

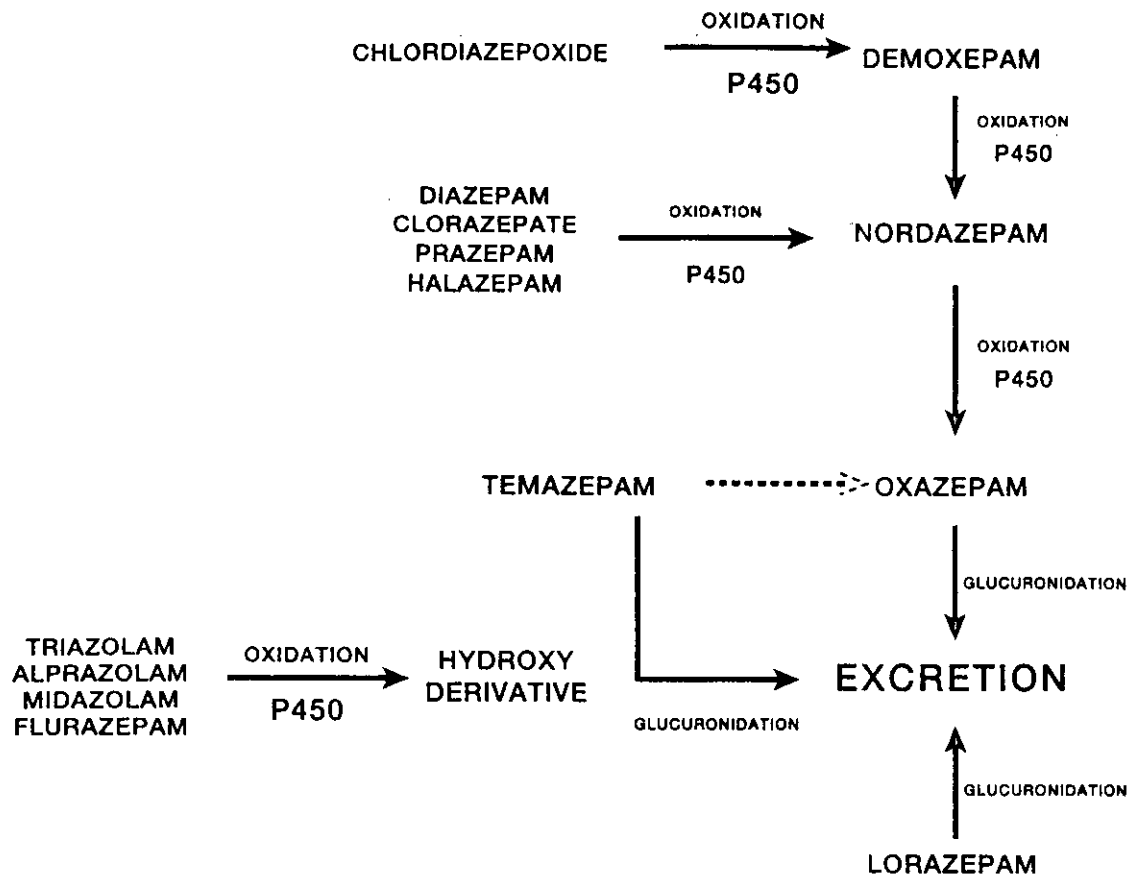
ン酸緩衝液 (1.15% KCl, 1mM EDTA, 1mM PMSF、0.5mM β -NADP⁺、3.75mM DL-Isocitric acid lactone、1 unit/ml NAD⁺ 5mM MgSO₄) に加え、ホモジナイズし、37°C、20min 間インキュベートした後、3°Cで一晩放置した。放置後、酢酸エチル 3ml 加えよく振り混ぜ、3000 rpmで10min間遠心分離し代謝物と未反応のTriazolamを抽出した。この抽出作業を3回繰り返す、集めた有機溶媒を留去後、窒素ガスで乾燥した。この残渣をH₂O-CH₃CN (8:2) の溶液 200 μ l に溶かし、HPLCにて代謝物を分離検出した。HPLC-UV検出条件：カラム, Wakosil-II 3C18 RS (150 mm x 4.6mm, i.d., 3 μ m), ガードカラム, Mightysil RP-18 GP (3 μ m); カラム温度, 40°C, 溶出液, H₂O-CH₃CN (77:23), 流速, 0.8 ml/min, UV検出, 240 nm, 注入量, 40 μ l。また3種の代謝物はマススペクトルにより解析した。HPLC-MSの条件は、2.2.に示す。

2.4. 代謝物の誘導体化

2.3.で検出された3種の代謝物の分画をHPLCにて分取し、溶媒留去後窒素ガスで乾燥し、この残渣に無水酢酸-ピリジン (1:2) 溶液100 μ lを加えてよく混和し、65°C、30min反応させた。この反応液を窒素ガスで留去し、残渣をHPLCの溶出液 200 μ lに溶かし、HPLC-MSにて測定した。カラムは、Wakosil-II 3C18 RS (150 mm x 4.6mm, i.d., 3 μ m)を使用した。溶出液は、H₂O-CH₃CN-AcOH (50:50:1), 流速、0.8 ml/min, カラム温度、40 °C、注入量、10 μ l。なお、標品の1- hydroxymethyltriazolam及び4-hydroxytriazolamも同様の操作を行なった。

3. 結果および考察

多くのベンゾジアゼピン類は蛋白と強固に結合しているが、クリアランス、分布、生体内変換、毒性の面から血液中の遊離型の濃度を測定することが重要である。図2は、ヒトでの代謝経路を示す。ベンゾジアゼピン類は肝臓でシトクロームP450により酸化され、この水酸化体は更に抱合体を形成し解毒されるが[9]、一般的には酸化と比較してこのグルクロン酸抱合は非常に早い。



Basic metabolic pathways leading to benzodiazepine elimination in humans. Oxidation P450 indicates metabolism by hepatic cytochrome P450 mixed-function oxidase system. Broken arrow indicates possible metabolic pathway. Compared with oxidation, glucuronidation is generally rapid and unaffected by impaired liver function. (From Skinner MH, Thompson DA. Pharmacologic considerations in the treatment of substance abuse. South Med J 1992;85:1207-1219.)

図2 ヒトにおけるベンゾジアゼピン類の代謝経路

トリアゾラムも類似の経路をへて、水酸化体とその抱合体に代謝される。ヒトでの主な代謝物は、1-hydroxymethyltriazolamであり、トリアゾラムの50～100%の薬理活性を有している。他の代謝物としては、4-hydroxytriazolam や 1-hydroxymethyl-4-hydroxytriazolam などが報告されている(図3)。尿中には少量の未変化体のトリアゾラムと多量のグルクロン酸抱合した水酸化体が排泄される。48時間以内に投与量の約80%が尿に、72時間後には、約7%が糞便中に排泄される[10-12]。

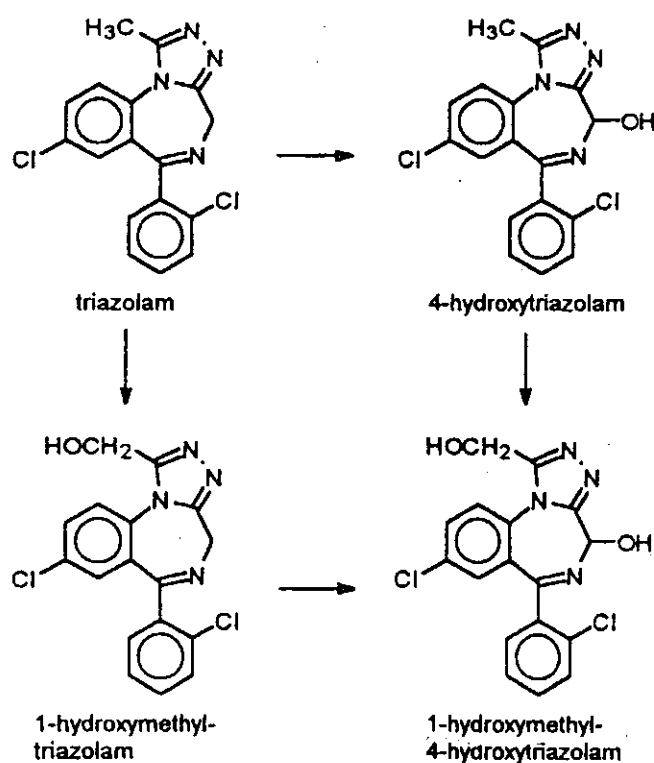


図3 トリアゾラムの代謝経路

トリアゾラムを含めたベンゾジアゼピン類の検出には操作が簡便な免疫化学的な方法が使われるが、この方法では、代謝物との識別は困難である[13-15]。分離分析法としては、薄層クロマトグラフィー (TLC) やガスクロマトグラフィー (GC) あるいは液体クロマトグラフィー (HPLC) が利用される。TLC法は安価な方法であるが、類似した物質の分離は困難である上に一般に検出感度が低い。GC法は感度が高く短時間で測定ができるが、分析に先立ち揮発性とするための誘導体化や加水分解操作などが必要となる。もちろんこの方法によれば、親化合物とその代謝物を分離検出することが可能である[16,17]。HPLC法はGC法に比較して分離条件が緩和であり、熱に不安定な化合物に適しているため、様々な物質の分析に用いられている。ベンゾジアゼピン類の分離分析についても例外ではなく、多くの報告がある[18-20]。トリアゾラムの分析としては、電子捕獲型検出器 (ECD) やN,P選択的検出器(NPD) を装備したガスクロマトグラフィー (GC) が優れている。また代謝物を含めた分析には、液体クロマトグラフィー (HPLC) が用いられる。ガスクロマトグラフィー/マススペクトル (GC-MS) 法は、生体試料中のトリアゾラムおよびその代謝物を高

感度で選択的に測定できる方法であり微量分析に適しているが、試料中に混在する不純物を厳密に取り除かなければならない上に揮発化するための誘導体化処理が必要となり、必ずしも高感度測定が可能とは限らない。これに対してHPLC-MS法では、一般的には厳密な前処理や誘導体化操作を必要としない。本研究では、このHPLC-MSを用いて毛髪中のトリアゾラムおよびその代謝物を高感度で分離定量できる方法の確立を目指した。

