

Direct Analysis in Real Time (DART)-TOFMS を用いた尿中覚せい剤及び 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) 迅速スクリーニング法の検討

河村麻衣子, 花尻(木倉)瑠理,* 合田幸広

Simple and Rapid Screening for Methamphetamine and 3,4-Methylene- dioxymethamphetamine (MDMA) and Their Metabolites in Urine Using Direct Analysis in Real Time (DART)-TOFMS

Maiko KAWAMURA, Ruri KIKURA-HANAJIRI,* and Yukihiro GODA

National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

(Received December 21, 2010; Accepted January 31, 2011; Published online February 10, 2011)

An ionization technique, direct analysis in real time (DART) has recently been developed for the ambient ionization of a variety samples. The DART coupled with time-of-flight mass spectrometry (TOFMS) would be useful as a simple and rapid screening for the targeted compounds in various samples, because it provides the molecular information of these compounds without time-consuming extraction. In this study, we investigated rapid screening methods of illicit drugs and their metabolites, such as methamphetamine (MA), 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA), amphetamine (AP) and 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA) in human urine using DART-TOFMS. As serious matrix effects caused by urea in urine samples and ionizations of the targeted compounds were greatly suppressed in the DART-TOFMS analyses, simple pretreatment methods to remove the urea from the samples were investigated. When a pipette tip-type solid-phase extraction with a dichloromethane and isopropanol mixed solution as an eluent was used for the pretreatment, the limits of detection (LODs) of 4 compounds added to control urine samples were 0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$. On the other hand, the LODs of these compounds were 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ by a liquid-liquid extraction using a dichloromethane and hexane mixed solution. In both extractions, the recoveries of 4 compounds from urine samples were over 70% and these extraction methods showed good linearity in the range of 0.5–5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ by GC-MS analyses. In conclusion, our proposed method using DART-TOFMS could simultaneously detect MA, MDMA and their metabolites in urine at 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ without time-consuming pretreatment steps. Therefore it would be useful for screening drugs in urine with the molecular information.

Key words—direct analysis in real time; methamphetamine; 3,4-methylenedioxymethamphetamine; urine; time-of-flight mass spectrometry

緒 言

近年開発された Direct Analysis in Real Time (DARTTM) イオン化法は、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⁾ DART では液体、固体等の試料形態を問わず、イオン源にかざすだけで物質の表面がイオン化され、分子量の測定が可能であるため、成分分析の簡便化及び迅速化が期待できる。既に DART を使用した食品中の異物²⁻⁵⁾や成分⁶⁻⁹⁾ 食品容器包装中

の添加物^{10,11)} 医薬品^{12,13)} 違法薬物¹⁴⁻¹⁶⁾ 生体試料中の代謝物¹⁷⁻¹⁹⁾ その他様々な分野における分析適応例が報告されている。また、われわれは過去に DART-TOFMS を用いた植物系違法ドラッグ製品及び法規制植物の簡便なスクリーニング法について報告している。²⁰⁾

尿中乱用薬物の 1 次スクリーニング法として、イムノクロマトグラフィーを用いた簡易検査キットによる検査法が、簡便な方法として多くの場面で使用されている。これら簡易検査キットは、尿を反応パネルの上に乗せ、試薬を滴下する等の単純な操作で判定できるが、日本における代表的な乱用薬物である覚せい剤 methamphetamine (MA) 及び合成麻薬 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) を

国立医薬品食品衛生研究所

*e-mail: kikura@nihs.go.jp

識別して同時に検出可能なイムノクロマトグラフィキットは現在のところ販売されていない。そこで、本研究では MA 及び MDMA, それら化合物の代謝物 amphetamine (AP) 及び 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA) を同時に判別可能な, DART-TOFMS を用いた尿中乱用薬物のスクリーニング法の検討を行った。

