

# LC/MS/MS による 血中ベンゾジアゼピン類の分析 アプリケーション

臨床中毒学および法中毒学

## 著者

Hazel Rivera and G. Stewart Walker  
Flinders University  
Adelaide, South Australia  
Australia

Peter Stockham and D. Noel Sims  
Forensic Science South Australia  
Adelaide, South Australia  
Australia

John M. Hughes  
Agilent Technologies, Inc.  
Pleasanton, CA  
USA

## 要旨

**Agilent LC/MSD Trap** を使用した、ヒト血液中の **13 種類** のベンゾジアゼピン類および **5 種類** の代謝物を同時にスクリーニングおよび同定するための高感度および高選択性を有するメソッドについて述べる。このメソッドでは、血液を液液抽出した後、逆相 **LC/MS/MS** (液体クロマトグラフ/タンデム質量分析法) を用いて分析している。この分析技法は、血液を僅か **500  $\mu$ L**、そして **Agilent LC/MSD Trap** のオリジナルモデル (“クラシック”) を使用しており、報告されている最低治療濃度での分析対象化合物のスクリーニング分析および信頼性の高い同定に適している。このメソッドは、低濃度ベンゾジアゼピン類が関連する法中毒学的事例で上手く適用されてきた。

## はじめに

ベンゾジアゼピン類は、催眠鎮静、抗不安、筋弛緩、抗痙攣を含む広範囲の治療効果を持つ重要な種類の医薬品である [1]。その幅広い用途のため、ベンゾジアゼピン類には生死に関わる状況や運転を正常に行えない状況を引き起こす恐れのある別の中枢神経系抑制薬との相互作用の可能性がある。現在ではベンゾジアゼピンは最も一般的に処方される薬であり、そのため依存症や乱用の可能性が増え、医薬品関連致死または医薬品の助長による性的暴行事件において、その他の薬との組み合わせで発見されることがよくある。これらの理由のため、ベンゾジアゼピン類の分析は法中毒学および臨床中毒学者にとって重大関心事である。

特に血液中の少量のベンゾジアゼピン類に対する免疫学的測定法は、化合物特異性が不十分か、しばしば感度が不十分なため、これらの化合物のスクリーニングでは問題を抱えてきた。ベンゾジアゼピン類はガスクロマトグラフ/窒素リン検出器 (GC/NPD) [3]、ガスクロマトグラフ/電子捕獲検出器 (GC/ECD) [3]、およびガスクロマトグラフ/質量分析法 (GC/MS) [4, 5] を用いてこれまで分析されてきた。多くのベンゾジアゼピン類には極性があり、熱的に不安定であるため、誘導体化しないで GC や GC/MS で分析することは不可能か困難である。化合物の中には、クロマトグラフ挙動を改善するための誘導体化ができないものもある。



Agilent Technologies

UV 検出付き HPLC を使用してもベンゾジアゼピン類のスクリーニングを行えるが [6]、この分析技法は法中毒学用途に求められる感度と特異性という両方の点において十分ではない。さらに、フルニトラゼパムのような新しいベンゾジアゼピンの中には有効量範囲が非常に狭く、消失が速いものがあるため、低濃度での同定が必要となる。

液体クロマトグラフ/質量分析法 (LC/MS) は誘導体化を必要とせず、そのため時間と費用を節約し、実験上の困難を克服できるため、この種類の化合物に理想的に適している。この種類の化合物はエレクトロスプレーイオン化 (ESI) や大気圧化学イオン化 (APCI) モードのどちらでもよくイオン化するため、 $\mu\text{g/mL}$  以下の濃度でも容易に検出できる。多数のベンゾジアゼピン類および関連物質は、Agilent 液体クロマトグラフ/シングル四重極質量選択検出器 (LC/MSD) を APCI モードと選択イオンモニタリング (SIM) モードで使用しても分析できる [7]。Agilent LC/MSD Trap の高いフルスキャン感度により、1 回の分析で同定/確認と定量の両方が可能であり、マルチ反応モニタリング (MRM) モードにより、血液などの複雑なマトリックスに含まれる薬物をより特異的に検出することができる。

本研究では、13 種類のベンゾジアゼピン類と 5 種類の代謝物 [表 1] の分析を約 20 分の 1 回の分析で行っている。このアプリケーションノートは、オーストラリアの研究室で行われ、参考文献 8 で以前報告された研究の続編である。

表 1. 分析した化合物

ベンゾジアゼピン類	代謝物
アルプラゾラム	-
プロマゼパム	-
クロバザム	-
クロナゼパム	7-アミノクロナゼパム
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	N-デスアルキルフルラゼパム
ロラゼパム	-
ミダゾラム	-
ニトラゼパム	7-アミノニトラゼパム
オキサゼパム	-
テマゼパム	-
トリアゾラム	-
ブラゼパム (内部標準)	-

## 実験

### 試料調製

それぞれの薬の低、中、高の治療濃度での検量線用標準液を調製するために、各分析対象化合物のリファレンス溶液を混合し、水で希釈し、内部標準と一緒にこれらの薬物を含まない血液に加えた。代表的な低および高治療濃度を表 2 に示す。抽出方法は、GC/ECD と GC/MS によるこれらの薬のスクリーニングに使用されるものと同じで、どの誘導体化手順も省略し、通常の GC 用溶媒に代えて LC 用初期移動相で最終残留物を再溶解した。

表 2. 分析対象化合物の有効治療濃度範囲 ( $\text{mg/L} = \mu\text{g/mL}$ )

ベンゾジアゼピン または代謝物	低治療域	高治療域
アルプラゾラム	0.01	0.1
プロマゼパム	0.08	0.2
クロバザム	0.1	1
クロナゼパム	0.03	0.08
7-アミノクロナゼパム	0.03	0.14
ジアゼパム	0.05	2
ノルジアゼパム	0.05	2
フルニトラゼパム	0.005	0.02
7-アミノフルニトラゼパム	0.002	0.02
フルラゼパム	0.0005	0.028
N-デスアルキルフルラゼパム	0.04	0.15
ロラゼパム	0.02	0.3
ミダゾラム	0.08	0.25
ニトラゼパム	0.03	0.2
7-アミノニトラゼパム	0.03	0.2
オキサゼパム	0.15	2
テマゼパム	0.3	1
トリアゾラム	0.002	0.02

ネジ蓋付チューブに入れた 0.5 mL の血液に、50  $\mu\text{L}$  の新たに調製した内部標準液 (5  $\mu\text{g/mL}$  水) を加えた。このチューブに 4.5% アンモニア溶液 1.75 mL と 1-クロロブタン 10 mL を加え、内容を機械式ミキサーで 10 分間攪拌した。遠心分離後、溶媒を除去し、清浄なガラス管に移し、Jouan 遠心エバポレータで蒸発乾燥した。残留物は 100  $\mu\text{L}$  の LC 移動相で再溶解した。

### LC/MS/MS 装置構成

本研究で使用した LC/MS/MS システムは、Agilent 1100 シリーズデガッサ、バイナリポンプ、オートサンブラ、温度調節カラムコンパートメント、マイクロフローセル付きダイオードアレイ検出器 (DAD)、LC/MSD Trap “クラシック” (モデル G2445A、現在の VL モデ

ルと性能で同等)、および G1947A APCI イオン源から構成される。完全なシステムコントロールとデータ解析には、Agilent LC/MS ChemStation を使用した。

## LC/MS メソッド詳細

### LC 条件

カラム: Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C8,  
150 × L 4.6 mm, 5 μm (p/n 993967-906)

