

学位論文(博士)

法薬毒物学鑑定としての

パラコートおよびジクワットの分析法の確立

2019年3月

薬学専攻

鈴木 雄亮

目次

論文リスト	1
略号リスト	2
緒論	3
第 I 章 微量試料からのパラコートおよびジクワットの迅速スクリーニング法の構築	7
第 1 節 序論	7
第 2 節 マイクロ固相抽出-呈色試験による清涼飲料水中パラコートおよびジクワットのスクリーニング	9
第 3 節 固相分散抽出-マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析による生体試料中パラコートおよびジクワットのスクリーニング	13
第 4 節 小括	20
第 II 章 酸化法-液体クロマトグラフィー質量分析による生体試料中パラコートおよびジクワットの定性分析法の構築	22
第 1 節 序論	22
第 2 節 液体クロマトグラフィー質量分析	24
第 3 節 固相分散抽出とその効果の検討	26
第 4 節 酸化反応条件の最適化	27
第 5 節 酸化反応後の固相抽出の検討	30
第 6 節 血液試料, 尿試料への適用と検出限界	31
第 7 節 小括	33
第 III 章 同位体希釈質量分析による生体試料中パラコートおよびジクワットの定量分析法の構築	34

第 1 節 序論	34
第 2 節 ジクワット- d_4 からのジクワットの生成	35
第 3 節 液体クロマトグラフィーイオントラップ型質量分析	37
第 4 節 固相抽出によるパラコートおよびジクワットの抽出	41
第 5 節 定量分析	42
第 6 節 小括	44
総括および結論	46
謝辞	49
実験の部	50
引用文献	62

論文リスト

本学位論文は、下記の発表論文を総括したものである。

- 1) 固相抽出ピペットチップによる尿中乱用薬物のマイクロ抽出法の検討 : 鈴木雄亮, 佐藤雅子, 金子毅, 日本法科学技術学会誌, **13**, 45-50, 2008. (第 I 章)
- 2) ピペットチップ型固相抽出を用いる清涼飲料水等に混入されたパラコート及びジクワットの簡易定性試験法 : 鈴木雄亮, 金子毅, 分析化学, **58**, 1029-1034, 2009. (第 I 章)
- 3) 固相分散抽出ーマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析法による生体試料中パラコートおよびジクワットのスクリーニング : 鈴木雄亮, 金子毅, 齊藤貢一, 日本法科学技術学会誌, **24**, 49-61, 2019. (第 I 章)
- 4) 酸化法ー液体クロマトグラフィー質量分析による生体試料中のパラコートおよびジクワットの分析 : 鈴木雄亮, 金子毅, 日本法科学技術学会誌, **21**, 57-65, 2016. (第 II 章)
- 5) The internal standard diquat- d_4 causes errors in diquat analysis by LC-MS/MS : Yusuke Suzuki, Tsuyoshi Kaneko and Koichi Saito, *Forensic Toxicol.*, **36**, 458-466, 2018. (第 III 章)

略号リスト

PQ : Paraquat (パラコート)

DQ : Diquat (ジクワット)

GC/MS : Gas Chromatography/Mass Spectrometry

(ガスクロマトグラフィー質量分析)

LC/MS : Liquid Chromatography/Mass Spectrometry

(液体クロマトグラフィー質量分析)

ESI : Electro Spray Ionization (エレクトロスプレーイオン化)

EI : Electron Ionization (電子イオン化)

SPE : Solid Phase Extraction (固相抽出)

μ SPE : Micro Solid Phase Extraction (マイクロ固相抽出)

SPDE : Solid Phase Dispersive Extraction (固相分散抽出)

MALDI : Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization

(マトリックス支援レーザー脱離イオン化)

TOF-MS : Time-Of-Flight Mass Spectrometry (飛行時間型質量分析)

CHCA : α -Cyano-4-hydroxycinnamic Acid (α -シアノ-4-ヒドロキシ桂皮酸)

DHB : 2, 5-Dihydroxybenzoic acid (2, 5-ジヒドロキシ安息香酸)

HILIC : Hydrophilic Interaction Chromatography

(親水性相互作用クロマトグラフィー)

SIR : Selected Ion Recording (選択イオンレコーディング)

LC/IT-MS : Liquid Chromatography/Ion Trap Mass Spectrometry

(液体クロマトグラフィー/イオントラップ型質量分析)

SRM : Selected Reaction Monitoring (選択反応モニタリング)

GC : Gas Chromatography (ガスクロマトグラフィー)

LC : Liquid Chromatography (液体クロマトグラフィー)

CE : Capillary Electrophoresis (キャピラリー電気泳動)

MS : Mass Spectrometry (質量分析)

緒論

薬毒物の使用が疑われる傷害，殺人などの犯罪が発生した場合，警察の科学捜査研究所において，薬毒物が混入された飲食物や被害者の生体試料(血液，尿，胃内容物，臓器，毛髪など)といった証拠物件からその成分を特定するための薬毒物鑑定が行われる．このような法科学における薬毒物鑑定（以下，法薬毒物学鑑定）で分析対象となる化学物質は，薬物(覚せい剤，大麻，麻薬，あへん，危険ドラッグ，睡眠薬，抗うつ薬，筋弛緩剤など)，揮発性毒物(シアン化物，アジ化物，一酸化炭素，硫化水素，アルコール，シンナーなど)，重金属類(ヒ素，水銀，タリウムなど)，自然毒(アコニチン，テトロドトキシン，カフェインなど)，化学兵器(サリン，VX，リシンなど)，界面活性剤(陽イオン系，陰イオン系，両性イオン系，非イオン系など)，農薬(有機リン系，カルバメート系，ピレスロイド系，ネオニコチノイド系，含リンアミノ酸系，アルキルジピリジニウム塩系など)と非常に多岐にわたる．パラコート(PQ)およびジクワット(DQ)は，アルキルジピリジニウム塩系の農薬に分類され，日本国内においてその塩(PQ ジクロリド，PQ ジモノメチルサルフェート，DQ ジブロミド)を高濃度(それぞれ 24 %，38 %，30 %，w/w)に含有する除草剤製品が過去に広く流通した．その入手の容易さから，1980 年代にこれらの製品を使用した無差別殺人や自殺といった中毒事案が多発し，1986 年にはその件数は 1213 件に昇り¹⁾，社会問題となった．これを受け，高濃度の各単独製品から PQ ジクロリドと DQ ジブロミドの低濃度混合製品(PQ ジクロリド ; 5 %，DQ ジブロミド ; 7 %，w/w)への切り替えが進み，中毒件数は減少傾向に転じたものの，警察庁科学警察研究所の統計によると，2016 年でも 52 件の中毒死の報告²⁾があり，現在も法薬毒物学鑑定において重要な分析対象であることに変わりはない．Fig. 1 に，PQ・DQ の化学構造式を示す．

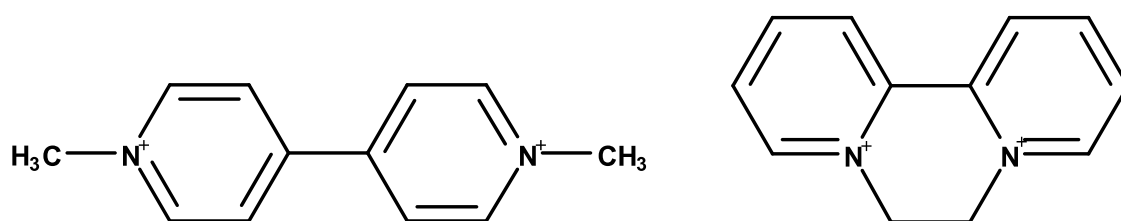


Fig. 1 Chemical structures of PQ (left) and DQ (right).

法薬毒物学鑑定において、中毒原因物質に関する事前情報がない場合には、前記のような数多くの薬毒物を網羅的に分析する必要があり、一つ一つの鑑定に用いることのできる試料量は必然的に少量になってしまう。また、事件の早期解決や被害者に対する適正な治療方針の確立のためには、薬毒物の迅速スクリーニングおよび的確な定性分析が求められる。更に、事案の性質によっては、定量分析が求められ、その結果の信頼性が公判の場で争われる。その際に、他の機関による再鑑定が行われる場合もあるため、これに耐え得る精確性の高い定量分析も欠かすことができない。

現在、法薬毒物学鑑定において、PQ・DQの分析は、呈色試験³⁾による簡易スクリーニングに始まり、キャピラリー電気泳動(CE)⁴⁻⁹⁾、ガスクロマトグラフィー質量分析(GC/MS)¹⁰⁻¹³⁾、液体クロマトグラフィー(LC)¹⁴⁻²¹⁾、液体クロマトグラフィー質量分析(LC/MS)²²⁻³¹⁾などによる定性および定量分析が主流となっているが、これらについて、それぞれ問題点が認められる。

呈色試験によるスクリーニングでは、それに先立ち固相抽出(SPE)カートリッジによりPQ・DQを抽出する必要がある³⁾が、通常30分程度の時間を要し、迅速性にやや欠ける。また、PQ・DQ混合製剤が混入された飲食物であればPQ・DQの各濃度は非常に高く、呈色試験で容易にその含有の有無を判定することができるが、生体試料では、軽症の場合や治療によりその濃度が下がっている場合に、PQ・DQの存在を見落とす可能性が否定できない。これらのことから、PQ・DQの迅速抽出法と、低濃度の試料にも対応可能な呈色試験に代わる高感度検出法が必要となる。更に、法薬毒物学鑑定においては、前記のとおり、多種多様の薬毒物が分析対象となることから、各薬毒物の鑑定に用いる試料量は最小限にとどめるべきであり、また、再鑑定に備えた試料の温存も必要となる。したがって、これらの点も考慮したスクリーニング法の構築が求められる。

法薬毒物学鑑定において薬毒物の同定は、ガスクロマトグラフィー(GC)、液体クロマトグラフィー(LC)といった分離分析法と、物質識別能力が高い質量分析(MS)法を組み合わせたGC/MS、LC/MSにより達成され、公判においても信頼性の高い同定法として評価され得る³²⁻³⁴⁾。これらの分析に先立ち、難揮発性化合物の揮発性化合物への変換、熱安定性の増大、イオン化効率の増大によ

る検出感度の向上などの目的で誘導体化反応が用いられることがある。その反応が分析対象成分に特異的なもので、MS による検出において特徴的なフラグメンテーションが起きる場合には、その分析の特異性が増し、物質同定の一助となる。PQ・DQ を水素化ホウ素ナトリウムや塩化ニッケルを用いた還元反応により非イオン性の還元体とし、GC/MS で検出する方法¹⁰⁻¹³⁾はあるが、尿や血清・血漿を試料としており、法薬毒物学鑑定において試料となり得る全血液については未だ検討されていない。また、誘導体化反応と LC/MS を組み合わせた生体試料中の PQ・DQ の分析法についての報告はこれまでになく、従来は、LC/MS として親水性相互作用クロマトグラフィー(HILIC)か、あるいは逆相系カラム(C18)にイオンペア試薬を添加した移動相を用いるといった特殊な条件により、PQ・DQ を直接検出する方法²²⁻³¹⁾が一般的であった。法薬毒物学鑑定において、多くの薬毒物は C18 カラムとギ酸アンモニウムや酢酸アンモニウムなどの揮発性塩を含む移動相を用いる条件で分析することが多く、HILIC カラムやイオンペア試薬を用いる条件は、他の薬毒物の分析との共用は困難である。特に、イオンペア試薬を用いた場合には、イオンペア試薬がカラムや LC/MS 装置の配管、検出部などに残存するため、分析後のメンテナンスに多大な時間を要する。したがって、これらの問題点を改善した特異性の高い PQ・DQ の定性分析法の確立が望まれている。

薬毒物を用いた犯罪の公判では、被害者の体内から検出された薬毒物の濃度が適用される罪名や量刑などに大きな影響を及ぼすため、定性分析に加えて定量分析も求められることがある。その結果が公判の争点となり、他の機関による再鑑定が行われることもあるため、より信頼性の高い定量分析法が必要となる。血液や尿などの生体試料中の薬毒物の定量においては、試料採取、有機溶剤による除タンパク処理、抽出、誘導体化反応および装置への注入など、各操作の過程で生じうる誤差を補正するため、分析対象物質と類似した化学構造と性質を持つ物質を内部標準物質として試料に添加することが多い。更に、検出方法として MS を選択した場合には、イオン化の際にマトリックス由来の夾雑物の影響により起きるイオンサプレッションまたはイオンエンハンスメントといったマトリックス効果の影響が非常に大きく、適切に補正しないと正確な定量値が得られないという問題がある。しかし、内部標準物質の化学構造と性質

が類似しているだけではマトリックス効果の補正が不十分であるため、分析対象物質の水素(H)または炭素(^{12}C)をそれぞれの安定同位体である重水素(D), 質量数 13 の炭素(^{13}C)で標識した安定同位体標識物質を内部標準物質として用いた同位体希釈質量分析がしばしば用いられる。安定同位体標識物質は、分析対象物質と物理的および化学的性質がほぼ同じであり、各操作の過程で生じる誤差はもとより、MS で検出する際のマトリックス効果の補正効果もあることから、これを用いることでより精確性の高い定量が可能となる。PQ・DQ の分析においても、安定同位体標識 PQ・DQ を内部標準物質として定量を検討した報告^{25,31)}がある。これらの中では安定同位体標識 DQ として DQ- d_4 (Fig. 2)を用いているが、近年、D-H 交換反応により DQ- d_4 から DQ が生成し、その結果、誤検出が起き、正確な定量値が得られないといった危険性が指摘されている³⁵⁾。したがって、このような問題が起きないように DQ- d_4 に代わる新たな安定同位体標識 DQ が必要であり、PQ の分析と合わせた精確性の高い定量法の開発が不可欠である。

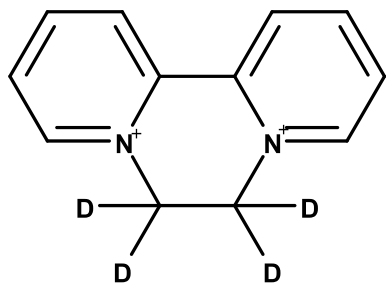


Fig. 2 Chemical structure of DQ- d_4 .

そこで本研究では、法薬毒物学鑑定において重要な分析対象となるアルキルジピリジニウム塩系農薬である PQ・DQ について、微量試料からの迅速スクリーニング法、公判に耐え得る証明力の高い定性分析法、同位体希釈質量分析による高感度かつ精確性の高い定量分析法を合わせた体系的分析法を確立することを目的とした。

第 I 章 微量試料からの PQ および DQ の迅速スクリーニング法の構築

第 1 節 序論

PQ および DQ は、いずれもアルキルジピリジニウム塩系の農薬に分類される非ホルモン型の非選択性茎葉処理除草剤であり、「毒物及び劇物取締法」では、PQ はその塩の種類に関わらず毒物に、DQ はその二臭化物(DQ ジブロミド)が劇物に指定されている。これらを有効成分とする除草剤製品を清涼飲料水などに混入し、喫食させることによる傷害または殺人事件が発生した場合、本事件に関わる証拠物件が鑑定資料として科学捜査研究所に持ち込まれる。PQ または DQ を含有する資料成分に対するスクリーニングは、水酸化ナトリウム(NaOH)水溶液とヒドロサルファイトナトリウム($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$)を添加することによる呈色試験³⁾が一般的である。この呈色試験は、塩基性下、DQ の一部が不可逆的に分解を受けて呈する黄色³⁶⁾、PQ・DQ が還元剤により一電子還元を受けて生成する一価のラジカルカチオンがそれぞれ呈する青色や黄緑色^{37, 38)}により PQ・DQ の含有を簡易的に判定するものである(Fig. I-1)。

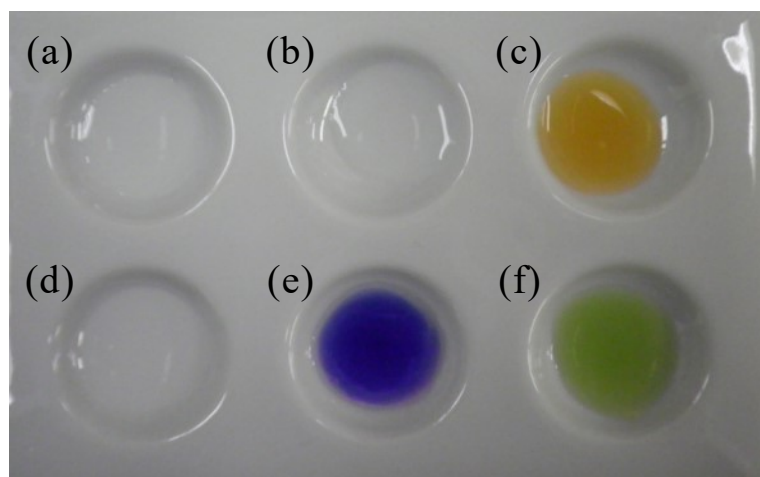


Fig. I-1 Color reactions of PQ and DQ. (a) water (blank) + NaOH, (b) PQ + NaOH, (c) DQ + NaOH, (d) water (blank) + NaOH + $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, (e) PQ + NaOH + $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, (f) DQ + NaOH + $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$.

この呈色試験は、事故防止のために製剤に添加されている催吐剤や青色色素、試料のマトリックス成分が妨害となるため、前処理による夾雑物の除去が必要

となる。これまでに前処理方法として、逆相系の SPE カートリッジを用いた抽出法が報告されている^{39, 40)}が、この方法では1検体あたり30分程度の時間がかかり、迅速な方法であるとは言い難い。また、呈色試験の検出感度については、PQで1 $\mu\text{g/mL}$ 、DQで3 $\mu\text{g/mL}$ ³⁾であることから、清涼飲料水に混入された場合のようにPQ・DQの濃度が高い場合には、PQ・DQ含有の判定が十分に可能であるが、生体試料の場合は、軽症の場合や治療後のものではPQ・DQの濃度が低い場合があり、その含有を見落とす恐れがある。更に、科学捜査研究所における鑑定では、再鑑定に備え、試料の消費は最小限に抑えなければならないことから、これらの点に配慮した迅速スクリーニング法の開発が必要とされる。

PQ・DQが混入された清涼飲料水については、ピペットチップ型 SPE デバイスによるマイクロ固相抽出(μSPE)を抽出方法として選択し、呈色試験により含有の有無を判定する方法を検討した。ピペットチップ型 SPE デバイスは、Fig. I-2 に示すように、ピペットチップ先端に微量の固相を充填したものであり、固相のコンディショニングから保持した目的物質の溶出までの一連の操作をマイクロピペットに装着した状態のままで行うことができる。これを用いることで、少量の試料から簡便かつ迅速に目的物質の抽出を達成することが可能となる。更に、従来の SPE カートリッジによる抽出法と比較して、専用のバキュームマニホールドが不要となり、また、使用する有機溶剤の量が極少量で済み、溶出時の目的成分の希釈も最小限に抑えることができるなどの利点があり、覚せい剤や抗うつ薬といった法薬毒物学鑑定において分析対象となり得る薬物の分析に適用した報告例⁴¹⁻⁴⁹⁾もある。

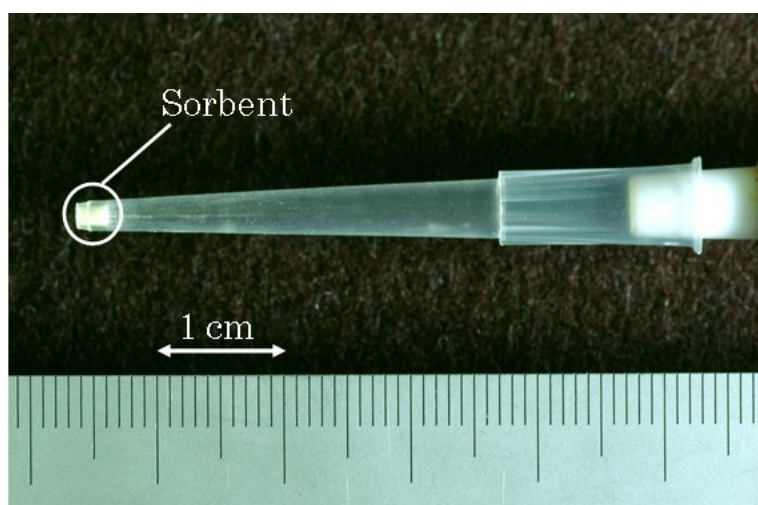


Fig. I-2 Micropipette tip type solid phase extraction (μSPE) device.

