

研究種目：基盤研究(G)

研究期間：2007～2009

課題番号：19590683

研究課題名（和文）カラムスイッチング LC/MS による緊急薬物スクリーニングシステムの構築

研究課題名（英文）Ultrafast determination of drugs in biological samples by column-switching LC/MS

研究代表者

有信 哲哉 (ARINOBU TETSUYA)

愛知医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30329776

研究成果の概要（和文）：

中毒原因薬物の迅速かつ確実な同定・定量法の確立は、重要な研究課題である。本研究は、前処理の大幅な簡略化とモノリスカラムを用いたバックフラッシュカラムスイッチング法により、血中テオフィリン及びカフェインの超迅速分析を行った。前処理は、ヒトブランク血清 50 μ L にテオフィリン及びカフェイン標準水溶液と IS (3-isobutyl-1-methylxanthine) を添加し、これに水 4,000 μ L を加え、そのうち 400 μ L を LC/MS 分析に供した。本分析システムでは、血清中の生体高分子の排除と薬物の保持を Waters 社製 Oasis HLB カートリッジカラムを用いてオンラインで行ない、その後バックフラッシュモードにより目的成分を分析カラム (Merck 社製 Chromolith Performance RP-18e) へ導入し、薬物の相互分離を行った。薬物の検出は質量分析計 (日立 M-8000) を使用し、イオン化は APCI 法を用いた。本法により、生体高分子 (タンパク質) の排除とテオフィリン、カフェイン、IS の相互分離を 2 分以内に行うことが可能となった。また、テオフィリン及びカフェインの中毒域における定量性も比較的良好であった。今回設定した方法では、前処理に要する時間は約 1 分であり、LC/MS による測定時間も 2 分以内であることから、救命救急などの分野においても有効な手法になるものと期待できる。

研究成果の概要（英文）：

Theophylline and caffeine are natural alkaloids widely being ingested, and show various pharmacological effects in humans. Caffeine is a constituent of coffee and other beverages and included in many medicines. Theophylline is used as a bronchodilator and also formed as a metabolite of caffeine in humans; theophylline poisoning is occasionally encountered in the field of forensic toxicology, because of its relatively narrow safe range of therapeutic doses. They have been analyzed by various methods, such as gas chromatography (GC), GC-mass spectrometry (MS), high-performance (HP) liquid chromatography (LC)-MS. In the existing analytical methods for the drugs, the sample pretreatments such as liquid-liquid extraction, solid-phase extraction, filtration or centrifugation were usually required to remove

proteins and other impurities contained in biological matrices. The analytical methods including time-consuming multi-step sample pretreatments are unsuitable for rapid detection of poisonous materials in human specimens. To avoid such sample pretreatments, special HPLC columns, which enabled direct injection of crude biological samples, were developed; our group applied them to compounds of forensic toxicological interest. Furthermore, backflush column-switching system using one of special HPLC columns have become a powerful analytical tool for simultaneous determinations of various drugs in biological samples. In this study, we have established an automated on-line method for ultra-fast determination of theophylline and caffeine in human serum by HPLC-MS with backflush column-switching and a monolithic separation column. To our knowledge, our method presented in this study is the fastest MS determination technique for theophylline and caffeine in human serum using the conventional HPLC instrument.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：法中毒学，迅速分析

1. 研究開始当初の背景

中毒原因薬物の迅速かつ確実な同定・定量法を確立することは、法中毒学の分野において極めて重要な研究課題の一つである。現在、血中薬物の同定において、もっとも主流な分析法はガスクロマトグラフィー／質量分析法(GC/MS)である。しかし、このGC/MS法では、タンパク質・核酸・多糖類等の生体高分子の除去(前処理)が必要不可欠である。そのため、測定結果がでるまでに数時間、場合によっては数日を要することもある。そのため、これに替わる新しい迅速分析法の開発

が現在求められていた。

2. 研究の目的

本研究は、中毒原因薬物の同定・定量を、血液の前処理を含め10分以内に実行可能な超迅速・簡易分析法の確立を目的とする。そのため、特に前処理を大幅に簡略化した手法を開発し、分析測定時間も5分以内を目標とする。

3. 研究の方法

分析装置は、薬物の誘導体化を特に必要と

しない高速液体クロマトグラフ/質量分析計 (HPLC/MS) を用い, Fig. 1 に示すようなバックフラッシュカラムスイッチングシステムを構築した。血清中の生体高分子の排除と薬物の保持は Waters 社製 Oasis HLB カートリッジカラムを用い, 分離分析用のカラムは Merck 社製 Chromolith Performance RP-18e を使用した。各薬物のイオン化は APCI 法を用いた。

