—原著—

カラムスイッチング LC/MS によるフェネチルアミン系薬物およびその代謝物の分析

金森達之, 岩田祐子, 大前義仁, 井上博之, 岸 徹

科学警察研究所

〒277-0882 千葉県柏市柏の葉 6-3-1

Analysis of Phenethylamines and Their Metabolites by Column-switching Liquid Chromatography/Mass SpectrometryTatsuyuki Kanamori, Yuko Iwata, Yoshihito Ohmae, Hiroyuki Inoue and
Tohru Kishi*National Research Institute of Police Science
6-3-1, Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba 277-0882, Japan**(Received 12 April 2002; accepted 28 June 2002)*

Liquid chromatography (LC) with a column-switching system connected to electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) was developed for the determination of phenethylamines and their metabolites in urinary and serum samples. After filtration, the sample was directly injected, and drugs were concentrated onto a strong cation-exchange (SCX) precolumn with an eluate of 10 mM ammonium acetate (pH 5). After 5 min elution, a six-port valve was switched, and drugs were introduced to a reversed-phase analytical column with an elution by 10 mM ammonium acetate (pH 5)–acetonitrile (80:20). Analytes eluted were introduced directly into the ESI source connected to an ion-trap detector. Linearity of quantification was obtained over the concentration range of 50–500 ng/ml for 2C-B and 20–500 ng/ml for the other compounds. The detection limit of each compound in urine samples ranged 5–50 ng/ml under scan mode. This method appeared rapid and sensitive for the determination of phenethylamines and their metabolites in biological samples.

Key words: Phenethylamine, Column-switching, LC/MS, Urine, Serum

緒 言

薬物の乱用は、我が国において依然として大きな社会問題であるが、なかでも、特に覚せい剤メタンフェタミンをはじめとするフェネチルアミン系薬物の乱用は、大きな割合を占めている。メタンフェタミンについては、第三次覚せい剤乱用期が宣言され

るなど、深刻な状況であり、また、メタンフェタミン以外にも、最近「エクスタシー」の俗称で知られる 3,4-メチレンジオキシメタンフェタミン (MDMA) 錠剤の大量押収なども相次いでいる。さらに、「脱法ドラッグ」として 2,5-ジメトキシ-4-エチルチオフェネチルアミン (2C-T-2) が出回るな

ど、青少年を中心としたフェネチルアミン系薬物の乱用の拡大が懸念されている。

これらのフェネチルアミン系薬物の分析においては、錠剤や粉末等の薬物そのものの分析であれば、そのまま、あるいは簡単な抽出操作を行った後、赤外吸収スペクトル (IR)、高速液体クロマトグラフィー (HPLC)、ガスクロマトグラフィー/質量分析 (GC/MS) 等で分析可能である。しかし、尿や血液など、生体試料中のこれらの薬物やそれらの代謝物を分析する場合、一般には、液-液抽出あるいは固相抽出により薬物を抽出し、必要に応じて誘導体化を行った後、GC/MS 等で分析を行うことが多く、抽出や誘導体化にかなりの時間と手間を要する。

一方、近年、生体試料の自動分析法として、カラムスイッチング-液体クロマトグラフィー/質量分析 (カラムスイッチング LC/MS) が注目されている。これは、前処理カラムでオンライン固相抽出を行った後、本カラムに対象薬物を導入し、溶出してきた薬物を質量分析計 (MS) で検出するものである。この方法では、生体試料を直接導入分析できるため、面倒な抽出操作が不要で、分析時間を大幅に短縮することができ、しかも、MS で検出することにより高い同定能力を有することから、特にルーチン分析などに非常に有用である。そのためこれまでに、種々の薬物について、カラムスイッチング LC/MS による分析例が報告されている¹⁻³⁾。

今回、代表的なフェネチルアミン系の薬物として、メタンフェタミン、エフェドリン、3,4-メチレンジオキシメタンフェタミン (MDMA) などの覚せい剤関連化合物 (11種)、比較的新しい乱用薬物である4-プロモ-2,5-ジメトキシフェネチルアミン (2C-B) および2,5-ジメトキシ-4-エチルチオフェネチルアミン (2C-T-2)、メタンフェタミンの代謝物である *p*-ヒドロキシメタンフェタミンおよび *p*-ヒドロキシアμφエタミンの合計15種類の化合物 (Fig. 1) について、カラムスイッチング LC/MS を用いた生体試料からの一斉分析法について検討したので報告する。

