

トリプル四重極 LC/MS/MS メソッド による、尿中の「バスソルト」成分 (メチレンジオキシピロバレロン (MDPV) およびメフェドロン) の定量分析

アプリケーションノート

法医学

著者

Guiping Lu, Ph.D.
Bert Toivola Ph.D.
Sterling Reference Laboratories,
2617 East L Street,
Tacoma, WA 98421

Thomas J. Gluodenis, Jr., Ph.D.,
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road,
Wilmington, DE 19808
USA

概要

合成カチノン(「バスソルト」と称して広く販売されている化合物)が出現し、危険なほど広まっていることから、現代の法医学ラボでは、生体試料中に含まれるそうした規制対象化合物の信頼性の高いスクリーニングや確認、定量が課題となっています。このアプリケーションノートでは、尿中の2つの規制対象の合成カチノン(3,4-メチレンジオキシピロバレロン(MDPV)と4-メチルメトカチノン(メフェドロン))の分析に対応できる、堅牢な定量メソッドを紹介および評価しています。このメソッドは、優れた直線性、低い検出下限(LOD)、優れた再現性/精度、低い定量下限(LOQ)が得られることが実証されています。また、構造的に類似する化合物による妨害は生じず、キャリアオーバーはほとんどありません。



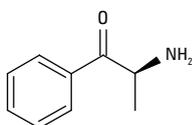
Agilent Technologies

はじめに

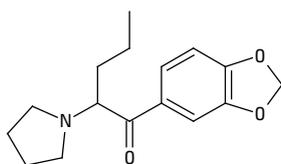
3,4-メチレンジオキシピロバレロン (MDPV) や 4-メチルメトカチノン (メフェドロン) などの合成カチノンは、米国や欧州、オーストラリアなどの多くの国で新たに出現している乱用薬物です。米国では合成カチノンに対する懸念が高まっており、Poison Control Center に寄せられた曝露に関する相談電話件数は、2010年の304件から、2011年には6138件に急増しました。特に問題となっているのは、そうした薬物の使用が原因とされる複数の死亡事故が報告されていることです。

合成カチノンは中枢神経系 (CNS) の刺激剤で、メタンフェタミンやエクスタシー (MDMA) と似た作用があり、常習性が高いと考えられています。図1を見ると、合成カチノンがカチノンの化学的構造とよく似ていることがわかります。このカチノンは東アフリカのチャット (麻薬) 工場で見つかった活性アルカロイドで、生の葉を噛んだり、茶として飲んだりする形で摂取されています。カチノンを摂取すると、脳がドーパミンを放出し、緩やかな幸福感や興奮、食欲抑制、多弁、情緒不安定、便秘、病的行動、眠気を伴う幻覚などの症状が現れます。

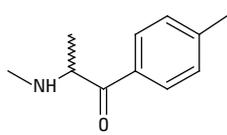
カチノン



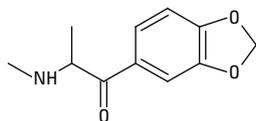
合成カチノン



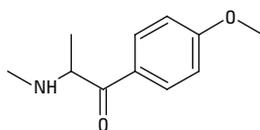
メチレンジオキシピロバレロン
MDPV



4-メチルメトカチノン メフェドロン
4-MMC



メチロン



メフェドロン
4-メトキシメトカチノン

図1. カチノンと一般的な合成カチノン

米国では、合成カチノンはインターネットやコンビニエンスストア、麻薬販売店で「バスソルト」として販売され、「Ivory Wave」や「Vanilla Sky」といったさまざまな商品名がつけられています。特に、MDPVとメフェドロンの使用は、メタンフェタミンやコカイン、エクスタシーと同様の作用をもたらします。心拍数や血圧の異常な上昇、不眠、吐き気、嘔吐、幻覚、極度の妄想や不安、発作などの薬害反応が生じることがあり、過剰摂取時や他の薬物との併用時には死に至ることさえあります。

MDPVは1960年代に開発されました。FDAにより医療目的での使用が認可されたことはありませんが、倦怠感の治療薬や食欲減退薬として以前から使用されていました。現在、欧州や英国、オーストラリアで広まっているMDPVの塩酸塩は、白から茶色の粉末で、一般にはコカインのように鼻から吸引されます。1929年にはじめて合成されたメフェドロンは、白色の結晶または粉末で、錠剤として調剤することができます。

MDPVとメフェドロンは数十年前から開発されていますが、1990年後半から2000年初めまでは広く知られることはなく、懸念の対象でもありませんでした。実際、2008年までは、おもに欧州で使用されていました。そのため、EUは2010年12月に、これら2つの薬物を違法薬物に指定しました。

米国では、2008年にMDPVとメフェドロンによる最初の発作が報告されました。ワシントンなどの多くの州では、これらの薬物が禁止されており、2011年10月から、DEAは暫定的に、MDPVとメフェドロン、およびメチロンを規制物質法のスケジュール1薬物に指定しました。現在では、米国でのこれらの薬物の使用、保持、販売、製造は違法行為となっています。

こうした流れを受け、MDPVとメフェドロンや他の合成カチノンの法医学分析が、急激に増加するものと予想されます。これらの化合物は、既存のアンフェタミンスクリーニング免疫測定や確認用のガスクロマトグラフィー/質量分析法 (GC/MS) では検出できないため、新たな手法が求められています。したがって、このアプリケーションノートでは、尿中のMDPVとメフェドロンのスクリーニング、確認、定量に対応できる、効果的な液体クロマトグラフィー/トリプル四重極質量分析法 (LC/MS/MS) によるメソッドを紹介します。Sterling Reference Laboratories とアジレントにより開発されたこのメソッドは、本アプリケーションノートの公開時点で、561件の患者サンプルの分析で効果を発揮しています。全体の陽性率は8% (45標本) で、うち41件 (7.3%) はMDPV陽性、3件 (0.5%) はメフェドロン陽性、1件 (0.2%) はMDPVとメフェドロンの両方で陽性でした。

