

SEGMENTAL HAIR ANALYSIS  
USING LIQUID CHROMATOGRAPHY  
TANDEM MASS  
SPECTROMETRY AFTER A SINGLE  
DOSE OF BENZODIAZEPINES

by. Miss Suprapada Chomsiri

อาจารย์ที่ปรึกษา พันตำรวจโทวรัช วิชชุวานิชย์

# *INTRODUCTION*

# INTRODUCTION

- ◎ อาชญากรรมด้านยาเสพติด (DFC) เป็นปัญหาใหญ่ในประเทศจีน
- ◎ benzodiazepines เป็นสารที่ใช้อยู่ในอาชญากรรมด้านยาเสพติด
- ◎ benzodiazepines พบมากในยาปลอมประสาทและยานอนหลับ มีผลทำให้ความจำเสื่อมได้ ถ้าได้รับยาในปริมาณสูง

# BENZODIAZEPINES

◎ ยา Benzodiazepine ตัวแรกที่ถูกนำมาใช้คือ Chordiazepoxide ถัดมาคือ Diazepam ซึ่งเป็นยาที่ใช้กันอย่างกว้างขวางในปัจจุบัน ออกฤทธิ์โดยการกดระบบประสาทส่วนกลาง มีผลทำให้หง่วง หลับ คลายกังวล กด้ามเนื้อคลายตัว และแก้ชัก ขนาดสูงทำให้สลบหรือถึงโคม่า



# INTRODUCTION

- ◎ Blood and Urine เป็นตัวอย่างที่ใช้ในการตรวจหาปริมาณยา
- ◎ ความจำเสื่อมเกิดจากการได้รับยาเสพติดสูงถึง 24-72 ชั่วโมงหรือนานกว่านั้น
- ◎ ยาบางชนิดสลายอย่างรวดเร็วจากของเหลวในร่างกาย
- ◎ ผมสามารถนำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์ได้



# INTRODUCTION

- ◎ การตรวจสอบ benzodiazepines ในเส้นผม โดยใช้ liquid chromatography คู่กับ MS / MS ในห้องปฏิบัติการทางนิติวิทยาศาสตร์
- ◎ การทดลองเป้าหมายคือการใช้วิธี LC-MS/MS ตรวจสอบเพื่อยืนยันระดับปริมาณ 18 benzodiazepines ในเส้นผม
- ◎ การตรวจสอบระดับของ benzodiazepine ในกลุ่มเส้นผมของอาสาสมัครที่มีสุขภาพดีหลังจากได้รับ estazolam เพียงอย่างเดียว และผู้ที่ตกเป็นเหยื่ออาชญากรรมทั้งสองกลุ่ม



