

毛髪を中心とした代替生体試料中薬物分析

花 尻 瑠 理

1 はじめに

近年、分析技術の発展とともに、ピコグラムレベルもしくはそれ以下の薬物を分析することが可能となった。その結果、血液や尿等、通常使用される生体試料のみならず、毛髪、口腔内液（唾液）、汗等、その他の様々な生体試料（代替生体試料）に含まれる極微量の薬物を検出することが可能となった。代替生体試料中の薬物分析においては、いかに選択性・感度・精度の高い分析を行うかという分析化学的な課題だけではなく、生体内に取り込まれた薬物が、どのような試料（組織・体液等）に、どのような要因が関与して、どの程度移行して検出されるのかという薬物学的な背景も重要となってくる。さらに、裁判化学の分野においては、いかに外部汚染の影響を除去し、試料採取後に何らかの化合物が故意に混ぜられる可能性を減らし、スクリーニング分析における擬陽性を少なくするか等の取り組みも重要となってくる。本稿では、毛髪を中心に、口腔内液（唾液）、汗、胎便等の代替生体試料中の薬物分析について、乱用薬物に焦点をあて、上述した内容の最近の流れを紹介する。なお、参考文献としては、原則として総説を中心に過去3～5年間に報告された代表的な論文を主に取り上げたが、背景をより明確にするために、それ以前の論文も適宜取り上げている。

2 毛髪試料

2.1 毛髪の特性^{1)~6)}

毛髪は主にケラチンタンパク（65～95%）、水（15～35%）、脂質（1～9%）、メラニン色素（0.1～5%）、微量元素（0.25～0.95%）から構成されている⁷⁾。一般的な成人の毛髪の成長速度は、個人差のみならず、部位や毛周期でも異なるが、おおよそ0.32～0.46 mm/dayと言われている⁸⁾。薬物の毛髪への移行方法としては、1) 血液から取り込まれる、2) 汗や皮脂が浸透する、3) 喫煙等による外部汚染等が考えられている。毛根部分に

存在する毛乳頭には毛細血管が入り込み、ここで血液中の薬物の一部が毛髪中に取り込まれる。毛母細胞が成長して分裂を繰り返し角化しながら毛幹部へと押し上げられていく際に、薬物は細胞の角化に従ってその部位に固定され、大きく拡散することなく、毛髪の成長とともに毛根側から先端に移動していくと考えられている。つまり、1か月に1cm程度毛髪が成長すると考えた場合、根本から1cm程度付近の部位には1か月前に使用した薬物が検出されることになる。そのため、毛髪の成長が一定である場合は、薬物の使用時期と毛髪中の薬物分布が一致し、毛髪分画分析により長期間にわたる過去の薬物使用歴の推定が可能である⁹⁾。薬物の毛髪への移行には、薬物のメラニン色素との親和性、脂溶性及び塩基性が大きく関与することが報告されている¹⁰⁾。極性が高い代謝物よりも親化合物のほうが毛髪へ移行しやすいことから、時間を経た尿中では代謝物しか検出されない薬物でも、毛髪中からは親化合物そのものが主に検出されることが多い¹⁰⁾。

毛髪試料の最大の特徴としては、何よりも薬物の検出期間が長いことにある。通常、薬物摂取後、血液では長くても1日程度、尿でも1週間程度しか薬物は検出されないが、毛髪では薬物摂取数週間後から数か月後までの検出が可能である。また、毛髪に一度取り込まれた薬物は、脱色や染色等を行わない限り比較的安定であるため、毛髪の長さにもよるが、1年以上過去に^{さかのぼ}った薬物使用の推定が可能である場合もある。さらに、1) 血液や尿と比較して採取しやすい、2) 試料採取後に他物質を混ぜにくい、3) 長期間安定に保管可能である、という利点がある。一方、毛髪試料の欠点としては、1) 検出濃度が低く高感度分析が要求される、2) 薬物摂取後短時間では薬物の検出が困難である、3) 毛髪の成長及び種類（色）には個人や人種により差がある、ということが考えられる。このように、薬物を単回摂取した後の薬物動態を評価するには血液や尿試料等のほうがすぐれた生体試料となるが、乱用薬物のように長期にわたる使用実態を評価することが必要な場合は、毛髪が最も適した試料と言える。

Drug Analysis in Hair and Other Alternative Biological Specimens.

2.2 毛髪中の乱用薬物の分析法

毛髪分析の手順は、大きく分類して、1) 毛髪の採取、2) 洗浄、3) 毛髪からの薬物の抽出、4) 抽出物の濃縮・精製、5) 薬物の測定となる。特に統一された方法があるわけではないが、国連の UNDCP (United Nations International Drug Control Programme) では、毛髪、汗及び唾液中药物の分析に関するガイドラインを提出している¹¹⁾。また、ヨーロッパを中心として組織された Society of Hair Testing (SoHT) では、代表的な乱用薬物に関する毛髪分析の手法に関して 2004 年に推奨法を提案している¹²⁾。この提案では、具体的な洗浄法や抽出法、分析法は提示されていないが、代表的な薬物について、推奨する定量限界値及び一緒に検出すべき代謝物等、分析結果の判断基準が記載されている。以下に、個々の操作について簡単に説明する。

2.2.1 毛髪の採取

毛髪の採取部位として最も推奨されるのは頭髪であるが、陰毛、腋毛、ひげ等からも採取される。部位により成長速度が異なり、薬物濃度に差異が認められる。Hanらの報告では¹³⁾、覚せい剤メタンフェタミン中毒者の各部位の毛髪分析を行った結果、頭髪よりも陰毛及び腋毛のほうが高濃度の薬物が検出されている。また、Kintzらの報告では¹⁴⁾、メタンフェタミン及び 3,4-メチレンジオキシメタンフェタミン (MDMA) 中毒者の各部位の毛髪分析において、頭髪、陰毛及び腋毛よりも臍毛において最も高濃度薬物が検出されている。頭髪の場合は、最も成長期の毛髪が多く、成長速度が一定である後頭部が採取場所として適している。採取した毛髪は、乾燥した状態で暗所室温下保管可能である。

2.2.2 毛髪の洗浄

毛髪分析を行う際に最も気をつけるべきことは洗浄である。外部汚染の影響を除くために、現在までに有機溶媒や界面活性剤、水等を組み合わせた様々な洗浄法が検討されてきた²⁾。最近では、最終洗浄液中薬物濃度と毛髪中薬物濃度の割合から、薬物使用と外部汚染を識別している例も報告されている¹⁵⁾¹⁶⁾。また、洗浄だけでは外部汚染を完全に除外しきれないことから、前述した SoHT では、外部汚染と識別するために、代謝物を同時に検出することを推奨している¹²⁾。特に大麻のような喫煙で使用するような薬物に関しては、主成分である Δ 9-テトラヒドロカンナビノール (THC) の定量限界が 0.1 ng/mg 以上の分離分析法を用いて、最終的な大麻使用の判断には代謝物である THC-COOH が 0.2 pg/mg 以上検出されることを推奨している。

2.2.3 毛髪からの薬物の抽出

採取した毛髪は、洗浄後、抽出効率を良くするため
ぶんせき 2009. 2

に、はさみ等により細かくして分析試料とする。毛髪からの薬物の抽出法としては、メタノール等の有機溶媒、酸性溶液、緩衝液等を用いた抽出、アルカリ処理、タンパク質分解酵素処理、そして超臨界抽出法等様々な方法が報告されている¹⁾²⁾⁴⁾。水酸化ナトリウム等の強アルカリ溶液を用いた方法では、毛髪をほぼ完全に可溶化することが可能である。しかし、アルカリ条件下で安定なアンフェタミン類や大麻成分等の毛髪からの抽出には効果的であるが、アルカリ溶液中で分解するコカインのような化合物の抽出には適さない²⁾。また、酸性溶液も塩基性化合物の抽出溶媒として広く用いられているが、酸により一部が加水分解をうけるコカイン (ベンゾイルエクゴニンに分解) やヘロイン使用のマーカとなる代謝物 6-モノアセチルモルヒネ (モルヒネに分解) のような化合物を抽出する際は弱酸を用いる必要がある²⁾。

タンパク質分解酵素を用いて毛髪を処理する方法は、現在までに数多く報告されている。プロナーゼ E もしくはプロテイナーゼ K が最もよく用いられている酵素であるが、酵素反応溶液に、1,4-ジチオスレイトール (DTT) やドデシル硫酸ナトリウムを加えることにより抽出効率が良くなることが知られている²⁾。酵素を用いた方法は、酸やアルカリに弱い化合物、例えばコカインや 6-モノアセチルモルヒネの抽出に適しているが、通常 6~24 時間の反応時間が必要である。酵素の反応時間を短くするために、超音波のエネルギーを用いた方法が報告されている。Míguez-Framilらは、反応液の温度、反応時間、プロナーゼ E 濃度、DTT 濃度、イオン強度、pH、そして超音波の各条件を検討し、最終的に 30 分間の酵素反応で、コカイン及び代謝物ベンゾイルエクゴニン、コデイン、モルヒネ、6-モノアセチルモルヒネを毛髪中から高い回収率で抽出することに成功している¹⁷⁾。筆者らも、実際に本抽出法を用いて、毛髪中のメチルフェニデート (商品名リタリン)、代謝物リタリン酸及びエタノール併用により生成するエチルエステル化体 (エチルフェニデート) について、効率良く同時抽出することが可能であることを報告している¹⁸⁾。超音波下で酵素処理を行う方法は、アルカリ処理や酸性溶液による抽出と比較してコストは高いが、30 分という短時間で、分解されやすい化合物の抽出も可能であることから、今後さらに活用されると考えられる。

2.2.4 抽出物の濃縮・精製法

毛髪から薬物を抽出した後、機器測定を行う前に、通常、抽出溶液の濃縮操作や、試料中の夾雑物を取り除くために、有機溶媒や固相抽出カラムを用いて、抽出 (精製) 操作を行う。近年では、毛髪からの薬物の抽出・濃縮法として、固相マイクロ抽出 (solid-phase micro-extraction, SPME) 法も用いられている³⁾¹⁹⁾²⁰⁾。

SPME 法は、細いニードル (ファイバー) に結合さ

れた固相に試料中の化学物質を吸着させ、吸着後、ファイバーをGC又はGC/MSの注入口に挿入して化学物質を加熱脱着させることにより測定を行う方法である。固相には、ポリアクリル酸(PA)、ポリジメチルシロキサン(PDMS)、ポリジビニルベンゼン(DVB)やそれらを組み合わせたものが主に用いられている³⁾¹⁹⁾²⁰⁾。SPME法とヘッドスペース法(headspace, HS)を組み合わせ(HS-SPME)、GC/MSで分析を行うことにより、クロマトグラム上のバックグラウンドが低い分析が可能となる。通常、毛髪試料では、試料をアルカリ処理してHS-SPME-GC/MS分析を行うため、アルカリ条件下でも安定な化合物である必要がある。現在までに、HS-SPME-GC/MSによる毛髪中のアンフェタミン類²¹⁾²²⁾、大麻成分THC²³⁾²⁴⁾等、いくつかの薬物分析検討結果が報告されている。毛髪中の大麻成分の分析では、Nadulskiらが高感度分析を報告している²⁴⁾。本法では、大麻喫煙時の主代謝物であるTHC-COOHは検出できない。また、Musshoffが報告した方法²³⁾のように、抽出・誘導体化・分析の一連の操作が全自動ではない。しかし、THC及びその他の大麻成分カンナビジオール(CBD)、カンナビノール(CBN)の検出限界が0.01~0.02 ng/mgと感度良い分析が可能となっている。また、ヘッドスペース/固相ダイナミック抽出法(HS solid-phase dynamic extraction, HS-SPDE)も報告されている²⁵⁾²⁶⁾。このHS-SPDEは、試料溶液を攪拌しながらバイアルを加熱し、バイアル中の気相部分をシリンジに何度か出し入れしながらシリンジニードルにコーティングされた固相に目的化合物を吸着させる方法である。LachenmeierらはHS-SPDEとGC/MS/MSを組み合わせ、抽出・濃縮・誘導体化の一連の操作を全自動で行い、毛髪中のメサドン、大麻成分、アンフェタミン類の化合物を検出限界6~52 pg/mg、精度0.4~7.8%で分析する方法を報告している²⁶⁾。その他、液相マイクロ抽出の一種(surfactant enhanced liquid-phase microextraction, SE-LPME)を用いて、試料を濃縮してHPLCに導入する方法も報告されている²⁷⁾。

