

## 簡素化されたミックスモードサンプル前処理戦略による尿中のベンゾジアゼピンと Z ドラッグの LC-MS/MS 分析

---

Jonathan P. Danaceau, Erin E. Chambers

Waters Corporation

研究目的のみに使用してください。診断用には使用できません。

---

### 要約

このアプリケーションノートでは、尿中のベンゾジアゼピンおよび代謝物の分析のための迅速で簡素化された固相抽出プロトコルおよび LC-MS/MS 分析法について説明しています。

Oasis MCX 吸着剤の独自の水湿潤性により、回収率や再現性を損なうことなく、一般的なコンディショニングおよび平衡化ステップを省くことができます。Oasis のこの特性により、加水分解ステップ全体を Oasis MCX  $\mu$ Elution プレーートのウェル内で行うことができます。これにより、時間がかかり、ミスが発生しやすい移送ステップが不要になり、インキュベーション後のステップの合計数を 9 回から 5 回に減らすことができます。この抽出手順と CORTECS C<sub>18</sub>+ カラムのクロマトグラフィー、および Xevo TQ-S micro 質量分析計の高感度で再現性のある定量を組み合わせることにより、迅速で効率的かつ正確性の高いメソッドが得られます。このメソッドは液液抽出よりもシンプルで、迅速かつ簡単です。また、逆相固相抽出 (SPE) と比べてクリーンであると同時に、この重要な化合物クラスの分析において優れた感度、正確性、および精度が得られます。

### アプリケーションのメリット

- 尿中ベンゾジアゼピンの迅速で簡素化されたサンプル前処理
- 液液抽出と比較して、溶媒の使用量および廃棄量を大幅に節約
- すべての化合物に対して一貫した回収率を実現

- 優れた正確性および再現性
- サンプルのすべての前処理および抽出がウェル内で実行され、移送ステップが不要に
- 逆相固相抽出（SPE）と比較したマトリックス効果の低減

---

## はじめに

ベンゾジアゼピン系薬は、鎮痛、抗不安、睡眠効果があることから、頻繁に処方される薬物です<sup>1</sup>。その機能として、抑制性神経伝達物質である  $\gamma$ -アミノ酪酸（GABA）が増強されます。米国国内でのベンゾジアゼピン系薬の過剰投与による死因数は、2001 年には年間 1,600 人未満でしたが、2014 年には年間 8,000 人と 600% 増加しており、ヘロインを除く他のあらゆる薬物クラスよりも多発しています<sup>2</sup>。通称「Z ドラッグ」（ゾルピデムおよびゾピクロン）は、一般的に使用されている睡眠補助薬であり、ベンゾジアゼピン系薬と同様の作用があります<sup>1</sup>。ベンゾジアゼピン系薬の分析における LC-MS/MS の使用はここ数年増加していますが、公開されている分析法の多くは、依然として労力のかかる液液抽出法に依存しています<sup>3-5</sup>。この手法の欠点として、個々のサンプルを 1 つずつ処理する必要があること、有毒な溶媒を使用すること、抽出後のサンプルを蒸発および再溶解する必要があることが含まれます。

このアプリケーションノートでは、法中毒学で使用されるベンゾジアゼピン、代謝物、および Z ドラッグの包括的なパネルにおけるサンプル前処理および LC-MS/MS 分析戦略について説明しています。短縮および変更された固相抽出（SPE）メソッドを用いて、Waters Oasis MCX  $\mu$ Elution プレートを使用して、尿サンプルからこのパネルの薬物と代謝物を迅速に抽出しました。酵素による加水分解を含むすべてのサンプル前処理ステップは、Oasis MCX  $\mu$ Elution プレートのウェル内で実施され、コンディショニングおよび平衡化のステップが排除されたことで抽出メソッドが簡素化されました。これにより、再現性のある優れた定量結果を達成しながら、サンプルの移送ステップを最小限に抑えた合理化されたワークフローが可能になりました。クロマトグラフィー分離は CORTECS UPLC C<sub>18</sub>+ カラムを使用して達成され、Xevo TQ-S micro 質量分析計を検出に使用しました。抽出回収率は平均 91% と効率的であり、ミックスモード吸着剤を使用することで、逆相固相抽出（SPE）と比較してマトリックス効果が低減されました。CORTECS UPLC<sub>18</sub>+ カラムにより、ノミナル質量が同一の内部標準試料から、すべてのターゲット分析種をベースライン分離できました。これにより、標識された内部標準と天然化合物の間のクロマトグラフィー干渉のリスクを排除できます。すべてのバッチ内およびバッチ間品質管理サンプルの平均正確性は、公称値の 5% 以内でした。

この分析法は、CORTECS UPLC C<sub>18</sub>+ 2.7  $\mu$ m カラム（3.0  $\times$  100 mm）（製品番号：186007372）を使用して HPLC スケールでも実施されています。1.6  $\mu$ m カラム（製品番号：186007402）と同じ効率的な分離が見られ、背圧は 4000 psi 未満に維持され、分離時間は 30% 増加しただけでした。

---

## 実験方法

すべての標準試料は Cerilliant (テキサス州ラウンドロック) から入手しました。フルラゼパムを除くすべての化合物には、重水素化内部標準試料を使用しました。ストック溶液はメタノールで調製しました。作業標準試料は、ストック標準試料を 80:20 水:メタノールで希釈して毎日調製しました。キャリブレーション試薬と QC サンプルは、尿中で作業標準試料から前処理しました。すべての分析種および保持時間、MS トランジション、パラメーターが表 1 に記載されています。

