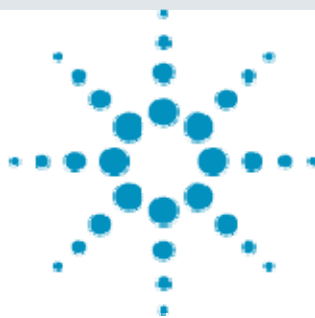




Agilent 6220 によるトリアゾラム、エチゾラム およびその代謝物の一斉分析



＜要旨＞ 抗精神薬であるエチゾラム、トリアゾラム及びその代謝物の 8-OH-エチゾラム、1-OH-エチゾラム、4-OH-トリアゾラム、1-OH-トリアゾラムについて LC/TOF-MS 法による一斉分析法を検討しました。その結果、全ての薬物で 1ng/mL 以下の測定が可能であり、LC で分離が困難であった 1-OH-エチゾラムと 1-OH-トリアゾラムも高分解能モードの TOF-MS で分離が可能であり観察されたプロトン化分子の精密質量誤差も相対誤差で 3ppm 以内でした。

Key Words: 法医学、抗精神薬、エチゾラム、トリアゾラム、LC/TOF-MS、精密質量

1. はじめに

エチゾラム及びトリアゾラムは、トリアゾロベンゾジアゼピン系に属する抗精神薬で、使用頻度の多い抗精神薬です。これら薬物は未変化体及び代謝物が類似構造を有する同重体であり、現在広く使用されている低分解能の質量分析装置で検出されるイオンの質量による識別は不可能です。一方、飛行時間型質量分析計は高分解能であることから同重体の質量分離が可能です。そこで本研究では 8bit-4GHz 高速デジタルコンバーター(ADC)を搭載した高分解能 LC/TOF-MS を用いてエチゾラム、トリアゾラム及び代謝物である 1-OH-エチゾラム、8-OH-エチゾラム、1-OH-トリアゾラム、4-OH-トリアゾラムの一斉分析法を検討しました。また、血漿及び尿にこれら薬物を添加し測定を行いました。

表.1 トリアゾラム、エチゾラム及び代謝物の LC/TOF-MS 条件

HPLC	: Agilent 1200 SL
Column	: ZORBAX Extend C18 (100mm, 2.1mm, 1.8 μ m)
Mobile phase	: A:ACN 0.1% HCOOH +10mM HCOONH_4 10%A/B----(30min)---50%A/B
Column temp	: 40C
Sample volume	: 5 μ L
Flow rate	: 0.2mL/min
MS	: Agilent 6220 time-of-flight LC/MS
Ionization	: ESI (positive)
Mass range	: m/z 100-1000
Mass window of MC	: 0.02 Da
Drying gas	: 10 L/min at 350°C
Nebulizer gas	: 345kPa
Fragmentor	: 100V
Vcap	: 4000V
Reference mass	: m/z121.050873, 922.009798

2. 装置及び測定条件

分析条件は表.1 に示した通りです。LC 条件はカラムに代謝物の分離を考慮して 1.8 μ m の微小粒子径の逆相系カラムを使用し、移動相はアセトニトリル及び 0.1%ギ酸+10mM ギ酸アンモニウム溶液を用いたグレジエントモードとしました。MS のイオン源にはデュアルスプレー-ESI を使用し、リアルタイム質量校正用リファレンス化合物としてプリン (m/z=121.050873) 及びヘキサシス(テトラフルオロプロポキシ)ホスファゼン (m/z=922.009798) を使用しました。また、4GHz 高速 ADC を使用することで分解能は m/z=121.05 で 10000 以上を確保しました。

3. 結果及び考察

図.1 に 6 種対象薬物の TIC を示しましたが、1-OH-エチゾラムと 1-OH-トリアゾラムの分離は困難でした。しかし MS で分離が不可能な異性体については LC による分離は可能でした。