移動相: A = 20 mM ギ酸アンモニウム、  
pH 9 水溶液  
B = メタノール

流量: 0.7 mL/min

グラジエント: 15 分まで 60% B  
16 分で 100% B  
21 分で 100% B  
ポストタイム (カラム再平衡) :5 分  
(再現性の良いリテンションタイムに十分)

注入量: 5 μL

### MS 条件

イオン源: ポジティブ APCI

ネブライザ: 60 psig

気化器: 400 °C

乾燥ガス流量: 5 L/min

乾燥ガス温度: 350 °C

V<sub>cap</sub>: 3000 V

コロナ: 4 μA

スキャン: m/z 150 ~ 400

平均: 2

SPS 設定: ターゲット質量 m/z 300  
化合物安定性 60% (スキム 1:24 V、  
キャップ出口オフセット:69 V  
トラップドライブ 100% (結果値 27))

前駆イオン分離幅: 2.5 amu

カットオフ: 45% (これらの化合物に対して 113 ~ 175  
m/z)

MRM: 表 3 に示された 8 つの時間区分

## 結果および考察

### 考察

これらの化合物の分析に使用するイオン化法として、ESI と APCI の両方を評価した。一般的に、ESI および APCI ともに、このメソッドで対象とする低治療濃度で

良好な感度が得られる。しかし、妥当な時間内で良好なクロマトグラフ分離が得られる移動相では、フルラゼパムとロラゼパムはどちらも、ESI のレスポンスが貧弱だった。APCI は ESI よりマトリックス抑制効果の影響を受けにくいことが分かっており、そしてフルラゼパムとロラゼパムはどちらも APCI で良好な感度が得られたため、より有効なイオン化法として APCI を選択した。

シンプルな LC メソッド、妥当な短い分析時間、対象化合物のクロマトグラフ分離の間で最良の妥協点を求めて、種々の移動相組成を評価した。選択肢には、pH 3 または pH 9 の 20 mM ギ酸アンモニウムのどちらか、または 0.1% ギ酸を使用したアイソクラティックまたはグラジエントメソッドを含めた。APCI が有効なイオン化法として選ばれているため、アセトニトリルに代えてメタノールを有機移動相として選択した。メタノールは APCI で良好な感度が得られ、APCI コロナニードル上に炭素堆積物を蓄積しない。アセトニトリルはメタノールより気相での塩基性が強い、つまり APCI でのイオン化が気相で起こるため (ESI での液相ではなく)、アセトニトリルはプロトン付加“機構”の利用について分析対象化合物分子と競合している。

有機移動相としてメタノールを含む塩基性水系移動相が、本分析に対して最高の分離、クロマトグラフピーク形状、および感度を示すことが分かった。ZORBAX Eclipse C8 カラムは、長期間この移動相の有効 pH 範囲で安定している。C8 固定相は、極性のある代謝物に対しても十分な保持力を持っている。C18 では、もっと長い分析時間が必要になると思われる。

HPLC の推奨手続として、初期移動相に試料抽出物を再溶解すると、ピーク形状が崩れず、そのため単にメタノール/水に再溶解するよりも感度が良くなることが分かっている。このことは特に早期に溶出する極性を持つ分析対象化合物の場合に重要である。

適切な内部標準としてプラゼパムを選んだ。この化合物は、他の分析対象化合物と構造が類似しており、そしてオーストラリアでは処方されない。

単一化合物の溶液 5 μg/mL を MS/MS に注入して、各化合物の最適 fragmentation amplitude 値を決定した。前駆イオン強度が主生成イオンの 10% ~ 20% に減少するまで、その化合物の fragmentation amplitude の値を増加した。結果として得られた値を、表 3 に示すデータ取込メソッドで使用した。

表 3. MRM 用データ取込パラメータ

グループ 番号 [min]	ベンゾジアゼピン/ 代謝物	RT (分)	前駆 イオン [M+H] <sup>+</sup>	主生成 イオン (m/z)	Fragmentation amplitude (V)	開裂幅 (m/z)
1 [1.00 ~ 4.00]	7-アミノニトラゼパム	2.6	252	224	2.00	10
	7-アミノクロナゼパム	2.8	286	250	2.50	10
	7-アミノフルニトラゼパム	3.1	284	264	1.88	10
2 [4.00-5.70]	プロマゼパム	5.3	316	288	1.92	10
3 [5.70 ~ 6.70]	クロナゼパム	6.1	316	270	2.00	10
	ニトラゼパム	6.2	282	236	1.86	10
	フルニトラゼパム	6.3	314	268	1.90	10
4 [6.70 ~ 8.80]	クロバザム	7.3	301	259	3.37	40
	フルラゼパム	7.6	388	315	2.60	40
	トリアゾラム	7.8	343	308	3.57	40
	アルプラゾラム	8.3	309	281	4.67	40
	ロラゼパム	8.3	321	275	2.98	40
	オキサゼパム	8.6	287	241	3.32	40
5 [8.80 ~ 11.10]	N- デスアルキルフルラゼパム	9.2	289	261	4.57	40
	テマゼパム	9.6	301	255	3.72	40
6 [11.10-13.00]	ノルジアゼパム	12.1	271	243	1.88	10
7 [13.00 ~ 17.00]	ジアゼパム	13.9	285	257	1.90	10
	ミダゾラム	14.9	326	291	2.05	10
8 [17.00-21.00]	ブラゼパム	19.4	325	271	1.90	10

Agilent LC/MSD Trap は極めて高速のスキャン速度であるにもかかわらず（現行のモデルでは最高で 26,000 amu/s）、前駆イオンのすべてに MRM メソッドを反復して割り当て、そして 18 種類分析対象化合物と内部標準のすべてに MS/MS スキャンを割り当てると、サイクルタイムが許容できないほど長くなり、そして各化合物を適切に同定および定量するためには秒当たりのデータポイント数が不十分になる。そのため、表 3 に示すとおり、この分析を時間でプログラムしたセグメントに分割し、所定のセグメントの中では、該当する少数の分析対象化合物に対して MRM が摘要される。

マニュアル Fragmentation Cut-off 値を使用した場合、多数の分析対象化合物がモニタリングされているグループの切替たとき時間的な遅延が観察されることがある。各分析対象化合物にマニュアル値を設定するのではなく、

すべてのグループのカットオフ選択（Trap Control window の MS/MS セクションの Fragmentation の下にある）を、前駆イオン質量の適切な百分率値、または“デフォルト”に設定することで、この遅延を回避できる。このメソッドの当初のバージョンでは、各 MRM に対して 150 m/z のマニュアル Cut-off 値を使用したため、そのような遅延があった。Cut-off 値をデフォルトの 27% に代えて 45% に設定することで、これらの分析対象化合物について感度が改良された。これにより、同定および定量に有用ではない低質量イオンをトラップすることなく、これらの分析対象化合物の主生成イオンが存在する m/z 領域にトラップが実質上フォーカスされる。

図 1 のクロマトグラムを考察することで MS/MS 取込の最適化の結果を確認できる。この分析のすべての分析対象化合物について、主生成イオンのクロマトグラムが重ね描きで示されている。