実験手法

メソッドの概要

合成薬物を添加した尿サンプルを作成し、カチオン交換固相抽出 (SPE) カラムを用いて抽出しました。単純なサンプル希釈と直接注入 (「希釈注入」) ではなく SPE を用いたのは、SPE メソッドのほうがよりクリーンなサンプルを質量分析計に導入できるからです。これにより、イオン化抑制およびイオン源洗浄の手間を最小限に抑えられ、感度も向上します。希釈注入メソッドでは、汚れたサンプル (未処理の尿サンプル) が質量分析計に導入されます。ただし、少数のバスマルト分析しかおこなわず、イオン源洗浄の頻度を気にする必要がないラボでは、「希釈注入」のほうが適しているかもしれません。

抽出したサンプルを、エレクトロスプレーイオン化を備えた LC/MS/MS システムに注入しました。各分析対象化合物と内部標準について、2 つのマルチプルリアクションモニタリング (MRM) トランジションをモニタリングしました。リテンションタイムと、選択したイオンの内部標準に対する比率を用いて、検出と定量をおこないました。検量線を作成し、MassHunter データ解析ソフトウェアを用いて定量分析をおこないました。定量分析にあたっては、検量線を作成し対象化合物の濃度を算出しました。検量線の直線性、より低い LOD および LOQ、再現性、共溶出物質の影響、キャリーオーバーについて評価し、有効性が確認されました。

合成尿サンプル、キャリブレーション溶液、品質管理溶液、内部標準溶液

超純水 800 mL に以下の物質を溶解し、合成尿サンプル (添加溶液およびネガティブコントロールまたはブランク) を作成しました。その後、超純水を加え、最終体積を 4,000 mL としました。

20.0 g	NaCl (ACS 試薬グレード)
2.0 g	クレアチニン (Sigma Cat. No. C4255-100G)
40.0 g	尿素 (ACS 試薬グレード)
38.6 g	リン酸一ナトリウム一水和物 (ACS 試薬グレード)
32.3 g	リン酸二ナトリウム七水和物 (ACS 試薬グレード)
4.0 g	アジ化ナトリウム (ACS 試薬グレード)
3~5 滴	食品用黄色着色剤 (食品グレード、McCormick)

その後、1 % HCl を用いて合成尿サンプルの pH を 6.5 に調整しました。

MDPV (Cayman, Cat. No.10684) とメフェドロン (Cerilliant Cat. No. M-138) 原液をメタノールに溶解し、**キャリブレーション溶液**を作成しました。1~5000 ng/mL の範囲で MDPV とメフェドロンの検

量線を作成するために、キャリブレーション化合物を合成尿サンプルに 1、5、10、25、50、100、500、1,000、5,000 ng/mL の濃度で添加しました。

品質管理 (QC) 溶液。合成尿サンプル中で、3 種類の QC サンプルを作成しました (陰性、陽性カットオフの 40 %、陽性カットオフの +25 %)。陽性カットオフは管理上、25 ng/mL に設定しました。したがって、40 % および +25 % QC サンプルに対応する名目上濃度は、それぞれ 10 ng/mL および 31 ng/mL になります。

HPLC グレードのメタノール中 MDPV-D8 (Cayman, Cat. No. 10679) およびメフェドロン-D3 (Cerilliant, Cat. No. M-139) の**重水素標識標準溶液**を、超純水を用いて 500 ng/mL の濃度で作成しました。

サンプル前処理

図 2 に、カチオン交換 SPE サンプル前処理手順の概要を示しています。この手順は、8 時間のシフトあたりで 300 以上のサンプルを簡単に処理できるように設計されています。

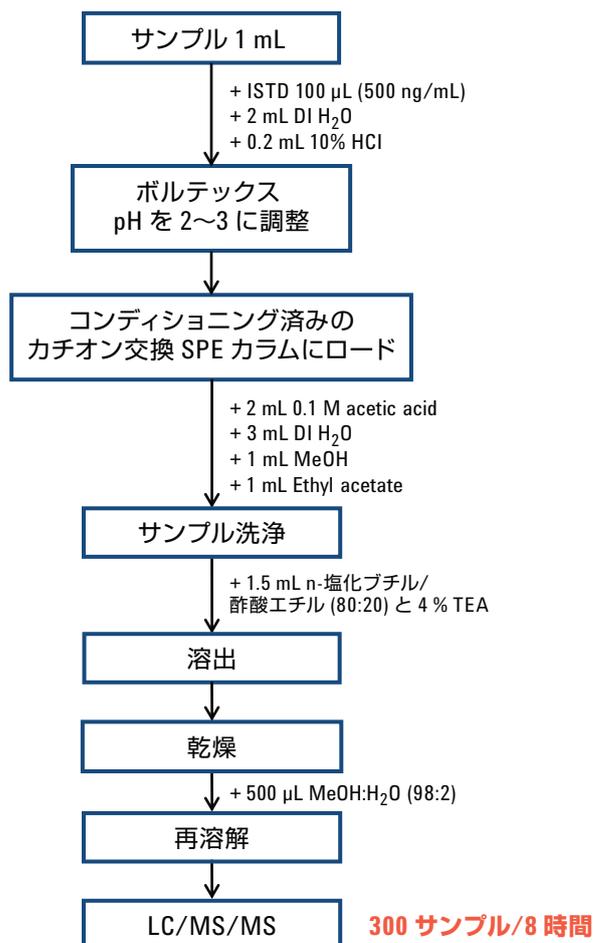


図 2. サンプル前処理の概要

校正済みのマイクロピペットを用いて、キャリブレーション、40 % QC、+25 % QC、ネガティブコントロール尿サンプルの各溶液 1 mL を各 16x100 mm とラベルされた試験管に移しました。次に、校正済みのリピーティングピペットとピペットディスペンサーを用いて、500 ng/mL 内部標準溶液 100 µL を試験管中のサンプルに加えしました。同様に、超純水 (2 mL) を各試験管に加えしました。各試験管に 10 % HCl 0.2 mL を加え、pH を 2~3 に調節しました。

