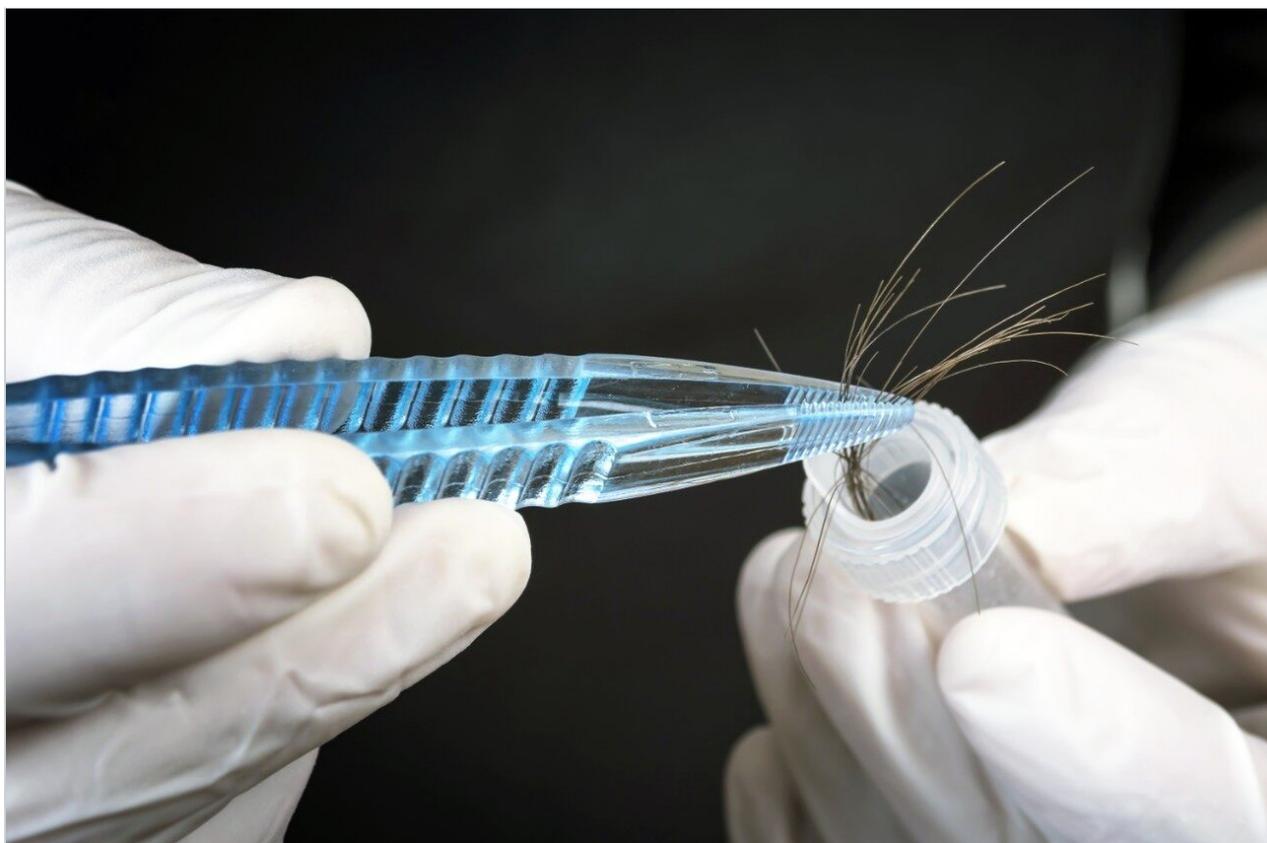


アプリケーションノート

毛髪試験協会（Society of Hair Testing、SoHT）ガイドラインに準拠した薬物測定の完全なワークフロー

Robert Lee, Massimo Gottardi, Andrea Gardumi, Simone Donzelli, Michelle Wood

日本ウォーターズ株式会社, Comedical



法中毒学のみで使用してください。

本書はアプリケーションブリーフであり、詳細な実験方法のセクションは含まれていません。

要約

過去 10 年間にわたり、法中毒学の生体マトリックスとしての毛髪の使用の人気の高まっており、ラボでは、毛髪試験協会 (SoHT) や欧州職場薬物試験協会 (EWDTs) などの団体の推奨事項に従って、薬物パネルの試験が行われています^{1,2}。これらのガイドラインを満たして毛髪中の乱用薬物のそのようなパネルを定量することができるようにする、頑健なサンプル前処理ワークフローと高感度の UPLC-MS/MS 分析法が開発されています。このワークフローにより、アヘン類、アンフェタミン類、コカイン、ケタミン、ブプレノルフィン、ベンゾジアゼピン類、およびそれらの代謝物、ならびにテトラヒドロカンナビノール (THC) とその代謝物であるカルボキシ-THC (cTHC) などの複数のクラスの薬物を、1 本の毛髪サンプルから測定できます。市販の抽出バッファー中でインキュベーションした後、OASIS PRiME MCX 96 ウェルプレートを使用した単一の固相抽出 (SPE) メソッドを用いて、分析種を残留毛髪マトリックスから分離しました。ACQUITY UPLC I-Class システム/Xevo TQ-S micro システムを用いた 2 つの LC-MS/MS 分析法が開発されました。1 つは 29 種の「塩基性薬物」、もう 1 つは THC、カンナビジオール、カンナビノールを定量するためです。THC の存在を確認するためにカルボキシ-THC を測定するには、残留インキュベーション混合物を使用する別のサンプル前処理法と、新しい LC-MS/MS 分析法が必要です³。このワークフローにより、すべての分析種をこの 2 つの団体が推奨する確認カットオフ値より低い濃度で、1 サンプルあたり 10 分未満で定量することができ、多数のサンプルを短時間で分析できます。

アプリケーションのメリット