2.2.5 薬物の測定法

毛髪中の薬物の測定法としては、主にイムノアッセイ、蛍光検出によるHPLC、GC/MS、GC/MS/MS、LC/MS/MS等が用いられている^{1)~6)}。GC/MSは最もよく使われていた測定法であるが、近年では、熱に不安定な化合物も分析が可能で、誘導体化を行わなくてもピコグラムレベルの感度良い分析が可能なLC/MS/MSが主流になりつつある。特に、使用量が少ないために、毛髪中濃度が低く検出が困難であるベンゾジアゼピン系の化合物の分析には優れていると考えられる²⁸⁾²⁹⁾。トリプル四重極型のLC/MS/MS測定により、血液、尿及び毛髪中の26種類のベンゾジアゼピン系薬物や代謝物等

の同時定量法を示した論文(定量限界0.5~10 pg/mg hair)も報告されている²⁸⁾。その他、毛髪分析ではないが、血液及び尿中薬物のスクリーニング分析において、Muellerらは、リニアイオントラップ型ハイブリッド質量分析装置(Qtrap)を用いて、information-dependent acquisition (IDA)機能により自動的に解析を行い、乱用薬物を含む301種類もの法化学的に重要な薬物をターゲットとした同時定性分析法を報告している³⁰⁾。

2.3 乱用薬物以外の毛髪分析例

前述したとおり、毛髪に一度取り込まれた薬物は、脱色や染色等を行わない限り比較的安定であるため、化合物の長期暴露評価を行う場合は、毛髪が最も適した分析試料と言える。そのため、毛髪試料は、裁判化学のみならず、アナボリックステロイド等のドーピング証明³¹⁾³²⁾、妊婦の薬物使用による胎児への薬物暴露評価³³⁾³⁴⁾、農薬やPCB等環境汚染物質のヒト(妊婦及び胎児を含む)への長期暴露評価^{35)~39)}、ヒトの重金属蓄積の評価^{40)~42)}、家畜体毛中薬物分析による抗生物質やステロイド蓄積評価⁴³⁾等、様々な分野で活用されている。また、近年では、HS-SPME-GC/MSやLC/MS、LC/MS/MSを用いて、毛髪からアルコール乱用のマーカーとなるエチルグルクロナイド及び脂肪酸エチルエステルを検出する様々な検討が行われている^{44)~47)}。妊婦及び新生児毛髪からこれら化合物を検出し、妊娠中のアルコール乱用の影響を検討する論文も報告されている⁴⁸⁾。

3 その他の代替生体試料分析

3.1 口腔内液/唾液試料

毛髪と同様に、口腔内液は乱用薬物分析に最もよく使用される代替生体試料の一つである。ここ数年で、口腔内液中の様々な薬物分析に関する論文が急増し、口腔内液採取キットやイムノアッセイによる検出法と組み合わせた携帯用薬物検査キットも多数市販されている^{6)49)~51)}。口腔内液は、非侵略的な試料採取が可能であり、プライバシー侵害の問題なく検査者の目前で採取が可能であることから、試料のすり替えの可能性や、他化合物が混入する可能性が低い。欧米では、自動車運転者や職場での被雇用者に対するオンサイト薬物検査法としても広く使われている^{6)49)~51)}。ただし、尿試料と比較すると採取可能な試料量が少なく、薬物濃度も低い。また、薬物検出期間が短いという欠点もある。

唾液は主要な口腔内液であり、主に大唾液腺(耳下腺、顎下腺、舌下腺)と数多くの小唾液腺から分泌される。水(99%)、ムチンや消化酵素等のタンパク質、ミネラル類等で構成される。通常、1日1000 mL程度分泌され、pHは6.5~7.2程度で血漿よりもやや酸性であることが報告されているが、条件により大きく変化する

る⁶⁾⁵¹⁾⁵²⁾。体内に取り込まれた薬物が口腔内液に移行する主なメカニズムは脂質膜を介した受動拡散である。これは、薬物の物理化学的性質に依存し、分子量、脂溶性、pH と pK_a 値、タンパク結合、イオン化状態等が関与する⁵³⁾⁵⁴⁾。口腔液内の薬物濃度は、個人差あるいは個人内変動が大きい、基本的には血中のフリーの非イオン化状態の薬物濃度に対応することが報告されている⁶⁾⁵⁵⁾⁵⁶⁾。経口や喫煙による薬物摂取の場合、摂取後短時間では口腔内液中薬物濃度は高くなり、血中濃度を反映しない。米国 National Institute on Drug Abuse (NIDA) の Huestis らのグループは、ヒトボランティアにコデイン⁵⁷⁾やメタンフェタミン⁵⁵⁾⁵⁸⁾を経口投与し、血漿中及び口腔内液中における薬物動態を検討している。また、Kauert らは、大麻喫煙者における血清中及び口腔内液中大麻成分の薬物動態検討結果を報告している⁵⁹⁾。

3・2 汗試料

汗は2種類の汗腺（エクリン腺及びアポクリン腺）から分泌される。水が99%以上を占め、高濃度のナトリウムや塩化物イオンを含む。アポクリン腺から分泌される汗にはタンパク質や脂肪酸も含まれる。汗は通常、1日に300~700 mL 分泌される⁶⁾。摂取した薬物の汗への移行は、主に血中から汗腺への受動拡散及び皮脂腺等からの混入が考えられる。汗のpHは5.8程度であり、血液(pH 7.4程度)と比較するとやや酸性であるため、塩基性薬物が汗中に移行するとイオン化され、汗から血液への戻りが抑えられて濃縮されと考えられている⁶⁰⁾。汗への移行は、薬物の物理化学的性質に依存し、分子量や pK_a 、タンパク結合、脂溶性等が関与している。一般に、汗中の薬物の検出期間は1~2週間であり⁶⁾、毛髪と同様に、極性のより高い代謝物よりも親化合物のほうが汗中から検出されやすいことが報告されている⁶¹⁾。

汗試料の採取は、通常、汗を吸着するパッドを装着した接着性フィルム(sweat patch)を背中や腹の部分に一定期間貼る。水分は蒸発していくので、汗中の薬物はパッド上で濃縮され、最終的には汗に含まれていた薬物の累積的な情報が得られる⁶⁾。Sweat patchを途中ではがすと、試験者にわかるようになっているので、途中でなんらかの化合物を加えることは困難である。ここ数年間で、汗中の薬物分析の論文報告が増加したが⁶⁾、米国NIDAのHuestisらのグループは、コカイン⁶²⁾、オピエイト⁶³⁾、大麻成分⁶⁴⁾⁶⁵⁾、MDMA類⁶⁶⁾、メタンフェタミン⁶⁷⁾、メサドン⁶⁸⁾等代表的な乱用薬物について、系統的な検討結果を報告している。Sweat patchによる汗中薬物検査は、非侵略的な試料採取法であり、累積的な薬物情報を得る手段としては効果的である。ただし、汗の量には大きな個人差、個人内差があり、採取量・濃度を

推定することは困難である。また、薬物摂取量と検出量には相関がないことから、汗はあくまでも定性分析を目的とした生体試料と思われる。

3・3 胎便試料及びその他試料

近年、妊婦の薬物乱用による胎盤を介した胎児の薬物暴露を評価するために、新生児の毛髪、尿、臍帯血、胎便、また妊婦の毛髪、血液、口腔内液、汗、尿、母乳、羊水等を試料とした薬物分析が多数報告されている³³⁾³⁴⁾。

胎便は新生児が初めて排泄する便であり、試料としては、誕生後1~3日間程度で排泄されるものを採取する。主にムコ多糖類、水、胆汁塩、胆汁酸、上皮細胞等から構成される⁶⁾³⁴⁾。胎児が羊水を飲み込み始める妊娠12週目あたりから形成されていくと考えられている⁶⁹⁾。胎便への薬物の移行は、主に母親から胎児へ胎盤を介して移行した薬物が排泄されることにより行われるが、それとともに、胎児が尿を羊水中に放出し、再び羊水を飲み込むことにより、胎便中に薬物が濃縮されることも考えられている⁷⁰⁾。胎便は、新生児に負担をかけることなく十分な量を採取することが可能である。また、妊娠12週目あたりから誕生までの長期にわたる薬物情報を蓄積しており、濃縮されているため他試料よりも濃度が高い。そのため、胎児への長期薬物暴露評価を行う際には、重要な生体試料となる。実際に、Ostrea らは、638人もの新生児を対象として、毛髪、胎便、臍帯血に含まれる代表的な農薬及び代謝物についてスクリーニングを行った結果、胎便において最も高い確率で検出している⁷²⁾。

胎便はマトリックスが複雑であり、胎便からの薬物の回収率は、抽出法に大きく依存する。また、オムツに付着している新生児尿からの外部汚染も無視できない。胎便中薬物分析の最も大きな欠点は、イムノアッセイ等によるスクリーニング分析において擬陽性が多いことである。現在までに、乱用薬物のみならず、農薬や食品添加物、重金属など様々な物質について、胎便分析の検討結果が数多く報告されている³³⁾³⁴⁾。前述した米国NIDAのHuestisらのグループは、ブプレノルフィン⁷²⁾、アンフェタミン類⁷³⁾等について、胎便中薬物の分析法検討結果を報告している。

4 まとめ

GC/MS (MS/MS) や LC/MS (MS/MS) 等の出現とともに、過去には分析対象とならなかった生体試料中に極微量含まれる薬物も検出することが可能となり、血液や尿などの従来の生体試料では得られなかった情報も得られるようになった。特に毛髪や胎便は、非侵略的な採取が可能であるとともに、長期的な化合物暴露情報が蓄積される生体試料であることから、薬物のみならず、

農薬や内分泌攪乱物質等の環境汚染物質、また食品添加物等の長期暴露評価へのさらなる応用が期待される。一方、口腔内液については、検査者の目前で試料を非侵略的に採取することが可能であり、感度等の問題はあんにしろ、イムノアッセイキット等と組み合わせれば、現場において短時間で結果を知ることも可能である。そのため、まさに現在、何の薬物の影響下にあるのかを知るためのオンサイトスクリーニング分析に適した生体試料と考えられる。これら代替生体試料には、試料の採取法、抽出法や検出法（感度・精度）等について技術的にまだまだ改善すべき点も残っている。また、分析結果に影響する様々な要因を考慮した上で、結果からどのような情報が得られるのか、判断基準について統一化していく必要があると思われる。

