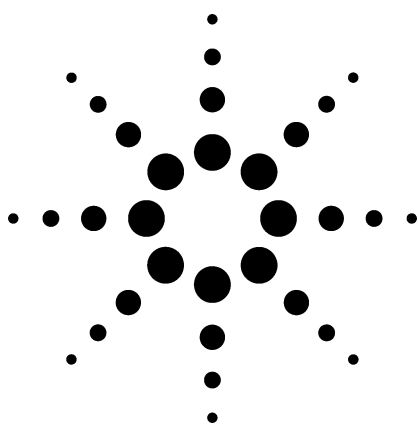


LC/MS によるベンゾジアゼピン類とその代謝物の同定と定量 アプリケーション



臨床中毒学および法中毒学

著者

Scott Schlueter and James Hutchison
Montana Department of Justice
Division of Forensic Science
2679 Palmer Street
Missoula, MT 59808
USA

John M. Hughes
Agilent Technologies, Inc.
4847 Hopyard Road, Suite 4
Pleasanton, CA 94588
USA

Michael Zumwalt
Agilent Technologies, Inc.
9780 S. Meridian Boulevard
Englewood, CO 80112
USA

要旨

一般的なベンゾジアゼピン類の分析に使用する液体クロマトグラフィー/質量分析 (LC/MS) メソッドについて説明し、血液、血清、または血漿に適したサンプル調製についても述べます。Agilent LC/MSD VL 四重極質量分析計をフルスキャンモードで使用すると、スペクトルの同定と定量を同時に行うことができます。本メソッドでは、血液中の分析対象成分の定量限界が $0.02 \mu\text{g/mL}$ で、3 桁にわたる濃度の相関係数が 0.98 を超えています。このシステムは、これらの薬物の分析に選択イオンモニタリング (SIM) モードを用いることなく、スキャンモードで十分に高い感度を示し、サンプルから検出される非ターゲット化合物の同定もできます。

はじめに

ベンゾジアゼピン類は、鎮静催眠薬、抗不安薬、筋弛緩薬、および抗痙攣薬を含めた幅広い治療効果をもつ重要なクラスの薬物です [1, 2]。ベンゾジアゼピン類は用途が幅広いことから、他の中枢神経抑制薬との相互作用が考えられ、その相互作用によって生命に危険を及ぼしたり運転能力が低下する状況に陥る可能性があります。ベンゾジアゼピン類は現在、最も多く処方される薬物の 1 つですが、中毒や乱用の危険性が高くなり、他の薬物との併用でしばしば薬物関連の致死や薬物による性犯罪を引き起こします。こうした理由から、ベンゾジアゼピン類の分析は法中毒学者および臨床中毒学者にとって非常に重要です。

ベンゾジアゼピン類の分析には、UV 検出による HPLC [3]、窒素リン検出器と電子捕獲検出器によるガスクロマトグラフィー [4]、およびガスクロマトグラフィー/質量分析法 (GC/MS) [5] が使用されてきました。多くのベンゾジアゼピン系化合物は極性で不揮発性であるため、GC や GC/MS による分析は不可能とは言わないまでも困難です。こうした化合物の一部は、クロマト挙動改善のための誘導体化ができません。さらに、フルニトラゼパムなど一部の新しいベンゾジアゼピンは治療域が低く、より速いクリアランスを持っているため、より低濃度での定量が必要です。こうした化合物には、誘導体化を必要としないことで時間、費用、実験の煩雑さが軽減されることから、液体クロマトグラフィー/四重極質量分析が最適です。Agilent 液体クロマトグラフ/質量選択検出器 (LC/MSD) によるフルスキャンでの感度によって、1 回の分析で定量、同定、確認ができます。



Agilent Technologies

実験

本実験で使用した LC/MS システムは、1100 シリーズ デガッサ、バイナリポンプ、オートサンブラ、温度調節カラム恒温槽、マイクロフローセル付きダイオードアレ イ検出器 (DAD)、および LC/MSD 四重極 VL モデルで構成されています。DAD は主に、メソッド開発の段階で 使用しますが、MS との間にシリーズで連結して UV 検 出器を使用すると、濃度が十分に高い場合には、得られ た UV スペクトルを同定にも使用できます。システムの 制御とデータの取込は、Agilent LC/MS ChemStation によって行いました。

