

分担研究課題：法規制薬物・植物の新規分析法の検討

研究分担者：花尻(木倉)瑠理 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 室長

—超臨界流体抽出(SFE)を用いた毛髪試料中薬物の抽出法の検討—

研究要旨：毛髪試料中の薬物分析では抽出等の煩雑な前処理が必要であることから、簡便かつ高効率な前処理方法が求められている。超臨界流体抽出(SFE)は超臨界流体の高い浸透性と拡散性を利用し、食品等の様々な試料抽出に用いられているが、毛髪試料への適用事例は少ない。本研究で我々は、過去に塩酸メタノール溶液抽出法による分析結果を報告している dextromethorphan (鎮咳去痰薬)もしくはエナンチオマーの levomethorphan (麻薬)を投与したラット毛髪実試料を用いて、SFE の条件検討を行い、LC-MS/MS を用いた定量分析を行った。Dextromethorphan 投与ラット毛髪実試料からの dextromethorphan 及び代謝物 3 化合物の SFE 条件を検討した結果、メタノールにトリフルオロ酢酸 1%、水 5%を添加した modifier を 50%用い、85℃に加温して静的抽出を 1 時間行った条件が最も適していた。ラットもしくはヒトのコントロール試料に、dextromethorphan 及び代謝物 3 化合物を浸透させたモデル毛髪試料を用いて、最適化した SFE 条件により各化合物の抽出率を検討した結果、いずれも 88-103%となり、ばらつき(RSD%)は 5.2%以下と良好な結果を示した。さらに、dextromethorphan もしくは levomethorphan 投与ラット毛髪実試料中の dextromethorphan/levomethorphan 及びそれらの代謝物を SFE で抽出し、キラルカラムを用いた LC-MS/MS により分離分析を行った。その定量値を既報の塩酸メタノール溶液抽出による定量値と比較した結果、(+)-3-HM は 42.5%であったが、他化合物はいずれも 60%以上であった。SFE による分析結果は塩酸メタノール溶液抽出による結果よりも低い値であったが、すべての分析対象化合物が再現性よく検出された。また、塩酸メタノール溶液抽出では抽出時間が 16 時間程度必要で、さらに溶媒留去、再溶解、固相抽出等の煩雑な操作が必要であるが、今回検討した SFE は 1 試料につき 1 時間半程度で抽出可能であり、煩雑な前処理も必要ない。以上より、SFE は毛髪中の薬物及び代謝物を効率よく簡便に検出可能なスクリーニング手法として有用であると考えられた。

研究協力者

河村麻衣子 国立医薬品食品衛生研究所
生薬部

髪組織内からの成分抽出には、通常煩雑な前処理が必要であるため、簡便かつ高効率な前処理方法が求められている。

超臨界流体抽出(Supercritical Fluid Extraction, SFE)は超臨界流体の高い浸透性と拡散性を利用し、食品等の様々な試料抽出に用いられているが、毛髪試料への適用事例は少ない。超臨界流体に主に使用されている二酸化炭素は、不燃

A. 研究目的

毛髪試料中の薬物分析は、長期間の摂取歴が推測できることや、頭髪等試料の入手、保管が容易であることから、広く用いられている。一方、毛

性、無毒で容易に入手可能であり、臨界温度が 31.1°C、臨界圧力が 7.38 MPa と、超臨界状態への移行が容易である。超臨界二酸化炭素はヘキサン程度の低極性の性質を持つが、モディファイア(modifier)と呼ばれるメタノール等の高極性溶媒を添加することで、幅広い化合物の抽出に対応可能である。通常、SFE においては試料を封入した抽出容器内に、温度、圧力をコントロールした抽出溶媒を通液する動的抽出(dynamic)と、溶媒を容器内に保持する静的抽出(static)を繰り返して抽出する。SFE は既存の抽出方法に比べて、簡便、迅速化が期待される手法である。

これらの SFE 条件検討にあたり、他抽出法(塩酸メタノール溶液抽出法)による分析結果をすでに報告している^{1),2)}、dextromethorphan(鎮咳去痰薬)もしくは、エナンチオマーの levomethorphan(麻薬)を投与したラット毛髪試料を用い、LC-MS/MS を用いた定量分析を行った。また、対象化合物溶液にコントロール毛髪を浸漬して作成したモデル毛髪試料を用いて、抽出効率等の検討を行った。