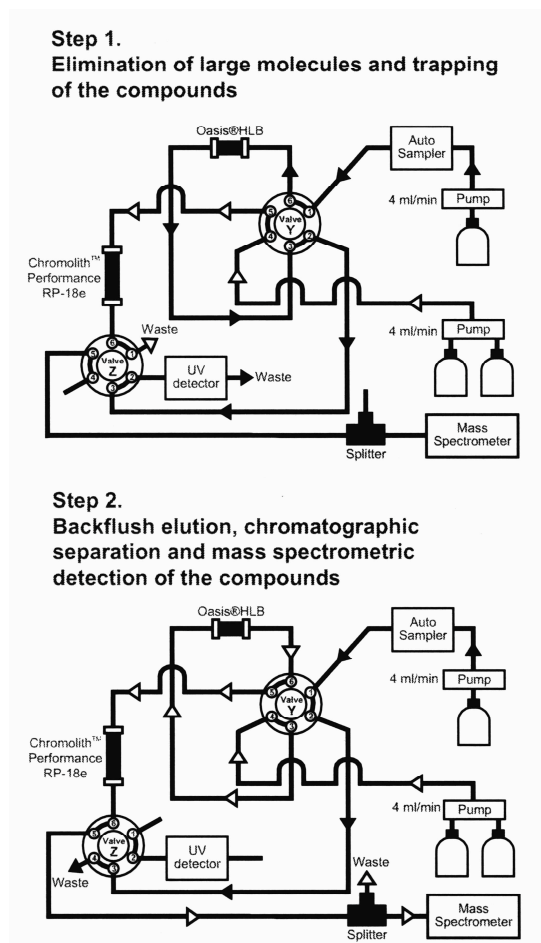


Fig. 1 Schematic diagrams of a backflush column-switching system constructed in this study

前処理は, ヒトblank血清 50 μ L にテオフィリン及びカフェイン標準水溶液と IS (3-isobutyl-1-methylxanthine) を添加し, これに水 4,000 μ L を加え, そのうち 400 μ L を

LC/MS 分析に供した。

4. 研究成果

LC/MS-APCI 法により各薬物を分析したところ, いずれもプロトン化分子イオンがベースピークとなるマススペクトルが得られた (Fig. 2)。

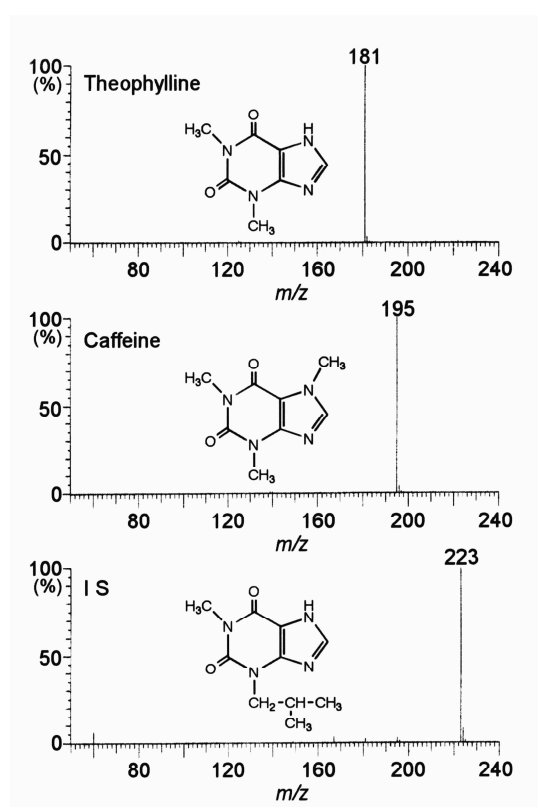


Fig. 2 APCI mass spectra for theophylline, caffeine and IS and their chemical structures

Fig. 3 に示すように, 生体高分子 (タンパク質) の排除を 40 秒以内に, テオフィリン, カフェイン, IS の相互分離を 2 分以内に行うことが可能であった。各薬物のプロトン化分子イオンによる SIM 測定を行ったところ, テオフィリン及びカフェインの検出限界はそれぞれ 1.0 μ g/mL, 0.5 μ g/mL であり, 検量線はいずれも 5-60 μ g/mL の範囲で直線性を示した。回収率は概ね 75%以上であった (Table 1)。テオフィリン及びカフェインの中毒域における定量性は, 日内変動では

