

ヶ月間は継続的にアセトアミノフェンを飲んでいたことを示している。また、毛髪中のアセトアミノフェン濃度は前述したように、かなりの高濃度であることから推測すると、半年間以上の期間に大量のアセトアミノフェン薬剤を飲み続けていたことを示唆した。なお、根元側に近づくに従い、濃度の上昇が見られた（図11）か、薬物濃度は毛髪の先端に進むに従い、毛髪中薬物の経時的変化や洗髪による漏えい等により減少傾向を示すことかあり⁸⁾、必ずしも使用量が増加しているとは言えないか、少なくとも死亡する月まで半年以上にわたり、使用量は減少していないと推察される。

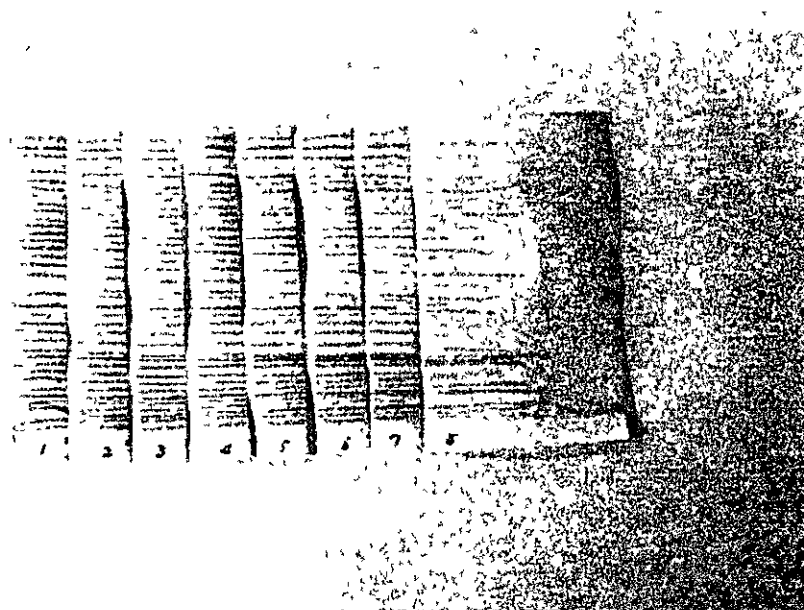


写真1 接着剤でコーティングした用紙上に根元を揃えて、伸ばして貼り付けた毛髪検体

通常、ヒトの頭髪は1か月に1.1～1.3cm伸びることか知られている⁶⁾。その成長速度は、年齢、性別、人種などにより異なるか、過去に遡った薬物使用時期の推定の報告^{7・12)}に従って、平均成長速度と考えられる1.2cm/月を用いて、各分画に相当する期間を示した（図11, 12）。

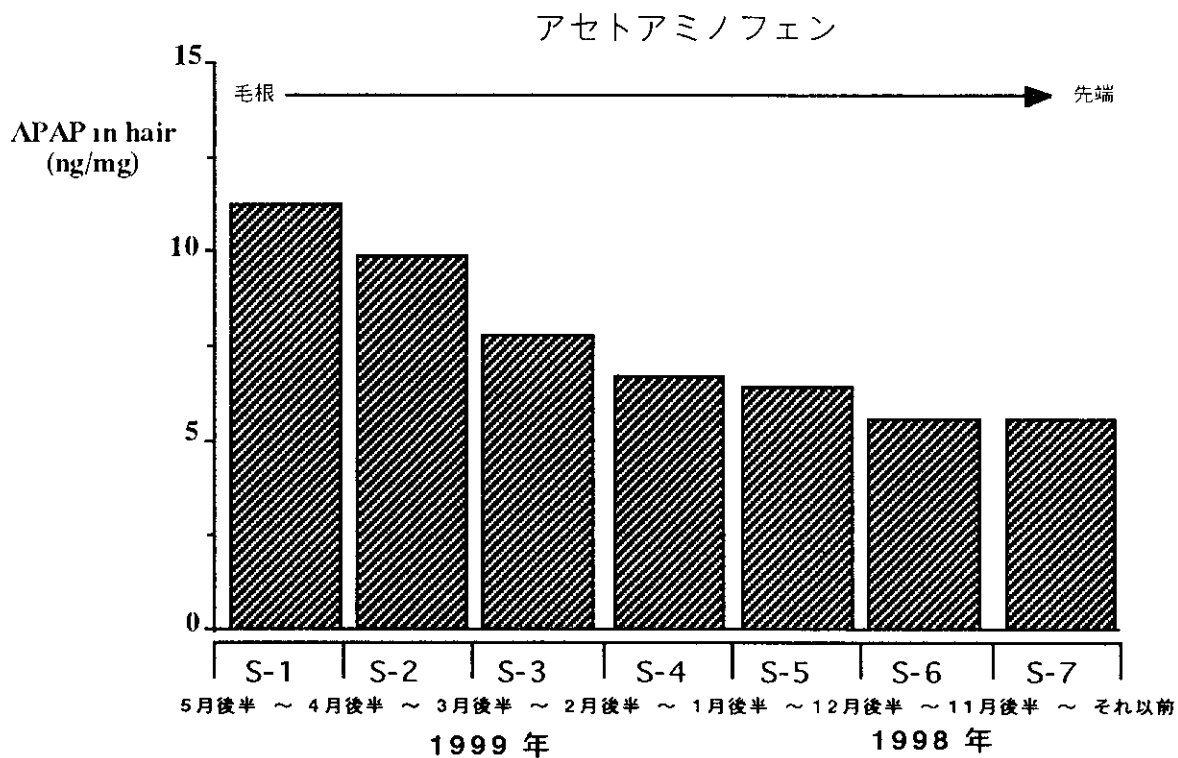


図11 各分画のアセトアミノフェン濃度と使用時期との関係

B) AP-3

この患者は、アセトアミノフェンを含む解熱鎮痛剤を始め、多くの種類の医薬品を半ば強制的に飲ませて、体調に異常をきたし、入院した38才の男性の頭髪（AP-3）である。長さ12～14cmの毛髪を手術用ハサミで粉末化し、抽出分析を行った。毛髪中のアセトアミノフェン濃度は0.26ng/mgを示した。AP-2に比へ、この低濃度の原因は、この患者は新ルル錠などのアセトアミノフェン製剤を飲むと、嚥下後毎回嘔吐していたと説明しているのて、あまり吸収されなかったのではないかと推察される。

また、毛髪検体（粉末化の前の元の状態）を接着紙に固定し、根元側から1.2cm毎に分画し、8つの分画に分けて測定した。図12に示すように、アセトアミノフェンは本試料の第3分画から第8分画に低濃度ながら、同程度の濃度で検出された。この結果は、AP-3は8ヶ月前から3ヶ月前までの少なくとも6ヶ月間はアセトアミノフェン製剤を飲んでいてを示している。しかし、入院時の2ヶ月前からは、アセトアミノフェン製剤の

