

学会創立20周年記念特集

乱用薬物の超高感度 HPLC 分析法の開発と
その薬物相互作用評価への応用

中島憲一郎

Development of ultra sensitive HPLC determination methods for drugs of
abuse and their applications to evaluate drug–drug interactions

Kenichiro Nakashima

*Graduate School of Biomedical Sciences, Course of Pharmaceutical Sciences,**Nagasaki University, 1–14 Bunkyo–machi, Nagasaki 852–8521, Japan***Abstract**

Development of ultra sensitive HPLC determination methods for drugs of abuse in biological samples and their applications for evaluation of pharmacokinetic interactions are described. Recently, the recreational use of abused drugs such as MDMA (called ecstasy) and MDA (called rave drug) by the young is spreading and causing serious social problems worldwide. However, available information of drug–drug interactions caused by the abused drugs is insufficient. We believe that accumulation of the information on drug–drug interactions caused by the abused drugs is urgent to predict of and protect of human health from the risks of drugs of abuse. To achieve this aim, sensitive analytical methods of drugs of abuse would be required.

In this review, some sensitive HPLC–fluorescence or –chemiluminescence methods for determination of drugs of abuse in various matrices are presented. Furthermore, their practical applications on the evaluation of pharmacokinetic drug–drug interactions caused by the abused drugs are described.

Keywords: drugs of abuse, HPLC, fluorescence detection, peroxyoxalate chemiluminescence detection, hair analysis, drug–drug interaction, labeling reagent

緒言

薬物乱用は、依然として本邦だけでなく世界各国が抱える大きな社会問題であり続けており、毎年のようにマスメディアを通じてこれが原因となる悲惨な事件や事故が報道されている。本邦における平成19年度の薬物事犯検挙人数は14,792名を数えるが、覚せい剤事犯、大麻事犯及びMDMA等合成麻薬事犯がその多くを占めている[1]。これらのうちMDMA(俗称：エクスタシー)やMDA(俗称：ラブドラック)は

錠剤型として密売されており摂取が容易なことや、インターネットあるいは携帯電話の普及により、容易に入手可能なことから若年層を中心にその乱用が広がっており、重大な社会問題となっている。

さらに最近では複数の種類の薬物を同時に乱用する多剤乱用の傾向がみられることや、前述のMDMAを中心とする錠剤型麻薬中に2種類以上の薬物が意図的に混入される事例も報告されている[2]。このことから複数の乱用薬物による予

期せぬ薬物-薬物相互作用の発現が危惧されている。しかしながらこのような乱用薬物の相互作用に関する研究はこれまで十分に行われておらず、これに関する知見の蓄積が急務であろうと考える。

著者はこれまで“乱用薬物のリスクの予測及び軽減”に資することを目的として、分析化学的なアプローチを試み、乱用薬物の高感度 HPLC-蛍光 (FL) 検出あるいは過シュウ酸エステル化学発光 (PO-CL) 検出法を開発し、覚せい剤及びやせ薬等の定量に適用してきた[3]。また尿、血液及び微小透析液などの生体試料中に存在する乱用薬物及びその代謝物の定量や、下着切片に付着した極微量の薬物の定量に適用し、その法中毒学の実用性を示してきた。特に毛髪分析においては、1本の毛髪を1cmに切断しそのセグメント分析を達成することで、薬物乱用歴に関する情報を引き出すことに成功している[4]。

本報告では、著者らの最近の研究成果から、近年その乱用が問題となっている MDMA を中心として、これと併用が確認されている乱用薬物の超高感度 HPLC-FL 法及び PO-CL 法についてまとめた。さらにこれらの分析法を薬物相互作用の評価等へ応用した結果についても紹介する。