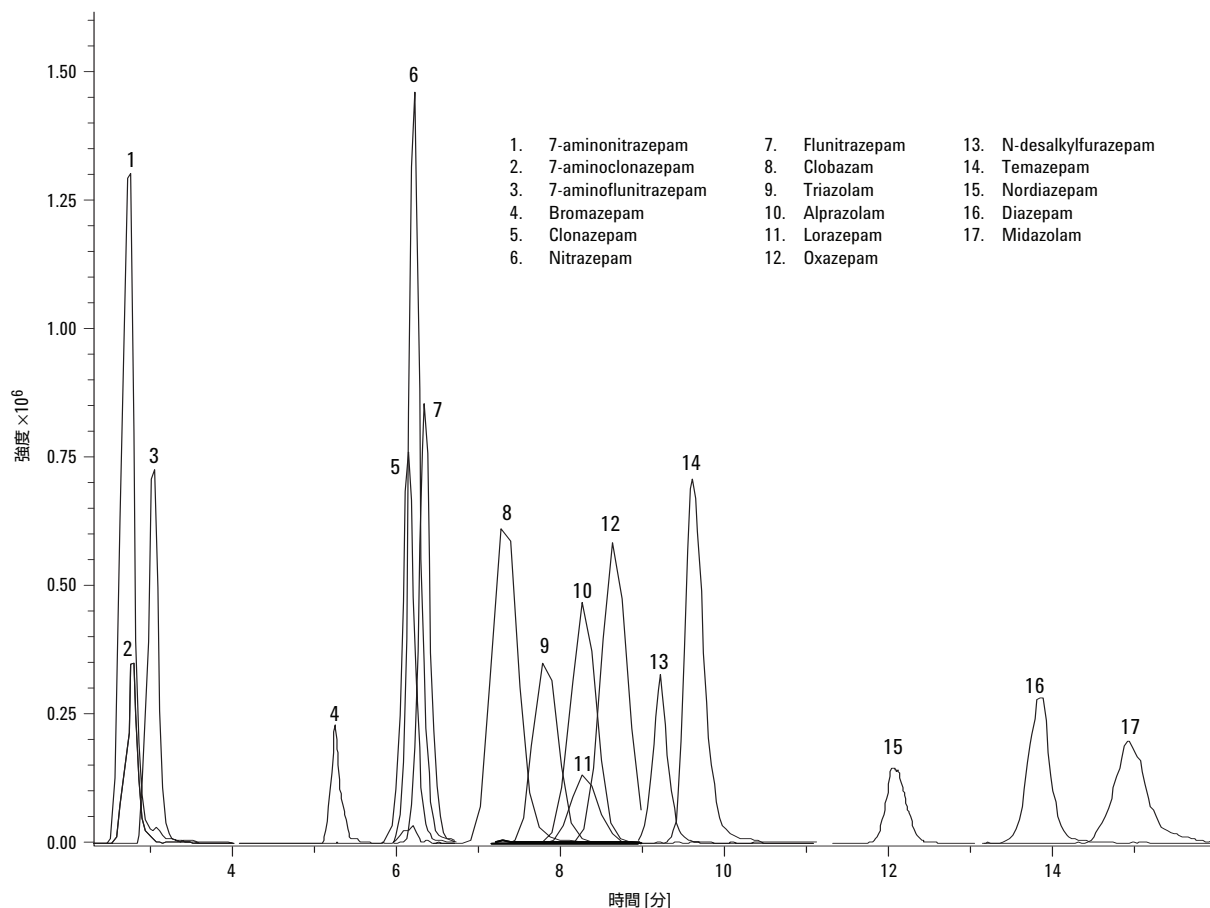


図 1. 主生成イオンクロマトグラムの重ね描き

1.0 ~ 4.0 分までの最初のグループには、実際には共溶出する 3 つの化合物の MRM 分析が含まれる。2 番目のグループは 1 つの化合物だけを対象とする一方、3 番目のグループは別の 3 つの化合物を対象としている。4 番目のグループは 6 つの化合物を対象とし、各化合物あたりの有効 duty cycle が削減されている。化合物が溶出するしないにかかわらず、MRM は 6 つの異なる前駆イオンを繰り返し測定している。しかしながらクロマトグラフピーク幅は、各分析対象化合物に対して十分なデータポイント数を採取するのに十分な幅を持っている。

生成イオンスペクトルはフルスキャンで取り込まれ、取り込んだ MS/MS スペクトルはユーザーライブラリに追加されて、スクリーニングおよび化合物同定の自動化に役立てることができる。そのようなライブラリは、毒物学分野方々のラボで利用されている。数多くの薬物をスクリーニングするには、AutoMS<sup>n</sup> モードの分析により、MS および MS/MS (MS/MS/MS つまり MS<sup>3</sup> も) スペクトルの両方を生成し、それらのスペクトルを、純粋な標準品から相当する MS<sup>n</sup> パラメータを使用して採取したスペクトルのライブラリを使って検索できる。

SmartFrag オプションを有効にすると、スペクトル再現性および生成イオンの強度が最も重要である定性分析の場合に幾つかの利点がある。SmartFrag オプションを無効にすると、少数の生成イオンの強度を最大化し、低濃度での定量分析に役立つ。

図 2 ~ 8 に、このメソッドの条件で分析した化合物の構造と MS/MS スペクトルを示す。スペクトルはグループに分けられており、構造上の僅かな違いによって起こるいくつかの共通的な脱離や開裂挙動の変化を説明している。

図 2 は、これらの条件で塩素を失う塩素含有ミダゾラムおよびトリアゾラムの MS/MS スペクトルを示す。窒素含有五員環を持つトリアゾラムは、五員環の開環に対応した主フラグメントイオンおよび二原子窒素の脱離も示している。