実 験

1. 試 料

l-ephedrine·HCl (EP) および *l*-methylephedrine·HCl (MEP) は大日本製薬製のものを、*l*-norephedrine·HCl (NEP) は Aldrich 製のものをそれぞれ用いた。*dl*-amphetamine·1/2H₂SO₄ (AP)、*d*-methamphetamine·HCl (MA)、*d*-dimethylamphetamine·HCl (DMA)、*dl*-*p*-hydroxymethamphetamine·HCl (OHMA)、*dl*-*p*-hydroxyamphetamine·HCl (OHAP)、*dl*-3,4-methylenedioxyamphetamine·HCl (MDA)、*dl*-3,4-methylenedioxyamphetamine·HCl (MDMA)、*dl*-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-butanamine·HCl (BDB)、*dl*-*N*-methyl-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-butanamine·HCl (MBDB) は、報告されている方法をもとに合成した^{4,5)}。2C-B·HCl および 2C-T-2·HCl は、Shulgin らの方法により合成した⁶⁾。*dl*-3,4-methylenedioxy-*N*-ethylamphetamine·HCl (MDEA)、*N*-propylamphetamine·HCl (PAP) は、MDA および AP をそれぞれ原料とし、対応する酸無水物とピリジンにより酸アミドに変換した後、水素化リチウムアルミニウムで還元して合成した。

これらの化合物について、標準試料水溶液 (1 mg/ml) を調製し、用時、蒸留水、健常人の尿あるいは血清に添加し、試料溶液を作成した。

アセトニトリルは HPLC グレードのものをを用い、その他の試薬は、全て市販の特級試薬を用いた。

2. 薬物摂取者の尿の採取

市販のかぜ薬 (エスタックイブ®錠, エスエス製薬) 1 回分 3 錠 (MEP を 20 mg 含有) を摂取した健康成人男性の摂取後 3 時間尿を、実試料として実験に用いた。

3. 分析用試料の調製

尿試料は、内部標準物質 (IS) として適当量の PAP (蒸留水に溶解したもの) を添加した後、0.45 μm のフィルターでろ過し、分析用試料とした。ただし、実試料については、尿中薬物濃度が高かったため、水で100倍に希釈し、同様に処理したものを分析に用いた。血清試料は、等量の10 mM 酢酸アンモニウム (酢酸を加えて pH 5.0 としたもの) を添

Fig. 1 Structures of phenethylamines used in this study.

加後、尿試料の場合と同様に処理し、分析用試料とした。

4. カラムスイッチング LC/MS

各試料について、下記の条件でカラムスイッチング LC/MS を行った。各試料は、オートインジェクターを用いて最大 50 μ l 注入した。

装置：島津製 LC-10ADVP 送液ユニット

島津製 SIL-10ADVP オートインジェクター

島津製 CTO-10ACVP カラムオーブン

島津製 SPD-M10AVP フォトダイオードアレイ検出器

フィニガン・マット製 LCQ 質量分析計

濃縮カラム：資生堂製 CAPCELL PAK MF SCX (2 mm i.d. $\times$ 10 mm)

分離カラム：

(a) Waters 製 Symmetry[®]C18 (4.6 mm i.d. $\times$ 150 mm)

(b) Waters 製 Symmetry[®]C18 (2.1 mm i.d. $\times$ 150 mm)

カラム温度：40 $^{\circ}$ C

濃縮時移動相：10 mM 酢酸アンモニウム（酢酸を加えて pH 5.0 としたもの）
流速 0.3 ml/min

分離時移動相：

(a) 10 mM 酢酸アンモニウム (pH 6.8)–アセトニトリル (75 : 25, v/v)

(b) 10 mM 酢酸アンモニウム（酢酸を加えて pH 5.0 としたもの）–アセトニトリル (80 : 20, v/v)

流速 0.5 ml/min (4.6 mm 径カラム)
 0.2 ml/min (2.1 mm 径カラム)
 イオン化法: エレクトロスプレーイオン化 (ESI)
 法
 キャピラリー電圧: 34 V
 チューブレンズオフセット値: 20 V
 測定モード: スキャン (m/z 100–300)

結果および考察

1. 分析条件の検討

今回用いたカラムスイッチング LC/MS システムの概要を Fig. 2 に示す. 濃縮カラム (プレカラム) には強陽イオン交換型である SCX タイプを, 分析カラムには逆相型の C_{18} タイプを用いた. また, カラムスイッチングの手法として, 薬物を濃縮後, バックフラッシュにより分析カラムに導入する方法を用いた.

前濃縮の条件を決定するため, プレカラムをフォトダイオードアレイ検出器に接続して検討した. 濃縮時の移動相として, 10 mM 酢酸アンモニウム

Fig. 2 Schematic diagram of column-switching LC/MS system.

Fig. 3 High performance liquid chromatograms of AP, MA, DMA, OHMA and EP.