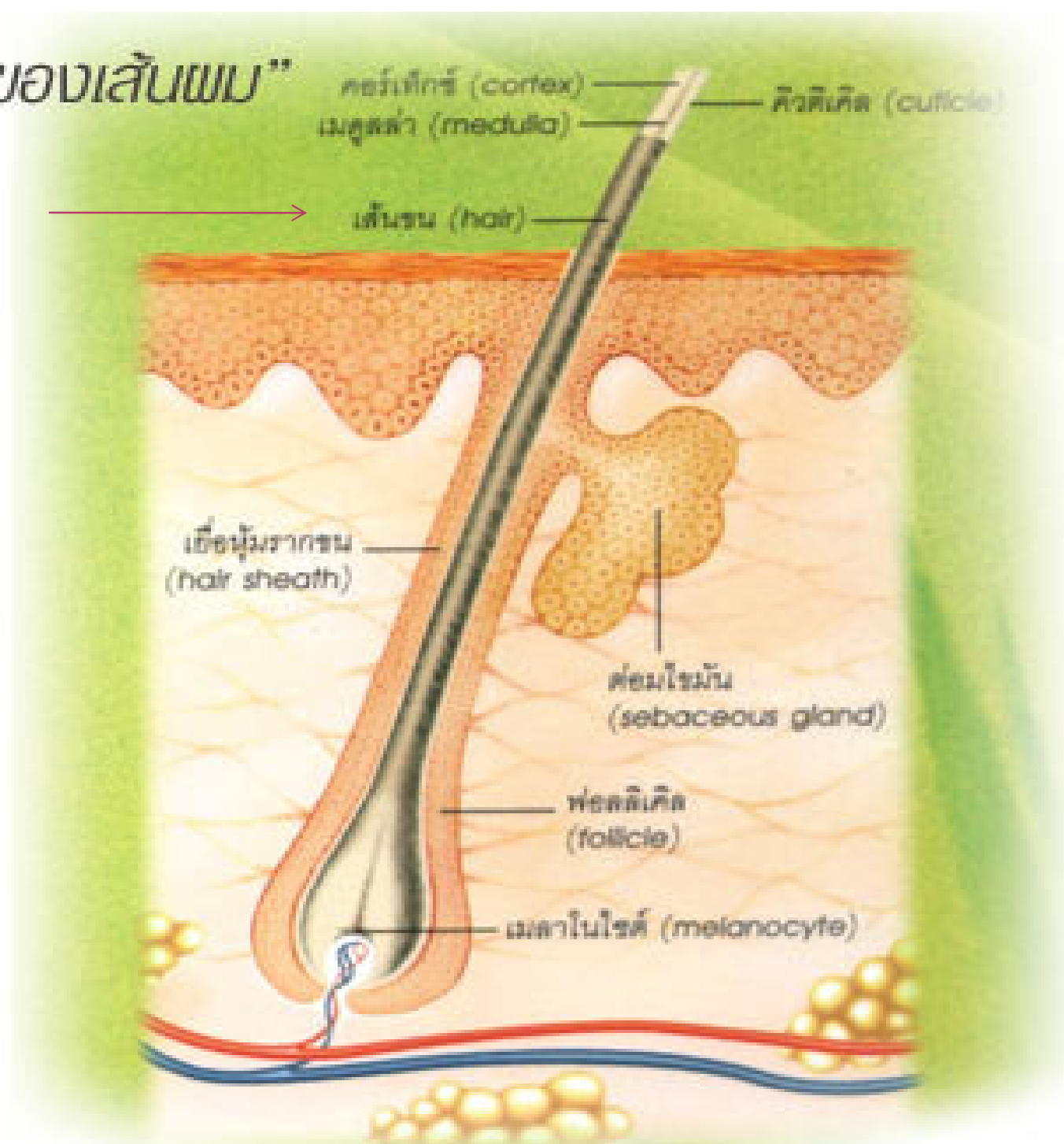
*MATERIALS AND  
METHODS*

## การเก็บตัวอย่าง

- ◎ อาสาสมัครสุขภาพจำนวนสิบสี่คน อายุ 23-27 ปี การเก็บตัวอย่างดูจาก ความถี่ในการสระผมและผลิตภัณฑ์ที่ใช้ จากกลุ่มทดลองส่วนใหญ่ผม ตรงดำยกเว้นหนึ่งคนเป็นผมตัด
- ◎ ตัวอย่างเลือดที่ได้รับ estazolam ในปริมาณ 1-6 mg และหลัง 1-8 ชั่วโมง ที่นำมาใช้ในการศึกษา
- ◎ เส้นผมถูกเก็บ 1 เดือนหลังจากการเก็บข้อมูล ประมาณ 100 เส้น เก็บไว้ใน ถุงกระดาษสะอาดที่อุณหภูมิห้อง



# “โครงสร้างของเส้นผม”



◎ กรณีการถูกทำร้ายทางเพศขณะเมาสุราและยาเสพติด เป็นเด็กหญิง 2 คน (V#1 and V#2) หลังจากดื่มเครื่องดื่มที่ทำให้พวกเค้าไม่ได้สติ เมื่อตื่นขึ้นมา ก็พบว่าตัวเองโดนข่มขืน

◎ พบตำรวจ 18 ชั่วโมงต่อมา

◎ เก็บตัวอย่างเลือดที่พบ clonazepam และ 7-aminoclonazepam ในเส้นผมเพื่อใช้เป็นหลักฐาน โดยเก็บเส้นผม 5 สัปดาห์หลังจากที่โดนกระทำ



## การจําเตรียมตัวอย่าง

### ◎ 1. ตัวอย่างจากเส้นผม เส้นผมตัดแบ่งและล้างสองครั้งด้วย

ไคคลอโรมีเทน 5 ml

- ตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาด 3 มิลลิเมตร และทำให้เป็นผง
- ผงเส้นผม 20 mg ถูกทำให้เซลล์แตก ที่มี ฟอสเฟตบัปเฟอร์ 1 ml.  
diazepam-d5 0.4 ng
- สกัดด้วย 3 ml ของไคคลอโรมีเทน ระเหยกับตัวทำละลายที่ 60 °C
- ส่วนที่เหลือได้ผสมใหม่กับ 100 ml ของ Acetonitrile - 20 mM ammonium acetate (70:30, v / v) และ 5 ml
- ฉีดเข้าระบบ LC-MS/MS

## ◎ 2. ตัวอย่างจากเลือด การสกัดเหมือนกับเส้นผม

- เลือด 1 ml, diazepam - d5 10 ng.(IS) และ 2 ml ของ sodium borate buffer, pH 9.2 ถูกเพิ่มเข้าไป
- ของเหลวที่สกัดได้ถูกนำมาผสมกับ 3 ml ของ diethyl ether
- ระเหยกับตัวทำละลายที่ 60 °C
- ฉีดเข้าระบบ LC-MS/MS

## การจัดเตรียมเครื่องมือ

- ◎ ระบบ liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) ประกอบด้วย Agilent HPLC (Palo Alto, CA, USA) รวมปั๊ม ทั้งสี่
- ◎ อุปกรณ์ในการกำจัดฟองอากาศในสารละลายและระบบส่งเลือดเข้า เครื่องอัตโนมัติ
- ◎ ใช้ความละเอียดของการวิเคราะห์ อัตราการไหล รวมผ่านคอลัมน์เป็น 200 มล. / นาที

# สารเคมีและสารตั้งต้น

**Table 1**

LC mobile phase gradient composition.

LC run time (min)	Acetonitrile (%)	Ammonium acetate buffer (%) <sup>a</sup>
0	5	95
3	60	40
7	80	20
20	80	20
20.5	5	95
30	5	95

<sup>a</sup> 20 mM ammonium acetate buffer with 0.1% formic acid, pH 4.0.

## CONT.

- ◎ เครื่องมือทำเป็นไอออนบวก ผลที่ดีที่สุดคือที่แรงดันไฟฟ้า ionspray 5 kV และแหล่งอุณหภูมิที่ 500 °C ก๊าซ CAD (ไนโตรเจน) ที่ 7 psi, ก๊าซ CUR ที่ 25 psi และทั้ง GS1 และ GS2 ที่ 35 psi
- ◎ ข้อมูลถูกบันทึกในโหมดการตรวจสอบปฏิบัติการหลายครั้ง (MRM)  
Parent ions
- ◎ ความเป็นไปได้ในการแตกตัวออกจากกลุ่มก้อน (DP) และพลังงานของการชน (CE) ที่เหมาะสำหรับการวิเคราะห์