使用を中止したことが毛髪分析の結果と一致する。

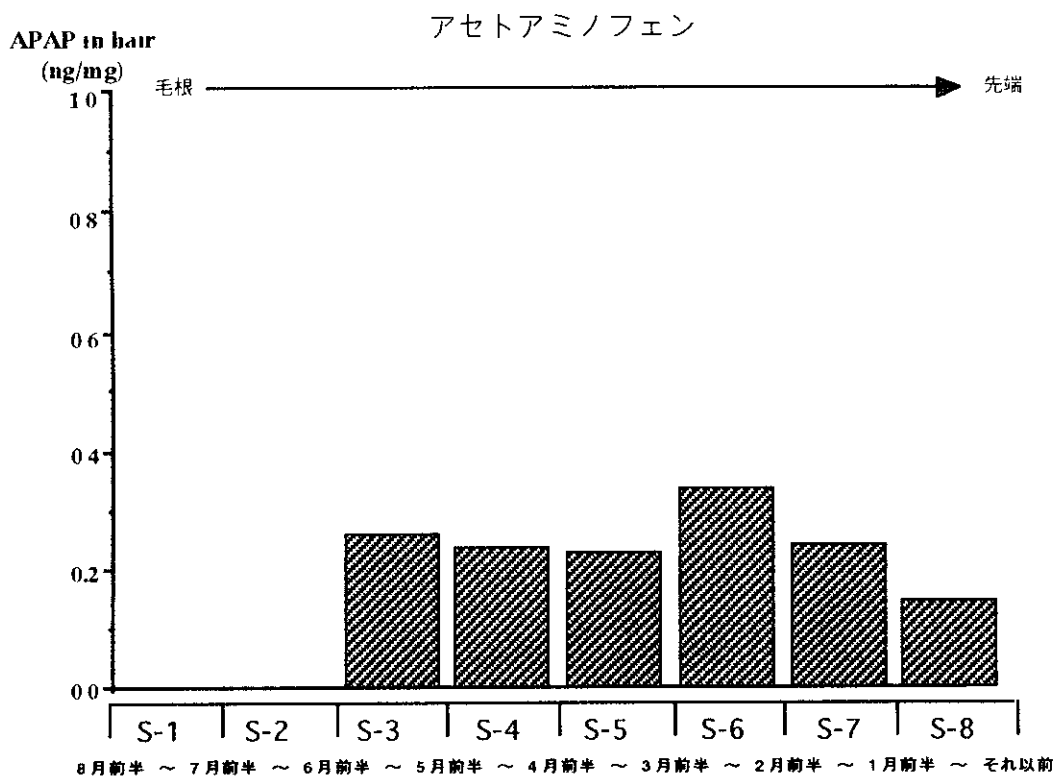


図12 各分画のアセトアミノフェン濃度と使用時期との関係

(4) おわりに

アセトアミノフェン投与のラット毛髪及びヒト頭髪からアセトアミノフェンの検出が可能であった。しかし、コカイン、メタンフェタミンと比べるとアセトアミノフェンの毛髪への移行性はかなり低いと考えられた。毛髪中から毒性代謝物であるNAQIの検出を試みたか、確認には至らなかった。これは、NAQIが熱不安定物質であることで、高感度のGC-MSでは分析困難であること、化学的にも不安定物質であり、体内で容易にシステイン等のSH基を有するアミノ酸と反応し、別の化合物に変化することか考えられ、検出を困難にしているものと思われる。

今回、3人のアセトアミノフェン中毒患者（1人死亡）の頭髪を分析することかできた。急性中毒に陥り、救急病院に運び込まれた患者の毛根に432 ng/mg という高濃度のAPAPを検出した。このとき用いた試料は毛髪2本の根元の5mmの部分であった。試料採

取に特別な道具もいらず、APAPを検出できる1, 2本の毛髪試料は今後の活用が期待される。

文 献

- 1) A G Nogen and J E Bremmer Fatal acetaminophen overdosage in a young child *Pediatrics* 92 832-833, 1978
- 2) A E Robinson H Sattar R D McDowall et al Forensic toxicology of some deaths associated with the combined use of propoxyphene and acetaminophen (paracetamol) *J. For Sci* 22 708-717 1977
- 3) M Holzbecher R A Peny and H S Ellenberger, Acetaminophen fatality~ case re-port *J Can Soc For Sci* 14 32-33 1981
- 4) B S Riggs et al , Acute acetaminophen overdose during pregnancy *Obstet Gyne col* , 74 247-255 (1989)
- 5) YNakahara, Effects of Physiochemical Factors on Incorporation of Drugs into Hair and Behavior of Drugs in Hair Root CRC Press, New York, 1999, pp 49-72
- 6) 日本パーマネントウェーブ液工業組合編, 「毛髪とパーマ」, 新美容出版株式会社, 1980年
- 7) YNakahara, K Takahashi, Y Takeda, K Konuma, Hair analysis for monitoring of methamphetamine abuse by stable isotope dilution gas chromatography/mass spectrometry *Forensic Sci Int* , 46 243-254(1990)
- 8) YNakahara, K. Takahashi, M Shimamine, Movement and Stability of Drug along Hair Shaft with Hair Growth *J Anal Toxicol* , 16. 253-257(1992)
- 9) Y Nakahara, R Kikura and K Takahashi, Effective extraction and determination of 6-Acetylmorphine and Morphine in Hair with trifluoroacetic acid-methanol for the confirmation of retrospective heroin use by GC/MS *J Chromatogr B* 657 93-101(1994)
- 10) YNakahara, R Kikura, K Takahashi, GC/MS analysis of drugs and metabolites in hair for diagnosis of MA abuse *Adv in Chem Diagnos Treat of Met Diseases* 2: 187-199 (1994)
- 11) Y Nakahara, Detection and Diagnostic Interpretation of Amphetamines in Hair *Forensic Sci Inter* , 70 135-153 (1995).
- 12) 中原, 高橋, 木倉, ガスクロマトグラフィー/質量分析法による毛髪試料中のヘロイン代謝物の定量とヘロイン使用証明への応用 *分析化学* 44 101-110 (1995)

2. カルバマゼピンの毛髪分析と診断

(1) 緒言

カルバマゼピン(CBZ)は、日本では1966年から使われ始めた抗てんかん剤で、三叉神経痛や舌咽神経痛の治療薬としても使われている。商品名としては、テクレール、テレスミン、レキシシなど知られている。大人の1日の経口投与量は200-1600 mgである。

5.3~20mg/kgの範囲で長期経口投与の25人のてんかん患者において、CBZの血漿濃度は平均5.4 µg/mLであった¹⁾。17.5mg/kgの経口投与の19人の患者において、血清CMZ濃度は平均7.5 µg/mLであった²⁾。

CBZは脱毛、混迷、呼吸抑制、血液障害を引き起こす。自殺目的で、5.8gを飲んだ例で、昏睡中に採取した血液の血漿中濃度は摂取3.6時間後でCBZ 1.0 µg/mLであった³⁾。2.0gのCBZを飲んだケースでは、摂取6.0時間後で2.5 µg/mLを示した⁴⁾。その患者は6日間昏睡状態が続き、6日後では9 µg/mLに下降した⁴⁾。その他に2.4の死亡しなかったケースが報告⁵⁾されているか、これらの患者は昏睡、発作、眼振、反射異常亢進、反射不能、頻脈を繰り返したか、CBZ血漿最高濃度は1.2~7.7 µg/mLで、エポキシ体は4.3~4 µg/mLであった。

1.9才男性が5.0gのCBZを飲み、発作と低血圧を示した。血漿濃度は120 µg/mLであった。入院1.4時間後に心臓呼吸停止となった。その時の血漿中CBZ濃度は9.0 µg/mLであった⁶⁾。3.4才の男がCBZオーバードーズで発作、妄想を示し、入院時の血清濃度は5.4 µg/mLを示した。6時間以内に、呼吸困難となり、4日後昏睡状態で死を宣告された⁷⁾。

妊娠中にCBZを投与された患者の中に、奇形児を出産した例が多いと報告されている。妊娠マウス7~12日にCBZ 375~938 mg/kg/dayを経口投与した実験で、用量に関連して、胎児の死亡の増加と、奇形発生率の増加(対照群9.4%、938mg投与群51.4%)が認められている⁸⁾。

CBZを1回6mg/kg(420mg/70kg)経口で5人の被験者に与えたとき、摂取3.2時間後に血清濃度は6.5 µg/mLとなり、3.1時間の半減期で減少する。最適血漿濃度は4~8 µg/mLであると言われている⁹⁾。代謝物の10,11-epoxideは親化合物と同様に抗けいれん作用を持ち、1時間の6血漿半減期をもつ¹⁰⁾。

