

機関番号：13802

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390194

研究課題名 (和文) 違法ドラッグの新分析法の開発：超高速型 HPLC と TOF-MS との結合

研究課題名 (英文) DEVELOPMENT OF NEW METHODS FOR ANALYSIS OF ILLICIT DRUGS: COMBINATION OF UPLC AND TOF-MS

研究代表者

鈴木 修 (SUZUKI OSAMU)

浜松医科大学・医学部・理事

研究者番号：70093044

研究成果の概要 (和文)：既設の飛行時間型質量分析 (TOF-MS) 装置に、今回の科学研究費で購入した超高速型液体クロマトグラフ (UPLC) を結合させ、薬毒物検出装置としての長所・短所を検証した。最初 TOF-MS 装置と UPLC 装置のメーカーが異なるため、オンラインで制御する工夫が必要であったが、克服した。次にきのこ毒である α -アマニチン、 β -アマニチンならびにファロイジンの同定・定量法を確立し、一定の成果を得ることができた。最後に、6 種類のトリプタミン系違法ドラッグについて、single-stage TOF-MS とタンデム quadrupole-TOF-MS でのマススペクトルの測定を行った。その結果、single-stage-TOF-MS によって得られるプロトン付加分子イオンのアイソトープマススペクトルパターンが各物質の同定に利用できることが判明した。さらにタンデム方式においても CID 電圧を調節することにより、100Da 以上のプロダクトイオンが出現し、特異性の高い定量も可能であることも判明した。

研究成果の概要 (英文)：To an already introduced time-of-flight (TOF)-mass spectrometer, a new ultra-power liquid chromatography (UPLC), which was bought by the present grant, has been connected to create a powerful system for analysis of drugs and poisons. To realize such an on-line connection, various problems appeared; these problems have been overcome. As the first analytical experiments, we used amatoxins and phalloidin, typical mushroom toxins. These toxins were found to be identified and quantitated in the UPLC-single-stage TOF-MS mode. As the second group of target compounds, we analyzed six tryptamine-type designer drugs in the single-stage TOF-MS mode. Each compound also gave protonated molecular isotopic peaks and their pattern was usable for identification of each compound. Moreover, even in the tandem quadrupole-TOF-MS mode, good product ions usable for specific quantitation of each designer drug could be obtained, depending on voltages for collision induced dissociation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	12,800,000	3,840,000	16,640,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

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：違法ドラッグ、薬毒物分析、超高速型液体クロマトグラフィー、法中毒学、社会医学、法医学、安全、安心

1. 研究開始当初の背景

(1) 飛行時間型 (TOF) 質量分析計 (MS) の進化

TOF-MSが開発されたのは、磁場型MSと殆ど変わらないくらいに古い。当初は感度も、分解能も磁場型MSに比べてかなり劣っていたが、この10~20年間の間のTOF-MSの進化は目を見張るものがある。今や、感度、価格、分解能すべての面で磁場型MSを凌駕している。この様な状況の中で、法中毒学分野においてもTOF-MSの有用性は高まるばかりと思われる。

(2) 新しい違法ドラッグ類の出現

規制薬物の定義は、その構造式によって決められている。そのため、その一部を修飾すれば規制薬物の範疇からはずれる。各種薬物取締法から逃れるため、次から次と新しい誘導体が合成され、怪しげなインターネットウェブサイトで販売されている。それらの多くは、健康を害するもの、依存性を有するものも多数あり、規制薬物ではないが、それらを摂取することは薬事法上では違法となる。最近、これらの多くの違法ドラッグ類を乱用する若者が多くなり、日本でも一種の社会問題となりつつある。

以上の様な背景の許、本研究が企画立案された。

2. 研究の目的

(1) TOF-MSとUPLCとのon-line結合の立ち上げ

既設のTOF-MS(-MS)装置と今回科研費で導入したUPLCとはメーカーが異なり、そのままon-lineで稼働させることができない。オートサンプラーを含め、コンピュータ制御ですべての機械操作を自動的に行う必要がある。これにより、無人運転が可能となり、夜間を通して分析ができ、それだけ多くの検体を処理できる。今回の研究の最初の目的はオートサンプラーから最後のデータ解析まですべて一貫した自動システムを構築することにある。

