

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：33804
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2012～2016
課題番号：24590865
研究課題名(和文) 分子インプリントポリマーを利用した薬毒物分析法の開発と法医学的応用に関する研究

研究課題名(英文) Development of analytical methods for the determination of drugs and poisons with molecularly imprinted polymers and its forensic application

研究代表者
熊澤 武志 (KUMAZAWA, Takeshi)
聖隷クリストファー大学・看護学部・教授

研究者番号：00186470
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：人体試料中覚せい剤類、麻薬類、向精神薬類及び農薬類について、分子インプリントポリマー(MIP)を用いた固相抽出法とガスクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー並びに質量分析計による分離検出法を組み合わせた新しい薬毒物分析法の開発を試みた。その結果、MIPを用いた固相抽出法によって、人体試料中の対象薬毒物が簡便・迅速かつ特異性高く検出できる分析システムを構築することができた。また、本システムは実際に薬物を服用した人体試料あるいは法医実際例において、概ねその有用性を確認することができた。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we examined the determination of drugs and poisons in human body fluids using molecularly imprinted solid-phase extraction (MISPE) as highly selective sample clean-up technique. After MISPE, the analytes extracted from whole blood, plasma, and urine were quantified using gas chromatography (GC), high performance liquid chromatography (HPLC), GC-mass spectrometry (MS), HPLC-MS. The results showed that drugs and poisons can be efficiently extracted from crude biological samples by MISPE with relatively good reproducibility. The present analytical method will be a useful for the screening and quantitative determination of xenobiotics, in clinical and forensic analysis.

研究分野：医歯薬学

キーワード：固相抽出 分子インプリントポリマー 薬毒物分析 分離分析法

1. 研究開始当初の背景

人体試料中薬毒物の抽出法として、液-液抽出 (liquid-liquid extraction: LLE) 法及び固相抽出 (solid-phase extraction: SPE) 法が広く用いられている。しかし、LLE 法は煩雑な操作が必要で、しかも低極性有機溶媒を使用することから、作業環境衛生上の問題及び廃液処理上の問題点が指摘されている。一方、SPE 法は LLE 法のような欠点が少なく、回収率が高いことや LLE 法よりも簡便で短時間に多数のサンプルを処理できること等の利点がある。この従来型の SPE 法の原理は充填剤の固相と薬毒物の間の相互作用、すなわち両者の疎水性、親水性あるいはイオン交換性等の物理化学的性質を利用することにより抽出を行うものである。しかし、人体試料中には固相と相互作用を示すような成分は無数に存在する。したがって、従来型の SPE 装置がいかに高い選択性と高い回収率が実現できると標榜したとしても、人体由来の成分が夾雑物として抽出物に混入することは避けることができず、満足のいく抽出性能が期待できない場合がある。しかも、質量分析計を用いた高感度分析を行う場合には、その夾雑物が検出感度や再現性に大きく影響することから、より一層選択性の高い SPE 法の開発が望まれる。

2. 研究の目的

人体試料から夾雑物を排除して目的の薬毒物のみを取り出すことができることは、「選択性の高い抽出」という抽出法の命題を解決するカギになる。これに対応可能であると考えられる機能性材料として、分子インプリントポリマー (molecularly imprinted polymer: MIP) が開発されている (Andersson *et al.*, Nature: 361, 645-647, 1993)。MIP とは目的の化合物分子を特異的に認識する結合部位をデザインした合成ポリマーのことで、人工抗体あるいは人工レセプターとも呼ばれ、薬毒物の SPE 法にも応用することができる。したがって、MIP と SPE 法を組み合わせた分子インプリント固相抽出 (MISPE) 法は SPE 法の中でも最も選択性の高い抽出法であると考えられる。

MISPE 法は、主に生化学、環境及び製薬の分野で利用が進められているが、法医学分野における薬毒物分析への応用も期待されることである。今回の研究では覚せい剤、麻薬、向精神薬及び農薬を分析対象として、MIP の合成と MISPE 法の設定、MISPE 法と分離検出法を組み合わせた薬毒物分析システムの構築及び法医学的有用性について検討することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 分析対象として覚せい剤 (メタンフェタミン、アンフェタミン)、麻薬 (MDMA 及びその

