

直接試料導入-化学イオン化マスキロマトグラフィーによる 薬物中毒の緊急検査法

村田 武[®]， 中村順子*， 島田 力， 沢辺善之**

(1984年11月5日受理)

直接試料導入を用い、インブタンを試薬ガスとした化学イオン化質量分析法で催眠薬、鎮痛薬、向精神薬、抗パーキンソン氏病薬などによる急性中毒診断のために、確実かつ迅速な同定法について述べる。使用した17種類の薬物の化学イオン化(CI)マススペクトルはブロムワレリル尿素を除いて、MH⁺イオンのほとんどがベースピークとなり、質量を読み取るだけで同定できた。しかし沸点差の大きく異なる薬物混合物や大きな濃度差のある薬物混合物に対してはCIマスキロマトグラフィーを用いなければ正確な同定が困難であることが分かった。この手法により胃洗浄液や血清抽出物中に含有するすべての薬物の同定を行った。CIマスキロマトグラフィーは揮発性、不揮発性薬物に関係なく数分で測定できる特徴をもっている。定量が必要なときは内部標準物質を用いれば良いことが分かった。この手法の検出限界はCIマスキロマトグラフィーで数十ng、CIマスキロマトグラフィーで数ngオーダーである。

1 緒 言

様々な薬が広く使用されている今日、薬の乱用や誤用が問題となっている。特に催眠薬、鎮痛薬、向精神薬、抗パーキンソン氏病薬などの偶然もしくは故意のoverdose(過量服用)による急性中毒の発生件数が増大し、これらの患者に対処する必要性に迫られている。この目的のために従来から、ガスクロマトグラフ(GC)や液体クロマトグラフ(LC)を含む広範囲な分析技術を用いた同定が行われてきたが、overdoseの場合のあらゆる薬物を対象としうるものでなければならぬ点からガスクロマトグラフ質量分析計(GC/MS)が適していると考えられていた¹⁾。GC/MSには分離能が高い、定性及び定量能力がある、微量分析が可能、などの多くの利点がある。しかしGC/MSの場合、GCが律速段階となり、1回の分析に約20~40分かかる。更にカラムに入る前にガス化しなければならぬために薬物のうちの相当数は誘導体化を必要とする。

最近過量に服用された薬物の緊急検査の必要性がより増大してきており確実かつ迅速に同定することが重要

となる。これに対処するためには直接試料導入法(DI)が最適で、数分の測定で十分である。しかし電子衝撃イオン化法(EI)であれば、定量分析に用いられている例²⁾はあるが、未知混合物を対象とした分離及び同定は困難であった。しかし、ほとんどMH⁺イオンしか出現しない化学イオン化法(CI)を用いれば、GCを使わずに迅速化を図ることが可能となるので、胃洗浄液からの抽出物の薬物同定に用いた例が報告されている³⁾。しかしCIマススペクトルのみでは正確な同定は困難である。

著者らはoverdoseによる急性中毒の場合の緊急検査法を確立することを目的として、分析の迅速化、定性能力の増加に加えて定量精度の上昇、微量化のために直接試料導入-化学イオン化マスキロマトグラフィー(DI-CIMC)あるいはマスキロマトグラフィー(DI-CIMF)を用いた実験を行ったので報告する。測定はしばしば問題となる薬物、胃洗浄液及び血清からの抽出物を用いた。

2 実 験

2.1 薬物及び分析試料

薬物の標品として次の17種類を用いた。ジアゼパム(精神安定剤、催眠、筋し緩)、ニトラゼパム(抗不安、催眠)、クロルジアゼポキシド(抗不安)、クロルプロマジン(向精神病)、フェノバルビタール(催眠、鎮痛、

* (株)島津製作所応用技術部：604 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1

** 大阪府立公衆衛生研究所：537 大阪府大阪市東成区中道1-3-69

抗てんかん), プリミドン (抗てんかん), フェニトイン (抗てんかん), バルプロ酸 (抗てんかん), プロメタジン (抗パーキンソン氏病), トリヘキシフェニジル (抗パーキンソン氏病), ピペリデン (抗パーキンソン氏病), アミトリプチリン (抗うつ), スルピリド (向精神病), アセトアミノフェン (鎮痛, 下熱), カフェイン (中枢興奮, 強心), プロムワレリル尿素 (催眠, 鎮痛), エテンザミド (鎮痛, 下熱). 各々の標品はクロロホルムで 10 mg/ml に調整し原液とした. この原液を漸次クロロホルムで希釈し測定に用いた. 標品のうち塩酸塩やナトリウム塩になっているものでも, そのまま溶媒に溶かしてマススペクトルを測定した. 生体試料は患者の胃洗浄液 (検体 I) 及び血清 (検体 II~V) から Fig. 1 に示した操作によって抽出した.

