

ノート

高速液体クロマトグラフィー（HPLC）及び高速液体クロマトグラフィー・質量分析（HPLC-MS）による向精神薬の分析（第2報）

秋 枝 毅*, 猪 間 進*

The Analysis of Psychotropic Substances by High Performance
Liquid Chromatography (HPLC) and High Performance
Liquid Chromatography—Mass Spectrometry (HPLC—MS) (No.2)

Takeshi AKIEDA* and Susumu INOMA*

*Central Customs Laboratory, Ministry of Finance
531 Iwase, Matsudo-shi, Chiba-ken, 271 Japan

High performance liquid chromatography (HPLC) and high performance liquid chromatography—mass spectrometry (HPLC—MS) assay for the identification and quantification of psychotropic substances (benzodiazepines and barbiturates) has been developed.

Protonated molecular ions (M1)⁺ of benzodiazepines in positive ion mode and deprotonated molecular ions (M1)[−] of barbiturates in negative ion mode were observed with few fragmentation by air pressure chemical ionization mass spectrometry (APCI—MS).

Acetonitrile—water—trifluoroacetic acid (300 : 700 : 1) and acetonitrile—water (30 : 70) as the eluents was useful for the identification and quantification of benzodiazepines and barbiturates respectively.

The relationships between the respective structure of benzodiazepines and barbiturates and their retention time (Rt) in HPLC was recognized.

1 緒 言

現在、向精神薬は、「麻薬及び向精神薬取締法」により規制の対象となっており、その種類が73種類と多いこと、また、ほとんどが製剤であり成分としての含有量が少ないこと等から、その鑑定は容易ではない。さらに、旅行者の携帯品、郵便物等で本邦に持ち込まれるケースが急増し、向精神薬（特にベンゾジアゼピン類及びバルビタール類）を含有するかどうか又はその含有量の定量について依頼される件数が爆発的に増えている。

向精神薬の鑑定を迅速・的確に行うためには、該当する向精神薬が多いことから各データの蓄積が不可欠であり、前回、薄層クロマトグラフィー（TLC）等による向精神薬の鑑別法の検討を実施した¹⁾。しかし、ベンゾジアゼピン類は、分子環内の窒素の数が異なるものについては良好に分離できるが、分子環内の窒素の数が同じ物については互いに類似した構造を有す

ることから、相互間の分離・定性が非常に困難であること、バルビタール類は、発色試薬による検出感度が低いこと等の問題点が指摘され、更なる分析法の向上が求められている。

向精神薬の中には不揮発性又は熱に不安定な化合物が多いことから、これらの分析を行うには HPLC が非常に有効な方法であると考えられる。更に、HPLC に質量分析計〔イオン化法：大気圧化学イオン化（APCI—MS）法〕が連結した LC—MS を用いることにより、該当するピークの分子量が測定できることから、定性の能力は一段と向上し、向精神薬を一層迅速かつ正確に分析できるものと考えられる。

ベンゾジアゼピン類^{2~8)}、バルビタール類^{9~13)} の HPLC による分析法については、多くの文献が認められるが、溶離液としてリン酸バッファー等の無機物質を含有しているものが多い。これらの無機物質が溶離液に含まれる場合、スプレー方式で溶質をイオン源に導入する LC—MS 法ではスプレー管に目詰ま

*大蔵省関税中央分析所 〒271 千葉県松戸市岩瀬531

りを生じることから分析できない。これらのことから、無機物質を含有しない溶離液を調製し、これらを用いてベンゾジアゼピン類及びバルビタール類が良好に分離・同定できる条件を検討した。

更に、N.Dinov¹⁴⁾ からは、18 種類のベンゾジアゼピン化合物について置換基等の影響を考慮した計算式から求めた保持容量と測定値とを比較し、生じた誤差は相当する分子内の隣接基の影響に関連すると述べており、これらの影響を全て考慮した計算式を構築することにより、保持容量が計算できる可能性を示唆している。当所に依頼される試料には、成分不明と称するものが多いこと及び向精神薬として取締りの対象となっている 73 種類の中で、標準品として当所に所有しているものは 43 種類しかなく、他のものの入手が非常に困難な状況にあることから、測定値 (Rf 又は Rt) を参考にして未知試料の構造を推定するための基礎データの収集を行ったので、それらの結果を報告する。

2. 実験

2.1 試料及び調製

向精神薬32種類：ベンゾジアゼピン類24種類

バルビタール類8種類

定性用：試料を薬1mg/ml になるようにメタノールに溶解したもの。

定量用：試料を 0.005~0.5mg/ml の各濃度になるようにメタノールに溶解したもの。各 5 種類用意し、5 µl を HPLC に注入した。

これらの試料は、調製後、メンブランフィルター (孔径 0.2 µm) でろ過したものを HPLC に注入した。

2.2 試薬及び溶離液の調製

メタノール、アセトニトリル及びトリフルオロ酢酸 (TFA) は、液体クロマトグラフィー用のものを使用した。

水は、脱イオン水の蒸留物をメンブランフィルター (孔径 0.2 µm) でろ過したものを使用した。

所定の割合 (V/V) に混和した溶離液は、使用前に超音波装置で 15 分間脱気したものを使用した。

2.3 装置及び測定条件

高速液体クロマトグラフィー (HPLC)：日立 L6000

カラム：INERTSIL ODS-2, 4.6mm φ×150mm

溶離液：メタノール-水混液、アセトニトリル-水混液及びアセトニトリル-水-トリフルオロ酢酸混液

検出：UV (254nm：ベンゾジアゼピン類, 220nm：バルビタール類)

注入量：1~5 µl

高速液体クロマトグラフィー・質量分析 (HPLC-MS)：日立 M1000

カラム：INERTSIL ODS-2, 4.6mm φ×150mm (標準のマススペクトル測定の場合には使用しなかった)

溶離液：メタノール、メタノール-水溶液、アセトニトリル-水混液及びアセトニトリル-水-トリフルオロ酢酸 (TFA) 混液

イオン化法：大気圧化学イオン化法 (APCI 法)

気化温度：230°C

脱溶媒温度：399°C

注入量：約1 µl

3. 結果及び考察

3.1 HPLC-MS

3.1.1 ベンゾジアゼピン類の大気圧化学イオン化マススペクトル (APCI-MS)

これらのマススペクトルは、試料を直接 (カラムを通さずに) イオン源に導入して測定したものである。

ベンゾジアゼピン類の APCI-MS を Fig. 1~6 に示す。正・負両イオンのマススペクトルを測定したものである。クロラゼパ酸塩については、いずれのイオン化においても一定のスペクトルが得られなかったことから省略した。正イオンのマススペクトルは、分子にプロトンが付加することによって生じるものと考えられる擬分子イオン $[M+1]^+$ を示し、フラグメントイオンがほとんど見られないのが特徴である。また、ベンゾジアゼピン類は、分子内に Cl 又は Br が結合しているものが多く、これらの同位体に相当する擬分子イオンピーク群が観察される。

一方、負イオンのマススペクトルは、1-位に二級のアミノ基を有するベンゾジアゼピン類及び 1-位のアミノ基を含むジアゾ環又はトリアゾ環を形成するベンゾジアゼピン類については、分子からプロトンが脱離することによって生じるものと考えられる擬分子イオン $[M-1]^-$ が基準ピークとなり、フラグメントイオンはほとんど認められない。一方、1-位にメチル基等のアルキル基が置換した三級のアミノ基を有する (ジアゾ環又はトリアゾ環を形成しない) ものについては、フラグメンテーションが認められ、フラグメントイオンが基準ピークとなる場合が多々見られるのが特徴である。更に、1-位のアミノ基に隣接したカルボニル基がないメダゼパムについては一定のスペクトル (省略) が得られないことから、ベンゾジアゼピン類 (ジアゾ環又はトリアゾ環を形成するものを除く) の負イオン化に際しては、2-位のカルボニル基及び1-位のアミノ基の構造が大きく関与しているものと考えられる。

3.1.2 バルビタール類

バルビタール類の APCI-MS を Fig. 7 に示す。これらの化合物は、正イオン化は進まず、観測されたのは負イオン化のマススペクトルのみである。バルビタールの骨格構造は、二つのアミノ基を三つのカルボニル基がはさむ構造を有していることから、負に帯電した構造がより安定になるためと考えられる。各スペクトルは、分子からプロトンが脱離することによって生じるものと考えられる擬分子イオン $[M-1]^-$ を示し、フラグメントイオンが観察されないことが特徴である。

3. 1. 3 HPLC-MS

任意の6種類のベンゾジアゼピン類の混合溶液をLC-MSで分析したもののマスキロマトグラムをFig. 8に示す。トータルイオンクロマトグラムは、分離が不十分でそれぞれの物質を同定することができない。しかし、各物質の擬分子イオンのマスキロマトグラムは、それぞれのピークが他の物質に影響されことなく観察され、トータルイオンクロマトグラムは、それぞれの質量数の擬分子イオンがオーバーラップすることにより生成したものであることがわかる。

ベンゾジアゼピン類の正イオン測定及びバルビタール類の負イオン測定においては、フラグメントイオンがほとんど観察されず、擬分子イオンが強く検出されることから、それぞれの擬分子イオンをモニタリングすることによりピークを検出する（SIM法）とともにそのピークをRtを標準の化合物のRtと比較することにより、向精神薬を迅速かつ正確に確認できるものと考えられる。

3. 2 HPLC

3. 2. 1 ベンゾジアゼピン類のHPLC

ベンゾジアゼピン類のHPLCのRtデータをTable 1に示す。前回¹⁾長さ250mmのカラムを使用したか、今回、迅速かつ正確な分析を目的とするために化学結合型のもので長さ150mmカラム（INERTSIL ODS-2, 0.46φ×150mm）を使用した。

これらの結果のなかで、メタノール-水系溶離液を使用した場合、フルザepamはピーク波形が安定せず、正確なリテンションタイムが求められなかった。また、アセトニトリル-水系の溶離液を使用した場合、クロキサゾラムはピークがブロードでかつ左右非対称のピークとなる。しかし、アセトニトリル-水-TFA系の溶離液を使用した場合Fig. 9に示すようにいずれのピークも左右対称のピークを示し、各ピークの分離能も良好であった。

オキサゾラムのLC-MSからは、二本のピークが認められたが、両ピークとも同じ質量数の擬分子イオン（正イオンの場合、質量数329）を示す。Miyadera¹⁵⁾らによると、オキサゾラムをHPLCで分析するとcis-及びtrans-異性体に相当する二本のピークに分離すると述べており、これらの二本のピークはcis-及びtrans-異性体によるものと考えられる。

クロラゼパ酸塩をHPLCに注入後、相当するピークのマススペクトルをFig. 10に示す。正イオンのマススペクトルの場合、質量数271、負イオンのマススペクトルの場合、質量数269に基準ピークが認められ、それぞれ分子内塩素原子によるものと考えられる同位体イオンピーク群が認められる。クロラゼパ酸は、水溶液中でpH=4以上の酸性にすると脱炭酸が起り、相当する脱炭酸化合物であるノルダゼパム（質量270）に変化すること³⁾及びM. Chiartti⁸⁾らによるとクロラゼパ酸はクロマトグラフィー中にノルダゼパムに変化すると述べており、測定したピークのマススペクトルは、クロラゼパ酸がクロマトグラフィー中に変化することにより生成したノルダゼパムによるものと考えられる。

4-位の窒素及び酸素原子を含む五員環を有するオキサゾロ誘導体（オキサゾラム、クロキサゾラム及びハロキサゾラム）のアルコール溶液を調製後、長期間放置したもののLC-MSからは、相当するマススペクトルを示すピーク以外に、相当する化合物の擬分子イオンよりも質量数で18多い擬分子イオン（Fig. 11）を有するピークが認められる。これらのピークは調製直後では認められないことから、調製後、徐々に加水分解又は付加反応によって生じたものと考えられ、分析に際しては、試料溶液を調製後、すみやかに使用することが望まれる。