アナログ体、モルヒネ、コデイン、ジヒドロコデイン、ケタミン、コカイン)、向精神薬 (フェノチアジン系、ブチロフェノン系、ベンゾジアゼピン系、三環系)、農薬 (有機リン系、カルバメート系) を用いた。

(2) 人体資料は健康人ボランティアから得られた全血及び血漿、司法解剖で得られた全血及び尿を用いた。

(3) MIP の合成は塊状重合法を用いて以下のような合成手順で行った。

対象薬毒物の標準品 (鑄型分子) について希釈剤を用いて溶解する。

機能性モノマー及び架橋剤を手順 の混合液に添加する。

重合開始剤を手順 の混合液に添加する。重合反応は 60 ~ 80 の温度範囲で 15 ~ 24 時間行う。

得られたポリマー塊を破碎し、50 μm のふるいで分級を行う。

分級後のポリマー粒子を溶媒に入れ、攪拌しながら鑄型分子の洗浄除去を行う。

手順 後の MIP 粒子を室温条件下で乾燥を行う。

上記合成手順において希釈剤 (アセトニトリル、クロロホルム、トルエン)、機能性モノマー (メタクリル酸: MAA、2,6-ビス-アクリルアミドピリジン)、架橋剤 (エチレングリコールメタクリレート: EDMA、ジビニルベンゼン) 及びラジカル重合開始剤 (2,2'-アゾビスイソブチロニトリル: ABIN) を用いた。また、合成時の鑄型分子とモノマー (あるいは溶媒) 混合物のモル比は、鑄型分子: 機能性モノマー: 架橋剤: 希釈剤 = 1: 8: 40: 120 を基準とした。一方、ポリマー粒子の洗浄 (手順) 時には、メタノール、酢酸及びアンモニア水を用い、スターラーを用いた攪拌によって実施した。MIP 粒子から解離する鑄型分子は、HPLC/UV 装置あるいは GC/MS 装置を用いて検出し、その消失度を指標にした。

(4) MISPE カートリッジの作製

手順 後の MIP 粒子は市販の 1 mL 容量の SPE 用カートリッジに充填し、MISPE カートリッジを作製した。

(5) MISPE 法による薬毒物抽出条件の設定

分析対象薬毒物の標準品を人体試料に添加し、MISPE 法による抽出条件を設定した。

MISPE カートリッジの前処理: MISPE カートリッジの前処理時に 1 mL x 2 回のメタノール及びメタノール-酢酸液を通液した。

試料調整: 人体試料の使用量、添加する

溶媒の種類と使用量及び試料液のpH等、抽出に最適な試料液を調整した。特に、人体試料の使用量は100～200 µLの少量に設定し、MISPEカートリッジは1 mL容量を使用することから、人体試料及び溶媒の使用量は全量で1 mL以内を設定した。

試料の通液：操作で調整した試料液をMIPカートリッジに通す際、バックエルト減圧装置を使用した。また、血液試料ではMIPカートリッジの通液性が妨害されたため、操作において遠心分離を行い、その上清を試料として使用した。洗浄：試料通液後のMIPカートリッジは1 mL x 2回の水、アセトニトリル水溶液、メタノール水溶液を用いて洗浄を行った。

溶出：溶出時に使用する溶出液にはメタノール、メタノール/酢酸、アセトニトリル/酢酸、メタノール/アンモニア水を使用した。

(6) 分離検出装置を用いた薬毒物分析法の設定

薬毒物の分離検出には、質量分析(MS)法及びタンデム質量分析(MS-MS)法を用いた。人体試料からの薬毒物検出の前に、標準品のフラグメンテーションを集積・解析したマススペクトルライブラリーを作成し、同定あるいは定量測定に利用した。また、対象の薬毒物が高濃度の場合は、ガスクロマトグラフィー(GC)-水素炎イオン化検出(GC-FID)あるいは高速液体クロマトグラフィー(HPLC)-UV法による検出を行った。

