

医薬品の一斉分析法の開発

Analysis of analgesic and antipyretic drugs and antidepressant drugs by liquid chromatography/mass spectrometry

— LC/MS法による解熱鎮痛消炎薬、抗うつ薬の分析 —

慶應義塾大学医学部法医学教室 専任講師 篠塚 達雄

TATSUO SHINOZUKA

Department of Legal Medicine, School of Medicine, Keio University

1. はじめに

地下鉄サリン事件、和歌山毒入りカレー事件などにみられるように、犯罪の立件には原因物質(薬毒物)の特定(同定)が大きく関わってくる。最近では使用される薬毒物の種類は多様化しており、法医学中毒学領域では中毒原因薬毒物の検索・同定法の開発が大きな課題となっている。中毒事例では極めて多種類の医薬品に基因するものが多くみられ、その検索・同定のためには迅速かつ高感度な一斉分析法(スクリーニング法)の確立が必須となってきている¹⁾。

本文では医薬品の一斉分析法として、著者らが検討している液体クロマトグラフィー/質量分析法(LC/MS法)を用いた解熱鎮痛消炎薬と抗うつ薬の分析例を紹介する。

2. 法医学中毒学領域における医薬品の一斉分析

法医学中毒学領域では、青酸やヒ素といった今では古典的といえる毒物から覚せい剤などの乱用薬物、医薬品類など、極めて多くの種類の薬毒物が分析対象となっている²⁾。中毒情報センターでは、家庭用品(たばこ関連品、化粧品、洗浄剤等)、医療用医薬品(解熱鎮痛消炎薬、抗うつ薬、抗不安薬、抗精神病薬等)、一般医薬品(解熱鎮痛薬、催眠鎮静薬)、農薬用品(殺虫剤、除草剤等)、自然毒(植物、きのこ等)、工業用品(化学薬品等)による中毒事例³⁾が報告されている。これらの事例では医薬品(医療用、一般用)によるものが多くを占め、なかでも解熱鎮痛薬によるものが年々増加する傾向にある。また、最近では高齢化に伴い向精神薬の一つ

である抗うつ薬による事例の増加も顕著になってきている(図1)。

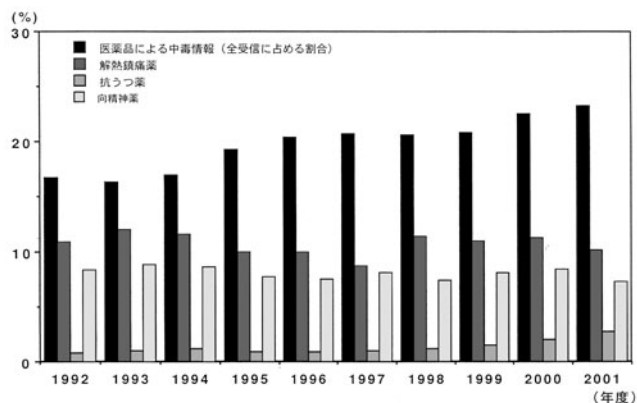


図1 日本中毒情報センター受信報告²⁾
受信件数はすべて一般医薬品と医療用医薬品の合計

薬毒物分析では、試料からの薬毒物を抽出する方法と得られた抽出物を分析する方法との双方について様々な検討が行なわれている。法医学中毒学領域における薬毒物分析試料は、一般的な血液や尿だけでなく、時として臓器や硬組織(骨、毛髪等)などが対象となる場合がある。このような分析対象試料に対しては様々な抽出法が考案され試みられている。従来では主として液-液法が繁用されてきたが、最近では簡便な固相抽出法が使用されるようになってきている。さらに、固相マイクロ抽出(SPME)法⁴⁾やモノリス型カラム(マイクロLCの分離カラムとして開発されたものを固相抽出剤として利用するもの)による抽出法⁵⁾も報告されている。これらの抽出法の開発目的は、医薬品類の抽出時に夾雑する生体内の多数の物質の除去であり、対象薬毒物の簡便・迅速な分析にある。分析方法としては、分離能力にすぐれたクロ

マトグラフィーと検出感度・同定能力に優れたマススペクトロメトリー(質量分析)の2種類の手法をオンラインで結合させた機器分析法として、ガスクロマトグラフィー/質量分析法(GC/MS法)、LC/MS法が繁用されている。