3. 2. 2 ベンゾジアゼピン類のRtと構造との相関性について

Fig. 12は、三種類の溶離液を用いたときのRtを折れ線グラフにしたものである。ベンゾジアゼピン類の2-位がカルボニル基のもの（○印）、そのオキサゾロ誘導体（▽印）、ジ又はトリアゾル環を有するもの（□印）及びその他のもの（▲印）に分類するとそれぞれ特徴的なパターンを示すことがわかる。上記構造毎のRtと置換基とをまとめたものをTable 2に示す。

ベンゾジアゼピン類の2-位がカルボニル基のもの（Fig. 13）については、メタノール-水系及びアセトニトリル-水系の溶離液を使用したときには、逆相の条件であることから、親油性の大きい置換基があるほどRtは長くなり、親水性の置換基が多いほどRtは短くなる。置換基の親油性の度合いを示す順はほぼ $R-\text{CH}_3 > \text{H} > \text{Cl} > \text{F} > \text{OH} > \text{NO}_2 > \text{N}$ （Rはメチル基よりも大きい置換基）となるのがわかった。一方、アセトニトリル-水-TFA系の溶離液を使用した場合、5-位に置換したベンゼン環の2'-位の置換基の影響が大きく、1-位がアルキル基で置換されているかどうかあまり影響は認められない。5-位に置換したベンゼン環の2'-位の置換されていない場合には、同じ割合のアセトニトリル-水系の溶離液のRtに比較して、その値が1/2以下程度に短くなるが、2'-位にCl又はFが置換した場合、TFAの影響がほとんどみられないのが特徴である。

オキサゾロ誘導体（Fig. 14）については、メタノール-水系及びアセトニトリル-水系の溶離液を使用したときには、上記と同様な傾向を示すが、4-位の窒素を含むオキサゾロ環を形成していることから、アセトニトリル-水-TFA系の溶離液を使用した場合、5-位に置換したベンゼン環の2'-位の置換基に関係なく、同じ割合のアセトニトリル-水系の溶離液のRtに比較して、Rtが著しく短い値となることが特徴である。

ジ又はトリアゾル環を有するもの（Fig. 14）については、メタノール-水系及びアセトニトリル-水系の溶離液を使用したときには、ジアゾール環の方がトリアゾール環よりもRtが長いのが特徴である。アセトニトリル-水-TFA系の溶離液を使用した場合、同様に5-位に置換したベンゼン環の2'-位が置換されていない場合には、同じ割合のアセトニトリル-水系の溶離液のRtに比較して、その値が1/2以下程度に短くなるが、2'-位にCl又はFが置換した場合、TFAの影響がほとんどみられないのが特徴である。

3.2.3 バルビタール類の HPLC

バルビタール類の HPLC の結果を Table 3 に示す。メタノール-水系及びアセトニトリル-水系の溶離液で比較的良好に分離できるが、アモバルビタールとペントバルビタール (質量数がいずれも 226) については、それぞれの質量数が同じであることから LC-MS を用いても分離できないこと及び R_t の値が近接していることから、互いのピークがオーバーラップし分類が困難であるが、アセトニトリル：水=30：70 の条件で良好に分離できることがわかった。Fig.15 にその高速液体クロマトグラムを示す。バルビタール類の場合は、アセトニトリル-水-TFA 系の溶離液を使用した場合、TFA のイオン化が優先し、バルビタール類の負イオンが得られず、負イオンの LC-MS の測定には使用できないことがわかった。

3.2.4 バルビタール類の R_t と構造との相関性について

用いた溶離液とバルビタールの R_t の関係を Fig. 16 に示す。バルビタール類の場合は、アセトニトリル-水-TFA 系の溶離液を使用した場合でも同じ割合のアセトニトリル-水系の溶離液を用いた場合の R_t とほぼ同じ値を示すことが特徴である。バルビタールの R_t と置換基についてまとめたものを Table 4 に示す。ベンゾジアゼピン類と同様に親油性の大きい置換基が多いほうが一般的に R_t の値が大きくなるのが特徴である。

3.3 定量性について

3.3.1 ベンゾジアゼピン類

アセトニトリル-水-TFA 系の溶離液を用いてベンゾジアゼピン類の定量性について考察した。注入量を 5 μ l と一定にし、ベンゾジアゼピン類の溶液の濃度 (mg/ml) と各ピーク面積の値をプロットしたもの Fig. 17~19 に示す。各化合物とも 0.01~0.2mg/ml の濃度の範囲で相関係数 $\gamma = 0.9990$ 以上の

値を示し (Table 5)、良好な結果が得られた。

3.3.2 バルビタール類

アセトニトリル-水系の溶離液を用いてベンゾジアゼピン類の定量性について考察した。注入量を 5 μ l と一定にし、ベンゾジアゼピン類の溶液の濃度 (mg/ml) と各ピーク面積の値をプロットしたもの Fig. 20 及び 21 に示す。各化合物とも 0.01~0.5mg/ml の濃度の範囲で相関係数 $\gamma = 0.9990$ 以上の値を示し (Table 6)、良好な結果が得られた。

4. 要 約

HPLC 及び HPLC-MS を用いた向精神薬の定性及び定量分析法を検討した。

ベンゾジアゼピン類の正イオン測定及びバルビタール類の負イオン測定においては、擬分子イオンが観察され、フラグメンテーションはほとんど認められてないことがわかった。

ベンゾジアゼピン類分析用の溶離液としてアセトニトリル-水-TFA 混液 (300：700：1) が有効であること及びバルビタール類の分析用の溶離液としてアセトニトリル-水混液 (30：70) が有効であることがわかった。

ベンゾジアゼピン類又はバルビタール類の構造と R_t との間には相関性が認められた。

5. 謝 辞

試料を提供していただいた各社関係者の方々、実験を手伝っていただいた中国海関 陳志敏氏及びインドネシア税関 Mr. Syarif R. Syarif Hideyat 氏に謝意を表します。

参考文献

- 1) 藤村徹, 秋枝毅, 猪間進: 本誌, 33, 65 (1994)
- 2) R. J. Flanagan, G. C. A. Storey and D. W. Holt: J. Chromatogr., 187, 391 (1980)
- 3) R. Gill, : Clarke's Isolation and Identification of Drugs, The Pharmaceutical Press, 217 (1986)
- 4) 厚生省向精神薬分析マニュアル No.5
- 5) R. Gill, : B. Law and J. P. Gibbs: J. Chromatogr. 356, 37 (1986)
- 6) C. M. Selavska, I. S. Krull and I. S. Lurie: J. Chromatogr. Sci. 23, 499 (1985)
- 7) P. M. Kabra, G. L. Stevens and L. J. Marton: J. Chromatogr. 150, 355 (1978)
- 8) M. Chiarotti, N. D. Giovanni and A. Fiori: J. Chromatogr. 358, 169 (1986)
- 9) R. Gill, A. A. T. Lopes and A. C. Moffat: J. Chromatogr. Biomed. Appl., 226, 117 (1981)
- 10) R. Gill, A. H. Stead and A. C. Moffat: J. Chromatogr., 204, 275 (1981)
- 11) R. Gill, : J. Chromatogr. Sci., 24, 153 (1986)
- 12) J. Hoogmartens, E. Rotes and H. Vanderhaeghe: J. Chromatogr., 219, 431 (1981)
- 13) M. J. M. Wells et al., : J. Chromatogr. Sci., 19, 573 (1981)
- 14) N. Dimov and M. Moskovkina: J. Chromatogr. 552, 59 (1991)
- 15) T. Miyodera, A. Terada, M. Fukunaga, Y. Kawano, T. Kamioka, C. Tamura, H. Takagi and R. Tachikawa: J. Medicinal Chem. 14, 520 (1971)

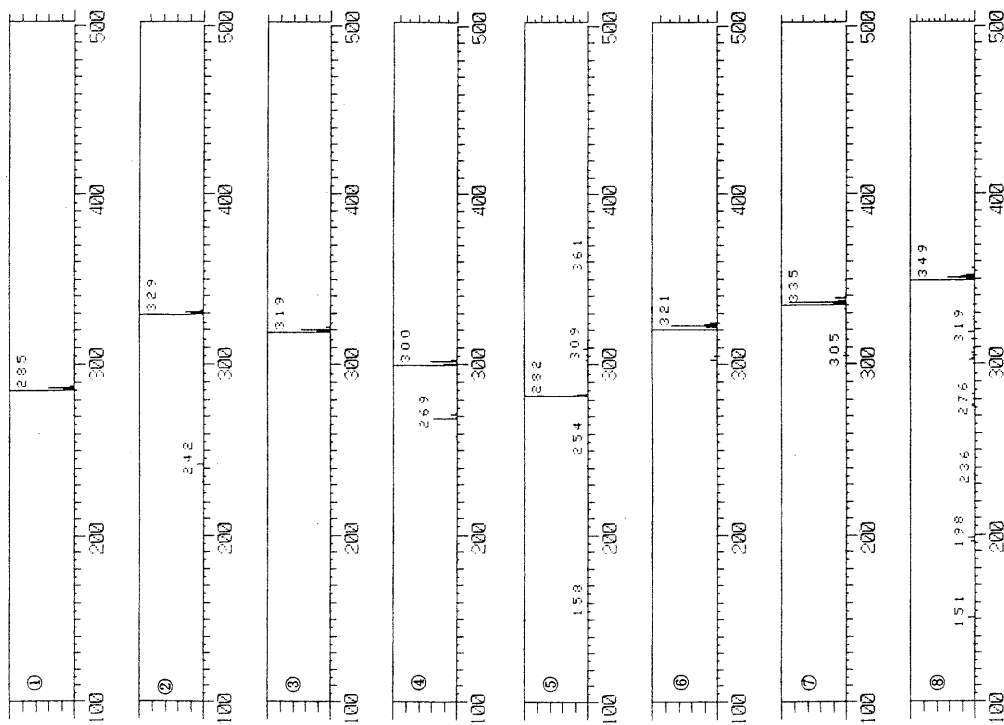


Fig. 1 Positive ion mass spectra of benzodiazepines

①Diazepam, ②Oxazolam, ③Clotiazepam, ④Chlordiazepoxide,
⑤Nitrazepam, ⑥Lorazepam, ⑦Lormetazepam, ⑧Clonazepam,

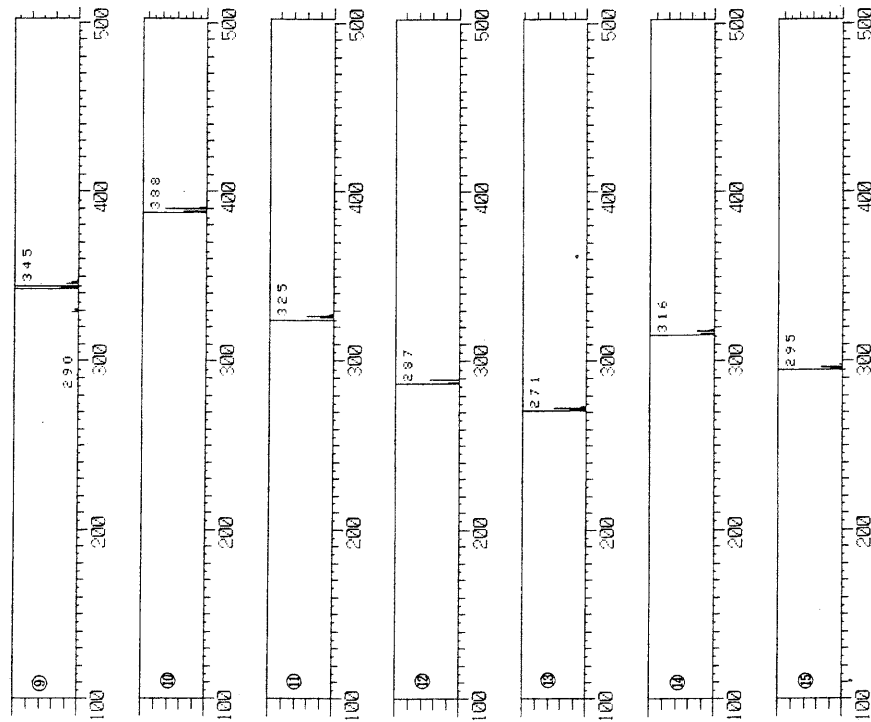


Fig. 2 Positive ion mass spectra of benzodiazepines

⑨Triazolam, ⑩Flurazepam, ⑪Prazepam, ⑫Oxazepam,
⑬Medazepam, ⑭Clonazepam, ⑮Estazolam,