生体試料中(血液および尿)の PQ・DQ については、呈色試験に代わる簡便かつ高感度な検出法としてマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析(MALDI-TOF-MS)法を選択した。また、生体試料のうち、血液のような粘性の高い試料では、上記のピペットチップ型 SPE デバイスが詰まってしまい、抽出が困難な場合があることから、このような試料に対応することができる抽出方法として固相分散抽出(SPDE)法を選択し、更に、これを MALDI-TOF-MS へ適用することで、低濃度試料に対応可能な方法を検討した。MALDI-TOF-MS は、GC や LC といった分離分析技術とのオンライン連結は原理的に困難であるものの、薬毒物の含有の有無の判定に資する精密質量情報が取得可能であり、かつ測定にかかる時間はわずか数秒という利点がある。実際、MALDI-TOF-MS を用いたヒト血液、尿および組織中の薬毒物分析について報告例⁵⁰⁻⁵⁸⁾がある。SPDE は、SPE の一種で、液体試料中に固相を分散させる方法であり、ごく短時間のうちに固相と液相間で目的物質の分配が平衡に達するため、SPE カートリッジを用いる場合と比較すると、試料負荷、洗浄および溶出の各過程での流量の調節が不要で抽出に要する時間を短縮することができ、また、溶出液の量は、固相が分散する程度の極少量でよいことから、濃縮にかかる時間も短縮できるという利点があり、生体試料中の睡眠薬や危険ドラッグなどの分析に適用した分析例が報告⁵⁹⁻⁶¹⁾されている。

本研究では、PQ・DQ が清涼飲料水に混入された試料を想定したピペットチップ型 SPE デバイスを用いた μ SPE と呈色試験、並びに生体試料に適用可能な SPDE と MALDI-TOF-MS を併用した方法を、微量試料からの PQ・DQ の迅速スクリーニング法として、法薬毒物学鑑定における有用性を検討した。

第 2 節 μ SPE—呈色試験による清涼飲料水中 PQ および DQ のスクリーニング

第 1 項 ブチルシリカ(C4), オクタデシルシリカ(C18)タイプのピペットチップ型 SPE デバイスによる清涼飲料水試料からの PQ・DQ の抽出

試料の希釈に 0.5 M 炭酸緩衝液(pH 10)を、溶出に 5 mM ギ酸アンモニウム緩衝液(pH 3.5)を用い、目的成分を保持する際の吸引・吐出を 5 回繰り返し、得られた抽出液について呈色試験を行ったところ、C4 を用いた場合は、いずれの

濃度の試料(コーラまたはコーヒー飲料に除草剤製品を体積分率 0.01 %, 0.1 %, 1 %となるように添加したもの)から得られた抽出液において呈色が確認された。他方, C18 を用いた場合には, 添加濃度 1 %および 0.1 % の試料については, 呈色は確認されたが, 添加濃度 0.01 %の試料については, 呈色が認められなかった。これは, C18 を用いた場合の回収率が C4 を用いた場合のそれと比較して低く, 呈色試験の検出限界を下回ったためと考えられた。PQ・DQ の濃度が各 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように標準水溶液を添加したコーラおよびコーヒー飲料を用い, LCにより回収率を求めたところ, C4を用いた場合でいずれも約 30 %, C18 を用いた場合は 20~25 %と, C4 を用いた場合よりも低かった。

試料の希釈に 0.1 M または 1 M 炭酸緩衝液(いずれも pH 10)を用い, 初期条件(0.5 M 炭酸緩衝液(pH 10))で抽出した際の回収率を基準として比較したところ, 0.1M 炭酸緩衝液を用いた場合が最も回収率が高く, PQ については約 1.2 倍, DQ については約 1.4 倍であった。しかし, 1 M 炭酸緩衝液を用いた場合は回収率が低下し, PQ については基準の約 7 割, DQ については約 6 割にとどまった。これらのことから, 塩基性下(pH 10)において, PQ・DQ は塩濃度(イオン強度)が低い方が固相に保持されやすくなることが示唆された。ジカチオンである PQ・DQ は, 固相の基材であるシリカゲル表面のシラノール基とのイオン交換相互作用により保持されているため, ナトリウムイオン濃度が低いほど, PQ・DQ との競合が起きにくく, 結果として, 回収率が高くなったものと考えられた。

次に, 溶出液として用いる 5 mM ギ酸アンモニウム緩衝液の pH を 3.0, 2.5, 2.0 とし, 初期条件(pH 3.5)での回収率を基準として比較したところ, pH 2.5 および pH 2.0 とした場合が最も回収率が高かったため, pH は 2.5 以下とすればよいものと考えられた。

続いて, 成分を保持する際の吸引・吐出の回数を 10 回, 20 回および 30 回とし, 初期条件(5 回)での回収率を基準として比較したところ, 20 回および 30 回の場合に回収率が最も高く, PQ については約 1.4 倍, DQ については約 1.2 倍であった。しかし, 抽出時間の短縮を考慮すると, 回収率は若干低下する(PQ; 約 1.2 倍, DQ; 約 1.1 倍)ものの, 10 回が適当であると考えられた。

上記の結果を総合し, 改良した抽出方法を Fig. I-3 に示す。この方法を用い

て、PQ・DQの回収率を求めたところ、改良前は20～30%前後であった回収率が、50～60%程度に改善された(Table I-1)。また、抽出にかかる時間は試料1検体当たり3分程度であり、従来のSPEカートリッジを用いた方法と比較すると、10分の1程度に短縮された。

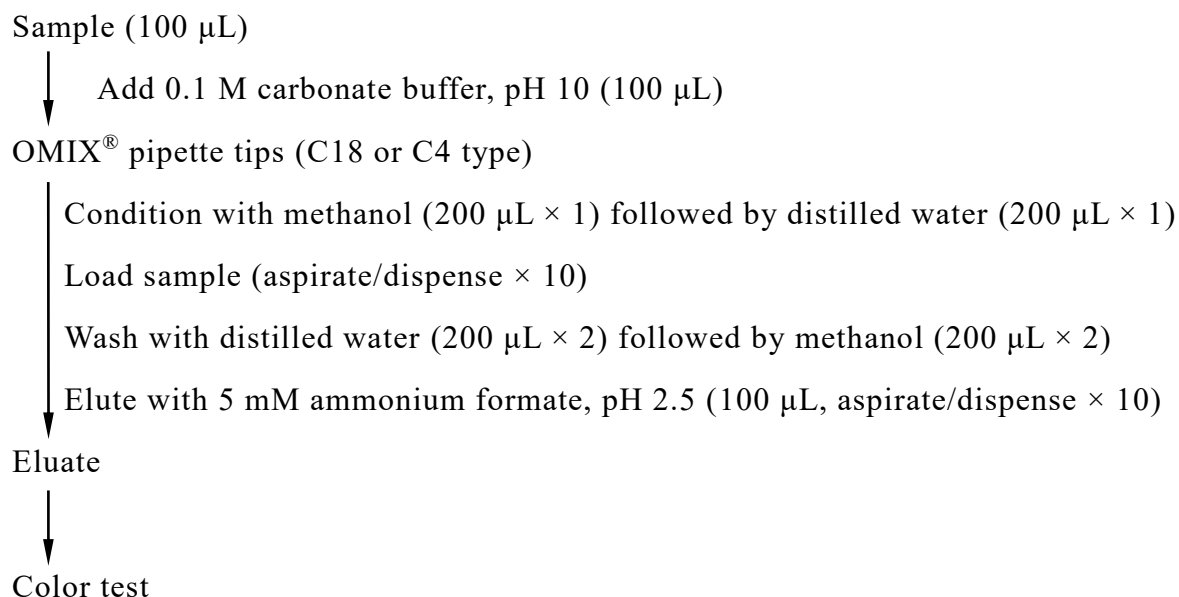


Fig. I-3 Optimized extraction procedure with OMIX[®] pipette tips (C18 or C4 type).

Table I-1 Intraday recoveries ($n = 5$ each) of PQ and DQ from coke and coffee using the present procedure

Analyte	Sample	Amount added (μ g/mL)	Sorbent type	Recovery (%)	RSD (%)
PQ	Coke	2	C4	48.7	2.2
			C18	50.1	2.3
	Coffee	2	C4	55.1	3.0
			C18	55.9	2.8
DQ	Coke	2	C4	57.2	2.7
			C18	53.0	2.8
	Coffee	2	C4	60.8	2.9
			C18	57.5	1.9

第2項 強酸性カチオン交換(SCX)タイプのピペットチップ型 SPE デバイスによる清涼飲料水試料からの PQ・DQ の抽出

PQ・DQ はいずれも強カチオン性化合物(4級アンモニウム)であり、pH 調整をしなくても、SCX 固相のスルホン酸基($-\text{SO}_3^-$)とのイオン交換相互作用により強固に保持される。強酸性カチオン交換作用で保持された塩基性化合物を溶出するためには、アンモニア水などの高 pH の溶液を通じて保持された化合物を非解離状態とするか、または対象物質よりも強いカウンターイオンを含んだ溶液、あるいは塩濃度の高い溶液を通じて競合させる必要がある。しかし、PQ・DQ はいずれも塩基性下では不安定で分解するため、高塩濃度の溶液で溶出する方法を採用し、調製が容易な飽和食塩水を用いることとした。

SCX タイプを用いて、除草剤製品添加試料から Fig. I-4 に示す方法により得られた抽出液について、呈色試験を行ったところ、いずれの試料(添加濃度 0.01 %、0.1 %、1 %)でも呈色が確認された。本法は、試料の pH 調整が不要であり、必要な試薬類としては、蒸留水、メタノールおよび飽和食塩水だけでよく、C4 および C18 タイプのものを用いた場合と比較するとより簡便であることから、呈色試験のための迅速な前処理法として優れているものと考えられた。なお、本法で処理した場合、溶出液が多量の塩化ナトリウムを含有するため LC での分析が困難であり、回収率を算出することはできなかった。しかし、添加濃度 0.01 %の試料でも呈色は確認されたことから、C18 および C4 タイプを用いた場合に近い回収率は得られているものと推察された。

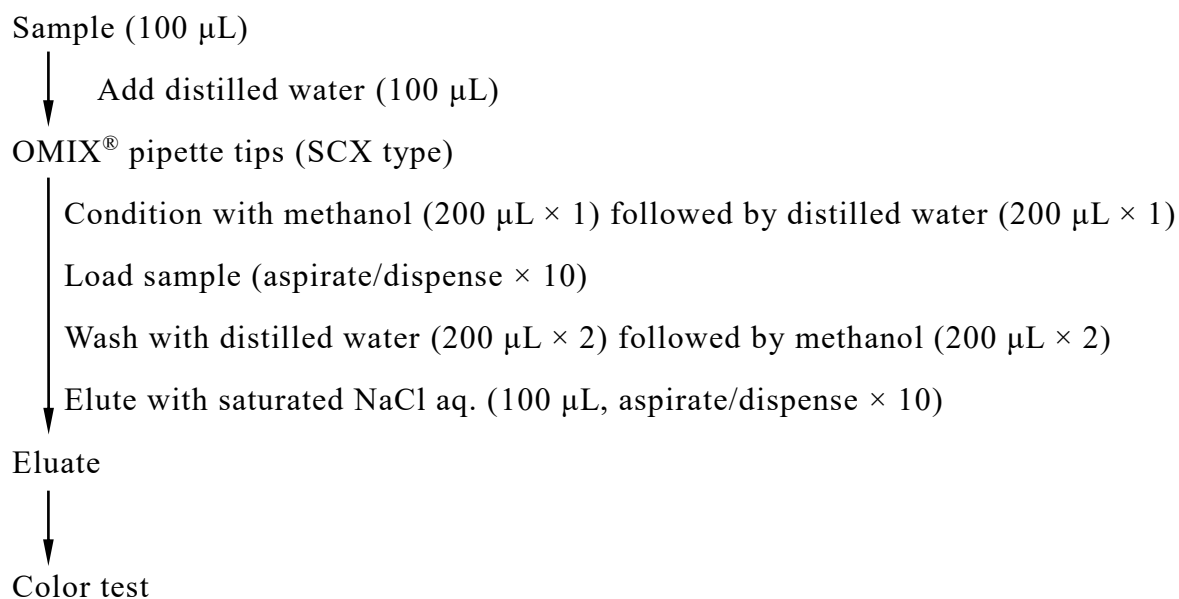


Fig. I-4 Extraction procedure with OMIX[®] pipette tips (SCX type).

第 3 節 SPDE-MALDI-TOF-MS による生体試料中 PQ および DQ のスクリーニング

第 1 項 マトリックスの種類および濃度の検討

MALDI-TOF-MS においては、対象化合物によって最適なマトリックスとその濃度が異なるため、初めにこれらについて検討した。マトリックスの種類としては、MALDI-TOF-MS で低分子化合物の測定に汎用される α -シアノ-4-ヒドロキシ桂皮酸(CHCA)と 2,5-ジヒドロキシ安息香酸(DHB)を選択し、これらを各 10 mg 秤りとり、0.2 %トリフルオロ酢酸水溶液/アセトニトリル混液(1:1, v/v) 1 mL を加えたものをマトリックス溶液とした。これに PQ・DQ 標準溶液を添加(PQ・DQ の終濃度各 0.2 μ g/mL)したものをターゲットプレート上に塗布して測定した。その結果、いずれのマトリックス溶液でも PQ・DQ は検出されたが、DHB の場合はターゲットプレート上で不均一な針状結晶が形成され、レーザー照射箇所により PQ・DQ の検出強度に大きなばらつきが認められ、検出されない箇所もあった。このため、含有の有無の判定に時間がかかり、見落としのリスクも否定できないことから、スクリーニングを目的とした分析において、DHB の使用は適切ではないと考えられた。他方、CHCA では比較的均一な薄膜

が形成され、レーザー照射箇所による PQ・DQ の検出強度のばらつきは少なかったため、マトリックスには CHCA を用いることとした。Fig. I-5 に、マトリックス溶液をターゲットプレート上に塗布した状態を示す。

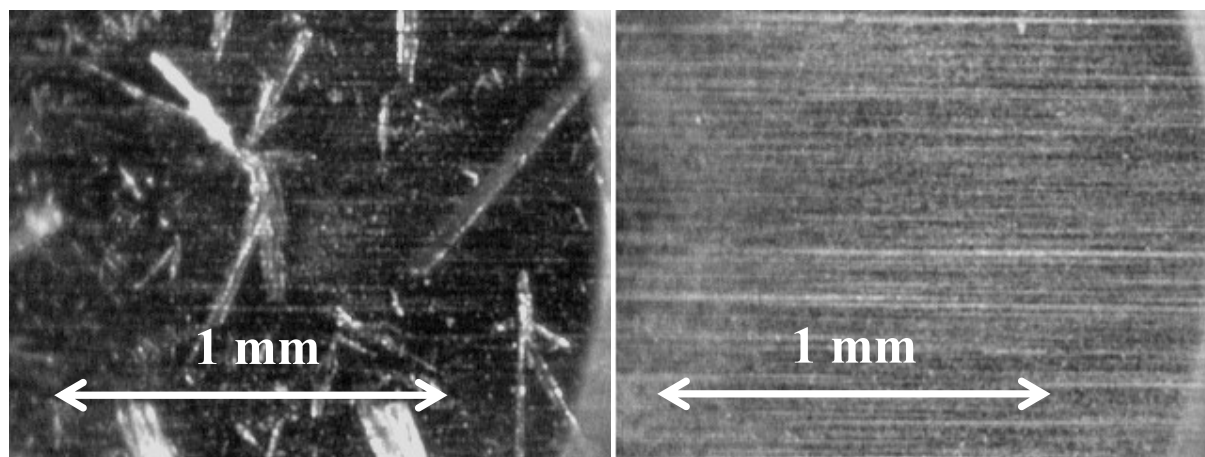


Fig. I-5 Optical images of MALDI target plate where the matrix solutions were applied on the well (left: DHB, right: CHCA) taken by using a mounted CCD digital camera.

また、CHCA の濃度について、1, 2, 5, 10 mg/mL および飽和濃度の 5 種類を検討したところ、濃度が高いほど PQ・DQ がよく検出される傾向が認められたことから、用いるマトリックス溶液の CHCA 濃度は飽和濃度とすることとした。

第 2 項 マススペクトル

マトリックス溶液に PQ・DQ 標準溶液を添加(PQ・DQ の終濃度各 0.2 $\mu\text{g/mL}$) したのについて測定したところ、PQ (M^{2+} の計算精密質量 186.1157) ではラジカルカチオン M^+ (m/z 186.11) が顕著に検出され、DQ (M^{2+} の計算精密質量 184.1000) ではラジカルカチオン M^+ (m/z 184.10) と脱プロトン化イオン $[\text{M}-\text{H}]^+$ (m/z 183.10) が検出された(Fig. I-6)。したがって、PQ については M^+ 、DQ については M^+ および $[\text{M}-\text{H}]^+$ の検出をもってその含有の有無を判定することとした。

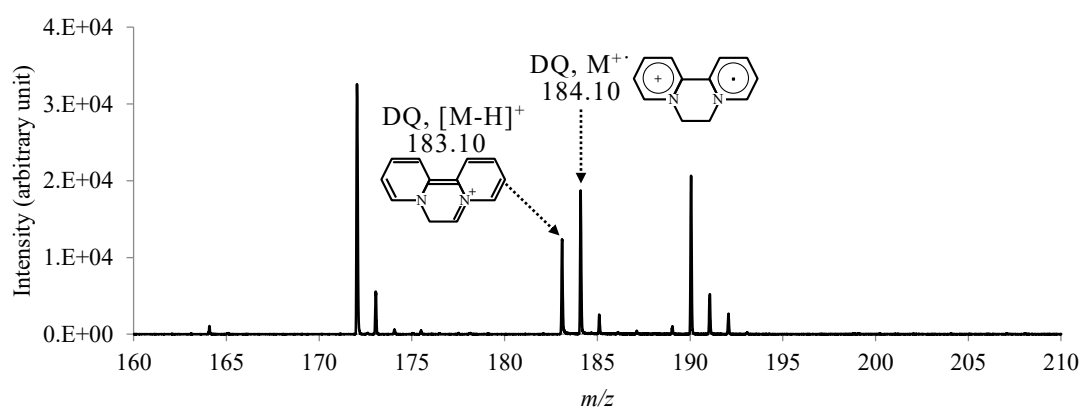
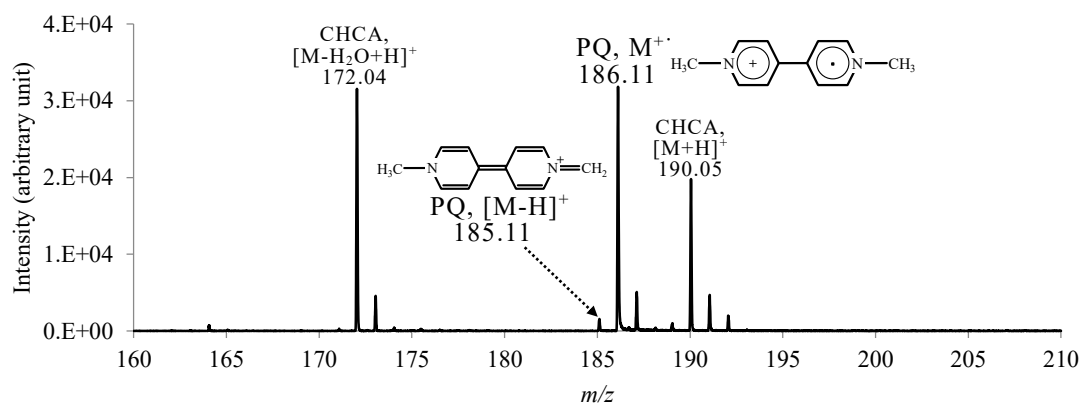


Fig. I-6 MALDI-TOF mass spectra obtained from the matrix solutions containing PQ or DQ at concentration of 0.2 $\mu\text{g/mL}$ (upper: PQ, lower: DQ).