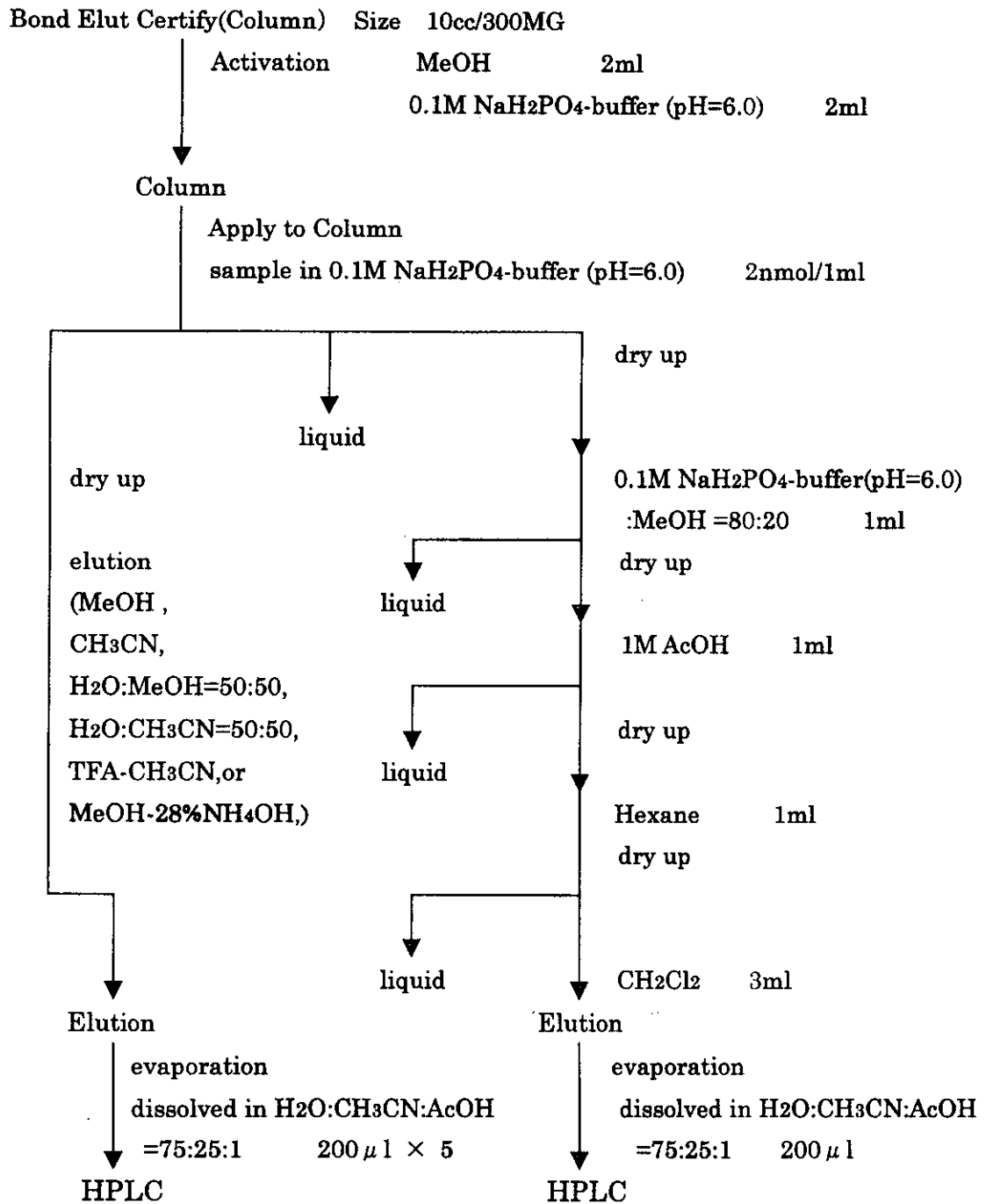
3.1. 前処理法の検討

HPLC-MSで毛髪分析を行う場合には、適切な分離条件を設定すれば、厳密な前処理を必要としないが、MSイオン源の汚染を避けるために、試料由来の不純物を取り除くための前処理法を固相カートリッジカラムを用いて検討した。図4には、毛髪試料を想定した前処理法の概略を示す。

標品を用いた検討では、洗浄操作を行わない場合（左ルート）には、酸性の溶出溶媒では、全くトリアゾラムをカラムから溶出させることはできなかったが、塩基性溶媒では、ほぼ定量的に回収することができた（図5）。しかし試料中の不純物を除去することを想定し、洗浄過程を加えた場合（右ルート）には、最も回収効率の良かったMeOH-28% NH₄OH (98:2) でも回収率は、わずか10%程度に低下した。これは各洗浄過程におけるトリアゾラムの漏出や樹脂、チューブ等への吸着が考えられたので、以後の実験では、固相抽出による前処理を行わないことにした。

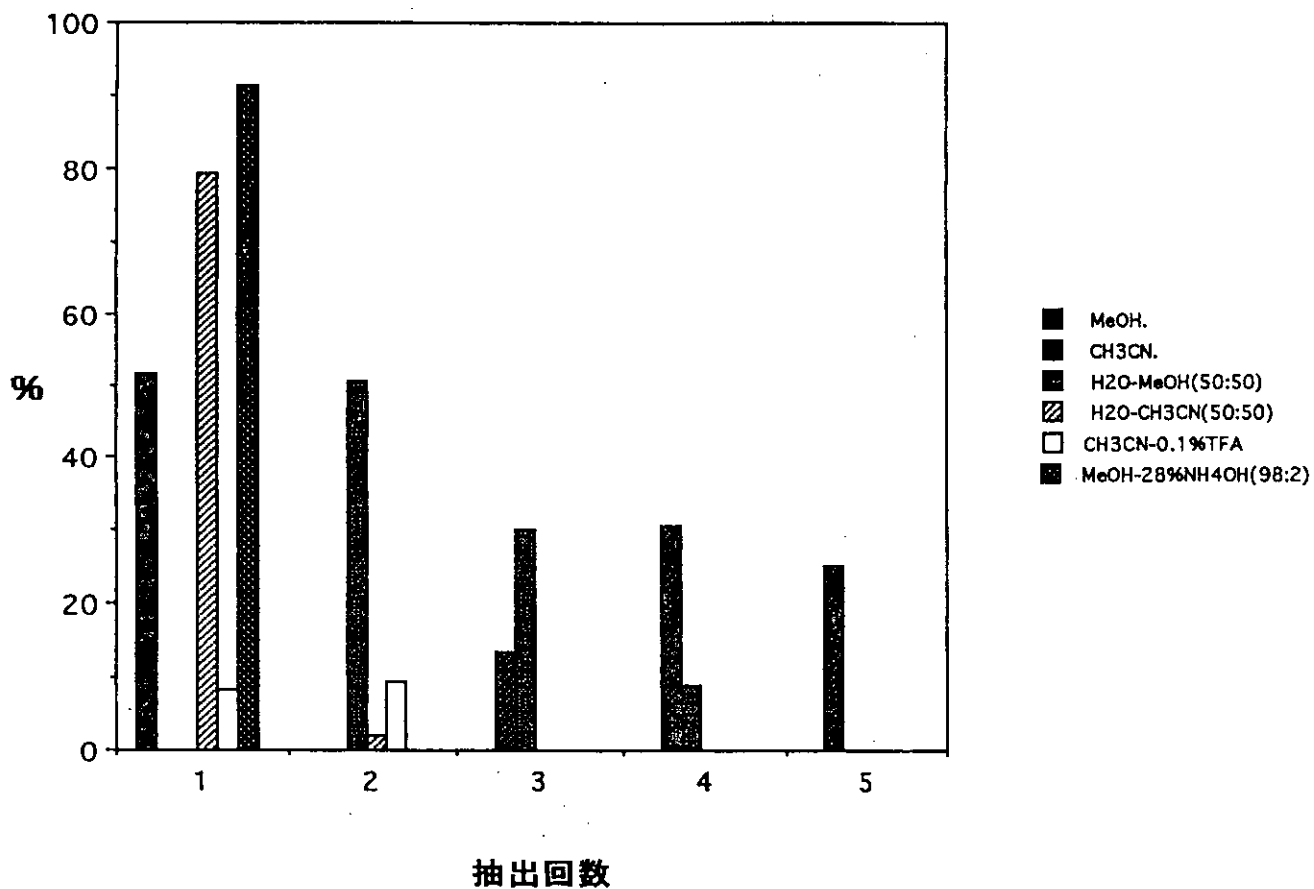
3.2. HPLC-MS 測定の最適化

トリアゾラムおよびその予測される代謝物は、その構造中に三級アミンが数個存在することから、MSでの検出はポジティブイオンモードで行うのが適切であると考えられる。この場合HPLCの溶出液は酸性が有利である。そこで、酸性度の異なる3種のカルボン酸を移動相に添加し、感度の比較を行った。図6には、triazolam および1-hydroxymethyltriazolamの各溶出液における感度の比較を示した。この図から明らかなように、triazolamとその水酸化体では添加した酸および溶剤の種差により感度に差が認められた。MSのイオン量はCH₃CNよりもMeOHの方が多かったが、バックグラウンドノイズレベルも高く、注入した標品の濃度に対して安定な



Column : ODS-3 (4.6 × 150mm)5 μ m
 Mobile phase : H₂O:CH₃CN:AcOH=65/35/1
 Flow rate : 1.0ml/min , Injection : 50 μ l

図4 トリアゾラムの固相抽出法

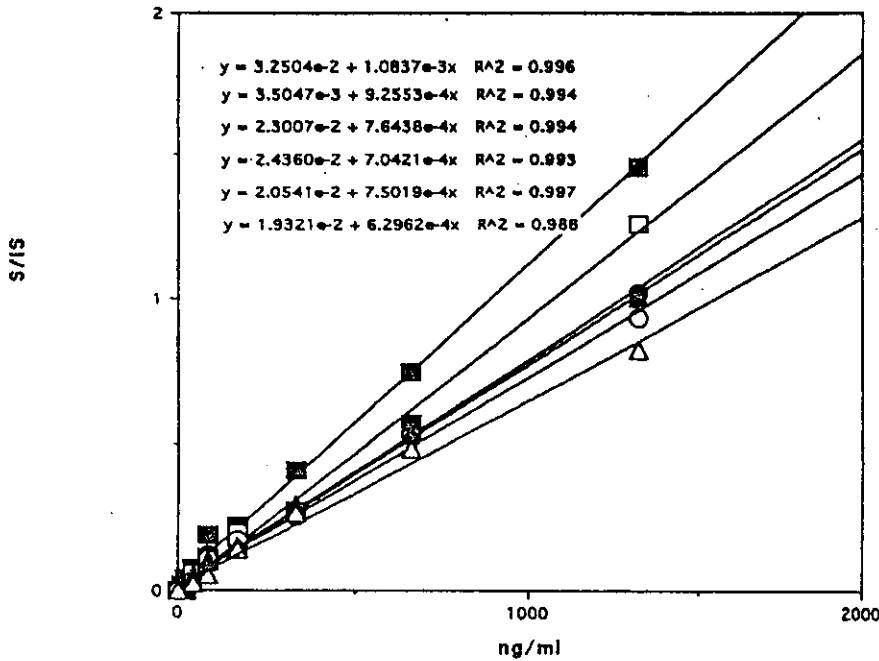


| Elution | Total recovery(%) |
|--|-------------------|
| MeOH | 51.47 |
| CH ₃ CN | 69.40 |
| H ₂ O-MeOH(50:50) | 89.21 |
| H ₂ O-CH ₃ CN(50:50) | 81.45 |
| 0.1% TFA-MeOH | 0.00 |
| 0.1% TFA-CH ₃ CN | 17.73 |
| MeOH-28% NH ₄ OH(98:2) | 91.50 |

図5 未洗浄時におけるトリアゾラムの回収率

1-hydroxymethyl-triazolam
 Column : ODS-3 (4.6X150mm)5um
 Flow Rate : 1.0ml/min
 IS : 1-OH triazolam-d4 (12.4ng/injection)