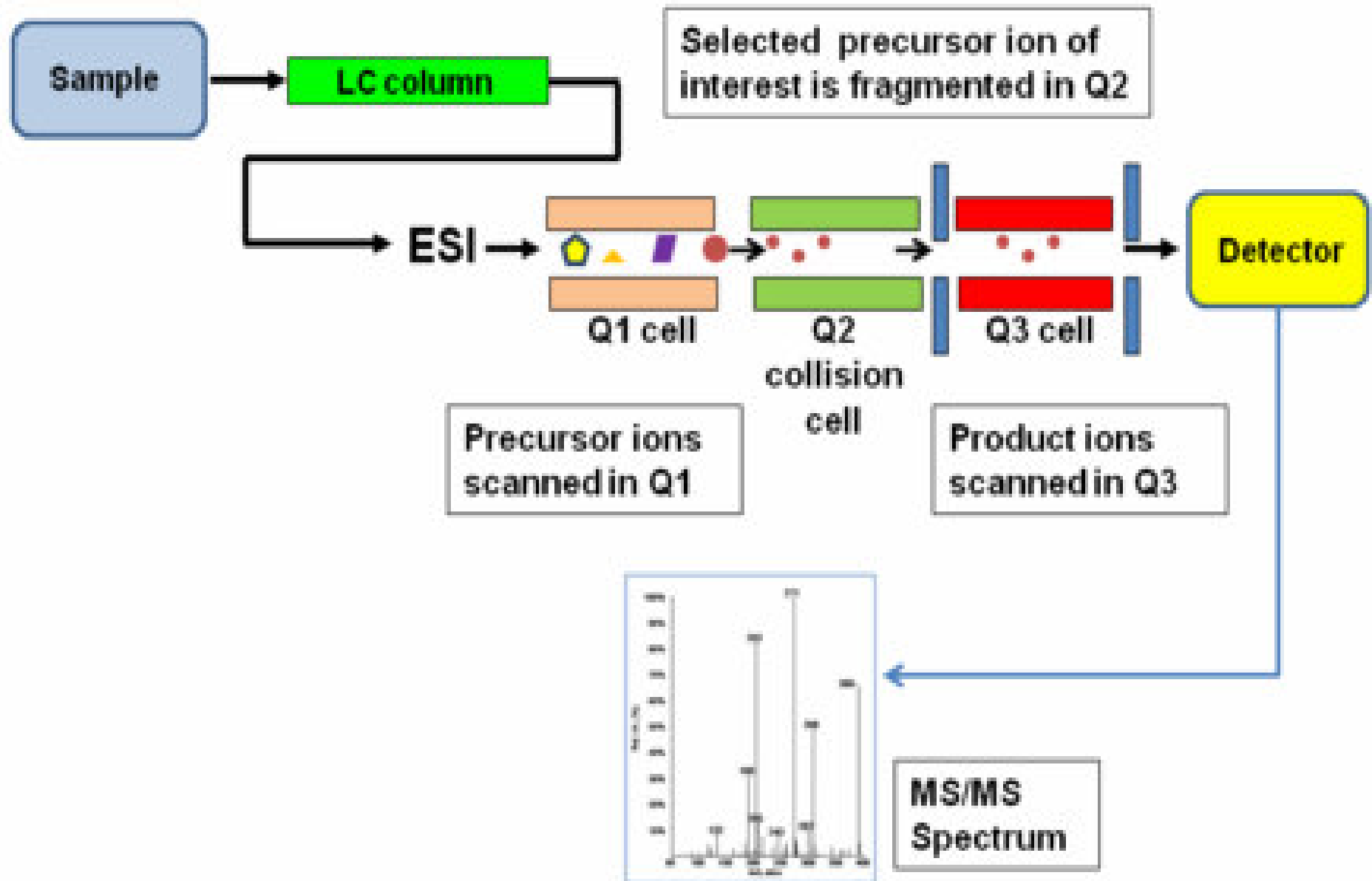
**Table 2**  
MRM transitions, condition and retention time for benzodiazepines.

Compound	Parent ion ( <i>m/z</i> )	Daughter ion ( <i>m/z</i> )	Dwell time (ms)	DP (V)	CE (eV)	Rt (min)
Diazepam	285.1	193.3	30	60	45	9.91
		154.1	30		36	
Oxazepam	287.2	241.2	30	50	31	8.55
		269.3	30		36	
Nordiazepam	271.2	140.2	30	60	36	9.14
		208.1	30		36	
Temazepam	301.2	255.2	30	70	36	9.25
		283.1	30		19	
Clonazepam	316.2	270.1	30	65	36	9.11
		214.1	30		49	
7-Aminoclonazepam	286.1	222.2	30	60	34	7.73
		250.1	30		42	
Nitrazepam	282.2	236.2	30	60	32	8.95
		180.2	30		52	
7-Aminonitrazepam	252.2	121.1	30	80	37	7.69
		146.2	30		38	
Flunitrazepam	314.2	268.3	30	65	35	9.62
		239.3	30		45	
7-Aminoflunitrazepam	284.2	135.2	30	80	39	8.08
		226.2	30		41	
Triazolam	343.2	308.2	30	70	36	8.93
		315.2	30		35	
$\alpha$ -Hydroxytriazolam	359.2	331.2	30	80	38	8.23
		176.1	30		37	
Alprazolam	309.2	281.1	30	70	32	8.94
		274.2	30		33	
$\alpha$ -Hydroxyalprazolam	325.2	297.2	30	70	35	8.23
		279.2	30		33	
Midazolam	326.2	291.4	30	70	37	11.65
		244.2	30		35	
$\alpha$ -Hydroxymidazolam	342.0	324.2	30	60	29	9.26
		203	30		38	
Estazolam	295.2	267.3	30	70	34	8.67
		205.2	30		53	
Flurazepam	388.2	315.2	30	55	32	19.66
		288.1	30		33	
Diazepam-d5 (IS)	290.2	198.2	30	60	45	9.91
		159.2	30		36	





