Jpn. J. Toxicol. Environ. Health
衛生化学 (1997)
43 (2) 108-113

Frit-FAB LC-MS によるスキサメトニウムの分析とラット臓器からの検出期間について

土橋 均,* 西川眞弓, 辰野道昭
大阪府警察本部科学捜査研究所

The Analytical Procedure by Frit-FAB LC-MS and Detectable Period of Suxamethonium in Rats Tissues

Hitoshi TSUCHIHASHI,* Mayumi NISHIKAWA, and Michiaki TATSUNO
*Forensic Science Laboratory, Osaka Prefectural Police Headquarters,
1-3-18 Hommachi, Chuo-ku, Osaka 541, Japan*

(Received September 2, 1996)

The analytical procedure and detectable period of a muscular relaxant, suxamethonium, in postmortem rat tissues were studied. Rats were killed by intraperitoneal administration of suxamethonium at doses of 10 mg/kg body weight. The dead rats were stored at room temperature (25°C) and in refrigerator (0°C) until the time of the analysis.

Suxamethonium in the tissues was identified and quantitated using Frit-FAB LC-MS following the solid phase extraction with a Bond Elut CBA cartridge. The rat tissue was homogenized and deproteinized with perchloric acid. The resulting supernatant was applied to the cartridge. Suxamethonium adsorbed on the cartridge was eluted with 1 ml of 0.1 M hydrochloride-methanol (1:1, v/v). Hexamethonium solution was added to the eluate as an internal standard. An aliquot (1 µl) of the eluate was injected into the Frit-FAB LC-MS system. The LC column used was a capillary-type Develosil ODS-UG-5 (0.3 mm i.d. × 150 mm). The gradient mobile phase system was composed of eluent A (0.1% trifluoroacetic acid, including 0.4% glycerol) and eluent B (methanol, including 0.4% glycerol), and the concentration of eluent B increased from 0% to 30% over 20 min. The flow rate was 5 µl/min.

The mass spectrum of suxamethonium gave the adduct of a molecular ion with trifluoroacetic acid (m/z 403) as a base peak. The detection limit of suxamethonium in the tissue by selected ion monitoring (SIM) was 5 ng/g. Suxamethonium in rats stored at 25°C and 0°C after death were found to be detectable for 7 and 42 d in the liver, 7 and 42 d in the kidney, and 2 and 4 d in the heart, respectively.

Key words — suxamethonium; LC-MS; Frit-FAB; rat tissue; detectable period

緒 言

脱分極型筋弛緩薬の塩化スキサメトニウムは、我が国では毒薬に指定され一般には入手し難く、従来は医療関係者の自殺目的による使用事件がほとんどであったが、近年スキサメトニウムを使用した殺人等重要事件の発生が増加している。このようなことから、スキサメトニウムは法中毒学上でも重要な薬毒物のひとつと考えられ、その摂取証明を行うこと

の重要性は、特に高まってきている。

スキサメトニウムは、体内では血漿コリンエステラーゼにより速やかにサクシニルモノコリンを経てコハク酸とコリンに分解され、投与量の数%が未変化で尿中に排泄されると言われる¹⁾ことから、これまでに著者らは尿中スキサメトニウムの分析法について検討してきた。²⁻⁴⁾しかし、死体遺棄事件等で死亡後長期間を経た場合など、尿の採取が困難であれば、摂取証明には臓器中からスキサメトニウムを検

出しなければならない。

第四級アンモニウムの構造を2つ有するスキサメトニウムは、高極性・不揮発性であり、GC-MSを行うには工夫を要する。一方、LC-MSは高極性・不揮発性化合物も煩雑な前処理なしに分析されることから、著者らは薬毒物やその代謝物の分析に利用してきた。⁵⁻¹¹⁾そこで、臓器中スキサメトニウムの高感度分析を行うことを目的とし、マイクロカラムを使用する Frit-FAB LC-MS による分析法を検討した。また、抽出は、陽イオン交換樹脂系カートリッジによる固相抽出について検討した。

死後臓器中のスキサメトニウムを長期間にわたり分析した報告は散見される^{12,13)}が、低温での保存や、防腐処理が行われ、実際の殺人等で考えられる外気温で放置されるような場合の検出期間は明確にはされていない。そこで、ラットに塩化スキサメトニウム製剤を投与し、犯罪後遺棄された場合のモデルとして死亡後室温(約25℃)で保存、及びその比較として冷蔵(約0℃)保存し、死亡直後から56日後までの肝臓、腎臓、心臓中のスキサメトニウムを分析し、検出可能期間についても考察した。

