

## LC-MS/MS 分析サンプル前処理

# ISOLUTE® SLE+ を使用した 合成カンナビノイド(SPICE)及び代謝物分析のための サンプル前処理

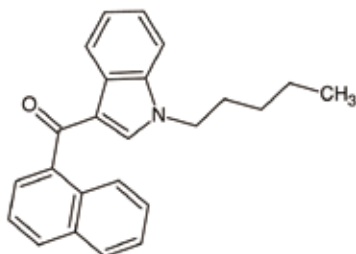
## はじめに

一般的にSPICEの名前で知られている合成カンナビノイドは、今日使用されている違法薬物の最新の形態の1つで、哺乳類のカンナビノイド受容体と結合してテトラヒドロカンナビノイド(大麻の成分)と同様の多幸感を示します。現在、その濫用が社会的問題になっており、急増する類似化合物群をスクリーニングし、検出する強固で迅速な分析方法が求められています。

このアプリケーション・ノートは、ISOLUTE SLE+を用いた、尿、血漿または全血からの合成カンナビノイド親化合物とその代謝物(JWHシリーズ)の抽出及び定量分析について詳しく説明しています。

合成カンナビノイド親化合物および代謝物から得られる回収率は70-98 %です。

### ■ 図1 JWH-018 の構造



## 生体サンプル前処理用珪藻土 ISOLUTE SLE+

ISOLUTE SLE+プレートおよびカラムは、従来の液液抽出法(LLE)に代わる効率的なサンプル前処理製品です。エマルジョン形成を回避し、処理時間を大幅に短縮します。ターゲット回収率が高く、サンプル-to-サンプル(検体間)のデータ再現性に優れており、且つ、操作方法が極めてシンプルで容易に前処理を行うことができます。

## 分析薬物

JWH-018, JWH-073, JWH-200, JWH-250, JWH-250-N-(5-ヒドロキシベンチル), JWH-018-N-5-(ペンタン酸), JWH-073 N-(3-ヒドロキシブチル), JWH 018 N-(4-ヒドロキシベンチル))

### ■ ISOLUTE SLE+による抽出メソッド

#### 尿の処理方法

尿の加水分解：尿<sup>\*</sup>にβ-グルクロニダーゼ(5000units/mL)を添加し、100mM 酢酸アンモニウム(pH 5)で希釈する(1:1, v/v)。内部標準物質を加え、β-グルクロニダーゼ試薬の使用法に従ってインキュベートする。

\*使用する尿サンプル量: ISOLUTE SLE+ 1mL サンプル用カラムを使用する場合は、尿500μLを使用する。  
ISOLUTE SLE+ 400μL サンプル用96ウェルプレートを使用する場合は、尿200μLを使用する。

使用製品:	ISOLUTE SLE+ 1mL サンプル用カラム (Part# 820-0140-C)
サンプルロード	希釈し、加水分解した尿1mLをカラムにロードし、軽くバキューム(または加圧)して導入する。 5分間静置し、尿サンプルを珪藻土に完全に吸収させる。
溶出	酢酸エチル3mL×2回をカラムに加え、軽くバキュームして溶出液を回収する。
エバポレーション・再溶解	溶媒を留去し、HPLC移動相で再溶解する。

使用製品:	ISOLUTE SLE+400 $\mu$ Lサンプル用96 ウェルプレート (Part# 820-0400-P01)
サンプルロード	希釈し、加水分解した尿400 $\mu$ Lをカラムにロードし、軽くバキューム(または加圧)して導入する。5分間静置し、尿サンプルを珪藻土に完全に吸収させる。
溶出	酢酸エチル500 $\mu$ L $\times$ 3回をウェルに加え、軽くバキュームして溶出液を回収する。
エバポレーション・再溶解	溶媒を留去し、HPLC移動相で再溶解する。

### 血漿の処理方法

サンプルの希釈：血漿500 $\mu$ LをHPLCグレードの水で希釈する(1:1, v/v)。

使用製品:	ISOLUTE SLE+1mLサンプル用カラム (Part# 820-0140-C)
サンプルロード	希釈した血漿サンプル1mLをカラムにロードし、軽くバキューム(または加圧)して導入する。5分間静置し、尿サンプルを珪藻土に完全に吸収させる。
溶出	ヘキサン4mL $\times$ 2回をカラムに加え、軽くバキュームして溶出液を回収する。
エバポレーション・再溶解	溶媒を留去し、HPLC移動相で再溶解する。