# Detection of a fatty acid by LC-MS/MS



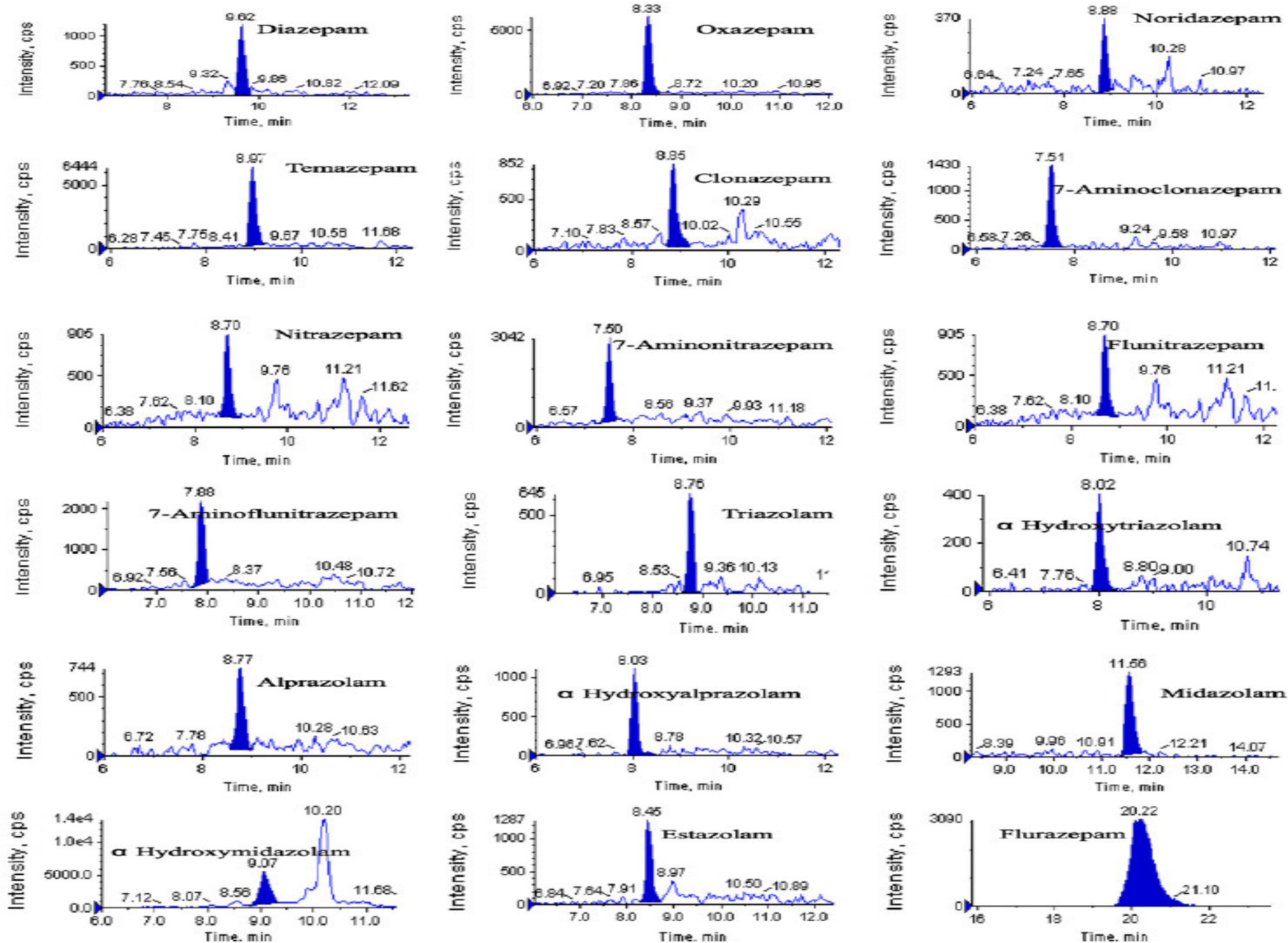


Fig. 1. The ion chromatograms of blank hair spiked with analytes at the Level of LOQ.

## วิธีการตรวจสอบ

- ทำตามคำแนะนำโดย Peters และชาวคณะ Standard curves
- เตรียมผงเส้นผมเพียงอย่างเดียว (20 mg) ที่มี 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200 และ 500 pg / mg ผสมกับ 18 benzodiazepines
- ความถูกต้องและแม่นยำทำได้โดย ใช้ผงผมเป็น blank ที่ประกอบด้วย 18 สารประกอบในปริมาณความเข้มข้นต่ำ, กลางและสูง เทียบกับช่วงสอบเทียบ
- ความแม่นยำได้ถูกตรวจสอบโดยการวิเคราะห์เส้นผม จำนวน 6 ครั้ง ในแต่ละระดับความเข้มข้นในวันเดียวกัน

## CONT.

- ◎ ในระหว่างวันความแม่นยำได้ถูกตรวจสอบ โดยการวิเคราะห์ซ้ำทุกๆ 4 วัน
- ◎ สารสกัดตัวอย่างที่ได้ (n = 6)
- ◎ การสกัด (n = 6) และ ME ได้กำหนดเป็น  $ME\% = (\text{extracted matrix area/mobile phase area}) \times 100$

# *RESULTS*

# วิธีการตรวจสอบ

Table 3

Calibration curves and LOD for 18 benzodiazepines.

Compounds	LOD (pg/mg)	Calibration ranges (pg/mg)	Calibration curves	r
Diazepam	0.5	1-200	$y = 0.0216x + 0.0356$	0.9997
oxazepam	2	5-200	$y = 0.019x + 0.2182$	0.9971
Nordiazepam	0.5	1-200	$y = 0.0109x + 0.0056$	0.9993
Temazepam	2	5-200	$y = 0.0466x + 0.0829$	0.9978
Clonazepam	0.5	1-200	$y = 0.0162x + 0.0133$	0.9997
7-Aminoclonazepam	5	10-500	$y = 0.0041x + 0.0075$	0.9989
Nitrazepam	0.5	1-200	$y = 0.0297x + 0.0389$	0.9996
7-Aminonitrazepam	5	10-500	$y = 0.007x + 0.0304$	0.9989
Flunitrazepam	0.5	1-200	$y = 0.0299x + 0.0356$	0.9997
7-Aminoflunitrazepam	2	10-500	$y = 0.0174x + 0.0233$	0.9995
Triazolam	1	2-200	$y = 0.2264x + 0.6017$	0.9993
$\alpha$ -Hydroxytriazolam	5	10-500	$y = 0.0011x + 0.0061$	0.9991
Alprazolam	0.5	1-200	$y = 0.0493x + 0.0491$	0.9999
$\alpha$ -Hydroxyalprazolam	1	10-500	$y = 0.0165x - 0.0015$	0.9995
Midazolam	1	2-200	$y = 0.0596x + 0.0024$	0.9982
$\alpha$ -Hydroxymidazolam	5	10-500	$y = 0.0226x - 0.1183$	0.9994
Estazolam	0.2	0.5-200	$y = 0.1414x + 0.0272$	0.9998
Flurazepam	0.5	1-200	$y = 0.1562x + 0.1377$	0.9998