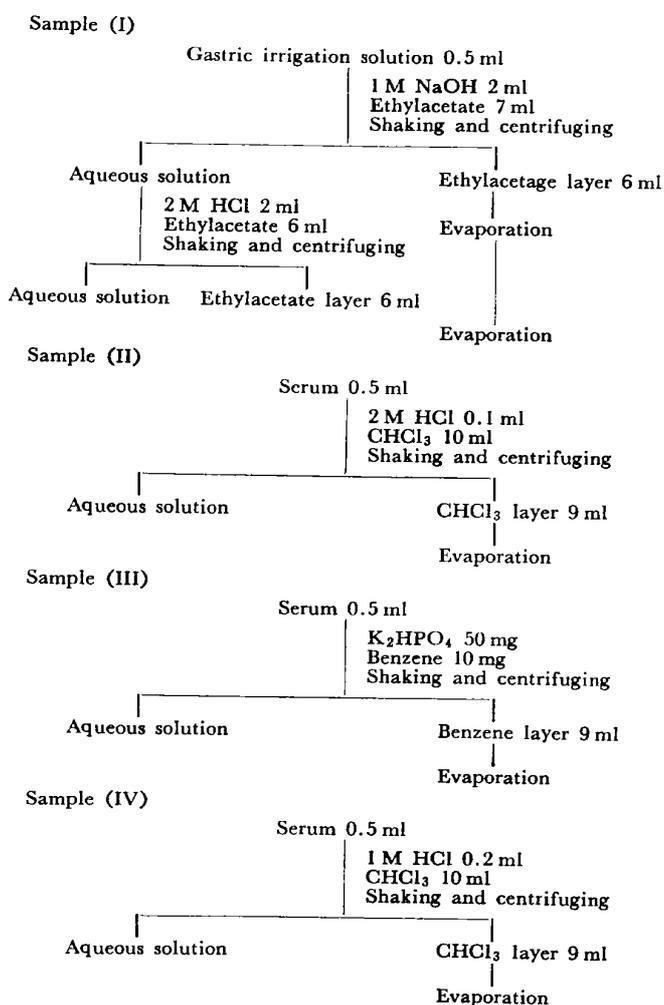


Fig. 1 Procedure of sample extraction

(I) Gastric irrigation solution, (II)-(IV) Serum

2.2 装置及び測定条件

測定: 島津製作所製の四重極型質量分析計である GCMS-QP 1000 で行った. 電子衝撃型イオン化と化学イオン化が切り換えによって測定可能なイオン源が装着されている. 試料のイオン源への導入はパイレックスガラス製セルを内蔵したプローブで行った.

条件: イオン源温度は 200 °C, DI プローブ温度は 4 °C/min の速度で 40~230 °C まで昇温を行った. 化学イオン化はイソブタンガスを用いて行った. イオン化電圧は EI は 70 eV, CI は 200 eV である. 試料はパイレックスガラス製セルにマイクロシリンジで 1 µl 注入し, 溶媒を揮発させた後イオン源に導入した.

3 結果及び考察

3.1 薬物の EI 及び CI マススペクトル

DI-EIMS 及びイソブタン DI-CIMS の測定は標品の各々を 1 µg/1 µl に調整して用いた. Fig. 2 に EI 法によるマススペクトルを示す. 分子イオンがベースピークとなっているのはアセトアミノフェンと無水カフェインの 2 種類のみである. しかもフラグメントイオンも多く観察され単純なマススペクトルとは言えない. ニトラゼパム, ジアゼパムは共に (M-H)⁺ イオンがベースピークで, m/z 200 から m/z 260 の間に多くのイオンが出現している. その他の薬物は分子イオンが出現しても強度が低いかあるいは分子イオンは観察されない. このような EI スペクトルでは, 数種類の薬物が異なった割合で, しかも濃度差の大きな割合で混合されているものを同定することは困難である.

