

- 当院の検出キットでは同定不可能な薬毒物が送られてきた事。
- 症例情報があるのに、知識がない為推定するのに苦労しました。
- マンパワー不足、予算不足が先立ってしまい、分析システムが構築できません。
- HPLC-PDA 主体の分析であるため、薬毒物の同定に苦労したり、また困難な場合も多い。
- 予試験用の器材（パックテスト等）の購入の優先順位について。また購入したとしても使用量が少なくデッドストックになること。農薬等の代謝物の標準品がないこと。中毒に関する基礎的知識（中毒時の血中濃度・尿中濃度等）の充実

参加者からの要望

- 今回のサンプルについて、分析例を教えてください。
- 機器分析となると高度な専門知識が必要なので、より多くの迅速検査キットの開発を切望します。
- 尿試料が、容器よりこぼれていました。
- せめて症例を減らしていただきたい。また、解答と追試験を国内複数の箇所で実施してもらえると参加もしやすいと思います。（現状では解答&追試験を見学に行くのは不可能なため）
- 救急医学や中毒学会等にて必要設置を明確にして頂く等、救急診療での検査体制を明確に構築されることが望まれます。
- （今回の報告には私共では興味深く、外部委託の成績も含めた上でささやかなながらも可能な限りの対応を図っておりました。）
- 試料3の標準物質を送付していただければ、確認分析が可能と思いますので、来年の検体送付時には、標準品を同封していただければ幸いです。
- 簡易に出来るアルカリジチオナイト反応の様な方法を教えてください。また、送ってくださる簡易キットを色々な種類で試せると有効性や使い勝手が分かり、場合によっては購入の検討も出来るのでうれしいです。
- 分析機器を配布した施設に誰にでも出来る共通の薬毒物マニュアルの作成を望みたい。予算的に許せるなら標準物質の配布も。
- 分析講習会を定期的に行なって頂きたい
- 最低限そろえるべき標準品（測定できるべき薬品）のリストを知りたいです。できれば優先順位付きで。
- 中毒患者の症状や検査値などから中毒物質の推定が可能な書籍やホームページなどを教えてほしい。
- 制度管理の時期を、もう少し遅らせてもらえると助かります。
- 次回のトライアルの時に『アセトアミノフェン検出キット』も提供して頂きたい。
- 今後も参加したいので継続してほしい
- サリンや VX ガスの検知紙として東洋紡製の製品が有るとのこと。価格も安価（4枚組50

0円程度)なので購入しようと、東洋紡に問い合わせたら防衛庁の許可が必要と言われました。自衛隊病院でさえも入手不能とかで、地方の基幹病院では歯牙にもかけて貰えないと判断しております。中毒学会等組織を通して入手の道を探して下さい。

- 試料の融解方法の記載もあった方が良いと思います。
- 毎回使用する試薬が偏っている気がしました。機器がない施設のためにも15項目を判別できるようにしてもらえればと思います。
- 保険点数をつけて下さい。
- 原因不明の意識消失で検査依頼があるが、同定出来ない症例がある。同定出来ない検体はそのままにしているが、原因追求をしていただける施設を国レベルで指定し、支援して頂きたい。
- 今回の測定項目では、メチルホスホン酸の誘導體化が上手くいっていないと思います。標準的な方法と、GC/MSのライブラリを教えてください。よろしくお願いします。ご指導と試薬を頂ければ幸いです。
- 国のほうで、また分析器購入のための予算がおりればいいのだが……。臨床現場で短時間に分析可能な迅速キットの開発をひきつづきお願いします。
- 中毒起因物質同定において中核病院中心のネットワークの形成。
- 今回の試料を用いて、どのように予試験→定性→定量と進んでいけばよいのか、講習会を開いて具体的方法を教えていただければありがたいです。
- 初心者なので症状と薬毒物が簡単につながるようなマニュアルがあれば教えていただきたいです。
- 初心者にとって毒物・劇物に関する良い資料などあれば、教えて欲しいです。
- 現状を集計していただいて、機器の不十分な施設には公的補助をしていただけるよう働きかけができればと思います。

(資料 1-3)

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>

1. 薬毒物検索，定性分析法の処理操作と分析条件

1) 窒素リン検出器付ガスクロマトグラフ法 (GC-NPD)

・処理操作

試料 100 μ l に塩化ナトリウム 0.1 g 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：フレイムサーミオニック検出器 (FTD)

カラム：DB-1, 30 m x 0.53 mm, 膜厚 1.5 μ m

温度：カラム 100 $^{\circ}$ C-(10 $^{\circ}$ C/min)-320 $^{\circ}$ C

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。

2) ガスクロマトグラフ質量分析法 (GC-MS)

・処理操作

試料 100 μ l に塩化ナトリウム 0.1 g 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：Shimadzu 2010 GCMS

検出器：質量分析計

カラム：DB-5, 30 m x 0.25 mm, 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，標準品の保持時間とその電子衝撃イオン化 (EI) 法でのマススペクトルとが一致すれば同一物質と断定できる。炎光光度検出器付ガスクロマトグラフ法や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。

3) 紫外可視検出器付高速液体クロマトグラフ法 (HPLC)

・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 (210 nm, 250 nm)

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

移動相 : 水 \rightarrow 10 min \rightarrow アセトニトリル : 水 (1 : 1) \rightarrow 10 min \rightarrow 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困難な化合物 (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。

4) キャピラリー電気泳動質量分析法 :

・前処理操作

なし (尿の場合、試料を直接CEに注入し分析することができる)

・キャピラリー電気泳動分析条件

装置 : Agilent CEシステム

キャピラリー : Fused silica capillary tube (75 μ m i.d., 100 cm long)

キャピラリー温度 : 20 $^{\circ}$ C

分析用電解液 : 1 M 酢酸-10%メタノール溶液

注入 : H₂O; 50 mbar x 5 sec, Sample; 50 mbar x 20 sec, Electrolyte; 50 mbar x 5 sec

印加電圧 : -25 kV

検出器 : MSD

・質量分析計分析条件

装置 : Agilent 1100 MSD

イオン化法 : エレクトロスプレーイオン化 (ESI)

極性 : Positive

キャピラリー電圧 : 4000 V

フラグメンター電圧 : 20 V

ドライガス流量 : 10 l/min (窒素)

