

キャリアガス：ヘリウム 1 ml/min

【注解】

ガスクロマトグラフ質量分析法は、薬毒物分析において最も信頼度の高い同定法で、電子衝撃イオン化 (EI) 法で標準品のマススペクトルと一致すれば同一物質と断定できる。窒素リン検出器付ガスクロマトグラフ法で検出された化合物の確認や窒素やリンを含まない化合物の検出を行う。また、濃縮乾固すると揮発してしまう化合物（ジクロロボス、クレゾールなど）の検出のために試料から抽出後、濃縮操作を行っていないが、検出感度向上のため揮発性の高い化合物の確認を行った後濃縮操作を行ってもよい。

6. 紫外可視検出器付高速液体クロマトグラフ法 (HPLC) : ベンゾジアゼピン系薬物, 有機リン剤, バルビタール系薬物, ブロムワレリル尿素, アセトアミノフェン, テオフィリン, カルバメート剤の検索

・処理操作

試料 100  $\mu$ l にアセトニトリル 100  $\mu$ l を加え、ボルテックスミキサにて攪拌後、遠心分離 (12000-g, 5分) した上清 20  $\mu$ l を分析装置に注入。

・HPLC の分析条件

装置：Waters M-600 & M-490E

検出器：紫外可視検出器 (210 nm, 250 nm)

カラム：Nova-Pak C18 (15 cm x 3.9 mm, 4  $\mu$ m)

移動相：水 → 10 min → アセトニトリル：水 (1 : 1) → 10 min → アセトニトリル

流速：1 ml/min

【注解】

紫外可視検出器付高速液体クロマトグラフ法は、高極性化合物や難揮発性化合物、熱不安定性化合物などのガスクロマトグラフでの分析が難しい化合物（アセトアミノフェン、ブロムワレリル尿素、カルバメート系農薬など）の検出を主な目的に行っている。

症例1-尿

1. 定性分析

- 1) ヘッドスペースガスクロマトグラフ法：アセトニトリルに一致するピークが検出された。（図1）

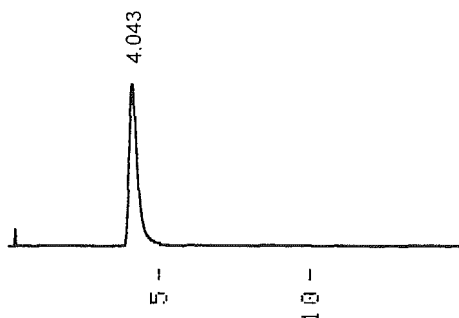


図1 ヘッドスペースガスクロマトグラフによる有機溶媒の検索

- 2) 乱用薬物スクリーニング検査キット：BAR 陽性。（図2）

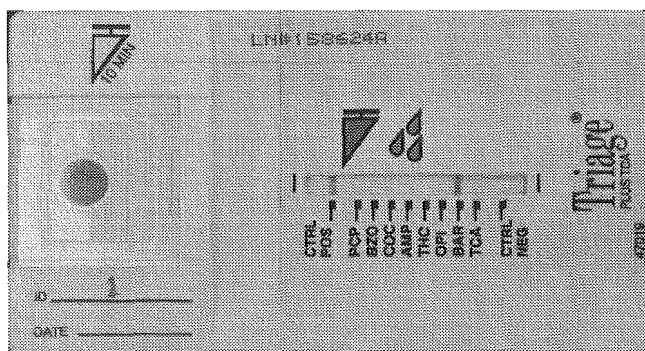


図2 Triageによる乱用薬物の検索

- 3) パラコート-ジチオナイト反応：陰性。（図3）

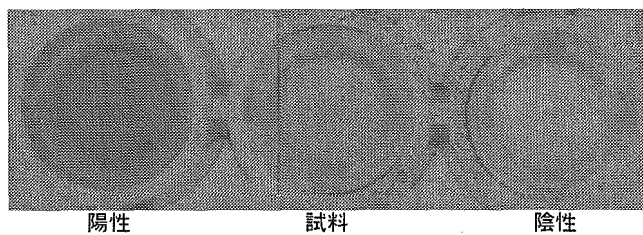


図3 パラコート-ジチオナイト反応によるパラコートの検索

4) GC-NPD : 中毒の原因となるような高濃度の化合物は検出されない。(図4)

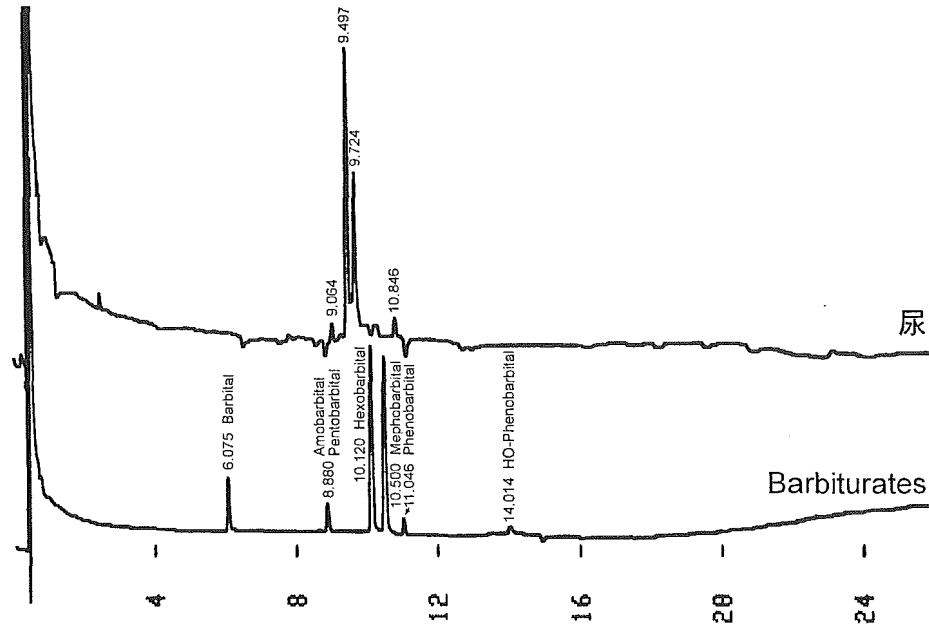


図4 GC-NPDによる毒劇物の検索

5) GC-MS : ペントバルビタールのマススペクトルに一致するピークを検出。(図5)