(2) UPLC-TOF-MS(-MS)分析のメリットとデメリット

現在までにTOF-MS法による薬毒物分析研究データはごく少ない。それは、TOF-MSの進歩が、この10年間に特に著しかったため、古いタイプのTOF-MS装置は、重視に値するものでなかったからである。

今回の研究は、UPLC-TOF-MS(-MS)法が法中毒学の中でどれ程のメリットとデメリットを有するものかを検証する先駆的な研究と考えられる。

(3) きのご毒ならびに違法ドラッグ類のUPLC-TOF-MS(-MS)による分析研究開発

まず分析対象として、最も毒性の強いきのこであるドクツルタケの成分である α -アマニチン、 β -アマニチン、ファロイジンについてUPLC-TOF-MS分析法の確立を目差した。これらの毒素は7~8個のペプチドで構成され、しかも環状という特殊な形状を持ち、分析には各ステップでかなりの工夫を要するものである。分子量も700~900とやや大きな分子である。

次に着目した物質は、いわゆる「違法ドラッグ」といわれているもので、現在16種類の純品物質を入手しているが、今回は報告の少ないトリプタミン系違法ドラッグ6種類に的を絞り、それぞれの化合物について、single-stage TOF-MSとタンデムquadrupole-TOF-MS方式でのマスペクトル測定を行い、それぞれのメリットとデメリットに関して検証を行うのが目的である。

3. 研究の方法

(1) 生物試料からの目的物質の抽出法の検討

ヒト各試料や、きのこ自体などから目的物質をかなり精製する必要がある。液-液抽出法、固相抽出法などを試し、回収率が良好で、しかも不純物の少ない前処理方法を検討・確立する。

(2) 液体クロマトグラフィーカラムの選定

検出目的物質が複数存在する場合には相互に良好に分離し、しかも、不純物による妨害もない最適なカラムを選定し、移動相の構成やグラジエント溶出方式の必要性などの詳細を設定しなくてはならない。

(3) 回収率、定量性、再現性などの検討

目的物質、マトリックス、検出法などが異なれば、各目的物質の定量法を確立するために、すべて改めて最初から、各定量法の信頼性を検証する必要がある。それぞれの定量法を確立するには大変な労力が必要となる。

4. 研究成果

(1) UPLCとTOF-MSとの結合のメリットとデメリット

前述のごとく、既設のTOF-MS(-MS)装置に、今回の科学研究費で購入したUPLC(オートサンプラーを含む)を結合させることに成功した。すなわち、ChemStationの制御システムを導入することによって、すべての操作を自動化にすることができた。

その上でまず手始めとして、きのこ毒である α -アマニチン、 β -アマニチンならびにファロイジンを用いて、本法のメリットとデメリットを検証することができた。まずメリッ

トとしては、TOF-MS は分解能 10,000～12,000 と高く、UPLC-single-stage TOF-MS で得られるプロトン付加分子イオン部分の横軸を拡大すると、炭素原子のアイソトープピークによるプロトン付加分子の同位体ピークが 4 本出現し、それぞれの精密質量数とピーク強度が一定の条件下では一定のパターンを示す。このパターンを、single-stage MS にもかかわらず、各物質固有のマススペクトルとして利用できることが判明した。

デメリットとしては、意外と検出感度が低く、検出限界は、 α -アマニチン、 β -アマニチン、ファロイジンでそれぞれ、30、30、ならびに 10 ng/g と最新鋭の UPLC-TOF-MS 装置としては低感度であった。

(2) 違法ドラッグ類の UPLC-TOF-MS による分析開発研究

6 種類のトリプタミン系違法ドラッグについて、single-stage TOF-MS とタンデム quadrupole-TOF-MS によるマススペクトル測定を行った。対象薬物は 4-OH-DIPT, 5-MeO-AMT, 5-MeO-DALT, 5-MeO-DET, 5-MeO-DPT ならびに 5-MeO-MIPT である。single-stage TOF-MS のプロトン付加分子イオンでは 5-MeO-AMT で 2 本、その他の 5 種類の物質では 3 本のアイソトープピークが出現し、理論値との誤差はいずれも 5 mDa 以下であった。

