. カラム洗浄: 脱イオン水: 氷酢酸 (80:20、1 mL)、脱イオン水: メタノール (40:60、1 mL)
5. カラムを乾燥します (5 分間)。
6. 酸性/中性化合物を溶出します。ヘキサン: 氷酢酸 (98:2、2 mL)
7. カラムを乾燥しながら、抽出物を蒸発乾固します (7 分)。
8. 塩基性化合物に対応するチューブに溶出します。酢酸エチル: 水酸化アンモニウム (98:2、2 mL)
9. 40 °C の窒素で蒸発乾固します。
10. メタノール (50 µL) に再溶解し、オートサンプリャルに移してキャップをします。
11. LC-MS/MS を使用して分析します。

液体クロマトグラフタンデム質量分析 (LC-MS/MS)

化合物に応じてポジティブまたはネガティブでのエレクトロスプレーイオン化モード (ESI) で動作する Agilent 6430 トリプル四重極 LC/MS システムに Agilent 1200 シリーズ LC ポンプを接続します。

カラム	Agilent ZORBAX RRHT Extend C18、 (2.1 x 50 mm、1.8 µm、p/n 727700-902)
カラム温度	60 °C
注入量	5 µL
移動相	溶媒 A: 0.2 % 酢酸および溶媒 B: アセトニトリル 時刻 0: 95 % A、5 % B、5 分: 100 % B、7 分 5 % B 分析時間: 9.2 分、ポストタイム 3 分 流量: 0.5 mL/min
窒素ガス温度	350 °C
ガス流量	10 L/min
ネブライザ圧力	55 psi
キャピラリ電圧	+4,000 V (ポジティブモード)、 -4,000 V (ネガティブモード)

2つのトランジションを選択し、薬物ごとに最適化しました。
 表1に、トランジション、親イオン(M+1、M-1)の最適化された
 フラグメント電圧、プロダクトイオンのコリジョンエネルギー
 を示します。以降の各分析で、陽性の結果の基準を満たすには、
 定量イオンとクオリファイアイオンの比が±20%以内でなけれ
 ばなりません。

表1. マルチプルリアクションモニタリング (MRM) トランジション、最適化されたフラグメント化電圧、「スパイス」化合物について 10 µg/mL で測定されるトランジションの許容範囲

化合物	トランジション	フラグメント電圧 (V)	コリジョンエネルギー (eV)	極性	定量トランジションと定性トランジションの比 (範囲)
<i>d9-JWH-018</i>	<u>351.3 > 223.4</u>	140	20	正	n/a
JWH-018	<u>342.2 > 155.1</u>	120	20	正	16~24
	342.2 > 214.2	120	20		
JWH-250	<u>336.3 > 200.2</u>	120	12	正	69~104
	336.3 > 188.2	120	20		
<i>d7-JWH-073</i>	<u>335.3 > 207.2</u>	120	20	正	n/a
JWH-073	<u>328.2 > 155.1</u>	120	20	正	60~90
	328.2 > 127.1	120	35		
JWH-200	<u>385.3 > 155.1</u>	140	20	正	54~81
	385.3 > 114.2	140	25		
CP 47497 C8	<u>331.3 > 313.3</u>	160	25	負	70~104
	331.3 > 259.3	160	35		
CP 47497	<u>317.3 > 299.2</u>	160	20	負	75~113
	317.3 > 245.2	160	30		
HU-210	<u>385.3 > 367.4</u>	120	30	負	13~20
	385.3 > 281.3	120	45		

下線の付いたトランジションを定量に使用。n/a = 内部標準には適用されない

図 1 に、濃度 10 ng/mL における化合物の 1 次トランジションのクロマトグラムを示します。各化合物の 1 次トランジションと 2 次トランジションの比も 10 ng/mL で測定しました。

収集パッドからの回収

濃度 4 および 40 ng/mL の化合物を添加した 6 つの合成唾液標本を前処理しました。1 mL (±10 %) が収集されるまで収集パッドをサンプル内に置き (収集パッドの軸部分に組み込まれた適量インジケータの色が青に変わることを確認)、次にこのパッドを Quantisal 緩衝液に移し、キャップをして、ラボへの輸送をシミュレートするために一晩保管しました。翌日に標本のアリコート进行分析しました。パッドなしで薬物を緩衝液に加え、室温で一晩置いた後に抽出、分析した絶対濃度 (100 %) と、パッドからの回収量を比較しました。