実 験

1. 試薬及び試料の調製 塩化スキサメトニウム(東京化成製)は、0.1% (w/v) 水溶液を作製し、希釈して用いた。内部標準として使用した臭化ヘキサメトニウム(和光純薬製)は、3 µg/ml の水溶液とした。これらはいずれも用時調製とした。塩化スキサメトニウム注射液は、山之内製薬製のサクシン注射液(2%)を用いた。抽出に用いた陽イオン交換系の Bond Elut CBA カートリッジは Varian 製、メタノール、水は HPLC 用、その他の試薬は特級の市販品を使用した。

2. 装置及び測定条件 質量分析計：JMS-SX102A(日本電子製)、イオン源：FAB、衝撃ガス：Xe、加速電圧：8 kV、LC ポンプ：10 AD(島津製作所製)、分析カラム：Develosil ODS-UG-5 (0.3 mm i.d. × 150 mm, 野村化学製)、移動相：A 液(0.4% グリセリンを含む 0.1% トリフルオロ酢酸 (TFA) 水溶液)、B 液(0.4% グリセリンを含むメタノール)で、B 液が 0—30% まで 1.5%/min のグラジエント。

今回用いた LC-MS のシステムを、Fig. 1 に示す。分析カラムと、抵抗カラムとして内径 4.6 mm のコンベンショナルカラムを T ジョイントで並列につなぎ、カラムの抵抗によって移動相をスプリットした。スプリット後の移動相流量は 5 µl/min で行っ

Fig. 1. Frit-FAB LC-MS System

A, LC pump; B, mixer; C, T-joint; D, injector; E, microcapillary column (analytical column); F, mass spectrometer; G, resistant column.

た。試料はスプリット後に注入し、全量を質量分析計に導入した。

3. 投与並びに保存方法 Wister 系雄性ラット(7週令)に、体重 1 kg 当たり 10 mg のスキサメトニウム(体重 1 kg 当たり 0.5 ml のサクシン注射液)を腹腔内投与し死亡させた。死亡後のラットは 2 群に分け、分析まで室温(25℃)の暗所と冷蔵庫(0℃)内でそれぞれ保存した。

4. 分析方法 死亡直後及び、1—56 日間室温並びに冷蔵庫内で保存後のラットを開腹し、肝臓、腎臓、心臓を得た。各臓器を細切し、その 3 g(3 g 以下の場合全量)に水 4 ml を加えてホモジネート(ポリトロン PT 10-35 型, Kinematica 製)後、1 ml の 1.2 N 過塩素酸を加え、3500 rpm で 10 分間遠心分離した。上澄液の 3 ml をアンモニアで pH 7 とし、メタノール、水各 1 ml で活性化した CBA カートリッジに通し、水 3 ml でカートリッジを洗浄後、0.1 M 塩酸-メタノール(1:1, v/v) 1 ml で溶出した。溶出液に内部標準溶液 0.1 ml を添加し、その 1 µl について、LC-MS を行った。

5. 検量線作成方法 薬物を投与しないラット肝臓 3 g 当たり 4 ml の水を加えてホモジネート後、スキサメトニウム水溶液 30—1000 ng/g となるように添加し、分析方法に従って抽出操作を行った。抽出後の溶出液に内部標準溶液 0.1 ml を添加し、その 1 µl について選択イオンモニタリング(SIM)による LC-MS を行い、検量線を作成した。なお、スキサメトニウムの選定イオンは m/z 403、内部標準であるヘキサメトニウムは m/z 315 とした。

結果及び考察

1. 移動相の検討

1) マトリックスの検討 グリセリン, チオグリセリン, 2,2'-ジチオジエタノール, 3-ニトロベンジルアルコール, マジックバレット, ジエタノールアミン及びトリエタノールアミンの7種類のマトリックスをそれぞれ0.1%TFAに添加したものを移動相とし, スキサメトニウムを測定し, マトリックスについて検討した.