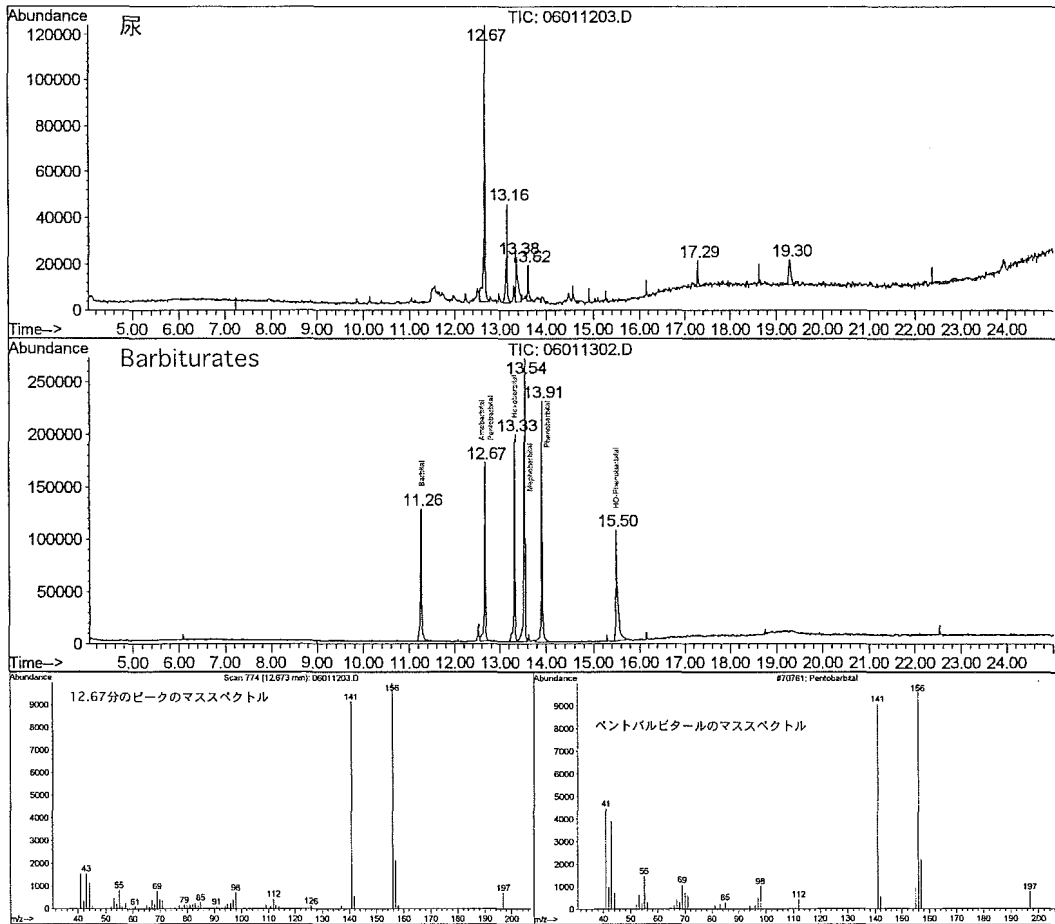


図5 GC-MSによる毒劇物の検索

6) HPLC : ペントバルビタール (アモバルビタール, ヘキソバルビタール) の保持時間に一致するピークを検出. (図6)

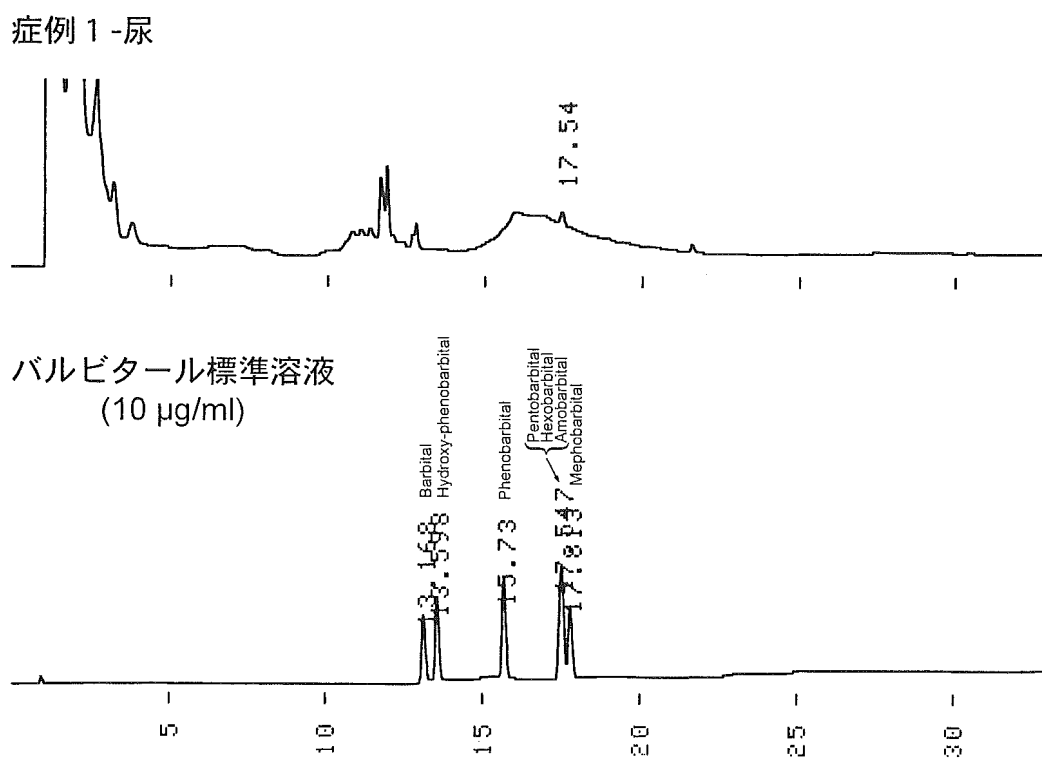


図6 HPLCによる毒劇物の検索 (210 nm)

## 2. 高速液体クロマトグラフによるペントバルビタールの定量分析

### <前処理>

- 1) 試料 100  $\mu$ l に 100  $\mu$ g/ml フェノバルビタール-メタノール溶液 5  $\mu$ l と 0.2 M 酢酸緩衝液 (pH 6.0) 100  $\mu$ l を加える.
- 2) 酢酸エチル- ジエチルエーテル (1 : 1) 600  $\mu$ l を加え, ボルテックスミキサーで 1 分間攪拌する.
- 3) 12000-g で 5 分間遠心分離する.
- 4) 有機層を分取する.
- 5) 室温水浴中で窒素ガスで乾固する.
- 6) 移動相 100  $\mu$ l に溶解し, その 20  $\mu$ l を高速液体クロマトグラフに注入する.