抽出には Multi-prep SPE ワークステーション (Biochemical Diagnostics) を使用しました。カチオン交換 SPE カラム (Biochemical Diagnostics, Cat. No. 1410082-0, GV-65) のコンディショニングでは、メタノール 1 mL に続いて 5 % 重亜硫酸ナトリウム 1 mL を重力によりシステムに流しました。

前処理したサンプルの抽出にあたって、各サンプルを対応するラベルの SPE カラムに入れました。次に、0.1 M 酢酸 2 mL をピペットで各 SPE カラムに加えたのち、脱イオン水 3 mL、メタノール 1 mL、最後に酢酸エチル 1 mL を加えました。各溶液の添加の間に、カラムベッド上で液体が観察されなくなるまで、重力により液体を流しました。

サンプルの溶出は、真空ボックス外の溶出試験管でおこないました。溶出溶媒 (1.5 mL)、4 % TEA を含む n-塩化ブチル/酢酸エチル 80:20 をピペットで各カラムに加え、カラムベッド上で液体が観察されなくなるまで、重力により流しました。溶出試験管をアルミニウム製の乾燥ブロックに設置し、34~40 °C で緩やかな窒素乾固により乾燥させました。

メタノール: 超純水 (2:98) 0.5 mL にサンプルを再溶解し、室温で 20 分放置してから、オートサンブラ用バイアルに移しました。サンプルの再溶解後に、LC/MS/MS 分析をおこないました。

LC/MS/MS 分析

LC/MS/MS 分析には、Agilent 1200 シリーズ LC システムと Agilent 6460 シリーズトリプル四重極質量分析計を使用しました。サンプルあたりの総分析時間は 4.2 分です。この LC システムは、オートサンブラ、デガッサ、バイナリポンプ、カラムコンパートメントで構成されています。分離には Agilent Polaris C18 カラムを使用しました。LC の動作パラメータを表 1 に示しています。

表 1. LC 動作パラメータ

カラム	Agilent Polaris C18, 50 x 2.0 mm, 5 µm			
注入量	1 µL			
LC グラジエン	時間	流速	移動相 B	移動相 A
	0	0.8	2 %	98 %
	2	0.8	30 %	70 %
	2.5	0.8	90 %	10 %
	3.5	0.8	90 %	10 %
	3.6	0.8	2 %	98 %

移動相 A : 0.1 % ギ酸を含む 100 % 脱イオン水

移動相 B : 0.1 % ギ酸を含む 100 % メタノール

Agilent 6460 シリーズトリプル四重極 LC/MS/MS システムは、エレクトロスプレーイオン化 (ESI) を用い、ポジティブイオンモードで測定しました。MS 測定パラメータを表 2 に示しています。

表 2. MS 測定パラメータ

ネブライザガス	窒素 (超高純度)、99.999 %	
コリジョンセルガス	窒素 (超高純度)、99.999 %	
イオン源パラメータ	ガス温度	300°C
	ガス流速	10 L/min
	ネブライザ	20 psi
	シースガス温度	350°C
	シースガス流速	8 L/min
	キャピラリ	4,000 V
	ノズル電圧	0 V
検出器パラメータ	EMV	200

各分析対象物と内部標準について、2 つの MRM トランジションをモニタリングしました。モニタリングしたメフェドロンおよび MDPV の MRM トランジションと MS/MS パラメータを表 3 に示しています。

表 3. MRM トランジションと MS/MS パラメータ

化合物	ブリークイオン	モニタリングされたプロダクトイオン	ドウェルタイム (ms)	フラグメンテーション電圧	コリジョンエネルギー電圧
メフェドロン	178.1	160.1/145.0	50	95	8/20
メフェドロン-D3	181.1	163.1/148.1	50	90	8/20
MDPV	276.2	135.0/126.1	50	130	24/24
MDPV-D8	284.2	134.5/149.0	50	130	28/32

検量線の作成

1~5,000 ng/mL の範囲で MDPV とメフェドロンを検量線を作成するために、各濃度 (1、5、10、25、50、100、500、1,000、5,000 ng/mL) で 5 回繰り返し分析 (5 つの抽出物を 1 回注入、n = 5) をおこないました。キャリブレーション溶液濃度に対する分析対象物/内部標準の定量イオン強度の比の最小二乗法による直線回帰を用いて、Agilent MassHunter ソフトウェアにより検量線を作成しました。

結果と考察

合成尿中で重水素化された形態、および重水素化されていない形態の濃度 25 ng/mL の MDPV とメフェドロンをトータルイオンクロマトグラム (TIC) と MRM クロマトグラムを図 3 に示しています。LC/MS/MS による高感度測定により、ケミカルノイズは無視できる程度で、高いレスポンスが得られました。定量に理想的な形状であるガウス分布型のピークも観察されました。