ドライガス温度 : 350 $^{\circ}$ C

ネブライザーガス圧 : 10 psi

シース液 : 5 mM 酢酸アンモニウム-50%メタノール溶液

シース液流量 : 10 μ l/min

【注解】

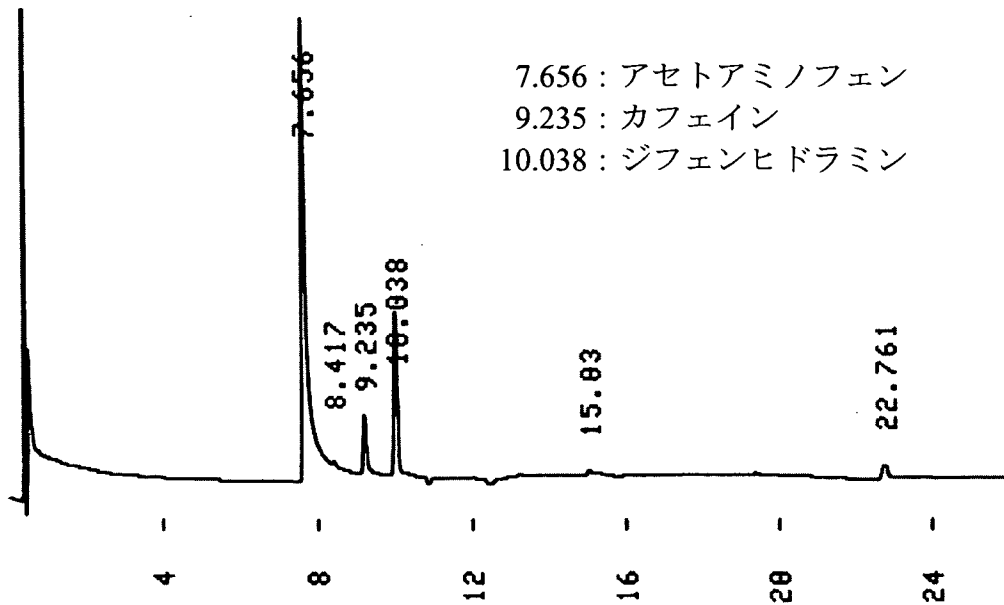
本分析条件にて有機リン系農薬の代謝物のリン酸基側やサリンの分解物を効率良く、高感度に分析することが可能である。

有機リン系農薬の代謝物の検出下限は 0.03 - 0.5 μ g/ml, サリンの分解物のイソプロピルメチルホスホン酸は 0.1 μ g/ml, メチルホスホン酸は 1 μ g/ml である。

症例 1

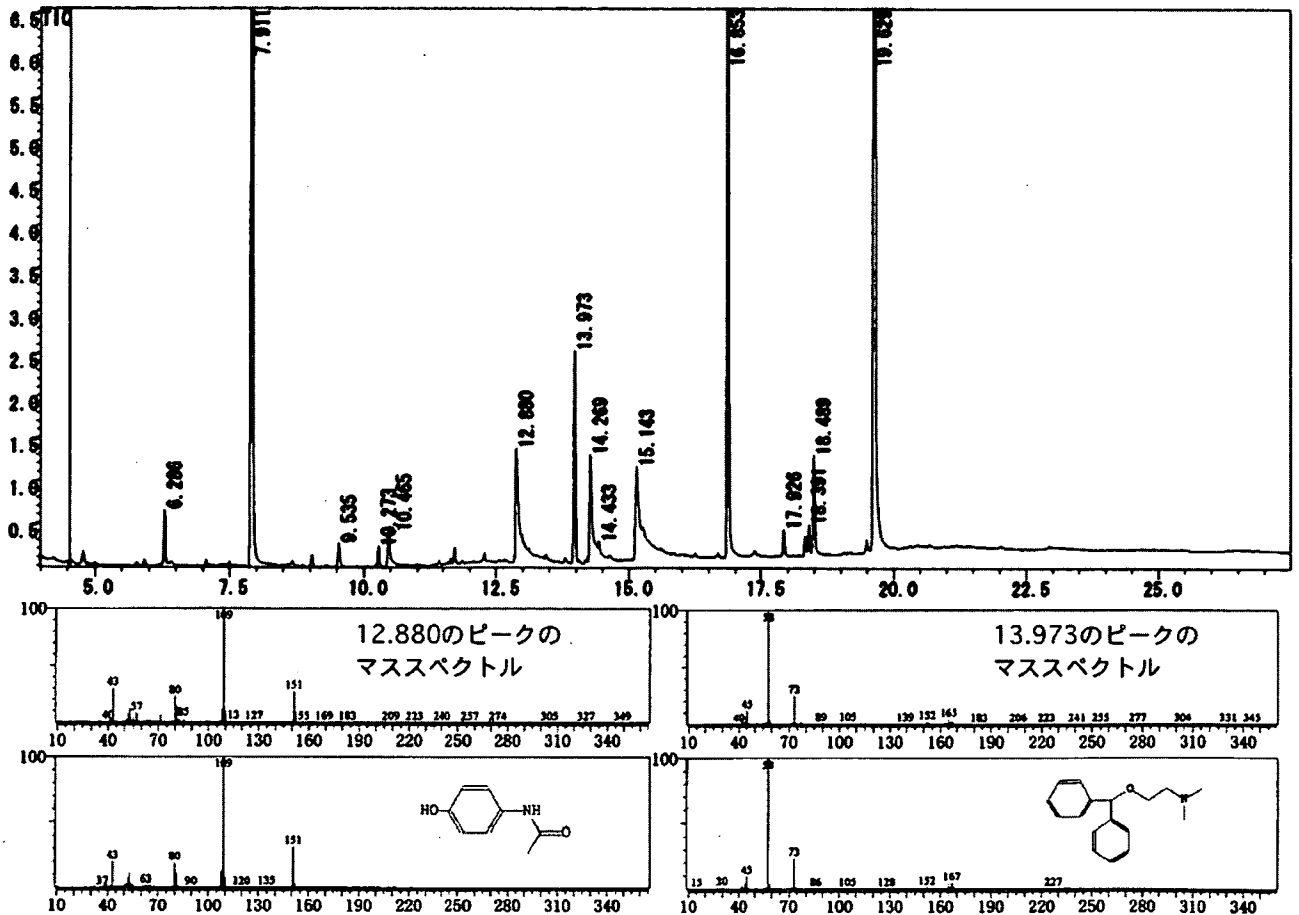
1. 定性分析

1) GC-NPD : アセトアミノフェンとジフェンヒドラミンに一致するピークを検出



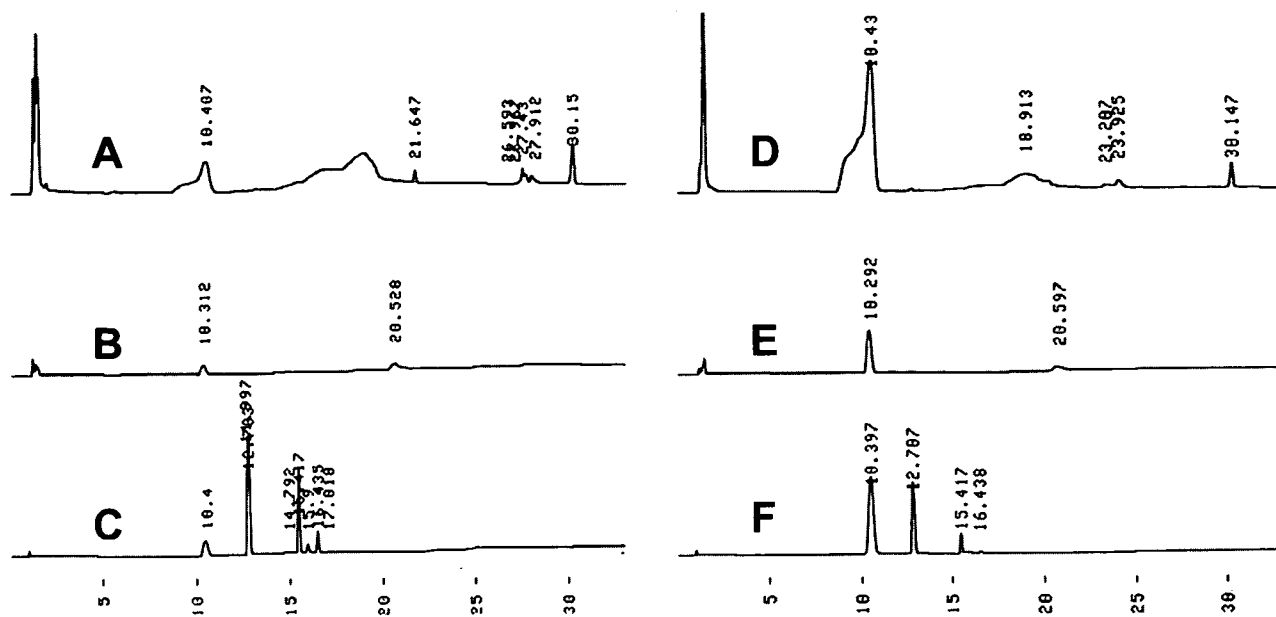
症例 1 血清の GC-FTD クロマトグラム

2) 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とジフェンヒドラミンのマススペクトルに一致するピークを検出



