

平成21年 5月 2日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19590679

研究課題名（和文） 固相抽出チップを用いた薬毒物分析法の開発とその法医学的応用

研究課題名（英文） Development of solid-phase extraction tips for analysis of drugs and poisons and its forensic application

研究代表者

熊澤 武志 (KUMAZAWA TAKESHI)

昭和大学・医学部・教授

研究者番号：00186470

研究成果の概要：

人体試料中覚せい剤（メタンフェタミン、アンフェタミン）、麻薬（コデイン、ジヒドロコデイン）、向精神薬（三環系、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）及び農薬（有機リン系、カーバメート系）について、固相抽出チップを用いた抽出法とガスクロマトグラフィー/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、抽出に使用する人体試料と溶媒の微量化が達成され、分析対象物質の回収率及び分離性が良く、定量性にも優れた、簡便で迅速性のあ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学実例において、その有用性を確認することができた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：

科研費の分科・細目：社会医学・法医学

キーワード：固相抽出, 固相抽出チップ, 薬毒物分析, GC法, GC/MS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、大麻、向精神薬、有機溶剤、農薬、自然毒等のように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、定量することが要求される法医学の領域

では、ガスクロマトグラフィー (GC)/質量分析 (MS)法、液体クロマトグラフィー/MS法等の高感度で特異性の高い検出法が利用されている。しかし、これら最新の分析機器を利用する現在であっても、目的の薬毒物を人体試料から分離する抽出操作は、試料の前処理法として欠くことのできな

いステップである。特に、人体試料に含まれる薬毒物が微量のときは試料中に共存する多くの成分によって本来の目的物質の検出が妨害されることがあり、クロマトグラフィー分析を精密に行う際には抽出操作が重要となる。しかも、それは目的物質のみが効率よく回収され、再現性良く、「迅速かつ簡便」に行われなければならない。

従来から人体試料中薬毒物の抽出法として、液-液抽出 (LLE) 法及び固相抽出 (SPE) 法が主に用いられている。LLE 法は有機溶媒を用いて目的物質を抽出する方法である。しかし、この方法は煩雑な操作が必要で、しかもエマルジョンが生じると液相同士が分離しにくくなり、不純物の混入や回収率の低下を引き起こす原因にもなる。また、ヘキササン、クロロホルム、エーテル、ジクロロメタン等の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 法は固相と呼ばれる充填剤へ分配あるいは吸着作用によって人体試料から目的物質を選択的に抽出する方法である。現在、逆相、順相、イオン交換及び吸着等の各種充填剤入りの SPE カートリッジが市販されており、多くの種類の薬毒物抽出に適用されている。SPE 法の利点は、LLE 法のようなエマルジョンの生成がないこと、LLE 法よりも簡便であること、真空吸引装置を利用することで短時間に多数のサンプルを処理できること等である。しかし、注射筒に SPE カートリッジを装着してマニュアルで操作を行う場合、コンディショニング、サンプル負荷、洗浄および溶出の操作毎にカートリッジから注射筒を外して次の溶媒を供給する煩雑性があるほか、溶出液 (メタノール、酢酸エチル等の有機溶媒) の蒸発乾固に時間がかかること、真空吸引装置を用いても溶媒の吸引スピードが個々のカートリッジ毎に異なることがあり抽出にバラツキが生じること等、種々の欠点が残されている。また、SPE 法では使用する有機溶媒が LLE 法より少ないものの数 mL から数十 mL 必要であることから、さらなる微量化が可能な SPE 法の開発が薬毒物分析の分野では望まれている。

## 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。この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<sub>18</sub>、C<sub>8</sub>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 μg~10mg) 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。①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。②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。③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。④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①) から溶出 (操作④) 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。そこで本研究では法医学上問題となる薬毒物である覚せい剤、麻薬、向精神薬及び農薬について、人体試料からのSPEチップを用いた抽出法とGC/MS法による検出法を組み合わせた新しい薬毒物分析法を開発し、法医実際例に応用できる分析システムの構築を目的とする。