濃度 4 および 40 ng/mL (n = 6) のときのパッドからの化合物の回収率は、いずれのレベルでもすべて > 60 % となりました。最大の回収率は、4 ng/mL のときの HU-210 の 86 %、最小は 40 ng/mL のときの JWH-073 の 61 % でした。回収率は、両方のレベルで基本的に同等でした (表 2)。

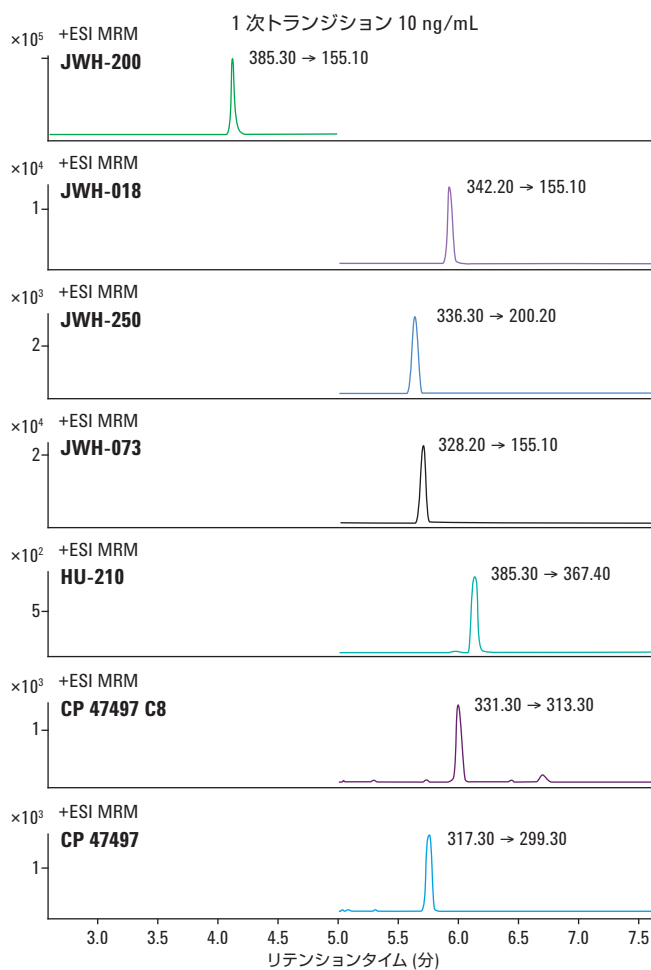


図 1. 10 ng/mL における 1 次トランジション

表 2. メソッド検証データ

	JWH-018	JWH-073	JWH-200	JWH-250	CP 47497	CP 47497 C8	HU-210
LOQ (ng/mL)	0.5	0.5	0.5	2	0.5	2	5
日内の不確定性							
4 ng/mL	3.9%	3.6%	5.0%	3.4%	4.9%	3.9%	8.6%
40 ng/mL	2.2%	2.1%	6.0%	2.0%	4.1%	4.3%	5.6%
日間の不確定性							
4 ng/mL	8.8%	9.6%	6.2%	11%	7.7%	11%	10%
40 ng/mL	8.5%	7.9%	6.2%	11%	10%	11%	12%
パッドの回収率							
4 ng/mL	65.5%	67.4%	85.0%	66.5%	77.7%	76.0%	86.4%
40 ng/mL	70.6%	61.4%	81.4%	75.1%	71.3%	78.2%	75.7%
マトリックス効果	-55%	-45%	-55%	-73%	-64%	-55%	-49%
プロセス効率	40%	51%	56%	24%	38%	45%	51%

データ解析

キャリブレーションは、0.5~100 ng/mL の濃度範囲で線形回帰分析を使用して行いました。Agilent MSD ソフトウェアを使用し、各濃度で対象化合物と内部標準のピーク面積比を計算しました。データは線形最小二乗回帰曲線に適合させ、強制的に原点を通さず、等しい重み付けを使用しました。確認のために、化合物ごとに2つのトランジション(1つは内部標準のもの)をモニターしました。許容範囲に収めるには、定性トランジションの比が、既知のキャリブレーション標準を使用して確立したトランジションの20%以内でなければなりません。

