

# Agilent Captiva EMR-Lipid と LC-MS/MS による全血中の THC および代謝物の 効率的な定量分析

## 著者

Joan Stevens  
and Limian Zhao,  
Agilent Technologies, Inc.

## 概要

複雑な生体サンプルの効率的な抽出、クリーンアップ、分析は、法医学ラボにとって大きなメリットとなります。全血中のテトラヒドロカンナビノール (THC) およびその代謝物の LC-MS/MS 分析におけるマトリックス効果の主な原因は、リン脂質 (PPL) であることがわかっています。このアプリケーションノートでは、全血からの  $\Delta^9$ -THC (THC) およびその主要代謝物、11-ヒドロキシ- $\Delta^9$ -THC (THC-OH) および 11-ノル-9-カルボキシ- $\Delta^9$ -THC (THC-COOH) の抽出と LC-MS/MS 分析について説明します。ウェル内 PPT の後に、Agilent Captiva EMR-Lipid をパススルー 1 mL カートリッジで使用して PPL を除去しています。Captiva EMR-Lipid では、よりクリーンな溶離液が生成されました。具体的には、全血マトリックスから不要な PPL が 97 % 超除去され、ターゲット化合物が 92 % 超回収されました。1 ng/mL で THC、THC-OH、THC-COOH を分析すると、適度なシグナルノイズ比 (S/N) の理想的なピーク形状になりました。0.5 ~ 100 ng/mL の濃度範囲において直線性があり、 $R^2$  は 0.99 を超えました。定量下限は 1.0 ng/g 以下で、RSD は 11.5 % 未満でした。3 日間の実験において一貫性のある結果が得られました。

## はじめに

LC-MS/MS 分析の前の効率的なサンプル前処理は、法医学ラボにとって重要な検討事項です。サンプル前処理によってシステムの汚染を減らし、データインテグリティ、メソッド選択性、分析感度、信頼性を向上させることができます。全血中の主な干渉は、タンパク質とリン脂質 (PPL) の 2 つです。PPL は、LC-MS/MS バイオ分析におけるマトリックス効果の主要原因であることがわかっています。エレクトロスプレーイオン化 (ESI)<sup>1</sup> 中に形成される液滴の表面で競合するイオン化のためです。

一般的な法医学向けサンプル前処理法としては、除タンパク処理 (PPT)、固相抽出 (SPE)、液液抽出 (LLE)、および保持型液液抽出 (SLE) などがあります。各手法とも、速度、コスト、生成データの品質に関する長所と短所があります。例えば PPT、LLE、SLE では PPL が除去されず、SPE を実行するには時間と手間がかかります<sup>2</sup>。ただしこれらの手法の中では、PPT が最も幅広く使用されています。PPT を使用すると、ACN や MeOH などの有機変性溶媒を生体サンプルに所定の割合で追加することで、タンパク質を簡単かつ効率的に除去できます。タンパク質が変性すると沈殿物が形成され、ろ過や遠心分離で簡単に除去できます。ただし、PPL は有機変性溶媒に溶けるため、PPT によって除去されることはありません。

カンナビノイドは、法医学ラボで最も一般的なターゲット化合物の 1 つです。生体サンプルに含まれる  $\Delta^9$ -THC (THC) およびその主な代謝物である 11-ヒドロキシ- $\Delta^9$ -THC (THC-OH) と 11-ノル-9- $\Delta^9$ -カルボキシ-THC (THC-COOH) を迅速かつ正確に確認および定量することは、非常に重要です。ただし THC とその代謝物は、サンプル前処理中に非特異的な結合となる場合があります。

オフライン PPT、遠心分離、移送、希釈などのサンプル前処理段階を省き、効率的なウェル内 PPT や PPL 除去を実行できる全血のサンプル前処理法が理想的です。このアプリケーションノートでは、Agilent Captiva EMR-Lipid 1 mL カートリッジを使用して、成分を損失することなく、シンプルなパススルー形式で干渉 (特に PPL) を除去する方法を説明します。この結果、抽出物がクリーンになり、イオン抑制の可能性と、カラムおよび質量分析計の汚染が低減します。

