

図 6 (A) 市場流通製品（白色粉末）のメタノール抽出溶液及び MDMA, MDA の分析用標準溶液の GC-MS 測定結果

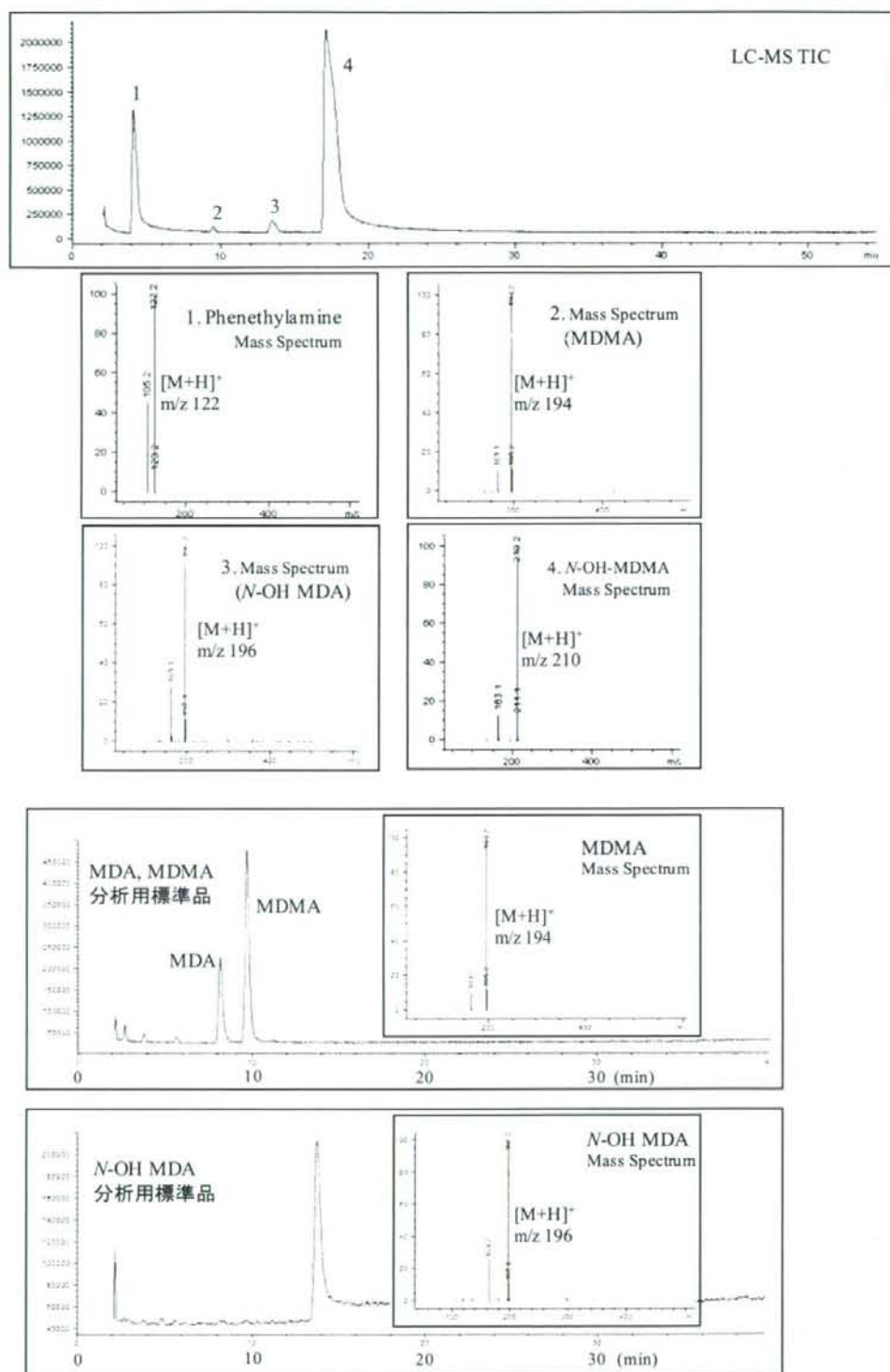


図 6 (B) 市場流通製品（白色粉末）のメタノール抽出溶液及び MDMA, MDA の分析用標準溶液の LC-MS 測定結果

分担研究課題 薬物の分析と同定に関する研究
分担研究者 花尻 瑠理 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 室長

DART-TOF/MS を用いた生体試料中の薬物スクリーニング法の検討

研究要旨 DART™ (Direct Analysis in Real Time) -TOF/MS を用いて、覚せい剤 MA 及び合成麻薬 MDMA、また、両化合物の代謝物 AP 及び MDA を対象化合物として、尿中乱用薬物のスクリーニング法を検討した。DART-TOFMS により薬物添加尿試料を直接測定したところ、尿中尿素による目的化合物のイオン化抑制が認められ、検出感度が大幅に低下した。そこで、尿素除去のための簡易前処理法を検討した結果、溶出液にジクロロメタン/イソプロパノール混液を用いたマイクロ固相抽出用ピペットチップで 0.25 µg/mL、ヘキサン/ジクロロメタン混液を用いた液-液抽出法では、0.5 µg/mL までの尿中薬物測定が DART-TOFMS により可能であった。なお、これら抽出法における各薬物の抽出効率を GC-MS 分析により確認した結果、両抽出法とも尿中薬物の回収率が 70%以上となり、0.5-5 µg/mL の濃度範囲で直線性 $R^2 > 0.990$ であった。通常、簡易検査キットで使用されている尿中 MA 及び MDMA のスクリーニング分析のカットオフ値が 0.5 µg/mL であることを考慮すると、本法は、これら化合物のスクリーニング法の一手段となる可能性が考えられた。

研究協力者

河村麻衣子 国立医薬品食品衛生研究所生薬部

A. 研究目的

近年開発されたイオン化法 Direct Analysis in Real Time (DART™) は大気圧下で非接触的に試料をイオン化でき、さらに質量検出器に time of flight-mass spectrometry (TOFMS) を用いることで、精密質量測定に基づく元素組成推定が可能となる¹⁾(図1)。DART の利点としては、液体、固体等の試料形態を問わず、DART イオン源にかざすだけで表面の物質がイオン化され、分子量の測定が可能である。すでにその簡便さから、DART を使用した薬品²⁾、香料³⁾、食品添加物⁴⁾等の分析への適用例が報告されている。我々はすでに、DART-TOFMS を用いた植物系違法ドラッグ製品および法規制植物の抽出操作を伴わない簡便なスクリーニング法について報告している⁵⁾。本

研究では、DART-TOFMS 分析のさらなる応用を目指し、覚せい剤 methamphetamine (MA)、合成幻覚薬 3,4-methylenedioxy-methamphetamine (MDMA)、またそれら化合物の代謝物 amphetamine (AP) 及び 3,4-methylenedioxy amphetamine (MDA) を対象化合物として、尿中乱用薬物のスクリーニング法を検討した。

尿中乱用薬物の検査は、日本においては、1次スクリーニングとして Triage ODA™ (Sysmex 社)、AccuSign one-step™ (Princeton BioMeditech Corporation 社、関東化学) や Monitect-3™

(Branan Medical Corporation 社、Veritas) 等のイムノクロマトグラフィーを用いた簡易検査キットを使用する機会が多い。簡易検査キットは、通常、尿を反応パネルの上のせ、試薬を滴下する等の単純な操作のみで簡単に測定できるが、今回対象とした MA と MDMA を 1 度に検出可能な

キットは販売されていない。そこで、DART を用いた尿中の薬物に対するスクリーニング法として、これら薬物について、簡易検査キットで通常使用されているカットオフ値濃度 (MA 0.5 $\mu\text{g/mL}$, MDMA 0.5 $\mu\text{g/mL}$) 程度で薬物を簡易に検出可能な手法を開発すること目的として分析方法を検討した。

B. 研究方法

1. 試薬及び試料

分析対象薬物として AP 硫酸塩, MA 塩酸塩, MDMA 塩酸塩, MDA 塩酸塩を使用した。また、標準溶液として、各化合物の 1 mg/mL 水溶液を作成した。ウレアーゼは urease Type C3 (Sigma Aldrich 社) を、マイクロ固相抽出用ピペットチップは Omix pipette tips C18 及び C4 (Varian 社) を、その他の試薬は試薬特級を使用した。尿試料は、薬物フリーのヒトコントロール尿を使用した。ウレアーゼを溶解する溶液は、0.2% BSA / 20 mM EDTA / 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) を使用した。

