

平成 21 年 5 月 28 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590669
 研究課題名（和文） カルボン酸添加によりガスクロマトグラフィーの感度を上昇させる方法の研究
 研究課題名（英文） The study of the method for improving sensitivity of gas chromatography by carboxylic acid addition
 研究代表者
 坂 幹樹（SAKA KANJU）
 東京大学・大学院医学系研究科・技術専門職員
 研究者番号：30447388

研究成果の概要：極性化合物をガスクロマトグラフィー質量分析計（GC-MS）にて測定すると吸着による感度低下を招くため、通常は誘導体化処理を行ってから測定する。我々は、この吸着が注入口のライナーに充填されているガラスウール上で主に起きていることをつきとめ、誘導体化をしなくても溶媒にカルボン酸（ギ酸・酢酸）を添加すると吸着が減少することを見出した。添加するカルボン酸は 3% 付近で感度・再現性ともに良い値を示し、この迅速・簡便な方法が定量性も十分であることを証明した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

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：ガスクロマトグラフィー，カルボン酸，マトリックス効果，薬物分析

1. 研究開始当初の背景

（1）法医学では、死因に薬物が関与しているか否かを調べるために血中薬物濃度（主に血清を用いる）の検査を行っている。気管支拡張剤であるテオフィリンを GC-MS を用いて測定したところ、標準品のレスポンスより同量を血清に添加・抽出したサンプルのレスポンスの方がはるかに大きかった（マトリックス効果）。この常識的ではない現象を検討したところ、サンプルがより汚い（夾雑物が多い）方がテオフィリンのレスポンスがより大きくなることが明らかになってきた。我々はこの現象をより深く理解するために研究

を始め、感度が上昇するという結果を利用して、抽出したサンプルに意図的に“ある物質”を加え、さらなる感度上昇を引き起こす方法を試みた。

（2）抽出サンプルに添加する“ある物質”を決めるため血清抽出物のバックグラウンドノイズを調べると、ヘキサデカン酸やオレイン酸などが多量に存在したので、カルボン酸は有効な物質であるかもしれないと仮説を立てた。しかし、これらのカルボン酸は沸点が高くキャリーオーバーが懸念されたため、より分子量が小さい酢酸を添加してみた。すると、酢酸の添加はテオフィリンの感度を

上昇させたので、添加実験によって現象の解明および分析条件の最適化を試み、実践で使える方法であるかを確認することにした。

2. 研究の目的

(1) 極性化合物の吸着が GC-MS のどの部位でどのように起きているかを知ることが最初の目的となった。また、カルボン酸はこの吸着に対してどのように、どの程度効果があるかを検討した。

(2) 予備実験にて、ギ酸や酢酸の添加がテオフィリンやアモバルピタル・フェノバルピタル（睡眠鎮静薬）の感度を上昇させることが明らかであったので、この方法における定量分析の正確さ・精度を確認することにした。誘導体化を用いないこの方法は、迅速・簡便であり、法医学や臨床医学の実践（薬物分析）で用いられることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 吸着部位は、注入口、カラム、イオン源が考えられるが、注入口のライナーを交換するとレスポンスが極端に大きくなる物質があったので、我々は注入口に注目していた。そのため、グラス入りライナーおよびグラスウールなしライナーについて調べることにした。テオフィリン標準品に酢酸を 0, 0.1, 1, 2, 3, 4% となるように添加して（酢酸エチル溶液）レスポンスを比較した。0-4%を一連の分析とし、これを 5 回繰り返す（sequence 1-5）感度・再現性を調べた。ただし、テオフィリンのキャリーオーバーを防ぐため、各サンプル間は 2%酢酸-酢酸エチルブランク溶液を注入した。このデータを用いて、最適な酢酸添加量、グラスウールの影響について検討した。

(2) ギ酸と酢酸の比較、注入口温度の検討による最適化を行った後、この条件にて定量性の検討を行った。薬物は、アモバルピタル、フェノバルピタルを用いた。この方法は抽出された夾雑物が感度に影響を与えるため、異なった夾雑物を生じる固相抽出、液-液抽出の 2 通りでこの方法を試した。内部標準をペンタバルピタルにしてそれぞれの検量線を作成し、低・中・高濃度における accuracy（正確さ） precision（精度）を求めた。この値を、Food and Drug Administration（FDA）ガイダンスの基準値と照らし合わせた。

4. 研究成果

(1) 図 1 は添加した酢酸濃度（横軸）に対するテオフィリンの面積値（縦軸）を示したものである。グラスウール入りのライナー（A）では酢酸濃度が増加するにつれてレスポンスが増加している。3%と4%の値があまり変わらないことから、これ以上はほとんど

