

度が低くなっているのではないと心配しております。

- 結果報告が遅くなり申し訳ありませんでした。実務の処理が優先になってしまうので、もう少し、時間に余裕があればと思いました。また、アセトアミノフェンや有機リン系農薬のキットが同封されていたので、何となく先入観を持って望んでしまいました。なお、症例2の Fenitrothion の標準品はかなり古いものを使用しましたので、定量値は疑問です。良い経験になりました。ありがとうございました。

(資料 3-4)

薬毒物分析例 1

福家千昭

琉球大学大学院医学研究科法医科学分野

<毒劇物分析結果と解説>

今回の毒劇物分析の実態調査で分析対象となるものは、日本中毒学会「分析委員会」報告において、その分析が中毒患者の治療に有用であるとされた中毒起因物質 15 品目（メタノール、ベンゾジアゼピン系薬物、三・四環系抗うつ薬、サリチル酸、有機リン剤、グルホシネート、ヒ素、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、カーバメート剤、パラコート・ジクワット、青酸化合物、メタンフェタミン）から選定したとされていたので、それらを中心に薬毒物の検索、定性分析を行った。さらに検索、定性分析で検出された化合物について定量分析を行った。

1. 薬毒物検索、定性分析法の処理操作と分析条件

1) ヘッドスペースガスクマトグラフ法 (HS-GC) : メタノールの検索

・処理操作

試料 0.5ml を 10ml バイアルに入れ、密栓したものを 60℃で 15 分間加温する。注射筒でバイアル中の気相 1ml を採取し分析装置に注入する。

・HS-GC の分析条件

装置 : Shimadzu GC-7A

検出器 : 水素炎イオン化検出器 (FID)

カラム : 25%PEG-100 (Mesh 60-80) , ガラスカラム 1mx2.5mm

温度 : カラム 70℃

注入部・検出器 110℃

キャリアガス : ヘリウム 50ml/min

【注解】

HS-GC は、揮発性の高い有機溶媒の分析に適しており、メタノールの他にエタノールやシンナー成分の酢酸エチルやトルエンなども同時に分析できる。

2) 乱用薬物スクリーニング検査キット (シスメックス, Triage) : ベンゾジアゼピン系薬物, 三・四環系抗うつ薬, バルビタール系薬物, メタンフェタミンの検索

・処理操作

使用説明書に従い操作する。

3) 有機りん系農薬検出キット (関東化学, カタログ番号 : 31115-96) : 有機リン系農薬の検索, ブロムワレリル尿素の検索

・処理操作

取り扱い説明書に従い操作する。

【注解】

有機りん系農薬検出キットは、交叉反応してブロムワレリル尿素でも陽性となるので陽性となった場合、臨床症状と合わせて結果を判断することを勧める。

4) 薄層クロマトグラフ法 (TLC) : グルホシネートとグリホサートの検索

・処理操作

試料 100 μ l にアセトニトリル 100 μ 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) した上清を薄層板にスポットする。

・ TLC の条件と発色

TLC : HPTLC aluminium sheets silicagel 60 pre-coated (Merck; Art. 5547)

展開溶媒 : エタノール : 水 : アンモニア水 = 7 : 3 : 0.1 (6 cm 展開で約 50 分)

発色試薬 : 2%ニンヒドリン溶液を噴霧後加熱する。

【注解】

本条件によるグルホシネートとグリホサートの Rf 値はグルホシネートが 0.66, グリホサートが 0.42 であった。

高濃度含有される胃内容や尿について適応できるが、特異性が低いので必ず対照と比較すること。血清や全血中には同じ移動率の化合物が存在するので応用できない。

濃度が濃すぎると Rf 値が変動するのでさらに水で希釈したものをを用いて確認する必要がある。

展開後、十分に乾燥させる必要がある。アンモニアが残っているとグリホサートの発色が弱くなる。

5) アセトアミノフェン検出キット (関東化学, カタログ番号 : 01601-96) : アセトアミノフェンの検索

・ 処理操作

取り扱い説明書に従い操作する。

6) パラコート- ジチオナイト反応 : パラコートとジクワットの検索

・ 処理操作

試料 100 μ l に 2 N 水酸化ナトリウム溶液 100 μ l を加え、ヒドロサルファイトナトリウムをミクロスパーテル軽く 1 杯加え攪拌する。検体の発色を確認する。

