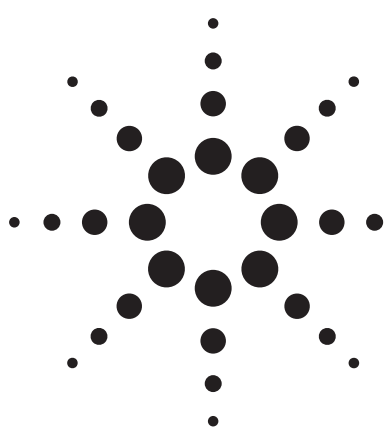


RRHT LC/MS/MS を用いた 毛髪中のベンゾジアゼピン類の分析



アプリケーション

法医学

著者

Christine Moore, Cynthia Coulter, and Katherine Crompton
Immalysis 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、毛髪中のベンゾジアゼピンとその代謝物を分析しました。毛髪サンプルは、洗浄、前処理を行い、混合モード SPE とエレクトロスプレーイオンモードの LC/MS/MS で分析しました。また、カラムは 1.8 μm の粒子径の ZORBAX RRHT C18 を使用しました。

信頼できる同定を行うためには、2 つのイオントランジションをモニターし、1 つのイオン比が既知の校正標準の 20% 以内に存在する必要があります。それぞれの化合物の濃度は、50 ~ 1000 pg/mg でした。日内精度 ($n = 5$) は、7-アミノクロナゼパムでは 1.75% と低く、 α -OH-アルプラゾラムは 11.8% でした。日間精度 (5 日間、日に 1 度) は、ジアゼパムで 2.55% と低く、7-アミノクロナゼパムは 13.4% でした。

1 次イオンに対してある比率内に存在することが求められるクオリファイングイオンを同時にモニターし、信頼できる同定を行った手順としては、我々の知る限りでは最初に紹介されるものです。アジレント独自のソフトウェアの機能により、イオンのトランジションをモニターし、陽性と判定されるキャリブレーション標準の範囲内に入る比率を自動計算することが可能になります。クオリファイングイオンのモニタリングは分析の感度を阻害しますが、結果に対する信頼性は法医学分析において重要な要素です。

緒言

ベンゾジアゼピン類は、不安神経症や不眠症の治療薬、筋弛緩剤、抗痙攣薬として一般的に処方されている薬物です。アルコールや他の薬物と併用すると依存症を引き起こす危険性が指摘されています。ベンゾジアゼピンや大麻は、他の薬物よりも乱用の危険性が多いの専門家から懸念されています [1]。生体試料として頭髪を用いると、長さによって薬物使用の履歴を明らかにすることができます。また、採取が簡単であるため、頭髪は便利な試料と言えます。

かつては薬物乱用による性的暴行に起因する薬物は 1 種類のみであると報告されていましたが [3]、Scott と中原は 2003 年に、8 種類のベンゾジアゼピン類が関係していたことを示しました [2]。Miller らは、LC/MS/MS で毛髪から 9 種類のベンゾジアゼピン類を分析した事例を報告しました。毛髪サンプルから検出された薬物の濃度は 30 pg/mg からジアゼパムの 200 pg/mg 以上に及びました [4]。



Agilent Technologies

毛髪中の 14 種類のベンゾジアゼピンと 5 種類の代謝物を分析しました。信頼性の高い定性を行うため、ブライマリオンに対してクオリファイングイオンが一定の範囲に収まるかを同時にモニターしました。アジレント・ソフトウェアの機能はトランジションを自動的にモニターし、各イオンの比を自動的に計算してキャリブレーション標準に対して一定の値の範囲に収まっているかを判断します。クオリファイングイオンをモニターすることは分析の感度を抑制する場合がありますが、法医学分析では信頼性の高さが優先されます。定量下限は頭髪 1 mg あたり 50 pg で、日内精度 (n = 5) は 7-アミノクロナゼパムで 1.75%、 α -ヒドロキシアルプラゾラムで 11.78%、日間精度 (n = 5) はジアゼパムで 2.55%、7-アミノクロナゼパムで 13.37% でした。

これらの化合物は、別のアジレントアプリケーションノート (5989-7072EN) で血中および尿中分析の例として紹介しています。構造式は当該資料を参照してください。

実験

サンプル前処理

溶媒と試薬

すべての溶媒は HPLC グレード以上、試薬はすべて ACS クラスで、Spectrum Chemical (カルフォルニア州、Gardena) から購入しました。