	化合物	RT	M+H+	MRM プロダクトイオン	コーン電圧	コリジョン エネルギー
1	N-デスメチルゾピクロン	1.07	375.1	245.0 331.0	6 6	14 8
2	ゾピクロン	1.13	389.1	245.0 111.9	8 8	12 58
3	ゾルピデム	1.62	308.1	235.1 92.0	34 34	32 52
4	7-アミノクロナゼパム	1.92	286.1	121.0 222.1	50 50	26 30
5	フルラゼパム	2.32	388.2	315.1 100.0	40 40	26 28
6	7-アミノフルニトラゼパム	2.36	284.1	135.0 226.9	34 34	26 22
7	クロルジアゼボキシド	2.35	300.0	227.0 283.0	34 34	20 12
8	ミダゾラム	2.53	326.0	291.0 222.9	16 16	36 24
9	$\alpha$ -OH-ミダゾラム	2.91	342.0	203.0 168.0	2 2	24 40
10	$\alpha$ -OH-トリアゾラム	3.78	359.0	176.0 140.8	28 28	24 38
11	$\alpha$ -OH-アルプラゾラム	3.77	325.1	297.1 243.1	50 50	25 30
12	オキサゼパム <sup>1</sup>	3.84	289.0	103.9 243.0	50 50	30 20
13	ニトラゼパム	3.87	282.1	180.1 236.0	50 50	36 20
14	ロラゼパム	4.01	321.0	277.0 229.0	50 50	20 30
15	クロナゼパム	4.10	316.0	214.1 241.1	54 54	42 40
16	アルプラゾラム	4.35	309.1	205.0 281.1	50 50	40 26
17	ノルジアゼパム	4.36	271.0	140.0 165.0	50 50	30 28
18	フルニトラゼパム	4.41	314.1	239.2 268.1	50 50	30 25
19	テマゼパム	4.45	301.1	177.0 255.1	36 50	46 20
20	トリアゾラム	4.47	343.0	308.0 239.0	28 28	24 38
21	ジアゼパム	5.14	285.1	154.0 193.1	50 50	26 30

表 1. このアプリケーションで分析したベンゾジアゼピンおよび代謝物の分析種リスト、保持時間、MS パラメータ<sup>1</sup>

$m/z$  287 で見られるニトラゼパム-D5 の干渉を避けるために、オキサゼパムのプリカーサーイオンを 289 に設定しました。

## サンプルの前処理

200  $\mu$ L の尿を Oasis MCX  $\mu$ Elution プレートの個々のウェルに添加してから、20  $\mu$ L の内部標準溶液 (250 ng/mL) および 10  $\mu$ L/mL の  $\beta$ -グルクロニダーゼ酵素を含む 200  $\mu$ L の 0.5 M 酢酸アンモニウムバッファー (pH 5.0) を添加しました (Sigma Aldrich、P. vulgate、85k 単位/mL)。すべてのプレートを 50 °C で 1 時間インキュベートしました。次に、200  $\mu$ L の 4% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> で反応を停止させました。

## 固相抽出 (SPE)

前処理したサンプルを真空によって吸着剤ベッドに吸引しました。続いて、すべてのサンプルを 200  $\mu\text{L}$  の 0.02 N HCl、続いて 200  $\mu\text{L}$  の 20% MeOH で洗浄しました。洗浄後、プレートを高真空 (約 15 インチ Hg) 下で 30 秒間乾燥させました。サンプルは、2  $\times$  25  $\mu\text{L}$  の 5% 強アンモニア溶液 (Fisher、28 ~ 30%) 含有 60:40 ACN: MeOH で溶出しました。次に、すべてのサンプルを 100  $\mu\text{L}$  のサンプル希釈液 (2% ACN: 1% ギ酸含有の MilliQ 水) で希釈しました。抽出手順のグラフィカルワークフローを図 1 に示します。

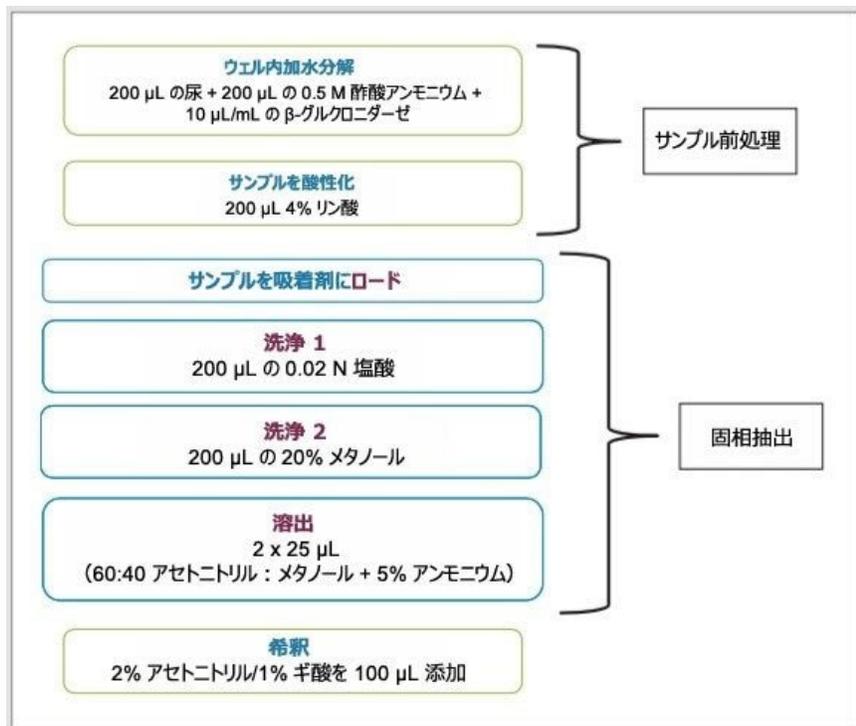


図 1. Oasis MCX  $\mu\text{Elution}$  プレートを使用した尿中ベンゾジアゼピン類の分析用の抽出メソッドの詳細。酵素による加水分解およびサンプルの前処理が抽出プレートのウェルで行われるため、移送ステップは最小限に抑えられます。コンディショニングおよび平衡化ステップが排除され、手順が大幅に簡素化されます。

