

2001年度日中医学協会共同研究等助成事業報告書

－ 中国人研究者・医療技術者招聘助成－

平成14年 3月 25日

財団法人 日中医学協会
理事長 殿

招聘責任者氏名 柏村 征一 ㊞

所属機関名 福岡大学医学部法医学

職 名 主任教授

所 在 地 〒814-0180 福岡市城南区七隈7-45-1

電話 092-801-1011 内線 3335

1. 招聘研究者氏名 劉 俊亭

所属機関 中国医科大学基礎医学院法医学化学教室 職名 教授

2. 研究テーマ 誘導化の自動固相マイクロ抽出ガスクロマトグラフィー質量分析法の薬物中毒検査への応用化

3. 日本滞在日程

2001年10月3日～2002年7月3日(予定)

4. 研究報告書

別紙報告書作成要領に準じ、添付の用紙で研究報告書を作成して下さい。

研究発表中または研究中の本人のスナップ写真を添付して下さい。

※決算報告書(書式自由)を添付して下さい。

※研究成果を発表する場合は、発表原稿・抄録集等も添付して下さい。

※発表に当っては、日中医学協会助成金による旨を明記して下さい。

誘導化の自動固相マイクロ抽出ガスクロマトグラフィー質量分析法 の薬物中毒検査への応用化

研究者 氏名	劉 俊亭
中国所属機関	中国医科大学 基礎医学院 教授
日本研究機関	福岡大学医学部 法医学教室
指導 責任者	教授 柏村 征一
共同研究者名	原 健二

要旨

本課題ではサンプル自動化抽出と揮発性誘導の二つ方面から、ヘッドスペース法 (Head-Space, HS) / 固相マイクロ抽出 (Solid Phase Microextraction, SPME) / ガスクロマトグラフィー (GC) / 質量分析法 (MS) (HS-SPME-GC-MS) における機能を広げてきた。本教室で独自に合成した重水素標識 MDMA (3,4-methylenedioxymethamphetamine-d5) を内部標準物質として用いて、救命救急センターから依頼された中毒試料、当教室の解剖試料、及び中国における覚醒剤使用者の毛髪試料を対象として、SPME 自動分析装置とサンプル揮発性誘導開発を行った。本法は臨床と法中毒の分野において実用であると考えられる。

Key Words 乱用薬物, MDMA-d5, HS-SPME-GC-MS, 自動分析法

緒言

固相マイクロ抽出法 (Solid Phase Microextraction, SPME) は新しいガスクロマトグラフィー (GC) 用の試料抽出、濃縮、導入法であり、従来用いられてきた試料調節法に比べ、有機溶媒を使用せず、短時間で簡単に試料調節ができるという特徴を持っている。現在までに、多くの研究者が幅広い分野での応用などについて報告をしており、SPME 法はクロマトグラフィーにおける試料前処理と導入の重要な手法の一つとして定着したと言える。

SPME の装置はホルダー (手柄) とファイバー (針) で構成されている。試料の抽出と濃縮はファイバーの表面に付いている固定相で行われる。SPME の抽出過程は試料 (血液や尿など) を入れたバイアル瓶の中にファイバーを露出させて、直接浸漬法、或いはヘッドスペース法 (Head-Space, HS) の形で行う。後者はもっと簡便迅速の利点を持たれているので、最近 SPME 法の主流として、薬毒物の法医、臨床検査の分野で活躍するようになった。われわれも、今までの研究結果がこの方法 (HS-SPME) を踏まえて得られていたものである [1,2]。

さらに、HS-SPME の固相マイクロ抽出法はガスクロマトグラフィー (GC) / 質量分析法 (MS) と連用すれば (SPME-GC-MS)、抽出、定量、定性が一体化になると考えられた。今までこのような連合で作られて