2. 分析法

1) 前処理法

尿中の尿素の影響を除去し、DART-TOFMS 測定における薬物の検出感度を向上させるために簡易前処理法 3 法 (マイクロ固相抽出用ピペットチップ、液-液抽出法、酵素処理法) を検討した。また、尿中からの MA, AP, MDMA, MDA の回収率および直線性を示す濃度範囲を確認するために、各化合物の標準水溶液を 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 $\mu\text{g/mL}$ となるようヒトコントロール尿に加え、各前処理を行い、各薬物濃度を GC-MS で測定した。

2) DART-TOFMS 分析

DART-TOFMS 測定装置として、イオン源 Direct Analysis in Real Time (DART) (日本電子社製) に質量分析計 AccuTOF JMS-T100 (日本電子社製) を連結したものを使用した。質量校正には PEG600 を使用し、各測定の内標準物質として

caffeine ($\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_2$) 溶液を用いた。

使用した。

DART 条件

Positive mode ; gas flow : He, 2.0 L/min ; gas temp. : 200°C ; needle : 3200 kV ; electrode 1 : 100 V ; electrode 2 : 250 V

TOFMS 条件

Positive mode ; orifice 1 : 15 V, 80°C ; orifice 2 : 5 V ; ring lens : 5 V ; ion guide : 500 V ; reflectron : 950 V ; mass range : 10 - 500 (Da)

3) GC-MS 分析

I) 前処理溶液の誘導体化

マイクロ固相抽出用ピペットチップもしくは液-液抽出による抽出液に内標準物質 MA-d4 水溶液 (最終濃度 2 $\mu\text{g/mL}$) および 5 M 塩酸/メタノール (1:20) 20 μL を添加し、窒素気流下で乾固させた。Trifluoroacetic anhydride (TFAA, Aldrich) 100 μL 及び酢酸エチル 100 μL を加え、60°C 20 分間反応させ、過剰の試薬を窒素気流下で留去し、酢酸エチル 100 μL に溶解して、各化合物のトリフルオロアセチル体として GC-MS 測定を行った。酵素処理溶液においては、溶液 100 μL に 0.9 mL のエタノール、5 M 塩酸/メタノール (1:20) 20 μL 及び内標準物質 MA-d4 水溶液 (最終濃度 2 $\mu\text{g/mL}$) を加えてタンパクを沈殿させた。溶液をフィルターろ過し、窒素気流下で蒸発乾固させたものを TFAA で同様に誘導体化して GC-MS 測定試料とした。

GC-MS は SIM モードで測定を行なった。各化合物と内標準物質とのピーク面積比を算出し、0.5-5.0 $\mu\text{g/mL}$ の濃度範囲における各化合物の直線性を検討した。回収率は、各濃度における標準溶液と前処理溶液のピーク面積比 ([各化合物] / [内標準物質]) を比較することにより算出した。

II) 装置

GC-MS 測定装置として、6890N GC-5975MSD, (Agilent 社製) を用いた。

Column: HP-1MS (30 $\text{m} \times 0.25 \text{ mm i.d.}$, 0.25 μm , Agilent), Gas: He, Flow: 1.0 mL/min ,

injection volume: 1 μL , splitless, Injection temp.: 200°C, Column temp.: 60°C (1 min hold) · 20°C/min · 280°C (5 min hold), ionization: EI, Transfer temp.: 280°C, Selected monitoring ions: m/z 140 (AP-TFA), 154 (MA-TFA, MDMA-TFA), 135 (MDA-TFA), 158 (MA-d4-TFA).

C. 研究結果及び考察

1. 標準溶液及び尿中薬物の直接分析

DART-TOFMS 測定は各試料溶液をガラス棒の先端に付着させ、DART イオン源にかざすことにより行った。対象薬物の標準水溶液を測定したところ、塩の状態だと DART でのイオン化が良好ではなかったため、25%アンモニア水を微量加え遊離塩基にして測定を行った。標準水溶液（遊離塩基）を希釈して MA, AP, MDMA, MDA の DART-TOFMS によるプロトン付加分子イオン $[\text{M}+\text{H}]^+$ の検出を確認したところ、各化合物 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ まで確認可能であった ($\text{S}/\text{N} > 3$)。なお、理論値と測定値の質量差が 10 mmu 以内の精度で組成推定可能な濃度は各化合物 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上であった。

尿試料に MA 標準水溶液（遊離塩基）を添加して測定を行ったところ、尿素 ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$) のダイマー ($[\text{2M}+\text{H}]^+$: 121.0725) によるイオン化抑制が認められ、MA のプロトン付加分子イオン $[\text{M}+\text{H}]^+$ が確認できる濃度 ($\text{S}/\text{N} > 3$) は大幅に低下し、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 程度であった (図 2)。表 1 に測定化合物及び尿素（尿中成分）の組成式（プロトン付加体）およびモノアイソトピック質量値（理論値）を示した。

以下に、DART-TOFMS による尿中薬物分析において、尿素の影響を除去し、検出感度を向上させるために簡易前処理法を検討した結果を示す。

2. マイクロ固相抽出用ピペットチップを用いた分析⁶⁾

マイクロ固相抽出用ピペットチップは、チップ先端に固定相を充填しており、マイクロピペットに装着して通常のピペット操作で溶液を吸引、吐

出することで一連の固相抽出操作を行うことが可能である (図 3)。各薬物標準溶液を 0.5 · 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ になるよう添加したヒトコントロール尿 100 μL を用いて、マイクロ固相抽出チップとして Omix pipette tips C18 もしくは C4 を、固相からの薬物の溶出溶媒としてメタノール、イソプロパノール、アセトニトリル、ジクロロメタンを組み合わせ、MA, AP, MDMA, MDA の 4 化合物が最も回収率良く、かつ、DART-TOFMS 分析において他成分による妨害が最も少ない抽出条件を検討した。Omix pipette tips の操作は以下の通り行った。

- ①固相の活性化：メタノール 100 μL 2 回、純水 100 μL 2 回ピペット操作を行う。
- ②試料の保持：各薬物を添加したヒトコントロール尿 100 μL に 0.1 M 水酸化ナトリウム水溶液 20 μL を加え、液中でピペット操作を 5 回繰り返す。
- ③洗浄：純水 100 μL 2 回、5%メタノール水溶液 2 回ピペット操作を行う（その際固相を乾固させないように注意する）。
- ④溶出：溶出溶媒 50 μL 中でピペット操作を 5 回繰り返す。

溶出溶媒を尿試料の半量とすることで、各薬物を約 2 倍に濃縮することが可能であるため、測定試料の最終薬物濃度は約 1.0 · 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となる。各種溶出溶媒を用いて各薬物の回収率を GC-MS 測定により検討した結果、溶出溶媒としてジクロロメタン/イソプロパノール混液 (3:1) を用いた操作法で最も良好な結果が得られた。本溶出溶媒を用いた場合の各化合物の尿中からの回収率は、0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (最終濃度 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) では AP, MDA において 70%以下と低い値を示したが、0.5 · 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (最終濃度 1.0 · 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) の濃度範囲では 4 化合物共に 70%以上の回収率を示し、直線性も $R^2 > 0.990$ であった (図 4 (A))。また、この溶出液をガラス棒に付着させて DART-TOFMS 測定を行ったところ、尿中薬物濃度 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 4 化合物のプロトン付加分子イオンピーク $[\text{M}+\text{H}]^+$ が確認可能であった ($\text{S}/\text{N} > 3$) (図 5)。