文 献

- 1) "Analytical and Practical Aspects of Drug Testing in Hair" Edited by P. Kintz, (2006), (CRC Press, Florida).
- 2) F. Pragst, M. A. Balikova: *Clin. Chim. Acta*, **370**, 17 (2006).
- 3) F. Musshoff, B. Madea: *Forensic Int. Sci.*, **165**, 204 (2007).
- 4) F. Musshoff, B. Madea: *Anal. Bioanal. Chem.*, **388**, 1475 (2007).
- 5) P. Kintz: *Anal. Bioanal. Chem.*, **388**, 1467 (2007).
- 6) E. Gallardo, A. Queiroz: *Biomed. Chromatogr.*, **22**, 795 (2008).
- 7) M. R. Harkey: *Forensic Sci. Int.*, **63**, 9 (1993).
- 8) L. Pötsch: *Int. J. Legal Med.*, **108**, 285 (1996).
- 9) Y. Nakahara: *J. Chromatogr. B*, **733**, 161 (1999)
- 10) R. Kikura, Y. Nakahara: *Bull. Natl. Inst. Health. Sci.*, **116**, 30 (1998).
- 11) "Guidelines for testing drugs under international control in hair, sweat and saliva" Edited by United Nations Office for Drug Control and Crime Prevention, (2001), (United Nations, New York)
- 12) Society of Hair Testing: *Forensic Int. Sci.*, **145**, 83 (2004).
- 13) E. Han, W. Yang, J. Lee, Y. Park, E. Kim, M. Kim, H. Chung: *Forensic Sci. Int.*, **147**, 21 (2005).
- 14) P. Kintz, V. Cirimele, A. Tracpui, P. Mangin: *J. Chromatogr. B*, **670**, 192 (1995).
- 15) M. Schaffer, V. Hill, T. Cairns: *J. Anal. Toxicol.*, **29**, 319 (2005).
- 16) L. Tsanaclis, J. F. C. Wicks: *Forensic Int. Sci.*, **176**, 19 (2008).
- 17) M. Míguez-Framil, A. Moreda-piñeiro, P. Bermejo-Barraera, P. López, M. J. Tabernerero, A. M. Bermejo: *Anal. Chem.*, **79**, 8564 (2007).
- 18) 花尻 (木倉) 瑠理, 河村麻衣子, 最所和宏, 合田幸広: 日本法中毒学会第 27 年会講演要旨集, p.84 (2008)
- 19) F. Pragst: *Anal. Bioanal. Chem.*, **388**, 1393 (2007).
- 20) G. Vas, K. Vékey: *J. Mass Spectrom.*, **9**, 233 (2004).
- 21) S. Gentili, M. Cornetta, T. Macchia: *J. Chromatogr. B*, **801**, 289 (2004).
- 22) M. Nishida, M. Yashiki, A. Namera, K. Kimura: *J. Chromatogr. B*, **842**, 106 (2006).
- 23) T. Nadulski, F. Pragst: *J. Chromatogr. B*, **846**, 78 (2007).
- 24) F. Musshoff, H. P. Junker, D. W. Lachenmeier, L. Kroener, L. B. Madea: *J. Anal. Toxicol.*, **26**, 554 (2002).
- 25) F. Musshoff, D. W. Lachenmeier, L. Kroener, B. Madea: *Forensic Sci. Int.*, **133**, 32 (2003).
- 26) D. W. Lachenmeier, L. Kroener, F. Musshoff, B. Madea: *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **17**, 472 (2003).
- 27) A. S. Yazdi, Z. Es'haghi: *J. Chromatogr. A*, **1082**, 136 (2005).
- 28) M. Laloup, M. del Mar Ramirez Fernandez, G. De Boeck, M. Wood, V. Maes, N. Samyn: *J. Anal. Toxicol.*, **29**, 616 (2005).
- 29) M. Villain, M. Concheiro, V. Cirimele, P. Kintz: *J. Chromatogr. B*, **825**, 72 (2005).
- 30) C.A. Mueller, W. Weinmann, S. Dresen, A. Schreiber, M. Gergov: *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **19**, 1332 (2005).
- 31) P. Anielski: *J. Mass Spectrom.*, **43**, 1001 (2008).
- 32) P. Kintz: *Leg. Med.*, **Suppl.1**, S29 (2003).
- 33) T. Gray, M. Huestis: *Anal. Bioanal. Chem.*, **388**, 1455 (2007).
- 34) J. Lozano, O. García-Algar, O. Vall, R. de la Torre, G. Scaravelli, S. Pichini: *Ther. Drug Monit.*, **29**, 711 (2007).
- 35) E. M. Ostrea Jr., Villanueva-Uy, D. M. Bielawski, N. C. Posecion Jr., M. L. Corrion, Y. Jin, J. J. Janisse, J. W. Ager: *Environ. Res.*, **101**, 312 (2006).
- 36) A. M. Tsatsakis, M. N. Tzatzarakis, M. Tutudaki: *Forensic Sci. Int.*, **176**, 67 (2008).
- 37) G. Zhao, Z. Wang, M. H. Dong, K. Rao, J. Luo, D. Wang, J. Zha, S. Huang, Y. Xu, M. Ma: *Sci. Total Environ.*, **397**, 46 (2008).
- 38) H. Zhang, Z. Chai, H. Sun: *Environ. Int.*, **33**, 685 (2007).
- 39) T. Nakao, O. Aozasa, S. Ohta, H. Miyata: *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **49**, 124 (2005).
- 40) I. A. Bergdahl, S. Skerfving: *J. Toxicol. Environ. Health A*, **71**, 1235 (2008).
- 41) I. M. Kempson, W. M. Skinner, K. P. Kirkbride: *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.*, **10**, 611 (2007).
- 42) K. Srogi: *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, **189**, 107 (2007).
- 43) M. Gratacós-Cubarsi, M. Castellari, A. Valero, J. A. García-Regueiro: *J. Chromatogr. B*, **834**, 14 (2006).
- 44) P. Kintz, M. Villain, E. Vallet, M. Etter, G. Salquebre, V. Cirimele: *Forensic Sci. Int.*, **176**, 87 (2008).
- 45) B. M. Appenzeller, M. Schuman, M. Yegles, R. Wennig: *Alcohol Alcohol.*, **42**, 326 (2007).
- 46) M. Yegles, A. Labarthe, V. Auwärter, S. Hartwig, H. Vater, R. Wennig, F. Pragst: *Forensic Sci. Int.*, **145**, 167 (2004).
- 47) C. Jurado, T. Soriano, M. P. Giménez, M. Menéndez: *Forensic Sci. Int.*, **145**, 161 (2004).
- 48) F. Pragst, M. Yegles: *Ther. Drug Monit.*, **30**, 255 (2008).
- 49) P. Lillsunde: *Ther. Drug Monit.*, **30**, 181 (2008).
- 50) O. H. Drummer: *Ther. Drug Monit.*, **30**, 203 (2008).
- 51) O. H. Drummer: *Clin. Biochem. Rev.*, **27**, 147 (2006).
- 52) D. J. Crouch: *Forensic Sci. Int.*, **150**, 165 (2005).
- 53) J. K. M. Aps, L. C. Martens: *Forensic Sci. Int.*, **150**, 119 (2005).
- 54) N. Samyn, M. Laloup, G. De Boeck: *Anal. Bioanal. Chem.*, **388**, 1437 (2007).
- 55) R. J. F. Schepers, J. M. Oyler, R. E. Joseph, Jr., E. J. Cone, E. T. Moolchan, M. A. Huestis: *Clin. Chem.*, **49**, 121 (2003).
- 56) O. H. Drummer: *Forensic Sci. Int.*, **150**, 133 (2005).
- 57) E. W. Schilke, A. J. Barnes, S. L. Kacinko, E. J. Cone, E.

- T. Moolchan, M. A. Huestis : *Clin. Chem.*, **52**, 1539 (2006).
- 58) M. A. Huestis, E. J. Cone : *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1098**, 104 (2007).
- 59) G. F. Kauert, J. G. Ramaekers, E. Schneider, M. R. Moeller, S. W. Toennes : *J. Anal. Toxicol.*, **31**, 288 (2007).
- 60) M. A. Huestis MA, J. M. Oyler, E. J. Cone, A. T. Wstadik, D. Schoendorfer, R. E. Joseph Jr. : *J. Chromatogr. B*, **733**, 247 (1999).
- 61) M. J. Follador, M. Yonamine, R. L. de Moraes Moreau, O. A. Silva : *J. Chromatogr. B*, **811**, 37 (2004).
- 62) S. L. Kacinko, A. J. Barnes, E. W. Schwilke, E. J. Cone, E. T. Moolchan, M. A. Huestis : *Clin. Chem.*, **51**, 2085 (2005).
- 63) E. W. Schwilke, A. J. Barnes, S. L. Kacinko, E. J. Cone, E. T. Moolchan, M. A. Huestis : *Clin. Chem.*, **52**, 1539 (2006).
- 64) T. Saito, A. Wtsadik, K. B. Scheidweiler, N. Fortner, S. Takeichi, M. A. Huestis : *Clin. Chem.*, **50**, 2083 (2004).
- 65) M. A. Huestis, K. B. Scheidweiler, T. Saito, N. Fortner, T. Abraham, R. A. Gustafson, M. L. Smith : *Forensic Sci. Int.*, **174**, 173 (2008).
- 66) B. S. De Martinis, A. J. Barnes, K. B. Scheidweiler, M. A. Huestis : *J. Chromatogr. B*, **852**, 450 (2007).
- 67) A. J. Barnes, M. L. Smith, S. L. Kacinko, E. W. Schwilke, E. J. Cone, E. T. Moolchan, M. A. Huestis : *Clin. Chem.*, **54**, 172 (2008).
- 68) B. R. Brunet, A. J. Barnes, K. B. Scheidweiler, P. Mura, M. A. Huestis : *Anal. Bioanal. Chem.*, **392**, 115 (2008).
- 69) J. Gareri, J. Klein, G. Koren : *Clin. Chim. Acta*, **366**, 101 (2006).
- 70) E. M. Ostrea Jr, D. M. Bielawski, N. C. Posecion Jr. : *Arch. Dis. Child.*, **91**, 628 (2006).
- 71) E. M. Ostrea Jr, D. M. Bielawski, N. C. Posecion Jr., M. Corrion, E. Villanueva-Uy, Y. Jin, J. J. Janisse, J. W. Ager : *Environ. Res.*, **106**, 277 (2008).
- 72) S. L. Kacinko, D. M. Shakleya, M. A. Huestis : *Anal. Chem.*, **80**, 246 (2008).
- 73) T. Kelly, T. R. Gray, M. A. Huestis : *J. Chromatogr. B*, **867**, 194 (2008).



花尻 (木倉) 瑠理

(Ruri KIKURA-HANAJIRI)

国立医薬品食品衛生研究所 (〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1)。千葉大学大学院薬学研究科博士課程前期修了。薬学博士。《現在のテーマ》乱用薬物・植物の分析及び薬物動態に関する研究。《趣味》弓道、各地の温泉巡り。

E-mail : kikura@nihs.go.jp

Direct Analysis in Real Time (DART)-MS を用いた前処理不要の迅速分析法

花尻 (木倉) 瑠理

Ruri Kikura-Hanajiri

国立医薬品食品衛生研究所生薬部
東京都世田谷区上用賀1-18-1National Institute of Health Sciences, Division of Pharmacognosy, Phytochemistry and Narcotics
1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

Summary

Direct Analysis in Real Time (DART) is a new ionization technique that was developed and first reported in 2005 for the ambient ionization of samples in either the solid, liquid or gaseous state. Any sample directly exposed to the DART gas stream will rapidly generate ions that are carried by the gas stream into the sampling orifice of the mass spectrometer (MS) atmospheric pressure interface. The most important advantages of this technique are a rapid analysis time (a few seconds) and a reduction in sample preparation. The DART maximizes its ability in combination with a high resolution MS because it is possible to instantaneously estimate elemental compositions of samples through exact mass

measurement. DART can be applied to a wide range of applications; for example, reaction monitoring, the direct analysis of a TLC plate, the search for constituents in the raw materials of plants or in plant tissue culture, the investigation into various products of foods and pharmaceuticals, biological analyses, and forensic sciences. Although it is difficult to estimate the matrix effects caused by other ingredients, the DART-MS will be useful as a simple and rapid screening for the targeted compounds in various samples because it provides the molecular information of these compounds without time-consuming extraction and pre-treatment steps.

1. はじめに

近年、様々な物質の分析手段として質量分析法が使用されている。新たなイオン源の開発により、適用範囲が広がり、多種多様な化合物を分析することが可能となってきたが、これらのイオン化法は試料に高温・高電圧、レーザー照射等の負荷をかける必要があるため、基本的には密閉された状態のイオン源を使用することになる。Direct Analysis in Real Time (DART) は、大気圧下で完全に解放された状態で、様々な形態の試料のイオン化を可能とする新しい技術として近年開発されたイオン化法である¹⁾。この装置を質量計 (mass spectrometer; MS) に接続することで、前処理無しに試料中の化合物のマスペクトルを測定することが可能である。特に、高分解能の飛行時間型質量分析計 (time of flight mass spectrometer; TOFMS) を用いることで、精密質量測定に基づく元素組成推定が可能となる。DARTは、液体、固体等の

試料形態を問わず、試料をそのままイオン源にかざすだけで表面の物質がイオン化され分子量の測定が可能であるため、成分分析の簡便化、迅速化が期待できる。すでにDARTを使用した食品中の異物²⁻⁶⁾・防かび剤⁷⁾、天然物 (食品成分を含む)⁸⁻¹¹⁾、玩具や食品容器包装中の添加剤^{12, 13)}、植物培養細胞・組織中成分¹⁴⁻¹⁶⁾、飲料水中アクリルアミド¹⁷⁾、医薬品¹⁸⁻²⁰⁾、生体試料中の代謝物²¹⁻²³⁾、香料²⁴⁾、細菌細胞の脂肪酸²⁵⁾、違法薬物・植物^{26, 27)}、書類上のインク²⁸⁾、その他様々な分析適用例が報告されている²⁹⁻³¹⁾。最近では、抗インフルエンザA型 (H1N1) 活性を有するエルダーベリー果実抽出物について、抽出物とウイルスをインキュベーションした後、ウイルス表面に結合している化合物を直接DART-TOFMSで分析することにより、活性化化合物の探索を行っている研究も報告されている³²⁾。本稿では、DARTイオン化法について簡単に解説するとともに、我々の研究結果を中心に、違法植物製品の成分分析及びいわゆる健康食品中に違法に添加された医薬品成分の分析への適用例について紹介する。

