

様 式 C - 1 9、F - 1 9、Z - 1 9 （共通）

科学研究費助成事業

研究成果報告書



平成 2 7 年 6 月 1 8 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870670

研究課題名（和文）グルクロン酸抱合体の高感度検出のための蛍光誘導体化の検討

研究課題名（英文）Fluorescence derivatization method for sensitive detection of glucuronide

研究代表者

中前 琢磨（Nakamae, Takuma）

鹿児島大学・医歯（薬）学総合研究科・助教

研究者番号：20453409

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）：グルクロン酸抱合体を高感度に検出することを目的とした蛍光誘導体化法の検討を行った。本研究ではEthyl glucuronide、Oxazepam glucuronide、Propofol glucuronideを対象薬物とし、縮合剤としてDMT-MM、蛍光試薬としてDMEQ-hydrazideを用いることにより、温和な条件下での蛍光誘導体化が進行し、HPLC蛍光検出による分析が可能であった。

研究成果の概要（英文）：A fluorescence derivatization method of glucuronides using DMEQ-hydrazide and DMT-MM was developed. Ethyl glucuronide, oxazepam glucuronide and propofol glucuronide were derivatized under mild condition and detected by HPLC fluorescence analysis.

研究分野：裁判化学

キーワード：蛍光誘導体化 グルクロン酸抱合体 HPLC

1. 研究開始当初の背景

近年薬毒物が影響する異状死体症例が増加している。薬毒物の種類も違法薬物、農薬、向精神薬などの医療用薬品だけでなく、解熱鎮痛薬などの市販薬など多岐に渡る。一方で法医学検体における薬毒物分析では分析試料が限られる場合も多く、少量の試料から服用の有無の確認を要する場合がある。グルクロン酸抱合体は多くの薬毒物及びその代謝物において生成する代表的な抱合体代謝物である。尿検体を用いた薬毒物分析に際しては多くの場合、その前処理として酵素処理などにより分解して分析される。

HPLC-蛍光検出は紫外可視吸光検出などに比べ高感度な分析をすることが可能であるものの、蛍光を有しない物質に対しては適用できず、多種類の薬毒物の検出を求められた際には不適である。グルクロン酸抱合体はその構造にカルボン酸残基を有することから蛍光官能基の導入に適することが予想される。また、多くの薬毒物において生成することから HPLC-蛍光検出による高感度分析が可能になることにより中毒分析に多大な寄与をもたらすと思われる。

2. 研究の目的

本研究では、グルクロン酸抱合体に対する蛍光誘導体化を目的として、誘導体化反応及び HPLC 分析条件の検討を行った。蛍光検出を行うための蛍光ラベルとして 6,7-dimethoxy-1-methyl-2(1H)-quinoxalinone-3-propionylcarboxylic acid hydrazide (DMEQ-H)を用い、縮合剤として 4-(4, 6-dimethoxy-1, 3, 5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chloride (DMT-MM)を用いた。

これらの試薬を用いた反応条件、反応後の過剰の誘導体化試薬の除去法及び、試料マトリックスとの分離を行うための HPLC の条件の検討を行った。

3. 研究の方法

(1) Ethyl glucuronide (EtG)の HPLC-DAD 分析法の検討

DMT-MM を用いたグルクロン酸抱合体への DMEQ-H の導入の対象として EtG を取り上げた (Fig.1)。EtG はエタノールの微量代謝物であり、代謝の早いエタノールの摂取を長期間に渡り反映することが可能な有用な分析対象であるものの、紫外可視部に吸光を有しないことから広く分析されておらず、HPLC-DAD による分析が可能となることは有用である。

