

TFA(9 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0.5 mLの水と0.5 mLの緩衝液 (pH6) を加え、さらに酢酸エチル2 mLを加えて、ホルテックスミキサーで抽出を行った。有機層を分離し、窒素で40°C以下で留去して残渣を得た。この残渣にTFA 100  $\mu$ LのHFIP 20  $\mu$ Lを加え、超音波下に30分間誘導体化を行った。反応溶液は窒素で留去後、酢酸エチル 100  $\mu$ Lに溶解して、その1  $\mu$ LをGC-MSに注入して、下記の条件で分析した。

#### 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  $\mu$ 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, 60°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

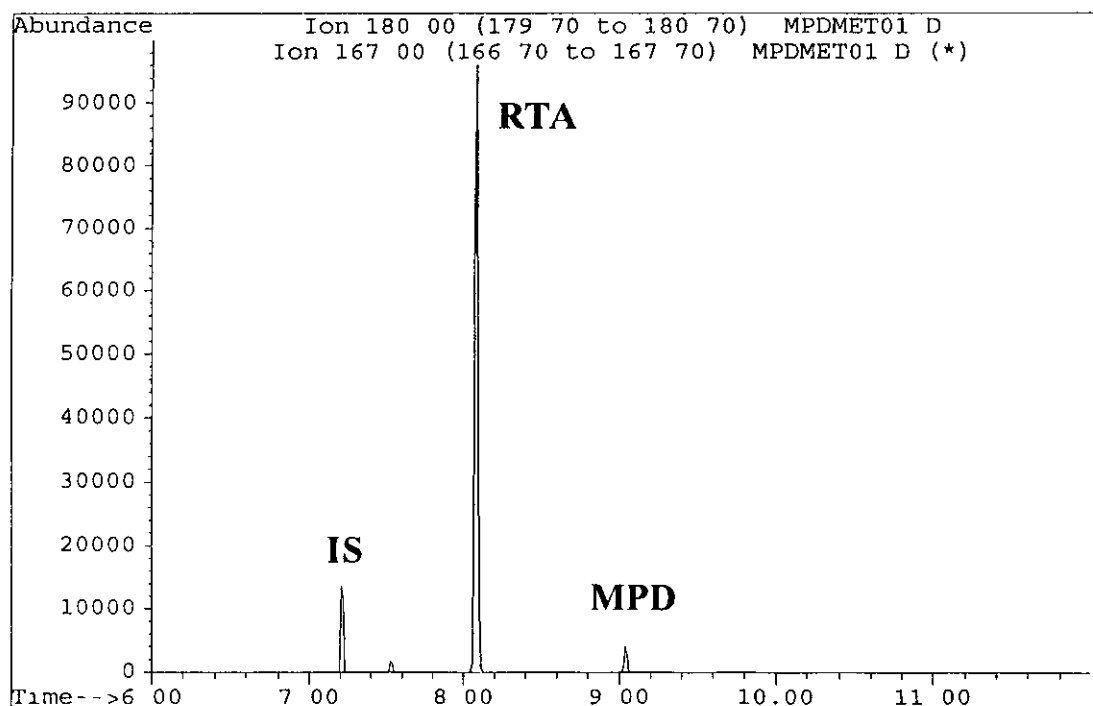


図2 メチルフェニデートとリタリン酸のTFA誘導体のマスクロマトグラム

図2-4にMPDとRTAのTFZ化体のマスクロマトグラム及びマススペクトルを示す。  
 内標準phenmetrazine (m/z 167) を用い、選択イオンモニタリングによりMPDとRTA  
 にはm/z 180のイオンで定量した。

