

完全自動化高速液体クロマトグラフシステムを用いた臨床法医学的迅速薬毒物分析に関する研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9238

完全自動化高速液体クロマトグラフシステムを用いた 臨床法医学的迅速薬毒物分析に関する研究

金沢大学医学部医学科法医学講座 (主任: 大島 徹教授)

大 辻 雅 彦

人体由来試料からの薬毒物分析は臨床および法医実務において極めて重要であり、既に各種の薬毒物分析装置が開発され、医療現場や法医実務で使用されている。しかし従来の装置による分析では、現場の状況などから推定しうる薬毒物のみを対象とする、限られた範囲の分析となる傾向を認めず、未知の対象薬毒物の場合に臨床および剖検試料からの薬毒物分析をいかに短時間に、かつ系統的に行うかは未解決の問題である。そこで本研究では、米国で開発された完全自動化高速液体クロマトグラフシステム REMEDI-HS[®]を用い、中毒学的情報が未知の症例の分析をも含めた包括的な薬毒物分析の可能性を検討した。まず、現在、汎用されている向精神薬、催眠・鎮静薬、抗ヒスタミン薬および局所麻酔薬などから42種の薬物・代謝物を選び、それらを蒸留水、血清または尿検体に実験的に添加し、同装置によりそれらの試料から当該薬物が定性的に正確に検出されるか否かを検討したところ、4種の酸性薬物を除く38種が正確に同定された。その内、リドカインと他の7種の局所麻酔薬および2種のリドカイン代謝物については、同一検体中での同時的定性分析が可能であり、検体中の水素イオン濃度の定性分析への影響はpH4から9の範囲で認めなかった。また、メタンフェタミンやその代謝物および関連化合物であるアンフェタミン、メチルエフェドリン、エフェドリンは、腐敗試料からも定性的に正確に検出された。また REMEDI-HS[®]の定量分析への可能性を探るため、前記42種の中から選んだ24種の薬物および代謝物について、クロルフェニラミンを内部標準物質として検量線を作成したところ、いずれも良好な直線性を示した。これらの検出限界は概して0.1 μ g/mlで、従来より我が国で薬物スクリーニングに使用されてきた薄層クロマトグラフシステムよりも良好であり、これら薬物の急性中毒の診断に有用であると同時に、プリロカイン、リドカイン、メピバカイン、プピバカイン、カルバマゼピンについては、REMED-HS[®]の検出限界が各々の有効血中濃度より低値なので、各薬物濃度のモニタリングにも有用であると考えられた。REMED-HS[®]の薬物同定ライブラリーには、約450種類の薬物または代謝物の濃度とピーク高の比に基づいて計算された定量パラメーターが登録されており、それを用いてブロムワレリル尿素、エフェドリン、ヒドロキシジン、ジフェンヒドラミン、ラニチジン、リドカインおよびグリネキソリジンの血清、尿並びに胃内容液中の濃度を定性分析終了後、直ちに定量し、内部標準法による定量結果と比較したところ、両定量値には相関係数0.960から1.000の範囲で高い相関のあることが確認された。また、リドカイン、モノエチルグリネキソリジンおよびブロムワレリル尿素の血清、尿検体中の濃度を内部標準法を用いて定量し、ガスクロマトグラフ・質量分析法での定量値と比較したところ、いずれも高い相関が認められた(相関係数0.753~0.978)。また、8種の局所麻酔薬と2種のリドカイン代謝物の定量値への検体 pH 値の影響は認められず、これら10種の薬物・代謝物の日内および日間精度の変動係数は各々1.07~8.35%、1.91~11.8%であり、いずれも高い再現性を示した。一方、市販感冒薬や抗ヒスタミン薬並びにリドカインを各々、ヒトボランティアやウサギに投与し、それらの血清および尿の分析結果から、各薬品に含有されている薬物とその代謝物の同時分析が可能であることが確かめられた。法医中毒学的実務に関する具体例として、剖検79例と救急患者53例の検体を分析したところ各々61例、46例で何らかの薬物が検出され、検出例では分析結果が死因の決定や確認、あるいは薬物中毒の診断や治療方針の決定に重要な役割を果たした。さらに急性心筋梗塞患者に投与されたリドカインおよびその代謝物について薬物濃度モニタリングを行ったところ、REMED-HS[®]は治療効果の確認や副作用の防止に有用であった。以上の結果から、完全自動化高速液体クロマトグラフシステム REMEDI-HS[®]は包括的な薬毒物分析に極めて有用であり、法医中毒学的実務および救急医療における有力な手段となりうることが示された。

Key words forensic toxicology, rapid drug screening, qualitative analysis, quantitative analysis, HPLC

平成8年9月26日受付, 平成8年10月21日受理

Abbreviations: AR, absorbance ratio; AR1, absorbance ratio of 209 nm to 205 nm; GC-MS, gas chromatography mass spectrometry; GX, glycinexylidide; HPLC, high performance liquid chromatography; IS, internal standard; IS1, N-ethylnordiazepam; IS2, chlorpheniramine; MEGX, monoethylglycinexylidide; M/Z, mass/electric charge; N-DES, N-desmethyldiphenhydramine; QF, quantitation factor; QLP, qualification

全ての中毒症例の診断は、体内における当該薬物の同定によって初めて確定されるため、薬物分析体制の確立は極めて重要な課題である。今日、薬物分析体制整備の進んだ米国を中心に、各種分析機器の発達は目覚ましいものがあり、我が国においても、こうした機器分析が臨床や法医実務で威力を発揮している。ただし現状では、現場の状況などから推定される薬物のみを対象とする、限られた範囲の分析となる傾向は否めず¹⁾、対象物質が未知の場合に広範囲の薬物分析をどのように行うべきかについては、なお十分な検討を必要とする。

さらに、分析結果を剖検所見の解析や臨床現場での治療に的確に反映させるために、薬物分析は可及的迅速に行われるのが理想的である。しかるに我が国では薬物分析体制の整備は人員および設備の両面で大きく立ち遅れており、救急医療や法医剖検例等を対象とする薬物の包括的緊急スクリーニングはこれまでほとんど行われて来なかった²⁾。このような問題に対処するため、当教室では従来より薄層クロマトグラフィー (thin-layer chromatography, TLC) とガスクロマトグラフィー質量分析法 (gas chromatography mass spectrometry, GC-MS) の両システムを用いた、薬物スクリーニングに関する研究を継続してきた³⁻⁵⁾。しかしこれらのシステムにおいて TLC では感度が低い点、また GC-MS ではやや長い分析時間を必要とする点などで、改善すべき問題点が残っている。

本論文では米国で開発された完全自動化高速液体クロマトグラフィーシステム (REMEDI-HS[®], BIO-RAD, Hercules, U.S.A.) による迅速な定性および定量分析の可能性を基礎的に検討し、この成績に基づき法医実務や救急患者試料からの薬物スクリーニングおよび薬物モニタリングへの応用を試みた。

材料および方法

I. 分析装置

REMEDI-HS[®] は高速液体クロマトグラフシステム (high performance liquid chromatography, HPLC) に、スキャンニング紫外線 (ultraviolet, UV) 検出器とコンピューターを接続した新しい薬物分析装置である。この装置付属のコンピューターには、約650種類の薬物について、内部標準物質 (internal standard, IS) に対する各薬物の相対保持時間 (relative retention time, RRT), および 205 から 300nm までの吸光スペクトルを用いて得られた各パラメーター (定性パラメーター) (qualification parameter, QLP) が薬物同定ライブラリーに登録されており、検体中の薬物同定を自動的に行うことができる。薬物同定ライブラリーには各々の薬物に対して、以下に述べる QLP が登録されている。すなわち RRT1 と RRT2 は、各々 IS である N-エチルノルジアゼパム (N-ethylordiazepam, IS1) とクロルフェニラミン (chlorpheniramine, IS2) に対する RRT を意味している。また、シミラリティーファクター (similarity factor, SF) は検体中の薬物から得られたスペクトラムと、その薬物について REMEDI-HS[®] のライブラリーに登録されているスペクトラムとの類似性を数値で表わしたものである。さらに、吸光度比 (absorbance ratio, AR) は2つの異なる波長における吸光度の比で、各薬物に特徴的な3波長比を登録

しており、L-max は薬物スペクトラムのピーク波長を示し、セカンドデリバティブ (second derivative) はスペクトラムを2次微分した場合に、2次微分値が0を示す波長に相当する。

同装置は検体の前処理用と分離用として各々2本、計4本のカラムを装備している。すなわち、検体が通過する順番に、1) 除蛋白・脱塩等を行なう 10×2.1mm 疎水性ポリマーカートリッジ (ピュリフィケーションカートリッジ) (Hamilton, Reno, USA), 2) 酸性物質等の除去を行なう 10×4.0mm 陰イオン交換カートリッジ (エクストラクションカートリッジ) (A-28, BIO-RAD, Richmond, USA), 3) 中性薬物の分離を行なう 25×3.2mm 逆相カートリッジ (セパレーション-1-カートリッジ) (Shandon, Cheshire, U.K.), そして4) 最後に塩基性薬物の分離を行なう 160×4.6mm 陽イオン交換カートリッジ (セパレーション-2-カートリッジ) (Machery-Nagel, Duren, Germany) の4本のカラムである⁶⁻⁷⁾。なお移動相は、アセトリルとリン酸緩衝液 (pH 7.05) を容積比33:67に混合したものを使用している。

II. 薬物分析方法

分析手順は検体 (血清, 血漿, 尿, 胃内容, 脳脊髄液など) 1ml に対して、IS として IS1 (濃度 12 μ g/ml) と IS2 (濃度 18 μ g/ml) の両者を含む溶液、または一方のみを含む溶液を 0.2ml 加え、ボルテックスを用いて十分に混和した後、9500回転/分で1分間遠心し、尿・胃内容等はその上清を採取して測

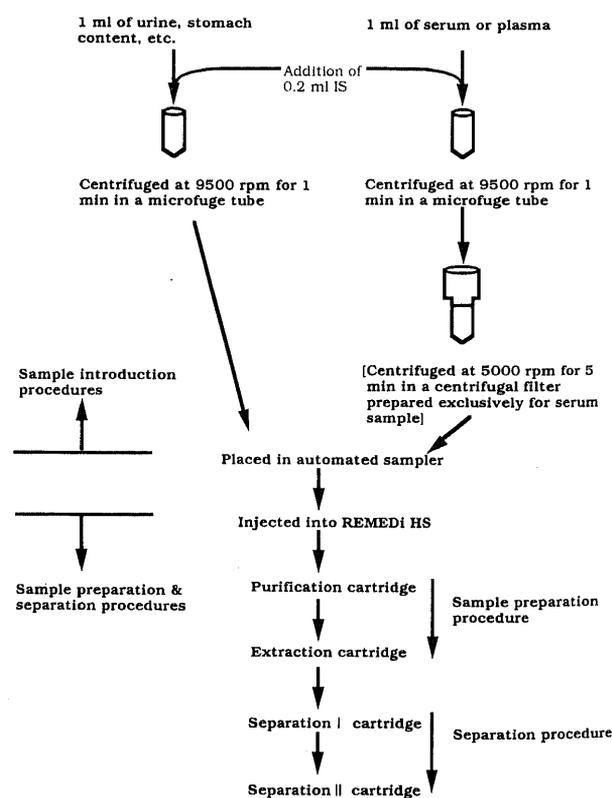


Fig. 1. Sample preparation procedures for REMEDI-HS[®] system. IS, internal standard.

parameter; RT, retention time; RRT, relative retention time; RRT1, relative retention time to N-ethylordiazepam; RRT2, relative retention time to chlorpheniramine; SF, similarity factor; TLC, thin-layer chromatography; UV, ultraviolet

定した。血清・血漿については上清を採取後、さらに径 0.22 μ m の REMEDI-HS[®] 専用フィルターチューブ (BIO-RAD) を使用して5000回転/分で5分間、遠心濾過した後にオートサンプラーに装着し、自動分析した (図1)。

Ⅲ. 薬物同定ライブラリーの基礎的検討

現在、我が国で汎用されている向精神薬、催眠・鎮静薬、抗ヒスタミン薬および局所麻酔薬などから、表1に示す42種の薬物や代謝物を、蒸留水、あるいは薬物未混入のヒト血清や尿に

Table 1. Retention time and relative retention time of drugs and metabolites by REMEDI-HS[®] system

Substance	RT(min)	RRT1	RRT2
Apronalide*	1.79	0.166	0.034
Caffeine*	1.83	0.156	0.037
Bromisovalum*	1.87	0.197	0.045
Phenobarbital	2.12	0.316	0.069
Carbamazepine	2.24	0.349	0.079
Brotizolam*	2.67	0.556	0.127
Phenytoin	2.25	0.363	0.081
Nifedepine	2.55	0.523	0.105
Triazolam*	2.60	0.518	0.122
Glycinexylidide*	3.78	1.193	0.244
Prilocaine*	4.58	1.568	0.322
Fenitrothion*	4.78	1.714	0.336
Amphetamine	5.09	1.697	0.369
Monoethylglycinexylidide	5.16	1.692	0.399
Phenethylamine	5.21	1.685	0.375
1-methyl-3-phenylpropylamine	5.29	1.568	0.373
3-phenyl-1-propylamine	5.30	1.573	0.374
β -methylphenethylamine	5.41	1.684	0.389
Phentermine	5.47	1.650	0.392
Ephedrine	5.50	1.862	0.405
Lidocaine	5.59	1.774	0.448
Hydroxyzine	5.74	2.183	0.434
Haloperidol	5.96	1.788	0.436
Mepivacaine	6.11	2.369	0.477
Nisoldipine*	6.25	2.279	0.468
Methamphetamine	6.36	2.268	0.494
Tetracaine	6.47	2.564	0.519
Bupivacaine*	6.76	2.692	0.542
N-methylphenethylamine	6.77	2.155	0.514
Diphenhydramine	6.77	2.679	0.536
Methylephedrine*	6.96	2.535	0.552
Procaine	7.16	2.884	0.583
Tipepidine hibenazate*	7.17	2.334	0.569
Imipramine	7.84	2.920	0.651
Cocaine	8.00	3.151	0.658
Biperiden	8.63	2.850	0.689
Dibucaine	8.73	3.651	0.739
Chlorpromazine	9.15	3.057	0.738
Ranitidine	9.33	3.799	0.807
Dihydrocodeine	12.51	4.950	1.119
Acetaminophen	ND	ND	ND
Amikacin	ND	ND	ND
Vecuronium bromide	ND	ND	ND
Pancuronium bromide	ND	ND	ND

RT, retention time; RRT1, relative retention time to N-ethyl-nordiazepam; RRT2, relative retention time to chlorpheniramine; ND, not detected by REMEDI-HS[®].
*, Drugs newly registered in REMEDI-HS[®] library.