- OASIS PRiME MCX 30 mg 96 ウェルプレートを使用した単一サンプル前処理プロトコル
- ACQUITY UPLC I-Class システムと ACQUITY UPLC BEH C₁₈ カラムによる複数の薬物クラスの分離
- Xevo TQ-S micro 質量分析計の優れた感度により、分析種の定量が低濃度で可能

はじめに

以前に、法中毒学試験の生物学的マトリックスとしての毛髪の利点について説明し、大麻の能動的な使用を明確に証明するために使用できる、THC の代謝物であるカルボキシ-THC のための、高感度な分析法について説明しました³。この手順では 20 mg の毛髪を使用し、M3 試薬を使用して毛髪マトリックスから薬物が抽出され、続いて OASIS PRiME HLB を使用してサンプルをクリーンアップし、ACQUITY UPLC I-Class システム/Xevo TQ-S micro 質量分析計を用いた LC-MS/MS 分析法で分析しました。

ただし、通常の業務では、cTHC は日常的に分析する必要がある薬物の大きなパネルに含まれ、SoHT や EWDTs などの学会が推奨するガイドラインに含まれている、唯一の化合物です (表 1 を参照)。このより大きなパネルには、アヘン類、アンフェタミン類、コカイン、ケタミン、ブプレノルフィン、ベンゾジアゼピン類、およびそれらの代謝物、ならびにテトラヒドロカンナビノール (THC) も含まれています。推奨カットオフ値は薬物クラスそれ

それで異なり、一部の分析種では非常に低くなっています。その結果、一部のラボでは、このパネル内のすべての分析種を確実に対象範囲に含めるために、いくつかの異なる手順を適用しています。実際に、これにはさまざまな薬物クラスに対して適切な感度を確保するために、さまざまな抽出手順、個別のサンプルクリーンアッププロトコル、さらには異なる分析法を、同じ試料に続けて適用することがあります。複数のプロトコルを適用する不便さに加えて、これにより必要なサンプルの量が増加し、利用可能な毛髪の量は通常限られているため問題を生じる場合があります。そこで、より合理化されたアプローチが必要です。好ましくは、ラボの効率を向上させることができ、これらの分析種を迅速、頑健、高感度で分析する方法により、毛髪中で定量できる簡素化されたサンプル前処理ワークフローです。ワークフローは、SoHT や EWDTS などの学会が推奨するガイドラインに準拠して、大量の試験を実施できる必要があります。