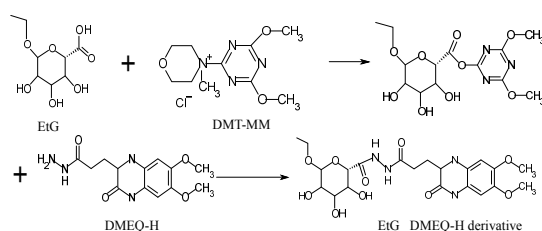


Fig. 1 EtG の蛍光誘導体化反応

水及びコントロール血清に対して標準物質を添加したサンプルを用いた。サンプル 20 μ L に 3 mM DMEQ-H メタノール溶液を加え、遠心して上清を別のチューブに移し 10% DMT-MM メタノール溶液を加えた。37 にて 20 分間反応した後に、45 、窒素気流化にて蒸発乾固させた。pH2.7 のリン酸緩衝液に 100 μ L に溶解後、遠心して夾雑物質を取り除き、さらにジクロロメタン：オクタノール (95 : 5, v/v) 1000 μ L を用いた溶媒抽出を 3 度行うことにより夾雑物質の除去を行い、水層を HPLC 分析に用いた。

HPLC 分析は日立ハイテック社の HPLC-DAD システムを用い、送液ポンプは L-2100、オートサンプラーは L-2200、カラムオープンは L-2300、PDA 検出器は L-2455 を使用した。分析カラムは GL サイエンス社の Inertsil ODS-3 (5 μ m 1.5 $\times$ 150 mm)を、ガードカラムは GL サイエンス社の Inertsil ODS-3 (3 μ m 1.0 $\times$ 10 mm)を用いた。

オートサンプラー温度は 1 、カラム温度は 40 に設定し、検出波長は 200 ~ 400nm に

設定した。流速は 0.200 mL/min、注入量は 20 μ L で、移動相は A 液をアセトニトリル/水 (10:90, v/v)、B 液を アセトニトリル/水(40:60, v/v) と し、 0min (B:0%) →2min (B:0%)→16min (B:40%) →17min (B:100%) →22min (B:100%)の条件でグラジエント分析を行った。

(2) EtG の HPLC-蛍光分析法の検討と法医検体への適用

(1)にて検討を行った誘導体化法を HPLC - 蛍光検出に適用を行った。

誘導体化条件は(1)と同様に行った。HPLC- 蛍光分析は Waters 社の 1575 Binary HPLC pump 及び Multi 2475 λ fluorescent detector を用い、試料注入はマニュアルで行った。分析カラムは GL サイエンス社の Inertsil ODS-3 (5 μ m 4.6 $\times$ 150 mm)を、ガードカラムは GL サイエンス社の Inertsil ODS-3 (5 μ m, 4.6 $\times$ 10 mm)を用いカラムオープンは 40 に設定し、励起波長 365 nm は検出波長 440 nm とした。流速は 1.4 mL/min、移動相は A 液をアセトニトリル /水(10:90, v/v)、B 液を アセトニトリル/水(40:60, v/v)とし、0min (B:12.5%) →1min (B:12.5%) →10min (B:17.5%) →12min (B:100%) →17min (B:100%)の条件でグラジエント分析を行った。注入量は 20 μ L とした。

また、上記分析法を法医検体に対して適用しその有用性を検討した。

(3)Propofol glucuronide の HPLC-蛍光分析法の検討

誘導体化反応は蒸発乾固の操作までは (1)と同様に行った。残差に水 100 μ L を加えて遠心し、上清を別のチューブに移した。ジクロロメタン 200 μ L を加えて混和後、遠心して有機層 150 μ L を別のチューブに移し蒸発乾固させた。0.1 mol/L 塩酸を 100 で溶解後、酢酸エチル 100 μ L を加えて溶解し有機層 75 μ L を別のチューブに移し、蒸発乾固させた。水

100 μ L に溶解し HPLC 分析に供じた。

HPLC-蛍光分析は機器、カラムに関しては (2) の条件に準じて行った。分析条件は移動相 A 液をアセトニトリル/水(10:90, v/v)、B 液を アセトニトリル/水(50:50, v/v)とし、0min (B:20.%)→ 1min (B:20%)→ 17min (B:100%) →22min (B:100%)のグラジエント分析を行った。

