—技術報告—

ギ酸プロピル誘導体化GC/MSによる尿中覚せい剤の自動分析

菊地真美^{*1}, 奈女良 昭^{*2}, 小嶋 亨^{*2}, 及川 肇^{*1}岩手県警察本部科学捜査研究所^{*1}, 広島大学医学部法医学教室^{*2}〒020-8540 岩手県盛岡市内丸8-10^{*1}〒734-0037 広島県広島市南区霞1-2-3^{*2}

Automated Analysis of Methamphetamine in Urine by Propylformylation with Gas Chromatography / Mass Spectrometry

Mami Kikuchi^{*1}, Akira Namera^{*2}, Tohru Kojima^{*2} and Hajime Oikawa^{*1}Forensic Science Laboratory, Iwate Prefectural Police, H. Q., 8-10, Uchimaru, Morioka,
Iwate 020-8540, Japan^{*1} andDepartment of Legal Medicine, Hiroshima University School of Medicine, 1-2-3, Kasumi,
Minami-ku, Hiroshima, Hiroshima 734-0037, Japan^{*2}

(Received 23 February 1999; accepted 19 January 2000)

Automated analysis of methamphetamine (MA) and amphetamine (AP) in human urine was made by using PrepStation[®] with gas chromatograph / mass spectrometer (GC / MS). Using "an extraction-derivatization solution", which was made up of chloroform, isopropylalcohol and propylchloroformate (150:50:1, v/v/v), it was possible to extract and derivatize MA and AP simultaneously. This method was applied to actual urine specimens. The analysis time for 1 sample was approximately 30 minutes. Linear calibration curves, using the internal standard method, were obtained throughout the concentration range from 0.25 to 5 $\mu\text{g/ml}$ in either the scan or selected ion monitoring (SIM) mode. Using a scan mode the detection limits were 1 $\mu\text{g/ml}$ for both MA and AP and using a SIM mode the limits were 0.25 $\mu\text{g/ml}$ for both MA and AP. The system studied here appeared simple and useful towards its application in daily duties.

Key words: Methamphetamine, Amphetamine, PrepStation, Propylchloroformate derivative, Liquid-liquid extraction, GC/MS

緒 言

我が国における覚せい剤の乱用はここ数年増加傾向にあり、第三次乱用期ともいわれている。それに伴って尿中覚せい剤の検査依頼も増加しているが、検査をする側の人員は限られており、対応には限界がある。このような状況を改善する一つの方法として、尿中覚せい剤の抽出から分析までを完全に自動化する方法が考えられる。

これまで、自動抽出装置であるPrepStation[®]を用いての分析法については、液-液抽出したものを誘導体化せずに窒素リン検出器付きおよび水素炎検出器

付きガスクロマトグラフィー (GC-NP-FID) で分析する方法¹⁾、固相カートリッジを用いて抽出したものをN-メチルビストリフルオロアセトアミドにより誘導体化後GC-質量分析 (MS) で分析する方法²⁾などが報告されている。

固相抽出法の長所として、夾雑物を容易に除去できることなどがあげられるが、液-液抽出に比べ、カートリッジが高価であること、カートリッジのコンディショニング-洗浄-抽出という操作のため、工程数および使用する溶媒の種類が増加し、処理に多少時間がかかることなどの検討すべき問題点もあ

る。

また、メタンフェタミン (MA) の誘導体化については、無水トリフルオロ酢酸などのアシル化剤を用いる方法が一般的であるが、試料の脱水や誘導体化剤を添加した後の加熱が必要である。一方、クロロギ酸プロピル (PCF) は試料の脱水を必要とせず水溶液中でも、室温で速やかに反応する³⁾。また、0.5%程度の溶液では、過剰なPCFによる分析装置の劣化の恐れはほとんどなく、従来の誘導体化剤と比較して操作が簡単である。

そこで今回、PCFをあらかじめ抽出溶媒に添加することで、抽出と誘導体化を同時に行い、単純操作でランニングコストが安価な自動前処理—分析方法について検討した結果、本法において実際の検体に対しても十分に適用可能であることが明らかとなったので報告する³⁾。

実 験

試料

標準試料溶液として、メタンフェタミン塩酸塩(大日本製薬製)およびアンフェタミン硫酸塩(合成品)をそれぞれ濃度5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように、健常人尿を用いて調整したものを用いた。内部標準溶液としてはジフェニルメタン(和光純薬製, 特級)の100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のアセトニトリル(和光純薬製, 特級)溶液を用いた。誘導体化試薬はクロロギ酸プロピル(Aldrich製)をクロロホルム(和光純薬製, 特級):イソプロパノール(和光純薬製, 特級)混液(3:1)に1:200(v/v)の割合で混合したものを、抽出—誘導体化溶媒とした。その他の試薬は市販の特級品を用いた。

装置

前処理装置:Hewlett Packard(HP)製7686PrepStation (SPE module)

GC/MS: HP製6890 series GC / 5973 MSD

測定条件

カラム: HP製Ultra-1 (12m $\times$ 0.2mm i.d., 膜厚0.33 μm)