**Table 4**  
Validation parameters for 18 benzodiazepines.

Compound	Spiked concentration (pg/mg)	Accuracy (%bias) (n=6)	Recovery (%) (n=6)	ME (%) (n=6)	Precision (%RSD)	
					Intra-day (n=6)	Inter-day (n=24)
Diazepam	1	12.8	103.0	59.4	11.4	7.6
	10	14	103.0	72.4	11.0	12.4
	150	0.8	102.0	62.4	5.1	8.8
Oxazepam	5	15	82.6	90.3	9.7	7.2
	10	6.8	103.0	86.5	10.6	6.6
	150	3.2	88.0	89.2	3.1	12.7
Nordiazepam	1	4.4	87.0	73.8	6.6	14.5
	10	5.0	91.0	84.5	13.5	7.6
	150	0.3	89.0	81.4	6.6	11.5
Temazepam	5	12.5	89.0	67.0	8.3	11.2
	10	1.2	90.0	73.9	7.7	5.7
	150	1.6	99.0	60.6	4.1	10.2
Clonazepam	1	5.8	102.0	95.4	13.3	13.3
	10	6.0	93.0	94.8	11.5	7.3
	150	0.4	97.0	95.7	6.6	12.0
7-Aminoclonazepam	10	11.5	58.1	35.0	9.3	15.4
	100	6.8	47.3	57.7	5.6	10.9
	400	2.6	49.3	56.7	5.9	11.9
Nitrazepam	1	4.9	75.0	81.3	14.8	18.3
	10	5.0	94.0	86.9	9.3	6.4
	150	0.3	86.0	84.5	8.3	13.3
7-Aminonitrazepam	10	14.8	40.8	53.2	5.5	12.5
	100	2.0	38.0	52.8	7.2	10.1
	400	3.0	39.4	71.4	6.2	14.8
Flunitrazepam	1	2.0	80.0	68.0	10.3	12.6
	10	1.7	97.0	73.4	8.6	12.3
	150	0	104.0	61.7	4.7	12.9
7-Aminoflunitrazepam	10	13.8	50.8	39.1	8.2	17.8
	100	5.8	67.5	45.6	4.7	12.0
	400	3.4	61.5	48.7	8.5	18.4
Triazolam	2	13.3	75.9	61.1	8.1	7.6
	10	14	71.4	68.2	8.2	8.5
	150	2.9	65.1	60.9	5.1	10.0
$\alpha$ -Hydroxytriazolam	10	8.8	50.3	92.6	6.8	11.9
	100	2.0	59.7	96.3	5.5	9.0
	400	2.4	61.0	94.5	3.0	7.9
Alprazolam	2	9.7	54.9	61.5	4.9	10.0
	10	3.3	69.2	74.7	6.5	8.3
	150	0.2	63.9	68.5	5.5	7.1
$\alpha$ -Hydroxyalprazolam	10	12.5	56.1	88.4	10.2	8.9
	100	2.8	77.0	90.7	6.5	8.3
	400	5.2	60.7	92.7	6.0	11.2
Midazolam	2	12.8	91.7	25.7	8.2	14.7
	10	9.5	87.2	30.9	6.5	8.6
	150	0.5	93.7	32.4	4.5	7.8
$\alpha$ -Hydroxymidazolam	10	16.5	65.6	64.0	7.5	14.1
	100	5.4	80.4	67.4	2.8	12.0
	400	0.8	82.6	60.0	8.2	13.9
Estazolam	2	6.4	59.6	69.2	4.0	14.4
	10	2.4	59.1	71.5	3.5	7.2
	150	1.2	62.1	65.4	3.9	7.4
Flurazepam	1	10.9	80.7	109.7	13.5	11.4
	10	0.7	76.5	103.5	8.7	9.7
	150	3.5	85.9	108.2	6.3	8.9



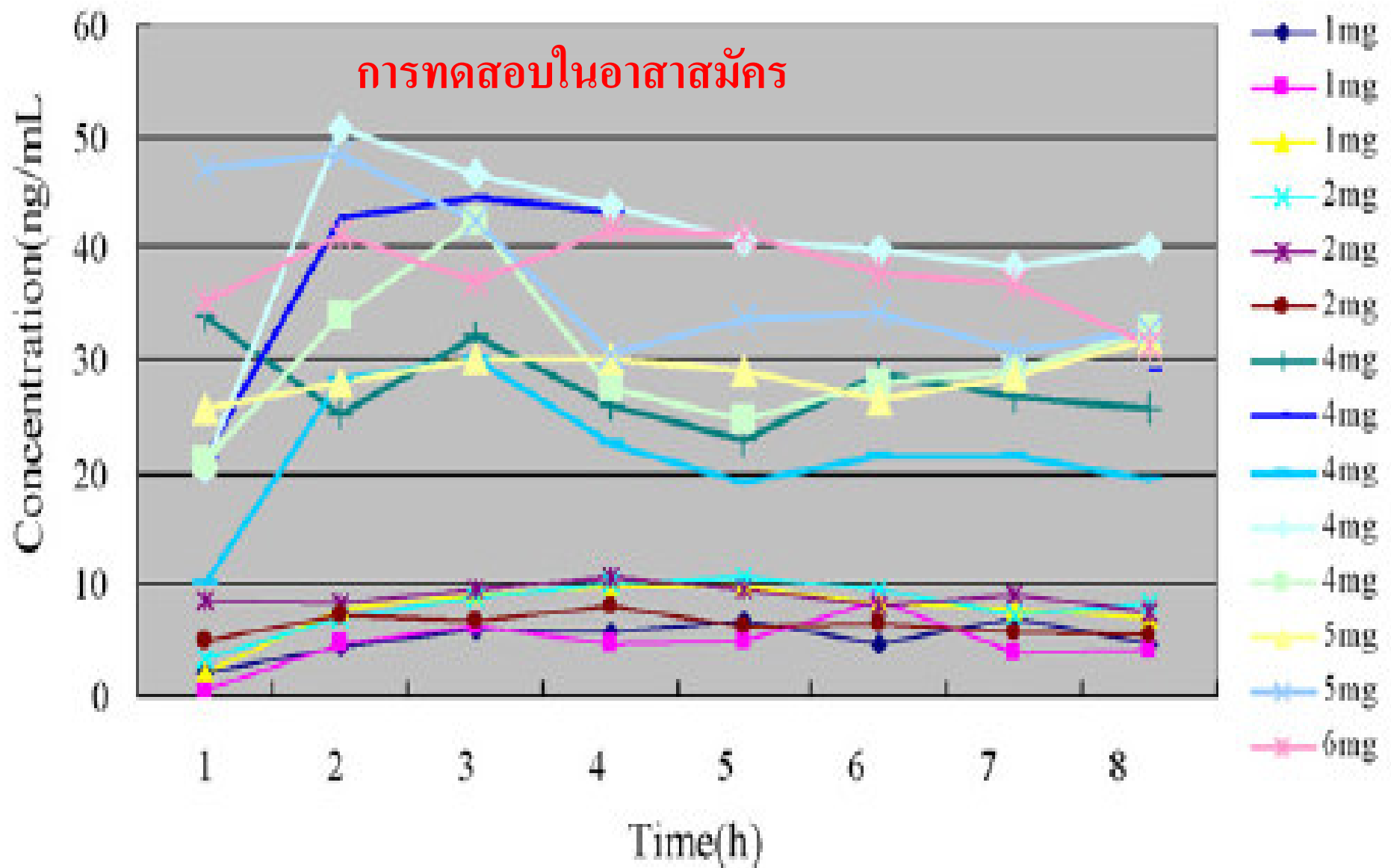


Fig. 2. The concentration-time curve in blood samples of volunteers who took single dose of estazolam.