標準試料 (Cerilliant [テキサス州、Round Rock] から購入)

内部標準混合液: 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-ノルジアゼパム; D5-ジアゼパム (100 ng/mL)

非ラベル薬物: 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 -OH-アルプラゾラム; α -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

各キャリブレーションレベルで、毛髪 10 mg を塩化メチレン 1.5 mL で簡単に洗い、ムース、スプレー、ジェルなどの整髪剤を取り除き、放置して乾燥しました。毛髪を小片に切断し、下記のとおり測定対象化合物と重水素化内部標準を加えました。

検量線:

コントロール:	重水素化原液 (100 ng/mL) 50 μ L
50 pg/mg:	重水素化原液 (100 ng/mL) 50 μ L 原液 (100 ng/mL) 5 μ L
100 pg/mg:	重水素化原液 (100 ng/mL) 50 μ L 原液 (100 ng/mL) 10 μ L
500 pg/mg:	重水素化原液 (100 ng/mL) 50 μ L 原液 (100 ng/mL) 50 μ L
1 ng/mg:	重水素化原液 (100 ng/mL) 50 μ L 原液 (10 ng/mL) 100 μ L

重水素化内部標準 (50 μ L) も、バリデーションに使用した習熟サンプルに加えました。

毛髪抽出物緩衝液 (0.025 M リン酸緩衝液、pH 2.7; 1.5 mL) 加え、混合します。

75 °C で 2 時間超音波にかけ、静かにデカントします。

0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0、1 mL) を加え、ボルテックスします。

抽出チューブ (CSDAU020) を真空マニホールドに設置します。

各カラムのコンディショニング:

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)

重要: カラム床が乾燥しないように注意してください。

カラムからサンプルを注ぎ、乾燥させます。

以下の溶媒で各カラムを洗い流します。

脱イオン水 (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)
カラムを乾燥させ、ヘキサン (1 mL)で

カラムを洗浄します。

薬物を溶出させます: 酢酸エチル + 2% 水酸化アンモニウム (2 mL)

窒素気流下で蒸発乾固させます(20 psi/37 °C)

水 (50 µL) に再溶解し、オートサンブラに移してキャップします。

分析手順

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

LC 条件:

カラム: ZORBAX RRHT Eclipse XDB C18、4.6 mm x 50 mm x 1.8 µm (PN: 922975-902)

フルニトラゼパム、ニトラゼパム、クロナゼパムの7-アミノ代謝物は、流量が 0.2 mL/min でも速やかに溶出しました。グラジエントと流量の最適化を試みましたが、3つの代謝物については満足できるクロマトグラムを得ることができませんでした。その後、別々のメソッドを実行し、3.5分で3つの代謝物をモニターしました。個別のメソッドを用いたことでクロマトグラフと感度を大幅に改善することができました。この研究では、内径 4.6 mm のカラムを用いて良好な結果を得ましたが、同じ流量で感度を向上させるために、粒径 1.8 µm、内径 2.1 mm のカラムを推奨します。

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、pH 8.6
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

ポストタイム: オフ

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 (初期)

移動相: A = 20 mM ギ酸アンモニウム、pH 8.6
B = アセトニトリル-アイソクラティック、50% B

時間 (分)	流量 (mL/min)
0	0.2
6.5	0.2
8	1
10	0.2

ストップタイム = 10分、ポストタイム = 5分

MS 条件:

操作:	エレクトロスプレー ESI ポジティブモード
	7-アミノ代謝物 その他のベンゾジアゼピン
ガス温度:	350 °C 300 °C
ガス流量 (N ₂):	6 L/min 6 L/min
ネブライザ圧力:	20 psi 50 psi
キャピラリー電圧:	4,000 V 4,500 V

マルチプルリアクションモニタリング (MRM) トランジションを表 1 に示します。すべての化合物について、プリカーサイオンは最初の四重極で低解像、2.5 amu と FWHM で操作しました。次の四重極ではプロダクトイオンを 0.7 amu で操作しました。

リテンションタイムは、定量メソッドで使用されます。各化合物を最適化するためには、フラグメンタ (Frag) 電圧と衝突エネルギー (CE) のパラメータを調整する必要があります。フラグメンタは、イオン源とアナライザの間にあるイオントランジション光学機器の一部で、指定した化合物のプリカーサイオンをトランジションします。このパラメータは、対応する標準試料のフローインジェクション分析 (FIA) (フラグメンタ電圧を注入ごとに変え、最適なレスポンスが得られる電圧を特定する) によって、各化合物ごとに最適化されます。