第3項 前処理の検討

1) 血液試料の除タンパク処理

血液試料については、溶血により遊離したヘムタンパク質や腐敗により変性して析出したタンパク質など、遠心分離では除去しきれない成分があるため、SPDEの前に除タンパク処理が必要であると考えられた。除タンパク法としては、簡便な有機溶媒を添加する方法を選択し、メタノール、エタノールおよびアセトニトリルを用いて検討した。血液試料 0.1 mL を超純水 0.1 mL で希釈し、これにメタノール、エタノールまたはアセトニトリル 0.4 mL をそれぞれ加え、高速振盪機で攪拌(1 min)し、遠心分離(10000 rpm, 1 min)後、得られた上清 0.5 mL に対し SPDE により PQ・DQ を抽出した。エタノールを用いた場合、除タンパク液に超純水を加えた時点で濁りが生じ、これが固相と共に沈殿して

しまったため、エタノールの使用は不相当と判断した。メタノールではヘムタンパク質が完全には除去しきれず、除タンパク後の上清が淡赤色を呈した。この抽出液を SPDE でクリーンアップし、MALDI-TOF-MS で測定したところ、アセトニトリルと比較して PQ・DQ の検出強度が低いという結果となった。これは、残存したヘムタンパク質が PQ・DQ の抽出を妨害したか、またはマトリックス効果として PQ・DQ のイオン化を抑制したためと考えられた。アセトニトリルでは、上記のような濁りの生成や除タンパク液の着色はなく、PQ・DQ は良好に検出されたため、除タンパク処理はアセトニトリルを用いて行うこととした。

2) SPDE

PQ・DQ はいずれも強カチオン性化合物であるため、市販されているカチオン交換能を有する固相抽出剤のうち、強カチオン性化合物用の Oasis[®] WCX を用いた迅速な前処理法を検討した。各試料中の PQ・DQ の濃度は、0.05 µg/mL とし、溶出に用いるマトリックス溶液の量については、濃縮の過程を省略するため最小限の量(8 µL)とした。

使用する Oasis[®] WCX の量を 0.5, 1, 2 mg で検討したところ、PQ・DQ の検出強度は、0.5 mg < 1 mg ≒ 2 mg であったが、固相の量が 2 mg の場合は 1 mg の場合と比較して固相量が多い分、溶出した際の上清(液層)の割合が少なく採取が困難であったため、固相の量は 1 mg とした。

また、使用する固相の量を 1 mg とし、Oasis[®] WCX の粒子径 30 µm と 60 µm のものを比較したが、差異は認められなかったため、本研究では粒子径 30 µm のものを用いることとした。

抽出に要する時間は 1 検体あたり 10 分程度と、従来の SPE カートリッジを用いた方法の 3 分の 1 程度の時間で操作が完了し、多検体同時処理も可能であった。また、固相懸濁液は、調製後 180 日のものを用いた場合でも PQ・DQ は良好に検出されたことから、一度調製すれば長期間ににわたり使用可能であった。

SPE カートリッジには通常数十～数百 mg の固相が充填されており、保持された目的物質を溶出するためには数 mL の溶出液が必要で、これを濃縮した後、測定に適した溶液に再溶解する必要がある。また、目的物質を効率よく保持す

るためには通液速度の調整が必要となる。これに対し、SPDE は、使用する固相量を任意に調整することができる、保持や洗浄のステップは攪拌、遠心といった簡便な操作で完了する、固相が分散する程度の極少量の溶出液で溶出が可能で濃縮に要する時間も少なくて済む、といったメリットがある。本研究では使用するマトリックス溶液が酸性であることに着目し、極少量(8 μL)の溶出液を用いることで通常必要とされる濃縮過程を省略することができ、更なる抽出時間の短縮化が達成された。したがって、今回構築した、PQ・DQ をターゲットとした SPDE は、迅速性が求められるスクリーニングのための抽出法として有用であると考えられた。

第 4 項 最適化した条件における各試料の測定と検出限界、他物質との競合

最適化した条件により、血液試料および尿試料(PQ・DQ 添加濃度；0(ブランク), 0.05, 0.5, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)について抽出、測定を行ったところ、ブランクの血液および尿から、PQ・DQ は検出されなかったが、添加試料からはいずれも検出され、特に低濃度(0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$)の試料でも十分な S/N 比で検出された(Fig. I-7)。この濃度は PQ・DQ の中毒事例としては軽症程度に相当することから、本法は現場での実用性が高いことが推察された。なお、本条件下での質量分解能を算出(半値幅法)したところ、PQ および DQ の M^+ で約 2000~4000 であった。検出限界を m/z 186.11(PQ, M^+) および m/z 183.10(DQ, $[M-H]^+$) を基準にして算出($S/N > 3$)したところ、いずれの試料も PQ が 0.002 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、DQ が 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。また、PQ・DQ の検出強度は、おおむね濃度が高いほど大きい傾向が見られたが、濃度に正比例しているわけではなかったため、測定結果から正確な濃度を見積もることは困難であった。

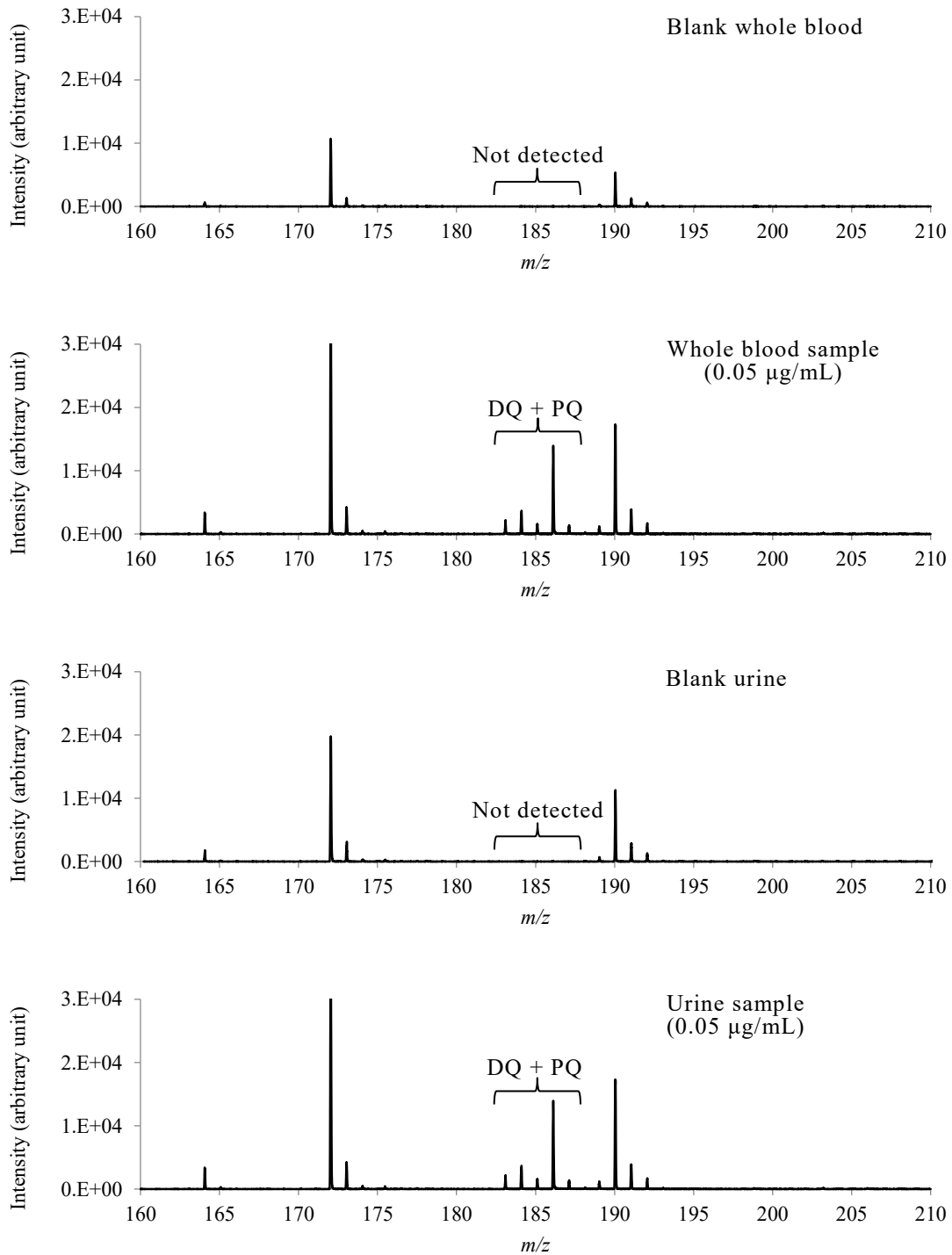


Fig. I-7 MALDI-TOF mass spectra obtained from blank whole blood, urine, and each respective spiked sample containing PQ and DQ at concentration of 0.05 µg/mL.

ブランクの血液および尿について、溶出液としてPQ・DQを含有(各0.2 µg/mL)するマトリックス溶液を使用し、得られた抽出物を測定した。この際、PQ・DQの検出強度と、使用したマトリックス溶液そのものを測定した際の検出強度と

を比較したところ、ほとんど差はなく、生体試料および固相に起因するマトリックス効果はほぼないものと考えられた。

添加回収率については、溶出液が高濃度の CHCA を含有し、LC/MS 装置への導入が困難で算出できなかつたため、CHCA の溶解に用いた 0.2 %トリフルオロ酢酸水溶液/アセトニトリル混液(1:1, v/v)を溶出液として得られた抽出物について LC/MS を行い、マトリックスマッチング法により作成した検量線をもとに、検出された PQ・DQ のピーク面積から回収率を算出した(Table I-2)。その結果、回収率は 30~60 %程度であったが、これは使用する固相の量が少ないことや、除タンパク液中のアセトニトリルが保持を妨害していることなどが要因と考えられた。実際の溶出液は、CHCA を含有するため、CHCA を含有しない場合と比較して溶出挙動が多少異なる可能性があるが、ばらつきはそれほど大きくなかつたことから、一定の再現性は得られるものと考えられた。

Table I-2

Intra-day recoveries ($n = 3$ each) of PQ and DQ from whole blood and urine samples using the present method

Analyte	Sample	Amount added ($\mu\text{g/mL}$)	Recovery (%)	RSD (%)
PQ	Whole blood	5	37.8	2.7
		0.05	43.5	2.2
	Urine	5	51.8	8.0
		0.05	67.9	6.5
DQ	Whole blood	5	38.3	4.7
		0.05	29.8	1.5
	Urine	5	44.3	5.8
		0.05	48.0	4.8

法薬毒物学鑑定において分析対象となり得る薬毒物には、整数質量が PQ あるいは DQ と同じであるため含有の判定を妨害する可能性のあるものが存在する。その一例としてエクゴニン($[\text{M}+\text{H}]^+$ の計算精密質量 186.1124)、クロロエフェドリン、クロロメタンフェタミンおよびクロルフェンテルミン(いずれも $[\text{M}+\text{H}]^+$ の計算精密質量 184.0887)が挙げられるが、本条件下での質量分解能(約

2000~4000)では, PQ(M⁺の計算精密質量 186.1157)および DQ(M⁺の計算精密質量 184.1000)との識別は困難であるものと考えられた. したがって, 本法で PQ・DQ の含有が疑われた試料については, 引き続いて行う LC/MS などを用いた本鑑定により最終的な判定する必要がある.

MALDI-TOF-MS による PQ・DQ の検出には, 装置が必要であるが, ターゲットプレートへのサンプルの塗布や装置への導入は 5 分程度で済むことから, 従来の呈色試験と比較して, 迅速性の面でも劣ることなく, PQ・DQ の含有の有無の判定に資する質量情報が得られ, 更に検出感度についても PQ が 200 倍, DQ が 150 倍高いという点で優れていた.

第4節 小括

法薬毒物学鑑定において重要な分析対象物質である PQ・DQ について, PQ・DQ 混合除草剤製品を混入された食品試料(清涼飲料水)と, PQ・DQ を摂取した者の生体試料を想定した微量試料からの迅速スクリーニング法を構築した.

清涼飲料水に混入された PQ・DQ は, ピペットチップ型 SPE デバイスである OMIX[®] pipette tips を用いた μ SPE により, C4 タイプで 48 %以上, C18 タイプで 50 %以上の回収率が認められ, 試料量 0.1 mL の除草剤製品添加濃度 0.01 % の試料まで呈色試験による確認が可能であった. また, SCX タイプを用いた場合も, 同濃度の試料まで呈色の確認が可能であったが, C4 および C18 タイプを用いた場合と比較して, 試料の pH 調整が不要であり, 操作も簡便で, 更に抽出に要する時間は約 3 分と, 従来の SPE カートリッジを用いた方法の 10 分の 1 程度であった.

生体試料(血液および尿)中の PQ・DQ については, 試料中の PQ・DQ の濃度が低い場合を考慮し, より高感度なスクリーニング法を検討した. 試料量を 0.1 mL とし, SPDE により抽出した後, MALDI-TOF-MS で検出する方法を構築した. 血液試料に対してはアセトニトリルによる除タンパク処理を, 尿については遠心分離をそれぞれ行った後, 弱酸性カチオン交換能をもつ固相(Oasis[®] WCX)を用いた SPDE を行い, 溶出液にマトリックス溶液(CHCA のトリフルオロ酢酸水溶液/アセトニトリル溶液)を用い, その溶出液について直接 MALDI-TOF-MS を行ったところ, 軽症を想定した低濃度(0.05 μ g/mL)の試料においても PQ・DQ は良好に検出さ

れた。SPDEにかかる時間は1検体あたり10分程度と、従来のSPEカートリッジを用いた方法の約3分の1程度である上、多検体同時処理も可能で、かつ、用いる固相の量は微量(1 mg)で済むことから、コストパフォーマンス面でも優位であると考えられた。MALDI-TOF-MSによるPQ・DQの検出は、呈色試験と比較して迅速性の面も遜色は無く、PQ・DQの含有の判定に資する質量情報が取得可能で、更に検出感度の面ではPQで200倍、DQで150倍高いという利点があった。また、1検体あたりの測定所要時間が数秒と短いため、検体数が多い場合には特に有利である。

したがって、 μ SPE-呈色試験、SPDE-MALDI-TOF-MSを用いた本法は、微量試料(0.1 mL)からPQ・DQの含有の有無を迅速に判定できることから、迅速スクリーニング法として、法薬毒物学鑑定上、非常に有用であることが示された。

第 II 章 酸化法-LC/MS による生体試料中 PQ および DQ の定性分析法の構築

第 1 節 序論

法薬毒物学鑑定においては、薬毒物の摂取を証明するために、生体試料からその成分を検出し、同定する必要がある。覚せい剤、大麻、麻薬などの法規制薬物の同定は、薬物分析に関する国際団体である SWGDRUG (Scientific Working Group for the Analysis of Seized Drugs；押収薬物分析のための科学ワーキンググループ)のガイドラインに基づき行われる。ガイドラインの中では、各種分析法を以下の 3 つのカテゴリー(下記)に分類しており、最も識別能力の高いカテゴリー A の分析法から 1 種、この他にカテゴリー A, B, C の中から最低でも 1 種の分析法を組み合わせた方法を用いることを推奨している⁶²⁾。

カテゴリー A；赤外分光法，質量分析法，ラマン分光法，X 線回折法など

カテゴリー B；ガスクロマトグラフィー，液体クロマトグラフィー，薄層クロマトグラフィー，キャピラリー電気泳動法など

カテゴリー C；呈色反応，蛍光分光法，紫外分光法，イムノアッセイなど

自然毒，農薬などの鑑定においても，公判の維持を考慮すると，このガイドラインに基づいて行われることが望ましい。PQ・DQ の分析に関し，第 I 章で述べた生体試料中の MALDI-TOF-MS を用いたスクリーニング法は，分離分析は伴わず，MS を単独で用いたものであり，SWGDRUG のガイドラインを満たしたのではない。ガイドラインでは，保持時間情報(カテゴリー B)と質量情報(カテゴリー A)が同時に得られる GC/MS や LC/MS などの複合分析技術は，1 回の分析で上記の推奨条件を満たすものと位置付けられていることから，スクリーニングにより PQ・DQ の含有が疑われた試料については，これらの分析法を採用することでその含有の証明が可能となる。また，MS で物質を同定する際，分析に先立ち分析対象物質をその誘導体へ変換することがあり，その誘導体化反応が分析対象成分に特異的なもので，特徴的なフラグメンテーションが起きる場合には，その分析の特異性が増し，証明力はより高まる。

生体試料中の PQ・DQ の分析についての報告のうち、GC/MS による方法¹⁰⁻¹³⁾は、GC/MS に先立ち PQ・DQ を還元体へと変換しているが、尿や血清・血漿を試料としており、法薬毒物学鑑定において試料となり得る全血液については検討されていない。また、LC/MS による方法²²⁻³¹⁾は、GC/MS による方法よりも高感度ではあるが、直接 PQ・DQ を分離・検出するもので、誘導体化反応を組み合わせた方法についての報告はない。PQ・DQ はいずれもジカチオンであることから、LC/MS で用いられることの多い一般的な条件(C18 カラムとギ酸アンモニウムなどの揮発性塩を含む移動相の組み合わせ)ではカラムに保持されず、分離分析が困難となるため、HILIC カラムを用いる、移動相にイオンペア試薬を添加するなどの特殊な条件が必要となり、他の薬毒物の分析との分析条件の共有が難しいという問題もある。

これまでに、除草剤製品または生体試料中の PQ・DQ を誘導体化反応(酸化反応)により対応するジピリドン(Fig. II-1, 以下, それぞれ PQ 酸化体および DQ 酸化体とする)に変換し、内径 6.0 mm の C18 カラムとイオンペア試薬を添加した移動相を用いた蛍光検出-液体クロマトグラフィーにより検出する方法^{63,64)}が報告されている。この他にも、農作物中の PQ・DQ を各酸化体とした後、内径 2 mm 程度の C18 カラムとイオンペア試薬を用いない一般的な移動相を用いて各酸化体を分離し質量分析により検出する方法⁶⁵⁾もあり、分子量や構造情報が得られるマススペクトルが取得できるという点で優れているが、生体試料へ適用した報告は見当たらない。したがって、本研究では、生体試料中の PQ・DQ について、酸化反応を利用した特異性の高い、かつ、特殊な LC/MS 条件を必要としない定性分析法の構築を検討した。

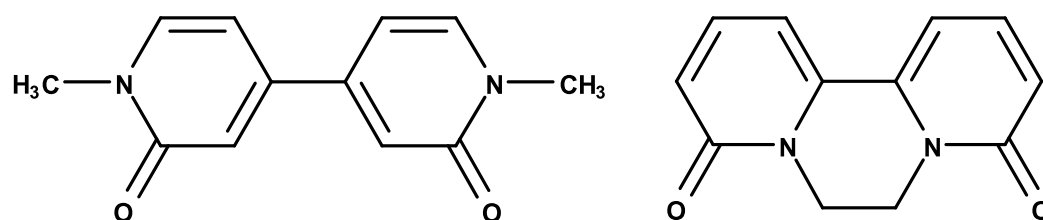


Fig. II-1 Chemical structures of PQ-oxide (left) and DQ-oxide (right).

第 2 節 LC/MS

第 1 項 移動相の検討

移動相に用いる有機溶媒について、水系移動相を 10 mM ギ酸アンモニウム緩衝液(pH 3)とし、有機溶媒にはメタノールまたはアセトニトリルを検討した。その結果、感度の面では両者にほとんど差は認められなかったものの、分離状況としてアセトニトリルでは両ピークが重なったが、メタノールでは PQ 酸化体と DQ 酸化体のピークは良好に分離した。そこで、有機溶媒にはメタノールを採用した。

移動相に用いる揮発性塩の溶液について、10 mM ギ酸アンモニウム緩衝液(pH 3)、10 mM 酢酸アンモニウム緩衝液(pH 5)、10 mM 酢酸アンモニウム水溶液(pH 6.5)を検討したところ、PQ 酸化体と DQ 酸化体の各保持時間は pH によらずほぼ一定(PQ 酸化体 ; 10.4 min, DQ 酸化体 ; 9.0 min)であったが、溶液の pH が低いほどピーク強度が増加する傾向が認められた(Fig. II-2)。

以上のことから、移動相には 10 mM ギ酸アンモニウム緩衝液(pH 3)とメタノールの混合液を用いることとした。

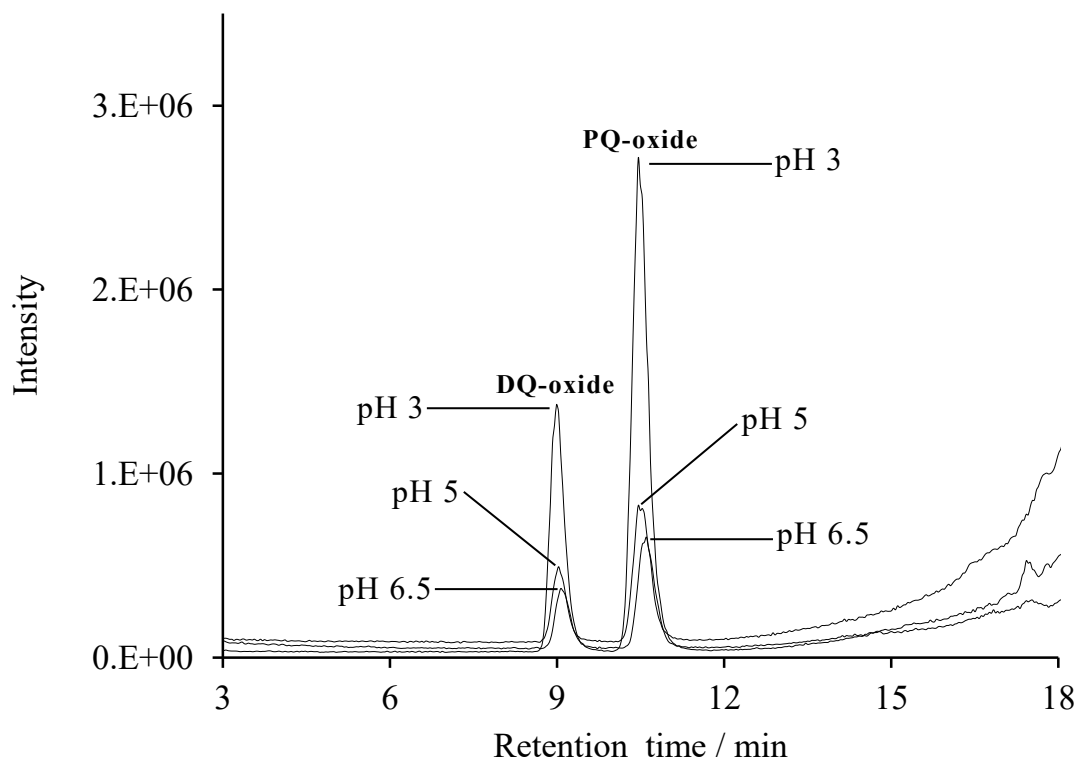


Fig. II-2 Total ion chromatograms by LC/MS with three types of mobile phase at different pH (3, 5 and 6.5) obtained from standard solution of PQ-oxide and DQ-oxide.