これに対して Fig. 3 に CI マススペクトルを示すが, MH⁺ イオンのみが出現するものが 17 種類のうち 11 種類, MH⁺ イオンがベースピークでフラグメントイオンが 1 本観察されるのが 5 種類で, プロムワレリル尿素のみが MH⁺ イオンは出現しているものの, m/z 145 がベースピークでフラグメントイオンも観察される. 従って混合物に対して分子イオンの質量を読み取るだけで同定が可能である. しかし薬物の各々は沸点が異なるために DI プローブ中でガス化する速さに差が生じて, マススペクトルのみの検討では不十分である. Fig. 4 に 11 種類の薬物の混合試料 (試料名は Fig. 5 参照) の total ion chromatogram (TIC) 及び TIC 上に矢印で示した部分の CI マススペクトル (a), (b) を示す. この両者を比較すると TIC の前で採集した (a) では MH⁺ 313 のピペリデンと MH⁺ 319 のクロルプロマジン, MH⁺ 300 のクロルジアゼポキンド, MH⁺ 282 のニトラゼパム, MH⁺ 253 のフェニトインが出現しておらず, (b) では MH⁺ 145 を示すバルプロ酸が出現していない. 又各質量ピークの相対強度も (a) と (b) とでは異なっている. TIC 上 (a) と (b) のほかに数枚のマススペクトルを採集し検討することで何成分含まれているかの推定は可能であるが, 強度の低い質量のイオンピークに対して, 化合物由来のものかバックグラウンドであるかの判断は困難である. 更に DI-CIMS の有利な点は