フラグメンタ電圧が最適化されると、クオンティファイアとクオリファイアイオン両方の最適なコリジョンエネルギー電圧が測定されます。クオンティファイアイオンは、全体で最も高いシグナルレスポンスを持つ生成物イオンです。クオリファイアイオンは、2 番目に強いレスポンスを持つ生成物イオンでクオンティファイアイオンとのピーク面積の比に基づいて薬物が同定されます。

表 1. ベンゾジアゼピンのマルチプルリアクションモニタリング (MRM) トランジション

化合物	RT (分)	MRM トランジション	Frag (V)	CE (V)
7-アミノ代謝物のみ:				
D7-7-アミノフルニトラゼパム	1.102	291 > 263	120	25
7-アミノクロナゼパム	0.94	286 > 222 (121)	200	25 (25)
7-アミノニトラゼパム	0.95	252 > 121 (208)	120	30 (35)
7-アミノフルニトラゼパム	1.104	284 > 226 (256)	160	30 (25)
残りのベンゾジアゼピン:				
セグメント 1 (0.0 分)				
α -OH-トリアゾラム	3.71	359 > 331 (176)	120	25 (25)
α -OH-アルプラゾラム	3.72	325 > 297 (216)	120	30 (35)
プロマゼパム	3.85	316 > 288 (209)	160	20 (30)
セグメント 2 (4.1 分)				
D5-オキサゼパム	4.40	292 > 246	120	20
オキサゼパム	4.44	287 > 241 (269)	120	20 (20)
D5-アルプラゾラム	4.57	314 > 286	160	25
アルプラゾラム	4.63	309 > 281 (274)	160	25 (30)
ロラゼパム	4.67	321 > 275 (229)	140	25 (35)
トリアゾラム	4.79	343 > 308 (239)	120	35 (35)
ニトラゼパム	4.85	282 > 236 (180)	160	25 (35)
クロルジアゼポキシド	5.07	300 > 283 (227)	120	15 (30)
D4-クロナゼパム	5.07	320 > 274	120	25
クロナゼパム	5.12	316 > 270 (214)	120	25 (35)
セグメント 3 (5.6 分)				
D5-テマゼパム	6.34	306 > 260	120	25
テマゼパム	6.43	301 > 255 (177)	120	35 (40)
フルニトラゼパム	6.44	314 > 268 (239)	160	30 (35)
ノルジアゼパム	6.46	271 > 140 (165)	160	30 (30)
ミダゾラム	7.05	326 > 291 (249)	200	30 (40)
セグメント 4 (7.4 分)				
D5-ジアゼパム	7.78	290 > 262	160	25
ジアゼパム	7.83	285 > 257 (222)	160	25 (25)
フルラゼパム	8.08	388 > 315 (288)	160	25 (25)

* () クオリファイアイオン; クオリファイア比はキャリブレーションポイントの 20% 以内である必要があります。

LC/MS/MS メソッドバリデーション

メソッドは、直線範囲、相関係数、日内および日間再現性 (n = 5、5 日間連続) で検証しました。検量線は原点を含みます。検量線と相関係数 (R^2) の標準的な式を表 2 に、分析の日間精度と真度を表 3 に示します。

さらに、分析の日内精度と真度を表 4 に示します。濃度 100 pg/mg での分析は堅牢、精密、正確で、50 ~ 1,000 pg/mg で線形でした。すべての薬物の、日内、日間精度はともに 20% 未満で、大部分のベンゾジアゼピンの変動は 10% 未満でした。図 1 には、尿中のオキサゼパムの標準的な検量線を示します ($R^2 > 0.9996$)。