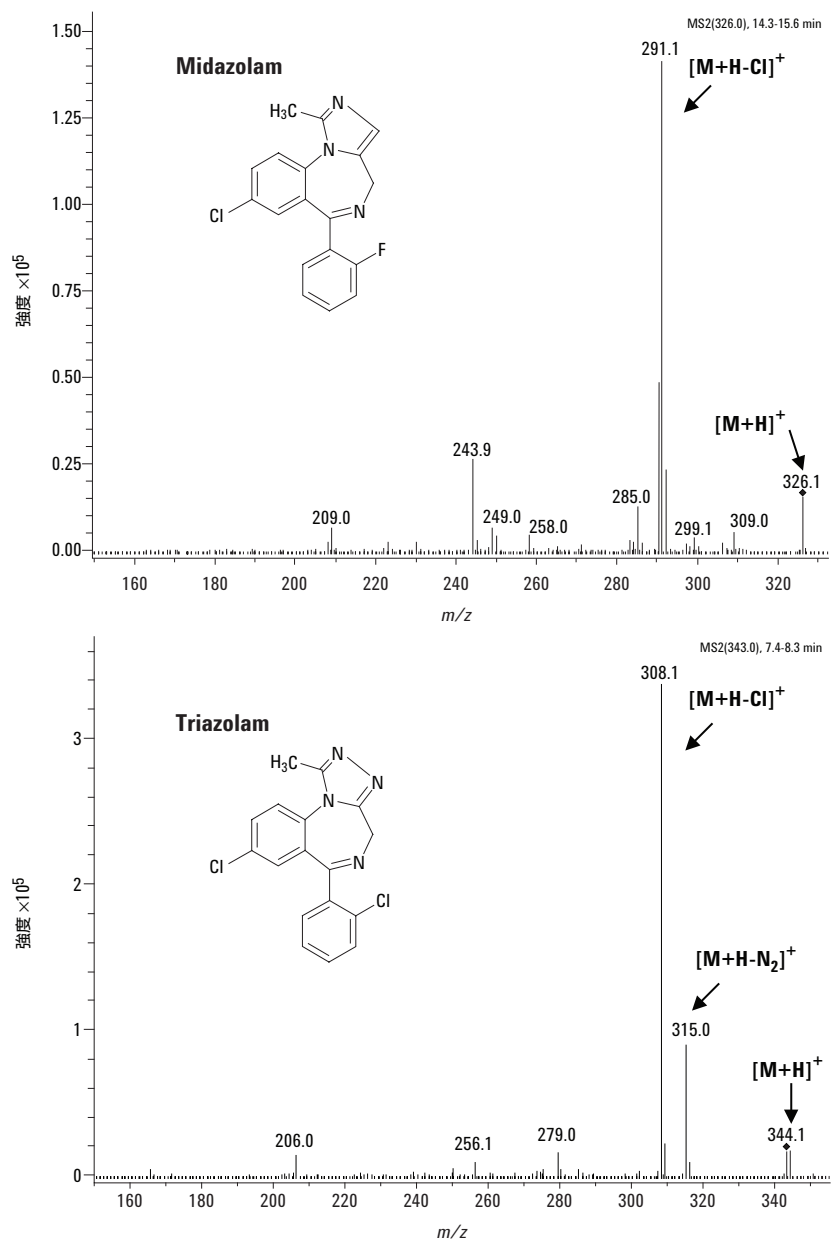


図 2. ミダゾラムおよびトリアゾラムの構造および MS/MS スペクトル

図 3 は、MS/MS スペクトルのベースピークが  $NO_2$  の脱離に対応する 3 種類のベンゾジアゼピンを示す。この図には、各親化合物についてニトロ基がアミノ基に還元された代謝物のスペクトルも示す。いずれの場合でも、構

造上の違いによって異なる開裂が生じている。7 員環の開環から、7-アミノクロナゼパムは  $HCl$  を失い、7-アミノニトラゼパムは  $CO$  を失い、そして 7-アミノフルニトラゼパムは  $HF$  を失う。

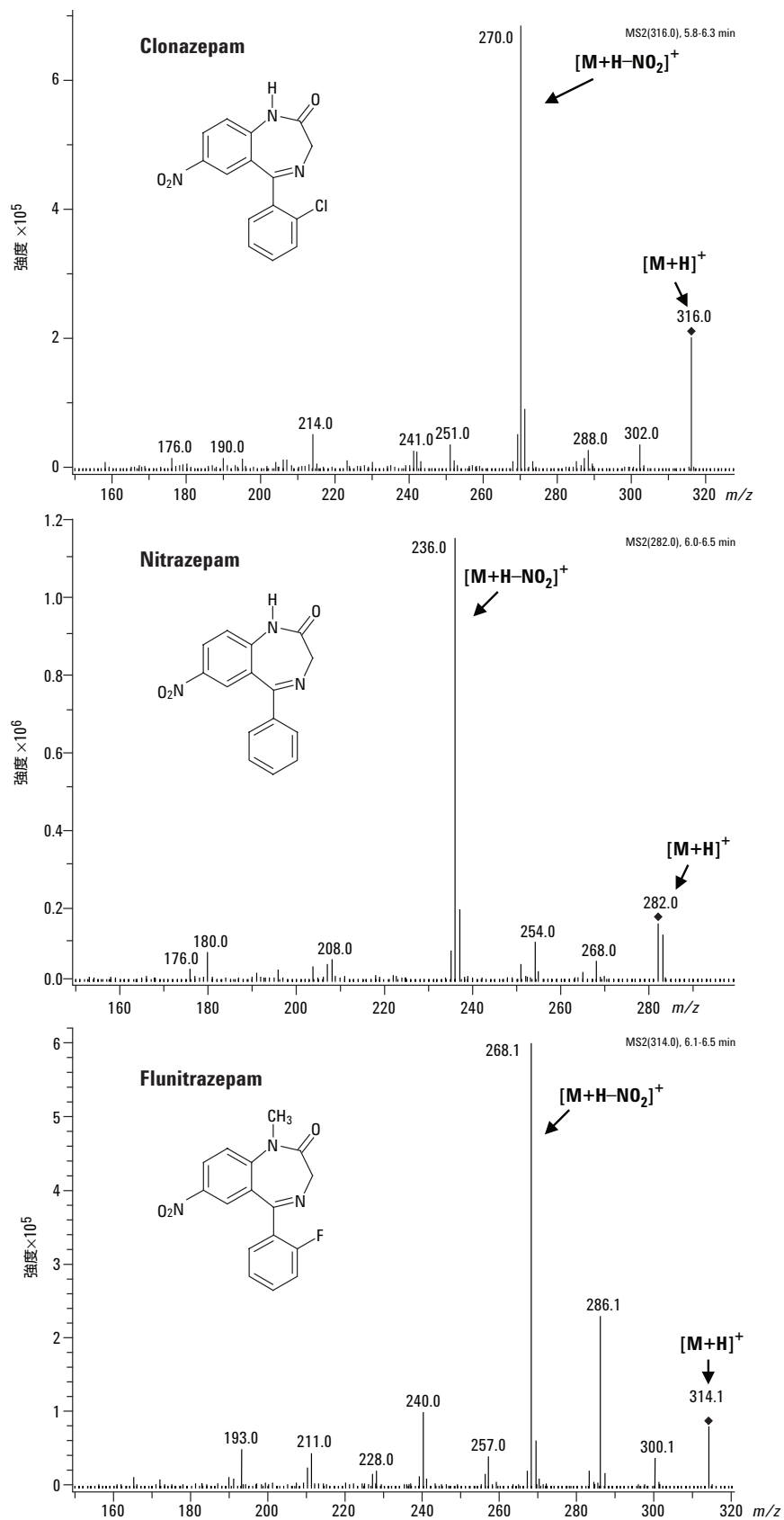


図 3. クロナゼパム、ニトラゼパム、フルニトラゼパム、7-アミノクロナゼパム、7-アミノフルニトラゼパム、7-アミノフルニトラゼパムの構造および MS/MS スペクトル

