

図1 頭髪試料 (2-3 cm) メタノール抽出物の PFP 誘導体化合物の(A)トータルイオンクロマトグラム (Scan mode) 及び(B)保持時間 8.79 分のピークのマスペクトル (上段) とライブラリーサーチ結果 (下段)

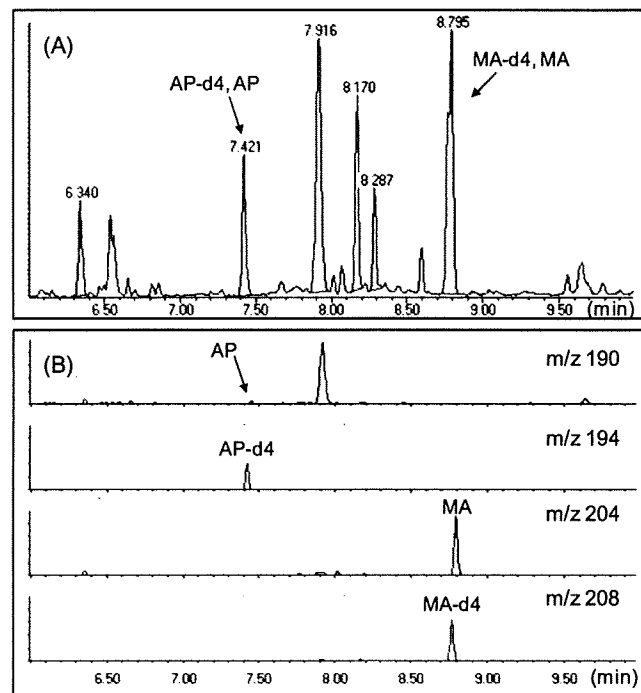


図2 頭髪試料 (2-3 cm) メタノール抽出物の PFP 誘導体化合物の(A)トータルイオンクロマトグラム (SIM mode) 及び(B)各イオンクロマトグラム

表 1 頭髪試料の各画分の MA 及び AP 濃度

Compounds	Length										
	Concentrations (ng/mg)										
	0-1cm	1-2 cm	2-3 cm	3-4 cm	4-5 cm	5-6 cm	6-7 cm	7-8 cm	8-9 cm	9-10 cm	> 10 cm
Methamphetamine	0.2	10.4	15.2	10.2	8.7	4	1.4	0.2	TR	ND	ND
Amphetamine	0.1	0.9	1.3	1	0.6	0.3	ND	ND	ND	ND	ND

\*TR: >0.1 ng/mg, ND: Not detected

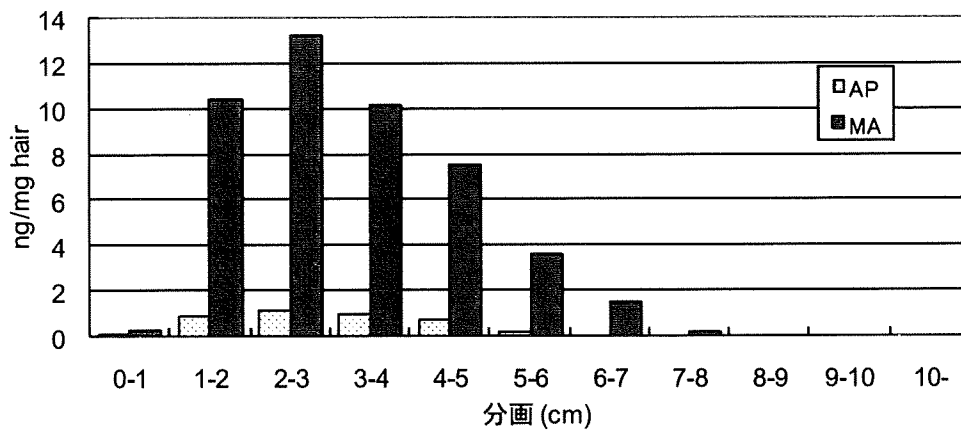


図 3 頭髪試料の各画分における MA 及び AP 濃度変化

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

研究分担者 花尻瑠理 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 室長

蛍光誘導体化試薬を用いる尿中薬物の迅速確認法の検討

研究協力者 津村ゆかり 近畿厚生局麻薬取締部神戸分室 鑑定官

研究要旨 尿中薬物を蛍光誘導体化試薬 4-(4,5-diphenyl-1*H*-imidazol-2-yl)benzoyl chloride (DIB-Cl)と反応させて蛍光検出器付 HPLC で分析する方法（平成 19 年度に報告）を、新規指定麻薬 7 化合物に適用した。尿に添加した薬物（1 μg/mL）の回収率は 69.6～119.4 %であり、検出下限値は尿中濃度として 0.01～0.2 μg/mL であった。フェネチルアミン系薬物のみでなく、ピペラジン系薬物である TFMPP 等及びトリプタミン系薬物である AMT にも適用可能であった。

研究協力者

高木敏之 近畿厚生局麻薬取締部 主任鑑定官

A. 研究目的

著者らは平成 19 年度の本研究事業において、尿中のフェネチルアミン系麻薬・覚せい剤 18 種を 4-(4,5-diphenyl-1*H*-imidazol-2-yl)benzoyl chloride (DIB-Cl)<sup>1-6)</sup>により誘導体化して蛍光検出器付高速液体クロマトグラフィー (HPLC)で検出する方法を報告した。

この試験法は、アセトニトリルと混合してろ過した尿に DIB-Cl 試薬を加えて 10 分間室温で放置するという簡便な操作で実施でき、鑑定においてガスクロマトグラフィー質量分析 (GC-MS)を補完する試験法となる。また、試料液は GC-MS のものとは別に調製するため、試験操作中の汚染が無いことの裏付けを提供する。

薄層クロマトグラフィー (TLC)も簡便な確認法であるが、薬物が低濃度の場合、TLC のスポットは肉眼で観察できても写真撮影で明瞭な画像が得られないことがある。これに対して HPLC では明確なデータを残すことができ、鑑定

データの保存の面で利点がある。

今年度は、上記方法を近年新規に麻薬指定された 7 種の薬物に適用した。フェネチルアミン系に限らず、トリプタミン系及びベンジルピペラジン系の薬物も検討対象とした。その結果を報告する。