表 2. 毛髪中のベンゾジアゼピンの直線性、相関係数、許容クォリファイア比

測定対象化合物	方程式	相関係数 (R ²)	クォリファイイング比 (範囲 20%)
7-アミノフルニトラゼパム	y = 0.0013x	0.9984	69.4 (55.5–83.3)
7-アミノニトラゼパム	y = 0.0112x	0.9678	8.6 (6.9–10.3)
7-アミノクロナゼパム	y = 0.0027x	0.9978	84.5 (67.6–101.4)
α-ヒドロキシアルプラゾラム	y = 0.0001x	0.9992	51.7 (41.4–62.0)
α-ヒドロキシトリアゾラム	y = 0.000073x	0.9964	95.5 (76.4–114.6)
アルプラゾラム	y = 0.001x	0.9999	15.6 (12.5–18.7)
プロマゼパム	y = 0.00035x	0.9974	61.3 (49.0–73.6)
クロルジアゼポキシド	y = 0.0004x	0.9996	91.3 (73.0–109.6)
クロナゼパム	y = 0.0015x	0.9999	30.1 (24.1–36.1)
ジアゼパム	y = 0.0012x	0.9987	76.0 (60.8–91.2)
フルニトラゼパム	y = 0.00038x	0.9946	56.5 (45.2–67.8)
フルラゼパム	y = 0.0011x	0.9998	11.9 (9.5–14.3)
ロラゼパム	y = 0.00005x	0.9832	34.5 (27.6–41.4)
ミダゾラム	y = 0.00064x	0.9994	31.2 (25.0–37.4)
ニトラゼパム	y = 0.00026x	0.997	47.7 (38.1–57.2)
ノルジアゼパム	y = 0.00036x	0.9955	59.6 (47.7–71.5)
オキサゼパム	y = 0.001x	0.9996	26.0 (20.8–31.2)
テマゼパム	y = 0.00045x	0.9987	39.1 (31.3–46.9)
トリアゾラム	y = 0.00036x	0.9998	75.2 (60.2–90.2)

表 3. 毛髪中のベンゾジアゼピンの日間分析の SD、CV、精度 (100 pg/mg、n = 5)

対象化合物	平均	SD	CV (%)	精度 (%)
7-アミノフルニトラゼパム	103.38	13.80	13.35	96.73
7-アミノニトラゼパム	93.72	11.54	12.31	106.70
7-アミノクロナゼパム	101.50	13.57	13.37	98.52
α-ヒドロキシアルプラゾラム	105.56	3.23	3.06	94.73
α-ヒドロキシトリアゾラム	106.38	3.91	3.67	94.00
アルプラゾラム	97.70	6.77	6.93	102.35
プロマゼパム	98.78	5.42	5.49	101.24
クロルジアゼポキシド	95.24	9.07	9.52	105.00
クロナゼパム	101.66	5.59	5.50	98.37
ジアゼパム	100.38	2.56	2.55	99.62
フルニトラゼパム	100.52	12.24	12.18	99.48
フルラゼパム	96.98	11.44	11.80	103.11
ロラゼパム	107.72	12.38	11.50	92.83
ミダゾラム	97.18	6.38	6.57	102.90
ニトラゼパム	107.90	7.03	6.51	92.68
ノルジアゼパム	106.14	5.25	4.95	94.22
オキサゼパム	100.28	11.33	11.30	99.72
テマゼパム	97.56	4.66	4.78	102.50
トリアゾラム	103.52	10.82	10.45	96.60

表 4. 毛髪中のベンゾジアゼピンの日内分析の SD、CV、精度 (100 pg/mg、n = 5)

対象化合物	平均	SD	CV (%)	精度 (%)
7-アミノフルニトラゼパム	99.78	5.43	5.44	100.22
7-アミノニトラゼパム	107.73	12.28	11.40	92.83
7-アミノクロナゼパム	110.58	1.94	1.75	90.43
α-ヒドロキシアルプラゾラム	93.24	10.99	11.78	107.25
α-ヒドロキシトリアゾラム	97.00	5.13	5.29	103.09
アルプラゾラム	97.72	4.28	4.38	102.33
プロマゼパム	93.00	7.13	7.66	107.53
クロルジアゼポキシド	91.36	7.00	7.66	109.46
クロナゼパム	92.98	5.32	5.72	107.55
ジアゼパム	102.32	3.70	3.62	97.73
フルニトラゼパム	106.24	4.87	4.59	94.13
フルラゼパム	87.98	4.98	5.66	113.66
ロラゼパム	99.86	5.39	5.40	100.14
ミダゾラム	94.52	6.79	7.18	105.80
ニトラゼパム	104.48	6.63	6.35	95.71
ノルジアゼパム	107.38	5.32	4.96	93.13
オキサゼパム	91.62	9.29	10.14	109.15
テマゼパム	93.66	3.12	3.33	106.77
トリアゾラム	107.80	5.05	4.68	92.76

