

# Agilent Captiva EMR—Lipid クリーンアップ および LC/MS/MS を用いた毛髪中の カルボキシ-THC の測定

## 著者

Mariá Del Bianco Luppi  
JM BioAnalises  
Botucatu, SP, Brazil

Simone Nascimento and  
Leonardo Valentin  
Agilent Technologies, Inc.  
Barueri, SP, Brazil

## 概要

このアプリケーションノートでは、Agilent 6470A トリプル四重極 LC/MS および Agilent 6495C トリプル四重極 LC/MS の 2 つの LC/MS/MS モデルを比較評価します。また、複雑な毛髪マトリックスに有効なサンプル前処理メソッドをまとめ、毛髪中のカルボキシ-THC のカットオフ限度 0.2 ng/g を満たすために確認法として選択した、クリーンアップステップで Agilent Captiva EMR—Lipid を用いた最終的なメソッドを示します。

## はじめに

毛髪乱用薬物検査は50年以上前に導入されました。毛髪検査の利点の1つとして、生体液よりも幅広い薬物を検出できることがあげられます。また、多くの薬物は毛髪中に残りやすく、900年前のミイラの毛髪からコカインが検出された例もあります。毛髪検査は、犯罪捜査、薬物使用歴の確認、薬物を悪用した性的暴行の特定、親権訴訟での薬物使用の証明、仮釈放者の断薬や薬物治療関係者または従業員のモニタリング、子宮内曝露の証拠提示、運転免許証返還時の大麻常用者かどうかの判断などに用いられています。図1に、考えられるヒト毛髪へのカンナビノイドの取り込み経路を示します。

毛髪薬物検査は、サンプリングが容易で、汚染による劣化が起こりにくく、検出可能期間が長いことから、職場環境プログラムにも組み込まれています。多くの国では、職場の毛髪検査に関するガイドラインが提示されており、初期検査のカットオフ濃度を毛髪1mgあたりマリファナ代謝物1pgとして定めています。ブラジルにおいては、Society of Hair Testing (SoHT) が規定する限度に従い、11-ノル-9-カルボキシ- $\Delta^9$ -テトラヒドロカンナビノール (THC-COOH) の確認カットオフ限度を毛髪1mgあたり0.0002ngとしています<sup>2</sup>。そのため、毛髪中の薬物の検出および定量には、十分に高感度で特異性の高い分析手順を使用することが重要であり、これがワークフローのボトルネックにもなっています。このことは、毛髪中濃度の低いカンナビノイドに特に当てはまります。従来、検査法には免疫アッセイが広く使用されてきましたが、感度、選択性、およびコストが課題として残されています。

クロマトグラフィーは、より特異性が高く、良好な検出下限 (LOD) と定量下限 (LOQ) が得られることから、毛髪中のカンナビノイドの確認に最適な測定法です。高感度の免疫アッセイおよびガスクロマトグラフィーによる測定は、その高い特異性と低い LOD および LOQ により、毛髪中のカンナビノイドの確認に適しています。また、高感度の免疫アッセイ、電子イオン化 (EI) を用いたガスクロマトグラフィー/質量分析 (GC/MS)、ネガティブ化学イオン化 (CI) を用いた GC/MS、およびガスクロマトグラフィー/タンデム質量分析 (GC/MS/MS) メソッドでは、毛髪中のカンナビノイドに対し、SoHT で要求される濃度の1/20 から 1/100 の検出下限を達成できることが報告されています。ただし、これらのメソッドには誘導体化ステップが必要です<sup>3~10</sup>。

LC/MS/MS メソッドを使用することで得られる最も重要な利点は、誘導体化が不要なこと、またスクリーニングおよび確認検査が可能なこと。ただし、GC/MS/MS が大麻代謝物を検出下限において最大の信号として検出および定量できるのに対し、LC/MS/MS では、それほど明確な信号が得られません。これは、毛髪マトリックスが複雑であることから LC/MS/MS で最終的に生じる制約であり、その際にイオン抑制が起こっていることが認められています。この代謝物については、カットオフ濃度以下でのみこの効果が顕著になります。表1に、ターゲット成分の特性を示します。

