

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006～2009

課題番号：18590646

研究課題名（和文） 新液-液抽出法と組合せたデュアルカラム HPLC の開発と
分析ルーチンの確立

研究課題名（英文） Development of the dual column-HPLC system using the new extraction
technique salting-out methods and establishment of its analysis procedures

研究代表者

吉田 学（YOSHIDA MANABU）

関西医科大学・医学部・准教授

20122004

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学

キーワード：薬毒物，抽出，親水性有機溶媒，HPLC

1. 研究計画の概要

生体試料を対象として薬毒物分析を実施する場合、抽出操作は必要不可欠である。また現在最も汎用されている高速液体クロマトグラフ（HPLC）を用いて薬毒物を分析する場合、抽出に親水性有機溶媒を用いると HPLC に直接注入できることから操作上非常に有効である。そこで、本来は試料溶液と混和してしまう親水性有機溶媒の分離を可能にした新液-液抽出法を考案した。これを法医解剖事例に応用することによって改良を加える。更に dual column-HPLC 法を開発して、この抽出法と組み合わせることによって分析精度の向上を検討するとともに、抽出試料の分析ルーチンを検討して薬物検査を簡便に実施する方法を確立することを目的とする。

2. 研究の進捗状況

(1) NaCl-アセトニトリル抽出法の検討

64 種類の薬物を対象として実用性を調べた。検体とアセトニトリルを等量混合した場合、二相に分離した上相（アセトニトリル相）に 90%（上下相の面積百分率計算）以上移行する薬物が多く認められた。アセトニトリルを検体の 1/2 量とした場合には濃縮効果が認められた。検出限界は薬物によって異なったが、中毒レベル濃度では抽出液を濃縮操作することなく測定可能で、検量線の直線性や相関係数も良好であった。この傾向はバルビツール酸系やベンゾジアゼピン系薬物、有機溶剤で認められた。ジヒドロコデインとエフェドリン、アセトアミノフェンはアセトニトリル相への移行率が低値であったが、再現性が良好であったことから定量への応用は可能であった。

(2) dual column-HPLC システムの基礎的検討 カラム種類と分離

保持時間での同定精度が良いカラムの組み合わせを 12 種類のベンゾジアゼピン系と 7 種のバルビツール酸系薬物を用いて検討した。カラムは COSMOSIL 5TMS, 5C4, 5C18, 5C22, Cholester（ナカライテスク）および Cadenza CD-C18（Imtakt）、Develosil ODS UG（野村化学）を用いた。同じ系列の薬物では溶出する順番に変化は認められなかったが、保持比で調べると 5TMS-MS、Cholester で違いが認められた。総合的に評価した結果、カラムの組み合わせは Cadenza CD-C18 と 5C4-MS が同定精度の向上に最も適していた。

カラム温度による流量の調整法の検討

カラム温度を低くするとカラム圧が高くなる傾向が認められた。このことからデュアルカラムの場合、カラム温度でカラム圧を調整することによって互いのカラム流量を調整できることが示唆された。またカラム温度と保持時間は薬物によって特徴のある変化が認められた。以上より、温度による分離・分析の調節が可能な分析法であることが見いだされた。

3. 現在までの達成度

おおむね順調に進展している

HPLC の移動相であるアセトニトリルはアクリロニトリル製造の副産物として生産・供給されている。このアクリロニトリルの需要が世界的な不況によって減少したことから昨年からは入手困難となっている。そのために dual column-HPLC の開発が停滞気味となった。そこで移動相をメタノールに変更して薬毒

物の分離について検討した。結果は一長一短であったが、有機溶剤の分析に対して有効性が認められた。研究全体に関しては基礎実験がほぼ構築されたので、年度内に結果が出せる見通しである。

4. 今後の研究の推進方策

(1) 事例による基礎データの収集。

抽出法として塩処理や低温処理(-20で30分間放置)を用いて抽出可能な薬毒物を確認することによって抽出・分析条件のデータベースを強化する。

抽出法の検討：薬毒物に対する応用性を回収量、再現性(定量性の検討)、検出限界(濃縮しないで抽出溶液を直接分析)で検討する。

同定(定量)法の検討：(a)フォトダイオードアレイ検出器付き高速液体クロマトグラフでの標準吸収スペクトルを収集してデータベースを作製する。(b)ガスクロマトグラフ質量分析計で抽出液を直接分析できる条件を遠心エバポレータシステムによって濃縮した試料と比較して検討する。