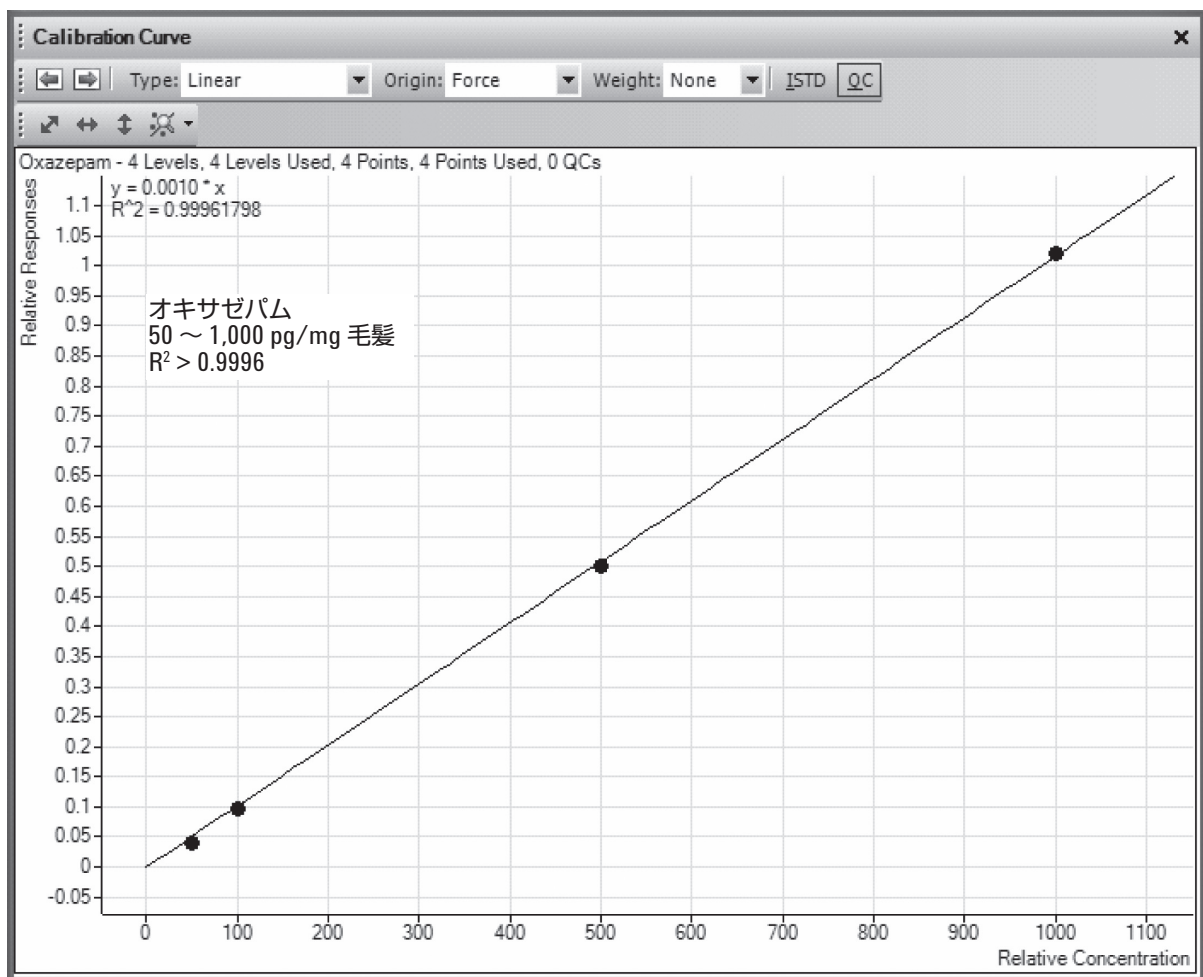


図 1. 直線近似、原点を含み、重み付けなしを用いたオキサゼパムの検量線

結果と考察

毛髪中の 14 種のベンゾジアゼピン類と 5 種類の代謝物を迅速に分析する方法を示しました。微粒子充てんのカラムを用いて各々のピークが分離されました (図 2)。この LC 分析条件では、7-アミノニトラゼパム、フルニトラゼパム、クロナゼパムは分離が悪かったため、高速分析 (3.5 分) で個別に分析しました。

図 3 には、濃度 50 pg/mg のミダゾラムを毛髪から検出したクロマトグラムを示します。この研究で使用した同定の条件は、クオンティファイアとクオリファイアイオンのピーク面積比が予想比の許容誤差 $\pm 20\%$ 以内であることです。このキャリブレーション濃度では、予想比は 31% で、35% の許容誤差内であることが分かりました。

