

# Application News

## No. C183

### Liquid Chromatography Mass Spectrometry

# LCMS™-9030 を用いた生体試料中 Etizolam、Triazolam、およびそれらの代謝物の一斉分析

### はじめに

Etizolam と Triazolam はベンゾジアゼピン系に属する向精神薬で、鎮静剤、睡眠薬、不安緩解放剤、抗てんかん剤、筋弛緩剤としての特性から幅広い用途で使用されています。生体内のベンゾジアゼピン類およびその代謝物は法中毒学分野の分析対象として重要で、LC/MS などを用いたより信頼性の高い薬毒物検査法が求められます。

Etizolam、Triazolam、およびそれらの代謝物 (alpha-Hydroxyetizolam、alpha-Hydroxytriazolam、4-Hydroxytriazolam) は類似した構造を有しているもの (図 1)、分子量が極めて近似しているものがあり、HPLC での分離が難しく、四重極型質量分析計などユニットマス程度の分解能では、*m/z* の違いによる分離が困難です。そこで、超高速液体クロマトグラフ Nexera™ X2 と高分解能を持つ質量分析計である LCMS-9030 を用いることにより、Etizolam、Triazolam、およびそれらの代謝物の一斉分析を行いました。

E. Imoto

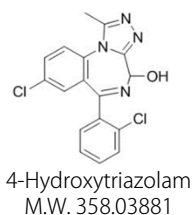
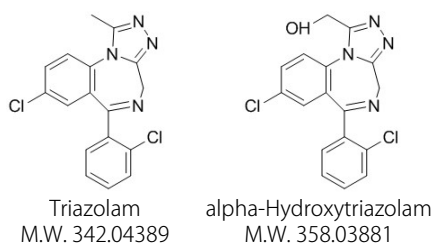
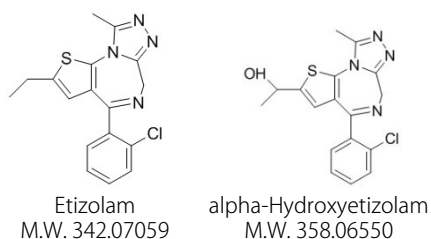


図 1 Etizolam、Triazolam、およびそれらの代謝物の分子構造

### 装置および分析条件

表 1 に HPLC および質量分析計の分析条件を示します。HPLC 条件は代謝物の分離を目的として 1.9 μm の粒子系を有するカラムを採用しました。移動相は 0.1 %ギ酸水およびアセトニトリル (0.1 %ギ酸含む) を用いました。

表 1 分析条件

HPLC 条件	
システム	Nexera X2
カラム	YMC-Triart C18 (1.9 μm、50×2 mm)
移動相 A	0.1 %ギ酸+水
移動相 B	0.1 %ギ酸+アセトニトリル
流速	0.6 mL/min
タイムプログラム	時間 (分)                      B 濃度 (%)
	0.00                              20
	3.00                              20
	11.50                             30
	11.51                             95
	13.00                             95
	13.01                             20
	15.00                             STOP
注入量	2 μL
カラム温度	40 °C
MS 条件	
システム	LCMS-9030
イオン化法	ESI (+)
ネブライザーガス流量	3.0 L/min
ヒーティングガス流量	10.0 L/min
ドライイングガス流量	5.0 L/min
インターフェイス温度	300 °C
DL 温度	250 °C
ヒートブロック温度	400 °C

### 添加血液／血漿試料の前処理

2.0 mL マイクロチューブに Q-sep™ QuEChERS 抽出塩/パケット (Q150/パケット、Restek) の充填剤を 100 mg 加え、3 mm 径のステンレスビーズ 3 個と合わせ、アセトニトリル 300 μL、蒸留水 200 μL、各化合物の標準物質およびヒト全血または血漿 100 μL を添加しました。遠心分離 (10,000 rpm、10 min) を行った後、上澄み液を試料として用いました。なお、マトリクスへの標準品は 10 ng/mL 相当となるように添加し、添加回収試験を行いました。前処理のワークフローを図 2 に示します。



