



Agilent 6460 による 37 種ベンゾジアゼピン系薬物の高感度一斉分析



＜要旨＞代謝物を含めた 37 種類のベンゾジアゼピン系薬物の Agilent6460LC/MSMS による高感度一斉分析法を開発しました。分離条件を最適化することでトリアゾラム及びエチゾラムの全水酸化体の分離も可能でした。AJS イオン源を使用することで各薬物の検出限界(S/N=3)は 0.006~0.48ng/mL でした。直線性もすべての薬物で決定係数が 0.999 以上と良好でした。

Key Words: ベンゾジアゼピン系薬物、DMRM、LC/MS-MS、法医学

1. はじめに

ベンゾジアゼピン系向精神薬は催眠剤や抗不安薬(マイナートランキライザー)として広く使用されている薬物で入手が安易なことから近年、昏睡強盗などの犯罪に使用される事件が増加しています。また、救命救急センターに入室のベンゾジアゼピン系薬物が関与したと思われる中毒患者の数も増加しています。一般的に、ベンゾジアゼピン系薬物は生体中で迅速に代謝されることから、生体中のベンゾジアゼピン系薬物の分析では代謝物も含めた分析法が必要です。そこで今回、LC/MSMS を使用した 27 種ベンゾジアゼピン系薬物及び 10 代謝物の一斉分析法について紹介します。

2. 装置及び測定条件

分析条件は表.1 に示した通りです。カラムには微小粒子径の逆相系カラムを使用し、移動相には、メタノール及び 0.1%ギ酸+10mM 酢酸アンモニウムを使用したグラジエント条件で測定しました。グラジエント条件はトリアゾラム及びエチゾラムの水酸化体が分離できる条件としました。表.1 の条件で測定したトリアゾラム、エチゾラム水酸化体のクロマトグラムは図.1 に示しましたが、すべての水酸化体の分離が可能でした。質量分析計のイオン源には AJS イオン源を使用し、各薬物の DMRM 条件は表.2 に示しました。プリカーサーイオンはすべてプロトン化分子を選択し、プロダクトイオンは定量用と確認用に強度の上位 2 イオンを選択しました。DMRM 法での測定時間範囲は各薬物ピークのベース幅の 2 倍または保持時間の 10% で大きい方を自動設定しました。

表.1 LC/MSMS によるベンゾジアゼピン系薬物の分析条件

LC	: 1260LC
Column	: ZORBAX Eclipse Plus C18(150mm, 2.1mm, 1.8um)
Mobile phase	: A: MeOH, B: 0.1%HCOOH+10mMHCOONH ₄ 20% A/B---(50min)---65% A
Column temp	: 40°C
Sample volume	: 5uL
Flow rate	: 0.4mL/min
MS	: Agilent 6460 LC-MS
Ionization	: AJS(Positive)
Drying gas	: 10L/min at 350°C
Sheath gas	: 12L/min at 400°C
Nebulizer gas	: 345kPa
Fragmentor	: 100V