MISPEの溶出液が有機溶媒の場合は、直接にGC-MSあるいはGC-FIDに注入した。また、水溶性の溶出液は蒸発乾固の操作を行い、その残渣をメタノール等の有機溶媒で溶解して、その一部をGC-MSあるいはGC-FIDに注入した。さらに、誘導体化を行う場合は、溶出液を蒸発乾固後に誘導体化処理を行い、機器分析に供した。なお、トリフルオロ無水酢酸(TFA)は覚せい剤、ビストリメチルシリルトリフルオロ無水酢酸は麻薬、N-メチル-N-トリメチルシリルトリフルオロ無水酢酸はブチロフェノン系向精神薬、亜硝酸ナトリウムはケタミンの誘導体化剤として使用された。一方、HPLC、HPLC-MS-MS及びHPLC-Tof-MSの場合は初期移動相を溶出液及び残渣に混合して注入試料とした。

分析対象の機器分析法では、覚せい剤及び麻薬類はGC-MS法、向精神薬はGC-MS法、HPLC-MS-MS法及びHPLC-Tof-MS法、有機リン系農薬の検出にはGC-FID法、カーバメート系農薬の検出にはHPLC-UV法を使用した。

(7) MISPE法とGC-MS(-MS)及びHPLC-MS(-MS)を接続した薬毒物分析システムの構築

MISPE法とGC-MS(-MS)及びHPLC-MS(-MS)の接続を行い、回収率の検討、検出限界、定量限界及び検量線の作成による定量性の検討、日内変動率及び日間変動率を指標とした再現性の検討等を行った。評価基準は、回収率が60%以上、検出限界(LOD)がS/N比が3、定量限界(LOQ)が検量線の下限值、再現性の指標となるCV値が15%以下とした。

(8) MISPEカートリッジの共有性の検討

化学構造的に類似性がある同じ系統の薬毒物同士において、MISPEカートリッジが共有できるかどうかを比較検討した。

4. 研究成果

(1) 覚せい剤(メタンフェタミン、アンフェタミン)

MIPはメタンフェタミンを鋳型とし、MAA、EDMA、ABINの存在下で合成した後、メタノール-酢酸水で洗浄し、SPEカートリッジに充填した。MISPE法では、全血あるいは尿0.2 mLに10 mM酢酸アンモニウム水溶液を加え混和後、遠心操作により上清を採取し、その上清をMISPEカートリッジに通液した。カートリッジは水、アセトニトリル/水の混液で洗浄後、1 mLの酢酸/アセトニトリル(1:199, v/v)を用いて溶出した。蒸発乾固後、TFAによる誘導体化を行い、GC-MSと選択イオンモニタリング(SIM)法を用いて対象薬物を検出した。回収率は85%以上、定量限界(LOQ)は20 ng/ml、再現性(CV値)は9～14%であった。MEPSE共有性に関しては、本法はアンフェタミン分析にも共有できることが明らかとなった。また、本法を法医実例に応用したところ、全血及び尿からメタンフェタミン及びアンフェタミンを検出することができた。

(2) 麻薬(MDMA及びアナログ体、モルヒネ、コデイン、ジヒドロコデイン、ケタミン)

MIPはモルヒネ及びケタミンを鋳型とし、MAA、EDMA、ABINの存在下で合成した後、モルヒネはメタノール-酢酸水、ケタミンはメタノール-酢酸で洗浄した。MISPE法は全血、血漿、尿をリン酸緩衝液で調整後、酢酸及びメタノール-酢酸溶出をそれぞれ行った。GC-MS-SIM分析はモルヒネではトリメチルシリル化、ケタミンでは亜硝酸ナトリウムによる誘導体化後に実施した。回収率は50%以上、LOQは10～50 ng/ml、再現性(CV値)は10～20%であった。また、モルヒネMIPはコデイン、ジヒドロコデインに共有性が認められた。さらに、MDMA及びアナログ体(MDA、MDEA、MBDB、BDB)はメタンフェタミンMIPと共有可能であることが明らかとなった。