2. DARTイオン化法

2-1. DARTイオン化法の原理

DARTのイオン化原理は、励起状態の原子・分子が大気ガス及び試料と相互作用することに基づく(図1)^{1), 3), 33)}。DARTに導入されたガス(主にヘリウムもしくは窒素)はニードル電極の放電によりプラズマを発生する。プラズマ中の荷電粒子の大部分はディスク電極及びグリッド電極により除去され、励起状態の中性気体分子のみが大気ガス中へ放出される。この時、ヒーターによりガスを加熱することで試料の気化及び物質表面からの熱脱着を促進し、より効率的にイオン化を行うことが可能となる。ヘリウムを使用した場合の正イオン化機構は、励起状態のヘリウムと大気中の水分子が相互作用することにより生成する水のクラスターイオンの形成とこれに基づくプロトン移動反応と考えられており、試料と反応して主に $[M+H]^+$ が形成される。また、負イオン化機構は、同様に大気中の水分子及び酸素分子との相互作用に基づくプロトン移動反応であると推定され、主に $[M-H]^-$ が形成される。イオン化効率、DARTに導入するガス流量や温度により変化する^{2), 34)}。

2-2. TLCとDARTイオン化法

上述したように、大気圧下で完全に解放された状態で、試料形態を問わず直接イオン化を行うため、薄層クロマトグラフィー(TLC)のプレート上で分離した試料成分を直接分析することも可能である^{6, 9, 17, 35, 36)}。この際、プレート上にグリセロールを塗布することにより、固定相に強く吸着してしまう

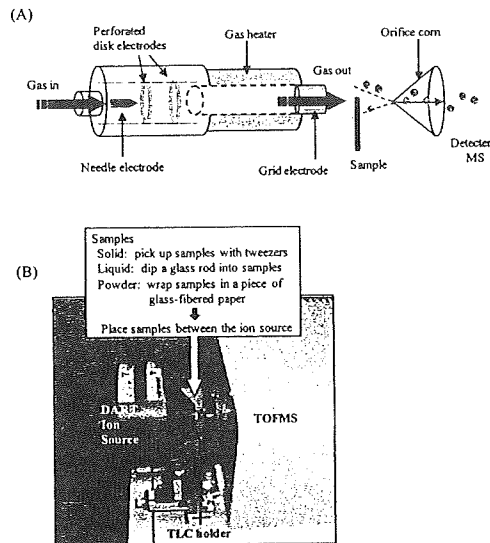


図1. DARTイオン化のしくみ

試料に対する感度向上や、熱による脱水などの分解を緩和する効果が期待できる³⁰⁾。TLCは簡便な分離手法であり、複雑なマトリックスを有する試料の一次スクリーニング分析にも使用されるが、分離した成分の確認については、UV吸収や呈色試薬に頼らざるをえず、特異性が十分とは言えない。DART-TOFMSを使用することにより、分取・精製等の操作を加えることなく、TLCプレート上分離した成分の元素組成推定が可能となり、特に天然化合物の単離同定や有機合成の過程において有用な分析手法になると考えられる。

2-3. DART-MS測定における再現性と定量性

DART-MS測定は、「試料をイオン源にかざすだけ」という試料導入法であるが故に、再現性及び定量性の低さが問題とされてきた。しかし、ここ数年で、イオン化用ガスの噴出角度の可変化や、固体や液体等、試料の形態に対応した自動サンプル導入用装置が開発され、一定の条件下で試料のイオン化が可能となり、データの信頼性が向上した³¹⁾。また、高流量を必要とするイオン化用ガスの質量分析装置への影響を抑えるために、質量分析装置とのインターフェイス部分に真空ポンプを接続して質量分析装置内の真空バランスを保ち効率的にイオンを導入することにより、感度も向上している³²⁾。Shaoxia Yuらは、DARTにタンデム四重極型質量分析計を接続し(DART-MS/MS)、血漿試料中の様々な薬物の測定を行い、自動サンプル導入用装置を用いた際の分析の再現性、感度、精度を検討している³³⁾。その結果、ラット血漿中ベンゾイルエコゴニン(乱用薬物コカインの主代謝物)の分析では、 $1\mu\text{M}$ 濃度における連続注入時($n=9$)のピーク高さの再現性(% CV)は3.1%であった。また、 2ng/mL から $20\mu\text{g/mL}$ の4ケタにわたる広い濃度範囲で直線性が得られ、精度(% CV)及び正確度(% Bias)共に良好な結果を示した。さらに、本システムを薬物投与ラットの薬物動態解析に適用したところ、液体クロマトグラフ装置(LC)にMS/MSを接続して分離測定した場合と、DART-MS/MSを用いて直接測定した場合の血漿中薬物濃度に大きな差異は認められなかった。用いる試料(血漿、組織ホモジネート、肝ミクロソーム等)や対象とする化合物によりマトリックス効果は異なり、テストステロンのように、化合物によっては簡単な前処理を行わないと検出が困難な例もあるが、薬物動態の検討など、定量性が必要とされる多試料の迅速分析にも、DART-MSは適用可能と考えられる。

3. 違法植物の成分分析への応用例

3-1. 植物系違法ドラッグ製品の成分分析²⁹⁾

近年、麻薬や覚せい剤などの代用として、違法ドラッグと呼ばれる様々な化学物質や植物が法律の規制枠を逃れて販

売、乱用されている。違法ドラッグとは、一般に、麻薬及び向精神薬取締法上の「麻薬」または「向精神薬」には指定されていないが、それらと類似の有害性を有することが疑われる物質（人為的に合成されたもの、天然物及びそれに由来するものを含む）であり、もっぱら人の乱用に供することを目的として製造、販売等されるものを示す。違法ドラッグ製品は比較的安価で、一時は繁華街の路上やアダルトショップ、インターネットなどで容易に入手が可能であったことから、特に青少年の間で蔓延し、健康被害や社会的弊害が大きな問題となった。これらの問題に対処すべく、2006年度（平成18）の薬事法改正により、平成19年4月より指定薬物制度が施行され、違法ドラッグに対する規制が強化された。しかし一方で、規制が厳しくなった化学合成化合物の代替品として、植物を原料とした製品（植物系違法ドラッグ製品）の流通が深刻な問題となっている。これらの製品は、幻覚等の作用を標榜し、乾燥植物の葉、樹皮、種子、樹脂、粉末など多様な形態で販売されたり、数種類の植物細片が混合された形態で販売されているが、実際にどのような植物や成分が含まれているか明らかとなっていないものが多い。そのため、まずは、個々の植物の活性成分についての研究を行うとともに、実際

の製品を分析するための、効率の良いスクリーニング手法の検討が重要な課題となっている。我々は乾燥植物、樹脂、粉末等の形態を有する植物系違法ドラッグ36製品（インターネット流通品）について、抽出操作等の前処理を行わずに、DART-TOFMSを用いて、代表的な植物由来幻覚成分であるサルビノリンA、メスカリン、ハルミン、ハルマリン、*N,N*-

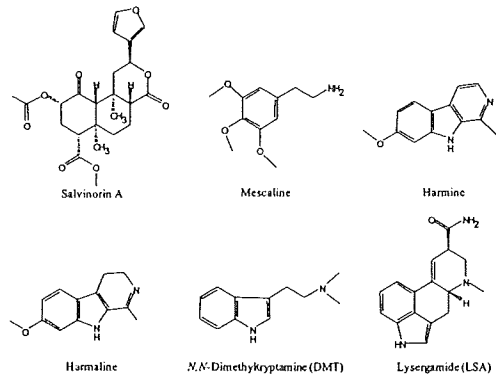


図2. 分析対象とした植物系違法ドラッグ製品に含まれる主な幻覚成分

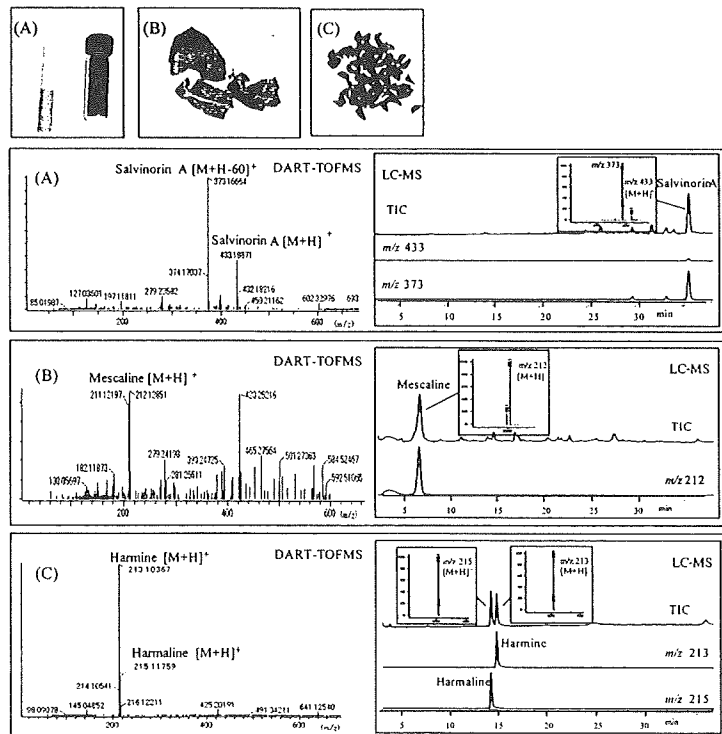


図3. 各植物系違法ドラッグ製品の形態、DART-TOFMSのマスペクトル及びメタノール抽出物のLC-MSイオンクロマトグラム
 (A) “サルビア”（乾燥葉試料、幻覚成分サルビノリンA含有）、(B) “サンパドロ”（乾燥サボテン試料、幻覚成分メスカリン含有）、
 (C) “ハルマラ”（種子試料、ハルミン及びハルマリン含有）

ジメチルトリプタミン及びリゼルグアミドの6化合物の検出を試みた(図2)。その結果、21製品から分析対象とした6化合物のいずれかに相当する[M+H]⁺イオンが主なピークとして検出され、さらに精密質量値より化合物の組成推定を行うことで、含有成分の推定が可能であった。また、別途行った各製品のメタノール抽出物のLC-MS測定結果とDART-TOFMS測定結果を比較したところ、検出化合物は両測定方法で完全に一致した。これら製品の測定結果の代表例を図3に示す。以上の結果から、今回分析対象とした植物由来幻覚成分を製品中から検出するのに、DART-TOFMSを用いた分析は優れた方法であることが示された。通常、これら植物試料をLC-MSで分析する際には、前処理に加え分離分析時間が1試料あたり1時間程度必要であるが、DART-TOFMSを用いた分析では前処理が不要で、測定時間も1分程度と非常に迅速である。さらにDART測定に必要な試料は微量で、植物の場合、葉1枚、種子1粒から目的成分を検出できる。したがって、少ない試料量しかなくても、同一試料をLC-MS等の他分離分析手法の試料としても用いることが可能であり、スクリーニング分析結果の信頼性を高めることができる。一次スクリーニングをDART-TOFMSで行った後、LC-MSやガスクロマトグラフ質量分析計(GC-MS)等の分離分析手段を用いて成分の同定、定量を行うという一連の手法が植物違法ドラッグの分析法として有用であると考えられた。

3-2. 法律で厳しく規制される植物の麻薬成分分析²⁾

大麻取締法、麻薬及び向精神薬取締法及びあへん法等の法律で厳しく栽培や所持等が規制されている植物試料として、大麻(*Cannabis sativa* L.)、シロシビン・シロシンを含有する幻覚性きのこ類(いわゆるマジックマッシュルーム)及びあへん(けし*Papaver somniferum* L.及び*Papaver setigerum* DC.の未熟な蒴果に傷をつけて流れ出る乳汁を乾燥して凝固した

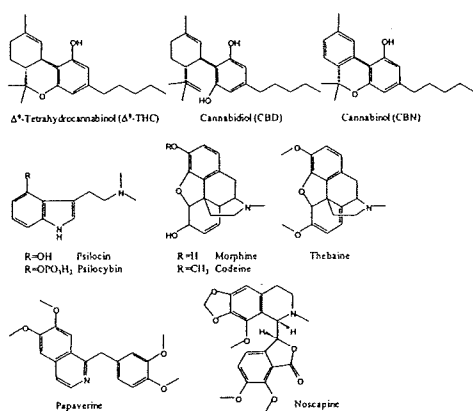


図4. 分析対象とした法規制植物に含まれる主な活性成分

もの)に着目し、これら試料中の主活性成分分析にDART-TOFMSを適用した。図4に分析対象とした各植物に含有される主な活性成分の構造を記載した。また、図5に各植物のDART-TOFMS測定結果を示した。

