

GC/MS 分析サンプル前処理

ISOLUTE® SLE+ を使用した ヒト尿中ベンゾジアゼピン分析のためのサンプル前処理

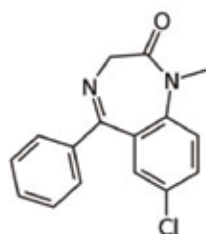
はじめに

ベンゾジアゼピン類は、不安、不眠、てんかん発作、アルコール離脱せん妄などの症状を抑えるために用いられる向精神薬です。長期使用により身体依存および投薬中止後の離脱症状を引き起こすため、投薬中のモニタリングと評価が必要です。

このアプリケーションノートはISOLUTE SLE+カラムを用いた、GC-MS によるヒト尿中ベンゾジアゼピン分析のためのサンプル前処理法を詳しく説明しています。メソッドは最適化されており、定量下限値は40pg/mL、分析薬物の回収率は90%以上を達成しています。

なお、「環境に優しい化学(Green Chemistry)」の観点から、ハロゲン化溶媒(ジクロロメタン)の代替として非ハロゲン化溶媒(酢酸エチル)による溶出も検討しました。

■ 図1 ジアゼパムの構造



生体サンプル前処理用珪藻土 ISOLUTE SLE+

ISOLUTE SLE+プレートおよびカラムは、従来の液液抽出法(LLE)に代わる効率的なサンプル前処理製品です。エマルジョン形成を回避し、処理時間を大幅に短縮します。ターゲット回収率が高く、サンプル-to-サンプル(検体間)のデータ再現性に優れており、且つ、操作方法が極めてシンプルで容易に前処理を行うことができます。

分析薬物

ジアゼパム、ノルジアゼパム、ミダゾラム、フルニトラゼパム、7-アミノフルニトラゼパム、プロメザパム、オキサゼパム、ニトラゼパム、フルラゼパム、テマゼパム、7-アミノクロナゼパム、ロラゼパム、ヒドロキシエチルフルラゼパム、エスタゾラム、アルプラゾラム、トリアゾラム、 α -ヒドロキシアルプラゾラム、 α -ヒドロキシトリアゾラム

■ ISOLUTE SLE+による抽出メソッド

尿の加水分解：ヒト尿500 μ Lに酢酸ナトリウム(100mM, pH 5)500 μ Lを加え、 β -グルクロニダーゼ(H3) ex.H.pomatia (Sigma-Aldrich G8885) 50 μ L/mL 尿(約4500U/mL 尿)を添加し、60°C \pm 2°C で2時間、加水分解する。25%アンモニア水によりpH7 に調整する。

使用製品:	ISOLUTE SLE+ 1mL サンプル用カラム (Part #820-0140-C)
サンプルロード	加水分解した尿サンプル1mLをカラムにロードし、軽くバキューム(または加圧)して導入する。 5分間静置し、尿サンプルを珪藻土に完全に吸収させる。
溶出	ジクロロメタン2.5mLをカラムに加え、5分間静置する。さらにジクロロメタン2.5mLを加え、軽くバキューム(または加圧)して溶出を完了する ^{※1}
エバポレーション・再溶解	35°Cで溶媒を留去し、酢酸エチル50 μ Lで再溶解する。 TBDMSTFA ^{※2} 50 μ Lを加え70°C \pm 2°Cで20分間、誘導体化を行う。

※1 ジクロロメタンの代わりに酢酸エチルを用いたデータを図3に示している。

※2 TBDMSTFA: N-tert-butylidimethylsilyl-N-methyltrifluoroacetamide with 1% tert-butylidimethylchlorosilane (Sigma-Aldrich 375934)

GC条件

機器： 7890A GC / 5975A MSD (Agilent Technologies Inc., Santa Clara CA, USA).
 カラム： Zebron ZB-5Msi (30m × 0.25mm, 0.25μm df)
 Pre-column (5m × 0.25mm; Deactivated fused silica)
 キャリアガス： ヘリウム1.2 mL min⁻¹ (定流速)
 注入口： パルスドスプリットレス (9.8psi at 250°C)
 圧カパルス (0psi to 0.75min)
 パージフロー (1.5min, 50mL/min)
 注入量： 2μL
 オープン： 50°C for 1.5min
 25°C/min to 150°C then 10°C/min to 320°C
 hold 6min
 トランスファーライン： 280 °C

MS条件

ソース温度： 230°C
 四重極温度： 150°C
 溶媒遅延： 6分
 MSD モード： SIM
 SIM グループ： 1-6.1min to 18.4min / 2-18.4min to 19.1min
 3-19.1min to 20.2min / 4-20.2min to 22.6min
 5-22.6min to 23.9min / 6-23.9min to 25.3min
 7-25.3min to 28min