### <分析条件>

装置 : Shimadzu LC-6A システム

検出器 : 紫外可視検出器 (210 nm)

カラム : Nova-Pak Phenyl (15 cm x 3.9 mm, 4  $\mu$ m, Waters)

移動相 : アセトニトリル : 水 = 2 : 8

流速 : 1 ml/min

カラム温度 : 40  $^{\circ}$ C

### <定量結果>

ペントバルビタール 5.4  $\mu$ g/ml

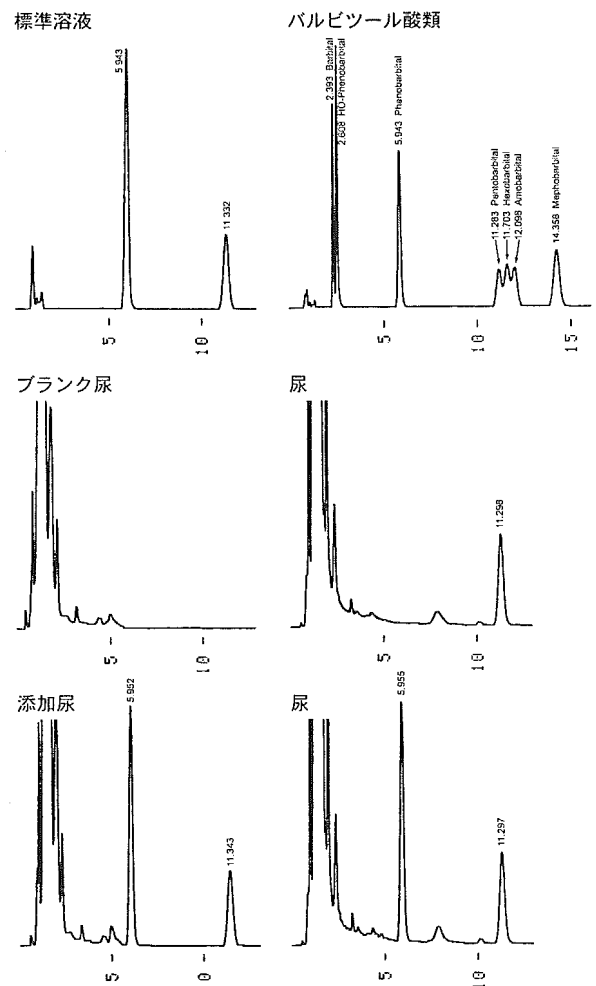


図7 試料と標準溶液, 添加尿  
のクロマトグラム

【注解】

- 1) 本分析条件にてペントバルビタール (11.28 分) とヘキソバルビタール (11.70 分) とアモバルビタール (12.10 分) はピークトップで分離しており定性可能であるが、ヘキソバルビタールが混在するときはピーク分離が不十分なため定量分析は困難である。
- 2) 本分析条件にてブロムワレリル尿素も検出される。そのピークはフェノバルビタールのピークに近い所に出現するが、完全に分離しているため本分析条件では妨害とはならない。しかし、条件によってはフェノバルビタールの分析の妨害となるので、ブロムワレリル尿素が混在するときはピーク分離を予め確認しておく必要がある。
- 3) 抽出後溶媒を留去した後、残渣を再溶解する時は移動相を用いることを勧める。アセトニトリルの含有比がピーク面積に影響することがある。
- 4) 1 mg/ml ペントバルビタール (ナトリウム塩) 溶液は冷蔵保存で3年間安定である。

## 症例 2-尿

### 1. 定性分析

- 1) ヘッドスペースガスクロマトグラフ法：アセトニトリルに一致するピークが検出された。（図 8）

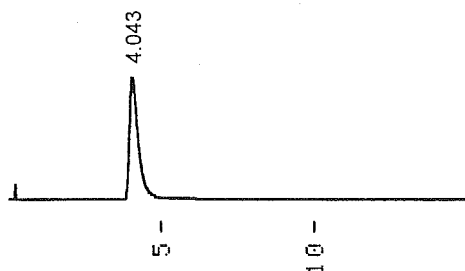


図 8 ヘッドスペースガスクロマトグラフによる有機溶媒の検索

- 2) 乱用薬物スクリーニング検査キット：陰性。（図 9）

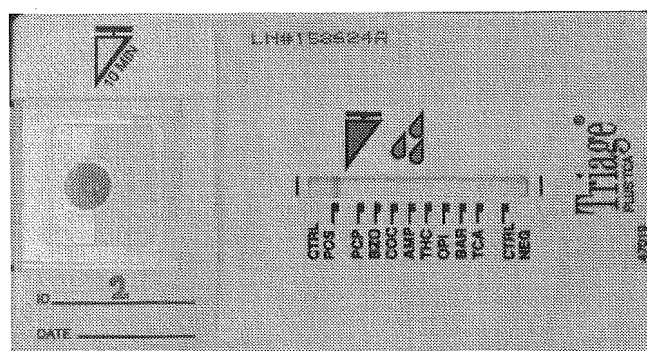


図 9 Triage による乱用薬物の検索

- 3) パラコート-ジチオナイト反応：陰性。（図 10）

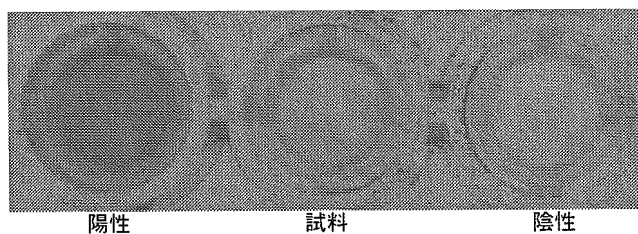


図 10 パラコート-ジチオナイト反応によるパラコートの検索

4) GC-NPD : フェニトロチオンの保持時間に一致するピークを検出. (図 11)