【注解】

パラコート- ジチオナイト反応は、試料中にパラコートが存在する場合、試料本来の色に加えて青色の発色が観られる。標準溶液での検出下限は約 1 μ g/ml であるが、試料に着色がある場合はその影響を受け検出しにくくなる。ヒドロサルファイトナトリウムが失活しているとパラコートが存在しても発色しないので、対象をおいて判定すること。パラコートを含有する試料を保存するときはガラス製の容器は避け、ポリプロピレン製などの容器を使用することが望ましい。

7) 窒素リン検出器付ガスクロマトグラフ法 (GC-NPD) : ベンゾジアゼピン系薬物, 三・四環系抗うつ薬, 有機リン剤, バルビタール系薬物, アセトアミノフェン, テオフィリン, カバメート剤, 青酸化合物の検索

・ 処理操作

試料 100 μ l に塩化ナトリウム 0.1g と酢酸エチル 100 μ l を加え、ボルテックスミキサにて 1 分間攪拌後、遠心分離 (12000-g, 5 分) した上清 1 μ l を分析装置に注入。

・ GC-NPD の分析条件

装置 : Shimadzu GC-7A

検出器 : フレームサーミオニック検出器

カラム：DB-1, 30mx0.53mm, 膜厚 1.5 μ m
温度：カラム 100 $^{\circ}$ C- (10 $^{\circ}$ C/min)- 320 $^{\circ}$ C, 室温 (青酸)
注入部・検出器 320 $^{\circ}$ C
キャリアガス：ヘリウム 40 ml/min

【注解】

今回使用した窒素リン検出器は、島津製でフレイムサーミオニック検出器 (FTD) と呼ばれ、窒素もしくはリンを含む化合物に対して選択的に高感度を示すので、医薬品や農薬などの高感度検出が可能である。また、オープン温度を室温にすることにより溶媒のピークの前に青酸のピークが認められるので青酸の定性にも便利である。

8) ガスクロマトグラフ質量分析法 (GC-MS) : ベンゾジアゼピン系薬物, 三・四環系抗うつ薬, サリチル酸, 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, カーバメート剤の検索

・処理操作

試料 100 μ l に塩化ナトリウム 0.1g と酢酸エチル 100 μ l を加え、ボルテックスミキサにて 30 秒間攪拌後、遠心分離 (12000-g, 5 分) した上清 1 μ l を分析装置に注入。

・GC-MS の分析条件

装置：HP6890 series
検出器：質量分析計
カラム：HP-5, 30mx0.25mm, 膜厚 0.25 μ m
温度：カラム 50 $^{\circ}$ C (4 min)- (20 $^{\circ}$ C/min)- 320 $^{\circ}$ C
注入部・検出器 300 $^{\circ}$ C
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 (ジクロルボス、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。

9) 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, カーバメート剤の検索

・処理操作

試料 100 μ l にアセトニトリル 100 μ 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 μ 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 (210nm, 250nm)
カラム：Nova-Pak C18 (15cm x 3.9mm, 4 μ m)
移動相：水 \rightarrow 10 min \rightarrow アセトニトリル：水 (1 : 1) \rightarrow 10min \rightarrow アセトニトリル

流 速 : 1ml/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

1. 定性分析

血清 1:

- 1) ヘッドスペースガスクロマトグラフ法: メタノールは検出されない
- 2) 乱用薬物スクリーニング検査キット: 検査せず
- 3) 有機りん系農薬検出キット: 検査せず
- 4) 薄層クロマトグラフ法: 検査せず
- 5) アセトアミノフェン検出キット: 陰性
- 6) パラコート- ジチオナイト反応: 陰性
- 7) GC-NPD: イミプラミンに一致するピークを検出 (図 1)
- 8) GC-MS: イミプラミンのマススペクトルに一致するピークを検出 (図 2)
- 9) HPLC: 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

尿 1:

- 1) ヘッドスペースガスクロマトグラフ法: メタノールは検出されない
- 2) 乱用薬物スクリーニング検査キット: TCA 陽性
- 3) 有機りん系農薬検出キット: 陰性
- 4) 薄層クロマトグラフ法: 陰性
- 5) アセトアミノフェン検出キット: 陰性
- 6) パラコート- ジチオナイト反応: 陰性
- 7) GC-NPD: イミプラミンとデシプラミンに一致するピークが検出された. (図 1)
- 8) GC-MS: イミプラミンのマススペクトルに一致するピークとデシプラミンのマススペクトルに一致するピークを検出 (図 2)
- 9) HPLC: 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