添加し、それらを REMEDI-HS[®] で分析することで各薬物や代謝物の定性分析の可否について検討した。薬物同定ライブラリーには使用者が測定して得られた薬物の QLP を新規に登録することが可能であり、本研究においても一部新規に登録した。

Ⅳ. リドカイン検出のためのパラメーター

REMEMEDI-HS[®] の薬物判定に使用する QLP の信頼度について、リドカインが検出された検体をもとに検討した。すなわち、前述した8種の QLP に加えて、薬物保持時間 (retention time, RT) について検討した。また、AR については、リドカインでは 209nm と 205nm との比 (absorbance ratio of 209nm to 205nm, AR1), 218nm と 213nm との比 (absorbance ratio of 218nm to 213nm), および 223nm と 218nm との比 (absorbance ratio of 223nm to 218nm) の3種類の AR が登録されているので、それらについても検討した。

リドカインが検出された検体を、実際に投与されたヒト検体群 (投与群)、診療録上、投与の記載がないにもかかわらず検出された検体群 (未投与群)、さらに検量線の作成等のためにこれら薬物をヒト血清または尿に実験的に添加した検体群 (添加群) の3群に分類し、各群における QLP について吟味した (表2)。リドカインの標準品はアストラジャパン (大阪) より入手した。

Ⅴ. 内部標準法のための薬物検量線

前記42種の中から選んだ24種の薬物・代謝物について、各々の標準物質を用い表3に示した濃度範囲で、血清・尿および蒸留水に実験的に添加後、前記Ⅱの方法で分析し、各々の薬物・代謝物のピーク高に対する IS2 のピーク高の比を用いて検量線を作成した (表3)。

Ⅵ. 定量パラメーター法と内部標準法の比較

REMEMEDI-HS[®] では登録薬物の大部分に対して、薬物濃度と

Table 2. Comparison of lidocaine qualification parameters of REMEDI-HS[®] system obtained from each group

Parameter	Group ^a		
	A (18)	B (33)	C (52)
RT (min)	5.748 \pm 0.158	5.643 \pm 0.177	5.649 \pm 0.220
RRT1	1.842 \pm 0.053	1.947 \pm 0.082	1.925 \pm 0.137
RRT2	0.432 \pm 0.008	0.425 \pm 0.010	0.420 \pm 0.011
SF	0.003 \pm 0.003	0.015 \pm 0.017*	0.004 \pm 0.004
AR1	1.223 \pm 0.009	1.236 \pm 0.023*	1.223 \pm 0.014
AR3	1.335 \pm 0.006	1.334 \pm 0.037	1.334 \pm 0.009
AR4	1.414 \pm 0.009	1.387 \pm 0.064	1.403 \pm 0.023
L-MAX (nm)	275 \pm 5	277 \pm 7	278 \pm 5
2DI (nm)	288 \pm 4	286 \pm 3	288 \pm 2

RT, retention time; RRT1, relative retention time to N-ethyl-nordiazepam; RRT2, relative retention time to chlorpheniramine; SF, similarity factor; AR1, absorbance ratio of 209 nm to 205 nm; AR3, absorbance ratio of 218 nm to 213 nm; AR4, absorbance ratio of 223 nm to 218 nm; L-max; wavelength showing maximum absorbance; 2DI, second derivative.

a) Group A, specimens with definitely positive history of lidocaine administration; group B, specimens without positive history of lidocaine administration; group C, specimens with experimental addition of lidocaine. Figures in parenthesis are the number of specimens.

*p<0.05 vs. Groups A and C by Scheffer's F test.

Table 3. Regression lines and detection limits for drugs and metabolites examined by REMEDI-HS[®] system

Substance	Specimen	Regression equation	Range ($\mu\text{g/ml}$)	r	Detection limit ($\mu\text{g/ml}$)
Amphetamine	Water	$Y=0.369X-0.015$	0.20- 7.0	0.999	0.2
	Serum	$Y=0.378X+0.032$	0.10- 8.0	1.000	0.1
	Urine	$Y=0.412X+0.013$	0.10- 6.0	0.999	0.1
Bromisovalum	Water	$Y=0.354X+0.001$	1.0 - 5.0	0.996	0.2
	Serum	$Y=0.267X+0.252$	1.0 -10.0	0.998	0.2
Bupivacaine	Water	$Y=0.658X+0.075$	0.09- 4.4	0.990	0.09
	Serum	$Y=0.456X+0.090$	0.14- 6.0	0.995	0.14
	Urine	$Y=0.710X+0.136$	0.18- 4.0	0.999	0.18
Caffeine	Water	$Y=0.172X+0.174$	1.0 -10.0	0.995	0.4
Carbamazepine	Serum	$Y=0.498X+0.159$	0.50-10.0	0.999	0.2
Cocaine	Water	$Y=0.355X+0.039$	0.12- 9.2	0.999	0.12
	Serum	$Y=0.230X+0.002$	0.15-12.0	0.997	0.15
	Urine	$Y=0.378X+0.068$	0.12- 7.6	0.999	0.12
Dibucaine	Water	$Y=0.883X-0.026$	0.06- 4.0	0.999	0.06
	Serum	$Y=0.216X+0.140$	0.12-12.0	0.991	0.12
	Urine	$Y=0.630X+0.068$	0.10- 4.6	1.000	0.1
Diphenhydramine	Serum	$Y=0.746X-0.002$	0.04- 3.0	1.000	0.04
Ephedrine	Urine	$Y=0.697X+0.011$	0.04- 3.0	1.000	0.04
	Water	$Y=0.279X+0.021$	0.25- 7.0	1.000	0.25
	Serum	$Y=0.306X+0.063$	0.10-10.0	0.999	0.1
Glycinexylidide	Urine	$Y=0.580X+0.011$	0.10- 4.0	0.999	0.1
	Water	$Y=0.876X-0.178$	0.20- 4.0	0.994	0.2
	Serum	$Y=0.535X+0.018$	0.06- 4.0	0.980	0.06
Hydroxyzine	Urine	$Y=1.444X+0.350$	0.02- 1.9	0.988	0.02
	Water	$Y=0.912X-0.013$	0.08- 2.5	1.000	0.08
	Urine	$Y=0.905X-0.040$	0.08- 2.5	1.000	0.08
Lidocaine	Water	$Y=0.739X+0.117$	0.05- 4.6	0.986	0.05
	Serum	$Y=0.554X+0.063$	0.10- 3.4	0.997	0.1
	Urine	$Y=0.941X+0.112$	0.05- 3.3	0.990	0.05
Mepivacaine	Water	$Y=0.919X+0.018$	0.05- 3.7	0.998	0.05
	Serum	$Y=0.634X-0.018$	0.10- 4.0	0.996	0.1
	Urine	$Y=1.045X+0.039$	0.05- 2.8	0.999	0.05
Methamphetamine	Water	$Y=0.286X-0.011$	0.10- 8.0	0.998	0.1
	Serum	$Y=0.267X+0.084$	0.10-10.0	0.997	0.1
	Urine	$Y=0.329X+0.029$	0.10- 5.0	1.000	0.1
Methylephedrine	Water	$Y=0.353X+0.077$	0.20- 5.0	0.993	0.1
	Urine	$Y=0.537X+0.215$	0.20- 4.0	0.982	0.1
Monoethylglycinexylidide	Water	$Y=1.145X-0.024$	0.04- 3.0	0.998	0.04
	Serum	$Y=0.833X-0.022$	0.10- 3.0	0.998	0.10
	Urine	$Y=1.718X+0.117$	0.04- 1.7	0.996	0.04
Nifedipine	Water	$Y=0.468X-0.050$	0.10- 5.0	0.999	0.1
	Serum	$Y=0.175X-0.011$	1.0 -10.0	0.998	0.5
Nisoldipine	Serum	$Y=0.013X+0.014$	2.0 -10.0	0.987	2
Phenethylamine	Water	$Y=0.196X-0.010$	0.15-16.0	0.998	0.15
	Serum	$Y=0.254X-0.014$	0.20-10.0	0.999	0.2
	Urine	$Y=0.441X-0.007$	0.10- 5.0	1.000	0.1
Prilocaine	Water	$Y=1.220X+0.055$	0.04- 3.0	0.986	0.04
	Serum	$Y=0.542X+0.196$	0.10- 5.0	0.988	0.1
	Urine	$Y=1.438X+0.609$	0.04- 1.9	0.939	0.04
Procaine	Water	$Y=0.379X+0.068$	0.10- 8.5	0.981	0.1
	Urine	$Y=0.516X+0.168$	0.10- 5.9	0.986	0.1
Ranitidine	Water	$Y=0.293X-0.025$	0.50- 8.0	1.000	0.2
	Urine	$Y=0.350X-0.007$	0.50- 5.0	0.998	0.15
Tetracaine	Water	$Y=0.378X+0.165$	0.10- 8.9	0.977	0.1
	Urine	$Y=0.476X-0.248$	0.20- 7.9	0.997	0.2
Triazolam	Water	$Y=2.193X+0.076$	0.10- 1.0	1.000	0.05
	Serum	$Y=1.505X+0.031$	0.20- 5.0	0.999	0.1

Y, peak height ratio of each substance to chlorpheniramine; X, concentration ($\mu\text{g/ml}$) of substance.

Table 4. Regression lines and correlation coefficients between Rapid Estimate Method and Internal Standard Method

Substance	QF	Specimen	Regression equation	r	Source
Bromisovalum	0.0109	Serum	$Y=1.072X-0.481$	0.973(n=6)	63-year-old male (E)
		Urine	$Y=1.026X-0.291$	0.960(n=5)	26-year-old female (A)
		GC	$Y=0.858X-0.117$	NC (n=2)	
Ephedrine	0.0130	Urine	$Y=2.173X-0.087$	0.983(n=74)	Exp; 6 male volunteers (aged 26 to 40 years)
Hydroxyzine	0.0044	Urine	$Y=1.120X-0.071$	0.999(n=6)	26-year-old male (E)
		GC	$Y=1.068X-0.047$	1.000(n=7)	26-year-old female (A)
Diphenhydramine	0.0055	Serum	$Y=1.047X+0.013$	0.992(n=71)	Exp; 17 male volunteers (aged 18 to 27 years)
		Urine	$Y=1.151X-0.014$	0.973(n=83)	
Ranitidine	0.0188	Urine	$Y=0.940X+0.099$	0.975(n=5)	63-year-old male (E)
Lidocaine	0.0042	Serum	$Y=0.856X-0.012$	NC (n=3)	Exp; 2 rabbits
		Urine	$Y=1.129X-0.071$	0.997(n=6)	(weight; ca. 2kg)
Glycinexylidide	0.0043	Serum	$Y=0.850X+0.050$	0.996(n=5)	Exp; 2 rabbits
		Urine	$Y=1.152X-0.061$	1.000(n=5)	(weight; ca. 2kg)

QF, quantitation factor; Y, concentration measured by Rapid Estimate Method; X, concentration measured by Internal Standard Method; E, emergency medical case; A, autopsy case; GC, gastric content; NC, not calculated.

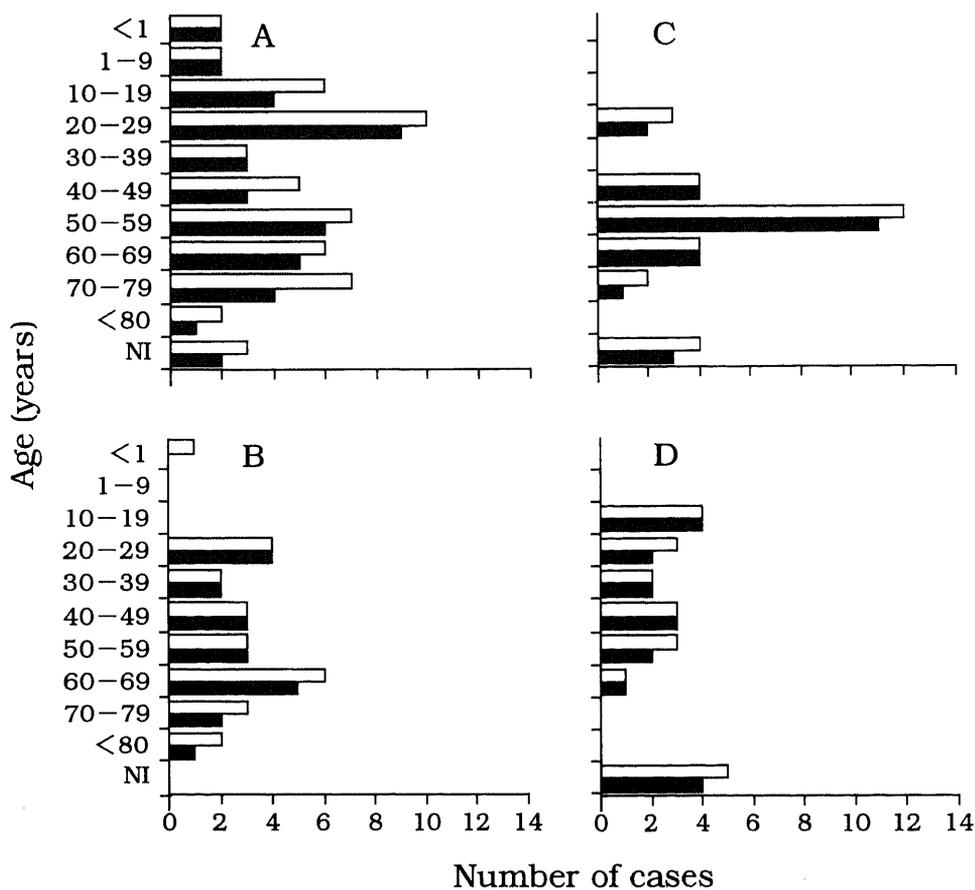


Fig. 2. Age distribution of tested cases and drug positive cases in autopsy cases and emergency medical cases. Drugs were detected in serum, urine and so on in autopsy cases and emergency medical cases by REMEDI-HS[®]. Open and closed bar indicate tested cases and drug positive cases, respectively. Group A, male autopsy cases; Group B, female autopsy cases; Group C, male emergency medical cases; Group D, female emergency medical cases; NI, no information on the age.

ピーク高の比に基づいて計算された定量パラメーター (quantitation factor, QF) が与えられており、この QF をクロマトグラム中の薬物ピーク高と乗することで、迅速に検体中の濃度を求めることができる。本研究では血清・尿および胃内容液中のブロムワレリル尿素 (bromisovalum), エフェドリン, ヒドロキシジン, ジフェンヒドラミン, ラニチジン, リドカイン, グリシネキソリジン (glycineoxylidide, GX) について、薬物濃度を QF を用いて定量 (rapid estimate method) し、内部標準法との定量結果 (internal standard method) と比較した (表 4)。なお各標準品は以下のものを使用した: ブロムワレリル尿素 (日本新薬, 京都), 塩酸エフェドリン (日本新薬), 塩酸ヒドロキシジン (ファイザー・ジャパン, 東京), 塩酸ジフェンヒドラミン (興和, 名古屋), 塩酸ラニチジン (三共, 東京), 塩酸 GX (藤沢薬品, 大阪)。

VI. カラム劣化の定量値への影響

抗ヒスタミン薬として頻用される塩酸ジフェンヒドラミン 2 μ g/ml の尿検体を作成し、前記 4 種のカラムを全て交換後、前記尿検体を 50 検体連続で測定し、定性および定量分析に対するカラム劣化の影響について検討した。

VII. 定量値に対するフィルター処理の影響

REMEDi-HS[®] で前処理に使用するフィルターへの薬物吸着について検討するため、前処理用フィルターとして REMEDI-HS[®] 専用フィルターチューブ (酢酸セルロース製, 孔径 0.22 μ m) とミリポア HV フィルター (ポリフッ化ビニリデン製, 孔径 0.45 μ m, 日本ミリポア, 東京) を使用した。血清検体にフェネチルアミンを 1.0, 3.0, 7.0 μ g/ml となるように実験的に添加し、REMEDi-HS[®] 専用フィルターで 5000 回転/分で 5 分間の遠心濾過をしたもの、および HV フィルターを用い注射筒による加圧操作で濾過したものの両者を分析した。さらに尿検体にフェネチルアミンを 1.0, 3.0, 5.0 μ g/ml となるように添加し、フィルターによる濾過を行わなかったもの、REMEDi-HS[®] 専用フィルターで濾過したもの、および HV フィルターで濾過したものを各々、オートサンプラーに装着し分析した。

IX. 薬物の検出限界濃度についての検討

各薬物を血清・尿および蒸留水に各々、実験的に添加した後 (表 3), 前記 II の方法で分析し、REMEDi-HS[®] での検出限界濃度を決定した。さらに、それら薬物の血液中での治療域、中毒域または致死域濃度の文献値と比較、検討した。

X. GC-MS 法

REMEDi-HS[®] 法による測定値と比較するため、リドカインとその代謝物モノエチルグリシネキソリジン (monoethylglycineoxylidide, MEGX) およびブロムワレリル尿素について GC-MS 法で定量した。塩酸 MEGX の標準品は藤沢薬品より入手した。