以上の文献からみると、一般にCBZの血中濃度は4~8 µg/mLが治療濃度、1.0~7.7 µg/mLが中毒濃度、それ以上が致死濃度と考えられる。

CBZは単回投与で血漿半減期は18-65時間で、維持治療中では8-20時間の半減期をもつ。長期投与において、代謝に及ほすかなりの自己誘発効果を示す。代謝は速く、未変化体は投与量の1%しか尿に排泄されない。主代謝経路は、10,11-epoxideを経て、加水分解後、10,11-dihydroxy体となり、さらに、抱合体となる。マイナーな経路はiminostilbeneの生成が知られている。10,11-dihydroxy(10-20%), 10,11-epoxide(2%), iminostilbene(0.5%)が代謝物として知られている¹¹⁾。(図1)

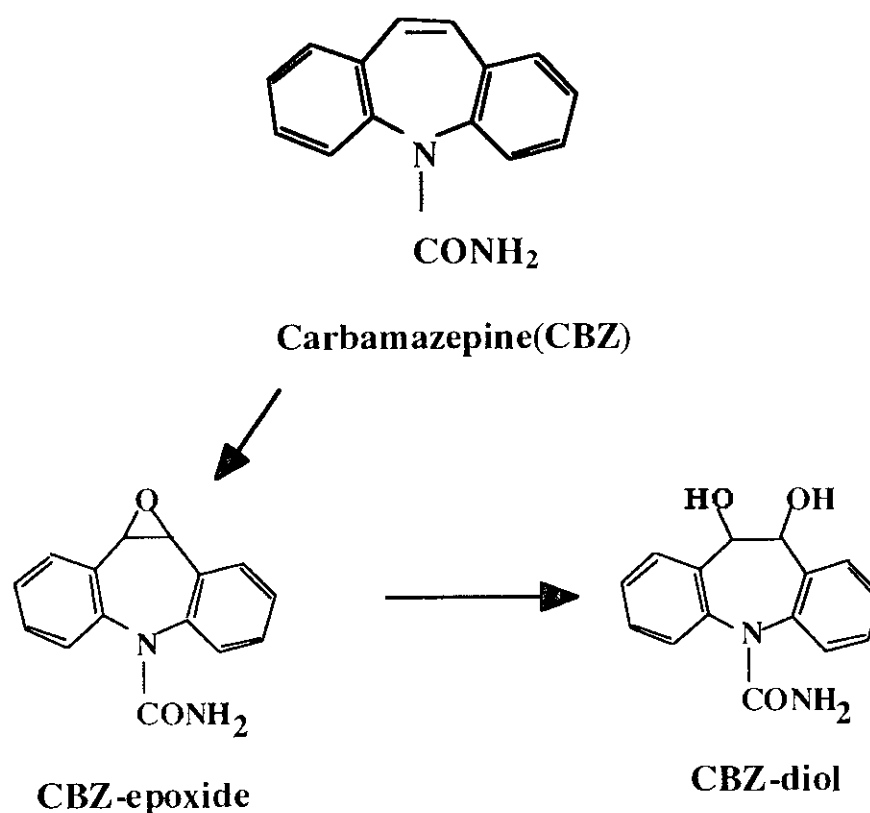


図1 Carbamazepine とその主代謝物の化学構造

本研究は、カルハマセピンをラットに投与し、ラット毛髪（有色毛）中のカルハマセピンとその代謝物を同時検出する方法を検討し、カルハマセピン中毒の証明法を確立する。また、カルハマセピン中毒の救急患者の毛髪を分析し、毛髪中のカルハマセピンを検出するとともに毛髪濃度とカルハマセピン中毒との関係を考察する。

(2) 実験材料と実験方法

2-1) 薬品と動物

Carbamazepine(BZ)及びpromazine はSigma社 (米国) から、bis-(trimethylsilyl)acetamide(BSA) はAldrich社 (米国) 購入し、CBZ-epoxide及びCBZ-diolは筑波大学社会医学系の田中栄之介博士から提供され、他の薬品は試薬特級を用いた。

雄性 Dark Agouti(DA) ラットはSLC社 (静岡) から5週齢を購入し、1週間の馴化飼育後、薬物投与の実験を行った。

2-2) 毛髪試料

ラット毛髪 ラットの背部の毛を薬物投与前に動物用電気バリカンで予め刈っておく。1群5匹の雄性 Dark Agouti(DA) ラット (茶褐色の毛、6週齢) に5日間50 mg/kg/dayのCBZを腹腔内に注射した後、最終投与日から17日後に新たに生えてきた背部の毛髪を電気バリカンで採取し、毛幹試料として分析を行った。毛髪試料は分析時までそれぞれ冷凍庫及び冷蔵庫に保存した。

2-3) 抽出条件の検討

毛髪からの薬物の抽出の最適化を見いだすために、4種の抽出溶媒 [メタノール-5 N塩酸 (20:1)、メタノール-トリフルオロ酢酸 (9:1)、アセトニトリル-塩化メチレン-濃アンモニア水 (20:80:2)及びメタノール-塩化メチレン-濃アンモニア水 (20:80:2)] による抽出効率を、APAP投与のラット毛髪試料を用いて、比較検討した。

2-4) 分析法

ラット毛髪試料は2 mLの0.1% SDSで2回、2 mLの蒸留水で2回、それぞれ1分間ホルテックスミキサーで洗浄した。乾燥後、約50 mgの試料に内標準液 (塩酸プロマジン4 µg/mL) を100 µLを加え、2 mLのmethanol-TFA(9:1) 中で超音波下に1時間抽出し、室温で一晩放置した。毛髪をろ去後、溶媒は窒素で40°C以下で留去し、残さを1 mLの酢酸エチルに溶解し、飽和NaHCO₃溶液1 mLで洗浄後、再び酢酸エチル層を窒素気流下に留去した。残渣に100 µLのBSAを加え、90°C、20分間加温した。反応溶液を直接GC-MSで分析した。

GC-MS測定条件

装置 Hewlett-Packard Model 5890 series-II/MSD5971,

カラム TC-1 capillary column (GL Science), 0.25 mm x 30 m with a 0.25 μ m film thickness

キャリアガス ヘリウム(流速, 4.5 psi),

温度条件 注入口, 200°C, 検出器, 280°C

昇温条件, 120°C (0.5-min hold) から280°Cまで20°C/分

オートインジェクター Hewlett-Packard Model 7673A autosampler

定量は、内標準promazineを用い、CBZにはm/z 193, CBZ-epoxideにはm/z 207, CBZ-diolにはm/z 282, IS(Promazine)にはm/z 284のイオンを用いて定量した。