大麻試料では、乾燥葉及び細片化した乾燥葉を詰めたタバコ状の試料を直接イオン源にかざしたところ、代表的な大麻由来活性成分 Δ^9 -テトラヒドロカンナビノール(Δ^9 -THC)とカンナビジオール(CBD)及びカンナビノール(CBN)の[M+H]⁺に相当するイオンを主なピークとして検出することが可能であった。また、精密質量の測定値から、THC/CBD及びCBNのプロトン付加体の組成式C₂₁H₃₀O₂及びC₂₁H₂₈O₂が推定可能であった。しかし、DART-TOFMSでは、同一の組成式を有するTHCの異性体(Δ^9 -THCや Δ^8 -THC等)やCBDを識別することはできなかった。一方、乾燥したマジックマッシュルームの試料片を直接イオン源にかざしたところ、シロシンの[M+H]⁺に相当するイオンを主ピークとして検出することが可能であり、精密質量の測定値からシロシンのプロトン付加体の組成式C₁₁H₁₇N₂Oが推定可能であった。しかし、他主活性成分のひとつであるシロシビンに相当する質量のイオンピークは検出されなかった。シロシビンは熱等により容

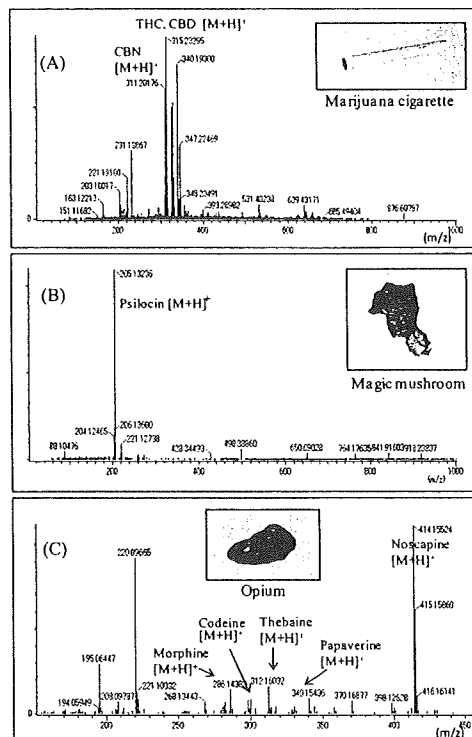


図5. 法規制植物試料のDART-TOFMSのマスマスペクトル (A) 大麻(マリファナシガレット、THC、CBD及びCBN含有)、(B) マジックマッシュルーム(乾燥きのこ片、シロシン含有)、(C) あへん(樹膠、モルヒネ、コデイン、テバイン、パバペリン、ノスカピン含有)

易に脱リン酸化されシロシンに分解されることが知られていることから、本測定においても、イオン化時の熱によりシロシンに分解されて検出されたものと考えられた。一方、あへん試料については樹脂状と粉末状の試料を、葉包紙に少量とりイオン源にかざして測定した。その結果、主要なあへんアルカロイドであるモルヒネ、コデイン、テバイン、パパペリン及びノスカピンの $[M+H]^+$ に相当するイオンが検出され、測定値よりプロトン付加体の組成式が推定可能であった。液体クロマトグラフィーで定量を行うと、あへん試料中のモルヒネ含量は11~13%程度と高いにもかかわらず、本研究におけるDART測定条件では、モルヒネに対応するピークのイオン強度は低かった。そこで、同濃度に調製したあへんアルカロイド5化合物のメタノール溶液をガラス棒に付着させてDART-TOFMSで測定したところ、溶液状態においてもモルヒネのイオン強度が最も低い結果となった。したがって、あへん試料をDARTで分析する際は、モルヒネよりノスカピン等の他成分を指標とするのが望ましいと考えられた。なお、他に、あへん以外のけし由来試料として、一般に焼き菓子等食品に使用されているけしの実一粒について、DART-TOFMSにより測定したところ、含有成分であるモルヒネとコデインが検出されたとの報告もある³⁰⁾。

通常、大麻やマジックマッシュルーム、あへん中の麻薬成分を検出するためには、抽出操作が不可欠である。しかし、DART-TOFMSでは、前処理を加えることなく、植物片や樹脂そのものの形態で成分のイオン化が可能であり、精密質量値より化合物の組成推定を行うことにより含有成分の推定が可能である。DART-TOFMSは、法律で厳しく規制されるこれら植物についても、活性成分の簡易スクリーニング分析法として有用であると思われた。

4. いわゆる健康食品中に違法に添加された医薬品成分の分析への応用⁵⁾

近年、多くの種類の強壯を標榜する“健康食品”がインターネット経由で、容易に入手可能となった。その中には、実際に、性機能改善薬（ED治療薬）として日本においても処方せん医薬品として認可されているシルденаフィルやバルデナフィル、タダラフィル（図6）、またそれら医薬品の構造の一部を改変した構造類似化合物やPDE5阻害剤として開発された化合物（医薬品としては無認可）が、強壯作用を強める目的で違法に加えられている製品があり、検出例が続々と報告されている³⁰⁾。これら医薬品はいずれも、生体内のホスホジエステラーゼ（PDE）5をターゲットとし、本酵素を阻害することで、陰茎の海綿体の平滑筋の弛緩を引き起こし、勃起不全を改善する。医薬品の添付文書によると、これらは、

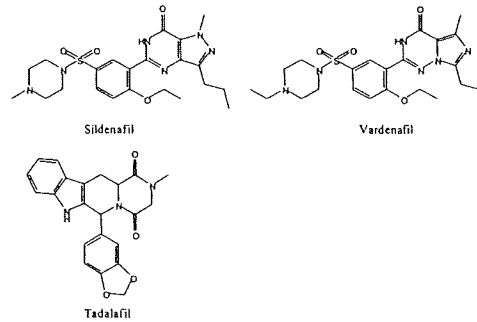


図6. ED治療薬の構造

硝酸剤あるいは一酸化窒素供与剤（ニトログリセリン、亜硝酸アミル、硝酸イソソルビド等）との併用により降圧作用が増強し、過度に血圧を下降させる恐れがある。また、死亡例を含む心筋梗塞等の重篤な心血管系等の有害事象が報告されている。さらに、構造類似体の中には、PDE5だけではなく、網膜に分布するPDE6に対しても同様に阻害活性を有するものもあり、失明等の重い副作用が起こる可能性も否定できない³⁰⁾。このような“健康食品”による健康被害を未然に防止するためには継続的に製品を買い上げ、成分分析調査を実施していく必要がある。

2007年度（平成19）までの5年間、強壯を標榜して市場に流通していたいわゆる健康食品661製品について、ED治療薬3成分及びPDE5阻害活性を有する構造類似化合物11成分を分析対象として、DART-TOFMSによるスクリーニング分析及びLC-MSによる一斉分析を行った。製品形態は、錠剤、カプセル、液体、粉末と様々であるが、DART-TOFMSでは特別な前処理を行わず（カプセルについては内容物を分析）、試料を直接イオン源にかざし分析を行った。また、LC-MSでは、1%酢酸水溶液・アセトニトリル（1:4）溶液で超音波下抽出し、遠心分離、膜ろ過を行った試料について分析を行った。LC-MS分析の結果、661製品中112製品から分析対象成分が検出され、112製品のうち17製品では複数の分析対象成分を含有していた。DART-TOFMS分析では、LC-MSで分析対象成分が検出された112製品のうち、他製品と比較して極端に低濃度しか検出されなかった2製品を除き、いずれも分析対象成分の $[M+H]^+$ に対応するピークが検出された。なお、DART-TOFMSにおいて検出が困難であった2製品は、HPLCのUV検出器でも分析対象成分は検出されなかった。これら“健康食品”は、HPLCやLC-MS等通常の分離分析手段で測定を行う際にはまずは目的成分の抽出操作を行う必要があるが、製品形態が様々であるため、特殊なマトリックスを有する製品では個別の抽出法を別途検討しなくてはいけない場合もある。また、分析対象成分とは異なる物性を有する違法成分が添加されていた場合、抽出時に十分回収できるとは限らず、含有を見落とす可能性も考えられる。DART-MS分析は、

抽出操作なしで短時間に含有成分を直接測定でき、このような製品のスクリーニング法として有用であると考えられた。

5. おわりに

DARTは2005年(平成17)に発表された新しいイオン化手法であるが³⁾、現在までに、食品化学、天然物化学、生化学、香料等化粧品化学、製剤、薬物動態、裁判化学、有機合成、工業原料等、様々な分野で応用例が報告されている。周辺機器の開発・改良も進み、2009年(平成21)になってDART-MS分析に関する報告数は急増している。

しかし、一方で、いくつかの欠点も指摘されている。DARTは、TLCで分離されたプレート上のスポットについては直接イオン化が可能であるが、その他のクロマトグラフィー等の分離手段とは組み合わせることが難しい。そのため、前処理を行わない場合、マトリックス中に大量に存在する他成分によるイオン化の妨害も否定できない。我々の経験では、尿中薬物分析において、適切な前処理を行わないと常在成分である尿素によるイオン化抑制がおき、目的化合物の検出感度が極めて低くなった。また、同一の元素組成を有する化合物は識別できない。さらに、エレクトロスプレーイオン化法と比較して、グルクロン抱合のような弱い結合を開裂する傾向にある³⁾。モルヒネの主代謝物であるグルクロン抱合体についても、DART-MS分析では抱合体のプロトン化分子イオンは検出されずモルヒネとして検出されるため、薬物動態を検討する際に、未変化体を過剰に見積もる恐れがある³⁾。我々の経験でも、プロトン化分子イオンが検出されやすい化合物とされにくい化合物が認められており、たとえば、DART-MS測定では、薬事法で指定薬物として規制されている亜硝酸エステル類は検出されなかった。さらに、DARTは分子量1000以上の化合物についてはイオン化が困難となる。検出感度の点でも、Petucciらの報告¹⁰⁾では、ポジティブ、ネガティブ両モードにおいて、20種類の様々な構造を有する薬物を対象に、DARTとエレクトロスプレーイオン化法で得られるイオン強度を比較した結果、DARTは2~10倍低い値を示している。

DARTはイオン源と質量検出器の間が解放されており、大気圧下、試料をその部位にかざすだけで表面がイオン化される。そのため、固体、液体、気体を問わず、そのままの形態で迅速に直接分析が行えることが最大の特徴といえる。まだ改善の余地がある技術であるが、特殊なマトリックス内の特定成分の簡易迅速スクリーニング分析やリアルタイムモニタリング分析、また、TLCと組み合わせた分析で最も能力を発揮すると思われる。どのような試料の何をターゲットとして分析するか、研究者の工夫次第で適用範囲が広がる可能性がある。

