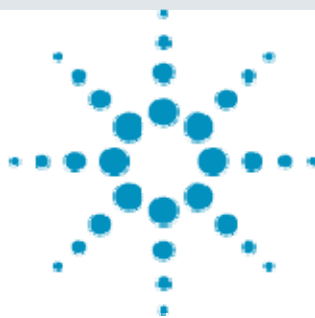




Agilent 6230 によるベンゾジアゼピン系及び一般薬物の包括的分析法

＜要旨＞LC/TOF-MS 及び保持時間-精密質量データベースを用いた向精神薬であるベンゾジアゼピン系薬物および一般薬物の包括的分析法を検討しました。その結果、41 向精神薬及び 69 一般薬物の測定が可能でした。その際の測定質量誤差は相対質量誤差で 4ppm 以内と良好でした。また最近増加している多剤併用薬物中毒症への本分析法の適応が可能でした。

Key Words: 法医学、向精神薬、LC/TOF-MS、精密質量、保持時間

1. はじめに

飛行時間型質量分析計を用いた LC/TOF-MS と保持時間-精密質量データベースを用いたスクリーニング手法は食品中多成分残留分析のような分析に有効でありアプリケーションノートでも紹介しています。この手法は救命救急センターでの迅速な薬物分析にも有効ですが、最近ではベンゾジアゼピン系の向精神薬だけではなく一般薬物も多く服用した多剤併用薬物中毒症が急増しています。一般的に一般薬物とベンゾジアゼピン系薬物では服用量が極端に異なり、多剤併用薬物中毒症患者に適用する場合、低濃度のベンゾジアゼピン系薬物と高濃度の一般薬物の同時測定が必要です。そこで今回はベンゾジアゼピン系薬物に加えて、法中毒学的薬物分析に重要と思われる薬物を追加し、合計 103 種類薬物の精密質量データベースを作成して多剤併用薬物中毒症例へ応用した精密質量を用いた LC/TOF-MS による薬物スクリーニング法の紹介を致します。

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ました。

表.1 LC/TOF-MS 条件

HPLC	: Agilent 1200 SL
Column	: ZORBAX Extend C18 (100,mm,2.1mm,1.8 μ m)
Mobile phase	: A:0.1% HCOOH +10mM HCOONH_4 B: MeOH 10%B----(40min)---100%B
Column temp	: 40°C
Sample volume	: 5 μ L
Flow rate	: 0.2 mL/min
MS	: Agilent 6230 time-of-flight LC/MS
Ionization	: ESI (positive)
ADC	: 2GHz
Reference ions	: m/z : 121.05087, 922.00979
Mass range	: 100-1000 Da
Drying gas	: 10 L/min at 300°C
Nebulizer gas	: 345kPa
Fragmentor	: 100V
Vcap	: 4000V

スクリーニング条件を表.2、スクリーニングに使用したデータベースのリストは表.3 に示した。

表.2 スクリーニング条件

Target mass	: $(M+H)^+$, $(M+NH_4)^+$	Relative Mass error	: $\pm 5\text{ppm}$
Charge state	: only Single charge	Retention time	: $\pm 0.5\text{min}$
Mass window	: 0.01 Da		
Retention time	: 2min		
Mass spectrum	: 半値幅での平均スペクトル		