## 分析条件

## LC 条件

システム:	ACQUITY UPLC I-Class (FL)
カラム:	CORTECS UPLC C <sub>18</sub> 、1.6 μm、2.1 × 100 mm (製品番号: 186007402)
カラム温度:	30 °C
サンプル温度:	10 °C
注入量:	5 μL
流速:	0.5 mL/分
移動相 A (MPA) :	0.01% ギ酸水溶液 (MilliQ 水)
移動相 B (MPB) :	0.01% ギ酸アセトニトリル溶液 (ACN)
グラジエント:	初期条件は 90:10 MPA: MPB でした。MPB の割合を 5 分間で 50% に増加して、5.25 分で 95% まで増加してから、0.75 分間 95% に維持し、0.1 分間で 10% に戻しました。

## MS 条件

システム:	Xevo TQ-S micro
イオン化モード:	ESI+
検出:	MRM (化合物ごとに最適化されたトランジション、表 1)
キャピラリー電圧:	0.5 kV
コリジョンエネルギー:	分析種ごとに最適化 (表 1 参照)

コーン電圧:

分析種ごとに最適化 (表 1 参照)

## データ管理

MassLynx ソフトウェアおよび TargetLynx アプリケーションマネージャー

分析種の回収率は下記の式で計算されます:

$$\% \text{ 回収率} = \left( \frac{\text{面積 A}}{\text{面積 B}} \right) \times 100\%$$

A は抽出サンプルのピーク面積を表しており、B はブランクマトリックス抽出後に分析種が添加されたサンプルのピーク面積を表しています。

---

## 結果および考察

### クロマトグラフィー

すべての試験化合物が表 1 に記載されており、それらのクロマトグラフィー結果が図 2 に示されています。表 1 には、すべての化合物の保持時間と MS 条件も記載されています。このアプリケーション用に複数のカラムを評価しましたが、CORTECS UPLC<sub>18</sub>+ カラムの選択性により、干渉する可能性のあるすべてのピークをベースライン分離することができました。図 3 に、主要なペア 2 つを示しています。クロナゼパム-D4 (RT 4.08) が 1 つ目のロラゼパムの MRM にわずかな影響を及ぼしていますが (323 > 277)、2 つのピークはベースライン分離されています。LLOQ (0.5 ng/mL) の場合にも、クロナゼパム IS はロラゼパムに干渉しておらず、ピークの定量にも影響していません。もう 1 つのクリティカルペアは、アルプラゾラム-D5 とフルニトラゼパムです。このケースでは、フルニトラゼパムが寄与しており、アルプラゾラム-D5 の MRM トレースに見られます (314.1 > 210.1)。ただし、これらのピークのベースライン分離により、ULOQ (500 ng/mL) であっても、アルプラゾラム IS の場合、ベースライン分離により、フルニトラゼパムの波形解析および定量への影響が防止されます。

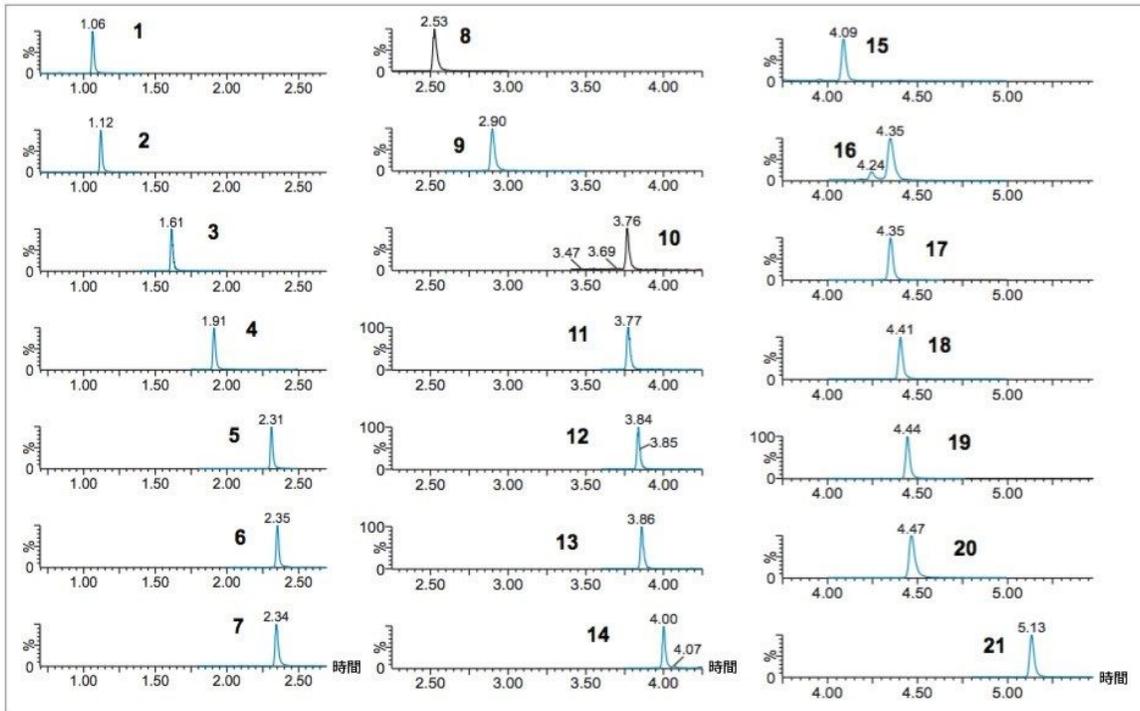


図 2. このアプリケーションで分析したベンゾジアゼピンのクロマトグラム。化合物番号については表 1 を参照してください。カラム: CORTECS UPLC  $C_{18}+ 1.6 \mu\text{m}$ 、 $2.1 \times 100 \text{ mm}$ 。

