

## 参 考 文 献

- [1]K.Yamamoto, H.Watanabe, K.Ukita, H.Wazawa, Y.Yamamoto and Y.Fukui, 3 Fatalities after communal use of methamphetamine. *Arch.Kriminol.* 188 (1991) 72-76.
- [2]A.Mori, H.Suzuki and I.Ishiyama, Three cases of acute methamphetamine intoxication-analysis of optically active methamphetamine. *Nippon Hoigaku Zasshi* , 46 (1992) 266-270.
- [3]S.Katsumata, K.Sato, H.Kashiwade, S.Yamanami, H.Zhou, I.Yonemura, H.Nakajima and H.Hasekura, Sudden death due presumably to internal use of methamphetamine. *Forensic Sci.Int.* , 62 (1993) 209-215.
- [4]P.Chan, J.H.Chen, M.H.Lee and J.F.Deng, Fatal and nonfatal methamphetamine intoxication in the intensive care unit. *J.Toxicol.Clin.Toxicol.* , 32 (1994) 147-155.
- [5]Y. Nakahara, M.Shimamine, K.Takahashi and Y.Takeda, Hair Analysis for Drugs of Abuse I. Determination of methamphetamine and amphetamine in hair by stable isotope dilution gas chromatography/mass spectrometry method. *J.Forensic Sci.* 36 (1991) 70-78.
- [6]Y. Nakahara, K. Takahashi, M. Shimamine, Y. Takeda, K. Konuma, S. Fukui and T. Tokui, Hair Analysis for Drugs of Abuse II. Hair Analysis for Monitoring of Methamphetamine Abuse by Isotope Dilution GC/MS. *Forensic Sci.Int.* 46 (1990) 243-249.
- [7]Y.Nakahara, R.Kikura, K.Takahashi, K.Konuma, GC/MS Analysis of drugs and metabolites in hair for diagnosis of chronic methamphetamine abuse, *Adv. Chem. Diagnos.Met. Diseases* , 2 (1994) 187- 199.

## 2. アミノピリンと代謝物の毛髪への取込

### 1) 緒言

ピリン疹又は固定疹を引き起こすことで知られるアミノピリンはアナフィラキシー様ショックや血小板減少症を引き起こし、発がん性も問題となり、わが国では市販されていないが、薬害のモデル薬物として研究に用いることは薬害の診断の基礎的データを得る上で、有用である。その上、ヒトや動物の体内にはaminopyrine N-demethylase が存在しており、肝毒性等の評価研究に用いられている。特に、N脱メチル代謝物はその毒性発現に関与していることが種々の実験で確かめられており、毛髪試料を用いて各段階の代謝物の生成を測定し、薬害診断の可能性を検討する。

ラットに3段階の投与量の dimethylaminoantipyrine (DMAA) を投与し、毛髪中の親化合物と代謝物(methylaminoantipyrine: MAA, 4-aminoantipyrine: 4AA, 4-acetylaminoantipyrine: AcAA) の検出を行い、単回投与と5, 10回投与の比較を行う。また、重篤な障害を引き起こすacetaminophen の併用の影響も調べた。

### 2) 実験材料と実験方法

2-1. 薬品と試薬: DMAA 及び4AA は和光純薬から購入した試薬特級品を再結晶して用いた。MAA 及び AcAA は4AA から定法通り合成して、用いた。内標品として用いた isopropylantipyrine (IPA) も和光純薬から購入した試薬特級品を用いた。その他、誘導体化試薬や溶媒は試薬特級品をそのまま用いた。

2-2. ラット毛髪: ラットの背部の毛を薬物投与7日前に動物用電気バリカンで予め刈っておく。1群3匹の雄性 Dark Agouti(DA) ラット(6週齢), に5 mg/kg を10回, 10 mg/kg を5回, 50 mg/kg を1回, dimethylaminoantipyrine (DMAA) を腹腔内に注射し、28日後に新しく生えてきた毛を電気バリカンで採取した。毛根試料は分析時まで冷蔵庫に保存した。

### 2-3. 分析法

ラット毛髪試料約20mgに内標準液 (Isopropylantipyrine: 500 ng/mL EtOH stock solution) を 100  $\mu$ l を加え、1 ml の methanol-5M 塩酸(20:1) 中で 37 $^{\circ}$ C、ボルテックス下に一昼夜抽出した。毛髪をろ去後、溶媒は窒素で 40 $^{\circ}$ C以下で留去し、残渣を水に溶かし、試験管に入れ、アンモニアアルカリ性として、塩化メチレンで抽出した。溶媒を留去後、残渣に 100  $\mu$ l の trifluoroacetic anhydride(TFAA) 中で 50 $^{\circ}$ C、20 分間加温し、溶媒を留去、50  $\mu$ l の ethyl acetate に再溶解して、GC/MS [Hewlett-Packard Model 5890 series-II/MSD5973; TC-1 capillary column (GL Science Inc., Tokyo), 0.25 mm x 20 m with a 0.25  $\mu$ m film thickness using helium carrier gas(4.5 psi), 200 $^{\circ}$ C injection temperature and temperature-programmed from 60 $^{\circ}$ C (0.5-min hold) to 280 $^{\circ}$ C(5-min hold) at 20 $^{\circ}$ C/min) equipped with 7673A autosampler] で測定した。定量は、選択イオンモニタリングで行い、それぞれ TFA-4AA は m/z 299, TFA-MAA は m/z 313, DMAA は m/z 231, AcAA は m/z 245 そして、内標準(IPN) は m/z 230のイオンを用いた。

### 3) 結果と考察

#### 3-1. アミノピリン(Diemthylaminoantipyrine) の代謝

アミノピリンの代謝に関する報告は非常に多く、動物に投与して、尿・血液から代謝物を分析した報告(1-3)も数々ある。N-脱メチル代謝の主経路は図1に示すとおりであり、モノ脱メチルを経て、ジメチルにより、主代謝物の4-aminoantipyrine(4AA) が生成される。さらに、N-アセチル化が起こり、N-acetylaminoantipyrine(AcAA) となることも知られている。

これらの代謝物の生成量は、いろいろな因子に影響を受ける。例えば、体の防御機構により、異物が入ってくると、代謝活性が上昇する(induction)ことが知られている。N-脱メチル酵素活性も投与される薬物の種類、期間、併用薬物、投与方法により、上昇することが報告されている。これらの現象は、血液や尿で見ると、毛