Mobile phase : H₂O : CH₃CN=65:35
 : H₂O : MeOH=45:55



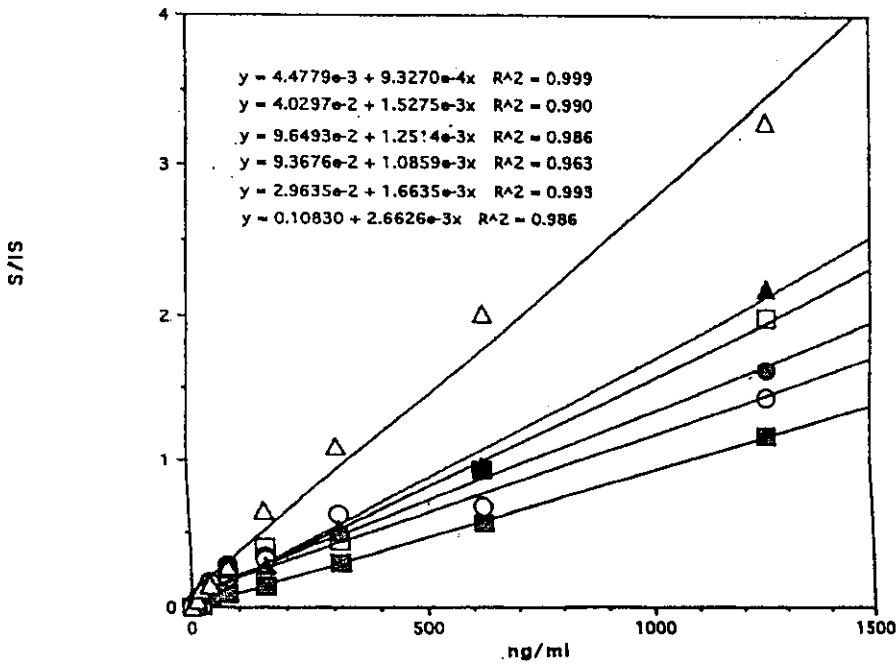
酸性度
 TFA > HCOOH > AcOH

- S/IS(T2) CH3CN/1%AcOH
- S/IS(T2) MeOH/1%AcOH
- S/IS(T2) MeOH/1%HCOOH
- S/IS(T2) CH3CN/1%HCOOH
- ▲ S/IS(T2) CH3CN/0.05%TFA
- △ S/IS(T2) MeOH/0.05%TFA

HPLC&MS 条件

Column : ODS-3 (4.6×15.0mm)5 μ m
 Flow rate : 1.0ml/min
 10 μ l / injection
 Sheath Gas Flow Rate (arb) : 80
 Aux Gas Flow Rate (arb) : 20
 |Spray Voltage (KV)| : 4.8
 Capillary Temp (°C) : 275
 Capillary Voltage (V) : 3.00
 Tube Lens Offset : 20
 Total Microscans : 3

Triazolam
 Column : ODS-3 (4.6X150mm)5um
 Flow Rate : 1.0ml/min
 IS : 1-OH triazolam-d4 (12.4ng/injection)



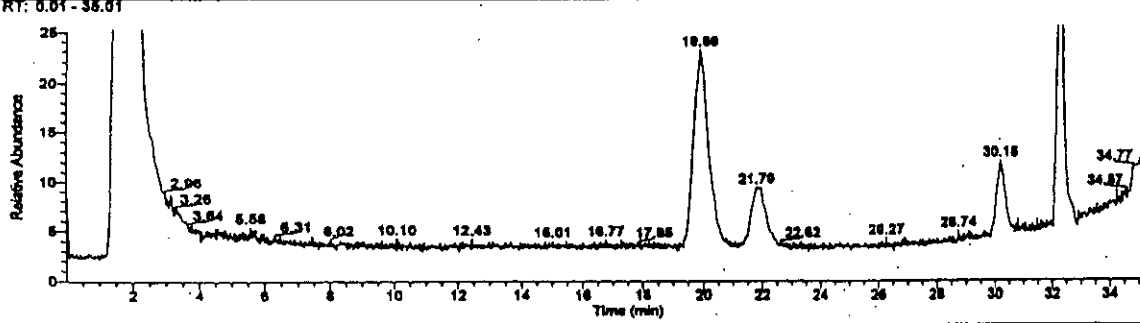
- S/IS(tri) CH3CN/1%AcOH
- S/IS(tri) MeOH/1%AcOH
- S/IS(tri) MeOH/1%HCOOH
- S/IS(tri) CH3CN/1%HCOOH
- ▲ S/IS(tri) CH3CN/0.05%TFA
- △ S/IS(tri) MeOH/0.05%TFA

図 6 MSの検出感度に及ぼす溶出溶媒の影響

イオン量が得られず、シグナル-ノイズ比 (S/N比) から考えると、1-hydroxymethyltriazolamでは1% 酢酸含有のCH₃CNが最も安定で感度が高く、triazolamでは0.05% TFA含有のMeOHが最適であった。しかし、毛髪中の代謝物の量は、triazolamに比較し微量と予測されたため、HPLC の溶出液は代謝体に対して感度の良い、1% 酢酸含有のCH₃CN-H₂Oとした。

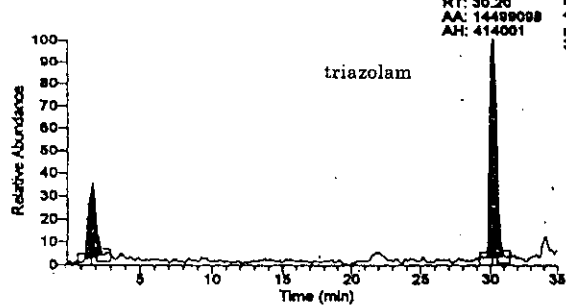
次にtriazolam および2種の水酸化体 (1-hydroxymethyltriazolam, 4-hydroxytriazolam) のHPLC分離条件を検討した。2種の水酸化体を完全に分離することと、毛髪中の不純物による妨害を考慮し、溶出条件は、H₂O:CH₃CN:AcOH (75:25:1) からH₂O:CH₃CN:AcOH (10:90:1) までの gradient 法とした。本溶出条件により、1-hydroxymethyltriazolam, 4-hydroxytriazolam, triazolam は、約 20 min, 22 min, 30 min にそれぞれ溶出した。また内部標準物質として添加した1-hydroxymethyltriazolam-d₄ は1-hydroxymethyltriazolamよりも僅かに早く溶出した (図7)。またマススペクトルの解析から、これら一連の化合物は分子量+水素 ([M+H]⁺) のシグナルが最も高くモニターイオンとして適切と判断し、毛髪試料分析の検出イオンとした。

以上の検討から確立したHPLC-MS 分離検出条件により検量線を作成したところ、図8に示すように、triazolamおよび2種の水酸化体のいずれも良好な直線を示し、実際試料に本法が十分適用可能であることが明かとなった。

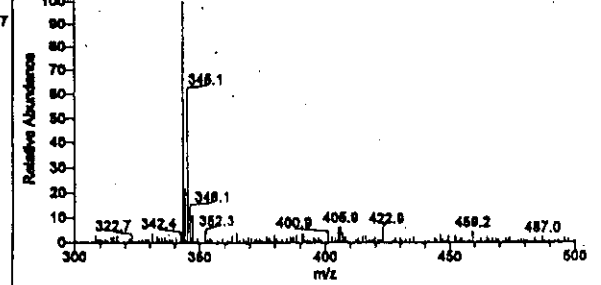


NL: 4.81E7
 TIC F: + e
 Full ms [300.00 - 800.00]

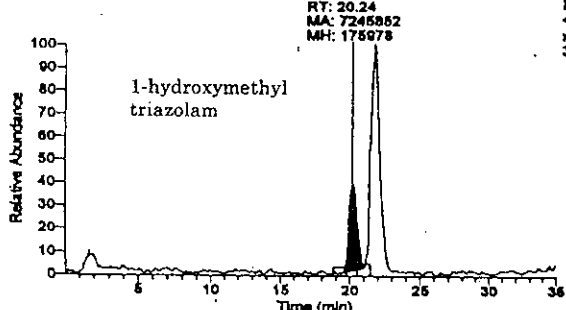
RT: 0.01 - 38.01 SM: 18B



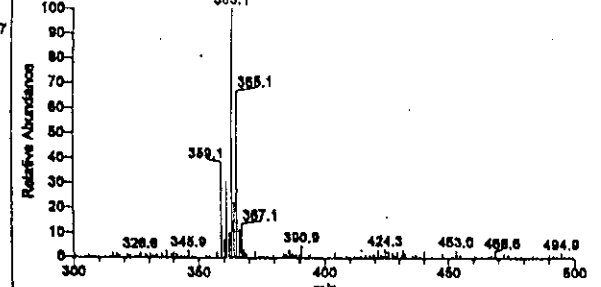
SR: 1183 RT: 30.11 AV: 1 NL: 1.08E8
 T: + e Full ms [300.00 - 800.00]



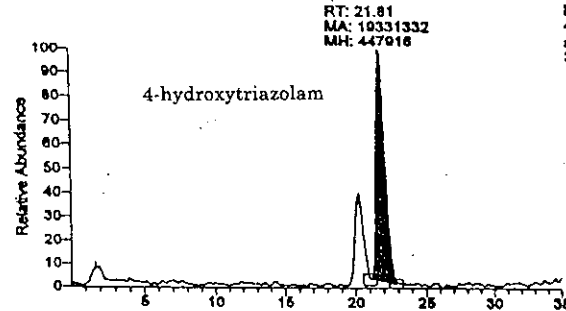
RT: 0.01 - 38.01 SM: 18B



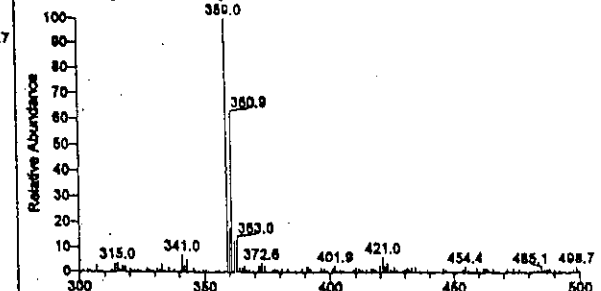
SR: 1183 RT: 20.22 AV: 1 NL: 1.22E8
 T: + e Full ms [300.00 - 800.00]



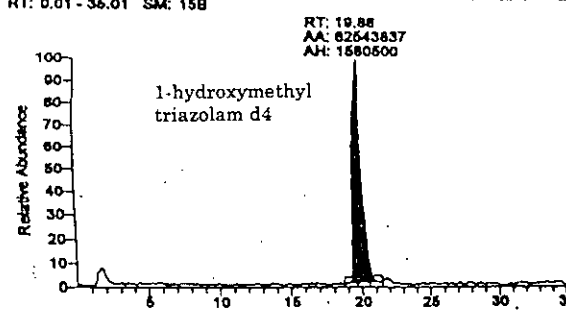
RT: 0.01 - 38.01 SM: 18B



SR: 1218 RT: 21.88 AV: 1 NL: 1.10E8
 T: + e Full ms [300.00 - 800.00]



RT: 0.01 - 38.01 SM: 18B



SR: 1145 RT: 19.83 AV: 1 NL: 3.71E8
 T: + e Full ms [300.00 - 800.00]