その結果, 3-ニトロベンジルアルコール, マジックバレット, ジエタノールアミン及びトリエタノールアミンの4種類をマトリックスとした場合には, いずれのマススペクトルにもスキサメトニウムの分子イオン種は観察されなかった. また, グリセリン, チオグリセリン, 2,2'-ジチオジエタノールでは, いずれも m/z 403 にスキサメトニウム分子に TFA 付加した分子イオン種が出現したが, チオグリセリンや 2,2'-ジチオジエタノールでは, 分子イオン種の強度が低く, 主にマトリックス由来のイオンが出現した. 一方, グリセリンをマトリックスとした場合には, m/z 403 の分子イオン種がベースピークとして得られた. この分子イオン種の強度の差は, スキサメトニウムとマトリックスの溶解度によるものと考えられ, 高極性のスキサメトニウムにはチオグリセリンや 2,2'-ジチオジエタノールより極性の高いグリセリンがマトリックスとして良好に作用したのと考えられた. また, 分子イオン種の出現し易さは, 試料とマトリックスの溶解度の他にマトリックスのプロトン親和性にも依存すると考えられ, プロトン親和性が高いアミン類のマトリックスを用いると, スキサメトニウムのイオン化よりもマトリックスのイオン化が主に起こり, 分子イオン種が出現し難いと考えられる. そこでマトリックスは, イオン強度の高い分子イオン種を与えるグリセリンを選択した.

2) グラジエント条件の検討 スキサメトニウムは極性が高く, 一般には ODS 系の分析カラムへの保持は困難であるが, GPC (gel permeation chromatography) カラムで適当な保持が得られる.⁴⁾ しかし, GPC カラムは一般に理論段数が低く, 高感度分析を行うには限界があると考えられる. そのため, ODS 系のマイクロカラムを使用し, TFA を添加した移動相で分析を行ったところ, スキサメトニウムと TFA がイオン対となりカラムへの保持が達成された.

Fig. 2. Effect of Mobile Phase on Capacity Factors and Peak Intensities of Suxamethonium

—○—, capacity factor; —●—, peak intensity.

そこで, 0.1%TFA にメタノールを 0 から 30% 添加した移動相で分析し, そのときのキャパシティーファクターと m/z 403 のイオン強度を測定し, 移動相条件について検討した. なお, 移動相にはいずれも 0.4% のグリセリンを添加した. その結果, Fig. 2 に示すように, 移動相にメタノールを含まないときにはキャパシティーファクターが約 1 であったが, メタノール濃度の増加に伴って溶出力が強くなり, メタノール 30% ではほとんどカラムに保持しなかった. 一方, イオン強度はメタノールを添加することによって増加し, メタノール 30% ではメタノールを添加しない場合の 2.5 倍以上になった. これは, 移動相にメタノールが添加されることにより, スキサメトニウムのマトリックスへの溶解度が増加すること, フリットへの LC 溶出液の供給と蒸発のバランスが良くなること, メタノールが水よりもプロトン供与能が高いことなどによって, イオン強度が増加するものと考えられた. この結果から, 移動相は A 液 (0.4%グリセリンを含む 0.1%TFA), B 液 (0.4%グリセリンを含むメタノール) で, メタノール濃度が 0 から 30% のグラジエント分析 (1 分間に 1.5% ずつ増加) を行うこととした.

2. 抽出法の検討

スキサメトニウムは, ODS 等の逆相系抽出カートリッジには保持され難い²⁾ ことから, 陽イオン交換樹脂系の抽出カートリッジ 3 種類で抽出法の検討を行った.

Bond Elut CBA, Bond Elut SCX, Sep-Pak CM の 3 種類で, 薬物を投与しないラットの肝臓にスキサメトニウムを添加し, 除タンパクした上清に関し

て1 M 塩酸-メタノール (1:1, v/v), 0.01 M 塩酸メタノール溶液, 2 M 過塩素酸アンモニウム-アセトニトリル (1:1, v/v) の3種類の溶出液を用いて抽出した。その結果, Bond Elut SCX, Sep-Pak CM カートリッジではいずれも保持力が強く, いずれの溶出液でも溶出しなかった。一方, Bond Elut CBA カートリッジでは, 0.1 M 塩酸-メタノール (1:1, v/v) で良好に抽出されたことから, 抽出には Bond Elut CBA カートリッジを使用することとした。

3. 標準品とラット肝臓中スキサメトニウムのマススペクトル

Fig. 3 は, 本法で分析したスキサメトニウムのマス کروマトグラムおよびマススペクトルである。上段 (a) が標準品 (100 $\mu\text{g/ml}$) を分析したときの m/z 403 のマス کروマトグラム, 下段 (b) がスキサメトニウムを腹腔内投与して死亡させたラットの肝臓から抽出したものの m/z 403 のマス クロマトグラムで, それぞれのマススペクトルは (c), (d) に示すようなものであった。(b) の試料について SIM による定量を行ったところ, スキサメトニウムの濃度は約 1500 ng/g であった。