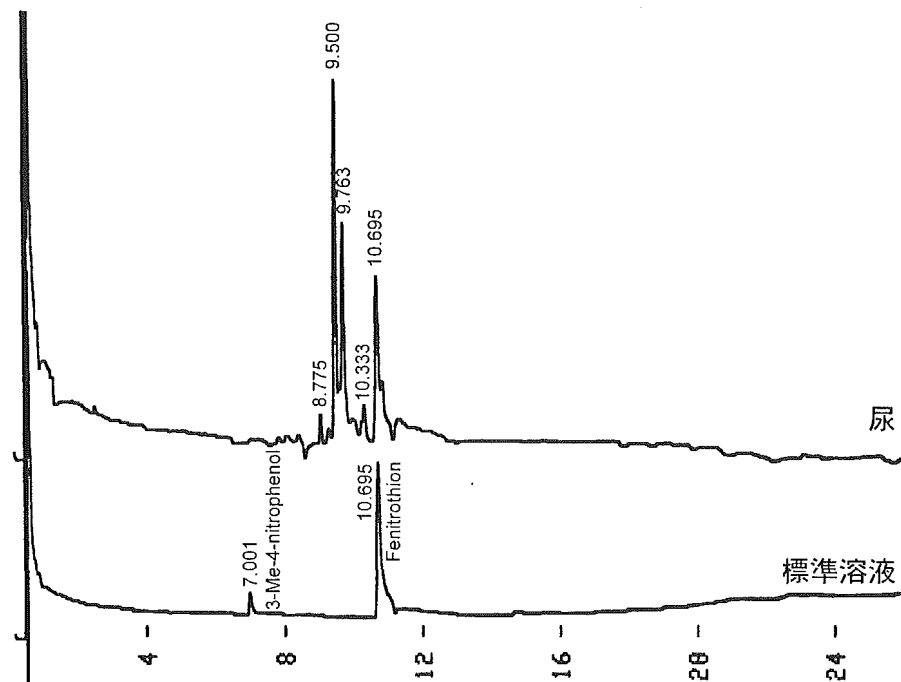


図 11 GC-NPD による毒劇物の検索

5) GC-MS : フェニトロチオンのマススペクトルに一致するピークを検出. (図 12)

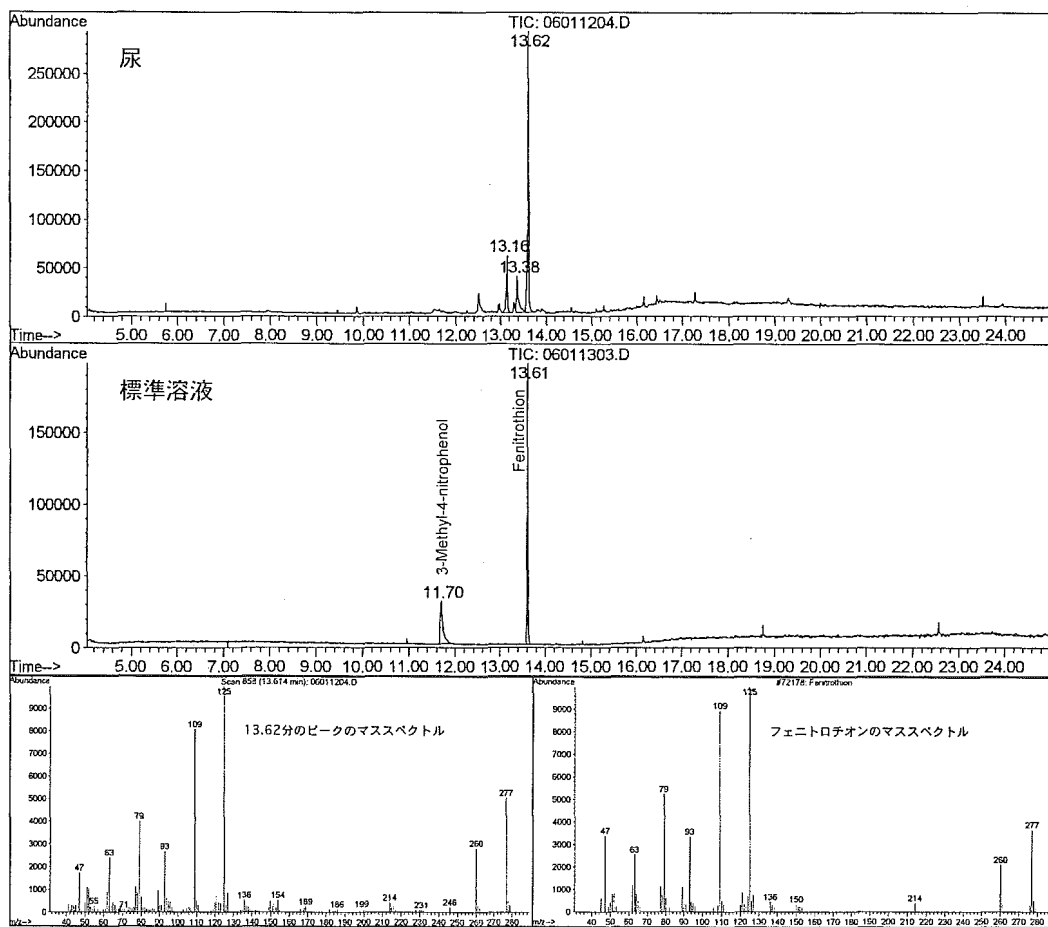


図 12 GC-MS による毒劇物の検索



6) HPLC : フェニトロチオンの保持時間に一致するピークを検出. (図 13)