B. 研究方法

1. 試薬

薬物標準品：表 1 に示した 11 種の薬物を用いた。AP は硫酸塩、BZP は遊離塩基であり、その他は塩酸塩である。また、不斉炭素原子を有する薬物の中で AP 及び MP は S アイソマー（右旋性）、その他はラセミ体である。

標準混合溶液：下記の組み合わせで 2 グループに分けて作製した。原液は 0.5～1 mg/mL のメタノール溶液とし、混合して水で希釈した。

A 液 AMT、AP、BZP、2C-T-2、3CPP、2C-T-4

B 液 MDA、MDMA、MP、2C-I、TFMPP

炭酸塩緩衝液： 10mM NaHCO<sub>3</sub>水溶液に 10mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>を加え、pH9.0 とした。

0.1mM DIB-Cl 試液： 東京化成工業(株)

4-(4,5-diphenyl-1*H*-imidazol-2-yl)benzoyl

chloride hydrochloride の 0.1mM アセトニトリル溶液

アセトニトリル、メタノール、蒸留水：HPLC 用

その他の溶媒及び無機試薬：特級

## 2. HPLC 条件

装置：島津 LC-20A

カラム：①Waters Atlantis dC18 (5  $\mu$ m, 4.6 x 150 mm)、②Imtakt Cadenza CD-C18 (3  $\mu$ m, 4.6 x 250 mm)

移動相：メタノール・アセトニトリル・水 (40:30:30)

流速：① 1 mL/min、② 0.8 mL/min

注入量：5  $\mu$ L

検出器設定値：励起波長 325nm、測定波長 430nm

カラム温度：40°C

## 3. 試料液調製方法

### (1) 尿試料

尿 100  $\mu$ L にアセトニトリル 900  $\mu$ L を加え、ボルテックスミキサーで攪拌した後、0.45  $\mu$ m のメンブランフィルターでろ過した。このろ液 100  $\mu$ L を共栓付き褐色遠沈管に入れ、10mM 炭酸塩緩衝液 50  $\mu$ L を加えた。これに 0.1mM DIB-C1 アセトニトリル溶液 800  $\mu$ L を加え、ボルテックスミキサーで攪拌した後、室温にて 10 分間放置し、28%アンモニア水 50  $\mu$ L を加えた。

### (2) 標準溶液

薬物の水溶液 10  $\mu$ L 及びアセトニトリル 90  $\mu$ L を共栓付き褐色遠沈管に入れ、10mM 炭酸塩緩衝液 50  $\mu$ L を加えた。これに 0.1mM DIB-C1 アセトニトリル溶液 800  $\mu$ L を加え、ボルテックスミキサーで攪拌した後、室温にて 10 分間放置し、28%アンモニア水 50  $\mu$ L を加えた。

## 4. 添加回収試験

薬物の混合水溶液をボランティアの尿に加え、添加回収試験を実施した。

## C. 研究結果

### 1. 保持時間及び検出下限

各薬物の DIB 誘導体化物の保持時間及び検出下限を表 2 に示した。アンフェタミン、メタンフェタミン、MDA、MDMA は平成 19 年度に検討済みであるが、データ比較のために加えた。

検出下限は基本的にベースラインノイズ高さの 3 倍相当の高さを与える薬物量とした。ただし、AP、MDMA、MP については当該保持時間に試薬由来の妨害ピークが常に出現するため、妨害ピークの高さの 3 倍相当を検出下限とした。また、AMT は試薬由来の大きなピークに近接しているため、肩として確認できる最低濃度を検出下限とした。以上の通り求めた検出下限値は、尿中濃度として 0.01~0.2  $\mu$ g/mL であった。

検量線は検出下限~500 pg の範囲で相関係数 0.999 以上の直線性が得られた。従って添加回収試験は一点検量で行った。

### 2. 尿への添加回収

尿に添加した薬物 (1  $\mu$ g/mL) の回収率は、表 3 に示した通り 69.6~119.4 % であった。フェネチルアミン系薬物のみでなく、ピペラジン系薬物である TFMPP、BZP、3CPP 及びトリプタミン系薬物である AMT にも適用可能であった。

### 3. クロマトグラム

HPLC 条件①及び②によるクロマトグラムを、それぞれ図 1 及び図 2 に示した。AMT のピークは、条件②においては試薬由来の妨害ピークと分離しなかった。

## D. 考察

1. DIB-C1 は 2 級アミンまたは 1 級アミンと反応するが、反応生成物の与えるピークの大きさは化合物によって大きく異なることが平成 19 年度の検討で示されている。今回対象とした中で、ピペラジン系の 3CPP と TFMPP は、検出はできるものの感度が低かった。同じピペラジン系でも BZP は比較的強度の大きいピークが得られた。これらの差は、反応収率または生成物の蛍光係数の違いによると考えられる。

## 2. 妨害ピークの影響

本法においては、試薬由来と考えられる妨害ピークが多数出現する。大きなものは保持時間10分以前に集中しているが、その後にもいくつかの妨害ピークが現れる。粒子径の小さいカラムの使用 (HPLC 条件②) 等の検討を行ったが、分離する条件は得られていない。

当部では本法を覚せい剤及びMDA・MDMAの鑑定に長年用いており、これらの薬物の保持時間付近については、多数の尿試料の鑑定データから、妨害ピークの出現する位置及び大きさを把握している。これらの妨害ピークの大きさは常に一定範囲内にある。

今後、鑑定嘱託例の少ない薬物にまで本法を適用するためには、より幅広い保持時間範囲にわたって妨害ピークの状況のデータを蓄積する必要がある。

なお、GC-MS及びGCの結果からおよその定量値を求め、その結果がHPLCの結果と整合性があることを確認すれば確実さは増す。また、濃縮した尿を試料にすれば妨害ピークは相対的に小さくなり問題にならなくなる。

## 3. LC-MS/MS との比較

本法は蛍光検出を行っているため選択性が高いが、ピークの情報は保持時間と強度のみであり、タンデム型質量分析計を備えたHPLC (LC-MS/MS) に同定能力の点で劣っている。しかしながら、LC-MS/MSは初期費用・ランニングコスト共に高額であり、また、高感度であるが故に汚染も起こりやすいなど、使いづらい側面もある。

本法は比較的低価格の機器及び試薬を用いて簡便に対象化合物の確認を行えることから、LC-MS/MSに無い利点を持つと考えられる。

## 参考文献

1) Al-Dirbashi, O., Qvarnstrom, J., Irgum, K., Nakashima, K. (1998) Simple and sensitive high-performance liquid

chromatographic determination of methamphetamines in human urine as derivatives of 4-(4,5-diphenyl-1H-imidazol-2-yl) benzoyl chloride, a new fluorescence derivatization reagent. *J. Chromatogr. B*, **712**, 105-112.