1. 生体試料中の乱用薬物の超高感度 HPLC 分析法の開発

著者はこれまでにメタンフェタミン (MP) 等の覚せい剤関連化合物を、著者らが開発した蛍光ラベル化試薬、4-(4,5-diphenyl-1*H*-imidazol-2-yl)benzoyl chloride (DIB-Cl) を用いてラベル化後、HPLC-FL 法を用いて高感度定量する方法を開発し、様々な生体試料に適用してきた[3]。今回、MP 類に構造が類似する MDMA 及びその代謝物である MDA (Fig. 1) にも本測定原理が応用可能であると考え、これを適用した。その結果、ヒト全血及び血漿のいずれの試料を用いた場

合も 0.50 ng/mL 及び 0.75 ng/mL の検出下限 [シグナル/ノイズ比 (S/N) = 3 の場合] を有する超高感度な方法を開発できた[5]。測定には 100 μ L と微量の血液試料を用いるのみであり、ラットを用いた MDMA の単回投与実験にて血中薬物モニタリングが可能であった。さらに MDMA 摂取被疑者毛髪中薬物[6]及びマイクロダイアリシス法と組み合わせることによるラット血液及び脳微小透析液中の遊離型 MDMA 及び MDA 分析に適用可能であった[7]。

この他、モルヒネ (Mor) 及びペンタゾシン (PZ, Fig. 1) は麻薬性鎮痛薬としてガン性疼痛緩和に用いられているが、しばしば不正に乱用されることが知られている。これらの薬物も DIB-Cl でラベル化が可能なフェノール性水酸基を有していることから、同様な HPLC-FL 定量法を検討した。その結果、Mor は室温、10分と温和な反応条件でラベル化が可能であり、脳及び血液微小透析液中の Mor をそれぞれ 0.4 ng/mL 及び 0.6 ng/mL の検出下限 (S/N = 3) で測定できた[8]。また PZ の場合は、内標準物質にシクラゾシンを用いて、高感度かつ精度良く PZ の DIB ラベル化体を定量可能であった。PZ 投与後のラット血漿及び毛髪での薬物モニタリングに適用が可能であり、毛髪への本薬物の移行性を評価することができた[9]。

一方、ベンゾフラザン骨格を有する蛍光ラベル化試薬、4-(*N,N*-dimethylaminosulfonyl)-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole (DBD-F, Fig. 1) は、試薬自身の蛍光がほとんどなく、かつラベル化体の蛍光波長のシフトが大ききことが特徴であり、MDMA 類の高感度定量に有効であると予想された。HPLC-FL 検出では、感度こそ DIB-Cl には及ばないものの、実際に薬物を投与したラット尿中 MDMA 及び MDA の定量が可能であった[10]。また DBD-F ラベル化体は PO-CL 検出において特に高感度に検出可能であることが分かっているこ

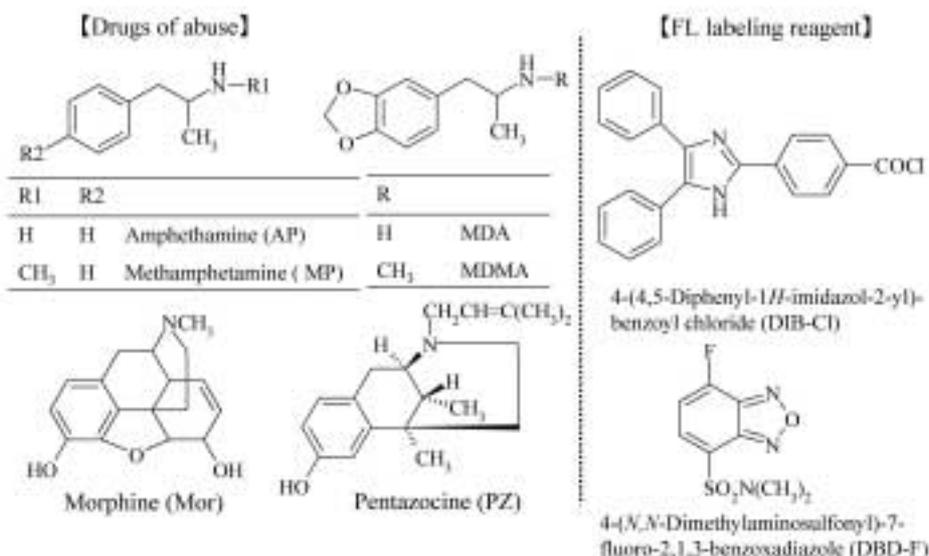


Fig. 1 Chemical structures of drugs of abuse and fluorescence labeling reagents examined.