### 全血の処理方法

サンプルの希釈：全血1mLをHPLCグレードの水で希釈する(1:1, v/v)。

使用製品:	ISOLUTE SLE+2mLサンプル用カラム (Part# 820-0290-D)
サンプルロード	希釈した血漿サンプル2mLをカラムにロードし、軽くバキューム(または加圧)して導入する。5分間静置し、尿サンプルを珪藻土に完全に吸収させる。
溶出	ヘキサン4mL $\times$ 2回をカラムに加え、軽くバキュームして溶出液を回収する。
エバポレーション・再溶解	溶媒を留去し、HPLC移動相で再溶解する。

## HPLC 条件

機器:	Agilent 1200 Liquid Handling System (Agilent Technologies, Berkshire, UK)
カラム:	Supelco Ascentis Express C18, 2.7 $\mu$ m分析用カラム(100 x 2.1 mm id) (Supelco, Bellefonte, Pa.)
移動相:	アイソクラティック：0.1%ギ酸水溶液 / 0.1%ギ酸-メタノール(20/80, v/v)
流速:	0.2mL/min, 8.5分間
注入量:	5 $\mu$ L
温度:	ambient

## MS条件

機器:	Turbo IonSpray <sup>®</sup> インターフェース装備Applied Biosystems/MDS Sciex 4000 Q-Trap トリプル四重極型質量分析装置 (Applied Biosystems, Foster City, CA.) 150°C
イオン源温度:	600°C

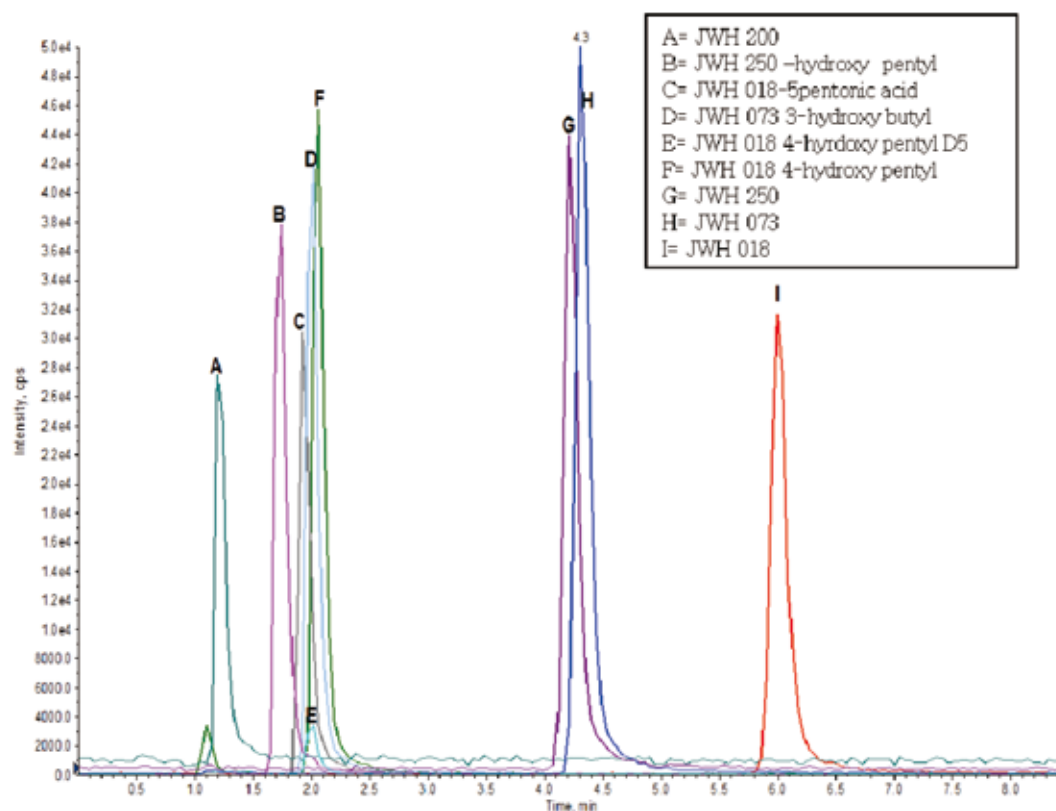
表1 MRMトランジション (ポジティブモード/ターボイオンスプレー法)

Scan Function	Analyte	MRM Transition	Decustering Potential (DP)	Collision Energy (CE)	Cell Exit Potential (CXP)
1	JWH-073	328>155	40	30	16
2	JWH-018	342>155	40	30	16
3	JWH-018 N-(4-ヒドロキシペンチル)	358>155	40	30	16
4	JWH-018 5-ペンタン酸	372>155	40	30	16
5	JWH-073 N-(3-ヒドロキシブチル)	344>155	40	30	16
6	JWH-250-N-(5-ヒドロキシペンチル)	352>120.9	40	30	16
7	JWH-200	385>155	40	30	16
8	JWH-250	336>121	40	30	16
9	d5-JWH-018 N-(4-ヒドロキシペンチル)	363.5>155	40	35	16