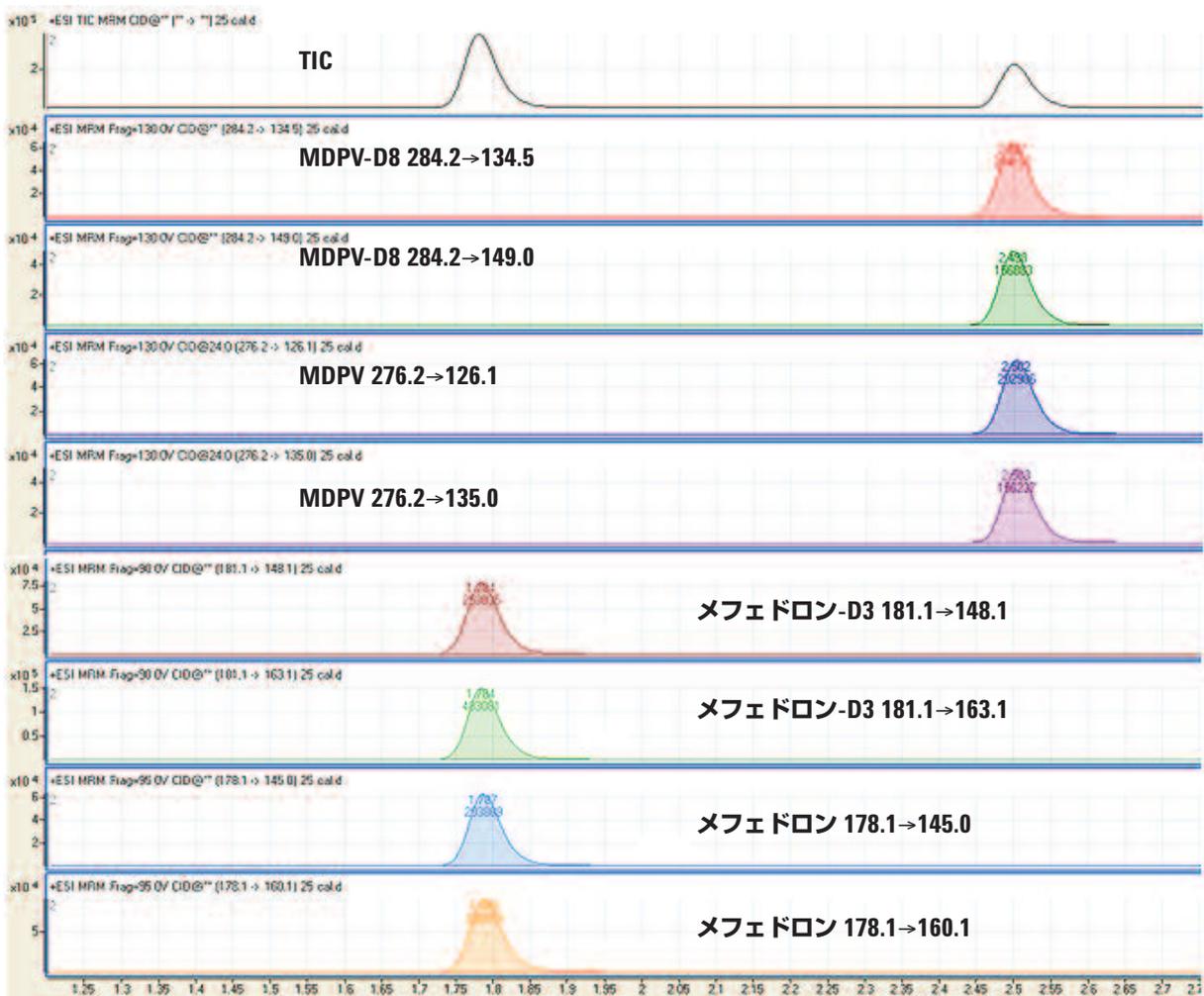


図 3. 合成尿中で重水素化された形態、および重水素化されていない形態の MDPV とメフェドロンのトータルイオンクロマトグラム (TIC) と MRM クロマトグラム。25 ng/mL で、すべての化合物について高いレスポンスが得られました

1~5,000 ng/mL の範囲で合成尿サンプルに添加した MDPV とメフェドロン の検量線を図 4 に示しています。低濃度域を含め、濃度範囲全体で優れた直線性が得られ、平均相関係数 (R²) は 0.999 を上回りました。

5 回繰り返し分析にもとづく 1 ng/mL における MDPV とメフェドロン の平均シグナル/ノイズ比 (S/N) は、それぞれ 19 ± 6 と 24 ± 9 でした。理論上は、さらに低い検出下限 (LOD) も得られますが、ほとんどのルーチン分析で実際的な濃度である 1 ng/mL を LOD としました。

図 5 と 6 に、1 ng/mL における MDPV とメフェドロン のイオン強度を示しています。

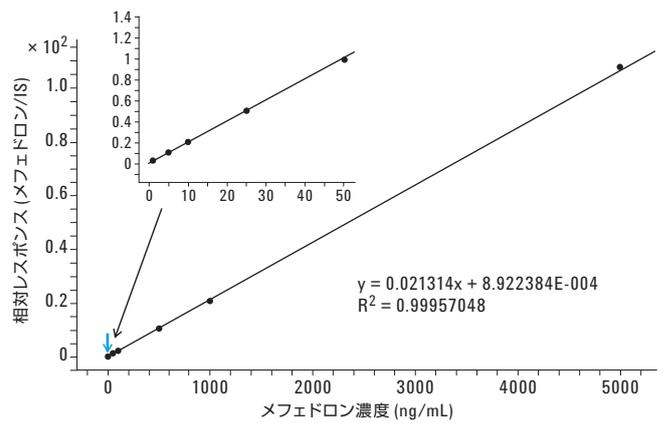
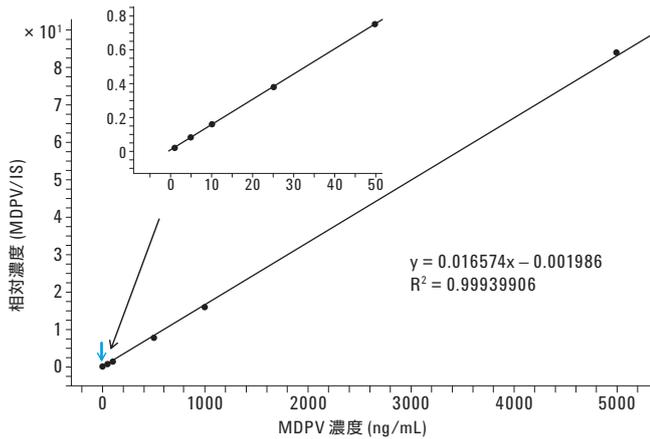


