

平成21年 5月26日現在

研究種目：基盤研究 (B)
研究期間：2006～2008
課題番号：18390207
研究課題名 (和文) 体組織中多種薬毒物検査のためのGC-MS測定の高速化について
研究課題名 (英文) A STUDY ON EFFECTIVE GC-MS PERFORMANCE FOR ANALYSIS OF MULTI DRUG EXAMINATION IN BODY MATERIALS
研究代表者
原 健二 (HARA KENJI)
福岡大学・医学部・講師
研究者番号：00090738

研究成果の概要：剖検試料から薬毒物を広く分析することで、死体の生前の健康状況を診断する情報を得ることができる。しかし、薬毒物は多種多様であり、剖検で薬物情報を得るには多種類の分析が必要で、時間がかかる。そこで、本研究では、ガスクロマトグラフィー質量分析法 (GC-MS) の測定を高速化し、時間短縮を検討した。2種類の短い分析カラムを連結することで、従来30分程度かかっていた1グループの薬物の測定を5分ぐらいに短縮できた。さらに、覚せい剤の光学異性体分離分析についても高速化の条件を設定できた。本研究で開発した技術は、法医中毒学分野の他、GC-MS分析を必要とする分野にも応用可能である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	11,500,000	3,450,000	14,950,000
2007年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・法医学

キーワード：法中毒学・薬毒物検査・体組織試料・ガスクロマトグラフィー・質量分析法・高速度化

1. 研究開始当初の背景

法医剖検において剖検試料から薬毒物を検出することは死因・事故原因に関する情報を得るのみでなく、生前の健康環境を得る意味で法医学に重要な意義がある。死者が生前摂取した薬物を全て検出することを理想とするが、薬毒物は多種多様であり、一つの方法だけで、一斉に分析することは不可能で、何らかの対処法が必要である。2000年代に入

ってから、ガスクロマトグラフ質量分析装置 (GC-MS 装置) の性能が安定して、高速測定が可能となり、多数の試料を分析する分野においてその応用が期待されるようになった。その当時は、高速測定が可能で MS を使って、尿や血液などの体液試料の高速分析が検討されていたが、法医学で取り扱うような体組織試料での試みは殆どされていなかった。本研究に着手する前、本研究代表者は、前世代

の GC-MS 装置により、本研究課題の予備的研究を行っていたが、機器の性能の限界があり、高速測定を試みに留まっていた。

上記のような背景から、全血・体組織を試料とした数種類の薬毒物（塩基性薬物、酸性薬物、揮発性薬物誘導体）の分析を GC-MS により自動的に連続分析する一斉分析システムを作成することを目的とした本研究を考案した。

- ① 尿試料、水の試料などで、行われていた GC-MS の高速測定には、試料を装置に導入する際、試料の一部を分析カラムに導入するスプリットインジェクションが使われていた。全血、体組織分析では、含有される薬物濃度が低いこともあるので、スプリットインジェクションでは高感度分析を期待できなかった。
- ② 剖検の全血、体組織では、臨床で得られる血液、尿に比べ、大量の脂質が含まれているので、その除去が重要である。その手法として、色んな固相抽出カートリッジが販売されているが、実用化するには、経済的な問題もあった。

2. 研究の目的

上記の問題 2 点に目的を絞って、研究を行った。

- ① 全血、体組織試料を対象とした GC- (四重極) MS 測定の高速化を図るため、分析対象物を試料導入時点で濃縮する手法を検討する。
- ② 本研究を実務に応用するため、経済的には低コストになるような簡易試料調製を検討する。
- ③ ①、②の経過から、多種薬物分析の連続分析を検討する。

3. 研究の方法

高速測定条件の応用性の検討

予備的研究において、1. 内径の小さいカラムを高圧で使用することで、GC-MS の高分離能、高速測定が可能になった。2. 2つのカラムを連結して使用することで、短いカラムを効率的に使うことができるということがわかり、本研究において、高速測定が可能な GC-MS の条件を設定し、数種の手法により調製された試料を分析した。