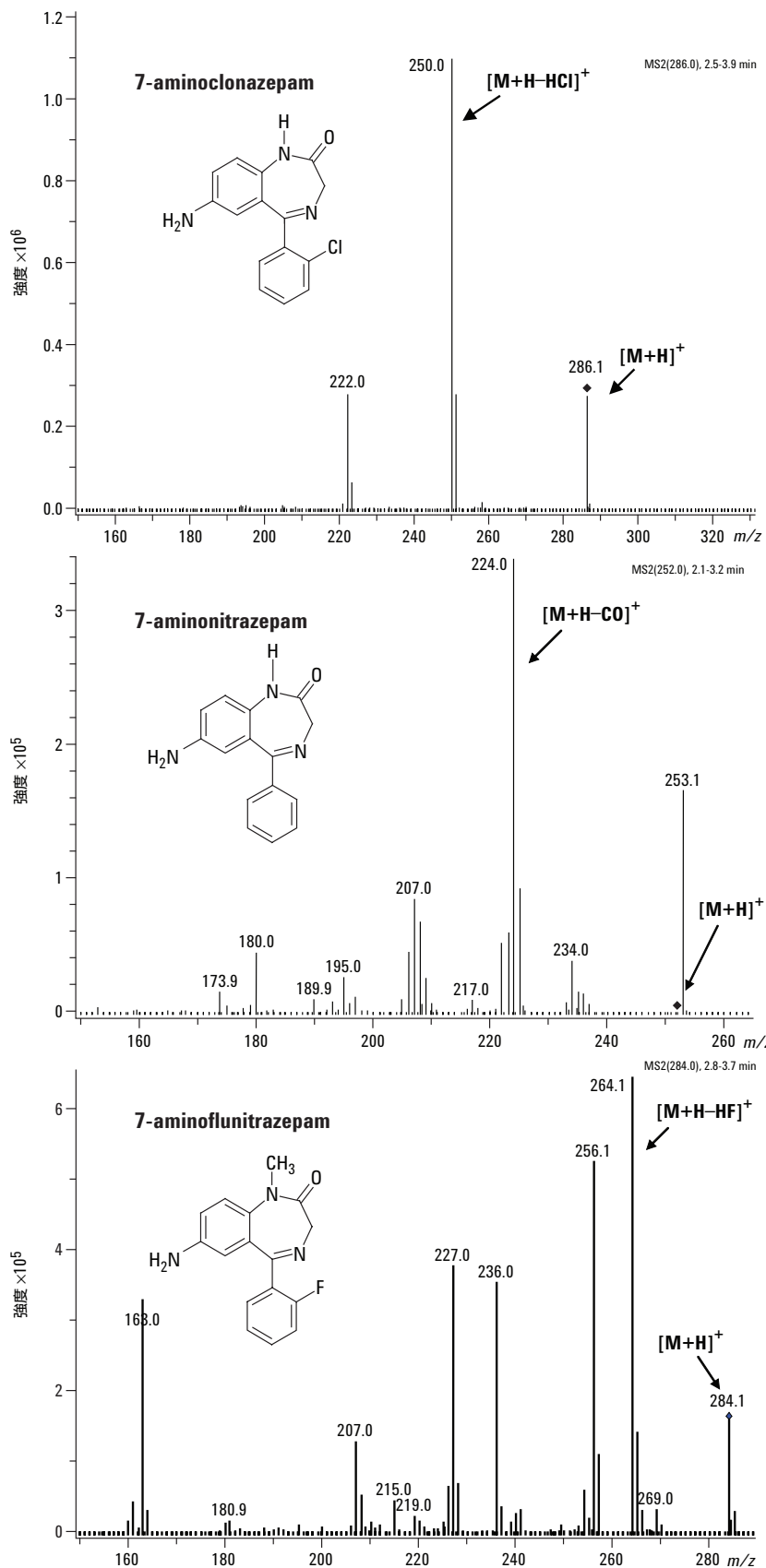


図 3 (続き) クロナゼパム、ニトラゼパム、フルニトラゼパム、7-アミノクロナゼパム、7-アミノフルニトラゼパム、7-アミノフルニトラゼパムの構造および MS/MS スペクトル



HCl と HF を失う分析対象化合物の構造上の類似性に注目されたい。フルラゼパムとプラゼパムは図 4 に示されるとおりアルキル基を失う。アルキルアミノ置換基全体

が既に失われているデスアルキルフルラゼパム代謝物は、CO の脱離に対応する主要イオンになり、異なった開裂挙動を持つ。

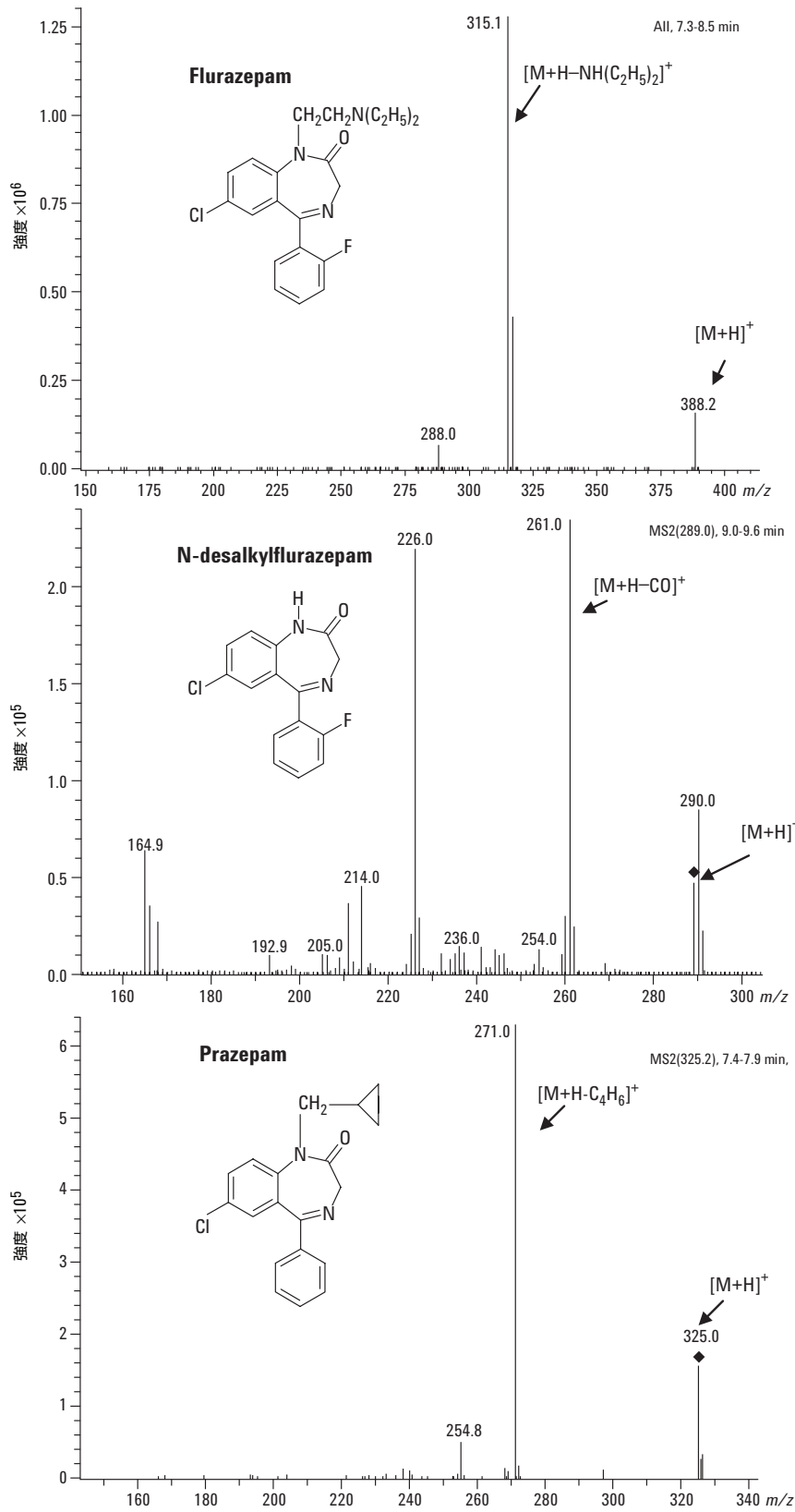


図 4. フルラゼパム、N- デスアルキルフルラゼパム、プラゼパムの構造および MS/MS スペクトル

図 5 は、これらの条件下でのアルプラゾラムからの N<sub>2</sub> の脱離を示す。この構造は、同様に 5 員環から N<sub>2</sub> を失うトリアゾラム (図 2) の構造と非常に似ている。