3. 液-液抽出を用いた分析

ヒトコントロール尿 1 mL に各薬物標準溶液を 0.5・5 µg/mL になるよう添加し、少量の 25% アンモニア水を加えて塩基性条件にした。その後 500 µL の有機溶媒を加え、よく震盪し、有機層をガラス棒に付着させて DART-TOFMS 測定に用いた。この際、有機溶媒量を尿試料の半量とすることで、各薬物を約 2 倍に濃縮することが可能であるため、測定試料の最終薬物濃度は約 1.0・10 µg/mL となる。GC-MS 測定では有機層 100 µL をとり、5 M 塩酸/メタノール (1:20) 20 µL 及び内標準物質 MA-d4 水溶液 (最終濃度 2 µg/mL) を加え、窒素気流下で乾固させ、誘導体化を行い測定試料とした。有機溶媒は、酢酸エチル、ジエチルエーテル、ジクロロメタン、ヘキサン、イソプロパノール、エタノール、アセトンを組み合わせて、MA, AP, MDMA, MDA の 4 化合物が最も回収率の良く、DART-TOFMS 分析において他成分による妨害が最も少ない抽出条件を検討した。GC-MS 測定による各薬物の回収率検討の結果、ヘキサンを使用すると、最も尿中常在成分が除去され、0.5・5.0 µg/mL の濃度範囲の直線性については各化合物共に良好な値を示したが、AP, MDA の回収率が 40・50% と低い値を示した。一方、ジクロロメタンを使用した場合は、回収率が 90% 以上と高いものの、ジクロロメタン層が下層になるため、ガラス棒に有機溶媒層のみを付着することが困難であった。そこで混合溶液について検討した結果、ヘキサン/ジクロロメタンを 2:1 で混合すると、有機層が上層となり、4 化合物すべての回収率が各濃度で 70% 以上に向上し、直線性も $R^2 > 0.990$ であった (図 4 (B))。この条件では、DART-TOFMS 測定において、0.5 µg/mL の尿中薬物濃度までは 4 化合物のプロトン付加分子イオンピーク $[M+H]^+$ が確認可能であり ($S/N > 3$)、他の溶媒と比較して最も良い結果が得られた (図 6)。しかし、マイクロ固相抽出用ピペットチップでは確認可能であった 0.25 µg/mL の尿中薬物濃度では、プロトン付加分子イオンピークは確認できな

かった。

4. 酵素処理による分析⁷⁾

尿中の尿素を除去するために、文献⁷⁾に従い、各薬物を添加したヒトコントロール尿 100 µL にウレアーゼ (1000 u/mL) 10 µL を加え、37°C で 10 分間酵素処理を行うことにより尿素を分解し、反応溶液をガラス棒に付着させて DART-TOFMS により測定を行った。その結果、尿素は分解されるものの、 m/z 114 のイオンピークが主に検出され、各薬物共に、1 µg/mL 以下の濃度ではプロトン付加分子イオンピークの検出は困難であった。図 7 に MA, AP, MDMA 及び MDA を 5 µg/mL 添加し、ウレアーゼ処理を行ったヒトコントロール尿試料の DART-TOFMS スペクトルを示した。

なお、本前処理法後の尿中各薬物濃度を測定するために、酵素処理溶液にエタノール及び内標準物質を加えてタンパクを沈殿させ、溶液をフィルターろ過し、5 M 塩酸/メタノール (1:20) を少量加え窒素気流下で蒸発乾固させたものを誘導体化して GC-MS 分析を行った。その結果、1.0-5.0 µg/mL の濃度範囲では各化合物濃度は、添加濃度の 60・80% であったが、本抽出法による測定では、GC-MS クロマトグラム上、尿中常在成分による妨害が大きく、0.5 µg/mL では SIM でも各化合物の測定値が大きくばらついた (図 4 (C))。

D. 結論

MA, AP, MDMA, MDA を添加したヒトコントロール尿試料を DART-TOFMS により直接測定したところ、尿中尿素による目的化合物のイオン化抑制が認められ、検出感度が大幅に低下した。そこで、尿素除去のための簡易抽出法を検討した。その結果、溶出溶媒にジクロロメタン/イソプロパノール混液を用いたマイクロ固相抽出用ピペットチップで、各薬物 0.25 µg/mL の濃度まで、プロトン付加分子イオンピークが検出可能であった ($S/N > 3$)。また、ヘキサン/ジクロロメタン混液を用いた液-液抽出では、0.5 µg/mL まで検

出が可能であった ($S/N > 3$)。一方、ウレアーゼを用いて尿中尿素を分解する手法では、尿中成分による妨害が大きく、 $1 \mu\text{g/mL}$ 以下の濃度ではプロトン付加分子イオンピークの検出が困難であった。本研究に用いた簡易前処理法の抽出効率を確認するために、各濃度の前処理溶液中薬物をGC-MSにより測定した結果、マイクロ固相抽出用ピペットチップ及び液-液抽出法では4化合物の回収率は70%以上となり、 $0.5 \sim 5 \mu\text{g/mL}$ の尿中薬物濃度範囲で直線性 $R^2 > 0.990$ が確保できた。

DART-TOFMS分析は、簡単な前処理を行うだけで、尿中の薬物のプロトン付加分子イオンピークが瞬時に検出可能である。一定の濃度以上では、さらに精密質量値を測定することにより、化合物の組成推定を行うことで含有成分の推定も可能となる。通常、簡易検査キットで使用されている尿中MA及びMDMAのスクリーニング分析のカットオフ値が $0.5 \mu\text{g/mL}$ であることを考慮すると、本法はこれら化合物のスクリーニング法の一手段となる可能性が考えられた。しかし、尿中に高濃度に排泄される可能性のある他の化合物や常在成分によるイオン化の妨害も否定できないため、強度の大きい他ピークが検出された場合には注意が必要である。また、構造類似体や異性体等の組成式が同一の化合物については、DART-TOFMSのみでは判別できないことに留意しなければならない。

E. 文献

1) R. B. Cody, J. A. Laramée and H. D. Durst, *Anal Chem.*, **77** (8), 2297-302 (2005).

2) C. Petucci, J. Diffendal, D. Kaufman, B. Mekonnen, G. Terefenko and B. Musselman, *Anal Chem.*, **79** (13), 5064-70 (2007).
3) O. P. Haeffliger and N. Jeckelmann, *Rapid Commun Mass Spectrom.*, **21** (8), 1361-6 (2007).
4) T. Vail, P. R. Jones and O. D. Sparkman, *J Anal Toxicol.*, **31** (6), 304-12 (2007).
5) 河村麻衣子, 花尻(木倉)瑠理, 合田幸広, 薬学雑誌, 投稿中.
6) 鈴木 雄亮, 佐藤 雅子, 金子 毅, 法科学技術, **13**, 45-50 (2008).
7) I. Matsumoto, T. Kuhara, *Mass spectrom. rev.*, **15** (1), 43 - 57 (1996).

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1) Kawamura, M., Kikura-Hanajiri, R., Goda, Y., Simple and rapid screening for psychotropic natural products using Direct Analysis in Real Time (DART)-TOFMS. *Yakugaku Zasshi*, **129**, accepted (2009).

学会発表

1) 河村麻衣子 花尻(木倉)瑠理 合田幸広, DART-TOF/MSを用いた尿中覚せい剤及びMDMAの迅速スクリーニング法の検討, 日本薬学会第129年会(2009.3, 京都).

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

表 1 測定化合物および尿素（尿中成分）の質量値（理論値）

Compounds	Elemental compositions (protonated)	Exact mass
AP	$C_9H_{14}N$	136.11262
MA	$C_{10}H_{16}N$	150.12827
MDA	$C_{10}H_{14}NO_2$	180.10245
MDMA	$C_{11}H_{16}NO_2$	194.11810
caffeine (IS)	$C_8H_{11}N_4O_2$	195.08820
urea (dimer)	$C_2H_9N_4O_2$	121.07255

DART™ : Direct Analysis in Real Time

(Cody RB, et al., Anal Chem. 77, 2297-302, 2005)

- ◆ 励起状態の原子・分子が大気ガス及び試料と相互作用することに基づく。
- ◆ 大気圧下、開放系での操作が可能であるため、試料をそのままイオン源の前にかざし、前処理なしで、非破壊的に比較的広範囲の化合物の直接イオン化が可能
- ◆ TOFMSをつなげることにより気体、液体、固体の精密質量測定が可能
- ◆ スクリーニング法のひとつとして注目