3. 解熱鎮痛消炎薬のLC/MS分析

著者は、これまでに高速液体クロマトグラフィー(HPLC)、薄層クロマトグラフィー(TLC)、ガスクロマトグラフィー(GC)などを用いた解熱鎮痛消炎薬に関する分析法を確立してきた⁶⁻⁸⁾。本文では、16種類の解熱鎮痛消炎薬のLC/MSによる一斉分析法について紹介する^{9,10)}。

3.1 解熱鎮痛消炎薬

解熱鎮痛消炎薬は解熱作用、鎮痛作用を有するとともに抗炎症作用も持つことから、一般には消炎鎮痛剤もしくは解熱鎮痛剤と呼ばれている。解熱鎮痛消炎薬は、薬理学上にはステロイド薬と類似の抗炎症作用を有する薬物であり、化学構造上ステロイド骨格を持たないことから非ステロイド性抗炎症薬(Non-Steroidal-Anti-Inflammatory-Drugs(NSAIDs))とも呼ばれている¹¹⁾。従って、ステロイド薬のような強力な抗炎症作用は有さないが、ステロイド薬のように重篤な副作用も発現しない。NSAIDsは先に述べた抗炎症、鎮痛、解熱作用などが主作用であるが、その他に血漿板凝集抑制作用や尿酸排泄作用などもあるので、その適応疾患は幅広く臨床各科におよんでいる。解熱鎮痛消炎薬は大きくは酸性と塩基性に分類される(表1)。塩基性のものは鎮痛作用が酸性薬剤より弱いので今はあまり用いられなくなっている。酸性薬剤は構造上8つのグループに分類され、同じ

グループに属する薬物はほぼ類似の薬理作用と副作用を持っている。本文では表1に太字で示すサリチル酸系、アントラニル酸系、フェニル酢酸系の一部及びプロピオン酸系の計16種類の解熱鎮痛消炎薬を分析対象とした。

3.2 OASIS MAX®固相カートリッジによる血清からの解熱鎮痛消炎薬の固相抽出¹⁰⁾

血清(内部標準物質を添加)にリン酸および精製水を加え、あらかじめメタノール、水で活性化したOASIS MAX® extraction cartridge(1cc用、日本ウォーターズ(株))に適用した。抽出操作はVac-Elut®システムを使用し、吸引圧力は15-20mmHgで行なった。5%メタノール-50mM酢酸ナトリウム溶液でカラムを洗浄後、100mMリン酸-アセトニトリル(50:50)で溶出した。溶出液は、窒素気流下で溶媒を留去し、移動相を加えて再溶解した後、LC/MSに注入して分析した。

3.3 解熱鎮痛消炎薬のLC/MS分析例

- 1) 解熱鎮痛消炎薬:表1に示した16種類の解熱鎮痛消炎薬について分析を実施した。
- 2) LC/MS分析の条件:装置:日立M-8000形 LC/3DQ・MSシステム、セミマイクロAPCI法(Negative mode)あるいはSSI法(Negative mode)、ドリフト電圧:40V、カラム:Mightysil RP-18(150×2.0mm i.d.,粒径5 μ m, 関東化学(株))、カラム温度:35℃、UV波長:238nm、移動相:メタノール-10mM酢酸(70:30,v/v)あるいはメタノール-10mM酢酸(90:10,v/v)、流速:0.08mL/min。
- 3) 分析例:16種類の解熱鎮痛消炎薬のLC/MS分析は、Mightysil RP-18カラムで良好な分離分析ができ(表2)、TICおよびマススペクトルでそれぞれ確認・同定が可能であった。LC/MS(セミマイクロAPCI法、negative mode)による16種類の解熱鎮痛薬の検出限界は、0.1-3.0 μ g/mL(S/N=3)であった。表3と表4には、セミマイクロAPCI法(negative mode)とSSI法(negative mode)での解熱鎮痛薬のマススペクトルをそれぞれまとめたものを示した。16種の解熱鎮痛薬は、いずれも擬分子イオンピーク(M+H)⁺を与えた。また、OASIS MAX® extraction cartridgeを用いた血清からの16種類の解熱鎮痛薬の抽出は、いずれも良好な回収率を示した(表5)。

表1 主な解熱鎮痛消炎薬の種類(化学構造に基づく分類)