図 4. MDPV とメフェドロン の検量線は、低濃度でも (挿入図) 優れた直線性を示しています

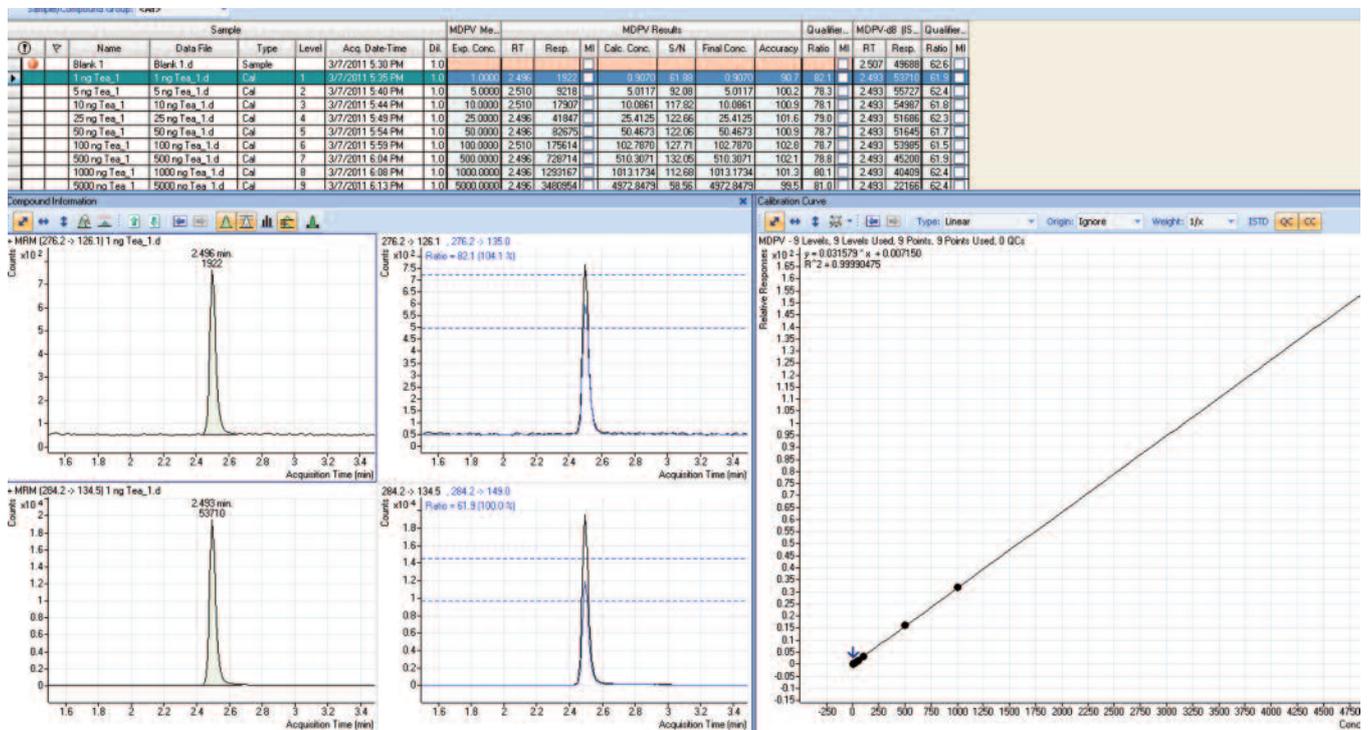


図 5. 1 ng/mL (LOD) における MDPV の強度

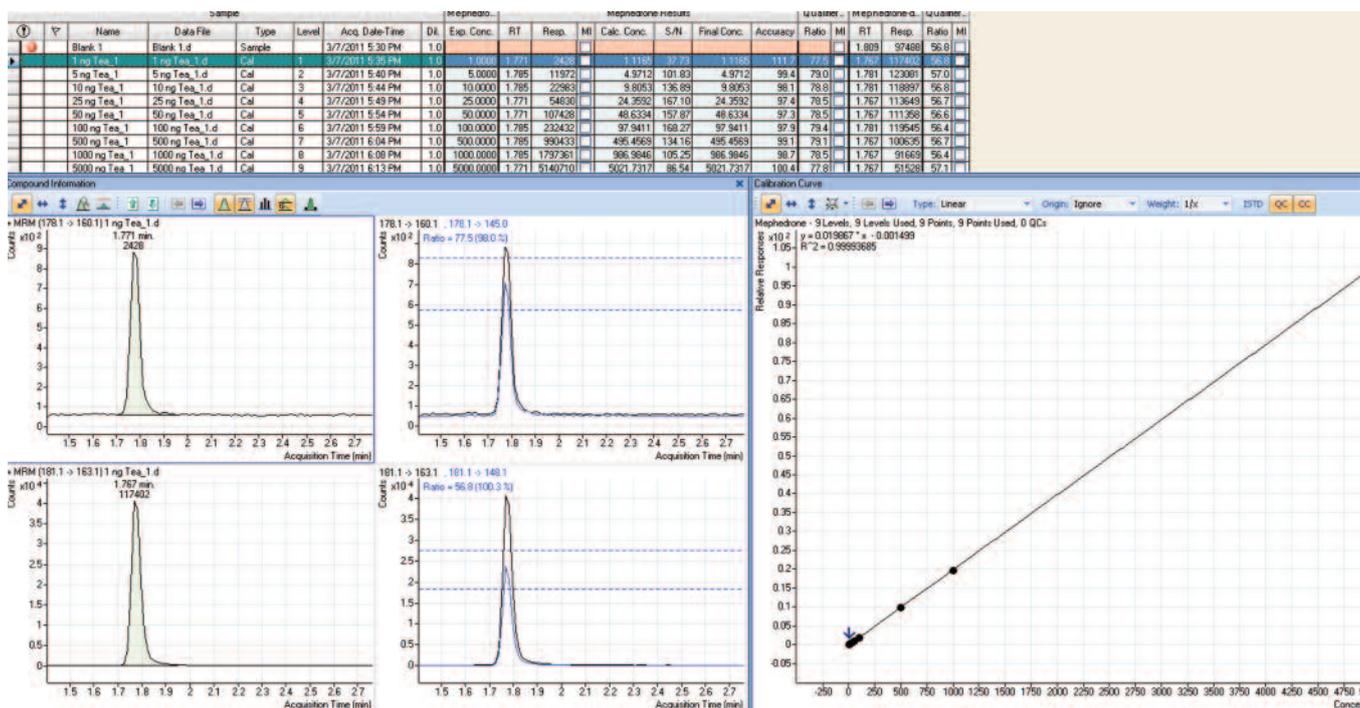


図 6. 1 ng/mL (LOD) におけるメフェドロン強度

表 4 では、合成尿サンプルに添加した 9 つのキャリブレーション溶液に関して、優れた再現性 (n = 5 での精度) が得られたことが示されています。相対標準偏差 (RSD) は 5 % 以内でした。2 番目に低いキャリブレーション溶液濃度である 5 ng/mL では、検量線作成時に 80 % 以上の精度が得られました。したがって、このメソッドの定量下限 (LOQ) の妥当な限界値として、5 ng/mL を選択しました。

表 4. 合成尿サンプル中のキャリブレーション化合物のメソッド精度 (n=5)

予想濃度 ng/mL	平均濃度 ng/mL	
	MDPV (RSD%)	メフェドロン (RSD%)
1	1.33 (3.83 %)	1.21 (4.91 %)
5	4.98 (3.98 %)	4.96 (3.14 %)
10	9.53 (2.49 %)	9.69 (1.72 %)
25	22.61 (1.84 %)	23.94 (1.81 %)
50	45.65 (2.64 %)	47.17 (0.82 %)
100	93.81 (3.12 %)	96.81 (1.32 %)
500	479.46 (0.92 %)	485.71 (1.79 %)
1000	991.13 (1.40 %)	975.75 (0.98 %)
5000	5042.34 (0.33 %)	5045.73 (0.39 %)

MDPV とメフェドロンについてカットオフ値を設定している規制当局はありませんが、ここで示す結果をもとに考えると、25 ng/mL は適切な値といえます。

