

令和 5 年 5 月 11 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K10556

研究課題名(和文) 薬毒物抽出時におけるピットホール(酸化還元機構)の解明と最善なる回避法の構築

研究課題名(英文) Elucidation of pitfalls (oxidation-reduction mechanism) during extraction of toxic substances and establishment of the best avoidance method

研究代表者

奈女良 昭(Namera, Akira)

広島大学・医系科学研究科(医)・教授

研究者番号：30284186

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本成果では、酢酸エチルなどの酸化物が混入している有機溶剤の使用で、N-oxideの生成することが判明した。モデル化合物として用いたオランザピンに限定されず、分子内に三級アミンを有するクロルフェニラミン、ゾテピンなどもN-oxideに変化することも確認され、適切な前処理法(抽出方法や抽出溶媒など)の選択が分析(定性・定量)結果に大きな影響、延いては誤った分析結果に結びつく恐れのあることが判明した。溶媒中の酸化剤(oxidants)の除去を試みるも完全なる除去は不可能であったことから、酸化防止剤の添加や酸化物を含まない溶剤を使用することで、これら前処理中の化学変化は回避することが可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本成果は、有機溶剤などに移行した後は化学変化を受けないという固定観念を覆し、抽出溶媒留去時に薬物が分解(酸化および還元)する大きなピットホールのあることを突き止めた。適切な前処理法(抽出方法や抽出溶媒など)を選択しなければ、分析(定性・定量)結果に大きな影響を及ぼし、延いては誤った分析結果に結びつく恐れがある。特にN-oxideは体内での"代謝物"として認知されている薬物もあり、これまでの定量結果の解釈に大きな影響を及ぼすことも想定されることから、正確に再現性のある分析法が求められる。今後は、薬物中毒の判断材料となりうる正確な定量値を提供する方法の構築に大きく貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Our findings challenge the common belief that once drugs are transferred to organic solvents, they do not undergo any chemical changes. We have identified a significant pitfall in that drugs may decompose (oxidation and reduction) during the solvent extraction process of the targets. If proper sample preparation methods, such as extraction methods and solvents, are not chosen, the analysis (qualitative and quantitative) results may be significantly affected, leading to incorrect analytical results. Some drugs, such as N-oxides, are recognized as "metabolites" in the body and may have a significant impact on the interpretation of previous quantitative results. Therefore, it is necessary to develop accurate and reproducible analytical methods. Our findings are expected to contribute greatly to the establishment of methods that can provide accurate quantitative values, which could serve as diagnostic criteria for drug poisoning in the future.

研究分野：法中毒

キーワード：薬物分析 クロマトグラフィー 質量分析

1. 研究開始当初の背景

日本法医学会を中心に犯罪死の見逃し防止に資する死因究明制度のあり方について検討が重ねられ、解剖率の低さや薬毒物検査が十分行われないなど、制度上の問題が犯罪死の見逃しの背景にあることが指摘されている。近年、薬物分析の重要性が浸透しつつあるが、麻薬・覚せい剤、危険ドラッグ等、薬物の乱用は留まることが無く、多種多様な薬物が蔓延している。救急搬送患者や死亡者の外表の所見だけでは薬物の関与は推定不可能である。そこで、体内に入った薬物が中毒や死因に関与したかを判断する為に、血液中の薬物濃度が用いられるが、どこの施設でも鑑定試料中の薬物濃度を正確に、かつ再現性をもって分析することは重要である。しかし、人為的過失によって濃度値が変化することは避けなければならず、鑑定試料の保存方法や分析時の回収率や再現性などの精度の担保が求められている。

これまでは、農薬などの一部の化学物質を除いては、一旦、有機溶剤などに移行したのちは化学変化を受けないと言う固定観念があり、抽出溶媒留去などの前処理時に薬物が分解(酸化および還元)は、熟練した薬物分析者でも認知されておらず、大きなピットフォールであることが予想される。この前処理中などの薬物濃度の変化は、これまでの定量結果の解釈に大きな影響を及ぼすが故に、“どの工程で、どのような機構で化学的变化を起こすのか？”との問題は解決すべき重大な課題の一つである。

