

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：32661

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2015

課題番号：24790644

研究課題名(和文)PTSPE-HPLC/MS法を用いた新しい人体試料中薬毒物分析システムの確立

研究課題名(英文)Establishment of a new method for determination of drug and poisons in human samples using the PTSPE-HPLC/MS.

研究代表者

長谷川 智華 (HASEGAWA, Chika)

東邦大学・医学部・助教

研究者番号：10468689

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：法医学領域の薬毒物抽出では人体試料および溶媒の微量化並びに操作性および簡便性が追求されている。本研究では人体試料中非ステロイド性抗炎症薬、覚せい剤、ベンゾジアゼピン系向精神薬について、PTSPE法による抽出とHPLCおよびGC/MS分析を設定し、ヒト血漿0.1 mlを用いて抽出および定量性の検討を行ったところ、回収率、検量線共に良好な結果を得た。PTSPE法の利点として、迅速簡便、人体試料や有機溶媒が少量、S/N比の向上、通液性が良い等が挙げられた。また、今回用いたPTSPE法の改良型として、一層の迅速性と微量性に優れた遠心操作型のスピントップの開発にも成功し、さらなる応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Recent trends in SPE methods focus on miniaturizing the process, reduction of sample and solvent consumption, and increased sample throughput. In this study, a rapid method for quantitative microanalysis of drugs including amphetamines, non-steroidal anti-inflammatory drugs, and benzodiazepines using PTSPE and MS techniques with GC and HPLC was reported. Target analytes were extracted using the PTSPE method. The recoveries of the drugs spiked into plasma or whole blood were 80-90%. Regression equations for the compounds showed excellent linearity in human samples. The advantages of PTSPE-MS method are simplicity, small volumes of sample solution and other liquids to be required, clean extract solution and improvement of detection performance, high sensitivity, and high throughput. Additionally the PTSPE tip was improved to the spin tip type that can be treatment in a centrifugal separation device. This method is expected to be very useful in drug monitoring and forensic toxicology.

研究分野：法医学

キーワード：PTSPE-HPLC/MS ピペットチップ固相抽出法

## 1. 研究開始当初の背景

法医学上問題となる薬毒物は覚せい剤、麻薬類、向精神薬類、農薬類、自然毒など多種多様にわたっている。これらの薬毒物を確実に検出同定することが要求される法医学の領域では、薬毒物を簡便かつ迅速に人体試料から分離する抽出法と、微量な薬毒物濃度にも対応できる高感度で特異性の高い検出法とを組み合わせる必要があるとされている。

人体試料からの薬毒物の抽出法として、従来から液-液抽出 (LLE) 法及び固相抽出 (SPE) 法は操作が煩雑で、有機溶媒を多量に使用するなど作業環境衛生上の問題や廃液処理上の問題が指摘されている。従って、さらなる微量化が可能で操作性の良い SPE 法の開発が望まれており、研究代表者は「簡便かつ迅速」という抽出法の命題を解決すべく、蛋白質やペプチドの濃縮および脱塩処理に利用されている SPE チップを薬毒物分析へ応用することに着目し、ピペットチップ固相抽出 (PTSPE) 法を考案した。

## 2. 研究の目的

SPE 法において使用する試料液および溶媒の微量化は、「迅速かつ簡便」という抽出法の命題を解決する一つであり、従来の SPE 法の問題点を克服するものでもある。SPE 法の微量化に対応したツールとして SPE チップが開発されている。現在、逆相系 ( $C_{18}$ 、 $C_8$  等) 及びイオン交換系の固相を中心に数種類の SPE チップが市販されており、プロテオミクス研究の分野で、ペプチドやタンパク質の精製に使用されている。この SPE チップは、微量 (約  $10\mu\text{g} \sim 10\text{mg}$ ) の固相がチップ内部に固定された丁度従来型の SPE カートリッジをピペットチップの大きさに超小型化したようなものである。この SPE チップを用いた抽出法では、チップ内の固相を試料液あるいは溶媒が通過するように吸引と吐出のピペッティングを行うことで抽出が可能になる。具体的には通常の実験で使用するマイクロピペッターに SPE チップを装着して以下の順序で操作を行う。コンディショニング: SPE チップ内の固相充填剤 (固相) をメタノール (あるいはアセトニトリル) や緩衝液等が通過するように吸引・吐出を行う。抽出: 試料液の吸引と吐出を複数回繰り返し、固相上に目的物質を保持する。

洗浄: 洗浄液 (蒸留水あるいは緩衝液等) を吸引・吐出して固相から夾雑成分を除去する。溶出: 溶出液 (有機溶媒あるいは緩衝液等) を用いて吸引・吐出を行い、目的物質を固相から解離させる。SPE チップの最大の利点は、コンディショニング (操作) から溶出 (操作) までの抽出操作の全過程を、マイクロピペッターに装着した状態で簡単に行うことができること、使