表.3 ベンゾジアゼピン系薬物のデータベース

No	Compounds	Formula	Exact mass	RT(min)	No	Compounds	Formula	Exact mass	RT(min)
1	7-amino-nitrazepam	C15H13N3O	251.10586	4.19	22	3-OH-brotizolam	C15H10N4O5ClBr	407.94472	16.32
2	7-amino-clonazepam	C15H12N3OCl	285.06689	8.98	23	nitrazepam	C15H11N3O3	281.08004	16.33
3	clonazepam	C17H14N2O2Cl2	348.04323	9.29	24	etizolam	C16H11N4O	294.06722	16.57
4	flalazepam	C17H14N2O2FBr	376.02227	10.39	25	lorazepam	C15H10N2O2Cl2	320.01193	16.93
5	flumazenil	C15H14N3O3F	303.10192	12.41	26	clonazepam	C15H10N3O3Cl	315.04107	17.01
6	8-ethyl OH etizolam	C17H15N4O5Cl	358.06551	12.47	27	N1-hydroxy-ethyl-flurazepam	C17H14N2O2ClF	332.07278	17.15
7	chlorazepoxide	C16H14N3OCl	299.08254	13.22	28	alprazolam	C17H13N4Cl	308.08287	17.28
8	bromazepam	C14H10N3OBr	315.00072	13.89	29	triazolam	C17H12N4O2	342.04390	17.68
9	midazolam	C18H13N3ClF	325.07820	14.09	30	flunitrazepam	C16H12N3O3F	313.08627	18.27
10	flurazepam HCl	C21H20N6O3Cl2	474.09739	14.09	31	brotizolam	C15H10N4S4Br	391.94981	18.29
11	flurazepam	C21H23N3OClF	387.15137	14.11	32	nimetazepam	C16H13N3O3	295.09569	18.39
12	oxazolam	C18H17N2O2Cl	328.09786	14.23	33	nordiazepam	C15H11N2O4	270.05599	18.39
13	medazepam	C16H15N2Cl	270.09238	14.56	34	tenazepam	C16H13N2O2Cl	300.06656	18.45
14	4-OH-alprazolam	C17H13N4OCl	324.07779	15.39	35	etizolam	C17H12N4S4Cl	342.07059	18.49
15	1-OH triazolam	C17H12N4OCl2	358.03882	15.81	36	clonazepam	C16H13N2O2Cl	300.06656	18.59
16	6-hydroxy-diprazolam	C17H13N4OCl	324.07779	15.92	37	lormetazepam	C16H12N2O2Cl2	334.02758	19.27
17	1-methyl OH etizolam	C17H15N4O5Cl	358.06551	16.03	38	fludiazepam	C16H12N2OClF	302.06222	20.38
18	4-OH triazolam	C17H12N4OCl2	358.03882	16.03	39	diazepam	C16H13N2O	284.07164	20.91
19	desmethyln-FNZ	C15H10N3O3F	299.07062	16.07	40	ethyl loflazepam	C18H14N2O3ClF	360.06770	21.56
20	9-OH-methylbrotizolam	C19H10N4O5ClBr	407.94472	16.15	41	clotiazepam	C16H12N2O5Cl	318.05936	22.57
21	loxazepam	C19H11N2O2Cl	286.05091	16.33					