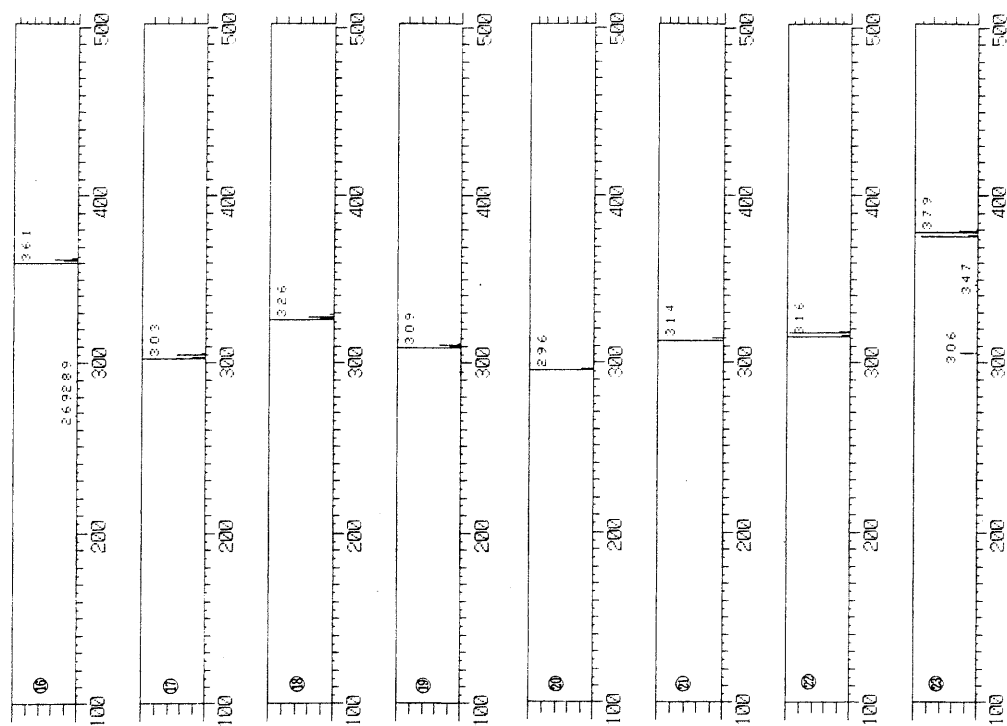


Fig. 3 Positive ion mass spectra of benzodiazepines

⑬Ethyl Loflazepate, ⑰Fludiazepam, ⑱Midazolam, ⑲Alprazolam,
 ⑳Nimetazepam, ㉑Flunitrazepam, ㉒Bromazepam, ㉓Haloxazolam,

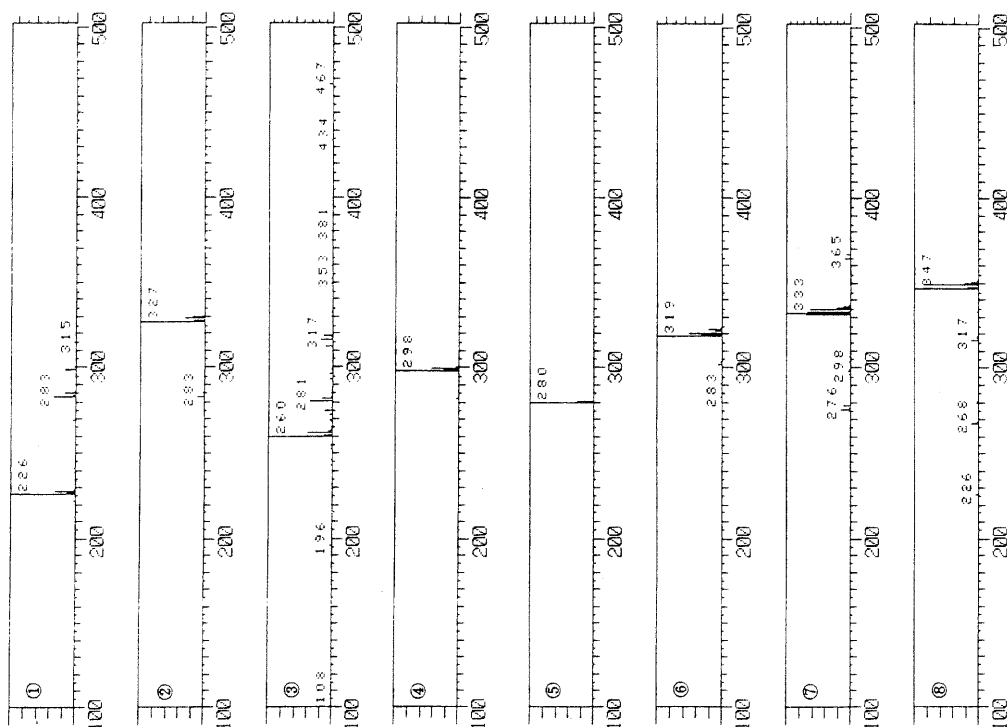


Fig. 4 Negative ion mass spectra of benzodiazepines

①Diazepam, ②Oxazolam, ③Clotiazepam, ④Chlordiazepoxide,
 ⑤Nitrazepam, ⑥Lorazepam, ⑦Lormetazepam, ⑧Clonazepam,

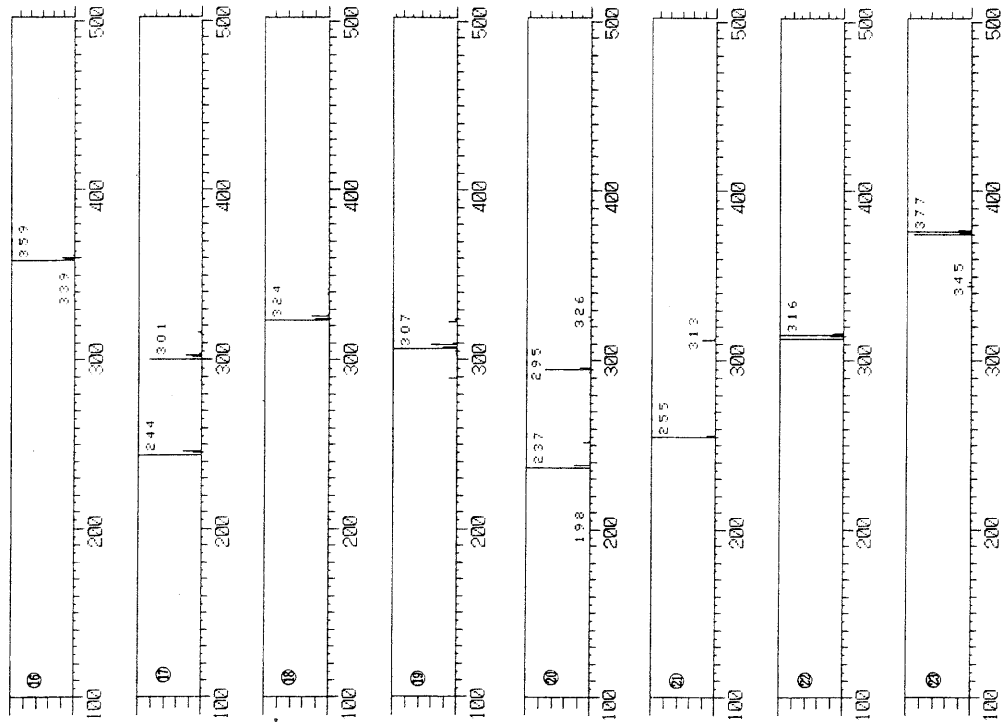


Fig. 6 Negative ion mass spectra of benzodiazepines

⑬ Ethyl Lofazepate, ⑭ Fludiazepam, ⑮ Midazolam, ⑯ Alprazolam,
⑰ Nimetazepam, ⑱ Flunitrazepam, ⑲ Bromazepam, ㉓ Haloxazolam,

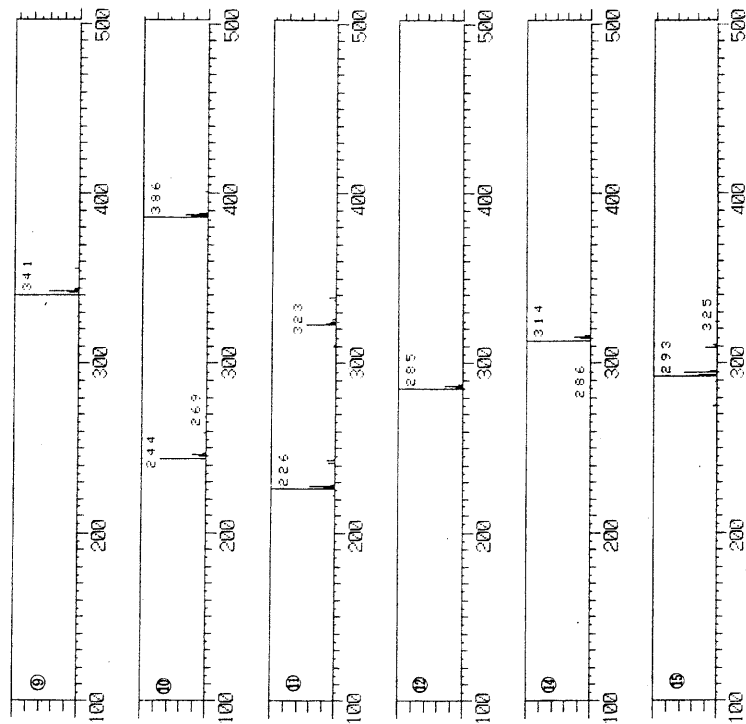


Fig. 5 Negative ion mass spectra of benzodiazepines

⑨ Triazolam, ⑩ Flurazepam, ⑪ Prazepam, ⑫ Oxazepam,
⑬ Clonazepam, ⑭ Estazolam,

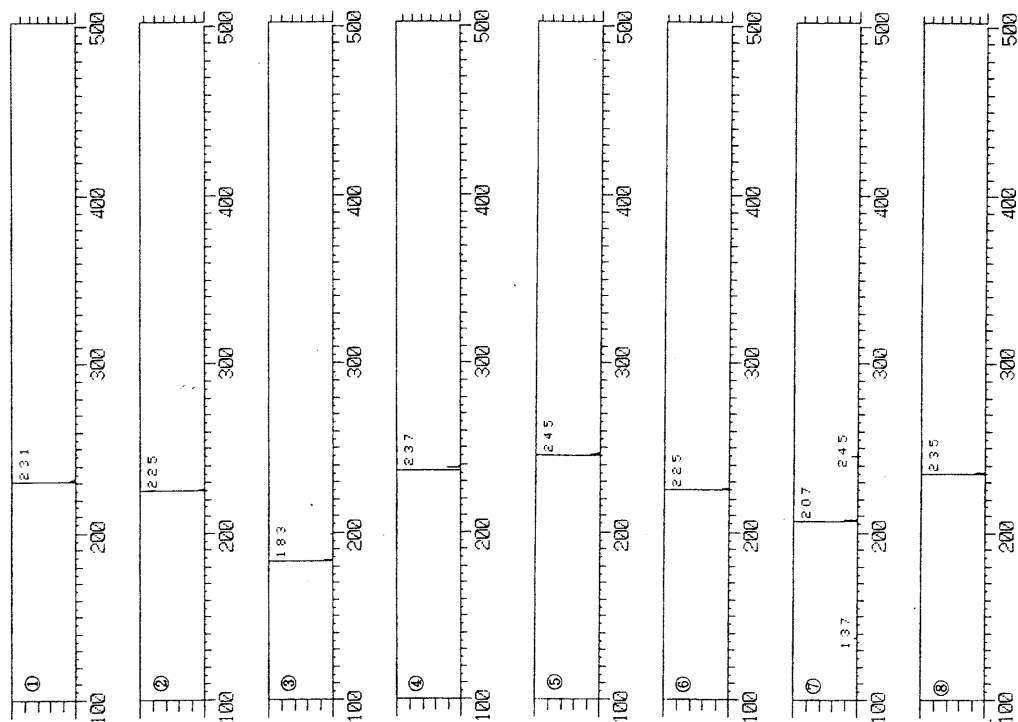


Fig. 7 Negative ion mass spectra of barbiturates

①Phenobarbital, ②Amobarbital, ③Barbital, ④Secobarbital
 ⑤Methylphenobarbital, ⑥Pentobarbital, ⑦Allobarbital, ⑧Cyclobarbital