ウェル内 PPT で全血から THC、THC-OH、および THC-COOH を抽出した後、Captiva EMR-Lipid カートリッジで PPL を除去しました。その後、Agilent 6490 トリプル四重極 LC/MS システムで定量分析をして、PPL 除去の範囲を評価しました。THC およびその代謝物の日間 (日数 = 3) の真度、精度、および回収率も測定しました。

血漿サンプルを分析するには、アプリケーションノート「Agilent Captiva EMR-Lipid と LC-MS/MS によるヒト血漿中の THC およびその代謝物の効率的な定量分析」を参照してください<sup>3</sup>。

## 分析方法

### 試薬

$\Delta^9$ -THC、11-ヒドロキシ- $\Delta^9$ -THC、11-ノル- $\Delta^9$ -カルボキシ-THC、 $\Delta^9$ -THC-d3、11-ヒドロキシ- $\Delta^9$ -THC-d3、および 11-ノル-9-カルボキシ- $\Delta^9$ -THC-d9 は Sigma-Aldrich (セントルイス、ミズーリ州、米国) から購入しました。LC-MS/MS グレードのギ酸アンモニウムは、Sigma-Aldrich から購入しました。すべての溶媒は LC グレード以上で、Burdick and Jackson (マスキーゴン、ミシガン州、米国) から購入しました。

### 溶液

THC およびその代謝物である THC-OH、THC-COOH のメタノール混合標準溶液を 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で作製しました。重水素化した THC-d3、THC-OH-d3、THC-COOH-d9 をメタノール標準溶液に 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で混合し、内部標準 (IS) として使用しました。

### キャリブレーション標準と品質管理サンプル

プレスパイクした品質管理 (QC) サンプルを、適切な濃度になるまで標準溶液に 7 回添加しました。全血中の濃度 1、10、および 50  $\text{ng}/\text{mL}$  に対応して、低 QC (LQC)、中 QC (MQC)、高 QC (HQC) の QC サンプルを用意しました。重水素化混合溶液 (IS) は QC レベルごとに 50  $\text{ng}/\text{mL}$  でスパイクしました。

Captiva EMR-Lipid でクリーンアップした後のブランクマトリックスを、THC とその代謝物の標準溶液で、全血中の 1、10、および 50  $\text{ng}/\text{mL}$  の濃度にポストスパイクしました。1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の IS 溶液の 5  $\mu\text{L}$  の分取量も追加しました。

マトリックス適合検量線を、標準溶液を使用して調製しました。Captiva EMR-Lipid で処理した後のブランクマトリックスを、抽出物で 0.5、1、5、10、50、および 100  $\text{ng}/\text{mL}$  の濃度に対応するようにポストスパイクしました。各キャリブレーション濃度に、1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の IS を 5  $\mu\text{L}$  追加しました。

## 機器および消耗品

表 1 に、分析に使用した機器と消耗品を示します。

表 1. サンプル前処理および分析用の機器と消耗品

項目	部品番号
<b>サンプル前処理</b>	
Agilent Captiva EMR-Lipid、1 mL カートリッジ	5190-1002
Agilent Vac Elut SPS 24 マニホールド、12 × 75 mm 試験管用 コレクションラック付き	12234041
エッペンドルフピペットとリピーターピペッタ (VWR, NJ, USA)	
<b>液体クロマトグラフィーシステム</b>	
Agilent 1290 Infinity LC システム	G4204A
Agilent 1290 Infinity シリーズサーモスタット付カラムコンパートメント	G1316C
Agilent 1290 Infinity オートサンブラ	G4226A
Agilent ZORBAX ラピッドレゾリューション High Definition (RRHD) Bonus RP 2.1 × 50 mm 1.8 μm カラム	857768-901
Agilent 1290 Infinity インラインフィルタ、0.3 μm	5067-6189
バイアルインサート 400 μL ガラス、平底、不活性処理済	5183-2086
MS 分析バイアルキット。2 mL 茶色スクリーバイアル、ラベル付、 青スクリーキャップ、PTFE/シリコンセパタム	5190-2280
<b>質量分析システム</b>	
Agilent 6490 トリプル四重極 LC/MS システム	
Agilent MassHunter ソフトウェア	