B. 研究方法

1. 試薬

分析対象化合物である dextromethorphan HBr、およびその 3 種類の代謝物 dextrorphan tartrate, (+)-3-hydroxymorphinan HBr ((+)-3-HM), (+)-3-methoxymorphinan HCl((+)-3-MEM)、内標準物質(IS)として使用した levallorphan tartrate は Sigma-Aldrich 社より購入した。また、dextromethorphan の光学異性体である levomethorphan(麻薬)は Cerilliant 社より入手し、代謝物 levorphanol(麻薬)は過去に東京大学大学院薬学研究系研究科より譲渡いただいたものを使用した。各化合物はフリー体として濃度を換算しメタノール溶液を作成した。各化合物の構造式を Figure 1 に示した。

膜ろ過用フィルターは Ultrafree-MC-HV

(Durapore PVDF, 0.45 μm, Merck Millipore 社製)を使用し、メタノール、アセトニトリルおよびギ酸は HPLC 用を、その他溶媒等は特級試薬を用いた。

2. 生体試料

毛髪実試料として、過去の報告¹⁾で分析を行った、dextromethorphan もしくは levomethorphan 投与ラットの毛髪試料(5 mg/kg, 10 days, n=3)を使用した。また上記において、薬物投与前にあらかじめラット背部の毛を刈り取り、これをラットコントロール毛髪試料とした。毛髪試料は既報に従い洗浄、乾燥後、0.5 mm 程度に細片化して使用した。

さらに SFE 条件検討用のラットおよびヒトのモデル毛髪試料を用意した。細片化したコントロールラット毛髪またはヒト頭髪 100 mg を、dextromethorphan および 3 代謝物(dextrorphan, 3-MEM, 3-HM)の各 0.01 mg/mL メタノール混合溶液に浸漬し、常温で 24 時間振盪後、メタノール 20 mL を加えて 3 回洗浄し、風乾して作成した。

3. SFE 条件の検討

抽出には MV-10 ASFE システム(Waters 社製)を使用し、超臨界流体には二酸化炭素を用いた。抽出方法の概要を Figure 2 に示した。細片化した毛髪試料を正確に量り取って、海砂、脱脂綿を入れた抽出管(2 mL)に入れ、さらに IS として levallorphan 溶液を添加して密封し、SFE システムに設置して抽出操作を行った。操作は制御ソフト(クロムスコープ)により自動化され、最大 6 試料を連続抽出可能である。1 試料につき pre run, main, post run を 1 サイクルとし、main 抽出時に modifier を添加し、dynamic(動的抽出)→static(静的抽出)→dynamic と順番に切り替えて抽出を行った。抽出液を 50 mL チューブに集め、30°C に加温して窒素吹付により乾固させた。残渣にメタノールを約 5 mL 加え、降り混ぜて溶解し、フィルターろ過後に LC-MS/MS で分析を行った。

SFE の条件検討は以下の点について行った。

- ① Modifier の種類
- ② 抽出温度、時間、modifier 添加濃度

③ 試料量

抽出効率の確認には、LC-MS/MS の MRM モードを用いて対象化合物の分析を行い、試料間のピーク面積比や、既報の塩酸メタノール溶液抽出における定量値¹⁾と比較を行った。

塩酸メタノール抽出は下記の通り、既報に従って行った。毛髪試料 10 mg に塩酸メタノール溶液および IS 溶液を加え、1 時間超音波抽出を行った後、一晩室温放置した。その後、窒素気流下で溶媒を乾固させ、蒸留水に溶解後、固相抽出 (OASIS HLB, 3cc, 60 mg, Waters) を行い、得られたメタノール溶出液を測定試料とした。