いる文献が多い。しかし、二つの問題が残っている。一つは SPME 抽出法自体が時間を厳密にしなければならないところが何カ所か存在している。時間に厳密にしないと、再現性が問題になる恐れがある。したがって、SPME 抽出法の各段階を特定の自動装置に託せれば良いのではないかと考えられた。もう一つは HS-SPME 法の必要条件として、目的分析物が多少揮発性でなければ分析できないことである。臨床と法中毒の分野には、大量の無揮発性の分析物質が存在している。HS-SPME 法をそれらの物質にまで応用させるために、揮発性を誘導するように工夫する必要がある。この点について、我々はいろいろな試みを行った[3,4,5,6]。

この研究では以上の二つ方面から HS-SPME—GC-MS 分析法を展開し、充分に業者と相談の上、改造された新型の SPME の自動分析装置を開発した。それを用いて、分析を行ったところ、いろいろな所見が得られた。

対象と方法

対象； 1、最近、本教室では覚醒剤分析関係の内部標準物質として重水素標識 MDMA (3,4-methylenedioxymethamphetamine-d5) を日本で初めて合成し[7]、覚醒剤の中間代謝物も分析対象とした。2、救命救急センターから依頼された除草剤であるパラコートと幾つかの農薬の分解産物としてのジクロロアニリン (Dichloroanilines) の検査に利用した。3、解剖例及び依頼された試料 (毛髪、血液、各臓器組織) でも検討した。4、さらに、中国では覚醒剤使用者の毛髪 46 例 (女 18, 男 28) を使って分析した。

装置：島津 QP-5000 質量分析装置。カラム：XTI-5 (Restek 社, 30 m x 0.25 mm, 膜厚 0.25 μ m)。温度：注入口 250°C, カラムオープン初期 70°C (1 min), 290°Cまで 20°C/min の昇温プログラム, インターフェース 260°C, キャリヤーガス：He 1.7 ml/min (一定)。測定はスキャンモード (50-650 amu /0.35 s cycle) で行った。

試薬：誘導化反応試薬、塩化ヘプタフルオロ-n-ブチリル (HFB-Cl), 内部標準物質 (IS) methamphetamine-d₅。SPME の fiber：100- μ m polydimethylsiloxane (PDMS)。自動 SPME 抽出装置：オートインジェクタ AOC-5000, HS-SPME：気化平衡瓶の中に、試料約 0.2 ml 及び IS 10 ng を入れ、分析物によって、リン酸緩衝液を加えたり、pH を調整したり、反応試薬を (10 μ l) 添加したりしてから、ゴム栓で密封し、オートインジェクタの装置に与える。オートインジェクタの自動抽出条件は、試料瓶を 60°C 設定し、1 分間静止して、fiber をその気相に 20 分間露出させ、GC-MS に導入する。注入口に 3 分間静止する。

結果

1、最終合成産物 MDMA-d5 は上記の誘導化 HS-SPME-GC-MS 自動分析の結果、分子イオン m/z 394, 及びフラグメントイオン m/z 258, m/z 213, m/z 164, m/z 163, m/z 136 の特徴イオンを示すマススペクトルを観察した。MDMA の分析のため、理想な定量用内部標準物質であることが明らかとなった。

2、ジクロロアニリンは幾つかの農薬の分解産物として、急性中毒の原因物質である。6 種異性体 (2,3-, 2,4-, 2,5-, 2,6-, 3,4-, 3,5-) の中に 3,4-, 3,5- の毒性一番強い。HFB 誘導体の SPME 自動分析法を検討した結果、強い塩基性の条件で、尿中 HFB 誘導体の HS—SPME 分析は可能であると認めた。3,4-ジクロロアニリンの場合、特徴イオンは m/z 359, m/z 357, m/z 190, m/z 188, m/z 162, m/z 133, m/z 109, m/z を示すように観察した。救命救急の農薬中毒の診断に応用可能である。一方、血漿と尿中の除草剤であるパラコートの分析法は誘導化の代わり、従来の還元法を採用してから、その揮発性を誘導した。HS—SPME 自動分析にも導入可能になった。