図 2 前処理のワークフロー図

## ■実験結果

図3は Etizolam、Triazolam、およびそれらの代謝物を混合し (50 ng/mL)、測定したXIC (抽出幅: 各化合物の  $m/z$ 理論値  $\pm 2$  mDa) です。Etizolam と Triazolam、alpha-Hydroxyetizolam と alpha-Hydroxytriazolam のような 26 mDa の差の化合物が保持時間の異なるピークとして検出されました。Etizolam と Triazolam は保持時間により十分な分離が可能でした。HPLC による分離が不十分な alpha-Hydroxytriazolam および alpha-Hydroxyetizolam は、精密質量による分離が十分か確認するために各単体を用いて測定を行いました。抽出クロマトグラムの質量幅はそれぞれ個別に設定しました。alpha-Hydroxyetizolam を単独で測定した場合、対象化合物の  $m/z$  理論値  $\pm 2$  mDa ( $m/z$  359.0708-359.0748) で抽出されたXICのみでピークが検出され、抽出幅  $m/z$  359.0441-359.0481のXICではピークは検出されませんでした (図4左図)。また alpha-Hydroxytriazolam を単独で測定した場合も同様に、対象化合物の  $m/z$ 理論値  $\pm 2$  mDa ( $m/z$ 359.0441-359.0481) のXICのみでピーク検出されることを確認しました (図4右図)。alpha-Hydroxytriazolam および alpha-Hydroxyetizolam は保持時間が近接しているため、ピークが重複しますが、この結果から、各化合物の検出に  $m/z$ 理論値  $\pm 2$  mDa のXICを用いることでお互いの化合物の妨害を受けることなく、選択的に定量できることが示されました。

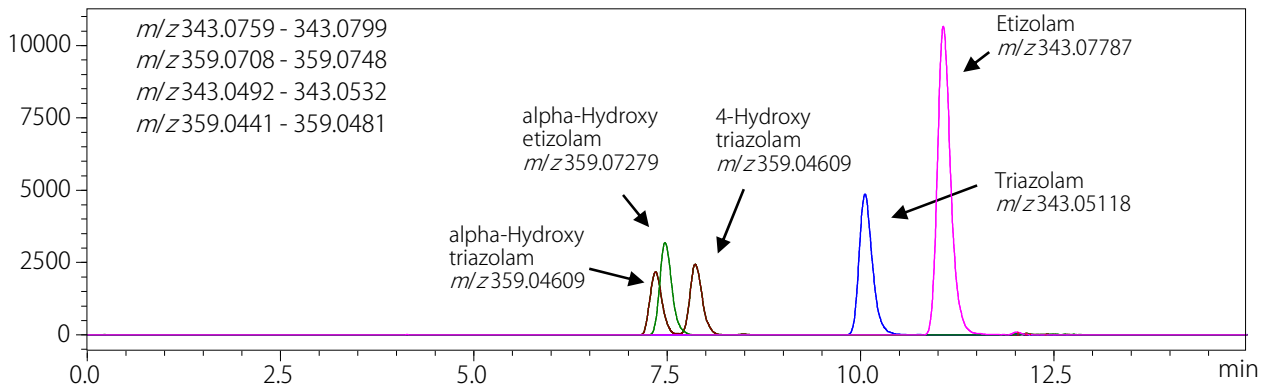


図3 Etizolam、Triazolam、およびそれらの代謝物 (50 ng/mL) のマスククロマトグラム (質量幅: 理論値  $\pm 2$  mDa)

