

令和 5 年 4 月 21 日現在

機関番号：99999

研究種目：奨励研究

研究期間：2022～2022

課題番号：22H04404

研究課題名 幅広い薬物種を一斉に抽出可能な全自動QuEChERS法の開発

研究代表者

石丸 麗子 (Ishimaru, Reiko)

石川県警察本部科学捜査研究所・主任研究員

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 360,000円

研究成果の概要：本研究では、アセトニトリル塩析支援液々抽出法（抽出法1）およびそれに続く分散固相抽出法（抽出法2）に基づく2つの全自動QuEChERS法を開発し、各種向精神薬（ベンゾジアゼピン系薬物11種、カルバマゼピン、クエチアピン、ソルピデムの計14種）の全血試料からの抽出に応用した。液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析を用いたバリデーション試験の結果、検量線は高い直線性を示し、pptレベルの高い検出感度、良好な精度・真度・マトリックス効果を有することがわかった。抽出法1は抽出法2と比べて高い回収率を示す一方、抽出法2は分散固相抽出のクリーンアップ効果により抽出法1よりも高い検出感度を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で確立した抽出法は、血液試料をセットするだけで迅速・簡便に機器分析用試料を自動調製でき、煩雑な前処理工程の減少によるラボ担当者の省力化や大幅な作業時間の短縮が可能となる。抽出操作の経験が不要であり、試料の取違いやサンプリングミスなどのヒューマンエラーも回避できるため、良好な試料調製が担保できる。加えて、使用する試薬や溶媒の少量化も期待でき、生体試料や試薬・溶媒の飛散流出防止による作業環境の維持保全にも貢献できる。

研究分野：法薬毒物学

キーワード：QuEChERS 全自動前処理 塩析支援液々抽出 分散固相抽出 向精神薬 ベンゾジアゼピン 液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析 全血

1. 研究の目的

多剤服用による中毒・死亡事案や危険運転事案の警察捜査における薬物鑑定では、血液試料からすべての摂取薬物を抽出し検出することが求められる。残留農薬分析の前処理法として開発された QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe) 法は、法科学・法中毒分野においても有用な前処理法であり、幅広い薬物種を同時に抽出可能な方法である。しかしながら、手動での操作が幾分煩雑であり、特に多検体処理には多くの労力や時間を要するデメリットが存在する。また近年では感染症予防の観点から、感染リスクのある生体試料の取扱いもこれまで以上に慎重を期すことが求められている。

そこで本研究では、QuEChERS 法の省力化や省時間化、試料飛散防止の実現を目的として、既存の自動前処理装置を用い、抽出のシーケンスプログラムを改変することで、血液試料をセットするだけの迅速・簡便な全自動 QuEChERS 法に構築することを試みた。これまでの中毒事件の発生状況や処方薬事情を考慮し、分析対象薬物としてベンゾジアゼピン系薬物 11 種 (アルプラゾラム, プロマゼパム, プロチゾラム, クロナゼパム, ジアゼパム, エチゾラム, フルニトラゼパム, フララゼパム, ニメタゼパム, ニトラゼパム, トリアゾラム), カルバマゼピン, クエチアピン, ゴルピデムの向精神薬計 14 種を選定し、これらをブランク全血にスパイクして調製した全血試料を本法に適用した。

2. 研究成果

(1) 結果および考察

① 自動抽出条件の最適化

アセトニトリル塩析支援液々抽出法 (抽出法 1) およびそれに続く分散固相抽出 (dSPE) 法 (抽出法 2) に基づく 2 つの QuEChERS 法について、島津トラステック製 ATLAS-LEXT を用いて、エマルジョン生成を抑え高効率な抽出を達成できる抽出条件を最適化し、全自動化することに成功した (図 1)。

多検体分析による分析機器への負荷も考慮し、自動前処理後に Mini-UniPrep (一般的なオートサンプラーに適合するフィルター一体型プランジャーとチャンバーから成るバイアル型ろ過デバイス) によるろ過ステップを加えることとした。分析対象薬物 (メタノール溶液, 各 50 ng/mL) の膜透過率は 97%–103% であり、Mini-UniPrep ポリプロピレン膜への吸着損失はほぼ無いと判断された。