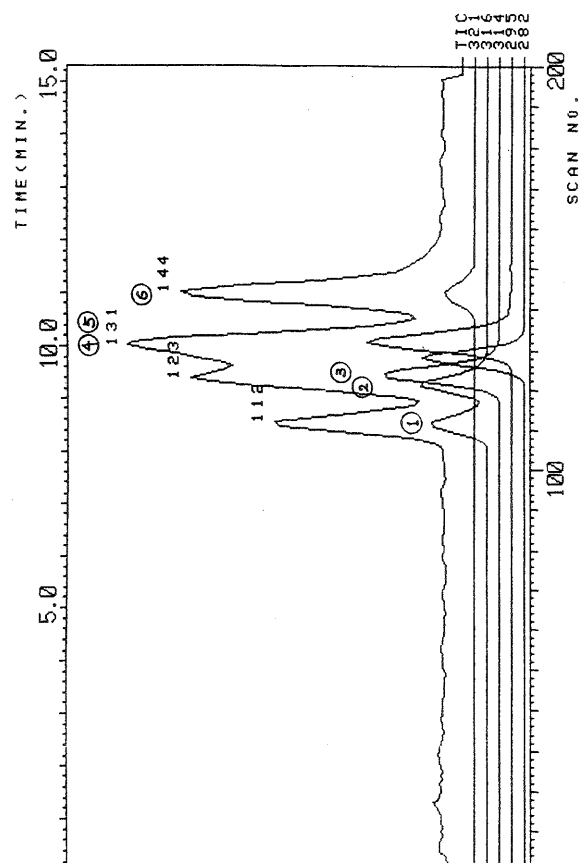


Fig. 8 HPLC-MS of benzodiazepines

Sample : ①Bromazepam, ②Clonazepam, ③Flunitrazepam
 ④Nitrazepam, ⑤Estazolam, ⑥Lorazepam

Col. : INERTSIL ODS- 2, 0.46 ϕ $\times$ 150 mm

Elu. : MeOH : H₂O = 70 : 30

Rate : 1 mL/min

Det. : APCI-MS

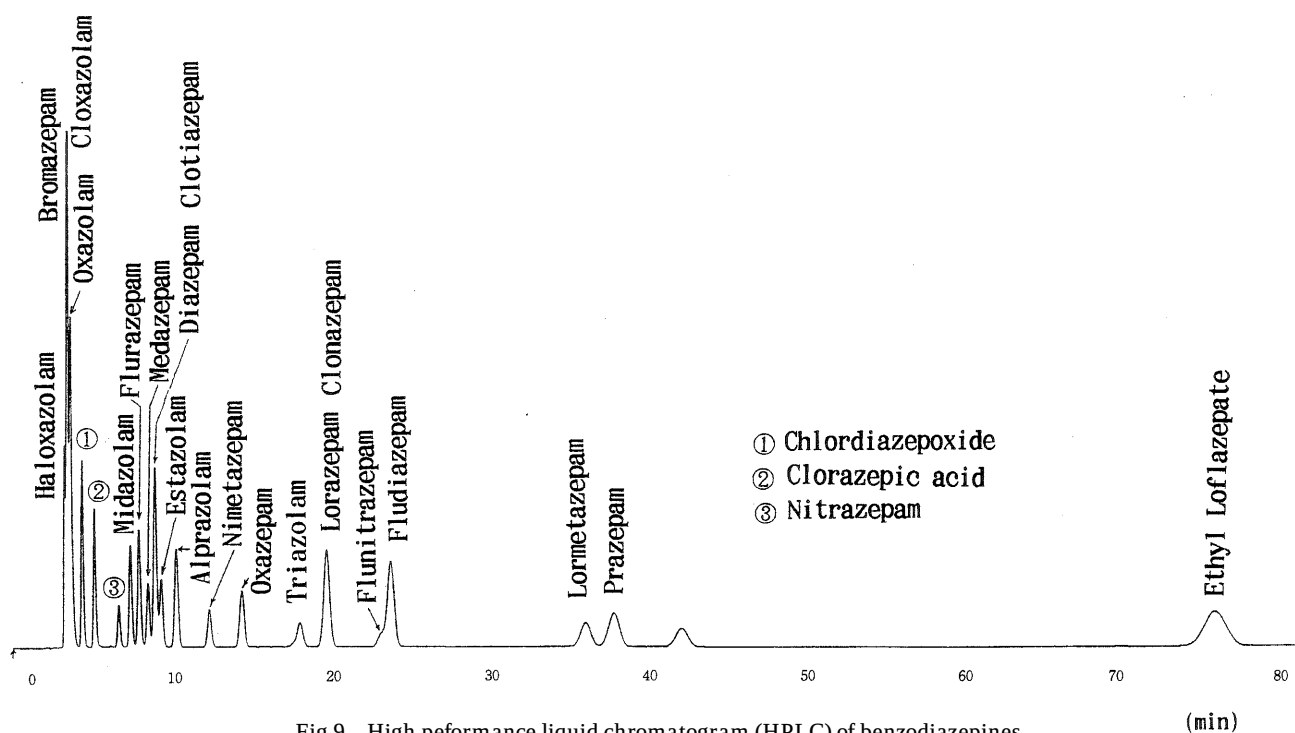


Fig.9 High performance liquid chromatogram (HPLC) of benzodiazepines

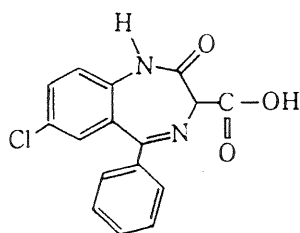
Det.: UV (254nm)

Rate: 1ml/min

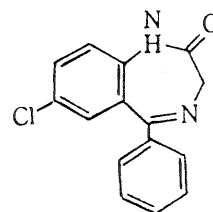
Elu.: CH₃CN : H₂O : TFA = 300 : 700 : 1

Col.: INERTSIL ODS-2, 0.46φ × 150mm

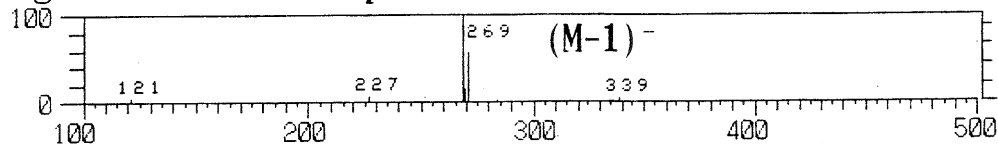
Clorazepic acid

 $C_{16}H_{11}N_2O_3Cl = 314$  $-CO_2$

Nordazepam

 $C_{15}H_{11}N_2OCl = 270$ 

Negative ion mass spectrum



Positive ion mass spectrum

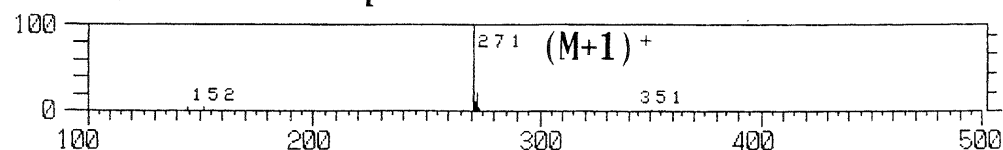


Fig.10 The conversion of clorazepic acid in HPLC and mass spectra of the peak in HPLC

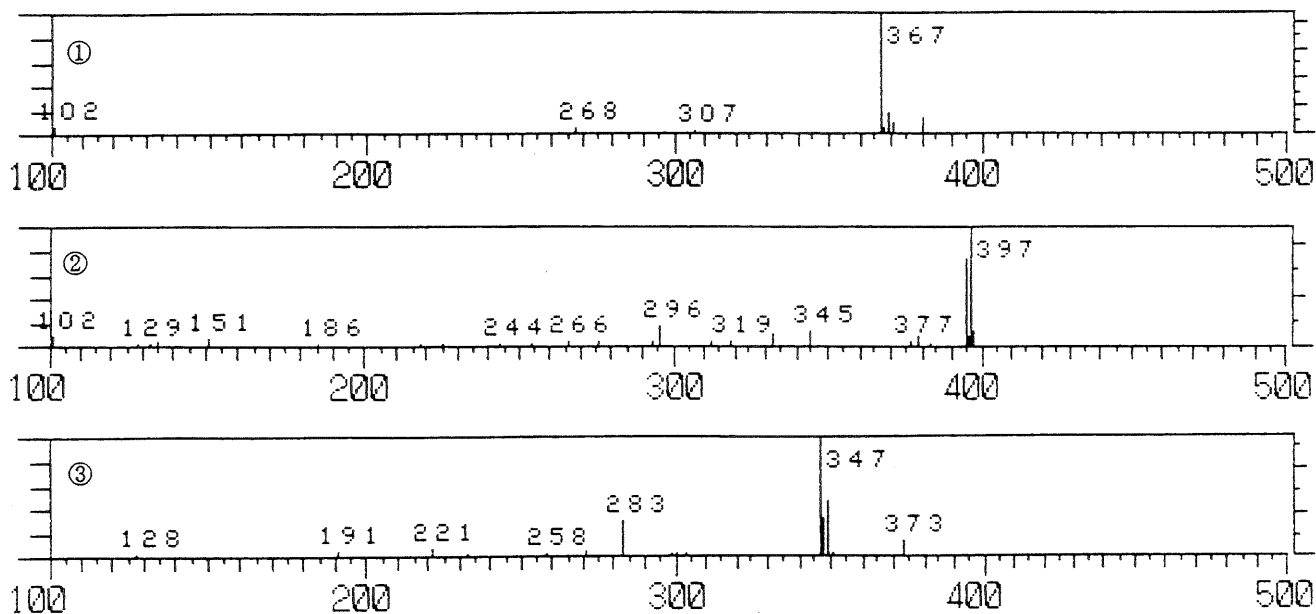
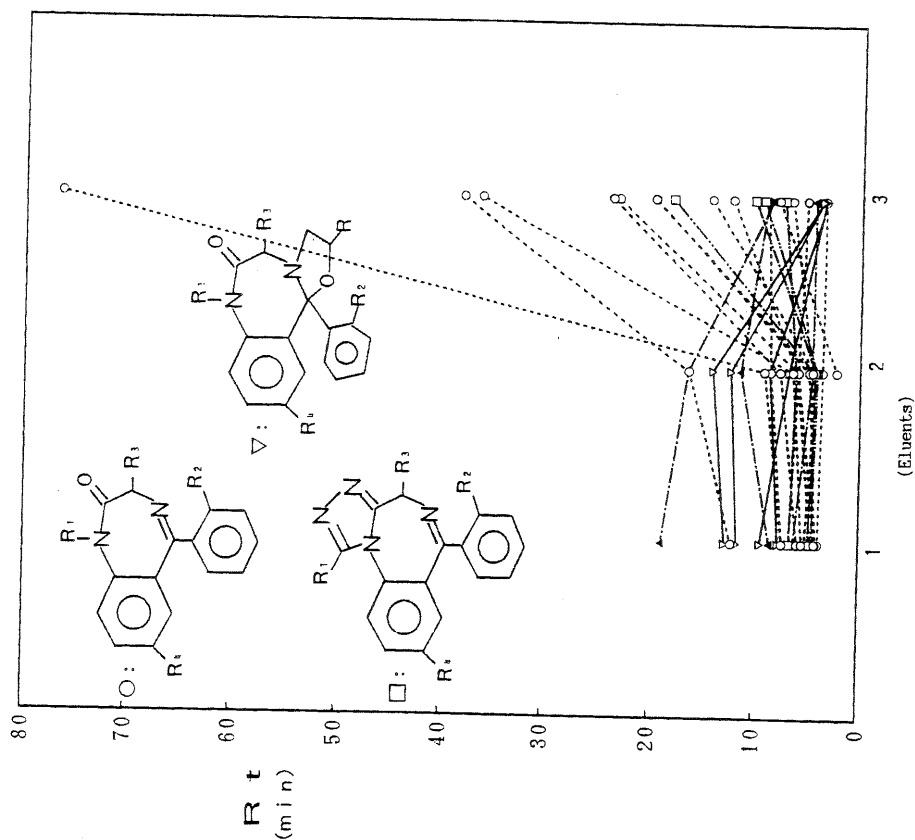


Fig.11 Positive ion mass spectra of hydrated products from oxazolo derivatives.

