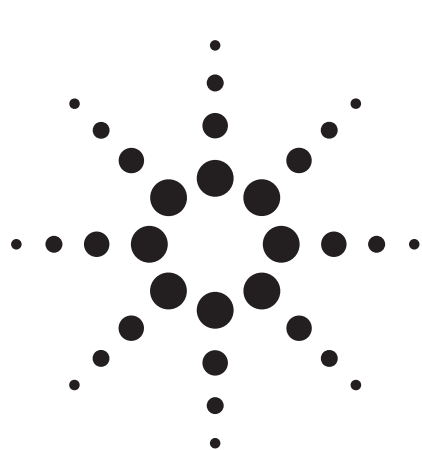




# ラピッドレゾリューション液体クロマト グラフ/トリプル四重極質量分析計を用いた 尿と血液中のベンゾジアゼピンの測定

アプリケーション

法医学

## 著者

Christine Moore, Cynthia Coulter, and Katherine Crompton  
Immunalysis Corporation  
829 Towne Center Dr.  
Pomona, CA 91767  
USA

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

## 要旨

エレクトロスプレーモードによる Agilent 6410 トリプル四重極質量分析計を用いて、尿と血液中の 14 種類のベンゾジアゼピンと 6 種類の代謝物の一斉分析について、迅速、簡単、かつ高感度な手法について説明します。尿試料の前処理では、基準試料中で  $\beta$ -グルクロニダーゼ処理を行いました。血液試料の前処理には、アセトニトリルによる赤血球の沈殿処理後、固相抽出を行い、溶出液は蒸発乾固し、LC/MS/MS システムに注入するため移動相で再溶解しました。

我々の知る限りでは、この手法は信頼のおける同定のために、定量イオンに対して特定比率内に存在することが必要とされる確認イオンの同時測定について言及した最

初のもので、アジレントソフトウェアの独自機能は、定量イオンと確認イオンの比率を自動計算します。その比率は陽性と判断するには検量線用標準液での比率に対して一定の範囲内に入っていなければなりません。確認イオンの測定は分析の感度を低下させますが、結果の信頼性を高めることは法医学分析において重要な要素です。

## 緒言

ベンゾジアゼピンは、不安神経症や不眠症の治療のために、特に高齢者に対して米国で最も一般的に処方される薬品です [1]。筋弛緩剤や抗痙攣薬としても使用され、性的暴行事件、薬物服用時の運転 (DUID) 等の事件においても、他の薬剤とともにしばしば検出されます。Hegstad らは、7-アミノニトラゼパム、7-アミノクロナゼパム、7-アミノフルニトラゼパム、アルプラゾラム、 $\alpha$ -ヒドロキシアルプラゾラム、オキサゼパム、3-OH-ジアゼパム、ノルジアゼパムを含む、ベンゾジアゼピン類検出のための LC/MS/MS を用いた分析手法を報告しています。Kintz らは、ロラゼパムの一回投与 (2.5 mg) 後に、96 時間、尿中に 5 ng/mL 以上のロラゼパムを検出しました [5]。Cheze らは、プロマゼパム (6 mg) とクロナゼパム (2 mg) の一回経口投与後、プロマゼパム濃度は 60 時間後で 5 ng/mL 以上、7-アミノクロナゼパムは少なくとも 144 時間は検出可能であると報告しています [6]。



Agilent Technologies

血液は通常は交通事故の後に採取し、重要な生体学的試料として検視にまわされます。しかし、特に血中のベンゾジアゼピンは、治療後の濃度は低くなる可能性があるため、その検出には困難を伴います。血漿や血清中のベンゾジアゼピンの分析についてはいくつかの文献がありますが、全血中での報告はほとんどありません。Gunnar らは、抽出、誘導体化、GC/MS 分析を用いて、全血中のベンゾジアゼピンを検出しています [7]。

Laloup らは、26 種類のベンゾジアゼピンと代謝物に対して、LC-MS/MS 法を用いた尿、血液、毛髪のスクリーニング手法を報告しています [8]。彼らは各薬物の定量イオンおよび確認イオンを一覧にまとめましたが、陽性試料のさらなる確認には、化合物あたり 2 つのイオンを測定するために 2 回目の注入が必要であると言及しています。アジレントのシステムとソフトウェアを用いると、確認イオンの測定と定量イオンの強度に対する比率の計算を行うことができます。

## 実験

### 試料前処理

#### 標準試料と試薬

- 重水素化内部標準: d5-ジアゼパム; d5-テマゼパム; d5-アルプラゾラム d7-7-アミノフルニトラゼパム、d4-クロナゼパム、薬物標準試料: 7-アミノフルニトラゼパム; 7-アミノクロナゼパム; 7-アミノニトラゼパム;  $\alpha$ -OH-アルプラゾラム;  $\alpha$ -OH-トリアゾラム; デスアルキルフルラゼパム、プロマゼパム; クロナゼパム; ニトラゼパム; トリアゾラム; アルプラゾラム; フルニトラゼパム; フルラゼパム; ロラゼパム; ミダゾラム; クロルジアゼポキシド; ジアゼパム、オキサゼパム、ノルジアゼパム、テマゼパムは、Cerilliant (テキサス州、Round Rock) から購入しました。
- 多機能固相抽出カラム (Clin II) は SPEWare (カルフォルニア州、San Pedro) から購入しました。
- すべての溶媒は HPLC クラス以上で、すべての試薬は ACS クラスで、Spectrum Chemical (カルフォルニア州、Gerdana) から購入しました。

#### 標準試料 (メタノールで調製)

- 内部標準液: D7-7-アミノフルニトラゼパム; D5-アルプラゾラム; D4-クロナゼパム、D5-テマゼパム; D5-オキサゼパム; D5-ジアゼパム (1,000 ng/mL)
- 薬物標準: 7-アミノフルニトラゼパム; 7-アミノクロナゼパム; 7-アミノニトラゼパム;  $\alpha$ -OH-アルプラゾラム;  $\alpha$ -OH-トリアゾラム; デスアルキルフルラゼパム; プロマゼパム; クロナゼパム; ニトラゼパム; トリアゾラム; アルプラゾラム; フルニトラゼパム; フルラゼパム; ロラゼパム; ミダゾラム; クロルジアゼポキシド; ジアゼパム、オキサゼパム、ノルジアゼパム、テマゼパム

#### 抽出手順 - 尿

重水素化内部標準液 (100  $\mu$ L) を尿 (1 mL) に加え、混合しました。

#### 検量線:

|            |                                                                  |
|------------|------------------------------------------------------------------|
| ブランク:      | 重水素化原液 (1,000 ng/mL) 100 $\mu$ L                                 |
| 10 ng/mL:  | 重水素化原液 (1,000 ng/mL) 100 $\mu$ L<br>原液 (1,000 ng/mL) 10 $\mu$ L  |
| 25 ng/mL:  | 重水素化原液 (1,000 ng/mL) 100 $\mu$ L<br>原液 (1,000 ng/mL) 25 $\mu$ L  |
| 50 ng/mL:  | 重水素化原液 (1,000 ng/mL) 100 $\mu$ L<br>原液 (1,000 ng/mL) 50 $\mu$ L  |
| 100 ng/mL: | 重水素化原液 (1,000 ng/mL) 100 $\mu$ L<br>原液 (1,000 ng/mL) 100 $\mu$ L |

2 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0、0.1 mL) を加え、基準試料には  $\alpha$ -グルクロニダーゼ (50  $\mu$ L) も加えました。混合液は 45 °C で 3 時間加熱しました。遠心分離 (10 分、2,500 rpm) 後、0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0、1 mL) を、遠沈後の上澄みに加えました。固相ミニカラムは真空マニホールドに設置し、メタノール (3 mL)、イオン交換水 (3 mL)、0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.0、2 mL) でコンディショニングしました。また、充填剤は乾燥しないようにしました。各試料はカラムに負荷し、乾燥後、イオン交換水 (3 mL)、0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.0)、アセトニトリル (80:20、2 mL)、でカラム洗浄、乾燥しました。さらにヘキサン (1 mL) でカラムを洗浄後、最終的に、薬物は 2% 水酸化アンモニウム含有エチル酢酸 (2 mL) で溶出しました。溶出液は窒素気流下 (20 psi/37 °C) で蒸発乾固させ、分析のためにメタノール<sup>1</sup> (50  $\mu$ L) で再溶解しました。