② 分析法バリデーション

定量分析には液体クロマトグラフィータンデム質量分析 (LC-MS/MS) を採用し、分析モードには優れた感度と定量性を両立できる dynamic multiple reaction monitoring (dMRM) 法を適用した。図 2 に全血試料から抽出した各分析対象薬物の dMRM クロマトグラムを示す。

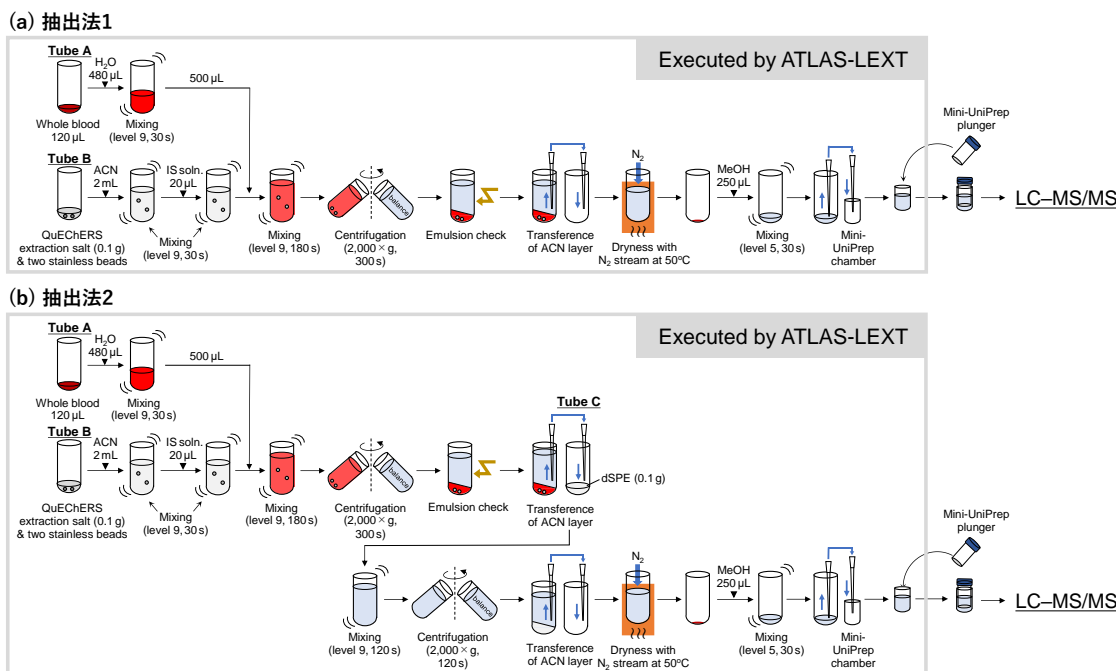


図 1. (a) 抽出法 1 と (b) 抽出法 2 による全自動 QuEChERS 法のワークフロー

抽出法 1 において、検量線 (1–200 ng/mL) は相関係数 (r) 0.9999 以上の高い直線性を示し、検出限界 (LOD) は、ベンゾジアゼピン系薬物で 0.052–0.47 ng/mL、カルバマゼピンで 0.048 ng/mL、クエチアピンで 0.025 ng/mL、ゾルピデムで 0.032 ng/mL であった。各濃度 (10, 50, 200 ng/mL) の quality control (QC) 試料を用いて算出された定量精度は相対標準偏差 (RSD) 8.6% 以下、真度は相対誤差 $\pm 12.7\%$ 以内、回収率は 80%–91%、マトリックス効果は 81%–110% であった。

抽出法 2 においても、検量線 (1–200 ng/mL) は高い直線性 ($r = 0.9997$ – 0.9999) を示し、LOD はベンゾジアゼピン系薬物で 0.005–0.094 ng/mL、カルバマゼピンで 0.010 ng/mL、クエチアピンで 0.003 ng/mL、ゾルピデムで 0.003 ng/mL であった。定量精度は 8.1% RSD 以下、真度は $\pm 16.0\%$ RE 以内、回収率は 72%–86%、マトリックス効果は 94%–111% であった。

抽出法 1 と 2 は、ともに優れた直線性、ppt レベルでの高い検出感度、良好な精度・真度・マトリックス効果、マニュアル法と同程度の回収率を有していた。抽出法 1 の回収率は、抽出法 2 よりも 0.1%–16% 高く、抽出法 2 の LOD は抽出法 1 より 0.02–0.42 ng/mL 低かった (検出感度として 3.8–13 倍高かった)。これは、dSPE によるマトリックス除去ステップが回収率と検出感度にトレードオフの関係 (回収率を低減させる一方、S/N 比の改善により検出感度が向上) を与えたものと考えられる。