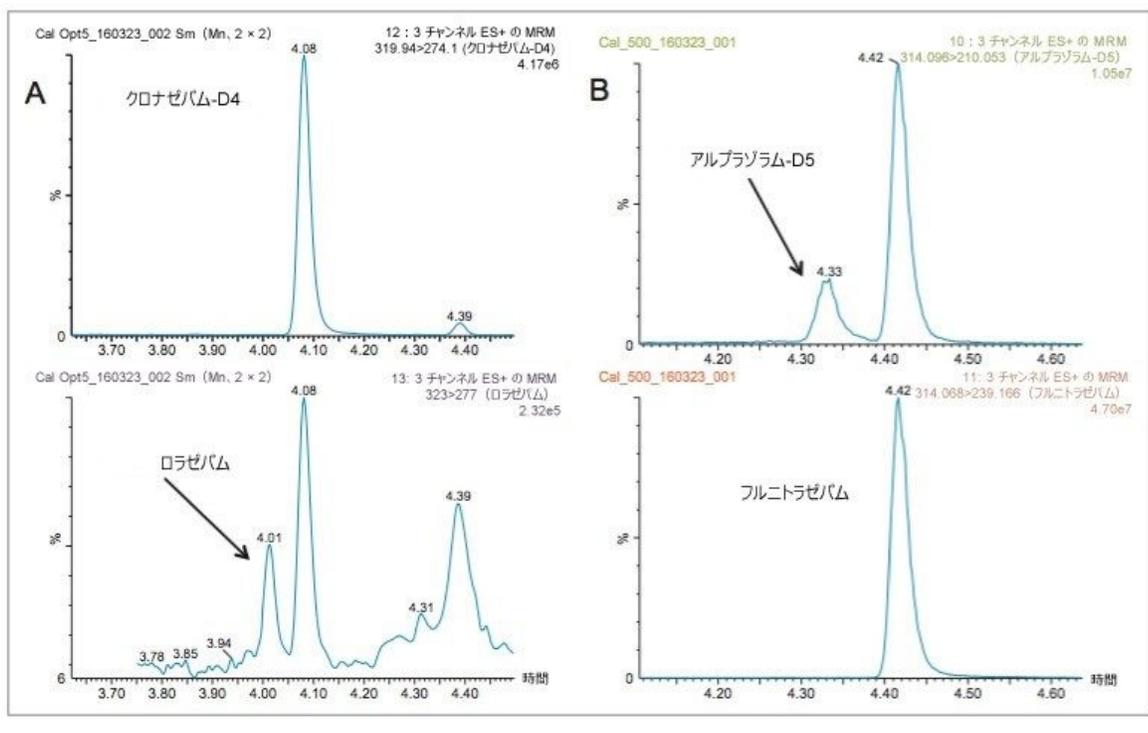


図 3. CORTECS UPLC<sub>C18+</sub> 1.6  $\mu\text{m}$  カラムで得られた主要な分析種ペアのクロマトグラフィー分離。A. クロナゼパム-D4 はロラゼパムの MRM に寄与しますが、このカラムではベースライン分離されます。B. 4.33 分のアルプラゾラム-D5 は 4.42 分のフルニトラゼパムからベースライン分離されています。

このパネルについては、CORTECS UPLC<sub>C18+</sub> 2.7  $\mu\text{m}$  カラム (3.0  $\times$  100 mm) と ACQUITY UPLC H-Class システムを使用して、HPLC スケールでも分析されました。表 2 では、UPLC と HPLC メソッドの保持時間を比較しています。HPLC 条件下で、重要な分離はすべて維持されました。最大システム圧力は、4000 psi 未満で維持されました。最後の溶出ピークであるジアゼパムの保持時間は 5.14 から 6.69 へと 30% しか増加していませんでした。また、溶媒ランプ時間が 7 分から 9 分に増加しました。保持時間の増加は、HPLC カラムの内径が大きくなった (3.0 mm vs 2.1 mm) ことで、移動相の線速度が低下し、溶媒ランプの傾きが減少したためであると考えられます。従来の HPLC システムで分析すると、デュエルボリュームの増加によりピーク幅が増加する可能性があります。とはいえ、CORTECS UPLC<sub>C18+</sub> カラムは拡張性が高いため、この調整は簡単に行えます。ACQUITY UPLC では最速かつ効率の良い分離が実現できますが、必要に応じて HPLC 装置でメソッドを実行することが可能になります。

### 回収率およびマトリックス効果

図 4 には、4 つの個別の実験からの化合物のパネル全体について、複合的な抽出回収率を示しています。回収率は 76 ~ 102% の範囲 (平均 91%) であり、優れた抽出効率が示されています。回収率も一貫しており、変動係数 (%CV)

は 5.2 ~ 15% の範囲で、平均値は 8.6% でした。塩基性化合物用に、抽出メソッドを従来の MCX メソッドから変更しました。クロナゼパム、フルニトラゼパム、アルプラゾラムなどの化合物の pKa が低いことを考慮して、MCX 吸着剤でのイオン交換保持が得られるように、最初の洗浄ステップを 2% ギ酸水溶液から 0.02 N HCl に変更しました。分析法開発中に実施した一連の実験により、洗浄ステップで 20% を超えるメタノールが含まれると、オキサゼパム、ロラゼパム、テマゼパムなどの酸性ベンゾジアゼピンが失われることが明らかになりました。このため、2 回目の洗浄ステップは 20% メタノールで行われています。これは、洗浄ステップ中に分析種の喪失を引き起こさなかった最も強力な有機洗浄溶媒です。このような変更により、逆相モードおよびイオン交換での保持が最大化され、ベンゾジアゼピンのパネル全体を通じて高効率で最も選択的な抽出が可能になります。

	化合物	RT-UPLC	RT-HPLC
1	N-デスメチルゾピクロン	1.07	1.98
2	ゾピクロン	1.13	2.05
3	ゾルピデム	1.62	2.58
4	7-アミノクロナゼパム	1.92	3.05
5	フルラゼパム	2.32	3.37
6	7-アミノフルニトラゼパム	2.36	3.55
7	クロルジアゼボキシド	2.35	3.39
8	ミダゾラム	2.53	3.57
9	$\alpha$ -OH-ミダゾラム	2.91	3.98
10	$\alpha$ -OH-トリアゾラム	3.78	4.95
11	$\alpha$ -OH-アルプラゾラム	3.77	4.93
12	オキサセパム <sup>1</sup>	3.84	5.16
13	ニトラゼパム	3.87	5.28
14	ロラゼパム	4.01	5.32
15	クロナゼパム	4.10	5.51
16	アルプラゾラム	4.35	5.52
17	ノルジアゼパム	4.36	5.78
18	フルニトラゼパム	4.41	5.90
19	テマゼパム	4.45	5.89
20	トリアゾラム	4.47	5.65
21	ジアゼパム	5.14	6.69