症例 1 血清の GC-MS トータルイオンクロマトグラムとマススペクトル

3) HPLC : アセトアミノフェンに一致するピークを検出



症例 1 血清の高速液体クロマトグラム

- A : 血清除タンパク上清 (210 nm)
 B : 血清除タンパク上清 (10 倍希釈 ; 210 nm)
 C : 標準溶液 (210 nm)
 10.4 : アセトアミノフェン
 12.7 : カフェイン
 15.4 : フェノバルビタール
 15.9 : クレゾール
 16.4 : アリルイソプロピルアセチル尿素

- D : 血清除タンパク上清 (250 nm)
 E : 血清除タンパク上清 (10 倍希釈 ; 250 nm)
 F : 標準溶液 (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 μ l に 1 mg/ml 3-アセトアミドフェノール 10 μ l と水 0.4 ml を加える。
- 2) ボルテックスミキサーで攪拌する。
- 3) 12000-g で 5 分間遠心分離する。
- 4) メタノール 1 ml, 水 1 ml でコンディショニングされた Oasis MCX カートリッジ (1 cc) に上清を注入する。
- 5) 0.1 M 塩酸 1 ml でカートリッジを洗浄する。
- 6) カートリッジを吸引し水分を除く。
- 7) メタノール 1 ml で溶出する。
- 8) 室温水浴中で窒素ガスで乾固する。
- 9) 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 (15 cm x 3.9 mm, 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 : 1 ml/min

カラム温度 : 40 $^{\circ}$ C

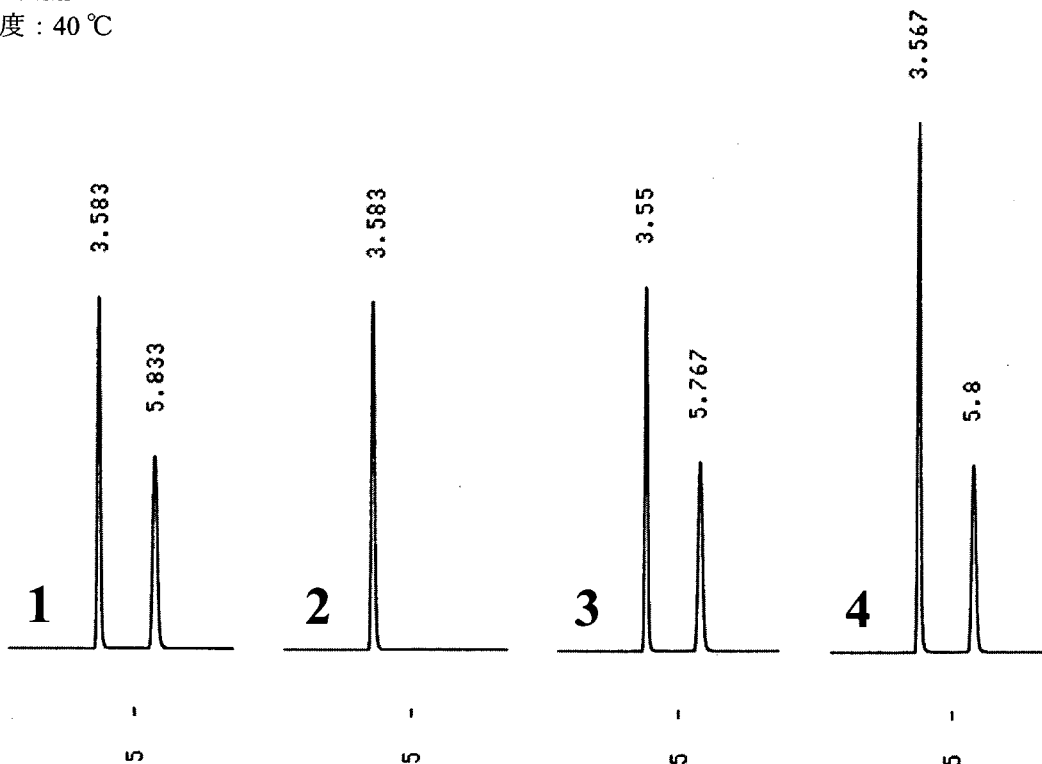


図 標準溶液と血清の高速液体クロマトグラム

1 : 標準溶液 (100 μ g/ml)

2 : 症例 1 血清 (定性)

3 : 症例 1 血清 (定量)

4 : 症例 1 血清+アセトアミノフェン (50 μ g/ml)

3.6 分 : アセトアミノフェン

5.8 分 : 3-アセトアミドフェノール

<定量結果>

アセトアミノフェン : 105.4 μ g/ml

3. 高速液体クロマトグラフによる血清中ジフェンヒドラミンの定量分析

<前処理>

- 1) マイクロチューブに 100 µg/ml クロルフェニラミンメタノール溶液 10 µl を加える.
- 2) 窒素ガスで乾固する.
- 3) 血清 100 µl と 0.1 N 塩酸 100 µl を加え, ボルテックスミキサーで攪拌する.
- 4) n-ブチルクロライド/酢酸エチル (9 : 1, v/v) を 0.5 ml 加え, 1 分間ボルテックスミキサーで攪拌する.
- 5) 12000-g で 5 分間遠心分離後, 有機層を分取する.
- 6) 水層に n-ブチルクロライド/酢酸エチル (9 : 1, v/v) を 0.5 ml 加え, 1 分間ボルテックスミキサーで攪拌する.
- 7) 12000-g で 5 分間遠心分離後, 有機層を分取する.
- 8) 有機層を合わせ, 室温水浴中で窒素ガスで乾固する.
- 9) 移動相 100 µl に溶解し, その 5 µl を高速液体クロマトグラフに注入する.