<sup>1</sup> この研究以降に、水での再溶解がメタノールよりも有効であることが分かりました。

## 抽出手順 - 血液

アセトニトリル (1 mL) を全血 (1 mL) に加えました。重水素化内部標準 (100 µL, 50 ng/mL) の混合液を加え、試料を混合した後、遠心分離 (20 分、2,500 rpm) にかかけました。上澄みを別の容器に静かに移し、0.025 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 2.7, 1.5 mL) を加えました。

### 検量線:

|            |                                                      |
|------------|------------------------------------------------------|
| ブランク:      | 重水素化原液 (1,000 ng/mL) 50 µL                           |
| 5 ng/mL:   | 重水素化原液 (1,000 ng/mL) 50 µL<br>原液 (100 ng/mL) 50 µL   |
| 10 ng/mL:  | 重水素化原液 (1,000 ng/mL) 50 µL<br>原液 (1,000 ng/mL) 10 µL |
| 25 ng/mL:  | 重水素化原液 (1,000 ng/mL) 50 µL<br>原液 (1,000 ng/mL) 25 µL |
| 50 ng/mL:  | 重水素化原液 (1,000 ng/mL) 50 µL<br>原液 (1,000 ng/mL) 50 µL |
| 100 ng/mL: | 重水素化原液 (1,000 ng/mL) 50 µL<br>原液 (100 ng/mL) 100 µL  |

固相ミニカラムは真空マニホールドに設置し、メタノール (3 mL)、イオン交換水 (3 mL)、0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.0, 2 mL) でコンディショニングしました。また、充填剤は乾燥しないようにしました。各試料はカラムに負荷し、乾燥後、イオン交換水 (3 mL)、0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.0)、アセトニトリル (80:20, 2 mL)、でカラムを洗浄、乾燥しました。さらにヘキサン (1 mL) でカラムを洗浄後、最終的に、薬物は 2% 水酸化アンモニウム含有エチル酢酸 (2 mL) で溶出しました。溶出液は窒素気流下 (20 psi/37 °C) で蒸発乾固させ、分析のためにメタノール<sup>2</sup> (50 µL) で再溶解しました。

<sup>2</sup>この研究以降に、水での再溶解がメタノールよりも有効であることが分かりました。

## 分析手順 - 尿と血液

7-アミノフルニトラゼパム、7-アミノニトラゼパム、7-アミノクロナゼパムは、流量が 0.2 mL/min でもほとんど保持せず、グラジエント条件と流量の最適化を試みましたが、これら 3 化合物についてはうまく測定できませんでした。別のメソッドを用いて、3.5 分でこれらの代謝物のみを測定しました。メソッドを分けることにより、分離と感度が大幅に向上しました。

これらの分析は Agilent 6410 トリプル四重極 LC/MS と 1200 シリーズ HPLC、ZORBAX Eclipse XDB C18 4.6 x 50 mm x 1.8 µm 分析カラム (PN: 922975-902) を用い、注入量は 5 µL としました。本文書では内径 4.6 mm カラムを用いて良好な結果が得られましたが、本流量で一般的に推奨されるカラムは粒子径 1.8 µm の内径 2.1 mm カラムです。

LC/MS の分析条件を表 1 に示します。確認イオンは() で示しました。

### ベンゾジアゼピン (7-アミノ代謝物を除く):

|            |                                                 |
|------------|-------------------------------------------------|
| カラム温度:     | 35 °C                                           |
| 溶媒流量:      | 0.2 mL/min                                      |
| 移動相:       | A = 20 mM ギ酸アンモニウム<br>(pH = 8.6)<br>B = アセトニトリル |
| アイソクラティック: | 50% B                                           |

| 時間<br>(分) | 流量<br>(mL/min) |
|-----------|----------------|
| 0         | 0.2            |
| 6.5       | 0.2            |
| 8         | 1              |
| 10        | 0.2            |

ポストタイム: 4.5 分

### 7-アミノ代謝物のみ:

|            |                                                 |
|------------|-------------------------------------------------|
| カラム温度:     | 45 °C                                           |
| 溶媒流量:      | 0.6 mL/min                                      |
| 移動相:       | A = 20 mM ギ酸アンモニウム<br>(pH = 8.6)<br>B = アセトニトリル |
| アイソクラティック: | 35% B                                           |
| ストップタイム:   | 3.5 分                                           |

### 質量分析計条件:

|                         |                   |          |
|-------------------------|-------------------|----------|
| 操作:                     | エレクトロスプレーポジティブモード |          |
|                         | 7-アミノ             | その他の     |
|                         | 代謝物               | ベンゾジアゼピン |
| ガス温度:                   | 350 °C            | 300 °C   |
| ガス流量 (N <sub>2</sub> ): | 6 L/min           | 6 L/min  |
| ネブライザ圧力:                | 20 psi            | 15* psi  |
| キャピラリー電圧:               | 4000 V            | 4500 V   |

\* LC 流量 0.6 mL/min で、安定したイオンスプレーのためには、50 psi 程度のネブライザ圧力設定値が推奨されます。

表 1a. 取り込みパラメータ: 7-アミノ代謝物

| 化合物              | 開始時間<br>(分) | プリカーサ<br>イオン | プロダクト<br>イオン | フラグメント<br>電圧 (V) | CE (V)  |
|------------------|-------------|--------------|--------------|------------------|---------|
| セグメント 1          |             |              |              |                  |         |
| D7-7-アミノフルニトラゼパム | 0           | 291          | 263          | 120              | 25      |
| 7-アミノクロナゼパム      | 0           | 286          | 222 (121)    | 200              | 25 (25) |
| 7-アミノニトラゼパム      | 0           | 252          | 121 (208)    | 120              | 30 (35) |
| 7-アミノフルニトラゼパム    | 0           | 284          | 226 (256)    | 160              | 30 (25) |

表 1b. 取り込みパラメータ: ベンゾジアゼピン

| 化合物                    | 開始時間<br>(分) | プリカーサ<br>イオン | プロダクト<br>イオン | フラグメント<br>電圧 (V) | CE (V)  |
|------------------------|-------------|--------------|--------------|------------------|---------|
| セグメント 1                |             |              |              |                  |         |
| プロマゼパム                 | 0           | 316          | 288 (209)    | 160              | 20 (30) |
| セグメント 2                |             |              |              |                  |         |
| D4-クロナゼパム              | 4.1         | 320          | 274          | 120              | 25      |
| クロナゼパム                 | 4.1         | 316          | 270 (214)    | 120              | 25 (35) |
| $\alpha$ -ヒドロキシアルプラゾラム | 4.1         | 325          | 297 (216)    | 120              | 30 (35) |
| $\alpha$ -ヒドロキシトリアゾラム  | 4.1         | 359          | 331 (176)    | 120              | 25 (25) |
| ロラゼパム                  | 4.1         | 321          | 275 (229)    | 140              | 25 (35) |
| ニトラゼパム                 | 4.1         | 282          | 236 (180)    | 160              | 25 (35) |
| D5-アルプラゾラム             | 4.1         | 314          | 286          | 160              | 25      |
| アルプラゾラム                | 4.1         | 309          | 281 (274)    | 160              | 25 (30) |
| クロルジアゼポキシド             | 4.1         | 300          | 283 (227)    | 120              | 15 (30) |
| D5-オキサゼパム              | 4.1         | 292          | 246          | 120              | 20      |
| オキサゼパム                 | 4.1         | 287          | 241 (269)    | 120              | 20 (20) |
| トリアゾラム                 | 4.1         | 343          | 308 (239)    | 120              | 35 (35) |
| セグメント 3                |             |              |              |                  |         |
| フルニトラゼパム               | 5.4         | 314          | 268 (239)    | 160              | 30 (35) |
| ミダゾラム                  | 5.4         | 326          | 291 (249)    | 200              | 30 (40) |
| D5-テマゼパム               | 5.4         | 306          | 260          | 120              | 25      |
| テマゼパム                  | 5.4         | 301          | 255 (177)    | 120              | 35 (40) |
| デスアルキルフルラゼパム           | 5.4         | 289          | 226 (261)    | 160              | 30 (25) |
| ノルジアゼパム                | 5.4         | 271          | 140 (165)    | 160              | 30 (30) |
| セグメント 4                |             |              |              |                  |         |
| 5-ジアゼパム                | 7.2         | 290          | 262          | 160              | 25      |
| ジアゼパム                  | 7.2         | 285          | 257 (222)    | 160              | 25 (25) |
| フルラゼパム                 | 7.2         | 388          | 315 (288)    | 160              | 25 (25) |