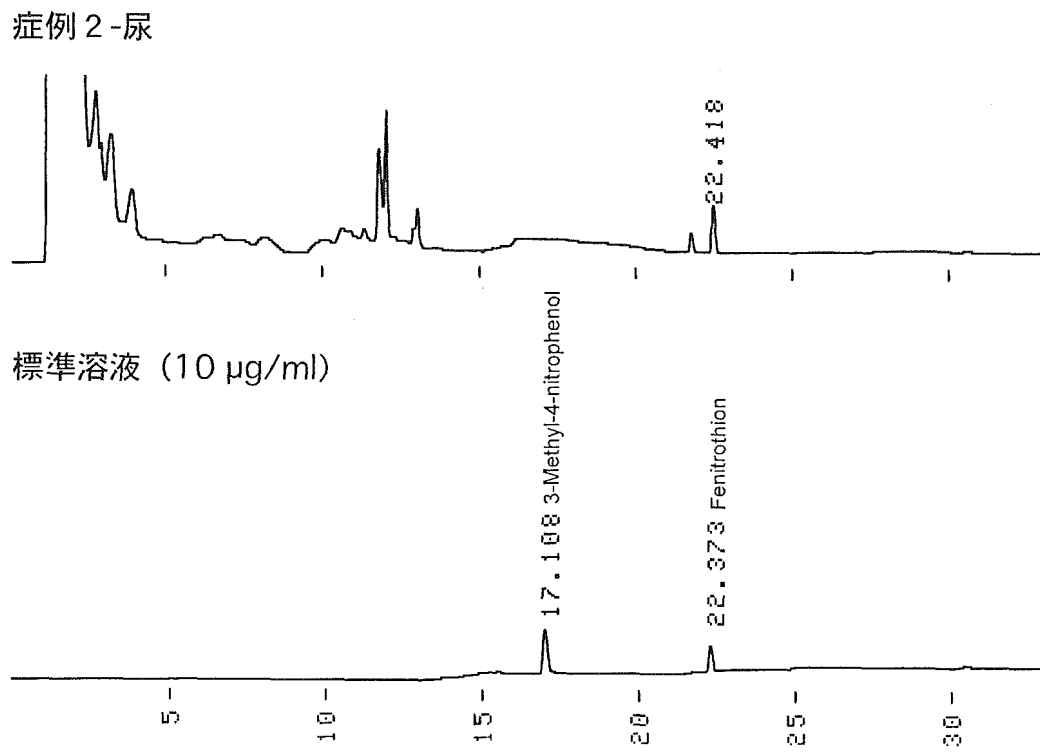


図 13 HPLC による毒劇物の検索 (210 nm)

## 2. 高速液体クロマトグラフによる尿中フェニトロチオンの定量分析

### <前処理>

- 1) 尿 100  $\mu$ l に 1 mg/ml シアノホス-メタノール溶液 5  $\mu$ l を加える.
- 2) ヘキサン 500  $\mu$ l を加え, ボルテックスミキサーで 1 分間攪拌する.
- 3) 12000-g で 5 分間遠心分離する.
- 4) 有機層を分取する.
- 5) 室温水浴中で窒素ガスで乾固する.
- 6) 移動相 100  $\mu$ l に溶解し, その 20  $\mu$ l を高速液体クロマトグラフに注入する.

### <分析条件>

装置 : Shimadzu LC-10A システム

検出器 : 紫外可視検出器 (270 nm)

カラム : Nova-Pak C18 (15 cm x 3.9 mm, 4  $\mu$ m, Waters)

移動相 : アセトニトリル : 20 mM リン酸二水素カリウム緩衝液  
= 5 : 5

流速 : 1 ml/min

カラム温度 : 40  $^{\circ}$ C

### <定量結果>

フェニトロチオン : 19.9  $\mu$ g/ml

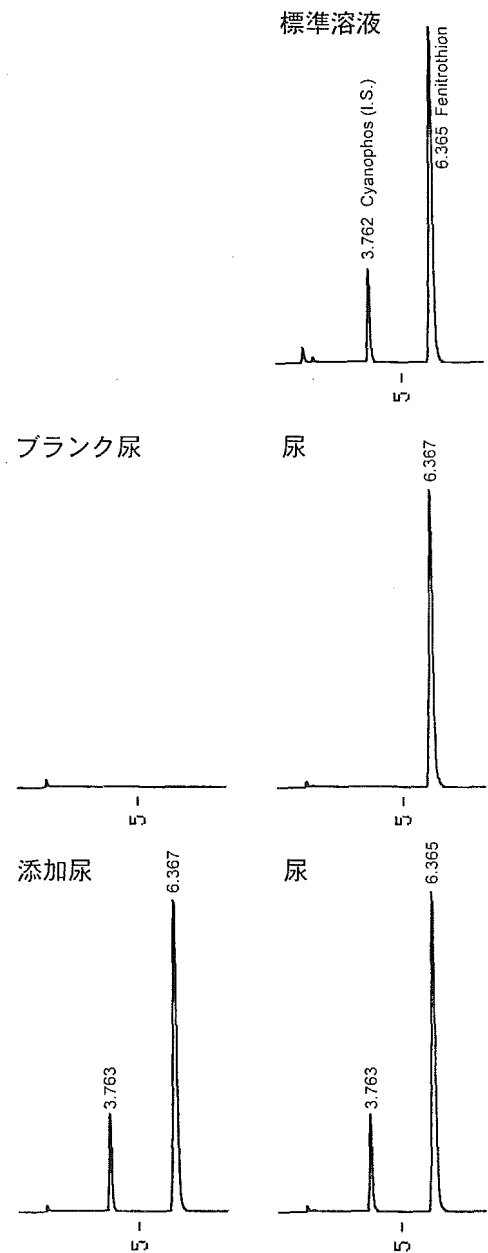


図 14 尿と標準溶液, 添加尿のクロマトグラム

#### 【注解】

- 1) 有機リン系農薬でリン酸型のジクロロボスやオクソン体は血液中で急激に分解される。また、マラチオンやフェントエートのように構造中にカルボキシエステル結合を有すると分解されやすく、ディプレックスも分解されやすい。これらの有機リン系農薬を正確に定量するためには、採血後直ちに抽出操作を行う必要がある。その他の有機リン系農薬も血液中で徐々に分解するので早めに分析することを勧める。
- 2) 有機リン系農薬はガスクロマトグラフ、高速液体クロマトグラフのいずれでも分析可能であるが、窒素リン検出器ではテーリングするため定量分析には適さない。
- 3) ジクロロボスは有機溶媒で抽出後、完全に濃縮乾固すると回収されないので、高速液体クロマトグラフで分析する際はアセトニトリル添加による除蛋白後の上清を直接分析する。
- 4) アセフェート、トリクロロホン、ジメトエートはヘキサンで抽出されにくいので、極性の高い溶媒で抽出する。
- 5) 1 mg/ml フェニトロチオン-メタノール溶液は冷蔵保存で1年間安定である。