髪で見える方が、長期の薬物暴露の影響を捉えやすいと思われる。

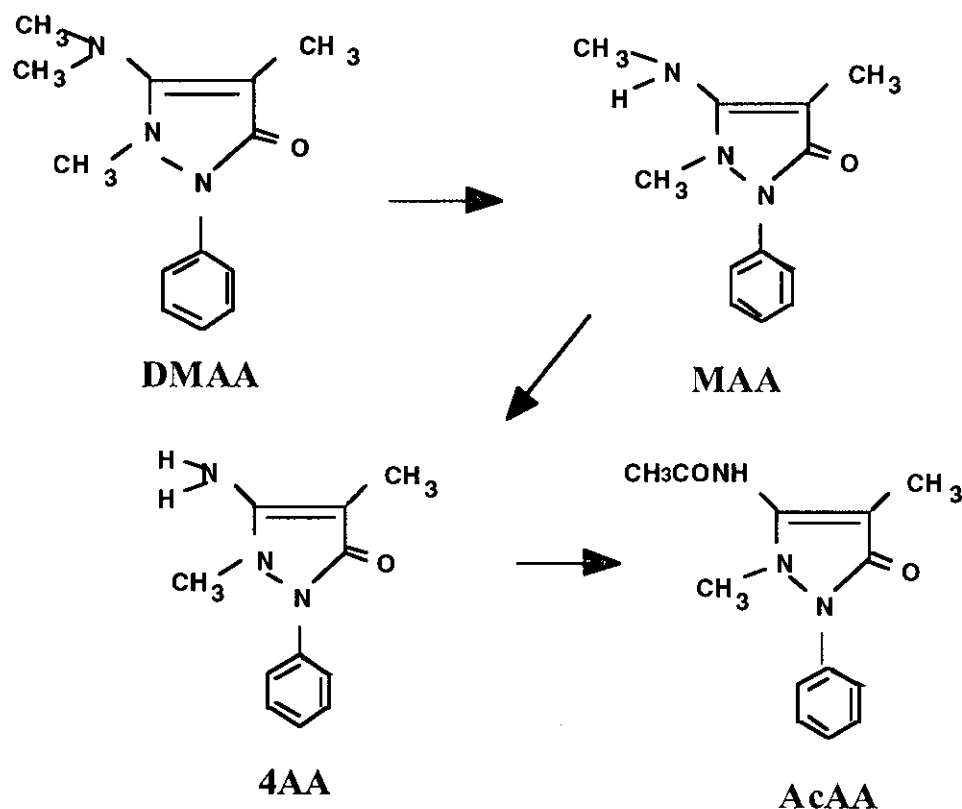


図1 アミノピリン(Dimethylaminoantipyrine) の主代謝経路

### 3-2. 毛髪中からのDMAA及び代謝物の検出

毛髪中からDMAA, MAA, 4AA 及び AcAA を同時に検出・定量するには、様々な条件設定を必要とする。まず、標品を誘導体化せずにGC/MSを測定すると、2級アミンと1級アミンのMAA, 4AA の検出が著しく悪くなり、誘導体化を必要とすると考えられた。誘導体化ではトリフルオロアセチル(TFA)化と bistrimethylsilylacetamide(BSA) を用いるシリル(TMS)化を検討した結果、一長一短が見られた。TFA化では、3級アミンとアミドのDMAA 及び AcAA のピークの形状が悪く、定量精度の低下が見られたが、MAA, 4AA の定量の再現性は良好であった。TMS化では、DMAA 及び AcAA のピークの形状は良好であったが、MAA, 4AA のピークに対し、妨害ピークが出現した。主代謝物の4AAの濃度の正確

