

(3) ガスクロマトグラフィー・質量分析法 (GC/MS)
(尿中代謝物の分析)

i) 前処理

試料¹⁾ 1 ml

- i) 内部標準液²⁾ 20 μ l, ハラゼパム/メタノール溶液³⁾ 1 ml を加えて混和する.
- ii) 2M酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.5)⁴⁾ 50 μ l,
 β -グルクロニダーゼ 50 μ l を加えて混和する.
- iii) 56°Cで2時間加温する.

加水分解溶液

- i) 1MNaHCO₃緩衝液 (pH 9.0)⁵⁾ 0.8 ml,
メチル-tert-ブチルエーテル 3 ml,
クロロホルム 1.5 ml を加える.
- ii) 15分間 Vortexで攪拌後, 1000 x g で3分間遠心する.

有機層

窒素気流下40°Cで乾固する.

残渣

プロピル化

- i) 2.5%TMAH (tetramethylammonium hydroxide)/メタノール溶液 3 μ l
およびヨウ化プロピル 10 μ l を含む アセトニトリル 50 μ l に溶解する.
- ii) 密栓し, 短時間 Vortexで攪拌後, 65°Cで15分加熱する.

反応液

- i) ヘキサン/クロロホルム (3 : 1, v/v) 2 ml,
0.1M Na₂CO₃緩衝液 (pH 9.0)⁶⁾ 0.15 ml を加えて混和する.
- ii) Vortexで2分間攪拌する.
- iii) 1000 x g で3分遠心する.

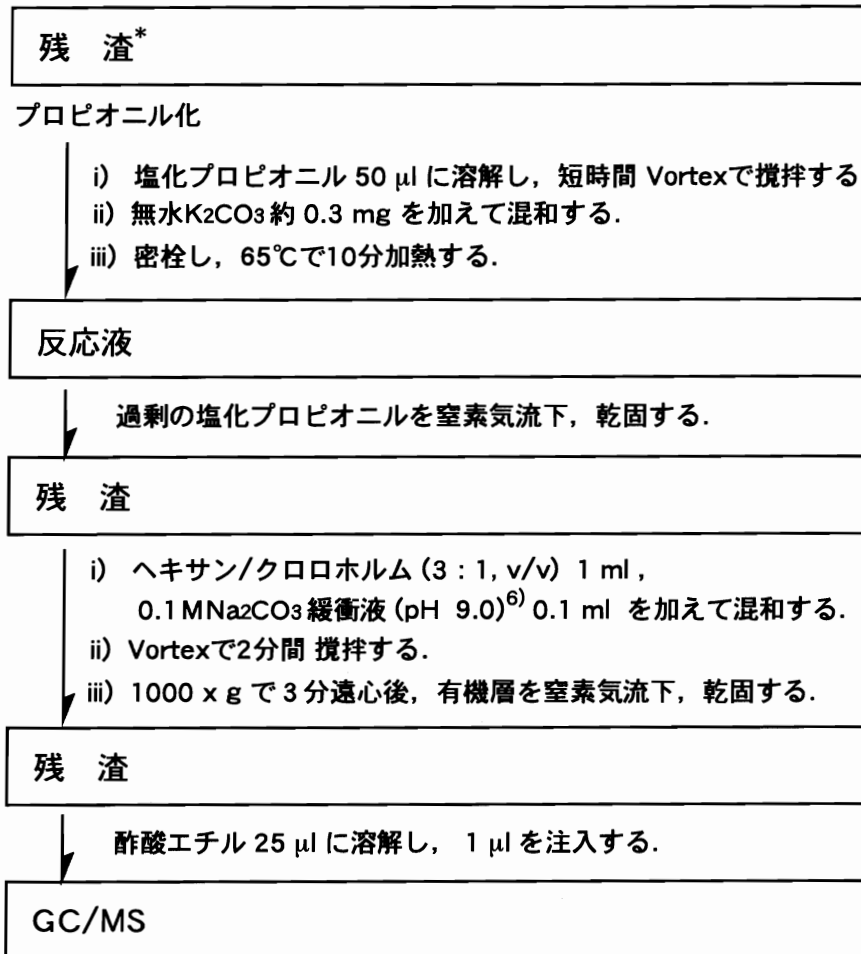
有機層

窒素気流下40°Cで乾固する.