<分析条件>

装置 : Alliance 2695 & 2996 (Waters)

検出器 : フォトダイオードアレイ検出器 (210 nm)

カラム : XTerra MS C18 (15 cm x 2.1 mm, 3.5 µm, 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 3.0) = 25 : 75

流速 : 0.2 ml/min

カラム温度 : 40 °C

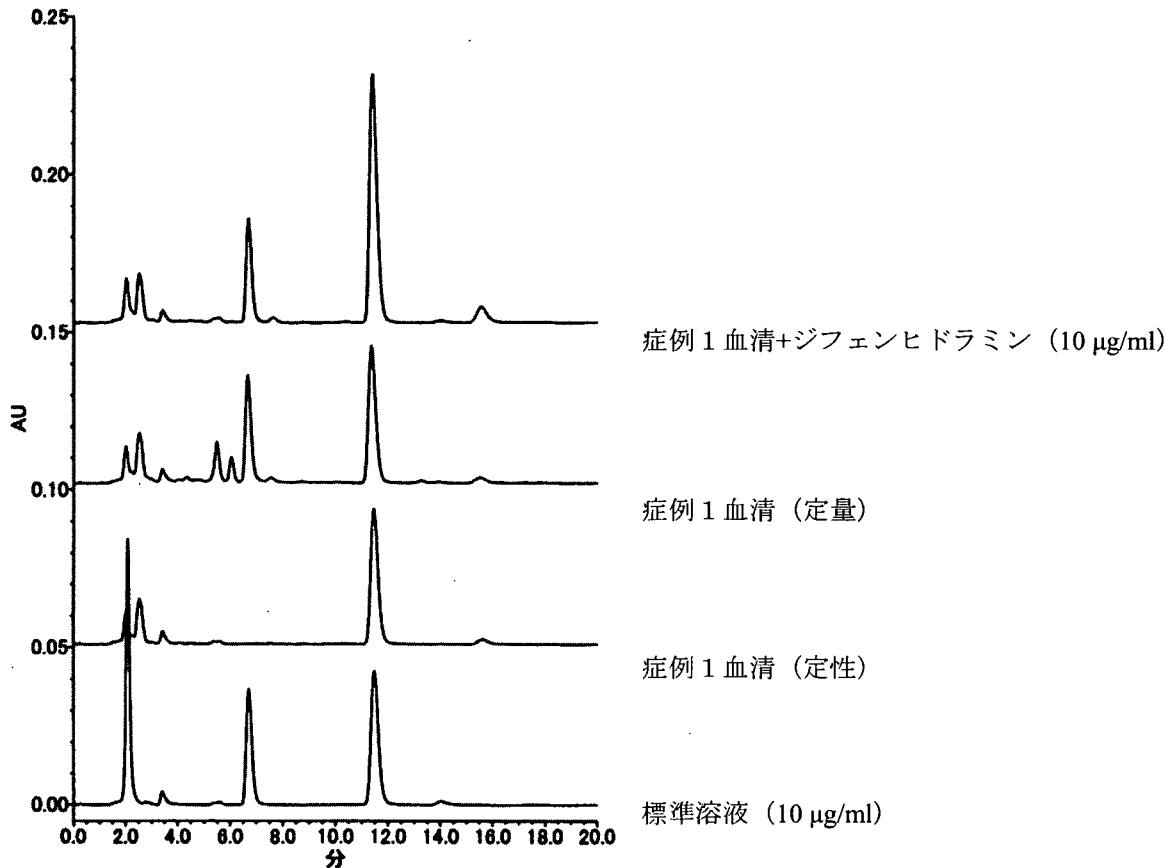


図 標準溶液と血清の高速液体クロマトグラム

6.7分 : クロルフェニラミン

11.4分 : ジフェンヒドラミン

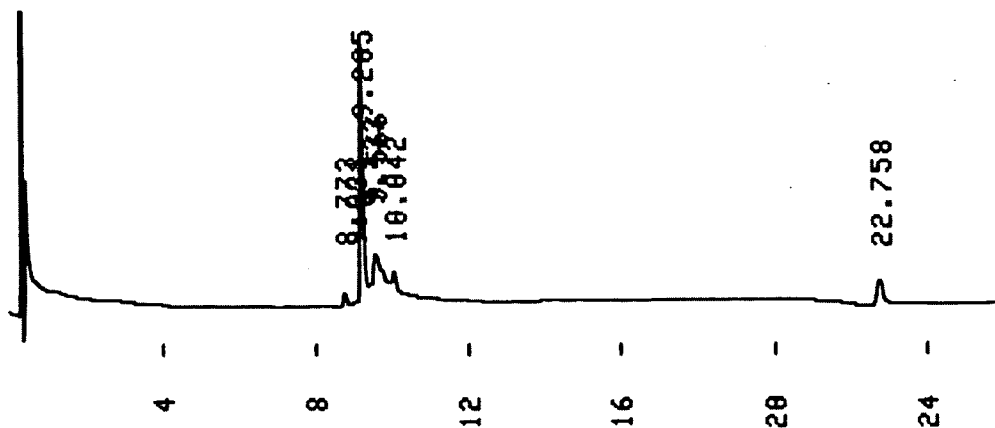
<定量結果>

ジフェンヒドラミン : 11.3 µg/ml

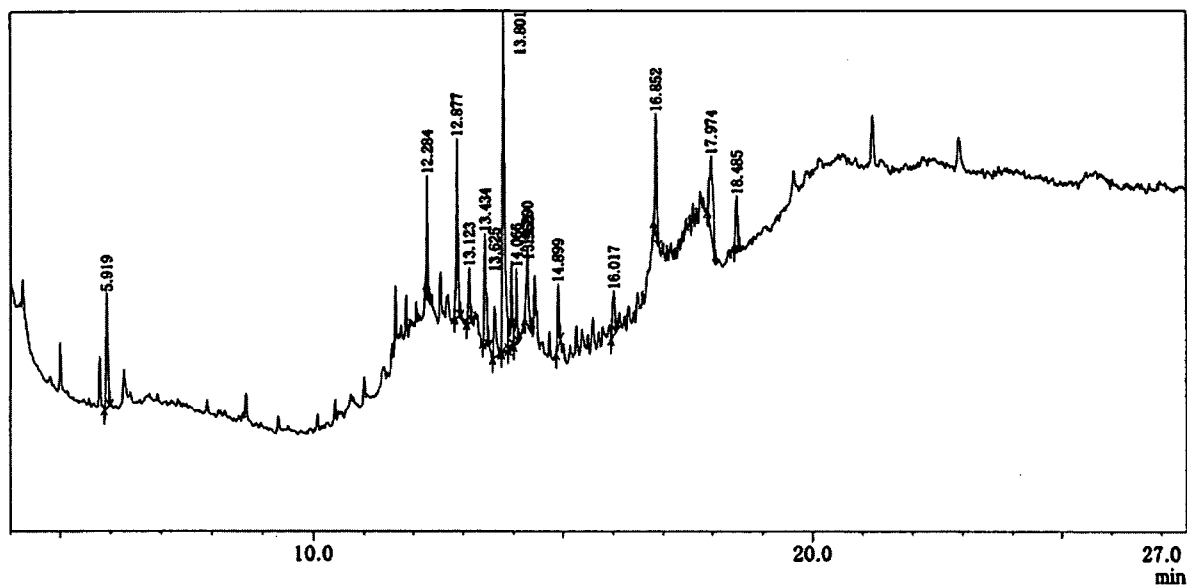
症例 2

1. 定性分析

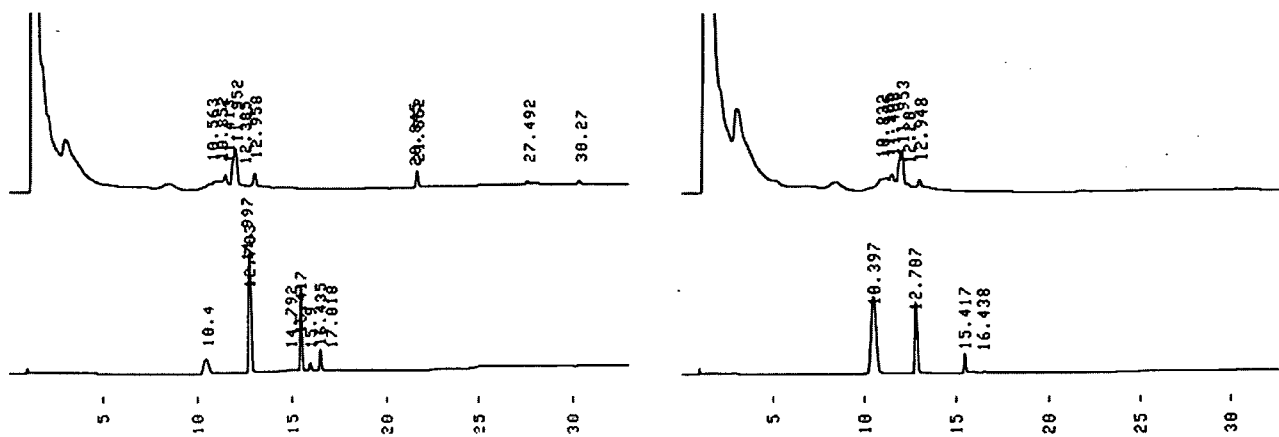