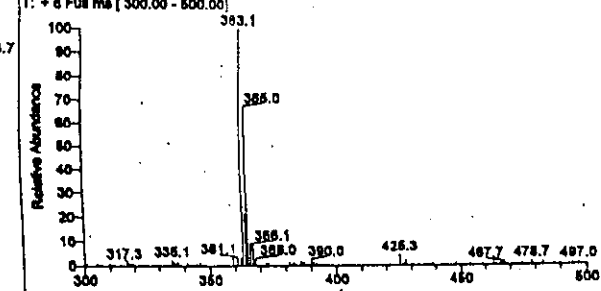
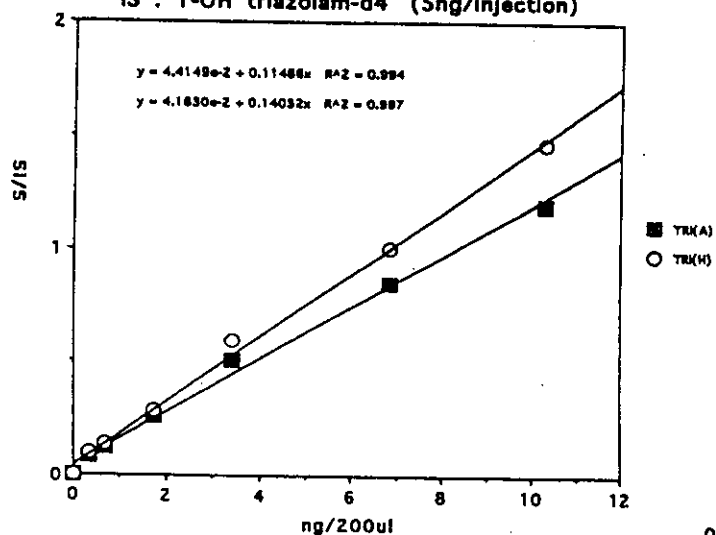
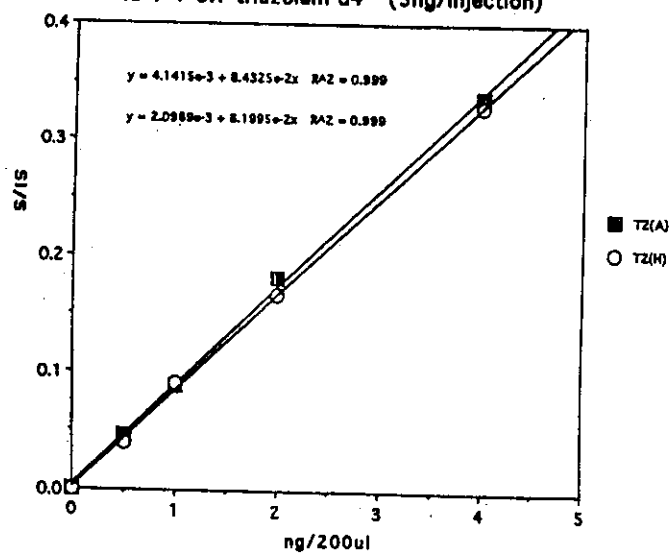


図7 トリアゾラムとその代謝物（標品）のマススペクトル

Triazolam
 Column : Mightysil RP-18
 Flow rate : 0.15ml/min
 IS : 1-OH triazolam-d4 (5ng/Injection)



1-hydroxymethyl-triazolam
 Column : Mightysil RP-18
 Flow rate : 0.15ml/min
 IS : 1-OH triazolam-d4 (5ng/Injection)



4-hydroxy triazolam
 Column : Mightysil RP-18
 Flow rate : 0.15ml/min
 IS : 1-OH triazolam-d4 (5ng/Injection)

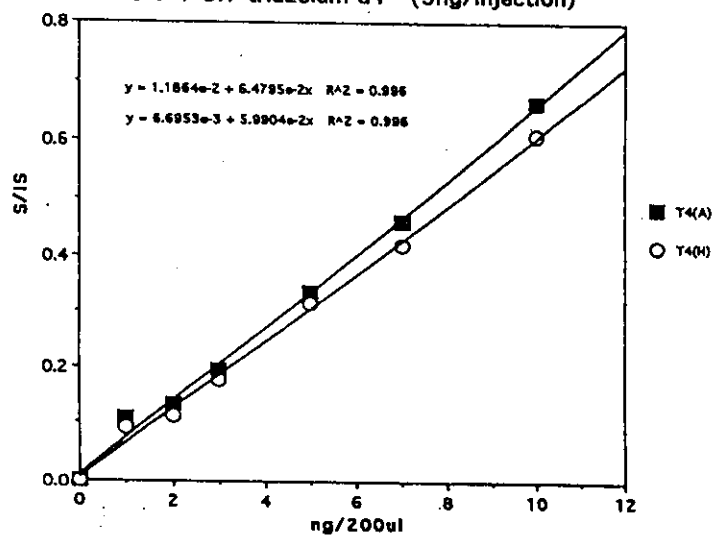


図8 トリアゾラムとその代謝物の検量線

3.3. 体毛および毛根分析

腹腔内に triazolam を投与した DA 系雄性ラットの体毛及び毛根の前処理法を図 9 に示す。SDS を用いて十分に洗浄した体毛に内部標準物質を加えて triazolam およびその代謝物を抽出した。毛根では、この洗浄操作を行うことにより、目的物質が一部除去される可能性があるの今回の実験では行っていない。またベンゾジアゼピン類は酸性溶液中で、7 員環の開環反応が起こることが報告されており、試料からの抽出操作を酸性条件下で行うことは適切ではない。また抽出溶媒の検討（図 5 参照）から塩基性の溶媒が効果的と判断し、体毛および毛根からの抽出には、 CH_2Cl_2 -MeOH-28% NH_4OH (20:80:2) を用いることとした。

体毛および毛根より得られたマススペクトルの結果を図 10～13 に示す。また試料 10 mg あたりの定量値を表 1 に示す。標品との比較から、3 mg/kg, 6 mg/kg 投与群の体毛からは、1-hydroxymethyltriazolam, 4-hydroxytriazolam, triazolam の 3 種が確認された。一方、3 mg/kg, 6 mg/kg 投与群の毛根からは、1-hydroxymethyltriazolam, 4-hydroxytriazolam, triazolam の他に、m/z 375 のシグナルが検出され、M+H の計算から、1-hydroxymethyl-4-hydroxytriazolam と思われた。

表 1 トリアゾラムとその代謝物の測定値

| | Triazolam (ng/10mg) | 1-OH Tri. (ng/10mg) | 4-OH Tri. (ng/10mg) | 1,4-OH Tri. (ng/10mg) |
|-----------|--|--|--|---|
| 6mg/kg 体毛 | 0.82 (NO.4) 0.61 (NO.5) | 0.40 (NO.4) 0.33 (NO.5) | 2.68 (NO.4) 2.87 (NO.5) | 測定不能 (NO.4&5) |
| average | 0.715 | 0.365 | 2.775 | 測定不能 |
| 3mg/kg 体毛 | 0.475 (NO.1) 0.445 (NO.2) 0.875 (NO.3) | 0.230 (NO.1) 0.175 (NO.2) 0.315 (NO.3) | 1.300 (NO.1) 1.195 (NO.2) 2.895 (NO.3) | 測定不能 (NO.1&2&3) |
| average | 0.598 | 0.24 | 1.797 | 測定不能 |
| 6mg/kg 毛根 | 0.41 (NO.4) 1.35 (NO.5) 1.08 (NO.6) | 1.37 (NO.4) 1.47 (NO.5) 1.93 (NO.6) | 6.01 (NO.4) 6.90 (NO.5) 8.23 (NO.6) | 1.83 (NO.4) 1.73 (NO.5) 2.44 (NO.6) |
| average | 0.94 | 1.59 | 7.05 | 2.00 |
| 3mg/kg 毛根 | 3.93 (NO.1) 1.15 (NO.2) 2.15 (NO.3) | 0.95 (NO.1) 0.37 (NO.2) 1.97 (NO.3) | 6.16 (NO.1) 4.12 (NO.2) 10.45 (NO.3) | 1.43 (NO.1) 1.54 (NO.2) 1.94 (NO.3) |
| average | 2.41 | 1.10 | 6.91 | 1.64 |

注) ここで 1,4-OH Triazolam の濃度は 1-OH Triazolam の検量線から計算して求めた値である。

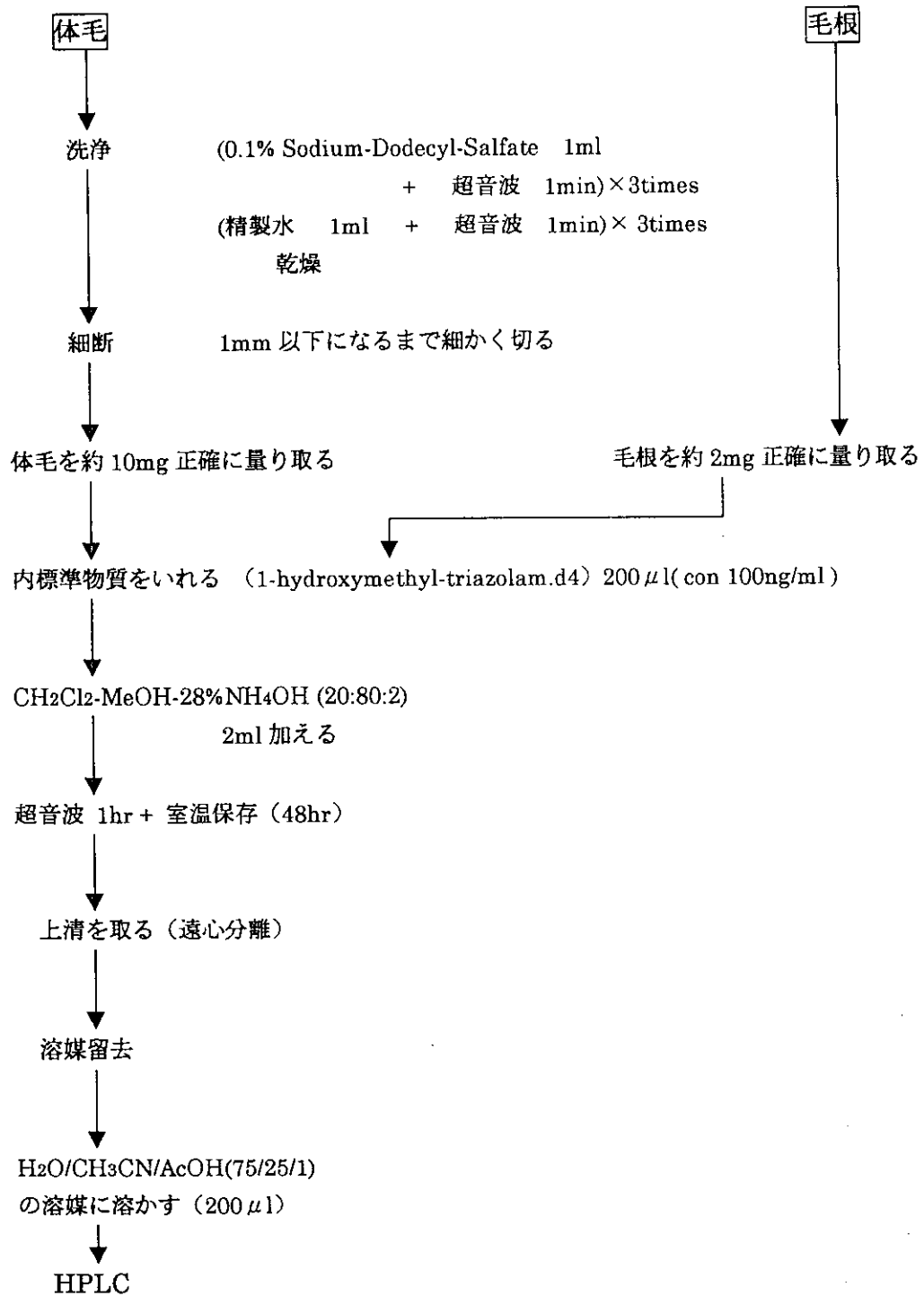
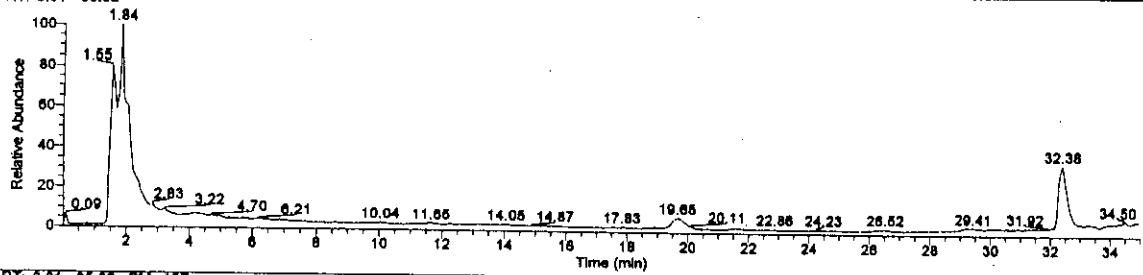
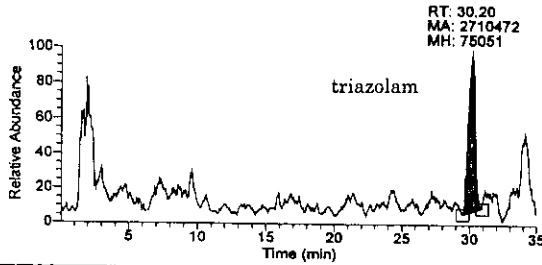