引用文献

- 1) R. B. Cody, J. A. Laramée and H. D. Durst, *Anal. Chem.*, 77(8), 2297-302 (2005).
- 2) M. J. Bennett and R. R. Steiner, *J. Forensic Sci.*, 54(2), 370-375 (2009).
- 3) K. Saka, K. Konuma, S. Asai, K. Unuma, M. Nakajima and K. Yoshida, *Forensic Sci. Int.*, 191(1-3), 5-10 (2009).
- 4) T. Vail, P. R. Jones and O. D. Sparkman, *J. Anal. Toxicol.*, 31(6), 304-312 (2007).
- 5) 最所和宏, 河村麻衣子, 花尻(木倉)瑠理, 合田幸広, 日本分析化学会第57年会講演要旨, 137 (2009).
- 6) G. Morlock and W. Schwack, *Anal. Bioanal. Chem.*, 385(3), 586-595 (2006).
- 7) J. Schurek, L. Vaclavik, H. D. Hooijerink, O. Lacina, J. Poustka, M. Sharman, M. Caldwell, M. W. Nielsen and J. Hajslova, *Anal. Chem.*, 80(24), 9567-9575 (2008).
- 8) L. Vaclavik, T. Cajka, V. Hrbek and J. Hajslova, *Anal. Chim. Acta.*, 645(1-2), 56-63 (2009).
- 9) H. J. Kim and Y. P. Jang, *Phytochem. Anal.*, 20(5), 372-377 (2009).
- 10) S. D. Maleknia, T. M. Vail, R. B. Cody, D. O. Sparkman, T. L. Bell and M. A. Adams, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 23(15), 2241-2246 (2009).
- 11) B. Roschek Jr., R. C. Fink, M. D. McMichael, D. Li and R. S. Alberte, *Phytochemistry*, 70(10), 1255-1261 (2009).
- 12) L. K. Ackerman, G. O. Nooman and T. H. Begley, *Food Additives and Contaminants*, 26(12), 1611-1618 (2009).
- 13) T. Rothenbacher and W. Schwack, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 23, 2829-2835 (2009).
- 14) K. P. Madhusudanan, S. Banerjee, S. P. Khanuja and S. K. Chattopadhyay, *Biomed. Chromatogr.*, 22(6), 596-600 (2008).
- 15) S. Banerjee, K. P. Madhusudanan, S. K. Chattopadhyay, L. U. Rahman, S. P. Khanuja, *Biomed. Chromatogr.*, 22(8), 830-834 (2008).
- 16) S. Banerjee, K. P. Madhusudanan, S. P. Khanuja and S. K. Chattopadhyay, *Biomed. Chromatogr.*, 22(3), 250-253 (2008).
- 17) A. Alpmann and G. Morlock, *J. Sep. Sci.*, 31(1), 71-77 (2008).
- 18) C. Petucci, J. Diffendal, D. Kaufman, B. Mekonnen, G. Terefenko and B. Musselman, *Anal. Chem.*, 79(13), 5064-5070 (2007).
- 19) L. Nyadong, G. A. Harris, S. Balayssac, A. S. Galhena, M. Malet-Martino, R. Martino, R. M. Parry, M. D. Wang, F. M. Fernández and V. Gilard, *Anal. Chem.*, 81(12), 4803-4812 (2009).
- 20) F. M. Fernández, R. B. Cody, M. D. Green, C. Y. Hampton, R. McGready, S. Sengaloundeth, N. J. White and P. N. Newton, *ChemMedChem*, 1(7), 702-705 (2006).
- 21) S. Yu, E. Crawford and J. Tice, B. Musselman, J. T. Wu, *Anal. Chem.*, 81(1), 193-202 (2009).
- 22) Y. Zhao, M. Lam, D. Wu and R. Mak, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 22(20), 3217-3224 (2008).
- 23) E. Jagerdeo and M. Abdel-Rehim, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 20(5), 891-899 (2009).
- 24) O. P. Haefliger and N. Jeckelmann, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 21(8), 1361-1366 (2007).
- 25) C. Y. Pierce, J. R. Barr, R. B. Cody, R. F. Massung, A. R.

- Woolfitt, H. Moura, H. A. Thompson and F. M. Fernandez, *Chem. Commun.*, 8, 807-809 (2007).
- 26) R. R. Steiner and R. L. Larson, *J. Forensic Sci.*, 54(3), 617-622 (2009).
- 27) 河村麻衣子, 花尻(木倉)瑠理, 合田幸広, *薬学雑誌*, 126, 719-725 (2009).
- 28) R. W. Jones, R. B. Cody and J. F. McClelland, *J. Forensic Sci.*, 51(4), 915-918 (2006).
- 29) M. E. Curtis, P.R. Jones, O. D. Sparkman and R. B. Cody, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 20(11), 2082-2086 (2009).
- 30) J. Y. Yew, R. B. Cody and E. A. Kravitz, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 105(20), 7135-7140 (2008).
- 31) K. Kpegba, T. Spadaro, R. B. Cody, N. Nesnas and J. A. Olson, *Anal. Chem.*, 79(14), 5479-5483 (2007).
- 32) R. B. Cody, *Anal. Chem.*, 81(3), 1101-1107 (2009).
- 33) L. Song, A. B. Dykstra, H. Yao and J. E. Bartmess, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 20(1), 42-50 (2009).
- 34) C. Laphorn and F. Pullen, *Eur. J. Mass Spectrom.*, 15(5), 587-593 (2009).
- 35) G. Morlock and Y. Ueda, *J. Chromatogr. A.*, 1143(1-2), 243-251 (2007).
- 36) MS Tips / Application Note for DART, No. D027-029 (JEOL), <http://www.jeol.co.jp/technical/ai.htm#MSTIPS-DART>
- 37) JEOL MS Tips / Application Note for DART, No. D008 (JEOL), <http://www.jeol.co.jp/technical/ai.htm#MSTIPS-DART>
- 38) 無承認無許可医薬品情報(厚生労働省), <http://www.mhlw.go.jp/kinkyu/diet/musyounin.html>
- 39) 合田幸広, 鎌倉浩之, *Functional Food*, 2(2), 198-202 (2008).

PROFILE

花尻(木倉) 瑠理

国立医薬品食品衛生研究所生薬部第3室
室長
薬学博士



1990年千葉大学大学院薬学専攻博士課程前期修了、同年国立医薬品食品衛生研究所(旧国立衛生研究所)薬品部研究員、主任研究官を経て2002年生薬部第3室室長、現在に至る。この間2000年7月から2001年8月まで科学技術庁長期在外派遣研究員(米国カンザス大学)。

Charged Aerosol Detection (CAD): A New Universal Approach for HPLC

荷電化粒子検出 (CAD):
HPLCの新しい普遍的検出技術

代田 修

Osamu Shiota

徳島文理大学香川薬学部

香川県さぬき市志度1314-1

Kagawa School of Pharmaceutical Sciences, Tokushima Bunri University
1314-1 Shido, Sanuki-shi, Kagawa 769-2193, Japan

Summary

The principles, features and applications of charged aerosol detection (CAD), a new approach that has recently attracted considerable attention as a universal detection system for HPLC, are introduced in comparison with other detection methods. CAD is based upon aerosols and provides high sensitivity, a broad dynamic range, reproducibility, quantification efficacy and consistent responses for all types of nonvolatile analytes. Relative to other universal detectors such as RI (refractive index) or evaporative light scattering detectors (ELSD), the detection sensitivity of CAD is very high, being 100 and 10 fold higher those of RI and ELSD, respectively, with a wide detection range from 10 nano g to 100 micro g. Therefore it can be said that CAD is a universal detection technology that can replace the ELSD that

has hitherto been the main approach used to detect nonvolatile compounds. The number of published research papers related to CAD has increased greatly in recent one or two years though the first report concerning development and testing appeared as recently as 2002 and commercial Corona CAD apparatus only became available in the latter half of 2004. Its broad applicability has now been demonstrated for a range of methods, including examples using gradient elution, normal and reversed phase, hydrophilic interactions, ions, and supercritical fluid chromatography, and in combination with other detectors, like UV, ELSD and mass spectrometers. Further new applications of CAD to many other areas such as food science and natural product chemistry will be expected in the future.

1. はじめに

従来から食品や生薬などの天然物の分析には、TLC (薄層クロマトグラフィー)、GC (ガスクロマトグラフィー) や、HPLC (高速液体クロマトグラフィー) などの各種クロマトグラフィーが成分を分離する技術として用いられてきており、現在もその有用性は全く変わらない。特にHPLCは今や日常的な分析に必要な不可欠なものとなっている。最近では、HPLCのさらに上を行くUPLC® (Ultra Performance Liquid Chromatography) もしくはUFLC (Ultra Flow Liquid Chromatography)、またはUHPLC (Ultra High Performance Liquid Chromatography)、またはRRLC (Rapid Resolution Liquid Chromatography) などと呼ばれるクラスの超高速分離技術さえも登場している。このように分離技術が成長・成熟した

一方で、成分を検出する技術に関しても進歩・多様性が著しい。本稿では、主にHPLCに用いられる検出技術として最近注目されてきている荷電化粒子検出 (CAD: Charged Aerosol Detection)¹⁾ について、他の検出法との比較を交えてその原理・特徴を解説すると共に、その適用例を紹介する。

2. 主にHPLCに用いられる検出器の種類と原理

2-1. 従来から用いられている検出器

前述したように、分離する技術が成長し成熟してきた一方で、成分を検出する技術についても進歩し多様性が増している。HPLCの例を挙げても (表1)、一般的に用いられる紫外可視吸光度検出器 (UV/VIS) やフォトダイオードアレイ検

表1. 主にHPLCに用いられる検出器

検出器名	略名	英名	利用する物性・特性
紫外可視吸光度検出器	UV/VIS	Ultra Violet/Visible light absorbance detector	紫外可視吸光
フォトダイオードアレイ検出器	PDA (DAD)	Photodiode Array detector (Diode Array Detector)	紫外可視吸光
蛍光検出器	FL	Fluorescence detector	蛍光
化学発光検出器	CL	Chemiluminescence detector	化学発光
旋光度検出器	ORD	Optical Rotatory Detector	旋光性
円二色性検出器	CD	Circular Dichroism detector	偏光特性
示差屈折率検出器	RI	Refractive Index detector	屈折率
電気化学検出器	ECD	Electrochemical Detector	酸化還元性
電気伝導度検出器	CD	Conductivity Detector	電気伝導性
質量分析計	MS	Mass Spectrometer	イオン化
蒸発光散乱検出器	ELSD	Evaporative Light Scattering Detector	不揮発性
荷電化粒子検出器	CAD	Charged Aerosol Detector	不揮発性

表2. HPLC検出器の比較 (ESA社カタログより)

検出器名	検出感度	検出範囲	応答一貫性	応用性	再現性	適応性	操作性
荷電化粒子検出器 (CAD)	☆☆☆	☆☆☆	☆☆☆	☆☆☆	☆☆☆	☆☆☆	☆☆☆
紫外吸光度検出器 (UV)	☆☆☆	☆☆☆	☆☆	☆☆	☆☆☆	☆☆	☆☆☆
蒸発光散乱検出器 (ELSD)	☆☆☆	☆	☆☆	☆☆☆	☆☆	☆☆☆	☆☆
化学発光窒素検出器 (CLN)*	☆☆☆	☆☆	☆☆	☆☆	☆	☆☆	☆☆
示差屈折率検出器 (RI)	☆	☆☆	☆☆	☆☆	☆☆	☆☆	☆☆☆

*化学発光窒素検出器 (CLN:Chemiluminescence Nitrogen) :窒素を選択的に検出する検出器。窒素を含む化合物を高温で燃焼して生成する一酸化窒素と、オゾンとの化学発光反応から生じる光を光電子倍増管で検出する。

出器 (PDAまたはDAD) のように物質が有する特定波長の光を吸収する性質を利用した検出器や、蛍光検出器 (FL) や化学発光検出器 (CL) のように物質が有する光もしくは化学反応エネルギーを与えることにより発光する性質を利用した検出器、または旋光度検出器 (ORD) や円二色性検出器 (CD) のように物質が有する旋光性・偏光特性を利用した検出器など、検出しようとする物質の光学的性質を用いたものが多い。その他にも電気化学検出器 (ECD) や電気伝導度検出器 (CD) などのように、検出しようとする物質の電気化学的性質を利用した検出器もある。また近年では、特に物質がイオン化する性質を利用して、質量分析計 (MS) をHPLCの検出器として利用したLC-MS (MS/MSまたはMSⁿ) の汎用性が増したことが極めて重要な進歩となっている。これら多種多様な検出器を連結して用いることにより、分離という時間軸に対して各検出器の情報が多次元に展開され、得られる成分に関する情報が格段に広がるのが期待される⁹⁾。しかしながら、これらの検出器は何れも検出しようとする物質の特性に依存している。つまり、検出しようとする物質が特定波長の光を吸収しなかったり、特定のエネルギーを与えても発光しなかったり、特異な電氣的性質を持っていなかったり、またはイオン化しづらかったりした場合などでは、その検出が困難となる。しかし、物質の光学的性質を用いたものの中にも、物質の濃度・性質により光が通過する角度が変わることを利用した示差屈折率検出器 (RI) は、溶媒液に対する溶質の屈折率が異なれば全ての物質に対して一定の感度があると

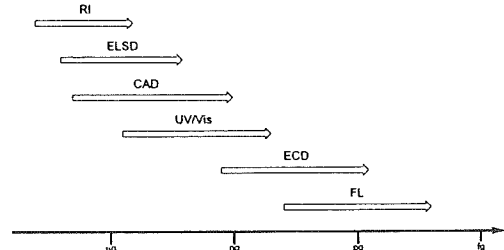


図1. 主な検出器の検出範囲

いう特徴を持ち、上記の検出器では検出しづらい場合には広く用いられている。それでもこのRI検出器は感度が低くだけでなく、温度変化や送液ポンプの脈動などに敏感に反応し、またグラジエント分析には用いることができないという様々な欠点がある。これらの欠点を克服するものとして、特に近年汎用されるようになったものに蒸発光散乱検出器 (ELSD) がある⁹⁾。これは、揮発性溶媒液を蒸発させて除去し、残った不揮発性物質の微粒子 (エアロゾル) に光を当てることにより生じる散乱光を検出するものであり、RI検出器と比較しても温度変化の影響を受けにくく、グラジエント分析が可能であり、さらに感度が数倍~10倍程度高いというメリットがある⁹⁾。しかしながら、この検出器においても、LC-MSのインターフェイスにおける大気圧イオン化と同様に、溶媒液として使用できる緩衝液などは揮発性のものに限られ、また揮