1. 抽出方法

試料 (血清又は尿) 調整は以下のように行った。リドカインおよび MEGX の分析では、試料 0.2ml に、IS として 5mg/ml ブピバカインエタノール溶液を 10 μ l 加え、1 N 水酸化ナトリウムで pH を 10 から 11 に調整後、試料 1ml をエキストレルト[®] (E. Merck, Darmstadt, Germany) カラムに適用し、ジクロロメタンとイソプロパノールの 85:15 混合液で抽出し、窒素ガスで乾固後、100 から 500 μ l のエタノールに再溶解し分析した。ブロムワレリル尿素の分析は、岡本ら⁹⁾の方法に準じ、試料 1ml をエキストレルト[®]カラムに適用し、酢酸エチルで抽出

した。

2. 装置および分析条件

GC-MS 装置に関し、リドカインと MEGX の分析は DX303-DA5100 システム (日本電子, 東京) で、ブロムワレリル尿素の分析は QP-1000 (島津, 京都) で行った。

GC カラムは DB-1 (15m \times 0.53mm \times 1.5 μ m) (J & W Scientific, Folsom, U.S.A.) を使用した。カラム温度について、リドカインおよび MEGX 分析時には 140 $^{\circ}$ C より 16 $^{\circ}$ C/分の割合で最終温度 300 $^{\circ}$ C まで昇温後、10 分間保持した。ブロムワレリル尿素の分析の際は 100 $^{\circ}$ C で 1 分間保持後、16 $^{\circ}$ C/分の割合で 250 $^{\circ}$ C まで昇温させた。キャリアーガスはヘリウムを用い、その流量はリドカインと MEGX の分析時は 15ml/分、ブロムワレリル尿素の分析時は 20ml/分であった。

MS の分析条件は、日本電子 DX303-DA5100 装置では加速電圧 3kV, イオン化電圧 70eV, イオン化電流 0.3mA およびコンバーションダイノード電圧 -10kV の条件で、また島津 QP-1000 装置ではイオン化電圧 70eV, イオン化電流 60 μ A の条件であり、いずれも電子衝撃および正イオン検出モードを用いた。定性確認分析は通常のスキャンモード (multiple ion monitoring mode) で行い、定量分析は選択イオン (selected ion monitoring) モードで行い、この際、リドカインは質量/電荷 (mass/electric charge, M/Z) 86, MEGX は M/Z 58, ブピバカインは m/z 140, さらにブロムワレリル尿素は M/Z 180 を指標とした。

XI. 覚醒剤の保存中の濃度変化とフェネチルアミン産生に関する基礎的検討

覚醒剤であるメタンフェタミンとその代謝物アンフェタミン、また覚醒剤原料であるエフェドリンおよびメチルエフェドリンの REMEDI-HS[®] による同時スクリーニングの可能性について検討した。さらに検体である尿を実験的に腐敗させ、その影響についても検討した。

塩酸メタンフェタミン (大日本製薬, 大阪), 硫酸アンフェタミン (昭和大学薬学部黒岩幸雄教授から恵与), 塩酸エフェドリン (大日本製薬), 塩酸メチルエフェドリン (丸石製薬, 大阪) の原末をエタノールまたは蒸留水に添加し、1mg/ml の保存原液を作成し、薬物未混入の清浄ヒト尿に各原液を添加し、最終濃度 6 μ g/ml (各々 4.0, 4.4, 3.6, 3.4 μ mol/100g に相当) になるよう調整した。調整後一部を直ちに REMEDI-HS[®] で測定し、残りはバイアル瓶に密封して、孵卵器内で 30 $^{\circ}$ C, 一定期間 (1, 2, 3, 5, 7 および 10 日間) 静置し、その後 REMEDI-HS[®] で測定した。また、薬物未混入の尿検体も同様に測定した。

なお実験に使用したメタンフェタミン, アンフェタミン, エフェドリンおよびメチルエフェドリンは、我が国では“覚醒剤取締法”でそれらの取扱いが厳しく制限されており、本研究では石川県知事から使用許可を得て行った。

XII. 局所麻酔薬同時スクリーニングのための検討

1. 多種局所麻酔薬の同時スクリーニングのための基礎的検討

局所麻酔薬や抗不整脈薬として頻用されるリドカインやその代謝物 GX, MEGX, さらに他の 7 種の局所麻酔薬の同時スクリーニングの可能性について検討した。

リドカイン, 塩酸 GX, 塩酸 MEGX, 塩酸プリロカイン (アストラジャパン), 塩酸メピバカイン (アストラジャパン), 塩酸テトラカイン (杏林製薬, 東京), 塩酸ブピバカイン (アストラ

ジャパン), 塩酸プロカイン (第一製薬, 東京), 塩酸コカイン (武田薬品, 大阪) および塩酸ジブカイン (ナガセ医薬品, 大阪) の原末をエタノールに添加し, 濃度 1mg/ml の保存原液を作成し, これらを薬物未混入のヒト血清や尿, 蒸留水に最終濃度 1 μ g/ml になるよう添加した. そして, 1) これらの同時的定性分析 (スクリーニング) が可能か否かについて検討し, 2) これらの検量線を作成後, 各 1 μ g/ml の濃度を指標に, 分析の日内および日間精度について検討した. さらに, 3) 薬物分析における水素イオン濃度の影響を検討するため, 蒸留水に10種類の局所麻酔薬・代謝物を添加し, その試料を 1 N 塩酸と 1 N 水酸化ナトリウムを用いそれぞれ pH を 4.0 および 9.0 に調整後, 前記

II の方法で分析した. そして RT, RRT およびピーク高への影響について検討した.

なお塩酸コカインについては, 我が国では“麻薬及び向精神薬取締法”でその取扱いは厳しく制限されており, 本研究では石川県知事から使用許可を得て行った.

2. 局所麻酔薬検出のための動物投与実験

白色日本ウサギ (約 2kg) を用い, 投与前採血・採尿後, 塩酸リドカイン 2% 注射液 (藤沢薬品) を体重 kg 当り 2mg 筋肉内注射し, 注射 15 分, 30 分, 1 時間, 1 時間 30 分後には耳静脈より採血し, 一方, 30 分, 1 時間 30 分, 3 時間, 6 時間後には尿を採取した. これらの血液および尿は前記 II の方法で分析し

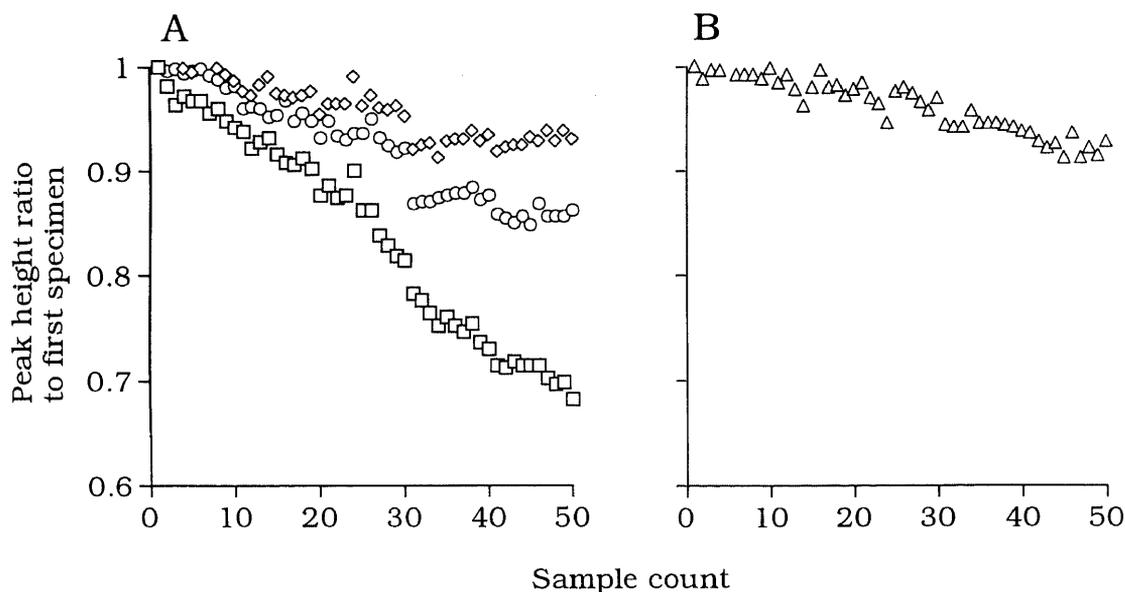


Fig. 3. Change of peak height of drugs through 50 consecutive analysis of urine specimen containing 2.0 μ g/ml of diphenhydramine hydrochloride. (A) Open square, lozenge and circle indicate the peak of N-ethylordiazepam, chlorpheniramine and diphenhydramine, respectively. (B) Open triangle indicates the peak height ratio of diphenhydramine to chlorpheniramine.

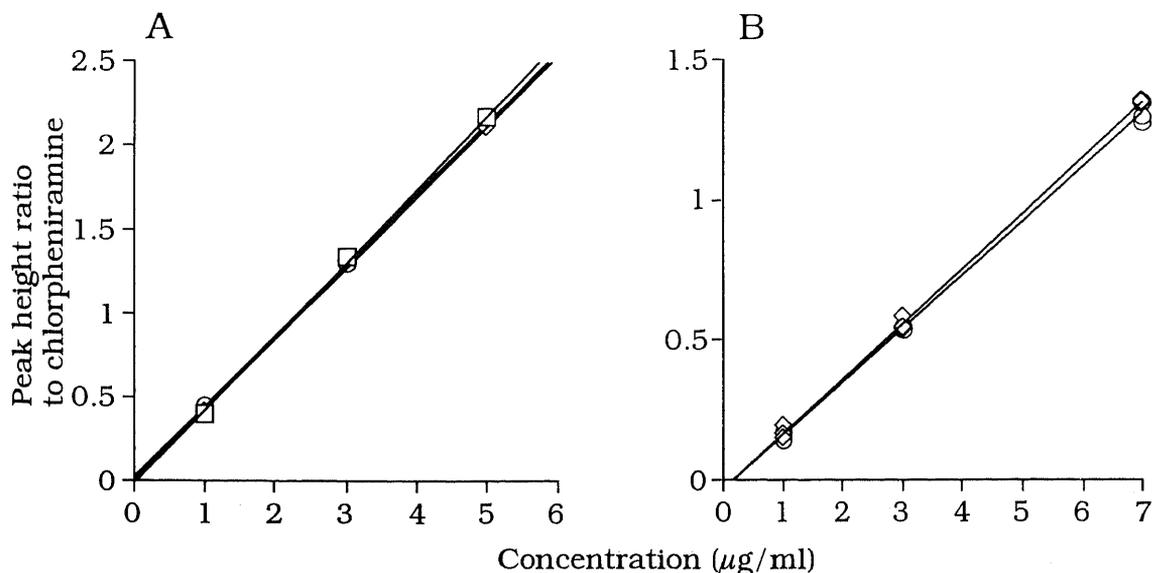


Fig. 4. Comparison of regression lines for phenethylamine in serum (A) and urine (B). Open square, lozenge and circle indicate the specimens not filtered, filtered by REMEDI filter and by HV filter.

た. なお, この動物実験は金沢大学宝町地区動物実験指針に準拠して行った.

Ⅷ. 市販感冒薬成分検出のためのヒトボランティアへの投与実験

2種類の市販感冒薬であるプレコール®持続性カプセル(2カプセル中, イソプロピルアンチピリン 150mg, アセトアミノフェン 225mg, dl-塩酸メチルエフェドリン 30mg, カフェイン 37.5mg を含有)(藤沢薬品)とコルゲンコーワ ET(2カプセル中, 塩化リゾチーム 20mg, トラネキサム酸 140mg, アセトアミノフェン 300mg, dl-塩酸メチルエフェドリン 20mg, カフェイン 25mg を含有)(興和新薬, 名古屋)を各々3名の健康成人男性ボランティア(26, 27, 30, 32, 37および40歳)に服用させ(1名には成人常用量である2カプセル, 2名にはその1.5倍量), 服用直前, 服用後1, 3, 6および24時間後に採血・採尿し, 分析用試料とした. これらの試料は前記Ⅱの方法で分析し, メチルエフェドリンおよびエフェドリンを定量した. なお

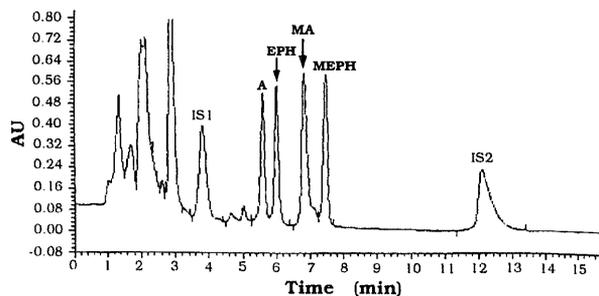


Fig. 5. REMEDI-HS® chromatogram of methamphetamine and related compound (monitored at 205 nm-wavelength) in the urine specimen experimentally prepared. AU, absorbance unit; IS1, N-ethylnormidazepam; A, amphetamine; EPH, ephedrine; MA, methamphetamine; MEPH, methylephedrine; IS2, chlorpheniramine.

Table 5. Intra- and interassay precision for distilled water, serum and urine of 10 local anesthetics and metabolites examined by REMEDI-HS® system

Substance	Spiked concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Measured concentration ($\mu\text{g/ml}$)					
		Within-day precision (n=6)			Day-to-day precision (n=12)		
		\bar{x}	SD	CV1 (%)	\bar{x}	SD	CV2 (%)
Distilled water							
GX	1	0.943	0.033	3.453	0.907	0.043	4.777
Prilocaine	1	1.052	0.069	6.555	1.067	0.079	7.438
MEGX	1	0.941	0.023	2.393	0.901	0.044	4.852
Lidocaine	1	1.078	0.054	5.016	1.071	0.051	4.715
Mepivacaine	1	1.034	0.036	3.454	1.023	0.037	3.634
Tetracaine	1	1.014	0.011	1.116	1.024	0.039	3.852
Bupivacaine	1	0.084	0.071	6.531	1.160	0.137	11.810
Procaine	1	1.015	0.085	8.348	1.007	0.081	8.044
Cocaine	1	1.004	0.024	2.438	0.964	0.049	5.119
Dibucaine	1	0.970	0.010	1.071	0.959	0.024	2.553
Serum							
GX	1	1.075	0.067	6.274	1.074	0.053	4.968
Prilocaine	1	0.837	0.053	6.290	0.859	0.098	11.454
MEGX	1	1.005	0.023	2.301	1.037	0.046	4.395
Lidocaine	1	1.020	0.027	2.641	1.020	0.027	2.641
Mepivacaine	1	0.964	0.020	2.077	0.971	0.019	1.905
Tetracaine	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Bupivacaine	1	0.939	0.074	7.930	0.938	0.068	7.194
Procaine	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Cocaine	1	1.075	0.054	4.984	1.055	0.072	6.810
Dibucaine	1	1.032	0.027	2.661	1.023	0.039	3.825
Urine							
GX	1	1.007	0.033	3.233	1.000	0.030	2.998
Prilocaine	1	1.000	0.076	7.590	0.987	0.071	7.212
MEGX	1	1.001	0.034	3.440	0.994	0.035	3.510
Lidocaine	1	1.031	0.037	3.567	1.018	0.037	3.627
Mepivacaine	1	1.032	0.033	3.217	1.027	0.026	2.542
Tetracaine	1	1.016	0.067	6.035	1.115	0.048	4.280
Bupivacaine	1	0.986	0.025	2.559	0.965	0.056	5.802
Procaine	1	0.988	0.021	2.161	0.990	0.049	2.501
Cocaine	1	1.007	0.028	2.773	0.999	0.026	2.606
Dibucaine	1	1.010	0.018	1.840	0.994	0.025	2.524

GX, Glycinexylidide; MEGX, Monoethylglycinexylidide; CV1, coefficient of variation for within-day precision; CV2, coefficient of variation for day-to-day precision; ND, not determined.