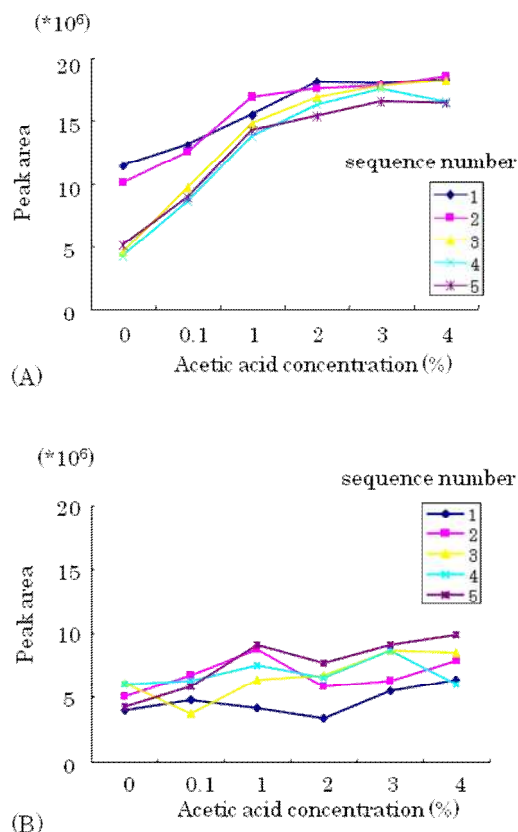


図 1. 0, 0.1, 1, 2, 3, 4% 酢酸-酢酸エチル溶液に溶かされた 20 ng テオフィリン（オンカラム）のピーク面積。グラスウール入りライナーを使用（A） グラスウールなしライナーを使用（B）

増加しないと考えた。0-4%の一連の注入を sequence 1 とすると、1 から 5 にかけてレスポンスが徐々に減少している。sequence 5 が終了した後にライナーを交換するとテオフィリンのレスポンスは sequence 1 のレベルに復活した。このことから、注入を繰り返すことによってグラスウールが劣化していることが示唆される。グラスウールが劣化すると、酢酸が低濃度の場合に再現性がひどく悪くなったが、3%酢酸においてはテオフィリン面積値の変動係数（%CV）が 3.3 と最も良い値を示し、酢酸添加量は 3%付近が最適であろうと思われた。グラスウールなしライナー（B）においては、繰り返し注入によるレスポンスの減少は観測されなかったが、全体的にレスポンスが低く再現性も悪かった。酢酸の効果はほとんどなかったと言える。これらの実験結果を踏まえると、トリメチルシリル基などで不活性化処理されたグラスウールは徐々に活性化し、テオフィリンなどの極性化合物(-NH)を吸着しやすくなる。しかし、酢酸はトリメチルシリル基が取れ、シラノールとなった末端を非解離型にする効果を持

つ。これが吸着を減少させた主な原因だと考えた。酢酸の沸点が低いことから、テオフィリンと酢酸は注入口を出るとすぐに離れてしまうと考えられるが、カラムでの吸着が支配的であるとすると、酢酸添加によるレスポンスの増減はほぼ起こらない。しかし、実際起きたのであるからテオフィリンと酢酸が同居している注入口がカラムより支配的であり、グラスウールなしライナーで酢酸の効果が無かったことから主な吸着部位はグラスウール上と考えるのが自然である。カラムが劣化をした場合は当然強い吸着を示すが、我々がこの研究を行った約2年間カラムを変えることはなかった。また、我々はイオン源をクリーニングした後に極性化合物の感度が非常に低くなった経験を持つが、これはメーカーによるイオン源の材質やクリーニングの仕方によって様々であり、最近では吸着の少ないイオン源が開発されていることから、極性化合物を測定するときは、注入口のグラスウールに最も注意を払うべきである。

(2) 添加するカルボン酸としてギ酸と酢酸を比較したところ、さほど変わらなかったため、より分子量の小さいギ酸を選択し、注入口の温度は300°Cを選択した。血清からアモバルピタール、フェノバルピタールを抽出するために我々が選択した固相抽出、液-液抽出では、液-液抽出のバックグラウンドノイズの方がだいぶ大きかったため、予想通り液-液抽出の方がマトリックス効果を強く受け、レスポンスが大きかった(図2AとC)。しかし、それぞれの抽出物を3%ギ酸-酢酸エチル溶液で溶かすとレスポンスはさらに増加し、同じくらいになった(図2BとD)。この結果により、ギ酸の添加はレスポンスの再現性を向上させることが示唆された。アモバルピタール、フェノバルピタール検量線の低・中・高濃度における accuracy、precision を表1に示した。実際は、intraday (日内変動: $n=5$) も求めたが、固相抽出の interday (日差変動: $n=15$) のみを示した。この値はFDAガイダンスの基準値である15%以内を満たしており、この分析法に十分な定量性があることが証明された。