最適化後の SFE 条件を以下に示す。

SFE 条件

装置設定 Modifier Solvent: 1% トリフルオロ酢酸 / 5% Milli-Q 水含有メタノール溶液, Makeup Solvent: メタノール, 抽出管: 2 mL, 抽出温度: 85°C, 抽出圧力: 280 psi, 試料量: 5 mg, Pre run: Modifier: 0%, Flow rate: 5 mL/min, Dynamic1: 0.1 min, Static: 0.1 min, Dynamic2: 0.1 min, Makeup flow: 0 mL/min, Main: Modifier: 50%, Flow rate: 5 mL/min, Dynamic1: 1 min, Static: 58 min, Dynamic2: 1 min, Makeup flow: 0 mL/min, Post run: Modifier: 0%, Flow rate: 5 mL/min, Dynamic1: 0.1 min, Static: 0.1 min, Dynamic2: 5 min, Makeup flow: 1 mL/min

4. LC-MS/MS 分析

SFE 条件検討時の dextromethorphan および 3 代謝物の LC-MS/MS 分析は、ACQUITY UPLC BEH C18 カラム (2.1x50mm, 1.7 μ m, waters 社) を用いた分析により簡易的に行った。

Dextromethorphan, levomethorphan および各代謝物の定量分析は、既報^{1),2)}に従い、各エナンチオマーが明確に分離可能な Chiral CD-ph column (150 x 2.1 mm, 5 μ m, Shiseido 社) を使用して行った。測定機器は LC-MS/MS (ACQUITY UPLC I-Class/ Xevo TQ-S, Waters 社) を用い、MRM モードで分析を行った。対象化合物の保持

時間、MRM 分析の各条件等を Table 1 に示した。検量線は、コントロール毛髪に化合物溶液を 0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50, 100 ng/mg hair, IS 溶液を 5 ng/mg hair となるよう添加し、SFE による抽出後、LC-MS/MS により測定を行い、内標準法により作成した。真度、精度は 0.1, 10, 100 ng/mg hair (n=3) となるようコントロール毛髪に化合物溶液を添加し、作成した検量線を用いて求めた。また、(-)-3-MEM および(-)-3-HM は標準品を所有していなかったため、(+)-3-MEM および(+)-3-HM の検量線を用いて、定量値を算出した。

LC 条件 カラム: Chiral CD-Ph (2.0 x150 mm, 5 μ m, Shiseido), カラム温度: 30°C, 移動相: A: 0.1% formic acid, B: 0.1% formic acid /acetonitrile, A/B 80 /20 (2 min hold)-70 /30 (15 min)-40 /60-(17 min, 3min hold), 流速: 0.25 mL/min, 注入量: 1 μ L

質量分析条件 EI, positive, Capillary voltage: 2.0 kV, Source temp.: 150°C, Desolvation Gas Flow: N₂ 1000 L/hr, Desolvation Temp.: 500°C, Cone Gas Flow: 150 L/hr, Collision gas flow: Ar 0.15 mL/min, MS 測定: MRM モード, 解析ソフト: Target Lynx

C. 研究結果

1. SFE 条件の検討

ラット毛髪実試料を用いて、dextromethorphan およびその 3 代謝物の抽出における SFE 条件を検討した。また、回収率や再現性等の検討用に、ラットおよびヒトのモデル毛髪試料を使用した。

① Modifier の検討

Modifier の種類を検討するために、メタノール、0.1%ギ酸添加メタノール、10mM 酢酸アンモニウム添加メタノール、アセトニトリル、アセトンの 5 種を超臨界二酸化炭素にそれぞれ 30% 添加し、ラット毛髪実試料の抽出を行った。抽出物について、LC-MS/MS により測定を行い、MRM クロマトグラム上の dextromethorphan のピーク面積を算出した。

Modifier としてメタノールを用いた際に得られるピーク面積値を 100 としたときの各 modifier 添加時のピーク面積比はそれぞれ 100, 100, 90, 20, 10 となり、メタノールを用いた場合に高い抽出効率が得られた。さらに、メタノールへの添加剤として、トリエチルアミン、ギ酸、トリフルオロ酢酸(いずれも 1%まで)および少量の Milli-Q 水(5%以内)を検討した結果、1%の酸および 5%の水を添加すると高い抽出率が得られた。