### 症例3-血清

#### 1. 定性分析

1) ヘッドスペースガスクロマトグラフ法：エタノールに一致するピークが検出された。（図15）

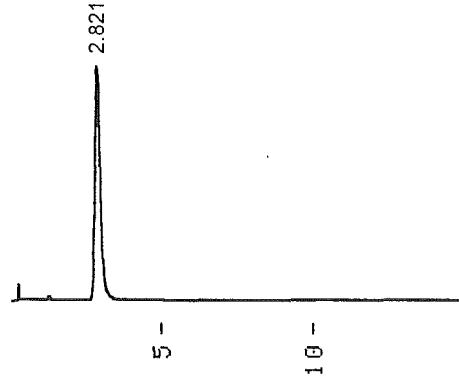


図15 ヘッドスペースガスクロマトグラフによる有機溶媒の検索

2) 乱用薬物スクリーニング検査キット：実施せず。

3) パラコート-ジチオナイト反応：陰性。（図16）

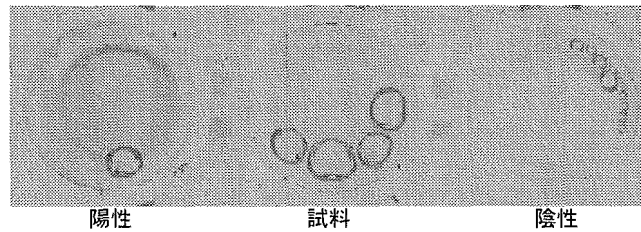


図16 パラコート-ジチオナイト反応によるパラコートの検索

4) GC-NPD : アセトアミノフェンの保持時間に一致するピークを検出. (図 17)

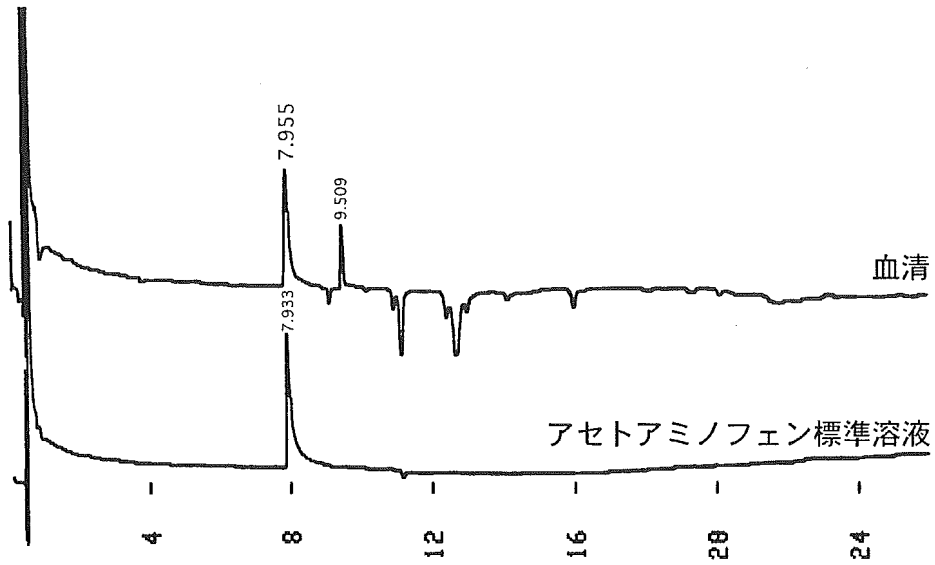


図 17 GC-NPD による毒劇物の検索

5) GC-MS : アセトアミノフェンのマススペクトルに一致するピークを検出. (図 18)

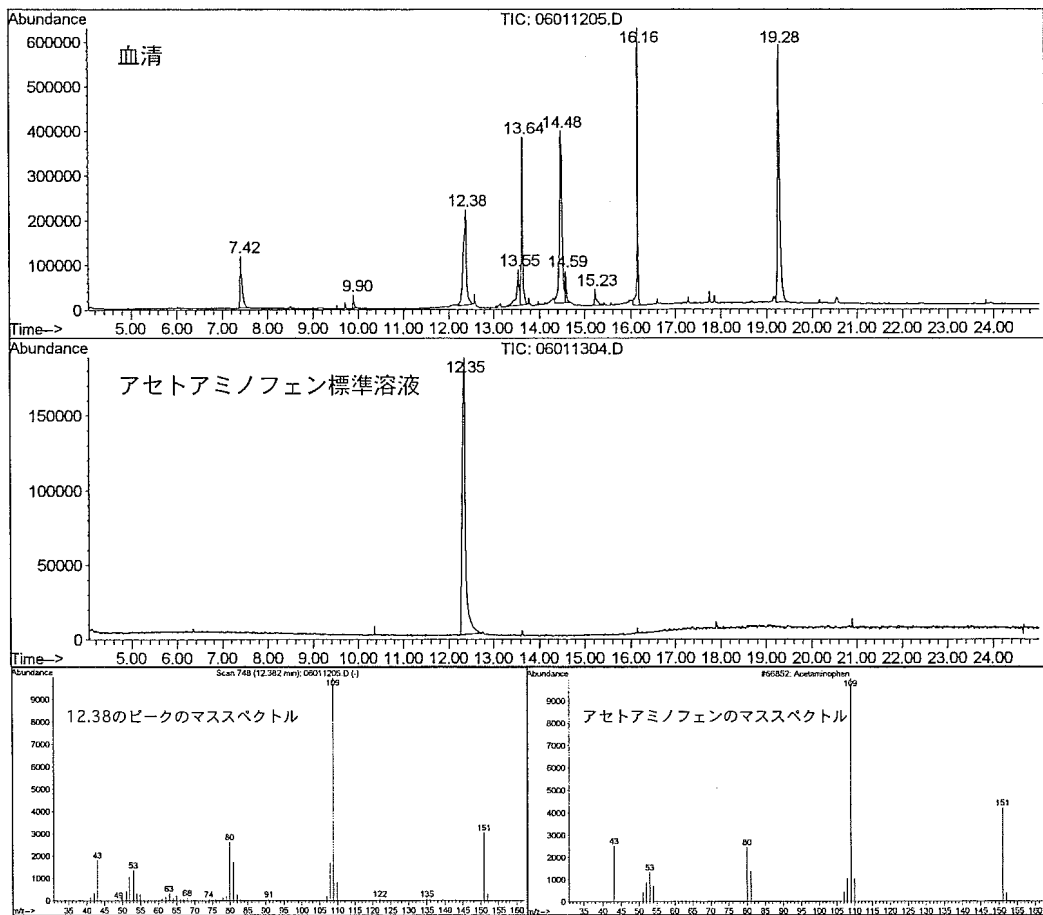
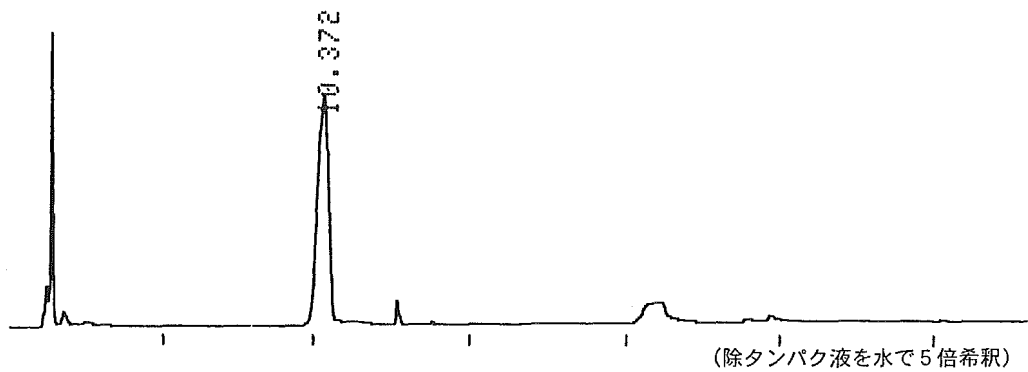