## 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 (コデイン、ジヒドロコデイン)、向精神薬 (三環系、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) 及び農薬 (有機リン系、カーバメート系) を用いた。

(2) 人体試料は健常人ボランティアから、あるいは司法解剖で得られた全血、血漿及び尿を用いた。

(3) SPEチップによる抽出法ではマイクロピペッター (200  $\mu$ Lサイズ) を用いた吸引と吐出の操作を全過程で行った。すなわち、①SPEチップのコンディショニング、②抽出、③SPEチップの洗浄、④SPEチップの乾燥、⑤溶出の順序である。

(4) 得られた溶出液 (有機溶媒の溶出液) の2  $\mu$ Lは直接にGC/MSあるいはGCに注入した。また、誘導体化を行う場合は溶出液を一旦窒素気流下で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、bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA) は麻薬、N-methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamide (MSTFA) はブチロフェノン系向精神薬の誘導体化剤として使用された。

(5) 分析対象の覚せい剤、麻薬、向精神薬及びカーバメート系農薬の検出にはGC/MS法を、有機リン系農薬の検出にはGC法 (水素炎イオン化検出、FID) を使用した。GC/MS法の場合は陽イオンスクリーンモードにてスペクトルを測定し、得られたマススペクトルの解析をまとめてライブラリーを作成した。このライブラリーを基に、定量では対象の薬物および農薬に最適なイオンを選択した選択イオン検出 (SIM) 法を用いた。

(6) 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

(1) SPEチップによる抽出操作の基本型

①SPEチップのコンディショニング (メタノール200  $\mu$ Lと蒸留水200  $\mu$ Lを各々2回の吸引・吐出)、②抽出 (試料液200  $\mu$ Lを複数回吸引・吐出)、③SPEチップの洗浄 (蒸留水200  $\mu$ Lを1回の吸引・吐出)、④SPEチップの乾燥 (バックエルトを用いて3分間)、⑤溶出 (メタノール100  $\mu$ Lで5回の吸引・吐出) の順序と操作内容を確認した。この中で特に操作②「抽出」のステップにおいて目的物質のSPEチップへの保持が最大になる試料液の調整及び吸引・吐出の回数を検討し、

各薬毒物について以下のような結果を得た。

(2) 覚せい剤 (メタンフェタミン、アンフェタミン)

全血0.1mLに5M水酸化ナトリウム水溶液50  $\mu$ L、蒸留水0.4mLを混和して、15,000xgで10分間の遠心後、上清を25回の吸引・吐出を行った。尿では0.5mLを試料として1M水酸化ナトリウム水溶液25  $\mu$ Lを混和して全血と同じ操作を行った。なお、メタノール溶出液は蒸発乾固後TFAによる誘導体化を施し、DB-5MSキャピラリーカラム (長さ30m、内径0.32mm、膜厚0.25  $\mu$ m) を用いたSIM法により定量を行った。回収率は85~92%、LODは全血で0.11~0.15 ng/0.1 mL、尿で0.04~0.05 ng/0.1 mL、LOQは全血で0.5 ng/0.1 mL、尿で0.3 ng/0.1 mLであった。再現性はCV値が6.7~11.2%であった。また、本法を覚せい剤中毒者の司法解剖で得られた全血及び尿に応用したところメタンフェタミン及びアンフェタミンの検出が可能であった。

(3) 麻薬 (コデイン、ジヒドロコデイン)

血漿0.1mLに0.04M炭酸水素アンモニウム水溶液 (pH 9.3) 0.1mL、蒸留水0.3mLを混和して、15,000xgで10分間の遠心後、上清を20回の吸引・吐出によって抽出を行った。メタノール溶出液は蒸発乾固後BSTFAによる誘導体化を施し、Equity-5キャピラリーカラム (長さ30m、内径0.32mm、膜厚0.25  $\mu$ m) を用いたSIM法により定量を行った。回収率は80~85%、LODは0.5 ng/0.1 mL、LOQは2 ng/0.1 mLであった。再現性はCV値が10.6~13.8%であった。