②抽出温度, 時間, modifier 添加濃度

抽出温度, 抽出時間および modifier 添加濃度を検討するために、ラットモデル毛髪試料を用いて、塩酸メタノール溶液抽出時の各化合物濃度を 100 としたときの SFE 使用時の各濃度を抽出比として評価した。ラットモデル毛髪試料 10 mg を用いて、modifier として 1% ギ酸/ 5% Milli-Q 水含有メタノール溶液を 30%添加し、抽出温度を 60℃あるいは 80℃として、45 分間の抽出を同一試料で 3 回繰り返し、各抽出液中の化合物濃度から抽出率を求めた。抽出時間は、dynamic 1 min -static 45 min -dynamic 1 min で 1 回とした。

その結果、60℃では 1 回目の抽出で 40-55%、3 回目までの合計で 58-79%の抽出率を示した。80℃に加温した場合は、1 回目で 52-75%、合計で 76-97%と抽出率の向上が確認できた。さらに条件の最適化を行ったところ、modifier の添加濃度を 50%、加温を 85℃、抽出時間を static 60 分間に変更したところ、1 回で 89-102%の抽出率を得ることが可能であった (Table 2, Figure 3)。

③試料量

②で設定した SFE 条件でラット毛髪実試料 10 mg の分析を行ったところ、ラットモデル毛髪試料での検討結果と比較して、30 %程度低い値となった。これを改善するため、modifier の添加剤を 1% ギ酸から 1%トリフルオロ酢酸へ変更するとともに、試料量の検討を行った。その結果、実試料の試料量を 10 mg から 5 mg へと減らすことで、抽出効率をさらに高くすることが可能であった。

上記の検討結果を反映させた SFE 条件(詳細は方法項に記載)を用いて、ラットおよびヒトモデル毛髪試料を抽出し、LC-MS/MSにより定量分析を行った結果を Table 3 に示した。SFEにより分析を行った場合の各化合物濃度は、ラットおよびヒト試料ともに、塩酸メタノール溶液抽出における定量結果とほぼ同等であった。また、相対標準偏差 (RSD %)は 5.2%以下となり、いずれも条件の最適化前と比較して改善していることが確認できた。ヒトモデル試料中の化合物濃度は、ラットと比較して 1/10 程度であったが、これはモデル毛髪試料作成時における、化合物溶液の毛髪内への浸透量の違いに起因していると考えられる。

今回、毛髪試料の SFE 条件検討において、コントロール毛髪試料に薬物溶液を浸透させたモデル毛髪試料を用いることで、化合物をコントロール試料に添加しただけの試料と比較して、より実試料に近い検討が可能であった。

2. SFE を用いた毛髪定量分析

最適化した SFE 条件を用いて、ラット毛髪実試料中の dextromethorphan/ levomethorphan および代謝物を抽出し、キラルカラム Chiral CD-ph column を用いた LC-MS/MS により定量分析を行った。

実験方法の項に示した通り、検量線は、コントロール毛髪に化合物溶液を 0~100 ng/mg hair, IS 溶液を 5 ng/mg hair となるよう添加し、SFE による抽出後、LC-MS/MS 分析を行い、MRM モードで作成した。真度、精度は 0.1, 10, 100 ng/mg hair (n=3)となるようコントロール毛髪に化合物溶液を添加して検討した。なお、(-)-3-MEM および(-)-3-HM は、(+)-3-MEM および(+)-3-HM の検量線を用いて定量値を算出した。バリデーションの結果を Table 4 に示した。全化合物で検量線範囲の 1-100 ng/mg hair で良好な直線性が得られ、20%以内の真度、精度が得られた。