1) GC-FTD : 特に中毒の原因となるような薬毒物は検出されない。



2) GC-MS : 特に中毒の原因となるような薬毒物は検出されない。



3) HPLC : 特に中毒の原因となるような薬毒物は検出されない。

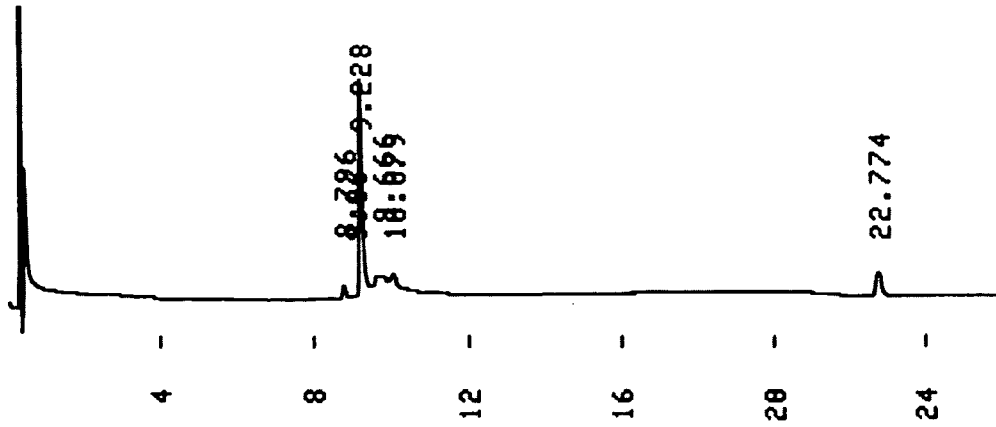


4) CE/MS : 有機リン系農薬の代謝産物やサリンの分解物は検出されない。

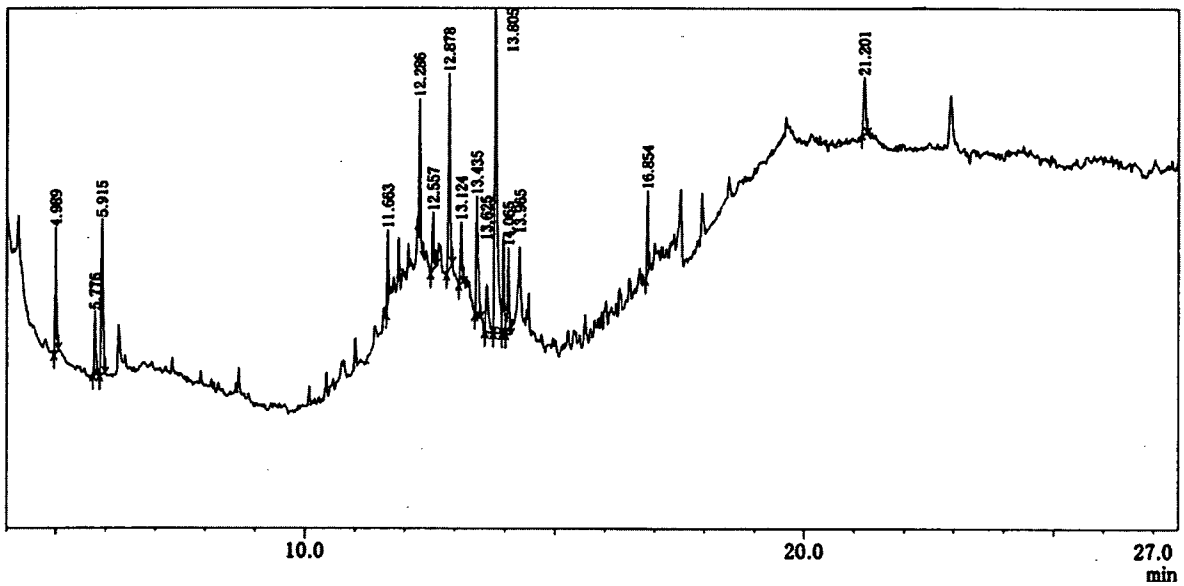
症例 3

1. 定性分析

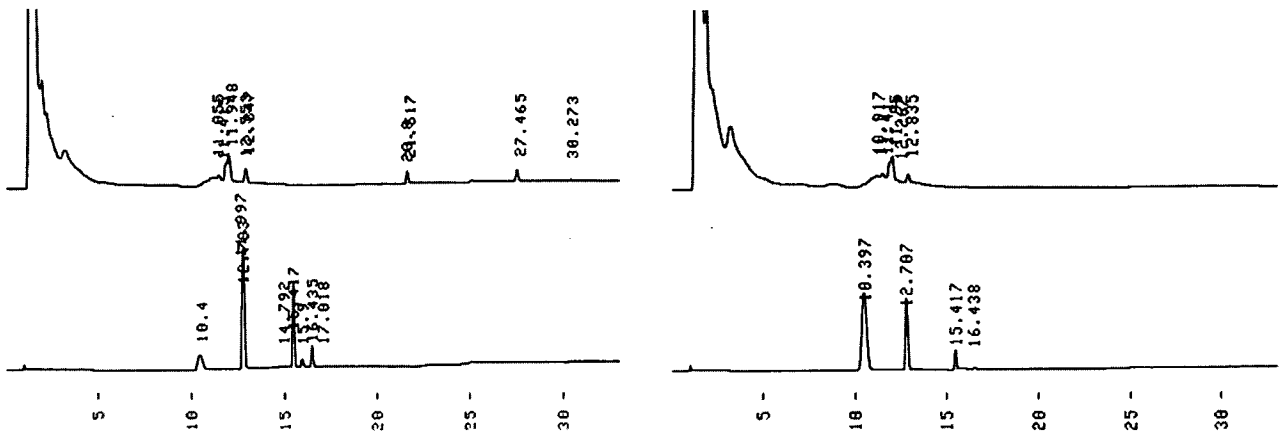
1) GC-NPD : 薬毒物は検出されなかった.



2) GC-MS : 薬毒物は検出されなかった.



3) HPLC : 薬毒物は検出されなかった.



4) キャピラリー電気泳動質量分析法 :

サリンの分解物メチルホスホン酸(m/z 97, 119, 141)を検出.

イソプロピルメチルホスホン酸(m/z 97, 139, 161, 183)は検出されなかった.