このことから、これらのトリプタミン系違法ドラッグについても、プロトン付加分子イオン部分のアイソトープマススペクトルパターンが各物質の同定にも利用できることが判明した。

タンデム quadrupole-TOF-MS でのマススペクトルでは、CID 電圧の違いで、プロダクトイオンパターンは変化するものの、定量に利用できる 100 Da 以上のプロダクトイオンが出現し、特異性の高い定量を実現できる可能性を示した。

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 16 件)

- ① K. Watanabe, H. Fujita, K. Hasegawa, K. Gonmori, O. Suzuki, GC/MS with post-column switching for large volume injection of headspace samples: sensitive determination of volatile organic compounds in human whole blood and urine. Anal. Chem. 査読有, 83(2011), 1475-1479
- ② S. Kanno, K. Watanabe, I. Yamagishi, S. Hirano, K. Minakata, K. Gonmori, O. Suzuki, Simultaneous analysis of

cardiac glycosides in blood and urine by thermoresponsive LC-MS-MS. Anal. Bioanal. Chem. 査読有, 399(2011), 1141-1149

- ③ W.H.A. Ahmed, K. Gonmori, M. Suzuki, K. Watanabe, O. Suzuki, Simultaneous analysis of α -amanitin, β -amanitin, and phalloidin in toxic mushrooms by liquid chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry. Forensic Toxicol. 査読有, 28(2010), 69-76
- ④ K. Minakata, I. Yamagishi, S. Kanno, H. Nozawa, M. Suzuki, O. Suzuki, Determination of iodide in urine using electrospray ionization tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. B 査読有, 878(2010), 1683-1686
- ⑤ K. Minakata, K. Ohnishi, S. Nakamura, M. Suzuki, O. Suzuki, Electrospray ionization tandem mass spectrometric determination of monomethylarsonic acid and dimethylarsinic acid after adduct formation with citric acid. J. Chromatogr. B 査読有, 877 (2009), 2624-2629
- ⑥ K. Minakata, H. Nozawa, K. Gonmori, M. Suzuki, O. Suzuki, Determination of cyanide, in urine and gastric content, by electrospray ionization tandem mass spectrometry after direct flow injection of dicyanogold. Anal. Chim. Acta 査読有, 651 (2009), 81-84
- ⑦ K. Watanabe, K. Hasegawa, I. Yamagishi, H. Nozawa, M. Takaba, O. Suzuki, Simple isotope dilution headspace-GC-MS analysis of naphthalene and *p*-dichlorobenzene in whole blood and urine, Anal. Sci. 査読有, 25 (2009), 1301-1305

[学会発表] (計 25 件)

- ① K. Gonmori, Simultaneous analysis of α -amanitin, β -amanitin, and phalloidin in toxic mushrooms by liquid chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry, The 48th Annual Meeting of the International Association of Forensic Toxicologists, 1 September 2010, Bonn, Germany
- ② K. Minakata, Electrospray ionization tandem mass spectrometric determination of monomethylarsonic acid and dimethylarsinic acid after adduct formation with citric acid, The 48th Annual Meeting of the

International Association of Forensic Toxicologists, 31 August 2010, Bonn, Germany

- ③ K. Minakata, Simple and sensitive determination of arsenite and arsenate by electrospray ionization mass spectrometry. The 47th Annual Meeting of the International Association of Forensic Toxicologists, September 2009, Geneva, Switzerland

[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]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 修 (SUZUKI OSAMU)

浜松医科大学・医学部・理事

研究者番号：70093044

(2) 研究分担者

権守 邦夫 (GONMORI KUNIO)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：10006744

南方 かよ子 (MINAKATA KAYOKO)

浜松医科大学・医学部・特任研究員

研究者番号：70115509

渡部 加奈子 (WATANABE KANAKO)

浜松医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70288546

長谷川 弘太郎 (HASEGAWA KOUTAROU)

浜松医科大学・医学部・リサーチアシスタント

研究者番号：40574025

菅野 さな枝 (KANNO SANAE)

浜松医科大学・医学部・特任研究員

研究者番号：50391090

鈴木 真一 (SUZUKI SHINICHI)

科学警察研究所・法科学第三部・室長

研究者番号：00356198