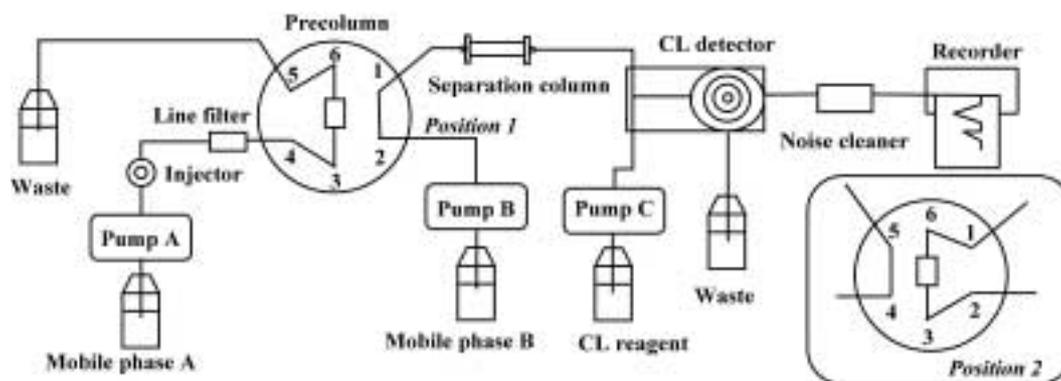


Fig. 2 Diagram of an HPLC-PO-CL detection system for measurement of MDMA.

Precolumn: Develsil ODS UG-S (10x1.5mm, i.d.); Separation column: Capcellpak C18 UG120 (250x1.5 mm, i.d.); Mobile phase A: 20 mM imidazole-HNO₃ buffer (pH 7.0)/acetonitrile(=65:35v/v%); Mobile phase B: 20 mM imidazole-HNO₃ buffer (pH 7.0)/acetonitrile/tetrahydrofuran (=52:44:4v/v/v%); CL reagent: 4 mM CPPO and 25 mM hydrogen peroxide in acetonitrile; Flow rate: 0.2 mL/min (pump A), 0.1 mL/min (pump B), 0.4 mL/min (pump C); Injection volume: 5 μ L.

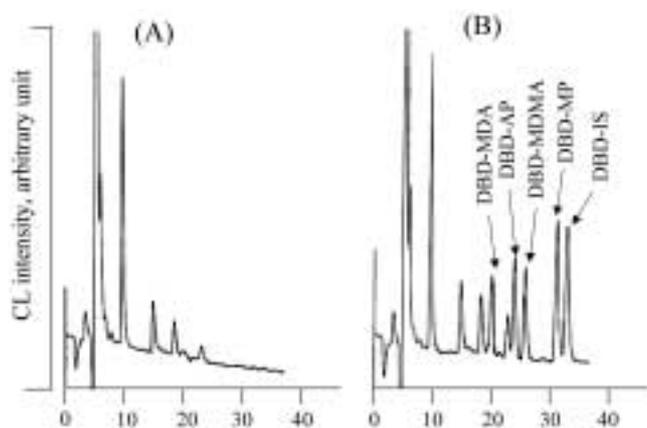


Fig. 3 Chromatograms of MDMA in human hair.

Sample: (A) normal human hair and (B) that spiked with 0.5, 2.5, 0.5, 2.5, and 1.5 ng/mg hair of MDMA, MDA, MP, AP and IS.