①Cloxazolam, ②Haloxazolam, ③Oxazolam

Fig. 12 Relationships between R_t values of benzodiazepines in HPLC and eluents3) $\text{CH}_3\text{CN} : \text{H}_2\text{O} : \text{TFA} = 300 : 700 : 1$ 2) $\text{CH}_3\text{CN} : \text{H}_2\text{O} = 50 : 50$ Elu. : 1) $\text{MeOH} : \text{H}_2\text{O} = 70 : 30$

Det. : UV (254 nm)

Rate : 1 ml/min

Col. : INERTSIL ODS- 2, $0.46\phi \times 150\text{ mm}$

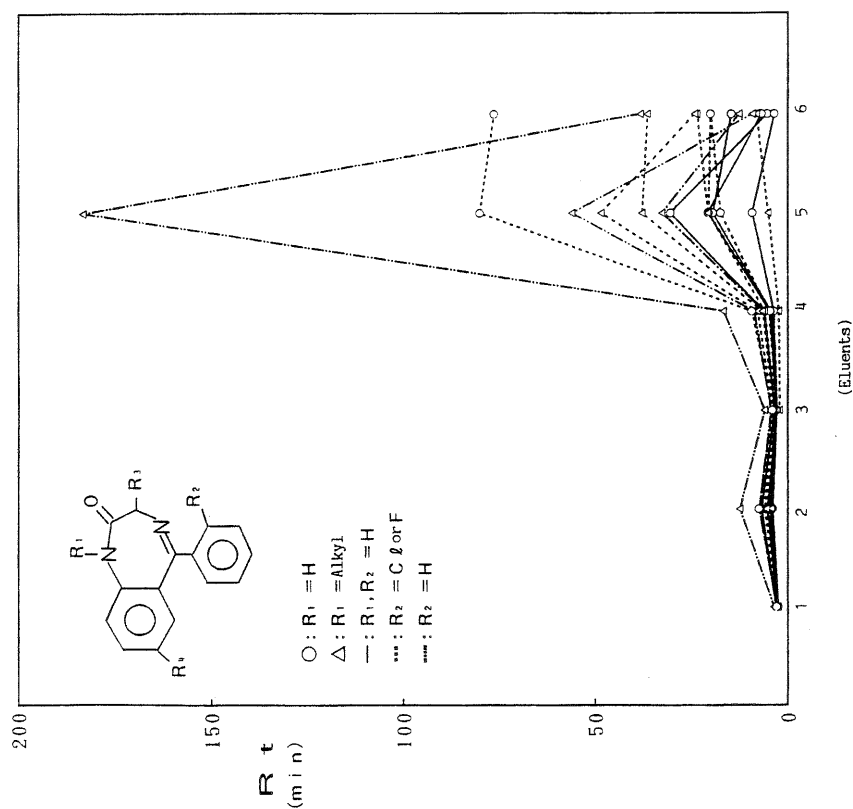


Fig. 13 Relationships between R_t values of benzodiazepines in HPLC and eluents

Col.: INERTSIL ODS-2, $0.46 \phi \times 150 \text{ mm}$
 Det.: UV (254 nm)
 Rate: 1 ml/min
 Elu.: 1) MeOH : H₂O = 90 : 10, 2) MeOH : H₂O = 70 : 30
 3) CH₃CN : H₂O = 70 : 30 4) CH₃CN : H₂O = 50 : 50
 5) CH₃CN : H₂O = 30 : 70 6) CH₃CN : H₂O : TFA = 300 : 700 : 1

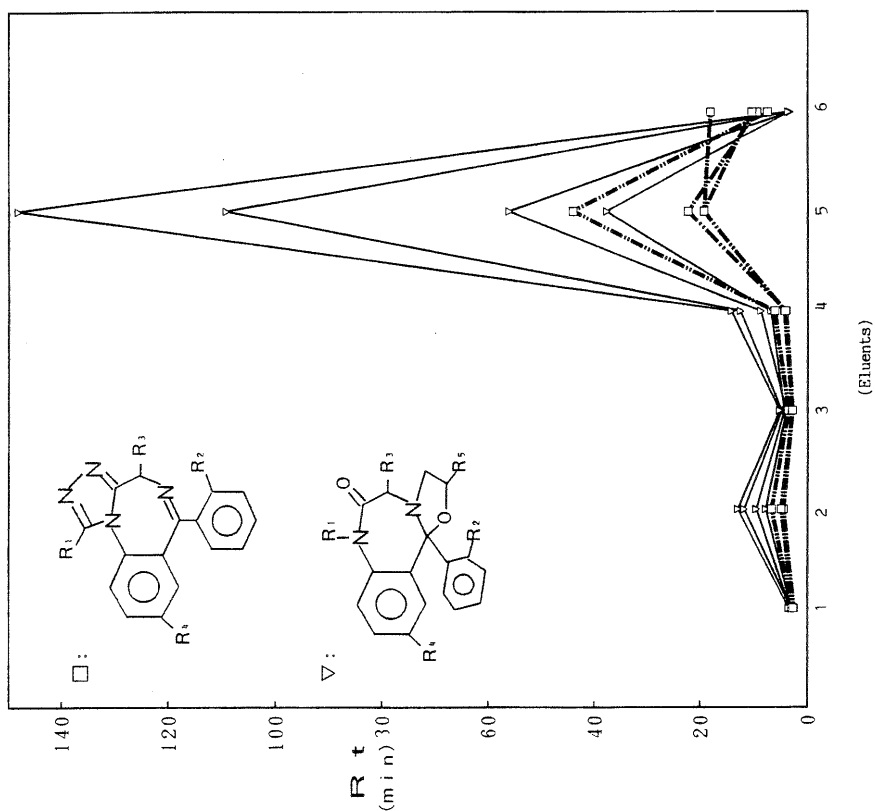


Fig. 14 Relationships between R_t values of benzodiazepines in HPLC and eluents

Col.: INERTSIL ODS-2, $0.46 \phi \times 150 \text{ mm}$
 Rate: 1 ml/min
 Det.: UV (254 nm)
 Elu.: 1) MeOH : H₂O = 90 : 10, 2) MeOH : H₂O = 70 : 30
 3) CH₃CN : H₂O = 70 : 30 4) CH₃CN : H₂O = 50 : 50
 5) CH₃CN : H₂O = 30 : 70 6) CH₃CN : H₂O : TFA = 300 : 700 : 1

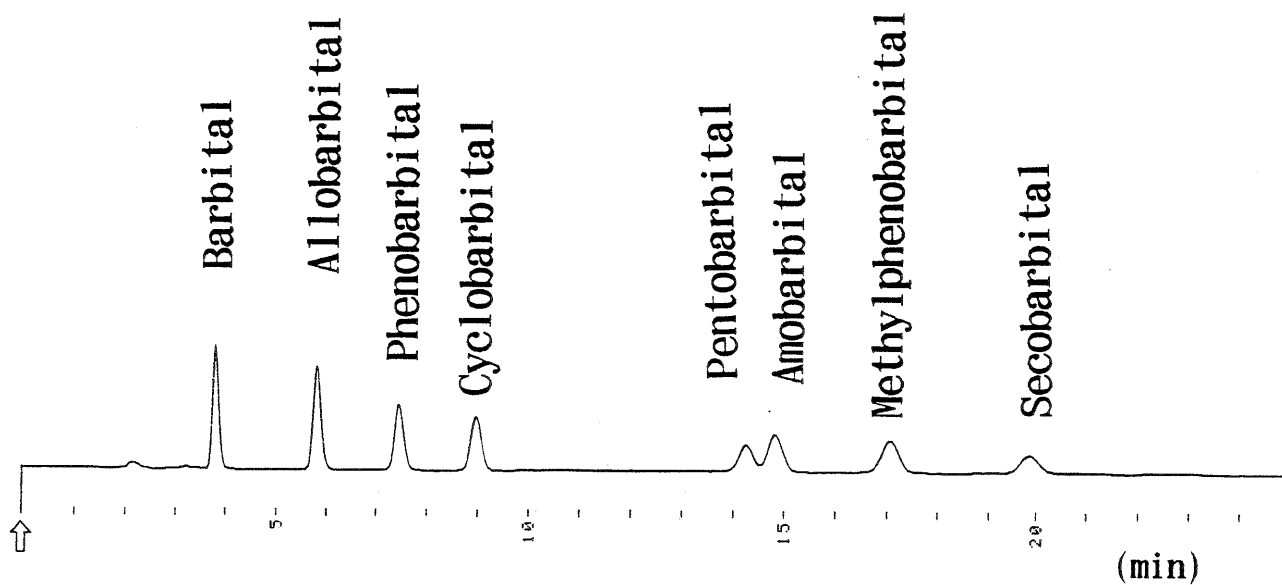


Fig.15 High performance liquid chromatogram (HPLC) of barbiturates

Det. : UV (220nm)

Rate : 1ml/min

Elu. : CH₃CN : H₂O = 30 : 70

Col. : INERTSIL ODS-2, 0.46φ × 150mm

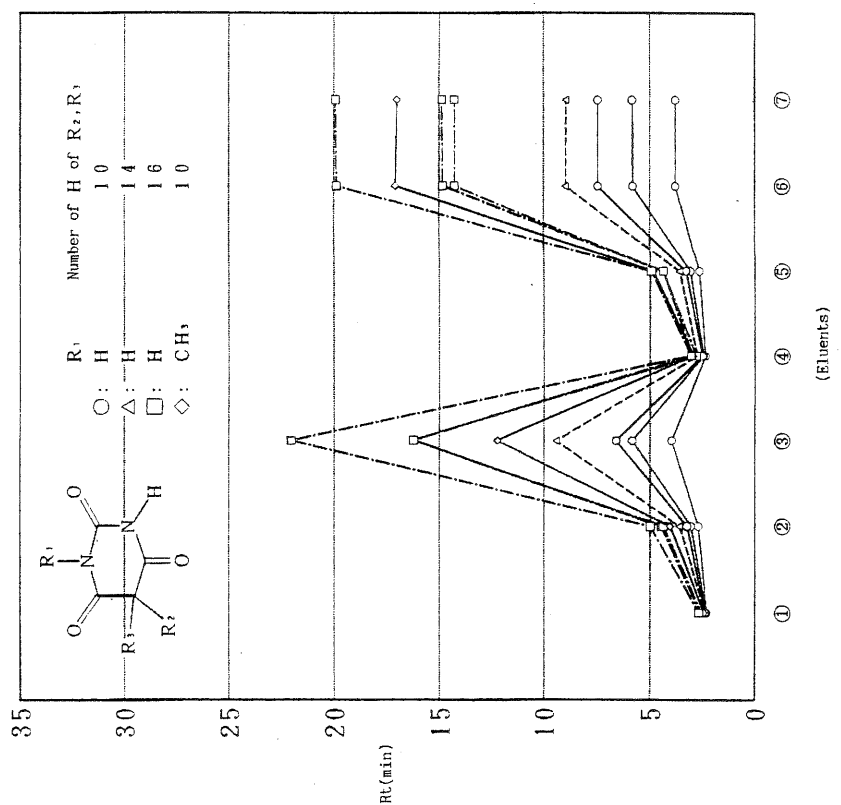


Fig. 16 Relationships between Rt values of barbiturates in HPLC and eluents

Col. : INERTSIL ODS-2, 0.46φ × 150 mm

Rate : 1 ml/min

Det. : UV (220 nm)