図2～5にGC-MSクロマトグラムとそれぞれのマススペクトルを示す。

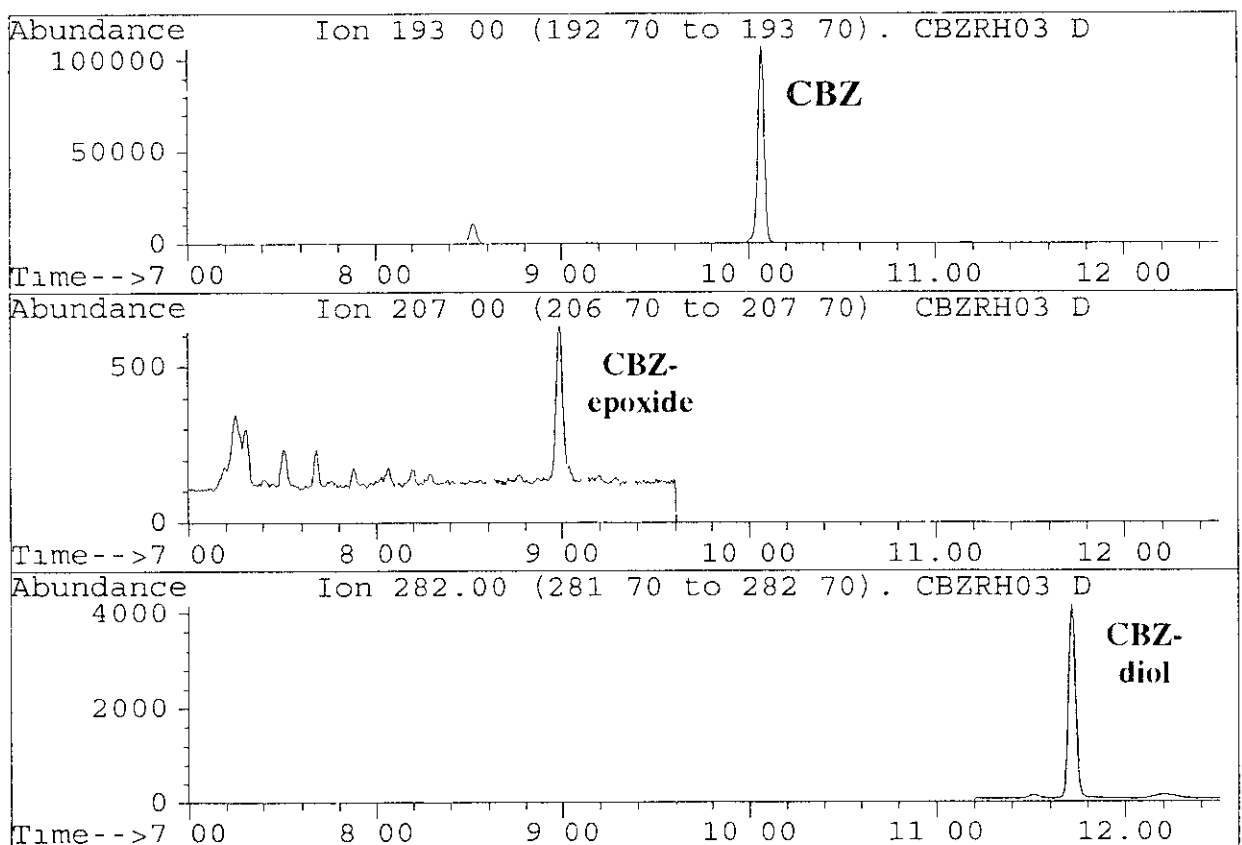


図2 カルハマセピン及び主代謝物(CBZ-epoxide, diol) のGC-MSクロマトグラム

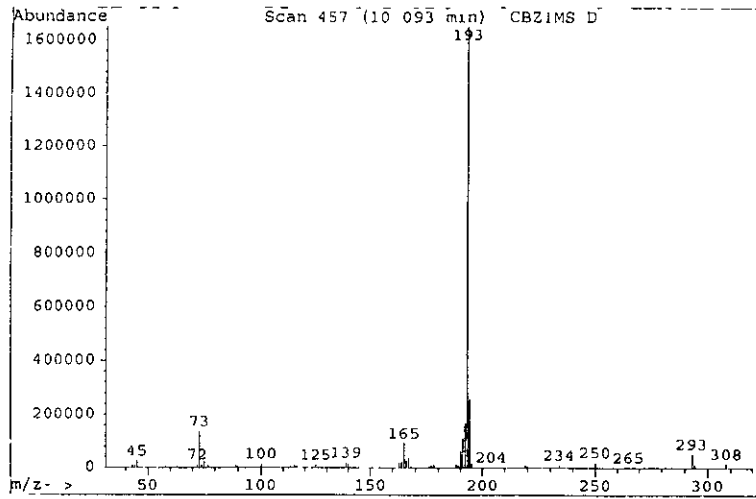


図3 カルバマセピン (CBZ) のマススペクトル

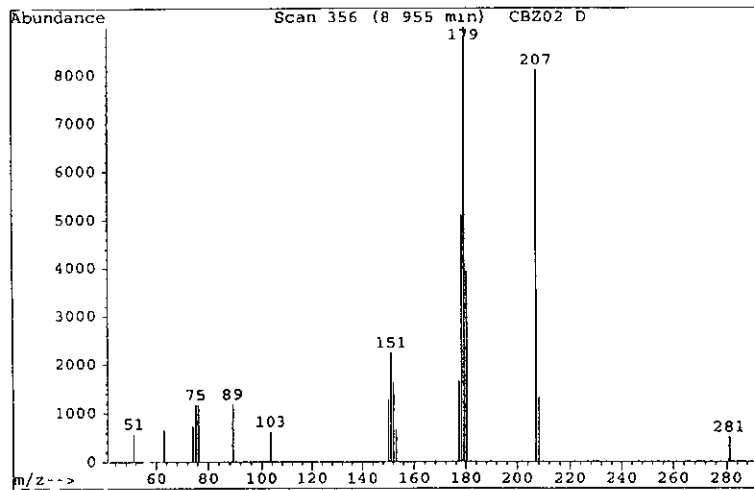


図4 カルバマセピン-エポキサイド代謝物 (CBZ-epoxide) のマススペクトル

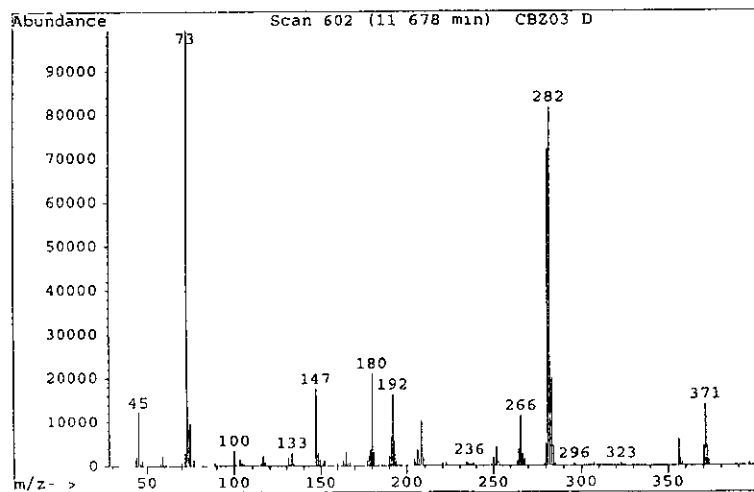


図5 カルバマセピン-シオール代謝物 (CBZ-diol) のマススペクトル

(3) 結果と考察

抽出の最適化

メタノール-5 N塩酸 (20 : 1), メタノール-トリフルオロ酢酸 (9 : 1), アセトニトリル-塩化メチレン-濃アンモニア水 (20 : 80 : 2) 及びメタノール-塩化メチレン-濃アンモニア水 (20 : 80 : 2) の4種類の抽出溶媒を用いて、毛髪試料からの薬物の抽出効率を比較したところ、抽出効率か最も良好であったのかメタノール-トリフルオロ酢酸(9 : 1) であった。

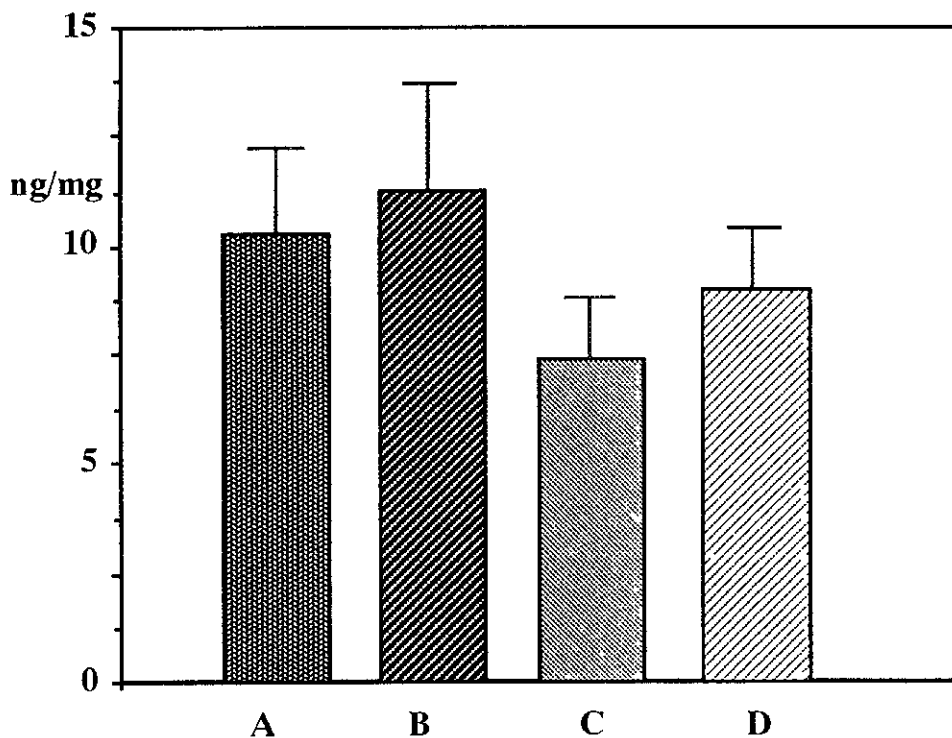


図6 4種の溶媒によるラット毛髪中APAPの抽出効率の比較

Solvent A: メタノール-5 N塩酸 (20 : 1), B: メタノール-トリフルオロ酢酸 (9 : 1), C: アセトニトリル-塩化メチレン-濃アンモニア水 (20 : 80 : 2) 及び D: メタノール-塩化メチレン-濃アンモニア水 (20 : 80 : 2)

