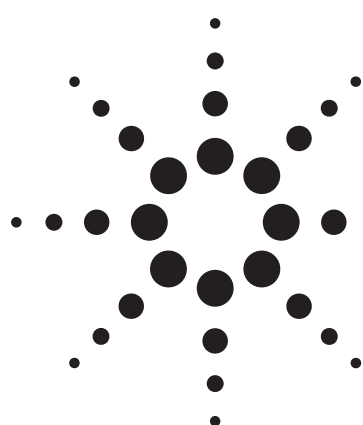


LC/MS/MS を用いた口腔液中の ベンゾジアゼピン類の測定



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 Drive
Pomona, CA 91767
USA

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

概要

Agilent 6410 トリプル四重極質量分析計を用いて、口腔液中のベンゾジアゼピン類 14 種をエレクトロスプレーイオンモードで、迅速、シンプルかつ高感度に同時分析を行いました。サンプルは固相抽出後、抽出液を蒸発乾固し、LC/MS/MS システムに注入するための移動相で再溶解しました。この手順は、信頼できる同定を行うために、クオリファイアがプライマリイオンに対して特定の比率内に存在することを必須とする、イオンの同時モニタリングのファーストステップです。アジレントのソフトウェアには、イオンのトランジションをモニタリングして、その比率を自動的に計算する独自の機能があります。陽性と判断するにはその値がキャリブレーション標準の範囲内に入る必要があります。クオリファイアイオンをモニタリングすると感度低下の原因になりますが、信頼性の高い結果は法医学分析において非常に重要です。

緒言

ベンゾジアゼピン類は、不安神経症や不眠症の治療薬として、米国で最も一般的に処方されている薬物です [1]。筋弛緩剤や抗痙攣薬としても使用されており、薬物服用時の運転 (DUID)、その他の薬物と併用したときによく検出されます [2,3]。口腔液は、法医学や臨床関連の多くの分野で試料として使用されることが多く、交通違反の取り締りの際にも採取されます。収集がしやすいのに加え、不純物が混和しにくく日常的なテストに適用しやすいからです。しかし、大部分の薬物は唾液:血漿の比率が低いため、特に口腔液中のベンゾジアゼピンの検出は困難です。

口腔液中の薬物同定での主な問題の 1 つは、収集できる試料容量についてです。現在の測定法では口腔液の量が決まっておらず、ラボで調整を行わないと正しい定量結果が得られません [4、5]。さらに、パッドで収集した唾液中の薬物の量は、装置に組み込む前と後で変わっている可能性があり、定量結果はさらに不確かなものになってしまいます。したがって、報告される薬物濃度は、使用される収集手順により異なります [6]。

この研究では、既知量の口腔液原液が収集できる Quantisal 口腔液収集装置を使用しました。定量値の信頼性を高めるために、収集パッドから緩衝液へ移動したベンゾジアゼピン類の回収効率を測定します。



Agilent Technologies

口腔液中のベンゾジアゼピン類分析の問題を取り扱った出版物もいくつかあります。Quintela らは、LC/MS で口腔原液中のベンゾジアゼピン類 9 種類を測定しました [7]。彼等は、我々の研究に含まれなかったロルメタゼパムとテトラゼパムも分析しましたが、クロナゼパム、クロルジアゼポキシド、ノルジアゼパム、テマゼパム、オキサゼパム、フルラゼパム、ニトラゼパムは除外しました。

Oiestad らはタンデム LC 質量分析を用い、口腔液からベンゾジアゼピン類を含む数種類の薬物スクリーニングについて報告しました [8]。彼等は、フェナゼパムと一部のベンゾジアゼピン代謝物は分析しましたが (下記参照)、一般に処方される薬物であるトリアゾラム、テマゼパム、ミダゾラム、フルラゼパム、クロルジアゼポキシドは除外しました。Smink らは、LC/MS/MS を用いて 33 種類のベンゾジアゼピンを尿と口腔液から分析しました [9]。定量下限が 0 ng/mL であったジアゼパムを除いてその他の化合物の定量下限はこのアプリケーションノートよりも大幅に低くなりました。さらにオキサゼパムでは 2 つ (濃度 18 ng/mL と 1659 ng/mL)、アルプラゾラムでは 3 つ (濃度 5 ng/mL、6 ng/mL、9 ng/mL) の合計 5 つの口腔液が陽性であることが分かりました。