第2項 コーン電圧の検討

LC/MS で汎用されるエレクトロスプレーイオン化法(ESI)は、GC/MS で多用される電子イオン化法(EI)と比較して、ソフトなイオン化法であり、ポジティブモードでは主にプロトン付加イオン $[M+H]^+$ が生成する。しかし、ESI でもコーン電圧を調節することでフラグメンテーションを起こすことができ、物質同定に有益なフラグメントイオンが検出される場合がある。そこで PQ・DQ の各酸化体について コーン電圧を 40, 50, 60 V としてマスペクトルを測定したところ、DQ 酸化体は 40 V でプロトン付加イオン $[M+H]^+$ の他にフラグメントイオンが観測され、他方、PQ 酸化体はコーン電圧が 60 V でフラグメントイオンが観測された。そこで、定性確度を高めるため、コーン電圧は、フラグメントイオンが生成する 60 V(PQ 酸化体)および 40 V(DQ 酸化体)とした。各酸化体のマスペクトルを Fig. II-3 に示す。

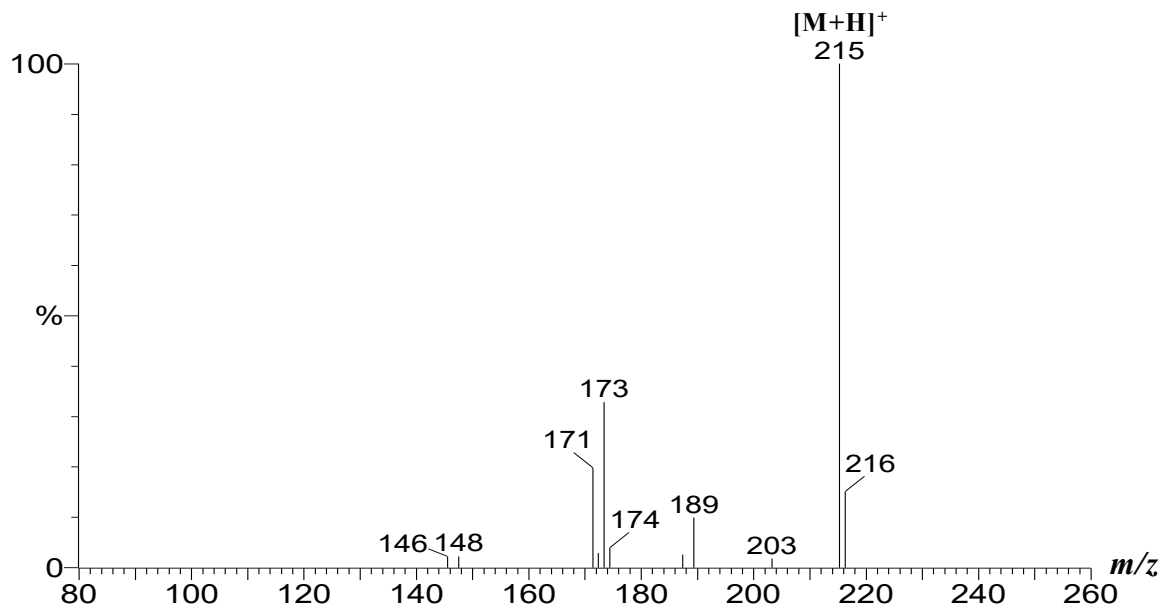
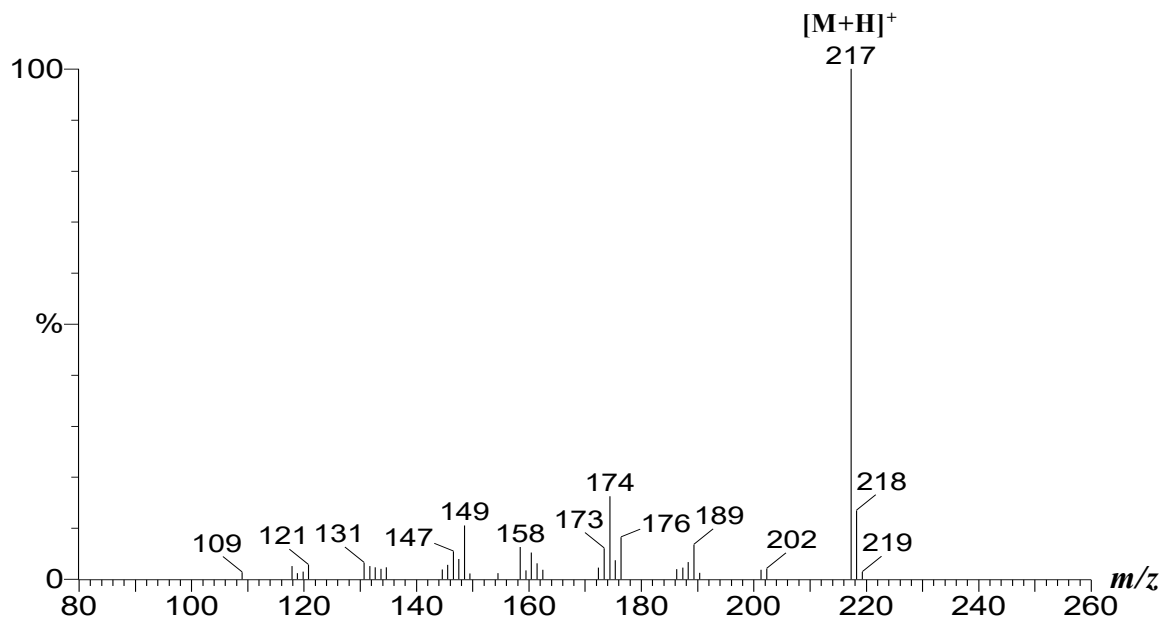


Fig. II-3 Mass spectra of PQ-oxide (upper, cone voltage ; 60 V) and DQ-oxide (lower, cone voltage ; 40 V).

第3節 SPDE とその効果の検討

尿試料を遠心分離して得られた上清について、SPDE を行わずに酸化反応を行ったところ、PQ 酸化体は良好に検出されたが、DQ 酸化体は尿由来と考えられる妨害ピークが重なり、同定が困難であった。このため、酸化反応の前に妨害成分を除去する操作が必要であると考えられた。生体試料中の PQ・DQ の抽

出については、Sep-Pak® C₁₈を用いる SPE 法^{39,40)}が非常に有効であることが知られているが、本研究では、より短時間で簡便に PQ・DQ を抽出する方法として SPDE 法を検討した。第 I 章で用いた方法を参考に、弱酸性カチオン交換能を持つ固相(Oasis® WCX)を用いて検討したところ、DQ 酸化体のピークに重なる妨害成分は除去され、各酸化体を良好に検出することができた。PQ・DQ の回収率(PQ・DQ 各 0.5 µg/mL, 平均値(%)±S.D.)は PQ が 86 %±9.8, DQ が 85 %±11.1 で、各酸化体の生成率が上昇する効果(PQ 酸化体 ; 70 %→80 %, DQ 酸化体 ; 15 %→50 %)も認められた。

第 4 節 酸化反応条件の最適化

第 1 項 水酸化ナトリウム濃度の検討

ブランク血液の除タンパク液およびブランク尿の SPDE 抽出液に、PQ・DQ の濃度が各 1 µg/mL となるように標準溶液を添加したものについて、フェリシアン化カリウム濃度を 1 mg/mL に固定し、水酸化ナトリウム濃度を 7 M から 20 M の間で酸化反応を行い、水酸化ナトリウム濃度の最適条件を検討した。各酸化体の生成率は、ブランク血液、ブランク尿について同様の操作を行った後、各酸化体の標準品溶液を添加したものを測定して得られた検量線をもとに算出した。

PQ 酸化体の生成率は、血液試料については水酸化ナトリウム濃度 11 M 以上で、尿試料については 7 M 以上で約 80 %で一定となった。DQ 酸化体の生成率は、血液試料、尿試料共に、20 M でそれぞれ 42 %, 54 %と最大となった。水酸化ナトリウム濃度と各酸化体の生成率の関係を Fig. II-4 に示す。

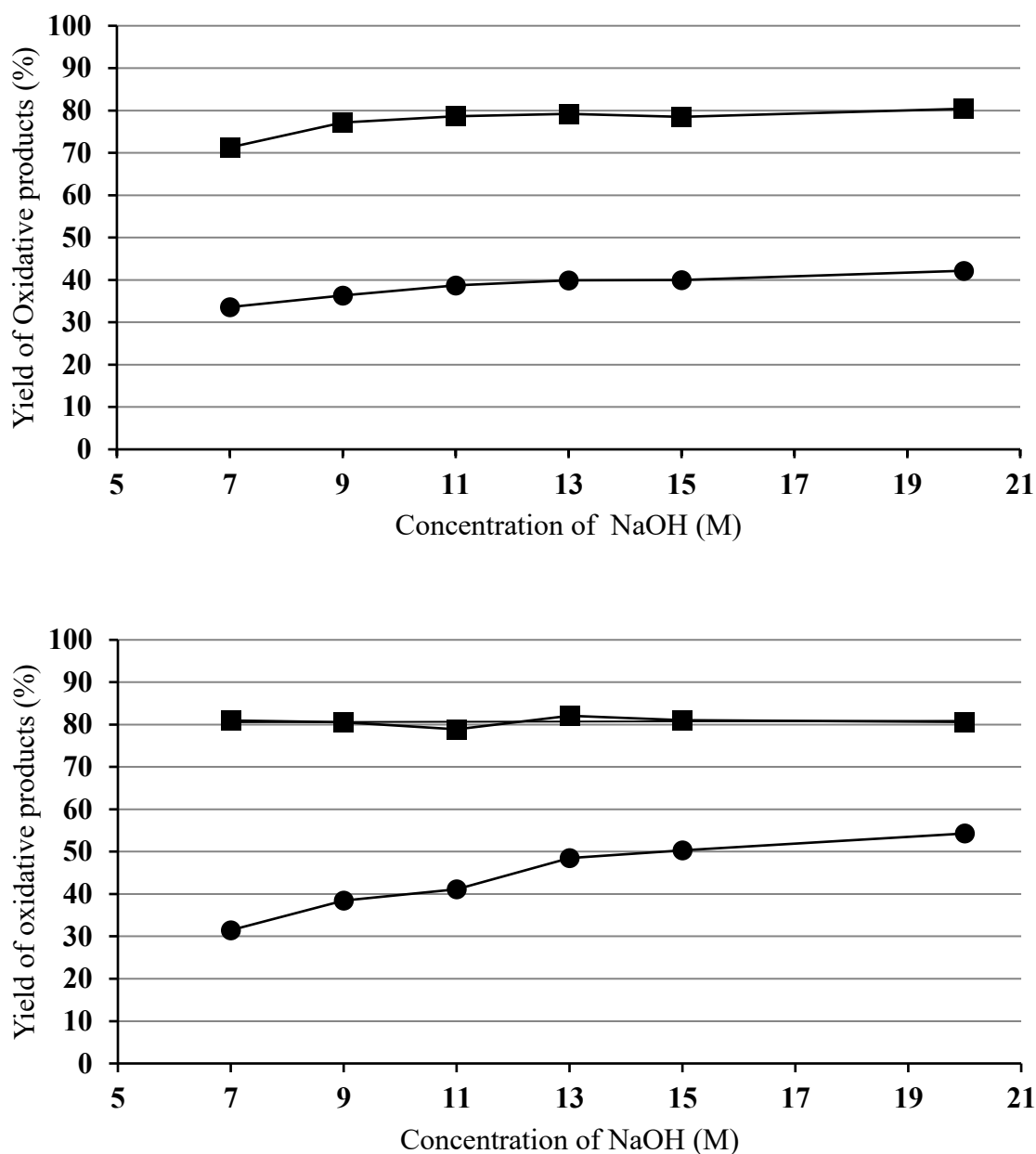


Fig. II-4 Effect of sodium hydroxide (NaOH) concentration on oxidation of PQ (■) and DQ (●) in a spiked whole blood sample (upper) and a spiked urine sample (lower).

これらの結果から、酸化反応に用いる水酸化ナトリウム濃度は、血液試料の DQ 酸化体の生成率が尿試料のそれと比較して低いことを考慮し、血液試料で DQ 酸化体の生成率が最大となる 20 M とすることが適当と考えられた。しかし、水酸化ナトリウム濃度が 15 M と 20 M のときの DQ 酸化体の生成率を比較すると、血液試料では 40 % と 42 %、尿試料では 50 % と 54 % と、生成率の上昇

幅はそれほど大きくない。また、高濃度の水酸化ナトリウム水溶液は、調製が煩雑であることから、水酸化ナトリウム濃度は 15 M とすることとした。

第 2 項 フェリシアン化カリウム濃度の検討

ブランク血液の除タンパク液およびブランク尿の SPDE 抽出液に PQ・DQ の濃度が各 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように標準溶液を添加したものについて、水酸化ナトリウム濃度を 15 M に固定し、フェリシアン化カリウム濃度を 0.1 mg/mL から 100 mg/mL の間で酸化反応を行い、フェリシアン化カリウム濃度の最適条件を検討した。各酸化体の生成率は、第 4 節第 1 項と同様の方法で算出した。

PQ 酸化体の生成率は、尿試料についてはフェリシアン化カリウム濃度が 2.5 mg/mL のときに最大となり、他方、血液試料については 1 mg/mL のときに最大になった。DQ 酸化体の生成率は、尿試料、血液試料共に 1 mg/mL のときにそれぞれ最大になった。尿試料、血液試料共に、各酸化体の生成率が最大となった後は、フェリシアン化カリウム濃度が高くなるにつれ、各酸化体の生成率が減少する傾向が認められた。フェリシアン化カリウム濃度と各酸化体の生成率の関係を Fig. II-5 に示す。

これらの結果から、フェリシアン化カリウム濃度は、DQ 酸化体の生成率が最大となる 1 mg/mL を最適濃度として採用した。

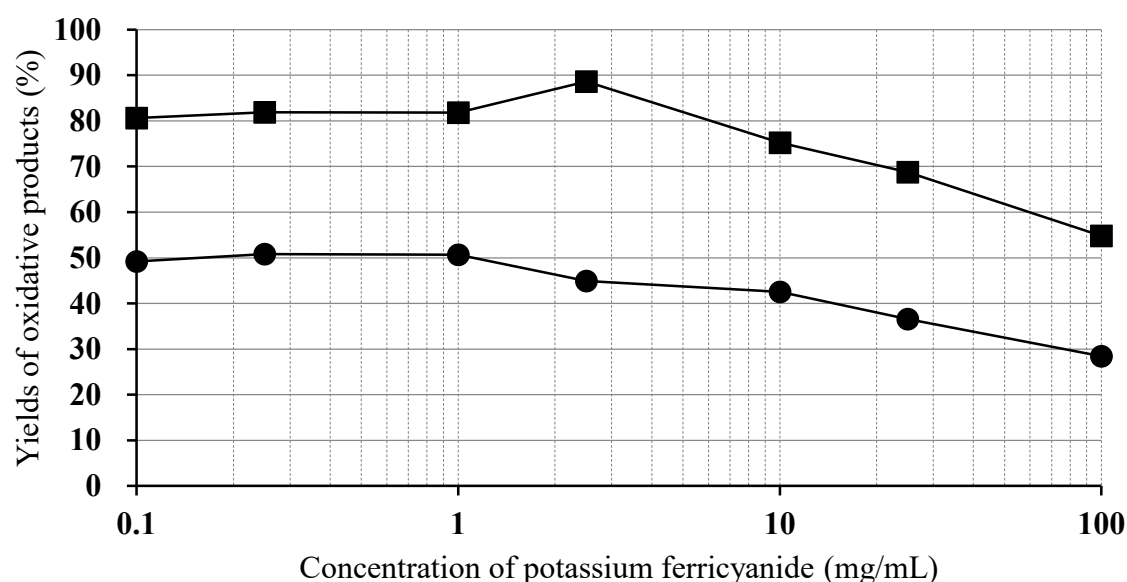
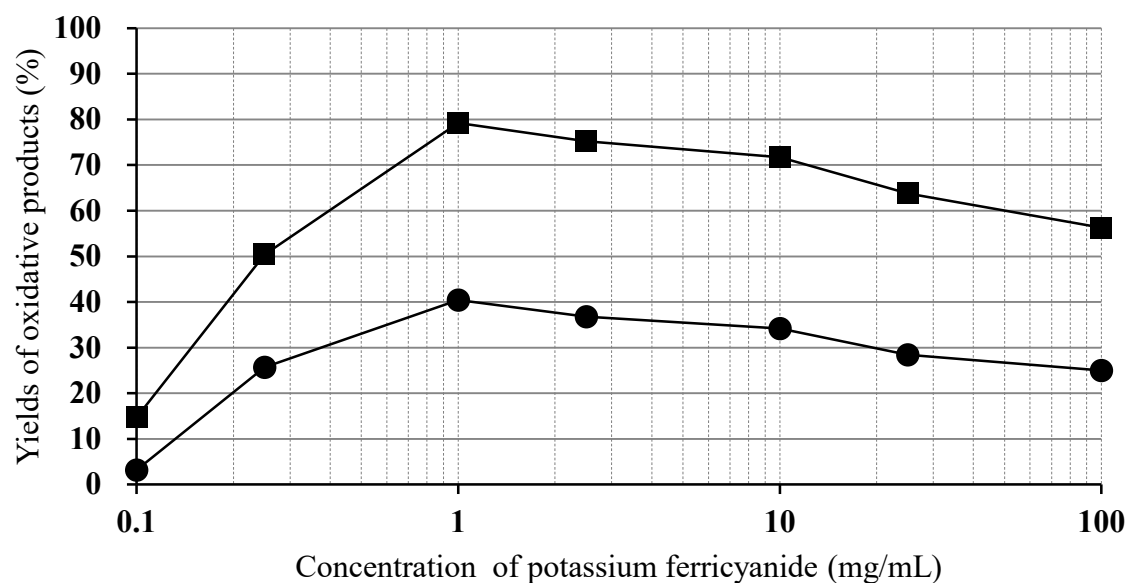


Fig. II-5 Effect of potassium ferricyanide concentration on oxidation of PQ (■) and DQ (●) in a spiked whole blood sample (upper) and a spiked urine sample (lower).

第5節 酸化反応後の SPE の検討

ブランク血液およびブランク尿の酸化反応液に、PQ・DQ の各酸化体を各 $1 \mu\text{g/mL}$ となるように添加し、これについて逆相-強塩基性アニオン交換タイプの固相が充填された SPE カートリッジ Oasis[®] MAX(60 mg/3 mL, 粒子径 $60 \mu\text{m}$)を用いた抽出法を検討した。コンディショニング(メタノールおよび蒸留水)と溶出(メタノール)の方法を固定し、洗浄に用いる溶液または溶剤について蒸留水/メタノール混液 (95:5, v/v), 蒸留水/アセトニトリル混液(95:5, v/v)およ

びヘキサンを検討したところ、蒸留水/メタノール混液・蒸留水/アセトニトリル混液ではいずれも各酸化体の溶出が認められたが、ヘキサンでは各酸化体の溶出は認められなかった。また、SPE カートリッジの洗浄に用いたヘキサンを濃縮した後、GC/MS を行ったところ、血液・尿由来と考えられるコレステロールが検出されたため、一定の洗浄効果はあるものと考えられた。これらの結果から、洗浄液はヘキサンを用いることとした。次に、コンディショニング(メタノールおよび蒸留水)と洗浄(ヘキサン)の方法を固定し、溶出に用いる溶剤としてメタノール、アセトニトリルおよび酢酸エチルを検討したところ、酢酸エチルでは各酸化体を溶出しきれなかったが、メタノールおよびアセトニトリルはいずれも完全に溶出することができた。この結果から、溶出液としてはメタノールまたはアセトニトリルが適当であると考えられたが、より沸点の低いメタノールの方が留去にかかる時間が少ないことから、溶出にはメタノールを用いることとした。洗浄液としてヘキサンを、溶出液としてメタノールを用いた際の血液試料および尿試料からの各酸化体の回収率(平均値(%) \pm S.D.)は、血液試料($n=5$)では PQ 酸化体が 96.0% \pm 3.8, DQ 酸化体が 91.9% \pm 2.7, 尿試料($n=5$)では PQ 酸化体が 97.9% \pm 1.0, DQ 酸化体が 92.8% \pm 2.3 と良好であった。

前処理(血液試料；除タンパク処理，尿試料；SPDE)，酸化反応および SPE を合わせた最終的な PQ および DQ の回収率は、血液試料でそれぞれ約 75% および約 35%，尿試料でそれぞれ約 80% および約 45% であった。DQ の回収率が著しく低いのは、DQ が塩基性下で不安定⁶⁾であり、高濃度の水酸化ナトリウムを使用する酸化反応の過程で一部が分解されたためと考えられた。

第 6 節 血液試料，尿試料への適用と検出限界

血液試料および尿試料(PQ・DQ の濃度各 0.5 μ g/mL)について、検討した条件で分析を行ったところ、いずれも PQ・DQ の各酸化体を良好に検出することができた(Fig. II-6)。本法での検出限界($S/N > 3$)は、尿試料，血液試料共に PQ が 0.2 ng/mL，DQ が 0.5 ng/mL であった。DQ の最終的な回収率は、血液試料で 35%，尿試料で 45% 程度であったが、これまでに報告されている LC/MS による分析での DQ の検出限界が血液試料で 5 ng/mL^{22, 23)}，50 ng/mL³¹⁾，尿試料で 0.13 ng/mL²⁵⁾，5 ng/mL²²⁾，50 ng/mL³¹⁾であることを考慮すると、本法は、血液

試料では従来の方法よりも高感度で優れており，尿試料についてもそれほど劣るものではないものと考えられた。

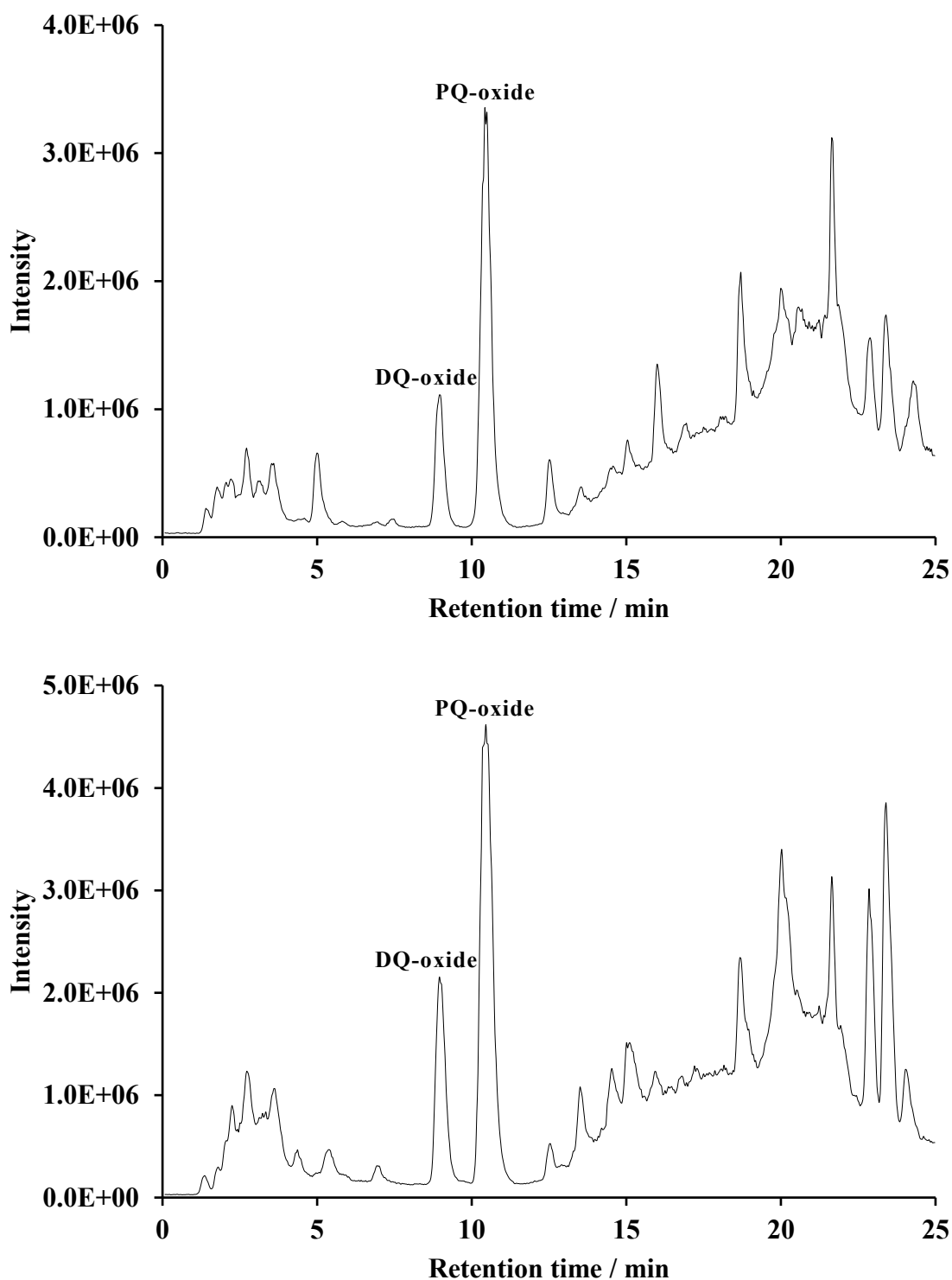


Fig. II-6 Total ion chromatograms by LC/MS obtained from a whole blood sample (upper) and a urine sample (lower) spiked with PQ and DQ at concentration of 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ each.