分析した化合物

薬物	代謝物
アルプラゾラム	-
クロナゼパム	-
ジアゼパム	ノルジアゼパム
フルニトラゼパム	7-アミノフルニトラゼパム
フルラゼパム	デスアルキルフルラゼパム
ハラゼパム	-
テマゼパム	-
トリアゾラム	-

フルマゼニル (内部標準)

サンプル調製

サンプルの調製には液液抽出を用いました。この抽出方 法は、GC/MS によるベンゾジアゼピン系化合物の分析 によく使用されます。GC/MS メソッドとの唯一の違い は、誘導化手順を省き、GC 注入用の揮発性溶媒ではな く LC 移動相で最終サンプルの再溶解を行うことです。

血液、血清、または血漿 1 mL に内部標準溶液 (10 ng/μL) の 100 μL を添加し、さらに飽和ホウ酸ナトリウム溶液 1 mL を加えて、その混合溶液を攪拌しました。酢酸エチ ル (4 mL) を追加して、その混合溶液をロータリーシ ョーカーで 5 分間振とうした後、5 分間 3400 rpm で遠 心分離しました。上層をクリーンチューブに移し替えて、 蒸発乾固しました。残渣を初期移動相の 50 μL で再溶解 し、オートサンブラ用のバイアルに移し替えました。

LC/MS メソッドの詳細

LC の条件

機器	Agilent 1100 HPLC
カラム	ZORBAX XDB-C18 (150 × 4.6 mm, 3.5 μm) (Agilent パーツ番号 963967-902)
カラム温度	50°C
移動相	A = 0.1% ギ酸水溶液 B = 0.1% ギ酸メタノール溶液
流量	0.5 mL/min (この分離に最適な流量)
グラジエント	2 分まで B 5% 2 分から 10 分まで B 90%、 B 90%を 8 分間保持
注入量	10 μL

MS の条件

機器	Agilent LC/MSD VL
イオン化モード	ポジティブ ESI
乾燥ガス流量	13 L/min
ネブライザ	40 psig
乾燥ガス温度	300°C
スキャン範囲	m/z 50~1000
V_{cap}	3,000 V
フラグメンター	120 V

結果と考察

本メソッドで用いたサンプル調製法は、GC または GC/MS を使用するメソッドからの応用です。数多くの GC メソッドまたは GC/MS メソッドで使用されるサン プル調製は、しばしば LC/MS で使用できますが、誘導 化手順を省略して、最終サンプルを揮発性溶媒でなく LC 移動相に移し替えます。フルマゼニルは今回の調査 対象サンプル内で検出されなかったベンゾジアゼピン拮 抗薬で、一部の対象化合物の重水素化合物はコストと入手 可能性に問題があることから、内部標準としてこの化合 物を使用しました。

LC/MSD の標準 VL モデルは、血中ベンゾジアゼピン類 の分析に適しています。SL モデルは他の対象化合物に必 要である場合に使用し、約 10 倍の高感度です。また、 ポジティブ/ネガティブモードの交互切り換え、 SIM/Scan モード、低/高フラグメント化モードなどのマ ルチシグナル機能も有用です。この分析ではフルスキャ ン取り込みモードで測定し、分析対象化合物の定量は抽 出イオンクロマトグラム (EIC) を使用しました。その化 合物スペクトルの他のイオンを使って補助的な同定確認 をしています。

本メソッドでは中程度量の衝突誘起解離 (CID) を使用するため、フラグメンター電圧値を、CID を最小化するデフォルト値 70 V よりも 50 V 高い値に設定しました。その結果、スペクトルには単なる擬分子イオンよりも多くのイオンが含まれていました。これらのイオンは、EI GC/MS での一般的な方法のように、EIC でのイオンの確認に使用することができます。これらのスペクトルを、薬物同定のユーザー作成ライブラリに登録して、API スペクトルによるライブラリ検索に使用することができます。

図 1 は、本実験で分析したターゲットのベンゾジアゼピンのすべておよび 3 種類の一般的な代謝物についての EIC の重ね描きです。

定量と確認の両方に用いられる代表的なフルスキャンスペクトルのいくつかを図 2 に示しました。選択したフラグメンター電圧は、分子量関連イオンの重要なシグナル

を確保したまま、確認のための CID によるフラグメントイオン生成を起こす程度の高さです。例えば、フルニトラゼパムのスペクトル内にある m/z 268.1 は、 m/z 314.1 での (M+H)⁺ イオンのフラグメント化からによるものです。