直線性および感度

化合物の許容可能な定量基準である最小値まで、系列希釈を使用してメソッドの定量下限 (LOQ) を測定しました。つまり、クロマトグラフィーのピーク形状、リテンションタイム (キャリブレーション標準の2%以内)、および10 ng/mL のキャリブレーション標準に対するクオリファイアトランジション比 ($\pm 20\%$) は許容範囲内のものでした。LOQ の定量値は対象濃度の $\pm 20\%$ 以内でなければなりません。定量下限は、JWH-018、JWH-073、JWH-200、および CP 47497 では0.5 ng/mL、CP 47497 C8 および JWH-250 では2 ng/mL、HU-210 では5 ng/mL でした (図2)。すべての化合物で、直線性は LOQ~100 ng/mL の範囲で許容値以内でした ($R^2 > 0.99$, $n = 5$)。

マトリックス効果

濃度10 ng/mL の非抽出薬物標準に加えて、薬物が含まれないマトリックス抽出物と陰性対照 (内部標準だけが含まれる抽出物) を前処理しました。唾液からの化合物の回収率は、最初に抽出サンプル ($n = 3$) の応答を濃度10 ng/mL $\{R_{ES}\}$ で評価することにより測定しました。次に、唾液を抽出し、抽出後に濃度10 ng/mL ($n = 3$) $\{R_{PES}\}$ となるように薬物を加えました。式 $(R_{ES}/R_{PES}) \times 100$ を使用して回収率を計算しました。

マトリックス効果 (イオン化抑制) による応答の低下は、非抽出の希釈していない薬物標準 ($n = 3$) のピーク面積応答を濃度10 ng/mL $\{R_{NES}\}$ で評価することにより測定しました。非抽出溶液を、抽出標本と同一の再溶解用溶媒で分析しました。式 $(R_{PES}/R_{NES}) - 1 \times 100$ を使用して%マトリックス効果を計算しました。プロセスの総合的な効率率は、式 $(R_{ES}/R_{NES}) \times 10$ を使用して計算しました。