用する試料液や溶媒の量が微量で済むこと等であり、SPE チップによる固相抽出法は「迅速かつ簡便」な微量抽出法として期待できる。しかし、人体試料中薬毒物分析への応用例は少なく、国内外で唯一我々が積極的な検討を開始したところである。

研究代表者は PTSPE による薬毒物の新しい抽出法とガスクロマトグラフィー/質量分析法を組み合わせた PTSPE-GC/MS システムを開発した。本研究では、法医学上問題となる人体試料中薬毒物について、PTSPE-GC/MS 法によるさらなる分析および、簡便かつ迅速な抽出と高感度検出が可能な PTSPE-HPLC/MS システムを構築し、法医学実際例に役立つ新しい分析システムの開発を目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 標準品を用いた分析機器の条件設定

分析対象薬毒物の標準品を用いて分離検出条件の設定を行った。すなわち、最適な分離用カラムの選択や移動相の選択を検討した。薬毒物標準品について MS 検出を行い、フラグメンテーションの解析をまとめてライブラリーを作成した。薬毒物の同定および定量には HPLC/MS 法のスキャンモードあるいは選択イオンモニタリング (SIM) 測定をそれぞれ用いた。その際に、標準品の分析で設定したマススペクトルライブラリーを参考にした。定量で使用する SIM 法では、基本的にはベースピークイオンを選択するが、そのイオンのバックグラウンドノイズが大きい場合はそれ以外のフラグメントイオンを選択した。また、ベースピークイオン以外でも S/N 比が高いフラグメントイオンがある場合はそのイオンの選択を検討した。ここでは、これらを考慮しながら標準品を用いて最適な諸条件の設定を行った。

### (2) 血液および尿中薬毒物の PTSPE 法による抽出条件の設定

標準品を人体試料、すなわち血液 (全血、血漿、血清) および尿に添加し、PTSPE 法による抽出条件を設定した。抽出の全操作はマイクロピペッターを用いた吸引と吐出の操作によって行い、主に以下について検討を行った。

前処理、薬物の抽出、洗浄、薬物の抽出における吸引・吐出の回数。

人体試料の使用量、添加する溶媒の種類及び使用量、pH 及び SPE チップの通液性等、最適な試料調整。特に、人体試料及び溶媒の使用量は SPE チップの特徴を生かし、少量 ( $500\mu\text{l}$  以下程度) の設定を検討した。

### (3) 定量性の検討

定量性の検討は分析対象物質を人体試料に添加して行い、回収率は60%以上、検出限界(LOD)はS/N比が3、定量限界(LOQ)は検量線の下限值でCV値が20%以下、再現性の指標となるCV値は15%以下等、それぞれを定量性評価の基準とした。

## 4. 研究成果

法医学上問題となる薬物、覚せい剤(メタンフェタミン、アンフェタミン)および非ステロイド性抗炎症薬(イブプロフェン、ケトプロフェン、フルルピプロフェン)、ベンゾジアゼピン系向精神薬(ジアゼパム、フルジアゼパム、メタゼパム、プロチゾラム)についてPTSPE法を用いた抽出を行った。分析器はGC/MSおよびHPLC/MSを用いた。

PTSPE法では吸引と吐出のピペティングを行うことで抽出が可能になり、ピペティングの回数が増えると回収率が高くなる。しかし、ある一定の回数で平衡化する。従って本研究では、回収率が80%以上得られる回数に決定した。

ヒト血漿中非ステロイド性抗炎症薬(NSAIDs)や覚せい剤の抽出では抽出のピペティングの回数は25回に設定した(図1、図2)。

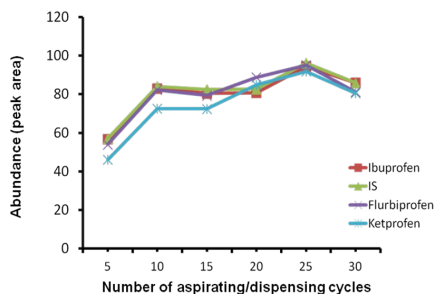


図1. NSAIDsのピペティング回数

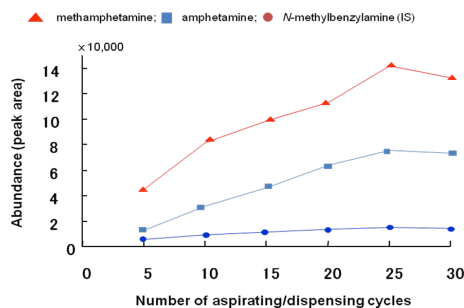


図2. 覚せい剤のピペティング回数

分析対象薬毒物の標準品を用いてGC/MS分析では最初にスキャンモードにて各スペクトルを確認し、ベースピークイオンを用いたSIM測定により定量性の検討を行った。HPLC/MSではプリカーサーイオンの設定と