表 2. ベンゾジアゼピンと Z ドラッグの UPLC および HPLC の保持時間

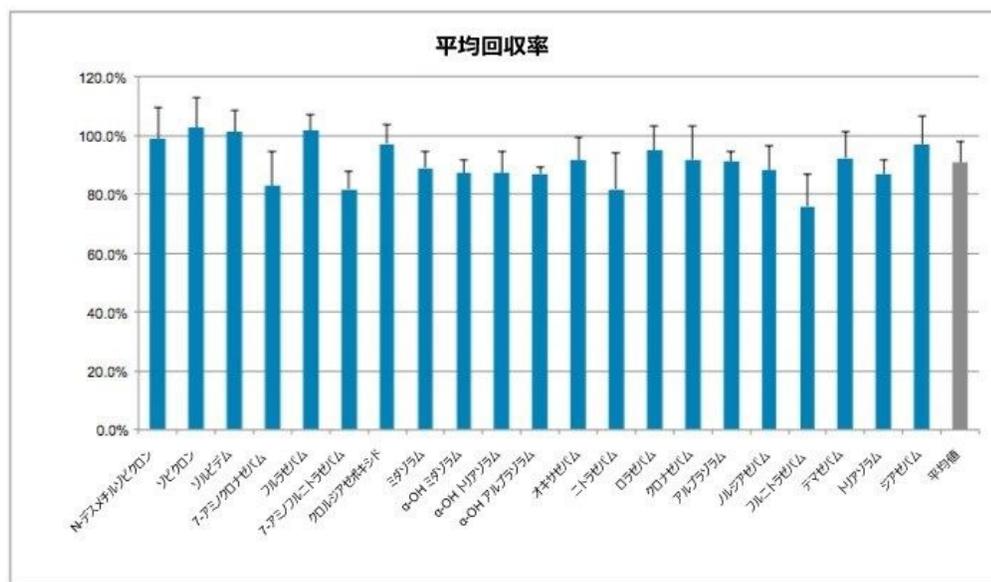


図 4. このアプリケーションでの化合物の抽出回収率。値は、4 回の個別の抽出の平均を表しています。回収率は 76% ~ 102.5% の範囲であり、平均回収率は 91% でした。コンディショニングおよび平衡化を行わずに、吸着剤を直接ロードしても、分析種の回収率に影響はありませんでした。

このメソッドの 2 つの主要な利点としては、Oasis 吸着剤の独自の水湿潤性により、コンディショニングや平衡化なしで直接ロードできる機能と、固相抽出 (SPE) プレーートのウェル内ですべての加水分解と前処理を実施できる機能が挙げられます。従来の 6 回のステップからなるミックスモード固相抽出 (SPE) メソッドが、わずか 4 回のステップに簡素化されました。これは、コンディショニングおよび平衡化ステップを排除することで達成されました。このような簡素化がメソッドの抽出効率に影響を及ぼすことはありませんでした (データは示していません)。また、Oasis 吸着剤の水湿潤性と一貫していました。これにより、すべてのサンプルの加水分解および前処理を 96 ウェルプレート内で実行できるため、サンプルをインキュベーション容器から固相抽出 (SPE) プレートに移す必要がなくなり、時間がかかりミスの発生しやすいステップを回避できます。Oasis MCX μElution プレーートのウェル内でインキュベーションした後、サンプルを 4% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> と混合して加水分解反応を停止させ、塩基性ベンゾジアゼピンをイオン化しました。次に、吸着剤に直接吸引されました。分析法開発またはバリデーション実験のいずれにおいても、漏れやウェルの詰まりは発生しませんでした。全体として、このメソッドは従来の固相抽出 (SPE) ワークフローと比較して、コンディショニング、平衡化、固相抽出 (SPE) デバイスへのサンプル移送、サンプルの蒸発乾固が排除されるため、インキュベーション後のステップ数が 9 回から 5 回に減少します。

マトリックス効果を図 5 に示します。直接ロードしたサンプルと吸着剤をコンディショニングおよび平衡化したサンプルの間では、分析種の回収率もマトリックス効果も同等でした。Oasis PRiME HLB を使用して、マトリックス効果に

についても、従来の逆相抽出と比較しました。絶対マトリックス効果は、Oasis MCX  $\mu$ Elution プレートで前処理したサンプルでの 17.7% に対して、Oasis PRiME HLB で前処理したサンプルでは 25.3% であり（データは示していません）、この分析種グループについて、ミックスモード固相抽出（SPE）のクリーンアップの方が優れていることが実証されました。