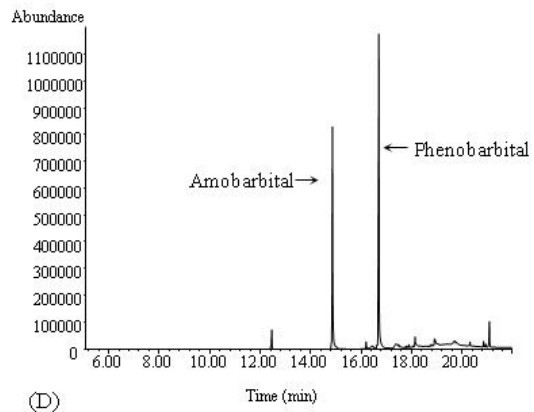
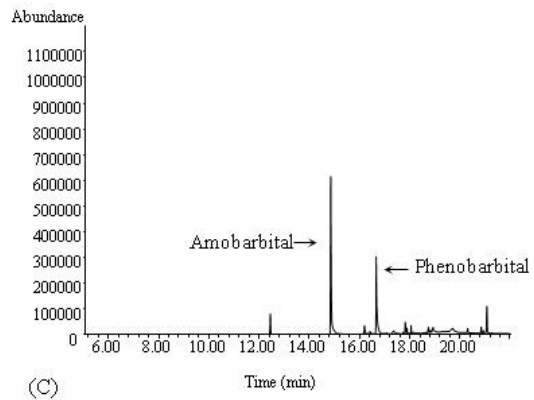
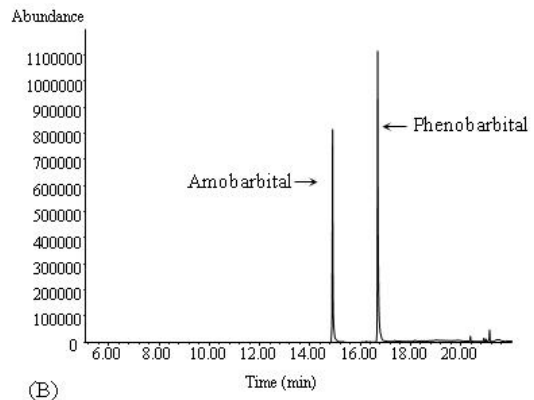
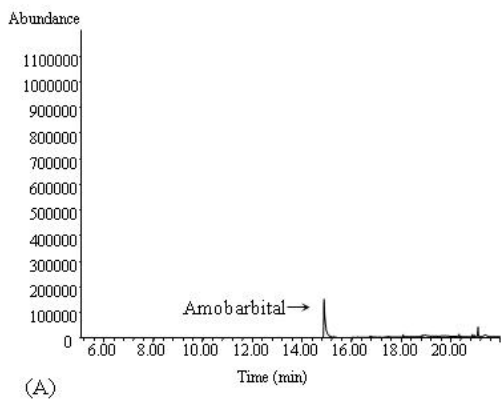


図2. 1 μg アモバルピタールと2 μg フェノバルピタールを添加した血清から、固相抽出し酢酸エチルで溶解 (A)、固相抽出し3%ギ酸-酢酸エチルで溶解 (B)、液-液抽出し酢酸エチルで溶解 (C)、液-液抽出し3%ギ酸-酢酸エチルで溶解 (D) したものの Selected ion monitoring (SIM) クロマトグラム

(3) この方法は、全ての極性化合物に対して有効ではなかったが、第2級アミンおよび類似体(アミド結合)に対しては有効であると思われた。メタンフェタミン(覚せい剤)も同様に感度上昇したが、アシル化し易いため、注入口の温度に注意を払う必要がある。定量分析では、内部標準の物性がターゲット

化合物の物性に近ければ近いほどガラスウールの状態に左右されないだろう。このような点に注意すれば、ここに示した3つの薬物以外にも応用可能であると考えられ、実用的な方法であると思われる。

表 1. 各濃度のアモバルビタールとフェノバルビタールを固相抽出後定量した mean ($\mu\text{g/mL}$), accuracy (%bias), precision (%CV)

Compound	Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Interday ($n = 15$)		
		Mean	Accuracy	Precision
Amobarbital	0.1	0.096	-3.70	2.57
	1.0	1.017	1.66	1.89
	2.0	1.948	-2.62	3.21
Phenobarbital	0.4	0.419	4.73	3.43
	4.0	3.708	-7.30	4.52
	8.0	7.205	-9.93	3.88

5. 主な発表論文等

(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 2件)

Saka K, Uemura K, Shintani-Ishida K, Yoshida K. Determination of amobarbital and phenobarbital in serum by gas chromatography-mass spectrometry with addition of formic acid to the solvent. J Chromatogr B. 869, 9-15, 2008. 査読有

Saka K, Uemura K, Shintani-Ishida K, Yoshida K. Acetic acid improves the sensitivity of theophylline analysis by gas chromatography-mass spectrometry. J Chromatogr B. 846, 240-244, 2007. 査読有

[学会発表](計 1件)

坂幹樹、タイから輸入された痩せ薬の主成分分析、第77回日本法医学会関東地方会、2008年11月1日、東京都文京区東京大学医学部教育研究棟鉄門記念講堂

6. 研究組織

(1)研究代表者

坂 幹樹 (SAKA KANJU)
東京大学・大学院医学系研究科・
技術専門職員
研究者番号：30447388

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

吉田 謙一 (YOSHIDA KEN-ICHI)
東京大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：40166947

上村 公一 (UEMURA KOICHI)
東京医科歯科大学・
大学院医歯学総合研究科・教授
研究者番号：30244586

新谷 香 (石田 香)
SHINTANI KAORI (ISHIDA KAORI)
東京大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：50345047