当然のことながら、スペクトルの性質は化合物によって変わります。例えばテマゼパムの場合では、 m/z 323.1 でのナトリウム付加物のシグナルが大きくなるため、そのイオンが定量に使用されます。一方で、 m/z 255.0 にあるフラグメントが確認に使用されます。分析中にプロトン付加イオンとナトリウム付加イオンとの比が一定である限り、プロトン付加分子イオン m/z 301.0 も確認イオンとして使用できます。酸素を含む官能基を有する化合物では、プロトン付加物だけでなくナトリウム付加物も生成します。こうした複雑さを避けるには、エレクトロスプレーイオン化 (ESI) の代わりに大気圧化学イオン化 (ACPI) を使用します [6, 7]。

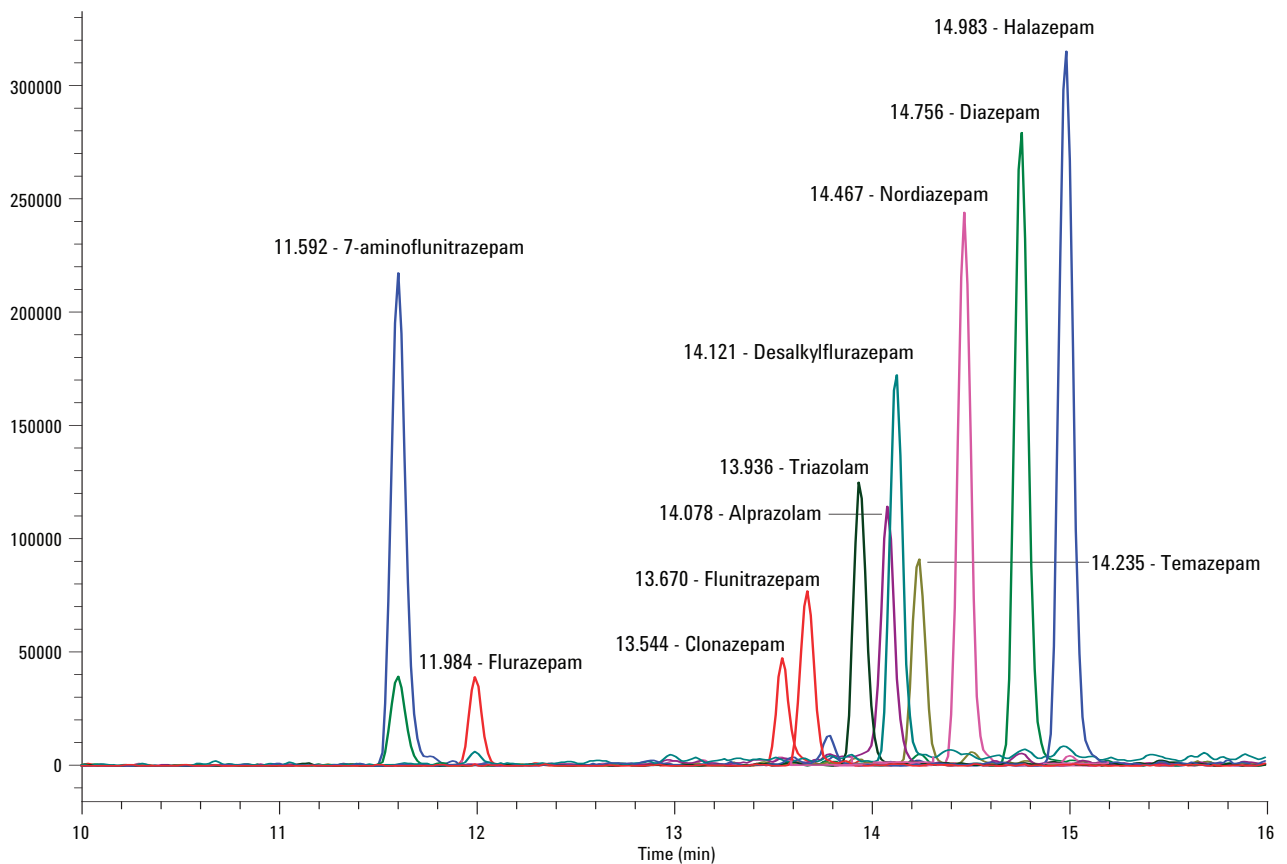


図 1 11 種類のベンゾジアゼピン系化合物の重ね描き EIC とリテンションタイム。時間軸は 10~16 分の範囲のみに拡大しています。

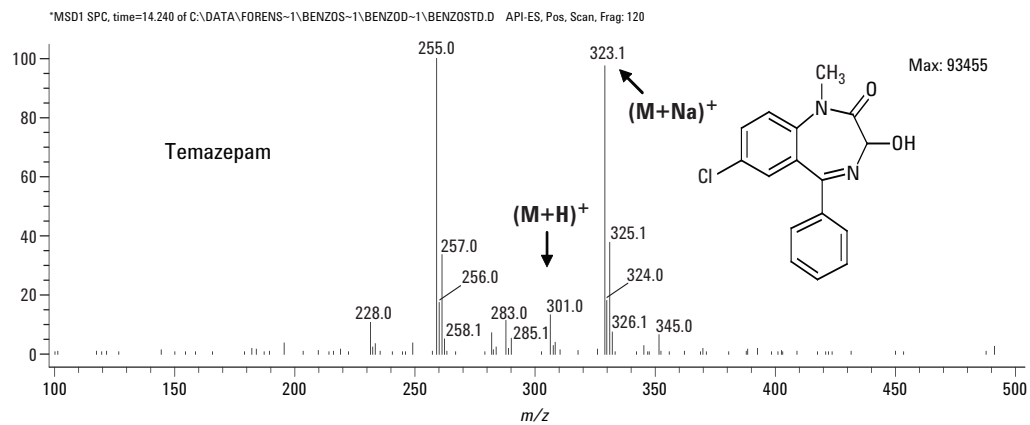
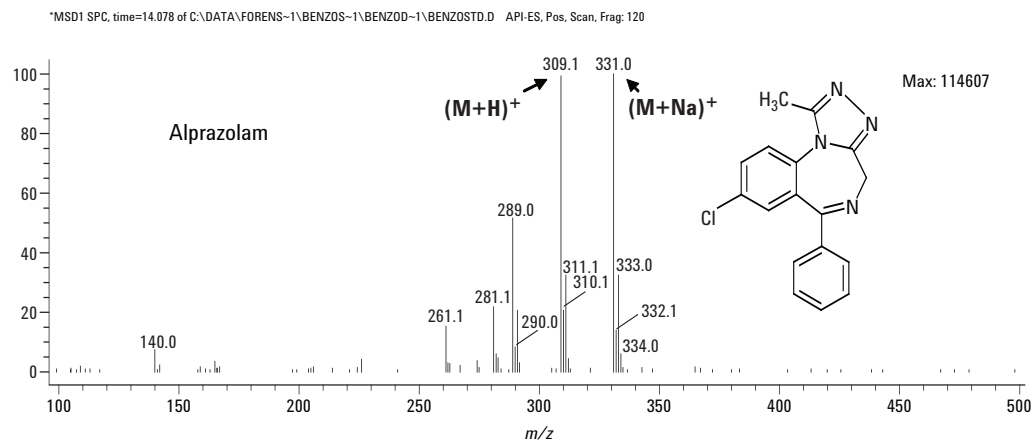
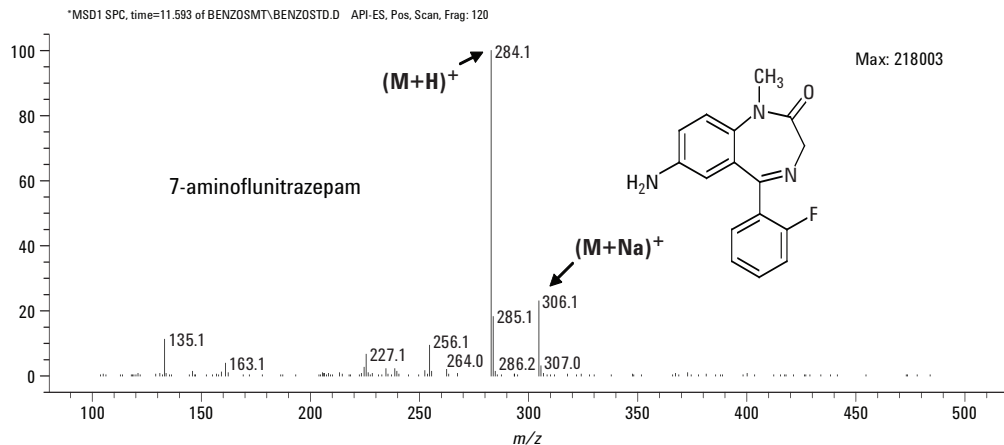
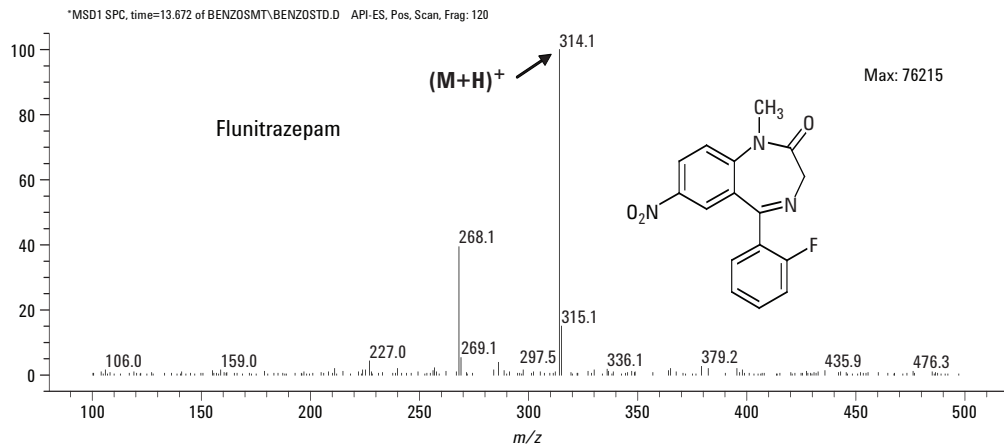