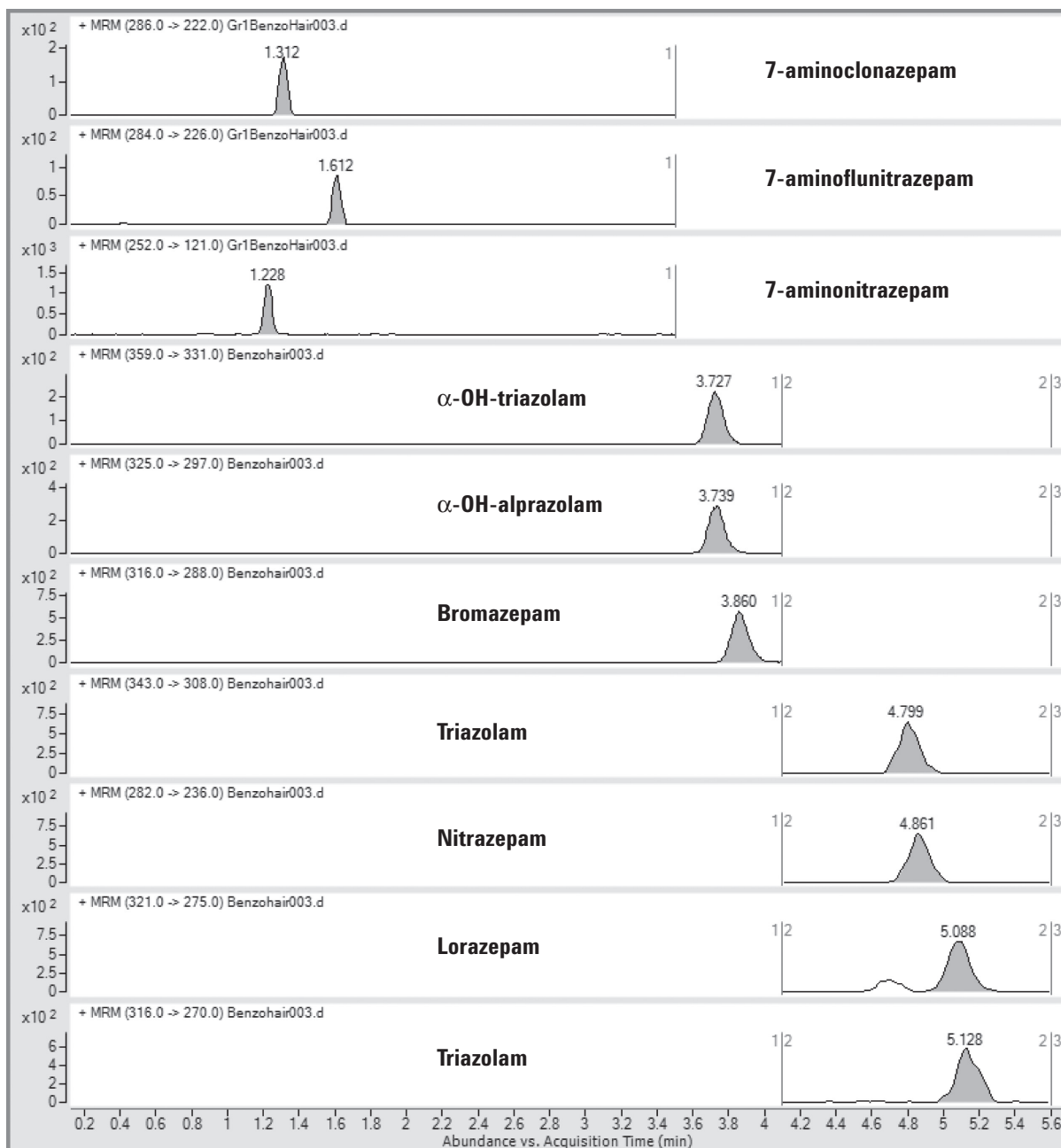


図 2. 毛髪から抽出されたベンゾジアゼピン (100 pg/mg):一次トランジション (クオンティファイア)