3、解剖例及び依頼された試料の中、各臓器組織中の覚醒剤定量はH F B誘導体の SPME 自動分析法を検討した。試料を簡単に調整し、抽出条件を調節して、自動分析装置に導入した。無人で徹夜で運転させ、朝データが揃っている。安定性もすぐれていて、人力面にも時間面にも節約できる。煩雑の試料を分析処理するのは最適であると証明した。

4、 中国安康病院入院患者（覚醒剤使用者）の毛髪、46例のH F B誘導体のH S—SPME 分析結果、殆ど MDMA が検出した。中国では特定の染毛剤も多数検出した。かえって、覚醒剤（amphetamine と methamphetamine）は殆ど含有してなかった。従って今中国の乱用者は MDMA を中心としていることが明らかとなった。

考察

平成8年から、福岡大学法医学教室で本格的に毛髪鑑定を開始した[8,9]。分析方法自体も絶えずに改良してきた。しかし、毛髪の横断分析の場合、毛髪が長すぎると、いくら簡単な分析法しても、サンプルの数が増えるため、煩雑の仕事になってしまう。今回自動分析装置を導入して、もっと短いセグメントで分析しても（今までは1cmずつ）、連続の薬毒物体内経過の歴史分布曲線が獲得できるようになる。

H F B誘導体の SPME 法は優れた結果を得たが、還元法の方は時間がちょっと長すぎるとか、バイアル瓶の中、水素の泡が出るため、すぐに密封できないとか、同時に還元できる内部標準物を探すとか、まだ問題が残っている。 今後分析物を揮発性の性質を持たせる誘導法の開発を目指して、努力していく。

参考文献

1. Juntong Liu, Kenji Hara, Seiichi Kashimura, Tomoko Hamanaka, Shigeki Tomojiri, Keiichi Tanaka, Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of dichlorobenzene isomers in human blood with headspace solid-phase microextraction, Journal of Chromatography B, 731, 217-221, 1999.
2. Juntong Liu, Kenji Hara, Seiichi Kashimura, Masayuki Kashiwagi, Tomoko Hamanaka, Aya Miyoshi, Mitsuyoshi Kageura, Headspace solid-phase microextraction and gas chromatographic-mass spectrometric screening for volatile hydrocarbons in blood. J. Chromatogr B Biomed Sci 748 (2):401-406, 2000
3. Juntong Liu, Kenji Hara, Seiichi Kashimura, Masayuki Kashiwagi, Mitsuyoshi Kageura, New method of derivatization and headspace solid-phase microextraction for gas chromatographic-mass spectrometric analysis of amphetamines in hair. J Chromatogr B, Biomed Sci Appl, 758 (1): 95-101, 2001
4. 劉俊亭、原健二、柏村 征一、柏木 正之、影浦 光義、毛髪中覚醒剤 GC—MS 分析のための誘導体化並びにその気化平衡—固相マイクロ抽出、第25回日本医用マススペクトル学会年会、広島、2000年、9月

5. 劉俊亭、原健二、柏村 征一、影浦 光義、柏木 正之、三好 綾、濱中 倫子、 体液中無機陰イオンのペンタフルオロベンジル化気化平衡 SPME/GC-MS 法の検討、第85次日本法医学総会、久留米、2001年、4月
6. 劉俊亭、原健二、柏村 征一、影浦 光義、柏木 正之、濱中 倫子、高本 睦夫、尿中覚醒剤スクリーニング分析の簡素化の検討、第84次日本法医学総会、和歌山、2000年、4月
7. 原健二、柏村 征一、劉俊亭、柏木 正之、影浦 光義、濱中 倫子、藤井 広志、GC-MS 分析のためのMDMAの内部標準物質、第86次日本法医学総会、岡山、2002年、4月
8. 柏村征一、毛髪検査の新しい展開—毛髪に快感の残渣を探る、日本法医学雑誌、55(3),2001,310-320
9. 柏村征一、原健二、柏木 正之、三好 綾、高本 睦夫、影浦 光義、 棚田 徳彦、毛髪試料中チラミンの検出について、第83次日本法医学総会、広島、1999年、4月

作成日： 2002年3月15日