\* ( ) 確認イオン; 確認イオンの比率は検量線データの 20% 以内である必要があります。

## LC/MS/MS のメソッドバリデーション

標準のプロトコール、つまり定量下限、直線範囲、相関関係、日内、日間の精確さについて、5 日間にわたって複数回 (n=5) の分析を行うことによって、分析メソッドを評価しました。検量線は原点を通りませんでした。検量線の方程式と決定係数 ( $R^2$ ) は表 2a (尿) と 2b (血液) に示し、分析の日間繰り返し精度と真度はそれぞれ表 3a と 3b に示しています。さらに、分析の日内繰り返し精

度と真度はそれぞれ表 4a と 4b に示しています。この手法は 25 ng/mL の濃度で堅牢で精度のよい、正確な測定が可能であり、5 ~ 100 ng/mL の範囲で良好な直線性を示しました。すべての薬物に対する繰り返し精度は日内と日間で相対標準偏差が 20% 未満で、大部分のベンゾジアゼピンの相対標準偏差は 10% 未満でした。例外は尿中の 7-アミノニトラゼパムで、5 回の繰り返しで、24.4% の相対標準偏差を示しました。すべての薬物に対

する定量下限は 5 ng/mL でした。一般的に検出される薬物は高濃度で抽出および分析され、分析に影響しないことが分かりました。

図 1a には、尿中のロラゼパムの標準的な検量線を示します ( $R^2 > 0.998$ )。図 1b には、決定係数が 0.999 以上のミダゾラムの標準的な検量線を示します。

**表 2a. 尿中のベンゾジアゼピンの直線性、決定係数、許容確認イオン比**

| 対象化合物                  | 方程式                      | 決定係数 ( $R^2$ ) | 確認イオン比 (20% 範囲)   |
|------------------------|--------------------------|----------------|-------------------|
| 7-アミノフルニトラゼパム          | $Y = 0.0210x - 0.0481$   | 0.9985         | 69.4 (55.4–83.2)  |
| 7-アミノニトラゼパム            | $Y = 0.5293x - 0.2512$   | 0.9990         | 8.6 (6.9–10.3)    |
| 7-アミノクロナゼパム            | $Y = 0.0523x - 0.1647$   | 0.9959         | 84.5 (67.6–101.4) |
| $\alpha$ -ヒドロキシアルプラゾラム | $Y = 0.0019x - 0.0053$   | 0.9997         | 40.4 (32.3–48.5)  |
| $\alpha$ -ヒドロキシトリアゾラム  | $Y = 0.000971x - 0.0024$ | 0.9996         | 92 (73.6–110.45)  |
| アルプラゾラム                | $Y = 0.0117x + 0.00063$  | 0.9998         | 15.8 (12.6–18.9)  |
| ブロマゼパム                 | $Y = 0.0035x + 0.0095$   | 0.9948         | 59.4 (47.5–71.25) |
| クロルジアゼポキシド             | $Y = 0.0064x + 0.0284$   | 0.9982         | 80.2 (64.1–96.2)  |
| クロナゼパム                 | $Y = 0.0121x - 0.0342$   | 0.9997         | 24.5 (19.5–29.3)  |
| デスアルキルフルラゼパム           | $Y = 0.0027x + 0.023$    | 0.9986         | 26.7 (21.3–32)    |
| ジアゼパム                  | $Y = 0.0116x + 0.0166$   | 0.9996         | 82.5 (66–99)      |
| フルニトラゼパム               | $Y = 0.0025x - 0.000311$ | 0.9994         | 49.4 (39.5–59.2)  |
| フルラゼパム                 | $Y = 0.1291x + 0.2849$   | 0.9993         | 13.6 (10.8–16.3)  |
| ロラゼパム                  | $Y = 0.0104x - 0.0457$   | 0.9981         | 34.2 (27.3–41)    |
| ミダゾラム                  | $Y = 0.0117x + 0.0149$   | 0.9997         | 31.4 (25–37.6)    |
| ニトラゼパム                 | $Y = 0.015x + 0.0176$    | 0.9948         | 20 (34.9–52.3)    |
| ノルジアゼパム                | $Y = 0.0032x + 0.0139$   | 0.9998         | 65.8 (52.6–78.9)  |
| オキサゼパム                 | $Y = 0.0079x - 0.0123$   | 0.9999         | 24.3 (19.4–29.1)  |
| テマゼパム                  | $Y = 0.0062x + 0.0011$   | 0.9998         | 31 (24.8–37.2)    |
| トリアゾラム                 | $Y = 0.0076x + 0.0522$   | 0.9983         | 92.1 (73.7–110.5) |

**表 2b. 血中のベンゾジアゼピンの直線性、決定係数、許容確認イオン比**

| 対象化合物                  | 方程式                      | 決定係数 ( $R^2$ ) | 確認イオン比 (20% 範囲)   |
|------------------------|--------------------------|----------------|-------------------|
| 7-アミノフルニトラゼパム          | $Y = 0.0199x - 0.0196$   | 0.9997         | 73.3 (58.6–88)    |
| 7-アミノニトラゼパム            | $Y = 0.525x - 0.2845$    | 0.9985         | 7.3 (5.8–8.7)     |
| 7-アミノクロナゼパム            | $Y = 0.0403x - 0.0429$   | 0.9996         | 97.8 (78.2–117.3) |
| $\alpha$ -ヒドロキシアルプラゾラム | $Y = 0.001x - 0.0016$    | 0.9989         | 41.0 (32.8–49.2)  |
| $\alpha$ -ヒドロキシトリアゾラム  | $Y = 0.00033x + 0.00065$ | 0.9985         | 90.4 (72.3–108.5) |
| アルプラゾラム                | $Y = 0.0124x - 0.0092$   | 0.9999         | 15.0 (12–18)      |
| ブロマゼパム                 | $Y = 0.0029x - 0.0128$   | 0.9940         | 59.2 (47.4–71.1)  |
| クロルジアゼポキシド             | $Y = 0.0136x + 0.0708$   | 0.9833         | 78.9 (63.1–94.7)  |
| クロナゼパム                 | $Y = 0.0113x - 0.0332$   | 0.9980         | 25.2 (20.2–30.3)  |
| デスアルキルフルラゼパム           | $Y = 0.0029x + 0.0006$   | 0.9996         | 26.6 (21.3–31.9)  |
| ジアゼパム                  | $Y = 0.0105x - 0.0197$   | 0.9992         | 83.3 (66.6–100)   |
| フルニトラゼパム               | $Y = 0.00083x + 0.00084$ | 0.9989         | 49.7 (39.8–59.7)  |
| フルラゼパム                 | $Y = 0.1303x + 0.1446$   | 0.9994         | 13.8 (11.0–16.6)  |
| ロラゼパム                  | $Y = 0.0153x - 0.0538$   | 0.9971         | 35.1 (28.1–42.2)  |
| ミダゾラム                  | $Y = 0.0142x - 0.0088$   | 0.9986         | 31.8 (25.4–38.2)  |
| ニトラゼパム                 | $Y = 0.0273x + 0.0974$   | 0.9951         | 42.7 (34.2–51.3)  |
| ノルジアゼパム                | $Y = 0.0048x + 0.0058$   | 0.9980         | 65.5 (52.4–78.6)  |
| オキサゼパム                 | $Y = 0.009x - 0.0136$    | 0.9997         | 23.6 (18.9–28.4)  |
| テマゼパム                  | $Y = 0.0063x - 0.0041$   | 0.9999         | 30.6 (24.5–36.7)  |
| トリアゾラム                 | $Y = 0.0032x + 0.00091$  | 0.9966         | 92.7 (74.2–111.3) |