イソプロピルメチルホスホン酸 (M: 138) メチルホスホン酸 (M: 96)

m/z 97 : M - イソプロピル + H⁺

(m/z 49 : M + H²⁺) : 50 以下は検出できない.

m/z 139 : M + H⁺

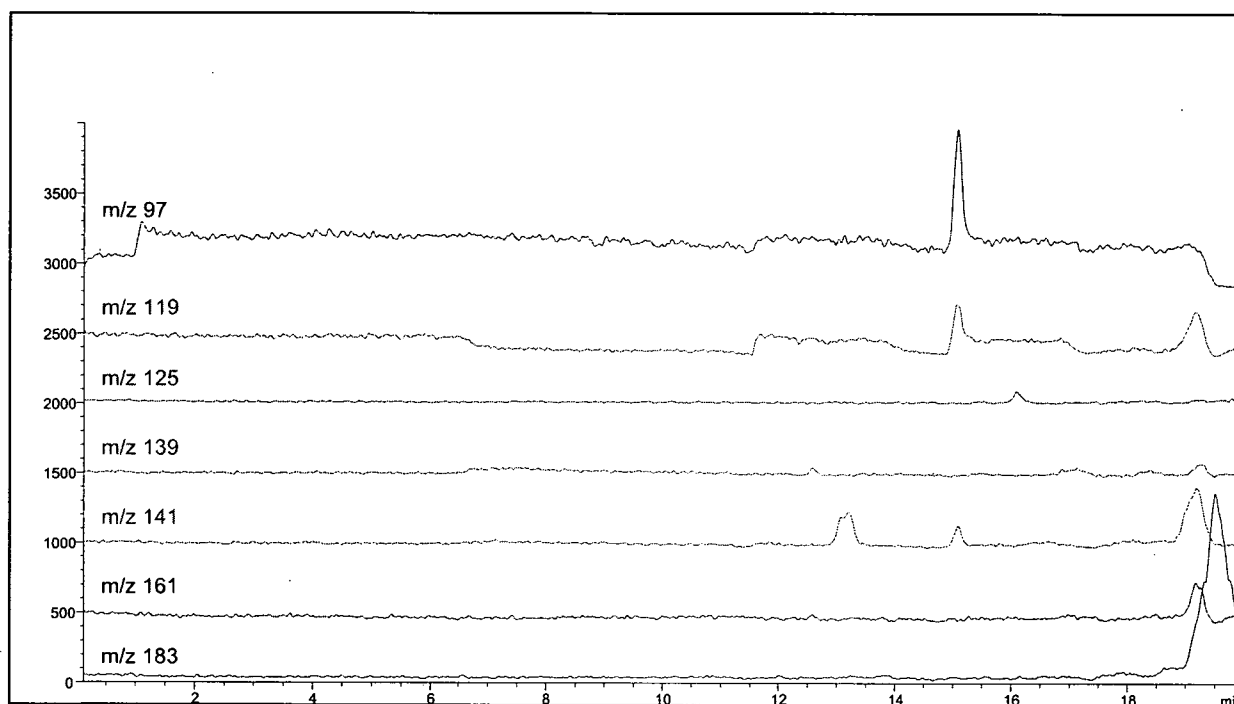
m/z 97 : M + H⁺

m/z 161 : M + Na⁺

m/z 119 : M + Na⁺

m/z 183 : M + K⁺

m/z 141 : M + K⁺



症例3尿の選択イオンエレクトロフェログラム

2. メチルホスホン酸の定量分析

<前処理>

なし (尿の場合, 試料を直接CEに注入し分析することができる)

<分析条件>

・キャピラリー電気泳動

装置: Agilent CEシステム

キャピラリー: Fused silica capillary tube (75 μm i.d., 100 cm long)

キャピラリー温度: 20°C

分析用電解液: 1 M 酢酸-10%メタノール溶液

注入: H₂O; 50 mbar x 5 sec, Sample; 50 mbar x 20 sec, Electrolyte; 50 mbar x 5 sec

印加電圧: -25 kV

検出器: MSD

・質量分析計

装置: Agilent 1100 MSD

イオン化法: エレクトロスプレーイオン化 (ESI)

極性: Positive

キャピラリー電圧: 4000 V

フラグメンター電圧: 20 V

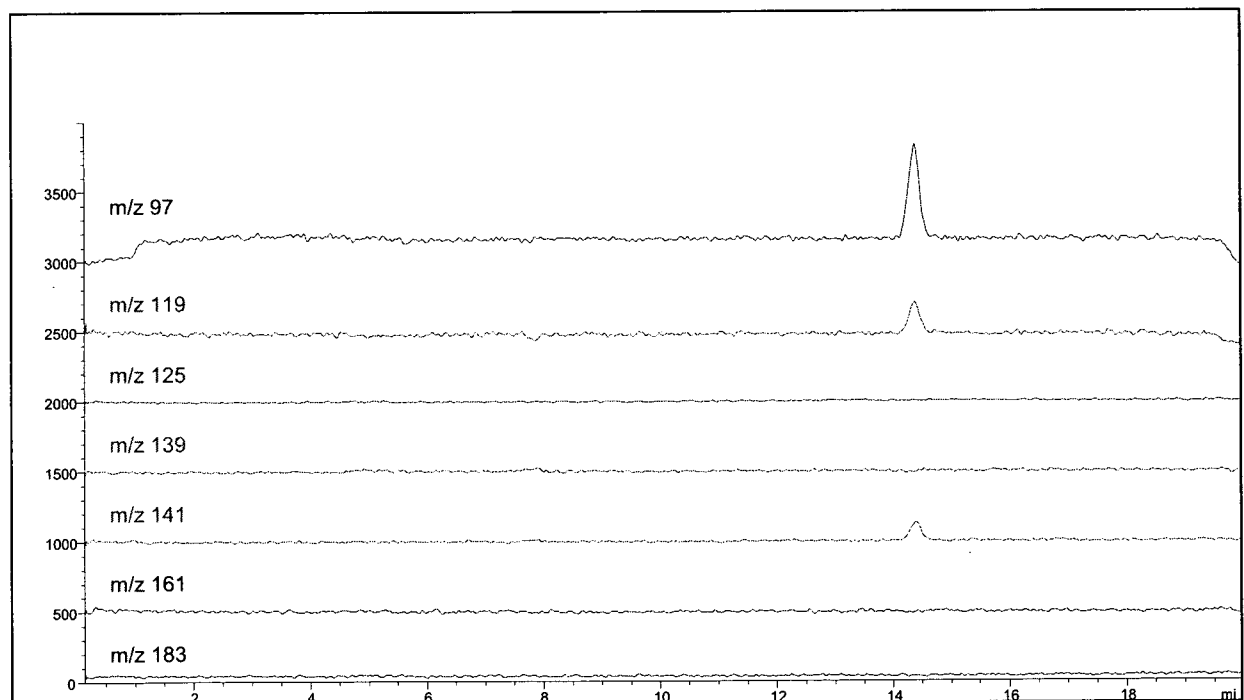
ドライガス流量: 10 l/min (窒素)