Dextromethorphan および levomethorphan を投与したラット毛髪実試料中の薬物および代謝物の

定量分析を行った結果を Table 5 に示した。また、各濃度について、既報^{1),2)}の塩酸メタノール溶液抽出による定量値と比較した結果、(+)-3-HM は 42.5%であったが、他化合物はいずれも 60%以上であった。塩酸メタノール溶液抽出と比較して、SFE の各化合物の抽出効率は低かったが、dextromethorphan および levomethorphan と共に、それぞれの 3 種類の代謝物も再現性よく検出されていた。SFE における抽出効率が低い理由のひとつとして、今回用いたラット毛髪は、洗浄・乾燥操作を行っても一定量の水分および油分が残存することから、超臨界流体で十分抽出しきれなかったことが考えられる。また、未変化体と代謝物では極性が異なり、双方の化合物の抽出に最適な条件を設定することが困難であることも考えられた。一方、既報^{1),2)}の塩酸メタノール溶液抽出では抽出時間が 16 時間程度必要であり、乾固後の再溶解、固相抽出等の煩雑な操作が必要であったが、今回検討した SFE による抽出は 1 試料につき 1 時間半程度で可能であった。SFE による抽出は、毛髪中の薬物および代謝物を簡便に検出可能で、毛髪中薬物のスクリーニング法として優れていると考えられた。

D. 結論

Dextromethorphan (鎮咳去痰薬)もしくはエナンチオマーの levomethorphan (麻薬)を投与したラット毛髪実試料を用いて、SFE の条件検討を行い、LC-MS/MS を用いた定量分析を行った。Dextromethorphan 投与ラット毛髪実試料からの dextromethorphan および代謝物 3 化合物の SFE 条件を検討した結果、メタノールにトリフルオロ酢酸 1%、水 5%を添加した modifier を 50%用い、85°Cに加熱して静的抽出を 1 時間行った条件が最も適していた。ラットもしくはヒトのコントロール試料に、dextromethorphan および代謝物 3 化合物を浸透させたモデル毛髪試料を用いて、最適化した SFE 条件により各化合物の抽出効率を検討

した結果、いずれも 88-103%となり、ばらつき (RSD%)は 5.2%以下と良好な結果を示した。さらに、dextromethorphan もしくは levomethorphan 投与ラット毛髪実試料中の dextromethorphan/levomethorphan およびそれらの代謝物を SFE で抽出し、キラルカラムを用いた LC-MS/MS により定量分析を行った。その定量値を既報^{1),2)}の塩酸メタノール溶液抽出による定量値と比較した結果、(+)-3-HM は 42.5%であったが、他化合物はいずれも 60%以上であった。SFE による分析結果は塩酸メタノール溶液抽出による結果よりも低い値であったが、すべての分析対象化合物が再現性よく検出された。また、塩酸メタノール溶液抽出では抽出時間が 16 時間程度必要で、さらに溶媒留去、再溶解、固相抽出等の煩雑な操作が必要であるが、今回検討した SFE は 1 試料につき 1 時間半程度で抽出可能であり、煩雑な前処理も必要ない。以上より、SFE は毛髪中の薬物および代謝物を効率よく簡便に検出可能なスクリーニング手法として有用であると考えられた。

E. 参考文献

- 1) 厚生労働科学研究補助金(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)「乱用薬物の分析・同定に関する研究」平成 21 年度研究分担報告「毛髪を中心としたラット生体試料中 dextromethorphan 及び levomethorphan の LC-MS/MS を用いた光学異性体分析について」(花尻(木倉)瑠理)。
- 2) R. Kikura-Hanajiri, M. Kawamura, A. Miyajima, M. Sunouchi, Y. Goda. Chiral analyses of dextromethorphan/levomethorphan and their metabolites in rat and human samples using LC-MS/MS. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2011, 400, 165–174.

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

学会発表

1. 河村麻衣子:超臨界流体抽出を用いた高効率なラット毛髪試料中薬物抽出法の検討. 日本薬学会第 142 年会 (25-28 Mar. 2022, Web 開催)

論文発表

特になし.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

Table 1 分析対象化合物の LC-MS/MS MRM 測定条件およびキラル分析における保持時間

Compounds	RT (min)	MRM1 (for quantification)				MRM2 (for confirmation)
		precursor ion (m/z)	product ion (m/z)	cone voltage (V)	Collision voltage (eV)	
Dextromethorphan	10.2	272.0	146.9	25	30	272.0>170.8
Dextrorphan	5.8	258.0	156.8	25	45	258.0>132.7
(+)-3-MEM	7.7	258.0	214.9	25	20	258.0>170.9
(+)-3-HM	3.6	244.0	156.8	25	30	244.0>200.9
Levomethorphan	10.7	272.0	146.9	25	30	272.0>170.9
Levorphanol	5.1	258.0	156.9	25	30	258.0>132.8
(-)-3-MEM (putative)	9.2	258.0	214.9	25	20	258.0>170.9
(-)-3-HM (putative)	4.0	244.0	156.8	25	30	244.0>200.9
Levallorphan (IS)	7.8	284.0	156.8	25	45	-