実験に際し全てのボランティアから書面による同意を得た。

Ⅳ. 抗ヒスタミン薬 (ジフェンヒドラミン) 検出のためのヒトボランティアへの投与実験

抗ヒスタミン薬であるレスタミンコーワ糖衣錠 (1錠中塩酸ジフェンヒドラミン 10mg を含有) (興和新薬) を、書面による同意を得た17人の健康成人男性ボランティア (18から27歳) に3から12錠服用させ、服用後0, 1, 2, 3, 6, 9, 24時間目に採血・採尿し、さらに36, 48時間目に採尿して分析用試料とした。

Ⅴ. 救急患者および剖検試料からの薬毒物分析

当教室の剖検事例79例分 (血清67検体, 尿51検体, 胃内容等5検体) および本学附属病院や他病院 (大阪大学附属病院, 石川県立中央病院, 厚生連高岡病院および福井厚生病院) から分析を依頼された救急患者53例分 (血清94検体, 尿86検体, 胃洗浄

液等19検体) について, REMEDI-HS[®] で分析した。

検査対象とした剖検79例中, 男性は53例 (67%), 女性は24例 (30%), 性別不詳は2例 (3%) であった。年齢分布は男性では20歳台 (10例) が最も多く, 1歳未満から80歳台の範囲であった。女性では60歳台 (6例) が最多で20歳台 (4例) と続き, 1歳未満から80歳台の年齢層に分布していた (図2 A, B)。救急例では検査対象の53例中, 男性は29例 (54%), 女性は21例 (40%) で, 性別の記載なしが3例 (6%) があった。男性の年齢分布は, 20から70歳台の範囲で, 50歳台 (12例) が最も多く, 女性は10から60歳台の範囲に分布し, 10歳台 (4例) が最も多かった (図2 C, D)。

Ⅵ. 薬物モニタリングへの応用例

前述の局所麻酔薬に関する基礎的検討に基づき, リドカイン投与中の救急患者3名について, 血清および尿検体中のリドカ

Table 6. Comparison of regression lines in distilled water adjusted to pH4 and 9

Substance	Range ($\mu\text{g/ml}$)	pH in a solution			
		4.0		9.0	
		Regression equation	r	Regression equation	r
GX	0.5-2.0	$Y=0.878X-0.014$	0.998	$Y=0.899X-0.008$	0.999
Prilocaine	0.3-1.2	$Y=1.082X+0.087$	0.986	$Y=1.213X+0.026$	0.990
MEGX	0.4-1.6	$Y=1.091X+0.002$	0.999	$Y=1.104X+0.013$	0.999
Lidocaine	0.6-2.4	$Y=0.657X+0.015$	1.000	$Y=0.660X+0.026$	0.999
Mepivacaine	0.5-2.0	$Y=0.908X-0.012$	0.999	$Y=0.930X+0.004$	0.999
Tetracaine	1.0-4.0	$Y=0.375X-0.002$	1.000	$Y=0.350X+0.037$	0.998
Bupivacaine	0.5-2.0	$Y=0.648X-0.069$	0.981	$Y=0.625X-0.016$	0.993
Procaine	1.0-4.0	$Y=0.375X+0.050$	0.991	$Y=0.347X+0.119$	0.996
Cocaine	1.0-4.0	$Y=0.250X+0.001$	1.000	$Y=0.230X+0.003$	1.000
Dibucaine	0.5-2.0	$Y=0.876X-0.043$	1.000	$Y=0.874X-0.079$	0.998

Y, peak height ratio of each substance to chlorpheniramine; X, concentration ($\mu\text{g/ml}$); GX, Glycinexylidide; MEGX, Monoethylglycinexylidide.

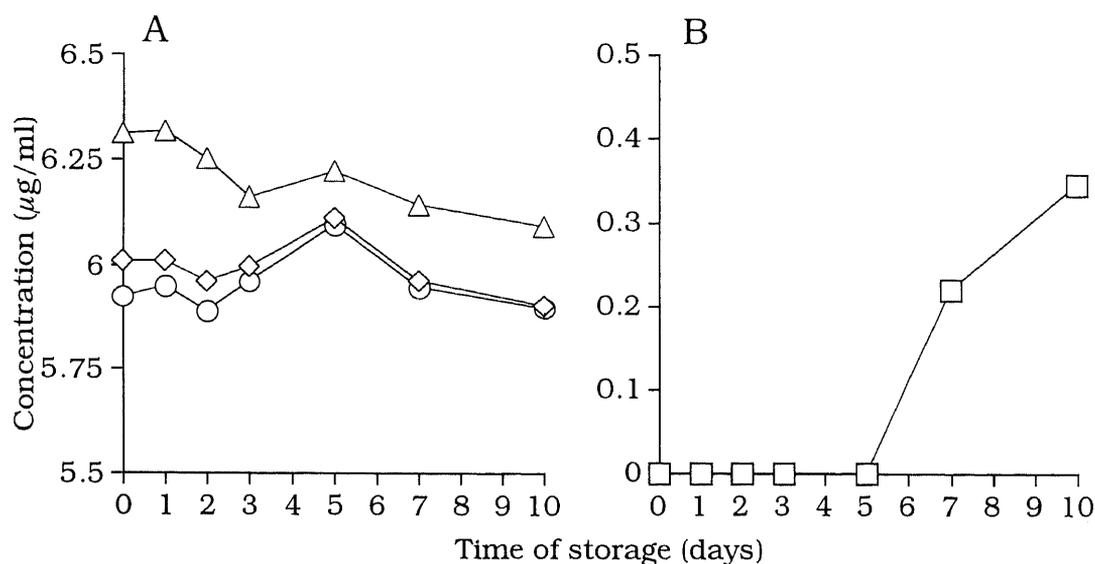


Fig. 6. Change of concentrations of methamphetamine and its related compounds in urine. (A) Change of concentration of methamphetamine (triangle), amphetamine (lozenge) and ephedrine (circle) in the urine specimen experimentally prepared at the concentration of $6 \mu\text{g/ml}$. (B) Change of concentration of phenethylamine in drug-free urine.

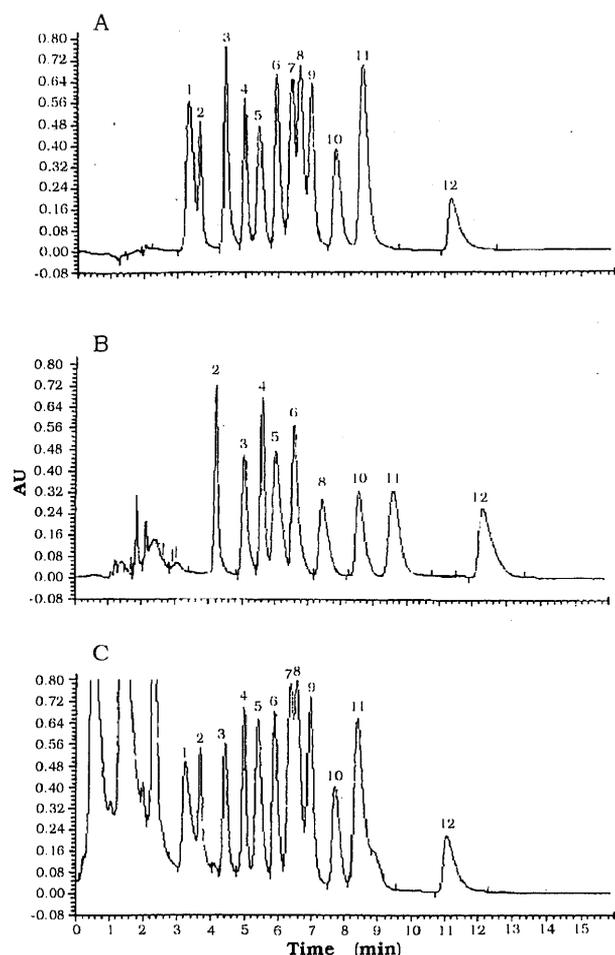


Fig. 7. REMEDI-HS[®] chromatograms of 10 local anesthetics and metabolites in distilled water (A), serum (B) and urine (C). 1, N-ethylmeprobamate; 2, glycinexylidide; 3, prilocaine; 4, monoethylglycinexylidide; 5, lidocaine; 6, mepivacaine; 7, tetracaine; 8, bupivacaine; 9, procaine; 10, cocaine; 11, dibucaine; 12, chlorpheniramine.

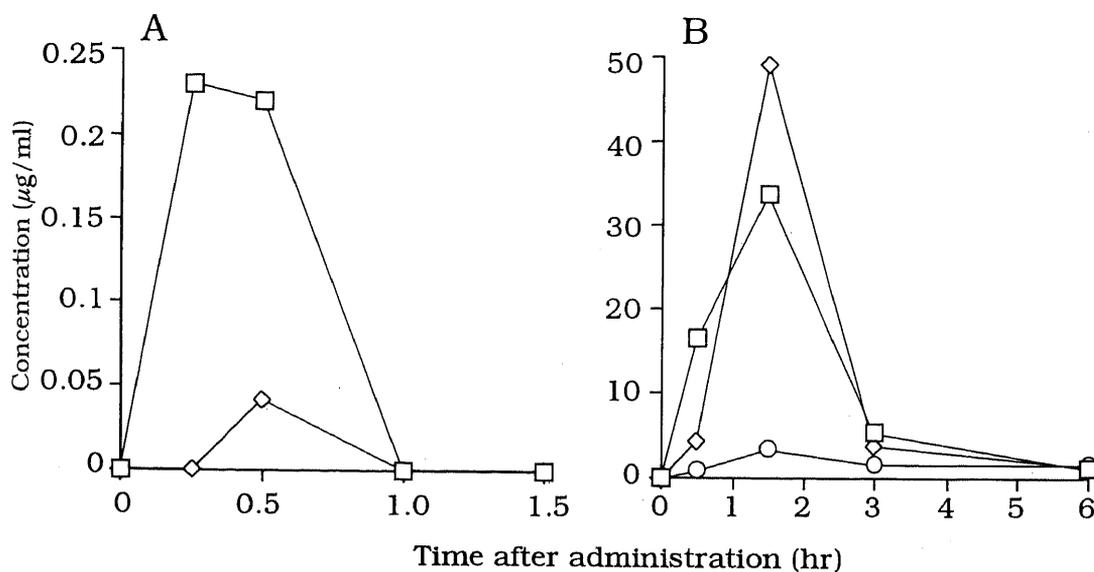


Fig. 8. Time course of lidocaine and its metabolites in serum (A) and urine (B) obtained from a rabbit with the administration of lidocaine hydrochloride of 2mg/kg. Open square, lozenge and circle indicate lidocaine, monoethylglycinexylidide and glycine, respectively.

インと MEGX の薬物モニタリングを行った。症例は急性心筋梗塞に罹患し本学附属病院に搬送され、不整脈予防の目的で塩酸リドカインの点滴静注を受けた3名の男性救急患者(55, 57, 62歳)である。55歳・男性は塩酸リドカイン投与を80mg/時間より開始し、第10病日より60mg/時間とした後、第11病日より100mg/時間、第12病日より120mg/時間に増量後、同日100mg/時間、80mg/時間に漸減し、その後第13病日に60mg/時間、第14病日に30mg/時間とし、第15病日に投与を中止した。57歳・男性は60mg/時間より開始し、第2病日より40mg/時間、第3病日より20mg/時間に漸減し、同日投与を中断し、第4病日より50mg/時間にて再開され、同日投与を中止した。62歳・男性は第1病日より第6病日まで60mg/時間投与された。各々第12から16病日、第3から6病日、第2から4病日に採血、第14から17病日、第2から6病日、第2から5病日で採尿し、REMEDi-HS[®]でリドカインとMEGXを同時測定した。

成 績

I. 定性分析

1. 標準薬物について

検討した42種の薬物・代謝物のうち38種はクロマトグラム上、明確に識別しうるピークとして認められた。それらのRT, RRT 値を表1に示す。

クロマトグラム上ピークを確認された薬物・代謝物のうち、アリルイソプロピルアセチル尿素 (Apronolide)、ブロムワレリル尿素、プロチゾラム、プリロカイン、フェニトロチオン、ニソルジピン、メチルエフェドリンおよびヒベンズ酸チベピジンの8種は、薬物同定ライブラリーに未登録であったので、これら薬物の測定で得られた、IS に対する RRT および吸光スペクトラムを新規に登録し、いずれも同定可能となった。カフェイン、トリアゾラム、GX およびブピバカインは既存の薬物同定ライブラリーに登録済みであったが、コンピューターで正しく同定されないことが多かったので、標準品を用いて再登録した。

ところ良好な結果を得た。

GX は IS1 と保持時間が近似し、低濃度では IS1 のピークに隠れてしまうため、その検出には IS2 のみを用いた分析が必要であった。プリロカインは尿中に含まれる生体成分由来のピークと重なるため、尿中で低濃度の場合はライブラリー登録後もお同定不能のことが多かった。

フェニトインはフェノバルビタールと RT が近く、同薬物と誤同定されることがあり、さらに同一検体中では両薬物は同じ

ピークとして認められた。アリルインプロピルアセチル尿素とブロムワレリル尿素は同一検体中で分離することは出来なかった。フェネチルアミン、3-フェニル-1-プロピルアミン、1-メチル-3-フェニルプロピルアミン、フェンテルミン、β-メチルフェネチルアミンは、アンフェタミンと分離同定することは出来ず、N-メチルフェネチルアミンはメタンフェタミンと分離同定することは出来なかった。その他の薬物・代謝物はいずれも正しく同定された。

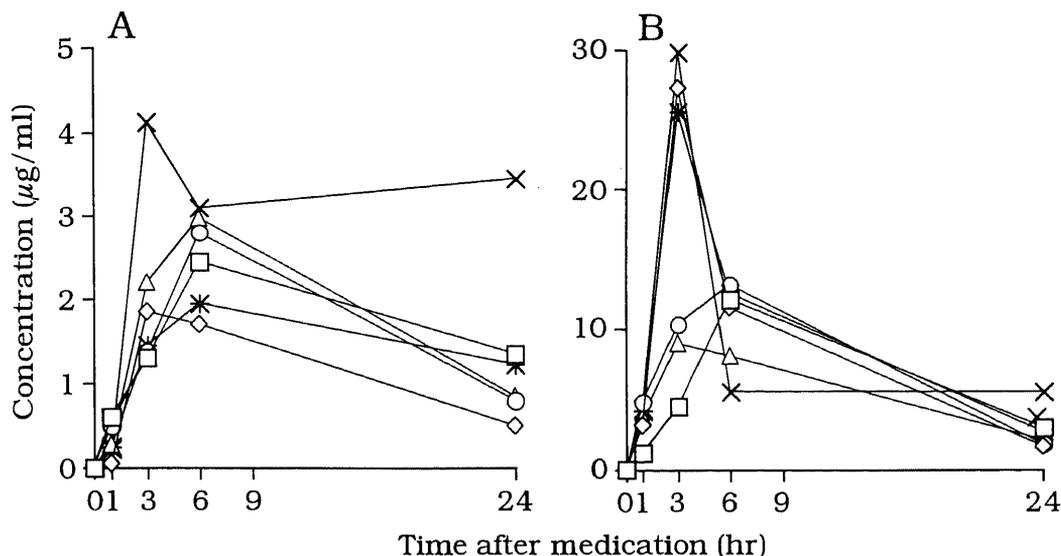


Fig. 9. Time course of methylephedrine (A) and ephedrine in urine obtained from human volunteers with the administration of cold remedies.