試料
 固体: ピンセットではさんで
 液体: ガラス棒に浸して
 粉末: ガラスウール紙に包んで

↓
 イオンソースとマスのかざす

図 1 DART の測定原理

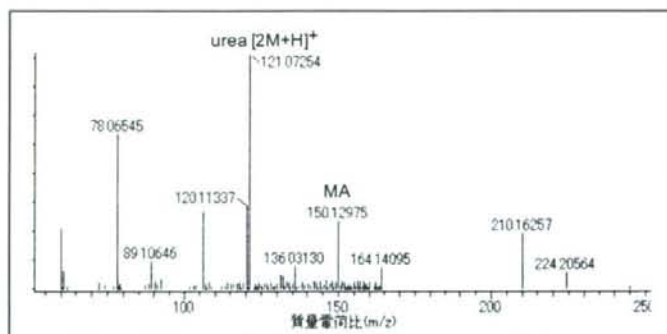


図 2 MA 20 $\mu\text{g/mL}$ 添加尿試料の DART-TOFMS スペクトル

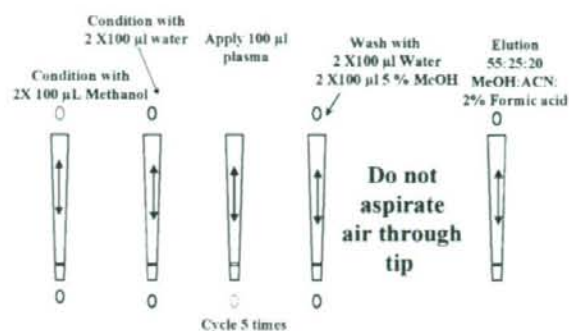


図3 マイクロ固相抽出ピペットチップの使用例 (<https://www.varian.com>)

固相がチップの先端に充填されており、チップをマイクロピペットに装着して通常のピペット操作で溶液を吸引、吐出することで一連の固相抽出操作を行う。

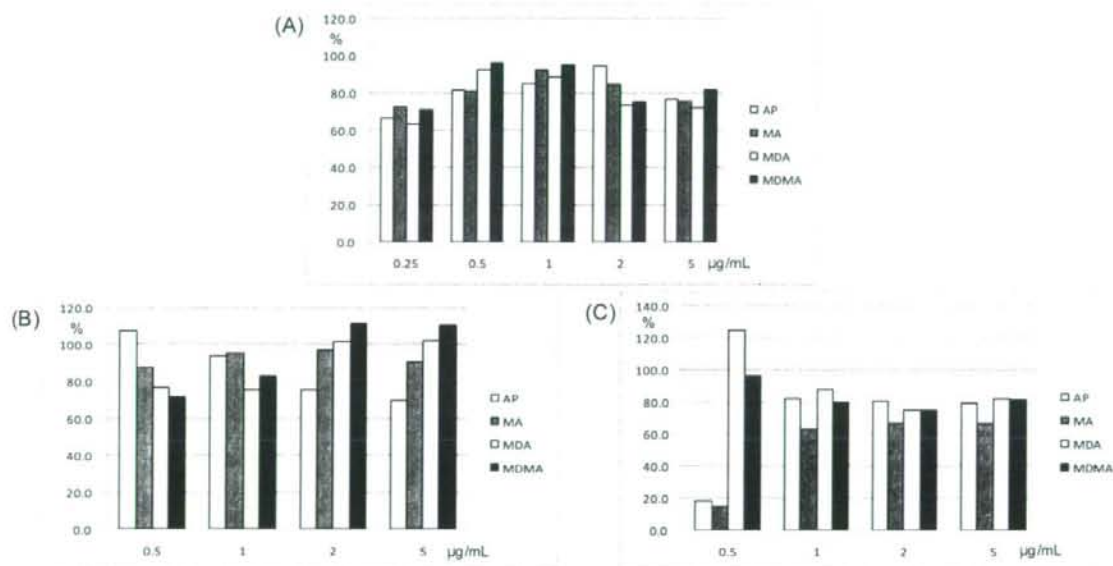


図4 各前処理法における尿中 AP, MA, MDA, MDMA の回収率 (添加量に対する検出濃度の割合 (%))
 (A) マイクロ固相抽出用マイクロチップ, (B) ヘキサン/ジクロロメタン液-液抽出, (C) ウレアーゼ処理

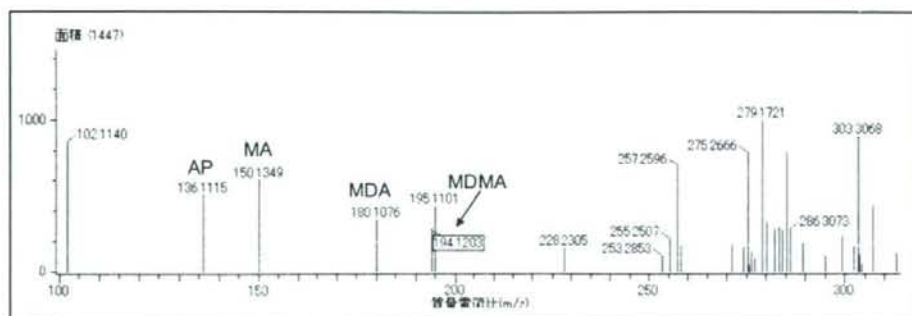


図5 マイクロ固相抽出用ピペットチップによる4薬物添加尿試料 (0.25 µg/mL) 抽出液の DART-TOFMS スペクトル

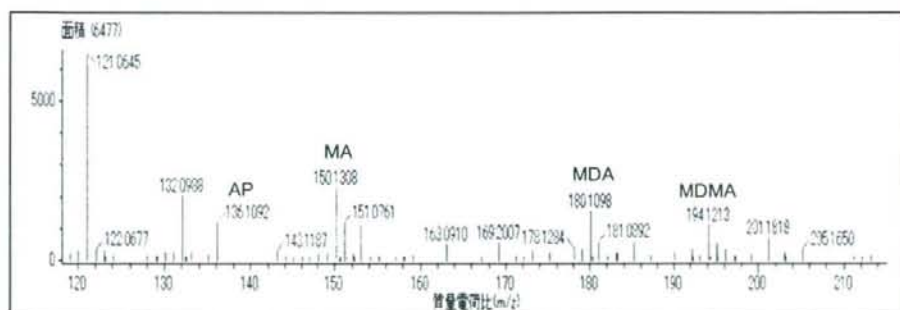


図6 ヘキサソ/ジクロロメタン液-液抽出による4化合物添加尿試料 (0.5 µg/mL) 抽出液の DART-TOFMS スペクトル

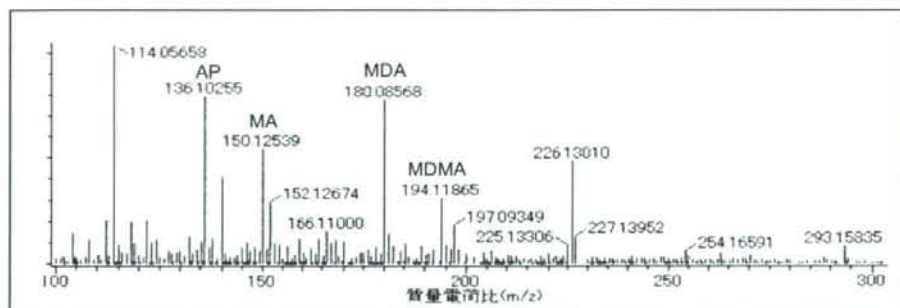


図7 ウレアーゼ処理を行った4化合物添加尿試料 (5 µg/mL) の DART-TOFMS スペクトル

分担研究報告書

分担研究課題 薬物の分析と同定に関する研究

分担研究者 花尻瑠理 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 室長

クエン酸フェンタニル及びその代謝物であるノルフェンタニルの UPLC-MS/MS を用いたラット毛髪中の分析法

研究協力者 最所和宏 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 主任研究官

要旨 近年、医療従事者による違法な摂取が報道された麻薬であるクエン酸フェンタニル及びその代謝物であるノルフェンタニルの UPLC-MS/MS を用いたラット毛髪中の分析法を検討した。UPLC カラムを用いることにより、迅速な分析（フェンタニルの保持時間 3.0 分及びノルフェンタニルの保持時間 1.6 分）が可能となった。メタノール/5M 塩酸（20/1）溶液による抽出後、固相抽出により精製する方法で、毛髪中のフェンタニル及びノルフェンタニルともに精度良く分析することができた。また、酵素消化法による抽出でも同様に精度良く分析することができた。薬物投与ラットの毛髪中より、フェンタニル 50.9 - 67.1 ng/mg hair 及びノルフェンタニル 1.81 - 4.12 ng/mg hair 検出された。また、短時間に抽出可能な超音波抽出下酵素消化法は、定性分析に適していると考えられた。薬物の使用証明の方法として、本分析法が適応可能であることが示唆された。