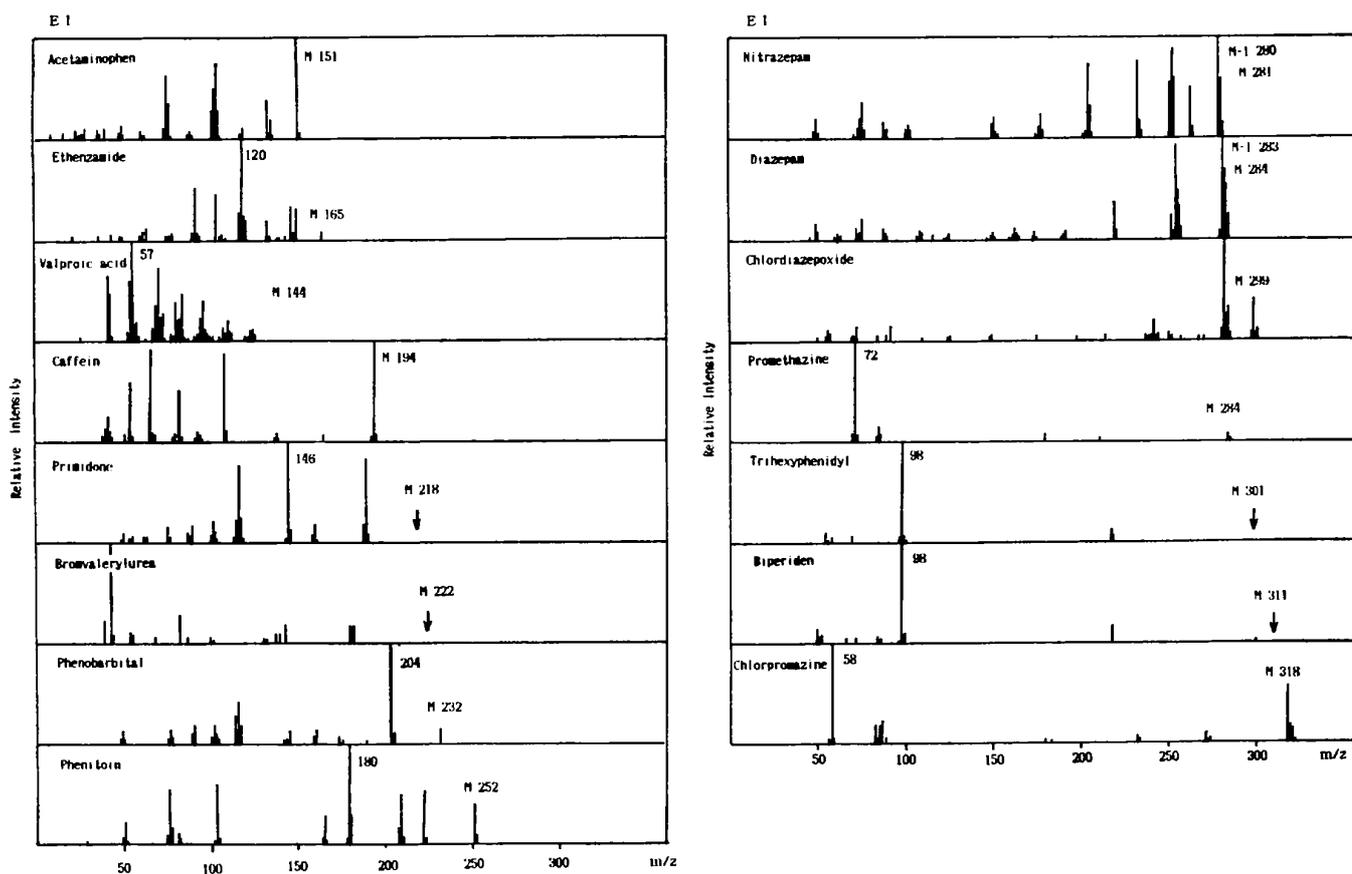


Fig. 2 Electron impact ionization mass spectra of standard samples

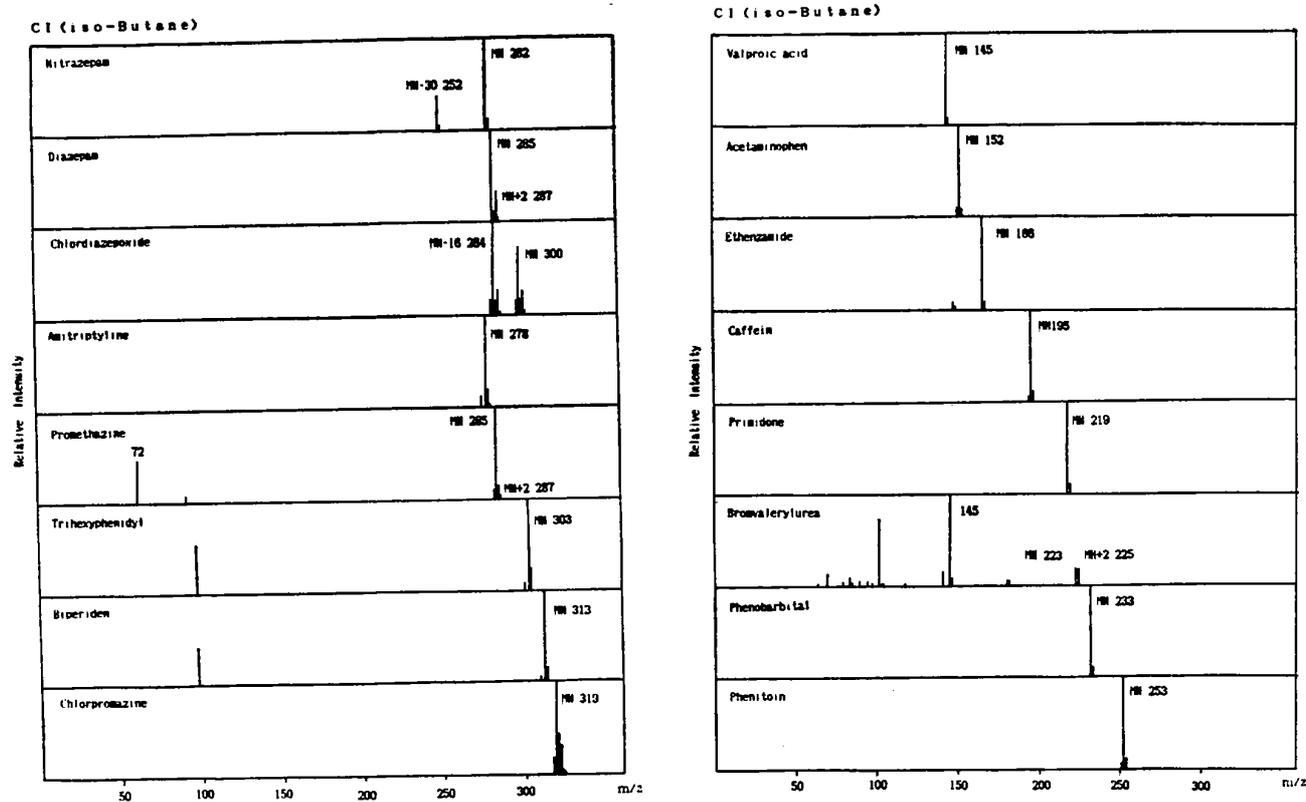


Fig. 3 Isobutane chemical ionization mass spectra of standard samples

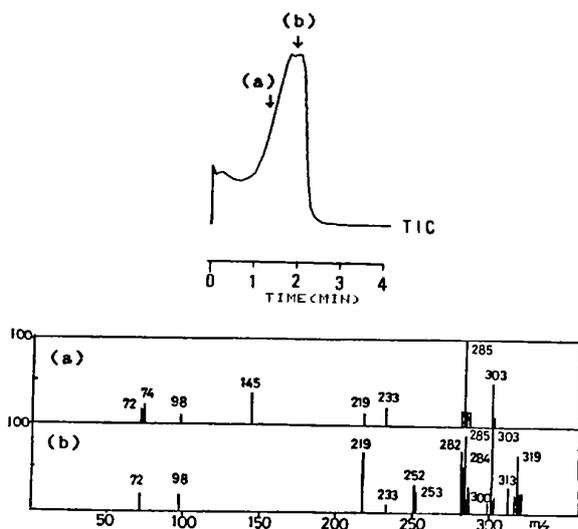


Fig. 4 Total ion chromatogram (TIC) of standard drug mixture and mass spectra of position (a) and (b) on the TIC

GC/MS では何らかの誘導体にしなければならない薬物でも前処理が不要な点である。

3.2 薬物の DI-CIMC

MC は TIC 上の目的ピークのみ絞ってマススペクトルを採集するのと異なり、質量走査を一定時間、一定間隔で繰り返して行い、得られた多数のスペクトルを磁気ディスクに収納、測定後に目的マススペクトルやマスクロマトグラムを書き出すことができる。この手法を行えば、マススペクトル上に出現したイオンがマスクロマトグラムを形作れば成分と判断できるし、フラグメントイオンであれば、その MH^+ イオンと頂点が同期するはずであるから、同定に大きな手掛かりを与えてくれる。Fig. 5 (a) に混合薬物のマスクロマトグラムを示すが、薬物によって溶出状態の違いが分かる。なお、マスクロマトグラム中の数字は指定したイオン、括弧内はイオン強度の倍率を示す。Fig. 4 の (a) は TIC の前、(b) は後でマススペクトルを取ったために異なったデータで、マスクロマトグラムではすべての成分が検出されている。複数の薬物が同じ分子量を持つ場合、塩素、臭素、硫黄などの特徴的な同位体の存在する元素を手掛かりにしたり、開裂パターンの違いや MH^+ イオンの出現しや