共溶出による影響の可能性を検証するために、MDPV およびメフェドロンと構造の似た 6 つの化合物を、 1×10^6 、 1×10^6 、 1×10^6 、 5×10^4 、 5×10^3 、 5×10^3 ng/mL という比較的高い濃度でブランク尿サンプルに添加しました。使用した化合物はフェニルプロパノールアミン (PPA)、エフェドリン、プソイドエフェドリン、フェンテルミン、アンフェタミン、メタンフェタミンです。図 7 に、これらの化合物の構造と分子量を示しています。分子量が MDPV およびメフェドロンとは異なるため、共溶出による影響は生じないものと予想されます。各サンプルは前述の方法で前処理および抽出し、LC/MS/MS システムで分析しました。

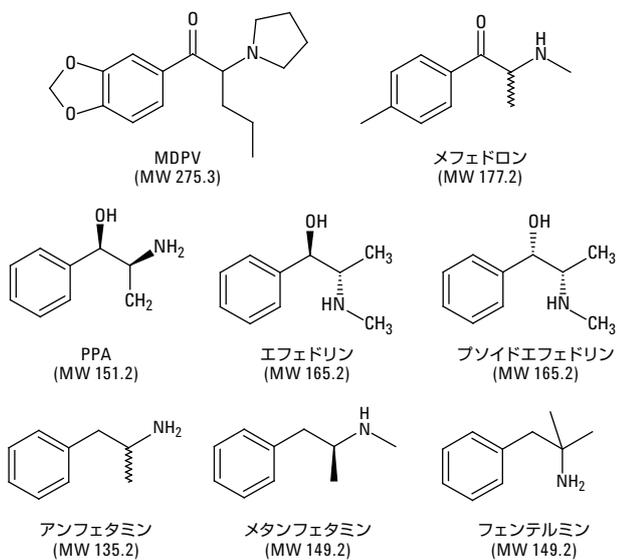


図 7. MDPV とメフェドロンと構造の似た 6 つの化合物

予想通り、共溶出の影響はありませんでした。図 8 は、エフェドリンを 1×10^6 ng/mL で添加したブランク尿サンプルの MRM クロマトグラムを示しています。この濃度は、ターゲットである合成カチノンに比べて高いものです。図に見られる 4 つのピークは、MDPV-D8 およびメフェドロン-D3 トランジションを示すものです。

キャリーオーバーを確認するために、10,000 ng/mL の MDPV とメフェドロンを 5 回注入したのちに、陰性対照尿サンプルを分析しました。キャリーオーバーにより生じる小さいピークが観察されました。図 9 および 10 は、ブランクサンプルにおける MDPV とメフェドロンの算出濃度が、それぞれ 3.18 ng/mL と 1.53 ng/mL であることを示しています。どちらの値もカットオフ値の 25 ng/mL を大きく下回っていることから、キャリーオーバーは無視できるものと考えられます。