A. 研究目的

1960 年代より、モルヒネの代用薬として、合成鎮痛薬であるクエン酸フェンタニル（麻薬）が鎮痛・麻酔の目的で利用されてきた¹⁾。欧米では、本化合物は、ヘロインの代わりとして、違法に使用される例が多く、その過剰摂取による事故が起こっている。近年、日本においても、ニュースや新聞紙上で、医療従事者による違法な摂取による事故が報道されるようになった。麻薬には、所持罪だけでなく使用罪も適用されるため、薬物の使用証明が必要となる。現在、薬物の使用証明は、主に被疑者の尿中薬物の検出により行われている。しかし、通常、尿中からは使用后 1 週間程度で、薬物が消失し、長期にわたる薬物情報を得ることができない。そこで、長期の薬物乱用情報が得られる手段として、毛髪試料が注目され、様々な薬物の毛髪中の分析法が報告されてきた²⁾。クエン酸フェンタニ

ルの毛髪試料中の GC-MS による分析については、幾つか報告され、2D-GC-MS³⁾、GC-MS/MS⁴⁾ により分析されている。しかし、2D-GC-MS 及び GC-MS/MS は、現在のところ、あまり普及している機器ではない。一方、LC-MS/MS による分析は、Schneider ら⁵⁾ により報告されている。代謝物を同時に検出することは、受動的に毛髪に付着したのではなく、能動的に摂取したことへの証明になるが、彼等の報告にはノルフェンタニルを含む代謝物の分析は行っていない。よって、フェンタニルの主代謝物であるノルフェンタニルも合わせて、近年普及してきた UPLC-MS/MS を用いて、迅速・高感度なラット毛髪中の分析法を検討した。

B. 研究方法

1. 試薬

クエン酸フェンタニル及びクエン酸ノル

エンタニルは cerilliant 社製の 1mg/mL メタノール溶液を使用した。クエン酸フェンタニル重水素化体は cerilliant 社製の d5 体の 100 μ g/mL メタノール溶液を使用した。dithiothreitol (DTT) 及び tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris) は Aldrich 社製、Ponase E (ストレプトマイセス、生化学用、>400 万 U/g) はメルク社製を使用した。

2. 動物実験及び分析試料採取法

Dark-Agouti (DA) ラット (♂、5 週齢、日本エスエルシー) の背部の毛を、動物用電気バリカンで刈り取り、この毛をコントロール毛髪試料とした。背部の毛を刈り取った DA ラット 3 匹ずつクエン酸フェンタニル 1mg/kg を 10 日間連続して腹腔内投与した。薬物の初回投与 28 日後、新たに生えた毛を採取して毛髪試料とした。毛髪試料を 0.1%ドデシル硫酸ナトリウム溶液、水で各 3 回、1 分間ずつ超音波下洗浄した後、乾燥した。ハサミを用いて、乾燥した毛髪試料を 0.5 mm 程度に細片化した。

(倫理面の配慮)

動物実験は、国立医薬品食品衛生研究所「動物実験に関する指針」を遵守し、当所動物管理者の協力得て、動物福祉、愛護の精神に基づいて、適切な実験計画及び適正な実験手技の基で実施した。

3. 分析法

3.1. 毛髪試料の分析法

3.1.1. 毛髪試料からの薬物の抽出法

3.1.1.1. メタノール/5M 塩酸抽出法⁶⁾

細片化した毛髪試料 20 mg に、内部標準溶液としてクエン酸フェンタニル重水素化体 (IS) のメタノール溶液 (10 μ g/mL) 10 μ L 添加し、メタノール/5M 塩酸 (20/1) 溶液 1 mL を加えて、超音波下 1 時間抽出し、さらに一晩放置した。抽出溶液をろ過した後、窒素気流下で乾固した。残渣を、0.1M 塩酸 2 mL に溶解して固相抽出溶液とした。

3.1.1.2. アルカリ可溶化法

細片化した毛髪試料 20mg に、IS のメタノール溶液 (10 μ g/mL) 10 μ L 添加し、1M 水酸化ナトリウム溶液を 2 mL 添加し、40 $^{\circ}$ C で 1 晩インキュベーションした。抽出溶液を遠心分離して不溶物を取り除いた後、5M 塩酸を加えて液性を pH3 程度にして、固相抽出溶液とした。

3.1.1.3. 酵素消化法

細片化した毛髪試料 20 mg に、IS のメタノール溶液 (10 μ g/mL) 10 μ L 添加し、DTT/0.1M Tris-HCl 緩衝液 (pH7.2) 12 mg/mL を 500 μ L 添加し、40 $^{\circ}$ C で 2 時間インキュベーションした。その後、Pronase E/0.1M Tris-HCl 緩衝液 (pH7.2) 2mg/mL を 500 μ L 添加し、40 $^{\circ}$ C でさらに 12 時間インキュベーションした。抽出溶液を遠心分離して不溶物を取り除いた後、少量の 5M 塩酸を加えて液性を pH3 程度にして、固相抽出溶液とした。

3.1.1.4. 超音波抽出下酵素消化法

細片化した毛髪試料 20 mg に、IS のメタノール溶液 (10 μ g/mL) 10 μ L 添加し、DTT/1.4M Tris-HCl 緩衝液 (pH7.3) 20 mg/mL を 500 μ L 添加し、Pronase E/1.4M Tris-HCl 緩衝液 (pH7.3) 2.5 mg/mL を 500 μ L 添加し、超音波抽出下、30 $^{\circ}$ C で 30 分間抽出を行った。抽出溶液を遠心分離して不溶物を取り除いた後、少量の 5M 塩酸を加えて液性を pH3 程度にして、固相抽出溶液とした。

3.1.2. 固相抽出

固相抽出カラムは OASIS HLB (3 cc、60 mg、waters) を用いた。MeOH、水 2 mL ずつを順に流して活性化しておいたカラムに、固相抽出溶液をアプライし、0.1M 塩酸 1 mL で洗いこみをした。10%メタノール溶液で洗浄後、2%ギ酸メタノール溶液にて、薬物を溶出させた。

3.1.3. UPLC-MS/MS 分析

2.1.2. の溶出液を窒素気流下で乾固し、0.1%ギ酸溶液/アセトニトリル (85/15) 300 μ L に溶解し、UPLC-MS/MS 分析試料とした。UPLC-MS/MS 分析は、ACQUITY UPLC PREMIA (waters) を

用いて、以下の分析条件で測定した。

LC/MS/MS 分析条件

カラム: ACQUITY UPLC HSS T3 (2.1 x 100 mm,
1.8 μ m, Waters)

移動相 A 液: 0.1%ギ酸溶液

移動相 B 液: 0.1%ギ酸アセトニトリル溶液

グラジエント条件 (A 液/B 液): 85/15 (0 min)-8
0/20 (6 min) - 10/90 (10 min)

流速: 0.3 mL/min

カラム恒温槽温度: 40 $^{\circ}$ C

検出器: 質量分析計

注入量: 2 μ L

イオン化法: ESI ポジティブモード

乾燥ガス流量: 800 L/hr

コーンガス流量: 50 L/hr

乾燥ガス温度: 450 $^{\circ}$ C

キャピラリー電圧: 3000 V

コーン電圧: 35 V (フェンタニル, IS)、25 V (ノ
ルフェンタニル)

コリジョン電圧: 25 V (フェンタニル, IS)、20
V (ノルフェンタニル)

MRM モード: m/z 337.1 \rightarrow 187.9 (フェンタニ
ル定量)、337.1 \rightarrow 104.8 (フェンタニル
定性)、233.1 \rightarrow 83.8 (ノルフェンタニル
定量)、233.1 \rightarrow 149.8 (ノルフェンタニ
ル定性)、342.1 \rightarrow 187.9 (IS)