2) Al-Dirbashi, O., Kuroda, N., Menichini, F., Noda, S., Minemoto, M., Nakashima, K. (1998) Enantioselective high-performance liquid chromatography with fluorescence detection of methamphetamine and its metabolites in human urine. *Analyst*, **123**, 2333-2337.

3) Al-Dirbashi, O., Wada, M., Kuroda, N., Inuduka, S., Nakashima, K. (1999) Enantiomer-specific high-performance liquid chromatography with fluorescence detection of methamphetamines in abusers' hair and urine. *Biomed. Chromatogr.*, **13**, 543-547.

4) Al-Dirbashi, O., Qvarnstrom, J., Irgum, K., Nakashima, K. (1999) Simple and sensitive HPLC determination of methamphetamines in human urine as derivatives of 4-(4,5-diphenyl-1H-imidazol-2-yl) benzoyl chloride, a new fluorescence derivatization reagent. *Biomed. Chromatogr.*, **13**, 137-138.

5) Al-Dirbashi, O. Y., Wada, M., Kuroda, N., Takahashi, M., Nakashima, K. (2000) Achiral and chiral quantification of methamphetamine and amphetamine in human urine by semi-micro column high-performance liquid chromatography and fluorescence detection. *J. Forensic. Sci.*, **45**, 708-714.

6) Kaddoumi, A., Kikura-Hanajiri, R., Nakashima, K. (2004) High-performance liquid chromatography with fluorescence

detection for the simultaneous determination of 3,4-methylenedioxy-methamphetamine, methamphetamine and their metabolites in human hair using DIB-Cl as a label. *Biomed. Chromatogr.*, **18**, 202-204.

E. 健康危機情報

なし

F. 研究発表

なし

表1 検討対象とした薬物

番号	略称	新規規 制薬物	化合物名
1	AMT	○	$\alpha$ -methyltryptamine
2	MDA		3,4-methylenedioxyamphetamine
3	AP		amphetamine
4	MDMA		3,4-methylenedioxymethamphetamine
5	BZP	○	1-benzylpiperazine
6	MP		methamphetamine
7	2C-T-2	○	2,5-dimethoxy-4-ethylthiophenetylamine
8	2C-I	○	2,5-dimethoxy-4-iodophenetylamine
9	3CPP	○	1-(3-chlorophenyl)piperazine
10	TFMPP	○	1-(3-trifluoromethylphenyl)piperazine
11	2C-T-4	○	2,5-dimethoxy-4-isopropylthiophenetylamine

表2 各化合物のDIB誘導体化合物のHPLC条件①における保持時間と検出下限

番号	薬物名	RT(min)	LOD(注入 量、 $\mu\text{g}$ )	LOD(尿中濃度換 算、 $\mu\text{g/mL}$ )
1	AMT	9.9	5	0.1
2	MDA	10.5	0.5	0.01
3	AP	11.7	10	0.2
4	MDMA	12.6	10	0.2
5	BZP	13.5	1	0.02
6	MP	14.3	10	0.2
7	2C-T-2	17.7	2	0.04
8	2C-I	18.7	1	0.02
9	3CPP	19.2	10	0.2
10	TFMPP	21.1	10	0.2
11	2C-T-4	22.8	2	0.04

薬物の遊離塩基に換算した量で示した。算出方法は本文に記載。

表3 各化合物の尿に対する添加回収率(HPLC条件①)

番号	薬物名	平均 (%)	SD (%)
1	AMT	103.9	8.6
2	MDA	96.0	6.6
3	AP	99.2	9.4
4	MDMA	91.7	6.5
5	BZP	106.2	10.1
6	MP	88.1	7.3
7	2C-T-2	111.7	11.8
8	2C-I	94.0	7.0
9	3CPP	69.6	13.6
10	TFMPP	100.3	10.3
11	2C-T-4	119.4	15.0