図9 体毛および毛根の前処理法



NL:
 9.40E7
 TIC F: + c
 Full ms [
 300.00 -
 500.00]

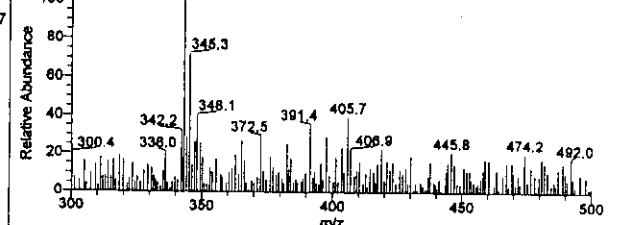
RT: 0.01 - 35.02 SM: 15B



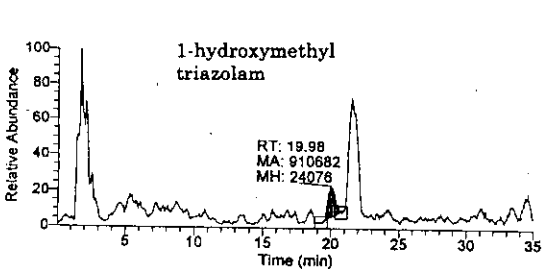
RT: 30.20
 MA: 2710472
 MH: 76051

S#: 1336 RT: 20.95 AV: 1 NL: 1.59E5

T: + c Full ms [300.00 - 500.00]



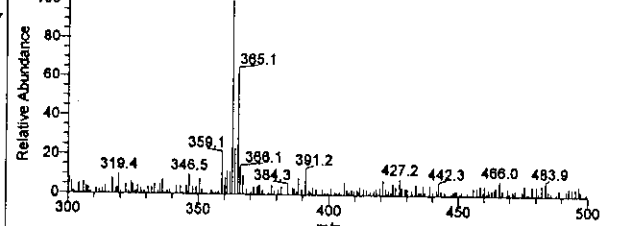
RT: 0.01 - 35.02 SM: 15B



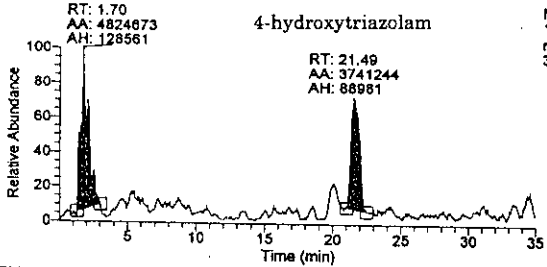
NL:
 1.38E5
 m/z=
 358.7-359.7

S#: 821 RT: 20.11 AV: 1 NL: 4.07E5

T: + c Full ms [300.00 - 500.00]



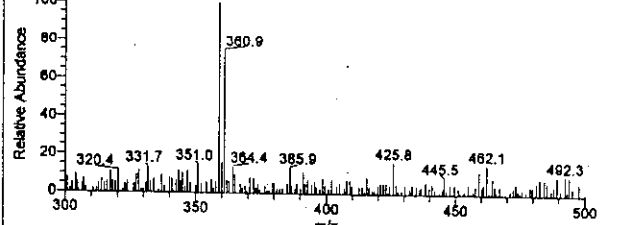
RT: 0.01 - 35.01 SM: 15B



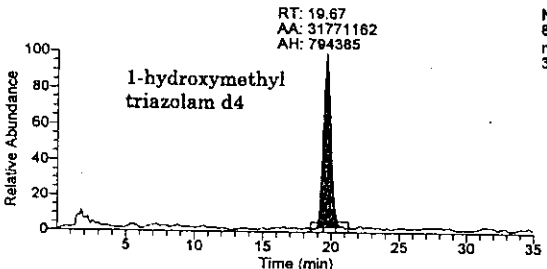
NL:
 1.38E5
 m/z=
 358.7-359.7

S#: 893 RT: 21.55 AV: 1 NL: 2.38E5

T: + c Full ms [300.00 - 500.00]



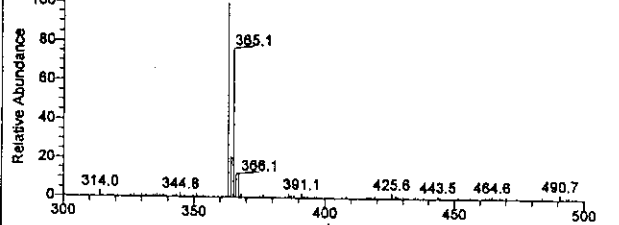
RT: 0.01 - 35.02 SM: 15B



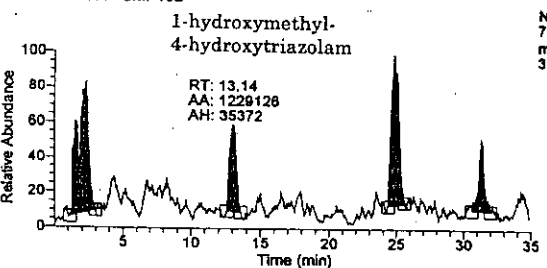
NL:
 8.14E5
 m/z=
 362.7-363.7

S#: 809 RT: 19.85 AV: 1 NL: 2.12E6

T: + c Full ms [300.00 - 500.00]



RT: 0.01 - 35.01 SM: 15B



NL:
 7.10E4
 m/z=
 374.7-375.7

S#: 520 RT: 13.12 AV: 1 NL: 1.06E5

T: + c Full ms [300.00 - 500.00]

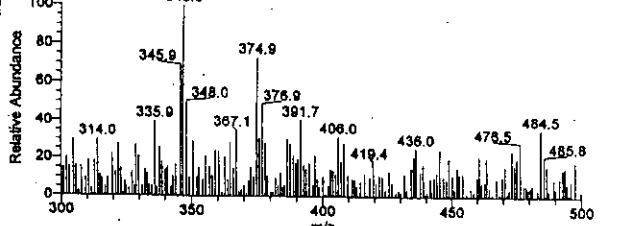
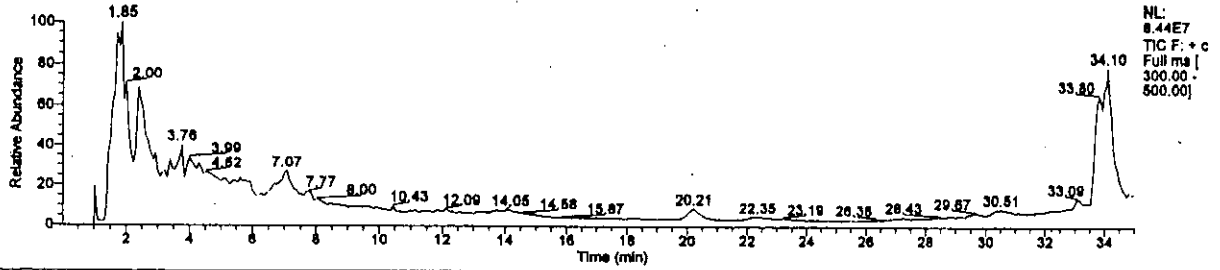
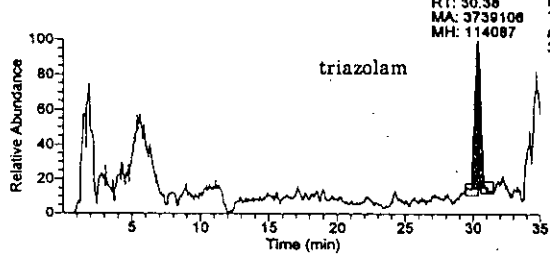


図 10 6 mg/kg投与ラット毛根のマススペクトル



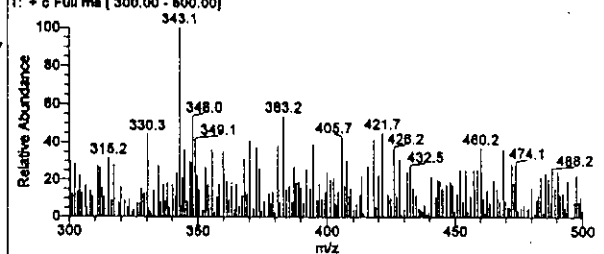
NL:
 8.44E7
 TIC F: + c
 Full ms [300.00 - 500.00]

RT: 0.01 - 35.08 SM: 15B

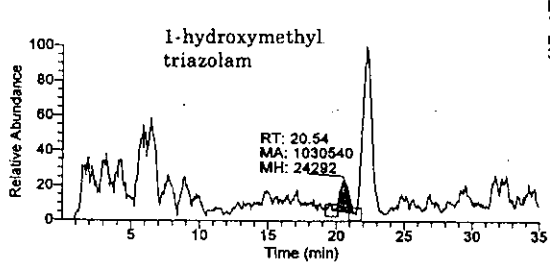


RT: 30.38
 MA: 3739108
 MH: 114087

SM: 1118 RT: 30.14 AV: 1 NL: 1.68E5
 T: + c Full ms [300.00 - 600.00]



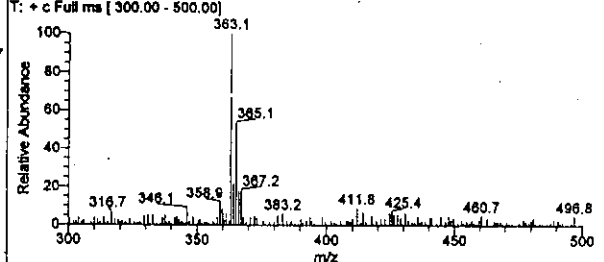
RT: 0.01 - 35.08 SM: 15B



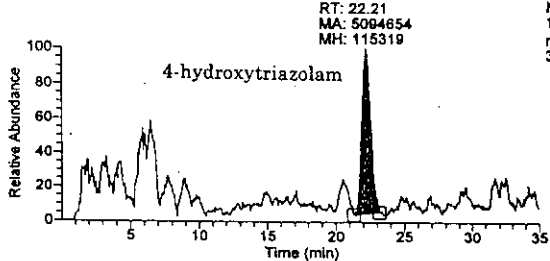
RT: 20.54
 MA: 1030540
 MH: 24292

NL:
 1.21E5
 m/z=
 358.7-359.7

SM: 738 RT: 20.52 AV: 1 NL: 8.75E5
 T: + c Full ms [300.00 - 500.00]