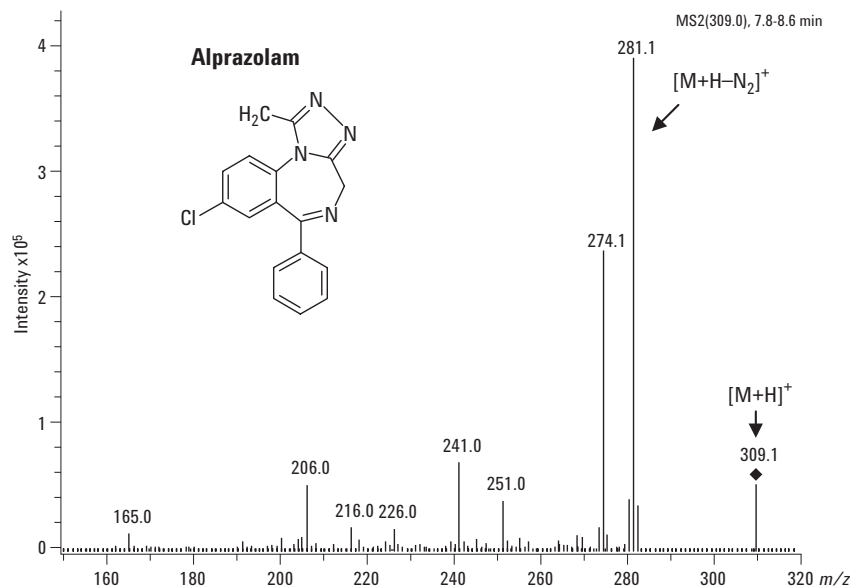


図 5. アルプラゾラムの構造および MS/MS スペクトル

図 6 は、図 4 の N-デサルキルフルラゼパムと同様に CO の元素を失う、他の数種類のベンゾジアゼピンを示す。すべて縮合ベンゼン環の 7 位にハロゲンを持つが、3 種類すべてが 7 員環から CO を失うことは興味深い。

ハロゲンが非縮合ベンゼン環の 2' 位にある 7-アミノクロナゼパムおよび 7-アミノフルニトラゼパム (図 3) からの HX 脱離は注目すべき点である。

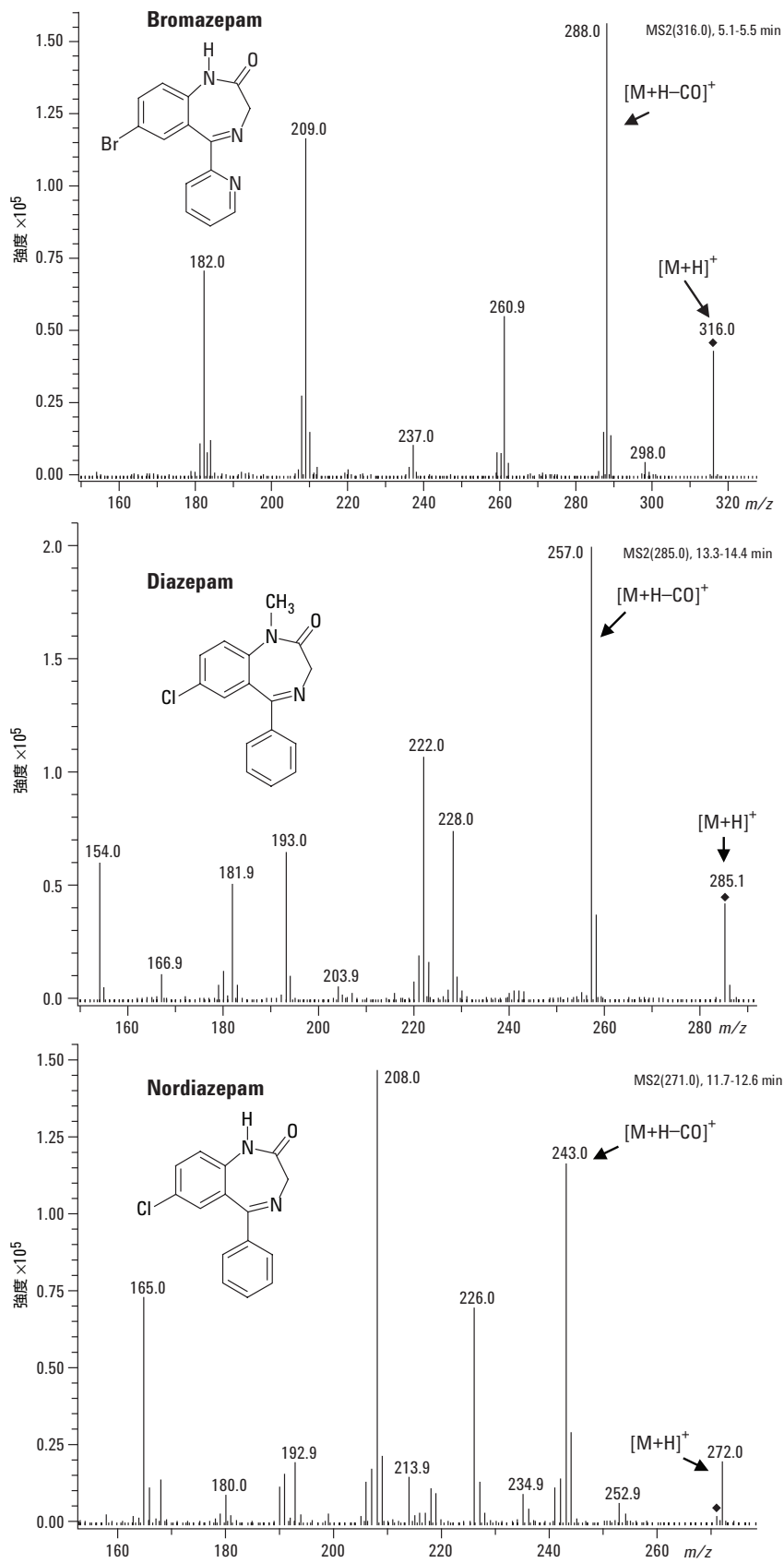


図 6. プロマゼパム、ジアゼパム、ノルジアゼパムの構造および MS/MS スペクトル

図 7 で、クロバゼムは極めてシンプルな MS/MS スペクトルおよび独特の CH<sub>2</sub>CO の脱離を示す。

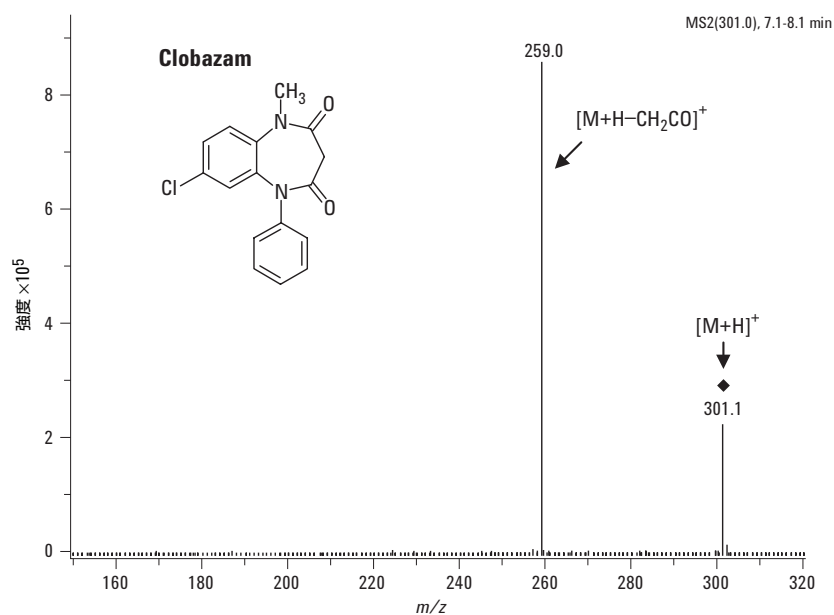


図 7. クロバザムの構造および MS/MS スペクトル

図 8 は、Agilent LC/MSD Trap の重要な機能を使用して得られた残りのベンゾジアゼピンの MS/MS スペクトルを示す。メソッド最適化段階での最初の MS/MS スペクトル調査では、ロラゼパム、オキサゼパム、およびテマゼパムは、水の元素の脱離の結果による主生成イオンを持つことが分かっていた。これは同定目的に利用できる特異的な脱離ではないため、以下の技術を使用して、各化合物に関してより個別な情報を含む MS/MS スペクトルが取得した。開裂ウィンドウを 10 amu から 40 amu に拡大することで（前駆イオン質量を中心として ± 20 amu）、開裂エネルギーが [M+H]<sup>+</sup> と [M+H-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> イオンの両方に与えられ、結果として生じる MS/MS スペクトルは同定にとってさらに特異的である。