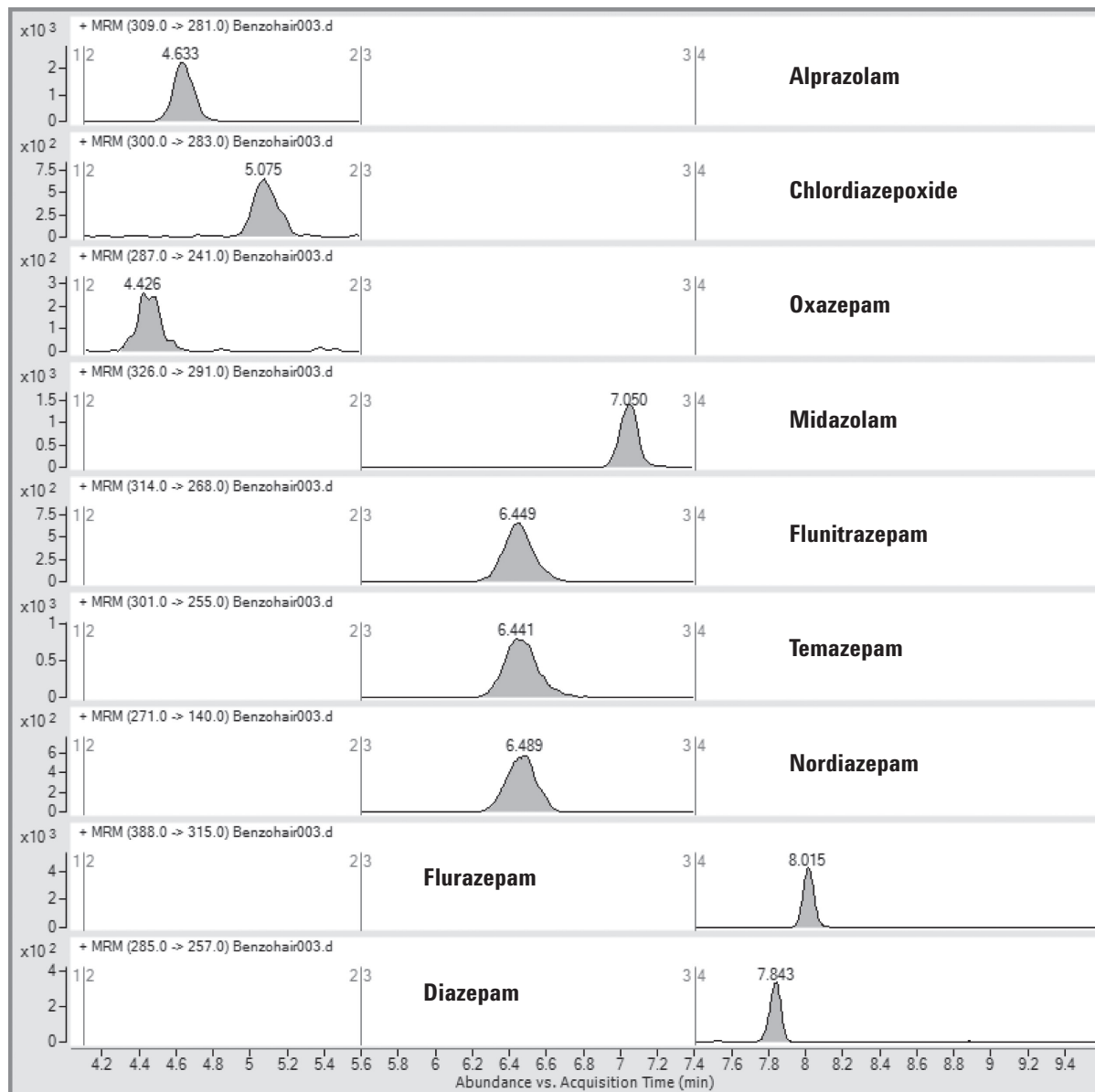


図 2. 毛髪から抽出されたベンゾジアゼピン (100 pg/mg): 一次トランジション (クオンティファイア)(続き)