**表 3a. 尿中のベンゾジアゼピンの日間精度と真度 (25 ng/mL 比較参照試料、n = 5)**

| 薬物             | 平均回収率<br>(ng/mL) | SD   | 繰り返し<br>精度 (%) | 真度<br>(%) |
|----------------|------------------|------|----------------|-----------|
| 7-アミノクロナゼパム    | 25.18            | 3.15 | 12.5           | 99.29     |
| 7-アミノフルニトラゼパム  | 23.92            | 1.55 | 6.47           | 104.52    |
| 7-アミノニトラゼパム    | 23.52            | 2.14 | 9.09           | 106.29    |
| α-ヒドロキシアルプラゾラム | 24.8             | 1.74 | 7.02           | 100.81    |
| α-ヒドロキシトリアゾラム  | 24.94            | 2.21 | 8.85           | 100.24    |
| アルプラゾラム        | 25.5             | 0.81 | 3.16           | 98.04     |
| ブロマゼパム         | 27.1             | 1.63 | 6.02           | 92.25     |
| クロルジアゼポキシド     | 25.3             | 1.35 | 5.32           | 98.81     |
| クロナゼパム         | 24.86            | 0.84 | 3.37           | 100.56    |
| デスアルキルフルラゼパム   | 26.16            | 0.3  | 1.13           | 95.57     |
| ジアゼパム          | 25.02            | 1.01 | 4.04           | 99.92     |
| フルニトラゼパム       | 25.2             | 0.31 | 1.22           | 99.21     |
| フルラゼパム         | 25.64            | 1.4  | 5.46           | 97.5      |
| ロラゼパム          | 23.8             | 1.85 | 7.76           | 105.04    |
| ミダゾラム          | 25.58            | 0.98 | 3.83           | 97.73     |
| ニトラゼパム         | 26.84            | 1.11 | 4.15           | 93.14     |
| ノルジアゼパム        | 26.26            | 0.65 | 2.46           | 95.2      |
| オキサゼパム         | 24.94            | 0.55 | 2.19           | 100.24    |
| テマゼパム          | 25.4             | 0.34 | 1.34           | 98.43     |
| トリアゾラム         | 27.16            | 1.96 | 7.23           | 92.05     |

**表 3b. 血中のベンゾジアゼピンの日間精度と真度 (25 ng/mL 比較参照試料、n = 5)**

| 薬物             | 平均回収率<br>(ng/mL) | SD   | 繰り返し<br>精度 (%) | 真度<br>(%) |
|----------------|------------------|------|----------------|-----------|
| 7-アミノクロナゼパム    | 26.3             | 1.46 | 5.54           | 105.2     |
| 7-アミノフルニトラゼパム  | 24.84            | 1.05 | 4.24           | 99.36     |
| 7-アミノニトラゼパム    | 25.1             | 1.57 | 6.27           | 100.4     |
| α-ヒドロキシアルプラゾラム | 24.62            | 0.88 | 3.56           | 98.48     |
| α-ヒドロキシトリアゾラム  | 25.7             | 1.39 | 5.41           | 102.8     |
| アルプラゾラム        | 24.56            | 0.42 | 1.72           | 98.24     |
| ブロマゼパム         | 26.14            | 2.9  | 11.1           | 104.56    |
| クロルジアゼポキシド     | 25.26            | 4.03 | 15.94          | 101.04    |
| クロナゼパム         | 24.32            | 0.85 | 3.51           | 97.28     |
| デスアルキルフルラゼパム   | 25.54            | 0.53 | 2.06           | 102.16    |
| ジアゼパム          | 24.84            | 0.59 | 2.39           | 99.36     |
| フルニトラゼパム       | 24.82            | 1.49 | 5.99           | 99.28     |
| フルラゼパム         | 26               | 1.05 | 4.04           | 104       |
| ロラゼパム          | 24.82            | 0.53 | 2.12           | 99.28     |
| ミダゾラム          | 24.72            | 1.41 | 5.7            | 98.88     |
| ニトラゼパム         | 28.32            | 2.73 | 9.65           | 113.28    |
| ノルジアゼパム        | 25.86            | 0.62 | 2.41           | 103.44    |
| オキサゼパム         | 24.32            | 0.89 | 3.67           | 97.28     |
| テマゼパム          | 24.72            | 0.41 | 1.65           | 98.88     |
| トリアゾラム         | 25.8             | 3.41 | 13.22          | 103.2     |



表 4a. 尿中のベンゾジアゼピンの日間精度 (n = 5)

| 薬物             | 平均<br>回収率<br>(ng/mL) | SD   | 繰り返し<br>精度<br>(%) |
|----------------|----------------------|------|-------------------|
| 7-アミノクロナゼパム    | 27.36                | 2.84 | 10.4              |
| 7-アミノフルニトラゼパム  | 24.74                | 0.57 | 2.31              |
| 7-アミノニトラゼパム    | 28.26                | 6.9  | 24.4              |
| α-ヒドロキシアルプラゾラム | 23.9                 | 2.74 | 11.47             |
| α-ヒドロキシトリアゾラム  | 23.6                 | 3.16 | 13.4              |
| アルプラゾラム        | 26.26                | 0.74 | 2.83              |
| ブロマゼパム         | 23.5                 | 3.93 | 16.7              |
| クロルジアゼボキシド     | 23.2                 | 1.49 | 6.42              |
| クロナゼパム         | 25.9                 | 0.29 | 1.13              |
| デスアルキルフルラゼパム   | 26.2                 | 1.06 | 4.03              |
| ジアゼパム          | 25.78                | 0.82 | 3.18              |
| フルニトラゼパム       | 25.42                | 0.79 | 3.13              |
| フルラゼパム         | 26.88                | 1.09 | 4.05              |
| ロラゼパム          | 24.78                | 0.47 | 1.9               |
| ミダゾラム          | 25.8                 | 0.74 | 2.86              |
| ニトラゼパム         | 27.62                | 1.76 | 6.37              |
| ノルジアゼパム        | 25.28                | 0.47 | 1.77              |
| オキサゼパム         | 25.28                | 0.92 | 3.64              |
| テマゼパム          | 25.42                | 0.36 | 1.43              |
| トリアゾラム         | 27.24                | 2.2  | 8.09              |

表 4b. 血中のベンゾジアゼピンの日間精度 (n = 5)

| 薬物             | 平均<br>回収率<br>(ng/mL) | SD   | 繰り返し<br>精度<br>(%) |
|----------------|----------------------|------|-------------------|
| 7-アミノクロナゼパム    | 24.02                | 1.57 | 6.52              |
| 7-アミノフルニトラゼパム  | 23.82                | 1.35 | 5.67              |
| 7-アミノニトラゼパム    | 28.64                | 1.04 | 3.86              |
| α-ヒドロキシアルプラゾラム | 24.36                | 1.77 | 7.28              |
| α-ヒドロキシトリアゾラム  | 24.66                | 3.35 | 13.57             |
| アルプラゾラム        | 24.6                 | 0.33 | 1.35              |
| ブロマゼパム         | 27.38                | 4.24 | 15.5              |
| クロルジアゼボキシド     | 25.52                | 2.69 | 10.54             |
| クロナゼパム         | 23.84                | 0.34 | 1.41              |
| デスアルキルフルラゼパム   | 26.96                | 2.32 | 8.61              |
| ジアゼパム          | 24.96                | 1.82 | 7.29              |
| フルニトラゼパム       | 24.54                | 4.37 | 17.8              |
| フルラゼパム         | 25.74                | 0.55 | 2.12              |
| ロラゼパム          | 17.66                | 2.38 | 13.48             |
| ミダゾラム          | 23.74                | 1.53 | 6.43              |
| ニトラゼパム         | 30.52                | 2.88 | 9.45              |
| ノルジアゼパム        | 27.28                | 2.76 | 10.1              |
| オキサゼパム         | 23.84                | 0.6  | 2.51              |
| テマゼパム          | 25.04                | 0.53 | 2.12              |
| トリアゾラム         | 26.02                | 4.17 | 16.02             |