性を優先し、TFA化を用いることとした。図2にラット毛髪中の4種の代謝物を検出したクロマトグラムの代表例を示す。

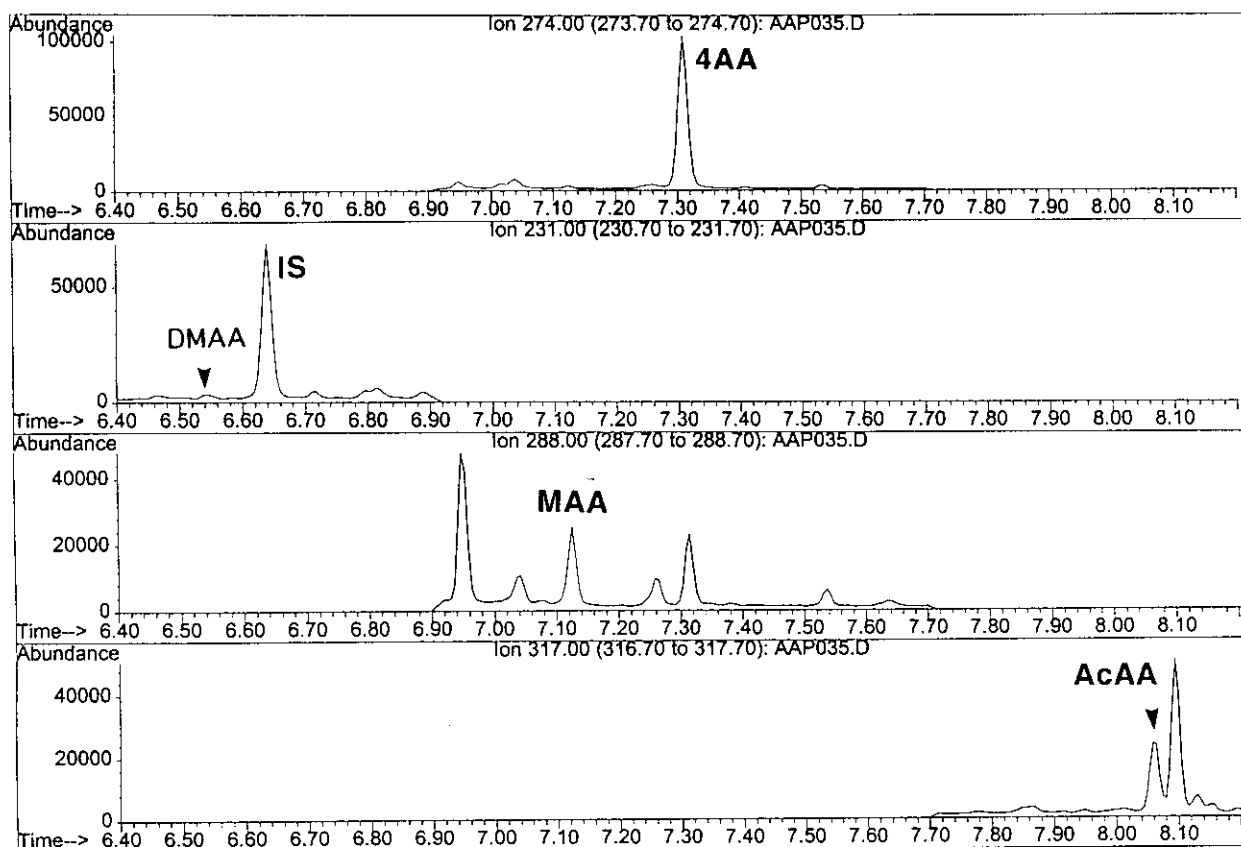


図2 アミノピリン (DMAA) 投与のラット毛髪試料のGC-MSクロマトグラム

### 3-3. 毛髪中の代謝物/親化合物比に及ぼす投与量と投与期間の影響

生体試料を検査して、この中毒は急性か、慢性かを知ることができれば、その後の治療に役立つ。投与全量を50 mg/kgと設定し、50 mg/kgを1回、10 mg/kgを5回、そして5 mg/kgを10回動物に投与し、その毛髪中の薬物量と代謝物/親化合物比を比較した。

その結果を図3にまとめた。親化合物のDMAAはいずれの投与パターンでもあまり差はなかったが、代謝物の4AAは1回投与より、5回投与、さらに10回投与の方が明らかに濃度が高く、代謝物/親化合物比 (MP比) は単回投与より慢性投与のほうが明らかに高い値を示した。

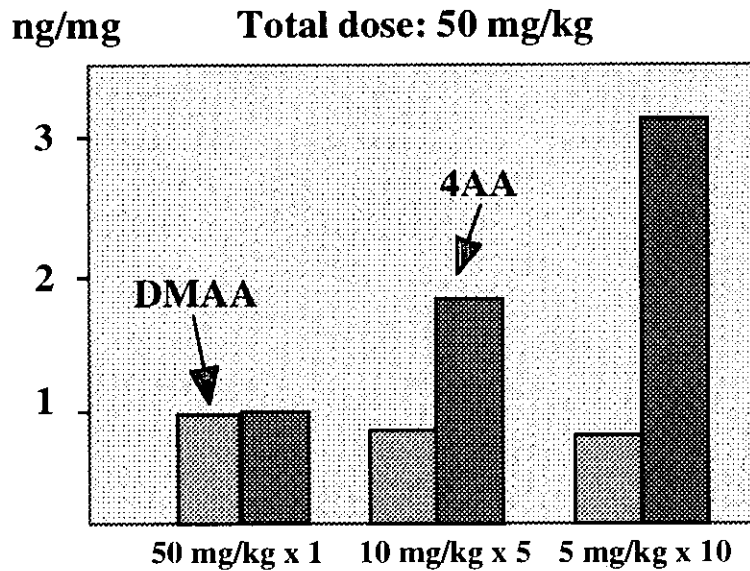


図3 3種の投与パターンによる毛髪中の代謝物/親化合物比の比較

DMAA は薬物代謝酵素を誘導することが知られており、投与を重ねると、薬物代謝酵素の活性が上昇することが知られている。本実験においても、その現象が見られた。このMP比は尿でも血液でも投与後の時間を正確に計って検査すればその傾向を見ることは可能であるが、現実には中毒患者の診断で条件を揃えることは難しい。それに反し、毛髪はその情報が蓄積されるので、試料採取時の影響は少ない。今後、中毒状態の診断に利用できる用にするためにはさらにデータを積み重ねる必要があると思われる。

#### 3-4. 毛髪中の代謝物/親化合物比に及ぼすアセタミノフェンの併用による影響

アミノピリンは、アセトアミノフェン(APAP)との併用で毒性が増すことが報告されている[4]。これらの毒性発現には、代謝物が関与していることが推定されており、毛髪中の代謝物を測定し、薬害診断の可能性を検討した。

図4 と 5 は薬物投与後の毛根中のDMAA と代謝物のAcAAの濃度変化をDMAA単独投与とAPAP併用との比較を示している。図4では単独と併用では大きな差はないが、APAP併用の方が毛根中の親化合物の濃度は有意に低く、APAP併用により