③ 高濃度試料の取扱い

dMRM の最適濃度範囲に応じて検量線範囲を 1–200 ng/mL と設定したが、本範囲は、ヒト血液において治療域～中毒域濃度までしかカバーできていない。致死域のような高濃度試料も適用するには、検量線範囲内に収まるよう、あらかじめ試料を希釈する必要がある。各分析対象薬物の濃度が 20 $\mu\text{g/mL}$ の全血試料を蒸留水で段階希釈して 100 ng/mL としたものを抽出法 1 および 2 に適用し、定量真度を算出したところ、抽出法 1 で $\pm 18.8\%$ RE 以内、抽出法 2 で $\pm 19.5\%$ RE 以内であり、上記②のバリデーション試験で得られた定量真度と同等あるいは数%低い程度の結果であった。したがって、両抽出法ともあらかじめ希釈ステップを加えれば、高濃度の血液試料にも適用可能であると判断された。

④ クロスコンタミネーションとキャリアオーバー

各分析対象薬物を 20 $\mu\text{g/mL}$ 含有する全血試料 5 本を両抽出法でそれぞれ連続処理し、その後、蒸留水 (ブランク試料) を前処理して得られた抽出試料を分析したところ、分析対象薬物の保持時間にピークは一切検出されず、ATLAS-LEXT の自動前処理におけるクロスコンタミネーションやキャリアオーバーは認められなかった。

また、全血試料からの抽出溶液 (各 1 $\mu\text{g/mL}$) 5 本を連続で分析し、直後にメタノールブランク溶液を分析したが、この場合でも分析対象薬物のピークは検出されず、LC-MS/MS におけるキャリアオーバーも生じないことが確認された。

(2) 結言

ATLAS-LEXT を用いた 2 種類の全自動 QuEChERS 法の開発に成功し、全血試料から 14 種類の向精神薬を良好に抽出できることを明らかにした。本法は、手間のかかる前処理工程の減少によるラボ担当者の省力化や大幅な作業時間の短縮化できる、抽出操作の経験が不要、試料の取違えやサンプリングミスなどのヒューマンエラーを最小化できる、使用する試薬や溶媒を少量化できる、生体試料や試薬・溶媒の飛散流出が回避でき作業環境の維持保全に貢献できるなどの利点が挙げられる。

今後は、他の向精神薬や乱用薬物、農薬、それらの代謝物など多様な薬物種への適用範囲の拡大を試みている。さらに、多検体の迅速な処理に対応するため、シーケンスプログラムの改良により前処理時間のさらなる短縮化も検討予定である。

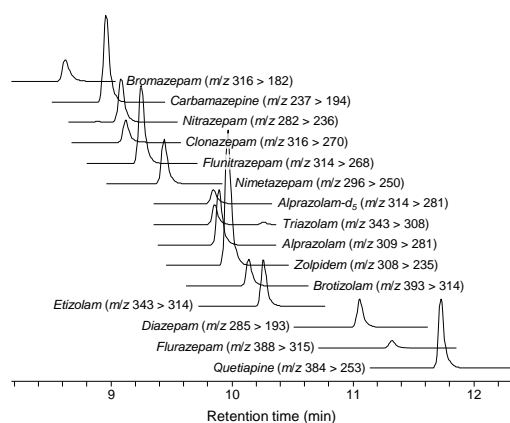


図 2. 全血試料から抽出した分析対象薬物 (各 80 ng/mL) の dMRM クロマトグラム

主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takaya Murakami, Reiko Ishimaru, Eriko Minami, Yoshiaki Iwamuro, Naoki Takamura, Aya Torai, Tsutomu Watanabe, Akihiro Miki, Munehiro Katagi, Maiko Kusano, Hitoshi Tsuchihashi, Kei Zaitso, Satoshi Chinaka	4. 巻 46
2. 論文標題 Development of two fully automated quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe pretreatment methods for the extraction of psychotropic drugs from whole blood samples	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Separation Science	6. 最初と最後の頁 2200681
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jssc.202200681	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

研究組織（研究協力者）

氏名	ローマ字氏名
村上 貴哉	(Murakami Takaya)