コカインは塩酸コカインを鋳型とし、MAA、EDMA、

ABIN、メタノールの存在下で合成した後、MIP 粒子はメタノール-超純水で洗浄した。MISPE は血漿あるいは尿(各々0.1mL)をリン酸緩衝液(pH6)で調製し、遠心後の上清をカートリッジに通液し、メタノール-酢酸(6:44, v/v)による洗浄、メタノール溶出を行った。定量はGC-MS-SIM法で行い、回収率は約42%、再現性(CV値)は10~16%であった。しかし、コカイン鑄型を用いない non-imprinted polymer (NIP)では、回収率は30%であり、コカイン MISPE の特異性が低いことが明らかとなった。

(3) 向精神薬

三環系抗うつ薬(アミトリプチリン、アモキサピン、イミプラミン、トリミプラミン)

MIP はアミトリプチリンを鑄型とし、MAA、EGDMA、ABIN、メタノールの存在下で合成した後、メタノール-酢酸で洗浄した。MIPSE 法は血漿をリン酸緩衝液(pH7)で調整後、超純水による洗浄、メタノール溶出をそれぞれ行った。定量はGC-MS-SIM 分析を行い、回収率は約50%、検量線は20~200ng/ml、CV値は20%以下であった。また、アミトリプチリン MIP はイミプラミン、トリミプラミンに共有性は低かった。なお、イミプラミンを鑄型とした時は、回収率は約20%で MISPE 法の効率が低かった。本法の実際例として、アモキサピンを服用したボランティア血漿を MIPSE-HPLC-MS-MS に適用したところ、未変化体を検出することが可能であった。

フェノチアジン系薬物(トリフルプロマジン、トリメプラジン、プロマジン、クロプロマジン、レボメプロマジン)

フェノチアジン系薬物を対象とした MIP は、クロプロマジンを鑄型とし、MAA、EDMA、ABIN の存在下で合成した後、メタノール-酢酸で洗浄した。MIPSE は血漿をリン酸緩衝液で調整後、洗浄は水を用い、メタノール-酢酸溶出を行った。GC-MS-SIM 法を用いた定量では、回収率は約70%以上、LOQ は10~80ng/ml、再現性(CV値)が10~15%であった。

ブチロフェノン系薬物(ハロペリドール、プロムペリドール、モペロン)

MIP はハロペリドールを鑄型とし、MAA、EDMA、ABIN の存在下で合成した後、メタノール-酢酸-トリフルオロ酢酸(80:15:5, v/v/v)で洗浄した。MIPSE は血漿を酢酸アンモニウム緩衝液で調整後、メタノール-酢酸溶出を行った。抽出された薬物は、HPLC-MS-MS を用いた選択イオンモニタリング法によって定量を行った。回収率は約90%、LOQ は1~10ng/ml、CV値は10~25%であった。また、NIP の回収率は10~20%であった。一方、ハロペリドール MIP はプロムペリドール、モペロンに共有性があり、両者の回収率は70~90%であった。

ベンゾジアゼピン系催眠・抗不安薬(メダゼパム、フルジアゼパム、ジアゼパム、フルニトラゼパム、プラゼパム)

MIP はジアゼパムを鑄型とし、MAA、EDMA、ABIN の存在下で合成した後、メタノール-酢酸水で洗浄した。MIPSE は全血及び血漿をリン酸緩衝液で調整後、メタノール溶出を行った。GC/MS-SIM 法による定量によって、回収率は60%以上、再現性(CV値)は15~20%以下であった。また、ジアゼパムを服用したボランティア血漿を MIPSE-HPLC-MS-MS に、法医実際例の全血を MISPE-GC-MS-MS に適用したところ、ジアゼパム未変化体を検出することが可能であった。一方、メダゼパム及びジアゼパムを用いた MIPSE 法とモノリス型スピンチップ SPE 法との比較では、モノリス型スピンチップ SPE 法の方が超微量の溶媒量、抽出時間の短縮、高回収率(70~100%)の抽出が可能であったことから、対象薬物と SPE 法の選択が高感度薬物分析に重要であることが明らかとなった。

バルビツール酸系催眠・鎮静薬(アモビタール、バルビタール、ペントバルビタール、セコバルビタール、フェノバルビタール)

