

研究種目：基盤研究 (A)  
研究期間：2006 ～ 2009  
課題番号：18209025  
研究課題名 (和文) ナノスケール高速液体クロマトグラフィー／質量分析計  
の法医学への応用  
研究課題名 (英文) Application of nanoLC/MS/MS to legal medicine

## 研究代表者

石井 晃 (ISHII AKIRA)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：30252175

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学、法医学

キーワード：高速液体クロマトグラフィー、質量分析、エレクトロスプレー、ナノスケール LC

## 1. 研究計画の概要

本研究では、LC/MS 及び LC/MS/MS で広く用いられているナノスプレー LC を用い、薬毒物分析の高感度化を図る。一方、ナノスプレー LC/MS/MS システムはプロテオミクス分野で汎用されているが、多くは共通機器として使用されている。ナノスプレー LC/MS/MS による分析が法医学領域で応用されれば、主に生化学等の領域で使用されている LC/MS/MS システムを共有できることとなり、高価な分析システムを教室で保有することなく、薬毒物の高感度分析が可能となる。同時に、新しいイオン化法のナノスプレー LC への応用も同時に検討する。

## 2. 研究の進捗状況

ナノスケール LC を用いた LC/MS/MS 分析のスケールダウンについては、ブチロフェノン系向精神薬をモデルとして血漿サンプルから精製を行い、分析した。血漿サンプルの量は 50  $\mu$ l とし、精製後、100  $\mu$ l の移動相に再構成した試料の 1  $\mu$ l を MS/MS に注入した。この条件下では、感度限界はオンカラムで 100 pg 程度であった。これ以上の血漿から精製した場合、不純物による流路の閉塞や、妨害ピークの影響が予想される。ピーク形状は、3  $\mu$ l/min 程度の流速で良好になったが、それ以上の流量の増加は流路の漏れやカラム圧の著しい上昇を招くと考えられ、望ましくないと結論付けられた。一方、ナノスケールにおけるエレクトロスプレーのイオン化効率を向上させるために、以前のセミマイクロスケールで効果が得られたレーザーสプレーイオン化法を、ナノスケールに応用することを計画した。しかしながら、検討を繰り返した

ものの、レーザーをナノスケール LC に確実に安全に照射することは極めて困難であることが明らかとなり、高い処理速度を持つ UPLC/MS/MS による分析を同時に試みることにした。UPLC は超高压にも耐えられるため、高速で多数の目的物質が分離できるという特色がある。UPLC を用いた場合、ブチロフェノン系向精神薬、マイナートランキライザー、三環系抗うつ剤は、血漿サンプルから高感度に検出することができ、感度限界は多くの薬物で 100 pg/ml 以下であった。また、1～1,000 ng/ml の範囲で良好な直線性が観察され、5, 50, 200 ng/ml の濃度で、CV 値は約 15 % 以下であり、再現性も良好であると考えられた。

## 3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している。  
理由：ナノスケール LC は、超微量の試料を扱うため、もともとハンドリングが困難と考えられる。今回の研究では、血漿サンプル 50  $\mu$ l 程度であれば、プロテオミクス用の LC/MS/MS システムにも十分使用可能であることを示し、これは、法医学と他の領域とが微量分析において、共有の可能性を示した点で評価できるものと考えられる。一方、UPLC と MS/MS との結合は、極めて高感度な分析が可能であることが示されたが、これらを勘案すると、ナノスケール LC/MS/MS システムは、爪や毛髪等、マトリックス中の夾雑物の影響が少ない試料に特化する方向も考えられ、ヒト体液中薬毒物の高感度分析という目標についても、着実にデータを蓄積している。

#### 4. 今後の研究の推進方策

- 1) 固相抽出の最適化及びスケールダウンをさらに遂行する。
- 2) 毛髪及び爪等の、不純物の少ない試料をターゲットとしてナノスケール LC/MS/MS 分析を行う。
- 3) ナノスケール LC と結合させる MS/MS として、UPLC と結合させている TQD を用い、感度や情報処理速度等の比較を行う。

#### 5. 代表的な研究成果

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 32 件)

- 1) Hattori H, Hirata Y, et al.: Simultaneous analysis of aconitine, mesaconitine, hyaconitine, and jesaconitine in whole blood by LC-MS-MS using a new polymer column. Forensic Toxicol. 27, 7-11, 2009. 査読有
- 2) Asakawa D, Chen LC, Hiraoka K: Negative-mode MALDI mass spectrometry for the analysis of pigments using tetrathiafulvalene as a matrix. J. Mass Spectrom. 43, 1217-1222, 2008. 査読有
- 3) 石井 晃, 金子理奈 他: 新しい質量分析技術の法医学領域への応用 質量分析 56, 131-138, 2008. 査読有
- 4) Hiraoka K, Nishidate K et al.: Development of probe electrospray using a solid needle. Rapid Commun. Mass Spectrom. 21, 3139-3144, 2007. 査読有
- 5) Kaneko R, Ishii A et al: Sensitive analysis of aconitine, hyaconitine, mesaconitine, and jesaconitine in human body fluids and Aconitum tubers by LC/ESI-TOF-MS. J. Mass Spectrom. 41, 810-814, 2006. 査読有

[学会発表] (計 13 件)

- 1) Kaneko R, Hirata Y et al: Simultaneous

analyses of 17 volatile organic compounds by cryogenic-oven-trapping gas chromatography-mass spectrometry. The 7<sup>th</sup> International Symposium of Advances in Legal Medicine, 2008 年 9 月 4 日, 大阪.

- 2) Kaneko R, Hirata Y, et al.: Sensitive analysis of volatile compounds by cryogenic-oven-trapping gas chromatography-mass spectrometry. The 46<sup>th</sup> TIAFT, 2008 年 6 月 4 日, La Martinique.

- 3) 服部 秀樹, 伊藤健次郎 他: 血清中 SNRI, DNRI 及び NRI の LC/MS/MS による迅速分析 日本法中毒学会第 27 年会, 2008 年 6 月 14 日, 東京.

- 4) 石井 晃: 新しい質量分析技術の法医学領域への応用 第 34 回 BMS カンファレンス, 2007 年 7 月 10 日, 鳥羽.

- 5) 石井 晃, 金子 理奈 他: レーザースプレーイオン化法によるヒト体液中向精神薬の高感度分析 第 91 次日本法医学会総会, 2007 年 5 月 18 日, 秋田.

[図書] (計 1 件)

- 1) Ishii A, Suzuki O, Katsumata Y: Section 8-2-04. Surface ionization and its application to GC-MS. In: Encyclopedia of Mass Spectrometry, Vol. 8 (ed. Wilfred Niessen), 92-99, 2006.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

産業財産権の名称: 特許

発明者: 平岡賢三

筆頭出願人: 山梨大学

発明の名称: イオン化法および装置

出願番号: 特願 2008-8247

出願日: 2008/01/17

国内