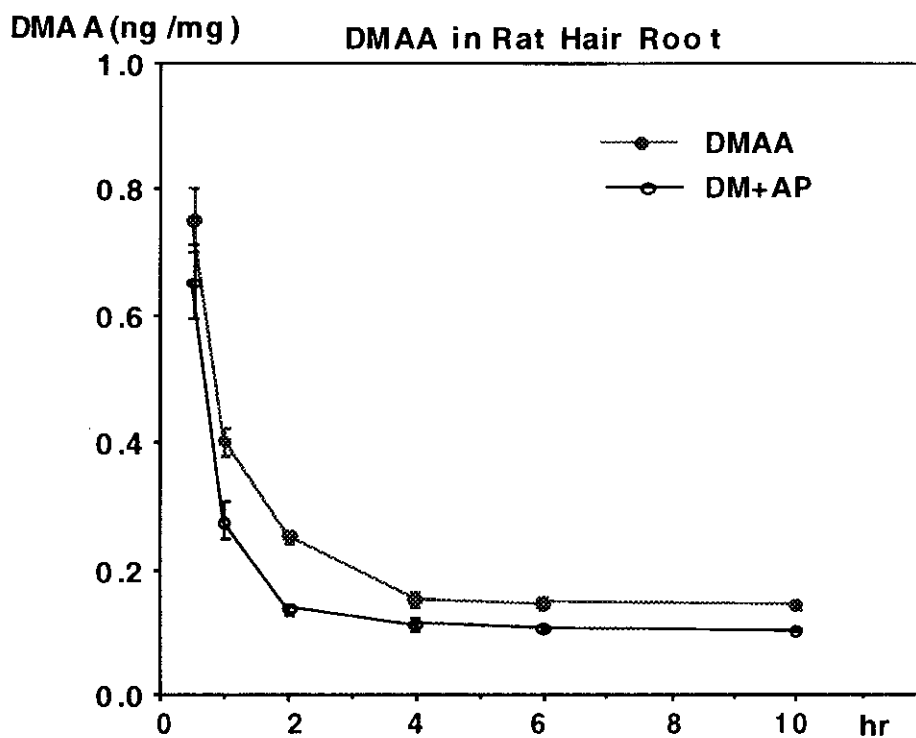


図4 毛根中のDMAA濃度の変化に及ぼすAPAP 併用の影響

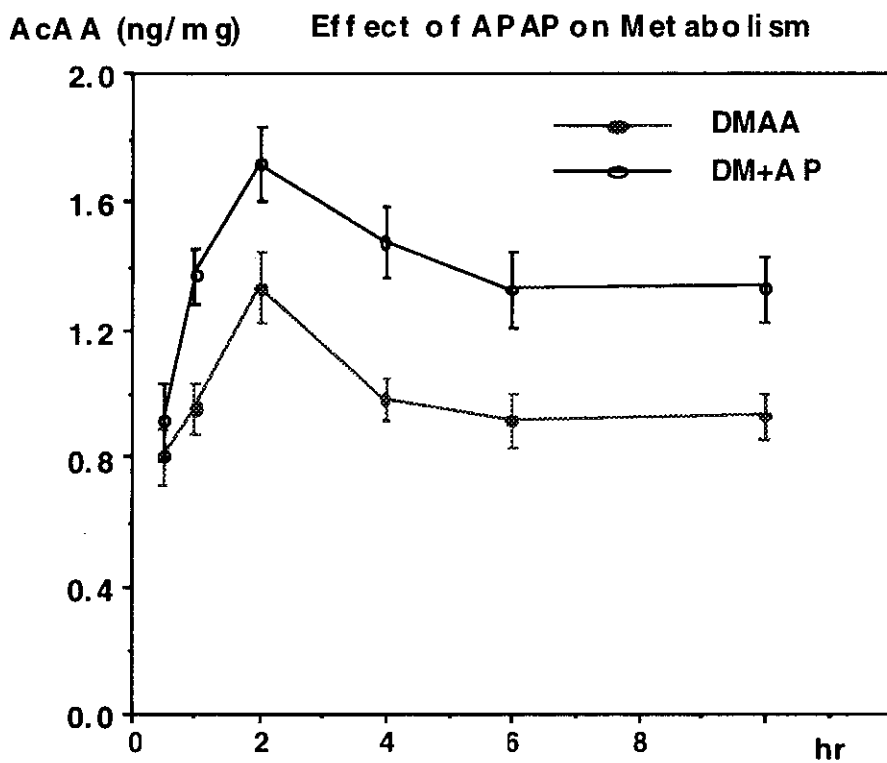


図5 毛根中の代謝物AcAA濃度の変化に及ぼすAPAP 併用の影響

投与薬物の代謝が速くなることが確認された。一方、図5を見ると、代謝物AcAAは明らかにAPAP併用により、単独に比べ1～10時間での濃度が高く、代謝物の生成はAPAPの併用に影響を受けることが認められた。

#### 4. おわりに

以上の結果を総合すると、中毒原因物質はその代謝物とともに、毛髪に取り込まれ、保持されるので、毛髪中に様々な薬物使用情報が含蓄されていることがわかる。現在臨床検査に用いられている尿や血液とは異なった結果が数々得られた。これらを活用することにより中毒の診断や治療効果の確認などに用いることができれば、非常に有用な検査が生まれる可能性がある。そのためには、まだまだ多くの基礎的研究が必要であろう。

#### 文献

(1) M.J.Moldowan, A noninvasive method for the study of hepatic drug metabolism in rodents: Aminopyrine metabolism in rats. *Pharmacology*, 26: 331-336 (1983).

(2) K.Inoue et al., Simultaneous determination of aminopyrine hydroxylation and aminopyrine N-demethylation in liver microsomes by HPLC. *J.Chromatogr.*, 274: 201-208 (1983).

(3) I.Carretero et al., Determination of antipyrine metabolites in human plasma by solid-phase extraction and micellar liquid chromatography. *Analyst*, 120: 1729-1732 (1995).

(4)



### 3. 中毒症例と毛髪検査

本研究において、動物実験から中毒原因物質の検査に毛髪（毛根）が有用な検査試料となることが認められたが、ヒトの場合に適用できるかどうかを確認する必要がある。実際に中毒症状をきたし、救急病院に入院・治療を受けた患者の毛髪（毛根）を採取して、分析した。

#### 毛髪試料と検査方法

毛髪検体：毛髪は、患者の頭部から1本ずつ引き抜いて、採取した。これらの検体の中から、顕微鏡（倍率16）での毛根観察により、成長期の毛根を選び出し、分析試料とした。試料は、毛根部の5mmを切り取り、各1mLの0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), リン酸緩衝液、水の順に1回ずつ、1分間ボルテックスで洗浄した後、先に報告した方法[1,2]である塩酸メタノール又はトリフロロ酢酸メタノールを用いて、薬物を抽出し、GC-MSで分析した。

#### 〔ケース1〕 クロルプロマジン, カルバマゼピン急性中毒

最初の例は、ベッドで昏睡状態で発見された22歳の女性の症例で、ベッドに薬の空箱 {クロルプロマジン, カルバマゼピン} が残っていた。入院時（13時間後と推定）に血液を採取し、血清中のクロルプロマジンを測定したところ、CZP濃度は13.8 ug/mlであった。3日後、頭髪を毛根から採取し、その5本を用い、毛根部（5mm）を分離し、洗浄後、1mLのメタノール-トリフロロ酢酸（9：1）で超音波下に4時間抽出し、定法通り処理してGC/MSで分析した。その結果、クロルプロマジンを46.7 ng/mg, カルバマゼピンを66.7 ng/mgを検出した（図1）。