Mobile phase (for separation): (a) 10 mM ammonium acetate-acetonitrile (75:25, v/v), (b) (c) 10 mM ammonium acetate (pH 5.0 with acetic acid)-acetonitrile (80:20, v/v). Column (for separation): (a) (b) Symmetry[®]C18 (4.6 mm i.d. × 150 mm), (c) Symmetry[®]C18 (2.1 mm i.d. × 150 mm). Flow rate: (a) (b) 0.5 ml/min, (c) 0.2 ml/min. Detection wavelength: 210 nm. The concentration of each compound is 10 μ g/ml. A 50 μ l aliquot of each sample was injected to HPLC system.

(酢酸を加えて pH 5.0 としたもの) を用い、流速 0.3 ml/min でブランク尿、ブランク血清および各化合物の標準品の分析を行ったところ、尿あるいは血清中の夾雑物は、おおむね 3 分程度で溶出した。一方、各化合物は 7 分後においても溶出しなかった。よって、濃縮時にはこの移動相を用い、六方バルブは 5 分後に切り替えることにした。

薬物分離時の移動相として、(a) 10 mM 酢酸アンモニウム (pH 6.8)-アセトニトリル、(b) 10 mM 酢酸アンモニウム (酢酸を加えて pH 5.0 としたもの)-アセトニトリルの系について検討を行った。MA, AP, DMA, OHMA, EP の 5 種の化合物について、上記の各移動相により分析した結果を Fig. 3 の (a) および (b) に示す (カラムは内径 4.6 mm のものを使用)。10 mM 酢酸アンモニウムの系では、全般にピークがテーリングする傾向が認められたが (Fig. 3(a))、酢酸を加えて pH 5.0 とした 10 mM 酢酸アンモニウムの系は、全体的な分離やピーク形状が良好であったので (Fig. 3(b))、分離時の移動相は、この系を用いることにした。

さらに、分離カラムのサイズについても検討を行った。分離カラムに内径 2.1 mm のカラムを用い、流速 0.2 ml/min で分析を行ったところ、各化合物のピークはブロードとなり、分離も不十分であった

(Fig. 3(c))。これは、SCX カートリッジに濃縮された薬物がある程度バンド幅を持って溶出されるため、結果的に大きなサンプル量として分離カラムに導入されることになり、内径の小さなセミマイクロカラムでは、飽和してしまったものと考えられた。従って、以降の分析には内径 4.6 mm のカラムを用いることにした。

2. 各化合物標準品の分析

各種フェネチルアミン系薬物およびその代謝物 15 種を分析して得られたマスキロマトグラムを Fig. 4 に示す。多くの化合物は 10 分から 16 分の間に溶出したが、2C-B と 2C-T-2 は溶出しにくく、保持時間はそれぞれ約 23 分および約 30 分であった。今回の分析条件においては、いずれの化合物のマススペクトルにおいてもプロトン化分子イオン ($[M+H]^+$) のみ認められた (Table 1)。保持時間 10 分から 16 分に溶出される化合物は、全イオンクロマトグラム上では完全に分離することはできなかったが、マスキロマトグラムにおいて、それぞれを確認可能であった。今回検討した化合物の中には、NEP と OHAP (MW 151)、MDEA と MBDB (MW 207) など、分子量が同じである組み合わせがいくつかあり、同一マスキロマトグラム上に検出されるが、MEP と MDA (MW 179) の組み合わせを除いて、おおむ

Fig. 4 Mass chromatograms of phenethylamines and their metabolites.

ね分離可能であった。

3. 薬物を添加した尿および血清の分析

AP, MA, DMA, OHMA および EP をそれぞれ 100 ng/ml になるように水, 尿および血清に添加した試料の分析結果を Fig. 5 に示す。尿および血清に標準品を添加した試料についても, 水に添加した

場合と同様に各化合物を検出可能であった。ただし, これらの化合物のうち, OHMA については, 特に尿添加試料においてピーク面積の著しい減少が認められた (Fig. 5(b))。これについては, 尿中夾雑物の影響により, OHMA が濃縮カラムに十分に保持されていない可能性が考えられた。なお, 同様の傾向は, OHMA の場合ほど顕著ではないものの, OHAP, NEP など, 特に分子内に水酸基を有する化合物において認められた。

今回検討した15種の化合物を尿および血清に添加した試料における各化合物の検出限界 (マスキロマトグラム上で $S/N > 3$) を Table 1 に示す。各化合物の検出限界はおおむね 5–50 ng/ml であり, 本法は通常の薬物スクリーニング検査を行う上では, 十分な感度を有すると考えられた。しかしながら, 本法で得られる各化合物のマスペクトルは, 前述のようにプロトン化分子イオンのみであり, 同定法としては不十分と考えられるため, 最終的な薬物の確認には GC/MS 等の他の分析法を併用することが望ましい。