第 7 節 小括

生体試料中の PQ・DQ について、酸化法-LC/MS による定性分析法を構築した。血液試料に対してはスルホサリチル酸による除タンパク処理を、尿試料に対しては弱酸性カチオン交換能を持つ固相(Oasis® WCX)を用いた SPDE による簡易精製をそれぞれ行った後、フェリシアン化カリウム水溶液と水酸化ナトリウム水溶液を用いた酸化反応により PQ・DQ を各酸化体に変換した。生成した各酸化体を、強塩基性アニオン交換能を持つ固相が充填された SPE カートリッジ(Oasis® MAX)で精製した後、LC カラムとして C18 カラムを、移動相としてギ酸アンモニウム緩衝液およびメタノールを用いた一般的な条件での LC/MS を行ったところ、各酸化体を良好に分離し、検出することができた。LC/MS の分析条件は、法薬毒物学鑑定で用いられる汎用分析条件であり、移動相の交換、カラムの交換・平衡化、イオンペア試薬による機器の汚染を除去するための装置の洗浄など、従来の PQ・DQ の分析方法を用いることで必要となる時間や労力を大幅に低減できることから、法薬毒物学鑑定全体の効率化にもつながるものと考えられた。また、LC/MS では保持時間情報と質量情報(マススペクトル)が得られ、これは SWGDRUG のガイドラインを満たすものであり、更に、誘導体化反応も伴うことで特異性もより増大している。したがって、本法は、生体試料中の PQ・DQ の定性分析法として、十分な証明力を持つ方法であり、法薬毒物学鑑定において非常に有用であることが示唆された。

第 III 章 同位体希釈質量分析による生体試料中 PQ および DQ の定量分析法の構築

第 1 節 序論

薬毒物を用いた犯罪の公判では、適用される罪名、量刑などを決定する際に、被害者の体内から検出された薬毒物の濃度を参考にする場合があり、法薬毒物学鑑定においては、定性分析に加えて定量分析も求められる。その結果が公判の争点となり、他の機関による再鑑定が行われる場合もあるため、それに耐え得るより信頼性の高い定量分析法が必要となる。

生体試料中の PQ・DQ の定量分析法としては、PQ と構造が類似したエチルパラコートを用いた内部標準物質として用いる報告^{22-24, 26, 27, 30)}があるが、この他に、より精度の高い定量分析を達成するため、安定同位体標識 PQ・DQ を用いた同位体希釈質量分析による方法も報告^{25, 31)}されている。安定同位体標識物質は、分析対象物質と物理的および化学的性質がほぼ同じであり、試料の採取や抽出操作などの際に起こり得る損失など様々な誤差を補正することができ、更に、クロマトグラフィーでの分離の際には分析対象物質とほぼ同じ保持時間に検出されるため、分析対象物質のイオン化を抑制または促進する成分が同時に溶出された場合に生じ得るマトリックス効果の補正効果が高く、精度の高い定量が可能となる。しかし、近年、法薬毒物学鑑定の専門書において、DQ の分析に際し、DQ-*d*₄ を内部標準物質として用いることの危険性について言及されている³⁵⁾。具体的には、DQ-*d*₄ の 4 つの重水素は、2 つのピリジン環をつなぐエチレン鎖上に存在するが、この重水素が活性を有するため、生体試料に内部標準物質として添加された際に、一部の DQ-*d*₄ が D-H 交換反応により DQ に変換され、その結果、試料からの DQ の誤検出や、不正確な定量といった問題が起こり得るというものである。DQ-*d*₄ を内部標準物質として用いた過去の報告^{25, 31)}では、この危険性について考慮されていない。特に、法薬毒物学鑑定においては、分析対象化合物の誤検出は絶対に避けなければならない、その可能性すら排除しなければならない。したがって、精確性の高い定量と、誤検出を防止するための、DQ-*d*₄ に代わる安定同位体標識内部標準物質が必要となる。

第 II 章で構築した酸化法-LC/MS による定性分析法については、酸化反応の

前に除タンパク処理や SPDE といった操作が必要で、多少煩雑であり、これが定量精度を下げる要因となる可能性が否定できないため、よりシンプルな前処理の検討が必要となる。また、成分の検出については、シングル四重極型質量分析計のフルスキャンモードでマススペクトルを取得しているが、定量については、イオントラップ型質量分析計、トリプル四重極型質量分析計、四重極-飛行時間型質量分析計などのプロダクトイオンスキャンモードや、選択反応モニタリング(SRM)モードにより得られる選択性の高いマススペクトルデータの取得がより望ましい。

そこで本研究では、PQ-*d*₆ と新たに合成した DQ-*d*₈ を内部標準物質として、生体試料中の PQ・DQ について、煩雑な操作を必要としない SPE による抽出と液体クロマトグラフィーイオントラップ型質量分析(LC/IT-MS)による高選択性検出に基づいた精確性の高い定量分析法の構築を検討した。Fig. III-1 に PQ, PQ-*d*₆, DQ, DQ-*d*₄, DQ-*d*₈ の化学構造式を示す。

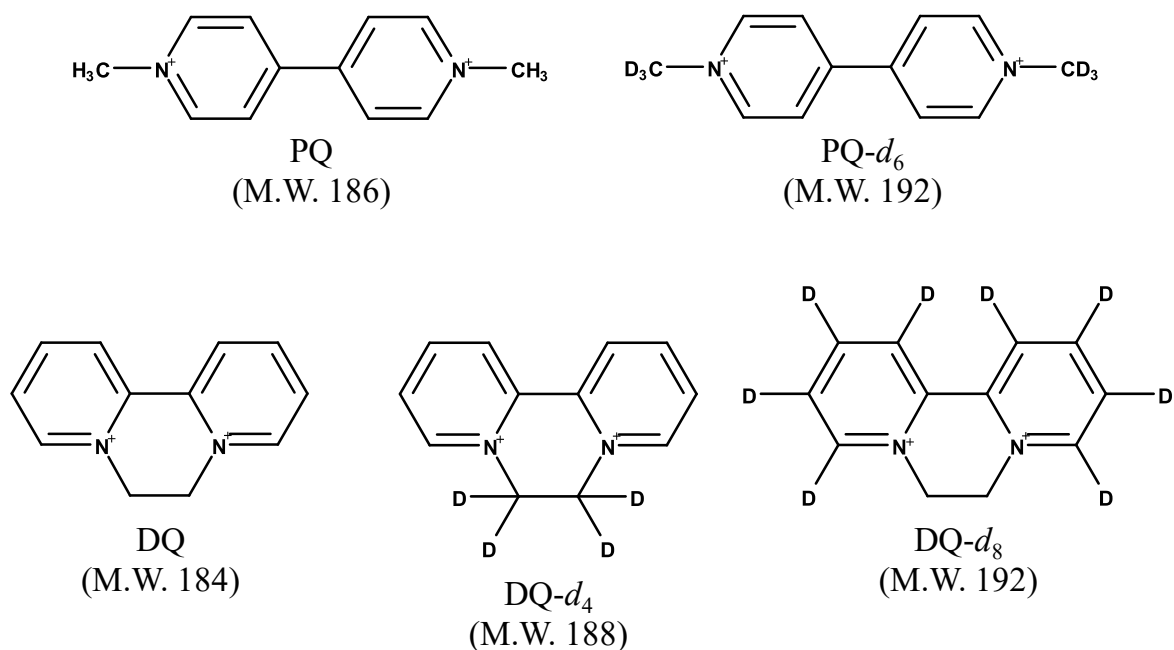


Fig. III-1 Chemical structures of PQ, PQ-*d*₆, DQ, DQ-*d*₄ and DQ-*d*₈.

第2節 DQ-*d*₄ からの DQ の生成

DQ-*d*₄ の水溶液(10 μg/mL)を 0.1 M 重炭酸ナトリウム-炭酸ナトリウム緩衝液(pH 11)で 10 倍希釈し、25 °C で 10 分間インキュベートしたものについて、

LC/IT-MS により分析したところ、DQ- d_4 に加え、DQ が検出され(Fig. III-2), この条件下では約 6 %の DQ- d_4 が DQ に変換されたものと見積もられた。したがって、腐敗した血液や尿といった塩基性の試料では、誤検出や定量値の押し上げといった問題が発生するものと考えられた。

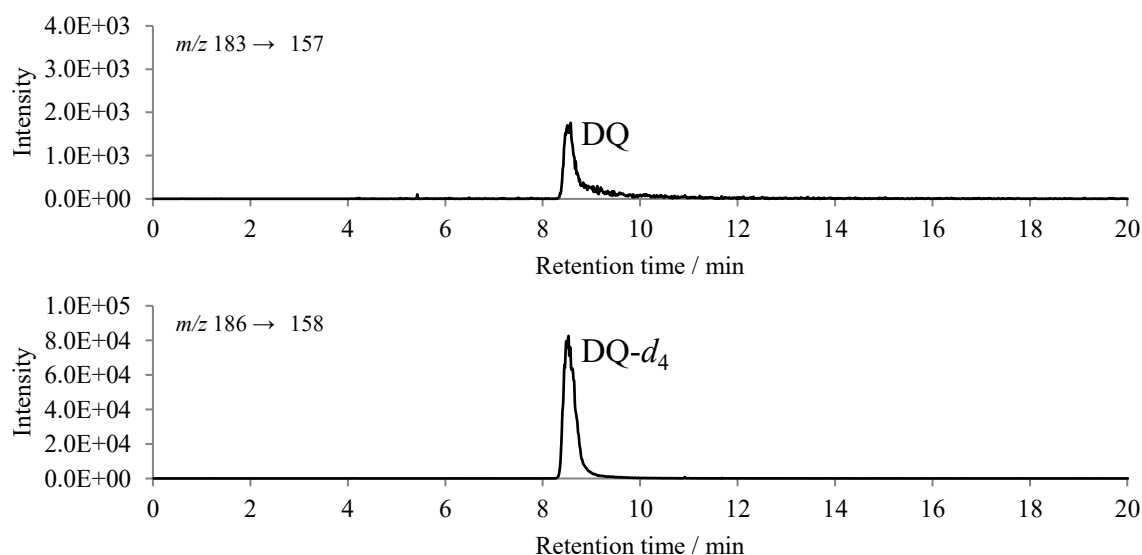


Fig. III-2 Selected reaction monitoring (SRM) chromatograms obtained from the aqueous solution of DQ- d_4 (10 $\mu\text{g/mL}$) diluted 10-fold with 0.1 M bicarbonate-carbonate buffer solution (pH 11) and incubated at 25 $^{\circ}\text{C}$ for 10 min. The upper panel shows the transition m/z 183 \rightarrow 157 for detection of DQ, whereas the lower panel shows the transition m/z 186 \rightarrow 158 for detection of DQ- d_4 .

一方、新たに合成した DQ- d_8 は、8 つの重水素がピリジン環上にあり、これらはいずれも不活性であり、D-H 交換反応は起きないものと考えられた。上記と同条件でインキュベートしたところ、DQ は検出されず(Fig. III-3), DQ- d_8 が内部標準物質として適当である可能性が示された。しかし、これまでに DQ- d_8 を用いた定量分析の例は報告されていないことから、DQ 分析における妥当性評価が必要であると考えられた。

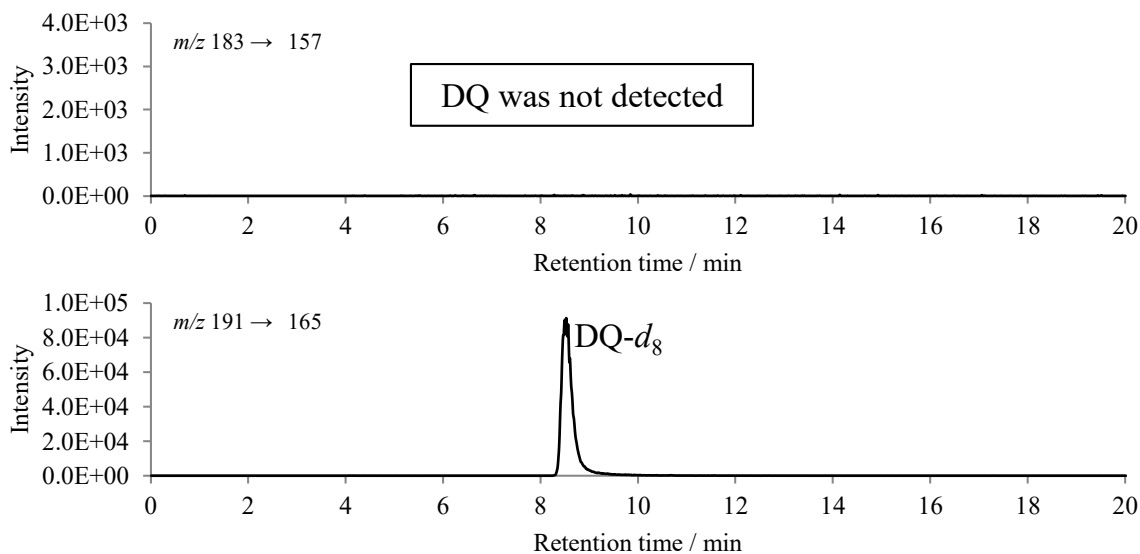


Fig. III-3 SRM chromatograms obtained from the aqueous solution of DQ- d_8 (10 $\mu\text{g/mL}$) diluted 10-fold with 0.1 M bicarbonate-carbonate buffer solution (pH 11) and incubated at 25 °C for 10 min. The upper panel shows the transition m/z 183 \rightarrow 157 for detection of DQ, whereas the lower panel shows the transition m/z 191 \rightarrow 165 for detection of DQ- d_8 .

第3節 LC/IT-MS

第1項 LC

PQ・DQはいずれも高極性化合物 (K_{ow} $\log P$; -4.6 (PQ), -4.5 (DQ))である⁶⁶⁾ため、一般的に用いられる C18 カラムで保持, 分離するためにはイオンペア試薬の添加が必要である。しかし, イオンペア試薬は装置内に残存し, それを除去するのは容易ではない。そこで, イオンペア試薬を必要としない HILIC カラムによる PQ・DQ の分離分析を検討した。スルホベタイン構造を持つポリマーベースカラムである ZIC[®]-pHILIC を用いたところ, PQ・DQ はギ酸アンモニウム緩衝液 (pH 3.5) -メタノール系の移動相を用いることで良好に保持, 分離された。緩衝液の濃度を 25 mM から 200 mM の間で変化させたところ, 濃度が高いほど PQ・DQ が早く溶出した (Fig. III-4) ことから, PQ・DQ の保持には親水性相互作用の他に, スルホニル基との間にイオン交換相互作用が働いているものと考えられた。

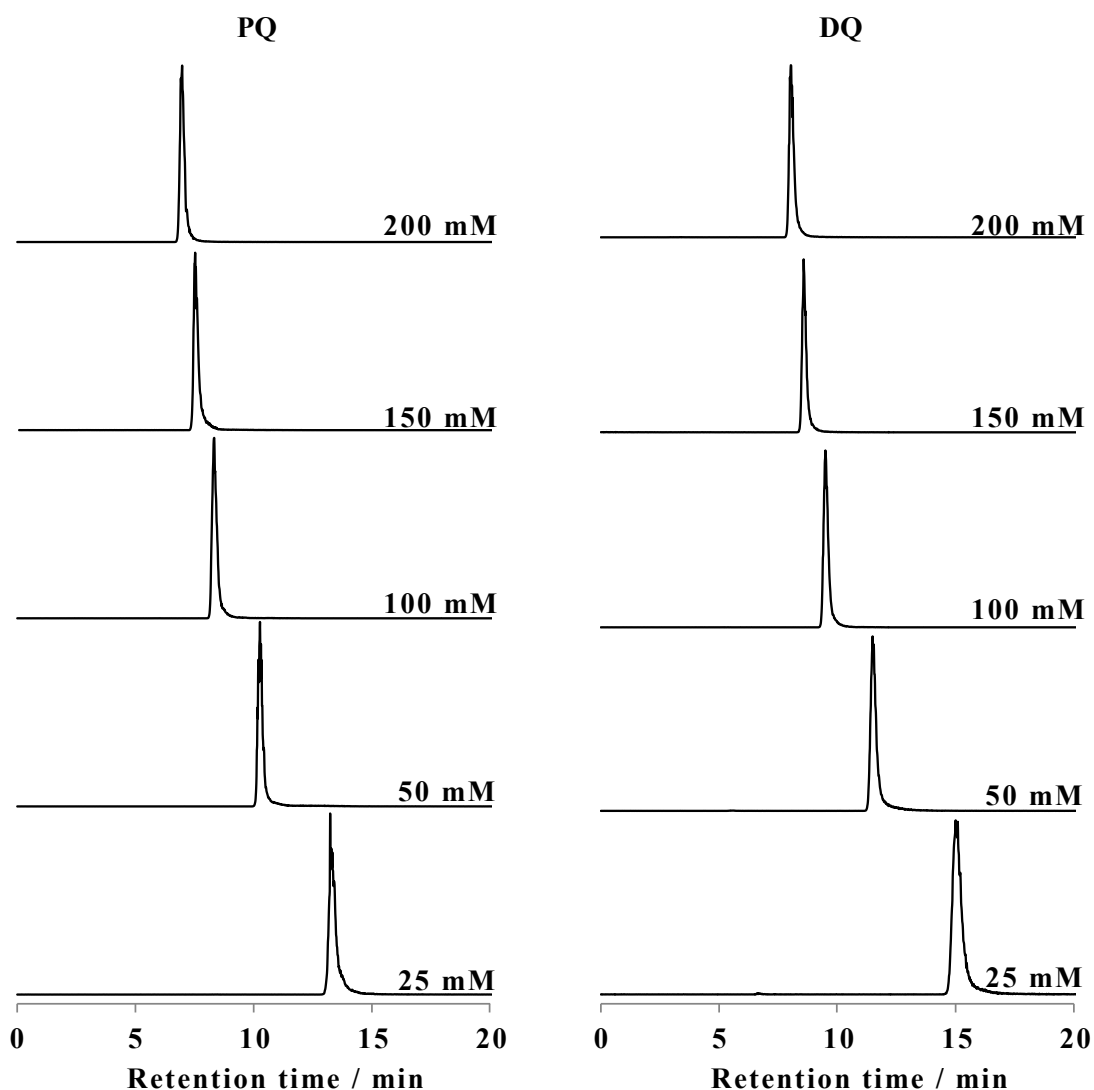


Fig. III-4 SRM chromatograms by LC-/ITMS with five types of mobile phase (A) at different concentrations (25, 50, 100, 150, and 200 mM) of ammonium formate and mobile phase (B) methanol for detection of the reference standard solution of PQ (left) and DQ (right) at a concentration of 0.5 $\mu\text{g/mL}$. The linear gradient program was 10 % (A)/ 90 % (B) to 90 % (A)/10 % (B) over 10 min and held for 15 min.