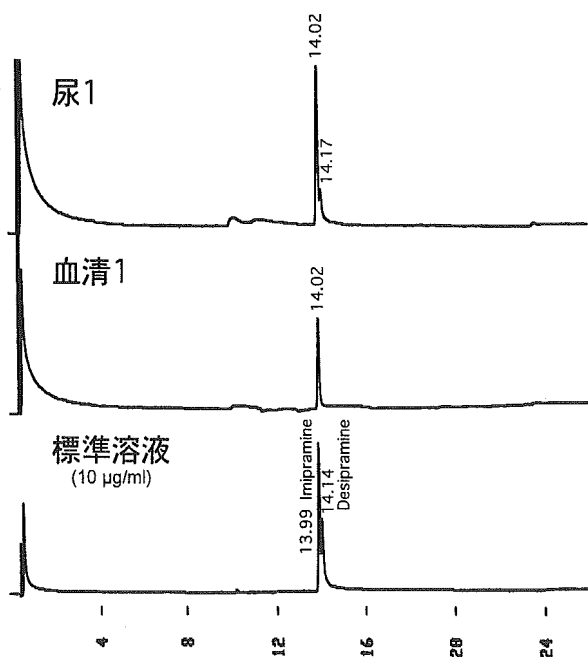


図 1 GC-NPD による毒劇物の検索

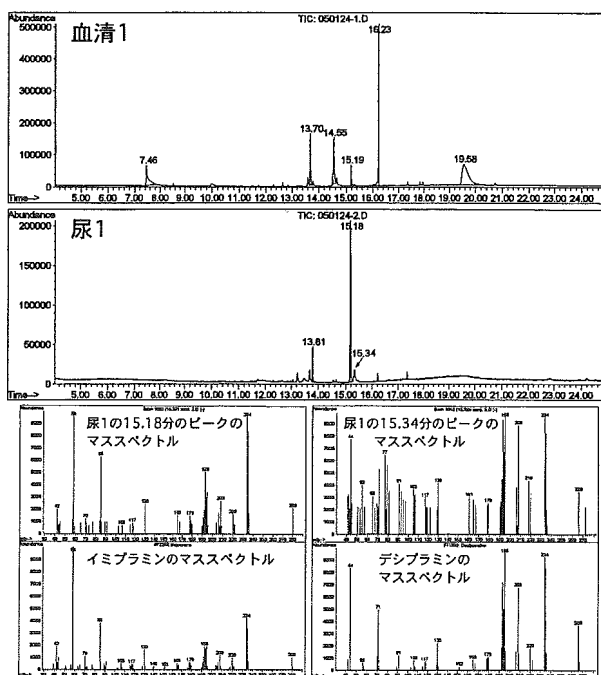


図 2 GC-MS による毒劇物の検索

2. 高速液体クロマトグラフによる血清 1, 尿 1 中イミプラミンとデシプラミンの定量分析

<前処理>

- 1) 試料 100 μ l に 100 μ g/ml トリミプラミン-メタノール溶液 10 μ l と 20%炭酸アンモニウム溶液 100 μ l を加える.
- 2) ヘプタン- イソプロパノール (98.5 : 1.5) 500 μ l を加え, ボルテックスミキサーで 30 秒間 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 μ l に溶解し, その 20 μ 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 (280 nm)

カラム : Nova-Pak C18 (15cmx3.9mm, 4 μ m, Waters)