**Table 5**

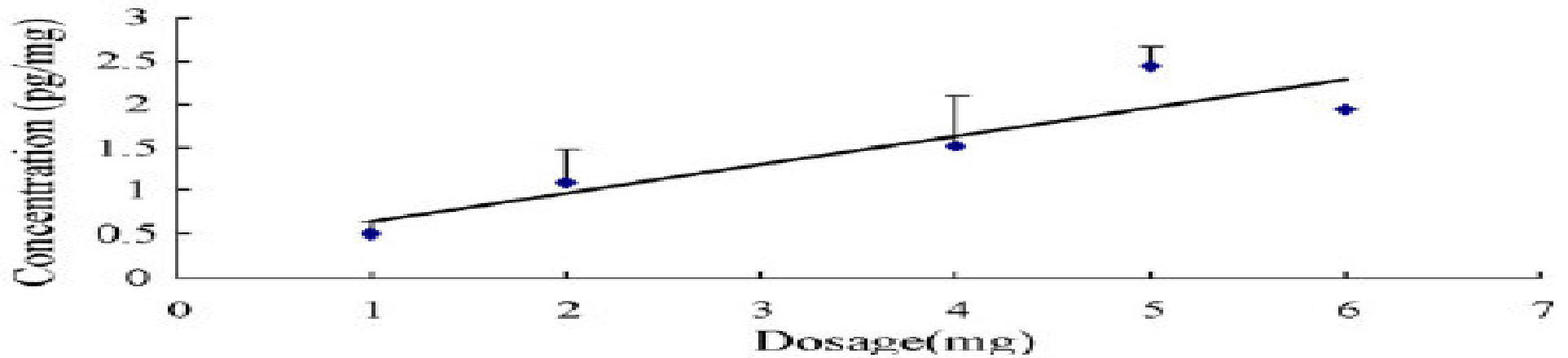
Concentrations of estazolam in hair 1 month after a single dose.

No.	Age	Sex	Weight (kg)	Hair length (cm)	Dosage (mg)	Concentration (pg/mg)			
						0-2 cm	2-4 cm	4-6 cm	Distal 2 cm
1	26	Female	50	20 cm	1	0.56	+ <sup>a</sup>	- <sup>b</sup>	-
2	26	Female	44	12 cm	1	0.61	-	-	-
3	24	Male	58	4 cm	1	+	-	/ <sup>c</sup>	-
4	27	Male	57.5	2 cm	2	0.67	/	/	-
5	24	Female	80	20 cm	2	1.45	-	-	-
6	27	Male	60	4 cm	2	1.11	-	/	-
7	27	Male	57.5	4 cm	4	1.52	0.77	/	-
8	26	Female	44	12 cm	4	1.12	0.83	+	-
9	24	Male	58	4 cm	4	2.45	0.71	/	-
10	26	Female	47	15 cm	4	0.94	+	+	-
11	23	Female	42	22 cm	4	1.49	+	-	-
12	25	Male	59	4 cm	5	2.60	+	/	-
13	26	Male	60	4 cm	5	2.28	+	/	-
14	27	Male	59	4 cm	6	1.94	+	/	-

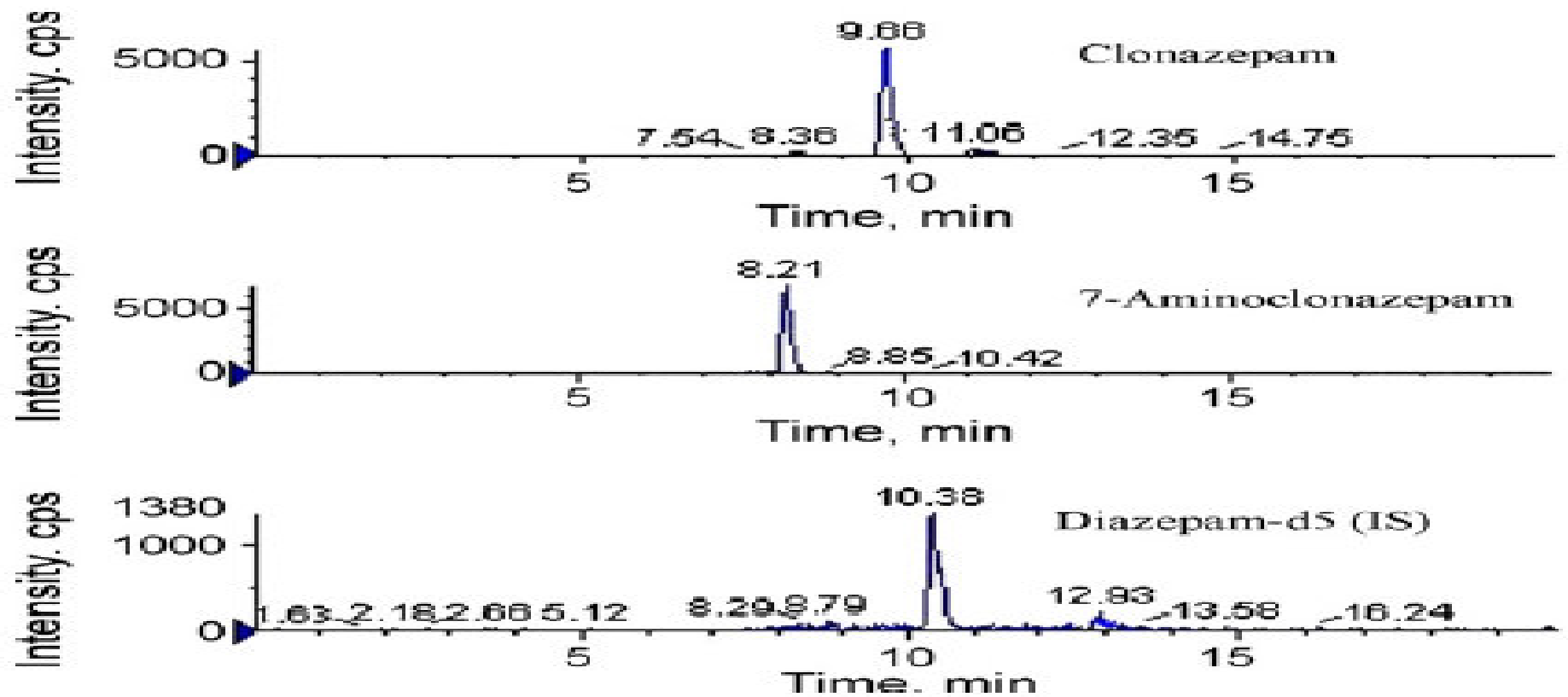
<sup>a</sup> +: detected, but below LOQ.<sup>b</sup> -: not detected.<sup>c</sup> /: sample is absent.