我々の研究では、親薬物が口腔液中の代謝物よりも高濃度な場合が多いので、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、 α -ヒドロキシアルプラゾラム、 α -ヒドロキシトリアゾラム、デスアルキルフルラゼパムなどの代謝物は分析の対象にはしませんでした。一方、ノルジアゼパム、テマゼパム、ロラゼパム、オキサゼパムなどの代謝物は個々の薬物として処方される可能性があるため、これらは分析の対象にしました。

実験

資材とメソッド

口腔液収集装置

口腔液は Immunalysis Corporation 社 (カリフォルニア州、Pomona) 製の定量装置で収集しました。装置には、口腔液 1 mL ($\pm$ 10%) が収集されると青色に変わるインジケータの付いた収集パッドがあります。そのパッドを輸送緩衝液 3 mL に浸し、分析にかけられる試料容量を 4 mL にしました (3 mL 緩衝液 + 1 mL 口腔液)。こうすると試料が複数の薬物に対して陽性の時や、試料の量が少ない時も分析できます。定量装置用に口腔液を 1:3 で希釈し、検出された薬物濃度を適宜調整しました。

標準物質と試薬

重水素化内部標準: D5-ジアゼパム; D5-テマゼパム; D5-アルプラゾラムと D4-クロナゼパム、同様に非ラベル薬物標準: ブロマゼパム; 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) 社から購入しました。混合モード固相抽出カラム (CSDAU020) は、United Chemical Technologies (ペンシルベニア州、Bristol) 社製のものを使用しました。

すべての溶媒は HPLC グレード以上で、試薬はすべて ACS グレードで、Spectrum Chemical (カリフォルニア州、Gardena) 社から購入しました。

キャリブレーションとコントロール

キャリブレーション標準とコントロールは、合成口腔液から調製し、Quantisal 輸送緩衝液で希釈しました。分析を通じて、複数の Quantisal 収集装置はさまざまなロットから選択しました。この実験で、合成口腔液を強化するために使用した薬物の濃度は、すべてのキャリブレーション標準とコントロールに対する希釈係数に従って調整しました。したがって最終的に得られた結果を希釈係数に応じて再計算する必要はありませんでした。各バッチで 4 点の検量線 (1、10、20、40 ng/mL) を作成しました。内部標準濃度は 100 ng/mL です。

抽出手順

以下の濃度で、定量用緩衝液 (1 mL) を測定し、検量線を作成しました。

陰性:	重水素化原液 (100 ng/mL) 100 µL
0.5 ng/mL:	重水素化原液 (100 ng/mL) 100 µL 原液 (10 ng/mL) 12.5 µL
1 ng/mL:	重水素化原液 (100 ng/mL) 100 µL 原液 (10 ng/mL) 5 µL
10 ng/mL:	重水素化原液 (100 ng/mL) 100 µL 原液 (100 ng/mL) 25 µL
20 ng/mL:	重水素化原液 (100 ng/mL) 100 µL 原液 (100 ng/mL) 50 µL
40 ng/mL:	重水素化原液 (100 ng/mL) 100 µL 原液 (100 ng/mL) 100 µL

緩衝液にリン酸ナトリウム緩衝液 (0.1 M, pH 6.0, 1 mL) を加えて、試料を混合しました。真空マニホールドに抽出チューブをつなげ、メタノール 3 mL、脱イオン水 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。カラムの吸着床が乾固しないように気をつけながら、各サンプルをカラムに通し、脱イオン水 3 mL と 0.1 M (pH 6) リン酸緩衝液:アセトニトリルの 80:20 混合液 2 mL で洗浄してから乾燥させました。次にヘキサン 1 mL を流し、最後に酢酸エチル + 2% 水酸化アンモニウム 2 mL で薬物を溶出させました。溶出液を窒素ガス (20 psi/37 °C) で蒸発乾固し、水 50 mL を加えて分析試料としました。