表.2 ベンゾジアゼピン系薬物の DMRM 条件

No	Drug name	Precursor	Target	Qual	CE(T)	CE(Q)	RT	Delta RT
1	7-amino-nitrazepam	252	121	94	26	40	3.61	1.01
2	7-amino-clonazepam	286	121	250	30	18	7.02	1.09
3	Cloazolam	349	305	140	22	38	7.84	2.60
4	Haloxazolam	377	333	226	26	38	9.55	2.71
5	7-amino-flunitrazepam	284	135	256	30	22	10.57	1.07
6	Flumazenil	304	258	217	10	22	17.62	1.76
7	Fulrazepam	388	315	317	22	14	20.66	3.00
8	8-OH-Etizolam	359	341	NA	20	NA	20.86	2.09
9	Midazolam	326	291	249	26	38	21.43	2.14
10	Medazepam	271	91	207	38	30	21.61	2.26
11	Bromazepam	316	182	288	34	18	22.40	2.24
12	Chlordiazepoxide	300	283	227	10	22	23.01	2.30
13	Desmethy-FNZ	300	254	198	26	40	23.13	2.31
14	Nitrazepam	282	236	180	22	40	24.78	2.48
15	Clonazepam	316	270	214	22	40	26.17	2.62
16	Flunitrazepam	314	268	239	26	38	27.04	2.71
17	Rilmazefone	475	418	344	18	40	27.26	2.73
18	Nimetazepam	296	250	221	22	38	27.35	2.74
19	1-OH-Triazolam	359	331	NA	25	NA	27.70	2.77
No	Drug name	Precursor	Target	Qual	CE(T)	CE(Q)	RT	Delta RT
20	Estazolam	295	267	NA	22	NA	28.31	2.83
21	9-hydroxy-methyl-brotizolam	409	336	284	26	26	28.70	2.87
22	4-OH-Triazolam	359	341	NA	15	NA	29.05	2.09
23	Clobazam	301	259	224	18	34	29.17	2.92
24	1-OH-Etizolam	359	286	NA	20	NA	29.32	2.93
25	Oxazepam	287	241	269	22	10	29.95	3.00
26	3-OH-brotizolam	409	391	323	14	30	30.30	3.03
27	Lorazepam	321	275	303	18	10	30.88	3.09
28	Alprazolam	309	281	205	26	40	30.96	3.10
29	Triazolam	343	308	NA	25	NA	31.88	3.19
30	Temazepam	301	255	283	22	10	32.36	3.24
31	Brotizolam	393	314	279	22	30	33.59	3.36
32	Nordiazepam	271	140	208	30	26	34.87	3.49
33	Etizolam	343	314	NA	20	NA	35.03	3.50
34	Fludiazepam	303	211	154	34	30	35.48	3.55
35	Diazepam	285	193	154	34	26	37.44	3.74
36	Loflazepate ethl	361	259	287	34	18	41.03	4.10
37	Clotiazepam	319	291	154	22	30	41.87	4.19



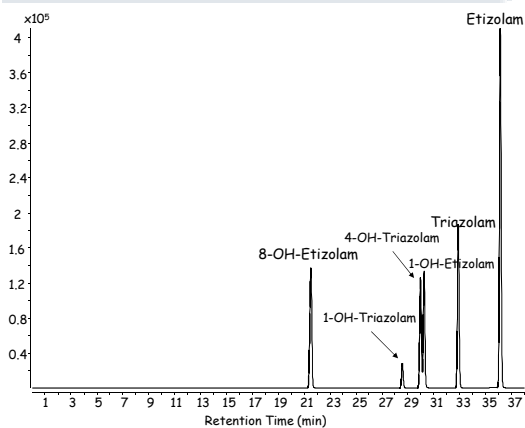


図.1 トリアゾラム、エチゾラム及び水酸化体の MRM クロマトグラム

3. 結果及び考察

標準溶液での結果は図.2 に MRM クロマトグラムを示しました。S/N=3 を検出限界とした場合の各薬物の検出限界は表.3 に示しましたが 0.006 ~ 0.48ng/mL でした。直線性は 0.1~100ng/mL の範囲で決定係数が 0.999 以上と良好でした。

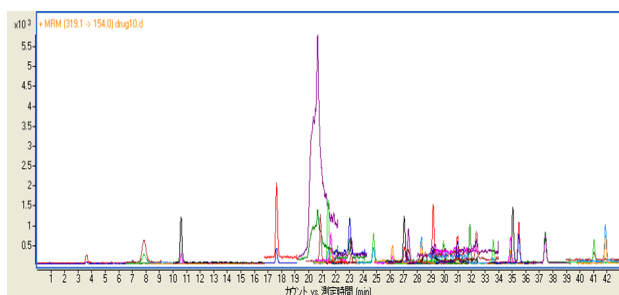


図.2 各薬物の MRM クロマトグラム(0.1ppb)