(4) 向精神薬

①三環系薬物 (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)

血漿0.1mLに1M水酸化ナトリウム水溶液0.1mL、蒸留水0.4mLを混和して、15,000xgで10分間の遠心後、上清を20回の吸引・吐出によって抽出を行った。GC/MS検出ではDB-5MSキャピラリーカラム (長さ30m、内径0.32mm、膜厚0.25  $\mu$ m) を使用し、SIM法により定量を行った。回収率は84~90%、LODは0.05~0.2 ng/0.1 mL、LOQは0.2~0.5 ng/0.1 mL、再現性はCV値が6.2~8.6%であった。また、アモキサピン経口投与後のヒト血漿から本法を応用することで実際に薬物を検出することができた。

②フェノチアジン系薬物 (トリフルプロマジ

ン、トリメブラジン、プロマジン、クロロプロマジン、レボメプロマジン)

血漿 0.1mL に 0.1M 水酸化ナトリウム水溶液 0.1mL、蒸留水 0.4mL を混和して、15,000xg で 10 分間の遠心後、上清を 25 回の吸引・吐出によって抽出を行った。GC/MS 検出では Equity-5 キャピラリーカラム(長さ 30m、内径 0.32mm、膜厚 0.25 $\mu$ m) を使用し、SIM 法により定量を行った。回収率は 86~93%、LOD は 0.5~1.3 ng/0.1 mL、LOQ は 1.5~5.3 ng/0.1 mL、再現性は CV 値が 9.1~14.8% であった。また、レボメプロマジン経口投与後のヒト血漿から本法を応用して実際に薬物を検出することができた。

③ ブチロフェノン系薬物 (ハロペリドール)

血漿 0.1mL に 0.25M リン酸緩衝液 (pH 6) 0.1mL、蒸留水 0.3mL を混和して、15,000xg で 10 分間の遠心後、上清を 20 回の吸引・吐出によって抽出を行った。なお、メタノール溶出液は蒸発乾固後、MSTFA による誘導体化を施し、SPB-1 キャピラリーカラム (長さ 30m、内径 0.32mm、膜厚 0.25 $\mu$ m) を用いた SIM 法により定量を行った。回収率は 81~99%、LOD は 0.06~2.6 ng/0.1 mL、LOQ は 1.5 ng/0.1 mL であった。また、再現性は CV 値が 6.9~14.6% であった。

④ ベンゾジアゼピン系薬物 (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)

血漿 0.1mL に 0.5M リン酸緩衝液 (pH 8) 0.05mL、蒸留水 0.35mL を混和して、15,000xg で 10 分間の遠心後、上清を 20 回の吸引・吐出によって抽出を行った。GC/MS 検出では DB-5MS キャピラリーカラム (長さ 30m、内径 0.32mm、膜厚 0.25 $\mu$ m) を使用し、SIM 法により定量を行った。回収率は 84~90%、LOD は 0.05~0.2 ng/0.1 mL、LOQ は 0.2~1.1 ng/0.1 mL、再現性は CV 値が 3.3~12.1% であった。また、ジアゼパム経口投与後のヒト血漿から本法を応用して実際に薬物を検出することができた。

(5) 農薬

① 有機リン系農薬 (MEP、EPN、IBP、イソキサチオン、エチオン)

血漿及び尿 0.1mL に 1M クエン酸緩衝液 (pH 5) 0.05mL、蒸留水 0.35mL を混和して、15,000xg で 10 分間の遠心後、上清を 15 回の吸引・吐出によって抽出を行った。GC-FID 検出では DB-1 キャピラリーカラム

