

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：37111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790647

研究課題名(和文)高温気化固相マイクロ抽出法の開発：血中薬物GC-MS分析の迅速化を目指して

研究課題名(英文)Development of a rapid GC-MS analysis method for drugs in blood using solid-phase microextraction and high temperature vaporization.

研究代表者

ウォータース ブライアン(WATERS, Brian)

福岡大学・医学部・助教

研究者番号：00609480

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：全血から乱用薬物を迅速かつ簡便に分析する方法を検討した。＜アソフェタミンとメソフェタミンの分析＞固相マイクロ抽出法(SPME)方法を採用し、血液量0.10gに水酸化ナトリウム(5N)0.1mlを添加することで良好に抽出できた。薬物を確実に気化するための最適な気化温度(ヘッドスペース温度)は約220℃であった。気相をSPMEファイバーに暴露する最適な吸着時間は、7分であった。＜バルビツレート、ベンゾジアゼピンの分析＞様々な条件下で実験を実施したが、これらの薬物は、かなり分子量が大きいことから、SPMEファイバーへ吸着が困難で、引き続き良好な分析条件を検討中である。

研究成果の概要(英文)：In this study, a rapid method for analyzing a number of drugs of abuse from whole blood was developed. The goal was to accomplish extraction of the compounds while avoiding harmful organic solvents and tedious solid-phase extraction media. Solid-phase microextraction (SPME) techniques were employed to accomplish this. Initially, the focus was on amphetamine and methamphetamine. Analysis was achieved with pre-treatment of 0.1 g of sample with 0.1 ml of a strong base (5N NaOH). It was also determined that heating the headspace to a temperature of 220°C was ideal for adsorption to the SPME fiber. Finally, the exposure time of the fiber to the heated headspace was examined. It was determined that exposure of the SPME fiber to the headspace for 7 minutes was ideal. These conditions were then used to analyze barbiturates and benzodiazepines in whole blood, however, analysis by SPME was problematic. Further study of SPME analysis of these classes of drugs in whole blood is necessary.

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：乱用薬物 覚せい剤 バルビツレート ベンゾジアゼピン ヘッドスペース 固相マイクロ抽出 ガスクロマトグラフィー

## 1. 研究開始当初の背景

法医剖検診断において、薬物スクリーニング検査は、生前使用した薬物を明確にすることで、死因ばかりでなく、死者の生前の嗜好、健康状況などの情報を得ることができる重要な検査である。薬物スクリーニング検査においては、より多くの種類の薬物を検出することが重要である。そのために、試料処理、分析に多くの労力と時間がかかっているのが現状である。薬物スクリーニング検査に関する国内外の研究においては、様々な方法による省力化、効率化、迅速化の研究が試みられている。しかし、多くの研究は液液抽出、固相抽出の従来法の変法、自動化であり、本質的には、僅かな効率化に留まっている。

本研究では、固相マイクロ抽出法をもとに、試料を高温加熱し、薬物を気化拡散させ抽出するという従来の一連の分析方法を劇的に変える画期的な方法である。これまで、気化平衡-固相マイクロ抽出法というものがあったが、加熱の温度は水の沸点以下であり、本研究の手法とは大きく異なる。そこで固相マイクロ抽出の抽出効率に興味をもち、試料を高熱で加熱して薬物を抽出することで、有機溶媒、濃縮を必要としない、迅速抽出が可能でないかと思い、本研究の着想に至った。

本研究は、これまで述べたように、新しい迅速分析を可能とする画期的な抽出概念を実現するものであり、剖検試料から広範な薬物情報を提供できる分析方法を提案するという点で、国内外の薬毒物スクリーニング検査に関する研究の中では特異かつ、ユニークな研究と言える。

## 2. 研究の目的

法医剖検診断において、薬物の影響の有無を明らかにするために、薬物スクリーニング検査が行われる。日本では LC-MS/MS (液体クロマトグラフィータンデム質量分析法)、GC-MS (ガスクロマトグラフィー質量分析

法)等の機器分析による医薬品、農薬、乱用薬物などの広範囲な薬物スクリーニングの開発が盛んに行われている。良好な分析結果を得るためには試料処理が重要であり、現在は、主に液液抽出、固相抽出の2種の方法が使われている。これらの試料処理方法は、操作に少なくとも1~2時間を要し、有機溶媒、抽出試料の濃縮などが必要である。また、親水性の化合物の抽出が困難である。本研究では、固相マイクロ抽出法を応用した、有機溶媒、濃縮を必要とせず、さらに親水性の化合物も含めた広範囲の薬物が可能で、かつ迅速な LC-MS/MS、GC-MS による薬物スクリーニング法を検討する。