1  $\mu\text{g/mL}$ 添加、各3試行の平均値

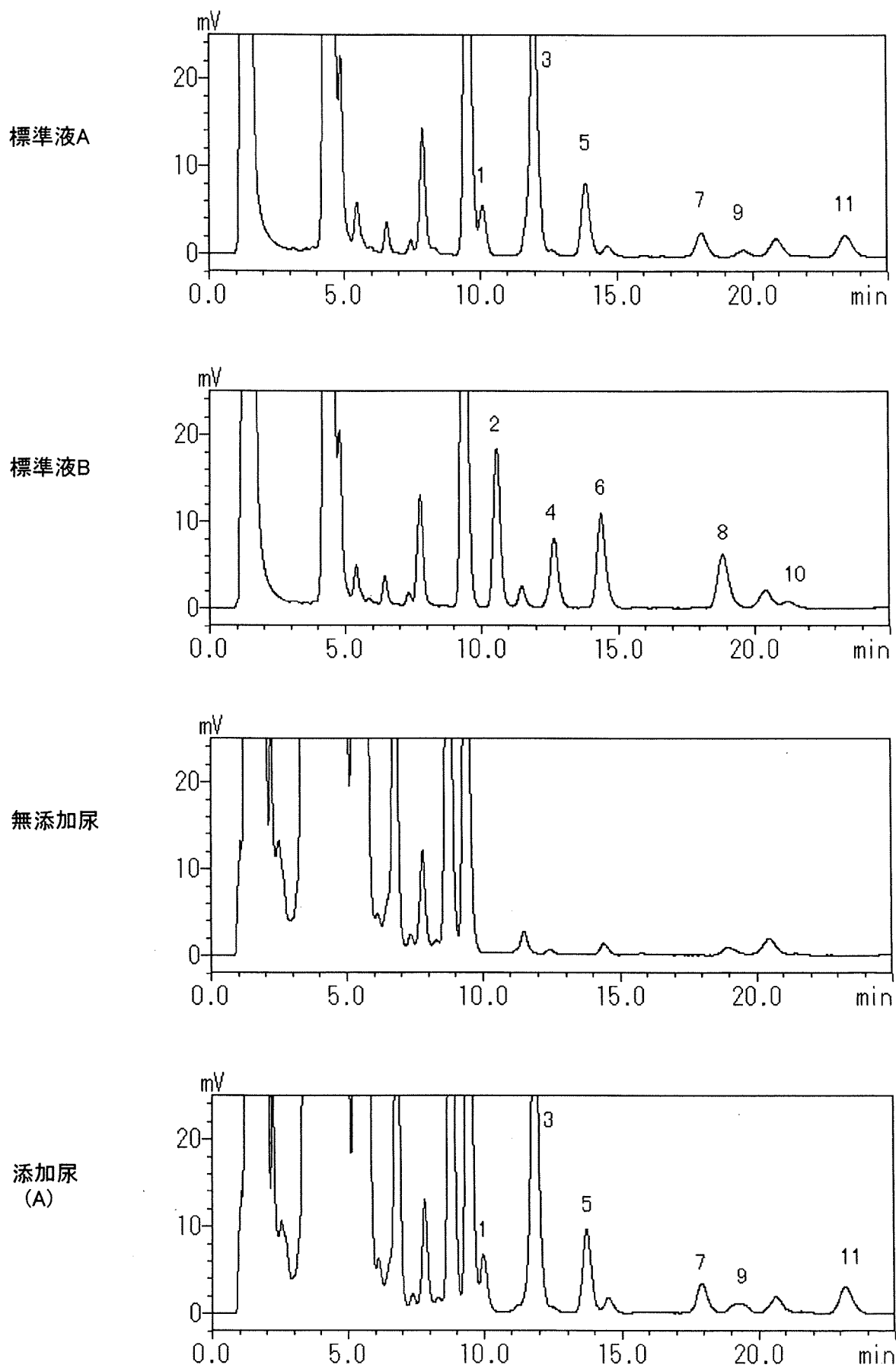


図1 HPLC条件①によるクロマトグラム(いずれも各薬物の尿中濃度として $1\mu\text{g/mL}$ )



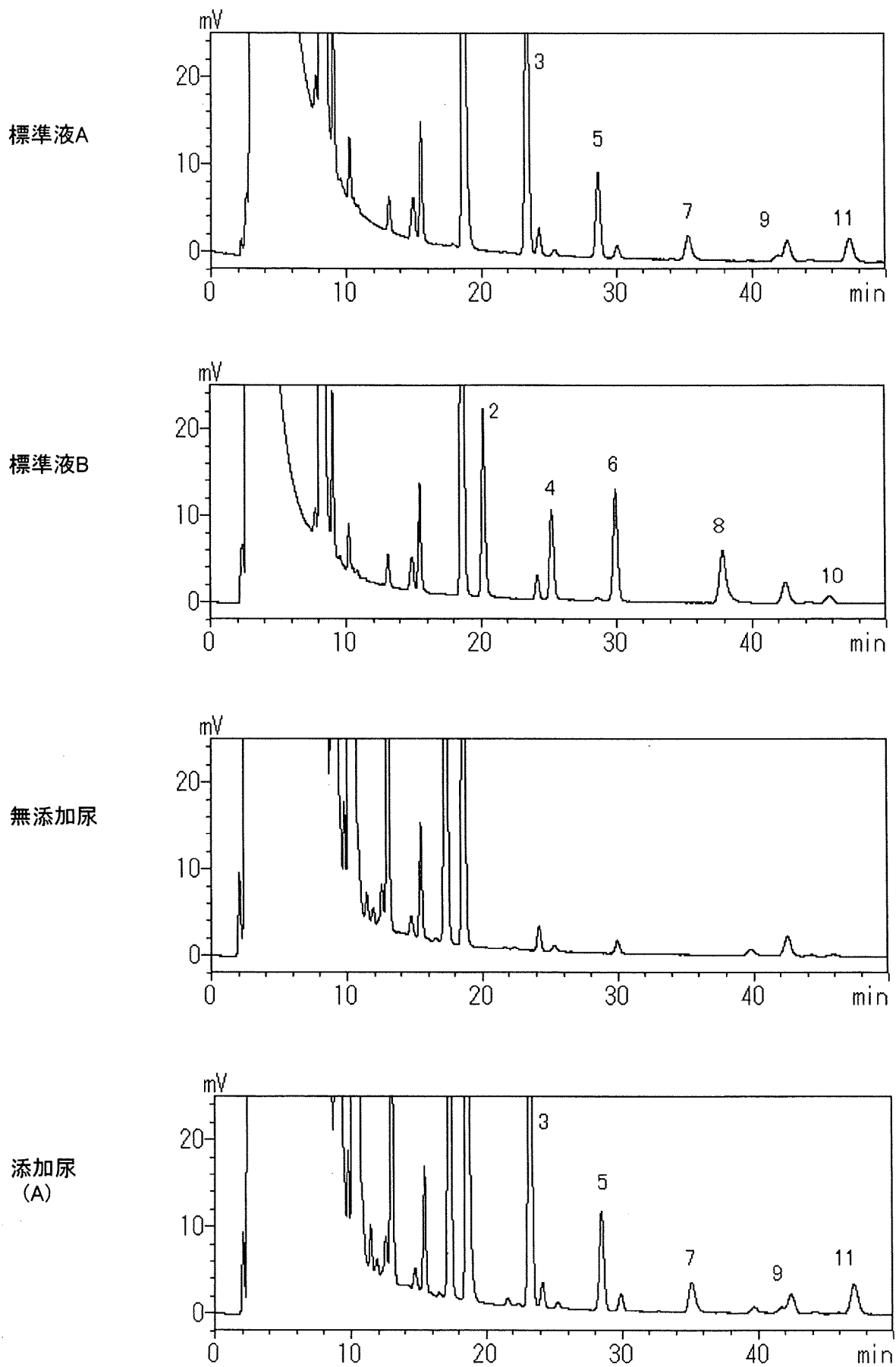


図2 HPLC条件②によるクロマトグラム(いずれも各薬物の尿中濃度として $1\mu\text{g/mL}$ )