Table 2 SFE における抽出温度の違いによるラットモデル毛髪試料からの各薬物の抽出量

	Drug concentrations (ng/mg hair)			
	Dextro-methorphan	Dextrorphan	(+)-3-MEM	(+)-3-HM
60°C-1	15.9	16.9	28.1	24.3
60°C-2	4.4	5.3	7.1	7.3
60°C-3	2.1	2.7	3.0	3.8
80°C-1	23.3	23.7	38.2	31.9
80°C-2	5.0	6.9	8.2	9.8
80°C-3	1.9	3.0	3.1	4.5
85°C-1	29.1	38.3	52.0	56.8
85°C-2	1.0	1.3	1.5	1.7
85°C-3	0.5	0.7	0.8	0.9
MeOH-5N HCl ext.	32.3	43.0	51.0	61.1
85°C-1 *	90%	89%	102%	93%
Extraction efficiency				

*各薬物濃度は簡易定量値

** Dynamic 1 min -static 45 min -dynamic 1 min を 3 回繰り返して抽出した際に各回で抽出された薬物量

***Modifier の添加濃度を 50%, 加温を 85°C, 抽出時間を static 60 分間に変更して 1 回抽出した時の抽出効率 (塩酸メタノール溶液抽出時の各化合物濃度を 100 とした場合の値)

Table 3 ラット(A)およびヒト(B)のモデル毛髪試料の最適化 SFE 条件による抽出検討結果

(A)

	Hair (mg)	Drug concentrations (ng/mg hair)			
		Dextro-methorphan	Dextrorphan	(+)-3-MEM	(+)-3-HM
Rat model hair -1	4.8	45.4	61.4	74.7	84.3
Rat model hair -2	4.8	43.7	59.0	74.0	81.8
Rat model hair -3	5.0	47.0	63.1	79.0	87.8
MeOH-5N HCl ext.	5.1	45.0	61.0	72.0	81.5
Extraction efficiency (%)		101	100	105	104
RSD (%)		3.7	3.4	3.6	3.5

*薬物濃度は簡易的定量値

**回収率は塩酸メタノール溶液抽出時の各濃度を 100 とした場合の値

(B)

	Hair (mg)	Drug concentrations (ng/mg hair)			
		Dextro-methorphan	Dextrorphan	(+)-3-MEM	(+)-3-HM
human model hair -1	1.9	3.3	3.3	3.1	3.1
human model hair -2	2.4	3.1	3.3	2.9	3.2
human model hair -3	2.8	3.0	3.4	2.9	3.1
MeOH-5N HCl ext.	2.3	3.0	3.5	3.0	3.3
Extraction efficiency (%)		104	94	101	96
RSD (%)		5.2	1.6	2.7	2.2

*薬物濃度は簡易的定量値

**回収率は塩酸メタノール溶液抽出時の各濃度を 100 とした場合の値

Table 4 LC-MS/MS キラル分析における分析法バリデーション結果

Compounds	RT(min)	Linear range		Precision (%)			Accuracy (%) (n=3)		
		ng/mg hair	R ²	0.1 ng/mg	10	100	0.1 ng/mg	10	100
Dextromethorphan	10.2	0.1-100	0.999	3.5	5.3	5.5	0.2	5.3	4.2
Dextrorphan	5.8	0.1-100	0.999	7.4	5.5	3.4	3.1	3.6	3.0
(+)-3-MEM	7.7	0.1-100	0.999	0.7	6.3	5.0	-16.3	5.6	2.4
(+)-3-HM	3.6	0.1-100	0.999	9.4	5.9	4.9	-14.4	7.4	-0.1
Levomethorphan	10.7	0.1-100	0.999	1.9	1.3	2.5	2.8	-4.7	-0.5
Levophanol	5.1	0.1-100	0.999	3.0	2.1	1.9	7.6	-4.8	1.8