C B Z 及び代謝物の定量限界

毛髪中のC B Zの定量は、GC-MSにおける内部標準のピーク面積に対するC B Zのピーク面積の比により、検量線を作製した。本法によれば、毛髪1 mgあたり0.2 ng以上のC B Z、C B Z-epoxide, C B Z-diolを検出・定量する事が可能である。

ラット毛髪中からのカルバマセピン及び代謝物 (CBZ-epoxide, -diol) の検出

ラットコントロール毛髪からの抽出物のSIMクロマトグラム (図7) にはCBZのシリル化体に相当するピークはないことを確認した。一方、CBZ投与のラット毛髪からの抽出物のシリル化体のGC-MS分析の結果、SIMクロマトグラム上の1005分にピークを示し (図8)、その保持時間は標準品CBZのシリル化体のそれと一致し、 m/z 193, 293及び194の主イオンの確認において、CBZであると同定した。

ラットコントロール毛髪からの抽出物のSIMクロマトグラム (図7) にはCBZ-epoxideのシリル化体に相当するピークはないことを確認した。一方、CBZ投与のラット毛髪からの抽出物のシリル化体のGC-MS分析の結果、SIMクロマトグラム上の898分にピークを示し (図9)、その保持時間は標準品CBZ-epoxideのシリル化体のそれと一致し、 m/z 207, 179及び151の主イオンの確認において、CBZ-epoxideであると同定した。

ラットコントロール毛髪からの抽出物のSIMクロマトグラム (図7) にはCBZ-diolのシリル化体に相当するピークはないことを確認した。一方、CBZ投与のラット毛髪からの抽出物のシリル化体のGC-MS分析の結果、SIMクロマトグラム上の1172分にピークを示し (図10)、その保持時間は標準品CBZ-diolのシリル化体のそれと一致し、 m/z 282及び371の主イオンの確認において、CBZ-diolであると同定した。

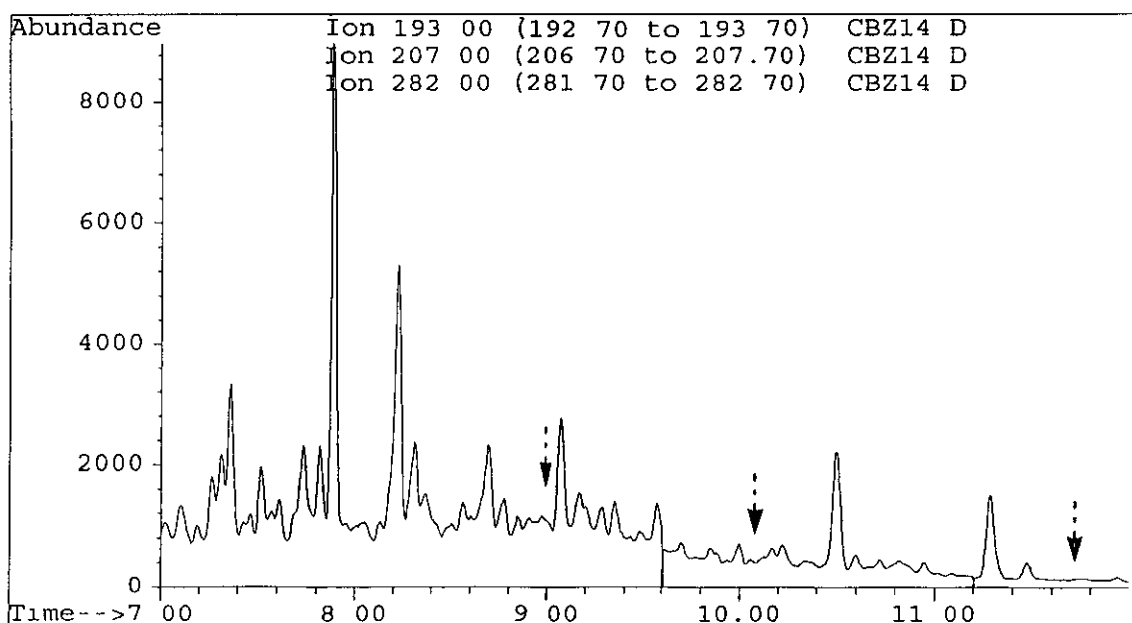


図7 ラットコントロール毛髪からの抽出物のGC-MSクロマトグラム

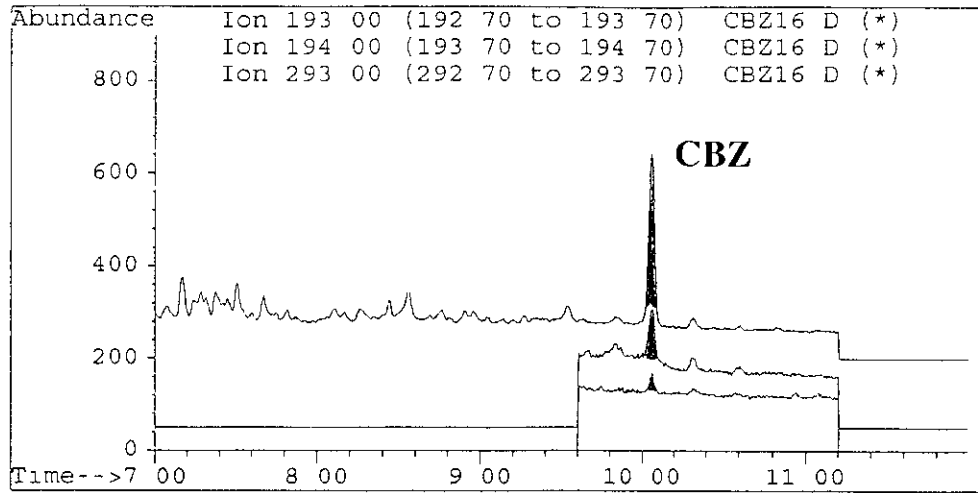


図8 CBZ投与のラット毛髪抽出物のシリル化体のGC-MS (CBZの同定)

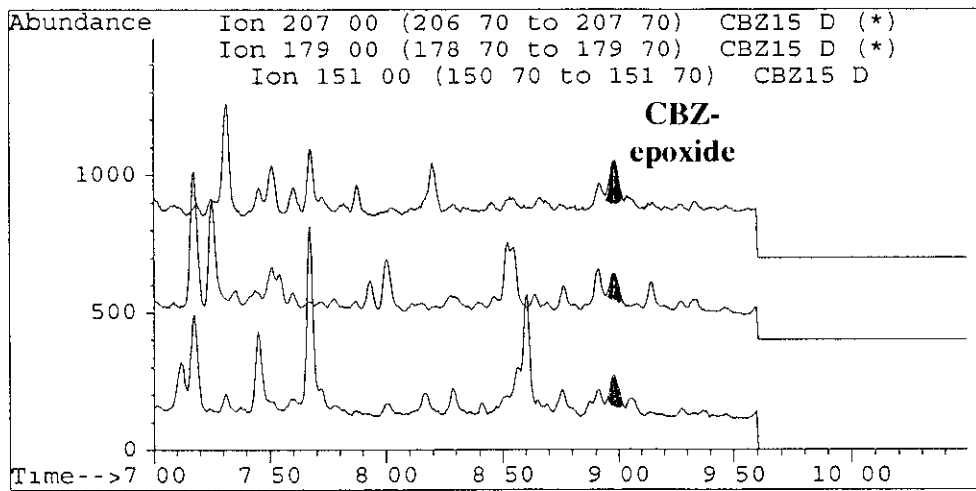


図9 CBZ投与のラット毛髪抽出物のシリル化体のGC-MS (CBZ-epoxideの同定)