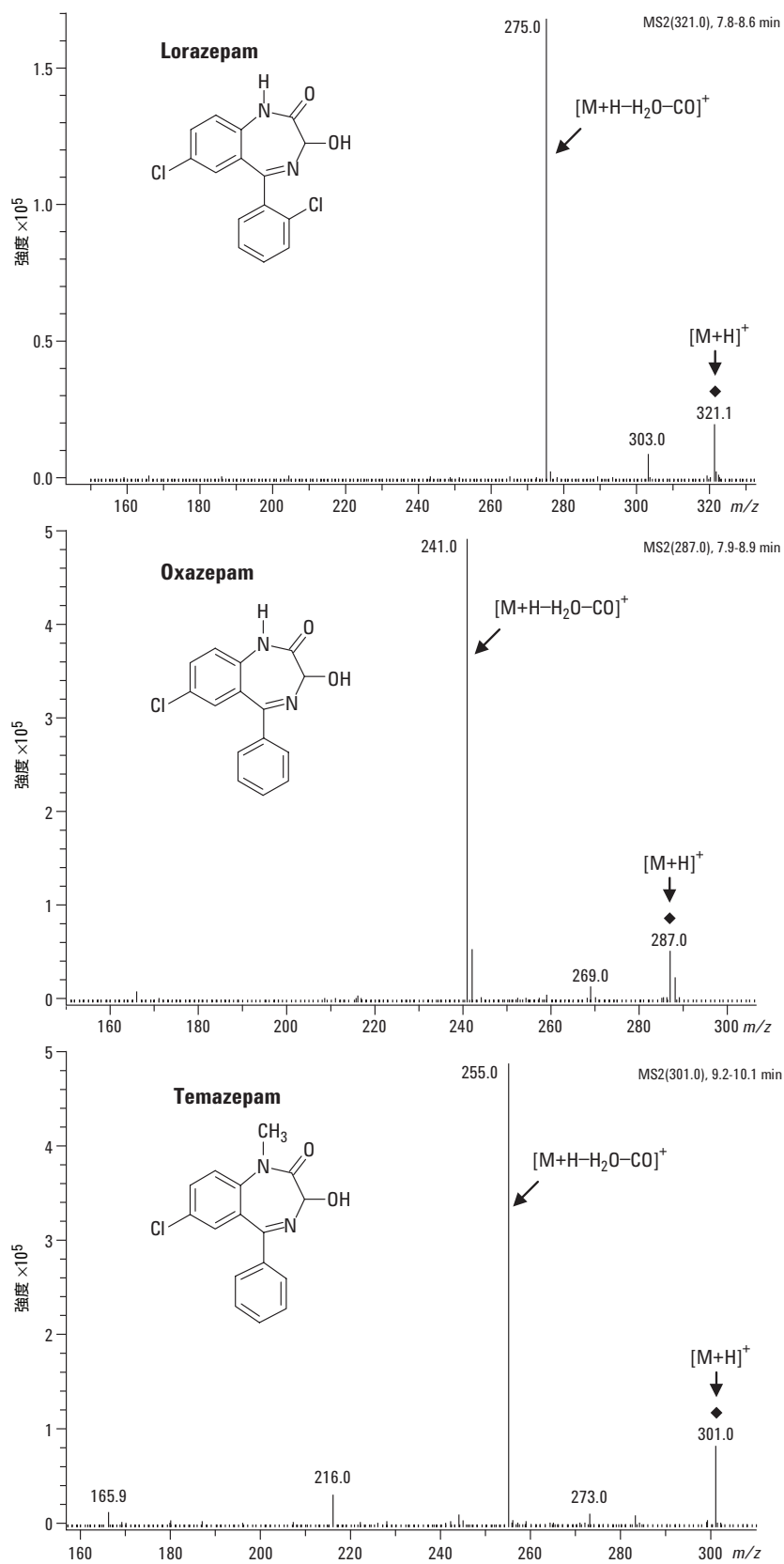


図 8. ロラゼパム、オキサゼパム、テマゼパムの構造および MS/MS スペクトル

たとえば、テマゼパムでは、開裂により  $m/z$  283.0 の水脱離イオン、そして  $m/z$  255.0 の水脱離に加えて CO 脱離イオンを生じることがある。40 amu の開裂ウィンドウを使用して、 $m/z$  301.0 の擬分子イオンだけでなく、水脱離イオンにも開裂エネルギーが与えられる場合、 $m/z$  255.0 の強度は改善され、結果として容易な検出と正確な同定が可能になる。

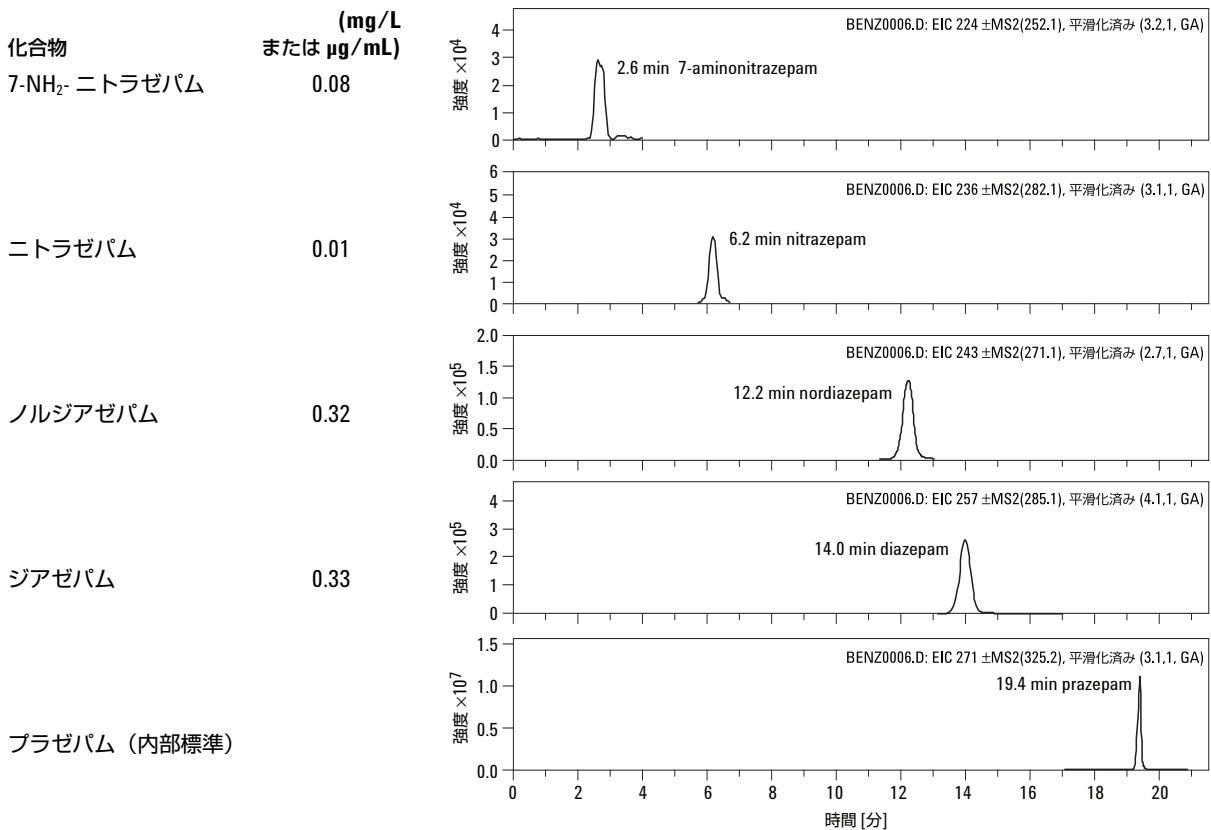
**法中毒学事例への応用**

複数薬物の過剰摂取、性的暴力被害者、および自動車事故被害者を含む幅広い種類の症例からの血液抽出物が、この LC/MS/MS 手法で分析された。このスクリーニングメソッドを使用して多くのベンゾジアゼピン類が同定され、GC/ECD または HPLC-UV でその後定量される。事例の幾つかとそれらの血中濃度を表 4 に示す。