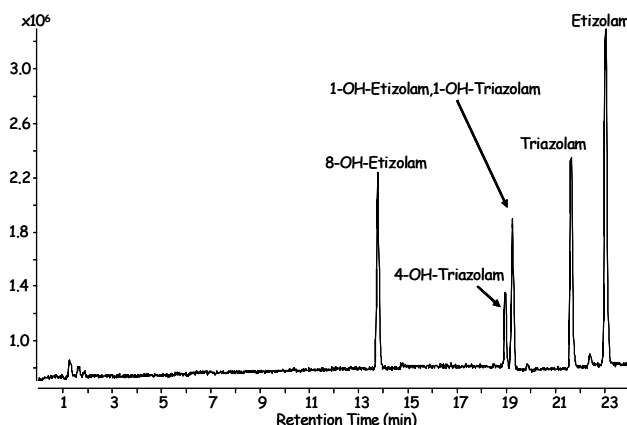


図.1 6 種薬物の TIC (1 μ g/mL)

図.2 は LC で分離が困難であった 1-OH-エチゾラムと 1-OH-トリアゾラムのマスキロマトグラム(質量幅:0.02Da)及びプロトン化分子付近の質量スペクトル

を示しました。結果、ADC の取り込み速度が 2GHz では TOF-MS の分解能が不十分でお互いに妨害を受け観察されたプロトン化分子の精密質量は理論値との相対誤差で 2ppm 及び 6.8ppm でした。一方、ADC の取り込み速度を 4GHz にすることで 1-OH-エチゾラムのクロマトグラムは若干 1-OH-トリアゾラムの影響を受けましたが 2GHz と比較して大きく改善され、観察されたプロトン化分子の相対質量誤差は 0.7ppm 及び 2.5ppm と良好でした。図. 3 には各薬物の 1ng/mL 相当でのマスクロマトグラムを示しましたが、全て S/N>10 で検出可能でした。直線性についても図. 4 に各薬物の検量線を示したとおり決定係数は 0.9975~0.9996 と良好でした。

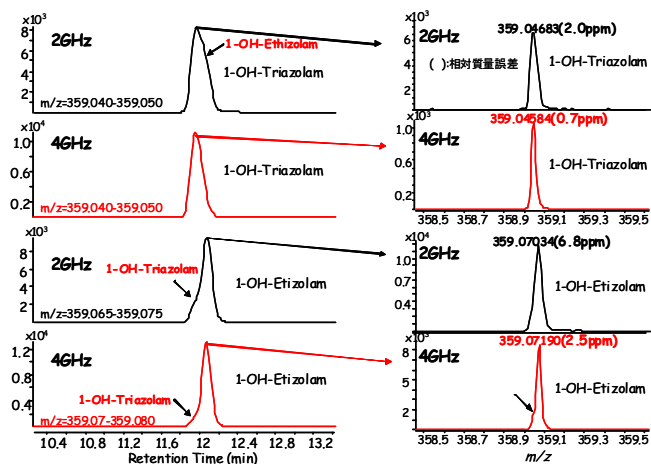


図. 2 1-OH-エチゾラム及び 1-OH-トリアゾラムのマスクロマトグラム(質量幅:0.02Da)及び質量スペクトル

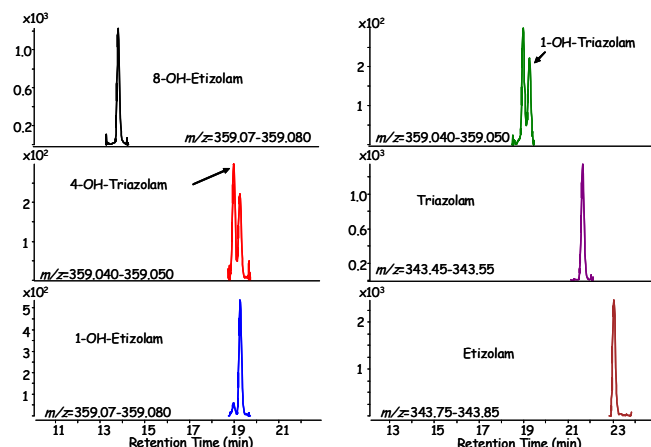


図. 3 各薬物のマスクロマトグラム(濃度:1ng/mL)