【試料の種類】

I. 2つのカラムを連結した分析システム 【分析対象化合物の分析系での濃縮】

- (i) 3 種の薬物スクリーニング分析のための試料処理 【A,B,C】
 - ① 微極性、塩基性薬物用処理 【A】
 - ② 微極性、酸性薬物用処理 【B】

- ③ 極性薬物用処理 【C】
 - (ii) 覚せい剤の分析 (迅速分析)
 - ④ ヘプタフルオロブチリル誘導体化処理 (覚せい剤など) 【D】
- ## II. 光学異性体分離分析の高速化
- ⑤ 覚せい剤光学異性体分離分析用処理 【ヘプタフルオロブチリル固相マイクロ抽出】

【試料処理過程】

I. 2つのカラムを連結した分析システム (試料調製 【A, B, C】 は本研究のために開発)

(i) 3 種 【A, B, C】 の薬物スクリーニング試料処理

試料の調製：【A】 微極性、塩基性薬物用：血液、体組織のホモジネート 0.5 ml に蒸留水 1 ml を混ぜ、酢酸ブチル 2 ml で抽出、さらにアンモニア水を加えアルカリ性、炭酸アンモニウム 1 g を入れ、酢酸ブチル 2 ml で抽出する。合わせた抽出液に硫酸マグネシウム 0.5 g を入れ、脱水する。脱水した液を窒素気流濃縮機（本補助金で購入）で濃縮乾涸、残渣をアセトニトリルに溶かし、GC-MS 測定を行う。さらに、試料をアセトニトリルで薄め、そのアセトニトリルをヘキサンで洗浄する。洗浄したアセトニトリルを濃縮し、酢酸プロピルを少量加えて、GC-MS 測定を行う。最後に、試料を濃縮乾涸し、BSTFA (1%TMCS を含む)少量を使って、電子レンジ内で TMS 化を行い、アセトニトリルで希釈して GC-MS 測定を行う。

【B】 微極性、酸性薬物用：血液、体組織のホモジネート 0.5 ml に蒸留水 1 ml を混ぜ、酢酸ブチル 2 ml で抽出、さらに酢酸を加え酸性、硫酸アンモニウム 1 g を入れ、酢酸ブチル 2 ml で抽出する。合わせた抽出液に硫酸マグネシウム 0.5 g を入れ、脱水する。脱水した液を窒素気流濃縮機で濃縮乾涸、残渣をアセトニトリルに溶かし、GC-MS 測定を行う。この後は、【A】と同様に調製し、GC-MS 測定を行う。

【C】 極性薬物用：血液、体組織のホモジネート 0.5 ml に飽和塩化ナトリウム水 0.05 ml、アセトニトリル 4 ml を入れ、よく混ぜた後、塩化ナトリウム 0.5 g を入れ、よく混ぜる。さらに、硫酸マグネシウム 0.5 g を入れ、脱水する。抽出液を濃縮し、GC-MS 測定を行う。この後は、【A】と同様に調製し、GC-MS 測定を行う。

(ii) 覚せい剤の分析

薬物の中で覚せい剤の検出例数は多く、試料調製と測定の高速化が望まれている。試料調製については、20 年以上の研究で、基盤を築いていたので、体組織、腐敗試料などから

の分析のための調製法を検討した。

【D】 けいそう土を使ったヘプタフルオロプロチリル抽出法

試料液（血液、ホモジネート）を 1M 塩酸で薄め、遠心し、固形物と表面に層をつくる脂質を除去する。試料溶液の pH を 12~13 に調製し、Extrelut にしみ込ませる。15 分後、反応試薬塩化ヘプタフルオロプロチリルを 1% 含むヘキサンを流して、誘導体化と抽出を同時に行う。抽出液を濃縮して、GC-MS 測定を行う。腐敗が進んでいる場合は、Extrelut を使う前に、ジエチルエーテルによる試料液の洗浄を加える。

【GC-MS の測定条件】

装置：島津 QP-2010Plus（本補助金で購入）
カラム：第 1 カラム（注入側）Rtx-5MS 1 m x 0.32mm i.d., 膜厚 0.5 μ m 第 2 カラム（分析部）InertCap-5MS/Sil 10 m x 0.18 mm i.d., 膜厚 0.18 μ m.