	大分類	中分類	小分類	主要薬剤（一般名）
酸性	カルボン酸系	カルボン酸系	サリチル酸系	アスピリン
			アントラニル酸系	フルフェナム酸、メフェナム酸、トルフェナム酸
		酢酸系	フェニル酢酸系	ジクロフェナクナトリウム、フェンブフェン
			インドール酢酸系	インドメタシン、アセメタシン
			ピラノ酢酸系	エトドラク
	エノール酸系	プロピオン酸系		アルミノプロフェン、フェノプロフェンカルシウム、フルビプロフェン、イブプロフェン、ケトプロフェン、ロキソプロフェンナトリウム、ナプロキセン、オキサプロジン、プラノプロフェン、チアプロフェン酸、ザルトプロフェン
		ピラゾロン系	フェニルブタゾン、オキシフェンブフェン	
	オキシシカム系	ピロキシカム、アンピロキシカム		
塩基性（非酸性）				メピリゾール

表2 主な解熱鎮痛消炎薬の液体クロマトグラフィー／質量分析計による保持時間と検出限界

化合物	移動相*	保持時間(分)**	検出限界 ($\mu\text{g/mL}$, S/N=3)***
アルミノブロフェン	i	19.2	2.9
フェノブロフェンカルシウム	i	17.0	0.1
フルルビプロフェン	i	19.3	0.13
イブプロフェン	i	25.3	2.2
ケトプロフェン	i	10.7	0.4
ロキソプロフェンナトリウム	i	11.6	2.53
ナブロキセン	i	11.6	0.09
オキサプロジン	i	19.3	0.46
ブранаプロフェン	i	7.8	0.33
チアプロフェン酸	i	9.3	2.0
ザルトプロフェン	i	12.6	0.18
フルフェナム酸アルミニウム	ii	9.7	1.54
アスピリン	ii	6.3	0.12
ジクロフェナクナトリウム	ii	8.2	2.0
メフェナム酸	ii	9.1	0.15
トルフェナム酸	ii	10.9	2.11

*移動相：(i) メタノール-10mM酢酸 (70 : 30)
(ii) メタノール-10mM酢酸 (90 : 10)

**カラム：Mightysil RP-18

***セミマイクロAPCI法：negative mode

表3 主な解熱鎮痛消炎薬の液体クロマトグラフィー／質量分析法によるマススペクトル(セミマイクロAPCI：negative mode)

化合物	分子量	基準ピーク	他のフラグメントイオン
アルミノブロフェン	219	218(M-H) ⁻	172, 202
フェノブロフェンカルシウム	242 (free)	197	241 (M-H) ⁻
フルルビプロフェン	244	198	-
イブプロフェン	206	205(M-H) ⁻	160
ケトプロフェン	254	253(M-H) ⁻	209
ロキソプロフェンナトリウム	246 (free)	244 (M-H) ⁻	201
ナブロキセン	230	170	185
オキサプロジン	293	292(M-H) ⁻	-
ブранаプロフェン	255	210	254 (M-H) ⁻
チアプロフェン酸	260	215	245, 203
ザルトプロフェン	298	253	219
フルフェナム酸アルミニウム	280 (free)	280(M-H) ⁻	-
アスピリン	180	137	124, 93
ジクロフェナクナトリウム	295(free)	294 (M-H) ⁻	134, 92
メフェナム酸	241	240 (M-H) ⁻	-
トルフェナム酸	262	261 (M-H) ⁻	138, 241

表4 主な解熱鎮痛消炎薬の液体クロマトグラフィー／質量分析法によるマススペクトル (SSI法：negative mode)

化合物	分子量	基準ピーク	他のフラグメントイオン
アルミノブロフェン	219	181	152, 161, 218(M-H) ⁻
フェノブロフェンカルシウム	242 (free)	197	181
フルルビプロフェン	244	199	-
イブプロフェン	206	205(M-H) ⁻	-
ケトプロフェン	254	209	253(M-H) ⁻
ロキソプロフェンナトリウム	246 (free)	268(M+Na) ⁻	201, 132
ナブロキセン	230	185	170
オキサプロジン	293	292(M-H) ⁻	-
ブранаプロフェン	255	254(M-H) ⁻	210
チアプロフェン酸	260	215	203
ザルトプロフェン	298	253	267, 241
フルフェナム酸アルミニウム	280 (free)	218	172
アスピリン	180	137	93
ジクロフェナクナトリウム	295(free)	250	252, 294(M-H) ⁻
メフェナム酸	241	240(M-H) ⁻	-
トルフェナム酸	262	260	261(M-H) ⁻