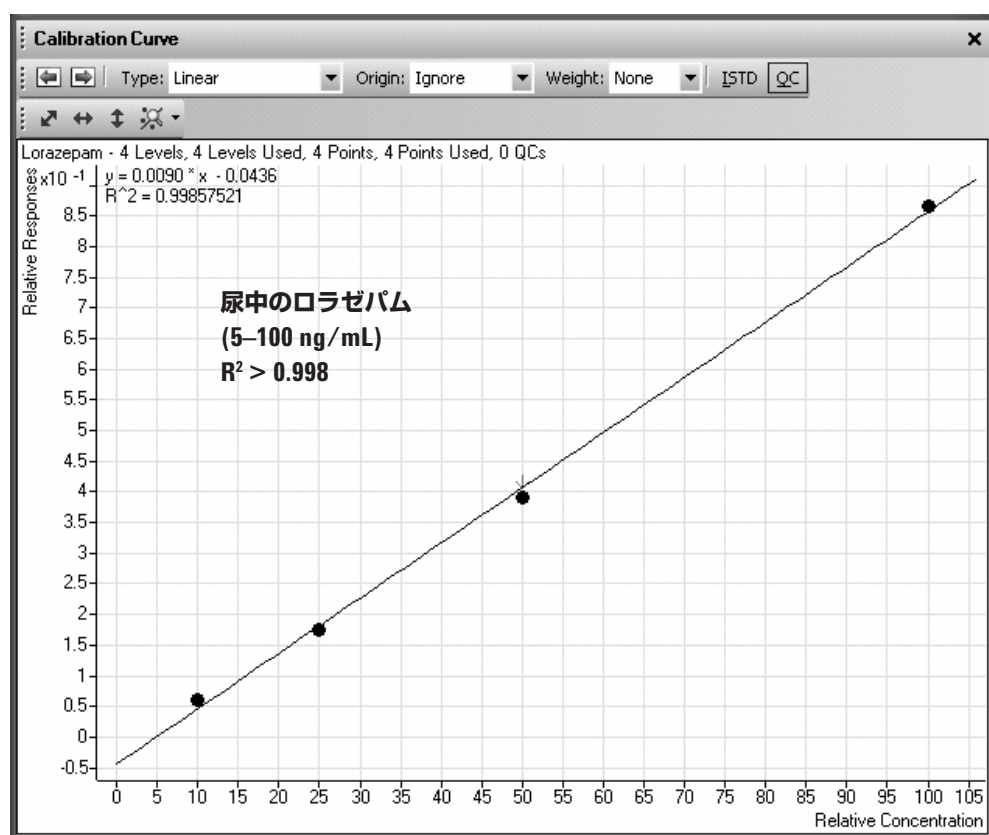


図 1a. 尿中のロラゼパムの検量線 (5、10、25、50、100 ng/mL)

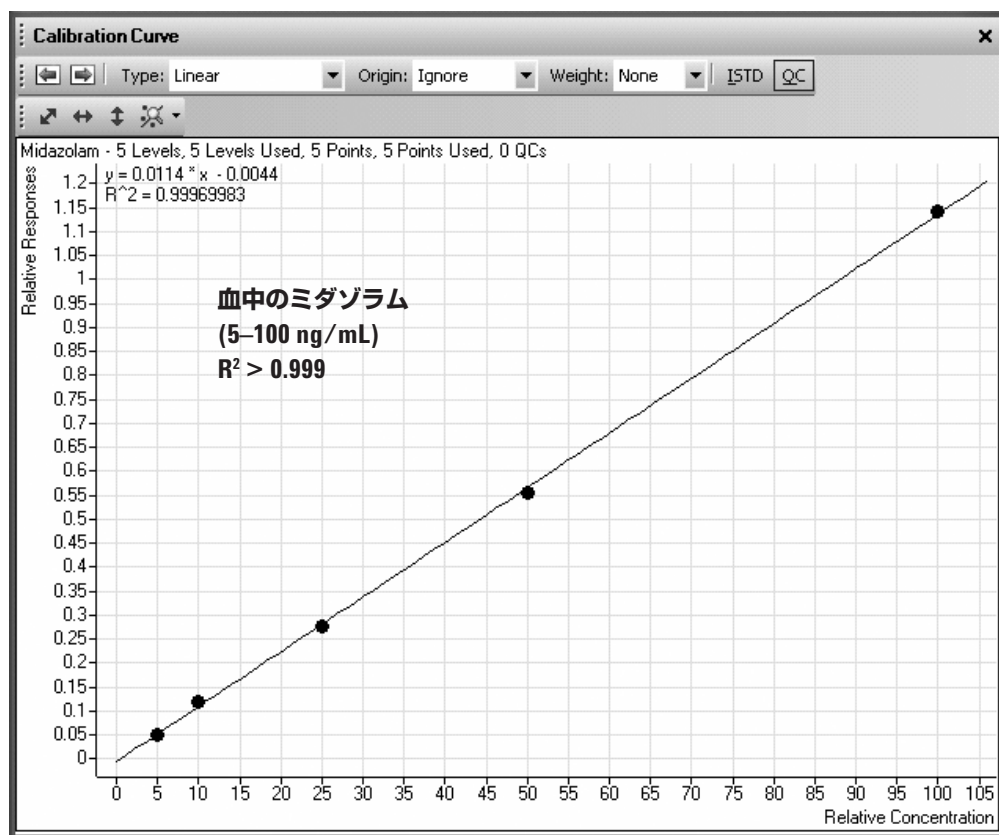


図 1b. 血中のミダゾラムの検量線 (5、10、25、50、100 ng/mL)

## 考察

アジレントの LC/MS により、尿と血液中の 14 種類のベンゾジアゼピンと 6 種類の代謝物の迅速な測定が可能です。微小粒子カラムにより、各グループセグメントのピークの分離が可能になりました (図 2a と 2b)。この LC 条件では、7-アミノニトラゼパム、7-フルニトラゼパム、7-クロナゼパムはうまく分析できなかったため、この分析とは別に高速分析 (3.5 分) を行いました。