Elu. : ①MeOH : H₂O=90 : 10 ②MeOH : H₂O=70 : 30
 ③MeOH : H₂O=50 : 50 ④CH₃CN : H₂O=70 : 30
 ⑤CH₃CN : H₂O=50 : 50 ⑥CH₃CN : H₂O=30 : 70
 ⑦CH₃CN : H₂O : TFA=300 : 700 : 1

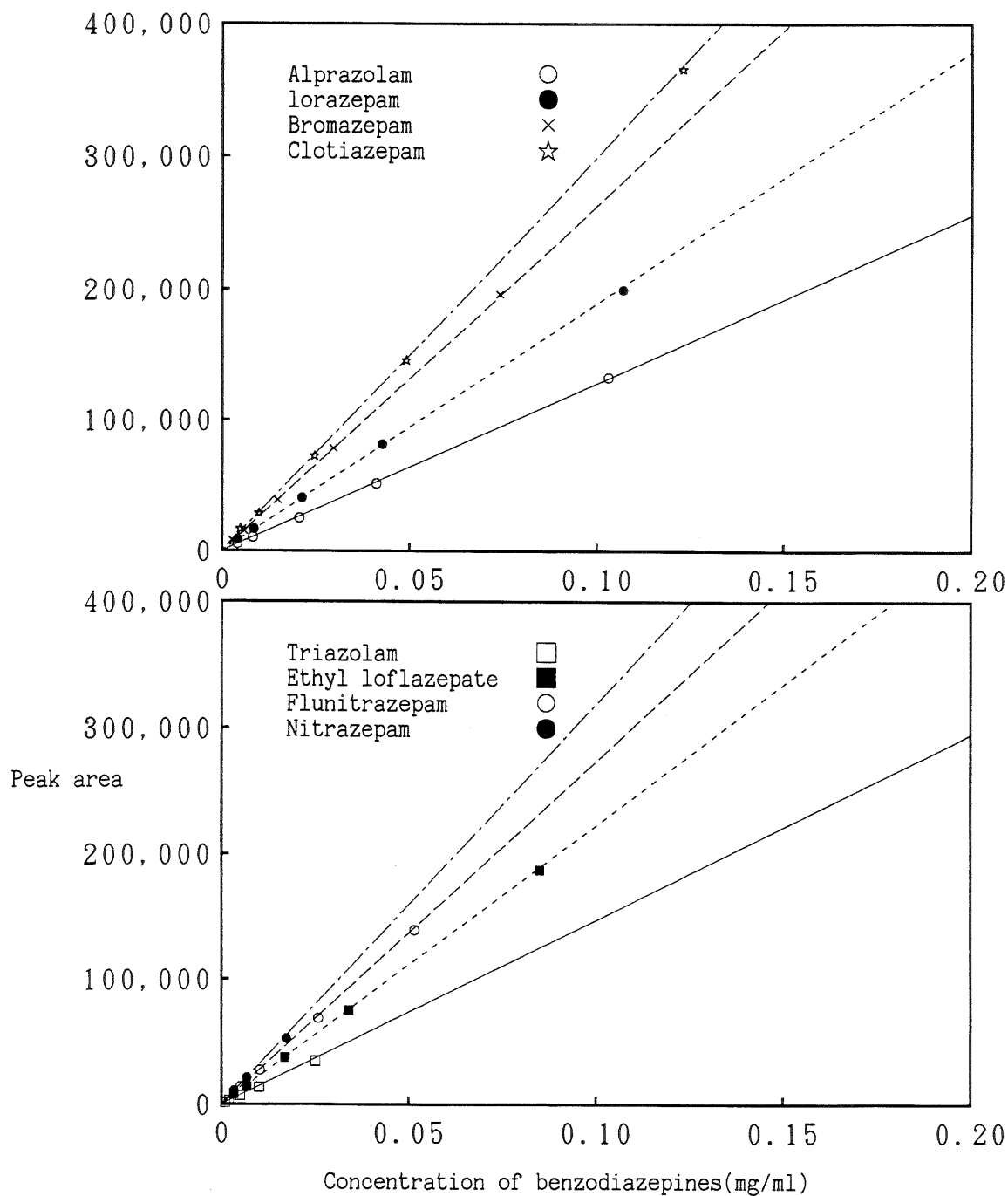


Fig.17 Relationships between peak areas and concentration of benzodiazepines

Col. : INERTSIL ODS-2, 0.46φ×150mm

Elu. : H₂O : CH₃CN : TFA = 700 : 300 : 1

Det. : UV (254nm)

Rate : 1ml/min

Inj. VoL : 5μl

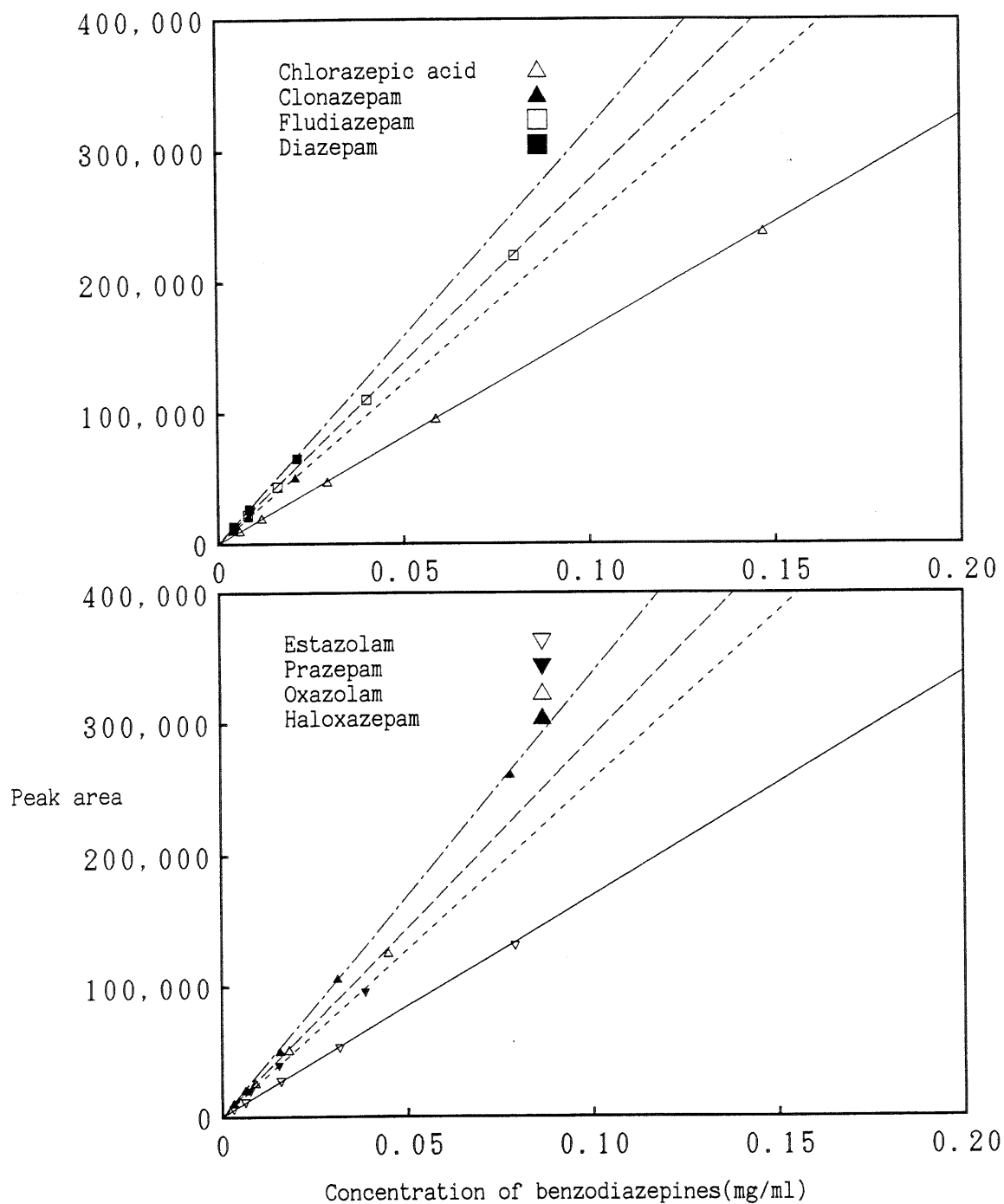


Fig.18 Relationships between peak areas and concentration of benzodiazepines

Col. : INERTSIL ODS-2, 0.46 ϕ $\times$ 150mmElu. : H₂O : CH₃CN : TFA = 700 : 300 : 1

Det. : UV (254nm)