#### 〔ケース2〕 Acetaminophen, Methylephedrine 急性中毒

2番目は、29歳女性で新ルルA錠を110錠（Acetaminophen, 11g, Methylephedrine, 0.6 g含有）を約2時間かけて飲んだという症例です。入院2日目に採取した毛根部2本を用い、上記と同様の処理で抽出・分析した。その結果、Acetaminophenを432 ng/mg, Methylephedrineを64 ng/mg検出した。毛根1, 2本で原因薬物が2種類も検出、定量できた例であった。図2にGC-MSで検出したクロマトグラムを示す。

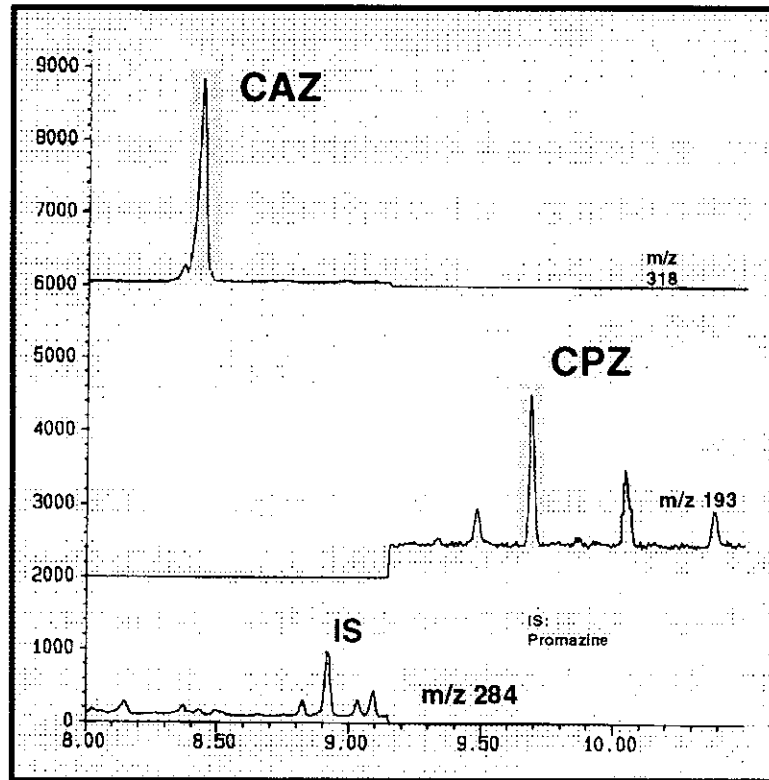


図1 ケース1の毛根試料より得たGC-MSクロマトグラム

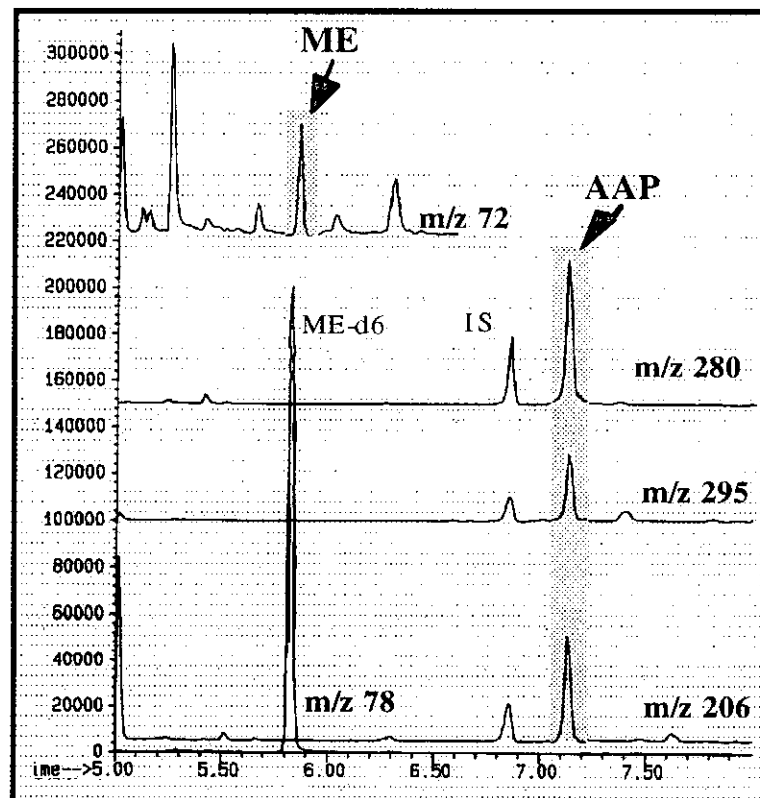


図2 ケース2の毛根試料より得たGC-MSクロマトグラム

### [ケース3] Diphenhydramine (トラベルミン中毒)

3番目の例は、トラベルミンを50錠程を服用し、興奮状態の女子高生が、病院に運び込まれたの症例です。入院2日目に採取した毛根部5本を用い、上記と同様の処理で抽出・分析した。トラベルミンの主成分Diphenhydramineを検出を試みたところ、毛根中Diphenhydramineの濃度は209 ng/mgであった(図3)。ちなみに、入院時に採取した血清は2.3 µg/mLで、尿は33.2 µg/mLであった。