ギ酸アンモニウム緩衝液について、各濃度でのピーク面積値を比較したところ、150 mM までは濃度の上昇によりピーク面積も上昇する傾向が認められたが、200 mM ではピーク面積値は減少に転じた(Fig. III-5)。このことから、ギ酸アンモニウム緩衝液の濃度は、150 mM が最適値であると考えられた。

また、今回、生体試料の抽出物を 800 回以上分析し、PQ・DQ の保持時間、

ピーク形状の変化を比較したところ、いずれもほとんど変化はなく、長寿命であることが示されたことから、ポリマーベースの ZIC®-pHILIC カラムは、夾雑物の多い過酷な試料の分析に適しているものと考えられた。

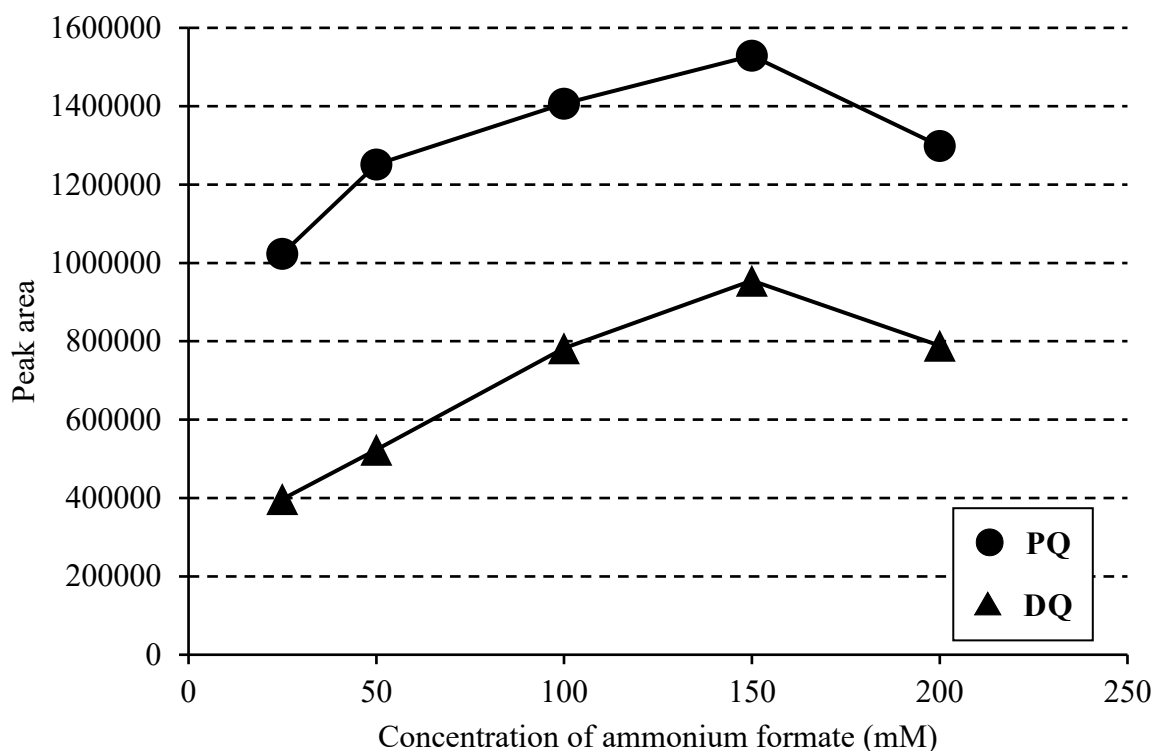


Fig. III-5 Effect of concentration (25, 50, 100, 150, and 200 mM) of ammonium formate in mobile phase (A) on peak area of PQ and DQ from a reference standard solution of PQ and DQ at a concentration of 0.5 $\mu\text{g/mL}$. The linear gradient program was the same as specified in Fig. III-4.

第2項 IT-MS

初めにフルスキャンモードで測定したところ、PQ, PQ- d_6 については m/z 186, m/z 192 (M^+)のイオンが、DQ, DQ- d_8 については m/z 183, m/z 191 ($[M-H]^+$)のイオンがそれぞれ顕著に観測されたため、これらをプリカーサーイオンとしたプロダクトイオンスキャンモードにより測定し、プロダクトイオンスペクトルを得た(Fig. III-6). PQ, PQ- d_6 からそれぞれ観測された m/z 171 と m/z 174 のイオンは $[M-CH_3]^+$ と $[M-CD_3]^+$, DQ, DQ- d_8 からそれぞれ観測された m/z 157 と

165 のイオンはいずれも $[M-H-C_2H_2]^+$ に相当するものと考えられた. この他のイオンについては検出されないか, または検出されても強度が非常に低いものであったため, 定量分析に用いる SRM のトランジションは, 顕著に観測されたこの 4 つのイオンを用いて設定することとした. ブランク血液試料, ブランク尿試料について測定したところ, PQ・DQ の検出を妨害するピークは検出されず, PQ, PQ- d_6 , DQ, DQ- d_8 を添加した血液試料, 尿試料について分析したところ, 各成分は良好に検出された. 一例として, 血液試料から得られた SRM クロマトグラムを Fig. III-7 に示す.

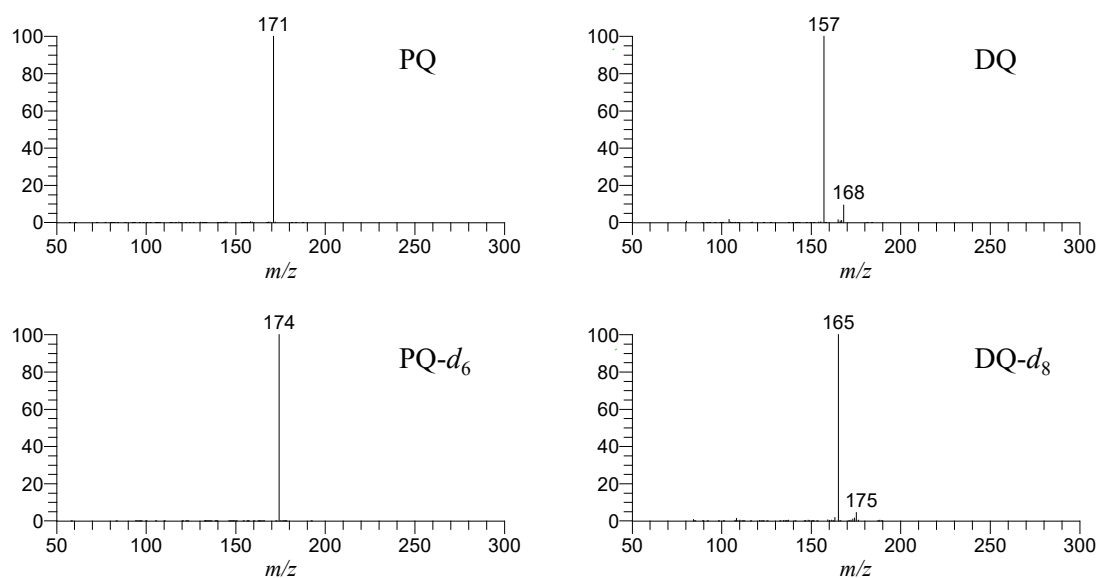


Fig. III-6 Product ion spectra of PQ (precursor ion at m/z 186), PQ- d_6 (precursor ion at m/z 192), DQ (precursor ion at m/z 183), and DQ- d_8 (precursor ion at m/z 191).

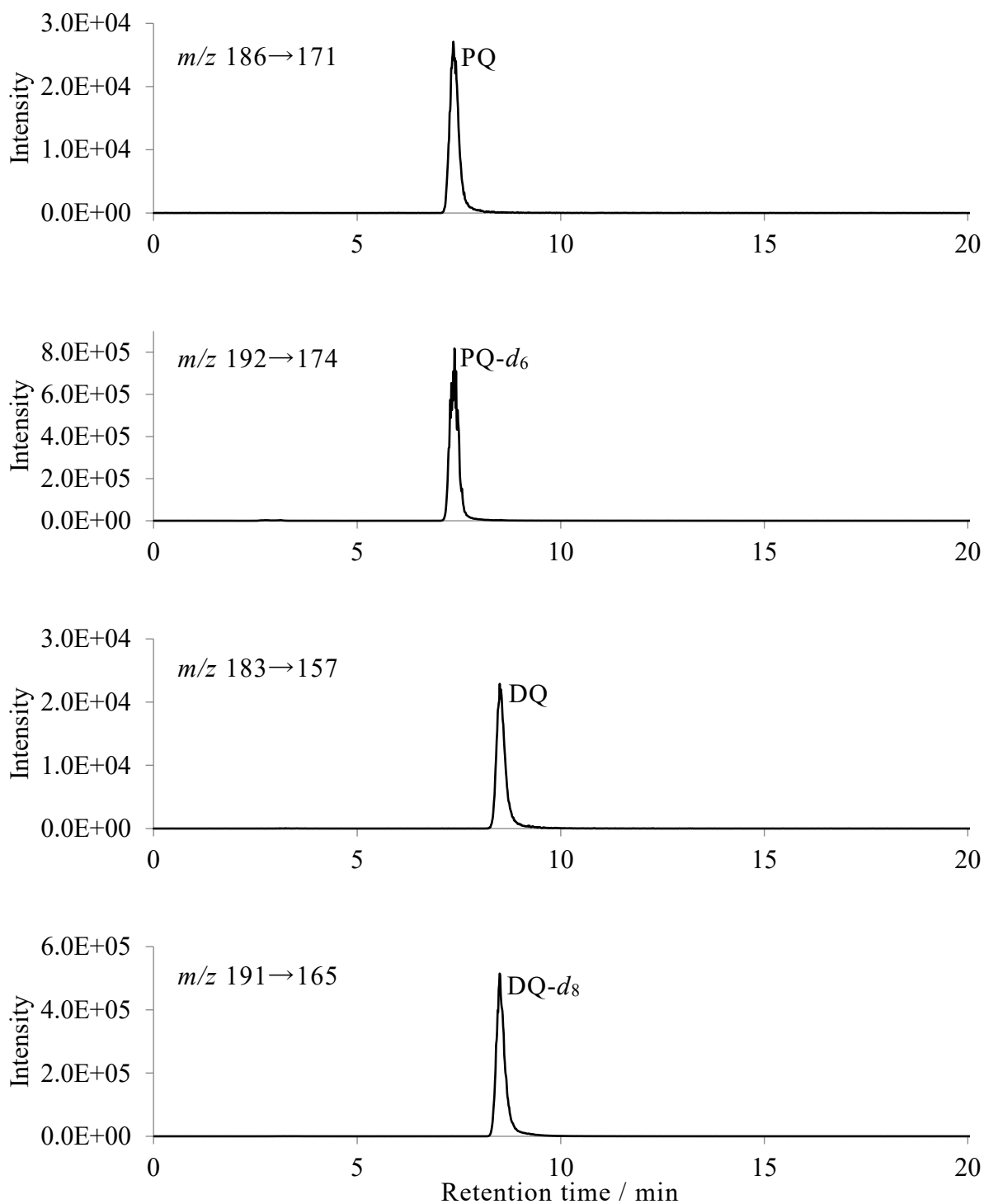


Fig. III-7 SRM chromatograms obtained from the blood sample spiked with analytes and internal standards at concentrations of 0.05 and 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively.

第4節 SPEによるPQおよびDQの抽出

血液試料および尿試料からのPQ・DQの抽出は、弱酸性カチオン交換能を持つ固相が充填されたSPEカートリッジ(EVOLUTE® WCX)を用いて行った。

なお、除タンパク処理は行わず、リン酸塩 pH 標準液(pH 7.41)を添加し、更に超純水で希釈し、攪拌した後、遠心分離して得られた上清を SPE カートリッジに負荷した。

PQ・DQ を添加した試料(0.1 µg/mL, 1.0 µg/mL)について、回収率を求めたところ、Table III-1 に示すように、PQ は 90.5~98.7%，DQ は 88.5~94.5%と良好で、相対標準偏差(RSD)も十分に低く(1.0~3.9%)、これまでに報告されている抽出法^{4, 5, 7, 14, 22-26, 29)}と比較しても遜色ないものであった。更に、この抽出法は、除タンパク処理や煩雑な pH 調整が不要である点で従来法よりも簡便であるものと考えられた。

Table III-1 Intraday recoveries (*n* = 6 each) of PQ and DQ from whole blood and urine samples using the present procedure

Analyte	Sample	Amount added (µg/mL)	Recovery (%)	RSD (%)
PQ	Whole blood	0.1	95.8	3.9
		1.0	94.7	3.3
	Urine	0.1	98.7	2.6
		1.0	90.5	3.0
DQ	Whole blood	0.1	88.5	2.6
		1.0	94.5	2.1
	Urine	0.1	91.9	1.0
		1.0	90.5	1.2

第 5 節 定量分析

第 1 項 検量線の直線性

PQ・DQ の定量のための検量線は、血液試料、尿試料のいずれもが 0.01 µg/mL から 2 µg/mL までの範囲(0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2 µg/mL の 7 点)で良好な直線性を示した(Table III-2)。

Table III-2 Regression equations and the correlation coefficients for analyses of paraquat (PQ) and diquat (DQ) obtained using the present method

Analyte	Sample	Regression equation	Correlation coefficient (<i>r</i>)	Linear range (μg/mL)
PQ	Whole blood	$y = 1.051x - 0.0122$	0.9994	0.01–2
	Urine	$y = 1.076x - 0.0191$	0.9992	0.01–2
DQ	Whole blood	$y = 0.920x + 0.0108$	0.9992	0.01–2
	Urine	$y = 0.953x + 0.0012$	0.9996	0.01–2

第 2 項 真度, 日内変動, 日間変動および検出限界

一定量の PQ・DQ を添加した試料(0.1 μg/mL, 1.0 μg/mL)について, 日内変動($n = 6$), 日間変動($n = 6 \times 3$ days)を評価したところ, Table III-3 に示すような結果が得られた. 真度, 日内精度(%RSD)は, それぞれ 93.3~103 %, 0.7~4.7 %, 日間精度も 0.8~6.7 %であり, 非常に精確性の高い定量が可能となることが判明した. このことから, PQ- d_6 と新たに合成した DQ- d_8 を用いた本法は, 血液中, 尿中の PQ・DQ の定量分析の内部標準物質として問題なく用いることができるものと考えられた. また, 本法における PQ・DQ の検出限界($S/N > 3$)は, 血液試料, 尿試料共にそれぞれ 0.001 μg/mL, 0.002 μg/mL, 定量限界($S/N > 10$)はいずれも 0.01 μg/mL であった.

Table III-3 Intraday accuracies ($n = 6$) and intraday ($n = 6$) and interday ($n = 6 \times 3$ days) precisions of PQ and DQ obtained from whole blood and urine samples using the present method

Analyte	Sample	Amount added ($\mu\text{g/mL}$)	Intraday accuracy (%mean)	Intraday precision (%RSD)	Interday precision (%RSD)
PQ	Whole blood	0.1	96.6	4.7	6.7
		1.0	100	3.5	4.4
	Urine	0.1	97.2	1.9	1.8
		1.0	93.3	2.4	4.1
DQ	Whole blood	0.1	97.0	0.7	2.3
		1.0	103	0.8	0.8
	Urine	0.1	96.3	1.5	1.8
		1.0	99.1	0.8	4.2

第 6 節 小括

本研究では、生体試料(血液および尿)中の PQ・DQ について、安定同位体標識 PQ・DQ を用いた LC/IT-MS による精確性の高い定量法について検討した。安定同位体標識 DQ については、これまで使われてきた DQ- d_4 が、一定の条件下で DQ を生成し、誤検出や定量値の押し上げの原因となることが示唆されたため、これに代わるものとして DQ- d_8 を新たに合成し、前記と同条件下で DQ が生成しないことを確認した後、内部標準物質としての妥当性を評価した。

生体試料からの PQ・DQ の抽出は、弱酸性カチオン交換能を有する固相が充填された SPE カートリッジである EVOLUTE® WCX を用いたところ、回収率は PQ で 90.5~98.7 %，DQ で 88.5~94.5 %といずれも高く、ばらつきは非常に低く(RSD, 1.0~3.9 %), 更に除タンパク処理や pH の調整といった煩雑な操作が不要であり、従来の方法よりも簡便な前処理方法であると考えられた。

PQ・DQ の分離分析は、ポリマー系の HILIC カラムを用いた LC で達成され、IT-MS の SRM モードによる測定により高感度に検出された。SRM モードによる検出法は、第 II 章で検討したシングル四重極質量分析計のフルスキャンモードによるものよりも特異性が高いため、定量のみならず、同時に定性も可能で

あり、分析の効率化につながるものであると考えられた。

上記のとおり最適化した条件により、PQ- d_6 と DQ- d_8 を用いた同位体希釈質量分析による定量分析を検討したところ、PQ・DQ 共に 0.01 $\mu\text{g/mL}$ から 2 $\mu\text{g/mL}$ の範囲で良好な直線性(相関係数(r) > 0.999)が得られ、更に、真度は 93.3~103 %、日内精度(%RSD)は 0.7~4.7 %、日間精度(%RSD)は 0.8~6.7 %と非常に精確性が高く、PQ- d_6 と DQ- d_8 は十分に内部標準物質として機能することが判明した。また、検出限界($S/N > 3$)は、血液試料、尿試料共に PQ が 0.001 $\mu\text{g/mL}$ 、DQ が 0.002 $\mu\text{g/mL}$ 、定量限界($S/N > 10$)はいずれも 0.01 $\mu\text{g/mL}$ と PQ・DQ の含有量が低い試料であっても適用可能であることが示された。

以上のことから、同位体希釈質量分析を用いた本法は、精確性の高い定量を求められる法薬毒物学鑑定において、生体試料中 PQ・DQ の定量分析法として非常に有用であると考えられた。

総括および結論

アルキルジピリジニウム塩系農薬である PQ・DQ を有効成分とする除草剤製品は、その入手の容易さから、これを使用した犯罪、誤飲事故、自殺事案が散見されるため、法薬毒物学鑑定上、PQ・DQ は重要な分析対象物質である。PQ・DQ の分析については数多くの報告があるものの、1)試料の使用量を抑制した迅速かつ高感度なスクリーニング、2)特異性が高く、かつ、特殊な分析条件を必要としない定性分析、3)公判を見据えたより精確性の高い定量分析と、以上3点については未だ十分とはいえない。本研究では、これらの課題について検討し、以下に述べる成果を得た。

微量試料からの PQ および DQ の迅速スクリーニング法の構築

法薬毒物学鑑定においては、初めに薬毒物が含有されているか否かを簡易的に判定するスクリーニングが行われることが多く、その際は、試料の量が少ない場合や再鑑定に備え、試料の消費は可能な限り抑制しなければならない。また、スクリーニングには、迅速性も求められることから、PQ・DQ が混入された食品試料(清涼飲料水)と、被摂取者の生体試料(血液、尿)を想定したスクリーニング法を構築した。清涼飲料水試料については、ピペットチップ型 SPE デバイスを用いた μ SPE と呈色試験、生体試料については SPDE と MALDI-TOF-MS による方法を検討した。PQ・DQ 混合除草剤製品を添加した清涼飲料水試料では、 μ SPE を用いることで抽出に要する時間が 1 検体あたり 3 分程度と、従来の SPE カートリッジを用いた方法の 10 分の 1 に短縮され、除草剤製品添加濃度 0.01 %の試料まで呈色試験による確認が可能であった。生体試料中の PQ・DQ は、血液試料のような粘性の高い試料であっても、SPDE により簡便な操作で抽出され、MALDI-TOF-MS により迅速に検出することができた。MALDI-TOF-MS による PQ・DQ の検出は、質量情報(マススペクトル)が得られるうえ、呈色試験を用いる方法と比較して PQ で 200 倍、DQ で 150 倍高感度であり、低濃度の試料(0.05 μ g/mL)であっても十分な S/N 比で検出された。また、両法共に、微量試料(0.1 mL)から PQ・DQ の含有の有無を迅速に判定できることから、本法は、迅速スクリーニング法として、法薬毒物学鑑定上、非常に有

用であることが示された。

酸化法—LC/MSによる生体試料中PQおよびDQの定性分析法の構築

上記スクリーニングによりPQ・DQの含有が疑われた生体試料(血液, 尿)については, その含有の有無を判定するため, 分離分析と物質識別能力の高い検出法を組み合わせた方法による定性分析が必要となる。分析方法としては, 特異性が高く, かつ, 特殊な分析機器や条件を必要としない方法であることが望ましいため, その点を考慮した分析法の構築を検討することとした。その結果, イオン性の物質であるPQ・DQを誘導体化反応(酸化反応)により非イオン性の各酸化体とし, C18カラムとギ酸アンモニウム緩衝液—メタノール系の移動相という一般的な条件のLC/MSにより, 良好に分離, 検出することができた。LC/MSの分析条件は, 法薬毒物学鑑定で用いられる汎用分析条件であり, 移動相の交換, カラムの交換・平衡化, イオンペア試薬による機器の汚染を除去するための装置の洗浄など, 従来のPQ・DQの分析方法を用いることで必要となる時間や労力を大幅に低減できることから, 法薬毒物学鑑定全体の効率化にもつながるものと考えられた。また, LC/MSでは保持時間情報と質量情報(マススペクトル)が得られ, 誘導体化反応も伴うことで特異性もより増大している。したがって, 本法は, 定性分析法として十分な証明力を持つものであり, 法薬毒物学鑑定に適用可能なものであると考えられた。