CV12. 4%以下 (Table 2), 日間変動は 15.0% 以下 (Table 3) であり, 比較的良好であった。また, コーヒー摂取 3 時間後のヒト血中からカフェインが検出されることを確認した (Fig. 4)。

今回設定した方法では, 前処理に要する時間は約 1 分であり, LC/MS による測定時間も 2 分以内であることから, 救命救急などの分野においても有効な手法になるものと期待される。今後は, 本手法が他の多くの薬物に適用できるか検討をしていく予定である。

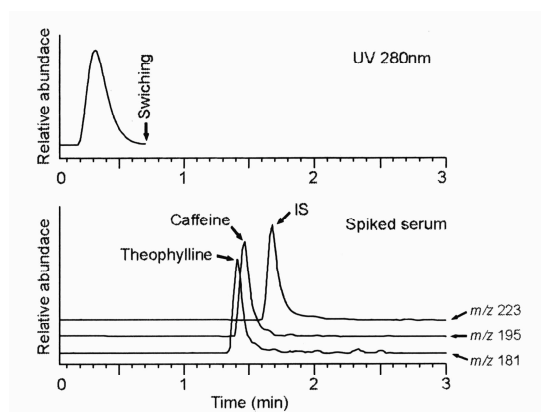


Fig. 3 LC-UV chromatogram at 280 nm for monitoring mainly proteins (upper panel), and mass chromatograms monitored at m/z 181, 195 and 223, showing peaks of theophylline, caffeine and IS, respectively, for spiked human blank serum (lower panel).

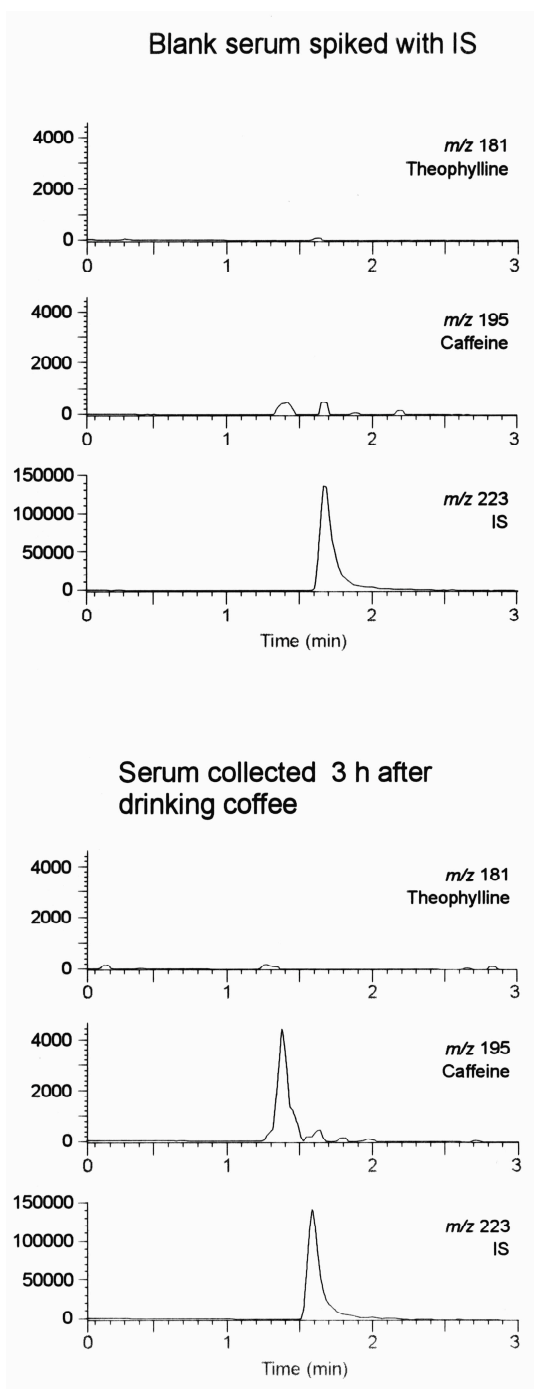


Fig. 4 Typical mass chromatograms at m/z 181, 195 and 223, showing $[M+H]^+$ ions of theophylline, caffeine and IS, respectively, in human blank serum spiked with IS (left column) and a serum sample collected 3 h after drinking coffee (right column).