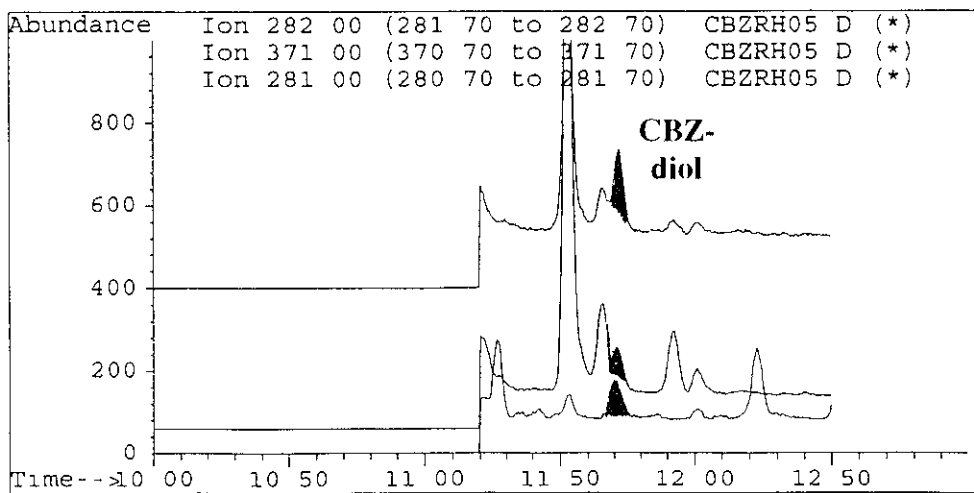


図10 CBZ投与のラット毛髪抽出物のシリル化体のGC-MS (CBZ-diolの同定)

ラット毛髪中のCBZ濃度

ラット毛髪中のCBZ濃度は、平均10.2 ng/mg(8.0~12.3 ng/mg)で、代謝物は定量限界付近の微量であった。

表1 5匹のDAラット毛髪中のCBZ濃度

	CBZ (ng/mg)	CBZ-epoxide (ng/mg)	CBZ-diol (ng/mg)
Rat-1	10.4 ± 2.6	0.2	trace
Rat-2	12.3 ± 3.1	0.3	0.2
Rat-3	8.0 ± 1.6	trace	trace
Rat-4	11.9 ± 3.7	trace	0.2
Rat-5	8.3 ± 1.5	trace	trace

(注 本測定のGC条件は上記の測定時と異なる)

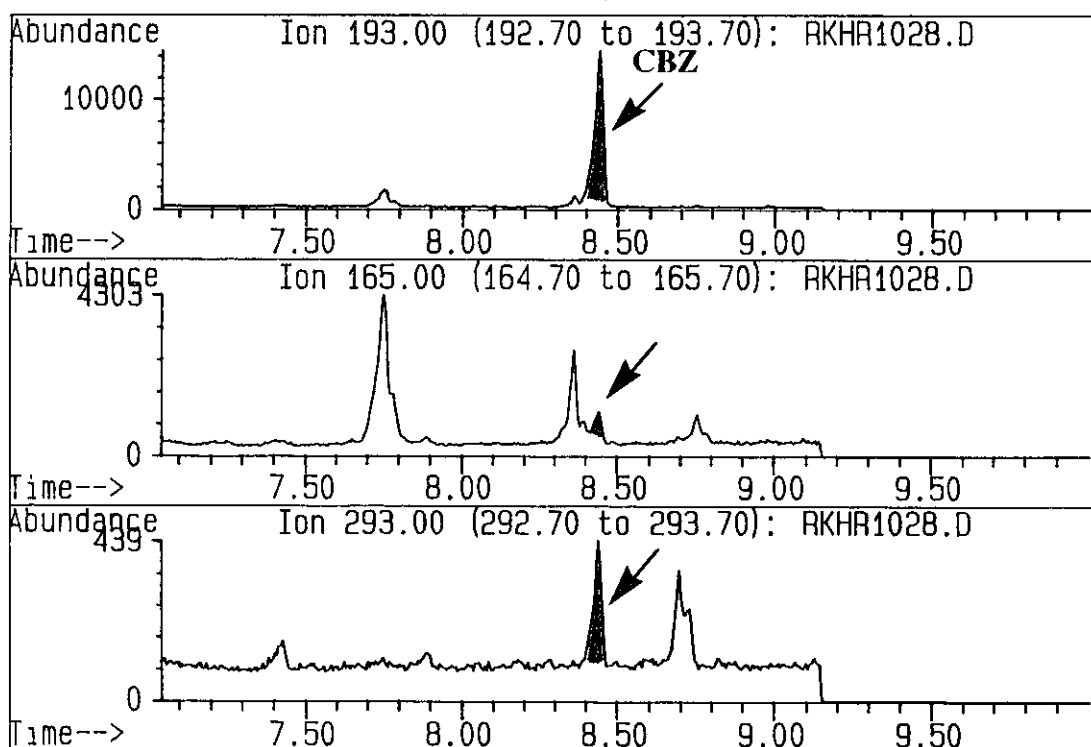


図11 患者の頭髪の毛根試料より得たGC-MSクロマトグラム

カルバマセピン中毒患者の毛髪分析

ヘッドで昏睡状態で発見された22歳の女性の症例で、入院時（13時間後と推定）の血清中のクロルプロマシン濃度は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、1 mL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、カルバマセピンを66.7 ng/mgを検出した（図11）。

（4）おわりに

CBZ投与のラット毛髪 毛根及びヒト頭髪の毛根からCBZ及び代謝物CBZ-epoxideと-diolが微量ながら検出されたか、毛髪中では親化合物のCBZが圧倒的に主成分であった。

今回、CBZ中毒患者の頭髪を分析することができた。急性中毒に陥り、救急病院に運び込まれた患者の毛根に66.7 ng/mgという高濃度のCBZを検出した。このとき用いた試料は毛髪5本の根元側の5mmの部分（重量にして0.3mg）であった。試料採取に特別な道具もいらず、CBZを検出できる毛髪試料は今後の活用が期待される。

文献

- 1) M Eichelbaum et al , Plasma levels of carbamazepine and carbamazepine-10,11-epoxide during treatment of epilepsy Eur J Clin Pharm , 9 417-421 (1976)
- 2) S I Johannessen and R E Strandjord, Concentration of carbamazepine(Tegretol) in serum and in cerebrospinal fluid in patients with epilepsy Epilepsia 14 373-379 (1973)
- 3) M Saloman et al , Acute carbamazepine encephalopathy J Am Med Asso , 231 915 (1975)
- 4) H Gruska et al , Toxicologie und Therapie einer schweren Carbamazepin-Vergiftung Arch Tox , 27 193-203 (1971)
- 5) R A de Zeeuw et al , An unusual case of carbamazepine poisoning with a near-fatal relapse after two days Clin Tox , 14 263-268 (1979)
- 6) B I Vuignier et al , Fatal carbamazepine overdose with seizures role of charcoal hemoperfusion Vet Hum Tox , 28 504 (1986)
- 7) R S Fisher et al , A fatal overdose of carbamazepine case report and review of literature Clin Tox , 26 477-486 (1988)
- 8) 佐藤孝道 編、妊娠と薬、薬事時報社、1992, p 71
- 9) R H Levy et al , Pharmacokinetics of carbamazepine in normal man Clin Pharm Ther , 17 657-668 (1975)