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

液体クロマトグラフ-タンデム質量分析計及びデータベース検索ソフトを用いる

尿中薬物スクリーニング法の検討

研究協力者 高木敏之 近畿厚生局麻薬取締部 主任鑑定官

研究要旨 液体クロマトグラフ-タンデム質量分析計(LC-MS/MS)及びデータベース検索ソフトを用いて、尿中の規制薬物及び代謝物を迅速にスクリーニングする方法を検討した。16種の化合物の混合標準溶液を用いて検出状況を調べた結果、検出下限濃度は化合物によって1 ng/mL以下から500 ng/mLまで幅があった。2検体の健常者の尿に添加した場合も類似の検出下限値となり、尿成分の影響は小さかった。鑑定嘱託された尿60検体を用いて本法の実用性を検討した。クロマトグラムを目視またはGC-MSによる測定で薬物が確認されたにもかかわらず、データベース検索では不検出となる場合があった。鑑定において実用に供するためには、前処理法や検索パラメータの再検討を行って検出下限を引き上げることが必要と考えられた。

研究協力者

津村ゆかり

近畿厚生局麻薬取締部神戸分室 鑑定官

ころである。これらはいずれも、嘱託事項において対象薬物が特定されている場合に適用可能である。

一方、複数薬物の乱用が疑われる被疑者については、対象薬物を特定せず、「麻薬を検出するか否か」との嘱託事項で鑑定依頼される場合がある。現在麻薬及び向精神薬取締法で麻薬に指定されている物質は154項目にのぼり、これらの測定条件の最適化のためには、一つ一つの標準品を用いた検討を行う必要がある。それには多くの費用と時間を要する。

分析される機会の多い化合物群については、LC-MS/MS装置メーカーが、自社製品で検討した測定条件やスペクトルをデータベースとして提供している。Cliquant<sup>TM</sup> Drug Screen & Quant（以下Cliquant<sup>TM</sup>と略）は、株式会社エービー・サイエックス（旧アプライドバイオシステムズジャパン株式会社）が販売している薬毒物スクリーニング・定量解析用ソフトウェアであり、

A. 研究目的

昨年度の本研究において著者らは、液体クロマトグラフ-タンデム質量分析計(LC-MS/MS)<sup>1)</sup>を尿中覚せい剤及び大麻成分代謝物の鑑定試験に利用する方法を確立し、報告した。この方法により、覚せい剤または大麻事犯に関わる鑑定について迅速・高感度なデータ取得が可能になった。

LC-MS/MS測定においては、対象化合物ごとにモニターイオンの選定、スプレー電圧・コーン電圧・ターボガス温度等の条件の最適化が必要である。当部においては、昨年度の研究成果を生かし、覚せい剤と大麻成分代謝物以外の主要な規制薬物についても同様に測定条件を確定してLC-MS/MSを日常の鑑定に利用していると

これを用いて 300 種の医薬品・乱用薬物・これらの代謝物を一斉にスクリーニング可能な測定条件「薬毒物スクリーニング分析 Ver1.0 iMethod™ テスト」(以下本法と略)が提供されている<sup>2-4)</sup>。本法が対象とする化合物には、表 1 に示した 31 種の規制薬物またはその代謝物が含まれている。これらの中には当部で標準品を保有していないものがあり、そのスペクトル情報等が利用できることは有益と考えられる。

著者らは、鑑定試験におけるこの方法の実用性を検討した。その結果若干の知見が得られたので報告する。

## B. 研究方法

### 1. 試薬

規制薬物標準品：表 1 で\*印を付けた 16 化合物。

モルヒネ塩酸塩、ジヒドロコデインリン酸塩、コデインリン酸塩、*d*-アンフェタミン硫酸塩、*d*-メタンフェタミン塩酸塩 (以上 大日本製薬)、ケタミン塩酸塩、THCCOOH (11-nor- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid, 1 mg/mL メタノール溶液 (以上 和光純薬)、コカイン塩酸塩 (武田薬品工業)、エクゴニンメチルエステル塩酸塩、ベンゾイルエクゴニン、6-O-モノアセチルモルヒネ、MDA 塩酸塩、MDMA 塩酸塩、ヘロイン、リゼルギド酒石酸塩、フェンシクリジン塩酸塩 (以上 国立医薬品食品衛生研究所より分与)

アセトニトリル、メタノール：HPLC 用

水：日本ミリポア製 Academic A10 にて製造

その他の溶媒及び無機試薬：特級

### 2. 標準溶液

薬物及び THCCOOH 標準品をメタノールに溶解または希釈して調製した。以下の文中、各薬物はそれぞれの遊離体としての濃度で示した。

### 3. 内部標準溶液

クロラゼパム水溶液 (100ng/mL)

### 4. 尿試料

ボランティア (成人) の尿 2 検体

鑑定嘱託された尿 60 検体

### 5. 試料液調製方法

尿 0.2mL にアセトニトリル 1.8mL を加えてボルテックスミキサーを用いて攪拌し、3000rpm、5 分間遠心分離した。この上澄液 1mL をとり、内部標準溶液 0.1mL を加え、試料液とした。

### 6. LC-MS/MS 条件

装置の条件は表 2 に、各化合物の測定条件は表 3 に示した。MRM は化合物ごとに最適なコリジョンエネルギー (CE) で測定し、イオン量が 1000cps を超えた場合に 3 段階の CE におけるスペクトルを取得した。

### 7. データ解析条件

得られたデータに対して次の解析を実施した。

1) Cliquid™を用いてライブラリ検索及び自動レポート化を実施した。ピーク純度閾値を基本的に 20% に設定した (デフォルトは 60%)。

2) Analyst™ (3200 Q TRAP を操作・データ処理するための基本的なソフト) を用いて個別の化合物ごとに目視でピーク及びスペクトルを確認した。IDA 基準 (1000cps 以上) を超えてスペクトルが取得され、保持時間のずれが  $\pm 5\%$  以内のものを「検出」と判定した。

### 8. 添加試験

薬物の水溶液を健常者の尿に添加して試験溶液を調製し、LC-MS/MS で測定して検出・不検出を判定した。

## C. 研究結果

### 1. 薬物等標準溶液に対するスクリーニング結果

16 種の化合物の混合標準溶液について本法によりスクリーニングを行い、化合物検出の有無を確認した結果、表 4 に示したとおりであった。検出下限濃度は化合物によって 1 ng/mL 以下から 500 ng/mL まで幅があった。