スキサメトニウムのマススペクトルは, m/z 403 の分子イオン種がベースピークであり, これはスキサメトニウム分子に TFA がイオン対の形で付加したものと考えられる。そのほか, メチル基が脱離した 1価イオンとなった m/z 275, C-N 結合が開裂した m/z 230, エステル部分で開裂した m/z 204 や, m/z 104 などがフラグメントイオンとして観察さ

れた。また, スキサメトニウムを投与しないラット肝臓を本法に従い抽出し, 分析したところ, スキサメトニウムと同保持時間に分析を妨害するピークは出現しなかった。

スキサメトニウムをサーモスプレイ LC-MS で分析した場合には分子イオン種は観察されず, エステル部分で開裂したフラグメントイオンがベースピークとして強く出現する⁴⁾が, Frit-FAB LC-MS では分子イオン種が出現すると共にフラグメントイオンも多数観察され, 同定には有効性が高いと考えられた。

4. 回収率, 検量線及び検出限界

薬物を投与しないラット肝臓 3 g に, スキサメトニウム水溶液を 300 ng/g となるように添加後抽出し, m/z 403 を選択イオンとする SIM で LC-MS を行った。その結果, 回収率は 85.2% で, 5 試料の分析による繰返し精度 (coefficient of variation) は, 8.8% であった。

なお, スキサメトニウム水溶液について同様の抽出操作及び分析を行ったところ, 得られた回収率は 90.2% であった。

また, ヘキサメトニウムを内部標準とする検量線を作成したところ, 30–1000 ng/g で良好な直線性が得られた ($y=6.54 \cdot 10^{-3}x+0.04$)。検出限界は, スキャンモードでは 1000 ng/g, SIM では 5 ng/g ($S/N=3$) であった。

5. 臓器中スキサメトニウムの検出期間

スキサメトニウム投与により死亡させたラット肝臓

Fig. 3. Mass Chromatograms and Mass Spectra of Suxamethonium

a, c, standard; b, d, extract from liver of a rat treated with suxamethonium.

Fig. 4. Detectable Amount of Suxamethonium in Rats Tissues

Rats were killed by intraperitoneal administration of 10 mg/kg of suxamethonium and stored at 25°C (left panel) or 0°C (right panel) until analysis. Each point represents the mean of three experimental values. —●—, liver; —○—, kidney; —◐—, heart.

器の定量結果を Fig. 4 に示す。保存方法によらず、死亡 30 分後から 42 日後まで、スキサメトニウム濃度は肝臓、腎臓、心臓の順に高かった。また、室温放置したラットの肝臓、腎臓、心臓から、それぞれ 7, 7, 2 日まで、冷蔵保存したラットの肝臓、腎臓、心臓からは、それぞれ 42, 42, 4 日まで、SIM によりスキサメトニウムが検出された。

スキサメトニウムは、代謝、排泄が迅速で、環境中での分解も速く、それが長期間の検出が困難である理由のひとつと言える。スキサメトニウムは、pH 7.5 以上では 37°C 10 分間で迅速に分解し、¹⁴⁾ 4°C でも pH 7 以上では 4 ヶ月後には検出されないと報告されている。¹⁵⁾ また、代謝は速やかで、血漿中半減期は 3 相性で 0.4, 1.2, 8 分と非常に短いとの報告¹⁶⁾ があり、一般には短時間で生体試料からの検出が困難になると考えられている。

Sørenssen ら¹²⁾ は、40 mg/kg のスキサメトニウムを静脈内投与したモルモットの眼、筋肉、腎臓及び尿中スキサメトニウムの GC-MS を行い、眼中スキサメトニウムは 4°C で 6 日間安定であり、分析に最も適すると報告している。このとき、眼中スキサメトニウムは 6 日以降急激に減少し、24 日目には検出されなかったと報告しているが、本法ではさらに低温の 0°C で保存した場合の肝臓、腎臓から 42 日まで検出され、長期保存における冷蔵の有効性が認められた。