2. 研究の目的

本研究は、どの薬物が、どの程度の期間、鑑定試料中で安定に存在するのかを明らかにすることによって、鑑定試料からの薬物抽出時の化学変化を抑え、どこの施設でも鑑定試料中の薬物濃度を正確に、かつ再現性をもって分析出来る方法を構築することを目的とする。

これまでは、一旦、有機溶剤などに移行したのちは化学変化を受けないと思われており、抽出溶媒留去時に薬物が分解(酸化および還元)する現象は、熟練した薬物分析者間でも認知されていなかった。しかし、他の抽出法を検討している過程で化学変化を受けることが明らかとなったことから、“どの位の温度で保存すれば、どの位の期間安定に存在するのか？”また、“どの工程で、どのような機構で化学的变化を起こすのか？”の問いに対しての詳細を明らかにし、薬物中毒の判断材料となりうる正確な定量値を提供する方法の構築を目指す。

3. 研究の方法

予備検討にて化学変化を起こすことを把握しているオランザピンをモデル化合物として用い、人為的に化学変化を起こさせた後に変化した化合物の特定を行い、溶剤抽出(液液抽出)や固相抽出に使用されうる有機溶媒の中で、化学変化を起こし易い有機溶媒を検索する。また、オランザピン以外にも化学変化を起こす化合物があるのか否かについても検討を行い、法則性の有無を推察する。次に化学変化の防止が可能であるかを検討し、防止策を探索、その効果の検証を行う。分析は、近年汎用性の高まっている高速液体クロマトグラフ/トリプル四重極質量分析計(LC/MSMS)を用いて行う。

4. 研究成果

1) 化学的变化を起こす薬物の特定とその機構

種々の薬物を液液抽出や固相抽出で使用する可能性のある溶媒(メタノール、アセトニトリル、酢酸エチル、ジクロロメタンなど)に溶解し、窒素気流下で濃縮・乾固した後に初期移動相に再溶解して分析を行った。その結果(図1)酢酸エチルを溶出溶媒に用いた場合にオランザピンやゾテピン、クロルフェニラミンのピークが極端に減少した。

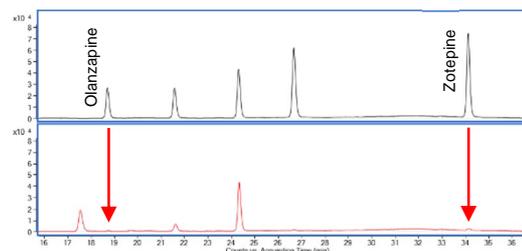


図1 酢酸エチルを用いた時のピーク変化

化学変化を起こして生成した化合物を特定する目的で、オランザピンを酢酸エチルに溶解して窒素気流下で濃縮・乾固させて化学変化を起こさせた後に LCMS で分析した。その結果(図2) 擬分子イオンの m/z が 16Da 増加していることが判明し、オランザピン分子に酸素原子が付加していることが示唆された。さらにコリジョンエネルギーを変化させて生じたフラグメントを解析して部分構造を推定した。化学変化する前のオランザピンと比較しても母核に由来する m/z 198, 213が確認されたことからチエノベンゾジアゼピン骨格への酸素の付加は無いと推定した。また、オランザピンの MSMS スペクトルにはピペラジン環に由来する m/z 84 が確認されたのに対し、酸素付加化合物には m/z 84 ではなく、 m/z 99 が確認されたことから側鎖のピペラジン環に酸素が付加していると推測した。このことは、類似化合物であるクロザピンとクロザピンの N-oxide の MSMS スペクトルと比較したところ、よく類似していた。さらに MSMS スペクトルを解析した結果、オランザピンのピペラジン環部分に酸素原子が付加していると推察され、オランザピ

ンの代謝物として報告のあるオランザピン N-oxide とよく一致していた。この化学変化体とオランザピン N-oxide の標準品を LC での溶出時間や MSMS スペクトルを比較した結果、化学変化体はオランザピンの N-oxide と断定した。