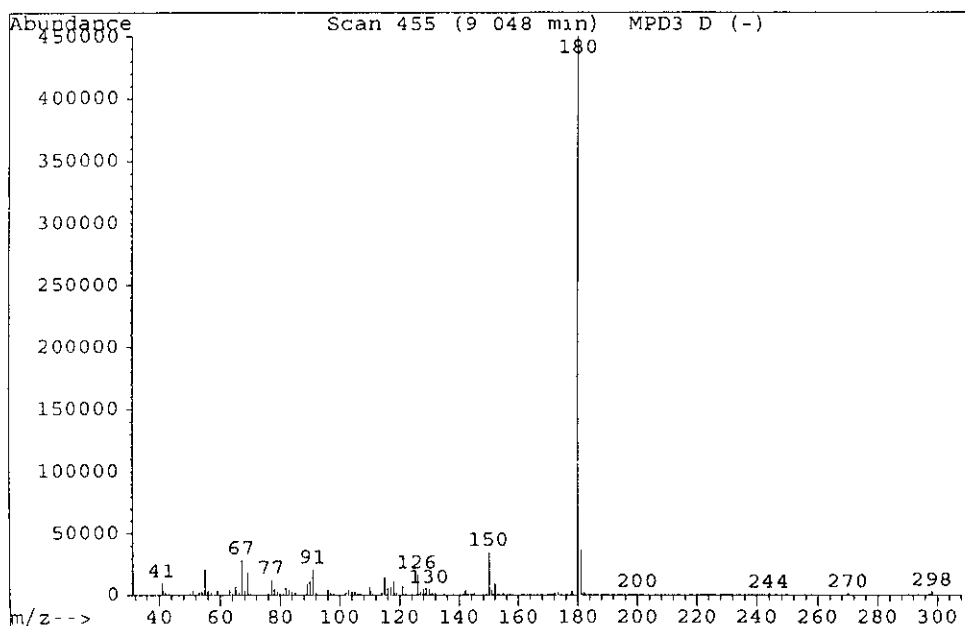


図3 メチルフェニテートのTFA誘導体のマススペクトル

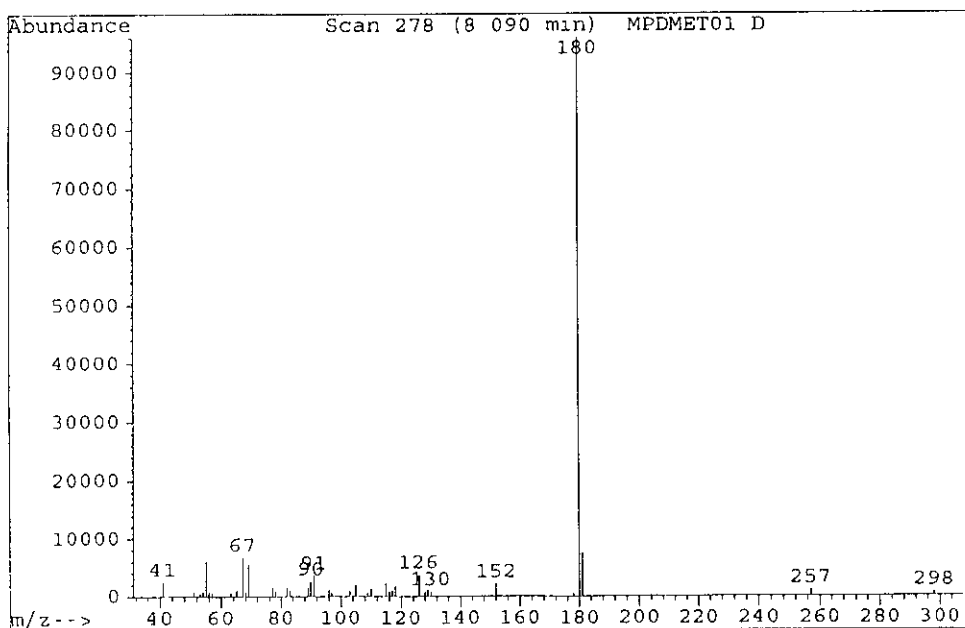


図4 リタリン酸のTFA-HFIP誘導体のマススペクトル

### (3) 結果と考察

MPDは化学的に加水分解を受けやすいので、メタノール-塩酸では抽出中に分解が認められたので、毛髪からの抽出はメタノール-トリフルオロ酢酸 (TFA) [9 1] を用いた。また、MPDとRTAの誘導體化について、シリル化とアシル化を検討したところ、TFA-PFIP(100-20 $\mu$ L)が2つの化合物の定量にもっとも良好な結果を示した。

#### ラット毛髪中からのメチルフェニデート及び代謝物の検出

図5, 6にコントロールラット毛髪とMPD投与のラット毛髪からの抽出物のGC-MSクロマトグラムを示す。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5)にはMPD及びRTAに相当するピークはなく、MPD投与のラット毛髪からの抽出物のGC-MS分析の結果、SIMクロマトグラム上の9.05分にピークを示し(図6)、その保持時間は標準品MPDのTFA化体のそれと一致し、 $m/z$  180及び150の主イオンの確認において、MPDであると同定した。しかし、RTAに相当するピーク(8.09分)は見あたらなかった。