発性が高い物質は検出できないなどの制限がある。本稿で紹介する荷電化粒子検出器 (CAD: Charged Aerosol Detector)¹⁾にも同様の制限があるものの、ELSDに比べてさらに高感度であること、LC-MSとは異なり物質そのもののイオン化のしづらさには感度が影響を受けないこと、などの違いがある。

2. エアロゾルに基づく検出器

上に述べたように、RI検出器の欠点を克服し、網羅的に物質を検出するという目的でELSDが1970年代後半に開発され、近年になって海外を中心に普及してきた。繰り返しになるが、ELSDではカラムから溶出された揮発性溶離液を噴霧・蒸発させて除去し、残った不揮発性物質のエアロゾル (噴霧微粒子) に光を当てることにより生じる散乱光により物質を検出する (図2)。この揮発性溶離液の噴霧・蒸発という過程は、CADにおいても共通する操作である。しかし、検出段階においてELSDが微粒子の光散乱を利用するに対し、CADでは荷電化した微粒子の電荷を測定している。このようなエアロゾルに基づく検出器には、他にも凝縮核形成光散乱検出器 (CNLS: Condensation Nucleation Light-Scattering Detector)²⁾がある。ここでは詳しく述べないが、これは噴霧・蒸発で形成されたエアロゾルを核にして、別途導入した溶剤蒸気を凝縮させて粒子を大きくし、その光散乱を検出するものである。CNLSは、ELSDはもとよりCADよりも高感度な検出器であるとされるが³⁾、今現在のところ普及にはまだ至っていない。最近、Quanti Technologies LLC社⁴⁾が、同原理に基づく市販モデルの検出器であるNQAD™ (Nano Quantity Analyte Detector) を開発している。

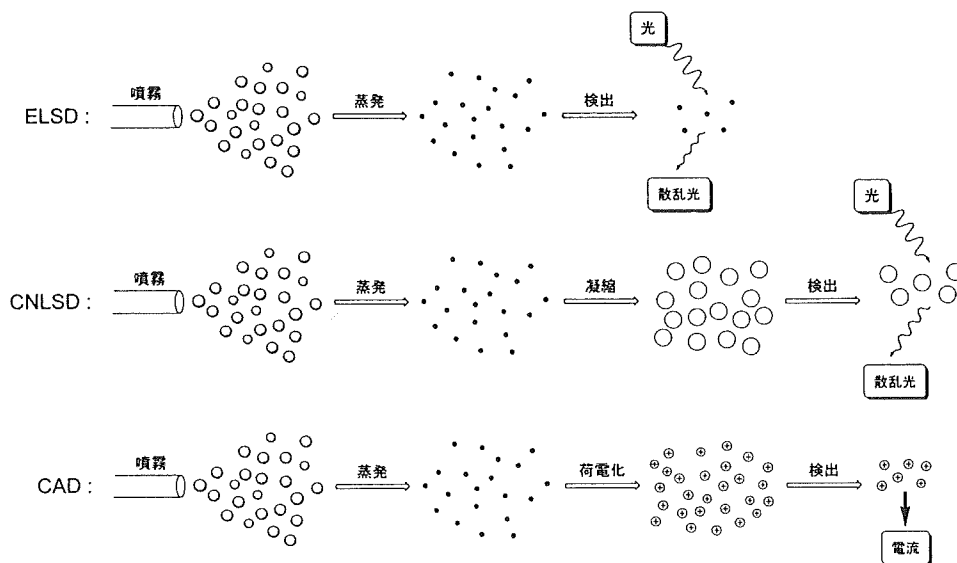


図2. エアロゾルに基づく検出器の概念図

3. 荷電化粒子検出器

3-1. 原理

ELSD (およびCNLS) では生じた微粒子を光学的に検出するが、CADでは生じた微粒子に電荷を与えた後に、これを電氣的に検出する。CADにおける検出過程は、次の4つのステップからなる (図3)⁵⁾。

ステップ1: カラム溶出液の噴霧

カラム溶出液はネブライザー (噴霧器) に導かれ、そこで加圧された窒素ガスにより噴霧され、微小な液滴となる。その際、大きな液滴はインパクター (衝突捕集器) に衝突してドレインへと落ちる。

ステップ2: 蒸発による溶質微粒子の形成

微小な液滴はドライングチューブ (乾燥管) に導かれ、そこで溶媒などの揮発性物質は完全に蒸発され、中性の球状固体微粒子が形成される。この球状微粒子の大きさは、カラムから溶出された不揮発性物質の重量に比例する。

ステップ3: 溶質微粒子への荷電

中性球状固体微粒子はミキシングチャンバー (混合室) に導かれ、そこで高電圧白金コロナ電極によるコロナ放電によりプラスに荷電した窒素イオン (N⁺) の流れと衝突し、電荷を転移されてプラスに帯電する。この時、球状微粒子の表面積の大きさに準じて電荷数も増加する。また、高い移動度を持つ過剰のN⁺イオンは、マイナスに荷電した低電圧のイオントラップにより完全に除去される。

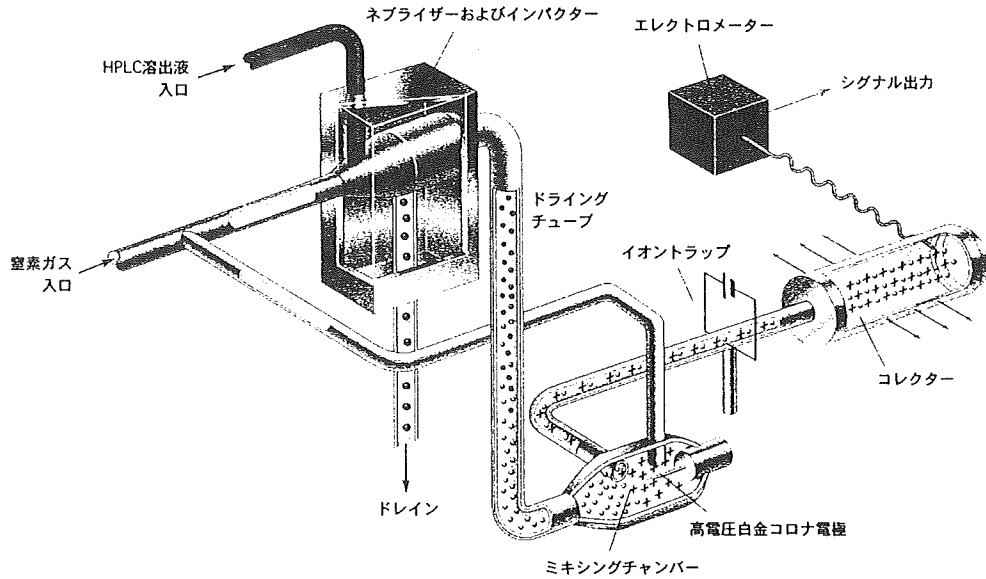


図3. 荷電化粒子検出器模式図 (ESA-ダイオネクス社提供)

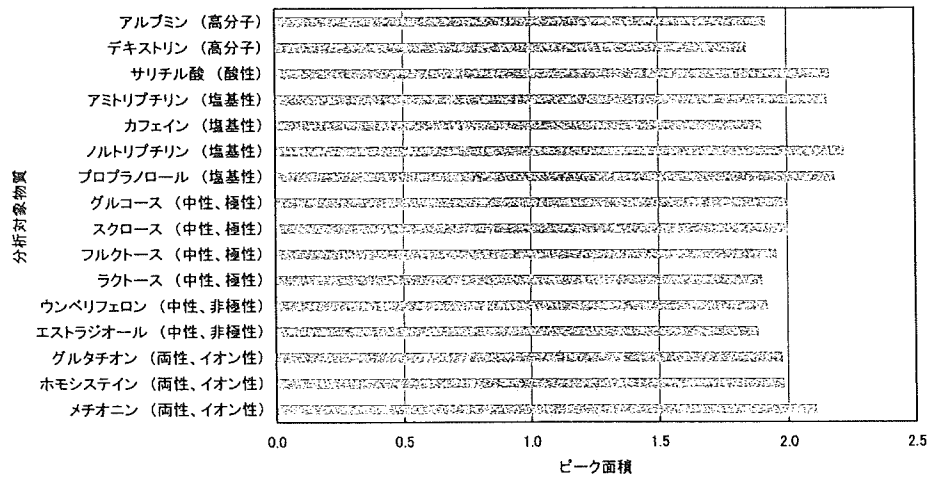


図4. 分析対象物質とCADの検出感度 (ESA社カタログより)

ステップ4: 荷電化された溶質微粒子の測定

低い移動度を持つ荷電化された溶質微粒子は、イオントラップを通過して導電性の膜フィルター (コレクター) に集められ、そこで電荷をスクリーンフィルターに転移する。これにより発生した電流が高感度のエレクトロメーター (電位計) により測定され、その信号が増幅されて検出器の出力となる。

このようにCADでは、カラムから溶出された不揮発性物質の重量に比例して形成される大きさの球状微粒子の、その表面積の大きさに準じた電荷数による電気信号により、不揮発

性物質を質量感的に検出することができる。つまり、CADの応答は、溶質質量の平方根にほぼ比例することになるので、溶質の分子構造や物理的な特性に関係なく、ほぼ一定の検出感度となるのである (図4)。このことは、同じエアロゾルに基づく検出器であるELSDの欠点を克服したことになる。ELSDでは、形成された溶質微粒子の大きさが光散乱応答強度に影響を与える。これは、先に述べたように、微粒子の大きさはカラムから溶出された不揮発性物質の量により変化するので、溶質の濃度分布も粒子サイズの分布として光散乱の

効率に影響を及ぼすことを示す。さらに、形成された溶質微粒子が結晶性固体なのか否か（当然、結晶性のものの方が光を効率的に反射・散乱する）によっても、つまり溶質の物理的な特性によっても光散乱応答強度は影響を受ける。これらのことにより、ELSDの検出感度は10 ng～数10 ng、ダイナミックレンジは3桁に留まるが、CADでは検出感度は数ng～10 ng、ダイナミックレンジは4桁（10 ng～100 μg）にも及ぶ。図5、6に揮発性イオンペーパーを用いたエフェドラルカロイド類のCADによる分析例を示す。この分析における検出限界は3 ng程度であり、また、生薬マオウ（麻黄）の分析においても適応可能であった。

3-2. 特徴

上記の通り、ELSDとCADでは揮発性溶離液を噴霧・蒸発除去する過程は同じであるが、検出段階においてELSDが微粒子の光散乱を利用するに対し、CADでは荷電化した微粒子の電荷を測定しているところが全く異なる。そのため、CADではカラムから溶出された不揮発性物質を、その分子構造や物理的特性に関係なく、ほぼ均一な高感度で検出でき、またその検出応答性は幅広く、繰り返し精度が良いところが大きな特徴である。このことは、CADがUV吸収を持たない化合物や未知物質を検出し定量する場合に適していることを示す。またELSDと同様に、CADにおいても周囲の温度変化による影響を受けにくく、グラジエント分析が可能であり、装置の安定化も早い。このような優位な点に対し、やはりELSDと同様の不利な点もある。それは揮発性物質や昇華性物質には適応できないことや、移動相として使用できる溶離液が揮発性のものに限定される、などである。しかし、ほとんど全ての点において、CADはELSDに勝っている。強いて言えば、CADの場合、検出器の開発製造元が1社¹⁾しかないところが不利な点であろう。なお、日本における販売代理店は、株式会社エル・エム・エス社²⁾である。

3-3. 注意点

実際の導入にあたって、CAD本体の他に窒素ガス発生装置などによる窒素ガスの供給が必要であり、また、排気のためにドラフトチャンバー等が必要である。さらに、ドレインからの廃液には、ガス漏れしない専用の廃液ボトルが必要となる。これは検出器内を一定の軽度な加圧下にしておくためであり、廃液ボトルのキャップやドレインチューブなどが正しく接続されていないと、検出器の応答性が悪くなる。移動相の溶媒には当然のことながら揮発性のものを用い、できるだけ純度が高い方がよい。緩衝液やイオンペーパーを用いる時にも純度が高い揮発性試薬を用いる。安い溶媒・試薬の使用は、確実にベースラインノイズの上昇をもたらしてしまう。また、使用するHPLCカラムにおいても、不揮発性緩衝液などの使用歴が無いものを用いる。新品のカラムを使用する場