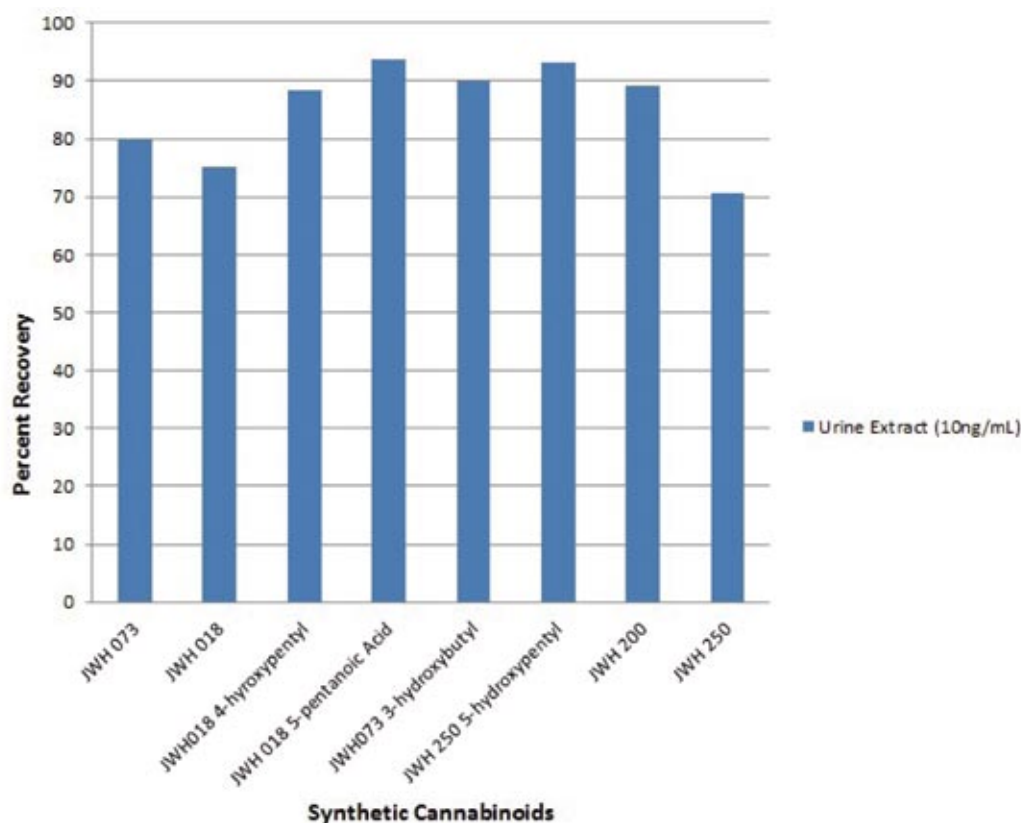
## 結果

図2に、尿中の合成カンナビノイド親化合物および代謝物の典型的なイオンクロマトグラムを示す。図3には、ISOLUTE SLE+ 1mLサンプル用カラムを使用し、濃度範囲1-1000ng/mLで評価した際の回収率を示す。なお、400 $\mu$ Lサンプル用96ウェルプレートについては、血漿および全血サンプルで濃度範囲0.1-50ng/mLにて評価し、同等の結果を得た。

図2 尿中から抽出した合成カンナビノイド(10ng/mL)の典型的なイオンクロマトグラム



■ 図3 ISOLUTE SLE+ 1mLサンプル用カラムを使用して尿中から抽出した合成カンナビノイド(10ng/mL)の回収率



### ■ 使用製品一覧

Part number	Description	Quantity
820-0140-C	ISOLUTE SLE 1mL Columns	1
820-0290-D	ISOLUTE SLE 2mL Columns	1
820-0400-P01	ISOLUTE SLE 400uL 96-well plate	1
121-2068	VacMaster 20 vacuum manifold	1
PPM-96	Positive Pressure Manifold-96	1
PPM-48	Positive Pressure Manifold-48	1
SD-9600-DHS-NA	SpeDry-96 Sample Concentrator System 110V USA	1
C103198	TurboVap LV 120V	1

### バイオタージ・ジャパン株式会社

本社：〒136-0071 東京都江東区亀戸1-14-4, 6F TEL 03-5627-3123 FAX 03-5627-3121  
 大阪：〒532-0011 大阪市淀川区西中島7-1-29, 6F TEL 06-6838-9311 FAX 06-6838-9312  
 URL: <http://www.biotage.co.jp> E-mail: [Japan\\_info@biotage.com](mailto:Japan_info@biotage.com)