実験方法

1. 試薬 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, また GC-MS 分析時の内標準物質として MA 重水素標識体 (2-methylamino-1-phenylpropane-2,3,3,3-d₄, MA-d₄) の各化合物水溶液を使用した。MA 塩酸塩は大日本住友製薬から購入し, その他の化合物は過去に合成し, 論文で報告したものを使用した。^{21,22} 前処理用の尿素分解酵素として urease Type C3 from Jack beans, 1490000 U/g (Sigma Aldrich 社, MO, USA) 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, CA, USA) を, タンパク沈殿時の溶液膜ろ過フィルターとして UltraFree-MC (孔径 0.45 μm) (Millipore 社, MA, USA) を使用した。その他の試薬は試薬特級を用い, 尿試料はボランティアから得た尿を薬物フリーのヒトコントロール尿として使用した。ヒト尿試料採取及びその取り扱い, 国立医薬品食品衛生研究所研究倫理委員会による倫理審査の承認を経て, 倫理委員会の定める規定に則り, 遵守すべき基準に従って実施した。

2. 前処理法 尿中の尿素による影響を低減し, DART-TOFMS 測定における薬物の検出感度を向上させるために以下に示した簡易前処理法を検討した。

2-1. 固相抽出法 マイクロ固相抽出ピペットチップ (Omix pipette tips C18 又は C4) を用いて各薬物標準溶液を加え濃度 0.5–5 μg/ml に調製した尿試料中の化合物を, 以下に示した操作で抽出を行った。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 100 μl 2 回ピペット操作を行

う。④溶出: 溶出溶媒 50 μl 中でピペット操作を 5 回繰り返す。得られた溶出液を DART-TOFMS 分析に使用した。

2-2. 液-液抽出法 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た。さらに 500 μl の有機溶媒を加えて振とうし, 静置後有機溶媒層を測定に使用した。

2-3. 酵素処理法 尿素除去のために文献²³) に従い, 各薬物を添加したヒトコントロール尿 100 μl に urease (1000 U/ml リン酸緩衝溶液) 10 μl を加え, 37°C で 10 分間振とうし酵素反応を行った。

3. DART-TOFMS 分析 DART-TOFMS 測定装置として, イオン源 Direct Analysis in Real Time (DART) に質量分析計 AccuTOF JMS-T100 (ともに日本電子社製) を連結したものを使用した。測定は各試料溶液をガラス棒の先端に付着させ, 同一試料を 1 回 1–2 分の分析中で複数回 DART イオン源にかざし, スペクトルの確認を行った。なお, 質量校正には PEG600 を使用し, 各測定の内標準物質として caffeine (C₈H₁₀N₄O₂) 溶液を用いた。その他の測定条件は以下の通りである。

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: 100–500 (Da)

4. GC-MS 分析 各前処理法における尿中からの MA, AP, MDMA, MDA の回収率及び, 濃度範囲の直線性を確認するために, 各処理を行った後 GC-MS を用いて定量分析を行った。マイクロ固相抽出用ピペットチップ若しくは液-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 μg/ml) 及び酸性メタノールを MA, AP 遊離塩基の揮発防止のために微量添加した後, 窒素気流下で蒸発乾固させた。Trifluoroacetic anhydride (TFAA, Sigma Aldrich 社) 100 μl 及び酢酸エチル 100 μl を加え, 60°C で 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 TFA 体として GC-MS 測定を行った。また, 酵素処理溶液については, 反応液に内標準物質 MA-d₄ 水溶液 (最終濃度 2 μg/ml) 及びエタノー

ル 0.9 ml を加えてタンパクを沈殿させた後、溶液をフィルターを通し、窒素気流下で蒸発乾固させ、TFAA を用いて同様に誘導体化して GC-MS 測定試料とした。

GC-MS は Selected ion monitoring (SIM) モードで測定を行い、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 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 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。