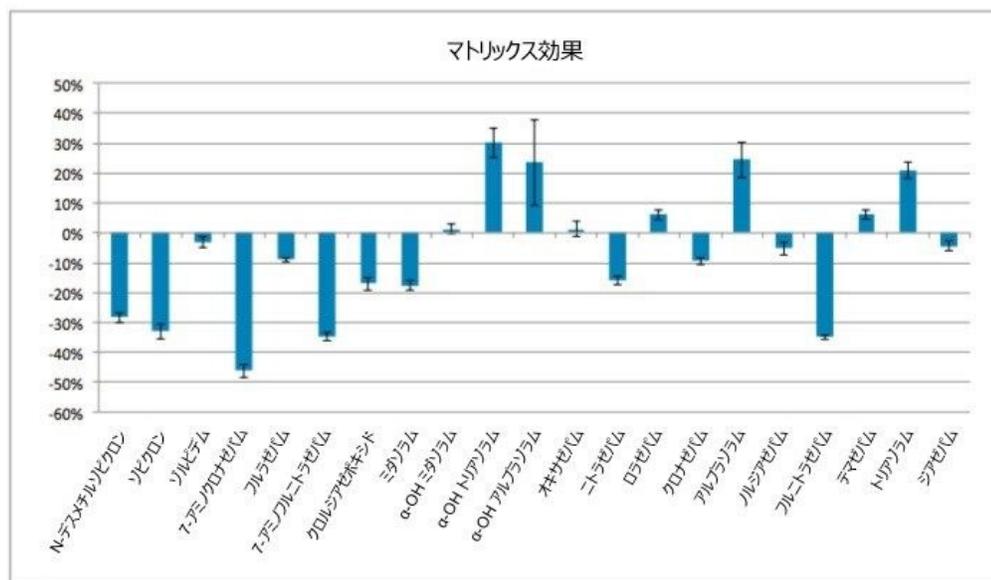


図 5. ベンゾジアゼピンのマトリックス効果。Oasis MCX ミックスモード固相抽出（SPE）プレートと逆相充填剤（Oasis HLB）を使用することで、絶対マトリックス効果が 25.3% から 17.7% に低減されました。

## 定量結果

すべての化合物において検量線は 0.5 ng/mL ~ 500 ng/mL の範囲でした。すべての化合物の LOQ は 0.5 ng/mL、ULOQ は 500 ng/mL でした。品質管理サンプルは、濃度が 1.5、7.5、75、300 ng/mL となるよう調製しました。キャリブレーションサマリーは表 3 に示されています。そのうち 6 本の曲線には 1/x 加重直線が適合し、15 本の曲線には 1/x 加重 2 次曲線が最も適合しました。図 6 には、直線（ニトラゼパム、アルプラゾラム）および 2 次曲線（ジアゼパム、7-アミノクロナゼパム）に最も適合する化合物の例を示します。使用した関数にかかわらず、高い一致が見られ、メソッドの分析目的に適合していました。17 種の化合物の R2 値は 0.999 以上で、残りの化合物の R2 値は 0.997 以上でした。表 3 は、すべての化合物の平均 % 偏差が 10% 未満であったことも示しています。さらに、表 4 および 5 には、バッチ内およびバッチ間 QC の分析結果が示されています。バッチ内の分析結果からは、優れた正確性および精度の両方が示されています。4 つの QC 濃度でのすべての化合物の平均正確性は 107.8%、98.5%、97.5%、97.5% でした。上位 3 つの QC 値（7.5、75、300 ng/mL）では、個々の正確性はすべてターゲット値の 10% 以内であり、すべて

の %CV は 10% 未満でした。表 5 に示されているバッチ間の結果は、さらに良好でした。4 つの QC レベルでの平均正確性は 102.1%、99.3%、98.2%、96.8% でした。個々の CV は 1.1% ~ 9.0% の範囲でした。このような高レベルの正確性と精度により、Oasis MCX 吸着剤および抽出技術の一貫性と信頼性が実証されました。また、このアッセイで使用するウェル内加水分解や、吸着剤を直接ロードしても結果の品質が損なわれないことが実証されました。また、使用した 2 次曲線が目的に適合しており、アッセイのニーズを満たしていることも示しています。

名前	R <sup>2</sup>	直線 (L) / 2 次 (Q)	平均偏差 %
N-デスメチルゾピクロン	0.999	L	5.4
ゾピクロン	0.998	L	5.4
ゾルピデム	0.999	Q	4.1
7-アミノクロナゼパム	1.000	Q	2.3
フルラゼパム	0.998	Q	4.1
7-アミノフルニトラゼパム	0.997	L	6.2
クロルジアゼボキシド	1.000	Q	3.4
ミダゾラム	1.000	Q	4.8
$\alpha$ -OH-ミダゾラム	0.999	Q	4.0
$\alpha$ -OH-トリアゾラム	1.000	Q	4.4
$\alpha$ -OH-アルプラゾラム	0.999	Q	9.0
オキサゼパム	1.000	Q	6.2
ニトラゼパム	0.999	L	4.6
ロラゼパム	0.999	Q	4.4
クロナゼパム	1.000	Q	6.2
アルプラゾラム	0.998	L	9.9
ノルジアゼパム	0.999	Q	6.6
フルニトラゼパム	0.999	L	3.9
テマゼパム	0.999	Q	5.3
トリアゾラム	0.999	Q	4.1
ジアゼパム	0.999	Q	3.7