ニトラゼパム、7-アミノニトラゼパム、ジアゼパム、ノルジアゼパム、およびプラゼパムを検出した事例 1 の血液試料からのイオンクロマトグラムを図 9 に示す。

**表 4. 薬物中毒事例とそれらの血中濃度**

事例	ベンゾジアゼピン または代謝物	濃度 mg/L
1	ニトラゼパム	0.01
	7-アミノニトラゼパム	0.08
	ジアゼパム	0.33
	ノルジアゼパム	0.32
2	ジアゼパム	0.06
	クロナアゼパム	0.009
	7-アミノクロナゼパム	0.02
3	ブロマゼパム	0.40
4	アルプラゾラム	0.006
	ジアゼパム	0.05
	ノルジアゼパム	0.01
5	ジアゼパム	0.58
	ノルジアゼパム	0.66
	オキサゼパム	0.04
	テマゼパム	0.12
	6	クロバザム



**図 9. 事例 1 からのイオンクロマトグラム**

このような複数薬物の乱用は珍しくなく、この事例で説明されるように、このメソッドにより 1 回の分析で複数のベンゾジアゼピン類および代謝物を容易に検出、確認、および定量できる。

ブランク血液試料からの代表的なイオンクロマトグラムを図 10 に示す。事例 4 (表 4) では、アルプラゾラム 0.006 mg/L (6 ng/mL) を検出できており、しかもフルスキャン MS/MS スペクトルにより明確に同定が得られていることに注目すべきである。事例 4 には、これらの事例で検出される最小濃度のベンゾジアゼピンつまり濃度 6  $\mu\text{g/L}$  (6 ng/mL) のアルプラゾラムが含まれている。

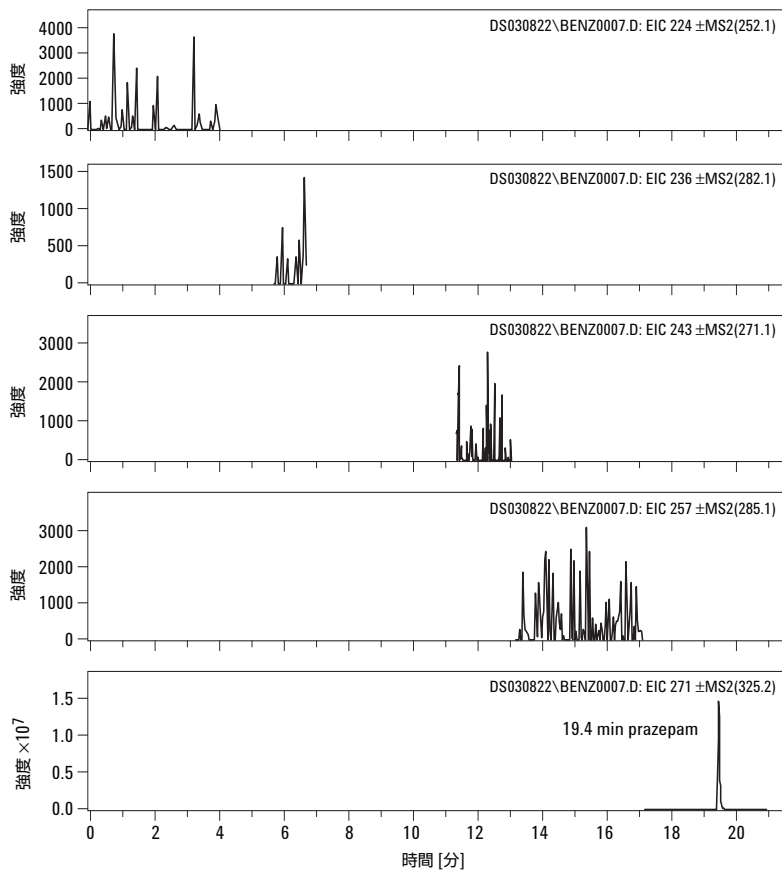


図 10.内部標準を含むブランク血液からのイオンクロマトグラム

## 結論

ここで述べられた LC/MS/MS メソッドにより、単一の操作手順で、オーストラリアで医学的用途に入手できる様々なベンゾジアゼピン類とそれらの代謝物を同定でき、試料調製作業も既存の GC/MS の方法を（誘導体化を要しないで）そのまま利用している。得られる MS/MS スペクトルから、これらの薬物を高い信頼性で同定できる。この分析技法により、わずか 500 µL の血液を使用し、最小治療濃度のベンゾジアゼピン類のスクリーニング分析および同定確認に適している。この手法での事例から、治療濃度および治療濃度以下のベンゾジアゼピン類を同定できることが、表 4 および図 9 のデータから説明した。低濃度の種々のベンゾジアゼピン類が、法中毒学事例で迅速かつ上手く同定されている。

## 参考文献

1. Goodman and Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 11th edition, McGraw-Hill, 1996.
2. O. H. Drummer, (2002) *Forensic Sci.*, **14**, 1.
3. Y. Gaillard, J. Gay-Montchamp and M. Ollagnier, (1993) *J. Chromatogr.* **622**, 197.
4. D. Black, G. Clark, V. Haver, J. Garbin and A. Saxon, (1994) *J. Anal. Toxicol.* **18**, 185.
5. M. Elsohly, S. Feng, S. Salomone and R. Brenneisen, (1999) *J. Anal. Toxicol.* **23**, 486.
6. I. McIntyre, M. Syrjanen, K. Crump, S. Horomidis, A. Peace and O. Drummer, (1993) *J. Anal. Toxicol.* **17**, 202.
7. C. Kratzsch, O. Tenberken, F. T. Peters, A. A. Weber, T. Kraemer and H. H. Maurer, (2004) *J. Mass Spectrom.* **39**, 856-872.
8. H.M. Rivera, G. S. Walker, D. N. Sims, and P. C. Stockham, (2003) *European Journal of Mass Spectrometry*, **9**, 599-607.

このアプリケーションノートの詳細に関しては、Agilent Technologies, Inc.、John Hughes までお問い合わせください

## 謝辞

オーストラリアの著者達に、彼らのメソッドを共有・公開し、忍耐強く本ノートの準備にご協力いただいたことを感謝します。Agilent の同僚 Micael Zumwalt に激励と最初の草稿を、Jeff Keever に批評と有用なアドバイスを感謝します。

## 詳細

弊社の製品およびサービスの詳細情報に関しては、弊社ウェブサイトをご覧ください ([www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp))。

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  
March 7, 2006  
5989-4737JAJP