図2 一般的なベンゾジアゼピン系化合物のスペクトル。プロトン付加イオン $(M+H)^+$ 、ナトリウム付加イオン $(M+Na)^+$ 、フラグメントイオンが示されています。

本メソッドはほとんどのターゲット化合物に使用しました。本メソッドと今回使用したモデルの LC/MSD を使用した場合、S/N が 3:1 としたときの検出限界 (LOD) は約 10 ng/mL でした。モンタナ州の中毒学ラボで実践されているメソッドでは、定量限界 (LOQ) が 20 ng/mL (0.02 µg/mL) で、キャリブレーション範囲を 1000 ng/mL まで拡張し、各化合物に 1 つ以上のクオリファイアイオンを使用しています。図 3 に、20 ng/mL (低) キャリブレーション標準試料に含まれる内部標準とテマゼパムについての、定量イオンと確認イオンがの抽出イオンクロマトグラムを示します。

指定したサンプル調製と機器条件により、キャリブレーション範囲を最大 1000 ng/mL まで拡張すると、これらの対象化合物のほとんどで、直線よりも二次曲線の方がよく適合した検量線になります ($r^2 > 0.99$)。図 4 にそのような例として、5~2000 ng/mL でのアルプラザラムの検量線を示します。直線近似の場合でも $r^2 > 0.98$ です。高濃度での検量線の曲がりは明らかに、対象化合物が幾分高濃度になるとイオンの飽和限界に達する ESI でのよく知られた現象によるものです。