図 18 GC-MS による毒劇物の検索

6) HPLC : アセトアミノフェンの保持時間に一致するピークを検出. (図 19)

症例 3 - 血清



アセトアミノフェン標準溶液

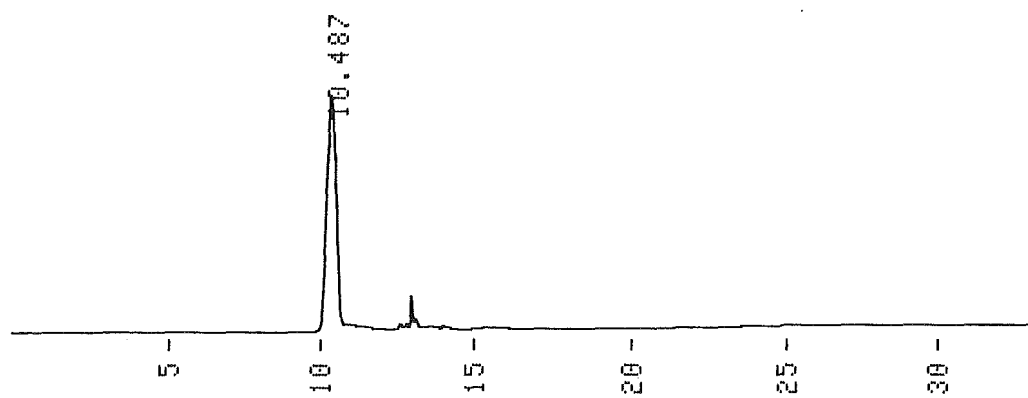


図 19 HPLC による毒劇物の検索 (250 nm)

## 2. 高速液体クロマトグラフによる血清中アセトアミノフェンの定量分析

### <前処理>

- 1) 血清 100  $\mu$ l に飽和塩化ナトリウム溶液 100  $\mu$ l と 1 mg/ml 3-アセトアミドフェノール 10  $\mu$ l を加える。
- 2) 酢酸エチル 600  $\mu$ l を加え、ボルテックスミキサーで1分間攪拌する。
- 3) 12000-g で5分間遠心分離する。
- 4) 有機層を分取する。
- 5) 室温水浴中で窒素ガスで乾固する。
- 6) 移動相 1 ml に溶解し、その 20  $\mu$ l を高速液体クロマトグラフに注入する。

### <分析条件>

ポンプ：Shimadzu LC-10A & SPD-10A

検出器：紫外可視検出器 (250 nm)

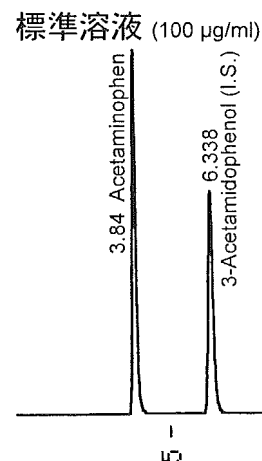
カラム：Nova-Pak C18 (15 cm x 3.9 mm, 4  $\mu$ m, Waters) **ブランク血清**

移動相：アセトニトリル：20 mM リン酸 2 水素カリ

ウム (pH 3.0) =5 : 95

流速：1 ml/min

カラム温度：40  $^{\circ}$ C



### <定量結果>

アセトアミノフェン：80.1  $\mu$ g/ml

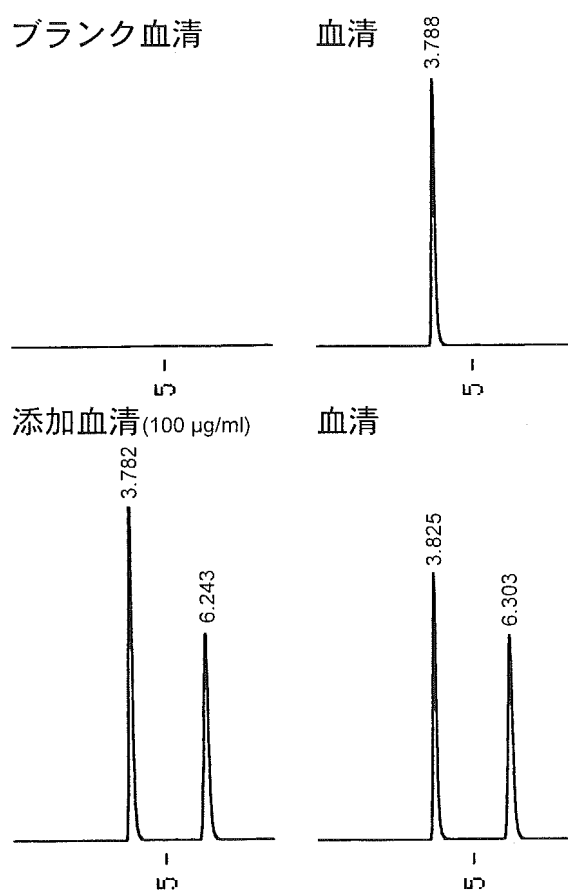


図 20 標準溶液と血清，添加血漿のクロマトグラム

【注解】

- 1) アセトアミノフェンをガスクロマトグラフにて定量分析する場合、誘導体化して分析する必要がある。
- 2) アセトアミノフェンは酸性条件下で 245 nm 付近に強い UV 吸収を持つので、高速液体クロマトグラフで感度良く分析することができる。
- 3) アセトアミノフェンは水溶性が高いので、飽和塩化ナトリウム溶液を加えることにより効率的に抽出できる。
- 4) 1 mg/ml アセトアミノフェン-メタノール溶液は冷蔵保存で5年間安定である。
- 5) 1 mg/ml アセトアミノフェン-アセトニトリル溶液は冷蔵保存で3年間安定である。