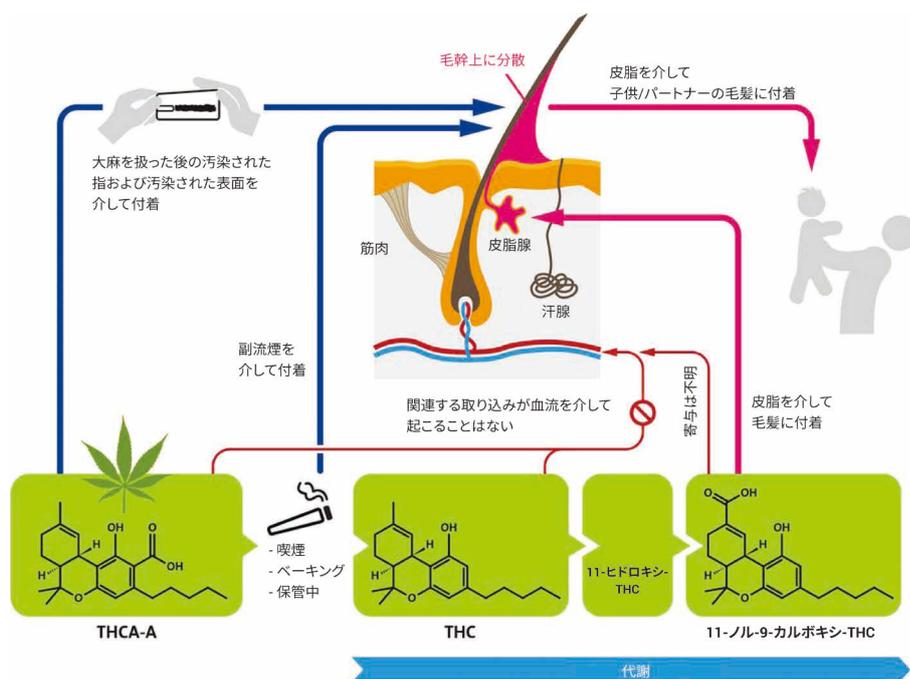


図1. 考えられるヒト毛髪へのカンナビノイドの取り込み経路<sup>1</sup>

## 実験方法

### 機器および試薬

使用した機器は次のとおりです。

- Agilent Captiva EMR—Lipid カートリッジ：3 mL、300 mg (p/n 5190-1003) (毛髪 40 mg の処理用) および 1 mL、40 mg (p/n 5190-1002) または 96 ウェルプレート (p/n 5190-1000) (毛髪 25 mg の処理用)
- Vac Elut 20 マニホールド、16 × 100 mm 試験管用コレクションラック付き (p/n 12234103)
- Agilent InfinityLab Poroshell 120 Phenyl-Hexyl、3.0 × 150 mm、1.9 μm (p/n 693675-312)、Poroshell 120 Phenyl-Hexyl、3 × 5 mm、1.9 μm、UHPLC ガード (p/n 823750-943)
- Agilent 1290 Infinity II インラインフィルタ、0.3 μm (p/n 5067-6189)

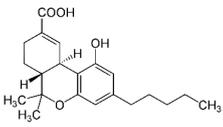
使用した試薬は次のとおりです。

- カルボキシ-THC およびカルボキシ-THC-d<sub>3</sub> 標準試薬 (それぞれ Cerilliant 社および LGC 社)
- GC グレードの *n*-ヘキサンおよび酢酸エチル (EtOAc)、LC/MS グレードのメタノール (MeOH) (J.T. Baker 社)
- ACS グレードの水酸化ナトリウム (NaOH) および酢酸 (Merck/Sigma 社)
- 超純水 (Milli-Q により製造)

### 標準および溶液の調製

- 1 M の水酸化ナトリウム (毛髪分解溶液)：** NaOH (4 g) をビーカーに計量し、水 50 mL を加えて溶解した後、溶液を 100 mL メスフラスコに移しました。ビーカーは、少量の水で 2 ~ 3 回洗浄しました。溶液を 1 分間超音波処理し、メスフ