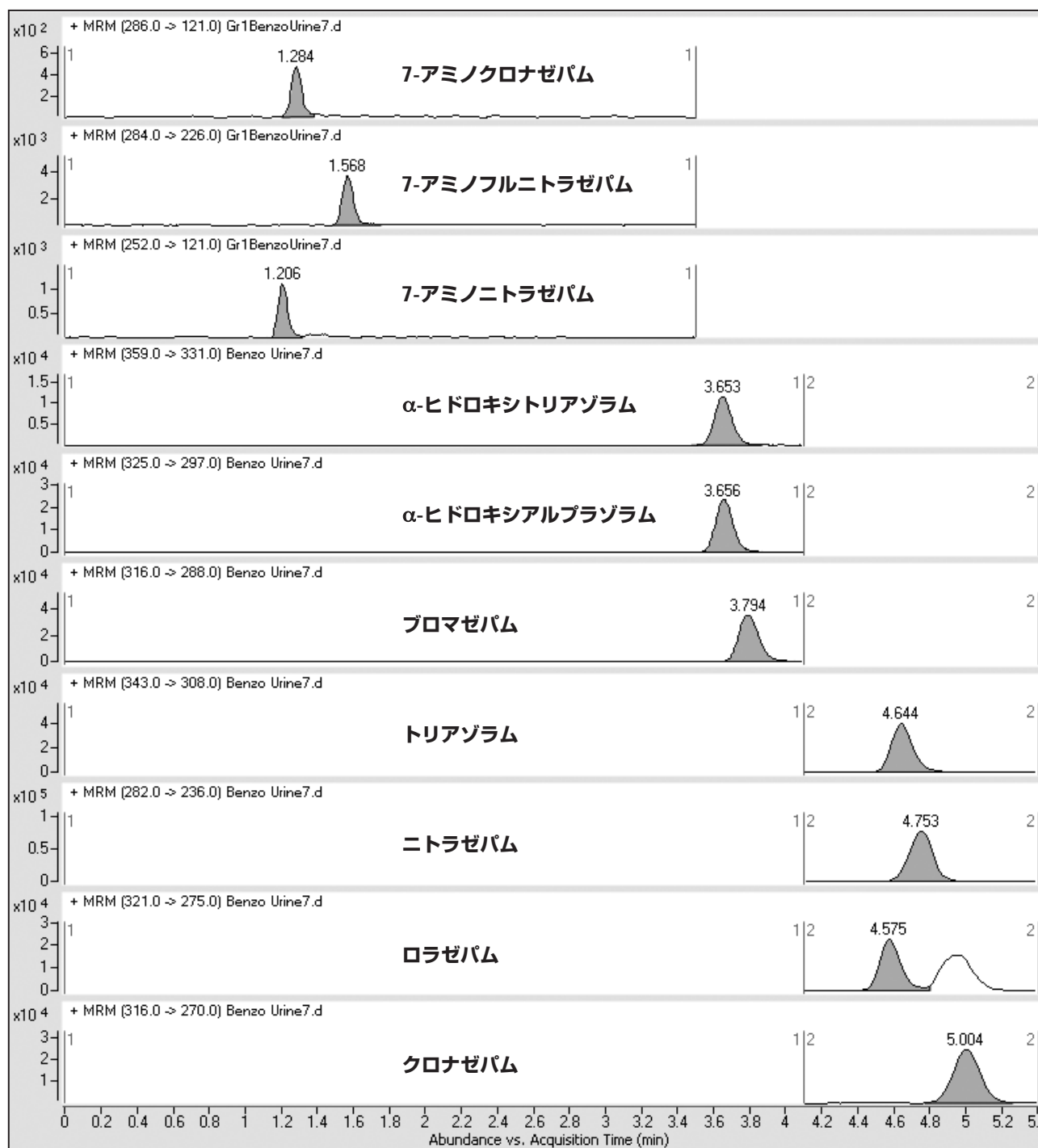


図 2a. 尿から抽出されたベンゾジアゼピン (25 ng/mL): 定量イオン、内部標準は非表示

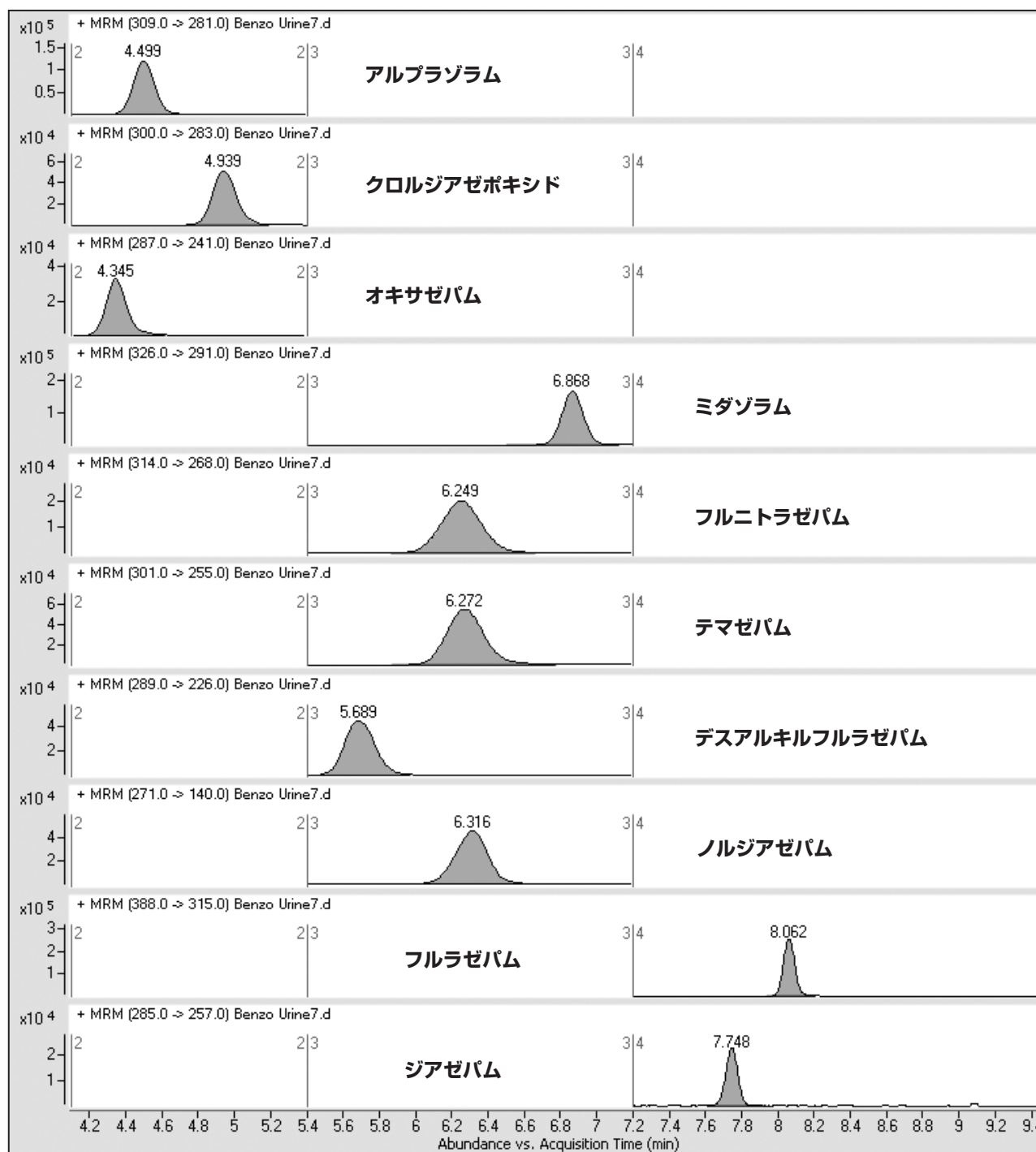


図 2a. 尿から抽出されたベンゾジアゼピン (25 ng/mL): 定量イオン、内部標準は非表示 (続き)