グループ	分析種	SoHT カットオフ (ng/mg)	EWDTS カットオフ (ng/mg)
アンフェタミン	アンフェタミン	0.2	0.2
	メタンフェタミン	0.2	0.2
	MDA	0.2	0.2
	MDMA	0.2	0.2
	MDEA		0.2
カンナビノイド類	THC	0.05	0.05
	カルボキシ-THC	0.0002	0.0002
コカイン	コカイン	0.5	0.5
	エクゴニンメチルエステル	0.05	
	ベンゾイルエクゴニン	0.05	0.05
	ノルコカイン	0.05	
	コカエチレン	0.05	0.05
アヘン剤	モルヒネ	0.2	0.2
	コデイン	0.2	0.2
	6-MAM	0.2	0.2
メサドン	メサドン	0.2	0.2
	EDDP	0.05	0.05
ブプレノルフィン	ブプレノルフィン	0.01	0.01
	ノルブプレノルフィン	0.01	0.01
ケタミン	ケタミン		0.5
	ノルケタミン		0.1
ベンゾジアゼピン/ Z 薬物			0.05
アルコール	エチルグルクロニド		0.03

表 1. SoHT と EWDTS が推奨する毛髪中薬物の確認カットオフ濃度

結果および考察

対照群毛髪はボランティアから収集され、ジクロロメタン、メタノール、ジエチルエーテルで逐次除染した後、ハサミで刻んで1～2 mmの切片にしました。M3 試薬は、イタリア、トレントの Comedical <http://www.comedical.biz/> から供給されました。

対照群の毛髪（10～20 mg）を密閉キャップ付きガラス製遠心分離管に量り取り、乱用薬物のパネルがカットオフ値の0.5倍からカットオフ値の200倍の範囲の濃度になるようにスパイクしました。M3 試薬とともに、内部標準試料（ISTD）混合液を、1 ng/mgになるように添加しました。サンプルをインキュベーター内で100℃で60分間加熱し、冷やした後、100 μLのサンプルをリン酸で希釈してから OASIS PRiME MCX 30 mg 96 ウェルプレート（製品番号：186008916 <<https://www.waters.com/nextgen/global/shop/sample-preparation-filtration/186008916-oasis-prime-mcx-96-well-plate-30-mg-sorbent-per-well-30-m-1-pk.html>>）にロードしました。サンプルを2%ギ酸、続いて50%メタノールで洗浄しました。分析種は、アンモニアが含まれているアセトニトリル/メタノール（9:1 v/v）で溶出しました。SPE 溶出液の25 μL アリコート「塩基性薬物」分析用に採取し、もう1つの25 μL アリコートを THC 分析用に採取しました。

FTN（フロースルーニードル）を装着した ACQUITY UPLC I-Class システムには30 μLのニードルが取り付けられており、これによって15 μLのサンプルを分析できました。2つの再溶解したサンプルを、ACQUITY UPLC BEH C₁₈ カラム（製品番号：186002350 <<https://www.waters.com/nextgen/global/shop/columns/186002350-acquity-uplc-beh-c18-column-130a-17-m-21-mm-x-50-mm-1-pk.html>>）で、ギ酸アンモニウム/アセトニトリルグラジエントを使用し、移動相は同じですが2つの異なるインレット方法によって分離しました。1分析種について、2つのMRM トランジションを、各ISTDのMRM トランジションとともにモニターしました。2つのLC-MS/MS 分析法の合計の分析時間は10分でした。

SoHT および EWDTS が推奨する確認カットオフで10 mgの毛髪にスパイクした「塩基性薬物」の分離を示すクロマトグラムが図1に示されており、29種の分析種の定量MRM トレースが示されています。このパネルでは、ブプレノルフィンとノルブプレノルフィンの推奨カットオフレベルが特に困難です。20 mgの毛髪に0.005 ng/mg から2 ng/mgの範囲の濃度でスパイクしたブプレノルフィンの検量線と残差プロットを、図2に示しています。