## 2. 尿に添加した薬物等のスクリーニング結果

健常者の尿 2 検体に 16 種化合物を添加してスクリーニングした結果を表 5 に示した。検出下限は標準溶液の場合と類似していた（尿は前処理により 11 倍に希釈）。図 1 にクロマトグラムを示した。

## 3. データベース検索と手動によるクロマトグラム確認との比較

2 通りの検出方法による結果の比較を表 6 に示した。16 化合物中 7 化合物において、手動による場合のほうが検出感度が高かった。

## 4. 鑑定試料における結果

鑑定試験において何らかの薬物または代謝物が検出された尿 50 検体を、本法により試験した。その結果、表 7 に示したとおり、GC-MS で検出された化合物が本法で検出されない場合があった。また、鑑定において陰性の尿 10 検体も別途試験した結果、対象化合物は、流路の汚染によると考えられるもの以外は検出されなかった。

なお、いずれの尿試料においても、ニコチン、テオフィリン、医薬品等がしばしば検出結果に含まれていた。（これらの化合物の同定は実施していない。）

## D. 考察

### 1. スクリーニングの感度

スクリーニング試験においては、ある程度の擬陽性を容認しても、できる限り低い濃度まで薬物を検出できることが望ましい。

今回本法（検索ソフト利用）と手動での確認とを比較した結果、検索でヒットしなくとも、手動で MRM クロマトグラム及び質量スペクトルを確認すれば目的化合物と判断できる場合があった。ライブラリ検索における一致度（純度）の閾値を下げて、ヒットする濃度の限界に大きな変化は見られなかった。

本法を鑑定で実用化するためには、試料の前処理法を変更して対象化合物濃度を高くす

る・検索パラメータを再検討する等の対応により検出下限を引き上げることが必要と考えられた。

## 2. 尿成分の影響

タンデム質量分析計は選択性の高い検出機器であるが、図 1 の尿試料のクロマトグラムにおいては、約 4 分までの保持時間に、尿由来成分と思われる夾雑ピークが複数認められる。また、尿 B においてはメタンフェタミンのピーク（8 番）が低くブロードになるなど、対象化合物の分離またはイオン化に影響を与えていることが推定される。

しかしながら、標準溶液中と尿中での各化合物の検出下限値は類似のレベルであり、データベース検索に関しては尿成分の影響は小さかった。

## 3. 高濃度の試料による汚染

昨年度の検討時と同様に、メタンフェタミンによる汚染が問題になった。覚せい剤乱用者の尿中メタンフェタミン濃度は他の薬物濃度より極めて高く、このような尿を注入した後は、ブランク試料を測定してもメタンフェタミンが検出され、その汚染の除去には時間がかかった。昨年検討した通り、あらかじめ免疫学的試験法キットでメタンフェタミンの有無を確認し、これを含有するものについては 100 倍に希釈する必要があった。このことによって、覚せい剤と麻薬が同時に嘱託された場合、麻薬及び代謝物の検出感度が低くなるが、解決策は検討中である。

## 4. THCCOOH の検出

THCCOOH はネガティブモードでイオン化されやすい化合物であり、今回用いたポジティブモードによるスクリーニングでは実用的な感度で検出されなかった。本法にはネガティブモードも用意されているが、当部の鑑定でターゲットとする化合物の中でネガティブモードが適するものは THCCOOH のみであることから、この化合物に特化したメソッド（昨年度報告）を利

用するほうが高感度かつ利便性が高いと考えられた。

#### 5. その他

標準溶液中の 6-モノアセチルモルヒネは 50 ng/mL の濃度でのみ検出され、これより高濃度でも低濃度でも検出されなかった（表 4）。高濃度側で検出されなかった原因としては、保持時間の近い他の化合物がスペクトル取得に影響を与えた可能性が考えられる。

操作性の面では、本ソフトウェアは測定中にデータ解析ができない点が不便である。

#### 参考文献

- 1) Dresen, S., Kempf, J., Weinmann, W. (2006)  
Electrospray-ionization MS/MS library of drugs as database for method development and drug identification. *Forensic Sci. Int.*, **161**, 86-91.
- 2) アプライドバイオシステムズジャパン株式会社「アプリケーションノート 従来の薬物スクリーニング検査法に代わる LC/MS/MS による新しい分析ソリューション」(2008)
- 3) アプライドバイオシステムズジャパン株式会社「Cliquant™ Software for Routine Forensic Toxicology 薬物スクリーニングの分析条件- ポジティブイオン - 3CE」
- 4) アプライドバイオシステムズジャパン株式会社「Cliquant™ Software for Routine Forensic Toxicology 薬物スクリーニングの分析条件- ネガティブイオン - 3CE」

#### E. 健康危機情報

なし

#### F. 研究発表

なし

表1 本法で検出可能な規制薬物及び代謝物(ポジティブモード)

*3,4-Methylenedioxyamphetamine	*Ketamine
3,4-Methylenedioxyethylamphetamine	*Lysergide
*3,4-Methylenedioxymethamphetamine	Mescaline
*6-O-Monoacetylmorphine	*Methamphetamine
*Amphetamine	Methadone
*Benzoylcegonine	*Morphine
*Cocaine	Morphine-3- $\beta$ -D-glucuronide
*Codeine	Norfentanyl
Dextropropoxyphene	Normorphine
*Dihydrocodeine	Oxycodone
*Ecgoninemethylester	*Phencyclidine
Ephedrine	Pseudoephedrine
Fentanyl	THC
*Heroin	*THC-COOH
Hydrocodone	THC-OH
Hydromorphone	