同位体希釈質量分析による生体試料中PQおよびDQの定量分析法の構築

定性分析によりPQ・DQの含有が確認された生体試料については, その中毒の程度を評価するため, 定量分析が必要となるが, 法薬毒物学鑑定においては, 信頼性の高い方法が求められる。同位体希釈質量分析は, 精確性の高い定量が達成できる優れた方法であるが, これまでDQの定量に用いられてきたDQ- d_4 は, 誤検出や不正確な定量につながる事が判明した。そこで, この問題を解決するため, 安定同位体標識DQとして新たにDQ- d_8 を合成し, DQの定量分析への適用を検討した。PQについてはPQ- d_6 を内部標準物質として用い, LC/IT-MSにより分析し, その妥当性を評価したところ, PQ・DQ共に検量線の直線性, 真度および精度は非常に良好で, 精確性の高い定量が達成された。

また、PQ・DQは、弱酸性カチオン交換固相が充填されたSPEカートリッジを用いたSPEにより高い回収率で抽出され、相対標準偏差も十分に低く、従来の抽出方法と比較しても遜色のないものであった。更に、除タンパク処理やpHの調整などの煩雑な操作が不要であることから、従来の方法よりも優れた前処理方法であると考えられた。LC/IT-MSでは、SRMモードよりPQ・DQを選択的かつ高感度に検出することができた。したがって、本法は、簡便でありながら定量分析と同時に定性分析も可能な方法であり、法薬毒物学鑑定におけるPQ・DQの分析法として非常に実用性の高いものであると考えられた。

薬毒物を使用した事件の捜査や公判廷において、科学的根拠に基づいた法薬毒物学鑑定の鑑定結果は、事実を適正に判断するための有力な証拠となり得る。特に、近年の刑事裁判では、客観的な証拠がより重要視される傾向があるため、正確性・信頼性の高い分析方法を用いた鑑定が必須である。本研究では、薬毒物のうち、中毒件数の多い農薬の一種であるPQ・DQについて、従来の分析方法では法薬毒物学鑑定として不十分であった点を克服した体系的分析法を確立した。迅速スクリーニングに始まり、十分な証明力を持つ正確な定性分析、精密性の高い定量分析からなる本法は、法薬毒物学鑑定としてのPQ・DQの分析法として極めて有用であり、今後の法科学分野への活用が期待される。

謝辞

本論文をまとめるにあたり，終始懇切丁寧なる御指導，御鞭撻並びに御高閲を賜りました星薬科大学 薬品分析化学教室 教授 斉藤貢一博士に深く感謝申し上げます。

入所以来，研究の進め方，論文の書き方をはじめ，研究の細部にわたりひとかたならぬ御指導を賜りました千葉県警察本部 科学捜査研究所 金子毅博士に厚く御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり，有益な御助言を頂きました千葉県警察本部 科学捜査研究所 濱本拓也博士に心より感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり，多大なる御支援を頂きました千葉県警察本部 科学捜査研究所の皆様には感謝いたします。

最後に，これまで筆者を温かく見守ってくれた母 孝子・亡き父 孝雄と，心の支えとなってくれた妻 知佳，息子 景友・明日真に感謝します。

実験の部

1 試薬，標準溶液および試料

1-1 試薬(市販品)

PQ ジクロリド，DQ ジブロミド水和物は，Dr. Ehrenstorfer GmbH 製のものを用いた。(第 I, II, III 章)

メタノールは関東化学製の電子工業用，和光純薬工業製の特級品または LC/MS 用のものを用いた。(第 I, II, III 章)

ギ酸およびアセトニトリルは，和光純薬工業製の LC/MS 用のものを用いた。(第 I, II, III 章)

CHCA は Sigma-Aldrich 製，DHB は東京化成工業製の MALDI 用のものを用いた。(第 I 章)

ヨードメタン- d_3 (99.9 atom%) および 2,2'-ビピリジン- d_8 (99.2 atom%) は CDN Isotopes 製のものを用いた。(第 III 章)

1,2-ジブromoエタン- d_4 (99 atom%)は，ISOTEC 製のものを用いた。(第 III 章)
リン酸塩 pH 標準液(pH 7.41) は，和光純薬工業製のものを用いた。(第 III 章)

その他の試薬は，和光純薬工業製の特級品を用いた。(第 I, II, III 章)

ピペットチップ型 SPE デバイス OMIX[®] Pipette Tips (C4, C18, SCX, 2.4 mg/100 μ L)は，VARIAN 製のものを用いた。(第 I 章)

SEP カートリッジ Oasis[®] WCX(150 mg/6 mL, 粒子径 30 μ m), Oasis[®] MAX (60 mg/3 mL, 粒子径 60 μ m)は Waters 製のものを，EVOLUTE[®] WCX cartridges (200 mg/6 mL, 粒子径 50 μ m)は Biotage 製のものを用いた。(第 I, II, III 章)

Ultrafree[®] - MC(孔径 0.22 μ m)は，Merck-Millipore 製のものを用いた。(第 II 章)

1-2 PQ・DQ 標準溶液(第 I, II, III 章)

PQ ジクロリドおよび DQ ジブロミド水和物を 105 °C で 2 時間乾燥した後，PQ ジクロリド 13.8 mg，DQ ジブロミド 18.7 mg を秤りとり，それぞれ超純水 100 mL に溶解し，PQ・DQ 標準溶液(各 100 μ g/mL)を調製した。これらをヒト血液およびヒト尿に適宜添加することで，必要な濃度の試料をそれぞれ

調製した。

1-3 試薬(合成品)

1-3-1 PQ 酸化体⁶⁷⁾ (第 II 章)

PQ ジクロリド 2.57 g に蒸留水 10 mL を加えて得られた水溶液に、フェリシアン化カリウム 17 g を溶解した 5 M 水酸化ナトリウム水溶液 200 mL を 10 分間かけて滴下し、その後、15 分間攪拌した。反応液をクロロホルムで抽出した後、抽出液を無水硫酸ナトリウムで脱水し、エバポレーターで濃縮乾固した。得られた残渣をクロロホルム 5 mL に溶解し、更にジエチルエーテル 45 mL を加えた後、冷凍庫で -20 °C で冷却して析出したものを吸引ろ過して分取した。この再結晶の操作を更に 2 回繰り返した後、減圧乾燥により余剰の有機溶剤を留去し、PQ 酸化体の白色粉末を得た(収率 26 %)。

1-3-2 DQ 酸化体⁶⁷⁾ (第 II 章)

DQ ジブロミド 3.44 g に蒸留水 12.5 mL を加えて得られた水溶液に、フェリシアン化カリウム 14 g を溶解した 5 M 水酸化ナトリウム水溶液 200 mL を 40 分間かけて滴下した。反応液を 10 M 塩酸で中性にした後、クロロホルムで抽出し、得られた抽出液を無水硫酸ナトリウムで脱水し、エバポレーターで濃縮乾固した。得られた残渣をクロロホルム 1 mL に溶解し、更に *n*-ペンタン 20 mL を加えた後、冷凍庫で -20 °C で冷却して析出したものを吸引ろ過により分取した。この再結晶の操作を更に 2 回繰り返した後、減圧乾燥により余剰の有機溶剤を留去し、DQ 酸化体の黄土色粉末を得た(収率 3.3 %)。

1-3-3 PQ-*d*₆ ジイオジド(第 III 章)

4,4'-ビピリジン 100 mg およびヨードメタン-*d*₃ 1mL を 7 mL 容量のスクルーキャップ付きガラス試験管に入れて密栓し、恒温槽を用いて 100 °C で加温(24 h)した。未反応のヨードメタン-*d*₃ を室温下、窒素パージにより留去した後、反応物をクロロホルム 7 mL で 3 回、更に、メタノール 7 mL で 3 回洗浄した。その後、吸引ろ過、減圧乾燥により余剰のメタノールを除去し、PQ-*d*₆ ジイ

オジドの橙色粉末を得た(収率 89 %).

1-3-4 DQ- d_8 ジブロミド(第 III 章)

2,2'-ビピリジン- d_8 100mg および 1,2-ジブロモエタン 0.6 mL を 7 mL 容量のスクリュウキャップ付きガラス試験管に入れて密栓し, 恒温槽を用いて 125 °C で加温(72 h)した. 反応物は *n*-ヘキサン 7 mL で 3 回, クロロホルム 7 mL で 3 回, 更に, イソプロパノール 7 mL で 3 回洗浄した. その後, 吸引ろ過, 減圧乾燥により余剰のイソプロパノールを除去し, DQ- d_8 ジブロミドの黄色粉末を得た(収率 93 %).

1-3-5 DQ- d_4 ジブロミド(第 III 章)

2,2'-ビピリジン 100mg および 1,2-ジブロモエタン- d_4 0.6 mL を 7 mL 容量のスクリュウキャップ付きガラス試験管に入れて密栓し, 恒温槽を用いて 125 °C で加温(72 h)した. 反応物は *n*-ヘキサン 7 mL で 3 回, クロロホルム 7 mL で 3 回, 更に, イソプロパノール 7 mL で 3 回洗浄した. その後, 吸引ろ過, 減圧乾燥により余剰のイソプロパノールを除去し, DQ- d_4 ジブロミドの黄色粉末を得た(収率 90 %).

1-4 試料

1-4-1 清涼飲料水試料(第 I 章)

清涼飲料水試料は, コカ・コーラ(日本コカ・コーラ)および雪印コーヒー(雪印メグミルク)に PQ ジクロリドおよび DQ ジブロミドの混合製剤(PQ ジクロリド ; 5 %, DQ ジブロミド ; 7 %, w/w)であるプリグロックス L(シンジェンタジャパン)を体積分率 0.01 %, 0.1 %, 1 %となるように添加して調製した.

1-4-2 生体試料(第 I, II, III 章)

ヒト血液(全血)は, 匿名化されたコスモバイオ製のものをを用いた.

ヒト尿は, 匿名化されたコスモバイオ製のもの(第 I, III 章)および日本法科学技術学会ヒト対象医学的研究等倫理審査委員会の承認を得て健常人から提供

されたもの(第 II 章)を用いた。健常人から提供を受けるにあたり、提供者に研究内容、研究期間、予測される結果および危険性、並びに個人情報(匿名化)の方法について説明した後、同意書により書面による同意を得た。

2 器具および装置

2-1 器具(第 I 章)

マイクロピペット:ピペットマン 200 μ L 用, ギルソン製

2-2 装置

微量高速冷却遠心機 : MX-305, TOMY 製 (第 I, II, III 章)

パーソナル遠心機 : CHIBITAN II (10000 rpm), メルクミリポア製(第 I 章)

高速振盪機 : CM-1000, EYELA 製(第 I, II, III 章)

超音波洗浄機 : LEO-80, LEO 製(第 I, II 章)

微量真空乾燥器 : FVM-303D, 東京硝子器械製(第 II, III 章)

アルミブロック恒温槽サーモバス : MG-2000, EYELA 製 (第 I, II, III 章)

ロータリーエバポレーター : R-210, BÜCHI 製 (第 II 章)

MALDI-TOF-MS : ultrafleXtreme, Bruker Daltonics 製 (第 I 章)

LC : alliance, Waters 製(第 I 章)

LC/MS : alliance (LC 部), Waters 製 + ZMD (MS 部), Waters 製 (第 II 章)

GC/MS : GCMS-QP2010, 島津製作所製(第 II 章)

LC/IT-MS : Prominence UFLC (LC 部), 島津製作所製

+ LTQ XLTM (IT-MS 部), Thermo fisher scientific 製 (第 III 章)

3 実験方法

3-1 第 I 章に関する実験

3-1-1 C18 および C4 タイプによる μ SPE

OMIX[®] Pipette Tips をマイクロピペットに取り付け、メタノール 200 μ L を 1 回、蒸留水 200 μ L を 1 回順次通液することによりコンディショニングした後、希釈した清涼飲料水試料 200 μ L(製剤添加試料 100 μ L を 0.1 M 炭酸緩衝液(pH 10) 100 μ L で希釈したもの)が入ったバイアル中で吸引・吐出操作を 10 回繰り返すことにより、PQ・DQ を固相上に保持した。次に、蒸留水 200 μ L を 2 回、メタノール 200 μ L を 2 回通液してクリーンアップした後、5 mM ギ酸アンモニウム緩衝液(pH 2.5)100 μ L 中で吸引・吐出を 10 回繰り返して PQ・DQ を溶出し、この抽出液を呈色試験に供した。

3-1-2 SCX タイプによる μ SPE

OMIX[®] Pipette Tips をマイクロピペットに取り付け、メタノール 200 μ L を 1 回、蒸留水 200 μ L を 1 回順次通液することによりコンディショニングした後、希釈した清涼飲料水試料 200 μ L(製剤添加試料 100 μ L を蒸留水 100 μ L で希釈したもの)が入ったバイアル中で吸引・吐出操作を 10 回繰り返すことにより、PQ および DQ を固相上に保持した。次に、蒸留水 200 μ L を 2 回、メタノール 200 μ L を 2 回通液してクリーンアップした後、飽和食塩水 100 μ L 中で吸引・吐出を 10 回繰り返して PQ・DQ を溶出し、この抽出液を呈色試験に供した。

3-1-3 呈色試験

前記 3-1-1 および 3-1-2 で得られた抽出液に 1 M 水酸化ナトリウム水溶液およびヒドロサルファイトナトリウムを添加し、呈色を確認した。

3-1-4 LC による回収率の算出

μ SPE により抽出された PQ・DQ の回収率は、得られた抽出液について、以

下に示す LC 条件で測定し、そのピーク面積値と PQ・DQ の標準溶液から得られたピーク面積値に基づく検量線から濃度を算出した。

カラム: HS- F5(150 mm × 2.0 mm i.d., 粒子径 5 μm, SUPELCO 製), 40 °C

移動相: 5 mM ギ酸アンモニウム緩衝液(pH 3.5)/メタノール混液(94:6, v/v)

移動相流量: 0.2 mL/min

試料注入量: 10 μL

検出波長: 258 nm (PQ), 309 nm (DQ)

3-1-5 固相懸濁液の調製

SPE カートリッジ Oasis® WCX(150 mg/6 mL, 粒子径 30 μm)にメタノール 6 mL, 超純水 6 mL, メタノール 6 mL を順次通液して固相を洗浄した後, 窒素ガスを通じ, 残存したメタノールを留去し, 固相を乾燥させた。次に, カートリッジのフリットを取り外して固相 100 mg を分取し, 超純水 10 mL を加えて 10 mg/mL の固相懸濁液を調製した。

3-1-6 マトリックス溶液の調製

CHCA を 20 mg 秤りとり, これに 0.2 %トリフルオロ酢酸水溶液/アセトニトリル混液(1:1, v/v)1 mL 加えて超音波処理(5 min)を行い, 遠心分離(10000 rpm, 1 min)により溶け残った CHCA を沈殿させて得られた上清をマトリックス溶液とした。

3-1-7 除タンパク処理

血液試料 0.1 mL を 1.5 mL 容量のプラスチック製マイクロチューブに採取し, 超純水 0.1 mL で希釈した後, アセトニトリル 0.4 mL 加えて高速振盪機で攪拌(1 min)し, 遠心分離(10000 rpm, 1 min)を行い, 得られた上清 0.5 mL に対し SPDE を行った。

3-1-8 SPDE による PQ および DQ の抽出

1) 血液試料からの抽出

3-1-7 により得られた血液試料の除タンパク液 0.5 mL を 1.5 mL 容量のプラス

チック製マイクロチューブに入れ，ここに超純水 0.9 mL および固相懸濁液 0.1 mL を加えて高速振盪機で攪拌 (30 s)した後，遠心分離(10000 rpm, 30 s)し，上清を除去した．底部に残った固相に超純水 1 mL を加えて攪拌(10 s)して洗浄し，遠心分離を行い，上清を除去した．次に，メタノール 1 mL を加えて同様の操作を繰り返した．わずかに残ったメタノールは，マイクロチューブを恒温槽 (60 °C)上で加温することで留去した．この乾燥した固相にマトリックス溶液 8 μ L を加えて超音波処理(1 min)により溶出した後，遠心分離(10000 rpm, 30 s)を行い，得られた抽出液 0.5 μ L をターゲットプレートに塗布した．

2) 尿試料からの抽出

尿試料を遠心分離して得られた上清 0.1 mL を 1.5 mL 容量のプラスチック製マイクロチューブに入れ，超純水 1.3 mL を加えて希釈した後，固相懸濁液 0.1 mL を加え，高速振盪機で攪拌(30 s)した後，遠心分離(10000 rpm, 30 s)し，上清を除去した．この後の洗浄，溶出は，上記 1)と同様の方法で行った．

3-1-9 MALDI-TOF-MS

MALDI-TOF-MS の測定は，次の装置条件で行った．

レーザー: SmartbeamTM-II (Nd:YAG 355 nm)

繰り返し周波数: 1000 Hz

レーザー出力: 50 %

レーザーショット数: 500 回

測定モード: ポジティブリフレクターモード(m/z 0-300)

MS キャリブレーション: m/z 190.0498 (CHCA, [M+H]⁺)

m/z 172.0393 (CHCA, [M-H₂O+H]⁺)

質量分解能: PQ および DQ の M⁺で約 2000~4000

質量誤差: 6.4 ppm (PQ, M⁺の計算精密質量 186.1157)

8.1 ppm (DQ, M⁺の計算精密質量 184.1000)

ターゲットプレート: MTP 384 target plate ground steel (Burker Daltonics 製)

試料量: 0.5 μ L

3-1-10 LC/MS による回収率の算出

SPDE の回収率については、溶出液が高濃度の CHCA を含有し、LC/IT-MS での分析が困難で算出できなかったため、0.2 %トリフルオロ酢酸水溶液/アセトニトリル混液 (1:1, v/v) を溶出液として用いて得られた抽出物について、以下の条件による LC/IT-MS を行い、マトリックスマッチング法により作成した検量線を基に、検出された PQ・DQ のピーク面積から回収率を算出した。

カラム: ZIC[®]-pHILIC

(150 mm × 2.1 mm i.d., 粒子径 5 μm, メルクミリポア製)

移動相 A: 150 mM ギ酸アンモニウム緩衝液(pH 3.5)

移動相 B: メタノール

グラジエントプログラム: A:B=10:90(0 min)→90:10(10 min)

移動相流量: 0.2 mL/min

カラムオーブン温度: 40 °C

イオン化法:エレクトロスプレーイオン化(ポジティブ)

測定モード:プロダクトイオンスキャン

プリカーサーイオン: m/z 186(PQ), m/z 183(DQ)

3-2 第 II 章に関する実験

3-2-1 血液試料の除タンパク処理

血液試料 0.75 mL を 2 mL 容量のプラスチック製マイクロチューブに入れ、100 mg/mL スルホサリチル酸⁶⁸⁾水溶液 0.75 mL を加えて攪拌した後、遠心分離して得られた上清を後述の酸化反応に用いた。

3-2-2 尿試料に対する SPDE

尿試料を遠心分離して得られた上清 0.5 mL, 蒸留水 1.5 mL および Oasis[®] WCX 固相约 20 mg を 2 mL 容量のプラスチック製マイクロチューブに入れ、1 分間攪拌した後、遠心分離して上清を除去した。底部に残った Oasis[®] WCX 固相を、蒸留水 1 mL で 1 回、メタノール 1 mL で 2 回洗浄し、最後に 0.1 M 塩酸 1 mL を加えて 1 分間攪拌し、遠心分離して得られた上清を後述の酸化反応に用

いた.

3-2-3 酸化反応

フェリシアン化カリウム水溶液(0.1 mg/mL, 0.25 mg/mL, 1 mg/mL, 2.5 mg/mL, 10 mg/mL, 100 mg/mL) 0.9 mL と水酸化ナトリウム水溶液(7 M, 9 M, 11 M, 13 M, 15 M, 20 M) 0.9 mL を 10 mL 容量のプラスチック試験管に入れて予めよく混合しておき, 高速振盪機で攪拌しながら, ここに 3-2-1 に示す除タンパク処理により得られた上清, または 3-2-2 に示す SPDE により得られた溶出液 0.9 mL を加えて高速振盪機で攪拌し, 1 分間静置して反応させた.

3-2-4 SPE

SPE カートリッジ Oasis[®] MAX (60 mg/3 mL, 粒子径 60 µm) にメタノール 3 mL, 蒸留水 3 mL を順次通液してコンディショニングした後, 3-2-3 で得られた反応液全量を負荷した. 蒸留水 6 mL で洗浄した後, ヘキサン 3 mL で洗浄し, メタノール 3 mL で溶出した. 溶出液を恒温槽(60 °C)上で加温しながら窒素気流下で乾固し, 残渣に LC/MS 初期移動相 0.1 mL を加え, これを Ultrafree[®]-MC(孔径 0.22 µm)でフィルターろ過して得られたろ液を LC/MS 用試料とした.

3-2-5 LC/MS

LC/MS の測定は, 以下の条件で行った.