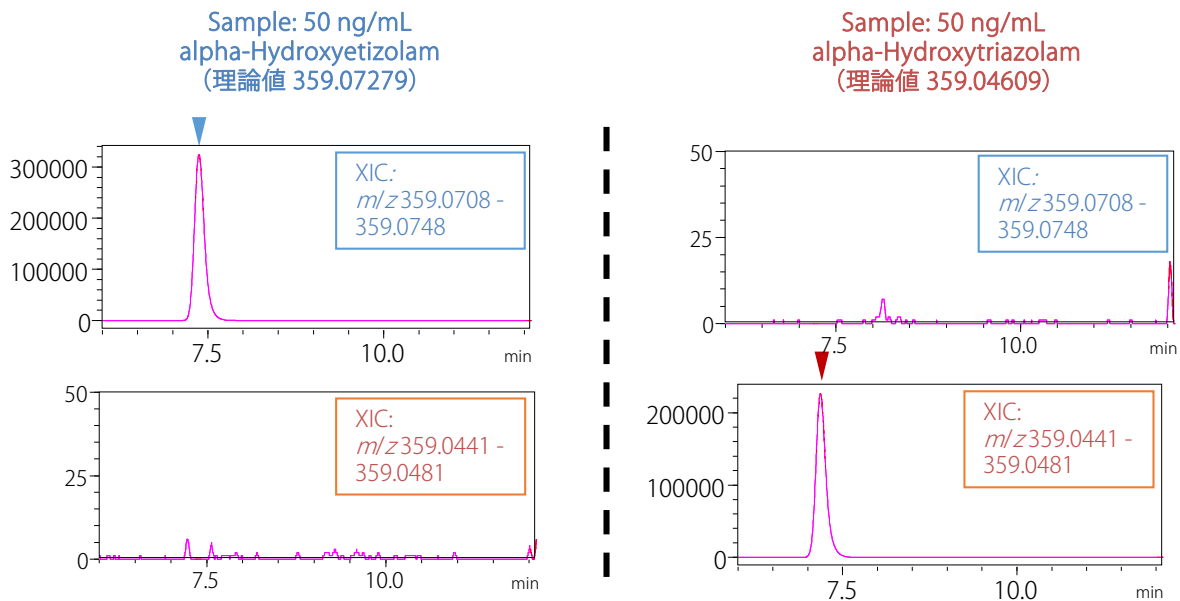


図4 alpha-Hydroxyetizolam と alpha-Hydroxytriazolam の質量分解能による分離

図5に Etizolam、Triazolam、およびそれらの代謝物の標準試料を用いて作成した検量線を示します。また表2に全血あるいは血漿に 10 ng/mL 相当スパイクしたサンプルの添加回収試験の結果を示します。各濃度において十分な感度でそれぞれの向精神薬およびその代謝物を検出することに成功しました。また、各化合物の検量線の決定係数は 0.999 を達成しており、非常に良好な直線性の結果を得ました。この検量線を用いた向精神薬およびその代謝物のマトリクス中における定量結果は、全血中で 105%-115%、血漿中で 117%-131% と良好な結果を得ました。

全血、血漿中にスパイクした向精神薬およびその代謝物、ブランクのマスキングクロマトグラム (図6) を示します。ブランクからはこれらの化合物は検出されておらず、スパイクした全血および血漿中のみから検出されていることがわかります。また、マトリクス中においても alpha-Hydroxytriazolam および 4-Hydroxytriazolam を LC にて分離することができました。

各濃度における標準溶液およびマトリクス中の相対質量誤差を示します (表3)。濃度による相対質量誤差への影響は少なく、-0.229 mDa ~ 0.335 mDa と非常に良好な結果を得ました。また、全血および血漿中においても -0.270 mDa ~ 0.354 mDa の相対質量誤差であり、マトリクス中においても安定した相対質量誤差であることがわかりました。

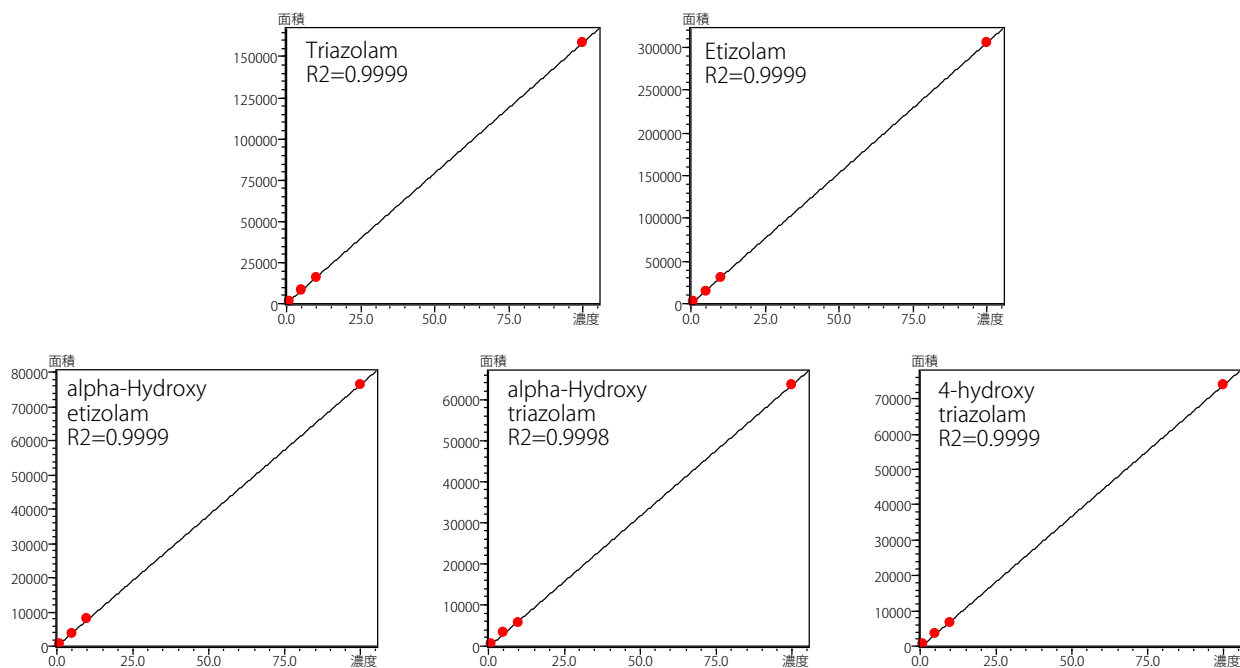


図5 各化合物の検量線 (1-100 ng/mL)

表2 各化合物の定量結果

化合物名	添加濃度 (ng/mL)					
	標準溶液				全血	血漿
	1	5	10	100	10	10
正確さ (%)						
Etizolam	107	96	102	100	105	117
alpha-Hydroxy etizolam	92	97	103	100	105	120
Triazolam	103	99	100	100	109	122
alpha-Hydroxy triazolam	135	107	92	100	113	125
4-Hydroxy triazolam	141	100	96	100	115	131