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

GC-MS 条件：Column: HP-1MS (30 m \times 0.25 mm i.d., 0.25 μm , Agilent); Gas: He; Flow: 1.0 ml/min; injection volume: 1 μl ; splitless mode; Injection temp.: 200 $^{\circ}\text{C}$; Column temp.: 60 $^{\circ}\text{C}$ (1 min hold) – 20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ –280 $^{\circ}\text{C}$ (5 min hold); ionization: EI; transfer temp.: 280 $^{\circ}\text{C}$; monitoring ions: m/z 140 (TFA-AP), 154 (TFA-MA, TFA-MDMA), 135 (TFA-MDA), 158 (TFA-MA-d4)

結果及び考察

1. 標準溶液及び尿中薬物の直接分析 対象薬物の標準水溶液に、25%アンモニア水を微量加え遊離塩基として測定を行った。DART イオン源に同一試料を繰り返しガラス棒の先端に付着させてかざし、TOFMS により複数回の化合物スペクトル確認を行った。その結果 MA, AP, MDMA, MDA 水溶液のプロトン付加分子イオン $[\text{M}+\text{H}]^+$ の検出は、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。Table 1 に測定化合物及び尿素 dimer の組成式（プロトン付加体）及びモノアイソトピック質量値を示した。

次に尿試料に MA 水溶液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 dimer ($[\text{2M}+\text{H}]^+$: 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 (Fig. 1)。そこで、DART-TOFMS による尿中薬物分析において、尿素の影響を低減し検出感度を向上させるための簡易的な前処理法を検討した。

2. マイクロ固相抽出用ピペットチップを用いた分析 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り、尿中薬物分析の前処理にも用いられている。²⁴⁾

Table 1. Elemental Compositions of Targeted Compounds, Caffeine and Urea (Dimer) and Their Exact Mass (Calculated)

Compound	Elemental compositions (protonated)	Exact mass (calculated)
AP	$\text{C}_9\text{H}_{14}\text{N}$	136.11262
MA	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}$	150.12827
MDA	$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{NO}_2$	180.10245
MDMA	$\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{NO}_2$	194.11810
caffeine	$\text{C}_8\text{H}_{11}\text{N}_4\text{O}_2$	195.08820
urea (dimer)	$\text{C}_2\text{H}_9\text{N}_4\text{O}_2$	121.07255

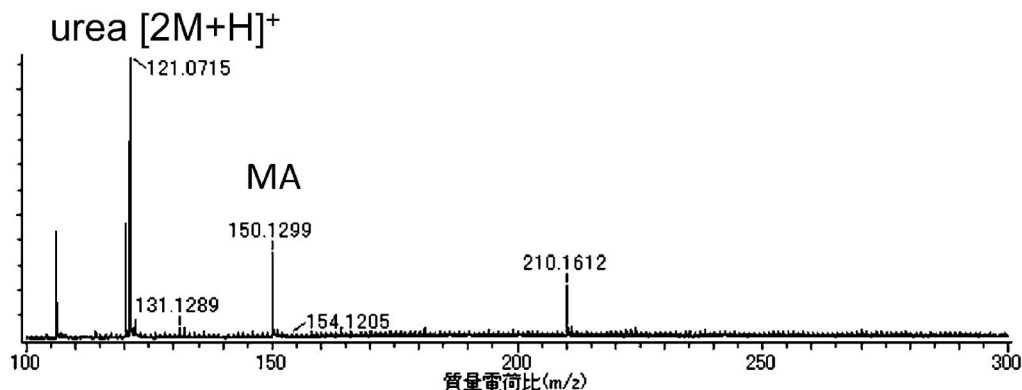


Fig. 1. DART-TOFMS Mass Spectrum of the Urine Sample Spiked with MA (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) without Any Pretreatments

DART-TOFMS では溶出液をそのままガラス棒に付着させて測定を行うため、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った。溶出溶媒としてメタノールのみ、メタノール/アセトニトリル混液、ジクロロメタン/イソプロパノール混液を用いて、DART-TOFMS測定を行ったところ、いずれの溶出溶媒においても、4化合物のプロトン付加分子イオンピーク $[M+H]^+$ が確認できた。最も感度が良好であったジクロロメタン/イソプロパノール混液 (3:1) と固相チップ C18 の組み合わせでは、尿中薬物濃度 $0.25 \mu\text{g}/\text{ml}$

で4化合物の $[M+H]^+$ が確認可能であった ($S/N > 3$) [Fig. 2(A)].