表 1. ターゲット成分、log P、分子式、化学構造

名前	Log P	分子式	構造
カルボキシ-THC	6.21	C <sub>21</sub> H <sub>28</sub> O <sub>4</sub>	

ラスコを目盛りまで水を加えました。溶液は、プラスチック製キャップ付きのボトルで保管しました。

**注意：水酸化ナトリウムに水を加えると熱が発生します。**

- n*-ヘキサンと酢酸エチル混合液 (9 : 1 v/v) (毛髪抽出用溶媒)：** 90 mL のヘキサンと 10 mL の酢酸エチルを合わせ、十分に混合しました。
- MeOH/水 (8:2 v/v) (Captiva EMR—Lipid 用溶媒)：** 80 mL のメタノールと 20 mL の超純水を合わせ、十分に混合しました。
- 内部標準 (IS) — カルボキシ-THC-d<sub>3</sub>：** 8 ng/mL のカルボキシ-THC-d<sub>3</sub> を含む IS 溶液を MeOH で調製しました。これは、マトリックス中濃度 8 ng/g に相当します。
- 検量線作成用標準溶液 — カルボキシ-THC (CCS)：** 6 種類の濃度 (0.15、0.2、0.4、0.8、1.6、および 3.2 ng/mL) の検量線作成用標準溶液を MeOH で調製しました。
- 品質管理 (QC) 溶液 (カルボキシ-THC)：** バッチの品質管理には、0.2 ng/mL の溶液を使用しました。また、システムの適合性を評価するため、分析開始前に 0.04 ng/mL の溶液を注しました。

### サンプル前処理メソッド

水、アセトン、ジクロロメタン (DCM) を順次使用し、毛髪サンプルをボルテックスミキサーで 1 分間攪拌して洗浄しました。次に、毛髪を乾燥させ、細断しました。その後、1) 毛髪の分解とプレクリーンアップ、2) 液液抽出 (LLE)、3) Captiva EMR—Lipid によるクリーンアップ、4) LC/MS/MS への注入、の 4 段階でサンプル前処理を行いました。

#### 1. 毛髪の分解

40 mg の陰性の毛髪をヘッドスペースバイアルに計量しました。静電気による毛髪のバイアル壁面への付着を防ぐため、塩水で処理したバイアルを使用することをおすすめします。その後、ブランク毛髪サンプルに次のようにスパイクしました。

- ブランク - 40 μL の IS を加えました。
- ダブルブランク (IS なし)。
- 標準溶液 1 ~ 6 - それぞれに各濃度の検量線作成用標準溶液 40 μL と IS 溶液 40 μL をプレススパイクして、毛髪サンプル中のカルボキシ-THC の最終濃度を 0.15、0.2、0.4、0.8、1.6、および 3.2 ng/g にしました。
- QC - 40 μL の QC 溶液と 40 μL の IS 溶液をプレススパイクして、毛髪サンプル中のカルボキシ-THC の最終濃度を 0.2 ng/g にしました。
- バッチの残りの検査対象サンプルに 40 μL の IS 溶液を加えました。

スパイクした毛髪サンプルを3分間平衡化した後、2 mL の 1 M NaOH 溶液を加えました。その後、バイアルにキャップをし、100 °C で 30 分間インキュベーションしてから、室温まで冷却しました。

次に、5 mL の *n*-ヘキサン/EtOAc (9 : 1 v/v) を加えました。サンプルをボルテックスミキサーで1分間攪拌した後、明確に相分離するために、必要に応じて4,000 rpm で5分間遠心分離しました。上澄みの有機層は廃棄しました。サンプルに2 mL の酢酸を加えて混合しました。

上記の手順の代わりに、25 mg の毛髪と Captiva EMR-Lipid 1 mL カートリッジを、各溶液の体積を適宜調整して使用することもできます。図 2 および図 3 に、40 mg および 25 mg のサンプルを使用したメソッドのワークフローを示します。

## 2. 液液抽出 (LLE)

5 mL の *n*-ヘキサン/EtOAc (9 : 1 v/v) を加えました。サンプルをボルテックスミキサーで1分間攪拌して、必要に応じて遠心分離し、上澄みを別のチューブに移しました。この LLE 手順を2回以上繰り返し、そのたびに上澄みの有機層を移して合わせました。合わせた有機抽出液を 50 °C の N<sub>2</sub> 流下で乾燥させました。その後、乾燥サンプルを 1.5 mL の MeOH/水 (8 : 2 v/v) で再溶解してから、1.5 分間超音波処理し、ボルテックスミキサーで30秒間攪拌しました。

