

不活性化 (inert) イオン源 GC/MS を用いた 口腔液中カンナビノイド類の分析 アプリケーション

法医学

著者

Christine Moore, Sumandeep Rana, and Cynthia Coulter
Immunoanalysis Corporation
829 Towne Center Drive
Pomona, CA 91767
USA

要約

口腔液は、法医学や臨床分野の多くで用いられている尿の代替分析手段として認められつつあります。一般的に、口腔液中の薬物濃度は尿中濃度よりも低く、そのため感度の高い抽出と分析手法が必要となります。テトラヒドロカンナビノール (THC) はマリファナの活性成分で、米国で最も幅広く使用されている違法向精神麻薬です。一般的に煙として摂取するため、植物性の素材の構成成分だけでなく、活性成分も薬物検査の目的で捕集された口腔液試料中に存在することがあります。不活性化 (inert) イオン源を装着した Agilent 5975 GC/MSD を使用した、ヒトの口腔液試料中の熱分解前駆体 Δ^9 -テトラヒドロカンナビノール酸 A (THCA-A、2-カルボキシ-THC)、テトラヒドロキシカンナビノール (THC)、カンナビノール (CBN)、カンナビジオール (CBD) などを一斉分析するための分析手法を説明します。このメソッドにより、マリファナ常習喫煙者から採取された口腔液試料中のテトラヒドロキシカンナビノール (THC)、カンナビノール (CBN)、カンナビジオール (CBD)、熱分解前駆体 2-カルボキシ-THC を測定するために必要な感度を得ることができました。従来これらの薬物はその他の様々なマトリックスを用いて検出してきましたが、増加傾向にある薬物分析への唾液の利用による研究室での分析手順の開発および迅速な分析が必要になります。

緒言

テトラヒドロカンナビノール (THC) はマリファナの活性成分で、米国で最も幅広く使用されている違法薬物です。一般的に喫煙を通して摂取され、陶酔感や幻覚を引き起こします。THC はマリファナの主要精神活性成分で、効果の一部が少なくとももう 1 つの植物成分であるカンナビジオール (CBD) と組み合わさっている可能性があることが報告されてきました。血漿、血液、尿など中のさまざまな種類のカンナビノイド類は以前から分析されてきましたが、汗、口腔液、毛髪などのさらに難解なマトリックス中の分析は最近になって取り扱われるようになってきました。

口腔液は、道端や職場内検査での薬物検出用試料として一般的になりつつあります。いくつかの文献で、さまざまな捕集装置を使用して唾液中の THC が検出できることが報告されてきました。マリファナ植物構成物質中のカンナビノール (CBN) やカンナビジオール (CBD) などその他のカンナビノイド類の存在に関して、口腔液サンプル中での捕集手法については以前には報告されてきませんでした。しかし、口腔液サンプル中のスクリーニング分析や確認分析のために重要です。さらに、 Δ^9 -テトラヒドロキシカンナビノール酸 A (THCA-A、2-カルボキシ-THC) はテトラヒドロキシカンナビノールの主要熱分解前駆体です。喫煙中の 2-カルボキシ-THC の活性 THC への脱炭酸では、前駆体の約 70% が活性状態に変換されるため、口腔液試料中の 2-カルボキシ-THC の潜在的な存在が検討されました。一般的に血液や尿はこれらのテストプロフィールにより使用されていますが、口腔液は捕集のしやすさ、マトリックスが混合物であることの難しさ、分析技術の感度向上のため、代替マトリックスとして一般的になりつつあります。口腔液中の薬物定量に関する主な問題の 1 つは捕集を行う際の試料量における難しさです。現在利用可能な捕集装置の多くは捕集される口腔液量が明記されていません。従って定量結果を求めることは、研究室でさらに分析



Agilent Technologies

する必要があるのであれば、意味がなくなってしまいます。さらに、唾液捕集のためのパッドまたは器具を組み込んだ装置は、分析前にパッドから回収される量を必ずしも指示しているとは限りません。この場合も同様に定量結果は正確性を欠くことになります。定量される薬物濃度は使用される捕集手順に依存します。

本検討では、一定量の口腔液を捕集するのに優れた Immunalysis Corporation の QUANTISAL 口腔液捕集装置を採用しました。定量値の信頼性を高めるために、捕集パッドから運搬緩衝液への薬物の回収率を測定しました。抽出物は、0.5 ng/mL の検出限界を持つ標準のシングル四重極 Agilent 6890-5975 GC/MSD 装置を使用して分析しました。