4. 分析法バリデーション

検量線はコントロール毛髪試料 20 mg に 0.1、
1、10、25、50、100 ng/mg hair となるように
各々の薬物及び内部標準溶液を加え、前述の分
析法に従って分析し、IS に対する各薬物のピー
ク面積比から作成した。真度及び精度は、コン
トロール毛髪試料に各薬物濃度 1、10、50 ng/
mg hair 添加し、全分析操作の各 3 回ずつの繰
り返し測定を行い算出した。

C. 結果と考察

1. 毛髪試料の抽出法の検討

薬物の毛髪試料からの抽出法には、さまざま

な方法が報告されている。その中で、主に、アルカリによる毛髪そのものを可溶化してからの抽出及び酸性メタノールでの抽出が、行われている。予試験として、コントロール毛髪試料に薬物を添加して、1M 水酸化ナトリウム溶液⁵⁾及びメタノール/5M 塩酸 (20/1) 溶液⁶⁾により毛髪から薬物を抽出し、固相抽出による精製後、UPLC-MS/MS 分析を行なった。その結果を図 4 に示した。アルカリ可溶化でのフェンタニル及びノルフェンタニルの回収率は各々、54 及び 32% であった。また、酸性メタノールでは、各々、101 及び 98% であった。アルカリ可溶化での低い回収率の原因は、薬物のアルカリ溶液中での分解であると考えられた。

近年、酵素消化による薬物の毛髪試料からの抽出法が報告されており、特に、超音波抽出下酵素消化法は、その他の抽出法に比較して極めて短時間に処理できる利点がある。そこで、酵素消化抽出法での薬物の添加回収実験を検討した。酵素消化法でのフェンタニル及びノルフェンタニルの回収率は、各々、98 及び 99% であった。また、超音波抽出下酵素消化法では、93 及び 100% であった。両者とも、良好な回収率が得られた。

以上の結果に基づき、酸性メタノール、酵素消化法及び超音波抽出下酵素消化法による、クエン酸フェンタニル投与ラット毛髪試料からの抽出効率を検討した。得られた結果を、図 5 に示した。酸性メタノールでは、フェンタニル 61.2 ng/mg hair 及びノルフェンタニル 4.1 ng/mg hair であった。また、酵素消化法では、フェンタニル 58.9 ng/mg hair 及びノルフェンタニル 4.2 ng/mg hair であった。両者はほぼ同じ値を示した。一方で、超音波抽出下酵素消化法は、フェンタニル 38.2 ng/mg hair 及びノルフェンタニル 3.3 ng/mg hair であった。酸性メタノール及び酵素消化法に比較して、フェンタニルが約 65%、ノルフェンタニルが約 80% と抽出効率が悪かった。酸性メタノール及び酵素消化法とも

に良い結果が得られた。

2. 固相抽出における溶出条件の検討

固相抽出には、生体試料中乱用薬物の精製に用いられ、簡便で汎用性の高い OASIS HLB を用いた。フェンタニル及びノルフェンタニルの各 100ng/mL の 0.1M 塩酸溶液について、溶出溶媒の条件を、2% 塩酸メタノール溶液、メタノール溶液及び 2% アンモニア水 (25%) メタノール溶液の 3 種類について回収率の検討を行った。回収率は、予め作成した各薬物の標準溶液の絶対検量線 (1-1000 ng/mL) を基準に算出した。結果は 3 種溶媒ともにほぼ 100% 回収された。そこで、実試料でのイオンサプレッションを調べることにした。

ラットコントロール毛髪試料 10mg から上述のメタノール/5M 塩酸抽出法による抽出を行い、上記 3 種類の溶出条件で溶出させて精製した液に、標準溶液を添加し、UPLC-MS/MS 分析を行なった。その結果、標準溶液に比較して、フェンタニル及びノルフェンタニルが、2% 塩酸メタノール溶液溶出で、各々 94、93%、メタノール溶液溶出で 87、85%、2% アンモニア水 (25%) メタノール溶液溶出で 68、90% 回収されることが明らかとなった。よって、フェンタニル及びノルフェンタニルともに最も良好な結果が得られた 2% 塩酸メタノール溶液で溶出を行うこととした。

3. 分析法バリデーション

分析法バリデーションは、良い結果の得られた酸性メタノール抽出法及び酵素消化法について行った。表 1 に酸性メタノール抽出法による毛髪試料の直線性、精度及び真度を示した。本分析法を用いて、毛髪試料の検量線を作成した結果、フェンタニル ($Y=0.0067X-0.0005$ 、 $R^2=0.9966$) (検出限界 $S/N>5$, 0.2 pg/mg)、ノルフェンタニル ($Y=0.013X+0.00174$ 、 $R^2=0.9992$) (検出限界 $S/N>5$, 0.1 pg/mg) が得られ、0.1~100 ng/mg hair において直線性が認められた。コントロール毛髪試料からは、いずれの

薬物も妨害するピークは認められなかった。

(図 2) 精度については、毛髪試料の 50、10 及び 1.0 ng/mg hair 添加で、フェンタニル 1.10-2.93% 及びノルフェンタニル 4.02-4.36% が得られた。真度については、いずれも 10% 以下であった。表 2 に、酵素消化法による毛髪試料の直線性、精度及び真度を示した。毛髪試料の検量線を作成した結果、フェンタニル ($Y=0.0075X-0.0121$ 、 $R^2=0.9969$)、ノルフェンタニル ($Y=0.0126X+0.00238$ 、 $R^2=0.9968$) が得られ、0.1~100ng/mg hair において直線性が認められた。コントロール毛髪試料からは、いずれの薬物も妨害するピークは認められなかった。精度については、毛髪試料の 50、10 及び 1.0 ng/mg hair 添加で、フェンタニル 1.24-3.42% 及びノルフェンタニル 5.68-8.78% が得られた。真度については、いずれも 15% 以下であった。酸性メタノール抽出法に比較して若干精度及び真度が悪かったが、分析法として十分に良好であった。クエン酸フェンタニル 1mg/kg を 10 日間腹腔内投与した DA ラットの毛髪試料を UPLC-MS/MS で測定した。その際のクロマトグラムを図 3 に示した。ラット毛髪からは、フェンタニルが 50.9 - 67.1 ng/mg hair、ノルフェンタニルが 1.81 - 4.12 ng/mg hair 検出された。

4. UPLC 分析

図 2 に示した様に、UPLC カラムをもちいることで、フェンタニル、ノルフェンタニルは良好な分離を示しながらそれぞれ 3.0 分、1.6 分に溶出し、迅速分析が可能であることが明らかとなった。

5. まとめ

薬物の毛髪試料からの抽出法に関しては、メタノール/5M 塩酸抽出法及び酵素消化法の両者とも良好結果が得られた。また、超音波抽出下酵素消化法も前 2 者に比較してフェンタニルが約 65%、ノルフェンタニルが約 80% と抽出効率が若干落ちるが、その迅速性を考慮すると定性分析として、有用であると考えられた。精製

法については、固相抽出により、効率良く精製できた。薬物添加コントロール毛髪試料を用いて、本分析法のバリデーションを検討したところ、良好な結果が得られた。クエン酸フェンタニルを摂取したヒトでの試料は入手できなかったため、ヒト試料には本分析法を適応できなかったが、ラット試料の結果から、ヒトでのクエン酸フェンタニル使用暦を推定するための手段として、本分析法が適応可能であることが示唆された。

E. 健康危機情報

特になし。

F. 研究発表

学会発表

日本分析化学会第 58 年会（札幌）発表予定

参考文献

- Downes J. J., Kemp R. A., Lambertsen, *J. P.armacol. Exp. Ther.*, 1967, 158, 416-417
- Kikura-Hanajiri R, Hayashi M, Saisho K, Goda Y., *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2005, 825(1), 29-37
- Moore C., Marinetti L., Coulter C., Crompton K., *Forensic Sci. Int.*, 2008, 176(1), 47-50
- Kintz P., Villain M., Dumestre V., Ciriemele V., *Forensic Sci. Int.*, 2005, 153, 81-84
- Schneider S., Ait-M-Bark Z., Schummer C., Lemmer P., Yegles M., Appenzeller B., Wennig R, *J. Anal. Toxicol.*, 2008, 32(3), 260-4
- Nakahara Y, Kikura R, *Biol. Pharm. Bull.*, 1995, 18, 267-72
- Scott PM, Weber D, Kanhere SR, *J. Chromatogr. A*, 1997, 765, 255-63