\* 今回の研究で添加実験を実施した化合物

文献3より抜粋

表2 LC-MS/MS条件

<HPLC>	
装置	島津製作所 Prominence システム システムコントローラ CBM-20A ポンプ LC-20AD 2台 オートサンプラー SIL-20AC カラムオープン CTO-20AC
カラム	Restek PFP Propyl Column (2.1 id x 50 mm, 5 μm)
ガードカラム	Restek PFP Propyl Column (2.1 id x 10 mm, 5 μm)
カラム温度	40°C
溶離液A	水 + 2 mM ギ酸アンモニウム + 0.2%ギ酸
溶離液B	アセトニトリル + 2 mM ギ酸アンモニウム + 0.2%ギ酸
グラジエント及び流速プログラム	10.00 流速 1 mL/min, ポンプB 90% 15.00 流速 1 mL/min, ポンプB 90% 15.50 流速 0.5 mL/min, ポンプB 10% 17.40 流速 0.5 mL/min, ポンプB 10% 17.50 終了
注入量	30 μL
<質量分析計>	
装置	アプライドバイオシステムズ(現AB SCIEX) 3200 Q TRAP トリプル四重極+リニアイオントラップ機能
イオン源	ターボイオンスプレー(ESI)
測定モード	ポジティブ Multiple Reaction Monitoring (MRM) Enhanced Product Ion Scan (EPI)
モニターイオン	表3のとおり
IDA閾値 <sup>1)</sup>	1000 cps
測定質量範囲	50 - 700 u
スキャン速度	4000 u/s
スプレー電圧	4000V
コーン電圧	40V
コリジョンエネルギー	20, 35, 50
ターボガス温度	500 °C

1) IDA: Information Dependent Acquisition(イオン量に応じEPIスペクトルを取得する手法)

表3 各化合物の測定条件

化合物名	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	CE(eV)*	島津RT (min)
1 Ecgoninemethylester	200.1	182.1	35	0.98
2 Morphine	286.1	201.1	35	1.75
3 Dihydrocodeine	302.2	199.1	35	2.70
4 Codeine	300.2	165.2	50	2.80
5 Benzoylcegonine	290.1	168.1	35	3.02
6 6-O-Monoacetylmorphine(MAM)	328.1	165.1	35	3.33
7 Amphetamine	136.1	91.1	35	3.37
8 Methamphetamine	178.1	77.0	50	3.51
9 3,4-Methylenedioxyamphetamine(MDA)	180.1	105.0	35	3.58
10 3,4-Methylenedioxymethamphetamine(MDMA)	194.1	105.1	35	4.07
11 Ketamine	238.1	125.0	35	4.21
12 Heroin	370.1	268.1	20	5.05
13 Lysergide	324.2	223.2	20	5.93
14 THC-COOH	345.2	193.2	50	6.00
15 Cocaine	304.1	182.1	35	6.21
16 Phencyclidine	244.2	86.1	20	7.58

\* MRMIにおけるQ2のコリジョンエネルギー

文献3より抜粋



表4 薬物等標準溶液を用いたライブラリ検索結果(純度の閾値20%)

化合物名	保持時間 (min)	標準溶液濃度 (ng/mL)					
		500	100	50	10	5	1
1 Ecgoninemethylester	1.30	◎	◎	◎	◎	◎	—
2 Morphine	2.49	◎	◎	◎	—	—	—
3 Dihydrocodeine	3.40	◎	◎	○	◎	◎	—
4 Codeine	3.50	◎	◎	○	—	—	—
5 Benzoylcegonine	3.84	◎	◎	◎	◎	◎	○
6 MAM	3.97	—	—	○	—	—	—
7 Amphetamine	3.99	◎	◎	◎	○	○	—
8 Methamphetamine	4.51	◎	◎	◎	◎	◎	◎
9 MDA	4.17	◎	◎	◎	◎	○	—
10 MDMA	4.66	◎	◎	◎	◎	◎	○
11 Ketamine	4.81	◎	◎	◎	◎	◎	◎
12 Heroin	5.52	○	◎	—	—	—	—
13 Lysergide	6.41	◎	◎	◎	◎	○	○
14 THC-COOH	6.42	◎	—	—	—	—	—
15 Cocaine	6.69	◎	◎	◎	◎	◎	◎
16 Phencyclidine	8.09	◎	◎	◎	◎	◎	◎

◎ すべてのCEにおいてヒット      ○ 1または2段階のCEにおいてヒット  
 — ヒットしない

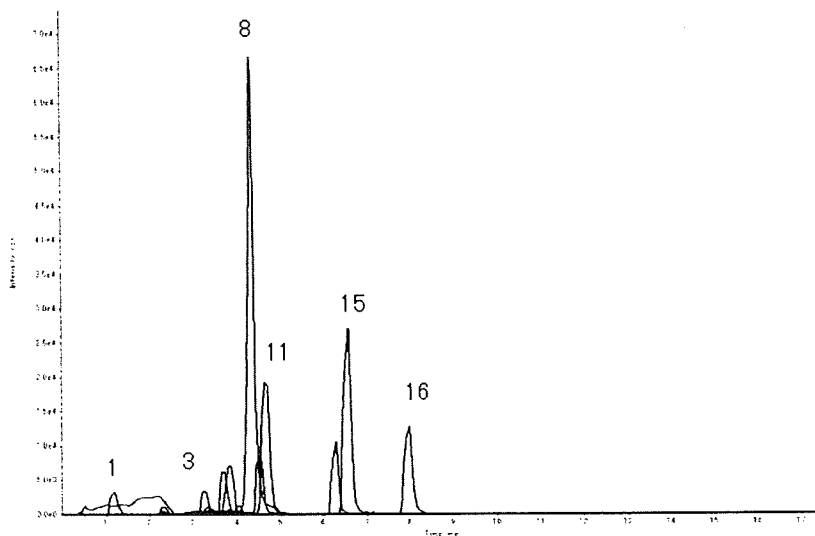
表5 薬物等を添加した尿を用いたライブラリ検索結果(純度の閾値20%)

化合物名	尿A(添加量ng/mL)			尿B(添加量ng/mL)		
	100	50	10	100	50	10
1 Ecgoninemethylester	◎	◎	—	◎	—	—
2 Morphine	○	—	—	—	—	—
3 Dihydrocodeine	◎	◎	—	◎	◎	—
4 Codeine	—	—	—	○	—	—
5 Benzoylcegonine	◎	◎	—	◎	◎	—
6 MAM	○	—	—	—	—	—
7 Amphetamine	◎	◎	○	◎	○	○
8 Methamphetamine	◎	◎	◎	◎	◎	◎
9 MDA	◎	○	—	○	—	—
10 MDMA	◎	◎	○	◎	◎	○
11 Ketamine	◎	◎	◎	◎	◎	◎
12 Heroin	—	—	—	—	—	—
13 Lysergide	◎	◎	○	◎	○	○
14 THC-COOH	—	—	—	—	—	—
15 Cocaine	◎	◎	◎	◎	◎	◎
16 Phencyclidine	◎	◎	◎	◎	◎	◎