実験

口腔液捕集装置

口腔液試料の捕集用 QUANTISAL 装置は Immunalysis Corporation (カルフォルニア州ポモナ) から入手しました。この装置には、口腔液が 1 mL (±10%) 捕集されると青色に変色する適正容量インジケータ付きの捕集パッドが付いています。次に、パッドを運搬緩衝液 (3 mL) の中に入れ、全試料量が 4 mL (緩衝液 3 mL + 口腔液 1 mL) となるようにし、次の分析に供します。これは、試料が 1 つ以上の薬物で陽性になった場合でも、そして分析に利用できる試料量に問題がある場合にも特に有利となります。Quantisal 捕集装置を使用した場合、口腔液濃度は 1:3 に希釈されるので、測定された薬物濃度はそれに応じて換算しました。4 mL の試料が分析に利用可能なため、全試料の 1 mL だけを用いて分析を行うのに、シングル四重極 Agilent 6890-5975 GC/MSD 装置は十分に満足できる感度を持っています。しかし、より少量の口腔液試料を捕集する別の捕集装置を使用する場合、必要な感度を満たすためには、マイクロ流体 Deans スイッチ 技術システムを使用する必要があることに注意してください。

標準試料と試薬

- 内部標準用のトリ重水素ラベル化 THC の他、ラベル化なし THC、CBN、CBD も Cerilliant (テキサス州ラウンドロック) から購入しました。2-カルボキシ-THC は Lipomed (マサチューセッツ州ケンブリッジ) から購入しました。
- 微量 N 315 固相抽出カラムは SPEWare (カルフォルニア州サンペドロ) から購入しました。
- 誘導体化試薬、N,O-ビス (トリメチルシリル)トリフルオロアセトアミド + 1% トリメチルクロロシラン (BSTFA + 1% TMCS) は Pierce (イリノイ州ロックフォード) から購入しました。

内部標準の濃度

THC 40 ng/mL

クロマトグラフ分析のためのサンプル前処理

- Quantisal 試料 1 mL (口腔液 0.25 mL に相当)
- 内部標準 (40 ng/mL) の添加
- 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.5、1 mL) 0.1 M の添加
- SPE カラムのコンディショニング: メタノール (0.5 mL)、酢酸 (0.1 mL) 0.1 M
- サンプルの添加
- カラムの洗浄:
 - 脱イオン水/0.1 M 酢酸 (80:20、1 mL)
 - 脱イオン水:メタノール (40:60、1 mL)
- 窒素気流下でのカラムの乾燥 (30 psi、2 分)。
- 溶出: ヘキサン/氷酢酸 (98:2、0.8 mL)
- 窒素気流下で蒸発乾燥

GC/MS 条件

装置:	Agilent 6890 GC 5975 MSD、不活性化イオン源、220/240V オープン
検出モード:	電子衝撃イオン化法 (EI)
カラム:	DB-5 MS、内径 0.25 mm、膜厚 0.25 μm 、長さ 15 m
インジェクタ温度:	250 $^{\circ}\text{C}$
ページ流量:	50 mL/min 1 分間
キャリアガス:	ヘリウム
注入モード:	スプリットレス
注入量:	2 μL
測定モード:	1.5 mL/min コンスタントフローモード
トランスファライン温度:	280 $^{\circ}\text{C}$
四重極温度:	150 $^{\circ}\text{C}$
イオン源温度:	230 $^{\circ}\text{C}$
デュエルタイム:	50 ms
オープンプログラム:	125 $^{\circ}\text{C}$ (0.5 分) \rightarrow 40 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ \rightarrow 250 $^{\circ}\text{C}$ (1.3 分) \rightarrow 70 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ \rightarrow 300 $^{\circ}\text{C}$
リテンションタイム:	重水素化 THC: 4.27 分、THC 4.28 分、カンナビジオール 3.88 分、カンナビノール 4.61 分、2-c-THC 5.66 分

モニターイオン

薬物	モニターイオン
THC	重水素化 (d3) 374.3 、389.3、 標識なし THC 371.2 、386.2、303.1
CBN	367.3 、382.2、310.1
CBD	390.1 、301.2
2-カルボキシ-THC	487.3 、488.2、489.2

