

超高速液体クロマトグラフータンデム質量分析計 (LC-MS-MS) を用いた覚醒剤中の残存エフェドリン類の分析方法の検討について

安藤 利典*, 石崎 哲章*, 佐々木 良祐*, 樋野 千寿*

Ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of residual ephedrine in methamphetamine samples

Toshinori ANDO*, Noriaki ISHIZAKI*, Ryosuke SASAKI* and Chitoshi HINO*

*Central Customs Laboratory, Ministry of Finance 6-3-5, Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba 277-0882 Japan

For improvement of rapidity and stability for the analysis of residual ephedrine (ephedrine and pseudoephedrine) in methamphetamine profiling analysis, we examined an analytical method using Ultra Performance Liquid Chromatograph-tandem Mass Spectrometry (LC-MS-MS). When analyzing the ephedrine in the product ion mode after optimizing the measurement conditions and setting precursor ion to m/z 166, it was possible to detect them separately with equal or higher sensitivity and better stability, compared with the current method (Ultra Performance Liquid Chromatography with fluorescence derivatization). The LC-MS-MS method also simplified pretreatment procedures and thereby improved throughput for ephedrine analysis.

1. 緒 言

不正薬物のプロファイル分析は、押収した不正薬物の不純物、純度、安定同位体比等の科学的特徴を明らかにする分析であり、その科学的特徴から不正薬物の原料、合成に用いられる試薬、押収した事案ごとの関連性等の情報を得て、原料や試薬の規制や新たな流通ルートの解明等を目的としている。

覚醒剤は、エフェドリン及びブソイドエフェドリン（以下、エフェドリン類という。）又はフェニルアセトンを原料として Fig.1 のように様々な合成法により密造されていることから²⁾、合成法は科学的な特徴付けにおいて重要な要素であり、その特定には、まず合成の原料として使用された物質が何かを知ることが必要である。これまでにメタンフェタミンに含まれる不純物に関する報告で、エフェドリン類を原料とするメタンフェタミンからエフェドリン類が検出されることが報告されており^{3,4)}、当所の覚醒剤プロファイル分析では、不純物分析でその分析を行っている。

覚醒剤中の微量エフェドリン類の分析は高感度検出が要求されることから、現在、当所においては、蛍光誘導体化ー超高速液体クロマトグラフィーにより行っている。しかしながら、当該分析手法は誘導体化に 30 分程度要し、その操作も煩雑である。また、測定では、水系溶媒（りん酸緩衝液）と有機系溶媒を移動相とし、その混合比を変化させながら分析するグラジエント条件で行わざるを得ず、有機溶媒比率が高くなると塩を析出し、測定が中断す

る等の問題も見受けられることから、分析方法として安定性に欠けている。

そこで、本研究では、上記の課題の解決にむけて、超高速液体クロマトグラフータンデム質量分析計（以下、LC-MS-MS と略記する。）を用いた覚醒剤中の微量エフェドリン類の分析方法を検討したので報告する。

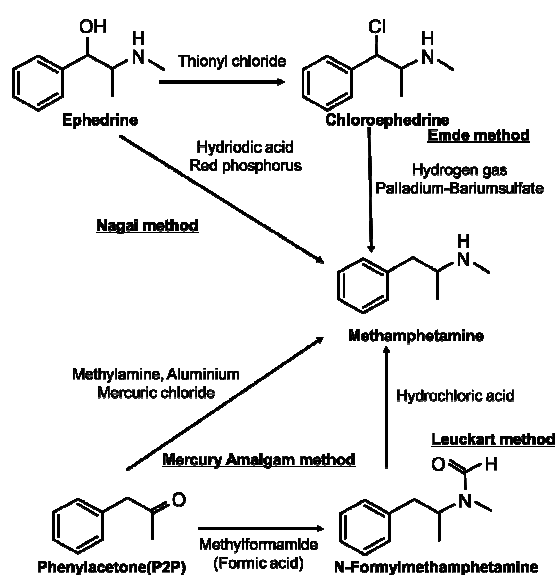


Fig.1 Synthetic routes of methamphetamine.