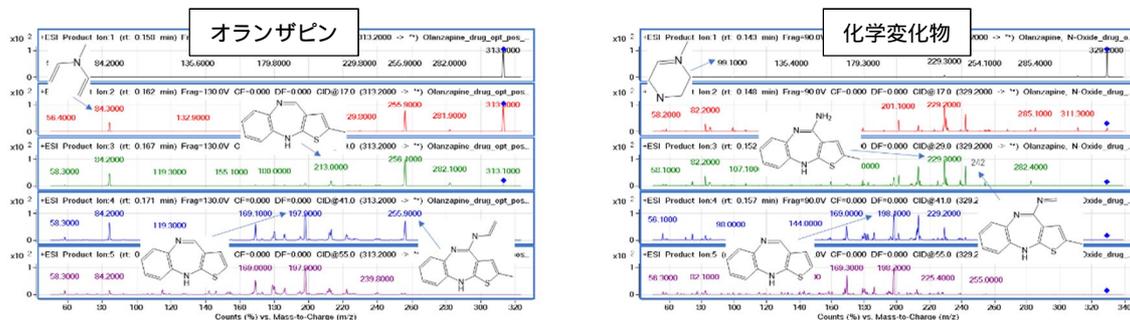


図2 オランザピンと化学変化を起こした化合物の MSMS スペクトル

他の窒素化合物についても同様の化学変化が起こりうるのかを確認するために、クロルフェニラミンやプロメタジンなどを酢酸エチルに溶解し、窒素気流下で濃縮乾固したものを分析した。その結果、他の窒素化合物、特に三級アミンを分子内に持つ化合物において、程度の差こそあれ、N-oxide に変化することが確認された（図3）。これらの N-oxide は生体内での“代謝物”として取り扱われている場合もあるが、試料採集後の保存法・保存期間や前処理の方法によっては、（生体内での生成ではなく）二次的（前処理の過程など）に酸化されている可能性もあるため、注意が必要である。

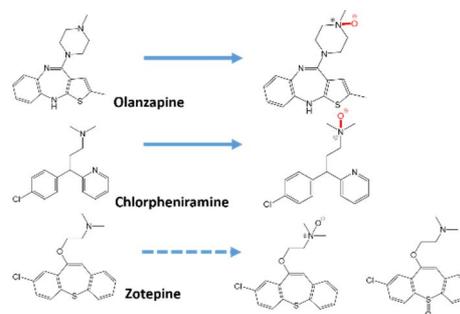


図3 分子内酸化の機構

2) 化学変化の防止策の検討

(1) 酸化物の除去

酢酸エチルには酸化剤に相当する不純物の混在が指摘されている。ロットや規格の異なる酢酸エチルで検証したが、開封直後の試薬を使用しても酸化反応は抑えることが出来なかった。また、亜硫酸水素ナトリウム、チオ硫酸ナトリウムなどを添加して過酸化物の除去なども試みたが、酸化反応を抑えることは出来なかった。

(2) 溶媒留去に使用するガスの検討

溶媒留去時には窒素を使用しているが、精製・ガス充填の都合上、微量な不純物の混入は避けられない。微量な不純物の中には酸素も含まれていることから、不純物の除去フィルターを通したガスでの溶媒留去を試みたが、酸化反応は抑えられなかった。

(3) 還元剤の効果

塩化第一鉄、アスコルビン酸、トコフェロールなどの還元剤を添加し、酸化反応が抑えられないかを検証した。いずれの試薬でも参加を抑えることは可能であった。しかし、塩化第一鉄は、試薬調整後速やかに塩化第二鉄へと変化し、用時調整の必要があるために実用的ではないと考えられた。半面、アスコルビン酸はそれ自体の酸化されやすさは塩化第一鉄に比べて緩やかであり、実務的にも使用可能と考えられた。可能な限り少量の添加で済むように適切な添加量を検討した結果、10Mの水溶液 10 μ L の添加で酸化を抑えることが可能であった。

(4) 抽出法の検討

生体試料、特に血液中の薬物を抽出・精製するには、溶媒抽出や固相抽出が用いられる。しかし、血液を検査試料として用いる場合に溶媒抽出すると乳化して有機溶媒を分離困難なことがある。この乳化を回避する一手法として珪藻土カラムに付加し、水と混和しない有機溶剤を流すことで抽出・精製できることが知られている。また近年、簡便な操作で抽出できる手法として脂質除去法が注目されている。さらに、抽出溶媒を濃縮乾固しない微量抽出法も注目されている。

