

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：33920

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790732

研究課題名(和文)UPLC-MS/MSを用いた生体内筋弛緩剤の網羅的微量分析法の開発

研究課題名(英文)Development of simultaneous micro analysis method for muscle relaxants in biological samples by UPLC-MS/MS

研究代表者

小川 匡之(OGAWA, Tadashi)

愛知医科大学・医学部・助教

研究者番号：50559937

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：高感度かつ短時間分析が可能なUPLC-MS/MS(超高速液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析装置)を用いて、生体内筋弛緩剤の網羅的な微量分析方法確立を研究目的とした。中枢性筋弛緩剤は、高感度かつESI(エレクトロスプレーイオン化)ポジティブ/ネガティブモードの並行測定が可能なUPLC-MS/MSを用いることで、数種類の血漿中筋弛緩剤の迅速同定・定量が可能であった。また末梢性非脱分極筋弛緩剤は、ESIモードの測定では定量性に問題があったが、ESI-APCI(大気圧化学イオン化)同時イオン化モードを用いることで、血中筋弛緩剤の迅速同定・定量が可能であった。

研究成果の概要(英文)：In this study, rapid and sensitive methods for simultaneous analysis of muscle relaxants by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) were developed. Simultaneous analysis of central-acting muscle relaxants by UPLC-MS/MS has been realized by the capability of our instrument for simultaneous selected reaction monitoring of the target compounds in both positive and negative ionization modes. On the other hand, quantification of peripheral non-depolarizing muscle relaxants was difficult by LC-MS/MS with ESI (Electrospray ionization) mode. However, the developed simultaneous analysis method of non-depolarizing muscle relaxants in whole blood by UPLC-MS/MS with ESI-APCI (Atmospheric pressure chemical ionization) mix ionization mode in this study showed better quantitativity.

研究分野：法医学

科研費の分科・細目：社会医学・法医学

キーワード：中枢性筋弛緩剤 末梢性筋弛緩剤 UPLC-MS/MS 法中毒

1. 研究開始当初の背景

近年の質量分析計の発展は目覚ましいものがあり、水中農薬や土壌中環境ホルモンの微量分析等、広い分野において成果を上げている。その中でも生体内薬毒物の微量分析は、質量分析計の機能が特に発揮されるケースであり、臨床医学における治療方針の決定や、法医学における死因究明において大変重要な役割を担っている。現在までに、質量分析計を用いた様々な薬物の微量分析法が確立しており、各研究機関、病院で応用されている。

薬毒物の分析に用いられる質量分析方法として、ガスクロマトグラフ-質量分析法と共に液体クロマトグラフ-質量分析法(LC-MS)が広く用いられており、汎用性の高い逆相LC-MSが多様な薬毒物の分析手段になり得ると期待され、数多くの研究報告がされている。研究、医療機関にとって、異なる薬毒物群の分析をひとつの機器システムで共用できるメリットは大きく、それに加えて個々の分析時間を短縮することができれば実験室における試料の処理効率は大幅に向上する。そして、近年開発された新しい分析技術として、高感度かつ短時間分析が可能なUltraPerformance LC (UPLC) -MS/MSがある。UPLCの特徴は、カラムに粒子径の小さい充填剤を用いることで理論段数の向上を図り、

1) 通常のLCと比較して、およそ10倍の分析時間の短縮良好な分離能かつ迅速な分析が可能

2) 一般的な分析では通常のLCと比較して、数倍の高感度分析が期待できる

3) ピーク幅の短縮により、通常のLC-MSおよそ3倍の分離能実現

4) イオン化のポジティブモード、ネガティブモードの同時並行使用が可能

と言う点がある。ごくわずかな量しか得られない可能性のある法医学分野試料では少量の試料の分析で高精度のデータが得られることは非常に大きな強みになる。ESIのポジティブ・ネガティブ両モードで強い感度を有する内部標準物質を選択すれば、少量の試料から様々な薬毒物の一斉分析が行うことが可能となる。

筋弛緩剤は、2000年に宮城県のクリニックで起きた患者殺傷事件で用いられた例が示す通り、医療事件・事故の原因となりうる重要な薬毒物であると考えられ、その微量分析方法の確立は重要な課題であると言える。しかし、一部を除いてその分析法は確立していない状況である。