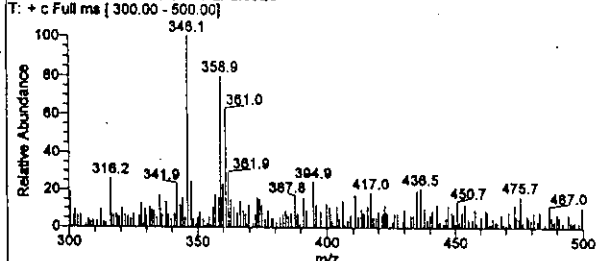
RT: 0.01 - 35.08 SM: 15B



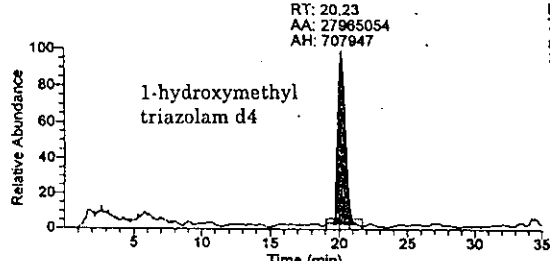
RT: 22.21
 MA: 5094654
 MH: 115319

NL:
 1.21E5
 m/z=
 358.7-359.7

SM: 783 RT: 22.04 AV: 1 NL: 2.06E5
 T: + c Full ms [300.00 - 500.00]



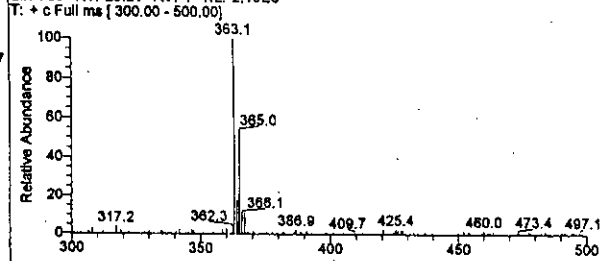
RT: 0.01 - 35.08 SM: 15B



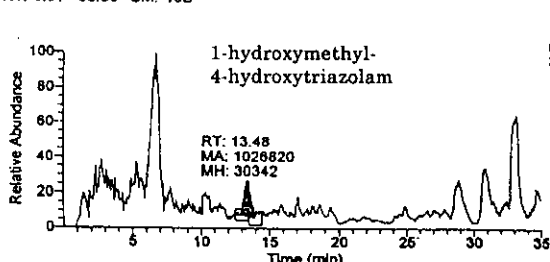
RT: 20.23
 AA: 27985054
 AH: 707947

NL:
 7.27E5
 m/z=
 362.7-363.7

SM: 730 RT: 20.21 AV: 1 NL: 2.16E6
 T: + c Full ms [300.00 - 500.00]



RT: 0.01 - 35.08 SM: 15B



RT: 13.48
 MA: 1026820
 MH: 30342

NL:
 1.48E5
 m/z=
 374.7-375.7

SM: 397-409 RT: 13.24-13.68 AV: 7 NL: 7.23E4
 T: + c Full ms [300.00 - 500.00]

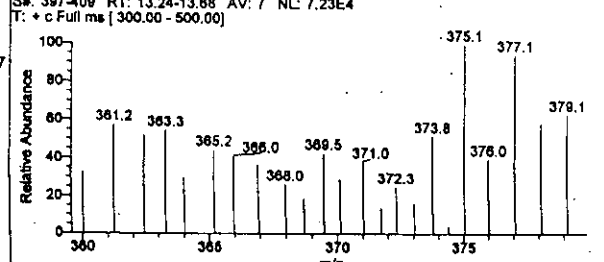
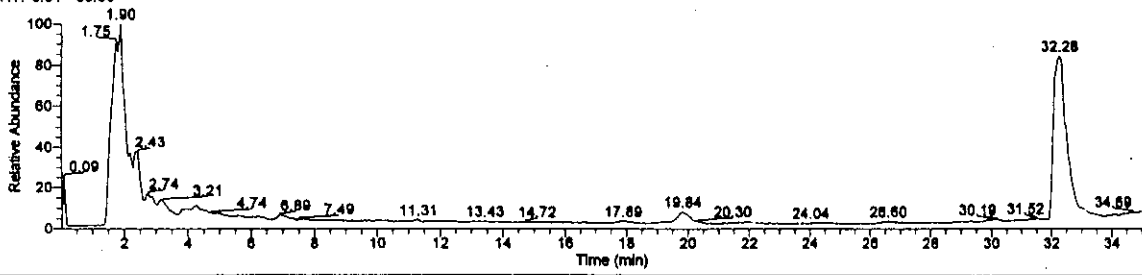
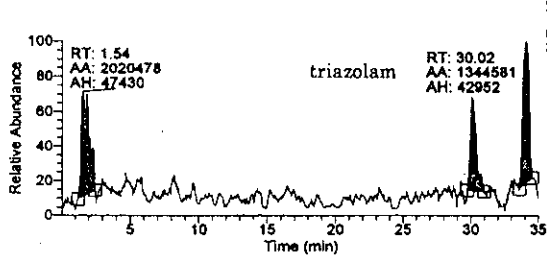


図 1 1 6 mg/kg投与ラット体毛のマススペクトル

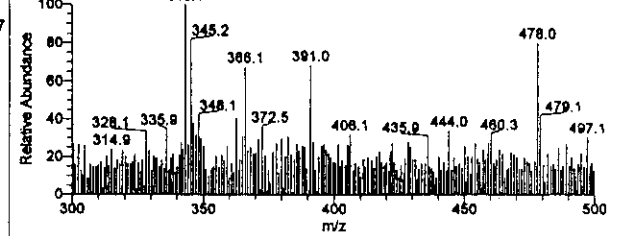


NL:
 6.61E7
 TIC F: + c
 Full ms [
 300.00 -
 500.00]

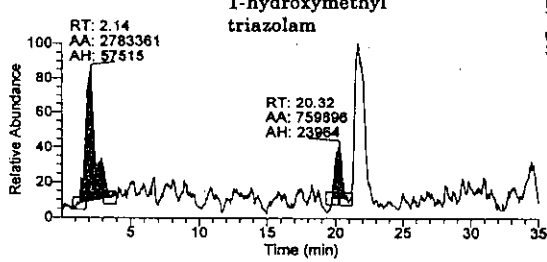
RT: 0.01 - 35.06 SM: 15B



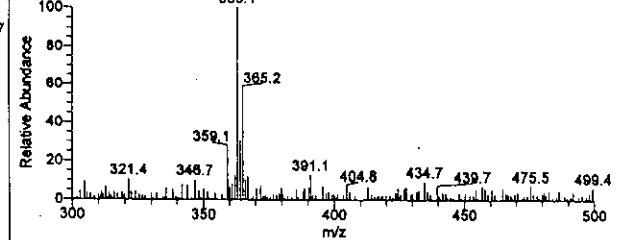
SN: 1413-1436 RT: 29.98-30.41 AV: 14 NL: 6.32E4
 T: + c Full ms [300.00 - 500.00]



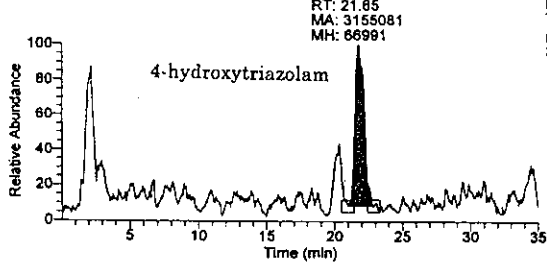
RT: 0.01 - 35.06 SM: 15B



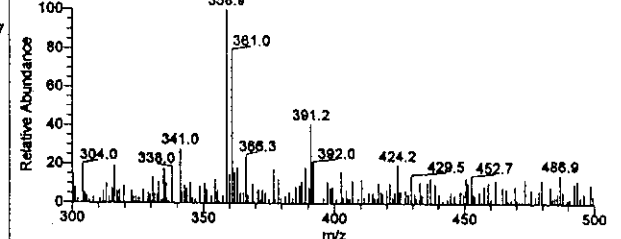
SN: 877 RT: 20.22 AV: 1 NL: 3.09E5
 T: + c Full ms [300.00 - 500.00]



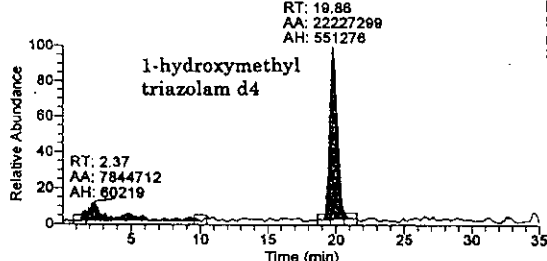
RT: 0.01 - 35.06 SM: 15B



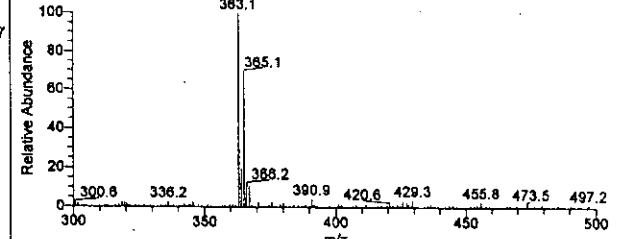
SN: 958 RT: 21.86 AV: 1 NL: 1.47E5
 T: + c Full ms [300.00 - 500.00]



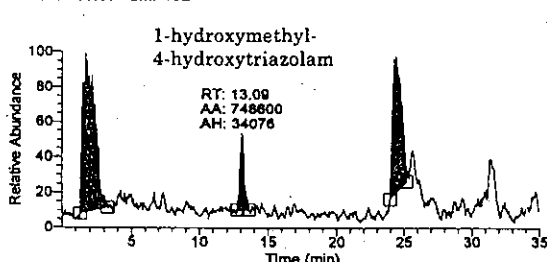
RT: 0.01 - 35.06 SM: 15B



SN: 865 RT: 19.76 AV: 1 NL: 1.38E6
 T: + c Full ms [300.00 - 500.00]



RT: 0.01 - 35.06 SM: 15B



SN: 511 RT: 13.03 AV: 1 NL: 6.07E4
 T: + c Full ms [300.00 - 500.00]