ターゲットイオン (定量イオン) は太字

分析対象化合物	LOQ (ng/mL)	一次方程式	相関係数 r^2	イオン比範囲 (%)
THC	0.5	$y = 0.0266x + 0.00273$	0.998	386/371:69.7-104.5 303/371:44.0-66.0
CBN	0.5	$y = 0.138x + 0.0022$	0.999	382/367:7.4-11.2 310/367:5.7-8.5
CBD	1	$y = 0.0271x + 0.00178$	0.998	301/390:17.1-25.7
2-カルボキシ-THC	1	$y = 0.0571x + 0.0195$	0.998	488/487:31.7-47.5 489/487:11.0-16.6

誘導体化

酢酸エチル (30 μL) に再溶解、BSTFA + 1% TMCS (20 μL) の添加、オートサンプリングバイアルに移送、キャップを付け、誘導体化(60 $^{\circ}\text{C}/15$ 分)。

結果と考察

口腔液分析に関する問題の 1 つとして、装置が使用可能できるとしても、捕集パッドからの薬物回収率を考慮する必要があります。これらの薬物に対する捕集システムの抽出回収率を測定しました。4 ng/mL の濃度のすべてのカンナビノイド類を添加した 6 種類の合成口腔液を合成サンプルとして供しました。捕集装置のステムに組み込まれた青色適正捕集量インジェクターの変色を確認することで、1 mL 捕集されるまで、捕集パッドをサンプルの中に入れました。次にパッドを Quantisal 緩衝液に移し、キャップをし、研究室への輸送のシミュレートを検討するため、一晩放置しました。翌日、血清分離器でパッドを取り除き、試料の一定量を上記前処理の説明のように分析しました。パッドから回収した濃度と、パッドなしに薬物を緩衝液に加え、室温で一晩放置し、抽出、分析した絶対濃度 (100%) とを比較しました。

	THC	CBD	CBN	2-カルボキシ-THC
平均薬物	89.2 \pm 9.0	71.9 \pm 19.1	79.7 \pm 7.8	78.2 \pm 11.8
回収率 (%)				

GC/MS メソッドバリデーション

標準プロトコルに従って、定量限界、直線性範囲、相関係数、日内と日間の精度を 4 日間にわたり複数の複製試料 ($n = 6$) を通して測定することにより、分析メソッドをバリデーションしました。

濃度	THC CV (%)		CBN CV (%)		CBD CV (%)		2-c-THC CV (%)	
	日内	日間	日内	日間	日内	日間	日内	日間
1 ng/mL	0	4.8	5.26	15.3	7.07	6.08	5.73	15.2
2 ng/mL	0	2.53	2.21	2.41	2.82	3.12	10.3	8.3
4 ng/mL	1.39	1.46	5.96	4.20	4.08	4.52	7.03	8.5
8 ng/mL	0.68	1.77	4.66	5.58	1.66	6.84	2.99	2.25

精度: 口腔液中の大麻ノイドを測定に関して日内 (n = 4) および日間 (n = 6) の精度を求めました。

選択性: 一般的に存在の確認ができた薬物は高濃度で抽出、分析され、分析の妨害をしないことが分かりました。

実試料

このメソッドは実際の大麻摂取者から採取した試料に適用されました。被験者はサンプル捕集に快く同意した 46 歳の男性で、20 年を超える大麻喫煙者でした。本研究目的のため、被験者は喫煙前の 5 日間は大麻を吸わずにいました。喫煙前の試料は 4 種類の大麻ノイドに対して陰性でした。サンプルは被験者が喫煙 (5 分間) した後、直ちに捕集され、次に喫煙 30 分後、および 1、2、12、24、36、48 時間後の間隔で捕集されました。THC は 5 分と 30 分のサンプルで 2000 ng/mL を優に超える濃度で検出できました。これはおそ

らく THC による過剰な口腔汚染によるものと考えられます。24 時間のサンプルで親薬物が検出され、吸引後 16 時間までのサンプルでは 2-カルボキシ-THC が同定されました。喫煙後 5 分と 30 分の試料にだけ大麻ビジオールが検出され、濃度は 5 ng/mL でした。大麻ビジオールは 2 時間後のサンプルでだけ測定できました (図 1)。

喫煙 1 時間後に捕集されたサンプルの抽出イオンクロマトグラムを図 2 に示します。試料中に CBD が存在しなかったため、大麻ビジオールの抽出イオンは含んでいません。