表1 SIMパラメータ

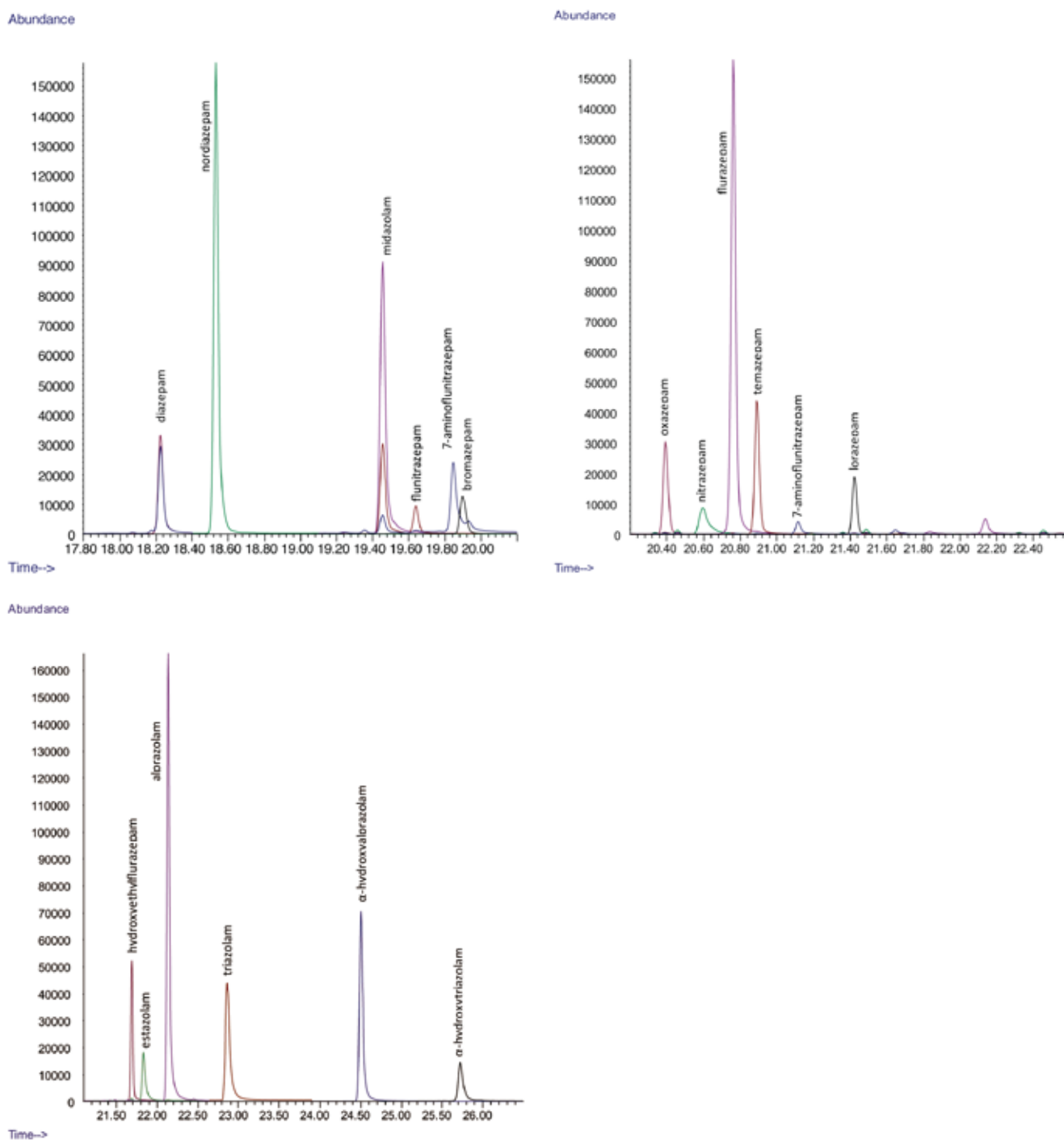
Scan Function	Compound	Quant Ion	1st Qual Ion	2nd Qual Ion	Dwell / ms
1	ジアゼパム	256	283	221.1	25
2	ノルジアゼパム	327.1	329.1	328.1	25
3	ミダゾラム	310.1	312	325.1	25
3	フルニトラゼパム	312.1	286.1	266.1	25
3	7-アミノフルニトラゼパム	283.1	255.1	264.1	25
3	プロマゼパム	374	372	346	25
4	オキサゼパム	457.2	513.3	459.1	10
4	ニトラゼパム	338.1	339.1	292.1	10
4	フルラゼパム	86.1	87.1	99.1	10
4	テマゼパム	357.1	283	359.1	10
4	7-アミノクロナゼパム	342.1	399.2	344.1	10
4	ロラゼパム	491.1	513.3	493.1	10
4	ヒドロキシエチルフルラゼパム	389.1	391.1	390.1	10
4	エスタゾラム	259.1	294.1	239	10
4	アルプラゾラム	279.1	308.1	204.1	10
5	トリアゾラム	313	238	342	25
6	α-ヒドロキシアルプラゾラム	381.1	383.1	384.1	25
7	α-ヒドロキシトリアゾラム	415	417.1	419.1	25