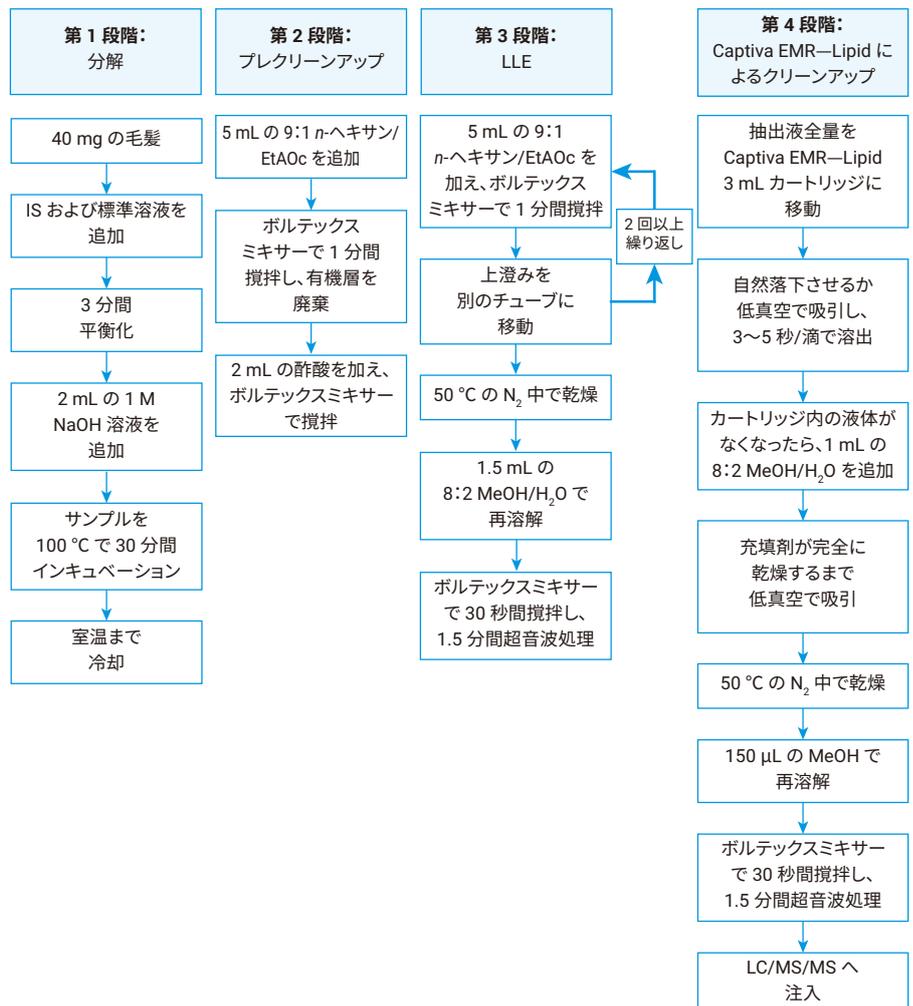


図 2. Agilent Captiva EMR-Lipid 3 mL カートリッジを使用した毛髪 40 mg のサンプル前処理ワークフロー



## 機器メソッド

サンプルの分析には、Agilent 1290 Infinity II LC と、Agilent Jet Stream iFunnel エレクトロスプレーイオンソース搭載の Agilent 6495C トリプル四重極 LC/MS を連結したシステムを使用しました。表 2 および表 3 に機器の使用条件を詳しく示します。

毎日、サンプルの分析を開始する前に、MeOH で調製した 0.04 ng/mL の QC 溶液を注入して、システム適合性試験を実施しました。

表 2. LC/MS/MS 条件

パラメータ	設定値																														
分析カラム	Agilent InfinityLab Poroshell 120 Phenyl Hexyl (3.0 × 150 mm, 1.9 μm) およびガードカラムオートサンブラにインラインフィルタを装着																														
カラム温度	50 °C																														
注入量	5 μL																														
移動相	A) 0.01 % 酢酸の水溶液 B) 0.01 % 酢酸の MeOH 溶液																														
流量	0.5 mL/min																														
グラジエント	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間 (分)</th> <th>%A</th> <th>%B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0.00</td><td>55</td><td>45</td></tr> <tr><td>0.50</td><td>55</td><td>45</td></tr> <tr><td>2.00</td><td>25</td><td>75</td></tr> <tr><td>5.00</td><td>25</td><td>75</td></tr> <tr><td>8.00</td><td>20</td><td>80</td></tr> <tr><td>9.00</td><td>20</td><td>80</td></tr> <tr><td>9.01</td><td>0</td><td>100</td></tr> <tr><td>12.00</td><td>0</td><td>100</td></tr> <tr><td>12.01</td><td>55</td><td>45</td></tr> </tbody> </table>	時間 (分)	%A	%B	0.00	55	45	0.50	55	45	2.00	25	75	5.00	25	75	8.00	20	80	9.00	20	80	9.01	0	100	12.00	0	100	12.01	55	45
時間 (分)	%A	%B																													
0.00	55	45																													
0.50	55	45																													
2.00	25	75																													
5.00	25	75																													
8.00	20	80																													
9.00	20	80																													
9.01	0	100																													
12.00	0	100																													
12.01	55	45																													
分析終了時間	12.02																														
ポストタイム	3 分																														
合計分析時間	15 分																														