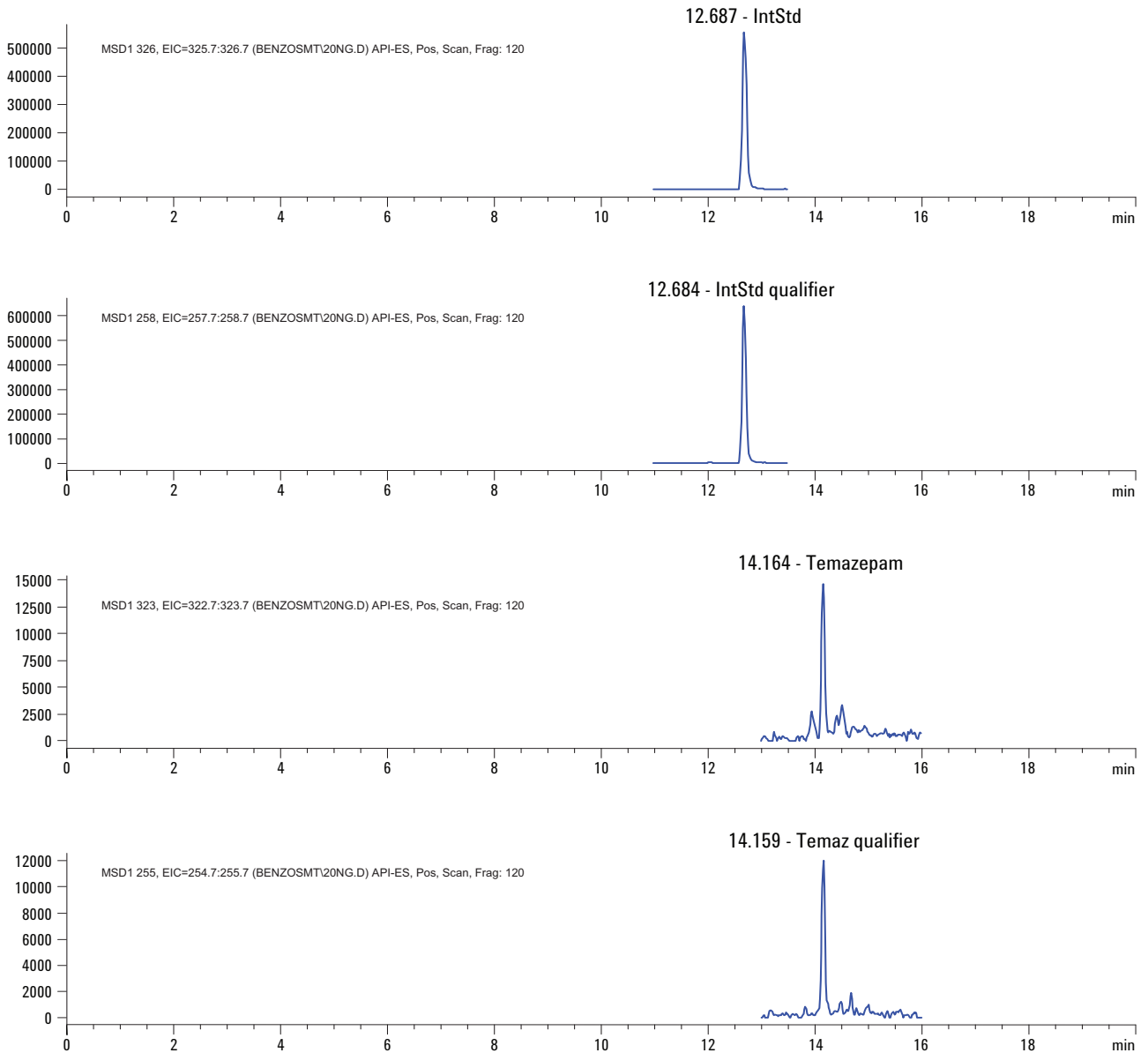


図 3 20 ng/mL (LOQ) での内部標準 (フルマゼニル) とテマゼパム、およびそれぞれの確認イオンの EIC

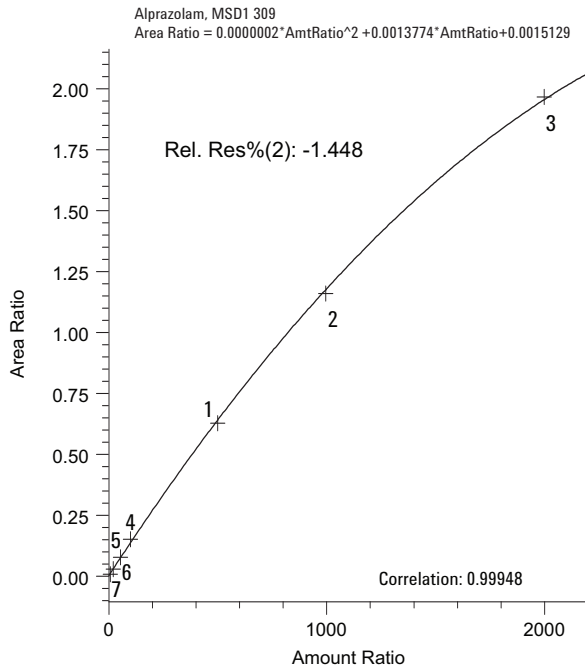


図 4 アルプラゾラムの検量線 (5~2000 ng/mL)

図 5 は、アルプラゾラムが中レベルである 128 ng/mL で検出された実際のサンプル例です。クロマトグラフピーク形状が非常に良好で、ピーク幅が狭くなっています。図 6 は、運転能力が低下した運転手のサンプル例における EIC の拡大図です。キャリブレーション範囲内で分析するため、サンプルには 10 倍の希釈を必要としました。そのため、血中濃度は 3000 ng/mL を超えると概算されました。