表.3.2 一般薬物のデータベース

No	Compounds	Formula	Exact mass	RT	No	Compounds	Formula	Exact mass	RT
1	sulpiride	C15H23N3O4S	341.14093	2.04	32	phenytoin	C15H12N2O2	252.08988	15.44
2	acetaminophen	C8H9NO2	151.06333	2.06	33	biperiden	C21H23NO	311.24911	15.52
3	caffeine	C8H10N4O2	194.08038	3.32	34	bromoperidol	C21H23BrFN2O2	419.08962	15.56
4	lorazepam	C17H12ON4S	312.14087	4.38	35	dosulepine (dothiepin)	C19H21NS	295.13947	15.78
5	primidon	C12H14N2O2	218.10553	7.81	36	desipramine	C18H22N2	266.17830	15.81
6	methylphenidate	C14H19NO2	233.14158	9.23	37	mephobarbital	C13H14N2O3	246.10044	15.81
7	ethenzamide	C9H11NO2	165.07898	10.99	38	imipramine	C19H24N2	280.19395	16.08
8	9-hydroxy-risperidon	C23H27FN4O3	426.20672	11.02	39	trihexphenidyl HCl	C20H31NO	301.24056	16.15
9	zidpidem	C19H21N3O	307.16846	11.04	40	glutetiximide	C13H15N2O2	217.11028	16.23
10	milnacipran	C15H12N2O2	246.17321	11.17	41	fluvoxamine	C15H14FN3N2O2	318.15551	16.27
11	benzocetate	C10H13NO2	179.09463	11.42	42	hydroxizine	C21H27ClN2O2	374.17611	16.31
12	risperidone	C23H27FN4O2	410.21180	11.05	44	antipyrine	C19H21N	263.16740	16.31
13	parchloronium bromide	C35H60N2O4	572.45530	12.11	45	magnetyline	C20H23N	277.18305	16.43
14	chlorpheniramine	C16H19ClN2	274.12368	12.11	46	Norvenapamil	C26H36N2O4	440.26751	16.45
15	trazodone	C19H22ClN5O	371.15129	12.21	47	amitriptyline	C20H23N	277.18305	16.63
16	droperidol	C22H22FN3O2	379.16961	12.78	48	levomepromazine	C19H24N2O5	328.16093	16.69
17	clofedanol	C17H20ClNO	289.12334	12.93	49	verapamil	C21H28N2O4	454.28316	16.74
18	timiprone	C22H24FN3O5	397.16241	13.17	50	trimipramine	C20H26N2	294.20960	17.06
19	chlorazepam	C11H12ClN3O3S	273.02264	13.79	51	bromocriptine	C21H28BrN5O5	653.21228	17.21
20	setipiline	C19H19N	261.15175	13.84	52	acetylphenetidine	C13H16N2O3	248.11609	17.28
21	diphenhydramine	C17H21NO	255.16231	13.91	53	chlorpromazine	C17H19N4O2	318.09575	17.56
22	mianserin	C18H20N2	264.16265	14.01	54	caripramine	C28H38N4O	446.30456	17.66
23	quetiapine	C17H25N3O2S	383.16675	14.03	55	perphenazine	C21H26ClN3O5	403.14851	17.71
24	amoxapine	C17H16ClN3O	313.09819	14.82	56	zotepine	C18H18ClN3O5	331.07976	18.01
25	4-OH-midazolam	C18H13ClFN3O	341.07312	14.82	57	clomipramine	C19H23ClN2	314.15498	18.15
26	propylcizine	C12H23N3OS	365.15618	14.96	58	thioridazine	C21H26N2S2	370.15374	19.24
27	haloperidol	C21H23ClFN2O2	375.14013	15.08	59	clozapine	C28H37ClN4O	480.26559	19.54
28	promethazine	C17H20N2S	284.13472	15.11	60	mosapramine	C28H35ClN4O	478.24994	19.65
29	carbamazepine	C15H12N2O	236.09496	15.29	61	lofepramine	C26H27ClN2O	418.18119	22.19
30	perospirone	C23H30N4O2S	426.20895	15.33	62	indomethacin	C19H16ClN4O4	357.07679	22.59



Agilent Technologies

3. 結果及び考察

図.1 にベンゾジアゼピン系薬物及び一般薬物標準品を2ng/mL 相当添加した尿のスクリーニング結果を示しましたが、感度の悪い一部の薬物の検出は困難でしたが、データベースに収載されている 103 薬物中 99 薬物について尿中成分の影響なく検出が可能でした。この手法では、データベースに収載されている薬物全てのマスキングマトグラムを抽出し化合物の有無を確認することから取りこぼしなくスクリーニングが可能でした。

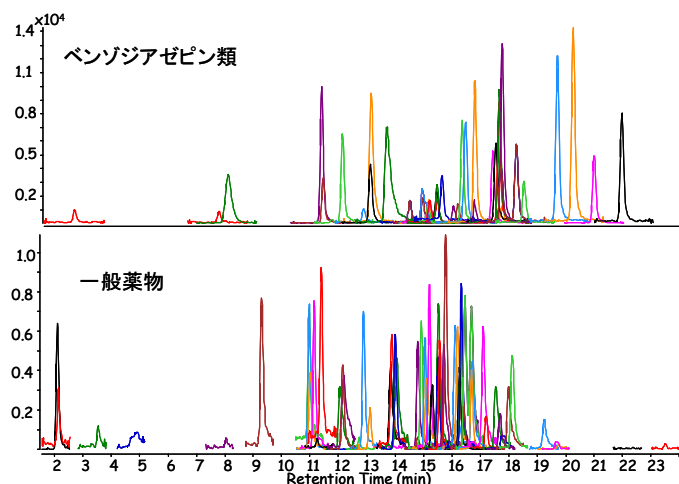


図.1 各薬物のマスキングマトグラム(濃度:2ng/mL)