プロダクトイオンスキャンを行い、その結果についてフラグメンテーションの解析をまとめてMSライブラリーを作成した。その結果、各薬毒物についてエレクトロスプレーイオン化法は、概ね有効な検出法であることが明らかとなった。

PTSPE法を用いた薬毒物の抽出法を検討する際の人体試料について、その量を0.01~0.3mlで検討したところ、血漿では0.1ml、全血では0.05mlが最も効率よく抽出できることが明らかとなった。ヒト血漿中の非ステロイド性抗炎症薬について、血漿0.1mlを用いてマイクロピペットを用いて吸引・吐出により抽出を行ったところ、回収率は80%以上、検量線は添加量約1-100ng/0.1mlの範囲で相関係数0.99以上の良好な結果を得た。一方、得られた試料をHPLC/MS/MS法にも適用したところ、概ねGC/MS法と同程度の定量性と回収率であることが明らかとなった。本結果は、第98次日本法医学会学術全国集会および第39回日本医用マスペクトル学会年会において発表を行った。

また、覚せい剤(メタンフェタミン、アンフェタミン)について薬毒物の従来の抽出法とPTSPE法の比較検討を行った。ヒト血液0.1mlを用いて抽出法を設定したところ、回収率は90%以上、検量線は相関係数0.99以上の良好な結果を得た。PTSPE法における利点についても検討したところ、迅速簡便であること。これは従来法では20分以上かかっていた抽出操作が本法では8分以内で抽出可能である。人体試料や有機溶媒が少量ですむこと。従来法では人体試料を1~2ml必要とするところを本法では0.01~0.1mlで、かつ従来法では有機溶媒が10~100ml必要とするところを本法では1ml程度ですむことが明らかになった。N比の向上につながる抽出試料中の夾雑物が少なく、クロマトグラフィー分析におけるバックグラウンドが綺麗であること(図3)。通液性が良いこと、MS法に應用することで高感度分析が可能であること等が明らかとなった。本研究成果は、国際学会(第4回 Forensic Research & Technology 学会、アトランタ)で発表を行った。

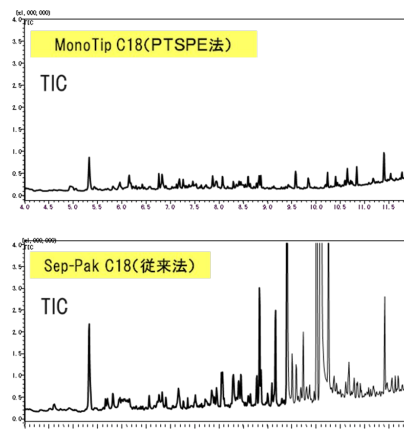


図3. 従来法とPTSPE法のバックグラウンド比較

さらに PTSPE 法を遠心操作による通液が可能なスピントップ型に改良開発し、ヒト血液中の薬毒物抽出と超高速液体クロマトグラフィー (UPLC) -飛行時間型質量分析 (Q-TOF-MS) 法に応用した。本結果は、「新しいモノリス型スピントップを用いた UPLC-Q-TOF-MS によるヒト血中 NSAIDs の分析」として第 100 次日本法医学会学術全国集会に、「スピントップと UPLC-Q-TOF-MS を用いたヒト血中ベンゾジアゼピン系向精神薬の新しい分析法」として第 41 回日本医用マススペクトル学会等で発表予定である。

#### 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 0 件)

[学会発表](計 3 件)

1. 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. 4<sup>th</sup> International Conference on Forensic Research & Technology. Atlanta USA, 2015 年 9 月 28 日.
2. 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. 第 39 回日本医用マススペクトル学会年会. 三井ガーデンホテル(千葉県千葉市), 2014 年 10 月 16 日.
3. 長谷川 智華, 熊澤 武志, 李 曉鵬, 寺田 賢, 佐藤 啓造, 山田 孝, 林 美千子, 難波 樹音, 黒崎 久仁彦: SPEチップ - GC/MS法を用いたヒト血漿中非ステロイド性抗炎症薬の分析. 第98次日本法医学会学術全国集会, 福岡国際会議場(福岡県福岡市), 2014年6月19日.

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

長谷川 智華 (HASEGAWA, Chika)

東邦大学・医学部・助教

研究者番号: 10468689