2. 実 験

2.1 試料及び試薬

2.1.1 試料

エフェドリン

プソイドエフェドリン

覚醒剤（微量のエフェドリン類が残留するもの）

いずれも当所が所持する標準品であり、エフェドリンは大日本製薬製のもの、プソイドエフェドリンは BASF 製のもの、覚醒剤は国庫帰属のものをそれぞれ使用した。

2.1.2 試薬

メタノール（HPLC 用，和光純薬）

エタノール（HPLC 用，和光純薬）

アセトニトリル（HPLC 用，和光純薬）

ギ酸アンモニウム（特級，ナカライテスク）

ギ酸（HPLC 用，和光純薬）

2.2 装置及び測定条件

2.2.1 標準エフェドリン類を用いた分離条件の検討

装置：超高速液体クロマトグラフータンデム質量分析計

UPLC (H-class)-XevoTQD（Waters 社製）

カラム：VanGuard C18（2.1 mm×5 mm）+ACQUITY BEH C18（2.1 mm×150 mm）

カラム温度：40℃

流速：0.3 mL/min

溶離液：(A)10 mM ギ酸アンモニウム水溶液(pH3)

(B)メタノール，エタノール，アセトニトリル

グラジエント条件：A/B 97/3 (0 min, 12 min hold)→60/40 (26 min, 14 min gradient)→10/90 (26.1 min, 0.1 min gradient)→10/90(31 min, 4.9 min hold)

イオン化法：エレクトロスプレーイオン化法（ポジティブモード）

検出器：タンデム四重極型質量分析計

コーン電圧：22 V

キャピラリ電圧：3.0 kV

2.2.2 シングルスキャンモードによる覚醒剤中の残存エフェドリン類の分析

溶離液：(A)10 mM ギ酸アンモニウム(pH3)，(B)メタノール

他の測定条件は 2.2.1 と同様。

2.2.3 プロダクトイオンスキャンモードによる覚醒剤中の残存エフェドリン類の分析

コリジョン電圧：20 V

選択したプリカーサーイオンの質量電荷比：m/z 166

他の測定条件は 2.2.2 と同様。

2.2.4 カラム長のスケールダウンによる測定時間の短時間化の検討

カラム：VanGuard C18（2.1 mm×5 mm）+ACQUITY BEH C18（2.1 mm×100 mm）

流速：0.4 mL/min

グラジエント条件：A/B 97/3 (0 min, 4 min hold)→60/40 (18 min,

14 min gradient)→10/90 (18.1 min, 0.1 min gradient)→

10/90(22min, 3.9 min gradient)

他の測定条件は 2.2.3 と同様。

3. 結果及び考察

3.1 標準エフェドリン類を用いた分離条件の検討

当所の覚醒剤プロファイル分析では検出されたエフェドリンとプソイドエフェドリンのピークの積分値の比を科学的特徴として異動識別等に活用しているため、エフェドリンとプソイドエフェドリンを分離して検出する必要がある。移動相の組み合わせを変えて LC-MS-MS にて標準エフェドリン類の分析を行い、それぞれの保持時間を確認した。測定時間の短縮を図るために、移動相については塩基性化合物であるエフェドリン類の保持を弱くする酸性緩衝液 10 mM ギ酸アンモニウム水溶液 (pH3) を水系溶媒として使用し、アルコール系有機溶媒又はアセトニトリルと組み合わせ、流速についてはカラムの耐圧上限を考慮して 0.3 mL/min とした。各移動相におけるエフェドリン類の保持時間を Table 1 に示す。

Table 1 Retention time of ephedrine in each mobile phase.

mobile phase		retention time(min)	
A	B	ephedrine	pseudoephedrine
10mM solution of ammonium formate (pH3)	methanol	16.6	17.7
	ethanol	9.0	9.9
	acetonitrile	10.0	10.9

検討条件中でエフェドリン類が最も良好な分離を示した移動相の組合せは、10 mM ギ酸アンモニウム (pH3) とメタノールであった。得られたトータルイオンクロマトグラムを Fig.2 に示す。