MIP はバルビタールを鑄型とし、2,6-ビス-アクリルアミドピリジン、ジビニルベンゼン、ABIN の存在下で合成した後、メタノール-酢酸水で洗浄した。MIPSE は血漿をリン酸緩衝液で調整後、酢酸及びメタノール-酢酸溶出をそれぞれ行い、蒸発乾固後に GC-MS-SIM 法による定量を行った。回収率は70%以上、LOQ は50~150ng/ml、CV値は20%以下であった。また、バルビタール MIP はペントバルビタール、セコバルビタール、フェノバルビタールに共有性があったが、回収率は40~50%程度であった。また、アモバルビタールを服用したボランティア血漿を MIPSE-HPLC-Tof-MS に適用したところ、未変化体を検出することができた。

(5) 農薬

有機リン系農薬(マラチオン、ダイアジノン、ジメトエート、メチダチオン)

MIP はマラチオンを鑄型とし、MAA、EDMA、ABIN の存在下で合成した後、メタノール-酢酸(90:10)で洗浄した。固相抽出は血漿及び尿を酢酸アンモニウム緩衝液(pH6)で調整後、メタノール溶出をそれぞれ行った。抽出された農薬は、HPLC を用いて検出を行った。回収率は20~40%、検量線は80~300 ng/ml、CV値は約25%以下であった。一方、マラチオン MIP は、人体試料の種類に関係なく、メチダチオンおよびダイアジノンに対する共有性が低く、回収率が10~25%であった。

カルバメート系農薬(カルボフラン、メトルカルブ、カルバミル、メソミル、イソプロカ

ルブ、フェノカルブ、プリミカルブ)

MIP はカルボフランを鑄型とし、MAA、EDMA、ABIN の存在下で合成した後、メタノール-酢酸(90:10) で洗浄した。MIPSE は血漿及び尿を酢酸アンモニウム緩衝液(pH 6)で調整後、超純水による洗浄、アセトニトリル溶出をそれぞれ行った。抽出された薬物は、HPLC を用いて測定を行ったところ、回収率は約 80%、LOQ は 10~50ng/ml、CV 値は約 20% であった。

研究の総括

本研究では、新規固相抽出法 MISPE を利用した各種分離検出システムによるヒト体液中薬毒物分析法を設定することができた。その結果、MISPE が適さない一部の薬毒物があったものの、概ねの薬毒物は本システムにより臨床レベルから中毒レベルの範囲で定性及び定量が可能であることが明らかとなり、法医学的有用性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 6 件)

Kumazawa T., Hasegawa C., Hara K., Uchigasaki S., Lee X.-P., Seno H., Suzuki O., Sato K.: Molecularly imprinted solid-phase extraction for the selective determination of methamphetamine, amphetamine, and methylenedioxyphenyl-alkylamine designer drugs in human whole blood by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Sep. Sci.*, 35, 726-733 (2012) 査読有

Hayashi D., Kumazawa T., Hasegawa C., Lee X.-P., Marumo A., Uchigasaki S., Kawamura M., Sato K.: A simple and reliable method for quantifying plasma concentrations of tetracyclic antidepressants using monolithic silica solid-phase extraction tips. *Forensic Toxicol.*, 30, 98-105 (2012) 査読有

Lee X.-P., Kumazawa T., Hasegawa C., Arinobu T., Seno H., Suzuki O., Sato K.: High-throughput determination of barbiturates in human plasma using on-line column-switching ultra-fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Forensic Toxicol.*, 31, 9-20 (2013) 査読有

Marumo A., Kumazawa T., Lee X.-P., Hasegawa C., Sato K.: Spin tip solid-phase extraction and HILIC-MS-MS for quantitative determination of methamphetamine and amphetamine in human plasma. *J. Liquid Chrom. Related Technol.*,

37, 420-432 (2014) 査読有

Kumazawa T.: Assay for methamphetamine and amphetamine in blood. Preedy V. R. (Ed.), *The Neuropathology of Drug Addictions and Substance Misuse. Vol.2, Stimulants, club and dissociative drugs, hallucinogens, steroids, inhalants, and international aspects* (pp.360-374). London: Academic Press (an imprint of Elsevier). (2016) 査読有