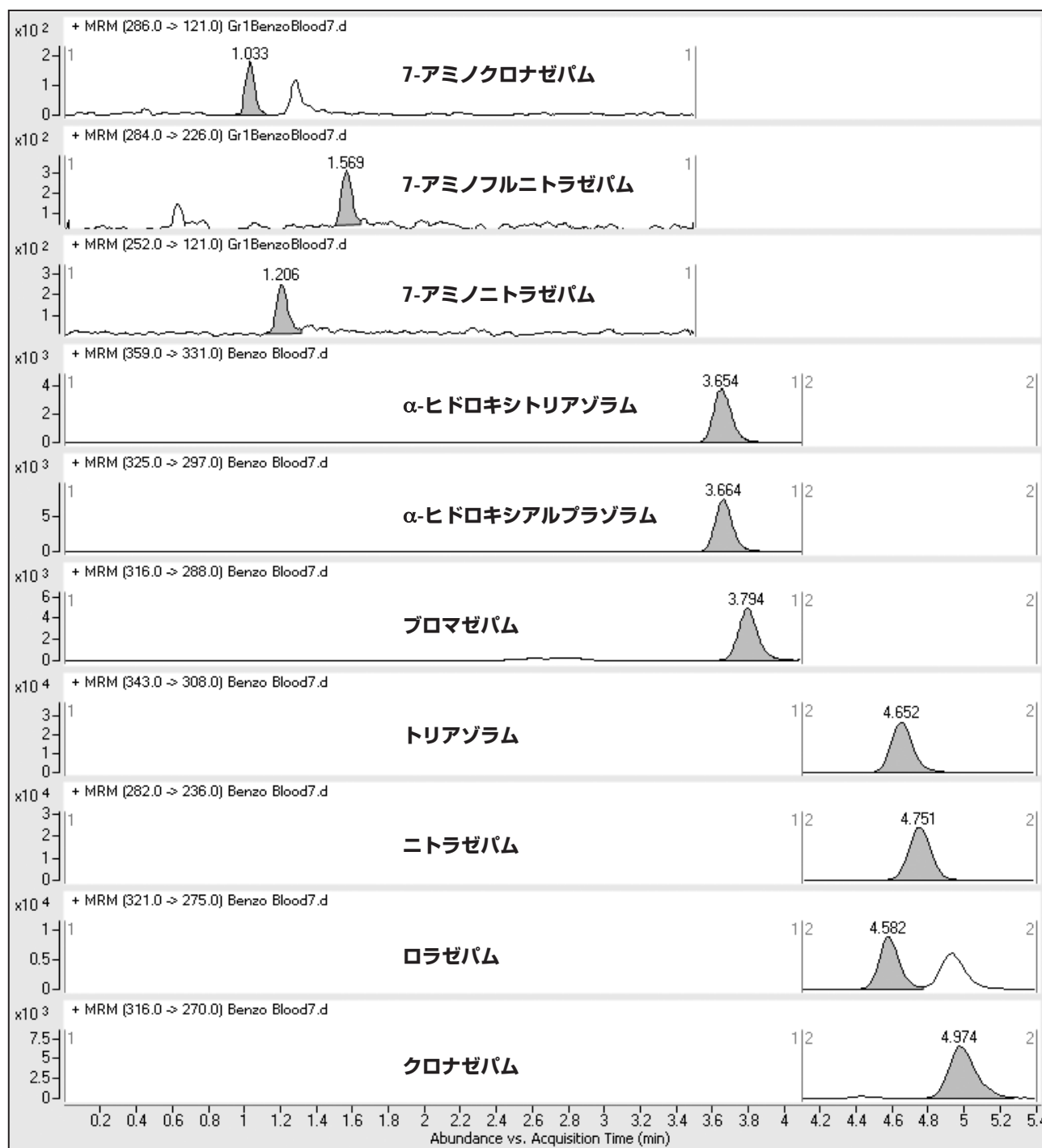


図 2b. 血液から抽出されたベンゾジアゼピン (25 ng/mL): 定量イオン、内部標準は非表示

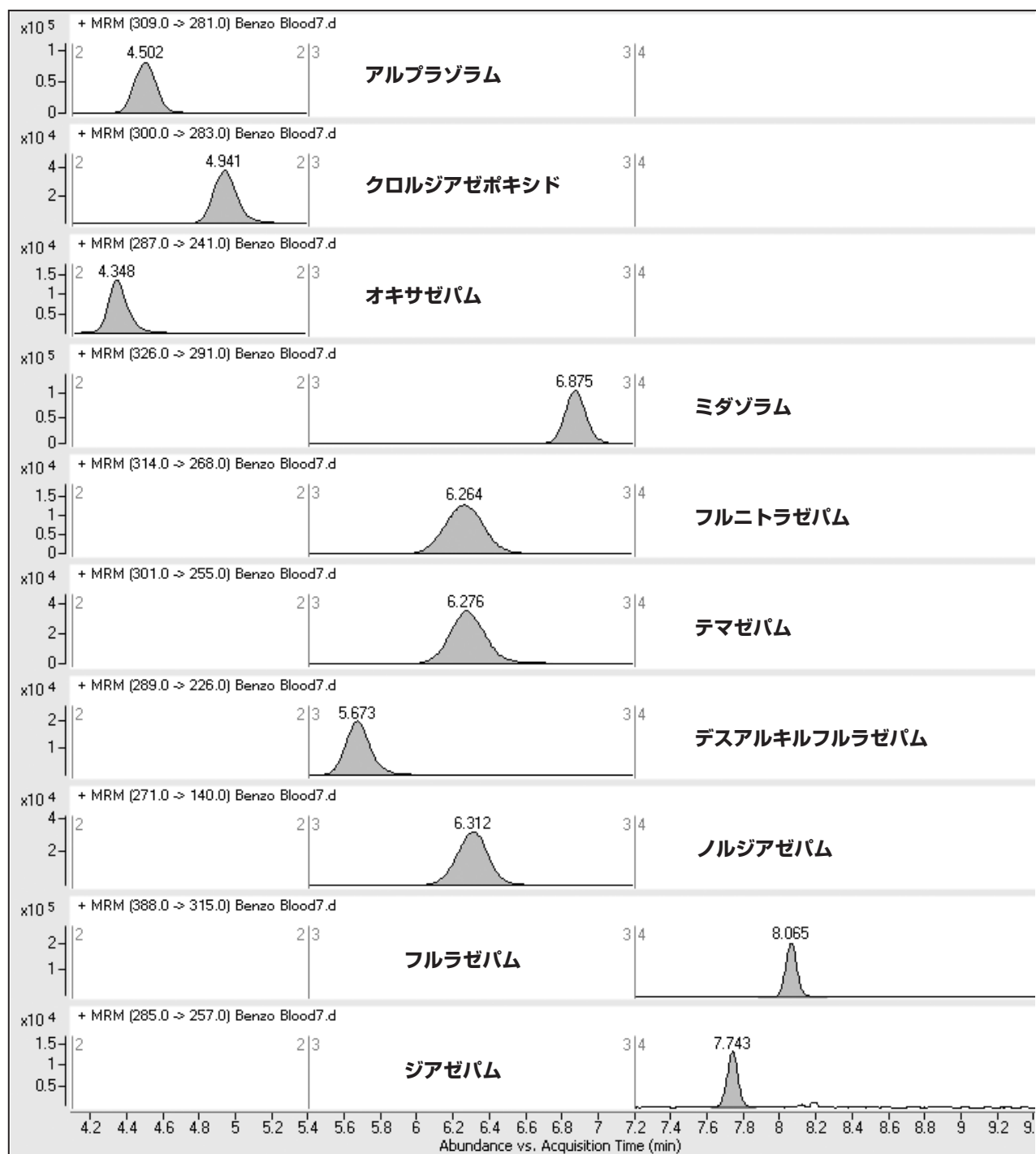


図 2b. 血液から抽出されたベンゾジアゼピン (25 ng/mL): 定量イオン、内部標準は非表示 (続き)

アジレント独自のソフトウェアは、確認イオンを測定し、定量イオンに対する比率を自動的に計算します。この比率が検量線用標準液の 20% 以内から外れた場合、同定は不合格になります。これはトリプル四重極質量分析計に追加された機能で、ラボデータに対する法的な異議申し立てが頻繁に起こる法医学分析では極めて重要です。確

認イオンを測定することで、結果の信頼性が高まります。つまり、確認イオンに定量イオンと比較した比率を適用することで、尿中の薬物の同定がさらに確かなものになります。ソフトウェアはクロマトグラフ画面に比率を表示し、分析者は確認イオンの許容範囲の破線により、陽性を視覚的に評価できます (図 3a: 尿、図 3b: 血液)。