ガードカラム: L-column2 ODS(5 mm × 2.0 mm i.d., 粒子径 5 µm,
化学物質評価機構製)

分析カラム: L-column2 ODS(150 mm × 2.1 mm i.d., 粒子径 5 µm,
化学物質評価機構製)

カラムオープン温度: 35 °C

移動相 A: 10 mM ギ酸アンモニウム緩衝液(pH 3)

または 10 mM 酢酸アンモニウム緩衝液(pH 5)

または 10 mM 酢酸アンモニウム水溶液(pH 6.5)

移動相 B: メタノールまたはアセトニトリル

グラジエントプログラム: A:B=85:15(5 min)→5:95(15 min)

移動相流量: 0.2 mL/min

イオン化法:エレクトロスプレーイオン化(ポジティブ)

測定モード:スキャンモード(m/z 80-300)

SIR モード(PQ 酸化体: m/z 217, DQ 酸化体: m/z 215)

キャピラリー電圧: 3.5 kV

コーン電圧: 40, 50, 60 V

ソースブロック温度: 120 °C

脱溶媒温度: 400 °C

脱溶媒ガス(窒素)流量: 500 L/h

試料注入量: 10 μ L

3-2-6 GC/MS

GC/MS の測定は、以下の条件で行った。

カラム: ZB-5MSi(30 m \times 0.25 mm i.d., 膜厚 0.25 μ m, Phenomenex 製)

カラムオーブンプログラム: 50 °C \rightarrow 330 °C (20 °C/min で昇温)

キャリアガス: ヘリウム, 40 cm/s(定線速度モード)

注入モード: スプリットレスモード(0.5 min), 250 °C

イオン化法: EI 法

測定モード: スキャンモード(m/z 33-650)

3-3 第 III 章に関する実験

3-3-1 SPE

血液試料 1 mL または尿試料 1 mL を 15 mL 容量のスクリュウキャップ付きプラスチック試験管に採取し、これに内部標準溶液(PQ- d_6 , DQ- d_8 の混合水溶液, 各 1 μ g/mL) 1 mL, リン酸塩 pH 標準液(pH 7.41) 1 mL, 超純水 3 mL を加えた後、高速振盪機で攪拌(30 s)し、遠心分離(12000 rpm, 5 min)した。得られた上清を、予めメタノール 6 mL, 超純水 6 mL でコンディショニングした SPE カートリッジ EVOLUTE[®] WCX (200 mg/6 mL, 粒子径 50 μ m) に負荷した。カー

トリッジを超純水 6 mL, メタノール 6 mL で順次洗浄し, メタノール/塩酸混液 (98+2, v/v) 3 mL で溶出した. 溶出液を恒温槽(60 °C)上で加温しながら窒素気流下で乾固し, 残渣に超純水 0.5 mL を加えて高速振盪機で攪拌した後, 遠心分離(12000 rpm, 1 分間)し, 得られた上清を LC/IT-MS 用の試料とした.

3-3-2 LC/IT-MS

LC/IT-MS の測定は, 以下の条件で行った.

ガードカラム: ZIC[®]-pHILIC (20 mm × 2.1 mm i.d., 粒子径 5 μm, メルクミリポア製)

分析カラム: ZIC[®]-pHILIC (150 mm × 2.1 mm i.d., 粒子径 5 μm, メルクミリポア製)

カラムオープン温度: 40 °C

移動相 A: 25 mM ギ酸アンモニウム緩衝液(pH 3.5)

または 50 mM ギ酸アンモニウム緩衝液(pH 3.5)

または 100 mM ギ酸アンモニウム緩衝液(pH 3.5)

または 150 mM ギ酸アンモニウム緩衝液(pH 3.5)

または 200 mM ギ酸アンモニウム緩衝液(pH 3.5)

移動相 B: メタノール

グラジエントプログラム: A:B=10:90 (0 min)→90:10 (10 min)

移動相流量: 0.2 mL/min

試料注入量: 10 μL

イオン化法: エレクトロスプレーイオン化(ポジティブ)

測定モード: SRM モード, m/z 186→171 (PQ), m/z 192→174 (PQ- d_6)

m/z 183→157 (DQ), m/z 191→165 (DQ- d_8)

スプレー電圧: 5 kV

キャピラリー電圧: 35 V

キャピラリー温度: 300 °C

チューブレンズ電圧: 60 V

ソースフラグメンテーション電圧: 10 V

ノーマライズドコリジョンエネルギー: 35 %

コリジョンガス: ヘリウム

シースガス(窒素)流量: 40 (arbitrary units)

オグジュアリーガス(窒素)流量: 10 (arbitrary units)

3-3-3 血液試料, 尿試料からの SPE による PQ・DQ の回収率の算出方法

回収率は, 事前添加試料と事後添加試料について, LC/IT-MS により得られた PQ・DQ と内部標準物質(PQ- d_6 , DQ- d_8)の面積比を検量線の範囲内で比較することにより算出した. 事前添加試料は, 既知濃度(0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ または 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) の PQ・DQ を含有する血液試料または尿試料について, SPE を行った後, 内部標準(PQ- d_6 , DQ- d_8)溶液を加えることにより調製した. 事後添加試料は, ブランク血液, ブランク尿について SPE を行った後, 標準溶液(0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ または 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)および内部標準(PQ- d_6 , DQ- d_8)溶液を加えることにより調製し, これを回収率 100 %のものとして, 事前添加試料と比較し, 回収率を算出した.

引用文献

- 1) 角田紀子, 最近の薬毒物中毒事故について. *J. Health Sci.*, **45**, 356-366, 1999.
- 2) 科学警察研究所 : 薬毒物による中毒事故の発生状況. 警察庁, 東京, 2018.
- 3) 大津留修, 角田紀子, 皆川節, 農薬試験法, 日本薬学会編, 薬毒物化学試験法と注解 2006. 262-266, 東京化学同人, 東京, 2006.
- 4) Tomita M., Okuyama T. and Nigo Y., Simultaneous determination of paraquat and diquat in serum using capillary electrophoresis. *Biomed. Chromatogr.*, **6**, 91-94, 1992.
- 5) Wu W. S. and Tsai J. L., Simultaneous determination of paraquat and diquat in urine by capillary electrophoresis. *Kaohsiung J. Med. Sci.*, **14**, 76-80, 1998.
- 6) Vinner E., Stievenart M., Humbert L., Mathieu D. and Lhermitte M., Separation and quantification of paraquat and diquat in serum and urine by capillary electrophoresis. *Biomed. Chromatogr.*, **15**, 342-347, 2001.
- 7) Ishiwata T., Onuki S., Okada H. and Ohashi K., Determination of paraquat and diquat in human blood by capillary electrophoresis after solid-phase extraction using an OASIS MCX[®] cartridge. *Jpn. J. Forensic Toxicol.*, **20**, 284-294, 2002.
- 8) 成田有史, 富岡なおこ, 飯田英己, 柳幸男, 皆川節, キャピラリー電気泳動による血液中のパラコートおよびジクワットの分析. 日本法科学技術学会誌, **10**, 171-178, 2005.
- 9) Lanaro R., Costa J. L., Fernandes L. C. R., Resende R. R. and Tavares M. F. M., Detection of paraquat in oral fluid, plasma, and urine by capillary electrophoresis for diagnosis of acute poisoning. *J. Anal. Toxicol.*, **35**, 274-279, 2011.
- 10) de Almeida R. M. and Yonamie M., Gas chromatographic-mass spectrometric method for the determination of the herbicides paraquat and diquat in plasma and urine samples. *J. Chromatogr. B*, **853**, 260-264, 2007.
- 11) Saito T., Fukushima T., Yui Y., Miyazaki S., Nakamoto A., Namera A. and Inokuchi S., Monolithic spin column extraction and GC-MS for the simultaneous assay of diquat, paraquat, and fenitrothion in human serum and urine. *Anal.*

- Bioanal. Chem.*, **400**, 25-31, 2011.
- 12) Moreira P. N., de Pinho P. G., Baltazar M. T., Bastos M. L., Carvalho F. and Dinis-Oliveira R. J., Quantification of paraquat in postmortem samples by gas chromatography-ion trap mass spectrometry and review of the literature. *Biomed. Chromatogr.*, **26**, 338-349, 2012.
 - 13) Gao L., Liu J., Wang C., Liu G., Niu X., Shu C. and Zhu J., Fast determination of paraquat in plasma and urine samples by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, **944**, 136-140, 2014.
 - 14) Fuke C., Arao T., Morinaga Y., Takaesu H., Ameno K. and Miyazaki T., Analysis of paraquat, diquat and two metabolites in biological materials by high-performance liquid chromatography. *Leg. Med.*, **4**, 156-163, 2002.
 - 15) Paixão P., Costa P., Bugalho T., Fidalgo C. and Pereira L. M., Simple method for determination of paraquat in plasma and serum of human patients by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B*, **775**, 109-113, 2002.
 - 16) Brunetto M. R., Morales A. R., Gallignani M., Burguera J. L. and Burguera M., Determination of paraquat in human blood plasma using reversed-phase ion-pair high-performance liquid chromatography with direct sample injection. *Talanta*, **59**, 913-921, 2003.
 - 17) Ito M., Hori Y., Fujisawa M., Oda A., Katsuyama S., Hirose Y. and Yoshioka T., Rapid analysis method for paraquat and diquat in the serum using ion-pair high-performance liquid chromatography. *Biol. Pharm. Bull.*, **28**, 725-728, 2005.
 - 18) Hara S., Sasaki N., Takase D., Shiotsuka S., Ogata K., Futagami K. and Tamura K., Rapid and sensitive HPLC method for the simultaneous determination of paraquat and diquat in human serum. *Anal. Sci.*, **23**, 523-526, 2007.
 - 19) Zou Y., Shi Y., Bai Y., Tang J., Chen Y. and Wang L., An improved approach for extraction and high-performance liquid chromatography analysis of paraquat in human plasma. *J. Chromatogr. B*, **879**, 1809-1812, 2011.
 - 20) 新藤敬梧, 岸川直哉, 大山要, 黒田直敬, 化学発光 HPLC による血漿中パラコート及びジクワットの同時定量. *分析化学*, **64**, 581-587, 2015.
 - 21) Sun B. and Chen Y., A simple and rapid method for detection of paraquat in human

- plasma by high-performance liquid chromatography. *Int. J. Clin. Exp. Med.* **8**, 17067-17071, 2015
- 22) Lee X. P., Kumazawa T., Fujishiro M., Hasegawa C., Arinobu T., Seno H., Ishii A. and Sato K., Determination of paraquat and diquat in human body fluids by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.*, **39**, 1147-1152, 2004.
- 23) Ariffin M. M. and Anderson R. A., LC/MS/MS analysis of quaternary ammonium drugs and herbicides in whole blood. *J. Chromatogr. B*, **842**, 91-97, 2006.
- 24) Wang K. C., Chen S. M., Hsu J. F., Cheng S. G. and Lee C. K., Simultaneous detection and quantitation of highly water-soluble herbicides in serum using ion-pair liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, **876**, 211-218, 2008.
- 25) Whitehead Jr. R. D., Montesano M. A., Jayatilaka N. K., Buckley B., Winnik B., Needham L. L. and Barr D. B., Method for measurement of the quaternary amine compounds paraquat and diquat in human urine using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, **878**, 2548-2553, 2010.
- 26) Wang Z., Wang Z. and Xing J., The quantitative analysis of paraquat in biological samples by liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry. *J. Anal. Toxicol.*, **35**, 23-27, 2011.
- 27) Wunnakup K., Medley G. A., Liu X., Grice J. E., Jayasinghe S., Gawarammana I., Buckey N. A. and Roberts M. S., Simple and sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry methods for quantification of paraquat in plasma and urine: application to experimental and clinical toxicological studies. *J. Chromatogr. B*, **879**, 3047-3052, 2011.
- 28) Yoshioka N., Asano M., Kuse A., Matsuoka T., Akiyama Y., Mitsuhashi T., Nagasaki Y. and Ueno Y., Rapid and sensitive quantification of paraquat and diquat in human serum by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry using atmospheric pressure photoionization. *Forensic Toxicol.*, **30**, 135-141, 2012.

- 29) Ruan X. L., Qiu J. J., Wu C., Huang T., Meng R. B. and Lai Y. Q., Magnetic single-walled carbon nanotubes-dispersive solid phase extraction method combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of paraquat in urine. *J. Chromatogr. B*, **965**, 85-90, 2014.
- 30) Lu H., Yu J., Wu L., Xing J., Wang J., Huang P., Zhang J., Xiao H. and Gao R., Optimized ultra performance liquid chromatography tandem high resolution mass spectrometry method for the quantification of paraquat in plasma and urine. *J. Chromatogr. B*, **1027**, 96-102, 2016.
- 31) Tsao Y. C., Lai Y. C., Liu H. C., Liu R. H. and Lin D. L., Simultaneous determination and quantitation of paraquat, diquat, glufosinate and glyphosate in postmortem blood and urine by LC-MS-MS. *J. Anal. Toxicol.*, **40**, 427-436, 2016.
- 32) 植木眞琴, 薬毒物検査, 鑑識分野における質量分析法. *ぶんせき*, **11**, 630-635, 2003.
- 33) 角田紀子, サリン事件と質量分析. *J. Mass Spectrum. Soc. Jpn.*, **53**, 157-163, 2005.
- 34) 太田彦人, 食品分析と犯罪捜査. *化学と生物*, **48**, 337-345, 2010.
- 35) 太田彦人, 高山成明, 地中啓, 角田紀子, 山室匡史, 農薬試験法, 日本薬学会編, 薬毒物化学試験法と注解 2017. 332-336, 東京化学同人, 東京, 2017.
- 36) Díaz T. G., Cabanillas A. G. and Salinas F., Square-wave and differential pulse oxidative voltammetric determination of diquat and paraquat in alkaline medium. *Electroanalysis*, **12**, 616-621, 2000.
- 37) Homer R. F. and Tomlinson T. E., Redox properties of some dipyridyl quaternary salts. *Nature*, **184**, 2012-2013, 1959.
- 38) Homer R. F., Mees G. C. and Tomlinson T. E., Mode of action of quaternary salts as herbicides. *J. Sci. Food Agric.*, **11**, 309-315, 1960.
- 39) 角田紀子, Sep-Pak C₁₈ カートリッジによるパラコートを選択的抽出. *衛生化学*, **29**, 206-211, 1983.
- 40) 佐藤常寿, Sep-Pak C₁₈ カートリッジによるジクワットの抽出について. *科学警察研究所報告*, **41**, 265-268, 1988.
- 41) Hasegawa C., Kumazawa T., Lee X. P., Fujishiro M., Kuriki A., Marumo A., Seno

- H. and Sato K., Simultaneous determination of ten antihistamine drugs in human plasma using pipette tip solid-phase extraction and gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **20**, 537-543, 2006.
- 42) Kumazawa T., Hasegawa C., Lee X. P., Marumo A., Shinmen N., Ishii A., Seno H. and Sato K., Pipette tip solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry for the determination of mequitazine in human plasma. *Talanta*, **70**, 474-478, 2006.
- 43) Hasegawa C., Kumazawa T., Lee X. P., Marumo A., Shinmen N., Seno H. and Sato K., Pipette tip solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry for the determination of methamphetamine and amphetamine in human whole blood. *Anal. Bioanal. Chem.*, **389**, 563-570, 2007.
- 44) Kumazawa T., Hasegawa C., Lee X. P., Hara K., Seno H., Suzuki O. and Sato K., Simultaneous determination of methamphetamine and amphetamine in human urine using pipette tip solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **44**, 602-607, 2007
- 45) Lee X. P., Hasegawa C., Kumazawa T., Shinmen N., Shoji Y., Seno H. and Sato K., Determination of tricyclic antidepressants in human plasma using pipette tip solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Sep. Sci.*, **31**, 2265-2271, 2008.
- 46) Kumazawa T., Hasegawa C., Uchigasaki S., Lee X. P., Suzuki O. and Sato K., Quantitative determination of phenothiazine derivatives in human plasma using monolithic silica solid-phase extraction tips and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **1218**, 2521-2527, 2011.
- 47) Hasegawa C., Kumazawa T., Uchigasaki S., Lee X. P., Sato K., Terada M. and Kurosaki K., Determination of dextromethorphanin human plasma using pipette tip solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.*, **401**, 2215-2223, 2011.
- 48) Hasegawa C., Kumazawa T., Terada M., Lee X. P., Sato K., Uchigasaki S. and Kurosaki K., A new method for quantitative determination of dimemorfan in human plasma using monolithic silica solid-phase extraction tips. *Leg. Med.*, **14**,

267-271, 2012.

- 49) Hayashi D., Kumazawa T., Hasegawa C., Lee X. P., Marumo A., Uchigasaki S., Kawamura M. and Sato K., A simple and reliable method for quantifying plasma concentrations of tetracyclic antidepressants using monolithic silica solid-phase extraction tips. *Forensic Toxicol.*, **30**, 98-105, 2012.
- 50) Gonmori K., Minakata K., Suzuki M., Yamagishi I., Nozawa H., Hasegawa K., Wurita A., Watanabe K. and Suzuki O., MALDI-TOF mass spectrometric analysis of α -amanitin, β -amanitin, and phalloidin in urine. *Forensic Toxicol.*, **30**, 179-184, 2012.
- 51) Minakata K., Yamagishi I., Nozawa H., Gonmori K., Hasegawa K., Wurita A., Suzuki M., Watanabe K. and Suzuki O., MALDI-TOF mass spectrometric determination of 11 phenothiazines with heavy side chains in urine. *Forensic Toxicol.*, **31**, 138-144, 2013.
- 52) Minakata K., Yamagishi I., Nozawa H., Hasegawa K., Wurita A., Gonmori K., Suzuki M., Watanabe K. and Suzuki O., MALDI-TOF mass spectrometric determination of four pyrrolidino cathinones in human blood. *Forensic Toxicol.*, **32**, 169-175, 2014.
- 53) Minakata K., Nozawa H., Yamagishi I., Hasegawa K., Wurita A., Gonmori K., Suzuki M., Watanabe K. and Suzuki O., MALDI-TOF mass spectrometric determination of four amphetamines in blood. *Forensic Toxicol.*, **32**, 299-304, 2014.
- 54) Minakata K., Yamagishi I., Nozawa H., Hasegawa K., Wurita A., Gonmori K., Suzuki M., Watanabe K. and Suzuki O., Determination of new pyrrolidino cathinone derivatives, PVT, F-PVP, MPHP, PV8, PV9 and F-PV9, in human blood by MALDI-Q-TOF mass spectrometry. *Forensic Toxicol.*, **33**, 148-154, 2015.
- 55) Minakata K., Yamagishi I., Nozawa H., Hasegawa K., Gonmori K., Suzuki M., Wurita A., Suzuki O. and Watanabe K., Semiquantitation of diphenidine in tissue sections obtained from a human cadaver in a poisoning case by direct MALDI-QTOF mass spectrometry. *Forensic Toxicol.*, **34**, 151-157, 2016.
- 56) Nozawa H., Minakata K., Yamagishi I., Hasegawa K., Suzuki M., Gonmori K.,

- Suzuki O. and Watanabe K., Simultaneous determination of cyclic antidepressants and their related drugs and the estimation of new metabolites in human whole blood and urine by MALDI-QTOF-mass spectrometry. *Forensic Toxicol.*, **34**, 244-255, 2016.
- 57) Nozawa H., Minakata K., Yamagishi I., Hasegawa K., Suzuki M., Gonmori K., Suzuki O. and Watanabe K., Application of MALDI-QTOF mass spectrometry to the determination of timiperone in whole blood, and estimation of its new metabolites in urine of a deceased subject who had been treated with timiperone antemortem. *Forensic Toxicol.*, **34**, 363-371, 2016.
- 58) Minakata K., Yamagishi I., Nozawa H., Hasegawa K., Suzuki M., Gonmori K., Suzuki O. and Watanabe K., Quantitation of biperiden in whole blood by MALDI-QTOF tandem mass spectrometry, and estimation of new metabolites in urine of deceased subjects treated with biperiden antemortem. *Forensic Toxicol.*, **35**, 86-93, 2017.
- 59) Sakamoto Y., Jinno Y., Shinodzuka I., Iwasaki Y., Ito R. and Saito K., Sample cleanup using solid-phase dispersive extraction for determination of vancomycin in serum. *Anal. Sci.*, **30**, 271-275, 2014.
- 60) Saito K., Kikuchi Y. and Saito R., Solid-phase dispersive extraction method for analysis of benzodiazepine drugs in serum and urine samples. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **100**, 28-32, 2014.
- 61) 阿久津守, 杉江謙一, 斉藤貢一, 固相分散抽出-GC/MS 法によるヒト血清中合成カンナビノイドの分析法の検討. 日本法科学技術学会誌, **21**, 75-85, 2016.
- 62) SWGDRUG Recommendations Edition 7.1 2016-June-09, Scientific Working Group for the Analysis of Seized Drugs, available from [<http://www.swgdrug.org/Documents/SWGDRUG%20Recommendations%20Version%207-1.pdf>], accessed July 30, 2018.
- 63) 土橋均, 辰野道昭, 大槻一夫, 酸化法によるパラコート及びジクワットの高速液体クロマトグラフィー同時分析法. 衛生化学, **34**, 31-35, 1988.
- 64) 土橋均, 辰野道昭, 大槻一夫, 酸化法による血中及び尿中パラコート, ジ

- クワットの高速液体クロマトグラフィー同時分析. 科学警察研究所報告, **41**, 269-271, 1988.
- 65) 厚生労働省, ジクワット、パラコート及びメピコートクロリド試験法 (農作物), available from [<http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syokusanzen/zanryu3/2-206.html>], accessed July 30, 2018.
- 66) Tomlin C. D. S., The pesticide manual 13th edn., British Crop Protection Council, Alton, 341-342 and 742-743, 2003.
- 67) Calderbank A., Charlton D. F., Farrington J. A. and James R., Bipyridylum quaternary salts and related compounds. Part IV. Pyridones derived from paraquat and diquat. *J. Chem. Soc.*, **10**, 138-142, 1972.
- 68) 加藤晴代, 磯野秀夫, 藤田進, 生体試料中パラコートの定性・定量のための除蛋白剤の検討について. 衛生化学, **32**, 460-463, 1986.