収集パッドからの薬物再抽出

ベンゾジアゼピン類の収集システムでの抽出効率を求めました。口腔液は各々の薬物 10 ng/mL (n = 6) で強化しました。収集パッドに口腔液 1 mL (± 10%) が吸着されたことを示すインジケータが青色に変わるまで口腔液に浸しました。パッドは定量用緩衝液 (3 mL) の中でキャップし、室温で一晩放置しました。翌日パッドを取り出し、前述の手順に従って試料 1 mL を分析しました。

分析手順

機器: Agilent 1200 シリーズ RRLC、
6410 トリプル四重極質量分析計

LC 条件

カラム: ZORBAX Eclipse XDB C18 4.6 x 50 mm x 1.8 µm (PN: 922795-902)
流量 0.2 mL/min には内径 2.1 mm のカラムが最適ですが、分析終了時に流量 1 mL/min でカラムを洗浄します。

カラム温度: 35 °C

注入量: 5 µL

溶媒流量: 0.2 mL/min

アイソクラティックポンプ

プログラム: A = 20 mM ギ酸アンモニウム (pH = 8.6)

B = アセトニトリル

50:50 v/v

時間 (分) 流量 (mL/min)

0 0.2

6.5 0.2

8 1

10 0.2

ポストタイム: 4.5 分

質量分析計条件

オペレーション: Agilent G1948B ESI イオン源を用いた
エレクトロスプレー ESI ポジティブモード

ガス温度: 300 °C

ガス流量 (N₂): 6 L/min

ネブライザ圧力: 15 psi (30 ~ 40 psi の圧力推奨)

キャピラリ電圧: 4,500 V

表 1 にプリカーサイオンと生成物イオン、最適化したフラグメンターとコリジョンエネルギー (CE) 電圧を示します。クオリファイアイオンに関連する値はカッコ内に示しました。

表 1. ベンゾジアゼピン取り込みパラメータ

化合物	プリカーサ イオン	生成物 イオン	フラグ メンタ(V)	CE (V)
セグメント 1 (時間 = 0 分)				
プロマゼパム	316	288 (209)	160	20 (30)
セグメント 2 (時間 = 4.1 分)				
D4-クロナゼパム	320	274	120	25
クロナゼパム	316	270 (214)	120	25 (35)
ロラゼパム	321	275 (229)	140	25 (35)
ニトラゼパム	282	236 (180)	160	25 (35)
D5-アルプラゾラム	314	286	160	25
アルプラゾラム	309	281 (274)	160	25 (30)
クロルジアゼボキシド	300	283 (227)	120	15 (30)
D5-オキサゼパム	292	246	120	20
オキサゼパム	287	241 (269)	120	20 (20)
トリアゾラム	343	308 (239)	120	35 (35)

表 1. ベンゾジアゼピン取り込みパラメータ
(衝突エネルギー; CE) (続き)

化合物	プリカーサ イオン	生成物 イオン	フラグ メンタ(V)	CE (V)
セグメント 3 (時間 = 5.4 分)				
フルニトラゼパム	314	268 (239)	160	30 (35)
ミダゾラム	326	291 (249)	200	30 (40)
D5-テマゼパム	306	260	120	25
テマゼパム	301	255 (177)	120	35 (40)
D5-ノルジアゼパム	276	140	120	30
ノルジアゼパム	271	140 (165)	160	30 (30)
セグメント 4 (時間 = 7.2 分)				
D5-ジアゼパム	290	262	160	25
ジアゼパム	285	257 (222)	160	25 (25)
フルラゼパム	388	315 (288)	160	25 (25)

LC/MS/MS メソッドバリデーション

標準プロトコールに従って分析メソッドをバリデーションしました。定量下限、線形範囲、相関関係、日中、日間の精度は、5 日間複数回測定して決定しました。バリデーションの結果を表 2 に示します。検量線は原点を含みません。日中と日間の変動(CV)はすべての薬物に対して 7% 未満で、良好な精度が確認できました。すべての薬物の定量下限は、口腔原液で 0.5 ng/mL、緩衝液 1 mL あたりでは 0.125 ng でした。