とから[11]、これをヒト毛髪中 MDMA 類及び MP 類の同時定量に適用した。本法ではプレカラム及び分析用カラムに市販のセミマイクロ ODS カラムを用い、カラムスイッチング法と組み合わせることで (Fig. 2)、毛髪中の夾雑成分の妨害なく MDMA, MDA, MP 及びアンフェタミン (AP) の定量が可能であった (Fig. 3)。その検出下限 (S/N = 3) は 0.02–0.16 ng/mg hair の範囲と超高感度であった[12]。本法を用いて薬物乱用更正施設 (米国ミシシッピ州立病院) に入所している薬物の多剤乱用患者の毛髪中から MDMA 類を定量することができ、その親化合物と代謝物の濃度比から摂取した乱用薬物種の評価を行うことが可能であった。

2. 多剤乱用による薬物相互作用の薬物動態学的評価

乱用薬物等、中枢神経系作用を有する薬物について血中及び脳内における遊離型薬物濃度を測定することは、薬理学あるいは薬物動態学的に重要である。マイクロダイアリシス法は、生体組織に半透膜製のプローブを挿入し、生理食塩水や人工脳脊髄液を灌流する事で、血液や組織細胞間隙に存在する薬物や神経伝達物質等の生体物質を経時的に採取できる方法であり、神経薬理学的研究や薬物動態学的研究に有効な試料採取法である[13]。そこで先述の DIB-Cl を用いる MDMA の超高感度 HPLC-FL 分析法との組み合わせによる乱用薬物の多剤乱用による薬物相互作用の評価を検討した。本法は得られた透析液を前処理することなくラベル化反応に供することができ、MDMA 及び MDA の薬物動態学的な研究において迅速・簡便な分析法として有用であった[7]。本法における MDMA 及び MDA の検出下限 (S/N = 3) は、血液透析液中で 4.2 ng/mL (MDMA) 及び 1.2 ng/mL (MDA)、脳透析液中で 4.8 ng/mL (MDMA) 及び 1.3 ng/mL と高感度であった。さらにラットを用いて、MDMA 及び錠剤型麻薬中に MDMA と混在することが報告されているカフェインとの相互作用を検討した (Fig. 4)。MDMA (5 mg/kg) 及びカフェイン (20 mg/kg) を単回同時投与したところ、MDMA 単独投与群と比較して脳内における MDMA 及び MDA の C_{max} の減少、及び T_{max} と MRT₀₋₃₀₀ の延長傾向が観測されるなど、カフェインが MDMA 及び MDA の脳移行性を低下させることが分かった。このように薬物の併用により MDMA 単独投与に比べ、異なる体内動態を示したことから、複数の乱用薬物の相互作用に関してはより詳細な検討が必要であると考えられる。