移動相 : アセトニトリル : 20 mM リン酸 2 水素カリウム,
10 mM トリエチルアミン (pH 6.9) = 5 : 5

流速 : 1ml/min

カラム温度 : 40 $^{\circ}$ C

<定量結果>

(μ g/ml)	血清 1	尿 1
イミプラミン	4.4	10.2
デシプラミン	1.8	7.8

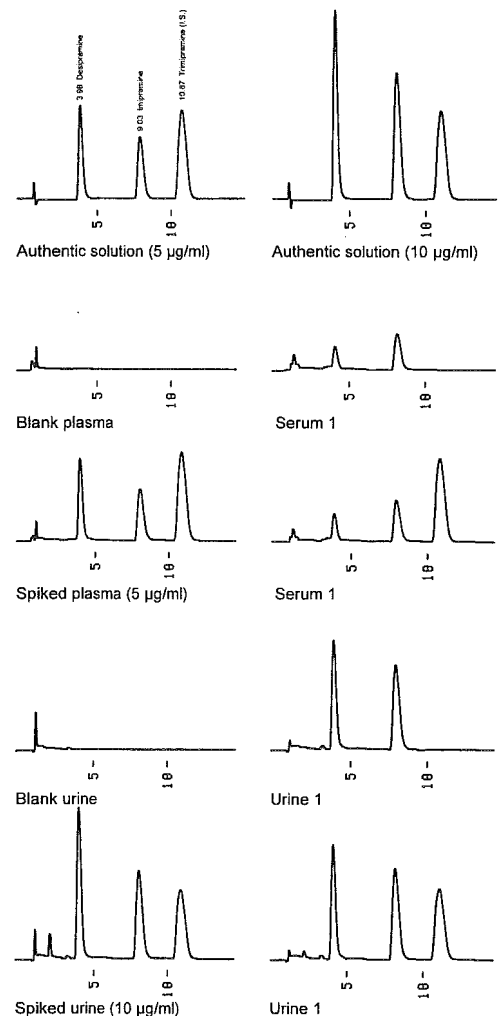


図3 試料と標準溶液, 添加血漿, 添加尿のクロマトグラム

【注解】

- 1) 本分析条件にてデシプラミン (3.98 分) とマプロチリン (4.32 分), トリミプラミン (10.87 分) とアミトリプチリン (10.57 分) は分離しないので, 同時に存在するときは分析条件の

変更が必要である。

- 2) フェノチアジン系薬物のレボメプロマジン¹は 9.43 分，プロメタジン²は 10.42 分，クロルプロマジン³は 14.96 分にピークがある。他にも三環系抗うつ薬とフェノチアジン系薬物は近接したところにピークがあるので服用薬物の情報がある時はそれぞれの化合物の保持時間を調べ、妨害しあわないことを確認したうえで定量分析する必要がある。
- 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や液性がピーク面積に影響することがある。

症例 2

1. 定性分析

尿 2 :

- 1) ヘッドスペースガスクロマトグラフ法 : メタノールは検出されない
- 2) 乱用薬物スクリーニング検査キット : 陰性
- 3) 有機リン系農薬検出キット : 陽性
- 4) 薄層クロマトグラフ法 : 陰性
- 5) アセトアミノフェン検出キット : 陰性
- 6) パラコート- ジチオナイト反応 : 陰性
- 7) GC-NPD : フェニトロチオンに一致するピークが検出された. (図 4)
- 8) 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 5)
- 9) HPLC : フェニトロチオンに一致するピークが検出された. (図 6)

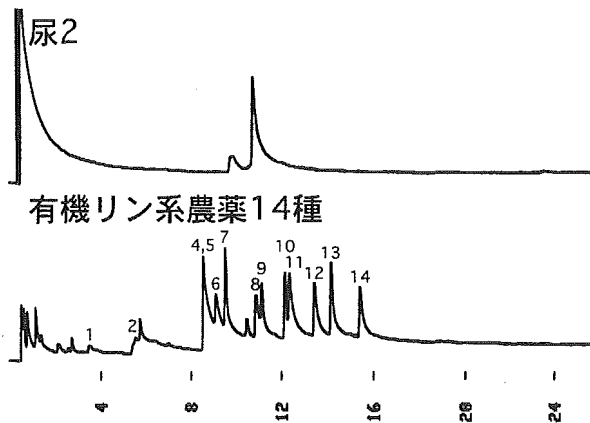


図 4 GC-NPD による毒劇物の検索

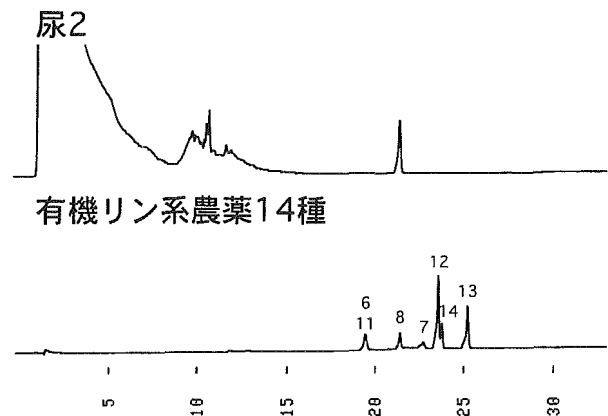


図 6 HPLC による毒劇物の検索 (UV: 250 nm)