1) 珪藻土カラム

珪藻土カラムを使った抽出は「振らない液液抽出」とも称され、溶液を振盪することなく液液抽出できるために乳化を回避できる便利な方法である。しかし、素材が天然物であるために、メーカーやロットによる品質の差が問題となる。今回、Chem Elut と ISOLUTE SLE+, Extrelut NT1、InertSep K-solute を用いて薬物抽出における有用性について検討を行った。

Chem Elut と ISOLUTE SLE+, Extrelut NT1、InertSep K-solute (ISOLUTE SLE+以外) では、抽出溶媒に酢酸エチルを用いた場合に多くの薬物が N-oxide へと変化することが確認された。原因を追究する目的で、各カラムの外観に由来する粒径や色調について検索を行った。粒径については篩を用いて粒度分布を確認したところ、ISOLUTE SLE+のみ 0.25mm 以下の粒子に揃えられていたが、それ以外は 0.5mm 以上の粒子が多く分布していた（図4）。また、基材の色調にも違いが感じられたため、各珪藻土に含まれる無機元素を分析したところ、N-oxide が生成する珪藻土ほど鉄が多く含まれていることが判明し、これらが酸化に影響を及ぼしていると推察された。

これらの結果を考慮すると、抽出に用いる珪藻土や抽出溶媒を注意深く選定する必要があることが示唆された。

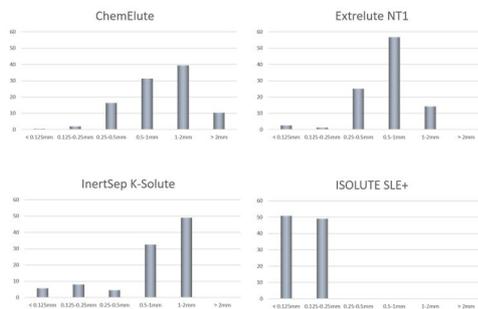


図4 各珪藻土カラムの粒度分布

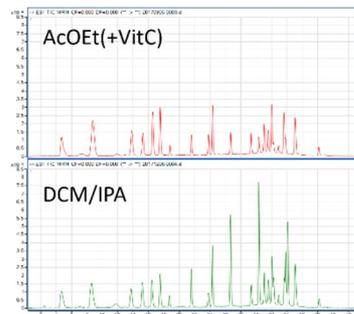


図5 抗酸化剤や抽出溶媒の変更による改善結果

抽出溶媒をジクロロメタン-メタノール混液に変更した場合には、酸化は抑えられる傾向が認められた(図5)ことから、抽出には酢酸エチルの使用は避け、ジクロロメタン-メタノール混液の使用が勧められる。溶出溶媒にジクロロメタン-メタノール混液を用いた場合のバリデーションデータを示した(表1)。溶出溶媒に酢酸エチルを使用した場合と異なり、クロルフェニラミンやオランザピンなども低濃度まで検出可能であり、定量性も確認された。ただし、抽出原理は液液抽出であるため、メトホルミンなどの水溶性化合物の抽出効率は悪く、薬物一斉スクリーニング分析の前処理法としてはデメリットがある。

表1 珪藻土カラム(ISOLUTE SLE+)を用い、にジクロロメタン-メタノール混液で溶出した場合のバリデーションデータ

	LOD (ng/ml)	LLOQ (ng/ml)	HLOQ (ng/ml)	Correlation coefficient
Acetaminophen	5.0	10.0	1000	0.997
Amitriptyline	0.1	1.0	1000	0.999
Atenolol	1.0	5.0	1000	0.998
Chlorpromazine	0.5	1.0	1000	0.998
Diazepam	1.0	2.0	1000	0.998
Ephedrine	1.0	2.0	1000	0.999
Estazolam	0.1	1.0	1000	0.997

Diazepam-*d*₅ was used as an internal standard

	LOD (ng/ml)	LLOQ (ng/ml)	HLOQ (ng/ml)	Correlation coefficient
Flunitrazepam	0.1	1.0	1000	0.996
7-NH ₂ Flunitrazepam	0.1	1.0	1000	0.999
3-OH Flunitrazepam	0.1	1.0	1000	0.996
7-NH ₂ Nitrazepam	0.1	1.0	1000	0.998
Olanzapine	1.0	5.0	1000	0.999
Slupride	1.0	5.0	1000	0.998
Ibuprofen	15.0	30.0	1000	0.997
Ketoprofen	15.0	30.0	1000	0.996