Rate : 1ml/min

Inj. Vol. : 5 μ l

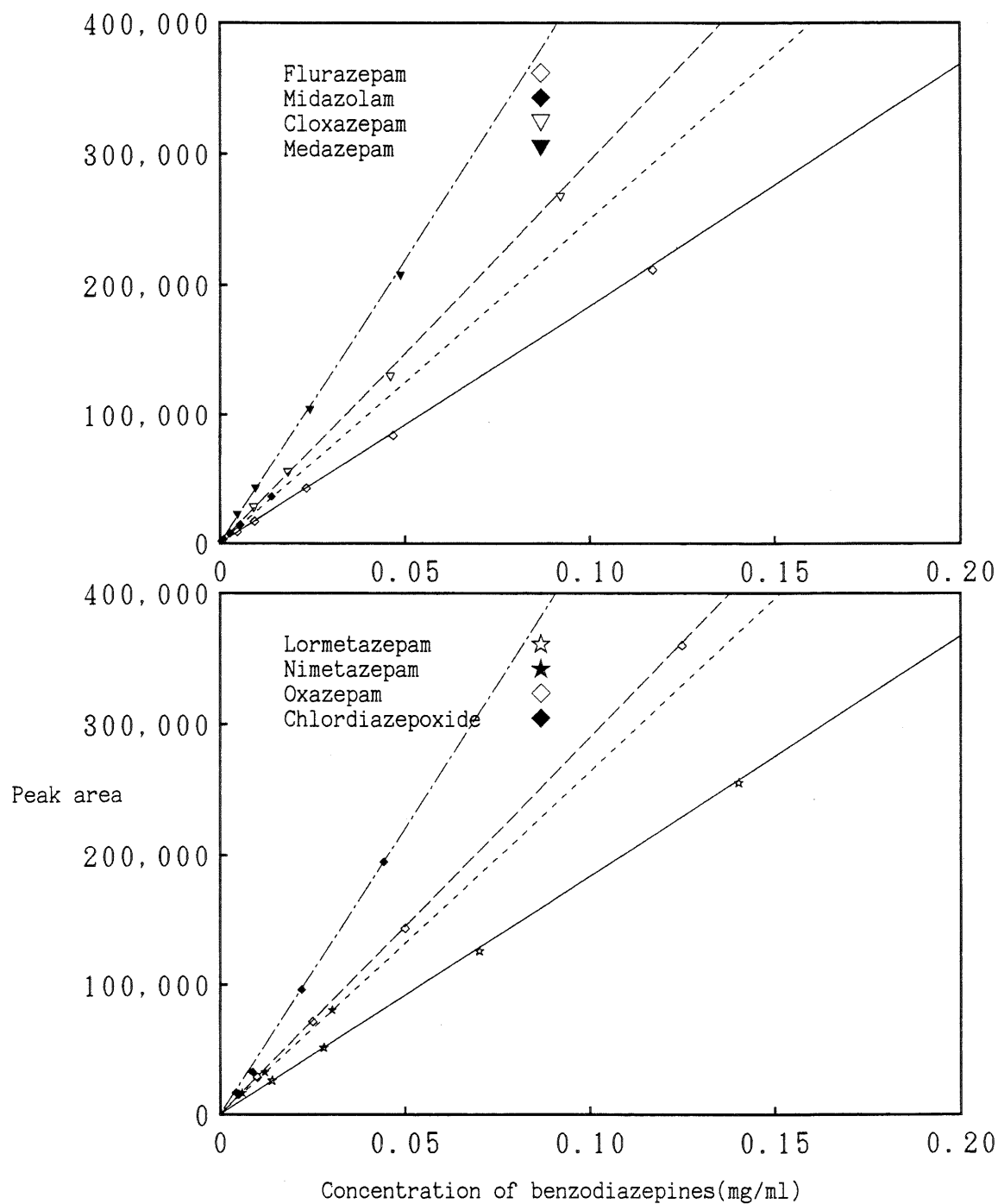


Fig.19 Relationships between peak areas and concentration of benzodiazepines

Col. : INERTSIL ODS-2, 0.46φ×150mm

Elu. : H₂O : CH₃CN : TFA = 700 : 300 : 1

Det. : UV (254nm)

Rate : 1ml/min

Inj. Vol. : 5μl

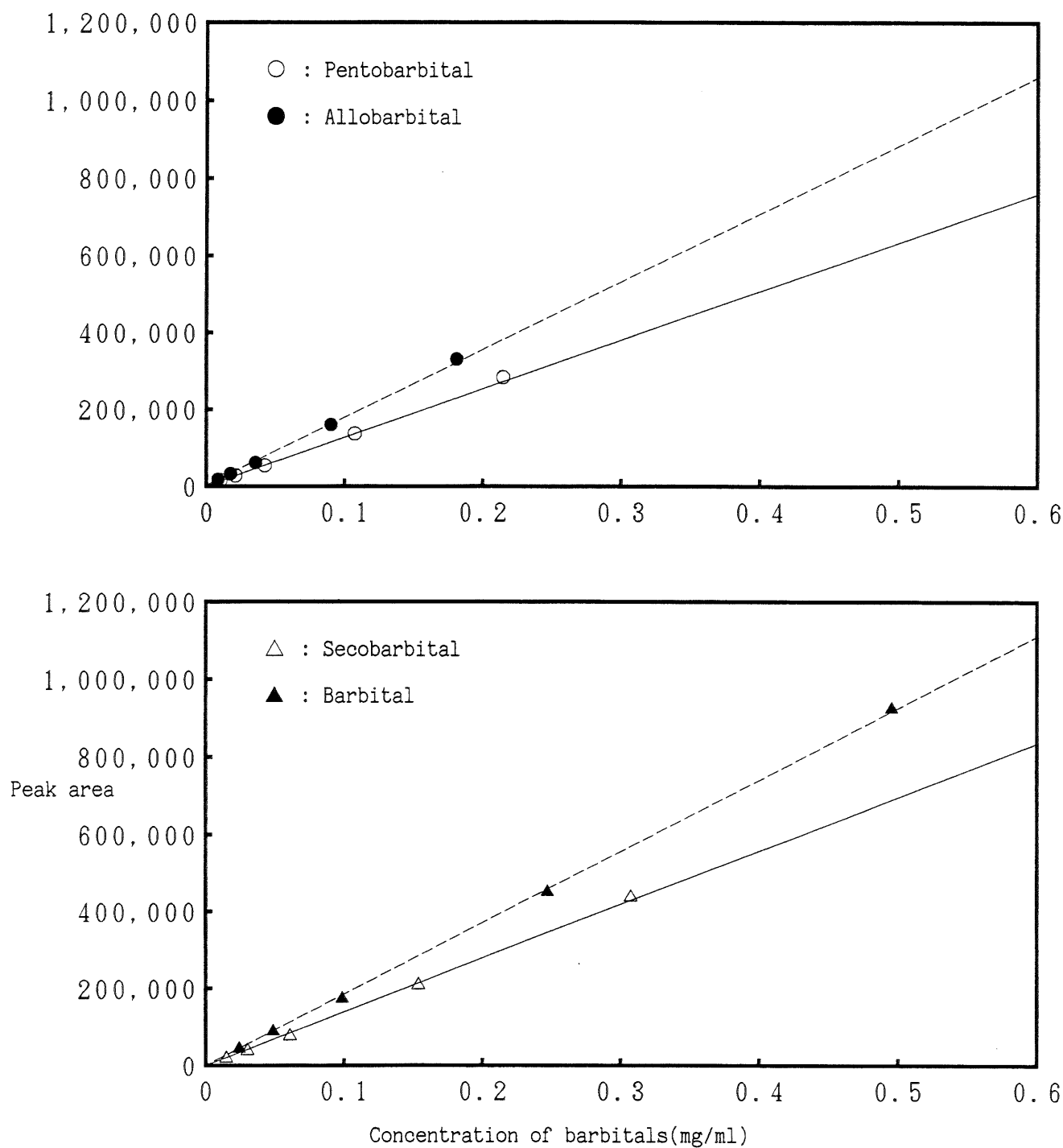


Fig. 20 Relationships between peak areas and concentration of barbiturates

Col. : INERTSIL ODS-2, 0.46 ϕ ×150mmElu. : CH₃CN : H₂O = 30 : 70

Rate : 1ml/min

Det. : UV (220nm)

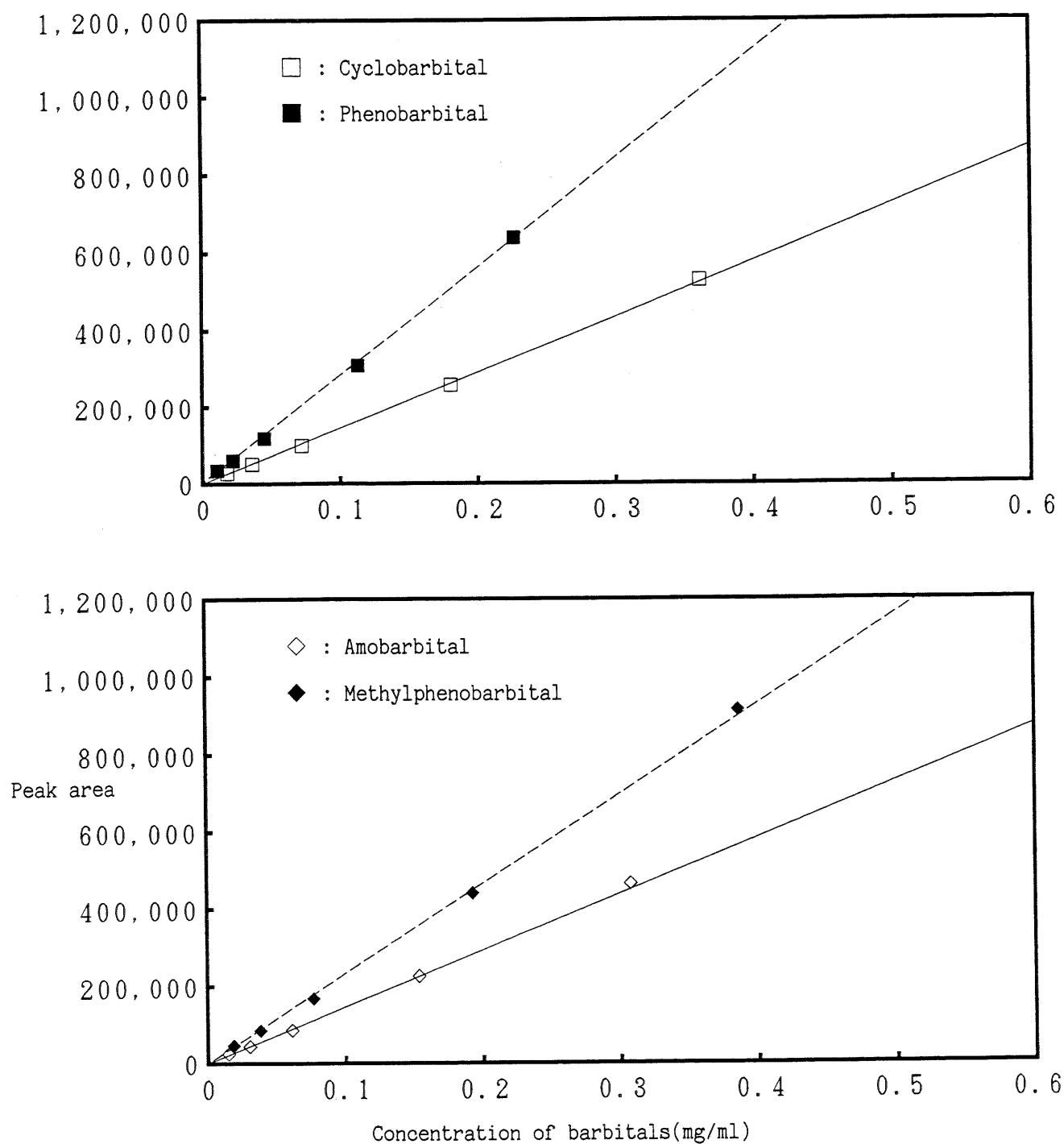


Fig. 21 Relationships between peak areas and concentration of barbiturates

Col. : INERTSIL ODS-2, 0.46 ϕ $\times$ 150mmElu. : CH₃CN : H₂O = 30 : 70

Rate : 1ml/min

Det. : UV (220nm)