Table 5 SFE および LC-MS/MS キラル分析によるラット毛髪実試料中薬物の定量値 (ng/mg hair) および既報^{1), 2)}の塩酸メタノール溶液抽出による定量値を 100 とした場合の抽出効率 (%) (n=3)

(A) Dextromethorphan 投与ラット毛髪分析結果

	Dextromethorphan (ng/mg) ±SE	Dextrorphan (ng/mg) ±SE	(+)-3-MEM (ng/mg) ±SE	(+)-3-HM (ng/mg) ±SE
Dex-rat hair-1	46.9 ± 0.41	1.9 ± 0.06	16.1 ± 0.37	0.33 ± 0.01
Dex-rat hair-2	53.6 ± 0.55	2.0 ± 0.01	16.8 ± 0.41	0.26 ± 0.02
Dex-rat hair-3	43.3 ± 1.74	1.5 ± 0.05	15.9 ± 0.88	0.27 ± 0.04
Extraction efficiency (%)	75.9	66.0	64.9	42.5

(B) levomethorphan 投与ラット毛髪分析結果

	Levomethorphan (ng/mg) ±SE	Levopranolol (ng/mg) ±SE	(-)-3-MEM* (ng/mg) ±SE	(-)-3-HM* (ng/mg) ±SE
Levo-rat hair-1	22.0 ± 1.01	15.4 ± 0.60	2.31 ± 0.09	0.40 ± 0.03
Levo-rat hair-2	12.4 ± 0.44	12.2 ± 0.25	1.37 ± 0.04	0.29 ± 0.02
Levo-rat hair-3	20.5 ± 0.56	16.6 ± 0.70	2.34 ± 0.09	0.38 ± 0.03
Extraction efficiency (%)	74.0	60.1	78.3	72.3