表 3. このアプリケーションのすべての化合物のキャリブレーションサマリー。% 平均偏差は、曲線内のすべてのポイントの偏差の絶対値の平均を示しています。

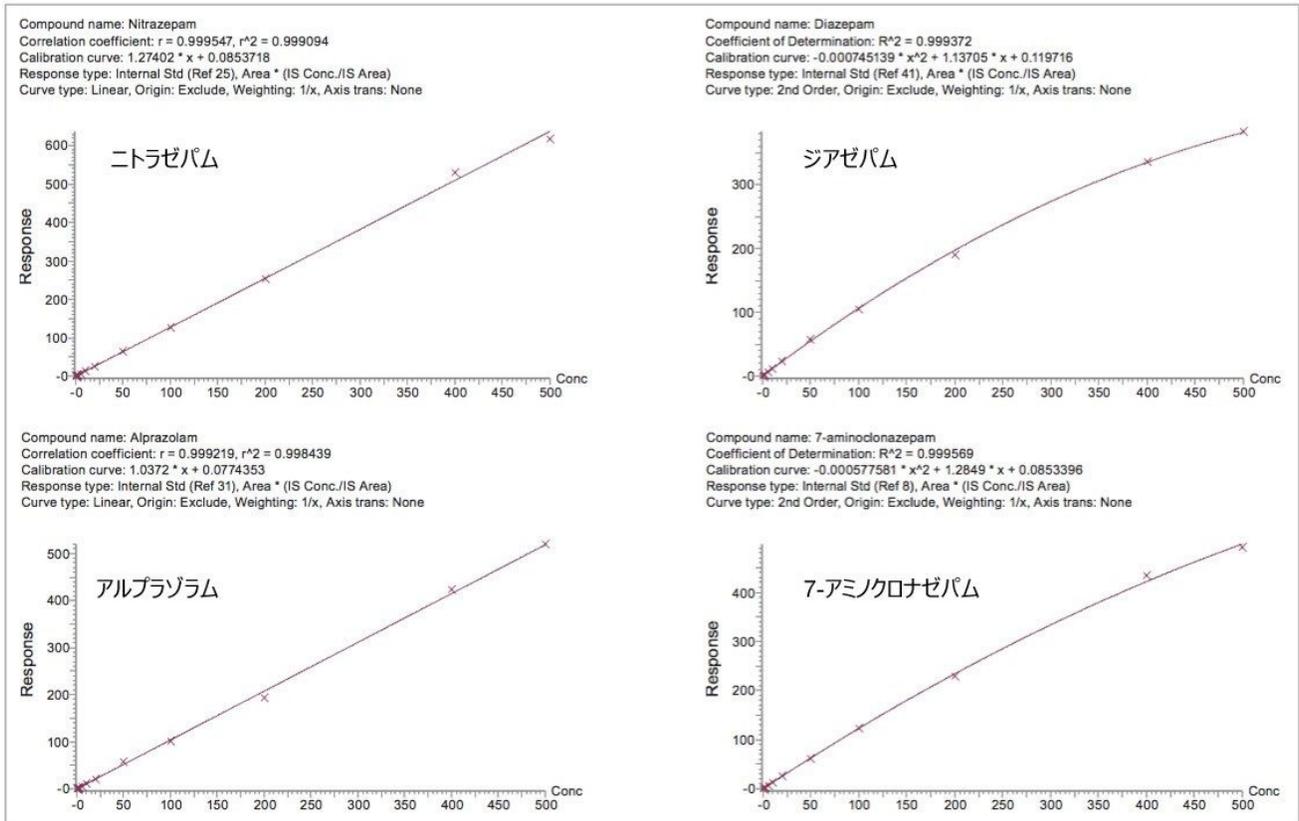


図 6. ベンゾジアゼピンの代表的な検量線。ニトラゼパムおよびアルプラゾラムは  $1/x$  直線に適合し、ジアゼパムおよび 7-アミノクロナゼパムは  $1/x^2$  次加重曲線に最も適合しました。

名前	QC 1.5		QC 7.5		QC 75		QC 300		平均値
	平均値	%CV	平均値	%CV	平均値	%CV	平均値	%CV	
N-デスメチルゾピクロン	103.6%	7.3%	99.3%	3.1%	99.8%	2.0%	98.2%	3.9%	100.2%
ゾピクロン	101.4%	7.4%	100.6%	3.2%	100.9%	2.3%	98.1%	4.0%	100.3%
ゾルピデム	102.7%	6.7%	100.1%	2.5%	96.8%	0.9%	93.4%	4.2%	98.2%
7-アミノクロナゼパム	102.3%	8.1%	96.5%	2.6%	95.4%	1.0%	96.8%	3.5%	97.8%
フルラゼパム	111.0%	9.0%	95.8%	4.5%	96.0%	2.1%	99.2%	4.7%	100.5%
7-アミノフルニトラゼパム	101.9%	10.9%	95.8%	4.5%	98.4%	1.7%	97.5%	3.6%	98.4%
クロルジアゼポキシド	100.7%	9.5%	97.8%	4.2%	98.5%	1.0%	100.3%	6.1%	99.3%
ミダゾラム	107.0%	9.9%	98.3%	2.3%	98.6%	2.3%	99.4%	2.8%	100.8%
$\alpha$ -OH-ミダゾラム	107.4%	8.1%	99.5%	2.3%	99.0%	1.6%	101.1%	3.8%	101.8%
$\alpha$ -OH-トリアゾラム	109.9%	9.2%	95.1%	2.3%	93.1%	1.6%	94.5%	5.4%	98.1%
$\alpha$ -OH-アルプラゾラム	114.5%	12.6%	98.9%	5.2%	94.1%	4.5%	95.4%	8.3%	100.7%
オキサゼパム	105.4%	6.3%	94.6%	3.2%	96.9%	1.4%	95.6%	3.1%	98.1%
ニトラゼパム	108.8%	7.7%	96.8%	2.6%	97.0%	0.8%	98.2%	3.5%	100.2%
ロラゼパム	107.0%	7.2%	95.5%	2.0%	96.1%	2.0%	97.4%	4.0%	99.0%
クロナゼパム	106.7%	10.6%	97.2%	3.0%	95.4%	2.0%	94.6%	3.8%	98.4%
アルプラゾラム	116.8%	10.0%	99.3%	5.7%	98.7%	4.4%	101.3%	6.1%	104.0%
ノルジアゼパム	110.9%	10.1%	103.2%	2.4%	99.2%	1.6%	96.3%	3.0%	102.4%
フルニトラゼパム	111.1%	8.2%	101.4%	2.4%	97.2%	1.9%	100.7%	4.3%	102.6%
テマゼパム	110.6%	8.0%	102.8%	2.7%	98.5%	1.4%	95.4%	6.0%	101.8%
トリアゾラム	113.6%	8.4%	103.4%	2.5%	101.1%	2.4%	99.4%	1.8%	104.4%
ジアゼパム	110.3%	7.9%	101.5%	2.3%	97.3%	0.8%	95.3%	3.6%	101.1%
平均値	107.8%		98.7%		97.5%		97.5%		