(長さ 30m、内径 0.32mm、膜厚 0.25 $\mu$ m) を使用した。回収率は 86~99%、LOD は 0.02~0.05 ng/0.1 mL、LOQ は MEP、IBP 及びエチオンが 0.2 ng/0.1 mL、EPN 及びイソキサチオンが 0.02 ng/0.1 mL であった。また、再現性は CV 値が 3.5~9.9% であった。

② カルバメート系農薬 (BPMC、MIPC、MPMC、MTMC、NAC、XMC、カルボフラン、メソミル)

血漿及び尿 0.1mL に蒸留水 0.4mL を混和して、15,000xg で 10 分間の遠心後、上清を 20 回の吸引・吐出によって抽出を行った。GC/MS 検出では DB-5MS キャピラリーカラム (長さ 30m、内径 0.32mm、膜厚 0.25 $\mu$ m) を使用し、SIM 法により定量を行った。回収率は 69~91%、LOD は 0.8~2.1 ng/0.1 mL、LOQ は 2.2~6.4 ng/0.1 mL、再現性は CV 値が 3.1~15.3% であった。

(6) 研究の総括

本研究では SPE チップを用いた GC 及び GC/MS システムによるヒト体液試料中薬毒物分析法の詳細を設定することができた。その結果、本システムは臨床レベル及び中毒レベルの濃度の薬毒物検査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

(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 9 件)

① Kumazawa T., Saeki, K., Yanagisawa I., Uchigasaki S., Hasegawa C., Seno H., Suzuki O., Sato K.: Automated on-line in-tube solid-phase microextraction coupled with HPLC/MS/MS for the determination of butyrophenone derivatives in human plasma. Anal. Biochem. Chem. 印刷中 (2009) 査読有

② Arinobu T., Hattori H., Kumazawa T., Lee X.-P., Mizutani Y., Katase T., Kojima S., Omori T., Kaneko R., Ishii A., Seno H.: High-throughput determination of theophylline and caffeine in human serum by conventional liquid chromatography-mass spectrometry. Forensic Toxicol., 27, 1-6 (2009) 査読有

③ Shinmen N., Lee X.-P., Kumazawa T., Hasegawa C., Ishiwata Y., Sato K., Seno H., Suzuki O.: Simultaneous