最近の救命救急センターでみられる多剤併用薬物中毒症例の試料には、ベンゾジアゼピン系薬物以外の一般薬物が多く含まれ、これら薬物は処方量が多いことから高濃度で検出されます。従って、これら高濃度薬物の影響についても確認する必要があります。そこで今回紹介したスクリーニング手法を多剤併用薬物中毒症の尿の分析に適用しました。

図.2,3 にスクリーニング結果のマスキングマトグラム及び検出された薬物のデータベースと、実測値の差を表.4 に示しました。

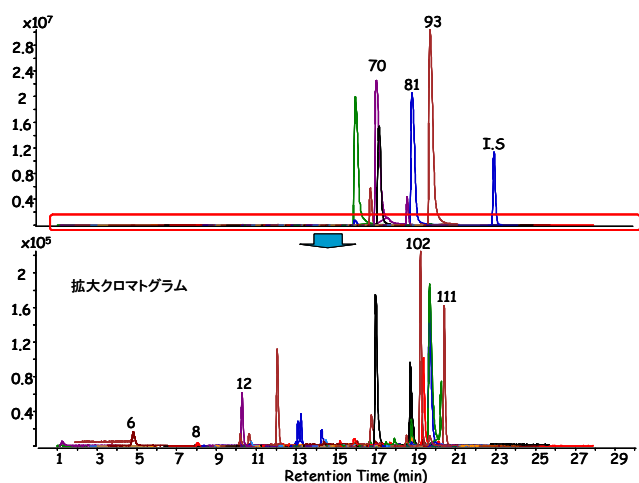


図.2 多剤併用薬物中毒患者の尿中各薬物のマスキングマトグラム

表.4 多剤併用薬物中毒症患者的尿中検出された薬物と測定結果

Cpd	Name	保持時間(分)			精密質量(Da)			強度
		データベース	測定値	誤差	理論値	測定値	相対誤差(ppm)	
6	caffeine	5.07	4.836	-0.234	194.08038	194.07941	-4.99	3053
8	7-amino-desmethy-FNZ	8.12	8.065	-0.055	269.09644	269.09593	-1.91	1374
12	7-amino-clonazepam	10.35	10.23	-0.12	285.06689	285.06662	-0.96	2799
21	7-amino-FNZ	12.26	12.082	-0.178	283.11209	283.11192	-0.6	31306
46	mianserin	15.94	15.948	0.008	264.16265	264.16333	2.58	5859619
56	promethazine	17.02	17.025	0.005	284.13472	284.13595	4.34	6940531
70	carbamazepine	17.17	17.14	-0.03	236.09496	236.09573	3.24	4925403
81	levomepromazine	18.81	18.807	-0.003	328.16093	328.16209	3.52	6484400
102	clonazepam	19.28	19.282	0.002	315.04107	315.04099	-0.25	47756
93	chlorpromazine	19.71	19.71	0	318.09575	318.09663	2.78	5717097
111	flunitrazepam	20.22	20.474	0.254	313.08627	313.08640	0.43	45780
126	diazepam-d5	22.64	22.928	0.288	289.10302	289.10311	0.3	2563367

この患者のスクリーニング結果では一般薬物がベンゾジアゼピン系薬物の 100 倍以上の濃度で存在していますが、これら一般薬物の影響なくベンゾジアゼピン系薬物の精密質量測定誤差は相対質量誤差で 2ppm 以下でした。また、高濃度(濃度:100ppm 以上)に存在する一般薬物の測定質量誤差も 5ppm 以内でした。この結果は Agilent6230 及び保持時間-精密質量データベースを用いたスクリーニング手法が多剤併用薬物中毒症にも適用できることを示しています。

4. まとめ

LC/TOF-MS 及び保持時間-精密質量データベースを用いた薬物の包括的分析法について示しましたが、41 向精神薬及び 69 一般薬物の一斉分析が可能であり、保持時間-精密質量データベースを用いることで迅速な薬物の検索が可能でした。また、Agilent6230 LC/TOF-MS のダイナミックレンジの広さ、高い質量精度により最近増加している多剤併用薬物中毒症への適用も可能でした。

【LCMS-201008TK-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