表5 固相カラムを用いた血漿からの主な解熱鎮痛消炎薬の回収率

化合物	回収率
アルミノブロフェン	64.8±8.8
フェノブロフェンカルシウム	86.5±6.5
フルルビプロフェン	71.5±10.0
イブプロフェン	108.0±10.1
ケトプロフェン	99.5±5.6
ロキソプロフェンナトリウム	94.0±5.3
ナブロキセン	91.5±0.5
オキサプロジン	106.9±11.3
ブранаプロフェン	109.6±5.9
チアプロフェン酸	111.6±10.1
ザルトプロフェン	63.0±2.0
フルフェナム酸アルミニウム	52.9±7.9
アスピリン	86.8±4.1
ジクロフェナクナトリウム	95.8±3.7
メフェナム酸	64.8±10.3
トルフェナム酸	71.0±5.2

4. 抗うつ薬のLC/MS分析

抗うつ薬の分析法としては、高速液体クロマトグラフィー、ガスクロマトグラフィーなどの報告がみられる^{12,13)}。本文では、18種類の抗うつ薬のLC/MSによる一斉分析法について紹介する¹⁴⁾。

4.1 抗うつ薬

気分障害には気分の抑制を主症状とするうつ状態、気分の高揚を主症状とする躁状態がある。うつ病やうつ状態の治療に用いられる薬を抗うつ薬と呼んでいる。表6には、代表的な抗うつ薬をまとめてある。三環系、四環系抗うつ薬の主たる作用機序としては、アミン再取込み阻害とモノアミンオキシダーゼ阻害が説明されている¹⁵⁾。最近ではSSRI (選択的セロトニン再取込み阻害薬) やSNRI (選択的ノルアドレナリン再取込み阻害薬) が開発され用いられている。

4.2 OASIS® HLB固相カートリッジによる血清からの三環系抗うつ薬の抽出¹⁴⁾

血清 (内部標準物質を添加) にリン酸および精製水を加え、あらかじめメタノール、水で活性化したOASIS® HLB extraction cartridge (1cc用) に適用した。抽出操作はVac-Elut®システムを使用し、吸引圧力は15-20mmHgで行なった。2%アンモニア-5%メタノール水溶液、2%アンモニア-65%メタノール水溶液、2%酢酸-5%メタノール水溶液の順に注入しカラムを洗浄した。次いで65%メタノール水溶液で薬物を溶出した。溶出液は、窒素気流下で溶媒を留去し、移動相を加えて再溶解した後、LC/MSに注入して分析した。

4.3 抗うつ薬のLC/MS分析例

- 1) 抗うつ薬:表6に太字で示した18種類の抗うつ薬について分析を実施した。
- 2) LC/MSの分析条件:日立M-8000 LC/3DQMS system、カラム:①Inertsil ODS-3 ②Inertsil C8 (150×2.0mm i.d.,粒径5 μ m, GLサイエンス(株))、移動相:メタノール-10mM酢酸アンモニウム (pH 5.0)-アセトニトリル (70:20:10, v/v/v)、流速:0.08mL/min、検出波長:254nm、イオン源:SSI (positive mode)、ネプライザー温度:180℃、カラムオープン温度:35℃、ドリフト電圧:50V、シールド温度:250℃、第一細孔温度:150℃。
- 3) 分析例:18種類の抗うつ薬のLC/MS分析は、Inertsil C8およびInertsil ODS-3カラムで良好な分離分析ができTICおよびマススペクトルでそれぞれ確認・同定が可能であった(図2、表7)。LC/MSによる18種類の解熱鎮痛薬の検出限界は、0.05-0.63 μ g/mL (S/N=3)であった。抗うつ薬のマススペクトル (SSI法、Positive mode)は、いずれも擬分子イオンピーク(M+H)⁺を与えた(表8)。

表6 主な抗うつ薬の種類

分 類		主要薬剤 (一般名)
第1世代	三環系	イミプラミン
		アミトリプチリン
		デシプラミン
		トリミプラミン
		ノルトリプチリン
第2世代	三環系	クロミプラミン
		アモキサピン
		ロフェブラミン
		ドスレピン
	四環系	マプロチリン
		ミアンセリン
		セチプチリン
第3世代	SSRI ¹⁾	トラゾドン
		フルボキサミン
第4世代	SNRI ²⁾	パロキセチン
		ミルナシبران
その他		スルピリド
		タンドスピロン
		メチルフェニデート
		メリトラセン