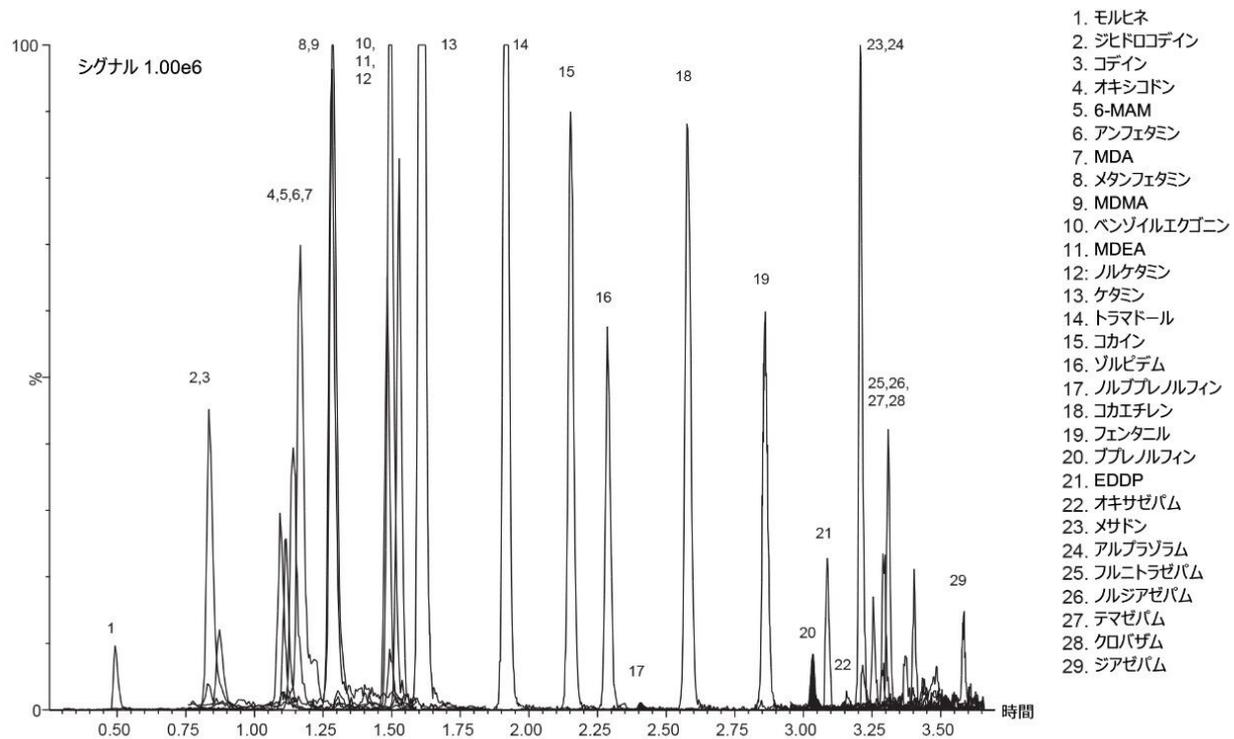


図 1. 10 mg の毛髪に、SoHT/EWDTS の確認カットオフ濃度でスパイクしたすべての分析種（カンナビノイドを除く）の定量 MRM トランジションを示すクロマトグラム。ノルブプレノルフィン（No. 17、2.41 分）とブプレノルフィン（No. 20、3.04 分）が強調表示されています。

Compound name: Buprenorphine
Correlation coefficient: $r = 0.998980$, $r^2 = 0.997961$
Calibration curve: $0.988286 * x + 0.00125395$
Response type: Internal Std (Ref 46), Area * (IS Conc./IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