Table 1 Rt values of benzodiazepines in benzodiazepines

English name	Mol. formula	M.W.	HPLC ¹	HPLC ²	HPLC ³	HPLC ⁵	HPLC ⁶	HPLC ⁷	HPLC ⁸	規制条項
Bromazepam	C ₁₄ H ₁₀ N ₃ O Br	315	7.22	2.38	3.81	2.75	3.56	9.09	3.41	令-2-56
Lorazepam	C ₁₅ H ₁₀ N ₂ O ₂ Cl ₂	320	8.31	2.62	4.79	2.88	4.47	20.34	19.80	令-2-12
Lormetazepam	C ₁₆ H ₁₂ N ₂ O ₂ Cl ₂	334	11.00	2.66	5.42	3.53	6.44	37.71	36.27	令-2-13
Ethyl Loflazepate	C ₁₈ H ₁₄ N ₂ O ₃ ClF	360	12.50	2.80	7.36	3.93	9.17	80.14	76.46	令-2-34
Prazepam	C ₁₉ H ₁₇ N ₂ O Cl	324	20.24	3.52	12.24	5.89	16.44	183.18	38.08	令-2-18
Clonazepam	C ₁₅ H ₁₀ N ₃ O ₃ Cl	315	7.51	2.38	4.10	2.90	4.84	17.16	19.74	令-2-30
Estazolam	C ₁₆ H ₁₁ N ₃ Cl	294	8.31	2.53	4.44	2.77	4.00	22.24	9.35	令-2-32
Fludiazepam	C ₁₆ H ₁₂ N ₂ O ClF	302	10.53	2.66	5.90	3.87	7.64	48.38	23.82	令-2-35
Diazepam	C ₁₆ H ₁₃ N ₂ O Cl	284	12.92	2.86	7.32	4.21	8.56	56.08	8.96	別表3-3
Oxazolam	C ₁₈ H ₁₇ N ₂ O ₂ Cl	328	18.70	3.11	11.70	4.82	12.39	109.15	3.63	別表3-4
Oxazolam	C ₁₈ H ₁₇ N ₂ O ₂ Cl	328	20.17	3.51	12.87	5.19	14.11	148.19	3.63	別表3-4
Flunitrazepam	C ₁₆ H ₁₂ N ₃ O ₃ F	313	7.78	2.39	4.18	3.21	5.90	20.50	23.23	令-2-55
Nimetazepam	C ₁₆ H ₁₃ N ₃ O ₃	295	8.36	2.59	4.58	3.31	6.05	32.43	12.38	令-2-46
Chlordiazepoxide	C ₁₆ H ₁₄ N ₃ O Cl	299	10.94	2.68	6.26	3.02	4.50	28.60	4.39	別表3-6
Haloxazolam	C ₁₇ H ₁₄ N ₂ O ₂ BrF	376	11.52	3.00	7.73	3.99	8.68	56.08	3.26	令-2-57
Haloxazolam	C ₁₇ H ₁₄ N ₂ O ₂ BrF	376	12.92	3.00	7.73	3.99	8.68	56.08	3.26	令-2-57
Medazepam	C ₁₆ H ₁₅ N ₂ Cl	270	29.72	4.42	18.86	6.88	16.50	183.23	8.54	令-2-27
Flurazepam	C ₂₁ H ₂₃ N ₃ O ClF	387		3.10	N.C.	1.95	2.20	4.97	7.96	令-2-17
Nitrazepam	C ₁₅ H ₁₁ N ₃ O ₃	281	7.87	2.38	4.32	2.85	4.55	20.51	6.67	別表3-8
Alprazolam	C ₁₇ H ₁₃ N ₃ Cl	308	8.87	2.72	4.85	2.80	4.16	19.24	10.28	令-2-38
Midazolam	C ₁₈ H ₁₃ N ₃ ClF	325	11.64	2.94	6.65	3.54	6.12	44.03	7.42	令-2-36
Clotiazepam	C ₁₆ H ₁₅ N ₂ O ClS	318	15.04	2.94	8.56	4.82	11.46	102.16	9.01	別表3-5
Triazolam	C ₁₇ H ₁₂ N ₄ Cl ₂	342	8.27	2.62	4.46	2.85	4.31	19.24	18.04	令-2-16
Oxazepam	C ₁₅ H ₁₁ N ₂ O ₂ Cl	286	9.00	2.72	5.13	2.80	4.22	19.24	14.40	令-2-22
Clorazepic acid	C ₁₆ H ₁₁ N ₂ O ₃ Cl	314	18.52	2.98	6.68	3.41	5.93	30.30	5.19	令-2-20
Cloxazolam	C ₁₇ H ₁₄ N ₂ O ₂ Cl ₂	348	16.04	3.26	9.44	4.30	6.82	37.68	3.42	令-2-15

HPLC^{1~9)} : See Table 3

Table 2 Rt values of benzodiazepines in HPLC and functional groups of them

	1	2	3	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Oxazepam —○	5.13	19.24	14.40	H	H	OH	Cl
Clorazepic acid —○	6.68	30.30	5.19	H	H	H	Cl
Nitrazepam —○	4.32	20.51	6.67	H	H	H	NO ₂
Bromazepam —○	3.81	9.09	3.41	H	PN	H	Br
Clonazepam ---○	4.10	17.16	19.74	H	Cl	H	NO
Lorazepam ---○	4.79	20.34	19.80	H	Cl	OH	Cl
Ethyl Loflazepat---○	7.36	80.14	76.46	H	F	CO ₂ E	Cl
Diazepam ---△	7.32	56.08	8.96	CH ₃	H	H	Cl
Prazepam ---△	12.24	183.18	38.08	C ₄ H ₇	H	H	Cl
Nimetazepam ---△	4.58	32.43	12.38	CH ₃	H	H	NO ₂
Lormetazepam ---△	5.42	37.71	36.27	CH ₃	Cl	OH	Cl
Fludiazepam ---△	5.90	48.38	23.82	CH ₃	F	H	Cl
Flurazepam ---△	N.C.	4.97	7.96	C-N<	F	H	Cl
Flunitrazepam ---△	4.18	20.50	23.23	CH ₃	F	H	NO ₂

	1	2	3	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Haloxazolam —▽	7.73	56.08	3.26	H	F	H	Br	H
Cloxazolam —▽	9.44	37.68	3.42	H	Cl	H	Cl	H
Oxazolam —▽	11.70	109.15	3.63	H	H	H	Cl	CH ₃
Oxazolam —▽	12.87	148.19	3.63	H	H	H	Cl	CH ₃
Midazolam ----□	6.65	44.03	7.42	CH ₃	F	H	Cl	
Triazolam ----□	4.46	19.24	18.04	CH ₃	Cl	H	Cl	
Estazolam ----□	4.44	22.24	9.35	H	H	H	Cl	
Alprazolam ----□	4.85	19.24	10.28	CH ₃	H	H	Cl	

Col. : INERTSIL ODS-2, 0.46 ϕ $\times$ 150mm

Rate : 1ml/min

Elu. : 1) MeOH:H₂O=70:302) CH₃CN:H₂O=30:703) CH₃CN:H₂O:TFA=300:700:1

Table 3 Rt values of barbitutates in HPLC

English name	Mol. formula	M.W.	HPLC ²	HPLC ³	HPLC ⁴	HPLC ⁵	HPLC ⁶	HPLC ⁷	HPLC ⁸	規制条項
Barbital	C ₈ H ₁₂ N ₂ O ₃	184	2.30	2.71	3.98	2.35	2.66	3.79	3.80	別表3-7
Allobarbital	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O ₃	208	2.32	3.06	5.84	2.45	3.10	5.80	5.83	令-2-40
Phenobarbital	C ₁₂ H ₁₂ N ₂ O ₃	232	2.39	3.26	6.60	2.50	3.31	7.44	7.44	別表3-1
Cyclobarbital	C ₁₂ H ₁₆ N ₂ O ₃	236	2.40	3.62	9.40	2.75	3.62	8.96	8.94	令-2-44
Methylphenobarbi	C ₁₃ H ₁₄ N ₂ O ₃	246	2.45	4.05	12.20	2.95	4.85	17.07	17.00	令-2-7
Amobarbital	C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O ₃	226	2.59	4.38	16.23	2.80	4.38	14.83	14.87	令-2-9
Pentobarbital	C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O ₃	226	2.64	4.48	16.23	3.00	4.38	14.26	14.27	別表3-2
Secobarbital	C ₁₂ H ₁₈ N ₂ O ₃	238	2.70	5.00	22.02	3.05	4.95	19.88	19.92	令-2-1

HPLC 1) INERTSIL ODS-2, 0.46mm ϕ $\times$ 250mm, MeOH:H₂O=70:30
 2) INERTSIL ODS-2, 0.46mm ϕ $\times$ 150mm, MeOH:H₂O=90:10
 3) INERTSIL ODS-2, 0.46mm ϕ $\times$ 150mm, MeOH:H₂O=70:30
 4) INERTSIL ODS-2, 0.46mm ϕ $\times$ 150mm, MeOH:H₂O=50:50
 5) INERTSIL ODS-2, 0.46mm ϕ $\times$ 150mm, CH₃CN:H₂O=70:30
 6) INERTSIL ODS-2, 0.46mm ϕ $\times$ 150mm, CH₃CN:H₂O=50:50
 7) INERTSIL ODS-2, 0.46mm ϕ $\times$ 150mm, CH₃CN:H₂O=30:70
 8) INERTSIL ODS-2, 0.46mm ϕ $\times$ 150mm, CH₃CN:H₂O:TFA=300:700:1

Table 4 Rt values of barbiturates in HPLC and functional groups of them

英語名	1	2	3	R ₁	R ₂	R ₃
Barbital —○	3.98	3.79	3.80	H	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅
Allobarbital —○	5.84	5.80	5.83	H	C ₃ H ₅	C ₃ H ₅
Phenobarbital —○	6.60	7.44	7.44	H	C ₂ H ₅	C ₆ H ₅
Cyclobarbital --△	9.40	8.96	8.94	H	C ₂ H ₅	C ₆ H ₉
Pentobarbital --□	16.23	14.26	14.27	H	C ₂ H ₅	C ₅ H ₁₁
Amobarbital --□	16.23	14.83	14.87	H	C ₂ H ₅	C ₅ H ₁₁
Methylphenobarbi—◇	12.20	17.07	17.00	CH ₃	C ₂ H ₅	C ₆ H ₅
Secobarbital ---□	22.02	19.88	19.92	H	C ₃ H ₅	C ₅ H ₁₁

Col. : INERTSIL ODS-2, 4.6 ϕ $\times$ 150mm

Rate : 1ml/min

Elu. : ① MeOH:H₂O=50:50

② CH₃CN:H₂O=30:70

③ CH₃CN:H₂O:TFA=300:700:1

Table 5 The correlation equations of benzodiazepines

Substances	Correlation equation	γ
Clozapepam	$Y = 2795986 X + 3066.8$	0.9999
Midazolam	$Y = 2560986 X - 93.5$	0.9999
Clotiazepam	$Y = 2967367 X + 329.4$	0.9999
Oxazepam	$Y = 2879320 X - 317.3$	0.9999
Flunitrazepam	$Y = 2700645 X - 578.0$	0.9999
Ethyl loflazepate	$Y = 2200451 X - 318.4$	0.9999
Bromazepam	$Y = 2657745 X - 600.8$	0.9999
Chlorazepic acid	$Y = 1622883 X - 25.6$	0.9999
Medazepam	$Y = 4350533 X - 1875.2$	0.9999
Alprazolam	$Y = 1292672 X - 1004.2$	0.9999
Lorazepam	$Y = 1857833 X + 673.5$	0.9999
Lormetazepam	$Y = 1808417 X + 253.1$	0.9999
Oxazolam	$Y = 2786882 X + 625.5$	0.9999
Nitrazepam	$Y = 2981466 X + 181.0$	0.9999
Diazepam	$Y = 3020084 X + 185.8$	0.9999
Nimetazepam	$Y = 2632212 X + 287.1$	0.9999
Clonazepam	$Y = 2415366 X - 13.5$	0.9999
Prazepam	$Y = 2450782 X - 174.8$	0.9999
Haloxazepam	$Y = 3362681 X - 975.9$	0.9999
Chlordiazepoxide	$Y = 5088854 X - 15441.4$	0.9990
Flurazepam	$Y = 1806977 X - 132.8$	0.9999
Estazolam	$Y = 1653244 X - 79.4$	0.9999
Triazolam	$Y = 1385428 X - 104.7$	0.9999
Fludiazepam	$Y = 2749108 X - 30.1$	0.9999

Y : Peak area

X : Concentration of benzodiazepines(mg/ml)

 γ : Correlation coefficient

Table 6 The correlation equations of barbiturates

Substances	Correlatuion equation	γ
Secobarbital	$Y = 1431172 x - 4396.4$	0.9997
Methyl phenobarbital	$Y = 2366171 X - 9987.1$	0.9997
Amobarbital	$Y = 1509304 X - 4720.3$	0.9998
Pentobarbital	$Y = 1318530 X - 2746.6$	0.9997
Cyclobarbital	$Y = 1469641 X - 5266.3$	0.9998
Phenobarbital	$Y = 2809487 X - 6116.7$	0.9997
Allobarbital	$Y = 1823151 X - 3801.1$	0.9997
Barbital	$Y = 1869826 X - 4690.5$	0.9999

Y : Peak area

X : Concentration of barbiturates(mg/ml)

 γ : Correlation coefficient