1 : ジクロルボス, 2 : トリクロルホン, 3 : アセフェート, 4 : ジメトエート, 5 : チオメトン,
6 : シアノホス, 7 : ダイアジノン, 8 : フェニトロチオン, 9 : マラチオン, 10 : フェントエート,
11 : メチダチオン, 12 : イソキサチオン, 13 : スルプロホス, 14 : EPN

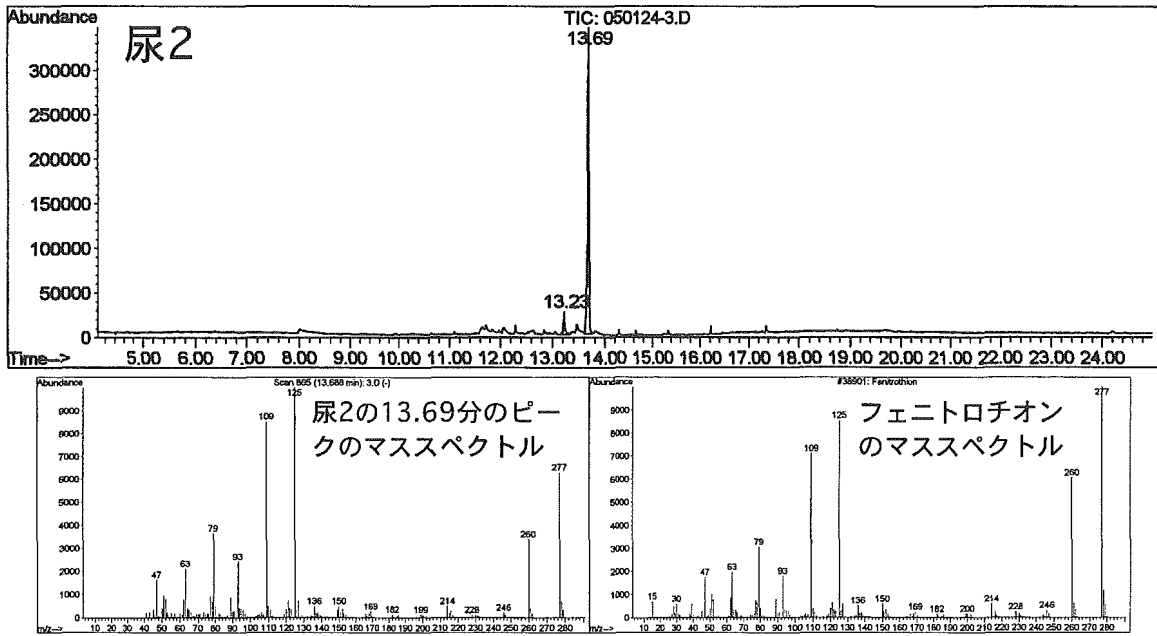


図5 GC-MSによる毒劇物の検索

2. 高速液体クロマトグラフによる尿 2 中フェニトロチオンの定量分析

<前処理>

- 1) 尿 100 μ l に 1mg/ml シアノホス-メタノール溶液 5 μ l を加える.
- 2) ヘキサン 500 μ 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 μ l に溶解し, その 20 μ 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-6A & SPD-6A

検出器: 紫外可視検出器 (270 nm)

カラム: Nova-Pak C18 (15cm \times 3.9mm, 4 μ m, Waters)