表.3 各薬物の検出限界及び直線性

No	Drug name	Linearity r^2	LOD S/N=3	No	Drug name	Linearity r^2	LOD S/N=3
1	7-amino-nitrazepam	0.9993	0.03	20	Estazolam	0.9994	0.023
2	7-amino-clonazepam	0.9991	0.01	21	9-hydroxy-methyl-brotizolam	0.9996	0.480
3	Cloazolam	0.9996	0.01	22	4-OH-Triazolam	0.9998	0.150
4	Haloxazolam	0.9999	0.15	23	Clobazam	0.9999	0.038
5	7-amino-FNZ	0.9998	0.01	24	1-OH-Etizolam	0.9995	0.011
6	Flumazenil	0.9999	0.01	25	Oxazepam	0.9998	0.043
7	Fulrazepam	1.0000	0.005	26	3-OH-brotizolam	0.9990	0.333
8	8-OH-Etizolam	0.9999	0.01	27	Lorazepam	0.9998	0.100
9	Midazolam	0.9999	0.01	28	Alprazolam	0.9996	0.027
10	Medazepam	0.9998	0.02	29	Triazolam	0.9999	0.007
11	Bromazepam	0.9994	0.15	30	Temazepam	0.9998	0.030
12	Chlordiazepoxide	0.9999	0.03	31	Brotizolam	0.9998	0.019
13	Desmethyl-FNZ	0.9996	0.04	32	Nordiazepam	0.9993	0.014
14	Nitrazepam	0.9997	0.02	33	Etizolam	0.9999	0.006
15	Clonazepam	0.9999	0.04	34	Fludiazepam	0.9999	0.012
16	Flunitrazepam(FNZ)	0.9999	0.02	35	Diazepam	0.9999	0.014
17	Rilmazefone	0.9960	0.08	36	Loflazeptate ethyl	0.9999	0.014
18	Nimetazepam	0.9997	0.01	37	Clotiazepam	0.9999	0.017
19	1-OH-Triazolam	0.9994	0.04				

濃度単位:ng/mL

実試料には薬物中毒患者の胃内容物の結果を図.3 に示しましたが、Flunitrazepam(FNZ)、その代謝物である Desmethyl-FNZ および Brotizolam が検出されました。しかし、Brotizolam の代謝物である検出された薬物の定量イオンと確認イオンの比率は標準液と良く一致しました。定量結果は表.4 に示した通り

です。

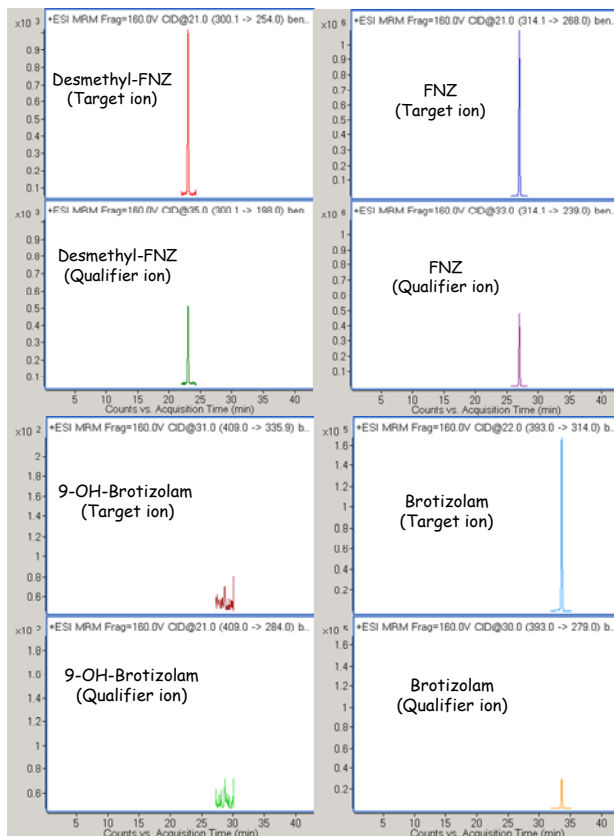


図.3 薬物中毒患者胃内容物中薬物の MRM クロマトグラム

表.4 中毒患者胃内容物中薬物の定量結果(濃度:ng/g)

	Desmethyl-FNZ	FNZ	9-OH-Brotizolam	Brotizolam
胃内容物	5.3	245.0	ND	41.2

4. まとめ

今回、LC/MSMS を用いた 37 ベンゾジアゼピン系薬物の一斉分析法を確立したことで、1ng/mL 以下の微量分析が可能でした。また、確立した分析法を救急救命に運ばれた薬物中毒患者の試料に適応した結果尿、血清、胃内容物から代謝物まで含めた薬物が検出されました。このことから今回確立した方法が薬物中毒患者の原因を解明する有効な手法であること実証されました。

今回の測定は全て日本医科大学法医学教室との共同研究によるものです。

【LCMS-201107TK-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



Agilent Technologies