表 3. データ取り込みパラメータ

Agilent 6495C MS の使用条件	
モード	MRM
ドライガス温度	300 °C
雾化器温度	450 °C
ドライガス流量	13 L/min
ネブライザ圧力	50 psi
キャピラリ電圧	4,500 V
シースガス流量	12 L/min
シースガス温度	385 °C
ノズル電圧	2,000 V
高圧 RF(+)	0
高圧 RF(-)	130
低圧 RF(+)	0
低圧 RF(-)	140
デルタ EMV(-)	800

化合物名	プリカーサイオン	プロダクトイオン	CE	CAV	極性
カルボキシ-THC	343.2	245.1	32	4	ネガティブ
	343.2	191.1	33	3	ネガティブ
カルボキシ-THC d <sub>3</sub>	346.2	302.2	20	3	ネガティブ
	346.2	194.1	20	3	ネガティブ

## 結果と考察

毛髪中のカルボキシ-THC を抽出するためのサンプル前処理メソッドとして、さまざまな手法が発表されています。これらのメソッドの多くでは、予備処理として、1) 毛髪サンプルの洗浄、2) 細断または粉碎、3) 分析用毛髪サンプル 10～50 mg の計量、の 3 つのステップを行います。その後、毛髪を酸性または塩基性溶液中でインキュベーションしてから、有機溶媒で抽出します。

今回の研究では、NaOH による塩基分解を選択しました。これにより得られた毛髪分解混合液を LLE で抽出した後、Captiva EMR-Lipid カートリッジでクリーンアップしました。この一連のメソッドにより塩、タンパク質、および脂質を効率的に除去することで、回収率を高め、イオン抑制を抑えることができます。表 4 は、毛髪サンプルの抽出とクリーンアップに用いられている一般的なサンプル前処理メソッドを比較したものです。

検量線では、4 回または 2 回の繰り返し注入により、キャリブレーション範囲 0.15～3.2 ng/g において  $R^2 > 0.99$  という良好な直線性が得られました。これを図 4 に示します。また、回収率は平均 110 % に維持され、RSD は、毛髪サンプル中濃度 0.2 ng/g の 7 個の繰り返しサンプルについては 8.8 %、毛髪サンプル中濃度 0.8 ng/g の 7 個の繰り返しサンプルについては 7.8 % でした。図 5 に示すように、カルボキシ-THC を 0.2 ng/g でスパイクした毛髪サンプルに対し、6495C トリプル四重極 LC/MS では、6470A トリプル四重極 LC/MS システムの 3 倍のレスポンスが得られました。図 6 は、両方の MRM における毛髪マトリックスブランクとカットオフ限度の 5 つの繰り返しサンプルの分析結果です。

表 4. 定量下限 (0.0002 ng/mg) の毛髪マトリックス中カルボキシ-THC に対する各サンプル前処理メソッドの比較

サンプル前処理メソッド	特長	欠点
LLE	<ul style="list-style-type: none"> <li>分解ステップで得られた溶液から塩およびタンパク質を除去</li> <li>適用が容易</li> <li>幅広い化合物を抽出</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>ターゲット成分と共溶出した脂質により、機器での分析時に問題が生じる</li> <li>メソッドの堅牢性に欠け、高いイオン抑制効果が生じる</li> </ul>
SPE-アニオン交換と LLE、または SPE-アニオン交換のみ	<ul style="list-style-type: none"> <li>分解ステップで得られた溶液から塩およびタンパク質を除去</li> <li>注入する最終的な抽出液が LLE よりクリーン</li> <li>成分の回収率が高い</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>LLE よりクリーンな抽出液が得られるが、高いイオン抑制効果が生じる</li> <li>抽出およびクリーンアッププロトコルのステップ数が多い</li> </ul>
SPE-カチオン交換と LLE、または SPE-カチオン交換のみ	<ul style="list-style-type: none"> <li>分解ステップで得られた溶液から塩およびタンパク質を除去</li> <li>注入する最終的な抽出液が LLE よりクリーン</li> <li>イオン抑制効果を低減</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>LLE およびアニオン交換よりクリーンな抽出液が得られるが、成分の回収率が低下</li> <li>抽出およびクリーンアッププロトコルのステップ数が多い</li> </ul>
LLE と Agilent Captiva EMR-Lipid	<ul style="list-style-type: none"> <li>分解ステップで得られた溶液から塩、タンパク質、脂質を除去</li> <li>注入する最終的な抽出液が LLE よりクリーン</li> <li>イオン抑制効果を低減</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>抽出およびクリーンアッププロトコルのステップ数が多い</li> </ul>