結果

図2に、分析薬物500pg/ μ Lをサンプルに添加した場合のオーバーレイ・ターゲット・イオンクロマトグラムを示す。全ての分析薬物において、peak-to-peak シグナル/ノイズ比14:1以上 (RSD<10%, n=3) にて、定量下限値 (LOQ) は40ng/mL を達成している (表2)。

図3には、溶出溶媒としてジクロロメタンを使用した場合と、酢酸エチルを使用した場合のそれぞれの回収率を示す。酢酸エチルはジクロロメタンに代わる非ハロゲン化溶媒であることが示唆されているが、シグナル/ノイズ比が低減しており回収率は低下している。

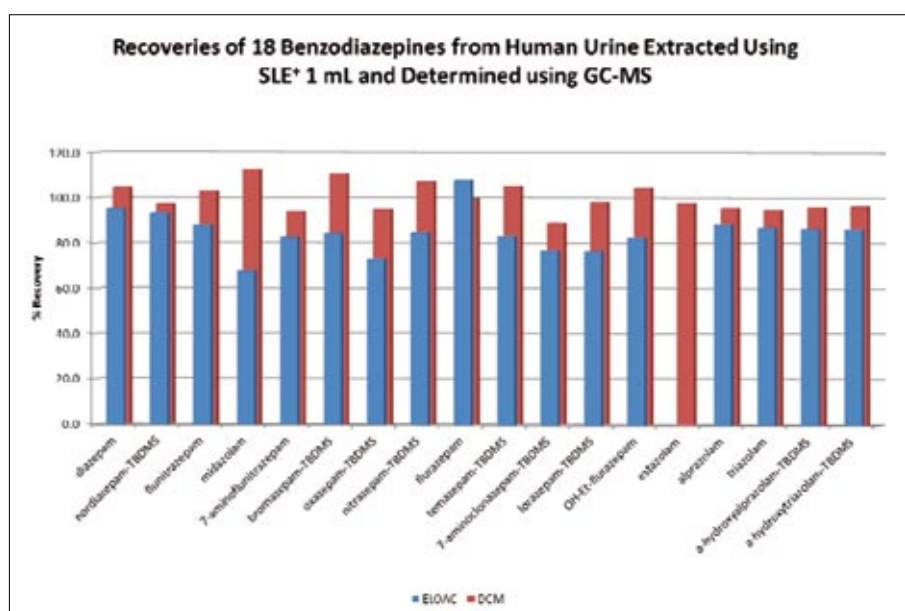
■ 図2 SIM グループごとのオーバーレイ・ターゲット・イオンクロマトグラム



■表2 尿中分析薬物濃度40ng/mLでのpeak-to-peak シグナル/ノイズ比

Analyte	S/N at 40 ng/mL
diazepam	732
nordiazepam	821.6
midazolam	218.8
flunitrazepam	53.6
7-aminoflunitrazepam	30.2
bromazepam	120.2
oxazepam	127.7
nitrazepam	139.6
flurazepam	133
temazepam	154.7
7-aminoclonazepam	14
lorazepam	129
hydroxyethylflurazepam	125.7
estazolam	17.6
alprazolam	94.9
triazolam	406.6
a-hydroxyalprazolam	201.3
a-hydroxytriazolam	141.2

■図3 ジクロロメタン溶出と酢酸エチル溶出の比較



■ 使用製品一覧

Part number	Description	Quantity
820-0140-C	ISOLUTE SLE+ 1 mL Sample Volume columns	30
121-1016	VacMaster-10 Sample Processing Manifold	1

バイオタージ・ジャパン株式会社

本社：〒136-0071 東京都江東区亀戸1-14-4, 6F TEL 03-5627-3123 FAX 03-5627-3121
 大阪：〒532-0011 大阪市淀川区西中島7-1-29, 6F TEL 06-6838-9311 FAX 06-6838-9312
 URL: <http://www.biotage.co.jp> E-mail: Japan_info@biotage.com