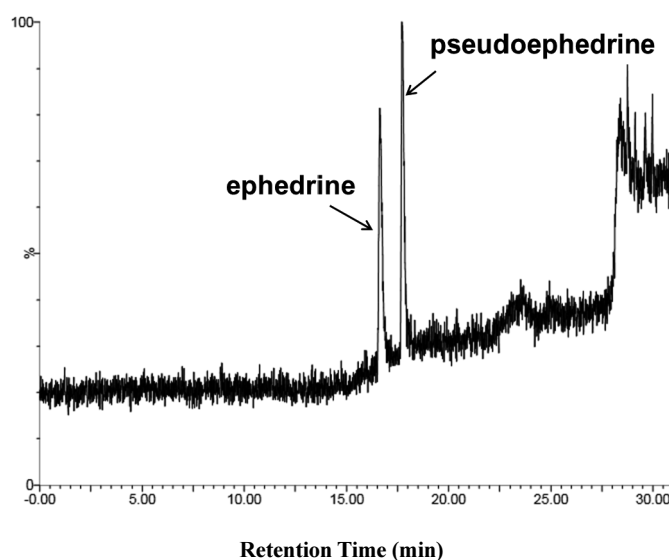


Fig.2 Total ion chromatogram of standard ephedrine in the case of solution of ammonium formate(pH3) and methanol.

3.2 シングルスキャンモードによる覚醒剤中の残存エフェドリン類の分析

3.1 の検討結果に基づき移動相に 10 mM ギ酸アンモニウム(pH3) とメタノールを用いて LC-MS-MS にて覚醒剤の分析を行い、覚醒剤中の残存エフェドリン類が検出されるか確認した。得られたトータルイオンクロマトグラム及び保持時間 16.3 分及び 17.3 分のマスマスペクトルを Fig.3 及び 4 にそれぞれ示す。

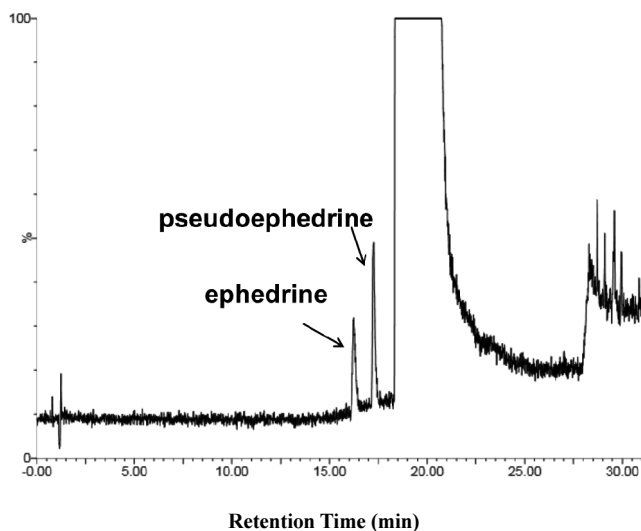


Fig.3 Total ion chromatogram of methamphetamine.

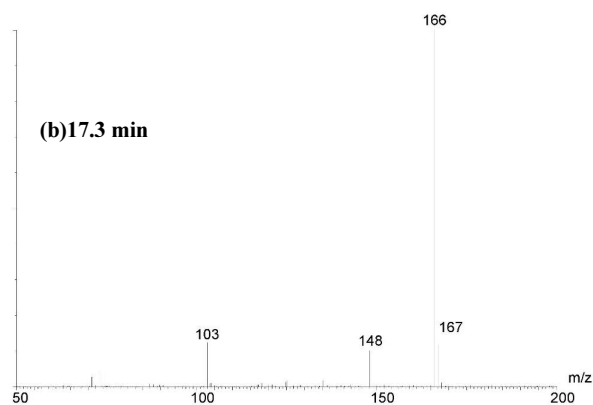
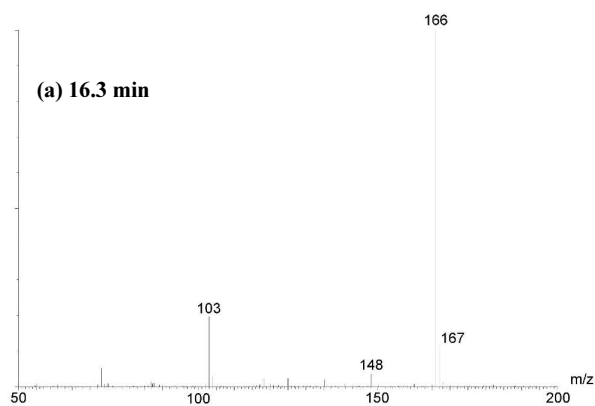


Fig.4 (a)ESI MS spectrum of ephedrine at 16.3 min and (b)ESI MS spectrum of pseudoephedrine at 17.3 min.