注入モード：スプリットレス

【キャリアガスの圧力】

試料 **【A,B,C】** の注入時の圧力条件：未誘導体化試料の場合：高圧注入 650 kPa (0.2 min)

TMS 誘導体化試料の場合：初期 350 kPa

試料 **【D】** の注入時の圧力条件：高圧注入 250 kPa (0.2 min)

【カラムオープンの温度】

試料 **【A,B,C】** 未誘導体化試料の場合：初期 100 $^{\circ}$ C（固定 0.5 min）

TMS 化試料の場合：初期温度 75 $^{\circ}$ C、345 $^{\circ}$ C まで 75 $^{\circ}$ C/min で昇温プログラム 終了まで 345 $^{\circ}$ C を保つ。

試料 **【D】** の場合：初期 70 $^{\circ}$ C（固定 0.2 min）220 $^{\circ}$ C まで 30 $^{\circ}$ C/min で昇温、310 $^{\circ}$ C まで 70 $^{\circ}$ C/min で昇温

【注入口の温度】 300 $^{\circ}$ C（試料 **【D】** は 280 $^{\circ}$ C）

【インターフェースの温度】 290 $^{\circ}$ C

II. 光学異性体分離分析の高速化

光学異性体分離分析については、平成 17 年度から平成 18 年度にかけて得た基盤研究 (C) (代表者：柏村 征一)「光学異性覚せい剤の 2 種の誘導体化抽出：迅速 GC-MS 分析法の開発」に得た一つの方法の成果をより有効に利用するため、本研究において、新しい技術の開発の試みを行った。

【固相マイクロ抽出のための前処理法】

試料：血液、体組織（塩酸酸性の抽出液）

試料処理：試料 0.2 ml に内部標準物質 L-アンフェタミン-d3、L-メタンフェタミン-d6 を 50 ng 添加後、1 M 塩酸 2.5 ml と混合し、よく混ぜた後、遠心し、上清を 2 ml 回収する。この液に 5 M 水酸化ナトリウム溶液 0.25 ml を加え、アルカリ性とした後、けいそう土にしみ込ませる。10 分後、ジエチルエーテル

7.5 ml で抽出する。エーテル抽出液に 1M 塩酸 2.5 ml を入れ、混合した後、1000 rpm で 1 分間遠心し、その下層（塩酸層）を回収する。回収した塩酸層を 70 $^{\circ}$ C で加熱し、過剰のエーテルを除去する。この 1.00g を気化平衡用バイアルに入れ、酢酸ナトリウム 0.20g、塩化ナトリウム 0.5g、5 M 水酸化ナトリウム溶液 0.205g を追加、混合後、塩化ヘプタフルオロプロチリル 0.015 ml 入れ、栓をして、自動注入装置を使って、気化平衡・固相マイクロ抽出 (SPME) で試料導入し、GC-MS 測定を行う。

（体組織：基礎的実験ではトリ肝を使用）

【GC-MS の測定条件】

装置：島津 QP-2010Plus

カラム：第 1 カラム（注入側）Rtx-5MS 0.7 m x 0.53 mm i.d., 膜厚 0.50 μ m 第 2 カラム：不活性ヒューズドシリカ 5 m x 0.10 mm i.d. 第 3 カラム（分析部）RT-betaDEXsm 30 m x 0.32 mm i.d., 膜厚 0.25 μ m

注入モード：スプリットレス（パージ 0.4 min）カラムオープン温度：初期 70 $^{\circ}$ C (0.40 min 一定) 130 $^{\circ}$ C まで 70 $^{\circ}$ C/min で昇温、140 $^{\circ}$ C まで 1 $^{\circ}$ C/min で昇温、190 $^{\circ}$ C まで 50 $^{\circ}$ C/min で昇温、190 $^{\circ}$ C を 10 分間保持。 注入口の温度：250 $^{\circ}$ C、インターフェース：200 $^{\circ}$ C