大きなイオン化抑制効果が見られましたが、固相抽出と重水素で標識した内部標準の使用により測定できました。

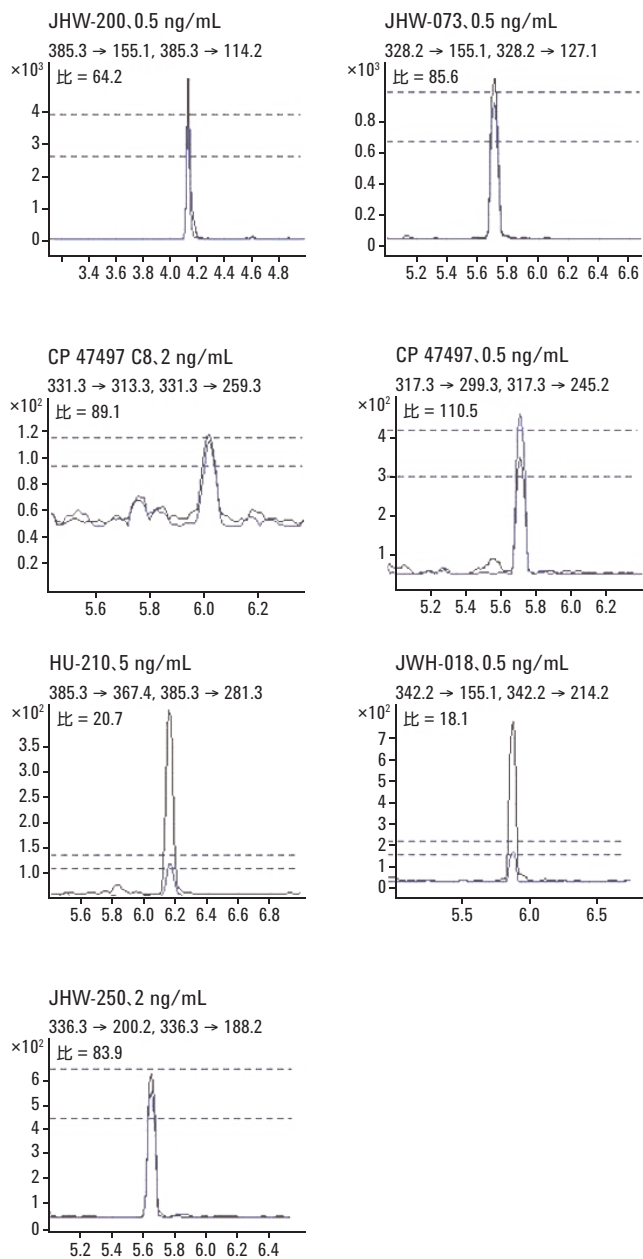


図2. $\pm 20\%$ の比を示す LOQ 濃度

選択性

Quantisal デバイスを使用して、薬物が含まれない5つの唾液標本を収集しました。内因性化合物または輸送用緩衝液に関連する干渉の可能性を評価するために、各アリコートを取り、説明に従って抽出と分析を行いました。

さらに、薬物が含まれない液体のアリコートに一般的な依存性薬物を濃度 2,000 ng/mL で加え、説明に従って抽出し、分析しました。

THC	アミトリプチリン
THC-COOH	シクロベンザプリリン
11-OH-THC	イミプラミン
カンナビノール	ドチエピン
カンナビジオール	ドキシセピン
コカイン	フルオキシセチン
ベンゾイルエクゴニン	セルトラリン
ノルコカイン	トリミプラミン
コカエチレン	プロトリプチリン
コデイン	クロルプロマジン
モルヒネ	クロミプラミン
6-AM	ノルトリプチリン
6-AC	パロキシセチン
オキシコドン	デシプラミン
オキシモルホン	プロマゼパム
ヒドロコドン	アルプラゾラム
ヒドロモルフォン	クロナゼパム
アンフェタミン	ロラゼパム
メタンフェタミン	オキサゼパム
MDMA	ジアゼパム
MDA	ミダゾラム
MDEA	フルラゼパム
フェンテルミン	フルニトラゼパム
フェンタニル	ノルジアゼパム
フェンシクリジン	トリアゾラム
トラマドール	テマゼパム
カリソプロドール	ニトラゼパム
メプロバメート	クロルジアゼポキシド
シタロプラム	メタドン
ベンラファキシン	

薬物が含まれない抽出物からは内因性干渉は見られず、高濃度で分析を行った THC とその主代謝物を含む一般的な薬物のいずれからも外因性干渉は見られませんでした。

不確定性

すべての化合物を同時に使用し、濃度 4 および 40 ng/mL で標本を強化しました。説明した手順に従い (n = 6、日内の不確定性)、5 日間連続して (n = 30、日間の不確定性) 各濃度を分析しました。全薬物のアッセイに関する日内の不確定性は、いずれの濃度でも < 9 % であり、日間の不確定性は、いずれの濃度でも < 12 % でした (表 2)。

純正サンプル

標本は、米国内で合法的に入手可能であった期間にこれらの化合物を購入した 2 人の若いボランティアから収集しました。被験者 1 は「Blueberry Posh」を、被験者 2 は「Black Mamba」を吸引しました。Quantisal 唾液収集デバイスを使用し、吸引開始前と、吸引後のさまざまな時点で標本を収集しました。被験者 1 からは 20 分、40 分、1 時間、2 時間、および 12 時間後に、被験者 2 からは 20 分、40 分、1 時間、5 時間、および 12 時間後にサンプルの提供がありました。これらの標本を収集の翌日に分析し、4 °C で 1 か月保管した後に、異なるメソッドを使用して再分析しました。1 年後に、この手順を使用して再分析を行いました。この時点では、これらの化合物を合法的に入手できなくなったため、純正の標本は調達できませんでした。

この 2 つの前処理で得られた主な活性化合物は JWH-018 であることがわかりました。4 °C で 1 か月保管した後にサンプルを再分析したところ、ほぼ同じ濃度が検出され、きわめて安定していることがわかりました。4 °C で 1 年間保管していた標本を再分析したところ、被験者 1 の濃度は 1 年前と基本的に同じで、元が大幅に低かった被験者 2 の濃度は概して低下していました (図 3)。