残渣*

プロピオニル化





【注 解】

- 1) 試料は尿.
- 2) 各 25 μg/ml のオキサゼパム-d5, ロラゼパム-d4, α-ヒドロキシアルプラゾラム-d5 および α-ヒドロキシトリアゾラム-d4 の混合メタノール溶液. 重水素標識体が入手できないときは, 内部標準物質を入れないで分析し, その試料に存在しないベンゾジアゼピンを内部標準物質にする.
- 3) ハラゼパムの 1 mg/ml メタノール溶液は薬物の試験管への吸着による損失を防ぐために加える.
- 4) 氷酢酸 57.2 ml を約 350 ml の水で希釈し, pH メーターでモニターしながら, 2 M NaOH 液 (80.0 g/l) で pH 4.5 に調整後, 水を加えて 500 ml にする.
- 5) NaHCO₃ 42 g を約 430 ml の水に溶かし (やや溶けにくい), pH メーターでモニターしながら, 2 M NaOH 液 (80.0 g/l) で pH 9.0 に調整後, 水を加えて 500 ml にする.
- 6) 上記の 1 M 炭酸ナトリウム緩衝液 (pH 9.0) を水で 10 倍に希釈する.

iii) GC/MS の条件

装置	: ガスクロマトグラフ/質量分析計
カラム	: retention gap カラム, 5% phenylmethyl silicone, 1 m x 0.52 mm i.d. + DB-1, 15 m x 0.25mm i.d., 膜厚 0.25 μ m
温度	: カラム 140°C (1 min) - (50°C/min) - 220°C - (10°C/min) - 290°C (0.5 min) ; 注入部 135°C (0.5min) - (100°C/min) - 285°C (8 min)
キャリアガス	: ヘリウム 20 psi (線速度 : 45 cm/s)
イオン化	: EI (電子衝撃), 70 eV
測定	: 質量範囲 m/z 210 - 450 ; 時間 2 - 10 min

【注 解】

- 1) ベンゾジアゼピンの保持時間を表 4 に示す。
- 2) ベンゾジアゼピン系薬物の中で保持時間が長いトリアゾロベンゾジアゼピンおよび第 2 級アミン, ニトロ基, 水酸基を持つ化合物の感度はそれ程高くない。個々の化合物に適った抽出法と機器分析条件の設定が必要である。

表 4. 主なベンゾジアゼピン系薬物の保持時間

化合物	保持時間 (分)	化合物	保持時間 (分)
Medazepam	3.67	Oxazepam	6.67
Diazepam	4.50	(N ¹ -R ₂ , 3-O-R ₁)	
N - Desalkylflurazepam	4.78	Clonazepam	6.80
(N ¹ -R ₂)		(N ¹ -R ₂)	
Chlordiazepoxide	4.83	Alprazolam	7.17
Nordiazepam	4.88	Lorazepam	7.38
(N ¹ -R ₂)		(N ¹ -R ₂ , 3-O-R ₁)	
Bromazepam	5.27	Triazolam	7.70
(N ¹ -R ₂)		N-Desethylflurazepam	8.10
Flunitrazepam	5.27	(N-R ₁)	
Prazepam	5.48	α -Hydroxyalprazolam	8.72
Norflunitrazepam	5.85	(α -O-R ₁)	
(N ¹ -R ₂)		α -Hydroxytriazolam	9.52
Nitrazepam	6.00	(α -O-R ₁)	
Flurazepam	6.25		

R₁ : プロピル ; R₂ : プロピオニル

【文 献】

1. Meatherall R. J Anal Toxicol 1994 ; 18 : 369-381.