キャリアガス He：注入部の圧力 604 kPa(初期)

4. 研究成果

高速測定条件の応用性の検討

I. 2つのカラムを連結した分析システム

GC-MS で高速測定には、内径の小さいカラムを使って、高圧のキャリアガスを使用するが多い。しかし、これは、注入モードがスプリットで、検討されている。予備的研究では、スプリットの注入モードである。しかし、試料中の夾雑物の影響で、血液、体組織試料中の微量分析への応用は困難である。本研究の申請時は、注入部に吸着剤を塗布あるいは詰めて、注入部で薬物を濃縮して、注入部の高速昇温で、薬物を急激に気化させて、低温のカラムに送り込む計画をしていた。しかし、吸着剤には、熱安定なものがなく、コーティングも技術的に困難ということであった。そこで、発想を変えて、注入部の温度は高めにし、薬物を注入と同時に気化させ、注入部を短い時間で通過させ、膜厚の厚いカラムに吸着させ、吸着後、速い昇温プログラムで内径の小さいカラムに送り込んで分析することにした。ということで、2つのカラムを連結した分析システムを検討することになった。

測定条件の設定には、①極性の強いニコチンアミドがきれいなピークで出現すること、②大部分の薬物 (GC-MS 可能なもの) が出

現する目安となるコレステロールの保持時間が5分以内になることを目標にした。

注入時の圧力については、3種の薬物スクリーニングには短時間に高压注入を採用し、揮発性の高い(保持時間の短い)化合物のピーク幅を狭くし、感度を高くするために短時間の高压注入(スプリットレスインジェクションの時間)を採用した。

(i) 3種の薬物スクリーニング

【極性化合物を含む群の例】

図1は、試料調製【A】(塩基性中心であるが、バルプロ酸のような酸性薬物も検出される)によって得られたクロマトグラムと検出された薬物のマススペクトル(試料は血液である)。

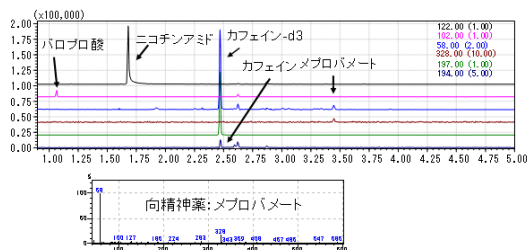


図1. 試料調製【A】で得られたあるクロマトグラムと検出された薬物のマススペクトル(試料は血液である)

図2は、ある剖検血液を試料の調製【B】で抽出し、ヘキサンによる洗浄前のアセトニトリル溶液を測定したクロマトグラムとその時得られた薬物のマススペクトルである。

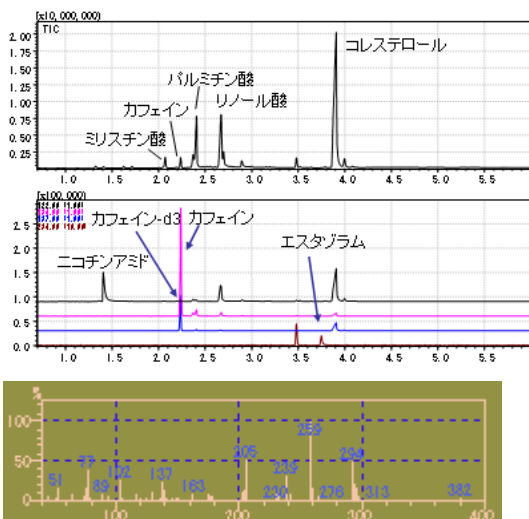


図2. 設定条件で得られたTICとマスクロマトグラム 試料: 剖検血液 試料の調製: 【B】 精製していない粗抽出

本条件による測定は、脂質の夾雑物がある程度存在しても、試料を希釈することで、ニコチンアミドやカフェインのような極性化合物から、感度が低いと言われていたエストazolamでも良いピークが得られている。測定時

間も、コレステロールが4分以内と、本研究の目標を捕らえている。

図3は、図1の試料をTMS化して得た試料をTMS化試料用に設定した条件で測定したものである。TMS分析は従来の条件であれば、20分以上の測定時間で行われているが、本研究において、かなり短い時間で測定可能になった。