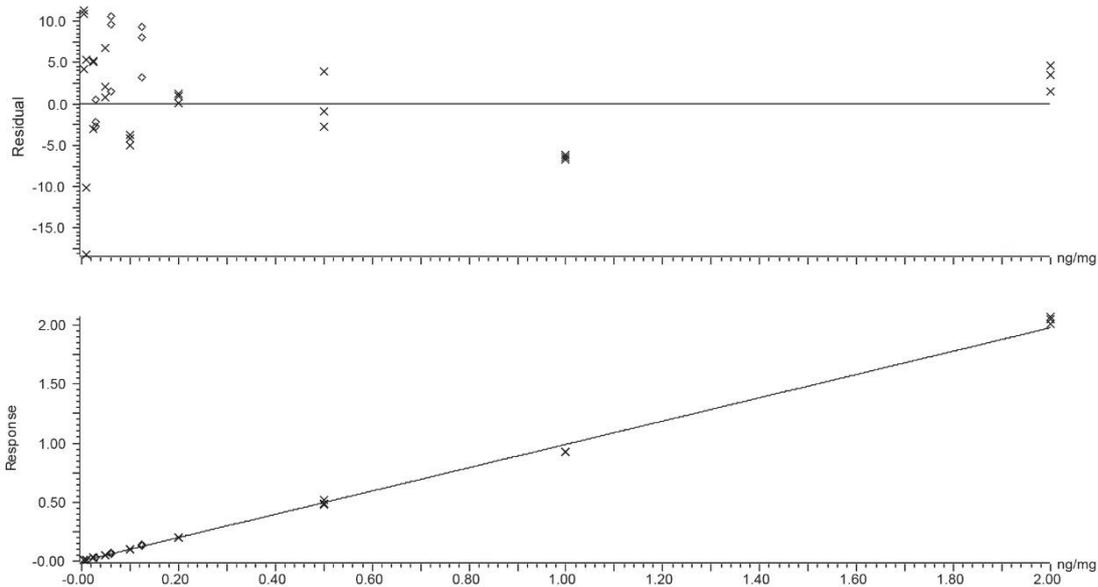


図 2. 20 mg の毛髪にスパイクしたブプレノルフィンの検量線。キャリブレーション範囲は、カットオフの 0.5 倍から 200 倍までです。カットオフ値は、SoHT および EWDTs によって確認用に推奨されている値です。

図 3 に、毛髪に 0.05 ng/mg でスパイクした THC、カンナビジオール、カンナビノールの定量 MRM トレースが示されています。サンプル中の THC の存在を確認するために、残留インキュベーション混合物を使用して、以前に報告した別の分析法によって cTHC を検出しました。アルコールのバイオマーカーであるエチルグルクロニドは、Joya 他⁴が記載した方法に従って、M3 のインキュベーション混合物から定量することができます⁴。可能性のある完全な分析ワークフローの概略図が図 4 に示されています。

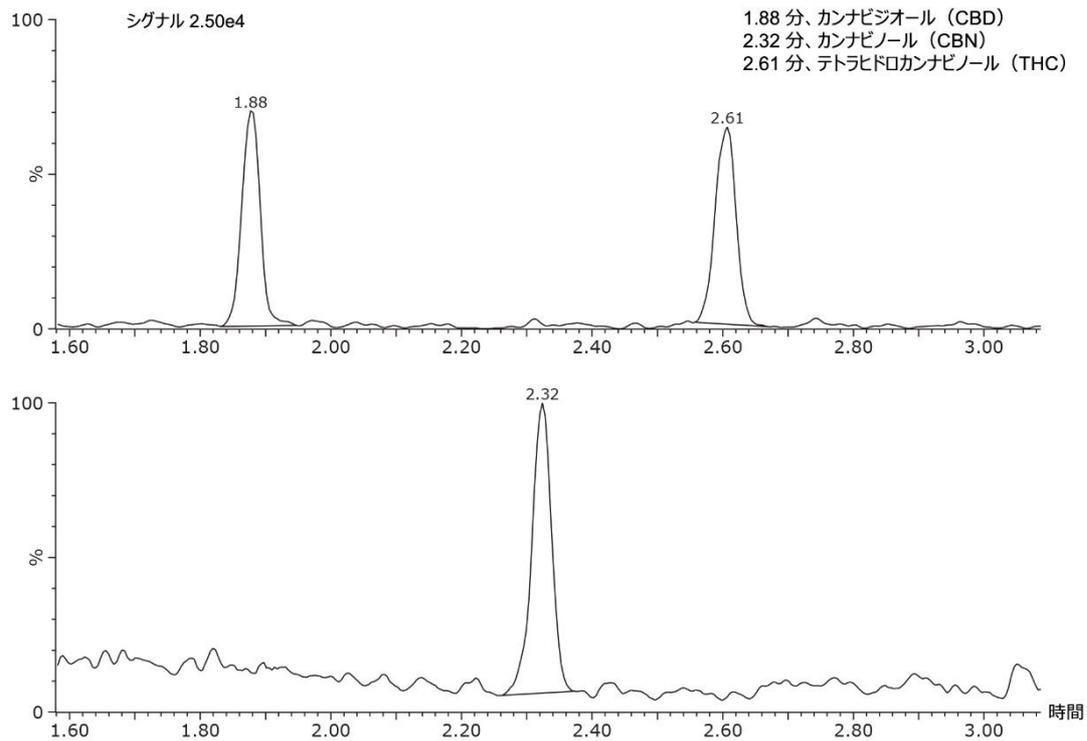


図 3. 10 mg の毛髪に、SoHT/EWDTS による確認カットオフ濃度でスパイクした THC の定量 MRM トランジションを示すクロマトグラム。同じ濃度 (0.05 ng/mg) でスパイクしたカンナビジオールとカンナビノールの定量 MRM トランジションも示されています。