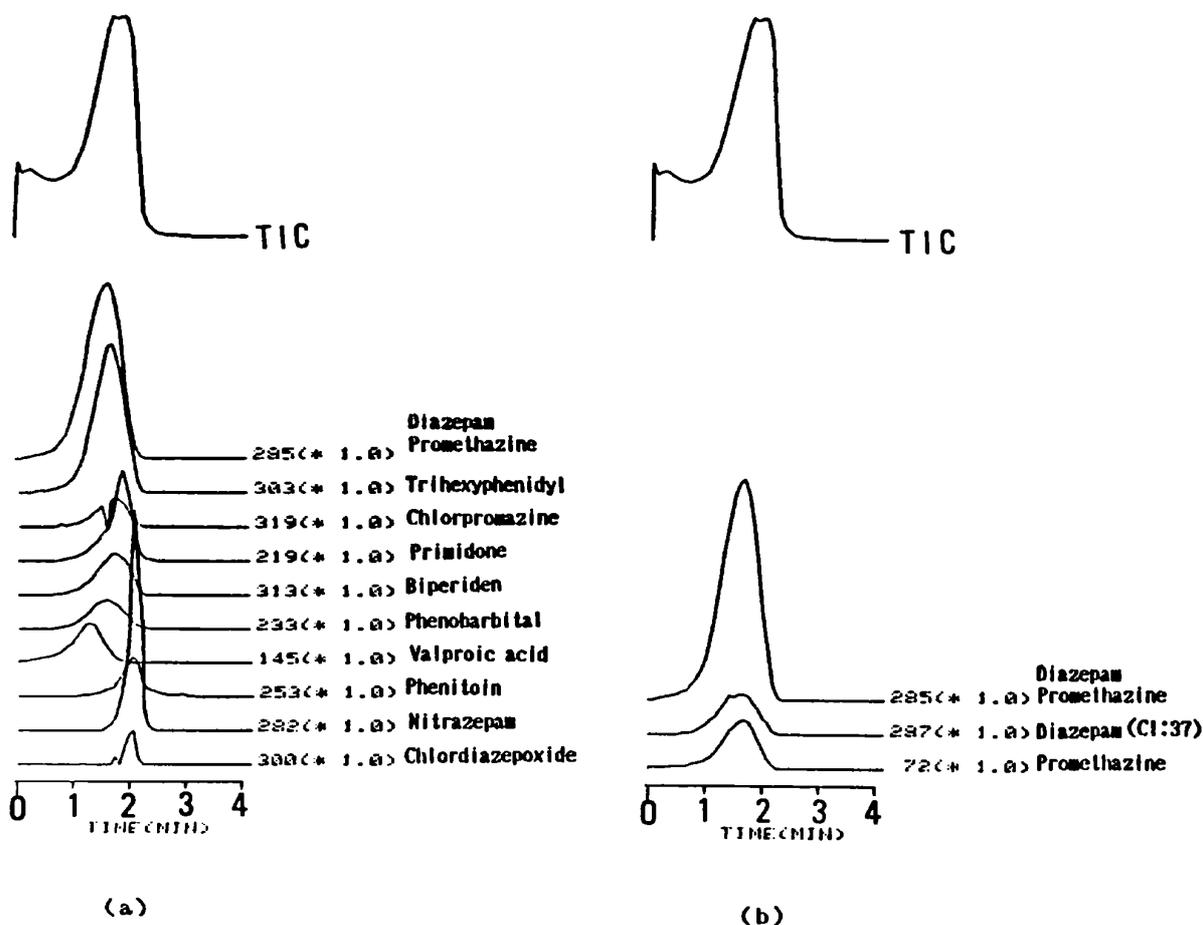


Fig. 5 CI mass chromatograms of standard mixture

(a) Eleven drugs were identified by the respective MH^+ ion. (b) Diazepam and promethazine which gave an MH^+ ion of the same mass number were separated using the $MH^+ + 2$ ion (m/z 287) and fragment ion (m/z 72).

すさなどを考慮することで同定できる. 同じ MH^+ 285 を示すジアゼパムとプロメタジンのマスクロマトグラムを Fig. 5 (b) に示す. この両者は MH^+ 285 では一つのピークとして出現しているが, ジアゼパムは1個の塩素原子を含んでいるため MH^+ 285 と MH^{++2} 287 イオンとの組み合わせ, プロメタジンは MH^+ 285 と m/z 72 イオンとの組み合わせにより両者の存在比が計算できる. この場合, MH^+ 285 と同時に出現する MH^{++2} イオンが, プロメタジンに含まれている硫黄の同位体 ^{34}S 由来の強度であればプロメタジンのみが存在するのであるが, はるかに強い強度を示せば塩素を含むジアゼパムが存在することになる.

3.3 胃洗浄液抽出物及び血清抽出物の DI-CIMC

Fig. 6 は胃洗浄液試料の TIC ピークトップでのマススペクトルと MH^+ イオンでのマスクロマトグラムを示す. スペクトルでは含有薬物7種のうち多量に含まれているクロプロマジン, プロメタジン, フェノバルビタール, アミトリプチリンの4種類しか検出されていない. m/z 72, 86 はプロメタジンのフラグメントイオンである. 倍率を上げれば微量成分も出現してくる場合もあるが, 目的の薬物かどうかの判定は難しい. 一方マスクロマトグラムではすべての成分が検出されている. 微量成分は感度を上げてやれば出現している. GC/MS によるマスフラグメントグラフィーで検出されなかったスルピリド, ニトラゼパムが DI-CIMC で出現したのは, DI 法によるガス化すなわちイオン化が容易なことと EI 法の代わりに CI 法を用いて S/N を高くしたためである. overdose による急性中毒者の胃洗浄液は, 多くの場合多量の薬物が存在しているのであるが, この例のように約 400 倍の濃度差があっても, すべての薬物が同時に同定できた.