## 3. 研究の方法

血液中薬物スクリーニングにおいて、固相抽出法は、一般に使用されている。しかし、有害物質である有機溶媒が使用され、抽出行程が複数で時間もかかる点において、簡便、迅速とは言い難い。本研究では、迅速な薬物スクリーニングのため、より簡素で、有機溶媒を使用することのない、気化平衡固相マイクロ抽出 (HS-SPME) を採用した。

- (1) 加熱気化装置の組み立て：装置の概要を図1に示す。500℃まで加熱可能なホットプレート上に、高熱対応のセラミックのトレイを置き、その中を小粒のアルミボールで敷き詰め、SPME のバイアルを固定する。
- (2) 試料の調製：血液 0.1 ml を SPME 用バイアルに直接入れ、抽出効果を高める条件を検討する。
- (3) SPME のファイバー：Varian 製の 100  $\mu\text{m}$ -Polydimethylsiloxane (PDMS) を使用。
- (4) GC-MS のカラム：DB-5 (長さ 10 m、内径 0.1 mm、膜厚 0.4  $\mu\text{m}$ )を使用。

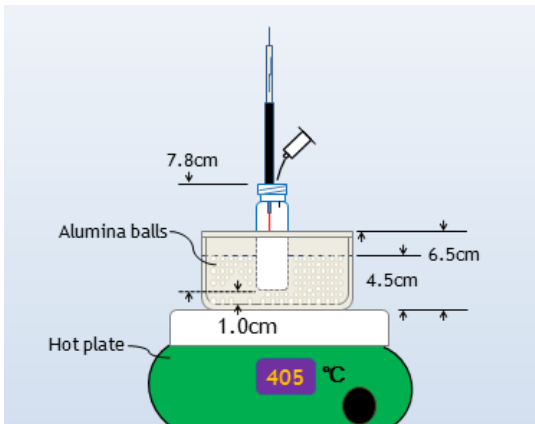


図1 ホットプレート上における固相マイクロ抽出の概略図

#### 4. 研究成果

本研究では、主に、覚せい剤（アンフェタミン、メタンフェタミン）、バルビツレートとベンゾジアゼピン系睡眠剤を対象に検討を行った。

##### (1) 覚せい剤アンフェタミンとメタンフェタミンの分析

###### 血液試料の前処理

全血から薬物を気化させるために、1)グラスウールをバイアルに入れ、全血を浸み込ませ、2)水酸化ナトリウム溶液を少量入れて検討を行った。

その結果、全血 0.1 ml に 5M 水酸化ナトリウム 0.1 ml を混ぜるという条件で、覚せい剤のピークを得ることができた。

###### 気化温度、SPME ファイバーへの吸着時間

薬物の気化の要因として、全血成分との相互作用、薬物の揮発性の強さ、薬物の分子量などが考えられる。私は、先行研究において尿試料について同様の手法について、覚せい剤およびその他の薬物と温度そして吸着時間の関係を検討した。気化温度（バイアルの底部）を、220、270、320 と変えた時の、対象薬物のピークの高さの関係を図2に示す。覚せい剤などの気化温度は、220 が最適であった。SPME ファイバーの吸着時間については、図2からわかるように、アンフ

エタミン、メタンフェタミンでは1分が最適であった。

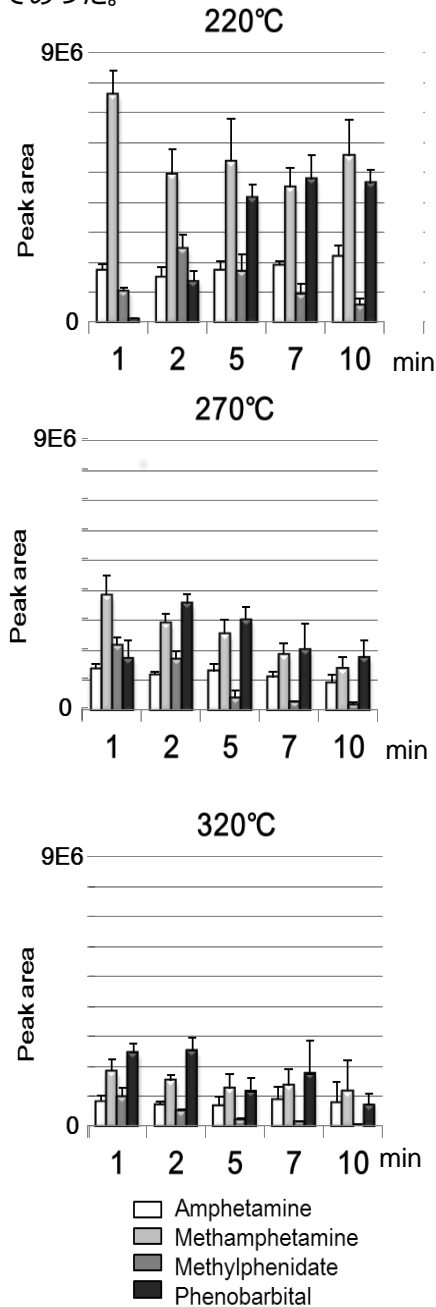


図2 加熱温度、時間とピーク面積関係

###### 覚せい剤の検出

覚せい剤の試料処理の最適条件は、加熱温度 220、吸着時間 1 分であったが、電子イオン化による GC-MS 測定では、アンフェタミン m/z 44、メタンフェタミン m/z 58 と特徴イオンの質量が低く、検出の障害が生じやすい。そこで、覚せい剤については、化学イオン化による検出を採用することで、図3のように、分子にプロトンが付加したイオンで検