1) Selective Serotonin Reuptake Inhibitor (選択的セロトニン再取り込み阻害薬)

2) Serotonin Noradrenaline Reuptake Inhibitor (選択的ノルアドレナリン再取り込み阻害薬)

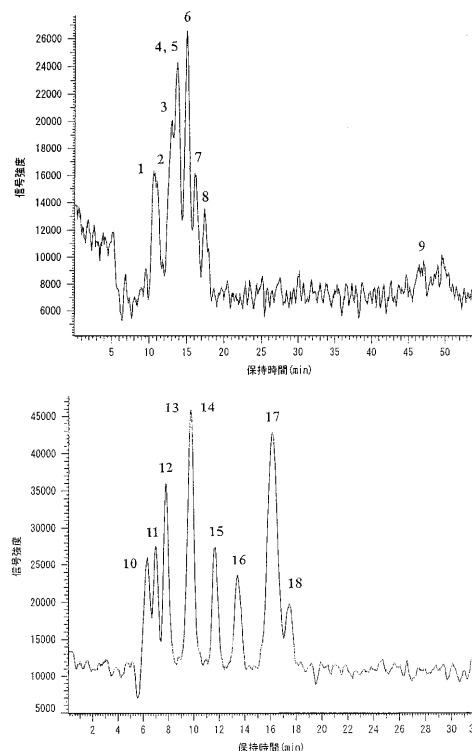


図2 主な抗うつ薬の液体クロマトグラフィー/質量分析法によるクロマトグラム

1: デシプラミン	2: ノルトリプチリン	3: アモキサピン
4: ドスレピン	5: イミプラミン	6: アミトリプチリン
7: トリミプラミン	8: クロミプラミン	9: ロフェブラミン
10: スルピリド	11: ミルナシبران	12: メチルフェニデート
13: パロキセチン	14: マプロチリン	15: トラゾドン
16: セチプチリン	17: メリトラセン	18: ミアンセリン

表7 主な抗うつ薬の液体クロマトグラフィー/質量分析計による保持時間と検出限界

化 合 物	カ ラ ム*		検出限界 (μ g/mL, S/N=3)**
	i)	ii)	
イミプラミン	12.7	10.2	0.05
アミトリプチリン	13.9	11.5	0.16
デシプラミン	8.6	9.5	0.08
トリミプラミン	15.7	15.2	0.05
ノルトリプチリン	9.2	7.8	0.08
クロミプラミン	16.2	13.9	0.10
アモキサピン	9.6	9.2	0.16
ロフェブラミン	29.3	37.3	0.63
ドスレピン	10.3	11.3	0.08
マプロチリン	9.5	7.0	0.15
ミアンセリン	11.9	14.2	0.05
セチプチリン	8.2	12.3	0.10
トラゾドン	12.8	11.2	0.05
パロキセチン	8.1	8.9	0.13
ミルナシبران	6.5	5.6	0.05
スルピリド	5.5	7.0	0.08
メチルフェニデート	7.6	7.1	0.08
メリトラセン	18.3	17.7	0.03

*移動相: メタノール-10mM酢酸アンモニウム (pH 5.0)-アセトニトリル (70:20:10),
カラム: i) Inertsil ODS-2, ii) Inertsil ODS-3

**SSI法: positive mode

表8 主な抗うつ薬の液体クロマトグラフィー/質量分析法によるマスペクトル (SSI: negative mode)

化合物	分子量	基準ピーク	他のフラグメントイオン
イミプラミン	280	281(M+H) ⁺	86
アミトリプチリン	277	278(M+H) ⁺	-
デシプラミン	266	267(M+H) ⁺	85
トリミプラミン	294	295(M+H) ⁺	-
ノルトリプチリン	263	264(M+H) ⁺	233
クロミプラミン	314	315(M+H) ⁺	-
アモキシセピン	313	314(M+H) ⁺	-
ロフェプラミン	418	419(M+H) ⁺	-
ドスレピン	295	296(M+H) ⁺	-
マプロチリン	277	278(M+H) ⁺	-
ミアンセリン	264	265(M+H) ⁺	-
セチプチリン	261	262(M+H) ⁺	-
トラゾドン	371	372(M+H) ⁺	-
パロキセチン	329	262(M+H) ⁺	-
ミルナシプラン	246	230	247(M+H) ⁺
スルピリド	341	342(M+H) ⁺	-
メチルフェニデート	233	234(M+H) ⁺	-
メリトラセン	291	292(M+H) ⁺	-