キャリア: He (定流量モード0.7ml/min)

注入口温度: 280 $^{\circ}\text{C}$ (スプリットレス 45sec hold)

オープン: 130 $^{\circ}\text{C}$ (4 min hold)—260 $^{\circ}\text{C}$ (20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$)

* 100 $^{\circ}\text{C}$ (2 min hold)—140 $^{\circ}\text{C}$ (10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$)
—260 $^{\circ}\text{C}$ (20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$)

(*ジメチルアンフェタミン (DMA)
も対象にする場合の条件)

操作

PrepStation[®]による自動抽出—誘導体化は、溶媒ボ

トルにメタノール(洗浄溶媒)、抽出—誘導体化溶媒(PCF-クロロホルム-イソプロパノール溶液、1:150:50, v/v/v)の2種類を、サンプルトレイには、内部標準溶液バイアル、尿試料バイアル(尿試料0.6mlおよび炭酸カリウム約50mgが入ったもの)、溶媒濃縮用空バイアルの3種類をセットする。

システムをスタートすると、以降の前処理操作はPrepStation[®]で自動的に行われる。

すなわち、尿試料バイアルに内部標準溶液を50 μl およびPCF-クロロホルム-イソプロパノール溶液350 μl が注入され、"High speedモード"で3分間かくはんされる。下層のクロロホルム-イソプロパノール層の320 μl を溶媒濃縮用バイアルに採取する。得られた抽出溶液を70 $^{\circ}\text{C}$ 、1分間窒素気流下(パージ圧0.80kg/cm²)で濃縮する。この操作で約120 μl の抽出溶液が得られ、その下層部1 μl をGC/MSに注入する。本法による分析時間は1検体あたり約30分である。

結果と考察

エマルジョン形成防止剤の検討及び試料のpH調整

液—液抽出の最大の問題点は、尿試料と抽出溶媒がかくはん時にしばしばエマルジョンを形成することである。これを防止するために、一般的には塩化ナトリウムなどの塩類を添加することが行われている。本実験では、無添加の尿試料、塩化ナトリウム約100mgおよび炭酸カリウム緩衝液50 μl (100mM, pH 10.8)を添加した尿試料、炭酸カリウム約50mgを添加した尿試料についてPCF-クロロホルム溶媒で比較検討した。

その結果、無添加のものについては、かくはん時にエマルジョンを形成し、明らかに溶媒濃縮用バイアルに水分の混入が認められた。塩化ナトリウム—炭酸カリウム緩衝液を添加したものについては、エマルジョンの形成がみられなかったが、抽出後の試料のpHが約6であったことから、MAの抽出が不十分である可能性が高いと推察された。試料のpH調整のために緩衝液を添加して抽出を行ったにもかかわらず、このような液性を示したのは、誘導体化の際に生成する過剰な塩酸が原因であると思われる。一方、炭酸カリウムを添加したものでは、水分の混入はほとんどなく、抽出後の尿試料も約pH10であった。

そこで、エマルジョン形成防止及び試料のpH調整として、あらかじめ炭酸カリウムを尿に添加してお

くこととした。

抽出-誘導体化溶媒の検討

本法は、遠心分離操作が出来ず、かくはん(回転)による液-液抽出だけであることから、使用する抽出-誘導体化溶媒は抽出効率がよいこと、水分の混入が少ないことが望まれる。本実験では、炭酸カリウムを添加した尿試料の抽出-誘導体化溶媒としてPCF-クロロホルム、PCF-クロロホルム-イソプロパノール(9:1, 6:1, 3:1)の4種類(PCFはすべて1/200, v/v添加)をもちいて比較検討した。

その結果、PCF-クロロホルムによるアンフェタミン(AP), MAの回収率を1とした場合、PCF-クロロホルム-イソプロパノール(3:1)の回収率が一番良く平均でAPが1.35, MAが1.56であった。抽出溶媒への水分の混入については、PCF-クロロホルム-イソプロパノール(3:1)が一番多く、PCF-クロロホルムではほとんど認められなかった。

ここで、PCF-クロロホルム-イソプロパノール(3:1)溶媒を使用した際に混入する水分は、抽出後の濃縮操作等により上層に分離し、実際のGC/MS注入では装置汚染等の大きな問題とはならないと考えられたことから、抽出-誘導体化溶媒はPCF-クロロホルム-イソプロパノール(3:1)を使用することとした。

次に、本法の抽出-濃縮回数を1回と2回にしたものと分液ロートを使用して2回抽出操作を行ったものとの回収率を比較したところ、1回抽出のものはAPが55.4%, MAが84.9%であり、2回抽出のものはAPが62.1%, MAが76.4%であった。ここで、抽出回数2回のMA回収率が1回のものより低くなったのは、抽出時の水分の混入量が増えたことによる影響と考えられた。このことから抽出溶媒への水分混入および操作時間の短縮から、抽出回数は1回とした。なお、抽出溶媒への水分の混入が少ないPCF-クロロホルム溶媒を使用した場合の回収率は、2回抽出でもAPが47.2%, MAが40.8%であった。