腐敗が進んで、脂質などが大量に存在する場合は、TMS処理前のアセトニトリル溶液をヘキサンで洗浄している。この洗浄により、微極性薬物が一部消失することがあるが、コレステロール、リノール酸などはかなり除去され、多くの薬物、極性成分が明確に検出される。

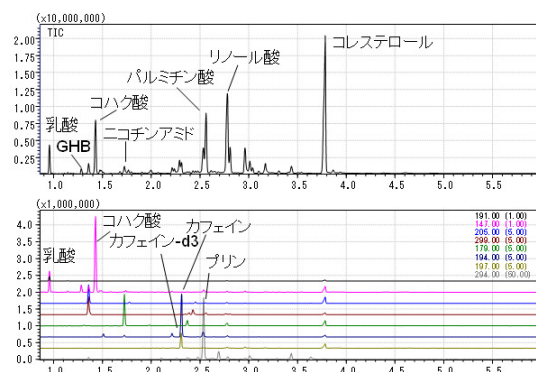


図3. TMS誘導体化試料から得られたクロマトグラム(上はトータルイオンクロマトグラム、下はマスクロマトグラム) 試料: 剖検血液 試料の調製: 【B】 TMS化処理

(ii) 覚せい剤の分析

けいそう土を使ったヘプタフルオロブチル抽出法

血液0.2 mlに覚せい剤、数種の関連薬物、代謝物、数種の重水素標識内部標準物質を添加して、試料処理して得たクロマトグラムを図4に示す。各薬物は、本方法によって同時に抽出され、5分程度で同時に測定される。

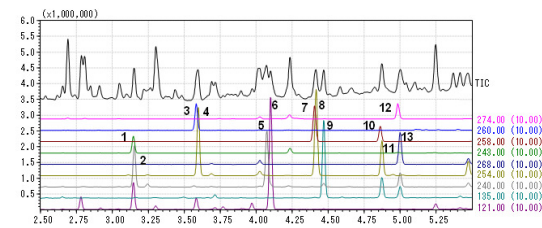


図4. 覚せい剤分析のマスクロマトグラム けいそう土(Extrelut)を使った誘導体化抽出により得られた試料(健康人血液0.1 mlに各標準品100 ngを添加して処理したもの)

1=L-アンフェタミン-d3, 2=アンフェタミン, 3=L-メタンフェタミン-d6, 4=メタンフェタミン 5=p-ハイドロキシアンフェタミン, 6=p-メトキシアンフェタミン(PMA), 7=p-ハイドロキシメタンフェタミン-d5, 8=p-ハイドロキシメタンフェタミン, 9=MDA, 10=MDMA-d5, 11=MDMA, 12=MDEA-d7, 13=MDEA

II. 光学異性体分離分析の高速化

試料調製の基礎実験として、トリの肝に覚せい剤を添加して、RT-betaDEX 30 m x 0.32 mm i.d. 膜厚 0.25 μ m を直接つないで、光学異性体(キラル)分析を試みた。図5に示すように、体組織試料のためのこの試料調製法は、気化平衡による固相マイクロ抽出で GC-MS 分析するのに、効果的であった。

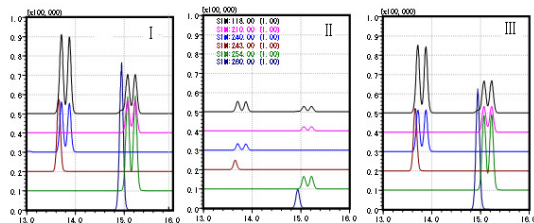


図5. 気化平衡-固相マイクロ抽出における前処理の回収率の効果

I : 標準物質+1M 塩酸 1ml を, HS-DR-SPME で分析

II : 標準物質+トリ肝ホモジネート上清 1 ml (除タンパク・除脂質なし) を, HS-DR-SPME で分析

III : 標準物質+トリ肝 1g を, 除タンパク・除脂質処理し, HS-DR-SPME で分析

[HS = 気化平衡, DR = 誘導体化 (ヘプタフルオロプロチル)]