出することができる。HS-SPME と化学イオン化 GC-MS を組み合わせた方は、覚せい剤の分析に適していることがわかった。

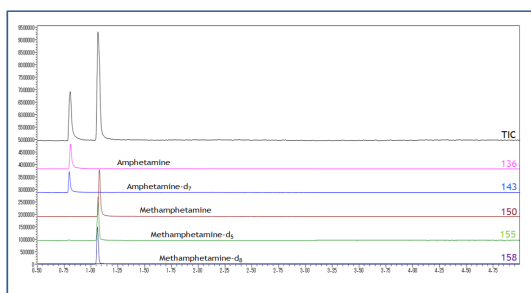


図3 GC-MS マスクロマトグラム

## (2) バルビツレートとベンゾジアゼピンの分析

覚せい剤分析と同様に、下記の薬物の気化温度と吸着時間の最適条件を検討した。マジンドール、フルニトラゼパム、ニメタゼパムのグループ A、ニトラゼパム、トリアゾラム、プロチゾラムのグループ B について、気化温度と吸着時間の関係を検討した。

グループ A は、270 で SPME ファイバーへの回収が高く、5 分間で十分な分析が可能であった。一方、難揮発性のグループ B では 320 と高い温度で高い回収が得られた。

図 4 に、アンフェタミンからプロチゾラムまでの低沸点化から高沸点までの混合薬物の GC-MS による一斉分析例を示している。使用したカラムはナローポア（内径が小さい）の DB-5 である。

HS-SPME は有機溶媒を含まない抽出であるので、生体試料の分析においても、ナローポアキャピラリーカラムを使った微量分析が可能と考える。

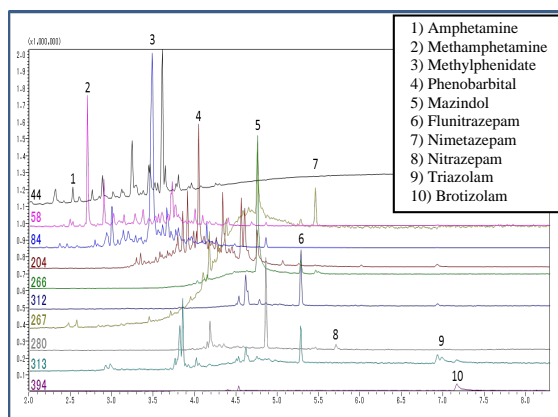


図4 GC-MS 一斉分析

## (3) まとめ

本研究期間において、高温気化 SPME を使って、全血からの覚せい剤(アンフェタミン、メタンフェタミン)の迅速試料調製、高速 GC-MS 測定を開発した。さらに、バルビツレート系、ベンゾジアゼピン系の薬物の一斉分析まで、この方法が応用可能であることがわかった。

有機溶媒を使った抽出でなく、気化させて抽出することから、試料許容量が小さいナローポアキャピラリーカラムを使った GC-MS 測定が、生体試料に応用可能であることがわかった。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

WATERS Brian, Fujii Hiroshi, Hara Kenji, Matsusue Aya, Kashiwagi Masayuki, Kubo Shin-ichi, A fast and simple method for analyzing drugs of abuse in whole blood using high temperature vaporization and solid-phase microextraction, 9<sup>th</sup> International Symposium on Advances in Legal Medicine (ISALM), 2014 年 6 月 20 日, 福岡県、福岡市、日本。

WATERS Brian, Hara Kenji, Kashiwagi Masayuki, Matsusue Aya, Takayama Mio, Fujii Hiroshi, Kubo Shin-ichi, Optimization of a Method for the Quantification of Underivatized Amphetamines in Whole Blood Using Headspace Solid-Phase Microextraction and Fast GC-MS/MS, The 43<sup>rd</sup> Annual Meeting of the Society of Forensic Toxicologists (SOFT), 2013 年 10 月 30 日, Orlando, Florida (USA).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等 なし

## 6．研究組織

### (1) 研究代表者

ウォータース ブライアン (WATERS,  
Brian)

福岡大学・医学部・助教

研究者番号：00609480