検出限界と定量性

標準試料溶液(5 $\mu\text{g/ml}$)から得られたトータルイオンクロマトグラムおよびMAギ酸プロピル誘導体とAPギ酸プロピル誘導体の質量スペクトルをFig. 1に示す。

MA及びAPの確認は、スキャンモードのマススペクトルおよびセレクトッドイオンモニタリング(SIM)モードともに、MAで m/z 144, 58, 91, 102の4種のフラグメントイオン、APで m/z 91, 44, 130の3種のフラグメントイオンの検出(S/N=3以上)を

Fig. 1 Total ion chromatogram (a) and mass spectra of propylchloroformate derivative from AP (b) and MA (c) in a spiked urine sample (5 $\mu\text{g/ml}$).

もって行った。

検出限界は、5, 2.5, 1, 0.5, 0.25 $\mu\text{g/ml}$ の添加尿試料を用いて検討したところ、MAおよびAPともスキャンモードで1 $\mu\text{g/ml}$, SIMモードで0.25 $\mu\text{g/ml}$ であった。

検量線は、スキャンモードで内部標準物質ジフェニルメタンの m/z 168, MAの m/z 144, APの m/z 91の各マスクロマトグラムにおけるピーク面積を、SIMモードでは各SIMにおけるピーク面積をそれぞれ測定し内部標準法により作成した。その結果、スキャンモード, SIMモードともに0.25~5 $\mu\text{g/ml}$ の範囲で良好な直線性が得られた。Fig. 2にスキャンモードにおける検量線を示す。また、標準試料溶液(5 $\mu\text{g/ml}$)を用いて本法により7回分析したときの変動係数はスキャンモードでAPが8.8%, MAが7.5%であった。

実検体への適用

当研究所に検査依頼のあった31の尿検体について、尿中メタアンフェタミンテストビスアライン(株式会社ダイアヤトロン, 輸入販売)および従来法⁴⁾(液-液抽出, GC/MS確認)と本法の分析結果をTable 1に示す。1検体を除いて従来法と本法はよく一致した。結果が一致しなかった1検体は、検出限界

Fig. 2 Calibration curve for AP (■) and MA (□) in a spiked urine sample.

以下のためである (MAが $0.28 \mu\text{g/ml}$, APが $0.16 \mu\text{g/ml}$)が, スキャンモードにおけるマスクロマトグラムではAP, MAと考えられるピークが確認されていた。

Table 1 Result of urine samples

Methamphetamine test	GC/MS	Prep-GC/MS	Number of samples
+	+	+	13
-	-	-	17
-	+	-	1

+: Methamphetamine positive.

-: Methamphetamine negative.

次に, 連続測定時の汚染の影響について, 陽性の実サンプル尿とブランク尿を交互に測定した. その結果いずれのブランク尿からもAP, MAのピーク (マスクロマトグラム) は検出されなかった。

また, 従来の方法によりジメチルアンフェタミン (DMA), AP及びMAが検出された1検体について, 本法による分析を行ったところ, Fig. 3に示すように誘導体化されないDMA, AP誘導体およびMA誘導体が検出された。

結 語

PrepStation®を用いたGC/MSによる自動分析の一つの方法として, 誘導体化剤PCFを添加した抽出溶媒を用いて, 抽出と誘導体化を同時に行う方法について検討した。

本法では, 固相カートリッジを用いず, 液-液抽出することで, 分析コストが抑えられた. また, PrepStation®による前処理操作が単純であるため, 操作メソッドの組立, 変更が容易であることと同時に, 分析に要する時間が短縮された。

なお, 本法による分析時間は, 1検体の分析にかかる時間が約30分と短く, 複数の検体の場合はさらに1検体あたりの分析時間が短くなり, 本法と並行し

Fig. 3 Total ion chromatogram (a) and mass spectrum of dimethylamphetamine (DMA) (b) obtained from a suspect's urine sample (DMA, MA and AP were detected from the sample).

て他の方法での検査が可能であることから, より慎重な検査を行うことができる。

文 献

- 1) Soriano, C., Munos-Guerra, J., Carreras, D., Rodriguez, C., Rodriguez, A. F. and Cortes, R. : Automated analysis of drugs in urine. *J. Chromatogr. B*, **687**, 183-187 (1996).
- 2) 片木宗弘, 西岡裕, 中島邦生, 西川眞弓, 土橋均, 滝埜昌彦, 山口憲治: 尿中覚せい剤の抽出・誘導体化及びGC/MSの全自動分析. *衛生化学*, **42**, 148-154 (1995).
- 3) Meatherall, R. : Rapid GC-MS Confirmation of Urinary Amphetamine and Methamphetamine as Their Propylchloroformate Derivatives. *J. Anal. Toxicol.*, **19**, 316-322 (1995).
- 4) 日本薬学会編, 薬毒物化学試験法と注解, pp294-306, 南山堂, 東京(1992)