表 2A. 検量線の勾配と相関係数

分析対象化合物	方程式	相関係数 (R ²)
アルブラゾラム	$Y = 0.0298x + 0.0114$	0.9995
プロマゼパム	$Y = 0.0096x - 0.0129$	0.9909
クロルジアゼポキシド	$Y = 0.0146x - 0.0032$	0.9998
クロナゼパム	$Y = 0.0278x - 0.0108$	0.9991
ジアゼパム	$Y = 0.0305x - 0.0004$	0.9996
フルニトラゼパム	$Y = 0.007x - 0.0002$	0.9999
フルラゼパム	$Y = 0.2984x - 0.0024$	0.9993
ロラゼパム	$Y = 0.0189x - 0.008$	0.9986
ミダゾラム	$Y = 0.0156x - 0.0143$	0.9960
ニトラゼパム	$Y = 0.0551x + 0.018$	0.9987
ノルジアゼパム	$Y = 0.011x - 0.0013$	0.9999
オキサゼパム	$Y = 0.0228x - 0.0065$	0.9996
テマゼパム	$Y = 0.0149x - 0.0034$	0.9998
トリアゾラム	$Y = 0.0225x + 0.0073$	0.9995

表 2B. 日間精度 (10 ng/mL の比較参照試料、n = 5)

薬物	平均回収率 (ng/mL)	SD	真度 (%)	精度 (%)
アルブラゾラム	9.48	0.19	2.03	105.49
プロマゼパム	9.72	0.66	6.8	102.88
クロルジアゼポキシド	10.08	0.23	2.26	99.21
クロナゼパム	9.44	0.3	3.14	105.93
ジアゼパム	9.84	0.59	6.04	101.63
フルニトラゼパム	9.84	0.5	5.11	101.63
フルラゼパム	9.84	0.49	5.01	101.63
ロラゼパム	8.88	0.33	3.68	112.61
ミダゾラム	9.18	0.54	5.94	108.93
ニトラゼパム	10.48	0.115	1.42	95.42
ノルジアゼパム	9.9	0.32	3.27	101.01
オキサゼパム	9.94	0.3	3.07	100.6
テマゼパム	10	0.3	3	100
トリアゾラム	9.86	0.25	2.55	101.42

表 2C. 日間精度 (n = 5)

薬物	平均回収率 (ng/mL)	SD	精度 (%)
アルブラゾラム	9.64	0.27	2.80
プロマゼパム	10.08	0.62	6.13
クロルジアゼポキシド	10.14	0.68	6.71
クロナゼパム	9.18	0.39	4.25
ジアゼパム	9.48	0.69	7.29
フルニトラゼパム	9.94	0.46	4.64
フルラゼパム	9.74	0.68	6.95
ロラゼパム	9.24	0.34	3.64
ミダゾラム	9.26	0.30	3.29
ニトラゼパム	10.40	0.46	4.41
ノルジアゼパム	9.84	0.36	3.71
オキサゼパム	9.58	0.40	4.20
テマゼパム	10.12	0.39	3.85

一般的な薬物は高濃度で抽出、分析でき、干渉はないことがわかりました。図 1 にアルブラゾラムの標準的な検量線を示します。相関係数は 0.9995 以上です。収集システムから回収されたベンゾジアゼピンの収率を表 3 に示します。

表 3. 室温で一晩の培養の後に口腔液収集システムからのベンゾジアゼピンの回収率 (10 ng/mL に強化、n = 6)

薬物	平均回収率 (%)	CV (%)
アルブラゾラム	86.76	8.85
プロマゼパム	88.42	14.01
クロルジアゼポキシド	89.41	6.33
クロナゼパム	88.10	2.97
ジアゼパム	82.82	4.42
フルニトラゼパム	85.10	4.46
フルラゼパム	81.57	2.85
ロラゼパム	83.44	2.52
ミダゾラム	81.48	5.32
ニトラゼパム	90.17	3.64
ノルジアゼパム	83.28	3.80
オキサゼパム	84.65	2.82
テマゼパム	84.19	2.96
トリアゾラム	85.45	8.71