表1 メタノール/5M 塩酸抽出法によるラット毛髪試料中薬物分析における直線性、精度及び真度

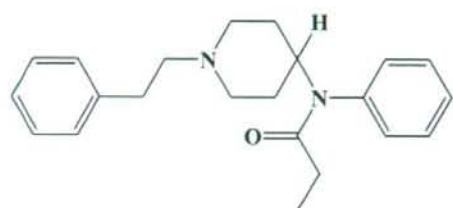
Compounds	Linear range (ng /mg hair)	Linearity	Precision (%)		Accuracy (%)	
			(ng/mg hair)	%	(ng/mg hair)	%
fentanyl	0.1-100	$y=0.0067x+0.0005$ $R^2=0.9966$	50	1.10	50	0.10
			10	2.93	10	1.18
			1.0	2.56	1.0	-8.39
norfentanyl	0.1-100	$y=0.013x-0.0174$ $R^2=0.9992$	50	4.02	50	0.21
			10	4.16	10	0.52
			1.0	4.36	1.0	-2.21

表2 酵素消化法によるラット毛髪試料中薬物分析における直線性、精度及び真度

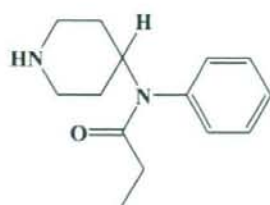
Compounds	Linear range (ng /mg hair)	Linearity	Precision (%)		Accuracy (%)	
			(ng/mg hair)	%	(ng/mg hair)	%
fentanyl	0.1-100	$y=0.0075x+0.0121$ $R^2=0.9969$	50	3.42	50	-7.39
			10	1.24	10	5.26
			1.0	1.65	1.0	-14.2
norfentanyl	0.1-100	$y=0.0126x+0.0238$ $R^2=0.9968$	50	6.23	50	2.26
			10	8.78	10	-0.68
			1.0	5.68	1.0	-5.61

表3 クエン酸フェンタニル (1mg/kg x 10日間) 投与ラット毛髪中の薬物濃度 (n=3)

Compound	RAT1 (ng/mg hair ± SD)	RAT2 (ng/mg hair ± SD)	RAT3 (ng/mg hair ± SD)
fentanyl	61.2 ± 1.3	67.1 ± 1.5	50.9 ± 0.5
norfentanyl	4.12 ± 0.18	3.68 ± 0.11	1.81 ± 0.07



フェンタニル



ノルフェンタニル

図1 フェンタニル及びノルフェンタニルの構造

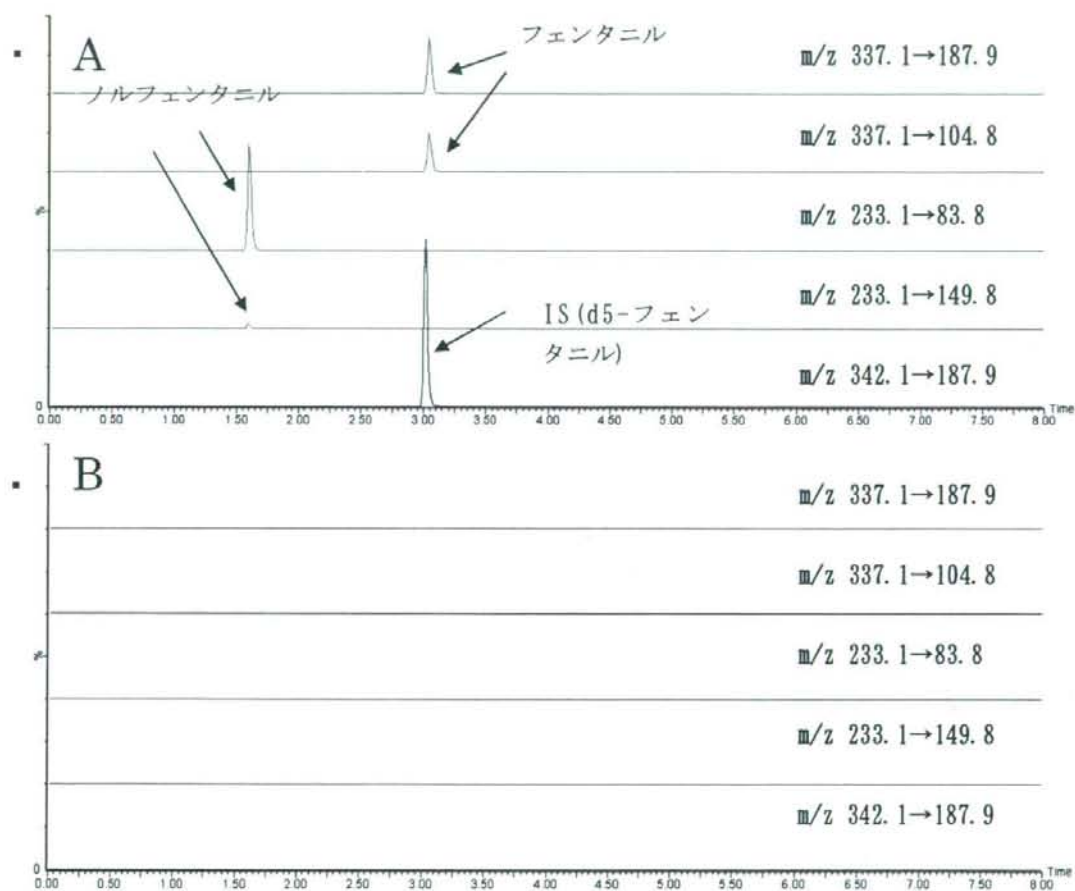


図2 フェンタニル及びノルフェンタニル (各 50 ng/mg hair) 添加ラット毛髪試料抽出物のクロマトグラム (A)、ラットコントロール毛髪試料抽出物のクロマトグラム (B)