(2) 高速液体クロマトグラムの dual column-HPLC への改良と試運転

今までに得たカラム種類とカラム長さのデータからカラムの組合せを選択し、これを流量可変のマイクロスプリッターバルブを用いて流路を二分割したシステムに装着して実用性(定性や定量性、迅速性)について調べ、改良を検討する。

(3) 分析ルーチンの確立の予備試験

事例を基にして関与が多い薬毒物を選択し、これらの薬毒物の標準品を用いて検討する。

5. 代表的な研究成果

(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 4件)

吉田 学, 赤根 敦, 吉村澄孝, 時安太久磨, 沖井裕, 有機リン系農薬 DDVP(ジクロルボス)を服毒した2剖検例の毒性評価の検討, 法医学の実際と研究, 51, 71-75, 2008, 査読者有

吉田 学, 赤根 敦, 三谷友亮, 胃内容を用いたTriage検査が死因に有効であった一剖検例, 法医学の実際と研究, 50, 181-185, 2007, 査読者有

吉田 学, 赤根 敦, 尿中に高濃度エタノールを検出した一事例, 法医学の実際と研究, 50, 175-179, 2007, 査読者有

Manabu Yoshida, Atsushi Akane, Mayumi Nishikawa, Hitoshi Tsuchihashi, Triage test and HPLC assay for analysis of vegetamin, an antipsychotic agent, using gastric contents and blood specimens,

Legal Medicine, 8, 172-176, 2006, 査読者有

[学会発表](計 9件)

Manabu Yoshida, Atsushi Akane, Tetsuya Kobayashi, Tomoaki Mitani, Yutaka Okii, Examination of seminal stain by HPLC assay of phenolphthalein, 7th International Symposium Advances in Legal Medicine, Sep. 2008, Osaka

吉田 学, 赤根 敦, 片木宗弘, 土橋 均, HPLCを用いた血清中キシレンの分析, 日本法科学技術学会, 2008年11月, 東京

吉田 学, 赤根 敦, 沖井 裕, 吉村澄孝, 時安太久磨, 小林哲哉, 三谷友亮, 有機リン系農薬の揮発性成分検出による簡易検査法の検討, 日本法医学会近畿地方会, 2008年11月, 和歌山

吉田 学, 赤根 敦, 吉村澄孝, 時安太久磨, 沖井 裕, GC-MSによるパラヒドロキシメタンフェタミンの簡易検出法, 日本法医学会総会, 2008年3月, 長崎

吉田 学, 赤根 敦, 西川眞弓, 片木宗弘, 土橋 均, ECD-HPLCによるパラヒドロキシメタンフェタミンの分析, 日本法科学技術学会, 2007年11月, 東京

吉田 学, 赤根 敦, 沖井裕, 時安太久磨, 吉村澄孝, 西川眞弓, 片木宗弘, 土橋均, フォトダイオードアレイ検出器-HPLCによるp-hydroxymethamphetamineの検出, 日本法医学会近畿地方会, 2007年11月, 大津

吉田 学, 赤根 敦, 吉村澄孝, 時安太久磨, 沖井裕, 簡易ホルマリン検査キットによる臓器固定液中のホルマリン濃度測定の検討(第一報) 臓器種類との関係, 法医学会総会, 2007年5月, 秋田

吉田 学, 赤根 敦, 西川眞弓, 片木宗弘, 土橋 均, 電気化学検出器および紫外吸収検出器-HPLCによるミノサイクリンの分析, 日本法科学技術学会, 2006年11月, 東京

吉田 学, 赤根 敦, 西川眞弓, 三谷友亮, 沖井裕, 吉村澄孝, 時安太久磨, 土橋均, NaCl-アセトニトリル抽出法を用いたプラゾシンのHPLC分析, 日本法医学会総会, 2006年4月, 福岡