(4)Oxazepam glucuronide の HPLC-蛍光分析法の検討

誘導体化反応は蒸発乾固の操作までは (1)と同様に行った。蒸発乾固した残渣に水 100 μ L を加えて遠心し、上清を別のチューブに移した。ジクロロメタン 200 μ L を加えて混和後、遠心して水層を HPLC 分析に供じた。

HPLC-蛍光分析は (3)と同様の条件で行った。

4 . 研究成果

(1) Ethyl glucuronide (EtG)の HPLC -PDA 分析法の検討

EtG の DMEQ-H 誘導体化を用いた HPLC-紫外外部吸光検出器での検出が可能となり、夾雑物質との分離は良好であった (Fig. 2)。DAD より得られた吸光スペクトルにおいて極大値を示した 364 nm のクロマトグラムを用いて定量を行ったところ、検量線は 0.1 μ g/mL ~10 μ g/mL において相関係数が $R^2 = 0.9968$ であり、高い定量性を示した。また、0.5 μ g/mL では日内変動 1.47%(n=5)日外変動 9.42%(n=3)、2 μ g/mL では日内変動 2.10%(n=5)日外変動 3.91%(n=3)を示し、高い再現性が得られた。EtG はアルコール摂取マーカーとしてのカットオフ値が 0.1 ~ 0.5 μ g/mL とされていることから、本法は EtG の検出において有用であると考えられる。

また、上記項目により DMT-MM を用いた DMEQ-H のカルボン酸残基への導入が可能であることが示された。

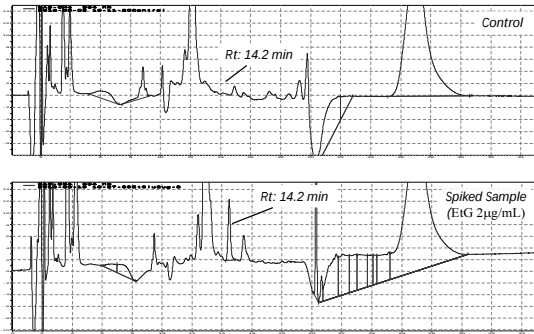


Fig.2 コントロール血清及び EtG 添加血清より得られたクロマトグラム

(2) EtG の HPLC-蛍光分析法の検討と法 医検体への適用

水への添加サンプルを調製し分析を行ったところ HPLC- 蛍 光 検 出 に よ る EtG DMEQ-H 誘導体の検出が可能であった (Fig. 3)。また、解剖時に得られた法医検体(血清、全血、尿) に対して適用したところ、尿検体では EtG が十分に検出可能であったが、血清、全血では夾雑物質との分離が困難な場合が多く、HPLC の分離分析条件及び誘導体化反応後の精製条件の改善が必要であると考えられた。