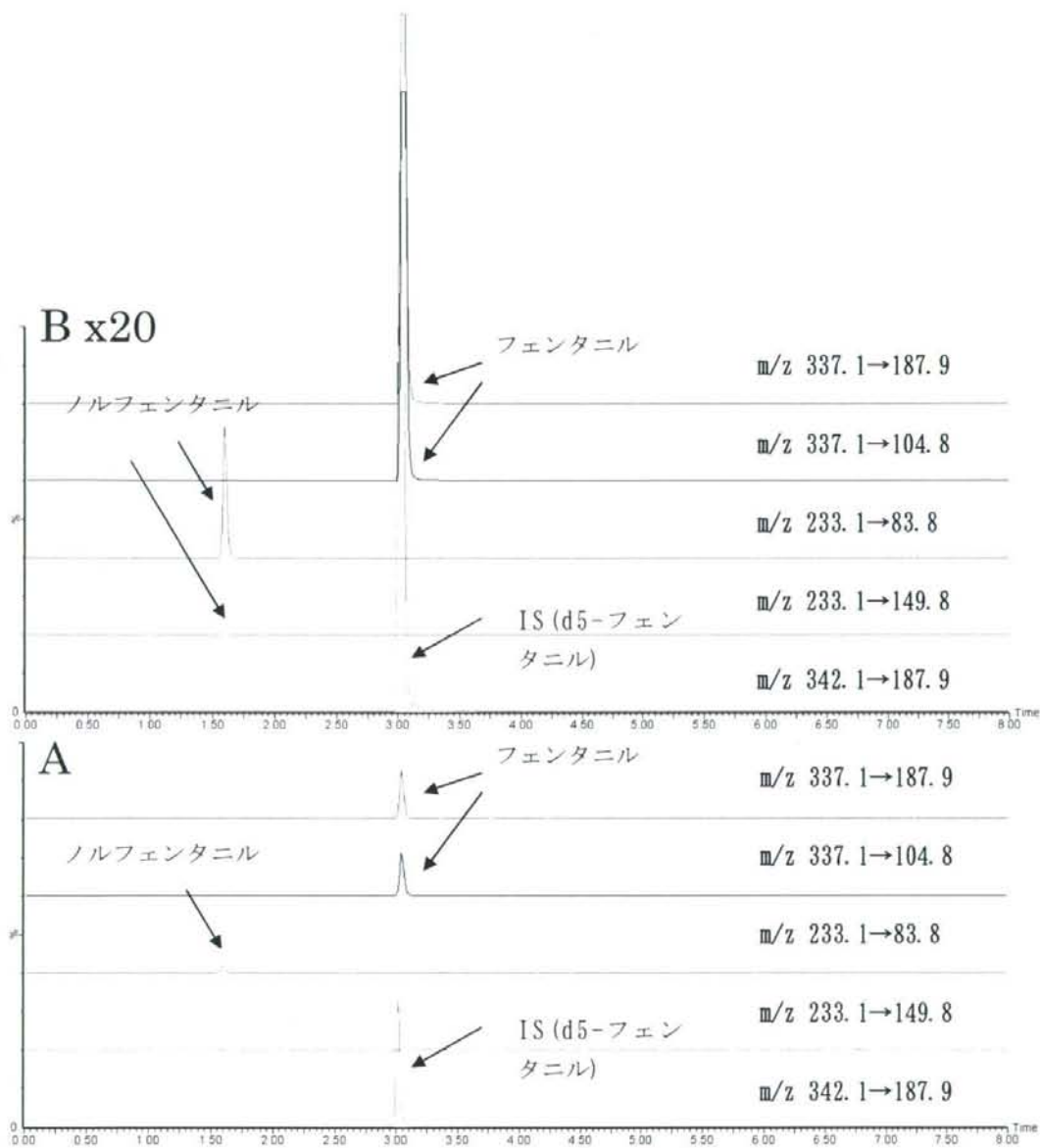


図3 クエン酸フェンタニル投与ラット毛髪試料抽出物のクロマトグラム (A) 及びAを20倍拡大したクロマトグラム (B)

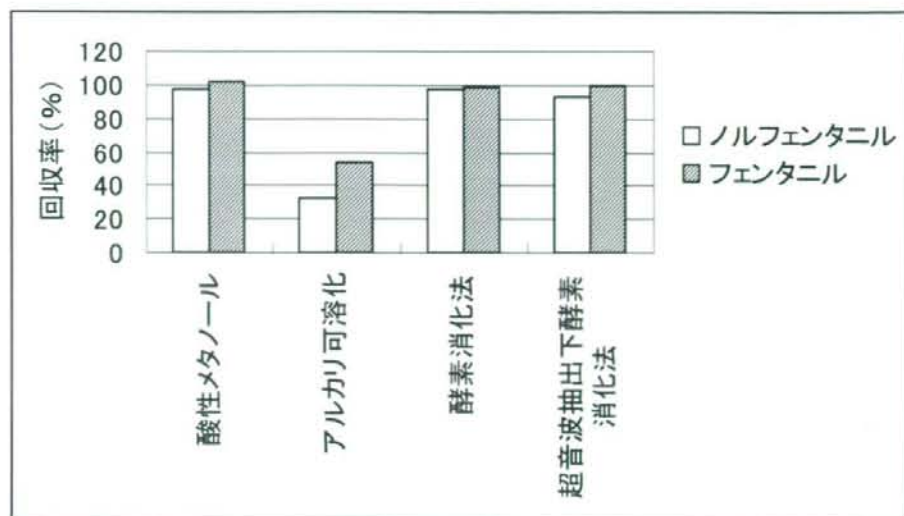


図4 フェンタニル (10 ng/mg hair) 及びノルフェンタニル (10 ng/mg hair) 添加ラット毛髪試料からの各種抽出法における添加回収率 (n=3)

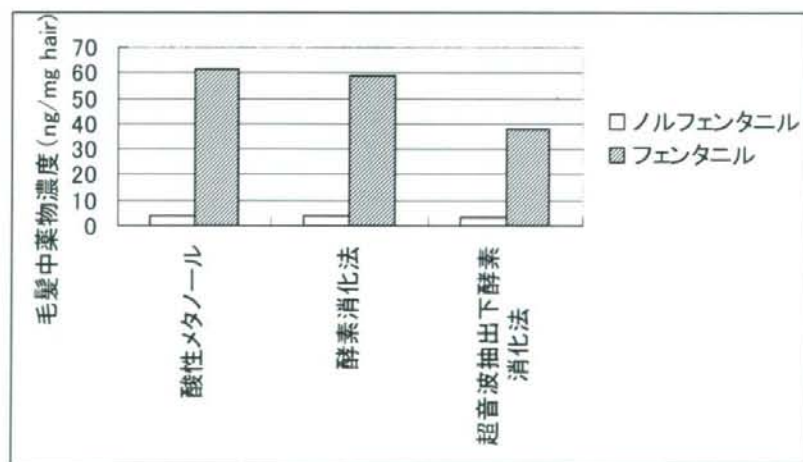


図5 クエン酸フェンタニル投与ラット毛髪試料からの各種抽出法における薬物濃度 (n=3)

分担研究報告書

分担研究課題 薬物の分析と同定に関する研究

分担研究者 花尻瑠理 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 室長

研究協力者 木本 茂 関東信越厚生局麻薬取締部 鑑定官

近赤外分光光度計を用いる乱用薬物分析法の検討

要旨 捜査現場における違法薬物の簡易試験は一般に呈色反応を利用して行われている。しかしながら、近年、乱用される薬物の種類が増加し、呈色試験のみでは識別困難な事例が散見される。そこで非破壊検査法として食品・医薬品等の品質管理に利用される近赤外分光光度計に着目し、これが乱用薬物試験分野でも有効な試験法となり得るかどうかの基礎的な検討を行った。その結果、捜査現場への携行が容易で、分析が迅速に行える等現場試験としての操作性に優れており、現場での薬物簡易試験に応用可能であることが示唆された。

A. 研究目的

薬物捜査現場における簡易試験は、一般に、携行に適し、操作・判定が簡便な呈色試験が用いられている。アンフェタミン系違法薬物では、通常マルキス試験（硫酸+ホルムアルデヒド）で発見物のスクリーニング試験を行い、橙赤色を示す覚せい剤メタンフェタミンや黒色を示す麻薬 3,4-メチレンジオキシメタンフェタミン（MDMA）にはさらにシモン試験（炭酸ナトリウム水溶液+アセトアルデヒド/エタノール+ニトロプルシッドナトリウム水溶液）を適用してそれら二級アミンの陽性反応である青藍色を呈するか否かの確認を行なう。しかしながら近年、薬物乱用が多様化し、現場で遭遇する規制薬物の種類が増加したことから呈色試験のみでは現場での違法薬物識別が混乱する事態が危惧される。これを解消する手段として呈色反応より定性能力の高いフーリエ変換型赤外分光光度計やラマン分光光度計などの光学分析機器を現場で使用しようとする試みがなされているが、携帯の容易性や安定したスペクトル取得、被包・夾雑物等の影響などの点で難点があり、捜査現場では実用化されていない。近赤外分光光度計（NIR）は波長 $0.8\mu\text{m}\sim 2.5\mu\text{m}$ の領域の吸光度を測定し、禁制遷移である

倍音、結合音に基づく分光法である。これらの吸収は中赤外領域に比べて弱いが透過性に優れ、いろいろな形態のサンプルに適用できる利点があって、非破壊検査法として食品や化成品の品質管理等に用いられている。しかしながら乱用薬物試験分野においてはMDMA錠剤の純度測定等数件の応用例^{1)~3)}しか報告されていない。本研究では、NIRが捜査現場簡易試験として利用できるかどうかの基礎的な検討を行った。

B. 研究方法

1. 試料

分析対象試料として関東信越厚生局麻薬取締部保管の鑑識用麻薬等、研究用麻薬及び同部が押収した不正薬物を用いた。

2. 分析装置

(1) NIRスペクトルの測定
近赤外線分光光度計 PlaScan-W (システムエンジニアリング社製)

(2) 多変量解析ソフトウェア

EXCEL 多変量解析 Ver.5.0 (株式会社エスミ)

3. 分析条件

波長範囲：1.2~2.5 μm

測定点数：801点