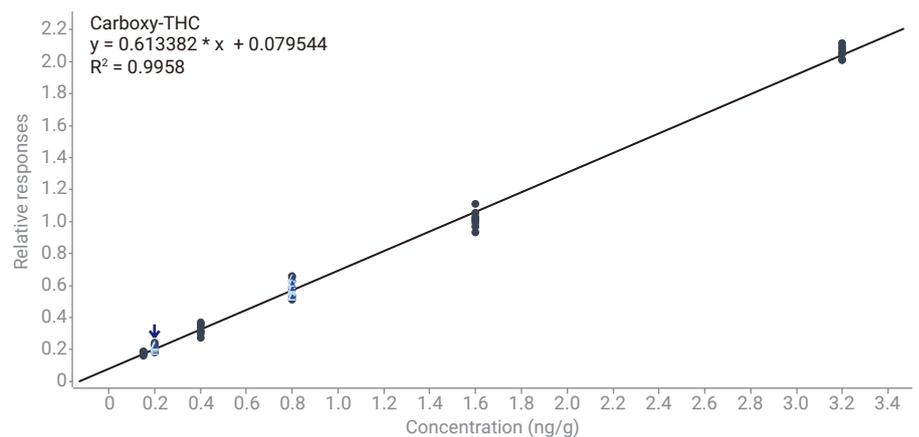
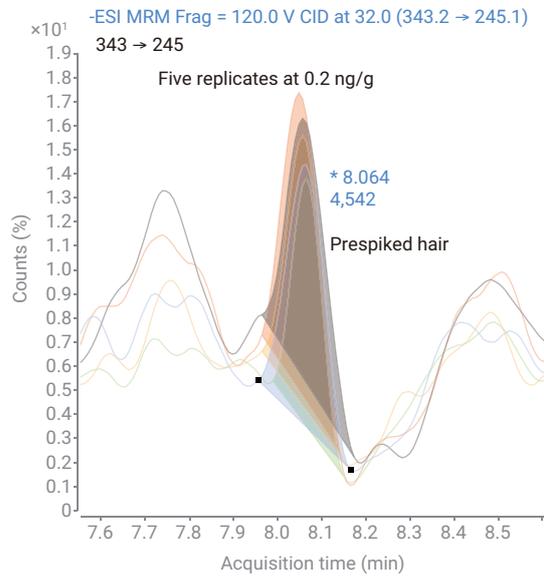
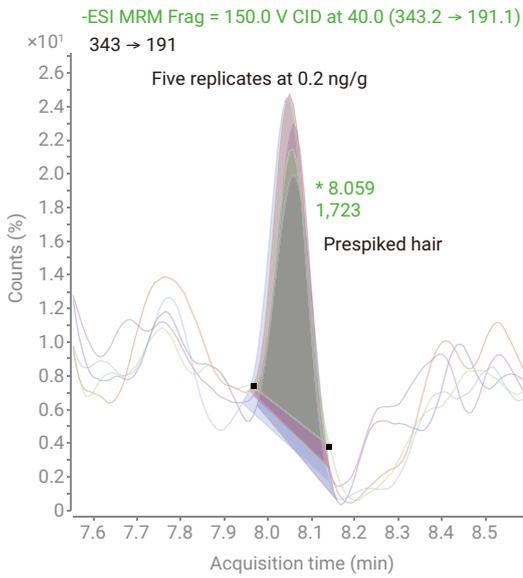


図 4. 毛髪サンプル中の 0.15～3.2 ng/g のカルボキシ-THC の検量線。青の三角形は、毛髪サンプル中濃度がカットオフ限度 0.2 および 0.8 ng/g の 7 個の繰り返し抽出液の分析結果を示します。