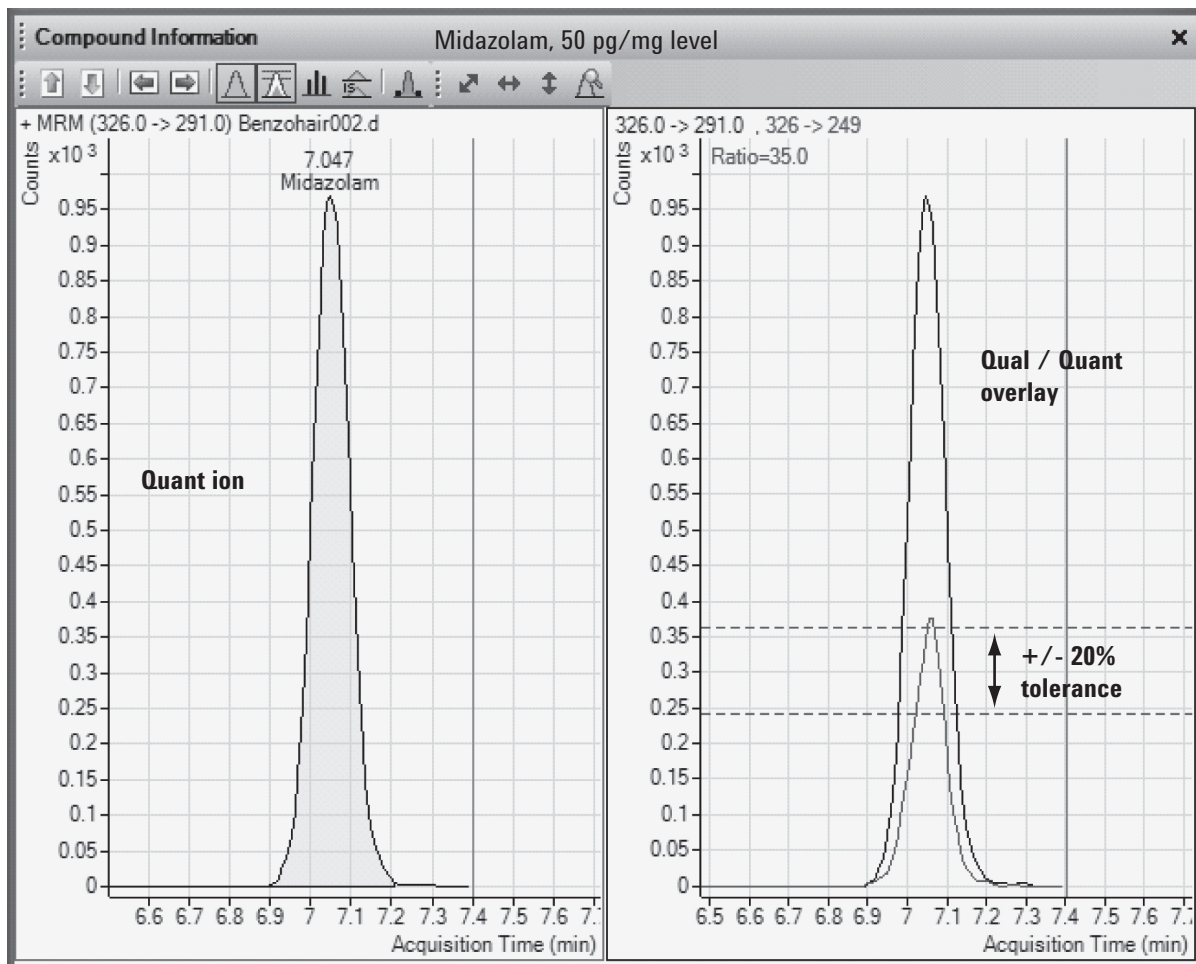


図 3. クオリファイイオンのクオンティファイイオンに対するピーク面積比を用いたミダゾラムの確認

結論

本資料で紹介したアジレントのトリプル四重極 LC/MS/MS システムを用いた分析手法は、毛髪中のベンゾジアゼピンの検出に適しています。これは、一次トランジションに対してクオリファイイングトランジションの強度が特定の比率内に収まらなければならないという手法を取った最初の分析メソッドです。

参考文献

1. M. R. Baldisseri, "Impaired Healthcare Professional," *Crit Care Med* 35(2): S106-116 (2007)
2. K. S. Scott and Y. Nakahara, "A Study into the Rate of Incorporation of Eight Benzodiazepines into Rat Hair," *Forens Sci Int* 133: 47-56 (2003)
3. P. Kintz, M. Villain, M. Cheze, and G. Pepin, "Identification of Alprazolam in Hair in Two Cases of Drug-Facilitated Incidents," *Forens Sci Int* 153: 222-226 (2005)
4. E. I. Miller, F. M. Wylie, and J. S. Oliver, "Detection of Benzodiazepines in Hair Using ELISA and LC-ESI-MS-MS," *J Anal Toxicol* 30(7): 441-448 (2006)

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
October 7, 2008
5989-7270JAJP