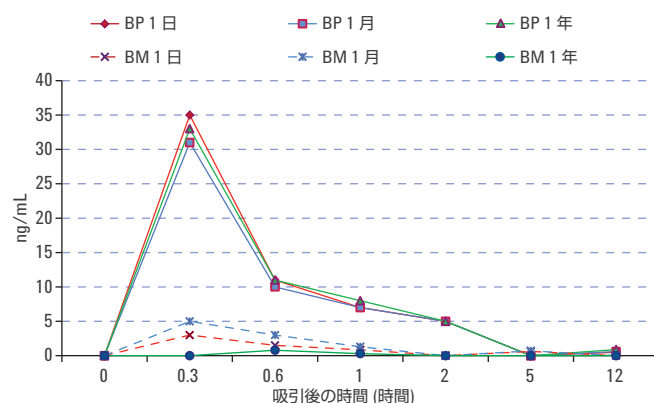


図 3. 4 °C で保管した純正標本の安定性

吸引 40 分後に収集したサンプルのトランジションと、定性トランジションの強度の周りの $\pm 20\%$ の許容バンドを示す抽出イオンクロマトグラムを図 4 に示します (被験者 1)。JWH-018 の濃度は 11 ng/mL でした。

まとめ

唾液に含まれる複数の「スパイス」化合物の同時測定が初めて報告されました。この手順は、合成カンナビノイドの存在を確認するために Quantisal デバイスを使用して収集した標本の分析に適用できるものであり、パッドからの回収率は、2 つの濃度で $> 60\%$ となりました。2 つの異なるハーブ製品ブランドの 1 回の吸引セッションの後、吸引 20 分後に、JWH-018 が唾液中に最高濃度で検出されました。1 年後でも、JWH-018 は、「Blueberry Posh」を 1 回吸引した 12 時間後に唾液中で検出することができました。

詳細情報

これらのデータは一般的な結果を示したものです。アジレントの製品とサービスの詳細については、アジレントの Web サイト (www.agilent.com/chem/jp) をご覧ください。

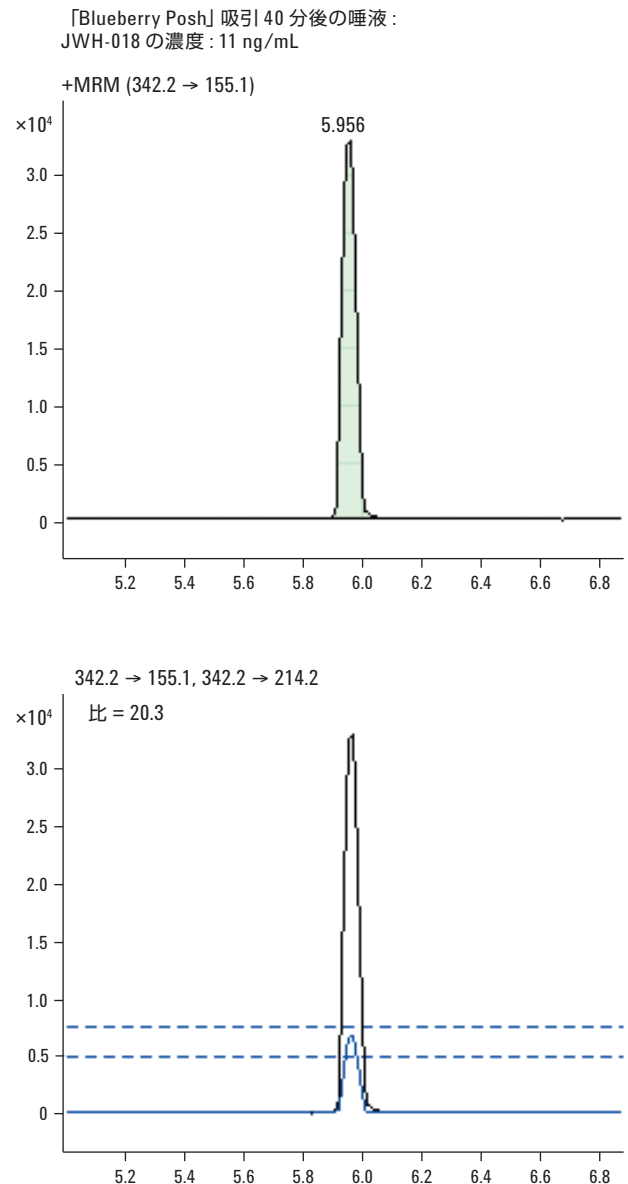


図 4. 吸引 40 分後の被験者 1 の唾液、JWH-018 = 11ng/mL

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

January 17, 2012

5990-9679JAJP



Agilent Technologies