表 4. バッチ内 QC の分析結果。N = 6。平均値は、各 QC レベルでの各化合物の平均およびすべての化合物の平均を示します。

名前	QC 1.5		QC 7.5		QC 75		QC 300		平均値
	平均値	%CV	平均値	%CV	平均値	%CV	平均値	%CV	
N-デスメチルゾピクロン	99.2%	3.8%	96.7%	2.4%	96.6%	2.9%	97.1%	4.7%	97.4%
ゾピクロン	97.7%	3.2%	96.7%	3.4%	98.0%	2.8%	96.2%	3.5%	97.2%
ゾルピデム	99.4%	3.4%	98.8%	1.5%	95.8%	1.1%	91.7%	1.6%	96.4%
7-アミノクロナゼパム	100.4%	1.9%	95.6%	1.0%	93.8%	2.4%	95.1%	2.0%	96.2%
フルラゼパム	103.6%	7.1%	97.6%	4.3%	99.3%	7.4%	97.6%	5.0%	99.5%
7-アミノフルニトラゼパム	99.3%	2.3%	93.7%	2.3%	96.1%	4.7%	97.0%	3.2%	96.5%
クロルジアゼポキシド	100.5%	1.1%	100.3%	2.1%	99.3%	1.5%	98.4%	3.2%	99.6%
ミダゾラム	103.7%	4.4%	104.2%	5.4%	102.1%	3.1%	98.9%	2.0%	102.2%
α-OH-ミダゾラム	103.4%	4.3%	102.5%	4.7%	100.8%	5.0%	99.1%	2.5%	101.4%
α-OH-トリアゾラム	101.5%	8.4%	98.8%	4.9%	98.3%	4.9%	95.1%	2.6%	98.4%
α-OH-アルプラゾラム	104.4%	9.6%	101.4%	2.2%	99.1%	5.9%	97.7%	2.4%	100.7%
オキサゼパム	100.4%	4.3%	98.5%	4.1%	98.2%	4.7%	97.6%	4.6%	98.7%
ニトラゼパム	102.0%	6.2%	95.8%	1.3%	95.7%	2.4%	98.1%	1.8%	97.9%
ロラゼパム	100.3%	6.9%	100.2%	4.2%	100.8%	5.4%	98.7%	4.9%	100.0%
クロナゼパム	102.0%	4.9%	98.2%	3.0%	97.5%	3.3%	95.2%	4.5%	98.2%
アルプラゾラム	107.0%	8.7%	94.6%	4.7%	95.0%	4.6%	98.8%	4.5%	98.9%
ノルジアゼパム	106.1%	9.0%	106.7%	3.7%	101.7%	4.6%	95.4%	5.2%	102.5%
フルニトラゼパム	101.8%	8.1%	98.2%	2.8%	96.3%	2.6%	96.3%	7.8%	98.1%
テマゼパム	102.9%	7.3%	101.6%	1.2%	97.5%	2.8%	94.7%	1.8%	99.2%
トリアゾラム	104.4%	8.4%	102.4%	2.3%	99.9%	3.2%	98.2%	3.4%	101.2%
ジアゼパム	104.3%	6.5%	103.8%	2.1%	99.6%	4.1%	94.9%	7.6%	100.6%
平均値	102.1%		99.3%		98.2%		96.8%		

表 5. バッチ間 QC の分析結果。値は、4 回の個別の抽出バッチの平均値および %CV を表します。平均値は、各 QC レベルでの各化合物の平均およびすべての化合物の平均を示します。

## 結論

このアプリケーションノートでは、臨床研究用の尿中のベンゾジアゼピンおよび代謝物の分析のための迅速で簡素化された固相抽出プロトコルおよび LC-MS/MS 分析法について説明しています。Oasis MCX 吸着剤の独自の水湿潤性により、回収率や再現性を損なうことなく、一般的なコンディショニングおよび平衡化ステップを省くことができます。Oasis のこの特性により、加水分解ステップ全体を Oasis MCX μElution プレートのウェル内で行うことができます。これにより、時間がかかり、ミスが発生しやすい移送ステップが不要になり、インキュベーション後のステップの合計数を 9 回から 5 回に減らすことができます。この抽出手順と CORTECS UPLC C<sub>18</sub>+ カラムのクロマトグラフィー、および Xevo TQ-S micro 質量分析計の高感度で再現性のある定量を組み合わせることにより、迅速で効率的かつ正確性の高いメソッドが得られます。このメソッドは液液抽出よりもシンプルで、迅速かつ簡単です。また、逆相固相抽出 (SPE) よりもクリーンであると同時に、この重要な化合物クラスの分析において優れた感度、正確性、および精度が得られます。

---

## 参考文献

1. Jufer-Phipps R, Levine, B. Benzodiazepines. In: *Principles of Forensic Toxicology*, B. Levine (Eds). AACC Press, Washington, D.C. 2013; 237–270.
2. Karithanom, M. Number of Deaths from Prescription Drugs, National Institute of Drug Abuse, National Overdose Deaths, CDC Wonder, 2015; <https://www.drugabuse.gov/related-topics/trends-statistics/overdose-death-rates>.
3. Laloup M, Fernandez M.d.MR, De Boeck G, Wood M, Maes V, Samyn N. Validation of a Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method for the Simultaneous Determination of 26 Benzodiazepines and Metabolites, Zolpidem and Zopiclone, in Blood, Urine, and Hair. *Journal of Analytical Toxicology*, 2005; 29(7):616–626.
4. Marin SJ, Coles R, Merrell M, McMillin G.A. Quantitation of Benzodiazepines in Urine, Serum, Plasma, and Meconium by LC-MS-MS. *Journal of Analytical Toxicology*. 2008; 32(7): 491–498.
5. Marin SJ, Roberts M, Wood M, McMillin GA. Sensitive UPLC-MS/MS Assay for 21 Benzodiazepine Drugs and Metabolites, Zolpidem and Zopiclone in Serum or Plasma. *Journal of Analytical Toxicology*. 2012; 36(7), 472–476.

---

## ソリューション提供製品

Xevo TQ-S micro タンデム四重極質量分析計 <<https://www.waters.com/134798856>>

ACQUITY UPLC I-Class PLUS システム <<https://www.waters.com/134613317>>

ACQUITY UPLC H-Class PLUS システム <<https://www.waters.com/10138533>>

MassLynx ソフトウェア <<https://www.waters.com/513164>>

TargetLynx アプリケーションマネージャー <<https://www.waters.com/513791>>

720005973JA、2023年3月改訂



©2019 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[利用規約](#) [プライバシーポリシー](#) [商標](#) [キャリア](#) [法的通知およびプライバシー通知](#) [Cookies](#)  
[Cookie 環境設定](#)