血清抽出物である検体 II (プロムワレリル尿素服用患者), 検体 III (ニトラゼパム服用患者), 検体 IV, V (セデス服用患者) の各々を DI-CIMC で測定した. この4検体に含有している薬物の中でプロムワレリル尿素とニトラゼパムは GC/MS で測定が困難なためすべての薬物が一度に測定できる高速液体クロマトグラフィーを使用しての検出及び定量が行われたものである.

3.4 薬物の DI-CIMF

DI-CIMC では数十 ng オーダーが測定限界であったが, より微量成分の検出と定量性について, MF で検討を行った. 検体 V を用いて, マスクロマトグラムとマスフラグメントグラムを比較すると, 両手法とも全成分

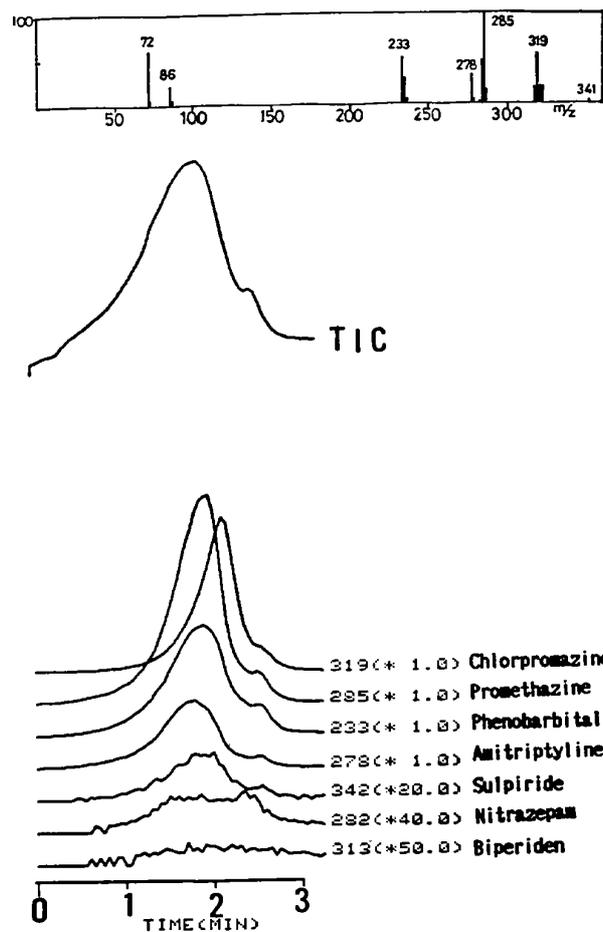


Fig. 6 CI mass chromatogram and mass spectrum of the apex of total ion intensity (TIC).

Chlorpromazine, promethazine, phenobarbital, amitriptyline, sulpiride, nitrazepam, and biperiden were identified by MH^+ ion in the stomach juice. Sulpiride and nitrazepam could not be determined by GC/MS after any derivatization.

の検出はできたが, MF のほうが数十倍の感度が得られるので高い感度が要求される場合はマスフラグメントグラフィーが適している. しかし一度に測定できる質量数 (m/z) がマスクロマトグラフィーの場合は制限がないことから, 極端な低濃度でないかぎり MC で十分である.

定量性の検討を絶対検量線法と内部標準法で行ったが, 絶対検量線法はばらつきが大きく定量は不可能であった. 内部標準法ではフェノバルビタールを内部標準物質としてエテンザミド, アセトアミノフェン, カフェインの 5, 10, 25, 50, 100 ng の各々で検量線を作成して再現性を検討した結果, 濃度が高くなるほど相対標準偏差は良くなる傾向となるが, 各々の濃度を 10 ng としたときアセトアミノフェンで 5.1, エテンザミドで 9.0, カフェインで 6.2 であった.