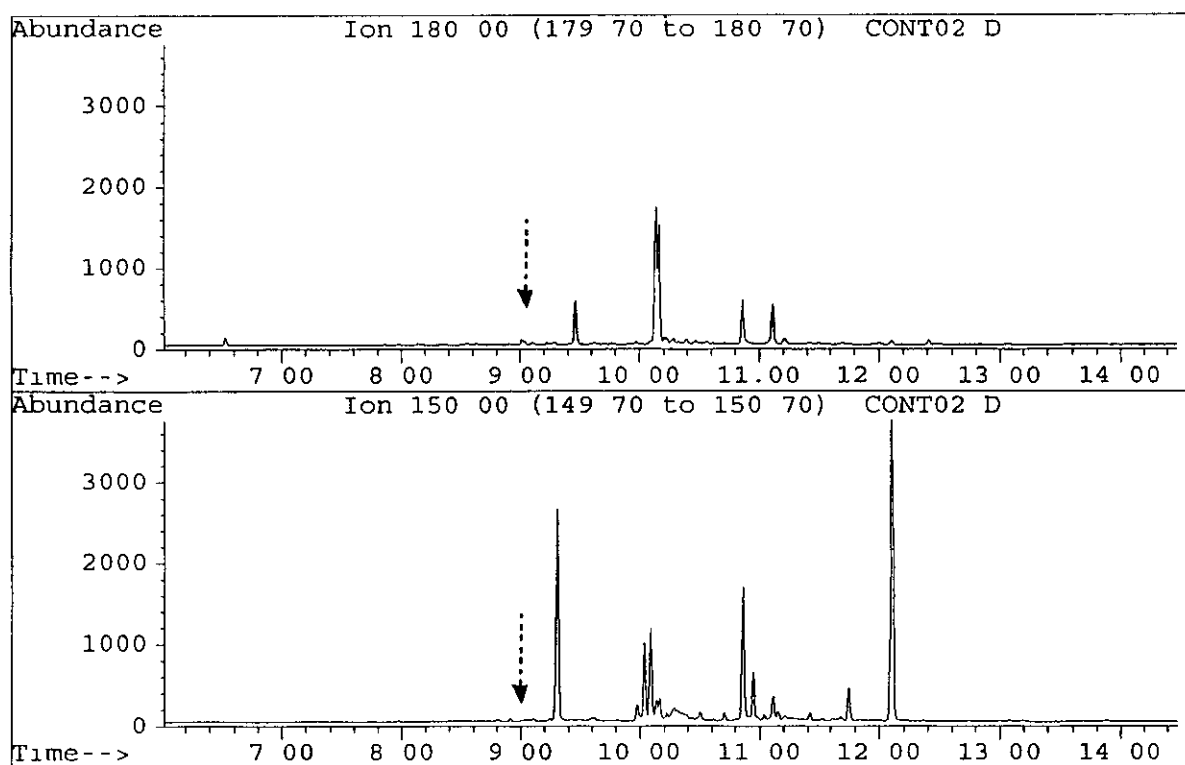


図5 コントロールラット毛髪からの抽出物のGC-MS

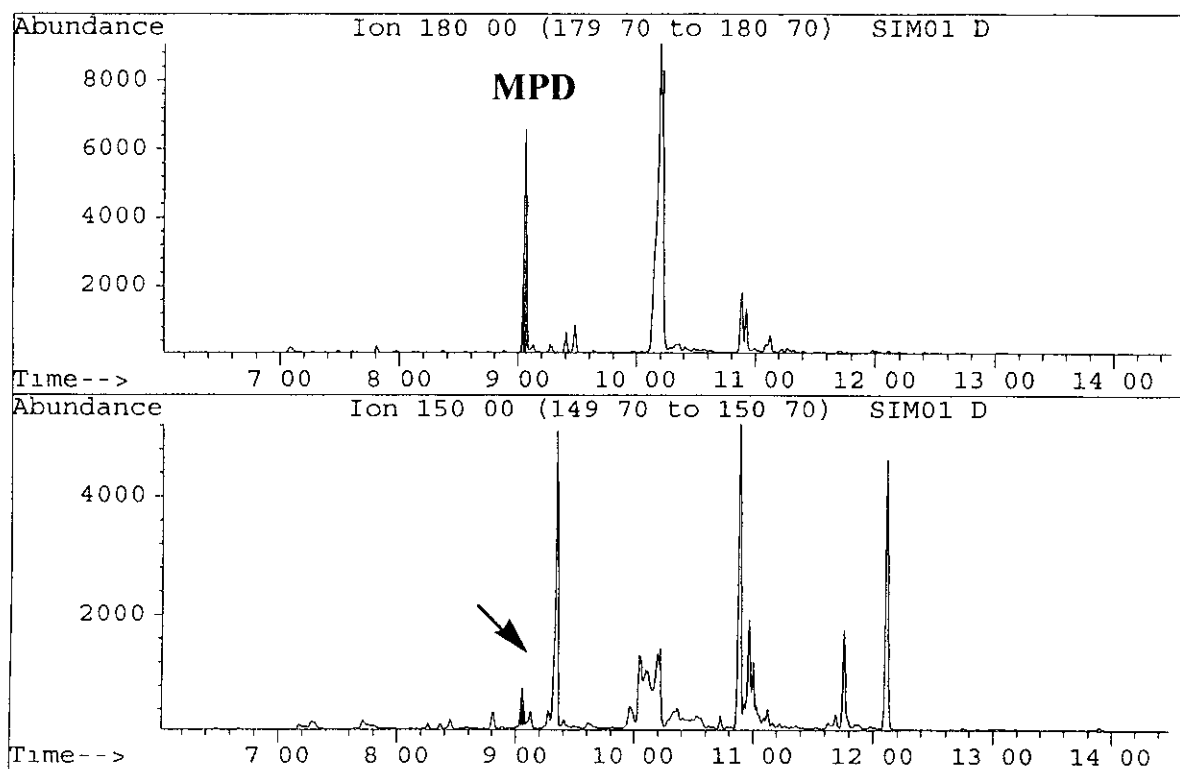


図6 メチルフェニテート投与ラット毛髪からの抽出物のGC-MS

緒言でも述べたように、血中では代謝物のRTAが親化合物のMPDより高濃度で存在し、顕著に主成分であることが推察される。にもかかわらず、毛髪中ではRTAはほとんど検出されず、MPDが比較的高濃度で検出された。我々の以前の研究<sup>7)</sup>でも見られたように薬物の血中から毛髪への移行性に関しては、塩基性物質（この場合MPD）が酸性または両性物質（この場合RTA）より圧倒的に毛髪移行性が高いことが実証されている。MPDの動物実験でもこの仮説が正しいことが支持された。

#### ラット毛髪中のMPD濃度

表1に示すように、ラット毛髪中のMPD濃度は、平均16.5 ng/mg(14.5~20 ng/mg)であった。この濃度は比較的高い濃度といえる。

表1 5匹のDAラット毛髪中のMPD濃度

	MPD (ng/mg)
Rat-1	20.0 ± 6.6
Rat-2	14.5 ± 4.1
Rat-3	15.0 ± 3.6

(4) おわりに

MPD投与のラット毛髪からMPDを検出した。しかしながらMPD投与のラット毛髪中には代謝物 RTA は見られなかった。毛髪への移行性は塩基性かつ脂溶性であることが優先されることを再確認した。

今回、メチルフェニデート使用者の頭髪を入手できなかったが、動物実験の結果から考えると、メチルフェニデート中毒の証明が必要になったときは、本研究で得られた効率的な検出法を用いて、その中毒原因を解明できるものと思われる。

#### 参考文献

- 1) R Milberg et al , A reproducible gas chromatographic mass spectrometric assay for low levels of methylphenidate and ritalinic acid in blood and urine Biomed.Mass Spec , 2: 2-8 (1975)
- 2) B L Hungund et al , Pharmacokinetics of methylphenidate in hyperkinetic children Brit J Clin Pharm , 8. 571-576 (1979)
- 3) P E Dayton et al , Physiological disposition of methylphenidate C-14 in man Fed.Proc , 29: 345 (1970)
- 4) M F Bartlett et al , Disposition and metabolism of methylphenidate in dog and man Fed Proc , 31 537 (1972).
- 5) R Dugal et al , The nitrogen-phosphorus detector in the gas chromatographic assay of unmetabolized methylphenidate J Anal Tox., 2 101-106 (1978)
- 6) B Levine et al , Fatality resulting from methylphenidate overdose. J Anal.Tox., 10 209-210 (1986)
- 7) Y Nakahara, R Kikura, Hair analysis for drug abuse XIII Effect of Structural Factors on Incorporation of Drugs into Hair the incorporation rates of amphetamine analogs Arch Toxicol , 70 841-849(1996)

## 6. Pentazocineの毛髪分析と診断

### (1) 緒言

ペンタゾシン(PTC)はベンゾモルファン構造を持ち、モルヒネの1/5程度の鎮痛効果があり、弱いモルヒネ拮抗剤でもある。PTCは乳酸塩として通常筋肉内注射で初期は30mg、塩酸塩の経口剤として50-100mg投与される。

ペンタゾシンは鎮痛剤として術後、各種癌の痛み、心筋梗塞、胃十二指腸潰瘍、腎尿路結石等に用いられる。また麻酔前投薬および麻酔補助としても用いられる。本品は鎮痛に1回15mgを筋肉内または皮下注射し、その後必要に応じて3~4時間毎に反復注射する。麻酔前投薬および麻酔補助に30~60mgを筋肉内、皮下または静脈内に注射する。