この光学異性体分離カラムの前の位置に内径 0.1 mm の不活性ナローボアキャピラリーカラム 5 m を付けた場合、図6のように、測定にかかる時間を図5に比べるとかなり短縮することができた。また、分離も、効率が高くなった。

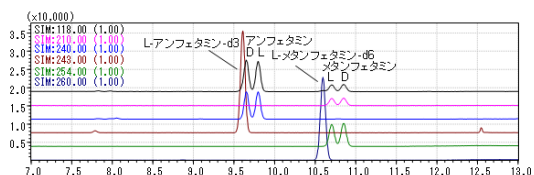


図6. 本研究で得られた条件で測定した光学異性体の分離分析のクロマトグラム(試料:血液に標準品を添加したもの)

分析カラムにナローボアキャピラリーで抵抗をつけて高圧で試料を導入することで、測定時間と分離能を高めることが明らかになった。光学異性体分離分析の測定時間を短くすることで、光学異性体分析を実務に導入可能になった。また、図7の例から判るように、分離が良くなったことで、微量に存在する成分のマススペクトルを明確に確認できるようになった。

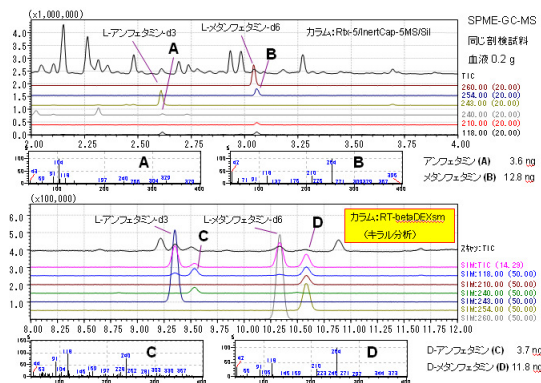


図7. 固相マイクロ抽出により導入した光学異性体 GC-MS 分離分析が腐敗試料分析に有用である1例(クロマトグラムとマススペクトル)

剖検から得られた血液を試料とし、上記試料処理を行い、固相マイクロ抽出で、GC-MS に試料を導入した。上部のクロマトグラムとマススペクトルは I-ii) で求めた条件で測定、下部は II で求めた条件で測定したものである。A と C はアンフェタミン相当のピークで、B と D はメタンフェタミン相当のピークである。メタンフェタミンについては両測定法とも問題なく測定可能であったが、アンフェタミンについては、上部の測定ではマススペクトルの確認が困難で、下部の光学異性体の分析が優れている結果が得た。

【まとめ】

本研究は、研究代表者が試料処理、測定条件を全般にわたり検討した。途中、3名の研究協力者(島津製作所の宮川治彦氏、九州厚生局の藤井広志氏、中国医科大学の劉俊亭氏)に専門的知識の提供、条件の設定に関する協力を得た。

- 宮川氏からは、キャピラリーカラム利用法の基礎的な技術に関する助言を得た。
- 藤井氏には、カラムのサイズの違いによる条件設定に関して協力を得た。
- 劉氏には、2つの短いカラムを連結したカラムシステムが実際の分析に応用できる可能性があるか、実際に試験を行い、助言を得た。

① (i) GC-MS 測定時の試料濃縮については、イ. 注入部のガラスインサートに吸着剤などを詰めて、温度プログラムを使って検討、ロ. 2つのカラムを連結し、注入部に近い方に膜厚の厚めの短いカラムを使って検討した。その結果、イは濃縮の効果は明確であったが、化合物の脱離が均一でなく、広範囲での分析には適していなかった。ロは注入部に入った化合物が一端気化して、最初のカラムに移り、濃縮され、高速昇温プログラムにて、一気に主(2番目)カラムに移る。その時に、化合

物が濃縮され、ピークの感度が高くなる。

条件検討は、常に出現する極性の高いニコチンアミドのピーク形状と感度を目安に行った。この濃縮の効果は、キャリアガスを初期に加圧することで、観察された。また、従来に比べ、カラムにかかるキャリアガスの圧力を高くしたこと、速い昇温速度によって、測定の高速化が実現した。