## LC-MS/MS 分析

この LC-MS/MS 分析では、Agilent 1290 Infinity LC システムと Agilent 6490 トリプル四重極質量分析システムを組み合わせ使用しました。表 2 と表 3 に、使用した LC および MS の分析条件を示します。サンプルは希釈せずにオートサンブラに配置しました。注入前に Agilent 1290 Infinity オートサンブラの希釈機能を使用しました。このとき、5 μL のサンプルの前に 10 μL の希釈 (水) を吸引しました。全量を LC システムに注入しました。オンライン希釈機能をオートサンブラバイアル内でのサンプル希釈と比較した場合の利点は、サンプルの有機性を 100 % 維持できることです。これで、ほとんどの化合物が安定します。

表 4 は、トリプル四重極のマルチプルリアクションモニタリング (MRM) の採取パラメータ (プリカーサ、定性イオンと定量イオン、コリジョンエネルギー (Collision Energy: CE)、リテンションタイムなど) を示します。Captiva EMR-Lipid による PPL の除去を評価するため、11 種類の PPL の MRM トランジションをモニタリングしました。結果は表 5 のとおりです。

表 2. LC 分析条件

パラメータ	設定値										
カラム	Agilent ZORBAX ラピッドレゾリューション High Definition (RRHD) Bonus RP 2.1 × 50 mm 1.8 μm カラム										
流量	0.5 mL/min										
カラム温度	50 °C										
オートサンブラ温度	5 °C										
注入量	5 μL										
インジェクタプログラム	「P2-F1」からデフォルトスピードで 10 μL 吸引 サンプルからデフォルトスピードで 5 μL 吸引 メソッドで指定された方法でニードルを洗浄										
移動相	A) 5 mM のギ酸アンモニウムの水溶液、0.1 % FA B) 5 mM のギ酸アンモニウムのメタノール溶液、0.1 % FA										
ニードル洗浄	ACN:MeOH:IPA:H <sub>2</sub> O、0.2 % FA (1:1:1:1)										
グラジエント	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間 (分)</th> <th>%B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.0</td> <td>65</td> </tr> <tr> <td>0.1</td> <td>65</td> </tr> <tr> <td>4.0</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>5.0</td> <td>95</td> </tr> </tbody> </table>	時間 (分)	%B	0.0	65	0.1	65	4.0	95	5.0	95
時間 (分)	%B										
0.0	65										
0.1	65										
4.0	95										
5.0	95										
ストップタイム	5.10 分										
ポストタイム	1.5 分										

表 3. MS 分析条件

パラメータ	設定値
イオン化モード	ESI
ガス温度	120 °C
ガス流量	20 L/min
ネブライザ	50 psi
シースガスヒーター	325 °C
キャピラリー電圧	3,500 V
フラグメンタ電圧	300
デルタエレクトロンマルチプライアの電圧 (EMV)	200
極性	ポジティブ

表 4. THC 化合物の MRM 採取パラメータ

化合物	プリカー サイオン	定量イオン (CE)	定性イオン (CE)	リテンションタイム (分)
THC-OH	331.23	313.2 (12)	193.1 (24)	1.70
THC-OH-d3	334.25	316.3 (12)		1.70
THC	315.23	193.2 (24)	123.0 (44)	3.05
THC-d3	318.25	196.1 (28)	28	3.04
THC-COOH	345.21	299.1 (20)	327.3 (12)	2.26
THC-COOH-d9	354.27	336.2	12	2.26

表 5. 11 種類の PPL 化合物の MRM 採取パラメータ

プリカーサイオン (m/z)	プロダクトイオン (m/z)	衝突エネルギー
808	184	30
806	184	30
786	184	30
784	184	30
760	184	30
758	184	30
704	184	30
524	184	30
522	184	30
520	184	30
496	184	30

機器コントロールとデータの定性および定量分析には、Agilent MassHunter ソフトウェアを使用しました。THC およびその代謝物の日間 (日数 = 3) の真度、精度、およびメソッドからの回収率を測定しました。