PTCの副作用は頭痛、めまい、嘔吐、発汗、口の渇き、低血圧、心悸亢進、呼吸抑制、アジテーション、幻視、震えなどが知られている。PTCによる呼吸抑制はnalorphineやlevallorphanでは取り除けないが、naloxoneではこの副作用を取り除くことができる。PTCは乱用依存能は弱い、1日12gまで使用した乱用例が報告されている<sup>1)</sup>。

死亡例における、PTCの血中濃度は一般に1-5 $\mu$ g/mLで、コティンのそれと近い。静脈注射を除き、脳中濃度はしばしば血中濃度を超え、呼吸器官はかなりのPTC濃度を示す。PTCとtripelennamineの併用での静脈注射でオーバートーズで死亡した14人のヒトの血中PTC濃度は0.4-1.1 $\mu$ g/mLであった<sup>2)</sup>。

PTCを45mg/kgを筋肉内注射で8人の被験者に与えたとき、摂取15から60分間に最高血漿濃度は平均0.14 $\mu$ g/mLとなり、21時間の半減期で減少する。75mgの経口投与では、2-3時間に最高血漿濃度は0.16 $\mu$ g/mLを示した<sup>3)</sup>。患者に30mgの静脈注射5-10分後、0.2-1.0 $\mu$ g/mLの血漿中濃度となることか報告されている<sup>4)</sup>。

PTCは代謝が速く、ジメチルアリル側鎖のメチル基の酸化とglucuronide抱合化がおこる。動物実験から血中に代謝物の遊離体と抱合体のほとんどが存在し、脳-血液関門は未変化のPTCしか通過しないし、脳中PTC濃度は血液中濃度を常に上回っている<sup>5)</sup>。経口でのバイオアベラビリティは11-32%で、多くは初回通過の時代謝されて、代謝物となる<sup>6)</sup>。

PTC 566mg経口摂取の4人の被験者の24時間尿中には、遊離体と抱合体を合わせて、PTC(9.5%)、cis-hydroxyPTC(11.6%)、trans-carboxyPTC(38.9%)

か検出され、trans-hydroxyPTCは検出されなかった<sup>7)</sup>。100mgの経口投与で、4人の被験者の尿中（酸性）に投与量の3-15%排泄された<sup>8)</sup>。

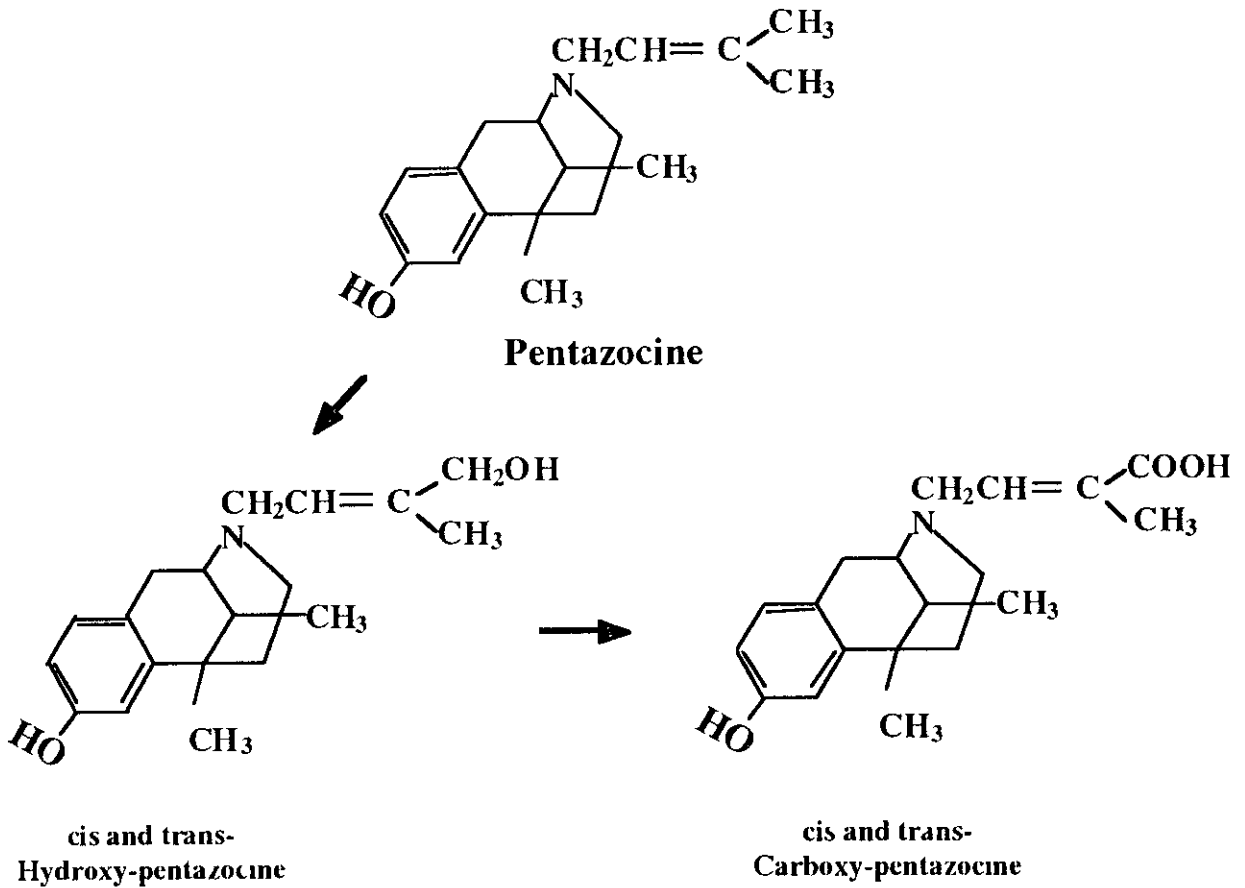


図1 ペンタゾシンの主代謝経路

本研究は、ペンタゾシンをラットに投与し、ラット毛髪（有色毛）中のペンタゾシンとその代謝物を検出する方法を検討し、ペンタゾシン中毒の検査に応用するために必要な基本データをまとめる。