3. 液-液抽出を用いた分析 液-液抽出は尿中薬物の簡便な抽出法であり、様々な抽出溶媒が用いられている。本研究では、DART-TOFMS 分析において4化合物の検出感度がよく、他成分による妨害が少ない抽出溶媒を検討した。抽出溶媒をそのままガラス棒に付着させ DART-TOFMS で測定した結果、酢酸エチルを用いた場合、dimer である $[2M+H]^+$ 177 が強く検出され、4化合物の検出感度が低下した。ジエチルエーテルを用いると、

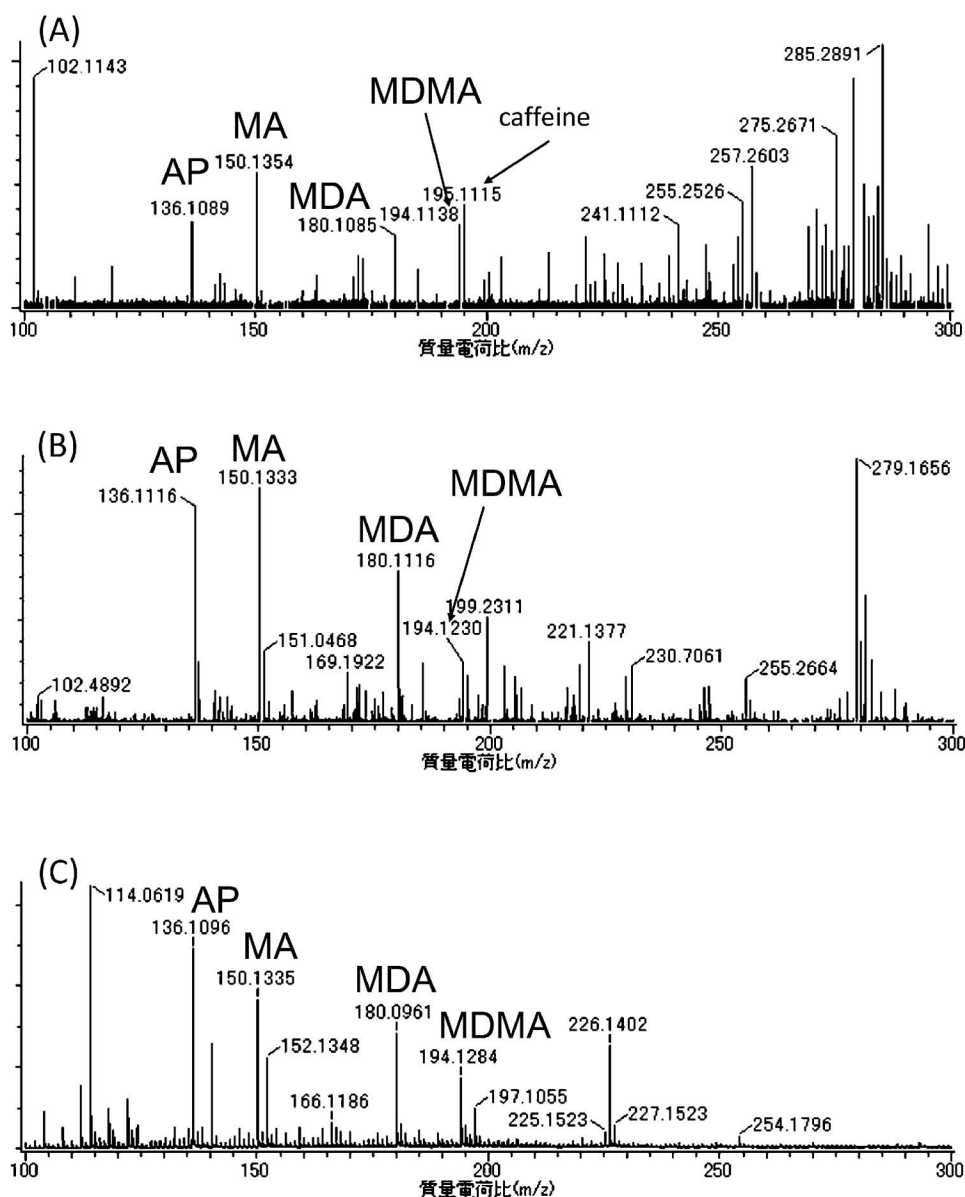


Fig. 2. DART-TOFMS Mass Spectra of the Extracts from the Urine

(A) at $0.25 \mu\text{g}/\text{ml}$ by C18 pipette tip-type solid-phase extraction (B) at $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ by liquid-liquid extraction with a mixed solution of dichloromethane and hexane and (C) at $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ treated with urease.

DART 測定中に揮発してしまうため、安定した測定が困難であった。ヘキサンを用いると、尿中常在成分の低減が確認できたが、AP 及び MDA の検出感度が他 2 化合物に比べ低下した。また、ジクロロメタンを使用した場合は、有機溶媒が下層なため、DART 測定時においてガラス棒に有機溶媒層のみを付着させることが困難であった。そこで、ヘキサンにイソプロパノール、エタノール、アセトン、ジクロロメタンを加えた混合液について検討を行った結果、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 化合物の検出感度が改善された。Figure 2(B)に示したように、 $0.5 \mu\text{g/ml}$ の尿中薬物濃度で 4 化合物のイオンピーク $[\text{M}+\text{H}]^+$ が確認可能であり ($\text{S}/\text{N}>3$)、他の溶媒抽出液と比較して最もよい結果が得られた。