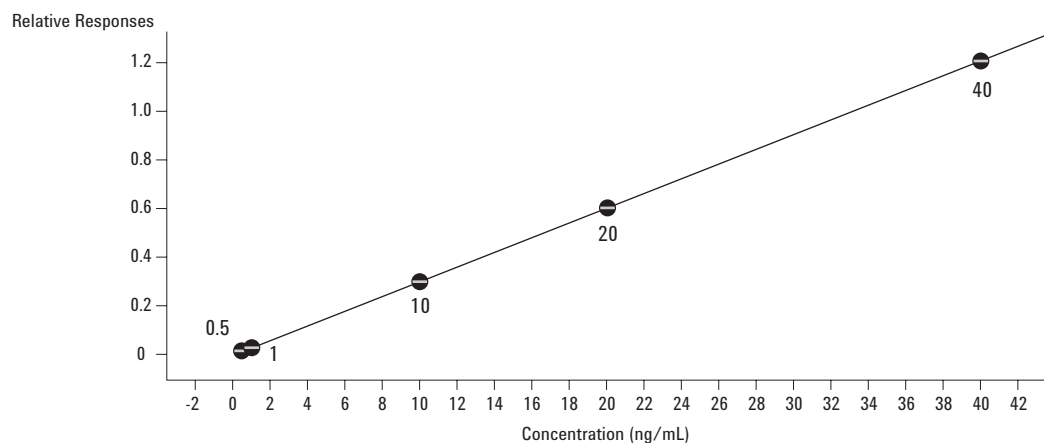


図 1. 口腔液中のアルプラゾラムの検量線 (0.5、1、10、20、40 ng/mL)

結果と考察

アジレントのシステムで口腔液中に極めて低濃度で存在する 14 種のベンゾジアゼピン類を迅速に測定することができました。粒径 1.8 μm カラムで、4 つのセグメントのピークの分離が可能です (図 2)。

さらに、アジレントのソフトウェアには、プリカーサイオンの 2 次トランジションをモニタリングし、主要イオンに対する比率を自動的に計算する独自の機能があります。この比率がキャリブレーション標準の 20% 以内でない場合、不合格となり同定はなされません。これはトリプル四重極質量分析計の追加機能で、ラボデータに対し