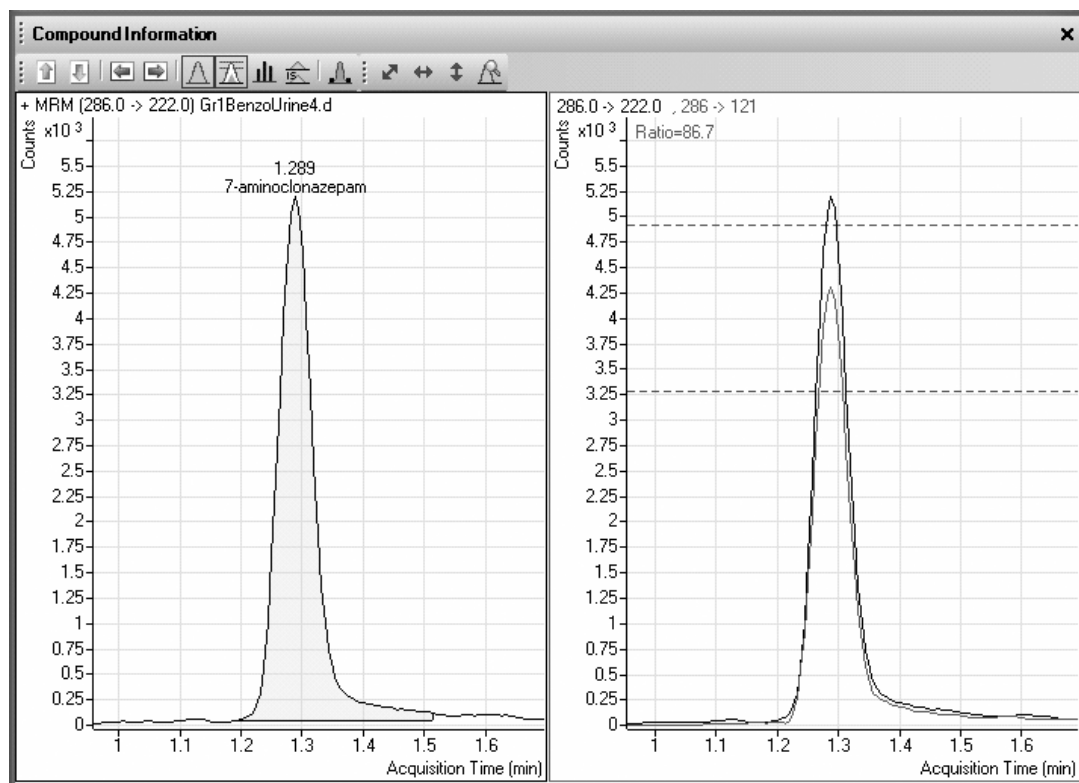


図 3a. 尿から抽出された 7-アミノクロナゼパム (50 ng/mL)、確認イオン (面積で標準化) と許容比率  $86.7 \pm 20\%$  誤差 (範囲: 69.4 ~ 104.0) を示す。

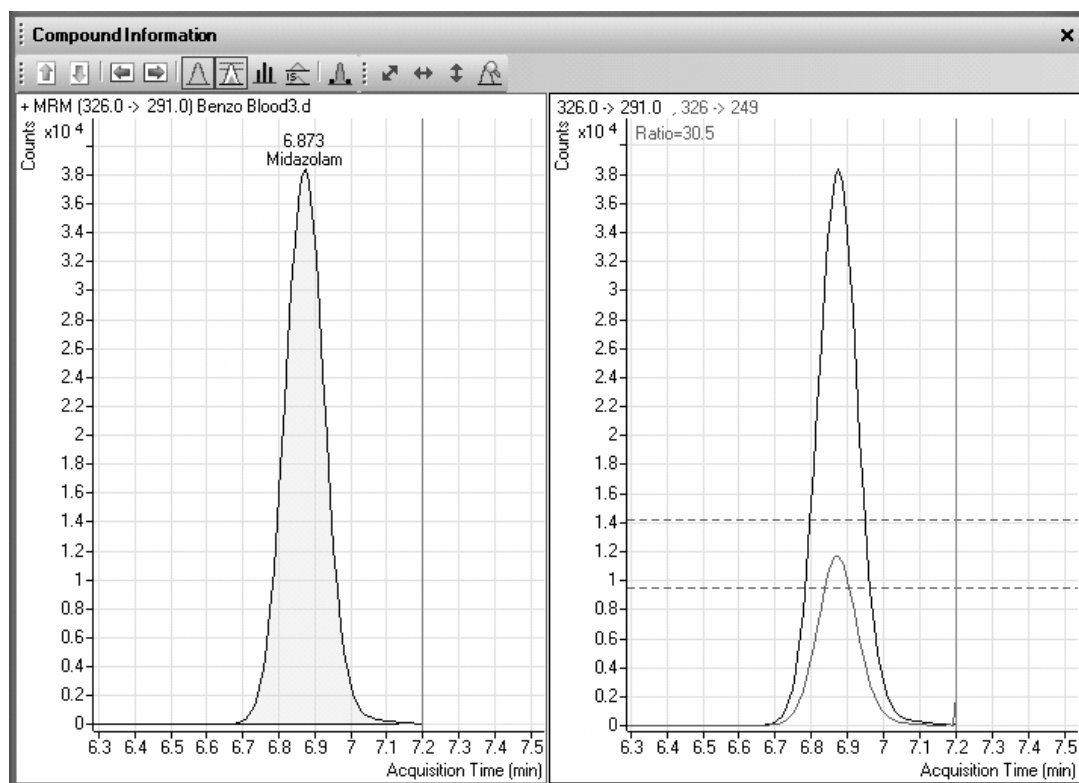


図 3b. 血液から抽出されたミダゾラム (10 ng/mL)、確認イオンと許容比率  $30.5 \pm 20\%$  誤差 (範囲: 24.4 ~ 36.6) を示す。

## 結論

Agilent 6410 Triple Quadrupole LC/MS システムを用いて、尿中のベンゾジアゼピンを検出しました。我々の知る限りでは、この手法は、確認イオンの強度が、定量イオンの強度と比較して特定の比率内でなければならないとした最初の方法です。

## 参考文献

1. J. M. Cook, R. Marshall, C. Masci, J. C. Coyne, "Physicians' Perspectives on Prescribing Benzodiazepines for Older Adults: A Qualitative Study," *J Gen Intern Med* 22(3): 303–307 (2007)
2. A. W. Jones, A. Holmgren, F. C. Kugelberg, "Concentrations of Scheduled Prescription Drugs in Blood of Impaired Drivers: Considerations for Interpreting the Results," *Ther Drug Monit* 29(2): 248–260 (2007)
3. E. W. Schwilke, M. I. Sampaio dos Santos, B. K. Logan, "Changing Patterns of Drug and Alcohol Use in Fatally Injured Drivers in Washington State," *J Forens Sci* 51(5): 1191–1198 (2006)
4. S. Hegstad, F. L. Oiestad, U. Johnsen, A. S. Christophersen, "Determination of Benzodiazepines in Human Urine Using Solid-Phase Extraction and High-Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry," *J Anal Toxicol* 30(1) 31–37 (2006)
5. P. Kintz, M. Villain, V. Cirimele, G. Pepin, B. Ludes, "Windows of Detection of Lorazepam in Urine, Oral Fluid and Hair With a Special Focus on Drug Facilitated Crimes," *Forens Sci Int* 145:131–135 (2004)
6. M. Cheze, M. Villain, G. Pepin, "Determination of Bromazepam, Clonazepam and Metabolites After a Single Intake in Urine and Hair by LC-MS/MS: Application to Forensic Cases of Drug Facilitated Crimes," *Forens Sci Int* 145: 123–130 (2004)
7. T. Gunnar, K. Ariniemi, P. Lillsunde, "Fast Gas Chromatography-Negative-Ion Chemical Ionization Mass Spectrometry With Microscale Volume Sample Preparation for the Determination of Benzodiazepines and Alpha-Hydroxy Metabolites, Zaleplon and Zopiclone in Whole Blood," *J Mass Spectrom* 41(6): 741–754 (2006)
8. M. Laloup, M. del Mar Ramirez Fernandez, G. De Boeck, M. Wood, V. Maes, N. Samyn, "Validation of a Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method for the Simultaneous Determination of 26 Benzodiazepines and Metabolites, Zolpidem and Zopiclone in Blood, Urine and Hair," *J Anal Toxicol* 29:616–626 (2005)

## 謝辞

John Hughes 氏 (Agilent Technologies) の精査とコメントに謝意を表します。

## 詳細情報

アジレント製品とサービスの詳細については、アジレントのウェブサイト [www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp) をご覧ください。

アジレントは、本資料に誤りが発見された場合、また、本資料の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。また、本資料掲載の機器類は薬事法に基づく登録を行っておりません。

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。著作権法で許されている場合を除き、書面による事前の許可なく、本資料を複製、翻案、翻訳することは禁じられています。

© Agilent Technologies, Inc. 2007

Printed in Japan  
July 25, 2007  
5989-7074JAJP



Agilent Technologies