移動相: アセトニトリル:水=5:5

流速: 1ml/min

カラム温度: 40 $^{\circ}$ C

<定量結果>

フェニトロチオン: 44.4 μ g/ml

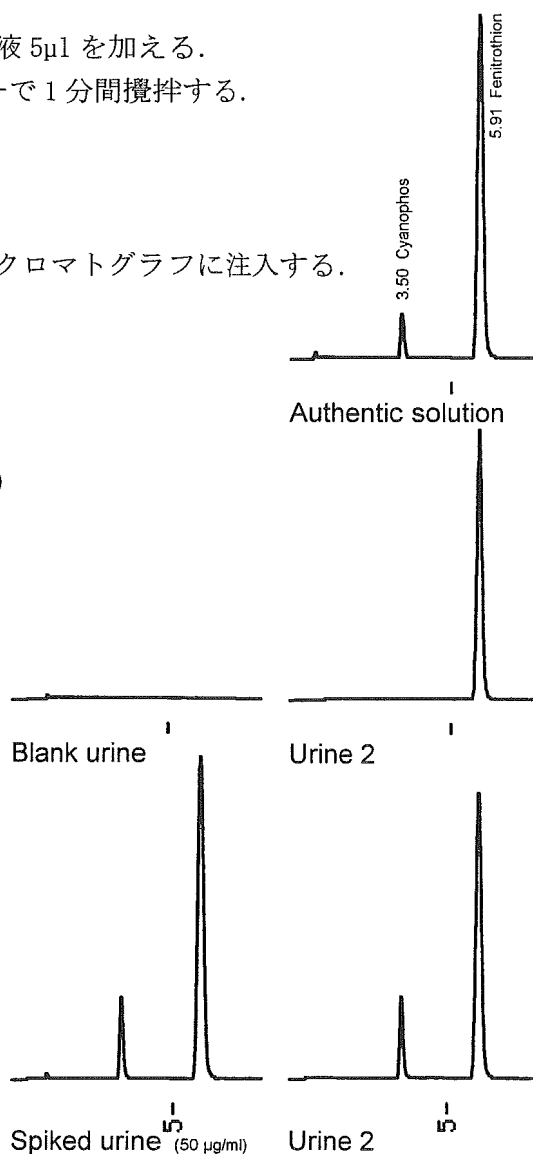


図 7 尿 2 と標準溶液, 添加尿のクロマトグラム

【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, ディブテ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 (図 4) 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, トリクロルホン, 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。

症例 3

1. 定性分析

血清 2 :

- 1) ヘッドスペースガスクロマトグラフ法：メタノールは検出されない
- 2) 乱用薬物スクリーニング検査キット：陰性
- 3) 有機りん系農薬検出キット：陰性
- 4) 薄層クロマトグラフ法：陰性
- 5) アセトアミノフェン検出キット：陽性
- 6) パラコート- ジチオナイト反応：陰性
- 7) GC-NPD : アセトアミノフェンに一致するピークが検出された. (図 8)
- 8) 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 9)
- 9) HPLC : アセトアミノフェンに一致するピークが検出された. (図 10)

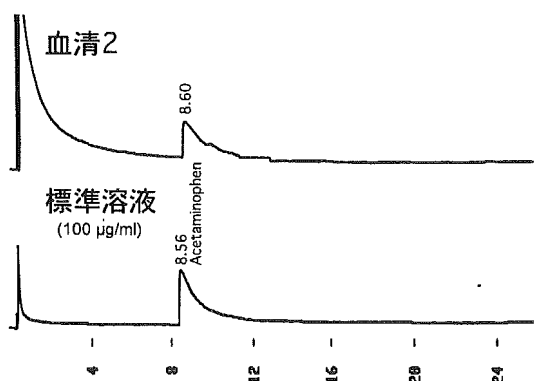


図 8 GC-NPD による毒劇物の検索
(UV:250 nm)