#### サンプル前処理手順

- 500  $\mu$ L の冷却した\* 15:85 MeOH:ACN を Agilent Captiva EMR-Lipid 1 mL カートリッジに追加します。
  - 100  $\mu$ L のヒト全血サンプルを追加します。
  - 使い捨てのガラスピペットでよく混合します。または、5 ~ 7 分間静置して混合させることもできます。
  - 3.5 ~ 4 psi の真空に引きます。
  - 冷却した 1:4 の H<sub>2</sub>O:ACN を 200  $\mu$ L 追加します。
  - 全量がカートリッジを通過するまで真空に引いてから、圧力を 11 ~ 13 psi に上げて残りの溶媒を引き出します。
  - 蒸発させて、100  $\mu$ L の MeOH (0.1 % FA) で再溶解します。
  - 5  $\mu$ L + 10  $\mu$ L の希釈用水を LC システムに直接注入します。
- \* 冷却した 15:85 の MeOH:ACN は -20 °C の冷凍庫に保存し、使用時には冷凍した容器に入れていました。

**注意:** 血漿サンプルを分析するには、アプリケーションノート「Agilent Captiva EMR-Lipid と LC-MS/MS によるヒト血漿中の THC およびその代謝物の効率的な定量分析」を参照してください<sup>3</sup>。

完全に除タンパク処理するには、一般的にサンプルと溶媒の比率を 1:3 ~ 1:5 にすることを推奨します。赤血球の溶血または破壊 (溶解) には、冷却した MeOH/ACN 溶媒を使用すると便利です。これで、その成分 (細胞質) が周囲の血漿に放出され、粉末状の沈殿が形成されます (図 1)。

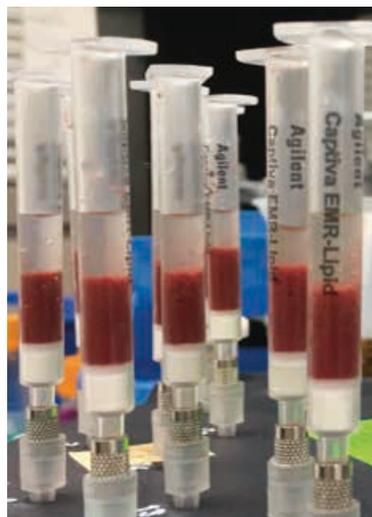


図 1. 攪拌後の全血では、真空の前に粉末状の沈殿が形成されます。

内径の大きなピペットチップ、またはその他の混合器具を使用して、ウェル内攪拌混合をすることを推奨します。真空圧によって Captiva EMR-Lipid カートリッジ内のフローが開始されます。最適な脂質除去のためには、3 ~ 5 秒ごとに 1 滴となるように流量を制御することを推奨します。カートリッジからサンプルが溶出すると、真空圧が上がり、サンプル回収率が最大限に高まります。

## 結果と考察

### 不要な脂質マトリックスの除去

EMR-Lipid は極性、中極性、非極性のターゲット化合物のマトリックス効果を減らし、分析対象物の回収率を上げるために広く使用できるシンプルな方法です。EMR-Lipid では独自の充填剤ケミストリを使用しており、水で活性化すると、EMR-Lipid の充填剤によるサイズ排除や疎水性相互作用によって、脂質が選択的にトラップされます (図 2)。脂質の枝分かれのない炭化水素鎖は充填剤に入りますが、枝分かれした成分は入りません。充填剤に入った脂質鎖は次に、疎水性相互作用によってトラップされます。PPL は細胞膜の主成分であり、全血中に豊富に含まれています。PPL はリン酸とコリンから成る親水性頭部基で構成されており、疎水性尾部は長アルキル鎖で構成されています。

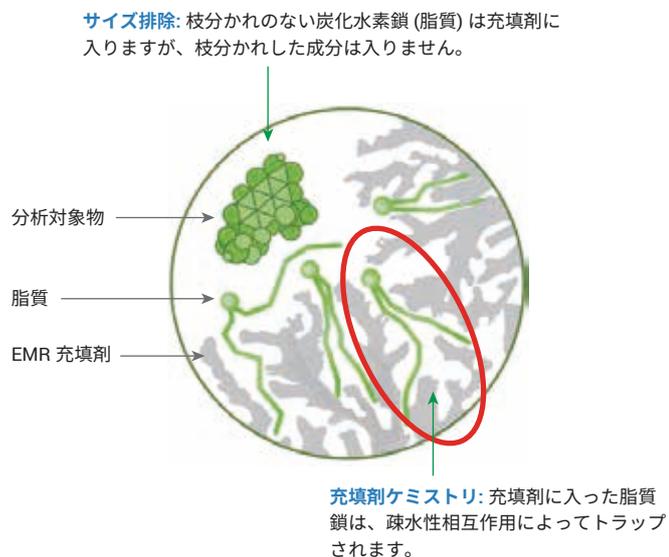


図 2. EMR-Lipid のメカニズム: サイズ排除と充填剤ケミストリ

図 3 の成分 THC、THC-OH、THC-COOH には直線の炭素鎖が含まれますが、鎖が短いため、EMR 充填剤との安定した疎水性相互作用が形成されません。また、枝分かれしたリング成分は充填剤によって保持されません。