(ii) 覚せい剤の光学異性体分離分析の場合は、誘導体化した化合物を気化平衡で固相マイクロ抽出を行う方式でGC-MSに導入する。GC-MSでは、一端、導入された化合物は第1カラムに吸収され、大きい昇温速度で、第2カラムに移り、ほとんど素通り状態で第3カラム(分析)に移り、ピークが濃縮された形式で分離され、従来の条件の2倍の高速測定ができる。

この方法は、市販されているサイズの種類が少ないカラムでは有効な方法だと示唆される。

② (i) 薬物の種類が多いため、覚せい剤以外の薬物に対しての試料処理に、コストがかかる手法は避けた。また、有機溶媒の消費は、他の方法に比べると少ない量でできるように工夫した。ただ、微妙な極性の差で操作を行うところがあった。本研究では、定量性についての吟味までは行わなかった。

メーカーの非公開の部分のある固相抽出カートリッジを使用するのと異なって、試料処理過程を明確化でき、さらに簡素なので、法中毒学実務に信頼できる試料調製になるのではないかと考える。

(ii) 覚せい剤光学異性体分離分析において、体組織試料も高感度で分析できる試料処理を固相マイクロ抽出により開発した。この方法により、腐敗成分で確認が困難な微量に存在するアンフェタミンを明確にマススペクトルで確認することができた。

③ 多種薬物分析の連続分析について

本研究では、多種薬物分析を連続で行うところまでには達せなかった。手動分析で、連続測定の可能性は伺えたが、酸性と塩基性を連続して分析するには、やや問題があった。すなわち、酸性薬物は、ほぼ問題なくピークが出現するが、塩基性薬物のピーク出現に妨害を生じることが多い。

【今後の展開】

- ◇ 2つのカラムを使って、高感度で、GC-MS測定の高速化が可能になった。今後は、研究代表者と島津製作所の宮川氏のグループと、この手法をより発展させるため、相互協力を行う方向で仕事を進める。
- ◇ この方法が確立されれば、法中毒学の分野のみならず、微量検査で忙しい分野に

比較的低コストで正確なGC-MS測定法を供給できる。

- ◇ 酸性、塩基性の試料調製の問題点を解決すれば、連続測定を可能にする。
- ◇ GC-MS装置(普及型)は、従来に比べれば、かなり高度になっているが、GCオーブンの昇温速度、四重極質量分析計のスキャンスピードがもう少し改良されれば、本研究をより発展できる。
- ◇ また、GC-MS装置の完全自動化が進めば、本研究の目的である「連続測定の自動化」を可能にする。

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 2件)

1. Hiroshi Fujii, Kenji Hara, Mitsuyoshi Kageura, Masayuki Kashiwagi, Aya Matsusue, Shin-ichi Kubo. High throughput chiral analysis of urinary amphetamines by GC-MS using a short narrow-bore capillary column. (2009) Forensic Toxicology, DOI 10.1007/s11419-009-0073-2 (in press, 査読有)
2. Hiroshi Fujii, Kenji Hara, Seiichi Kashimura, Mitsuyoshi Kageura, Masayuki Kashiwagi, Aya Miyoshi, Sachiko Ikeda. Rapid GC-MS analysis of methamphetamine and its metabolites in urine - application of a short narrow-bore capillary column to GC-MS. (2006) Journal of Chromatography B, 842: 116-120. (査読有)

[学会発表] (計 1件)

1. Hiroshi Fujii, Kenji Hara, Mitsuyoshi Kageura, Masayuki Kashiwagi, Aya Matsusue, Shin-ichi Kubo. Rapid chiral analysis of urinary amphetamines by gas chromatography-mass spectrometry using single-step extraction with TPC-chiral derivatization. 7th International Symposium Advances in Legal Medicine, Osaka, September 1-5, 2008.

[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]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原 健二 (HARA KENJI)

福岡大学・医学部・講師

研究者番号: 00090738