- 10) T Thomson et al , Single-dose kinetics and metabolism of carbamazepine-10,11-epoxide
Cln Pharm Ther , 33 58-65 (1983)
- 11) P L Morselli et al , Metabolism and pharmacokinetics of carbamazepine Drug Met Rev , 4 97-113
(1975)

3. Phenytoinの毛髪分析と診断

(1) 緒言

フェニトイン(Diphenylhydantoin PPH, アレヒアチン、ヒタントール)は硬直性けいれん発作や精神運動発作に広く用いられている。20 mg/kg以上の経口摂取で中毒症状が現れる。

PPHのオーバードーズによる死亡事故はあまり多くないが、中毒事故のケースはよく見られる。p-水酸化の代謝はしばしば肝代謝能力をこえ、代謝能を越えた投与量では血中PPH濃度が上昇し、患者は眼振、運動失調、言葉の不明瞭、困惑などにおちいる。連用し、中毒となった患者の血漿中濃度では、108 µg/mLのPPHが記録されている¹⁾。25才の子供が28gのPPHを飲んだ急性中毒の場合、昏睡状態の子供の血中最大濃度は112 µg/mLであった²⁾。

PPH静脈注射による死亡事故が報告されている。死亡例の各臓器中のPPH濃度は、血液で95 µg/mL、脳で34 µg/mLであった³⁾。

PPHを1回100mg 経口投与後、2～4時間で16～28 µg/mLの最高血清濃度を示した⁴⁾という報告があるが、一方毎日300-400 mg 長期経口投与の患者において、PPHの血漿濃度は平均136 µg/mL(78-175)であった⁵⁾という報告がある。以上の報告データから考えたとき、1～15 µg/mL治療濃度で、20～80 µg/mLか中毒濃度で、100 µg/mL以上になると重度の中毒濃度であることがわかる。

妊娠中にPPHを投与された患者の中に、奇形児を出産した例が多いと報告されている。妊娠マウスにCMP 15～150 mg/kg/dayを経口投与した実験で、50 mg/kg/day以上の群では、奇形発生率の増加が認められている⁶⁾。

PPHは治療量でも、代謝が幾分抑制される。主代謝経路はp-水酸化(p-HPPH)で、PPHは尿毒症の患者の血漿に蓄積する傾向があり、最大37 µg/mLまでに達する。この化合物は弱い抗けいれん効果があり、主にglucuronideとして排泄される⁷⁾。マイナー代謝物として、meta-hydroxy体と3,4-dihydrodihydroxyphenyl体が知られている⁸⁾。

600 mg 単回投与の尿中未変化体の濃度は5 µg/mLを越えることはない。21時間尿のPPHの総排泄量は投与量の4%以下である⁵⁾。HPPHの抱合体尿排泄量は48時間で投与量の23～67%であった⁹⁾。このとき、meta-hydroxy体は5%近く存在する¹⁰⁾。

多くの薬物と相互作用を示すので、併用には、注意を要する。

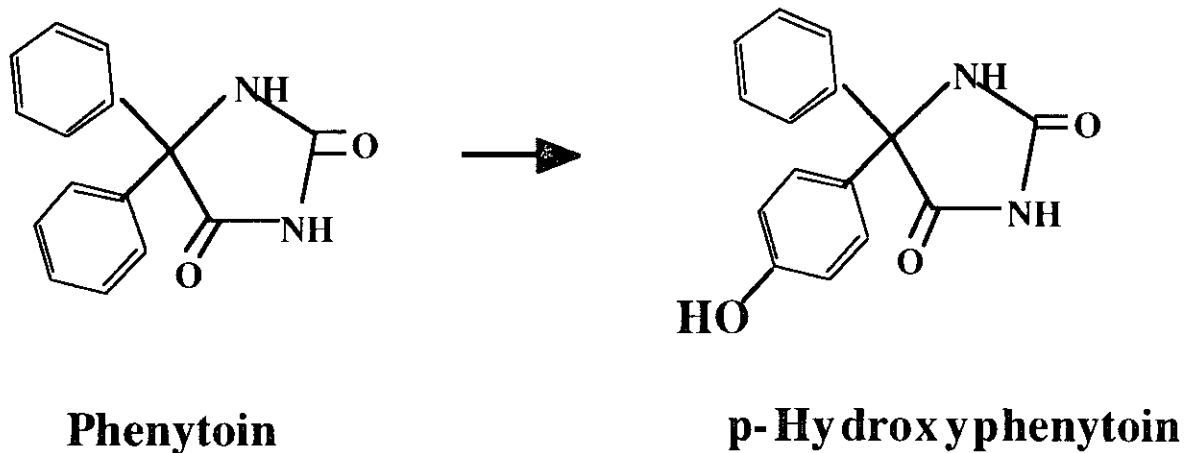


図1 フェニトインと主代謝物p-ヒドロキシフェニトイン

本研究は、フェニトインをラットに投与し、ラット毛髪（有色毛）中のフェニトインとその代謝物を検出する方法を検討し、それらの毛髪濃度とフェニトイン中毒との関係を考察する。また、フェニトインを服用したヒトの頭髪中のPPHとその代謝物についても調べた。

（2）実験材料と実験方法

2-1) 薬品と動物

para-Hydroxy PPH (p-HPPH) 及び5-(4-methylphenyl)-5-phenylhydantoin は筑波大学社会医学系の田中栄之介博士から提供され、Phenytoin (PPH) は和光純薬から、meta-hydroxy PPH, 5-(4-methylphenyl)-5-phenylhydantoin 及びbis-(trimethylsilyl)acetamide (BSA) はAldrich社（米国）から購入し、他の薬品は試薬特級を用いた。

雄性 Dark Agouti(DA) ラットはSLC社（静岡）から5週齢を購入し、1週間の馴化飼育後、薬物投与の実験を行った。

2-2) 毛髪試料

ラット毛髪 ラットの背部の毛を薬物投与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（茶褐色の毛、6週齢）に1日1回、5日間 25 mg/kg のPPHを経口投与した後、最終投与日から17日後に新たに生えてきた背部の毛髪を電気バリカンで採取し、毛幹試料として分析を行った。

ヒト毛髪 ボランティアに1日1回、フェニトイン顆粒錠（PPHとして100mg含有）を5日間服用を依頼し、最終使用日の7日後に頭皮に近い位置でハサミ切断して、頭皮側の5mmを分析試料とした。

2-3) 抽出条件の検討

毛髪からの薬物の抽出の最適化を見いたすために、4種の抽出溶媒 [メタノール-アセトン-濃アンモニア水 (10:10:1)、プロテイナーゼ K, 1M 水酸化ナトリウム及びメタノール-アセトン-トリフルオロ酢酸 (25:25:1)] による抽出効率を、PPH投与のラット毛髪試料を用いて、比較 検討した。

2-4) 分析法

ラット毛髪試料は2 mLの0.1% SDSで2回、2 mLの蒸留水で2回、それぞれ1分間ホルテックスミキサーで洗浄した。乾燥後、約10mgの試料に内標準液(5-(methylphenyl)-5-phenylhydantoin の1 µg/mL MeOH solution) を100 µLを加え、1.5 mLの methanol-acetone-NH₄OH(10:10:1) 中で超音波下に1時間抽出し、室温で一夜放置した。毛髪をろ去後、溶媒は窒素で40°C以下で留去し、残渣に1 mL リン酸緩衝液 (pH 6.0) と1 mL dichloromethane-isopropanol(5:1)を加えてホルテックス抽出し、有機層を分離して、これを窒素気流下に留去した。得られた残渣を100 µLのacetonitrilに溶かし、20 µLの20% tetramethylammonium hydroxide/methanol solution と30 µLのmethyl iodideを加えて、70°C、10分間加温した。反応溶液を窒素気流下に留去し、0.2 mLリン酸緩衝液 (pH 6.0) と1 mL dichloromethane-isopropanol(5:1)を加えてホルテックス抽出し、有機層を分離して、これを窒素気流下に留去した。残渣を50 µL acetoneに溶かし、GC-MSを測定した。