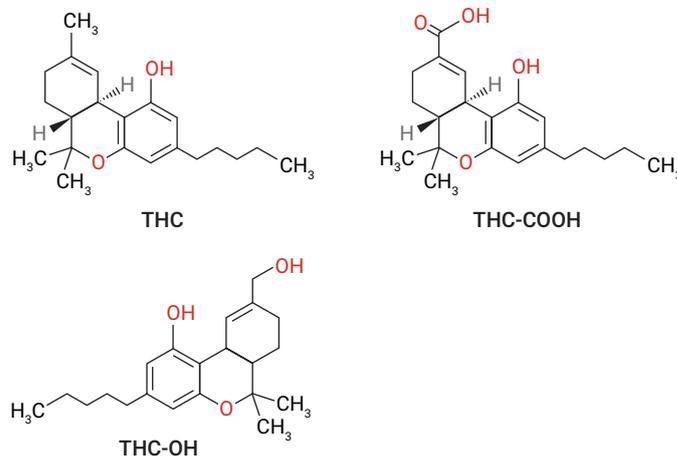


図 3. THC と代謝物の構造

EMR-Lipid 技術は 96 ウェルプレート形式または 1 mL カートリッジ形式で、高スループットを必要とするアプリケーション向けのウェル内 PPT 用に溶媒リテンションフリットが含まれています。この独自設計によって、つまりを最小限に減らすことができます。

### クロマトグラフィー性能

1 ng/mL の THC、THC-OH、THC-COOH での、プレスパイクした全血の MRM クロマトグラム (図 4) は、EMR-Lipid プロトコルで取得できるクロマトグラフィー性能を示しています。1 ng/mL の濃度であっても、マトリックス効果と干渉の減少による分離能とシグナルノイズ比 (S/N) の向上によって正確に積分され、理想的なピーク形状となっています。法医学的分析によって損傷を証明する場合、通常は 5 ng/mL までの正確な検出と定量が求められます。

### リン脂質の除去

LC-ESI-MS/MS による全血の天然アセトニトリル抽出に含まれる THC およびその他のカンナビノイドの直接分析 (PPT のみ) は、共溶出 PPL からの顕著なイオン抑制の影響を受けます。干渉の主な原因は、PPL<sup>4,5</sup> のリゾホスファチジルコリンクラスとリゾホスファチジルエタノールアミンクラスです。

Captiva EMR-Lipid による全血からの PPL 除去の効率を測定するため、11 種類の天然 PPL をモニタリングしました。特に m/z 184 でのホスファチジルコリンプロダクトイオンフラグメントを使用して、除タンパク処理および Captiva EMR-Lipid による除去後に全血抽出物に含まれる PPL をモニタリングしました。

図 5 は、抽出された全血サンプルから 97 % の PPL が除去されたことを示しています。この一部はターゲット化合物と共溶出しています<sup>6</sup>。図 5 の PPL の高いアバンドンス (黒色のトレース、冷却した MeOH:ACN、15:85 のみによる PPT) は、検出器の飽和の可能性を示しており、定量の品質に影響する可能性があります。また PPL のアバンドンスが高いと、長期的には MS システムの汚染につながる可能性があります。

### 定量性能

THC とその代謝物の検量線の直線性を評価しました。図 6 は、6 種類の濃度 (0.5 ~ 100 ng/mL、n = 5) の試験において、良好な直線性が見られたことを示しています。各曲線の平均決定係数 ( $R^2$ ) は 0.99 を超えました (全血の 0.5 ~ 100 ng/mL における直線性、直線の回帰適合、1/x の重み付け)。