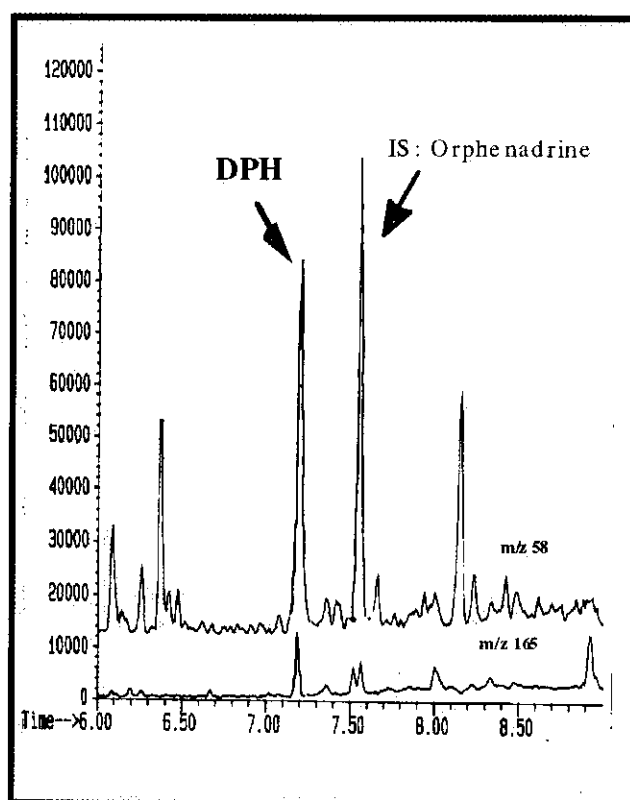


図3 ケース3の毛根試料より得たGC-MSクロマトグラム

### [ケース4] フラゼパム急性中毒

4番目の例は、27歳、男性で、喘息の持病があり、フラゼパムを大量使用して、意識不明・呼吸困難となり、救急隊で病院に運び込まれた症例である。入院3日目に採取した毛根部2本を用い、上記と同様の処理で抽出・分析した。その結果、毛根中のフルラゼパム濃度は、158 ng/mgであった(図4)。ちなみに、入院時に採取した血清は2.0 µg/mLで、尿は0.022 µg/mLであった。このケースは血清、尿とも低濃度であったが、毛髪濃度はからり高い値を示した。

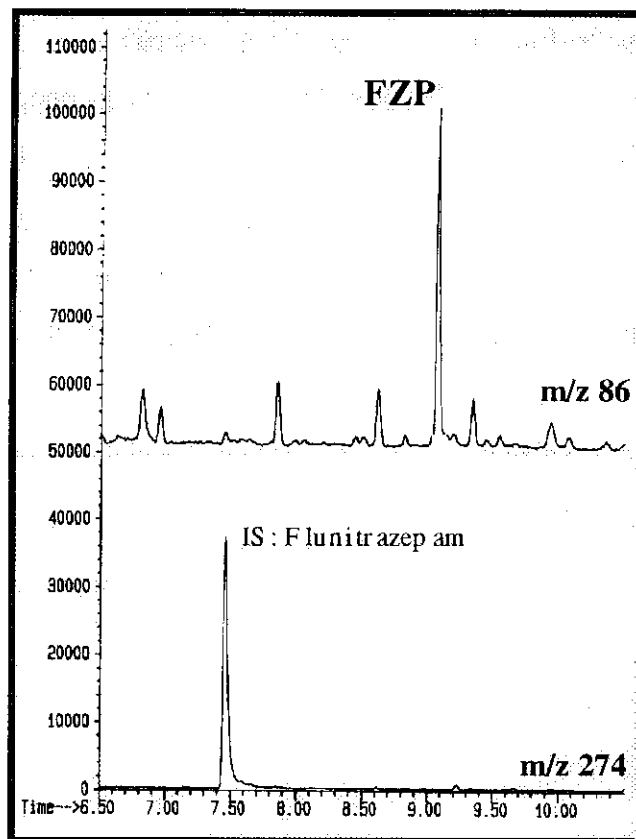


図4 ケース4の毛根試料より得たGC-MSクロマトグラム

[ケース5] Methylephedrine 中毒

5番目は覚醒剤使用が疑われた症例である。患者は、入院時、痙攣と高体温（42℃）を伴い、横紋筋融解症を引き起こしていた。尿検査では、予試験でベンゾジアゼピンとオピエートが陽性を示した。尿から12μg/ml、血清から0.04μg/mlのMethylephedrineを検出をした。これを確認するために9日後に毛髪採取し、14本の毛根部を3分画にして、上記と同様の処理で抽出・分析した。その結果を表1に示す。

この結果、毛根部（5mm）には薬物は検出されず、0.5-1.5cmの分画にもっとも高濃度でmethylephedrine(ME) と ME との比率から代謝物と推定されるephedrine が検出され、1.5cm-4 cmの分画にも両者が高濃度で検出された。この患者は異常をきたす前からME製剤を用いていたと考えられ、急性中毒と言うより、慢性的な使用により（又は、急に用量を増やして）異常をきたし、病院へ来たように推測された。

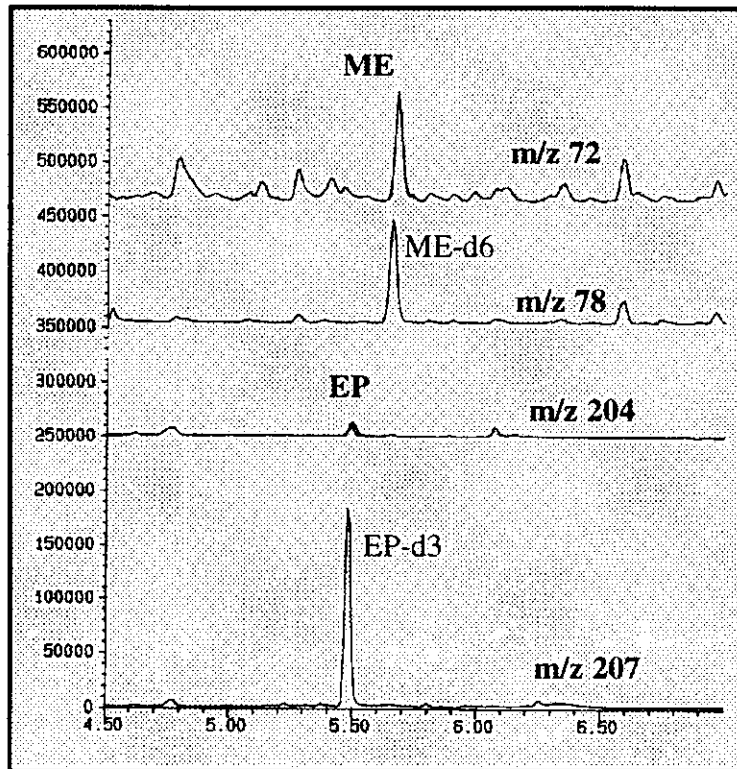


図5 ケース5の毛根試料より得たGC-MSクロマトグラム

表1 興奮状態で入院した患者の頭髪3分画中の薬物濃度

	Methylephedrine	Ephedrine
0 - 0.5 cm	ND	ND
0.5-1.5 cm*	180 ng/mg	30 ng/mg
1.5cm-4 cm	80 ng/mg	12 ng/mg