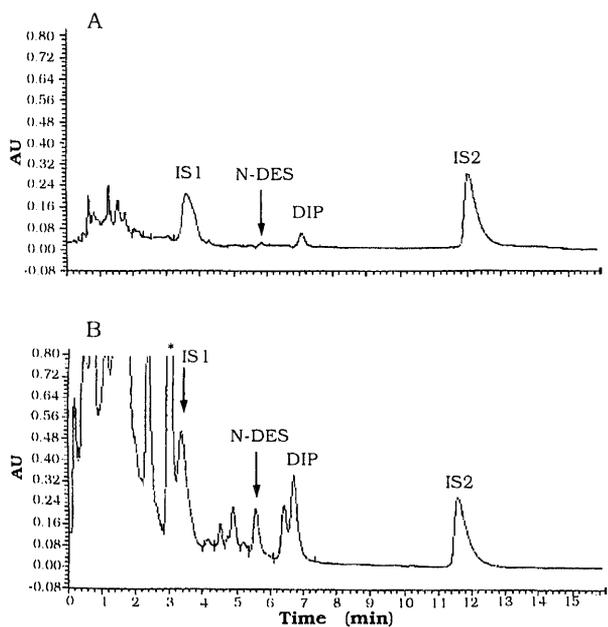


Fig. 10. REMEDI-HS[®] chromatograms of serum (A) and urine (B) obtained from 27-year-old male with the ingestion of diphenhydramine hydrochloride of 100 mg (after 2 hours). IS1, N-ethylnordiazepam; N-DES, N-desmethyldiphenhydramine; DIP, diphenhydramine; IS2, chlorpheniramine; *, another metabolite of diphenhydramine.

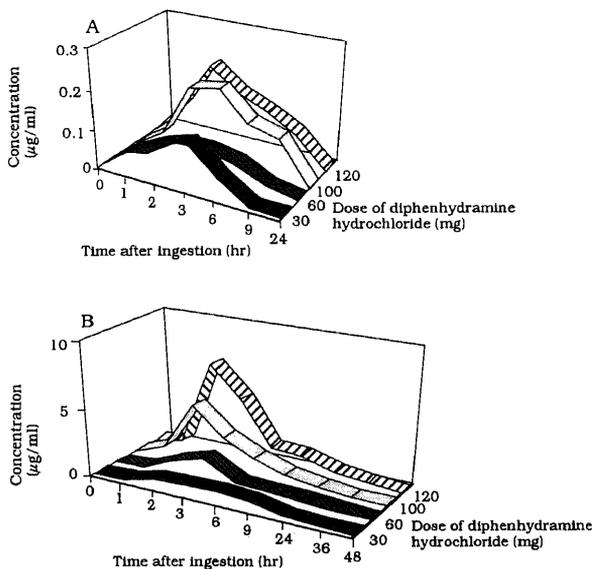


Fig. 11. Time course of diphenhydramine in serum (A) and urine (B) obtained from 17 human volunteers with the ingestion of diphenhydramine hydrochloride.

アセトアミノフェン, アミカシン, 臭化ベクロニウムおよび臭化パンクロニウムを蒸留水中に各々最終濃度 20, 200, 10, 50 $\mu\text{g/ml}$ となるように添加し測定したが, クロマトグラム上, 各薬物のピークを確認することは出来なかった. テトラカインおよびプロカインについては, 蒸留水や尿検体では, 0.1 から 0.2 $\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度でそれらのピークが検出可能となったが, 血清検体からは 2 $\mu\text{g/ml}$ の濃度でも各ピークを確認することは出来なかった.

2. リドカイン検出のためのパラメーター

リドカインが検出された検体を3群(実際に投与した群, 未投与群, 血清または尿に実験的に添加した群)に分け各群のQLPについてANOVA法の後, Scheffe's F検定を用いて比較した. SFおよびAR1で, 未投与群の値は投与群および添加群の値に対して有意差($p < 0.05$)を認めたが, 投与群と添加群間ではこれら2つのパラメーターにはいずれも有意差は認められなかった(表2).

II. 定量分析

1. 内部標準法のための薬物検量線

24種の薬物・代謝物について, 内部標準法を用いて検量線を作成した. 各々の薬物・代謝物において表3に示す範囲で直線

性(0.94以上)が認められた.

2. 定量パラメーター法と内部標準法の比較

ブロムフレリル尿素, エフェドリン, ヒドロキシジン, ジフェンヒドラミン, ラニチジン, リドカイン, GX, 計7種の薬物, 1種の代謝物についてQFを用いた定量値(rapid estimate method)と, 内部標準法による定量値(internal standard method)を比較した結果を表4に示す. これら7種の物質について, 両定量値には相関係数0.960から1.000の範囲で高い相関のあることが確かめられた.

3. カラム劣化の定量値への影響

測定をくり返すことによるカラムの劣化による定量値への影響について, 各測定回数ごとのジフェンヒドラミン, IS1, IS2のピーク高を, 1検体目のピーク高に対する各々の比として求めた. IS1のピーク高は50検体目で1検体目の68%まで減少したが, ジフェンヒドラミンおよびIS2は各々86%, 93%であった. また, 50検体目のジフェンヒドラミンのIS2に対するピーク高の比は1検体目の93%であった(図3).

4. 定量値に対するフィルター処理の影響—フェネチルアミン例

血清中に添加されたフェネチルアミンは, REMEDI-HS[®] 専

Table 7. Drugs and metabolites detected by the analysis of REMEDI-HS[®] system in emergency medical cases and autopsy cases.

Aminoglutethimide	Hexobarbital
Amitriptyline	Hydrocortisone
Apronalide	Hydroxyzine
Azacyclonol	Ketamine
Betaxolol	Lidocaine
Bromisovalum	Maprotiline
Bupivacaine	Monoethylglycinexylidide
Butriptyline	Methadone
Caffeine	Methamphetamine
Carbamazepine	Methylephedrine
Carbamazepine-10, 11-epoxide	Methylphenidate
Carbamazepine metabolite	Methylprednisolone
Carbromal	Metoclopramide
Chlorpheniramine	Naphazoline
Chlorpheniramine metabolite	N-desmethyldiphenhydramine
Chlorpromazine metabolite	N-desmethylverapamil
Cimetidine	Oxymetazoline
Clemastine	Perphenazine
Cyclophosphamide	Phencyclidine
Desmethylopiclone	Phenethylamine
Desmethylniperidine	Phenobarbital
Diazepam	Phenytoin
Dihydrocodeine	Pindolol
Dihydrocodeine metabolite	Promethazine
Diltiazem metabolite	Promethazine metabolites
Diphenhydramine	Promethazine sulfoxide
Diphenhydramine metabolite	Quinidine
Dipivefrine	Ranitidine
Dothiepin	Ranitidine metabolites
Econazole	Sertraline metabolite
Ephedrine	Sulpiride
Erythromycin	Thiopropazate
Estazolam	Trazodone
Fentanyl	Verapamil metabolite
Glycinexylidide	

用フィルター, HV フィルターを用いた分析でいずれも同定が可能であり, 検量線を作成したところ良好な直線性が得られ, 血清検体での IS2 に対する薬物ピーク高比は濾過するフィルターの種類に関係なくほぼ一定であった (図 4 A). 尿検体でも両フィルターを用いて得られた検量線は良好な直線性を示し, 非濾過検体とほぼ同一のピーク高比が得られた (図 4 B).

Ⅲ. 薬物の検出限界濃度についての検討

24種の薬物について REMEDI-HS[®] における各々の検出限界濃度を求めた. その結果, これらは血清中で 0.04~2 μ g/ml, 尿中で 0.02~0.2 μ g/ml, 蒸留水中で 0.04~0.4 μ g/ml の範囲にあった (表 3).

Ⅳ. 局所麻酔薬およびリドカイン代謝物濃度の日内および日間変動

REMED-HS[®] の日内および日間精度について検討するため, 8種の局所麻酔薬と2種のリドカイン代謝物を蒸留水, 薬物未混入の血清や尿に添加し, 検量線を作成後, 日内変動としては同日中に, 日間変動としては翌日に, 各々 1.00 μ g/ml を標

的濃度とする検体を測定した. その結果, 日内変動 (CV₁; coefficient of variation for within-day precision), 日間変動 (CV₂; coefficient of variation for day-to-day precision) はそれぞれ変動係数 1.07~8.35%, 1.91~11.8% であった (表 5).

Ⅴ. リドカイン, MEGX およびブロムワレリル尿素の REMEDI-HS[®] と GC-MS 法による比較

リドカイン, MEGX, さらにブロムワレリル尿素を GC-MS 法で定量 (Y) し, REMEDI-HS[®] での定量結果 (X) と比較し相関係数を算出した. リドカインは血清中で $Y=0.778X+0.597$ (相関係数 $r=0.861$, $n=12$), 尿中で $Y=0.908X-0.010$ ($r=0.908$, $n=12$), MEGX は血清中で $Y=1.518X+1.910$ ($r=0.978$, $n=13$), 尿中で $Y=0.272X+3.477$ ($r=0.753$, $n=8$), ブロムワレリル尿素は $Y=0.718X+13.548$ ($r=0.939$, $n=6$, 血清 4 検体, 尿 2 検体) であった.

Ⅵ. 覚醒剤の保存中の濃度変化とフェネチルアミン産生に関する基礎的検討

薬物未混入の尿検体に, 実験的にメタンフェタミン, アン

Table 8. Main three emergency medical cases and three autopsy cases of which toxicological informations were clarified by REMEDI-HS[®] system

Case	Sex	Age (years)	Profile	Specimen	Drug	Concentration (μ g/ml)
A	M	32	Death due to methamphetamine intoxication	Serum	Methamphetamine	20.5
A	F	26	Death due to bromisovalum intoxication	Urine	Methamphetamine	49.7
				Serum	Bromisovalum	23.9
				Urine	Hydroxyzine	1.56
				Urine	Bromisovalum	81.4
A	M	17	Death due to motorcycle accident	Urine	Hydroxyzine	27.0
				Gastric content	Bromisovalum	1324
				Urine	Hydroxyzine	50.4
				Urine	Methylephedrine Ephedrine Dihydrocodeine	
E	M	63	Attempted suicide by bromisovalum ingestion	Serum	Bromisovalum	98.8
				Urine	Bromisovalum	47.6
				Urine	Ranitidine Ranitidine metabolite Pindolol	57.4
				Gastric content	Bromisovalum	761
E	F	37	Attempted suicide by the ingestion of carbamazepine and other drugs	Serum	Carbamazepine Carbamazepine-10, 11-epoxide	15.2 8.6
				Urine	Desmethylzopiclone Chlorpheniramine Promethazine sulfoxide	
				Gastric content	Promethazine Promethazine sulfoxide	
				E	F	46
Urine	Desmethyleperidine Maprotiline Sulpiride					
Gastric content	Lidocaine Erythromycin					

A, autopsy case; E, emergency medical case; M, male; F, female.

フェタミン、エフェドリンおよびメチルエフェドリンを添加し分析したところ、これらはすべて互いに異なるピークとして分離同定された(図5)。それらの定量値は経時的に徐々に減少したが、10日目でも定性および定量分析可能であった(図6A)。また薬物未添加の尿検体から、30℃で保存後7日目からフェネチルアミンが検出されたが(図6B)、これはアンフェタミンと分離同定することは出来なかった。

Ⅶ. 局所麻酔薬同時スクリーニングのための検討

1. 多種局所麻酔薬の同時スクリーニングのための基礎的検討

同一検体中に10種の薬物および代謝物を実験的に添加して検討したところ、蒸留水および尿検体で各々10種、および血清検体では8種の薬物ないし代謝物が、すべて互いに異なるピークとして正確に分離同定された(図7)。さらに蒸留水検体をpH 4.0および9.0に調整後、これらの検量線を作成したが、RT、RRTおよびピーク高への水素イオン濃度の影響は認められなかった(表6)。

2. 局所麻酔薬検出のための動物投与実験

体重1kgあたり塩酸リドカイン2mgを筋肉内注射したウサギ血清試料からリドカインとその代謝物MEGXを検出した。また、尿試料からはリドカインとMEGXに加え、GXも検出された。さらに内部標準法を用いて定量した結果、血清中ではリドカインが投与後15分目から検出されたが、1時間後には検出されなくなった。MEGXはリドカインよりも遅れて投与後30分で検出された。尿ではリドカイン、MEGX、GXのいずれも、投与後30分から検出され始め、1時間30分後に最高濃度に達し、その後減少したが、6時間後でもなお検出可能であった(図8)。

Ⅶ. 市販感冒薬成分検出のためのヒトボランティアへの投与実験

服用後1時間目の尿から、その成分であるメチルエフェドリンとその代謝物エフェドリンがクロマトグラム上、分離同定され、服用後3ないし6時間目に最高濃度に達し、24時間後もなお検出可能であった(図9)。これに対し血清では、これら2つの薬物ともに検出されなかった。

Ⅹ. 抗ヒスタミン薬(ジフェンヒドラミン)検出のためのヒトボランティアへの投与実験

服用後1時間又は2時間目の血清からジフェンヒドラミンとその代謝物であるN-デスマチルジフェンヒドラミン(N-desmethyldiphenhydramine, N-DES)が検出された。さらに尿からはジフェンヒドラミン、N-DESに加えて、さらに1つの代謝物が検出された(図10)。内部標準法を用いジフェンヒドラミン濃度を定量したところ、服用量の増加に伴って、血清および尿中濃度ともに増加しているのが確認された(図11)。

X. 救急患者および剖検試料からの薬物分析

REMEDi-HS[®]での薬物分析により検出された薬物を、表7に示す。検査対象となった剖検79例と救急患者53例を、各性別・年齢層に分類し、医薬品が検出された人数を求め、それらを図2に示した。

剖検例では男性の53例中41例(77%)で医薬品を検出し、20歳台(9例)が最多であり、続いて50歳台(6例)、60歳台(5例)の順であった。女性では24例中20例(83%)で検出し、60歳台(5例)が最多で、次いで20歳台(4例)であった(図2A、B)。このうち、REMEDi-HS[®]での薬物分析が死因決定に有用で

あったり、生前の状況を客観的に示し得た事例としては、心内血、尿および胃内容より覚醒剤が検出され、死因が急性覚醒剤中毒と診断された32歳男性例、心内血、尿や胃内容さらに死体発見現場に残留した清涼飲料水からブロムワレリル尿素が検出され、同薬物による急性中毒と診断された26歳女性例、さらにはエフェドリン、メチルエフェドリンやジヒドロコデインが検出され、生前に感冒薬を服用したことが判明した17歳男性例などがあった(表8)。

一方、救急例では男性29例中25例(86%)で医薬品が検出され、50歳台(11例)が最多であった。女性では21例中18例(86%)で検出され、10歳台(4例)が最多であった(図2C、D)。このうち、REMEDi-HS[®]による薬物分析が診断や治療方針の決定に有用であった例として、来院時の血清、尿および胃内容からブロムワレリル尿素が検出され、ブロムワレリル尿素中毒と診断された63歳男性例、カルバマゼピンを主体とする複

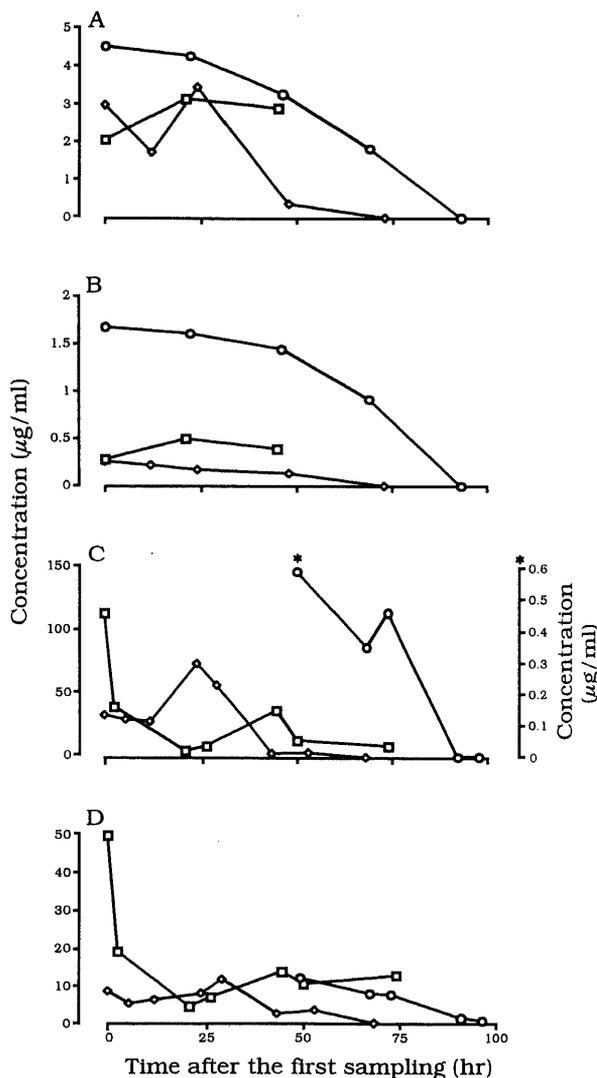


Fig. 12. Time course of lidocaine and monoethylglycinexylidide (MEGX) in the serum and urine in three male cases of acute myocardial infarction. Open circle, lozenge and square correspond to a 55-year-old male, a 57-year-old male and a 62-year-old male, respectively. (A) Lidocaine in serum, (B) MEGX in serum, (C) Lidocaine in urine, (D) MEGX in urine. *, a 55-year-old male.