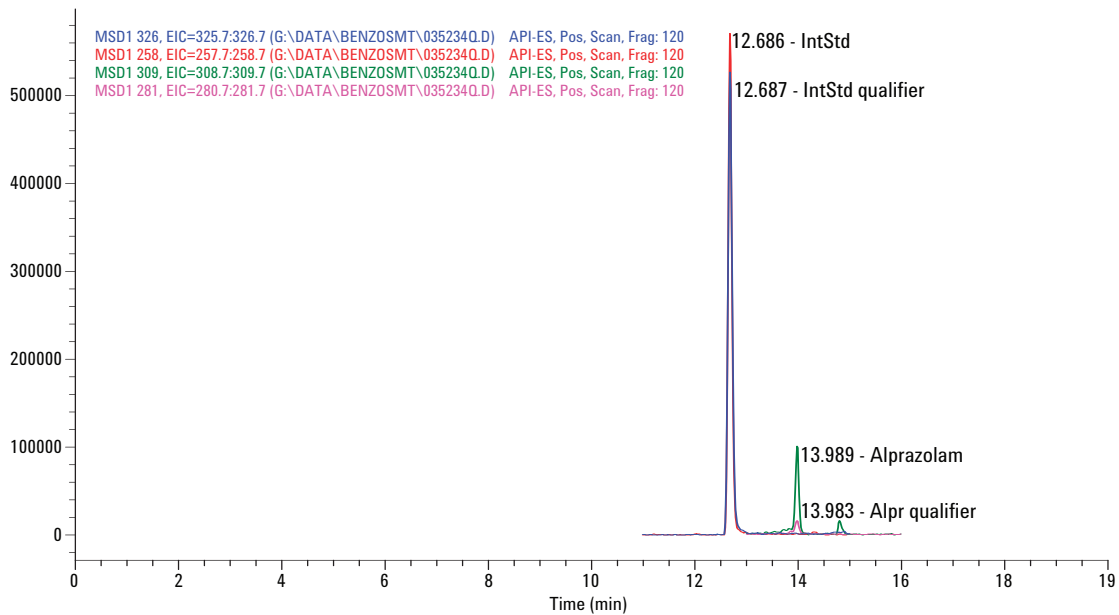


図 5 サンプル例 - アルプラゾラム (中レベル 128 ng/mL)

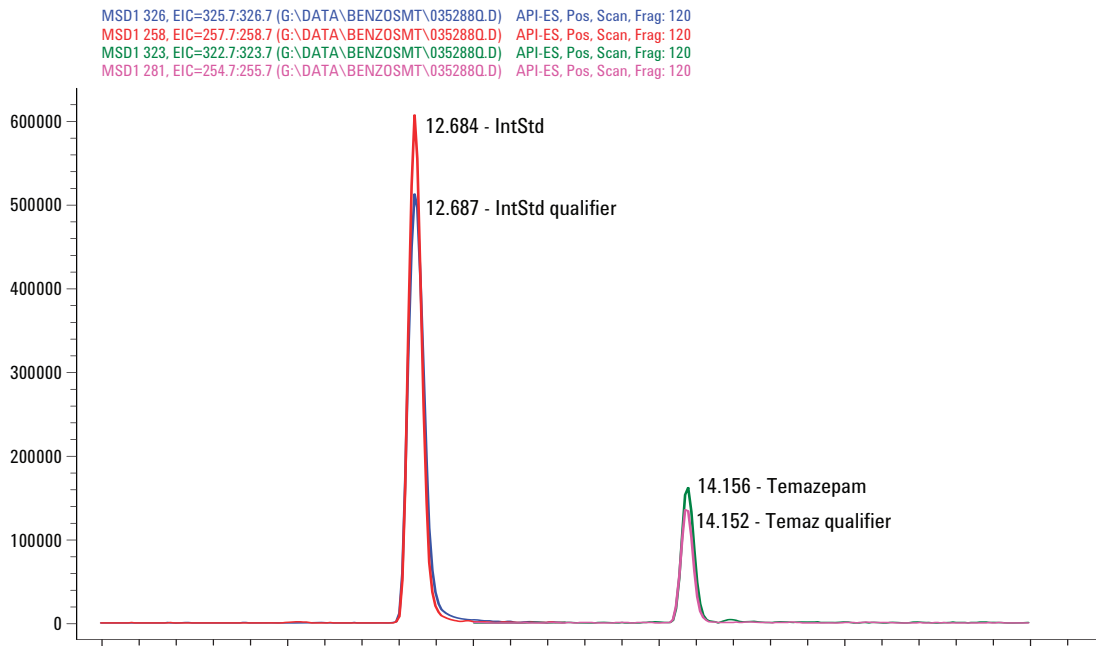


図 6 サンプル例 - フルマゼニル (高レベル 307 ng/mL) (キャリブレーション範囲に収まるよう 10 倍希釈後)