各化合物を尿に添加した試料について検量線を作成したところ, 各化合物とも, おおむね検出限界の濃度から 500 ng/ml までの範囲で良好な直線性 (いずれも $r^2 > 0.99$) を示した。尿添加試料において著しいピーク面積の減少が認められる OHMA につい

Table 1 Detection limit of each compound.

compound	(M + H) ⁺	detection limit ^{a)} (ng/ml)	
		urine	serum
AP	136	20	10
MA	150	10	5
DMA	164	20	20
OHAP	152	20	20
OHMA	166	20	20
NEP	152	10	10
EP	166	10	5
MEP	180	20	20
MDA	180	20	20
MDMA	194	5	5
MDEA	208	10	5
BDB	194	10	20
MBDB	208	20	20
2C-B	260	50	50
2C-T-2	242	20	20

a) $SN > 3$.

Fig. 5 Total ion chromatograms (TIC) and mass chromatograms of samples spiked with AP, MA, DMA, OHMA and EP.

(a) Distilled water, (b) urine, (c) serum. A 50 μ L aliquot of samples containing each compound at a concentration of 100 ng/ml was injected to LC/MS system.

Fig. 6 TIC and mass chromatograms of the human urine sample collected 3 h after oral administration of a medicine containing 20 mg of MEP. The concentrations estimated were 10.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and 0.57 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for MEP and EP, respectively. PAP: *N*-propylamphetamine.

ても、ピーク面積の減少の割合が濃度に依存せず一定であったため、検量線は直線性を示した。

4. 実試料への適用

本法を MEP 服用者の尿検査に適用した。MEP を含有する市販のかぜ薬（1 回分の服用量において MEP を 20 mg 含有）を服用した成人男性の尿（投与 3 時間後に採取）を本法により分析した結果を Fig. 6 に示す。m/z 180 のマスキロマトグラムにおいて、保持時間 11.8 分に MEP の明瞭なピークが認められた。また、m/z 166 のマスキロマトグラムにおいて、保持時間 11.4 分には、MEP の代謝物である EP のピークが認められた。さらに、尿中 MEP および EP の定量分析を行った結果、それぞれの濃度は、10.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ および 0.57 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。なお、同じ尿試料について、液-液抽出（尿試料を水酸化ナトリウムで強アルカリ性とし、クロロホルムで抽出）した後、ガスクロマトグラフィー/質量分析（GC/MS）で定量分析（装置はサーモクエスト製 GCQ を使用。MEP は free base として、EP は常法⁷⁾によりトリフルオロアセチル誘導体として分析）した結果、MEP および EP の尿中濃度はそれぞれ 9.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ および 0.76 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であり、EP の定

量値の差異が若干大きかったものの、おおむね満足する結果が得られた。このように、本法は実試料についても、定性に加え定量分析にも適用可能であった。

結 語

生体試料中のフェネチルアミン系薬物およびその代謝物について、カラムスイッチング LC/MS による一斉分析法の検討を行った。本法によれば、ろ過するだけの簡単な前処理で尿および血清を分析可能であった。また、各化合物の検出限界は 5–50 ng/ml であり、これらの薬物の検出には十分な感度であった。このことから、本法は、フェネチルアミン系薬物および代謝物のスクリーニング法として非常に有用であると考えられる。

文 献

- 1) Katagi M, Nishikawa M, Tatsuno M, Miki A and Tsuchihashi H.: Column-switching high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry for identification of heroin metabolites in human urine. *J. Chromatogr. B*, **751**, 177–185 (2001).
- 2) Kanazawa H., Atsumi R., Matsushima Y and Kizu J.: Determination of theophylline and its metabolites in biological samples by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **870**, 87–96 (2000).
- 3) Miki A, Tatsuno M, Katagi M, Nishikawa M and Tsuchihashi H.: Simultaneous determination of eleven benzodiazepine hypnotics and eleven relevant metabolites in urine by column-switching liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Anal. Toxicol.*, **26**, 87–93 (2002).
- 4) 金森達之, 岩田祐子, 田中 謙, 井上堯子: *N*-Methyl-1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-2-butamine (MBDB) 及びその代謝物の分析. 科警研報告, **52**, 1–8 (1999).
- 5) 岸 徹, 井上堯子, 鈴木真一, 安田年博, 及川智正, 丹羽口徹吉: 覚せい剤メタンフェタミンに含まれる不純物の分析. 衛生化学, **29**, 400–

- 406, (1983). CA (1991).
- 6) Shulgin, A. T. and Shulgin, A.: *PIHKAL: A Chemical Love Story*. Transform Press, Berkeley, 7) 日本薬学会編：薬毒物化学試験法と注解，第4版，p. 290，南山堂，東京（1992）.