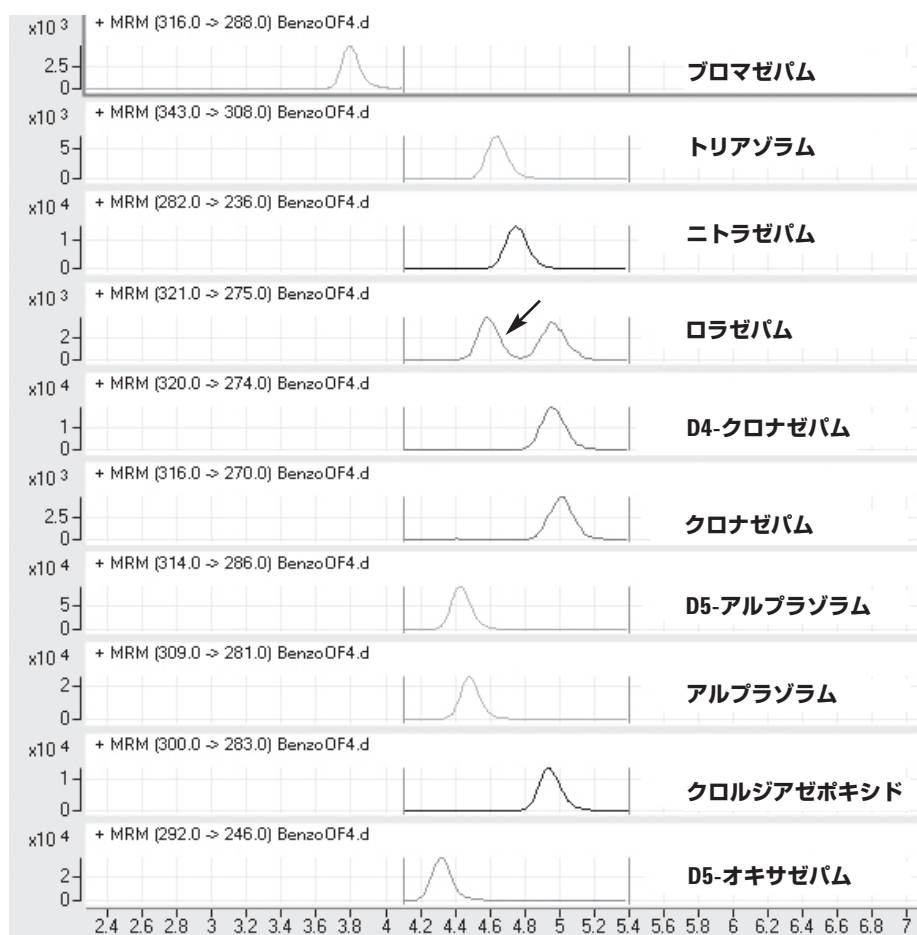


図 2. 口腔液中のベンゾジアゼピンの 1 次トランジション

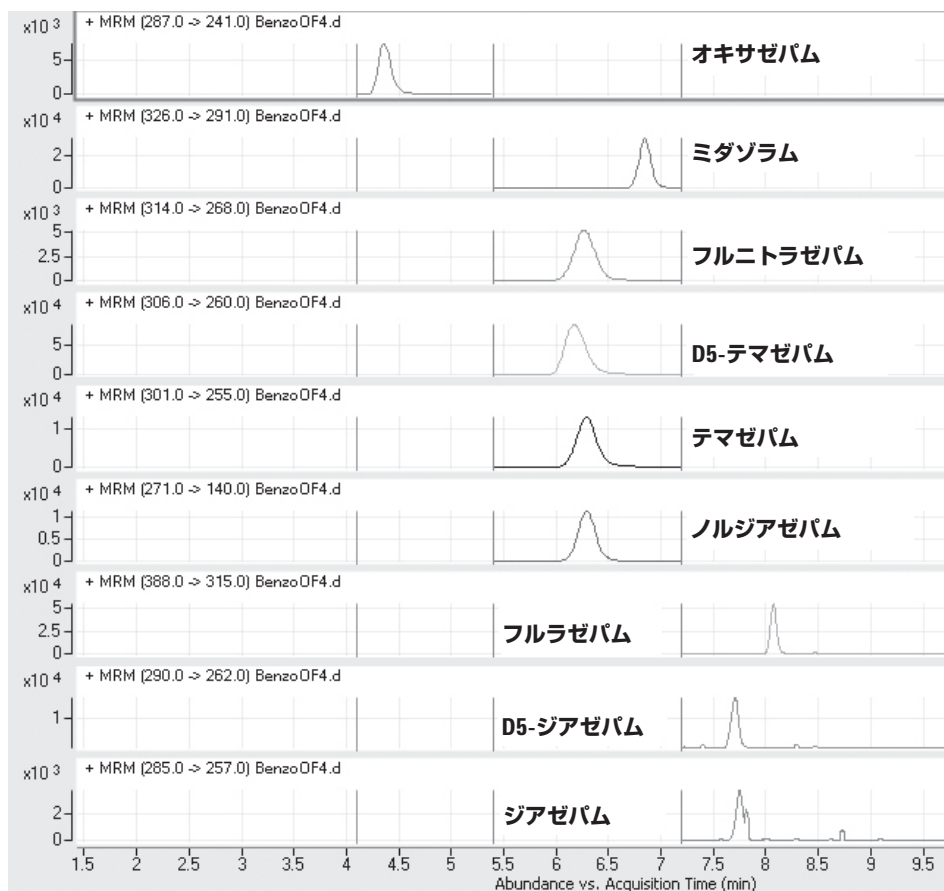


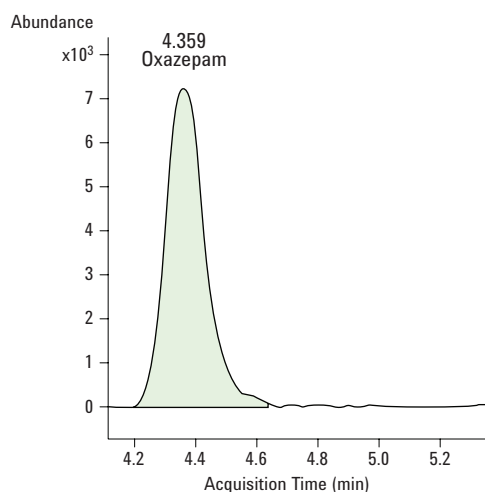
図 2. 口腔液中のベンゾジアゼピンの 1 次トランジション(続き)