標準エフェドリン類との保持時間及びマスマスペクトルの比較により覚醒剤中の残存エフェドリン類の同定を行った。シングルスキャンモードではイオン化したイオンが全て検出され、主要なフラグメントイオンは m/z 166 のエフェドリン類のプロトン付加体である。また、検出下限は 1 ppm 程度であり、現行法の検出下限 100 ppb 程度には及ばなかった。

3.3 プロダクトイオンスキャンモードによる覚醒剤中の残存エフェドリン類の分析

プリカーサーイオンの質量電荷比を m/z 166 に設定しプロダクトイオンスキャンモードを用いて覚醒剤中の残存エフェドリン類が検出されるか確認した。プロダクトイオンスキャンモードとはイオン化した特定のイオン（プリカーサーイオン）のみを通過させ、コリジョンセルにて衝突誘起解離させて得られたプロダクトイオンを全て検出しマスマスペクトルを得るものである。得られたトータルイオンクロマトグラム及び保持時間 16.3 分及び 17.3 分のマスマスペクトルを Fig.5 及び 6 にそれぞれ示す。

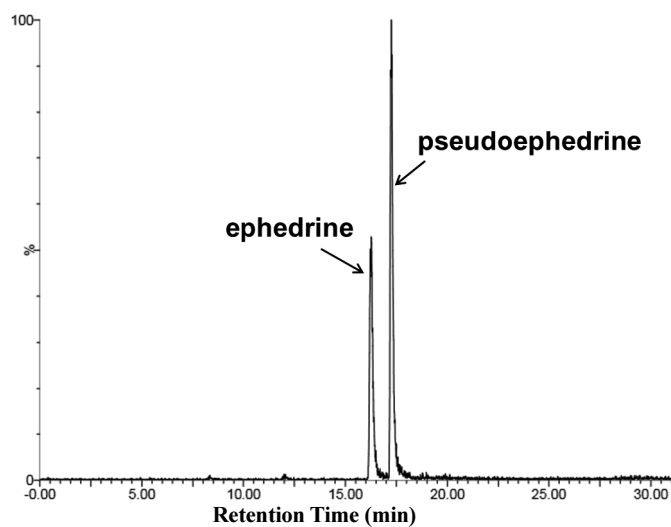


Fig.5 Total ion chromatogram of methamphetamine in the product ion scan mode using m/z 166.

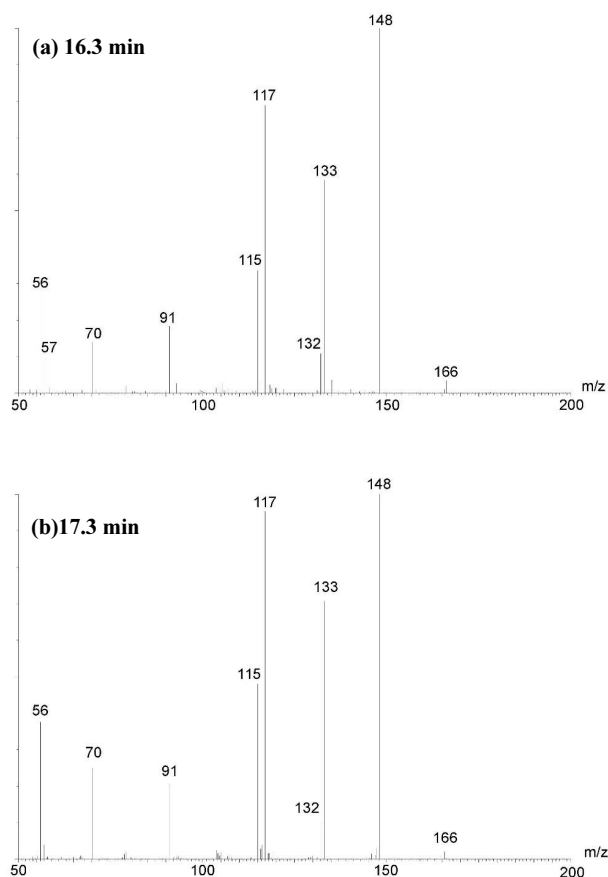


Fig.6 (a)MS/MS spectrum of ephedrine at 16.3 min and (b)MS/MS spectrum of pseudoephedrine at 17.3 min.