## (2) 実験材料と実験方法

### 2-1 薬品と動物

ペンタゾシン（PTC）及びコティンは三共製薬から提供されたものを用いた。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 50 mg/kg のPTC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。

## 2-3 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10 mgの試料に内標準液(codeine 1 µg/mL methanol soln) を100 µLを加え、2 mLのmethanol-5N HCl(20:1) 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、残渣に水0.5 mL,リン酸緩衝液 (pH 6) 0.5 mLを加えて溶かし、定法に従いBond Elute Certifyで抽出 精製後、溶出液を窒素気流下に留去した。残渣に100 µLのBSAを加え、90°C、20分間加温後、その1 µLをGC-MSに注入して、下記の条件で分析した。

### 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 20 m with a 0.25 µm 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, 60°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



図2, 3にPTCのBSA化体のマスクロマトグラム及びマススペクトルを示す。

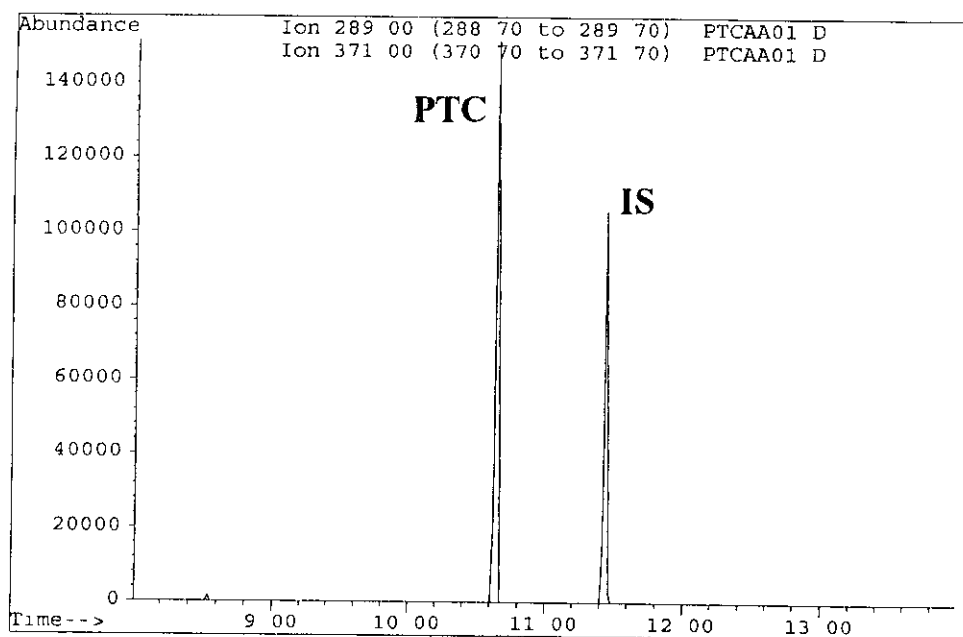


図2 ペンタゾシンのBSA化体のマスクロマトグラム

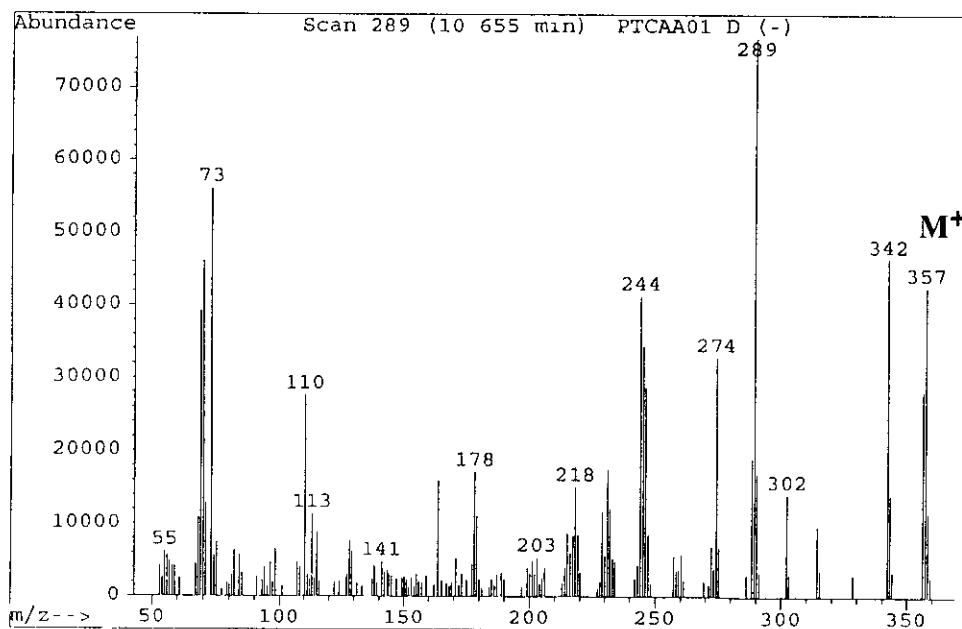


図3 ペンタゾシンのBSA化体のマススペクトル

内標準codeine (m/z 371) を用い、選択イオンモニタリングによりPTCにはm/z 289のイオンで定量した。また、予想される Hydroxy代謝物の検索にはm/z 289,342,430を用いた (図2参照)。