# กรณีการถูกทำร้ายทางเพศขณะเมาสุราและยาเสพติด





**Fig. 3.** Estazolam concentrations in hair at different doses.



**Fig. 4.** Chromatogram of the proximal segment of V#1.

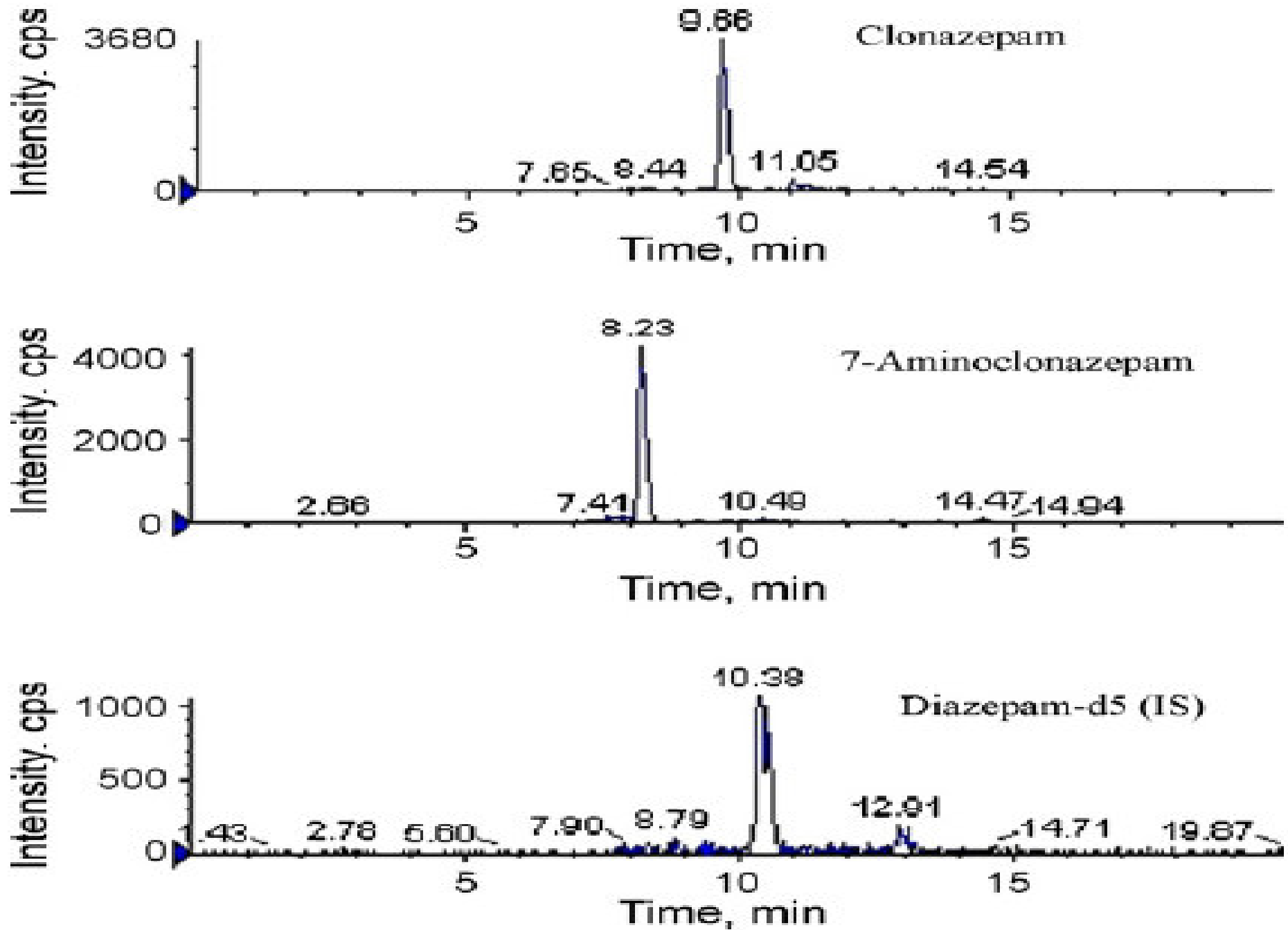


Fig. 5. Chromatogram of the proximal segment of V#2.

**Table 6**

Concentrations of clonazepam and 7-aminoclonazepam in two victims' hair.

Hair segments from proximal	V#1		V#2	
	Clonazepam (pg/mg)	7-Aminoclonazepam (pg/mg)	Clonazepam (pg/mg)	7-Aminoclonazepam (pg/mg)
0-2 cm	15.47	45.30	11.93	33.47
2-4 cm	5.31	- <sup>a</sup>	1.31	-
4-6 cm	1.63	-	-	-
6-8 cm	+ <sup>b</sup>	-	-	-
8-10 cm	-	-	-	-
10-12 cm	-	-	-	-
12-14 cm	-	-	-	-
14-16 cm	-	-	-	-

<sup>a</sup> -: not detected.<sup>b</sup> +: detected, but below LOQ.