2. 研究の目的

筋弛緩剤は、本来は手術時の全身麻酔において、筋肉を弛緩させるために使われるものだが、医療事件・事故、まれに発生する自殺の原因となりうる重要な薬毒物であると考えられ、その微量分析方法の確立は重要な課

題であると言える。しかし、その一斉分析法は確立していない現状であり、本研究では、高感度かつ短時間分析が可能なUPLC-MS/MSを用いて、種々の生体試料からの中枢性・末梢性筋弛緩剤の網羅的な微量分析方法確立を目指した。

3. 研究の方法

UPLC-MS/MSシステムを用いて、中枢性および末梢性筋弛緩剤について、迅速・高感度検出及び定量法の開発を行った。

薬物標準品を用い、

1) UPLCによる分離(分離カラムの選択、分離溶媒と分離勾配プログラムの検討)条件

2) 質量分析装置のイオン化条件(スプレー電圧、イオン化モード)

等について最適化を試みる。これと同時に、3) 一斉分析に適した内部標準物質の探索も併せて行う。

さらに、体液に添加したサンプルについては、4) 精製条件(固相抽出のカラム、抽出溶媒等)の検討

も同時に行い、高回収効率の抽出法を確立する。

4. 研究成果

(1) UPLC-MS/MSシステムを用いて、中枢性筋弛緩剤について、迅速・高感度検出及び定量法の開発を行った。9種類の筋弛緩薬を添加した血漿100 μ Lをアルカリ性にした後、固相抽出法により精製を行った。抽出した試料は乾固後、100 μ Lの0.1%ギ酸含有25%メタノールに溶解し、UPLC-MS/MSに導入した。測定条件は以下のとおりである。装置: Waters Acquity UPLC system, Acquity TQD、カラム: Waters Acquity UPLC BEH C18 (2.1 \times 50 mm i.d., 1.7 μ m)、カラム温度: 40 $^{\circ}$ C、移動相: A (0.1%ギ酸)、B (0.1%ギ酸含有アセトニトリル)、グラジエント: 90% A / 10% B (0 min) - 50% A / 50% B (3 min)、流速: 0.5 mL/minで行った。高感度かつESIポジティブ/ネガティブモードの並行測定が可能なUPLC-MS/MSを用いることで、9種類の血漿中筋弛緩剤の3分以内の迅速同定・定量が可能であった。検量線は良好な直線性を示し、検出限界は0.5 - 2 ng/mLであった。UPLC-MS/MSはわずかな検体量・短いサイクルタイムで、様々な化学構造の薬物の並行測定を可能としており、これを応用すれば網羅的な分析方法が見出されていなかった薬毒物の微量分析法を確立する可能性が期待できる。

(2) さらに、UPLC-MS-MSのESIイオン化法を用いて、末梢性筋弛緩薬の一斉分析方法確立を試みたが、数種類の筋弛緩薬の定量性に問題があった。よって、UPLC-MS-MSのESI-APCI同時イオン化モードを用いて、末梢性筋弛緩薬である、血中非脱分極性筋弛緩薬一斉分析法の検討を行った。筋弛緩薬を添加した血漿100 μ Lにアセトニトリル200 μ Lを加え除タ

ンパク法により精製を行った。抽出した試料は乾固後、100 μ L の初期移動相に溶解し、UPLC-MS-MS に導入した。測定条件は以下のとおりである。装置: Waters Acquity UPLC system, Acquity TQD、カラム: Waters Acquity UPLC BEH C18 (50 \times 2.1 mm i.d., 1.7 μ m)、もしくは Waters CORTECS C18 (50 \times 2.1 mm i.d., 1.6 μ m)、カラム温度: 40、移動相: A (0.025%ギ酸含有ギ酸アンモニウム)、B (アセトニトリル)、グラディエント: 90% A / 10% B (0 min) - 5% A / 95% B (4 min)、流速: 0.5 mL/min、検出: ESI-APCI ポジティブ同時測定モードで行った。ESI モードで検量線の直線性に問題のあったベクロニウム、パンクロニウムが、APCI モードを用いることによって検量線の直線性を得ることが可能であった。UPLC-MS-MS ESI-APCI 同時イオン化モードを用いることで、血中筋弛緩薬の迅速同定・定量が可能であった。ESI モードの方が検出感度は自体は優れているため、並行利用すれば、非脱分極性筋弛緩薬の微量分析法を確立する可能性が期待できる。

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 8 件)

Tadashi Ogawa, Hideki Hattori, Rina Kaneko, Kenjiro Ito, Masae Iwai, Yoko Mizutani, Tetsuya Arinobu, Akira Ishii, Hiroshi Seno. High-throughput and simultaneous analysis of eight central-acting muscle relaxants in human plasma by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the positive and negative ionization modes. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 査読有. Vol.400, No.7, 2011, 1959-1965.