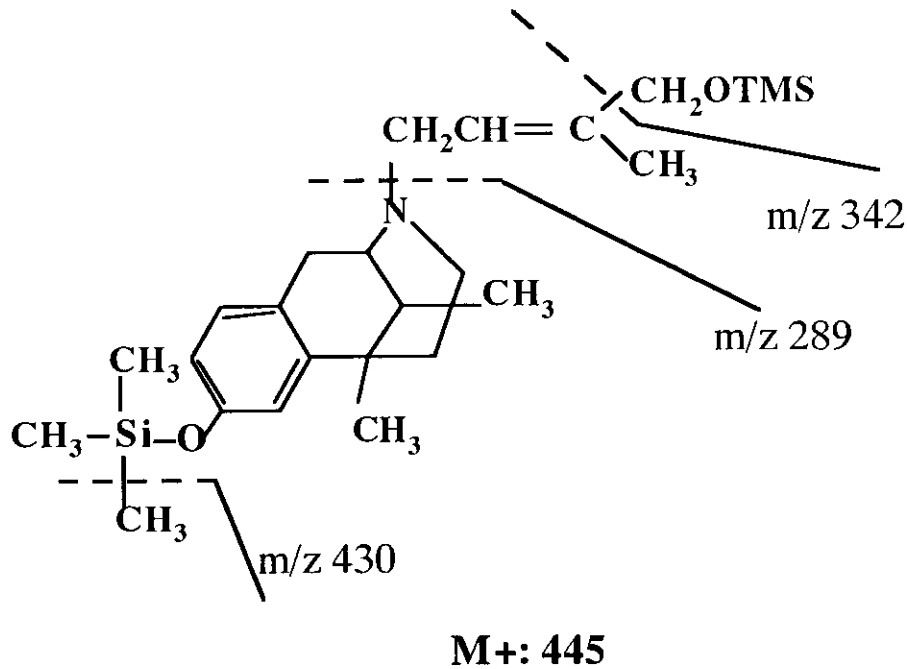


図4 Hydroxy代謝物 (TMS誘導化体) の予想されるマス主要イオン

### (3) 結果と考察

PTCは塩基性薬物であり、化学的にも比較的安定なので、毛髪からの抽出はメタノール-塩酸 [20 1] を用いた。また、PTCの誘導体化は、BSAによるシリル化を用いた。内部標準物質には比較的化学構造が類似し、化学的性質が近いコデインを用いた。

#### ラット毛髪中からのペンタソシン及び代謝物の検出

図5, 6にコントロールラット毛髪とPTC投与のラット毛髪からの抽出物のGC-MSクロマトグラムを示す。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5)にはPTCに相当するピークはなく、PTC投与のラット毛髪からの抽出物のGC-MS分析の結果、SIMクロマトグラム上の10.63分にピークを示し(図6)、その保持時間は標準品PTCのTMS化体のそれと一致し、m/z 289,342及び357の主イオンの確認において、PTCであると同定した。また、予想される Hydroxy代謝物の検索にm/z

289,342及び430を用いて検索したところ、図5のコントロールのクロマトには見られないピークが図7の11 80と12 07分に2つのピークが見られた。標準品がない現時点では、確定はできないが、PTCのhydroxy代謝物のcis体とtrans体であろうと推定される。これらは親化合物PTCに比へ著しく低濃度であった。

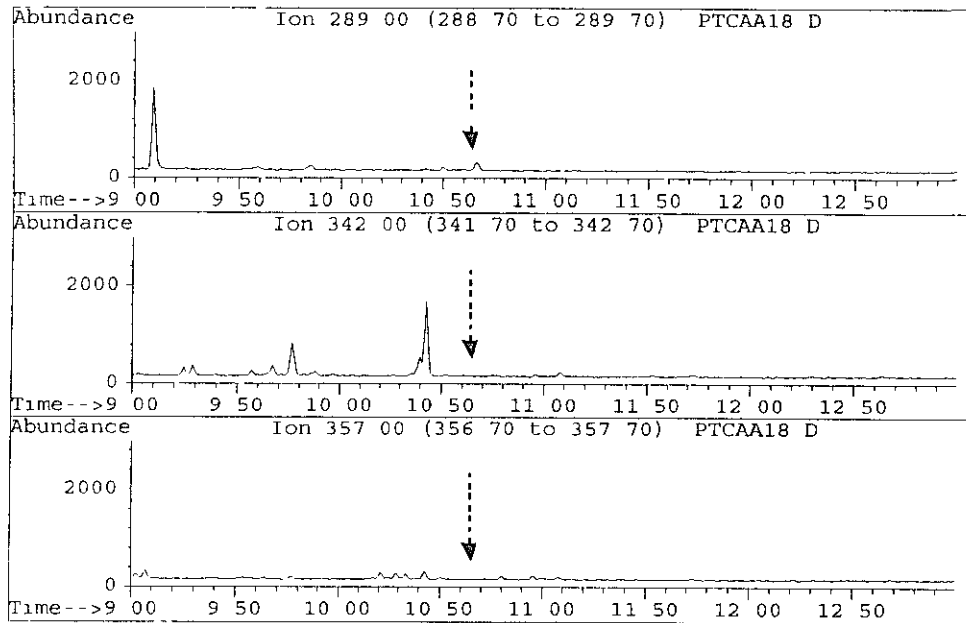


図5 コントロールラット毛髪からのGC-MSクロマトグラム

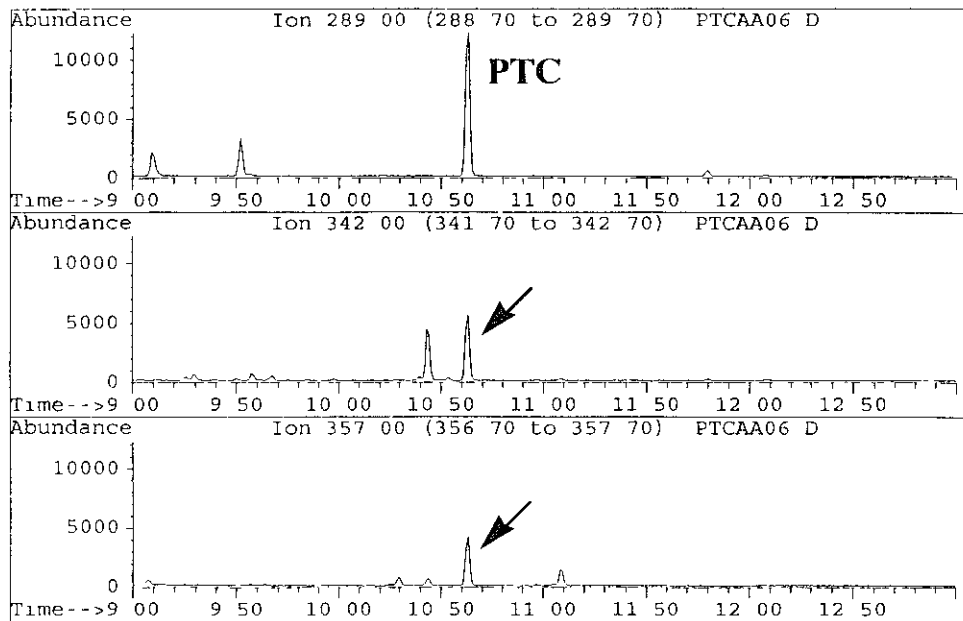


図6 PTC投与のラット毛髪からのGC-MSクロマトグラム(PTCの検出)