合には、CADに接続する前にカラムメーカー推奨の溶媒組成などで可能な限り洗浄し、さらにCAD専用（もしくはLC-MSとの共用）とすべきである。

実際の分析にあたって、まず、特に分析対象が低分子有機化合物の場合には、フローインジェクション分析を行って対象化合物が感度良く検出されるか確認すると良い。例えばナフトールのような揮発性化合物はドライングチューブを通過する過程で蒸発し、CADでは検出できない。また、移動相の種類によっても感度が異なる。これは、水系比率が高い移動相では有機溶媒に比べて表面張力が大きくなるため、噴霧により大きな液滴が形成されやすく、結果としてインパクター部分でドレインへと除去されやすくなるためである。同様に、グラジエント分析においても移動相中の有機溶媒比率が高まると検出感度も高くなるので、ピーク面積比から未知物質もしくは標準品が無い化合物の量を求める時には、有機溶媒比率を元にした補正が必要となる。または後述する移動相補整（mobile-phase compensation）という手法³⁾を用い、ポストカラムにおいて移動相グラジエント組成と真逆の組成のグラジエント溶媒を混合することで、グラジエント分析においても単純にピーク面積比から物質量を求めることができるようになる。さらに定量時において注意すべきこととして、検出強度（レスポンス）は溶質微粒子の表面積に比例するので、検出強度と物質量は厳密には直線関係にならないという事実がある。そのため検量線は両対数（log-log plot）で描く必要があるが⁴⁾、クロマトグラフデータ処理システムが備えている二次曲線により容易に近似できる。しかしその曲線は比較的直線に近いので、狭い定量範囲では直線と見なしても差し支えないであろう。さらに、分析する試料の調製にも注意を払う必要がある。CADでは不揮発性化合物をほとんど全て検出するので、目的とする対象化合物以外の夾雑物をいかに前処理で除くかにより、そのクロマトグラムの見目が決まる。言い換えれば、夾雑物が多いとそれらに由来するピークが山のように現れ、分析対象物がその中に埋もれてしまい、とても定量などできなくなってしまう。図7に示した生薬セッコク（石斛）の分析は、特徴的なUV吸収を持たないデンドロビン類をCADで検出した例であるが、デンドロビン類以外にも多くの夾雑物のピークが現れている。しかし、夾雑物が除けない場合にも、UVやMSなどの他の検出器と組み合わせて用いることで改善されることが期待できる。

3-4. 分析例

CADは不揮発性化合物の検出に優れており、特にUV/Visでは検出しづらい物質、例えば、糖、脂質、アミノ酸や無機イオンなどの分析に有用である。最初のCAD開発試験に関する論文⁵⁾が2002年、Corona[®] CAD[®]⁶⁾としての市販装置の発表が2004年後半であったため、まだまだ分析報告例は多くないものの、ここ1、2年で格段に発表論文数が増えてきた（図

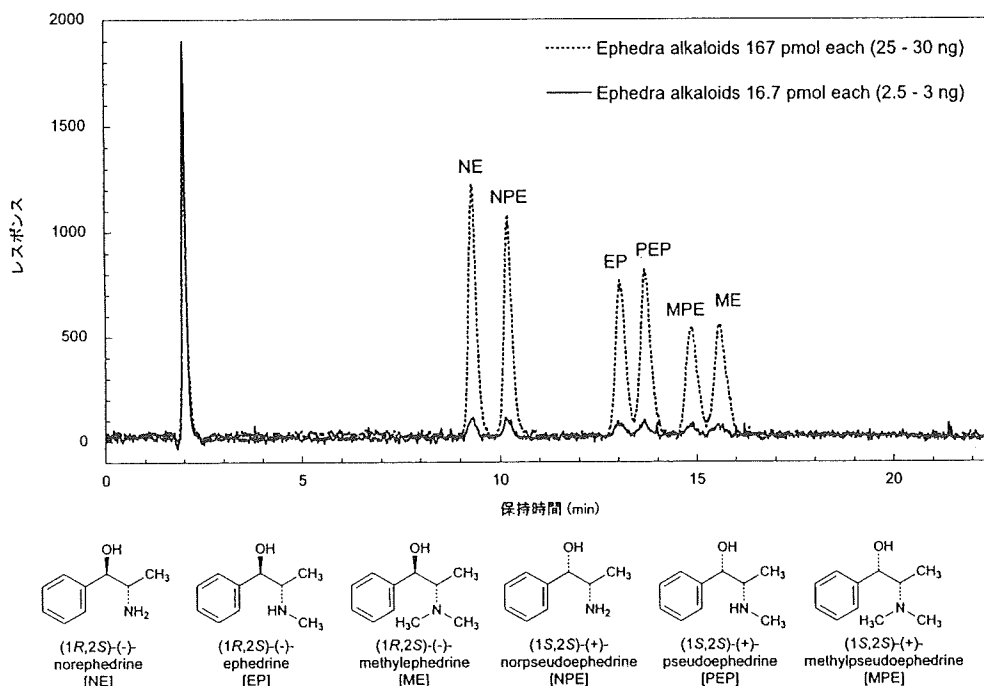


図5. エフェドラアルカロイド6種のクロマトグラム
 [分析条件] カラム: Mightysil RP-18 (4.6 mm i.d. × 150 mm; 5 μm)、カラム温度: 35 °C
 移動相: 0.1 % トリフルオロ酢酸-アセトニトリル (93 : 7, v/v)
 流速: 1.0 mL/min、検出: CAD、試料: エフェドラアルカロイド標準品
 (代田修、安藤広和、関田節子、日本生薬学会第55回年会、2008)

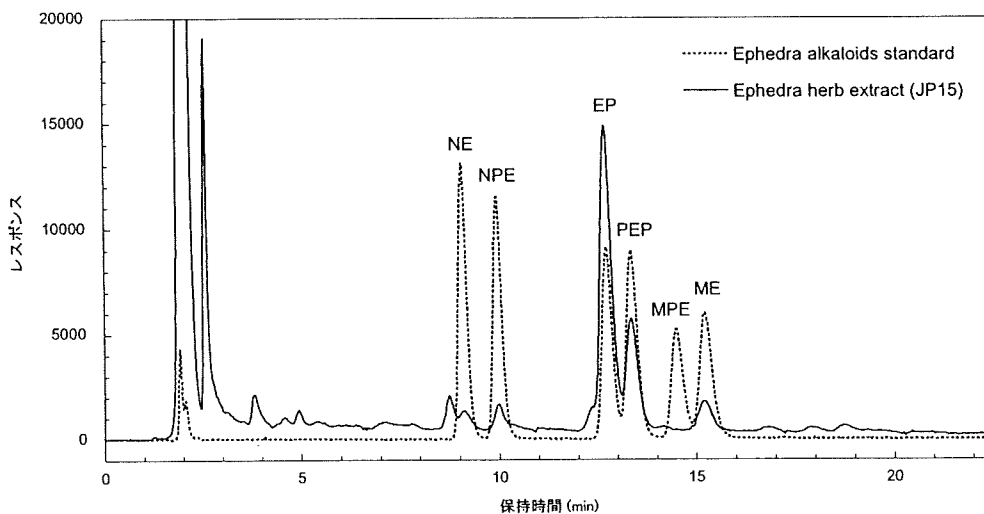


図6. 生薬マオウ (麻黄) の分析
 [分析条件] カラム; カラム温度; 移動相; 流速; 検出: 図5に準じる
 試料: Ephedra herb extract (JP15): 日本薬局方 (第15改正) 収載「マオウ」定量法の試料溶液に準じて調製
 (代田修、安藤広和、関田節子、日本生薬学会第55回年会、2008)

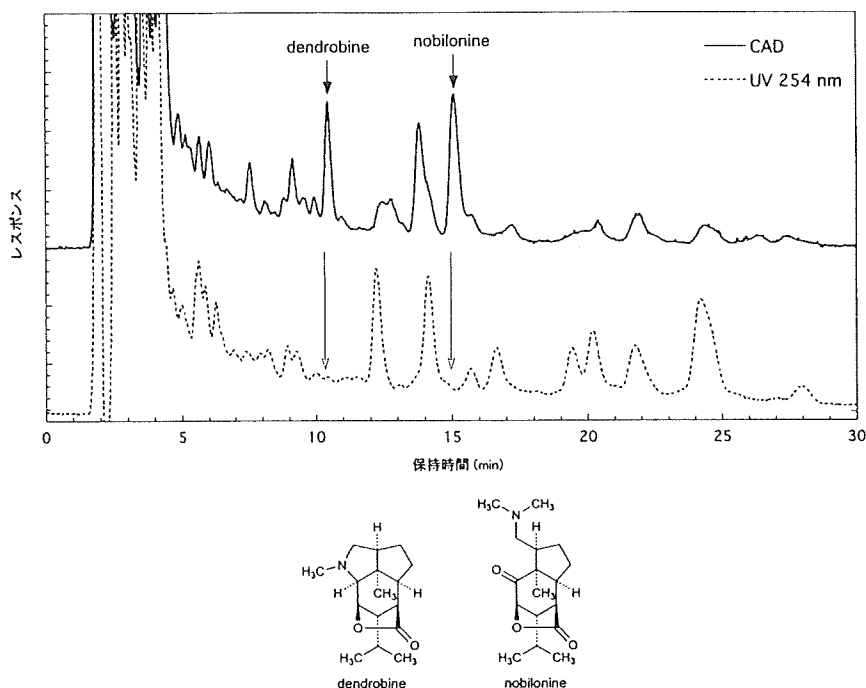


図7. 生薬セッコク (石斛) の分析
 [分析条件] カラム: Cosmosil 5C₁₈-MS-II (4.6 mm i.d.×150 mm; 5 μm)、カラム温度: 35 °C、
 移動相: 0.1%トリフルオロ酢酸-アセトニトリル (85:15, v/v)、流速: 1.0 mL/min、
 検出: CADおよびUV 254 nm、試料: セッコク (*Dendrobium nobile*) のメタノール抽出物、
 (朝比奈はるか、森光康次郎、佐竹元吉、代田修、関田節子、日本薬学会第130年会、2010)

8). 以下にCADを用いた分析適用例をいくつか挙げる。

(1) 脂質

HPLCによる脂質の定量分析は、これまで水素炎イオン化検出器 (FID) もしくはRIで行われることが多かったが、どちらもグラジエント分析ができないなどの欠点があり、FIDはELSDの登場で姿を消した。しかし、初期型のELSDによる検出限界は10~20 μgであり、最新型のもでも50~100 ngであると言われている。そこでCADの適用した報告例がCADの登場初期から多数見受けられる。

Moreauは¹⁴⁾、HPLC-CADによる脂質定量分析の予備試験として、まず、植物油中の主要な非極性脂質分子種の順相グラジエント溶出条件による分析について検討を行っている。オレイン酸コレステロールエステル (OC) とトリオレイン (TO) の検出感度 (ピーク面積) は同程度であるのに対し、コレステロール (Ch) とオレイン酸 (O) のそれはそれぞれ10%および80%低く、オレイン酸メチルエステル (OME) に至ってはCADで検出されなかったという。これは、CADのエアゾル形成過程において蒸発されたものと考えられる。同様の現象はELSDにおいても観察されている。同条件下でのOC、TO、Ch、Oの検出限界は約1 ngであり、質量-ピーク

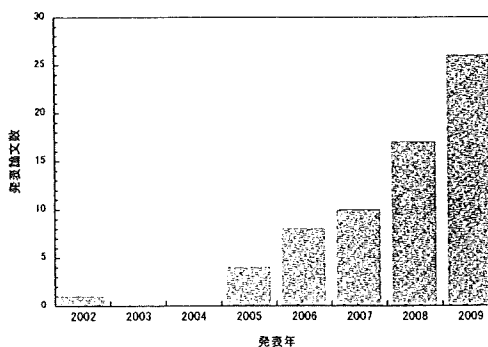


図8. 荷電化粒子検出 (CAD) に関する発表論文数
 2009年12月末時点における "charged aerosol detection" をキーワードとしたSciFinder®による検索結果のうち、学会要旨集などを除いた発表論文数

面積比は20 μgまでほぼ直線性が見られたという。次に極性脂質分子種についても順相グラジエント溶出条件下で検討を行い、Ch、ホスファジルエタノールアミン (PE)、ホスファジルコリン (PC) およびリソホスファジルコリンの検出限界は約25 ng、質量-ピーク面積比は10 μgまで近似直線性が見