GC-MS測定条件

装置 Hewlett-Packard Model 5890 series-II/MSD5971,

カラム TC-1 capillary (GL Science), 0.25 mm x 30 m (0.25 μm thickness)

キャリアガス ヘリウム(流速, 4.5 psi),

温度条件 注入口, 200°C, 検出器, 280°C

昇温条件, 90°C (0.5-min hold) から 280°Cまで 20°C/分

オートインジェクター Hewlett-Packard Model 7673A autosampler

定量は、内標準5-(4-methylphenyl)-5-phenylhydantoinを用い、選択イオンモニタリングにより PPHはm/z 280、HPPHはm/z 310のイオンで定量した。

図2-4にPPHとHPPHのGC-MSクロマトグラムとマススペクトルを示す。

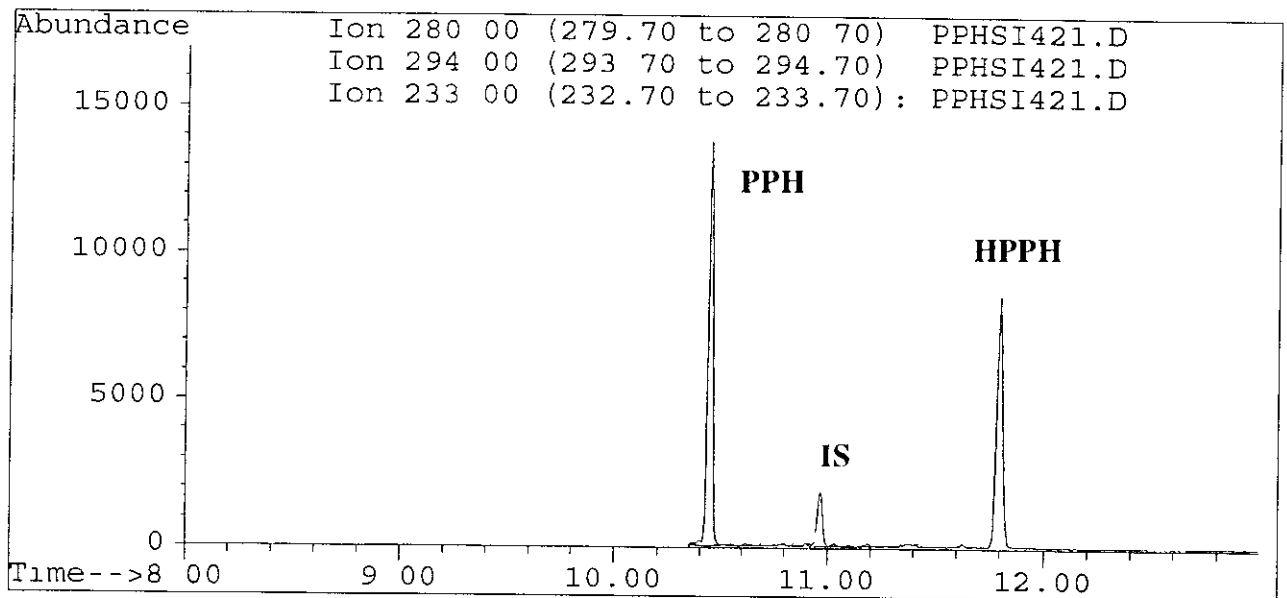


図2 PPHとHPPHのGC-MSクロマトグラム

ISは5-(4-methylphenyl)-5-phenylhydantoin

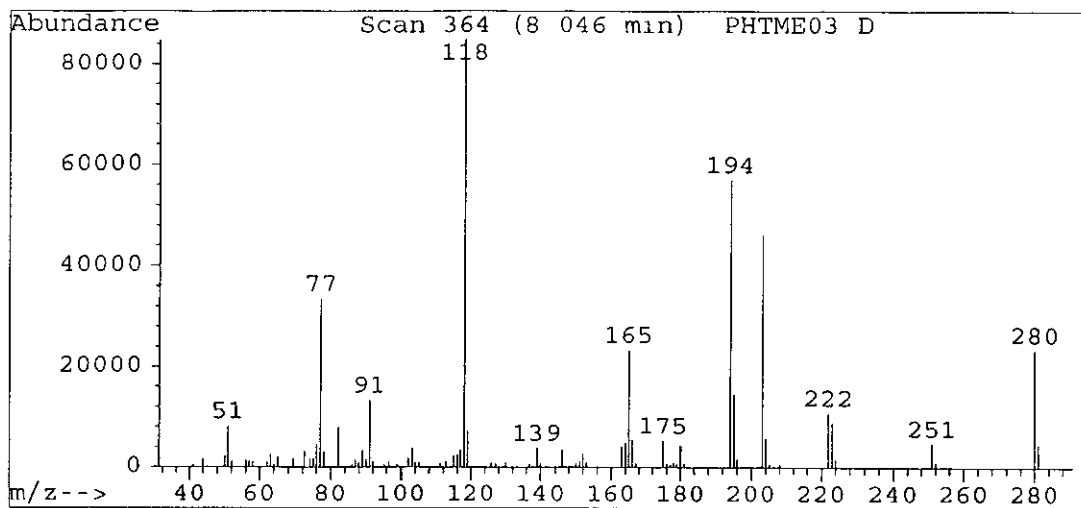


図3 PPHのメチル化体のマスクロマトグラム

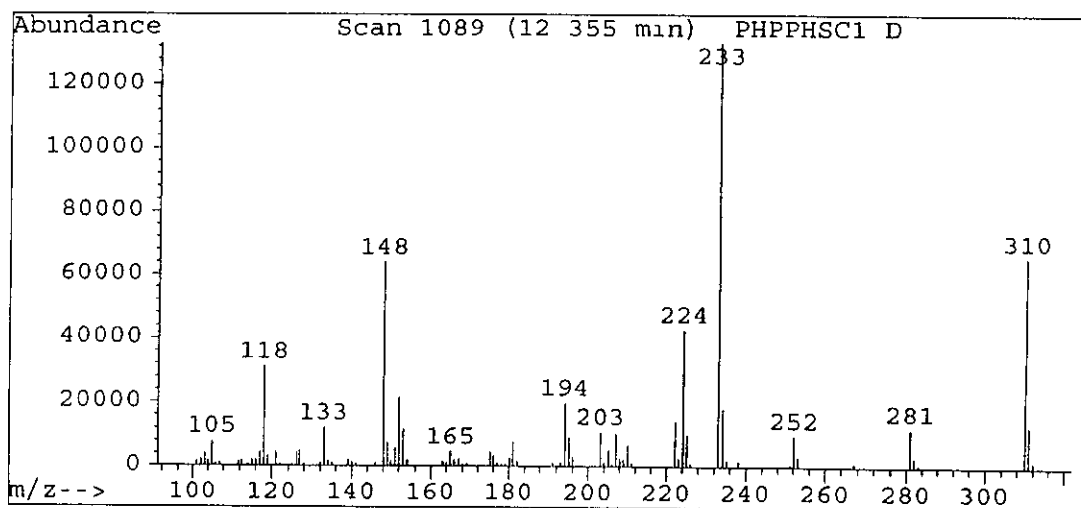


図4 HPPHのメチル化体のマスクロマトグラム

3) 結果と考察

抽出の最適化

毛髪からの薬物の抽出の最適化を見いだすために、4種の抽出溶媒 [メタノール-アセトン-濃アンモニア水 (10/10/1)、プロテイナーゼ K、1M 水酸化ナトリウム及びメタノール-アセトン-トリフルオロ酢酸 (25/25/1)] による抽出効率を、PPH投与のラット毛髪試料を用いて、比較検討した。図5に示すように、PPHの抽出効率は、プロテ