*(-)-3-MEM, (-)-3-HM の定量値は (+)-3-MEM, (+)-3-HM の検量線を用いて算出

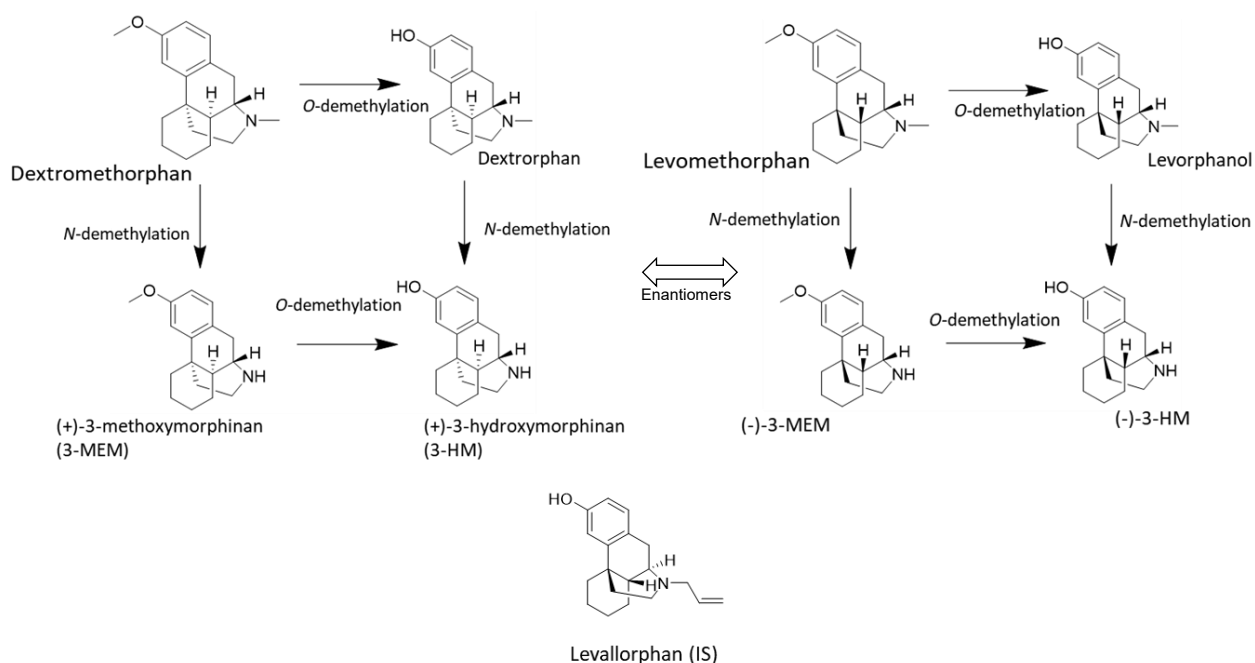


Figure 1 分析対象化合物の構造

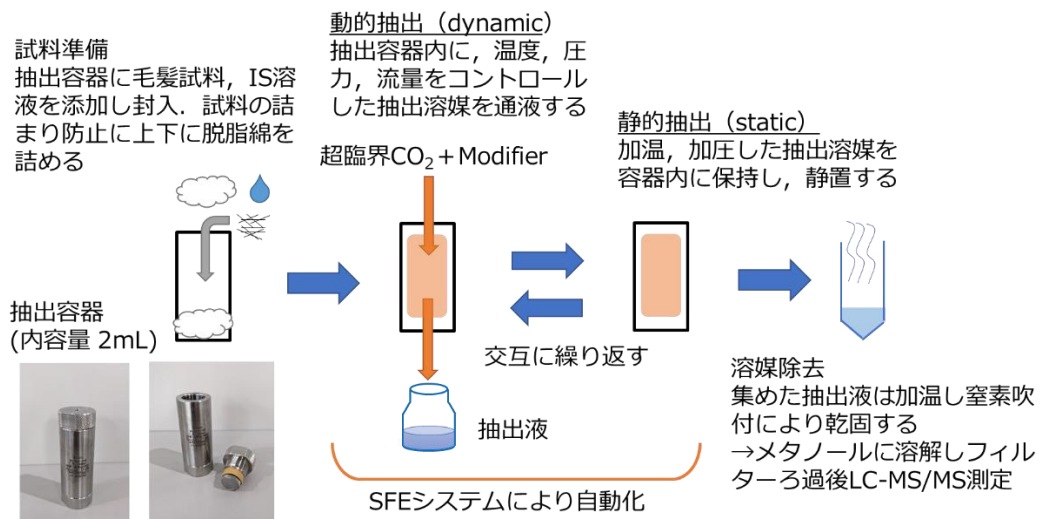


Figure 2 超臨界流体抽出(SFE)法の概要 (装置: MV-10 ASFE システム, Waters 社製)

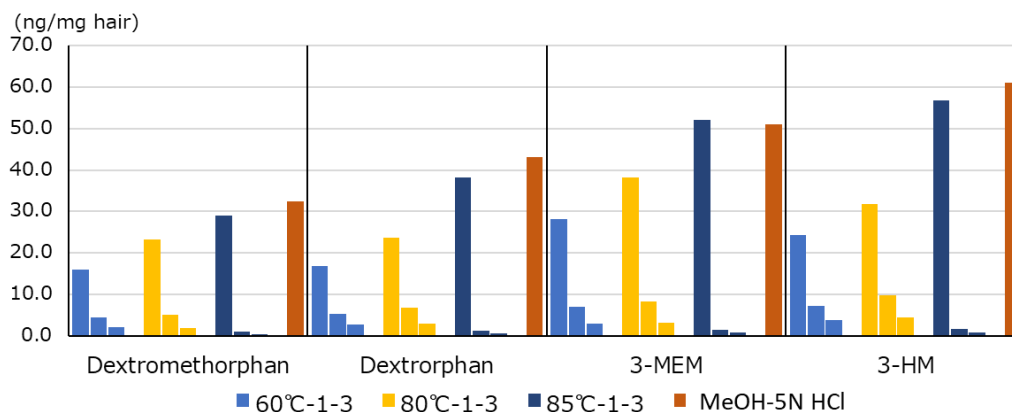


Figure 3 SFE における抽出温度の違いによるラットモデル毛髪試料からの各薬物の抽出量

* Dynamic 1 min -static 45 min -dynamic 1 min を 3 回繰り返して抽出した際に各回で抽出された薬物量