数の薬物による急性中毒と診断された37歳女性例,あるいは血清中にカルバマゼピンを検出したことが,カルバマゼピンによる抗利尿ホルモン不適合分泌症候群の診断をもたらした46歳女性例などがあった(表8)。

XI. 薬物モニタリングへの応用例

塩酸リドカインを投与された急性心筋梗塞患者3名の血清および尿からリドカインとその代謝物 MEGX, GX を検出し,リドカインと MEGX の濃度を内部標準法で定量したところ,血清リドカイン濃度の推移は,投与リドカイン量の増減を良く反映していた。また血清 MEGX 濃度も十分に測定可能な濃度域にあった。また尿中では,MEGX 濃度はリドカイン濃度より数時間遅れて推移していた(図12)。

考 察

現在用いられている薬毒物スクリーニング法には, TLC, GC/MS, HPLC やイムノアッセイ等があるが,いずれも操作や判定に熟練が必要ならうえ,前処理にやや多くの時間を要する問題点がある。また検査結果についても,ある単一の薬物を特定出来ず薬物群としてしか判定し得なかったり,逆に特定の薬物のみ分析可能であるといった種々の難点を抱えている。当教室では従来から TOXI-LAB[®] (Toxi-lab Inc, Irvine, U.S.A.) システムを用いて薬毒物スクリーニングを施行してきた²⁾⁹⁾が,同システムは TLC の原理に基づくもので¹⁰⁾,比較的多くの薬毒物分析(約100種類)が短時間で可能ではあるものの¹¹⁾,定量的評価が困難であり,検出限界も概略 1 μ g/ml 以上と良好とは言えない。

そこで本研究では,包括的な薬毒物分析用として HPLC を原理とする REMEDI-HS[®] システムに着目し,その有用性を法医学中毒学的観点から総合的に検討した。すなわち,同装置はカラムスイッチング法¹²⁾を採用しているため,薬物抽出等の前処理や分離がオンラインで施行可能であり,分析に要する時間も試料の分注,遠心等を含めて約30分程度と短い。さらに付属コンピューターには,約650種類の各薬物の内部標準物質に対する相対保持時間と各々の吸光スペクトルが,薬物ライブラリーとして登録されているため,分析後に薬物判定結果が自動的に表示され,これにより中毒学的情報の乏しい検体についても広範囲の薬毒物分析が可能となっている。

米国で開発され,このような特徴を有する REMEDI-HS[®] の我が国での本格的な使用は著者らの教室が最初であるが,米国と日本では使用薬物の種類に相違がみられるため,同装置の国内における薬毒物判定上の有用性については十分に検討する必要がある^{11)13)~15)}。そこで本研究では同装置の有用性を臨床法医学中毒学的観点から検討するため,基礎的検討を含めて順次,着手した。

まず定性分析上の問題点について検討した。すなわち, REMEDI-HS[®] で検体中に含有される薬物が正確に同定されるかを検討するため,表1に示すように日本での使用頻度が高い薬物の原末を蒸留水,あるいは薬物未混入の血清や尿に実験的に添加し, REMEDI-HS[®] の同定能力を吟味した。

また REMEDI-HS[®] の薬物ライブラリーは,開発された米国の薬毒物濫用事情を念頭に置いて作成されたものであり,日本での中毒事情¹⁶⁾とはその内容を異にしている。そこで,日本での使用頻度が高いブロムワレリル尿素,ニソルジピン他6種の薬物をライブラリーに新規登録することで, REMEDI-HS[®] の

薬物検索能を補完した。結論的には,一部を除いて検討された薬物は正確に同定され,実際の救急例や剖検例における薬物分析での有用性を示唆する成績が得られた。

しかしながら,複数の薬物が同一検体中において互いに同一のピークとして認められる場合があったが,これは REMEDI-HS[®] が短時間(約20分)に約650種類の薬物を分離していることによるものであり,今回の検討では互いに分離不能であった,フェニトインとフェノバルビタール,あるいはアリルインプロピルアセチル尿素とブロムワレリル尿素については,いずれの場合も両者を含む合剤が使用されているため,これらの分離同定には他の分析システムに依らざるを得ない。

クロマトグラムの上にピークが検出されない薬物としてアセトアミノフェン,アミカシンなどの酸性薬物があるが,これは前処理用カラムで除去されてしまうためと考えられた⁹⁾¹⁷⁾。また,我が国で高頻度で使用されるアスピリンも同様に検出が困難であり¹⁷⁾,分析上の問題点として残った。テトラカインおよびプロカインについては,それらの蒸留水および尿中での検出限界濃度の10ないし20倍になるよう実験的に清浄血清に添加し測定したものの,両者ともピークを確認することは出来なかった。これはヒト血清に含まれるエステラーゼにより,テトラカインやプロカインが加水分解されるためと考えられた¹⁸⁾¹⁹⁾。

前述のように REMEDI-HS[®] の薬物判定は,薬物同定ライブラリーに登録された各薬物の IS に対する RRT と,吸光スペクトルにより得られた8種のパラメーター(QLP)を用いて行われるが,著者は実験的に得られた試料や剖検例・救急例での薬物分析を通じて,明らかな誤同定や同定不能といった例を経験した。この理由としては前処理用カラムで除去し得なかった生体成分の影響や,薬物判定用の QLP が必ずしも各々の薬物に特異的ではないなどが考えられたため,既に薬物同定ライブラリーに登録済みであるにもかかわらず同定不能に陥りやすいカフェイン,トリアゾラム, GX およびプピバカインについては,標準品を用いて再登録したところ容易に同定された。また明確な投与の記載がないにもかかわらず多くの検出例を経験したりドカインに着目し,同薬物が検出された検体を3群(実際に投与した群,未投与群,血清または尿に実験的に添加した群)に分類し,各群の薬物判定に使用する QLP の信頼度を検討したところ, SF および AR1 では投与群と添加群間には有意差($p < 0.05$)を認めなかったものの,未投与群については投与群および添加群の両者に対して有意差($p < 0.05$)が認められた。その差はいずれも BIO-RAD 社の定めた許容範囲(tolerance window)内ではあったが, SF および AR1 を用いてリドカイン真陽性例と偽陽性例とを識別しうる可能性が示された。このように, REMEDI-HS[®] では薬物判定をコンピューターが QLP を用いて自動的に行うが,自動判定結果を鵜呑みにするのではなく,薬物判定に使用された QLP を使用者自らが十分に吟味,検討することが重要であると考えられた。

また, REMEDI-HS[®] は原理的に HPLC システムを用いており,1回の測定で親物質のみならず代謝物も同時分析可能であるので,代謝物も含めた幅広い薬物分析に極めて有用と言えます。親物質と代謝物の同時同定は,当該親物質服用の事実をより一層確実に立証し得る。本研究でも REMEDI-HS[®] での分析を通じて,ヒドロキシジン,ジフェンヒドรามミン,ラニチジン,リドカイン,メチルエフェドリン,カルバマゼピンの各代謝物を検出したが,これらはいずれも検体中の親物質の存在を支持

する所見であった。

さて、スクリーニングで定性的に検出された薬物が、救急患者の中毒症状の発現や剖検死体の死因にどの程度強く関与しているかの判断を行うには、それら薬物の定量分析が必要不可欠である。REMEDi-HS[®]は検出薬物のピーク高をスキャンニング UV 検出器で測定するため、他の HPLC システム同様、定性分析に加えて定量分析も可能である。そこで表 3 に示す 24 種の薬物と代謝物の原末を入手して検量線を作成し、内部標準法で REMEDI-HS[®] による迅速な定量分析が行いえるようにした。

しかし実際の臨床および法医実務では定量分析の対象となる薬物は多種多様であり²⁰⁾、それら薬物に対して事前に検量線を作成しておくことは不可能であり、検査依頼を受けた後に当該薬物の原末を入手することも少なくはない。特に救急例においては緊急に重症度を判断する必要があるにもかかわらず、対象薬物の入手に数か月を有することもまれではないため²¹⁾、中毒症例があってもその定量分析を依頼し得なかったり、依頼しても迅速な結果は初めから期待していないという考え方に傾き²²⁾、治療に直接還元される定量分析をいかに迅速に行うかは重要な問題である。

この問題の解決に REMEDI-HS[®] は大きく貢献する。すなわち、REMEDi-HS[®] は大部分の登録薬物に対する係数が QF として与えられており、これをクロマトグラム中の薬物ピーク高に乗ずることで定量結果が得られる。本研究では救急例、剖検例や動物またはヒトボランティア投与例で検出されたブロムワレリル尿素、エフェドリン、ヒドロキシジン、ジフェンヒドラミン、ラニチジン、リドカイン、GX について、その濃度を QF を用いて定量し、内部標準法との定量結果と比較した。表 4 に示すように両定量結果はいずれも高い相関関係にあり、QF による定量の信頼性を示している。すなわち、REMEDi-HS[®] の QF を用いた定量分析では、約 30 分で中毒学的情報に乏しい検体についてスクリーニングと定量が可能となり、またこの定量値は内部標準法の結果と高い相関を有し、救急現場や法医実務に大きく寄与するものと考えられた。

その構造上、REMEDi-HS[®] は前処理用カラムと分離用カラムがオンラインで接続されているため、直接検体をカラム内に注入することになり、他の分析システムに比べてカラム劣化の定量結果に対する影響が懸念された。そこでジフェンヒドラミンを薬物未混入の尿検体に添加し、4 種のカラムを全て交換後、前記尿検体を 50 検体連続で測定し、カラム使用回数の増加に伴う薬物および IS ピーク高の変動を調べることで、カラム使用回数の増加が定量値に与える影響を検討した。その結果、ジフェンヒドラミン、IS1、IS2 について、1 検体目のピーク高に対する 50 検体目でのピーク高は各々、86%、68%、93%であった。すなわち、薬物ピーク高はカラム劣化に伴い 10% 以上の減少を示したが、同時に IS も減少傾向を示したため、ジフェンヒドラミンの IS2 に対するピーク高比は、50 検体目では 1 検体目の 93% と、その減少程度は 10% 未満となっていた。このことは、薬物の定量には当該薬物のピーク高のみを用いるよりも、当該薬物と IS2 の比を用いた方が、カラム使用回数の増加の影響が少なくなることを示している。また、IS1 のピーク高は、カラム使用回数の増加の影響を受けやすいことが判明したので、内部標準法による定量評価には IS2 を用いる方がより確実であると考えられた。

また、血清・血漿検体を REMEDI-HS[®] で分析する際は、測定前に専用フィルターチューブを用いて不純物を除去する必要があるが、この前処理によって内部標準物質の一つである IS1 のピークが著明に減少する場合があった。これはフィルターへの吸着によるものと考えられ、他の薬物についても同様にフィルターが回収率に影響を与える可能性が考えられた。そこで法医実務上、腐敗した剖検試料での分析の際に比較的、高頻度で認められるフェネチルアミンに着目し、フェネチルアミンの回収率に与えるフィルターの影響を検討した。すなわち血清・尿検体にフェネチルアミンを実験的に添加し、血清検体では REMEDI-HS[®] 専用フィルターまたは HV フィルターで濾過後、また尿検体についてはフィルターで濾過しなかった検体も含めて分析した。その結果、フェネチルアミンの IS2 に対するピーク高比はいずれのフィルターによる濾過後もほぼ一定であり、さらに尿検体での比較から、その比は濾過処理を行わない時とほぼ同様であった。このことはフェネチルアミンの分析では、REMEDi-HS[®] 専用フィルターや HV フィルターを用いた濾過処理による回収率の減少は認められないことを示している。

一方、小澤ら¹⁴⁽²³⁾は、有機リン系農薬であるフェニトロチオン、マラチオンや、ベンゾジアゼピン系薬物を REMEDI-HS[®] 専用フィルターを用いて分析したところ、HV フィルターを用いた場合に比べてピーク高が著明に減少したと報告しているが、ピーク高の低下によって中毒原因物質が検出されなくなる場合も考えられるので、前処理用フィルターの選択は慎重に行う必要がある。

REMEDi-HS[®] は内部標準法や QF を用いた迅速定量が可能であるが、それらが可能な薬物の濃度範囲が生体でどの様な濃度レベルに相当するのか検討することにより、実際の臨床および剖検実務に応用できるか否かを判断すべきである。そこで、REMEDi-HS[®] による薬物の検出感度とその薬物の有効血中濃度や中毒域あるいは致死域濃度の関係について検討した。

その結果、検出限界は概ね 0.1 μg/ml 前後で、従来より薬物スクリーニングに頻用されてきた TLC システムよりも良好であった。また、プリロカイン、リドカイン、メピバカイン、プピバカイン、カルバマゼピンについては有効血中濃度下限よりもさらに低い濃度でも検出可能であり^{24(25)~28)}、急性中毒の診断に加え、薬物濃度のモニタリングにも有用であると考えられた。一方、コカイン、ラニチジン、ヒドロキシジン、ジフェンヒドラミン、ニフェジピンについては有効血中濃度より検出可能となった^{24(30)~34)}。また、プロカイン、メタンフェタミンについては、報告されている血中毒域下限より低濃度でも検出可能であり²⁴⁽³⁵⁾³⁶⁾、前述のコカインなどと同様、中毒症例の診断に有用と考えられた。さらに、ブロムワレリル尿素的の検出限界濃度は中毒例や致死例での血中濃度に対して十分に検出可能なものであり^{37)~39)}、一方、トリアゾラムについては検出下限値よりも低濃度の血中濃度での死亡例が報告されているため⁴⁰⁽⁴¹⁾、同薬物による致死例の血液からでもトリアゾラムを検出し得ない例がありうることを示された。

また、実際に機器分析を行う場合に必要事項、特に日内・日間変動と内部標準物質についても検討した。すなわち、REMEDi-HS[®] 分析での日内、日間精度を検討するため、10 種の局所麻酔薬およびリドカイン代謝物を用い、それらの検量線を作成後、1 μg/ml の標的濃度を定量し、その変動係数を算出

した結果、分析によって得られた薬物の濃度の日内、日間変動は、各々10%、12%未満であり分析結果の再現性が良好であった。

さらに REMEDI-HS[®] での薬物分析は内部標準物質である IS1 と IS2 の両者、またはどちらか一方に対する相対保持時間を用いて行われるが、抗ヒスタミン薬である IS2 は市販感冒薬にも含まれ、我が国では比較的高頻度で使用されているため、REMED-HS[®] による分析上の支障となる可能性があった。今回検討した症例でもクロルフェニラミンの検出例があったが、IS1 のみを内部標準物質として用いる分析も一応、可能であるが、この場合はカラム使用回数の増加によりピーク高の変動が大きくなってしまふ(図3)。また血清検体では、前述のごとく前処理用フィルターに IS1 が吸着されてしまうため、IS1 のみを内部標準物質とすることは困難であり、したがって實際上、内部標準法を用いたクロルフェニラミンの定量分析は難しい。また GX は IS1 と保持時間が近似しているため、低濃度では IS2 のみを用いた分析が必要であった。他にも内部標準物質とその保持時間が近いために分析困難な薬物が報告されており⁴⁰⁾、したがって、今後、内部標準物質の種類についても検討していく必要がある。