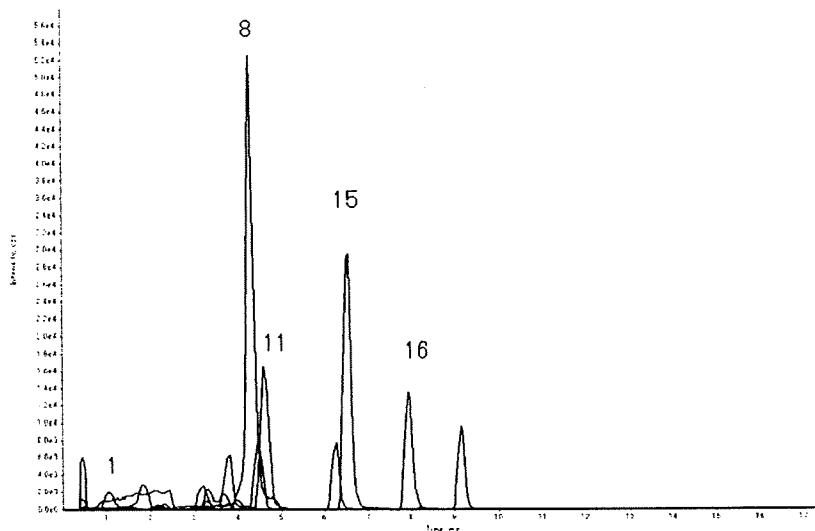
◎ すべてのCEにおいてヒット      ○ 1または2段階のCEにおいてヒット  
 — ヒットしない

注:測定時の試料液濃度は添加量の11分の1に希釈される

標準溶液  
(5ng/mL、尿中濃度  
55ng/mL相当)



尿A  
(50ng/mL添加)



尿B  
(50ng/mL添加)

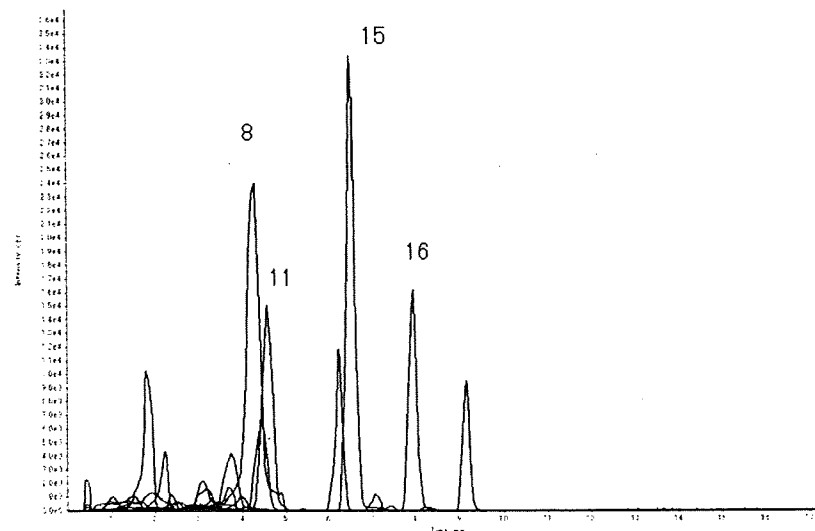


図1 標準溶液及び添加尿試料液の抽出イオンクロマトグラム例

表6 ライブラリ検索と手動によるクロマトグラム確認との感度比較  
 (標準溶液の検出下限濃度ng/mL)

化合物名	検索	手動
1 Ecgoninemethylester	5	1以下
2 Morphine	50	5
3 Dihydrocodeine	5	1以下
4 Codeine	50	5
5 Benzoyllecgonine	1以下	1以下
6 MAM	50	10
7 Amphetamine	5	1以下
8 Methamphetamine	1以下	1以下
9 MDA	5	5
10 MDMA	1以下	1以下
11 Ketamine	1以下	1以下
12 Heroin	100	50
13 Lysergide	1以下	1以下
14 THC-COOH	500	500
15 Cocaine	1以下	1以下
16 Phencyclidine	1以下	1以下

検索: 純度閾値20%の条件でヒットした最低濃度

手動: MRMクロマトグラム上に保持時間の一致するピークが認められ、  
 そのピークの強度がEPI取得基準(1000cps)以上であった最低濃度

表7 鑑定嘱託された尿におけるGC-MS及びLC-MS/MS測定結果の比較

番号	GC-MSで検出された薬物*	LC-MS/MS測定 希釈倍率	データベース検索でヒットした薬物
1	Cocaine Benzoylecgonine Ecgoninemethylester	10	Cocaine Benzoylecgonine Ecgoninemethylester
2	Cocaine Benzoylecgonine Ecgoninemethylester	10	Cocaine Benzoylecgonine Ecgoninemethylester
3	Benzoylecgonine Ecgoninemethylester THCCOOH	10	Benzoylecgonine Ecgoninemethylester
4	MDMA MDA	10	MDMA
5	Methamphetamine Amphetamine THCCOOH	100	Methamphetamine
6	Methamphetamine Amphetamine MDMA MDA	100	Methamphetamine Amphetamine MDMA
7	Methamphetamine Amphetamine MDMA MDA	100	Methamphetamine Amphetamine MDMA
8	Methamphetamine Amphetamine MDMA MDA	100	Methamphetamine Amphetamine MDMA
9	Methamphetamine Amphetamine Ketamine Morphine	10	Methamphetamine Ketamine Morphine
10	Methamphetamine Amphetamine Cocaine Benzoylecgonine	10	Methamphetamine Amphetamine Cocaine Benzoylecgonine Ecgoninemethylester
11-20	THCCOOH(10検体)	10	不検出(10検体すべて)
21-50	Methamphetamine Amphetamine (30検体)	100	Methamphetamine(すべて) Amphetamine(26検体)

\* THCCOOH及びモルヒネについてはTMS化して検出した。