4. 酵素処理による分析 酵素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ところ、尿素の分解は確認できたが他成分の影響により、4 化合物とも $1 \mu\text{g/ml}$ 以下の濃度でイオンピーク $[\text{M}+\text{H}]^+$ の検出が困難であった。Figure 2(C)に 4 化合物を $5 \mu\text{g/ml}$ 添加し、urease 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。

5. GC-MS 分析による各前処理液の定量結果

以上の DART-TOFMS による測定結果に基づき、各前処理法の抽出効率を確認するため GC-MS を用いて処理液について定量分析を行った。

固相抽出法では、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)、固相に C18 を用いた操作法で、各化合物の尿中からの回収率が、 $0.25 \mu\text{g/ml}$ (最終濃度 $0.5 \mu\text{g/ml}$) では AP, MDA において 70% 以下であったが、 $0.5\text{--}5 \mu\text{g/ml}$ (最終濃度 $1.0\text{--}10 \mu\text{g/ml}$) の濃度範囲では 4 化合物ともに 70% 以上の回収率を示し [Fig. 3(A)], 直線性も $\text{R}^2>0.990$ であった。

液-液抽出法においては、抽出液にヘキサンのみを使用した場合、AP 及び 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% 以上であった。そこで、ヘキサン/ジクロロメタンを 2:1 で混合したところ、4 化合物すべての回収率が各濃度で 70% 以上に向上し [Fig. 3(B)], 直線性も $\text{R}^2>0.990$ であった。

また、酵素処理法においては、タンパク沈殿及び膜ろ過後、誘導體化を行った試料を GC-MS で分析した結果、 $1.0\text{--}5.0 \mu\text{g/ml}$ の濃度範囲では回収率が 60-80% であったが、GC-MS クロマトグラム上で尿中常在成分による妨害が大きく、 $0.5 \mu\text{g/ml}$ では