感度は非常に高く、試験対象化合物の全血の定量下限 (LOQ) は 1.0 ng/g 以下でした。メソッドの LOQ は %RSD  $\leq 15$  と S/N  $\geq 10$  に基づいています。メソッド再現性は、全血に標準物質を 1、10、および 50 ng/mL の濃度でスパイクし、この操作を 7 回繰り返して測定しました。図 7 の表は、RSD が 2.4 ~ 11.5 % で、マトリックスにとって適度であったことを示しています。

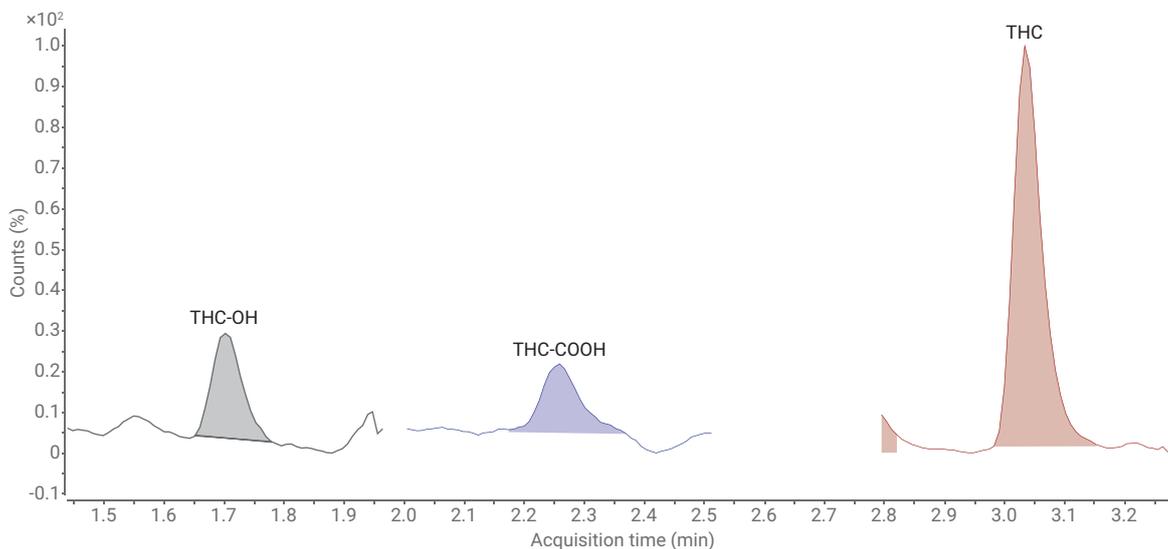


図 4. 1 ng/mL でプレスパイクした全血の MRM クロマトグラム

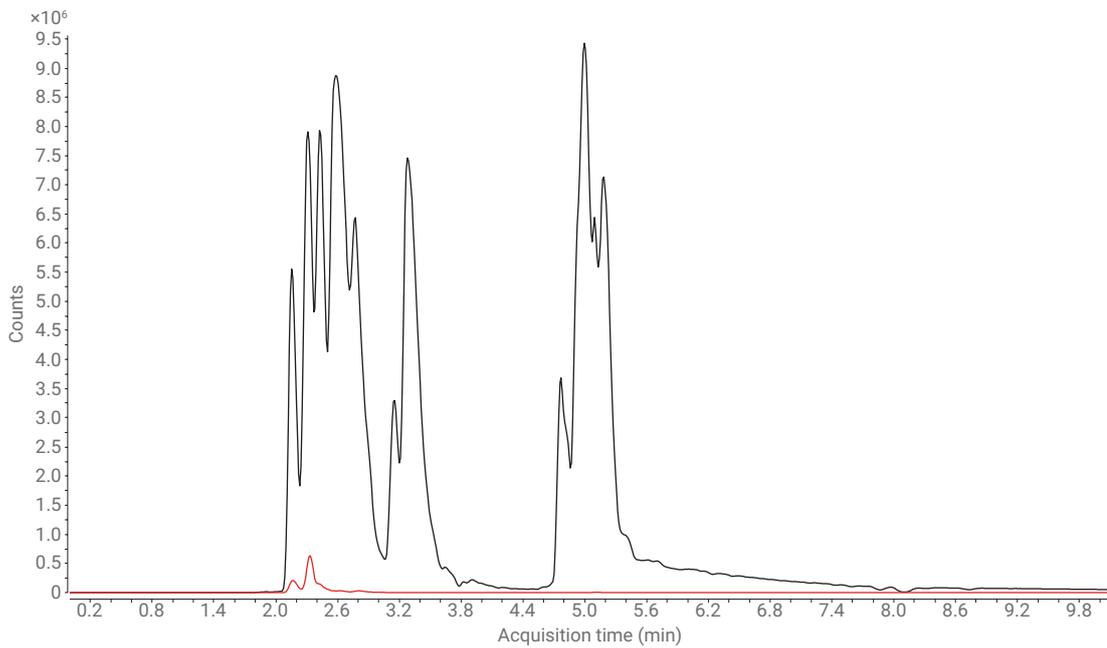


図 5. プロダクトイオン m/z 184 でモニタリングした 11 種類の PPL の MRM クロマトグラム。Agilent Captiva EMR-Lipid による除去を使用した場合が赤色、使用しない場合が黒色のトレース