ドライガス温度: 350 °C

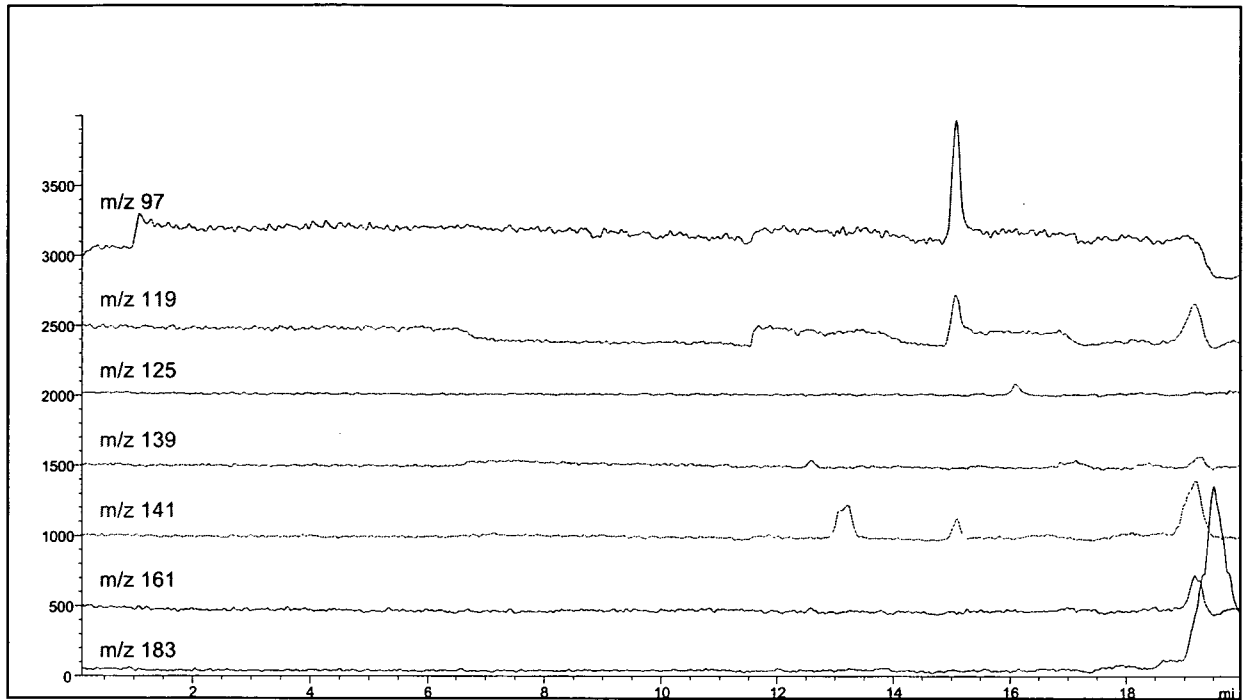
ネブライザーガス圧: 10 psi

シース液: 5 mM 酢酸アンモニウム-50%メタノール溶液

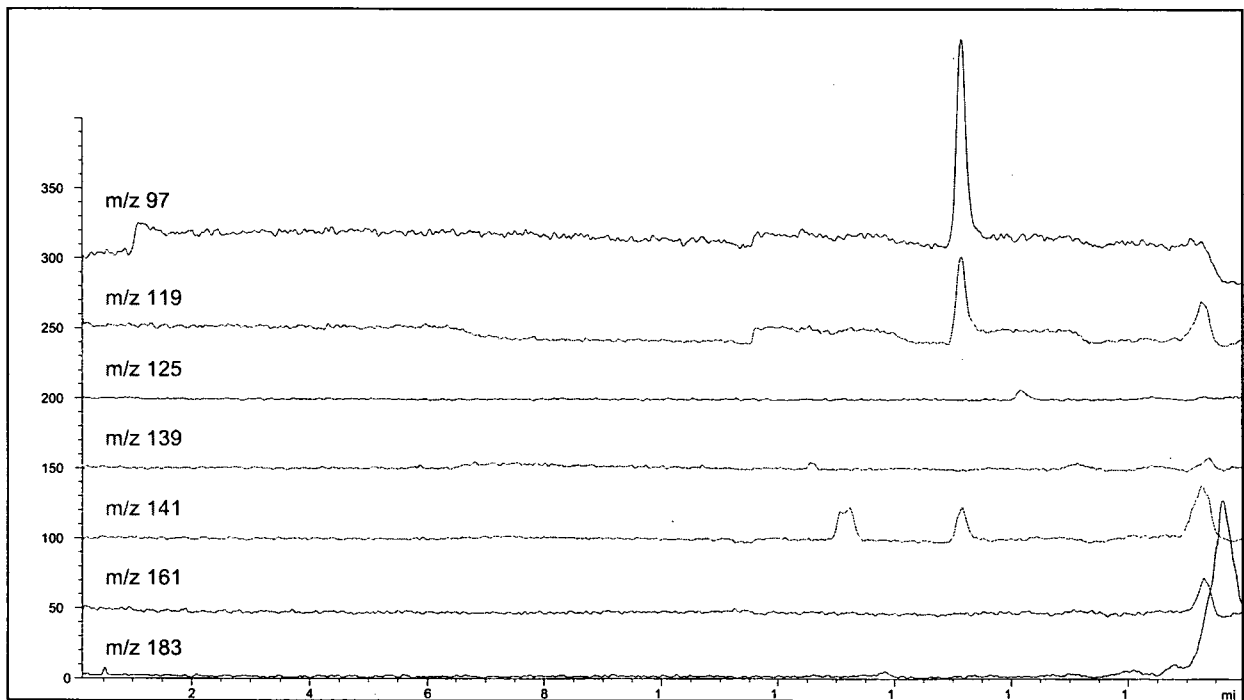
シース液流量: 10 $\mu\text{l}/\text{min}$



メチルホスホン酸標準溶液の選択イオンエレクトロフェログラム (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 溶液)



症例3尿の選択イオンエレクトロフェログラム



症例3尿に標準物質 (5 $\mu\text{g/ml}$) を添加したものの選択イオンエレクトロフェログラム

<定量結果>

メチルホスホン酸 : 4.5 $\mu\text{g/ml}$ (TICのピーク面積より算出)

【注解】

- 1) キャピラリー電気泳動質量分析法を用いることにより誘導体化することなく迅速に検出が可能である。
- 2) 本分析法ではメチルホスホン酸とイソプロピルメチルホスホン酸は分離しないが検出イオンの違いにより区別・定量することができる。

(資料 1-4)

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

救急隊よりカロナールの PTP シートとドリエルの空箱が部屋の中から発見されていることから、アセトアミノフェン、ジフェンヒドラミン中毒と考えられた。

そこで、血清中のアセトアミノフェンとジフェンヒドラミンのスクリーニングをガスクロマトグラフ質量分析計(GC-MS)で行ったところ共に存在が確認できた。次いで、アセトアミノフェンとジフェンヒドラミンの定量を以下のように行った。

抽出方法

1. 試料の血清 0.2 mL に内部標準物質として、*o*-アセトアミドフェノール 10 μg (1 mg/mL 溶液を 10 μL)と純水 0.8 mL を加え、十分にボルテックスした。
2. OASIS HLB 1 cc カラムをメタノール、純水各 1 mL で活性化した。
3. 1 で調整した試料を活性化した HLB カラムに通す。
4. 試料が完全に HLB カラムを通った後に、純水 1.0 mL、5%メタノール 1.0 mL を順次流してカラムを洗浄した。
5. 十分に吸引して余分な水分を除いた。
6. ネジ付き試験管中に 100%メタノール 1.0 mL で溶出した。
7. 45°Cの加熱下、窒素気流下で乾固した。
8. BSTFA+1%TMCS 30 μL 、酢酸エチル 70 μL を加え、キャップ後に 80°Cで 10 分間加熱して誘導体化した。
9. 冷却後、1 μL を GC-MS 試料とした。

検量線は上記と同様の抽出操作を行い作成し、試料中のアセトアミノフェンを定量した。

【分析条件】

GC-MS (EI)