【ケース6】妊娠中ブロン・覚せい剤中毒（胎児への影響）

この症例は、妊娠中の妊婦の薬物乱用のケースである。生まれてきた赤ん坊が異常な興奮・ふるえ・高熱を発し、泣きやまないため、この原因を知りたいという産

婦人科の医師の依頼で、分析を行った。母親は妊娠中にSSブロン液（のど薬）を飲んだことがあるということで、その成分を1cmの分画に第1分画から第11分画に分け、分析したところ、メチルエフェドリン、カフェイン、クロルフェニラミン、ジヒドロコデインを母子ともすべての分画（1cmでほぼ1ヶ月に相当）に高濃度で検出した（図6）。妊娠中ほぼ全期間ブロンを多量に乱用していたことを証明した。新生児の毛髪は3cm弱だったので、3分画として分析したところ、全分画から上記の4つの成分を確認した。胎盤を通じて強い薬物が胎児の循環系に入ったことを示している。このほかに覚醒剤も同時に検出し、妊娠中の薬物乱用が胎児に確実に悪影響を与えることを証明した例であった。

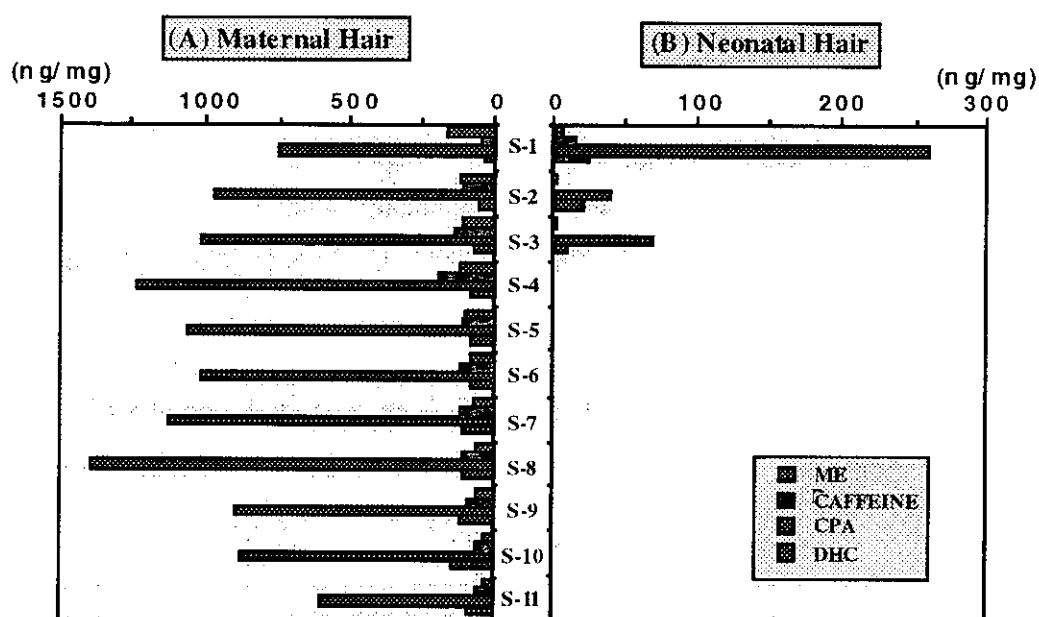


図6 ケース6の母親(A)と新生児(B)の頭髪中のSSブロン液成分  
母親の頭髪は11分画，新生児の頭髪は3分画

以上の中毒症例での毛髪検査で得られた知見を以下に示す。

1. 急性中毒患者の毛根中に中毒原因物質を検出できた。
2. 他の試料に比べ、毛根中に比較的高濃度の薬物を検出した。
3. 毛根数本で使用薬物を明確に検出できた。
4. 毛根からの薬物の抽出・分析は簡便、迅速であった。

文献

- 1)Y. Nakahara, et al., Hair Analysis for Drug Abuse XIV. Identification of substances causing acute poisoning using hair root. I. Methamphetamine. Forensic Sci. Inter., 84:157-164 (1997).
  
- 2)Y. Nakahara, R. Kikura, Hair analysis for drug abuse: XVIII. Identification of substances causing acute poisoning using hair root. II. MDMA poisoning. Biol. Pharm. Bull, 20: 969-972 (1997).

薬物中毒、薬害、農薬中毒等の予防と原因解明のための毛髪診断研究

分担研究：トリアゾラム及びその代謝物の毛髪分析

静岡県立大学 薬学部 豊岡 利正



## 目次

1. 緒言
2. 実験材料および実験方法
  - 2.1. 試薬・試液
  - 2.2. 装置
  - 2.3. 動物実験
    - 2.3.1. 体毛および毛根の前処理
    - 2.3.2. ラット肝ミクロソームによるTriazolamの代謝
  - 2.4. 代謝物の誘導体化
3. 結果および考察
  - 3.1. 前処理法の検討
  - 3.2. HPLC-MS 測定の最適化
  - 3.3. 体毛および毛根分析
  - 3.4. トリアゾラムの *in vitro* 代謝
4. 参考文献

## 1. 緒言

ベンゾジアゼピン系の向精神薬は、緩和な精神安定薬として汎用されており、これまでに多種類のベンゾジアゼピン系の薬剤が上市されている。これらの薬剤のうちとりわけトリアゾラムは低い投与量（0.125～0.25 mg）で催眠作用を示し、速効性の優れた薬物である[1-8]（図1）。しかし、過去においては、大量服用による死亡例も多数みられベンゾジアゼピン系の薬物の中でも最も事故率が高く危険な薬剤の一つに挙げられる。また昨年末（1998年）には、伝言ダイヤルを利用し、この薬剤を服用させた犯罪が報道されたことは記憶に新しいことである。このように、トリアゾラムは裁判化学的にも重要なものの一つである。

### Triazolam

Synonym. Clorazolam

Proprietary Name. Halcion

8-Chloro-6-(2-chlorophenyl)-1-methyl-4H-1,2,4-triazolo[4,3- $\alpha$ ]-1,4-benzodiazepine

C<sub>17</sub>H<sub>12</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>4</sub>= 343.2