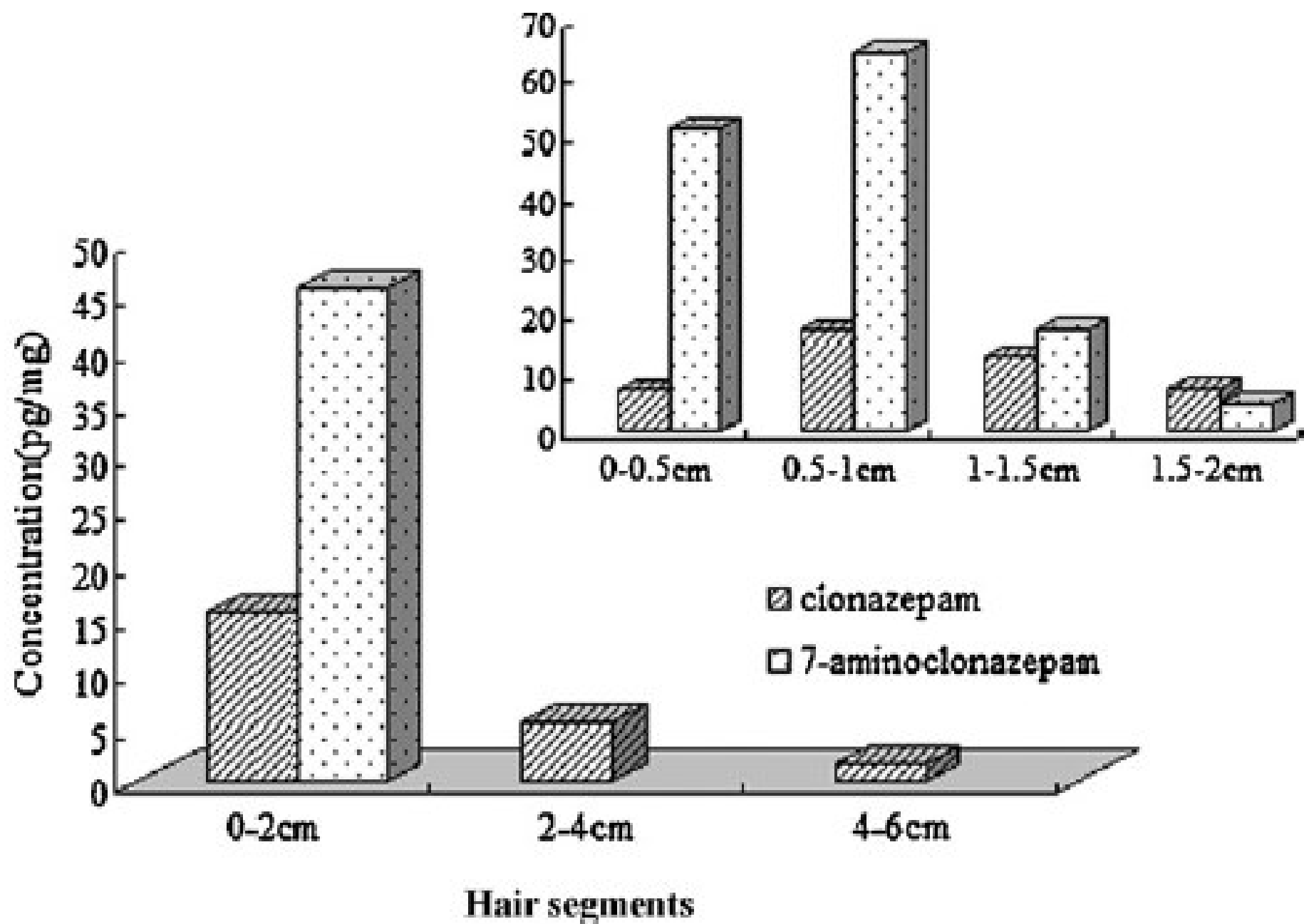


Fig. 6. Hair Segment Analysis of V#1.

# *DISCUSSION*



- ◎ วิธี LC-MS/MS ถูกพัฒนาขึ้นพร้อมกันกับการตรวจวัด 18 benzodiazepines ในตัวอย่างเส้นผม สามารถช่วยในอาชญากรรมด้านยาเสพติดได้ มีความไวสูง
- ◎ Triazolam พบมากที่สุดหลายปีที่ผ่านมาในประเทศไทย



## กลไกการรวมตัวของยาในเส้นผม สารเสพติดสามารถผ่านเข้าไปในเส้นผมได้โดย

- แพร่แบบ active หรือ passive จากกระแสเลือด
- การแพร่จากเหงื่อและต่อมสารคัดหลั่งอื่น ๆ ที่เจริญเติบโตขึ้นหรือเส้นใยผมที่เจริญเติบโตเต็มที่
- ยาจากภายนอกกระเหยไปสู่เส้นผมที่เจริญเติบโตเต็มที่

**การรวมกันของเส้นทางเหล่านี้จะมีความเป็นไปได้มากที่สุด**

- ◎ ผสม 2-4 ชม. ได้ถูกทดสอบว่าให้ผลบวกทั้งในการทดสอบควบคุมและกรณีการถูกทำร้ายทางเพศขณะเมาสุราและยาเสพติด
- ◎ เมื่อปริมาณสารเพิ่มขึ้น สามารถตรวจพบ estazolam ในช่วงผสม 4-6 ชม. มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ
- ◎ การเพิ่มขึ้นของ clonazepam และความเข้มข้นของ 7-aminoclonazepam สอดคล้องกันตามระยะเวลาอัตราการเจริญเติบโตของเส้นผมตามปกติ
- ◎ จากผลงานการวิจัยของหลายๆท่าน ได้ข้อสรุปตรงกันว่า  
“สารเสพติดที่พบในเส้นผมเกิดจากกลไกการแพร่จากต่อมเหงื่อและสารคัดหลั่งต่างๆ.”

- ความเข้มข้นของ 7-aminoclonazepam มีนัยสำคัญสูงกว่า clonazepam หลังจากได้รับ single dose ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Che`ze และคณะ
- Nakahara และคณะแสดงให้เห็นว่าที่ความเข้มข้นของยาในผมแตกต่างกันขึ้นอยู่กับคุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์



- ◎ ผมสีดำ ที่ได้รับ estazolam เพียงอย่างเดียว 1 mg สามารถตรวจพบในเส้นผมส่วน proximal (0-2 cm)
- ◎ อาสาสมัครที่ได้รับยาในปริมาณเดียวกัน จะมีค่าการแปรผันระหว่างบุคคลที่แคบ ในช่วง 0-2 cm.
- ◎ จะต้องมีการพัฒนาและปฏิบัติมากขึ้นเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ผมในงานอาชญากรรมด้านยาเสพติด



THANK

YOU