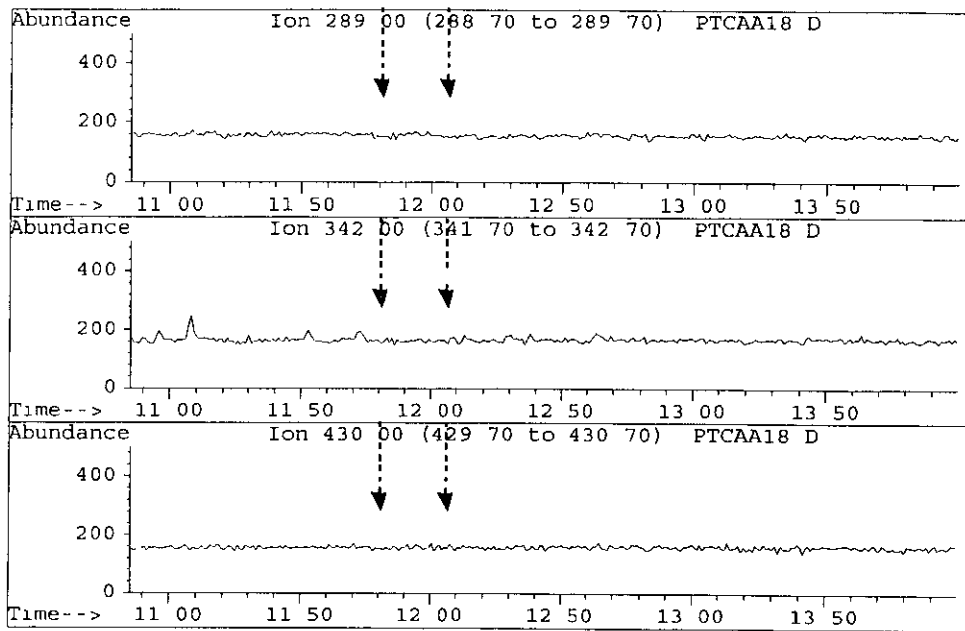


図7 コントロールラット毛髪からのGC-MSクロマトグラム

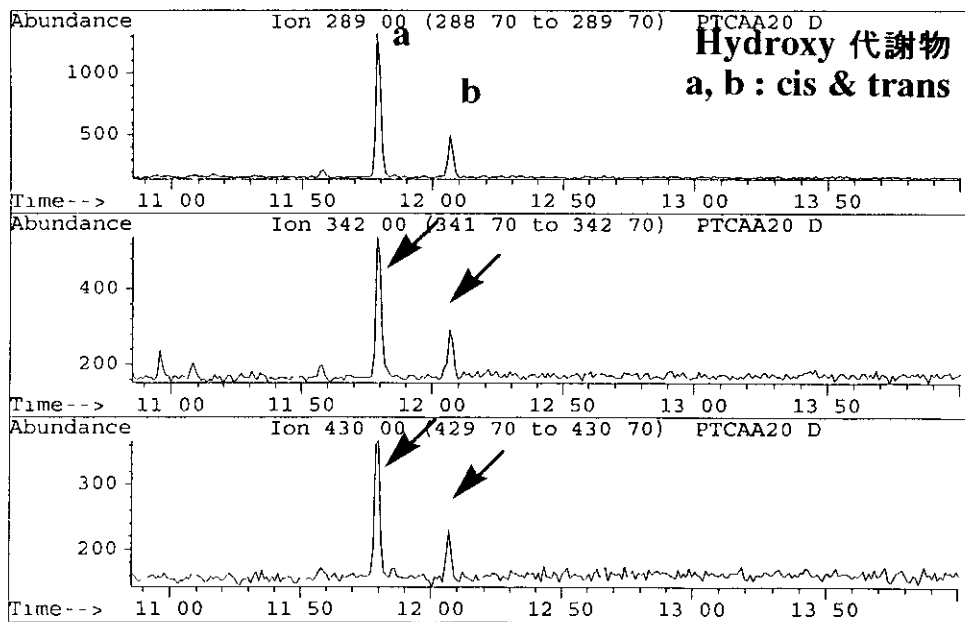


図8 PTC投与のラット毛髪からのGC-MSクロマトグラム(Hydroxy代謝物の検出)

我々の以前の研究<sup>9)</sup>でも見られたように薬物の血中から毛髪への移行性に関しては、脂溶性の高い親化合物（この場合PTC）か水溶性の増した代謝物（この場合Hydroxy代謝物）より毛髪移行性が高いことが実証されている。この動物実験でもこの仮説が正しいことが支持された。

#### ラット毛髪中のPTC濃度

表1に示すように、ラット毛髪中のPTC濃度は、平均57.0 ng/mg(49.6~65.4 ng/mg)であった。この濃度はかなり高い濃度といえる。

表1 3匹のDAラット毛髪中のMPD濃度

	MPD (ng/mg)
Rat-1	56.0 ± 6.9
Rat-2	65.4 ± 7.7
Rat-3	49.6 ± 3.8

#### (4) おわりに

ペンタゾシン投与のラット毛髪から高濃度のPTCを検出した。また、予想されたhydroxy代謝物のcis体とtrans体と思われる一対のピークか3つの主要イオンで現れた。標準品を持っていない現時点では確認はできないが、かなりの確率で代謝物の存在を示したものである。また、この動物実験でも確かめられたが、脂溶性の高い親化合物が優先的に毛髪へ移行するという仮説を再確認した。