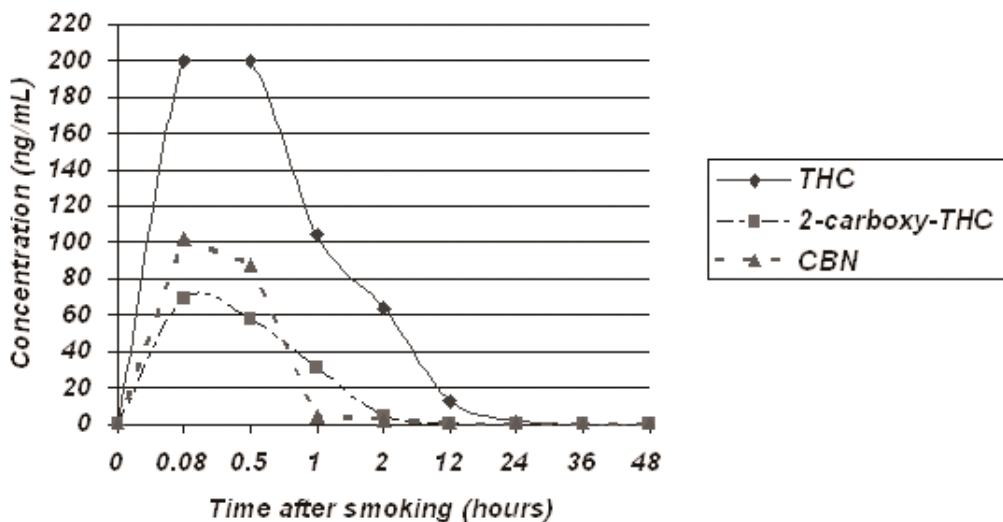


図 1. マリファナ喫煙後の口腔液中の大麻ノイド

結論

検討した分析方法は、Quantisal 口腔液捕集装置と Agilent シングル四重極 GC/MSD とを使用した口腔液中の THC、CBN、2-カルボキシ-THC のルーチンにおける検出および確認に適しています。

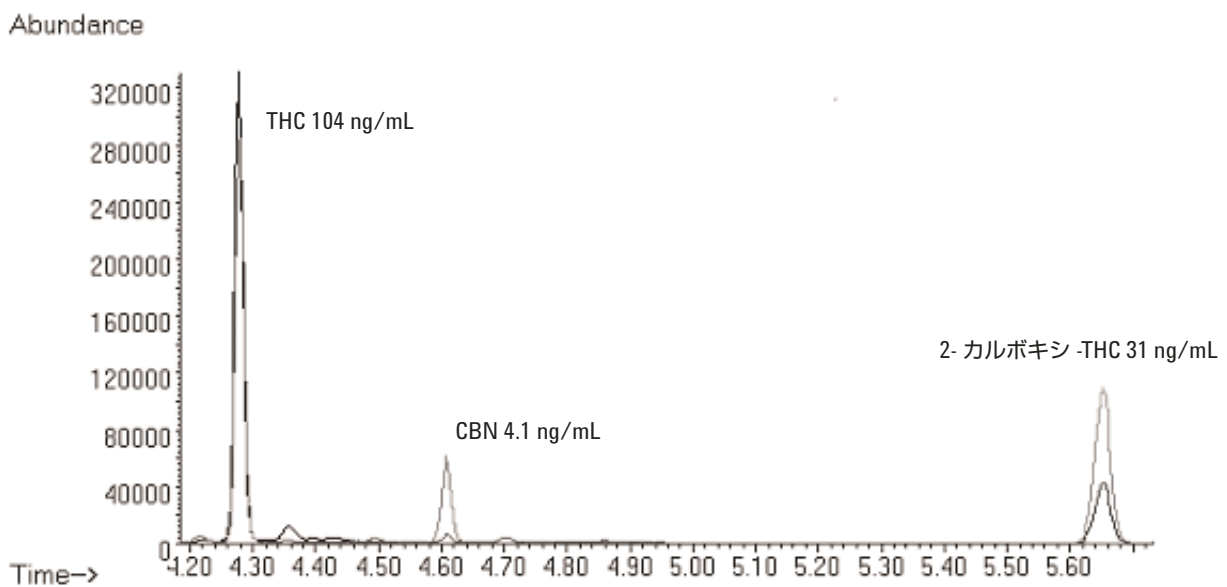


図 2. マリファナ喫煙 1 時間後に捕集された口腔液試料

詳細情報

弊社製品とサービスについて更に詳しい情報をご希望のお客様は弊社 Web サイト (www.agilent.com/chem/jp) をご覧ください。

Agilent は、万一この資料に誤りが発見されたとしても、また、本資料の使用により付随的または間接的に損害が発生する事態が発生したとしても一切免責とさせていただきます。

本資料に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更することがあります

© Agilent Technologies, Inc. 2006

Printed in Japan
December 5, 2006
5989-5860JAJP