Tadashi Ogawa, Hideki Hattori, Masae Iwai, Kenjiro Ito, Kenya Iwakura, Akira Ishii, Osamu Suzuki, Hiroshi Seno. A rapid and simultaneous analysis of theophylline and its metabolites in human whole blood by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Forensic Toxicology*. 査読有. Vol.30, No.2, 2012, 142-148.

Mina Nomura, Yudai Suzuki, Rina Kaneko, Tadashi Ogawa, Hideki Hattori, Hiroshi Seno, Akira Ishii. Simple and rapid analysis of amatoxins using UPLC-MS-MS. *Forensic Toxicology*. 査読有. Vol.30, No.2, 2012, 185-192.

Yudai Suzuki, Rina Kaneko, Mina Nomura, Hisao Naito, Kazuya Kitamori, Tamie Nakajima, Tadashi Ogawa, Hideki Hattori, Hiroshi Seno, Akira Ishii.

Simple and rapid quantitation of 21 bile acids in rat serum and liver by UPLC-MS-MS: effect of high fat diet on glycine conjugates of rat bile acids. *Nagoya Journal of Medical Science*. 査読有. Vol.75, No.1-2, 2013, 57-71.

小川匡之. 法医学分野での未知薬毒物分析への超高速 LC-MS-MS の応用. *JSBMS Letters*. 査読無. Vol.38, No.1, 2013, 6-13.

Masae Iwai, Tadashi Ogawa, Hideki Hattori, Kei Zaitzu, Akira Ishii, Osamu Suzuki, Hiroshi Seno. Simple and rapid assay method for simultaneous quantification of urinary nicotine and cotinine using micro-extraction by packed sorbent and gas chromatography-mass spectrometry. *Nagoya Journal of Medical Science*. 査読有. Vol.75, No.3-4, 2013, 255-261.

Kenya Iwakura, Tadashi Ogawa, Hideki Hattori, Masae Iwai, Osamu Suzuki, Takashi Nakagawa. Simultaneous and sensitive analysis of fourth-generation antidepressants in human plasma by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Forensic Toxicology*. 査読有. Vol.32, No.1, 2014, 30-38.

Tadashi Ogawa, Masae Iwai, Hideki Hattori, Kei Zaitzu, Takeshi Kumazawa, Akira Ishii, Osamu Suzuki, Hiroshi Seno. High-throughput analysis of ramelteon, agomelatine and melatonin in human plasma by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Forensic Toxicology*. 査読有. Vol.32, No.1, 2014, 126-131.

[学会発表](計 3 件)

小川匡之, 服部秀樹, 金子理奈, 伊藤健次郎, 岩井雅枝, 星野伸忠, 有信哲哉, 石井晃, 鈴木修, 妹尾洋. UPLC-MS/MS を用いた血漿中筋弛緩剤の一斉分析. 第95次日本法医学会学術全国集会. 2011年6月, 福島.

Tadashi Ogawa, Kenjiro Ito, Hideki Hattori, Jun Ueyama, Masae Iwai, Kenya Iwakura, Akira Ishii, Osamu Suzuki, Hiroshi Seno. Simultaneous analysis of peripheral muscle relaxants in whole blood by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. The 50th Annual Meeting of the International Association of Forensic Toxicologists. 2012年6月, Hamamatsu.

小川匡之, 服部秀樹, 白石洋輔, 岩井雅枝, 財津桂, 石井晃, 鈴木修, 妹尾洋. UPLC-MS-MS ESI-APCI 同時イオン化モ-

ドを用いての血中非脱分極性筋弛緩薬一
斉分析法の検討. 第 38 回日本医用マス
スペクトル学会年会. 2013年9月, 神戸.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

特になし

6. 研究組織

(1)研究代表者

小川 匡之 (OGAWA, Tadashi)

研究者番号: 50559937