(資料 2-5)

## 薬毒物分析例 2

斉藤 剛

東海大学医学部専門診療学系救命救急医学

## 症例 1

状況から睡眠薬中毒と考えられるが、フルマゼニルに反応しなかったことからベンゾジアゼピン系薬物の可能性は低く、他の睡眠薬と考えられスクリーニングを行った。

### スクリーニング

試料の尿を Triage でスクリーニングを行ったところ、バルビツレートが陽性であった。次に、バルビツレート類のスクリーニングと定量を兼ねて、抽出を行った後、窒素リン検出器付ガスクロマトグラフィーで分析した。

念のためブロムワレリル尿素の定性も液体クロマトグラフィーで行ったが陰性であった。

### バルビツレート抽出方法

1. ネジ付試験管に試料尿 1.0 ml を加え、内部標準物質として 5 µg のトリルバルビタール、0.1N 塩酸水溶液 0.1 ml、酢酸エチル 4 ml を加える。
2. キャップ後、抽出、遠心分離する。
3. 上層を別のネジ付試験管に移し窒素気流下で乾固する。
4. 50 µl の 4 mM TMAH (Trimethylanilium hydroxide) を加え、80°C にて 10 分間メチル化する。
5. 冷却後、ガスクロマトグラフィー試料とする。

### 分析条件

Agilent 6890 Series ガスクロマトグラフ

カラム : DB-1 (30 m x 内径 0.25 mm x 膜厚 0.25 µm)

オープン温度 : 100°C (1 分) · 10°C/分 · 300°C (1 分)

キャリアガス : ヘリウム

注入口温度 : 250°C

検出器温度 : 250°C

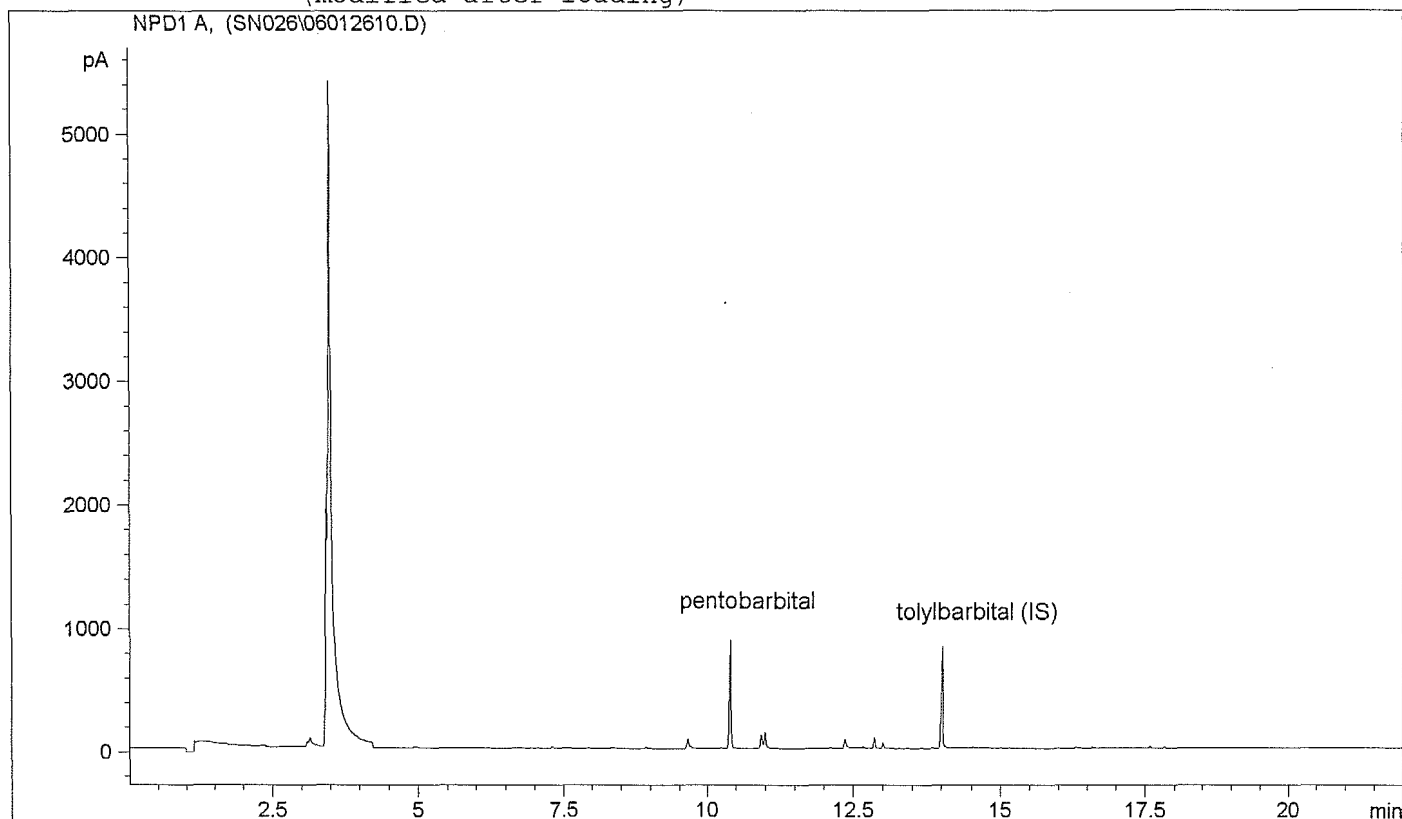
### 分析結果

ペントバルビタール 5.1 µg/ml

NPD, case 1, tolylbarbital (IS), extract, 4 mM TMAH-derivativ, 100(1)-10-300(1), DB-1

```
=====
Injection Date   : 01/26/2006 3:38:27 PM
Sample Name      : urine
Acq. Operator    : saito
Vial             : 1
Inj              : 1
Inj Volume       : Manually

Method           : C:\HPCHEM\1\METHODS\NPDSCREEN.M
Last changed     : 01/26/2006 3:29:39 PM by saito
                  (modified after loading)
=====
```



```
=====
Area Percent Report
=====
```

```
Sorted By       : Signal
Multiplier      : 1.0000
Dilution        : 1.0000
Sample Amount   : 4.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
```

No peaks found

```
=====
*** End of Report ***
=====
```

Current Chromatogram(s)

NPD1 A, (SN026\06012610.D)