2) 除タンパク・脂質除去カラム

近年のLCMSの普及に伴い、マトリックス効果を抑える前処理法が提案されている。古くから知られている有機溶剤や無機塩などによる除タンパク法は、親水性から疎水性化合物を広く抽出できるメリットがあるが、イオン化に影響を及ぼすリン脂質などを多く含むことが問題となっていた。これを改善する目的で種々の脂質除去カラムが販売されている。珪藻土カラムと同様に各メーカーの製品(Captiva® ND Lipids, Captiva® EMR Lipid, HybridSPE®-Phospholipid, InsetSep® Phospholipid Remover, ISOLUTE® PLD+, and OASIS® PRiME HLB)の比較検討を行った。

除タンパク・抽出にアセトニトリルを使用した場合、HybridSPE などではロキソプロフェンなどのプロピオン酸系化合物の回収率が極端に低下した。また、モルヒネとオランザピンの回収率はカラムに極めて依存し、10~100%の範囲であった。その他の薬物の回収率は、カラムや溶出溶媒の影響を受けず、60~120%の範囲であった(図6)。一般にイオン化に影響を及ぼすと言われているリン脂質は、ほぼ対象薬物のイオンサプレッションに影響を与えず、その他の内因性物質(側鎖の短い脂質など)がイオン化に影響を及ぼしていると考えられた。

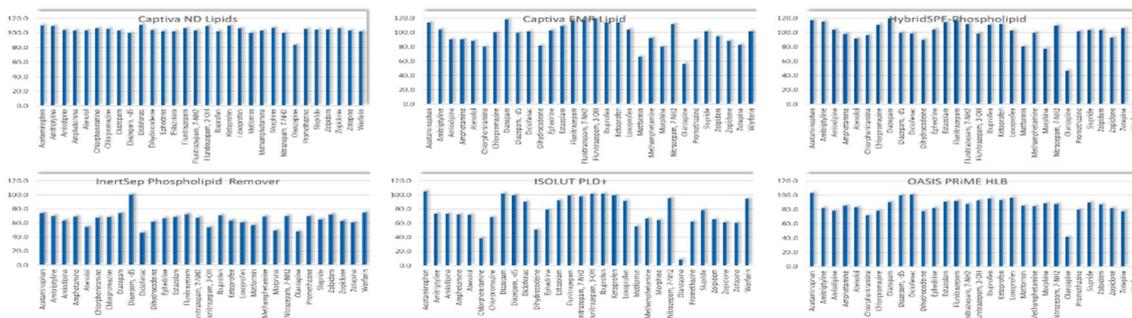


図6 各カラムを用いた場合の回収率の比較

カラムからの溶出液を濃縮せずに直接分析する場合と溶出液を濃縮して少量の溶媒に再溶解する方法での検出下限値や直線性を比較したところ、検出限界は直接注入法で6.25~50 ng/ml、蒸発後で1.0~5.0 ng/mlの範囲であった(表2)。両方とも直線性は相関係数0.98以上の直線性が確認された。

表2 脂質除去土カラム (ISOLUTE SLE+) を用いた場合のバリデーションデータ

	Sample injection without evaporation			Sample injection with evaporation		
	LOD (ng/ml)	Calibration curve	Correlation coefficient	LOD (ng/ml)	Calibration curve	Correlation coefficient
Amitriptyline	6.25	$y = 1.7379x + 0.0015$	0.999	1.0	$y = 1.9148x + 0.0009$	0.996
Atenolol	50	$y = 0.6913x + 0.0009$	0.998	5.0	$y = 0.1359x + 0.0016$	0.993
7-NH ₂ Flunitrazepam	6.25	$y = 1.1863x + 0.0010$	0.998	1.0	$y = 1.7280x + 0.0051$	0.999
Ketoprofen	6.25	$y = 2.5181x + 0.0074$	0.998	1.0	$y = 2.7572x + 0.0058$	0.999
Metformin	12.5	$y = 0.5542x + 0.0016$	0.999	2.5	$y = 1.0036x + 0.0036$	0.999
Sulpride	25	$y = 3.0046x + 0.0025$	0.997	5.0	$y = 0.2447x + 0.0014$	0.987
Zopiclone	6.25	$y = 4.7423x + 0.0027$	0.997	1.0	$y = 4.2531x + 0.0052$	0.998
Zolpidem	6.15	$y = 3.2234x + 0.0093$	0.999	1.0	$y = 3.1462x + 0.0105$	0.999
Zotepine	6.25	$y = 3.8252x + 0.0082$	0.979	1.0	$y = 6.7570x - 0.0162$	0.984
Warfarin	6.25	$y = 5.2780x + 0.0142$	0.999	1.0	$y = 7.7130x + 0.0156$	0.999