図. 5 には人血漿に 10ng/mL 相当の薬物を添加した試料の測定結果を示しましたが、マスクロマトグラムにより全て検出が可能でした。また、表. 2 に標準溶液及び生体試料中で検出された薬物のベースピークイオンの相対質量誤差を示しましたが-2.84~1.83ppm と非常に良好でした。

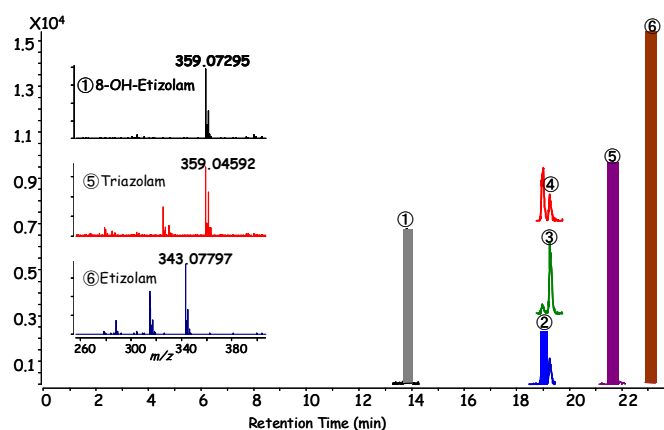


図. 4 各薬物の検量線(500~1ng/mL)

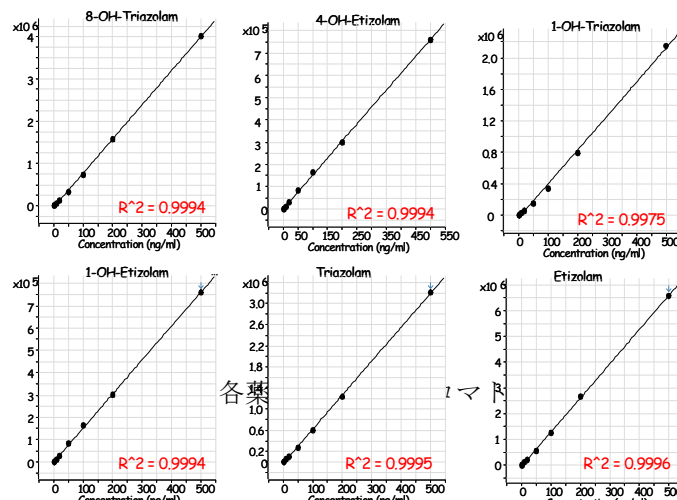


表. 2 各薬物のベースピークの相対質量誤差(ppm)

No	Compounds	MW	標準液濃度(ng/mL)				尿 10ng/mL	血漿 10ng/mL
			500	100	10	2		
1	8-OH-etizolam	358.06551	1.52	0.91	0.24	0.33	1.21	-0.56
2	4-OH-triazolam	358.03882	1.48	0.48	-2.94	1.51	0.33	-1.69
3	1-OH triazolam	358.03882	1.21	0.78	-1.21	-1.21	-1.23	-1.53
4	1-OH-etizolam	358.06551	1.83	1.21	-0.98	-0.76	-1.78	-1.61
5	Triazolam	342.04390	1.32	0.76	-1.05	-0.02	0.83	-0.33
6	Etizolam	342.07059	1.32	0.7	0.42	-0.11	0.54	-0.28

4. まとめ

LC/TOF-MS によるエチゾラム、トリアゾラム及び代謝物についての一斉分析法を検討しましたが、LC では全ての薬物の分離はできませんでしたが、TOF-MS の高分解能モードにより 1-OH-トリアゾラムと 1-OH-エチゾラムの個別分析が可能でした。また、各薬物を添加した尿、血漿試料においても 10ng/mL で全薬物の検出が可能であり、観察されたイオンの相対質量誤差も 3ppm 以内と良好でした。

【LCMS-200901TK-003】

本資料に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更することがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社
〒192-8510 東京都八王子市高倉町 9-1
www.agilent.com/chem/jp