標準エフェドリン類との保持時間及びマスマススペクトルの比較により覚醒剤中の残存エフェドリン類の同定を行った。プロダクトイオンスキャンモードにより得られたマスマススペクトルにおいて m/z 148, 117 や 133 等のフラグメントイオンが強く検出されている。また、質量分析計にて選択的にイオンを通過させるためノイズが低くなるので検出下限は 100 ppb 程度であり、現行法の検出下限と同等であった。

シングルスキャンモードの結果と比較すると、プロダクトイオンスキャンモードではマスマススペクトルはより特徴的であるため定性能力は高く、検出下限も 10 倍程度向上した。

3.4 カラム長のスケールダウンによる測定時間の短時間化の検討

測定時間を短縮するために、長さ 150 mm のカラムを 100 mm のものに変更して LC-MS-MS にて覚醒剤の分析を行い、覚醒剤中の残存エフェドリン類が十分に分離されるか確認した。得られたトータルイオンクロマトグラム及び保持時 6.2 分及び 6.9 分のマスマススペクトルを Fig.7 及び 8 にそれぞれ示す。

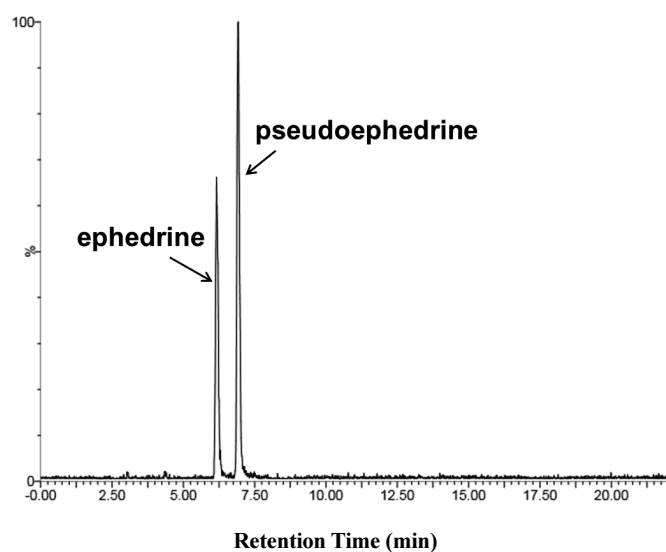


Fig.7 Total ion chromatogram of methamphetamine in the product ion scan mode using m/z 166.

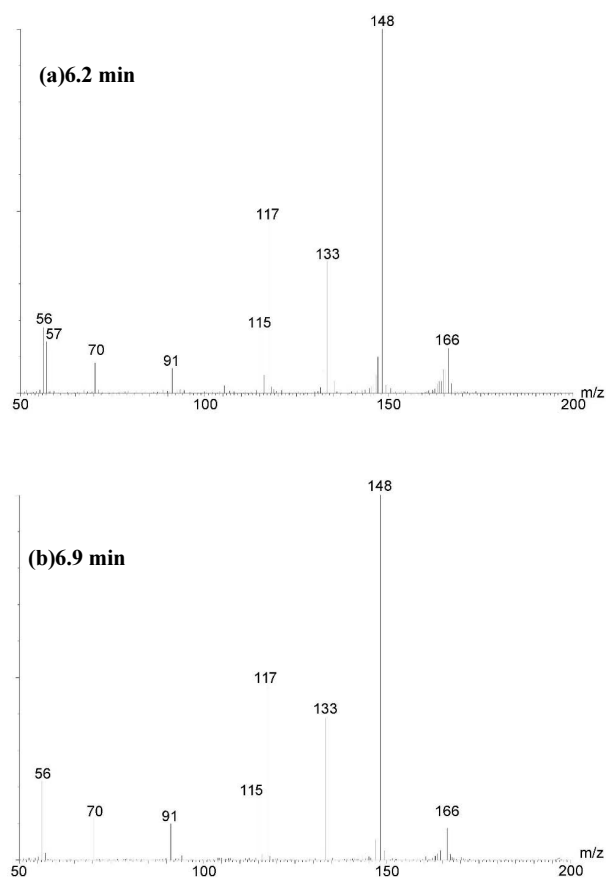


Fig.8 (a)MS/MS spectrum of ephedrine at 6.2 min and (b) MS/MS spectrum of pseudoephedrine at 6.9 min.