結論

この報告では、血中ベンゾジアゼピン類の分析に LC/MS が有用であることを示しました。これらのベンゾジアゼピン系化合物は GC による方法では分析が困難である場合が多いです。しかし LC/MS を使用した場合、API エレクトロスプレーではイオン化が容易で、最も低コストのモデルである LC/MSD (VL) を使用するフルスキャンモードでも、非常に高い感度が得られます。血液は分析が困難なマトリックスですが、今回の結果では、誘導体化を行わずに 1 mL のサンプルを GC/MS の場合と同様な単純な液液抽出法のみで、優れた定量結果と同時に同定確認が得られました。CID スペクトルには、強いベースピークシグナルがあり、これは 3 桁にわたる広い範囲で定量に使用できます。さらに CID フラグメント

イオンは、イオン比の確認やライブラリ検索に使用できます。本メソッドは SIM モードで使用でき、さらに血中にて低濃度で見つかる新しい種類のベンゾジアゼピン系化合物に対してより高感度である LC/MSD SL モデルで使用することができます。

また、Agilent LC/MSD 四重極システムを使用して多数のベンゾジアゼピン系化合物とその関連物質を対象とした、迅速で有効なメソッドも発表されています。そのメソッドでは、ESI ではなく ACPI、今回と同様の液液抽出法、より多数のフラグメント化による CID、および複数の重水素化内部標準が使用されています。その論文では、CID スペクトルの使用、および同定を行うためのライブラリ検索の使用について説明しており、フラグメント化状態が高い場合と低い場合の両方におけるすべての対象化合物のスペクトルについても示しています。

参照文献

1. Goodman and Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 11th edition, McGraw-Hill, 1996.
2. O. H. Drummer, "Benzodiazepines – effects on human performance and behavior", (2002) *Forensic Sci. Rev.*, **14** (1–2).
3. M. J. Bogusz, R.-D. Maier, K.-D. Kruger., W. Fruchtnicht, (1998) *J. Chromatogr. B* **713**, 361.
4. Y. Gaillard, J. Gay-Montchamp and M. Ollagnier, (1993) *J. Chromatogr.* **622**, 197.
5. M. Elsohly, S. Feng, S. Salomone and R. Brenneisen, (1999) *J. Anal. Toxicol.* **23**, 486.
6. C. Kratzsch, O. Tenberken, F. T. Peters, A. A. Weber, T. Kraemer and H. H. Maurer, "Screening, library-assisted identification and validated quantification of 23 benzodiazepines, flumazenil, zaleplone, zolpidem and zopiclone in plasma by liquid chromatography/mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization," (2004) *J. Mass Spectrom.* **39**, 856–872.
7. B. E. Smink, J. E. Brandsmaa, A. Dijkhuizen, K. J. Lusthofa, J. J. de Gierb, A. C. G. Egbertsb, and D. R. A. Ugesc, "Quantitative analysis of 33 benzodiazepines, metabolites and benzodiazepine-like substances in whole blood by liquid chromatography-(tandem) mass spectrometry", (2004) *J. Chromatogr. B*, **811**, 13–20.

詳細については

弊社の製品およびサービスに関する詳細については、ウェブサイト www.agilent.com/chem/jp をご覧ください。

このノートに関する詳細については、Agilent Technologies, Inc. の John Hughes までご連絡ください。

謝辞

@End of document: 励ましの言葉と初稿をいただいた Michael Zumwalt 氏、レビューとアドバイスをいただいた Jeff Keever 氏には、同じ Agilent の社員として多大なる感謝を申し上げます。

Agilent は、万一この資料に誤りが発見されたとしても、また、本資料の使用により付随的または間接的に損害が発生する事態が発生したとしても一切免責とさせていただきます。

本資料に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

© Agilent Technologies, Inc. 2006

Printed in Japan
April 11, 2006
5989-4639JAJP



Agilent Technologies