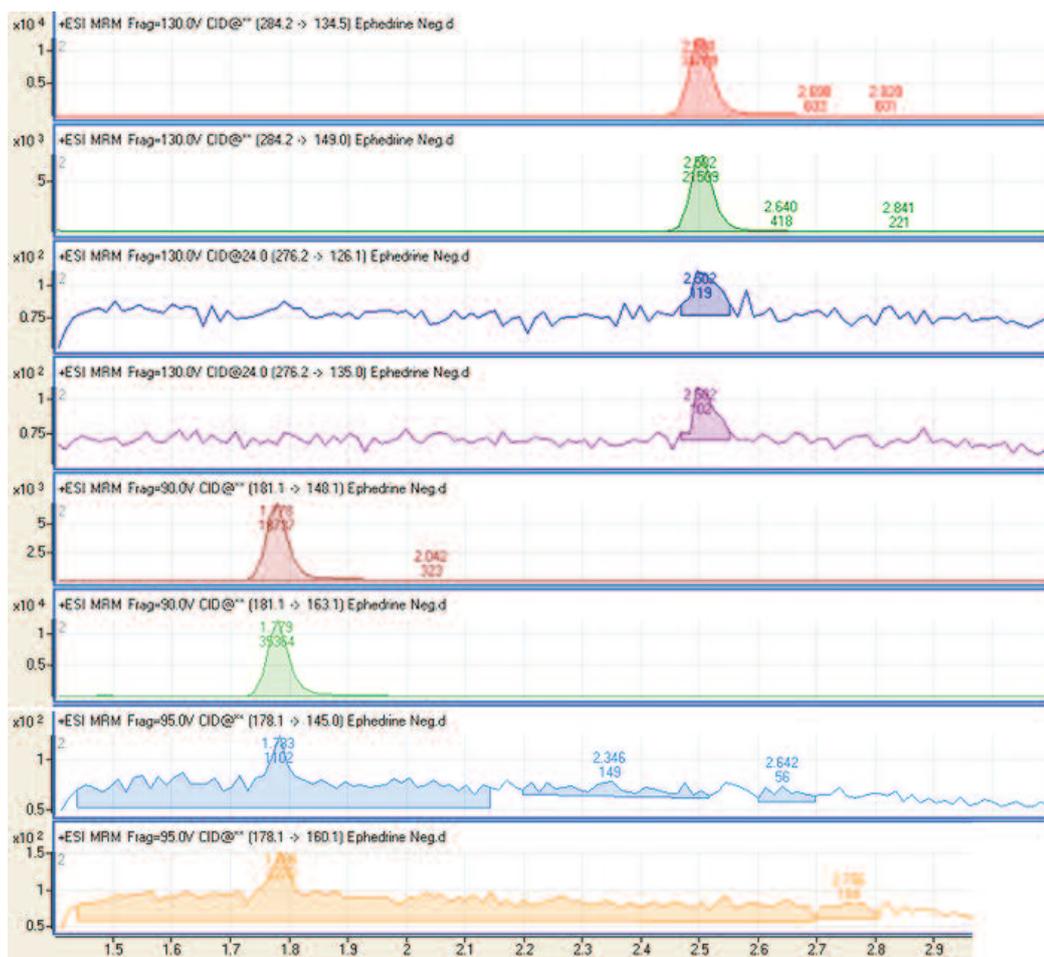


図 8. 1×10^6 ng/mL でエフェドリンを添加したブランク尿サンプルの MRM クロマトグラム。共溶出による影響はありません

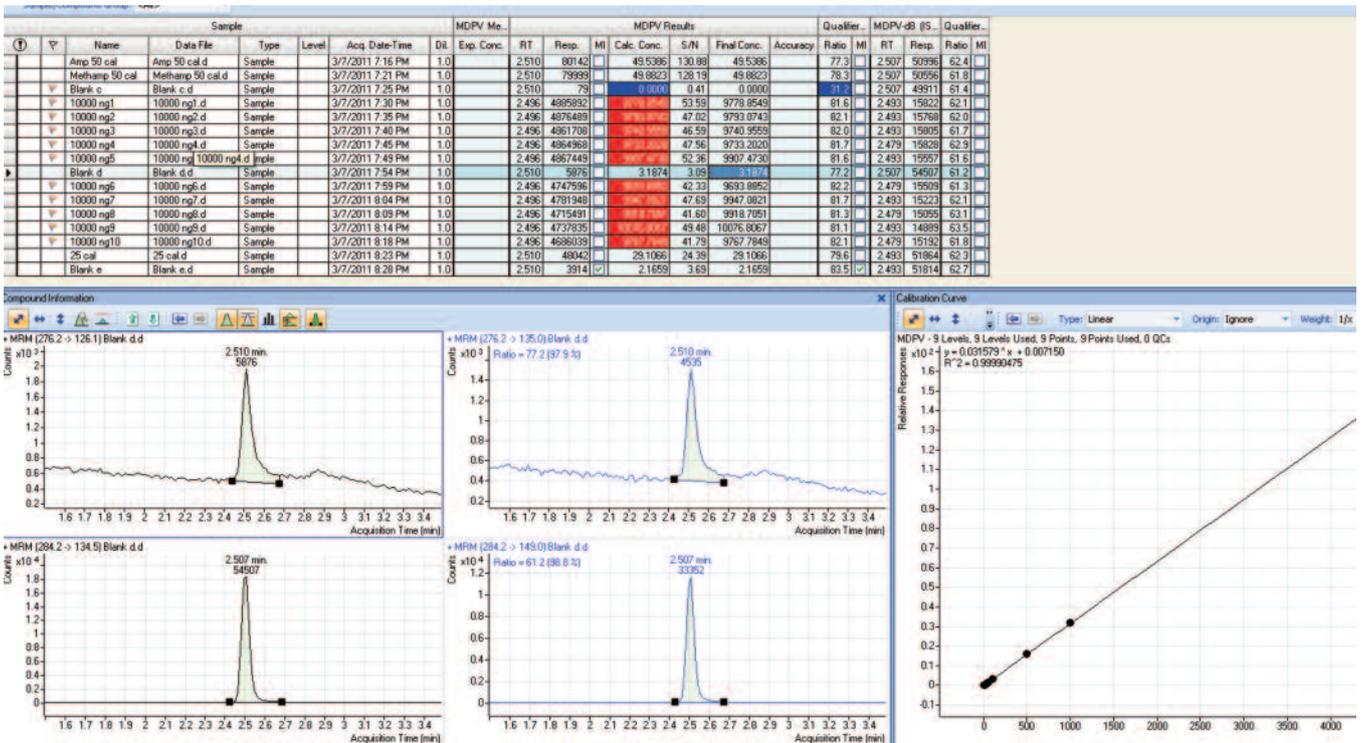


図 9. MDPV のキャリアオーバーは 3.18 ng/mL という無視できる大きさで、カットオフ値の 25 ng/mL を下回っています

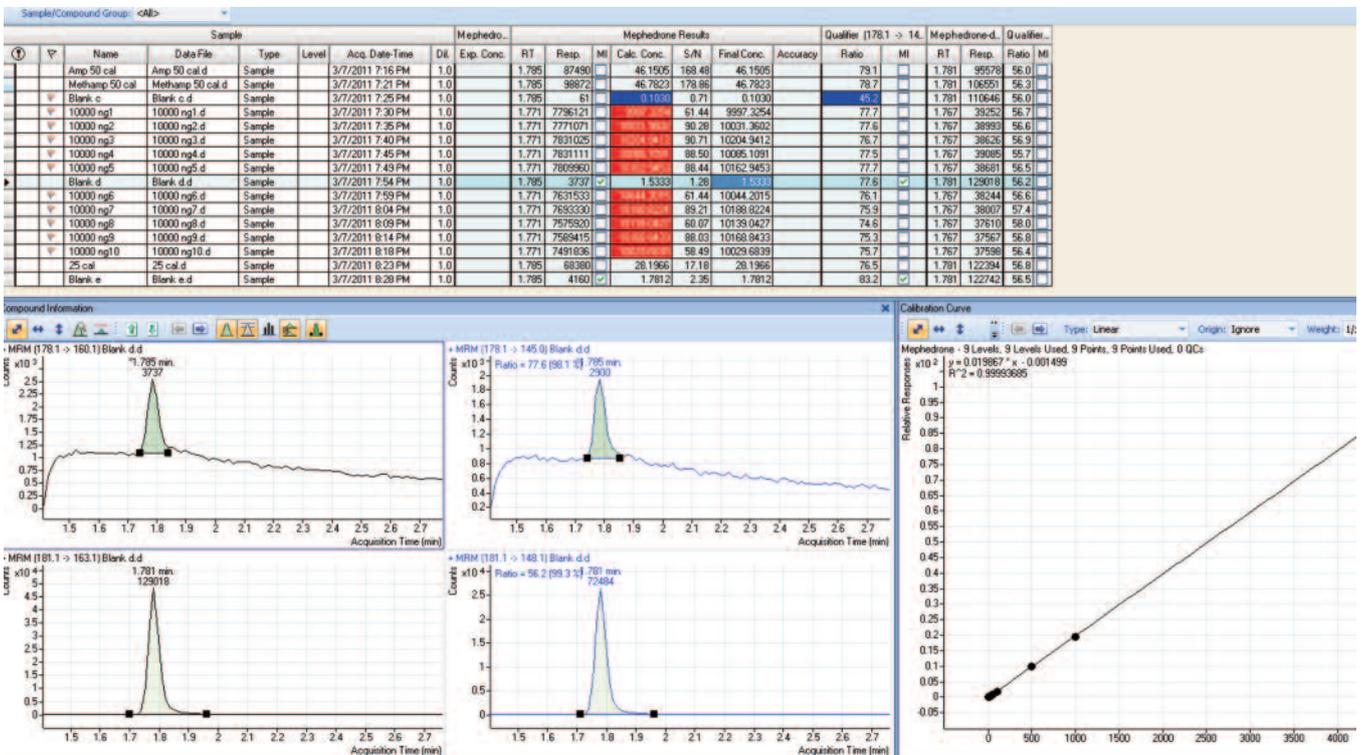


図 10. メフェドロン のキャリアオーバーは 1.53 ng/mL という無視できる大きさで、カットオフ値の 25 ng/mL を下回っています

結論

選択性と感度に優れた LC/MS/MS は、尿などの複雑な生体試料マトリクス中の MDVP やメフェドロンといった乱用合成カチノンのスクリーニング、確認、定量に効果的なテクニックです。ここで紹介した LC/MS/MS は、法医学ラボ向けの簡単で堅牢なアプローチで、すぐれた直線性、LOD、再現性、LOQ を備えていることに加え、構造が似ている化合物による共溶出の影響がなく、キャリアオーバーもほとんどありません。また、必要に応じて他の合成カチノンも分析できるように、メソッドを簡単に修正することができます。

参考文献

1. American Association of Poison Control Centers.
<http://www.aapcc.org>.
2. DEA Drug Fact Sheet, Bath Salts or Designer Cathinones (Synthetic Stimulants).
http://www.justice.gov/dea/pubs/abuse/drug_data_sheets/Bath_Salts.pdf.
3. Federal Register Vol. 76, No. 174. September 8, 2011.
4. Spiller, H.A. et al. Clinical experience with and analytical confirmation of "bath salts" and "legal highs" (synthetic cathinones) in the United States. Clin. Toxicol. 2011; Jul;49(6): 499-505.

詳細情報

本書に記載のデータは、代表的な結果です。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

May 22, 2012

5991-0180JAJP



Agilent Technologies