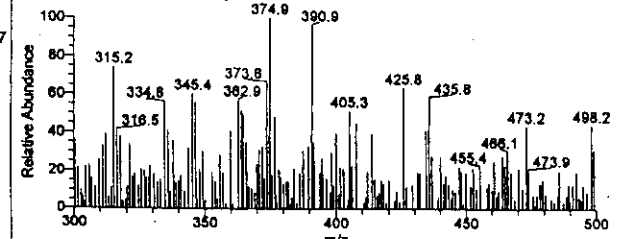
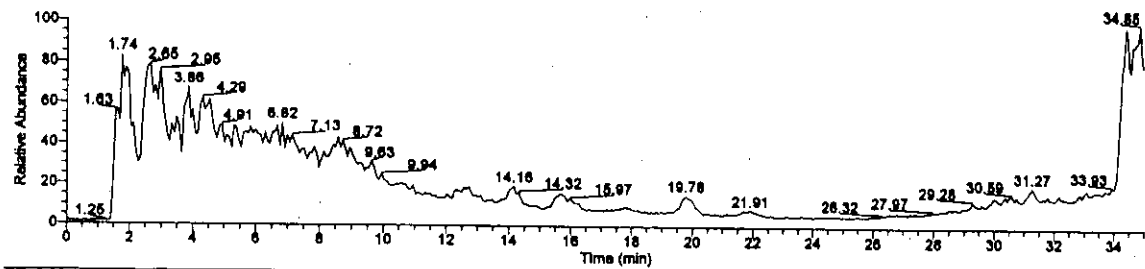
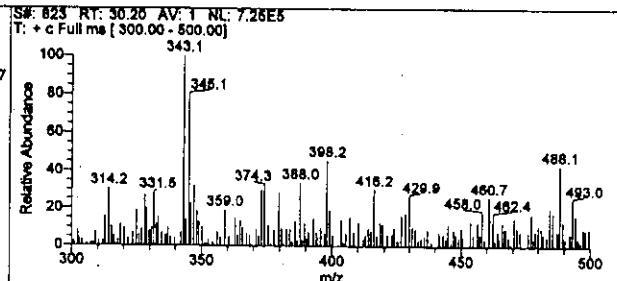
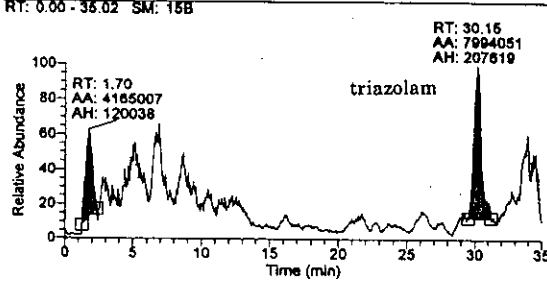


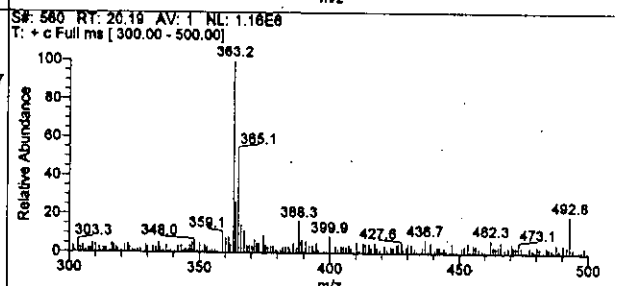
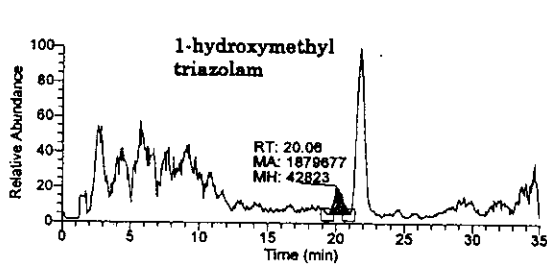
図12 3mg/kg投与ラット毛根のマススペクトル



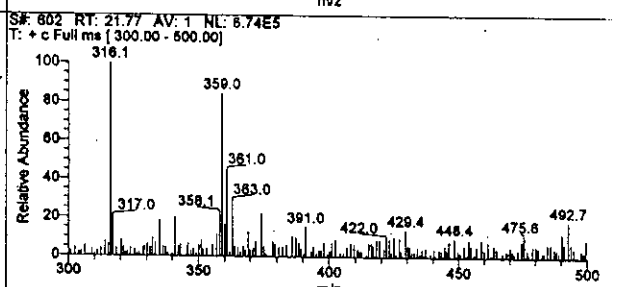
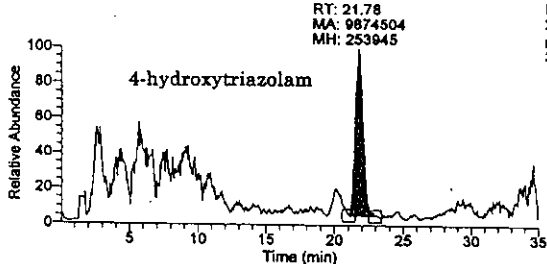
RT: 0.00-35.02 SM: 15B



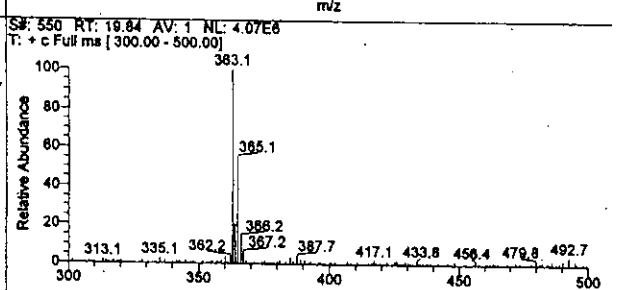
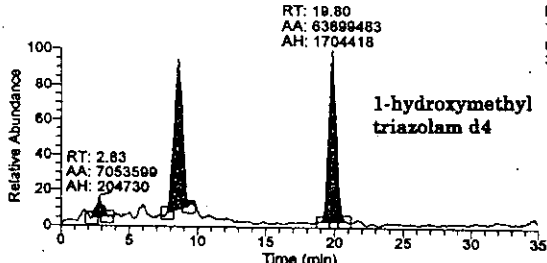
RT: 0.00-35.02 SM: 15B



RT: 0.01-35.02 SM: 15B



RT: 0.00-35.02 SM: 15B



RT: 0.00-35.02 SM: 15B

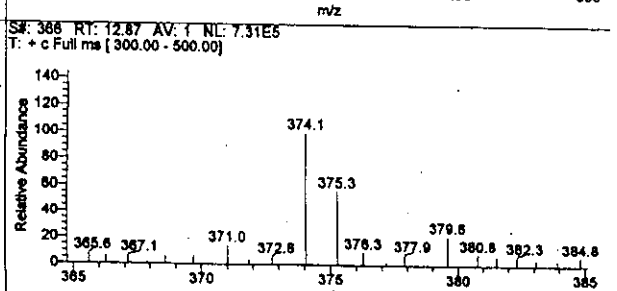
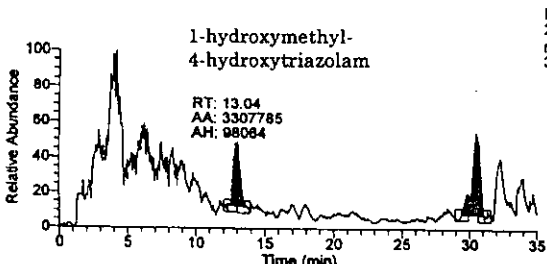


図 1 3 3 mg/kg投与ラット体毛のマススペクトル

3.4. トリアゾラムの in vitro 代謝

毛根中に認められた1-hydroxymethyl-4-hydroxytriazolamと思われる化合物を確定するために、ラット肝ミクロソームによるtriazolam の代謝実験を行った。その操作法を図14に示す。肝ミクロソームの調製は定法に従って行い、triazolamを加えて一定時間インキュベートし、生成した代謝物を酢酸エチルで抽出し、HPLCで分離後、UV (240 nm) およびMSで検出した。

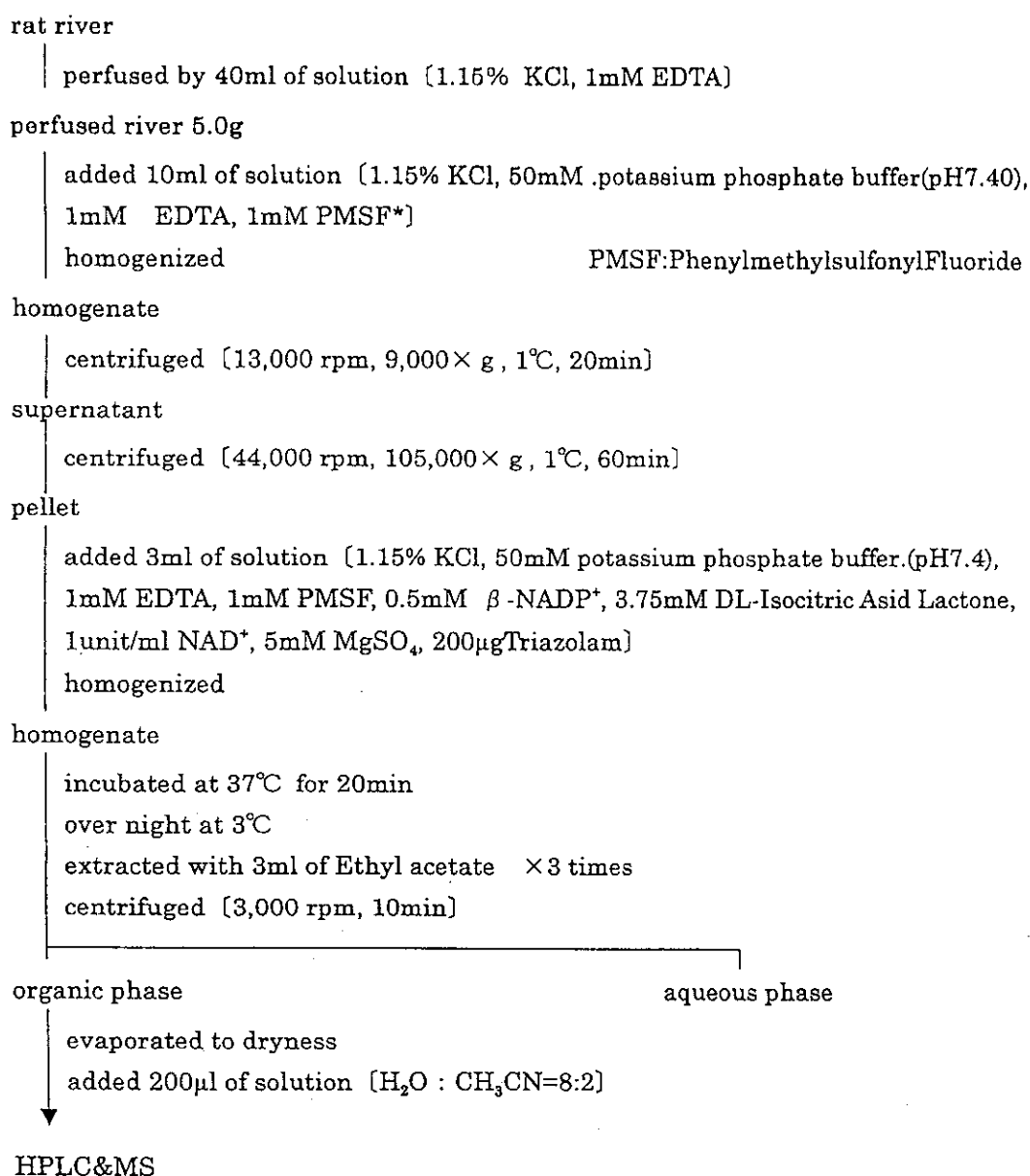


図14 ラット肝ミクロソームによるトリアゾラムの代謝実験

その結果、未反応のtriazolam 以外に、体毛、毛根の場合と同様に1-hydroxymethyltriazolam, 4-hydroxytriazolam が確認された(図15~17)。また、1-hydroxymethyl-4-hydroxytriazolamと思われるピークが検出された(図15、18)。この物質の溶出時間は、先に毛根から得られた未知の化合物のピークの溶出位置とほぼ等しく、マススペクトルのパターンが完全に一致したことから、1-hydroxymethyl-4-hydroxytriazolamの可能性が極めて高い思われた。