Lee X.-P., Shouji Y., Kumazawa T., Hasegawa C., Fujishiro M., Sato K.: Rapid and high sensitive analysis of benzodiazepines and tandospirone in human plasma by automated on-line column-switching UFLC-MS/MS. *Legal Med.*, 24, 36-55 (2017) 査読有

[学会発表](計 9 件)

Lee X.-P., Kumazawa T., Hasegawa C., Arinobu T., Seno H., Marumo A., Sato K.: High-throughput determination of barbiturates in human plasma using on-line column-switching ultra-fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry. The 50th Annual Meeting of the International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT), Hamamatsu, Japan, Jun. 3-8, 2012.

Lee X.-P., Kumazawa T., Hasegawa C., Marumo A., Sato K.: High-throughput determination of benzodiazepine drugs in human plasma by automated on-line column-switching UFLC/MS/MS and MS³. The 51st Annual Meeting of the International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT), Funchal, Portugal, Sept. 2-9, 2013.

李 曉鵬, 熊澤武志, 長谷川智華, 入野野 晋, 藤城雅也, 丸茂明美, 佐藤啓造: UFLC-MRM³ 法によるヒト血漿中ベンゾジアゼピン系薬物の高感度分析法. 第 38 回日本医用マススペクトル学会年会, 兵庫県神戸市, 9/26-27, 2013.

李 曉鵬, 熊澤武志, 長谷川智華, 入野野 晋, 武井 一, 庄司幸子, 佐藤啓造: ヒト血中ベンゾジアゼピン系薬物の高感度分析における UFLC-IDA-MRM/EPI 法の有用性. 第 39 回日本医用マススペクトル学会年会, 千葉県千葉市, 10/16-17, 2014.

長谷川智華, 熊澤武志, 李 曉鵬, 寺田 賢, 佐藤啓造, 妹尾 洋, 黒崎久仁彦: 血中 NSAIDs の GC/MS 分析におけるシリカモノリス固相抽出チップの応用. 千葉県千葉市, 10/16-17, 2014.

Hasegawa C., Kumazawa T., Lee X.-P., Terada M., Sato K., Kurosaki K.: Application of

solid-phase extraction tips for the analysis of drugs in human blood. 4th International Conference on Forensic Research & Technology, Atlanta, USA, Sept. 28-30, 2015.

李 曉鵬, 長谷川智華, 熊澤武志, 庄司幸子, 藤城雅也, 丸茂明美 佐藤啓造 : UPLC-Q-ToF-MS 法を用いたヒト血中ベンゾジアゼピン系薬物の高分離能・高精度分析の検討. 第 100 次日本法医学会学術全国集会, 東京都品川区, 6/15-17, 2016.

李 曉鵬, 長谷川智華, 熊澤武志, 宮崎将太, 庄司幸子, 藤城雅也, 丸茂明美, 佐藤啓造 : モノリス型 SPE スピンチップを用いた UPLC-Q-ToF-MS によるヒト体液中バルビツール酸系薬物の高分解能・高感度分析. 第 41 回日本医用マススペクトル学会年会, 愛知県名古屋, 9/15-16, 2016.

長谷川智華, 熊澤武志, 李 曉鵬, 宮崎将太, 佐藤啓造, 妹尾 洋, 黒崎久仁彦 : 新しいモノリス型 SPE スピンチップを用いた生体試料からの薬物抽出と質量分析への応用. 第 41 回日本医用マススペクトル学会年会, 愛知県名古屋, 9/15-16, 2016.

〔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〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

熊澤 武志 (KUMAZAWA, Takeshi)
聖隷クリストファー大学・看護学部・教授
研究者番号 : 00186470

(2) 研究分担者

長谷川 智華 (HASEGAWA, Chika)
東邦大学・医学部・助教
研究者番号 : 10468689

李 曉鵬 (LEE, Xiao-Pen)
昭和大学・医学部・准教授
研究者番号 : 90245829