Agilent 6470A



Agilent 6495C

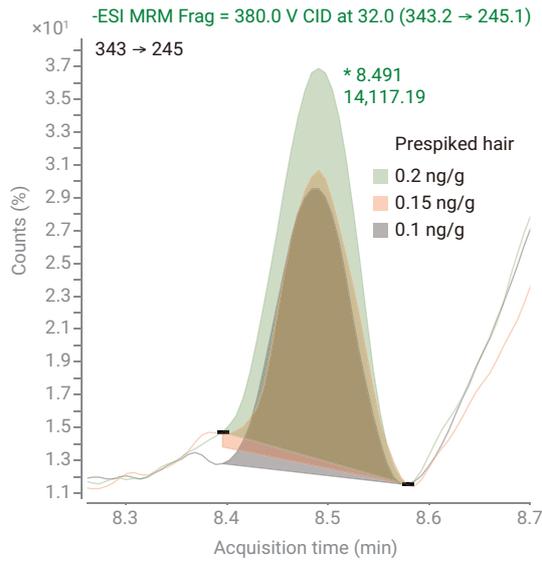
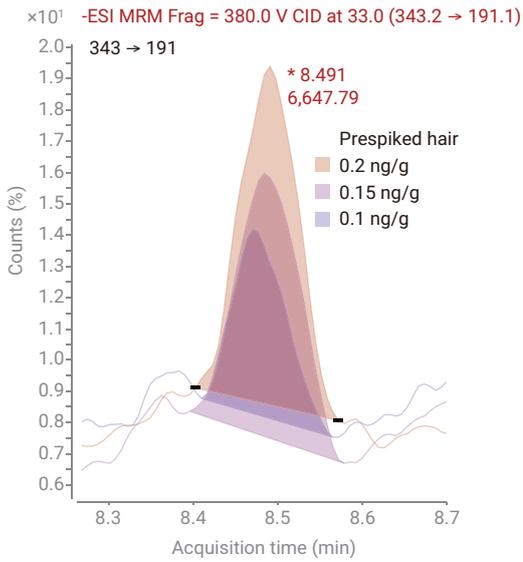