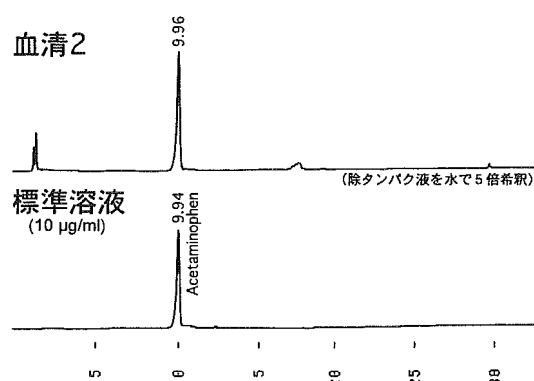


図 10 HPLC による毒劇物の検索

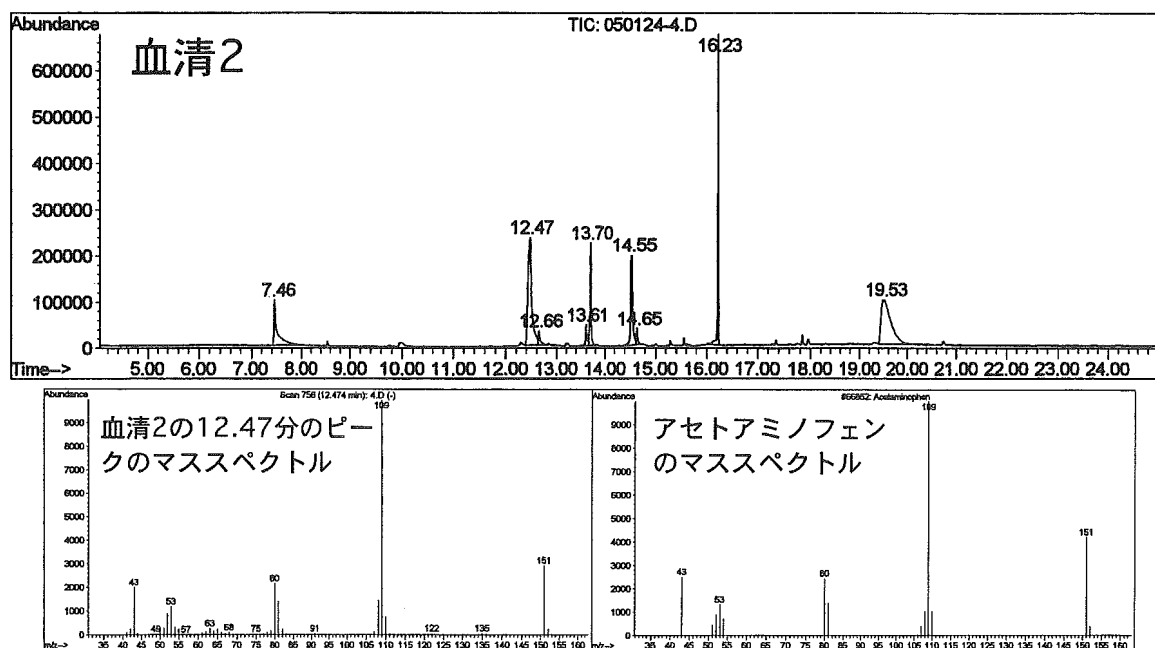


図 9 GC-MS による毒劇物の検索

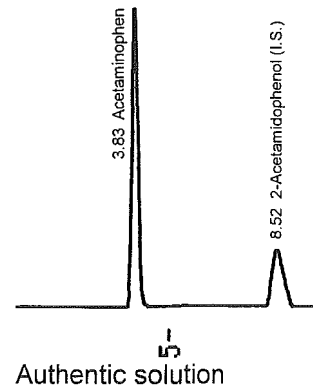
2. 高速液体クロマトグラフによる血清2中アセトアミノフェンの定量分析

<前処理>

- 1) 血清 100 μ l に飽和塩化ナトリウム溶液 100 μ l と 1mg/ml 2-アセトアミドフェノール 10 μ l を加える.
- 2) 酢酸エチル 600 μ 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 μ l に溶解し, その 20 μ 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 (15cmx3.9mm, 4 μ m, Waters)
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 : 1ml/min
カラム温度 : 40 $^{\circ}$ C