現在、法医学中毒学領域においては GC-MS 法による分析結果が求められる機会が多く、REMED-HS[®] による成績との対比を行う必要も生じてくることから、REMED-HS[®] での定量結果を GC-MS 法によるものと比較した。今回検討したリドカイン、MEGX およびブロムワレリル尿素の両システムによる定量結果は相関係数0.753から0.978の範囲を示し、高い相関のあることが確かめられた。また、REMED-HS[®] による定量値の他システムとの比較に関して、大庭ら¹⁷⁾および佐藤ら⁴⁰⁾は各々、救急患者血液中のフェニトインおよびメタンフェタミン添加尿について免疫学的手法を用いた TDX[®] (ダイナボット、東京) および EMIT[®] (Syva、東京) での定量結果と比較しており、それぞれ相関係数は0.88および0.989であったと報告している。これらの結果から、REMED-HS[®] の定量結果が他の分析装置と高い相関を有することが改めて示された。

実験的に薬物を添加した検体の分析を通じて、REMED-HS[®] が検体中の薬物を正確に判定したことは、実際の救急例や剖検例で得られる試料からの薬物検出の可能性を示す所見ではあるが、生体由来の試料中の薬物は既に生体内で修飾を受けていることが添加試料とは異なる。したがって生体試料における薬物分析の有用性の検討には、実際のヒト検体から含有薬物を正確に分離同定しうるかどうかを確認する必要がある。しかしながら、現実の救急例や剖検例で正確な中毒学的情報(服用薬毒物の種類、量、経路、経過時間等)を備えた症例を経験することは稀である。そこでその代替として薬物をウサギやヒトボランティアに投与し、その後、血清や尿検体を採取し、薬物やその代謝物を分析する検討を行った。薬物としては我が国で高頻度で使用される局所麻酔薬リドカイン、市販感冒薬成分であるメチルエフェドリン、抗アレルギー薬ジフェンヒドラミンを選択した。その結果、血清と尿検体中から、リドカイン、ジフェンヒドラミンやそれらの代謝物 MEGX、GX および N-DES が検出され、N-DES を除いて、全て内部標準法による定量分析も可能であった。一方、感冒薬を服用したボランティアでは、尿中よりメチルエフェドリンおよびエフェドリンが検出され定量可能であったが、血清中からはこれら薬物と代謝物

は検出されなかった。これは血清中での両者の濃度が、REMED-HS[®] の検出限界以下であったためと考えられた。以上のウサギおよびボランティアによる成績は、実際の生体由来試料についても REMEDI-HS[®] による薬物の定性・定量分析が可能であることを示している。

今日、薬物濫用は世界的規模の重要問題であり、世界保健機構(WHO)も10カ年計画でその対策に取り組んできた。覚醒剤メタンフェタミンは日本での濫用件数が多い代表的な薬物であり、その迅速分析法の確立が求められている²⁾。本研究でもメタンフェタミンおよびその代謝物アンフェタミン、さらに両者の関連化合物について法医学剖検例についての薬毒物分析を通じて検討し、腐敗死体の尿検体等から覚醒剤類似物質であるフェネチルアミンが高頻度で検出されることを示した。そのため薬物未添加の尿検体、並びにメタンフェタミン、アンフェタミン、エフェドリンおよびメチルエフェドリンを添加した尿検体の両者を腐敗させ、腐敗によって尿中覚醒剤やその代謝物の検出がいかなる影響を受けるかを実験的検討したところ、メタンフェタミン、アンフェタミン、エフェドリン、メチルエフェドリンについては、30℃にて保存後10日目でもなお正確に分析可能であり、腐敗の分析値への影響は小さかった(図6A)。また、薬物未添加の尿検体から保存後7日目よりフェネチルアミンが検出され、これは腐敗により産生されたものと考えられたものの⁴⁰⁾、アンフェタミンと分離同定することは出来なかった(図6B)。このことはアンフェタミンの分析では、腐敗試料の分析結果の解釈に注意しなければならないことを示している。

メタンフェタミンやコカインといった“犯法的”薬物は、“覚醒剤取締法”や“麻薬及び向精神薬取締法”で取扱が厳しく制限されている。これら薬物中毒の診断は、治療の観点からすれば迅速な結果を求められるが、一方、将来、刑事事件として立件の際に検査結果が証拠資料として提出されるため、証拠能力を十分に有する分析結果を得ることが重要である²⁰⁾²²⁾。REMED-HS[®] の分析では、これら犯法的薬物の血清および尿中での検出感度は、従来より我が国において犯法的薬物のスクリーニングに用いられてきた TLC システムと比較して²⁾、十分に良好なものであり、同装置がこれら薬物の迅速・簡便なスクリーニングとして使用可能であることが示された。しかし、法医学実務でしばしば経験するフェネチルアミンや、3-フェニル-1-プロピルアミン、1-メチル-3-フェニルプロピルアミン、フェンテルミンおよびβ-メチルフェネチルアミンなどはそれらの化学構造上アンフェタミンと良く類似していることからアンフェタミンと分離同定することは出来ず、また、N-メチルフェネチルアミンも同様の理由でメタンフェタミンと分離同定できないことが確認された。さらにメタンフェタミンやコカインについての REMEDI-HS[®] の検出感度は未だ十分ではないので、これら薬物を濫用したにもかかわらず、血清検体では検出し得ない可能性もありうる³⁰⁾⁴⁵⁾。また最近、欧米において、アンフェタミンの代謝を遅らせることでその作用を増強させるフェネチルアミンの異性体が多々押収されているとの報告もある⁴⁶⁾。REMED-HS[®] は、覚醒剤やコカインのスクリーニングおよび定量分析には有用であるが、確定判断には GC-MS システムも含めた分析が必要であると考えられた。

局所麻酔薬は医療過誤の原因薬物としてしばしば報告されており⁴⁷⁾⁴⁸⁾、法医学実務の対象となることも少なくない。そのため従来から法医学領域において、多種局所麻酔薬の同時分析に開

する報告がなされてきた^{50)~53)}。著者は8種の局所麻酔薬および2種のリドカイン代謝物が、REMEDi-HS[®]のクロマトグラム上、各々異なる保持時間を示すことに着目し、まず、それら10種の薬物や代謝物を同一試料に実験的に添加し、同時的定性分析を行いうるか否か検討した。その結果、蒸留水・尿検体、および血清検体で、各々10種、および8種の薬物ないし代謝物が全て互いに明確に異なるピークとして分離されて、当該薬物と正確に同定され、これら薬物の同時分析が可能なが証明された。また、分析の際の前処理を煩雑にする操作として、試料中の水素イオン濃度の調整があったが、REMEDi-HS[®]では試料のpHが4.0および9.0のいずれにおいても、今回検討した全ての薬物や代謝物のRT、RRTおよびピーク高に対する水素イオン濃度の影響はなく、前処理としてこの範囲のpH調整は必要でないことが確かめられた。

投与薬物濃度のモニタリング (therapeutic drug monitoring) は臨床中毒学上、重要である。特に血中治療域が中毒域や致死域に近い薬物を用いた治療の際には、特に嚴重な薬物濃度モニタリングが必要である。局所麻酔薬以外に抗不整脈薬として頻用されるリドカインは⁵²⁾⁵⁴⁾⁵⁵⁾、血中治療域が中毒域と近く²⁴⁾⁵⁴⁾⁵⁵⁾、さらにその代謝産物であるMEGXやGXもリドカインと同様の薬理活性を有している。特にMEGXは活性がリドカインの83%にも相当し、中毒症状の発現にも強く関与するため^{56)~58)}、リドカインのモニタリングにはMEGXを含める必要がある。しかし、従来からリドカインのモニタリングには免疫測定法を応用したTDX[®]が用いられているが、TDX[®]では代謝産物であるMEGXの定量は出来ない。著者はこの問題点に対処するため、塩酸リドカイン投与中の急性心筋梗塞患者の血清および尿検体についてリドカインとMEGXの同時定量分析を試み、リドカインの連日投与によりMEGXが血中に蓄積し、それによって中毒症状が発現した例を確認し、REMEDi-HS[®]を用いたリドカインおよびMEGXの同時分析の有効性を示した。このようにREMEDi-HS[®]を用いた薬物モニタリングでは、代謝産物や同時に投与された薬物の同時定量分析も可能であるため、複数の薬物の相加あるいは相乗作用の検討にも有用であると考えられる。また、本研究の成績と直接の関連はないが、リドカインが肝臓内の薬物代謝酵素の作用でMEGXに変わることから、最近、肝臓移植後の肝機能を把握するための指標としてMEGX値を経時的にモニタリングすることの有効性が報告されている⁵⁹⁾。これはREMEDi-HS[®]が、こうした移植医療にも貢献しうることを示すものであり、生体に対する薬理作用が熟知された、比較的安全な薬物を臓器機能検査に用いる際にREMEDi-HS[®]が重要な役割を演ずるものと思われる。

結 論

米国で開発された完全自動化高速液体クロマトグラフィシステムREMEDi-HS[®]が、薬物のスクリーニングや定量分析といった包括的薬物分析に有用であるかについて、以下の基礎的および臨床法医学的検討を行った。

1. 我が国で使用頻度が高い向精神薬、催眠・鎮静薬、抗ヒスタミン薬および局所麻酔薬などから42種の薬物・代謝物を選び、それらを蒸留水あるいは血清や尿に実験的に添加し、REMEDi-HS[®]で分析したところ、4種の酸性薬物を除く38種の薬物や代謝物の分析が可能であり、一部新規に薬物同定ライブラリーに登録することで、38種の薬物全てが定性的に同定可

能となった。また、リドカイン、プリロカイン、メピバカインなど10種の局所麻酔薬およびその代謝物、さらに覚醒剤メタンフェタミンやその代謝物および関連化合物であるアンフェタミン、メチルエフェドリン、エフェドリンは、同一検体での同時スクリーニングが可能であった。なお、メタンフェタミンらは、実験的に腐敗させた試料からも同時分析可能であった。

2. 前記42種の中から選んだ24種の薬物・代謝物について、クロロフェニラミンを内部標準物質として検量線を作成したところ、いずれも良好な直線性が認められた。検出限界濃度は概ね0.1μg/mlで、これは中毒症例の血清からの薬物検出にも十分な感度であり、プリロカイン、リドカイン、メピバカイン、ブピバカイン、カルバマゼピンは、治療域下限より低い濃度でも検出可能であることから、各薬物濃度のモニタリングにも有用であると考えられた。またブロムワレリル尿素、エフェドリン、ヒドロキシジン、ジフェンヒドラミン、ラニチジン、リドカインおよびグリシネキシリジンの血清、尿並びに胃内容液中の濃度を、付属の定量パラメーターを用いて定量し、内部標準法との定量結果と比較したところ、相関係数は0.960~1.000と高い相関のあることが確認された。さらにリドカイン、モノエチルグリシネキシリジンおよびブロムワレリル尿素的血清、尿検体中の濃度を内部標準法を用いて定量し、GC-MS法での定量結果と比較したところ、相関係数は0.753~0.978といずれも高い相関が認められた。試料のpHを4.0および9.0に調整し、前述の10種の局所麻酔薬およびその代謝物の保持時間、内部標準に対する相対保持時間およびピーク高について検討したところ、水素イオン濃度が分析に与える影響は認められなかった。またこれら10種の局所麻酔薬・代謝物の日内および日間精度について検討したところ、変動係数は各々1.07~8.35%、1.91~11.8%であり、いずれも高い再現性を示した。

3. 局所麻酔薬を投与したウサギ試料、および市販感冒薬または抗ヒスタミン薬を投与したヒトボランティア試料をREMEDi-HS[®]で分析したところ、各薬品に含有されている薬物と代謝物の同時分析が可能であった。

4. REMEDI-HS[®]を用いて53例の救急患者および79例の剖検例の試料からの薬物分析を施行したところ、各々46例、61例で何らかの薬物が検出され、その分析結果は死因決定や確認、あるいは薬物中毒の診断や治療方針の決定に重要な役割を果たした。また急性心筋梗塞患者に投与中のリドカインおよびその代謝物について薬物濃度モニタリングを行い、治療効果の確認や副作用防止の点でその有用性が確認された。

以上の結果は、完全自動化高速液体クロマトグラフィシステムREMEDi-HS[®]が、迅速・簡便な薬物スクリーニング(定性分析)および定量分析といった包括的かつ広範囲な薬物分析に極めて有用であること、並びに法医学的実務および救急医療における有力な手段となりうることを示している。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究の御指導、御校閲を賜りました大島 徹教授に深甚なる謝意を表しますと共に、御助言、御協力を頂きました高安達典助教授をはじめ法医学教室各位に厚く御礼申し上げます。また本研究対象となる臨床試料の収集に御協力頂きました、本学附属病院救急部石瀬 淳助教授、柴田恵三講師並びに吉田 豊助手(現、厚生連高岡病院麻酔科)に心からお礼申し上げます。また、ご協力いただきました大阪大学附属病院、石川県立中央病院、厚生連高岡病院および福井厚生病院の諸機関に深謝致します。さらに、アンフェタミンを供与して頂い

た昭和大学薬学部黒岩幸雄教授, ジフェンヒドラミンを供与して頂いた興和株式会社, テトラカインを供与して頂いた杏林製薬株式会社, リドカイン, グリシネキシリジン, モノエチルグリシネキシリジン, プロロカイン, メピバカイン並びにプピバカインを供与して頂いた藤沢薬品工業株式会社, およびアストラジャパン株式会社, さらに本研究の遂行に際し御協力頂きました米国バイオラッド社の Jason Lai 博士および板垣正博士, 並びに日本バイオラッド社各位に感謝いたします。

なお, 本研究の一部は文部省科学研究費補助金 一般研究 A (No. 05404027) (研究代表者: 金沢大学医学部附属病院薬剤部市村藤雄教授) の助成に依った。ここに記して謝意を表する。

本論文の各成績は, 日本法中毒学会第14年会 (金沢, 1994), 第22回日本救急医学会総会 (東京, 1994), 第79次日本法医学会総会 (山形, 1995), 第17回日本中毒学会総会 (東京, 1995), 13th International Conference on Alcohol, Drugs and Traffic Safety (Adelaide, Australia, 1995), 第80次日本法医学会総会 (京都, 1996), 第18回日本中毒学会総会 (高松, 1996年), 14th Meeting of the International Association of Forensic Sciences (IAFS) (東京, 1996), The Third International Symposium Advances in Legal Medicine (ISALM) (大阪, 1996) において発表した。