CAS-28911-01-5

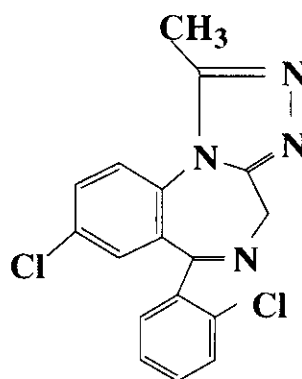


図1 トリアゾラムの構造

本研究では、このトリアゾラムを測定対象薬物として取上げ、毛髪中のトリアゾラムおよびその代謝物の分離定量法の開発ならびに毛髪診断研究を行う。

## 2. 実験材料および実験方法

### 2.1. 試薬・試液

Triazolam (Upjohn Farmoquimica, S.A.; Madrid, Spain)、1-hydroxymethyltriazolam (BIOMOL Research Laboratories: Plymouth Meeting, PA)、4-hydroxytriazolam (BIOMOL Research Laboratories)、内標準物質として、1-hydroxymethyltriazolam-d4 (Radian International; Austin, Texas)を使用した。アセチル化には、無水酢酸 (和光純薬)、ピリジン(和光純薬)を使用した。HPLCの溶出溶媒として、アセトニトリル (CH<sub>3</sub>CN; 関東化学)、酢酸 (AcOH: 関東化学)を使用した。固相抽出用のカラムには、Bond Elut Certify (Varian, Harbor City, CA)を使用した。

ラット肝臓の灌流にはKCl (和光純薬)、EDTA (関東化学)の水溶液を使用した。緩衝液は、KCl (和光純薬)、EDTA (関東化学)、リン酸水素二カリウム (和光純薬)、リン酸二水素カリウム (和光純薬)、Phenylmethylsulfonyl Fluoride (PMSF)(和光純薬)を用いて調製した。水は精製水を使用した。ミクロソーム液は緩衝液にβ-NADP<sup>+</sup> (和光純薬)、DL-Isocitric acid lactone (和光純薬)、NAD<sup>+</sup> (和光純薬)、MgSO<sub>4</sub> (関東化学)を加えたものを使用した。

## 2.2. 装置

緩衝液のpHは、pHメータ M-8 (堀場)を用いて調製した。遠心機は、KN-70 (KUBOTA)、超遠心機は、CS 120EX (日立)を使用した。

HPLC装置 (TOSOH) は、ポンプ(CCPM)、ポンプコントローラ(PX-8010)、脱気装置 (SD-8022)、カラムオープン (CO-8020)から成り、自動解析ソフトとして C-R7 Aplus (島津)を使用した。UV検出器は、VARIABLE WAVELENGTH UV MONITOR (日立)を、蛍光検出器は、L-7480 (日立)をそれぞれ使用した。カラムは、Wakosil-II 3C18 RS (150 mm x 4.6mm, i.d., 3μm: 和光純薬)を使用した。ガードカラムは、Mightysil RP-18 GP (3μm; 関東化学)を使用した。

HPLC-MS解析用のHPLC装置 (Hewlett Packard) は、ポンプ、オートサンプラー、フォトダイオードアレイ検出器、カラムオープン、脱気装置 から成るHP1100シリーズを用いた。自動解析ソフトにHP ChemStationを使用した。イオントラップ型質量分析計は、LCQ (Finnigan MAT)を使用した。自動解析ソフトとして、Navigator (Finnigan MAT)を使用した。測定は、エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法ポジティブイオン (H<sup>+</sup>) モードで行った。カラムは、Mightysil RP-18 (

100×2.0mm, i.d., 3 μm ; 関東化学 )を使用し、カラムオープンを用いて40℃とした。溶出液は、1% AcOH を含有する水及びアセトニトリルを用い、流速は0.15ml/min とした。グラジエントの組成はH<sub>2</sub>O-CH<sub>3</sub>CN-AcOH (75:25:1)から7min 間でH<sub>2</sub>O-CH<sub>3</sub>CN-AcOH (74:26:1)へ緩やかに変化させ、17min までそのままの組成で流した。その後 25min までにH<sub>2</sub>O-CH<sub>3</sub>CN-AcOH (60:40:1)に変化させ、35min 後にH<sub>2</sub>O-CH<sub>3</sub>CN-AcOH (10:90:1)に変化させた。

### 2.3. 動物実験

#### 2.3.1. 体毛および毛根の前処理

Dark Agouti 系雄性ラット (5weeks, ca.100g) にTriazolamを1日2回、5日間腹腔内投与し、5日目の投与2時間後に毛根を採取する。又、最終投与日から7日後に体毛を背部より刈り取り試料とした。この体毛に0.1% Sodium dodecylsulfate (SDS) 1ml を加え超音波で一分間洗浄し、洗液を除去した。この操作を3回繰り返した。次に、精製水 1mlを加え同様な洗浄操作を3回繰り返した。その後、体毛をろ紙に集めデシケーター中で乾燥し、1mm以下になるまで細断し、体毛試料とした。この試料約10mgを正確に量りとり、内部標準溶液 200 μl (1-hydroxymethyltriazolam-d<sub>4</sub>, con. 100ng/ml )を添加し、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH-28%NH<sub>4</sub>OH (20:80:2) 2mlを加え、超音波で一時間処理後、48時間室温で保存抽出し、遠心分離 (3000rpm, 5min) 後、上清を分取した。この溶液を減圧下留去しHPLCの溶出液に溶かし直してLC-MSで測定した。一方、毛根の場合は洗浄過程を省略し、約2mgを正確に量り取り、以後体毛の場合と同様に処理した。

#### 2.3.2. ラット肝マイクロソームによるTriazolamの代謝

Wistar系雄性ラット (6 weeks, ca. 200 g) の頸動脈を切り血を抜き、肝臓を摘出した。この肝臓を、水溶液 (1.15% KCl, 1mM EDTA) 40 mlで灌流後、5 g 切り取り、リン酸緩衝液 (1.15% KCl, 1mM EDTA, 1mM PMSF) 10 mlを加え、十分にホモジナイズし遠心チューブ4本に各3 mlを分注した。この懸濁液を13,000 rpm、9,000×g、1℃、20minで遠心し、上清を各1 ml採り遠心チューブ2本に移し各2mlとした。44,000 rpm、105,000×g、1℃、60minで遠心し、上清を捨て、沈澱物を2回リン酸緩衝液 (1.15% KCl, 1mM EDTA, 1mM PMSF) で洗い、2本の遠心チューブの沈澱物を1本の試験管に集め、Triazolam 200 μgを3 mlのリ