5. まとめ

薬毒物の一斉分析法の開発は、救急領域では患者の迅速な治療処置につながるとともに、法医中毒学領域では時として裁判上の有力な証拠となる薬物の迅速な同定という点で重要なものとなる。本文では医薬品の一斉分析法(スクリーニング法)として、解熱鎮痛消炎薬と抗うつ薬のLC/MSを用いた分析法について述べてきた。今回は紹介出来なかったが、法医中毒学領域では覚せい剤を代表とする乱用薬物¹⁶⁾の分析(摂取証明)法の開発も大きな課題としてある。規制薬物の乱用は、幻覚薬にみられる種々のデザイナーズドラッグや医療現場で使用されている多くの向精神薬にまで広がってきている。そのため様々な規制薬物や医薬品の非合法的な乱用に対して、迅速・正確な分析法の開発の必要性がせまられている。この事に関しては、機器分析法とは別に迅速スクリーニング法として尿中の規制薬物に対する簡易キットが種々考案され、市販されるようになってきている。

これまでに医薬品類や乱用薬物の分析には、主としてGC/MS法が繁用されてきた。生体試料からの薬毒物分析に対する簡便さを考えると今後LC/MSによる分析法の開発がより活発になってくものと想定される。また、LCカラムの開発も盛んに行なわれており、それに伴い従来では分離分析不可能な薬毒物に対する分析も可能となってきた。LC/MS法による薬毒物分析に関する報告はGC/MS法と比較してまだ少なく、分析データの集積はこれからの課題となる。

文献

- 1) 篠塚達雄、中島理加、薬毒物分析実践ハンドブック 鈴木修、屋敷幹雄(編)、じほう、(2002)
- 2) 松井秀和、篠塚達雄、杉江秀明、永井智紀、栗原克由、北里医学、**30**,276,(2000).
- 3) (財)日本中毒情報センター、1992-2001年度受信報告中毒研究、**vol.6-15**、(1993-2002).
- 4) 奈女良昭、屋敷幹雄、小嶋亨、福永徳人、法中毒、**16**,1,(1998).
- 5) 中本晃弘、倉本孝子、奈女良昭、西田まなみ、屋敷幹雄、武井義之、古野正浩、木村恒二郎、鑑識科学、**8**,76,(2003).
- 6) T.Shinozuka, M.Terada, A.Ogamo, R.Nakajima, S.Takei, T. Murai, C.Wakasugi, J.Yanagida, *Jpn J Forensic Toxicol.*, **14**,246,(1996).
- 7) T.Shinozuka, S.Takei, N.Kuroda, A.Ogamo, M.Terada, C.Wakasugi, J.Yanagida, *Jpn J Forensic Toxicol.*, **14**,43,(1996).
- 8) T.Shinozuka, R.Nakajima, S.Takei, A.Ogamo, M.Terada, T. Murai, J.Yanagida, *Jpn J Forensic Toxicol.*, **17**,51,(1999).
- 9) 篠塚達雄、中島理加、馬場美年子、呂彩子、久康成、大上治、武井節子、村井達哉、寺田賢、日法医誌、**55**,54,(2001).
- 10) 篠塚達雄、中島理加、大上治、武井節子、村井達哉、寺田賢、法中毒、**19**,172,(2001).
- 11) 柏崎禎夫、非ステロイド抗炎症薬 日本医学出版、**1997**.
- 12) E.Tanaka, M.Terada, T.Nakamura, S.Misawa, C.Wakasugi, *J.Chromatogr. B.*, **692**,405,(1997).
- 13) R.de laTorre, J.Ortuno, JA.Pascual, S.Gonales, Ballesta, *Ther Drug Monit.*, **20**,340,(1998).
- 14) 篠塚達雄、上野由貴、鈴木祐子、中島理加、寺田賢、田中栄之介、日本薬学会第124年会 口演要旨集、**2004**.
- 15) 田中千賀子、加藤隆一(編)、NEW 薬理学(改訂第2版権)、南江堂、**1994**.
- 16) 篠塚達雄、日本医師会雑誌、**122**,1601,(1999).