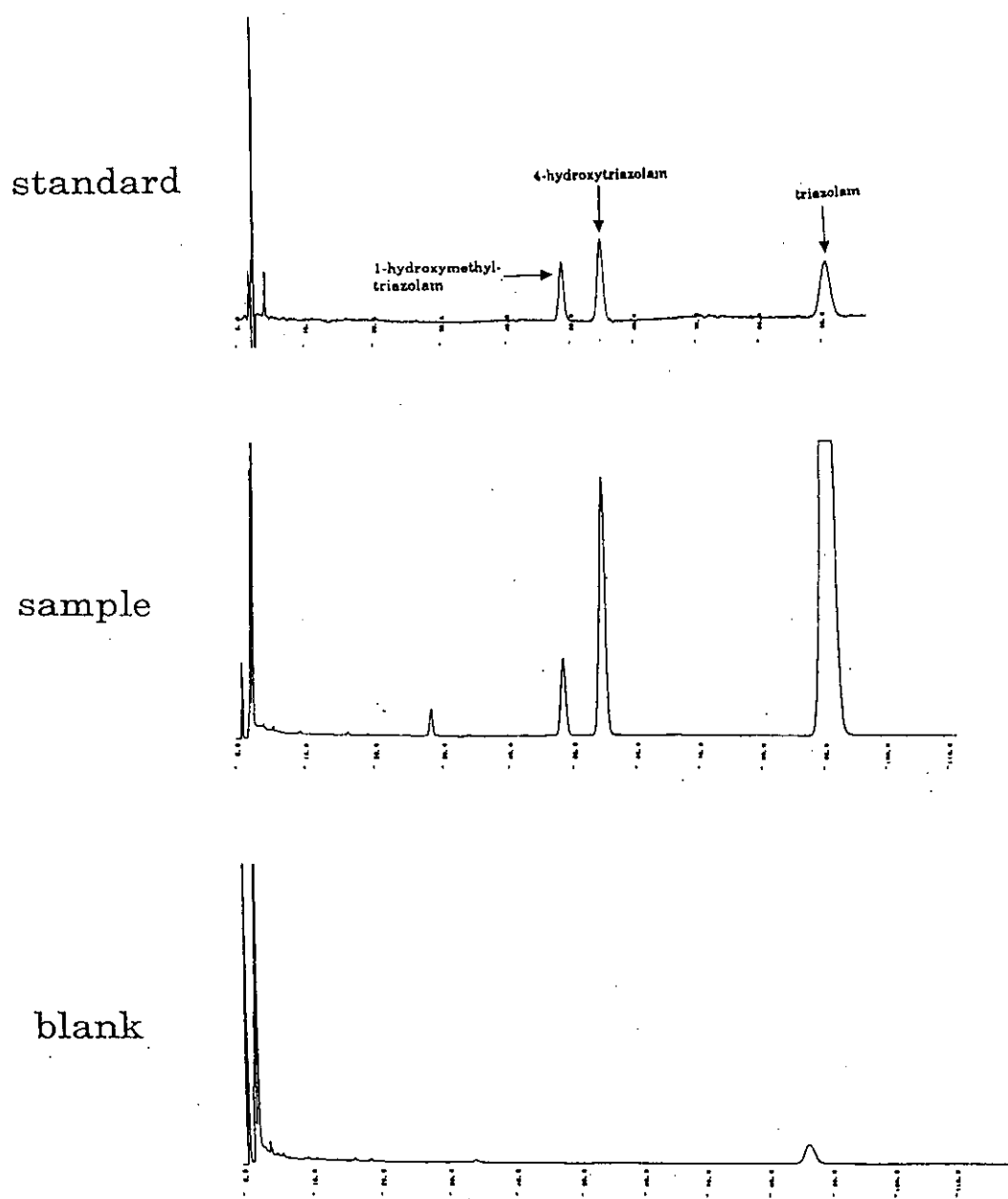


図15 紫外吸光検出法(240 nm)によるトリアゾラム代謝物のクロマトグラム

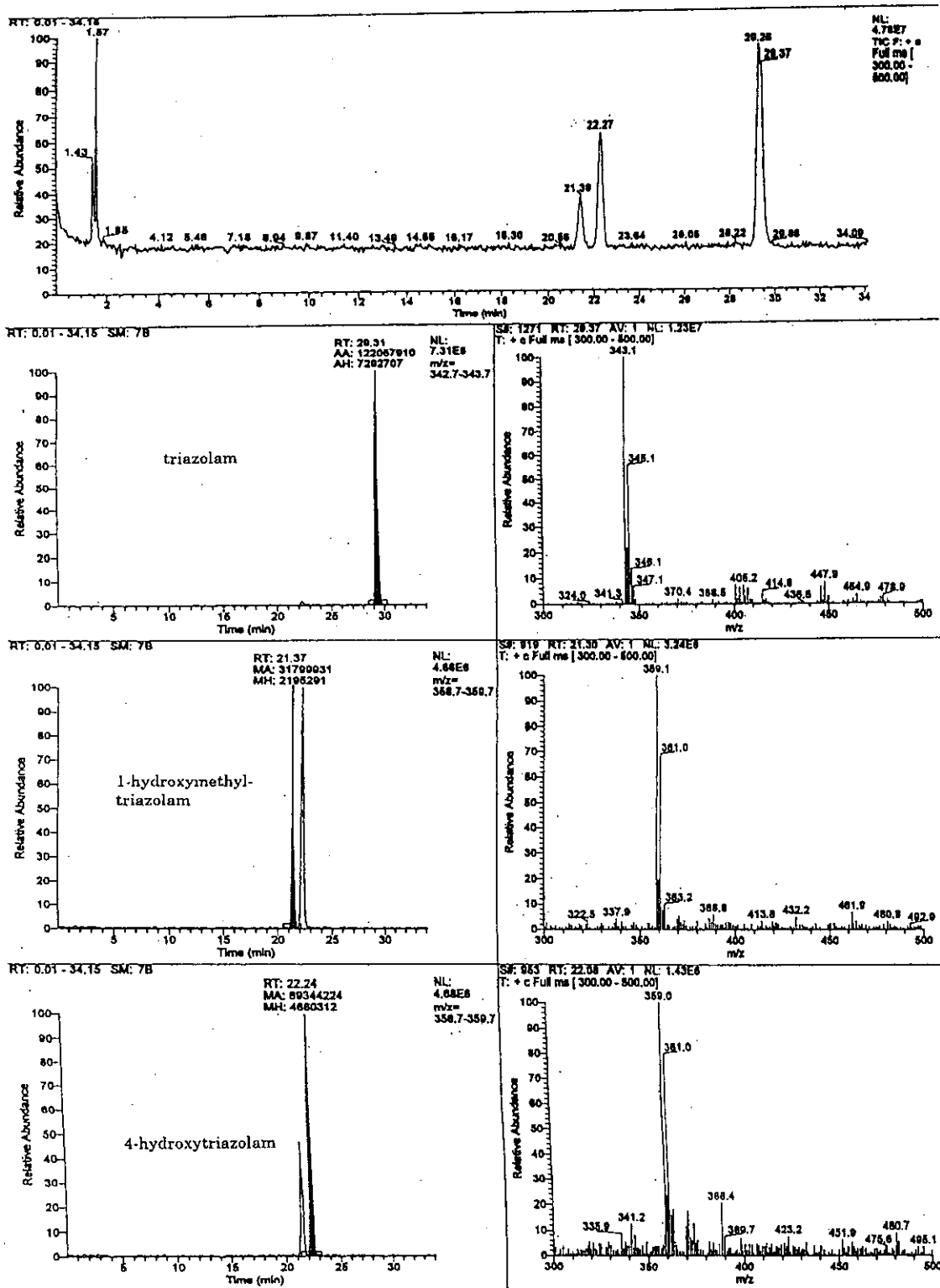


図16 トリアゾラムとその代謝物（標品）のマススペクトル

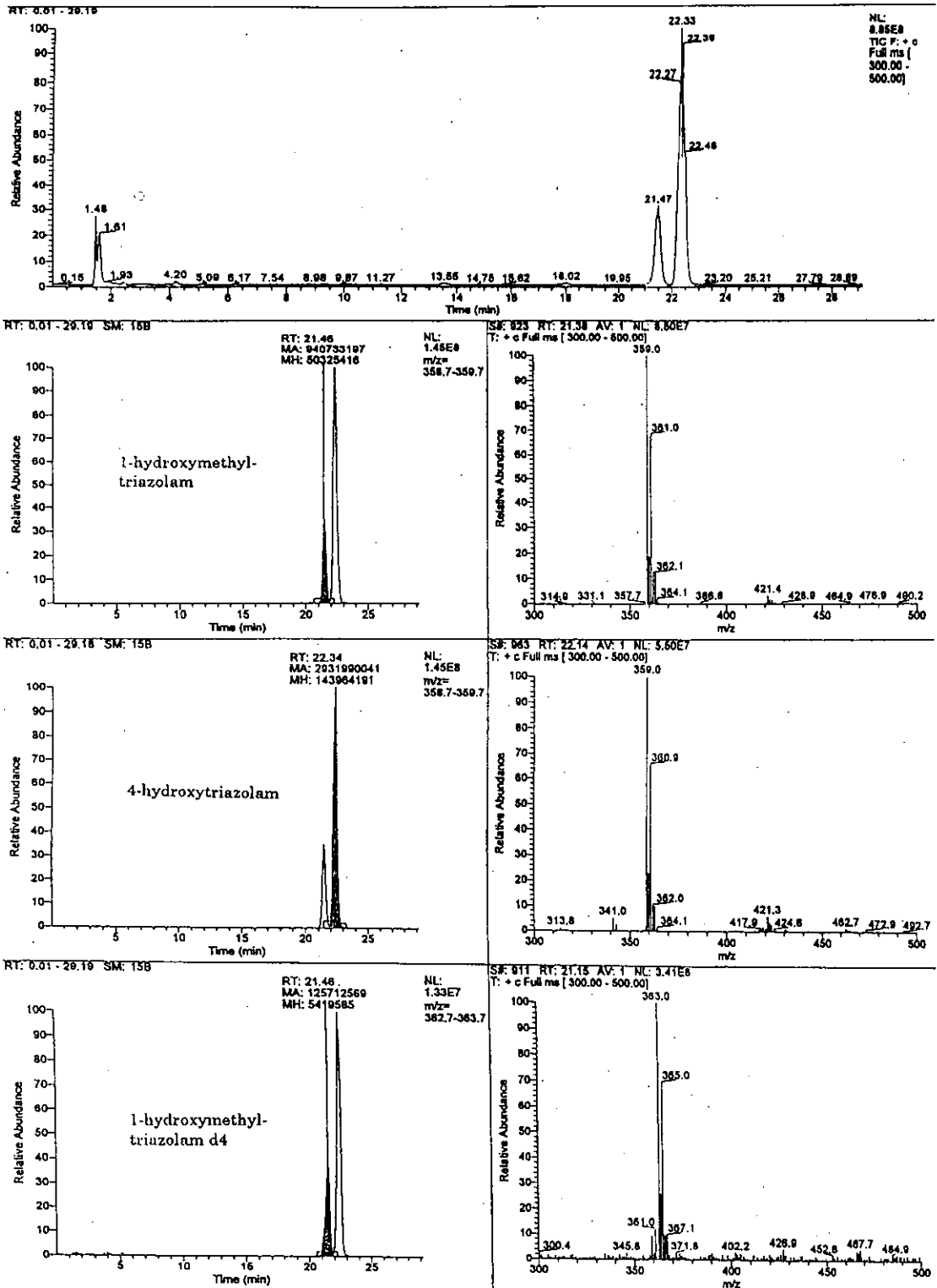


図17 ラット肝ミクロソームより得られた代謝物 (1-hydroxymethyltriazolam, 4-hydroxytriazolam) のマススペクトル