x are concentration of analytes (mg/ml) and y are peak area ratios

3) マイクロ抽出

薬物の化学変化は、使用する抽出溶媒と濃縮工程に問題がある。そこで、濃縮工程(溶媒の除去)が省けるマイクロ抽出の中でも少量の溶媒で溶出できる前処理法に注目し、薬物一斉スクリーニング分析の前処理法としての可能性を検討した。今回は OASIS μElution (Waters) を検討した。

HLB タイプを用いた場合、概ね 50~80%の回収率が得られた(図7)が、覚せい剤類やモルヒネなどの回収率は5~20%程度に留まった。覚せい剤類の回収率改善を目的に、リン酸水溶液の濃度や加える酸の種類を変化させたが回収率の改善は出来なかった。さらに、全血に添加するリン酸水溶液をアルカリ緩衝液に代えた結果、覚せい剤類は50~60%程度の回収率に上昇したが、イブプロフェンなどの酸性薬物の回収率が低下した(図8)。本法では、溶出後の溶媒濃縮の時間が削減され、前処理に要する時間の大幅な短縮化が可能となったが、高回収率での一斉薬物抽出は困難であった。

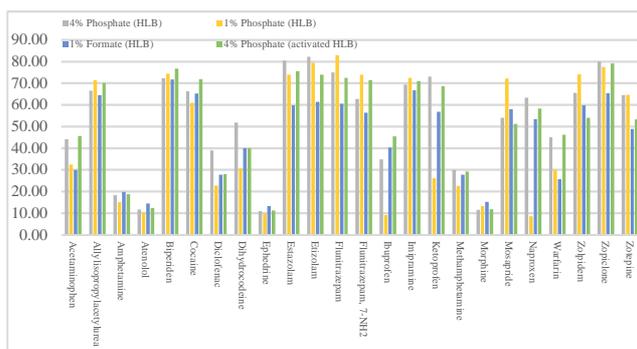


図7 OASIS μElution での回収率の比較

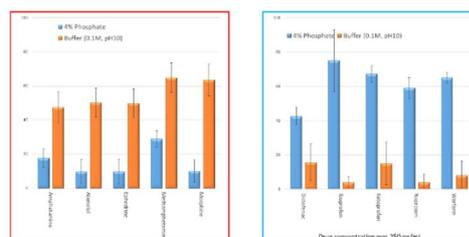


図8 溶出溶媒の液性の違いによる回収率の比較

本検討により、適切な前処理法(抽出方法や抽出溶媒など)の選択が分析(定性・定量)結果に大きな影響を及ぼし、延いては誤った分析結果に結びつく恐れのあることが判明した。特に N-oxide は体内での”代謝物”として認知されている薬物もあることから、正確に再現性のある分析法が求められる。本成果では、有機溶剤などに移行したのちは化学変化を受けないと言う固定観念を覆し、抽出溶媒除去時に薬物が分解(酸化および還元)する大きなピットフォールのあることを突き止めた。さらに、これまでの定量結果の解釈にも大きな影響を及ぼすことも想定される。本研究成果は、今後の薬物中毒の判断材料となりうる正確な定量値を提供する方法の構築に大きく貢献することが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 奈女良 昭
2. 発表標題 Chem Elut Sを用いた血液中からの薬物一斉抽出法の検討
3. 学会等名 第104次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 奈女良 昭
2. 発表標題 高速液体クロマトグラフ-質量分析計での薬物誤同定の危険性について
3. 学会等名 第106次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------