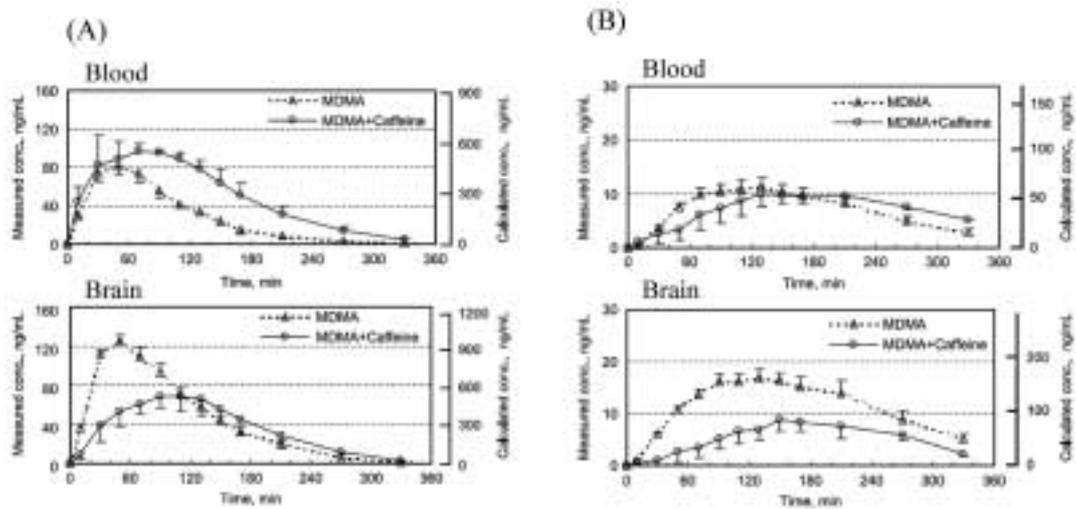


Fig. 4 Concentration–time profiles of (A) MDMA and (B) MDA in blood and brain microdialysates from the rats administrated MDMA with/without caffeine.

結 言

今回、MDMA を中心とした乱用薬物の超高感度 HPLC–FL 及び–PO–CL 検出法の開発及びそれらの動態学的薬物相互作用評価に関する結果を紹介した。しかしながら相互作用評価には乱用薬物間での網羅的な検討を必要とすることから、その完遂には今後さらに膨大な時間と労力を必要とする。著者は、日頃より乱用薬物による薬物相互作用の危険性について警鐘し、その評価の重要性あるいは緊急性に関して機会あるごとに提言してきたが、本領域において分析化学に携わる研究者は数少なく、学問領域として十分に社会貢献できているとはいえないのが現状である。今後、多くの若い世代の分析化学者達とその技術力を持って乱用薬物のリスクの予測及び軽減に貢献し、将来的には“薬物乱用の撲滅”を達成して欲しいと願っている。

文 献

- [1] Drug 2008, Keisatsu–no–mado, No. 138; Drugs and Firearms Division, National Police Agency, Ed.; Tokyo, Japan, pp. 14–15, **2008**.
- [2] Kalasinsky, K. S.; Hugel, J.; Kish, S. *J. Forensic Sci.*, **2004**, 49, 1106–1112.
- [3] Nakashima, K. *Chromatography*, **2006**, 27, 1–11.
- [4] Nakashima, K. *Bunseki Kagaku*, **2008**, 57, 783–789.
- [5] Tomita, M.; Nakashima, M. N.; Wada, M.; Nakashima, K. *Biomed. Chromatogr.*, **2006**, 20, 1380–1385.
- [6] Nakamura, S.; Tomita, S.; Wada, M.; Chung, H.; Kuroda, N.; Nakashima, K. *Biomed. Chromatogr.*, **2006**, 20, 622–627.
- [7] Tomita, M.; Nakashima, M. N.; Wada, M.; Nakashima, K. *Biomed. Chromatogr.*, **2007**, 21, 1016–1022.
- [8] Wada, M.; Yokota, C.; Ogata, Y.; Kuroda, N.; Yamada, H.; Nakashima, K. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2008**, 391, 1057–1062.
- [9] Wada, M.; Kurogi, R.; Kaddoumi, A.; Nakashima, M. N.; Nakashima, K. *Luminescence*, **2007**, 22, 157–162.
- [10] Wada, M.; Nakamura, S.; Tomita, M.; Nakashima, M. N.; Nakashima, K. *Luminescence*, **2005**, 20, 210–215.
- [11] Uzu, S.; Imai, K.; Nakashima, K.; Akiyama, S. *Biomed. Chromatogr.*, **1991**, 5, 184–185.
- [12] Nakamura, S.; Wada, M.; Crabtree, B. L.; Reeves, P. M.; Montgomery, J. H.; Byrd, H. J.; Harada, S.; Kuroda, N.; Nakashima, K. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2007**, 387, 1983–1990.
- [13] Nakashima, M. N.; Wada, M.; Nakashima, K. *Current Pharm. Anal.*, **2005**, 1, 127–133.