文 献

- 1) 大辻雅彦, 近藤藤和, 西上 潤, 高安達典, 吉田 豊, 大島 徹. REMEDI-HS[®] システムを用いた薬毒物分析. 法中毒 13: 39-48, 1995
- 2) 高安達典. 犯法的薬毒物の緊急スクリーニングに関する研究. 十全医会誌 102: 376-390, 1993
- 3) 永野耐造, 高安達典. 救急医療及び法医学検体試料からの緊急薬毒物スクリーニング地域スクリーニング体制確立の必要性. 第18回 BMS 談話会 (福井芦原, 1991), 17-25頁, 1991
- 4) Nagano T, Ohshima T, Takayasu T, Nishigami J, Nakaya T, Sawaguchi T. A system of emergency toxicology screening for drugs and poisons. Proc. 30th Meeting The Int Assoc Forensic Toxicologists (Fukuoka, 1992), p219-222, 1992
- 5) Binder SR, Regalia M, Biaggi-McEachern M, Mazhar M. Automated liquid chromatographic analysis of drugs in urine by on-line sample cleanup and isocratic multi-column separation. J Chromatogr 473: 325-341, 1989
- 6) Adams AK, Essien H, Binder SR. Identification of drugs in physiological fluids following on-line liquid chromatographic purification and analysis. Ann Biol Clin 49: 291-297, 1991
- 7) Binder SR, Adams AK, Regalia M, Essien H. Standardization of a multi-wavelength UV detector for liquid chromatography-based toxicological analysis. J Chromatogr 550: 449-459, 1991
- 8) 岡本郁代, 近末文彦, 宮崎哲次, 屋敷幹雄, 小嶋 亨. GC および GC/MS による生体試料中薬毒物スクリーニングのための Extrelut[®] カラム抽出-アセトアミノフェン, エテンザミド, プロムワレリル尿素含有製剤中毒死例. 日法医誌 39: 386-391, 1985
- 9) 西上 潤, 大島 徹, 高安達典, 近藤藤和, 林 子清, 永野耐造. TOXI-LAB[®] スクリーニングの法医中毒学的応用-剖検および救急患者試料を用いて. 日法医誌 47: 372-379, 1993
- 10) Bonicamp JM, King DL, O'Brien BA, Jones, DW. A simple procedure for separating drugs from interfering lipids on special thin layer chromatographic media. J Anal Toxicol 5: 261-263, 1981
- 11) 林田真喜子, 仁平 信, 守谷直樹, 渡辺日章, 須崎紳一郎, 牧野俊郎, 山本保博. TOXI-LAB システムの評価に関する基礎的研究. 中毒研究 5: 251-265, 1992
- 12) Campíns FP, Herráez HR, Sevillano CA. Column-switching techniques for high-performance liquid chromatography of drugs in biological samples. J Chromatogr 619: 177-190, 1993
- 13) 影浦光義, 原 健二, 柏村征一, 稗田洋子, 田中経一. REMEDI HS[™] による薬毒物スクリーニング: GC/MS との比較. 法中毒 12: 207-212, 1994
- 14) 小澤和雄, 門脇祐子, 田中克巳, 浅海博子, 山元俊憲, 黒岩幸雄. 薬物同定システム REMEDIHS の有用性に関する検討. 法医学の実際と研究 38: 135-138, 1995
- 15) 屋敷幹雄, 宮崎哲次, 小嶋 亨, 岩崎泰昌, 長澤信行, 村岡満太郎, ト部利真, 日下慎二. REMEDI HS の臨床および法医学における利用. 中毒研究 8: 271-275, 1995
- 16) 井上堯子. わが国における中毒死の現状. 中毒研究 7: 341-345, 1994
- 17) 大庭裕二, 高須伸克, 小延俊文, 奥村 徹, 武井 仁, 村井哲夫. 薬物中毒における全自動高速液体クロマトグラフィシステム (REMEDEI 薬物同定システム) の臨床使用経験. 中毒研究 6: 441-442, 1993
- 18) Moffat AC, Jackson JV, Moss MS, Widdop B, Greenfield ES. Clarke's Isolation and Identification of Drugs, 2nd ed, p335-336, The Pharmaceutical Press, London, 1986
- 19) Moffat AC, Jackson JV, Moss MS, Widdop B, Greenfield ES. Clarke's Isolation and Identification of Drugs, 2nd ed, p925-926, The Pharmaceutical Press, London, 1986
- 20) 井上堯子. 定量分析. 中毒研究 9: 32-34, 1996
- 21) Ohtsuiji M, Lai JS, Binder SR, Kondo T, Tatsunori T, Ohshima T. Use of REMEDI HS in emergency toxicology for a rapid estimate of drug concentrations in urine, serum, and gastric samples. J Forensic Sci 41: 881-886, 1996
- 22) 屋敷幹雄, 宮崎哲次, 小嶋 亨. 急性中毒. 救急医学 18: 173-177, 1994
- 23) 田中克巳, 小澤和雄, 村山純一郎, 浅海博子, 山元俊憲, 黒岩幸雄. REMEDIHS によるベンゾジアゼピン系薬物の分析における問題点. 中毒研究 8: 438, 1995
- 24) Winek CL. Drug & Chemical Blood-level Data 1994, Fisher Scientific, Litho (U.S.A.), p1-14, 1994
- 25) Scott DB, Jebson PJR, Braid DP, Örtengren B, Frisch P. Factors affecting plasma levels of lignocaine and prilocaine. Brit J Anaesth 44: 1040-1049, 1972
- 26) Greenblatt DJ, Bolognini V, Koch-Weser J, Harmatz JS. Pharmacokinetic approach to the clinical use of lidocaine intravenously. J Am Med Asso 236: 273-277, 1976
- 27) Takasaki M, Oh-Oka T, Doi K, Kosaka Y. Blood levels of mepivacaine during continuous epidural anesthesia. Anesth Analg 66: 337-340, 1987
- 28) Moore DC, Mather LE, Bridenbaugh LD, Balfour RI, Lysons DF, Horton WG. Arterial and venous plasma levels of bupivacaine following peripheral nerve blocks. Anesth Analg 55: 763-768, 1976
- 29) Eichelbaum M, Bertilsson L, Lund L, Palmér L, Sjöqvist F. Plasma levels of carbamazepine and carbamazepine

- pine-10, 11-epoxide during treatment of epilepsy. *Eur J Clin Pharmacol* 9: 417-421, 1976
- 30) Dyke CV, Barash PG, Jatlow P, Byck R. Cocaine: plasma concentrations after intranasal application in man. *Science* 191: 859-861, 1976
- 31) Chau NP, Zech PY, Pozet N, Hadj-Aissa A. Ranitidine kinetics in normal subjects. *Clin Pharmacol Ther* 31: 770-774, 1982
- 32) Fouda HG, Hobbs DC, Stambaugh JE. Sensitive assay for determination hydroxyzine in plasma and its human pharmacokinetics. *J Pharm Sci* 68: 1456-1458, 1979
- 33) Albert KS, Hallmark MR, Sakmar E, Weidler DJ, Wagner JG. Pharmacokinetics of diphenhydramine in man. *J Pharmacokinetic Biopharm* 3: 159-170, 1975
- 34) Brown GR, Fraser DG, Castile JA, Gaudreault P, Platt DR, Friedman PA. Nifedipine serum concentrations following sublingual and oral doses. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol* 24: 283-286, 1986
- 35) Usubiaga JE, Wikinski J, Ferrero R, Usubiaga LE, Wikinski R. Local anesthetic-induced convulsions in man. *Anesth Analg* 45: 611-620, 1966
- 36) Lebish P, Finkle BS, Brackett JW. Jr. Determination of amphetamine, methamphetamine, and related amines in blood and urine by gas chromatography with hydrogen-flame ionization detector. *Clin Chem* 16: 195-200, 1970
- 37) 高安達典, 西上 潤, 大島 徹, 林子清, 近藤稔和, 中谷 剛, 澤口聡子, 永野耐造. 7種の薬物が検出された一中毒死例. *日法医誌* 47: 63-71, 1993
- 38) 屋敷幹雄, 宮崎哲次, 近末文彦, 小嶋 亨, 大谷美奈子. CI-SIM による生体試料中のブロムワレリル尿素の分析—ブロムワレリル尿素による一中毒死例. *日法医誌* 41: 452-456, 1987
- 39) 大辻雅彦, 近藤稔和, 西上 潤, 林子清, 南野友義, 高安達典, 大島 徹, 吉田 豊. 意識障害で搬入され, REMEDI-HS[®] によりブロムワレリル尿素 (プロバリソ[®]) が検出された1救急救命例. *日法医誌* 49: 117, 1995
- 40) Steentoft A, Worm K. Cases of fatal triazolam poisoning. *J Forensic Sci Soc* 33: 45-48, 1993
- 41) Joynt BP. Triazolam blood concentrations in forensic cases in Canada. *J Anal Toxicol* 17: 171-177, 1993
- 42) 小澤和雄, 多田善幸, 浅海博子, 山元俊憲, 黒岩幸雄. REMEDIHS を利用した有機リン系農薬の分析. *中毒研究* 6: 442-443, 1993
- 43) 佐藤彌生, 黒崎久仁彦, 斉藤久子, 木内政寛. 全自動 HPLC (REMEDi) による覚醒剤の分析. *日法医誌* 48 (補冊): 176, 1994
- 44) Kæmpe B. p-Hydroxyphenylacetic acid, β -phenylethylamine and tyramine in post-mortem livers stored under different conditions. *Acta Pharmacol Toxicol* 23: 15-26, 1965
- 45) Cook CE, Jeffcoat AR, Sadler BM, Hill JM, Voyksner RD, Pugh DE, White WR, Perez-Reyes M. Pharmacokinetics of oral methamphetamine and effects of repeated daily dosing in humans. *Drug Metab Dispos* 20: 856-862, 1992
- 46) King LA, Poortman-van der Meer AJ, Huizer H. 1-Phenylethylamines: a new series of illicit drugs?. *Forensic Sci Int* 77: 141-149, 1996
- 47) Poklis A, Mackell MA, Tucker EF. Tissue distribution of lidocaine after fatal accidental injection. *J Forensic Sci* 29: 1229-1236, 1984
- 48) Peat MA, Deyman ME, Crouch DJ, Margot P, Finkle BS. Concentration of lidocaine and monoethylglycylxylidide (MEGX) in lidocaine associated death. *J Forensic Sci* 30: 1048-1057, 1985
- 49) McCloskey JJ, Haun SE, Deshpande JK. Bupivacaine toxicity secondary to continuous caudal epidural infusion in children. *Anesth Analg* 75: 287-290, 1992
- 50) Tanaka E, Nakagawa Y, Zhang SX, Misawa S. A simple high-performance liquid chromatographic method for seven local anesthetic drugs in human serum. *Jpn J Forensic Toxicol* 13: 11-16, 1995
- 51) Kumazawa T, Lee XP, Sato K, Seno H, Ishii A, Suzuki O. Detection of ten local anaesthetics in human blood using solid-phase microextraction (SPME) and capillary gas chromatography. *Jpn J Forensic Toxicol* 13: 182-188, 1995
- 52) Benkő A, Kimura K. Toxicological analysis of lidocaine in biological materials by using HPLC. *Forensic Sci Int* 49: 65-73, 1991
- 53) Gill R, Abbott RW, Moffat AC. High-performance liquid chromatography systems for the separation of local anaesthetic drugs with applicability to the analysis of illicit cocaine samples. *J Chromatogr* 301: 155-163, 1984
- 54) Harrison DC, Alderman EL. The pharmacology and clinical use of lidocaine as an antiarrhythmic drug. *Mod Treat* 9: 139, 1972
- 55) Gianelly R, Groeben JO, Spivack AP, Harrison DC. Effect of lidocaine on ventricular arrhythmias in patients with coronary heart disease. *N Engl J Med* 277: 1215-1219, 1972
- 56) Blumer J, Strong JM, Atkinson Jr AJ. The convulsant potency of lidocaine and its N-dealkylated metabolites. *J Pharm Exp Ther* 186: 31-36, 1973
- 57) Strong JM, Parker M, Atkinson Jr AJ. Identification of glycinoxylidide in patients treated with intravenous lidocaine. *Clin Pharmacol Ther* 14: 67-72, 1972
- 58) Halkin H, Meffin P, Melmon KL, Rowland M. Influence of congestive heart failure on blood levels of lidocaine and its active monodeethylated metabolite. *Clin Pharmacol Ther* 17: 669-676, 1976
- 59) Armstrong VW, Schütz E, Kaltefleiter M, Luy M, Helmhold M, Wieland E, Ringe B, Oellerich M. Relationship of apolipoproteins AI, B and lipoprotein Lp (a) to hepatic function of liver recipients during the early post-transplant period. *Eur J Clin Invest* 25: 485-493, 1995

Rapid Clinical Forensic Toxicological Analysis Using Full Automatic High Performance Liquid Chromatography System Masahiko Ohtsuji, Department of Legal Medicine, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med Soc., 105, 627—647 (1996)

Key words forensic toxicology, rapid drug screening, qualitative analysis, quantitative analysis, HPLC

Abstract

Toxicological analysis on human specimens such as body fluid is very important in clinical and forensic medicine. Many analytical instruments have already been developed, and they are now available in the medical field. In practice, those instruments are, however, used for definite confirmation of a drug or poison that is already known or strongly suspected to have existed in the specimen tested. It is, however, much more important and necessary to rapidly and systematically explore drugs or poisons in emergency medical cases and forensic autopsy cases with no or little toxicological information. In this study, the full automatic high performance liquid chromatography system, REMEDI-HS® system was used, and its possibility for drug identification in those specimens with no toxicological information was systematically examined. Forty-two kinds of widely used drugs and their metabolites, being selected from among such drug groups as antipsychotics, hypnotics, antihistaminics, local anesthetics, etc., were experimentally added to distilled water, serum and urine, and it was examined whether this instrument could correctly identify these substances or not. The result was that 38 compounds (but not four acidic drugs) were correctly identified by REMEDI-HS®. Eight local anesthetics and two lidocaine metabolites could be simultaneously separated as different peaks in a specimen and correctly identified as well by this system. The qualitative analysis of these compounds in specimens was not influenced by the hydrogen ion concentration ranging from pH 4 to pH 9. Methamphetamine, its metabolites, amphetamine, ephedrine and methylephedrine could be also correctly identified even in putrefied specimens. Calibration curves for 24 kinds of drugs and metabolites were prepared by plotting the peak height ratio of each standard to chlorpheniramine, internal standard, against the concentration to examine the possibility of quantitative analysis by the REMEDI-HS® system, and they showed excellent linearity. Detection limits of these compounds were about $0.1 \mu\text{g/ml}$. The sensitivity of this system for these compounds was better than that of the thin-layer chromatography system usually used in Japan. Therapeutic drug monitoring for prilocaine, lidocaine, mepivacaine, bupivacaine and carbamazepine was considered fully feasible because their detection limits by REMEDI-HS® were much lower than their therapeutic blood levels. Quantitative values of bromisovalum, ephedrine, hydroxyzine, diphenhydramine, ranitidine, lidocaine and glycinexylidide in serum, urine and gastric matrices using quantitation factors, being determined for approximately 450 different kinds of drugs and metabolites by the manufacturer based on the average ratio of drug concentration against the peak height, were compared with the results by multi-point calibration method. Then each regression line between the values given by these two different methods gave good correlation coefficient, ranging from 0.960 to 1.000. When the values of lidocaine, monoethylglycinexylidide and bromisovalum in serum and urine measured by multi-point calibration method were compared with those by gas chromatography-mass spectrometry methods, thus showing good correlations (0.753 to 0.978). Within-run and day-to-day precision coefficients of variation, being examined with eight local anesthetics and two lidocaine metabolites, were from 1.07 to 8.35%, and 1.91 to 11.8%, respectively. The hydrogen ion concentration had no influence on the quantitative analysis of these ten compounds. The serum and urine, obtained from human volunteers and a rabbit to whom an over the counter drug or lidocaine was administered, respectively, were analyzed, and then the administered drugs and their metabolites were correctly detected. Out of 79 autopsies and 53 clinical cases, of which specimens were analyzed by REMEDI-HS®, every drug or metabolite was detected in 61 autopsies and 46 clinical cases. Drug identification by REMEDI-HS® was shown to be very useful for diagnosis and/or therapy in these autopsy and clinical cases. Drug monitoring of lidocaine and its metabolite, MEGX, was performed in three cases of acute myocardial infarction with intravenous lidocaine administration, and REMEDI-HS® was also shown to be useful in drug effect certification and side effect prevention. From these results obtained, it has been well demonstrated that REMEDI-HS® contributes significantly to rapid and comprehensive drug analysis in both forensic toxicological practice and emergency medicine.