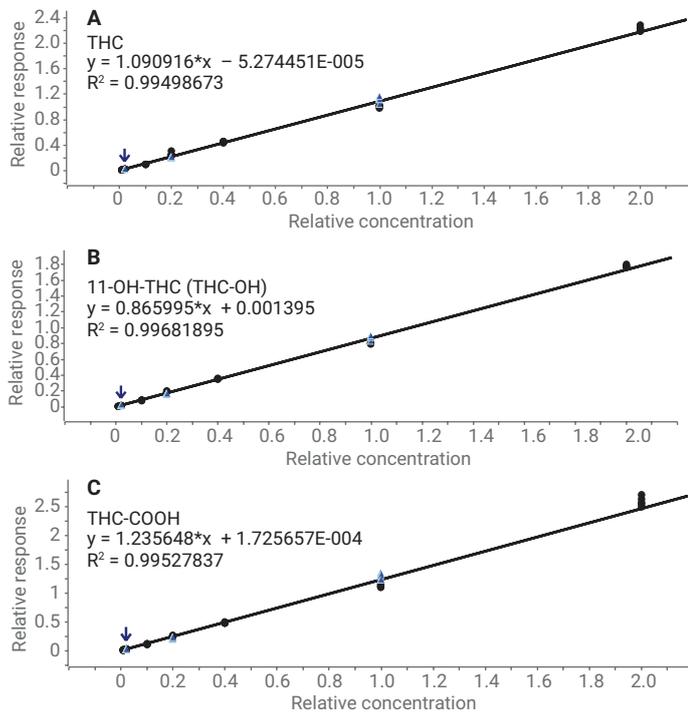
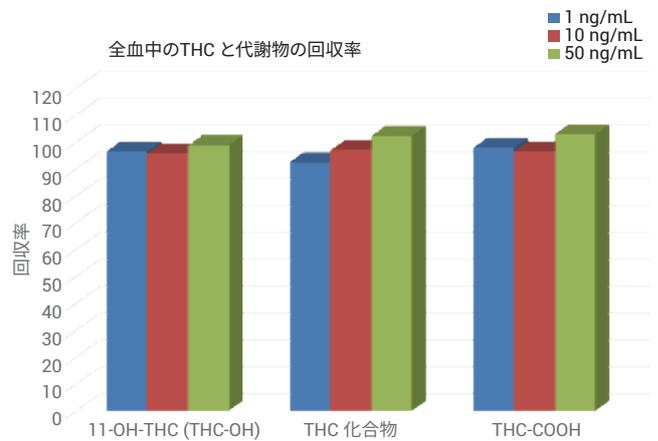


図 6. 検量線。A) THC、B) THC-OH、C) THC-COOH。  
全血中の濃度範囲 0.5 ~ 100 ng/mL、n = 5



化合物	1 ng/mL		10 ng/mL		50 ng/mL	
	回収率	%RSD	回収率	%RSD	回収率	%RSD
THC-OH	96.7	11.5	95.9	3.5	99.0	2.4
THC	92.7	6.2	97.2	2.8	102.5	3.5
THC-COOH	98.1	9.2	96.8	3.7	103.1	3.6

図 7. 全血中の THC およびその代謝物のメソッド %RSD (1 日目)