標準エフェドリン類との保持時間及びマスマススペクトルの比較により覚醒剤中の残存エフェドリン類の同定を行った。覚醒剤中の残存エフェドリン類は、充分に分離されており、測定時間は150 mm カラムを用いた場合に比べ3分の1程度短縮することができた。

3.5 現行法（蛍光誘導体化－超高速液体クロマトグラフィー）の前処理方法及び安定性との比較

現行法の前処理手順及び今回考案した LC-MS-MS を用いた分析方法の調製手順を Fig.9 に示す。

- ・ Existing method for UPLC-Fluorescent Detection
 - ① Dissolve 10 mg of sample in 5 mL of 0.1 mol/L carbonic acid buffer (pH 9)/acetonitrile 4/1 solution.
 - ↓
 - ② Mix 70 μ L of 4-(4,5-diphenyl-1H-imidazole-2-yl) benzoyl chloride hydrochloride 13 mg/mL acetonitrile solution with 100 μ L of the sample solution, and stand for 20 minutes at room temperature.
 - ↓
 - ③ Filtrate it with 0.2 mm membrane filter, and add 10 μ L of 2.5% ammonia aqueous solution, and stand for 10 minutes at room temperature, then filtrate it with 0.2 mm membrane filter again.
- ・ New method for LC-MS-MS

Dissolve 10 mg of sample in 1 mL of 10mM solution of ammonium formate (pH3).

Fig.9 Comparison of pretreatment step in our existing method for UPLC-Fluorescent Detection and new method for LC-MS-MS.

現行法では誘導体化処理を行うため前処理方法が煩雑であり、反応に30分程度の時間を要する。また、機器測定の安定性については測定中に塩を析出し、測定が中断する場合がある。

一方、今回考案した LC-MS-MS を用いた分析方法では前処理の必要がなく、70時間連続分析しても測定が中断するような問題は生じなかった。

以上のことから LC-MS-MS を用いた分析方法は、煩雑な前処理がないため、簡便かつ短時間で行うことができ、なおかつ測定の安定性についても優れている。

4. 要 約

本研究では、LC-MS-MS を用いて、現行法と同等以上の高感度検出が可能で、かつ前処理の必要がなく、安定性に優れた覚醒剤中の残存エフェドリン類の分析方法を考案・検討した。

今回検討した中では、グラジエント条件で移動相に10 mM ギ酸アンモニウム (pH3) とメタノールを用いた場合がエフェドリン類の分離が最も良好であり、覚醒剤中の残存エフェドリン類の分析も可能であった。また、測定時間の短縮のためカラム長をスケールダウンしても分析は可能であった。

質量分析計の測定モードにプロダクトイオンスキャンモードを用いることによって、検出感度は現行法と同等程度が実現でき、かつ定性能力については、保持時間の他に特徴的なマスマススペクトルが利用できるため現行法よりも優れている。

また、今回考案した LC-MS-MS を用いた分析方法は現行法に比べ、前処理の必要がなく簡便かつ短時間で行うことができ、測定については塩の析出等により中断することがないため安定性に優れている。

文 献

- 1) B. Remberg, A.H. Stead : *Bulletin on Narcotics*, LI (1999) 97-117.
- 2) Y. Makino, Y. Urano, T. Nagano : *Journal of Chromatography A*, **947** (2002) 151-154.
- 3) J.S. Lee, E.Y. Han, S.Y. Lee, E.M. Kim, Y.H. Park, M.A. Lim, H.S. Chung, J.H. Park : *Forensic Science International*, **161** (2006) 209-215.
- 4) Maroney KA, Culshaw PN, Wermuth UD, Cresswell SL : *Forensic Science International*, **232** (2014) 52-61.