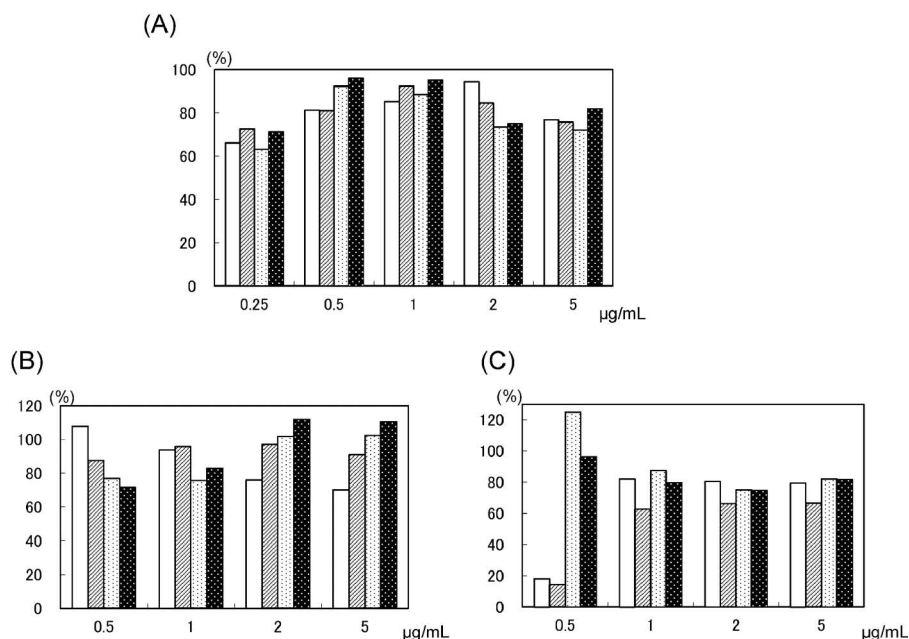


Fig. 3. Recoveries of Targeted Compounds

AP (□), MA (▨), MDA (▤) and MDMA (■). (A) from urine samples extracted by C18 pipette tip-type solid-phase extraction, (B) a liquid-liquid extraction with a mixed solution of dichloromethane and hexane and (C) treated with urease.

各化合物の回収率が大きくばらついた [Fig. 3(C)].

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 により測定したところ、尿素等の常在成分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、簡易抽出法を検討した結果、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により、各薬物 0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度まで、プロトン付加分子イオンピーク $[\text{M}+\text{H}]^+$ が検出可能であった ($\text{S}/\text{N}>3$)。また、ヘキサノール/ジクロロメタン混液を用いた液-液抽出では、0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ まで検出が可能であった ($\text{S}/\text{N}>3$)。一方、urease 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 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下の濃度では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、上記の前処理溶液中薬物を GC-MS により測定した結果、固相抽出法及び液-液抽出法で 4 化合物の回収率は 70% 以上となり、0.5–5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の尿中薬物濃度範囲で良好な直線性を示した。

本研究において、簡単な前処理を行うことにより、常在成分によるイオン化抑制が低減し、尿試料中の薬物分子イオンピークが DART-TOFMS により検出可能であった。さらに十分なスペクトル強度が得られる高濃度試料においては、精密質量値から、組成推定を行うことが可能であった。本法は、米国乱用薬物・精神衛生サービス管理局 (SAMHSA) 等の推奨するカットオフ値濃度 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の尿中 MA 及び MDMA について、固相抽出又は液-液抽出による前処理に 1 分程度、DART-TOFMS による測定で 1–2 分と、合計 3 分以内の分析時間で同時に検出することが可能であり、また、高濃度の場合は組成推定による判別が可能である。さらに、代謝物を同時検出することにより、尿への MA, MDMA の混入を否定でき、スクリーニングの信頼性が高まる。既存の尿検査簡易キットでは MA と MDMA 及び代謝物の同時検出が困難であることを考慮すると、DART-TOFMS は尿中のこれら薬物の 1 次スクリーニング法として有用であると考えられた。しかし、組成式が同一な化合物については、DART-TOFMS のみで判別できないことに