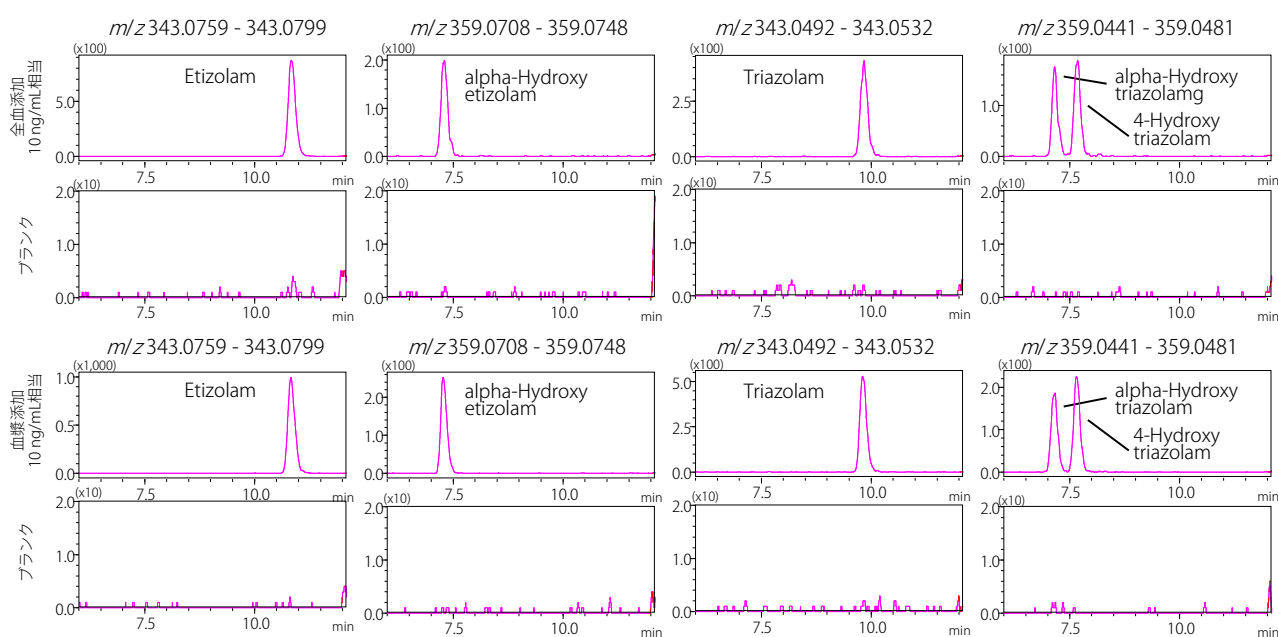


図6 全血、血漿中における各化合物のマスクロマトグラム

表3 各濃度における標準溶液およびマトリクス中の質量誤差 (mDa)

化合物名	添加濃度 (ng/mL)					
	標準溶液				全血	血漿
	1	5	10	100	10	10
	絶対誤差 (mDa)					
Etizolam	0.237	0.152	0.088	0.064	0.271	0.310
alpha-Hydroxy etizolam	0.101	0.335	-0.229	-0.091	0.354	-0.113
Triazolam	0.233	0.142	0.060	0.308	-0.270	0.002
alpha-Hydroxy triazolam	-0.037	-0.145	-0.102	-0.290	0.314	0.048
4-Hydroxy triazolam	-0.157	0.194	0.068	0.195	0.136	0.192

## ■ 結論

高分解能を持つ四重極-飛行時間型質量分析計 (Q-TOF) である LCMS-9030 を用いて Etizolam、Triazolam、およびそれらの代謝物の一斉分析を行いました。LC のみでは全ての化合物を分離することができませんでしたが、Q-TOF の高分解能により、質量差 26 mDa の alpha-Hydroxyetizolam、alpha-Hydroxytriazolam を分離検出することで、全ての化合物を選択的に定量することができました。

段階希釈した標準溶液を用いて作成した検量線の直線性は良好であり、全血、血漿中の定量結果も高い確度を示しました。

質量誤差の結果から、濃度やマトリクスによる影響を受けることなく、高い質量精度で安定して測定できることが示されました。

## <謝辞>

本分析は名古屋大学大学院医学系研究科 法医・生命倫理学講座 財津桂先生のご協力の下、行いました。

- ・ 本文書に記載されている製品は、医薬品医療機器等法に基づく医療機器として承認・認証を受けた機器ではありません。
- ・ 本文書に記載されている分析手法を診断目的で使用することはできません。

LCMS および Nexera は株式会社島津製作所の商標です。  
Q-sep は Restek Corporation の商標です。