- determination of some phenothiazine derivatives in human blood by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection. *J. AOAC Int.*, 91, 1354-1362 (2008) 査読有
- ④ Marumo A., Kumazawa T., Lee X.-P., Hasegawa C., Suzuki O., Sato K.: Utility of disk solid-phase extraction for whole blood samples: analysis of some tetracyclic antidepressants by gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection. *Forensic Toxicol.*, 26, 16-18 (2008) 査読有
- ⑤ Umezawa H., Lee X.-P., Arima Y., Hasegawa C., Marumo A., Kumazawa T., Sato K.: Determination of diazepam and its metabolites in human urine by liquid chromatography/tandem mass spectrometry using a hydrophilic polymer column. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 22, 2333-2341 (2008) 査読有
- ⑥ Lee X.-P., Hasegawa C., Kumazawa T., Shinmen N., Shoji U., Seno H., Sato K.: Determination of tricyclic antidepressants in human plasma using pipette tip solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Sep. Sci.*, 31, 2265-2271 (2008) 査読有
- ⑦ Hasegawa C., Kumazawa T., Lee X.-P., Shinmen N., Marumo A., Seno H., Sato K.: Pipette tip solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry for the determination of methamphetamine and amphetamine in human whole blood. *Anal. Bioanal. Chem.*, 389, 563-570 (2007) 査読有
- ⑧ Aoki R., Arinobu T., Kumazawa T., Hattori H., Noguchi H.: An automated on-line method for simultaneous analysis of phenothiazines in human serum by high-performance liquid chromatography/sonic spray ionization mass spectrometry using backflash column switching. *Forensic Toxicol.*, 25, 8-15 (2007) 査読有
- ⑨ Kumazawa T., Hasegawa C., Lee X.-P., Hara K., Seno H., Suzuki O., Sato K.: Simultaneous determination of methamphetamine and amphetamine in human urine using pipette tip solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 44, 602-607 (2007) 査読有
- [学会発表] (計 10 件)
- ① 長谷川 智華, 熊澤 武志, 佐藤 啓造: 生体試料中薬毒物のGC/MS分析における固相抽出チップの開発と応用. 第 33 回日本医用マスペクトル学会年会, 2008/9/26, 東京.
- ② 李 曉鵬, 熊澤 武志, 佐藤 啓造: ダイレクト注入HPLC-MS/MS法の生体試料中薬物及び代謝物分析への応用. 第 33 回日本医用マスペクトル学会年会, 2008/9/26, 東京.
- ③ 熊澤 武志: 新規固相抽出技術の法中毒学的応用に関する研究. 日本法中毒学会第 27 年会, 2008/6/1, 東京.
- ④ 梅澤 宏亘, 李 曉鵬, 有馬 由子, 長谷川 智華, 丸茂 明美, 熊澤 武志, 佐藤 啓造: HPLC-MS/MSによる尿中ジアゼパム及び関連代謝物の簡易分析法. 第 92 次日本法医学会総会, 2008/4/2, 長崎.
- ⑤ 梅澤 宏亘, 李 曉鵬, 熊澤 武志, 有馬 由子, 丸茂 明美, 長谷川 智華, 新免 奈津子, 妹尾 洋, 佐藤 啓造: 直接注入HPLC/MS/MSによるヒト血漿中β遮断薬の簡易分析法. 第 91 次日本法医学会総会, 2007/5/18, 秋田.
- ⑥ 梅澤 宏亘, 有馬 由子, 李 曉鵬, 熊澤 武志, 佐藤 啓造: 直接注入HPLC-MS/MS法による尿中ジアゼパムおよび代謝物の一斉分析. 第 76 回日本法医学会関東地方会, 2007/10/20, 横浜.
- ⑦ 熊澤 武志, 李 曉鵬, 佐藤 啓造, 鈴木 修: オンライン/オフライン試料前処理法とLC/MS/MS法による生体試料中の薬毒物分析. 第 32 回日本医用マスペクトル学会年会, 2007/9/28, 京都.
- ⑧ Arinobu T., Aoki R., Kumazawa T., Lee X.-P., Ishii A., Kaneko R., Kojima S., Noguchi H., Suzuki O., Hattori H., Seno H.: Determination of phenothiazines in human serum by HPLC/SSI-MS using backflush column-switching. 12th International meeting on recent developments in pharmaceutical analysis, 2007/9/23-26, 2007, Elba, Italy.
- ⑨ Marumo A., Kumazawa T., Lee X.-P., Hasegawa C., Suzuki O., Sato K.: Analysis of psychotropic drugs in human body fluids using disk solid-phase extraction. T-2007-A Joint Meeting of The International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT) and the International Council on Alcohol, Drugs and Traffic Safety (ICADTS), and

featuring the 2008, 8th Ignition Interlock Symposium (IIS), 2007/8/26~30, Seattle, USA.

- ⑩ 熊澤 武志, 長谷川 智華, 李 曉鵬, 宮崎 将太, 原 健二, 妹尾 洋, 鈴木 修, 佐藤 啓造: 固相抽出チップを用いた尿中覚せい剤の分析. 日本法中毒学会第 26 年会, 2007/6/8, 宮崎.

(3) 連携研究者

[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]

- ① 日本法中毒学会吉村賞 (学術奨励賞) 受賞  
受賞題目: 新規固相抽出技術の法中毒学的応用に関する研究  
日本法中毒学会第 27 年会, 2008/6/1, 東京.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

熊澤 武志 (KUMAZAWA TAKESHI)

昭和大学・医学部・教授

研究者番: 00186470

### (2) 研究分担者