図 5. Agilent 6470A および 6495C トリプル四重極 LC/MS による 0.2 ng/g の毛髪サンプル中カルボキシ-THC の分析結果

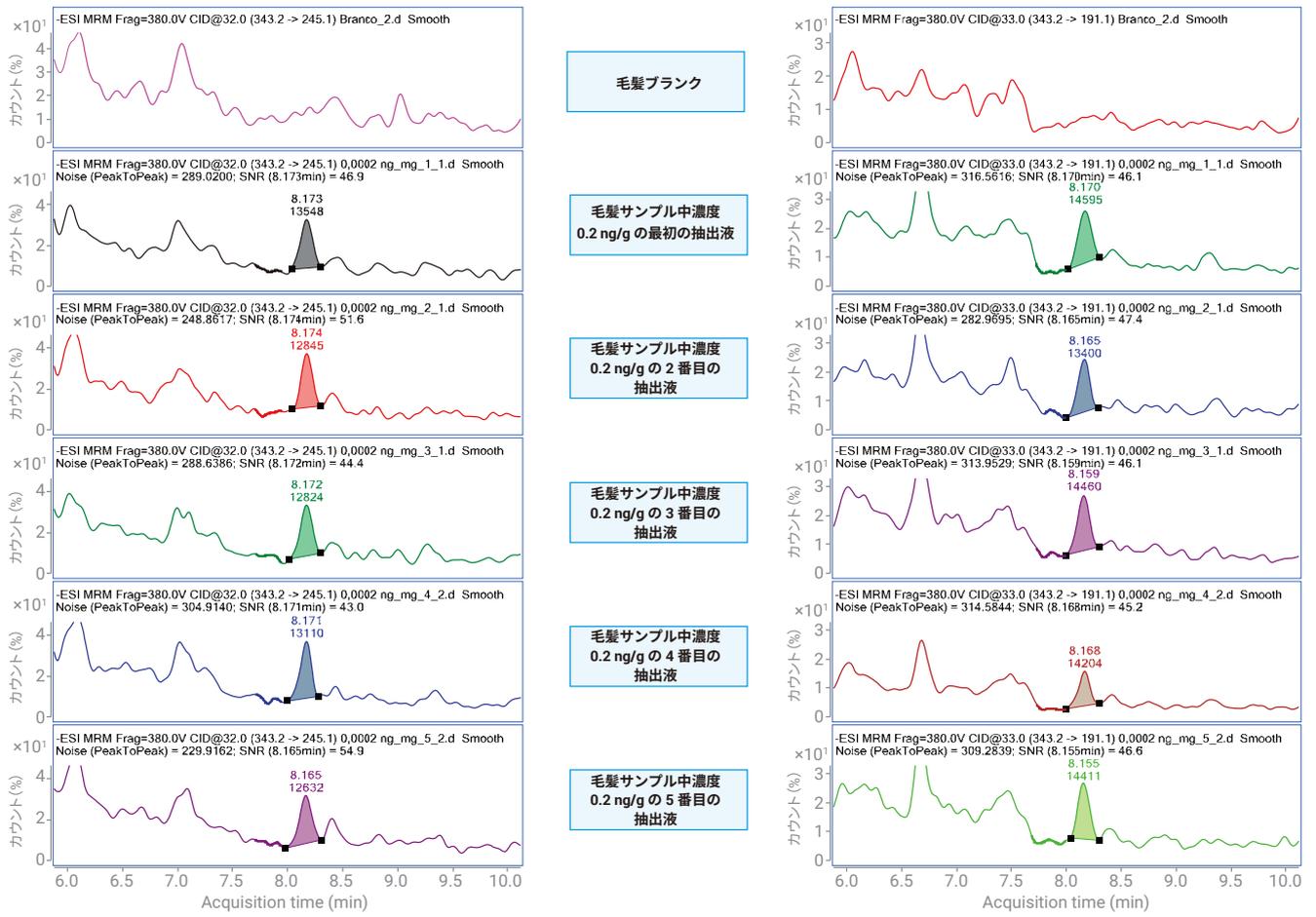


図 6. 毛髪ブランクと 0.2 ng/g の 5 つのプレスパイク毛髪サンプルを MRM 343.2 & 245.1 および 343.2 & 191.1 で分析した結果

## 結論

LLE と Agilent Captiva EMR—Lipid によるクリーンアップを用いた堅牢なサンプル前処理メソッドを開発し、LC/MS/MS を使用して毛髪中のカルボキシ-THC の分析性能を確認しました。また、毛髪マトリックスサンプルを Agilent 6495C トリプル四重極 LC/MS システムと Agilent 6470A トリプル四重極 LC/MS システムで分析して感度を比較したところ、6495C の方が 6470A より高感度であることがわかりました。このメソッドにより、メソッドの堅牢性と感度が高まることが確認されました。新たに開発したメソッドを使用したルーチン分析では、すでに数百のサンプルが評価されています。

## 参考文献

1. Bjoern, M.; Nadine, R.; Auwarter, A. Finding Cannabinoids in Hair Does Not Prove Cannabis Consumption. *Sci.Rep.* **2015**, 14906.
2. SoHT (Society of Hair Testing) 公式ウェブサイト：<https://www.soht.org/statements/9-nicht-kategorisiert/85-statement-2011>.
3. Baumgartner, W. A.; Hill, V. A.; Bland, W. H. Hair Analysis for Drugs of Abuse. *J. Forensic Sci.* **1989**, 34(6), 1433–1453.
4. Cirimele, V.; Kintz, P.; Mangin, P. Testing Human Hair for Cannabis. *Forensic Sci.Int.* **1995**, 70(1–3), 175–182.
5. Wilkins, D. et al. Quantitative Analysis of THC, 11-OH-THC, and THCCOOH in Human Hair by Negative Ion Chemical Ionization Mass Spectrometry. *J. Anal. Toxicol.* **1995**, 19(6), 483–491.
6. Moore, C.; Guzaldo, F.; Donahue, T. The Determination of 11-Nor-Delta(9)-Tetrahydrocannabinol-9-Carboxylic Acid (THC-COOH) in Hair Using Negative Ion Gas Chromatography-Mass Spectrometry and High-Volume Injection. *J. Anal. Toxicol.* **2001**, 25(7), 555–558.
7. Baptista, M. J.; et al. Hair Analysis for Delta(9)-THC, Delta(9)-THC-COOH, CBN and CBD, by GC/MS-EI. Comparison with GC/MS-NCI for Delta(9)-THC-COOH, *Forensic Sci. Int.* **2002**, 128(1-2), 66–78.
8. Mieczkowski, T. Assessing the Potential of a “Color Effect” for Hair Analysis of 11-Nor-9-carboxydelta(9)-tetrahydrocannabinol: Analysis of a Large Sample of Hair Specimens. *Life Sci.* **2003**, 74(4), 463–469.
9. Uhl, M.; Sachs, H. Cannabinoids in Hair: Strategy to Prove Marijuana/Hashish Consumption, *Forensic Sci. Int.* **2004**, 145(2-3), 143–147.
10. Engelhart, D. et al. Rapid, Robust, and Sensitive Detection of 11-Nor-Delta(9)-Tetrahydrocannabinol-9-Carboxylic Acid in Hair. *Agilent Technologies application note*, publication number 5990-7535EN, **2014**.
11. Stevens, J.; Zhao, L. Efficient Quantitative Analysis of THC and Metabolites in Human Plasma using Agilent Captiva EMR—Lipid and LC/MS/MS. *Agilent Technologies application note*, publication number 5991-8636EN, **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

**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. 2019

Printed in Japan, December 16, 2019

5994-1635JAJP

DE. 1844212963