また、Nordgren ら¹³⁾ は、ラットにスキサメトニウムを筋注後グルタルアルデヒドをベースとする防腐

液を注入し、長期保存後分析したところ、50 mg/kg を筋注し 6 ヶ月間 8°C で保存したグループの、注射部位の筋肉と腎臓からスキサメトニウムが検出されたと報告している。これは、防腐処理により組織が酸性に保たれ酵素も不活化されたということに加えて、本法に比較して投与量が 5 倍と多いことも、長期間検出の原因のひとつであると考えられる。しかし、本実験の結果から、一般に防腐処理等を施さない死後臓器からは、25°C 程度の室温で放置された場合には、1 週間程度でスキサメトニウムは検出されなくなると推定された。また、冬期など冷所で放置された場合には、検査部位によっては約 1.5 ヶ月後でも分析可能と考えられ、分析試料の保存の面からも冷蔵の有効性は認められた。

結 語

Frit-FAB LC-MS によるスキサメトニウムの分析法を検討し、10 mg/kg のスキサメトニウムを腹腔内投与したラット臓器からの検出期間について考察した。

臓器からのスキサメトニウムの抽出は、ホモジナイズした臓器を 1.2 N 過塩素酸で除タンパク後、Bond Elut CBA カートリッジで固相抽出した。定量は、ヘキサメトニウムを内部標準とし、SIM で行ったところ、30—1000 ng/g で直線性を示し、SIM による検出限界は 5 ng/g であった。

室温 (25°C) で放置したラットの肝臓、腎臓、心臓からは、それぞれ 7, 7, 2 日まで、冷蔵保存 (0

℃)した肝臓、腎臓、心臓からは、それぞれ42、42、4日までSIMによりスキサメトニウムが検出された。このことから、腹腔内投与後の肝臓、腎臓では、25℃では1週間程度でスキサメトニウムは検出されなくなるが、0℃では約1ヶ月半程度まで検出期間が延長されると推定された。

従来、スキサメトニウムのような第四級アンモニウム塩系薬物の鑑定には、有用な方法がなかったが、Frit-FAB LC-MSによって、臓器中のスキサメトニウムが、煩雑な前処理なく良好に分析され、鑑定業務にも利用可能であることが明らかになった。

Reference

- 1) Moffat A.C., Jackson J.V., Moss M.S., Widdop B. (eds.), "Clarke's Isolation and Identification of Drugs," 2nd ed., The Pharmaceutical Press, London, 1986, pp.998—999.
- 2) Tsuchihashi H., Tatsuno M., Nishikawa M., *Eisei Kagaku*, **36**, 28 (1990).
- 3) Nishikawa M., Tatsuno M., Suzuki S., Tsuchihashi H., *Forens. Sci. Intern.*, **51**, 131 (1991).
- 4) Nishikawa M., Tatsuno M., Tsuchihashi H., Igarashi K., Kasuya F., Fukui M., *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*, **40**, 534 (1994).
- 5) Nishikawa M., Nakajima K., Igarashi K., Kasuya F., Fukui M., Tsuchihashi H., *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*, **38**, 121 (1992).
- 6) Tatsuno M., Nishikawa M., Katagi M., Tsuchihashi H., Igarashi K., Kasuya F., Fukui M., *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*, **38**, 162 (1992).
- 7) Nishikawa M., Nakajima K., Tatsuno M., Kasuya F., Igarashi K., Fukui M., Tsuchihashi H., *Forensic Sci. Int.*, **66**, 149 (1994).
- 8) Katagi M., Tatsuno M., Tsuchihashi H., *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*, **40**, 357 (1994).
- 9) Nishikawa M., Tatsuno M., Katagi M., Tsuchihashi H., *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*, **41**, 59 (1995).
- 10) Katagi M., Nishioka H., Nakajima K., Tsuchihashi H., Fujima H., Wada H., Nakamura K., Makino K., *J. Chromatogr.*, **676**, 35 (1996).
- 11) Tatsuno M., Nishikawa M., Tsuchihashi H., Igarashi K., Kasuya F., Fukui M., *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*, **42**, 248 (1996).
- 12) Malthe-Sørenssen D., Odden E., Blanch J., Bugge A., Mørland J., *Forens. Sci. Intern.*, **32**, 171 (1986).
- 13) Nordgren I.K., Forney Jr. R.B., Carroll F.T., Holmstedt B.R., Jäderholm-Ek I., Pettersson B.-M., *Arch. Toxicol., Suppl.*, **6**, 339 (1983).
- 14) Ikarashi Y., Hada T., Way E.L., Maruyama Y., *J. Chromatogr.*, **533**, 23 (1990).
- 15) Stevens H.M., Moffat A.C., *J. Forensic Sci. Soc.*, **14**, 141 (1974).
- 16) Lagerwerf A.J., Vanlinthout L.E.H., Vree T.B., *J. Chromatogr.*, **570**, 390 (1991).