今回、ヒトの頭髪を入手できなかったか、動物実験の結果から考えると、ペンタゾシン中毒の証明が必要になったときは、本研究で得られた効率的な検出法を用いて、その中毒原因を解明できるものと思われる。

#### 参考文献

- 1) J A Inciardi et al , Patterns of pentazocine abuse and addiction N Y State J Med , 71 1727-1733 (1971)
- 2) J R Montforte et al , Toxicological and pathological findings in fatalities involving pentazocine and

tripelennamine *J For Sci* , 28 90-101 (1983)

3) B A Berkowitz et al , Relationship of pentazocine in biological samples by partition chromatography as ion pair in micro-columns *Acta Pharmac Suecica* 7 673-680 (1970)

4) M Ehrnebo et al , Pentazocine binding to blood cells and plasma proteins *Clin Pharm Ther* , 16 424-429 (1974)

5) K A Pittman, Pentazocine in rhesus monkey plasma and brain after parenteral and oral administration. *Life Sci* , 12 131-143 (1973)

6) M Ehrnebo et al , Bioavailability and first-pass metabolism of oral pentazocine in man *Clin Pharm Ther* , 22 888-892 (1977)

7) K A Pittman, Human metabolism of orally administered pentazocine *Biochem Pharm* , 19 1833-1836 (1970)

8) A H Beckett et al , The absorption, distribution and excretion of pentazocine in man after oral and intravenous administration *J Pharm Pharmac* , 22 123-128 (1970)

9) YNakahara, R Kikura, Hair analysis for drug abuse XIII Effect of Structural Factors on Incorporation of Drugs into Hair the incorporation rates of amphetamine analogs *Arch Toxicol* , 70 841-849(1996)

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：HPLC-ESI/MS によるベンゾジアゼピン系  
向精神薬の毛髪分析

Hair analysis of benzodiazepine hypnotic agents by  
HPLC-ESI/MS

静岡県立大学 薬学部 豊岡 利正

## 目次

### 緒言

## 第 1 章 TZ 及びその代謝物の HPLC-ESI/MS による測定法の検討

### 1-1 緒論

#### 1-2 実験材料及び装置

##### 1-2-1 試薬及び試液

##### 1-2-2 固相抽出装置

##### 1-2-3 測定装置

#### 1-3 実験方法

##### 1-3-1 移動相溶媒の決定

##### 1-3-2 前処理法の検討

#### 1-4 実験結果及び考察

##### 1-4-1 移動相溶媒の決定

##### 1-4-2 固相抽出による前処理法の検討

## 第 2 章 毛髪分析法の確立及び TZ とその代謝物の測定

### 2-1 緒論

#### 2-2 実験材料及び装置

##### 2-2-1 試薬及び試液

##### 2-2-2 実験動物

##### 2-2-3 測定装置



## 2-3 実験方法

- 2-3-1 セミマイクロカラムを用いた HPLC 条件の検討  
及び検量線の作成
- 2-3-2 動物実験操作法
- 2-3-3 体毛及び毛根の前処理法
- 2-3-4 ラット肝マイクロソームによる TZ の代謝実験
- 2-3-5 未知代謝物の構造確認

## 2-4 結果及び考察

- 2-4-1 TZ 及びその代謝物の検量線
- 2-4-2 ラット体毛及び毛根の測定結果
- 2-4-3 アセチル化による水酸化代謝物の確認

## 第3章 毛根中 TZ の経時変化

### 3-1 緒論

### 3-2 実験材料及び装置

- 3-2-1 試薬及び試液
- 3-2-2 測定装置
- 3-2-3 実験動物

### 3-3 実験方法

- 3-3-1 測定条件の検討及び検量線作成
- 3-3-2 TZ 投与ラット毛根の測定
- 3-3-3 TZ 投与ラット血漿の測定

### 3-4 結果及び考察

- 3-4-1 測定条件の検討及び検量線の作成
- 3-4-2 毛根中の TZ 及びその代謝物の経時変化

3-4-3 血漿中の TZ 及びその代謝物の経時変化

## 第 4 章 ベンゾジアゼピン系向精神薬の毛髪分析

### 4-1 緒論

### 4-2 実験材料及び装置

4-2-1 試薬及び試液

4-2-2 実験動物及び測定装置

### 4-3 実験方法

4-3-1 動物実験投与方法

4-3-2 体毛及び毛根の前処理法

4-3-3 測定条件の検討

### 4-4 結果及び考察

4-4-1 分離・分析条件の検討

4-4-2 ALP 投与ラットの体毛及び毛根分析

4-4-3 EST 投与ラットの体毛及び毛根分析

4-4-4 MDZ 投与ラットの体毛及び毛根分析

## 第 5 章 ヒト毛髪分析への応用

### 5-1 緒論

### 5-2 実験材料及び装置

5-2-1 試薬及び試液

5-2-2 測定装置

5-2-3 ヒト毛髪

### 5-3 実験方法

5-3-1 測定条件の検討及び検量線作成

5-3-2 毛髪の前処理法

### 5-4 結果及び考察

5-4-1 測定条件の検討及び検量線の作成

5-4-2 ヒト毛髪分析

総括

参考文献

略語表

TZ Triazolam

ALP Alprazolam

EST Estazolam

MDZ Midazolam

1-OH TZ 1-hydroxymethyltriazolam

4-OH TZ 4-hydroxytriazolam

1-OH TZ d4 1-hydroxymethyltriazolam-d4

1,4-d<sub>1</sub>OH TZ 1-hydroxymethyl-4-hydroxytriazolam

1-OH ALP  $\alpha$ -hydroxyalprazolam

1-OH ALP d5  $\alpha$ -hydroxyalprazolam-d5

EST d5 Estazolam-d5

TFA trifluoroacetic acid

SDS sodium dodecylsulfate

ESI Electrospray Ionization

DAD Diode Array Detector

MS mass spectrometer

DA rat Dark Agouti rat

SIM selective ion monitoring

RT retention time