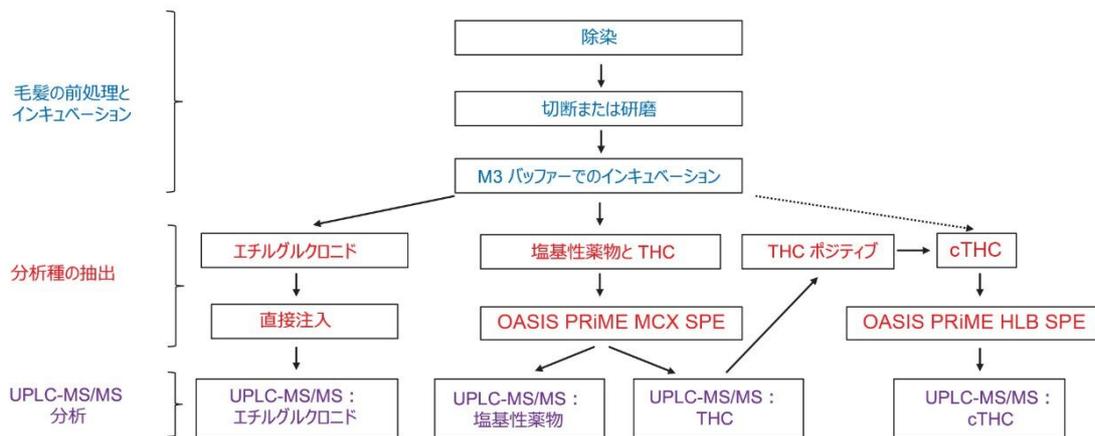


図 4. 毛髪中の薬物を分析するための可能性のある完全なワークフローの概略図

結論

薬物検査での毛髪の使用の増加により、非常に低い濃度で乱用薬物を定量するための、迅速で、正確で、信頼性が高く、頑健な分析法の必要性が強調されています。このノートでは、市販の抽出バッファーと OASIS PRiME MCX 96 ウェルプレートを用いた、SoHT と EWDTS の両方が推奨する 1 本の毛髪試料からカットオフ濃度の薬物パネルを定量するワークフローについて、詳しく説明しています。ACQUITY UPLC I-Class システムを Xevo TQ-S micro 質量分析計と組み合わせることで、低濃度で多数の化合物を定量し、高いサンプルスループットを確保できます。

参考文献

1. Cooper, G.A.A.; Kronstrand, R.; Kintz, P. Society of Hair Testing Guidelines for Drug Testing in Hair. *Forensic Science International*, 2012 218: 20–24.
2. European Workplace Drug Testing Society Guidelines.<http://www.ewdts.org> <<http://www.ewdts.org/>> (accessed July 6, 2020).
3. Gottardi, M. *et al.* Using UPLC-MS/MS for the Determination of carboxy-THC (cTHC) in Hair. Waters Tech Brief, 720006363EN <<https://www.waters.com/nextgen/in/en/library/application-notes/2018/uplc-ms-ms-determination-carboxy-thc-cthc-hair-forensic-toxicology.html>> , 2018.
4. Joya, X. *et al.* Fetal Exposure to Ethanol: Relationship Between Ethyl Glucuronide in Maternal Hair During Pregnancy and Ethyl Glucuronide in Neonatal Meconium. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2015 54(3): 427–435.

ソリューション提供製品

ACQUITY UPLC I-Class PLUS システム <<https://www.waters.com/134613317>>

Xevo TQ-S micro トリプル四重極型質量分析計 <<https://www.waters.com/134798856>>

MassLynx MS ソフトウェア <<https://www.waters.com/513662>>

TargetLynx <<https://www.waters.com/513791>>

720006989JA、2020 年 10 月 改訂

© 2021 Waters Corporation. All Rights Reserved.