て法的な異議申し立てが頻繁にある法医学分析で極めて重要です。イオンの 2 次トランジションをモニタリングすることで、結果の信頼性はさらに高まります。それは、口腔液中の薬物の同定をより確かなものにするにつながります。ソフトウェアがクロマトグラフウィンドウで比率をプロットするため、視覚的に陽性を判断できます(図 3)。

結論

アジレントのトリプル四重極質量分析装置が、口腔液中のベンゾジアゼピンの検出に最適であることを示しました。分析精度は他のメソッドよりも大幅に向上しました。これは口腔液の低濃度のベンゾジアゼピンを同定す

+ MRM (287.0 → 241.0) Benzo0F4.d



287 → 241.0, 269.0

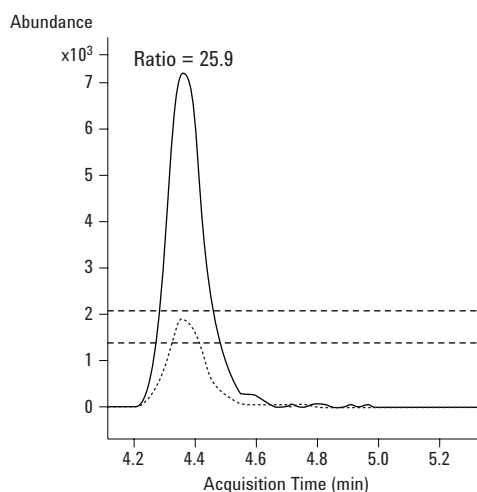


図 3. 口腔液から抽出されたオキサゼパム (10 ng/mL)

るためのクオリファイングイオンを含む初めてのメソッドで、我々のラボでは日常的に使用しています。

著者注: この論文は『Journal of Analytical Toxicology』に掲載されます。

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," *The 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. C. Moore, D. Lewis, "Comment on Oral Fluid Testing for Drugs of Abuse: Positive Prevalence Rates by Intercept Immunoassay Screening and GC-MS-MS Confirmation and Suggested Cutoff Concentrations," *J Anal Toxicol* 27(3): 169 (2003)
5. G. F. Kauert, S. Iwersen-Bergmann, S. Toennes, "Assay of Delta 9-Tetrahydrocannabinol (THC) in Oral Fluid—Evaluation of the OraSure Oral Specimen Collection Device," *J Anal Toxicol* 30(4): 274–277 (2006)
6. P. Kintz, N. Samyn, "Use of Alternative Specimens: Drugs of Abuse in Saliva and Doping Agents in Hair," *Ther Drug Monit* 24(2): 239–246 (2002)
7. O. Quintela, A. Cruz, A. de Castro, M. Concheiro, M. Lopez-Rivadulla, "Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry for the Determination of Nine Selected Benzodiazepines in Human Plasma and Oral Fluid," *J Chromatogr* 825: 63–71 (2005)
8. E. L. Oiestad, U. Johnsen, A. S. Christophersen, "Drug Screening of Preserved Oral Fluid by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry," *Clin Chem* 53(2): 300–309 (2007)
9. B. E. Smink, M. P. M. Mathijssen, K. J. Lusthof, J. J. de Gier, A. C. G. Egberts, D. R. A. Uges, "Comparison of Urine and Oral Fluid as Matrices for Screening of Thirty-Three Benzodiazepines and Benzodiazepine-Like Substances Using Immunoassay and LC-MS (-MS)," *J Anal Toxicol* 30: 478–485 (2006)

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 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. 2008

Printed in Japan
September 26, 2008
5989-7201JAJP



Agilent Technologies