留意する必要がある。また本研究では、尿中に存在する可能性がある他の成分 (薬物や添加物を含む) が及ぼす影響は検討しておらず、今後、実際の薬物使用者を含む様々な尿試料について検討を加える必要がある。

謝辞 本研究は、厚生労働科学研究費補助金で行われたものであり、関係各位に深謝いたします。

REFERENCES

- 1) Cody R. B., Laramée J. A., Durst H. D., *Anal. Chem.*, **77**, 2297–2302 (2005).
- 2) Vail T., Jones P. R., Sparkman O. D., *J. Anal. Toxicol.*, **31**, 304–312 (2007).
- 3) Saka K., Konuma K., Asai S., Unuma K., Nakajima M., Yoshida K., *Forensic Sci. Int.*, **191**, 5–10 (2009).
- 4) Dane A. J., Cody R. B., *Analyst*, **135**, 696–699 (2010).
- 5) Vaclavik L., Rosmus J., Popping B., Hajslova J., *J. Chromatogr. A*, **1217**, 4204–4211 (2010).
- 6) Kim H. J., Jang Y. P., *Phytochem. Anal.*, **20**, 372–377 (2009).
- 7) Vaclavik L., Cajka T., Hrbek V., Hajslova J., *Anal. Chim. Acta*, **645**, 56–63 (2009).
- 8) Maleknia S. D., Vail T. M., Cody R. B., Sparkman D. O., Bell T. L., Adams M. A., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **23**, 2241–2246 (2009).
- 9) Block E., Dane A. J., Thomas S., Cody R. B., *J. Agric. Food Chem.*, **58**, 4617–4625 (2010).
- 10) Ackerman L. K., Noonan G. O., Begley T. H., *Food Addit. Contam.*, **26**, 1611–1618 (2009).
- 11) Rothenbacher T., Schwack W., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **24**, 21–29 (2010).
- 12) Fernández F. M., Cody R. B., Green M. D., Hampton C. Y., McGready R., Sengaloundeth S., White N. J., Newton P. N., *Chem-MedChem*, **1**, 702–705 (2006).
- 13) Petucci C., Diffendal J., Kaufman D., Mekonnen B., Terefenko G., Musselman B., *Anal. Chem.*, **79**, 5064–5070 (2007).
- 14) Bennett M. J., Steiner R. R., *J. Forensic Sci.*, **54**, 370–375 (2009).
- 15) Steiner R. R., Larson R. L., *J. Forensic Sci.*,

- 54, 617–622 (2009).
- 16) Jagerdeo E., Abdel-Rehim M., *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **20**, 891–899 (2009).
 - 17) Zhao Y., Lam M., Wu D., Mak R., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **22**, 3217–3224 (2008).
 - 18) Yu S., Crawford E., Tice J., Musselman B., Wu J. T., *Anal. Chem.*, **81**, 193–202 (2009).
 - 19) Jeckelmann N., Haefliger O. P., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **24**, 1165–1171 (2010).
 - 20) Kawamura M., Kikura-Hanajiri R., Goda Y., *Yakugaku Zasshi*, **129**, 719–725 (2009).
 - 21) Kikura R., Nakahara Y., Mieczkowski T., Tagliaro F., *Forensic Sci. Int.*, **84**, 165–177 (1997).
 - 22) Nakahara Y., Takahashi K., Shimamine M., Takeda Y., *J. Forensic Sci.*, **36**, 70–78 (1991).
 - 23) Matsumoto I., Kuhara T., *Mass Spectrom. Rev.*, **15**, 43–57 (1996).
 - 24) Suzuki Y., Sato M., Kaneko T., *Jpn. J. Forensic Sci. Tech.*, **13**, 45–50 (2008).