Table 1 Recoveries of theophylline and caffeine spiked into human blank sera, measured by the present LC-MS method ($n=5$)

Analyte	Concentration added	Mean \pm SD (%)
	($\mu\text{g/ml}$)	
Theophylline	5	93.5 \pm 23.4
	10	116 \pm 10.0
	20	75.4 \pm 12.6
	30	79.2 \pm 5.9
	60	84.5 \pm 4.8
	120	97.2 \pm 2.3
Caffeine	5	100 \pm 12.5
	10	108 \pm 4.4
	20	85.2 \pm 5.5
	30	80.6 \pm 4.6
	60	94.1 \pm 8.4
	120	104 \pm 5.3

Table 2 Intraday and interday accuracy and coefficients of variation (CV) for theophylline and caffeine measured by the present method

Analyte	Concentration added ($\mu\text{g/ml}$)	Intraday ($n=5$)		
		Concentration found ($\mu\text{g/ml}$)	Accuracy (%)	CV (%)
Theophylline	5	5.9 \pm 0.6	118	10.2
	10	10.3 \pm 1.2	103	11.7
	20	19.4 \pm 2.4	97.0	12.4
	30	28.6 \pm 2.2	95.3	7.7
	60	60.8 \pm 4.1	101	6.7
	Caffeine	5	6.2 \pm 0.3	124
10		10.3 \pm 1.2	103	11.7
20		18.6 \pm 0.4	93.0	2.2
30		29.0 \pm 1.5	96.7	5.2
60		60.8 \pm 2.4	101	3.9

Table 3 Intraday and interday accuracy and coefficients of variation (CV) for theophylline and caffeine measured by the present method

Analyte	Concentration added ($\mu\text{g/ml}$)	Interday ($n=5$)		
		Concentration found ($\mu\text{g/ml}$)	Accuracy (%)	CV (%)
Theophylline	5	5.4 \pm 0.7	107	13.5
	10	8.3 \pm 1.2	82.6	14.9
	20	16.4 \pm 1.5	81.8	9.0
	30	28.5 \pm 3.0	95.1	11.7
	60	52.6 \pm 6.0	87.7	11.4
	Caffeine	5	5.7 \pm 0.9	114
10		9.7 \pm 1.1	96.5	11.0
20		18.7 \pm 1.1	93.3	5.8
30		25.1 \pm 2.9	83.8	11.4
60		53.9 \pm 5.5	89.9	10.3

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 3 件)

① Aoki R, Arinobu T, Kumazawa T, Hattori H, Noguchi H. An automated on-line method for simultaneous analysis of phenothiazines in human serum by high-performance liquid chromatography/sonic spray ionization mass spectrometry using backflush column switching. *Forensic Toxicol.* (査読有) 2007; 25(1): 8-15.

② Hattori H, Ito K, Iwai M, Arinobu T, Mizutani Y, Kumazawa T, Ishii A, Suzuki O, Seno H. Rapid analysis of sertraline, fluvoxamine, and paroxetine in serum specimens by LC-MS-MS using a new polymer column. *Forensic Toxicol.* (査読有) 2007; 25(2): 100-103.

③ Arinobu T, Hattori H, Kumazawa T, Lee X-P, Mizutani Y, Katase T, Kojima S, Omori T, Kaneko R, Ishii A, Seno H. High-throughput determination of theophylline and caffeine in human serum by conventional liquid chromatography-mass spectrometry. *Forensic Toxicol.* (査読有) 2009; 27: 1-6.

[学会発表] (計 3 件)

① Arinobu T, Aoki R, Kumazawa T, Lee X-P, Ishii A, Kaneko R, Kojima S, Noguchi H, Suzuki O, Hattori H, Seno H, Determination of phenothiazines in human serum by HPLC/SSI-MS using backflush column-switching. 12th International meeting on recent developments in pharmaceutical analysis, Elba, Italy 2007. 9.

② 伊藤健次郎，服部秀樹，有信哲哉，妹尾洋，イオンペア試薬を用いた尿中第四級アンモニウム塩系筋弛緩剤の分析.

第 90 次日本法医学会総会 2008. 4.

③ 有信哲哉，服部秀樹，熊澤武志，李曉鵬，水谷洋子，大森貴之，西本寛，小島貞男，石井晃，妹尾洋，モノリスカラムを用いたバックフラッシュカラムスイッチング LC/MS による血中テオフィリンの超迅速分析.

第 34 回日本医用マススペクトル学会年会
2009. 9.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

有信 哲哉 (ARINOBU TETSUYA)

愛知医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30329776