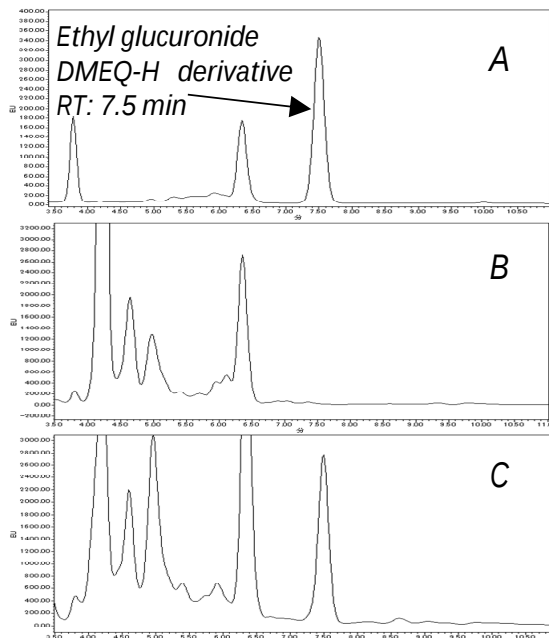


Fig. 3 Ethyl glucuronide の分析時のクロマトグラム A. 水添加サンプル B. エタノール 非服用症例の尿 C. エタノール服用症例の尿

(3) Propofol glucuronide の HPLC-蛍光 分析法の検討

水への添加サンプルを調製し分析を行ったところ propofol glucuronide の HPLC- 蛍 光 検 出 に よ る DMEQ-H 誘導体の検出が可能であった (Fig. 4)。水-酢酸エチルにおいて分配させた際に多くが酢酸エチル層に見られたものの水層へ分配したものが少量見られた。一方、ジクロロメタンでの分配においては水層への分配は見られなかったものの、クロマトグラム上夾雑ピークが多く、より低濃度かつ高マトリックスのサンプルにおいては不適であると考えられた。より効果的な精製方法を検討する必要がある。

今後、尿、血液への添加実験及び法医検体へ適用し、より実用に適した分析条件を検討していく予定である。

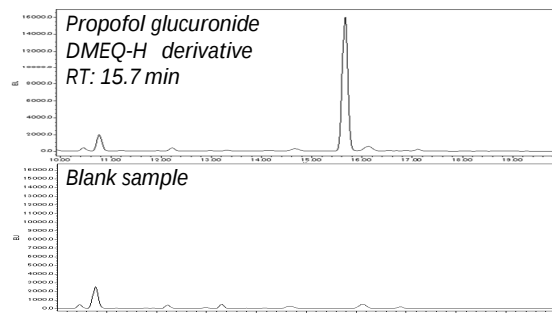


Fig.4 Propofol glucuronide 水添加サンプルより得られたクロマトグラム

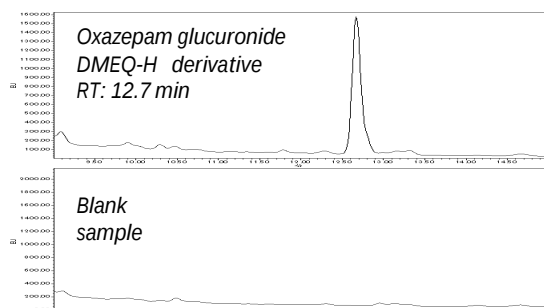
(4) Oxazepam glucuronide の HPLC-蛍光 分析法の検討

Oxazepam は diazepam をはじめとした数種類のベンゾジアゼピン系薬剤の代謝物として存在しており、その高感度な検出法はベンゾジアゼピン系薬剤の服用の確認において非常に有用である。

水への添加サンプルを調製し分析を行ったところ oxazepam glucuronide の HPLC-蛍 光 検 出 に よ る DMEQ-H 誘導体の検出が可能であった (Fig. 5)。反応後の精製においては誘導体が水-ジクロロメタン系において水層に分配しており、夾雑物質の除去を効率的に行

うことが可能であった。

今後、尿、血液への添加実験及び法医検体へ適用していく予定である。



**Fig.5 Oxazepam glucuronide 水添加
サンプルより得られたクロマトグラム**

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)

〔学会発表〕(計 2 件)

中前 琢磨, 林 敬人, 肥後 恵理, 吾郷 一利, 小片 守 死後の心臓血, 大腿静脈血, 鎖骨下静脈血試料から測定したエタノール濃度の比較 第 64 回日本法医学学会学術九州地方集会 2014 年 10 月 10 日(鹿児島)

中前 琢磨, 田口 里美, 秋間 博子 血清中の ethyl glucuronide の HPLC-UV 分析法の検討. 日本薬学会第 134 年会 2014 年 3 月 26 日(熊本)

6．研究組織

(1)研究代表者

中前 琢磨 (NAKAMAE TAKUMA)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・助教
研究者番号: 20453409