手順 3 での PPT の攪拌により、THC とその代謝物 (THC-OH および THC-COOH) の回収率は最適なレベルの 92.7 % ~ 103.1 %、RSD は 11.5 % 未満、検量線の  $R^2$  は 0.99 となりました。パッシブ PPT では回収率が 91 % ~ 105 %、RSD が 10 % 未満でしたが、検量線の  $R^2$  は 0.98 でした。Captiva EMR-Lipid 独自の PPL 除去メカニズムによって、十分な回収率を達成できました。他の手法では、PPL と THC などの疎水性化合物を区別できない場合があります (Log P、7.6)。

3 日間の分析で、日間のメソッド回収率と精度は一貫して良好であり、1、10、50 ng/mL で 93.4 ~ 109.2 %、RSD が 11.5 % 未満という結果となりました。

## 結論

このアプリケーションノートでは、THC およびその代謝物の LC-MS/MS 法医学分析用の全血サンプルを調製するためのシンプルで迅速なワークフローについて説明しました。ウェル内 PPT で全血から THC とその主要代謝物 (THC-OH と THC-COOH) を抽出した後、Agilent Captiva EMR-Lipid 1 mL カートリッジで PPL を除去しました。Captiva EMR-Lipid では、全血マトリックスから不要な PPL の 97 % を効率的に除去できました。またターゲット化合物の回収率も高いものでした。PPT のみを使用した場合よりサンプル抽出物がクリーンであるため、イオン抑制や LC-MS/MS システムの汚染およびダウンタイム発生の可能性も低下しました。ウェル内 PPT には、サンプルの処理と移送が少ないという利点があります。

THC、THC-OH、THC-COOH を 1 ng/mL で分析し、優れたピーク形状と S/N を得ることができました。1 ng/mL は、損傷の証明に必要な濃度より小さい数値です。7 種類の濃度 (0.5 ~ 100 ng/mL) における THC およびその代謝物の応答は直線性があり、 $R^2$  は 0.99 を超えました。LOQ は 1.0 ng/g 以下で、RSD は 11.5 % 未満でした。THC とその代謝物の回収率は、試験対象濃度で 92 % 以上と非常に高いものでした。3 日間分析を繰り返し、一貫性のある結果を得ることができました。

Captiva EMR-Lipid は、既存のワークフローに簡単に組み入れることができます。また、サンプル前処理用に追加の機器やガラス器具を用意する必要はありません。Captiva EMR-Lipid は、96 ウェルプレートと 1 mL カートリッジのいずれの形式でも、自動化および高スループットアプリケーションに対応しています。フリット設計のため、つまりのない、簡単かつ効率的なサンプル溶出が可能です。

## 参考文献

1. Matuszewski, B. K.; Constanzer, M. L.; Chavez-Eng, C. M. Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC-MS/MS. *Anal. Chem.* **2003**, 75(13), 3019-3030.
2. Jamey, C.; et al. Determination of Cannabinoids in Whole Blood by UPLC-MS-MS. *J. Analytical Tox.* **2008**, 32, 349-354.
3. Stevens, J.; Zhao, L. Efficient Qualitative Analysis of THC and Metabolites in Human Plasma Using Captiva EMR-Lipid by LC-MS/MS, Agilent Technologies Application Note, publication number 5991-8636, October **2017**.
4. Elian, A.; Hackett, J. Solid-Phase Extraction and Analysis of THC and Carboxy-THC from Whole Blood Using a Novel Fluorinated Solid-Phase Extraction Sorbent and Fast Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *J. Analytical Tox.* **2009**, 33, 461-468.
5. Sorensen, L.; Hasselstrom, J. Sensitive Determination of Cannabinoids in Whole Blood by LC-MS-MS After Rapid Removal of Phospholipids by Filtration. *J. Analytical Tox.* **2017**, 41, 382-391.
6. Zhao, L.; Lucas, D. Efficiency of Biological Fluid Matrix Removal Using Agilent Captiva EMR-Lipid Cleanup, Agilent Technologies Application Note, publication number 5991-8006EN, July **2017**.

ホームページ

[www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp)

カスタムコンタクトセンター

0120-477-111

[email\\_japan@agilent.com](mailto:email_japan@agilent.com)

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等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。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2017

Printed in Japan, November 6, 2017

5991-8635JAJP