Table 1 Result by DI-CIMC method

No.	Sample	Drug	Result by DI-CIMS method (characteristic m/z)	Remarks	
				Concentration/($\mu\text{g/ml}$)	Method
I	Gastric irrigation solution	Amitriptyline	278(MH)	101.9	GC/MS/MF
		Biperiden	313(MH)	0.7	"
		Promethazine	285(MH), 72	273.4	"
		Chlorpromazine	319(MH)	228.2	"
		Phenobarbital	233(MH)	85.6	"
		Sulpiride	342(MH)	—	HPLC
		Nitrazepam	282(MH), 252(MH-30)	—	"
II	Serum	Bromvaleryl urea	145(MH-78)	33.0	HPLC
			223(MH), 225(MH+2)		
III	Serum	Nitrazepam	282(MH), 252(MH-30)	3.1	HPLC
IV	Serum	Acetaminophen	166(MH)	84.6	HPLC
		Ethenzamide	152(MH)	59.2	"
		Bromvaleryl urea	145(MH-78)	18.3	"
		Caffein	195(MH)	—	
V	Serum	Acetaminophen	166(MH)	34.2	HPLC
		Ethenzamide	152(MH)	15.3	"
		Bromvaleryl urea	145(MH-78)	10.6	"
		Caffein	195(MH)	—	

3.4 まとめ

Table 1 に試料 (I)~(V) の DI-CIMC による測定結果を示す。すべての試料について存在する薬物は MH^+ イオンと特徴あるフラグメントイオンで同定できた。これらの薬品の濃度は GC/MS と高速液体クロマトグラフィーで定量した値で示してあるように、最高と最低値では約 400 倍もの違いがあったが、両者を同定するに当たっての問題点は何もなかった。

(1984 年 10 月, 第 9 回医用
マス研究会において一部発表)

文 献

- 1) J. R. Althaus, K. Biemann, J. Biller, P. F. Donaghue, D. A. Evans, H. J. Förster, H. S. Hertz, C. E. Hignite, R. C. Murphy, G. Preti, V. Reinhold: *Experientia*, **26**, 714 (1970).
- 2) A. Tatematsu, H. Yoshizumi, T. Nadai, T. Kubodera, S. Asai: *Biomed. Mass Spectrom.*, **5**, 3 (1978).
- 3) G. W. A. Milne, H. M. False, T. Axerirod: *Anal. Chem.*, **43**, 1815 (1971).

☆

Rapid identification method of drugs causing acute toxicosis by direct inlet chemical ionization mass chromatography. Takeshi MURATA, Junko NAKAMURA*, Tsutomu SHIMODA, and Yoshiyuki SAWABE** (*Analytical Applications Laboratory, Shimadzu Corp., 1, Nishinokyo-Kuwabaracho Nakagyo-ku, Kyoto-shi, Kyoto 604, **Osaka Prefectural Institute of Public Health, 1-2-3, Nakamichi, Higashinari-ku, Osaka-shi, Osaka 537)

Direct inlet-chemical ionization mass chromatography (DI-CIMC) and mass fragmentography (DI-CIMF) using isobutane as the reagent gas were investigated as a rapid and reliable method of identification for the diagnosis of acute toxicosis caused by accidental or deliberate overdose of sleeping drugs, analgesics, tranquilizers, antiparkinsonism drugs, etc. Ordinary GC/MS method, which is characterized by its high resolution, high qualitative and quantitative reliability, and high sensitivity to permit trace analysis, has the drawbacks that a run takes 20~40 min because the GC is the rate determining step, and that many components must be derivatized into volatile components. In the DI-CIMC and DI-CIMF, the MH^+ ions of the CI mass spectra of seventeen kinds of drugs were mostly recorded as the base peaks, and hence they could be easily determined from their mass numbers. DI-CIMC gave even more reliable results in analyses of gastric juice and serum extract samples, which include components that are greatly different in their boiling points and/or concentrations, or that are equal in mass numbers. DI-CIMC and DI-CIMF have the feature that they permit reliable qualitative analysis of drug samples within a few minutes, whether the components are volatile or nonvolatile. It was also found that reliable quantitative determination could be accomplished through the use of a suitable internal standard. The detection limit was a few tens of nanogram level in DI-CIMC and a few nanogram level in DI-CIMF.

(Received November 5, 1984)

Keyword phrases

direct inlet-chemical ionization-mass chromatography; drugs; acute toxicosis.