Agilent 6890N ガスクロマトグラフ

Agilent 5975B 質量検出器

カラム : HP-5MS (30 m x 0.25 mm i.d. x 0.25 μm film thickness)

注入口温度 : 250°C

MS イオン源 : 230°C

MS 四重極温度 : 150°C

トランスファー温度 : 280°C

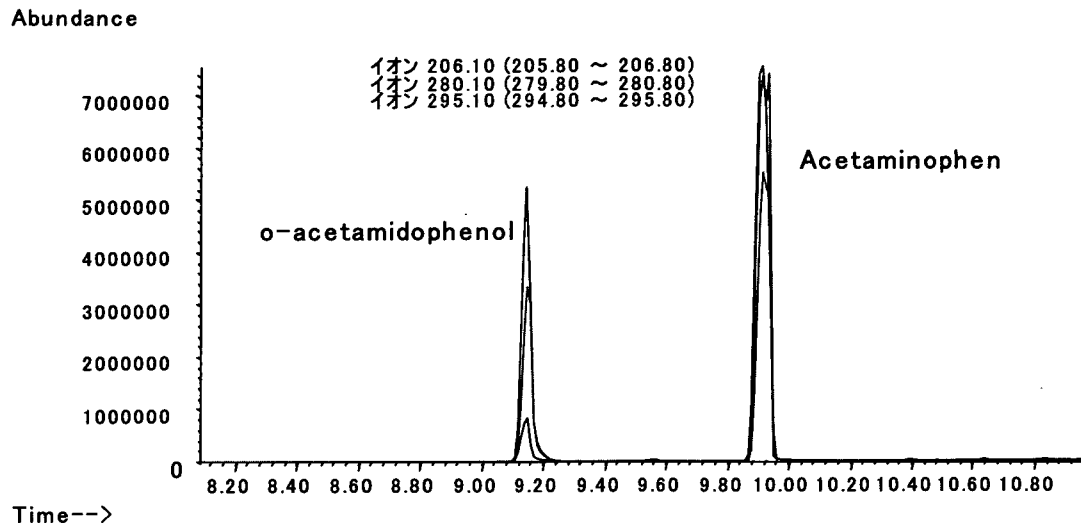
カラム温度 : 100°C (3 min) - 10°C/min - 250°C (3 min)

モニターイオン

アセトアミノフェン : m/z 280.1、206.1、295.1

IS : m/z 280.1、206.1、295.1

抽出後の SIM 分析



定量結果

アセトアミノフェン 96.8 $\mu\text{g/mL}$

ジフェンヒドラミンの抽出と GC-MS 条件

【抽出方法】

1. 試料 0.2 ml に内部標準物質としてシクリジン 2 μg (100 $\mu\text{g/mL}$ の 20 μL) と 0.8 mL の純水を加え十分にボルテックスした。
2. 予め各 1 mL のメタノールと純水で活性化した HLB カラムに上記試料をアプライした。
3. 1 ml の純水、1 ml の 5%メタノールで順次洗浄した。
4. HLB カラムを乾燥した。
5. 1 mL のクロロホルム：エタノール (9:1) で溶出した。
6. 窒素気流下で乾固した。
7. 50 μL の酢酸エチルで再溶解し、1 μL を GC-MS 試料とした。

【分析条件】

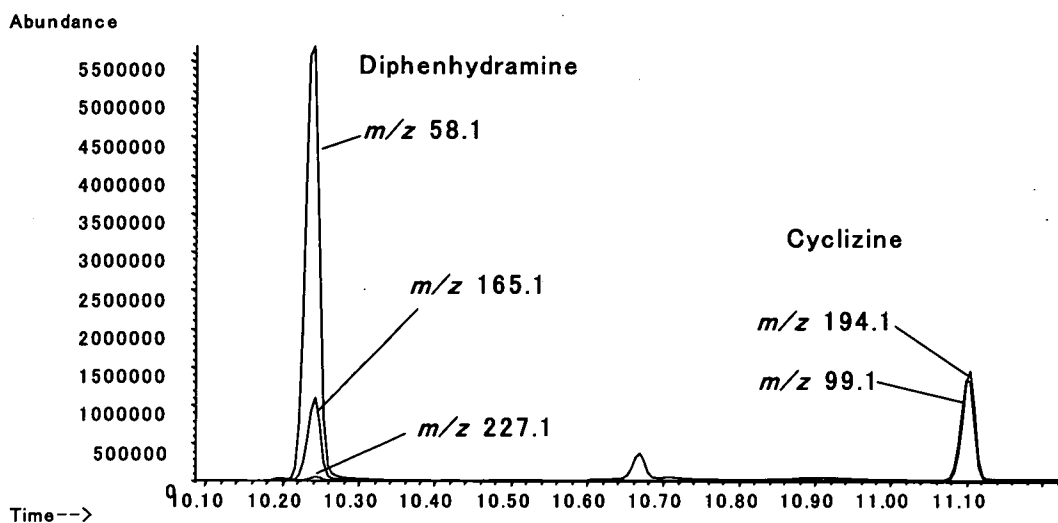
GC-MS (EI)

Column: HP-5MS, 30 m x 0.25 mm i.d. x 0.25 μm thickness

Injectore Temp.: 100 $^{\circ}\text{C}$ (3 min) - 20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ - 300 $^{\circ}\text{C}$ (3 min)

Target Ions: Diphenhydramine; m/z 58.1, 165.1, 227.1

Cyclizine; m/z 194.1, 99.1

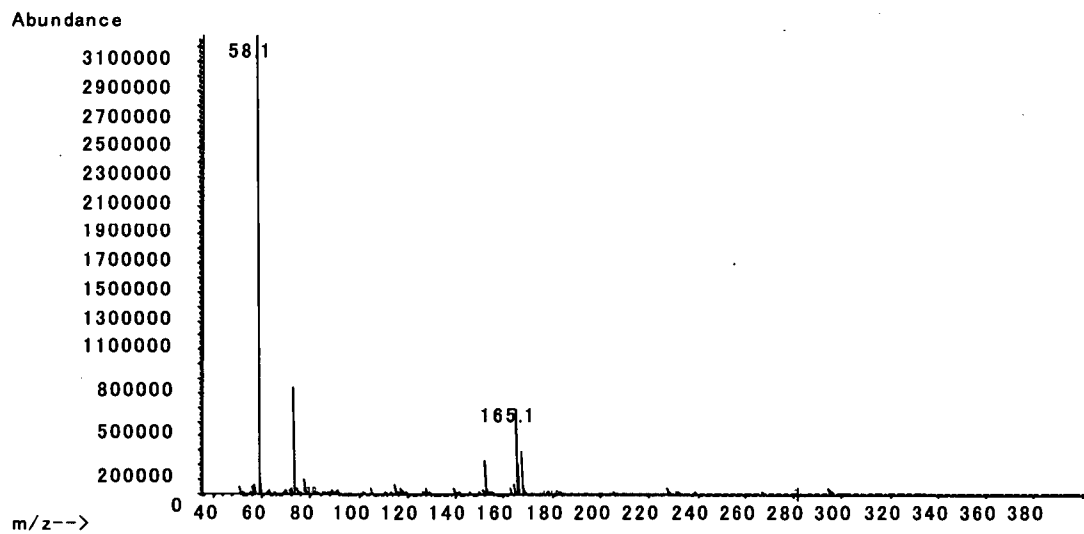


定量結果

ジフェンヒドラミン 8.7 µg/mL

【参考】

ジフェンヒドラミンのマススペクトル



シクリジンのマススペクトル