<定量結果>

アセトアミノフェン : 92.2 μ g/ml

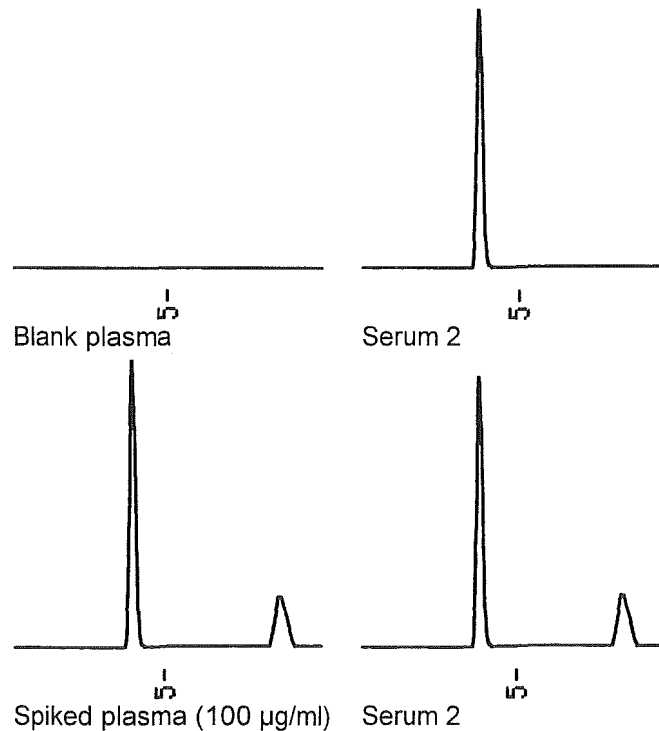


図 11 血清 2 と標準溶液, 添加血漿のクロマトグラム

【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 245nm 付近に強い UV 吸収を持ち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。

(資料 3-5)

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

本症例は医薬品による中毒と考えられるため、検体の尿を用いてトライエージで1次スクリーニングを行った。



1次スクリーニング結果

トライエージの結果、TCA が陽性となったため三環系抗うつ薬が含まれていると判断できたため確認検査を行った。



確認検査

三環系抗うつ薬のスクリーニングは尿から薬物を抽出し GC-MS を用いたライブラリ一検索と GC-NPD による保持時間の確認を行った。



抽出方法

1. 検体 0.5 ml に純水 0.5 ml、20%炭酸ナトリウム水溶液(w/v)0.2 ml を添加。
2. ジエチルエーテル 4.0 ml を加える。
3. 震盪後、遠心(3,000 回転、5 分間)。
4. 上清を別の新しい試験管に移す。
5. 窒素気流下で蒸発乾固。
6. 残渣を 50 μ l のメタノールに溶解し GC-MS、GC-NPD 試料とする。



GC-MS の分析条件(確認検査)

Hewlett-Packard 5890 Series II Gas Chromatograph/5971 Mass Selective Detector
Column: HP-5MS (30 m x 0.25 mm i.d. x 0.25 mm film thickness)
Injector Temp.: 250°C
Oven Temp.: 180°C (1 min) – 5°C/min – 300°C (3 min)

GC-NPD の分析条件(確認検査)

Hewlett-Packard 6890 Series Gas Chromatograph-NP Detector
Column: DB-5 (30 m x 0.25 mm i.d. x 0.25 mm film thickness)
Injector Temp.: 250°C
Detector Temp.: 250°C
NP Bead: 30 pA
Oven Temp.: 180°C (1 min) – 5°C/min – 300°C (3 min)

定量時 GC-NPD 温度条件

Oven Temp.: 150°C (1 min) – 5°C/min – 280°C (1 min)

↓
結果

GC-MS の SCAN モードで分析を行ったところ2つの化合物のピークが確認された。これらのピークをライブラリー検索したところ、イミプラミン、デシプラミンのマスフラグメントと一致したが、デシプラミンのピーク形状が悪かったため GC-NPD によって再度分析を行ったところ2つのシャープなピークが確認された。これらのピークは更に、イミプラミン、デシプラミンの標準品とも保持時間が一致したため、本中毒症状はイミプラミン、デシプラミンによるものと判断した。(クロマト1-4)

↓
定量方法

内部標準物質としてカルバマゼピン 30 µl (100 µg/ml)を添加して上記抽出を行った。GC-NPD で分析を行い、イミプラミンと内部標準物質、デシプラミンと内部標準物質との面積比を各々求め各々検量線からそれらの濃度を求めた。
(クロマト5、6)

注)本抽出方法は 0.5 – 15.0 µg/ml(イミプラミン)、0.5 – 10.0 µg/ml(デシプラミン)の間で良好な直線性が得られた。定量は抽出毎にキャリブレーターを用いて検量線を作成した。検量線の精度は低、高濃度の Quality Control (QC)によって確認した。検量線の十分な精度を QC によって確認した後にイミプラミンとデシプラミンの濃度を求めた。

定量結果

	血清 (μg/ml)	尿 (μg/ml)
イミプラミン	5.16	10.9
デシプラミン	1.89	7.54