

การวิเคราะห์ส่วนของเส้นผมโดยใช้ liquid chromatography–tandem mass spectrometry หลังจากได้รับ benzodiazepines เพียงครั้งเดียว

Ping Xiang a,b,* , Qiran Sun a, Baohua Shen a, Peng Chen c, Wei Liu a, Min Shen a

a Department of Forensic Toxicology, Institute of Forensic Sciences, Ministry of Justice, Shanghai Key laboratory of Forensic Medicine, China

b Department of Forensic & Investigative Science, University of Central Lancashire, UK

c Zhejiang Province Wenzhou Public Security Bureau, China

ข้อมูลบทความ

ประวัติบทความ:

ได้รับเมื่อ 16 January 2010

ได้รับการปรับปรุงเมื่อ 26 April 2010

ยอมรับเมื่อ 28 April 2010

ออนไลน์เมื่อ xxx

คำสำคัญ: Segmental hair analysis, Benzodiazepines, A single dose, Liquid chromatography–tandem mass spectrometry, DFC

บทคัดย่อ

ในประเทศจีน benzodiazepines เป็นสารที่พบบ่อยในกรณีของอาชญากรรมที่เกี่ยวข้องกับยาเสพติด วิธีการที่มีความไวต่อปฏิกิริยาและมีความจำเพาะและสามารถทดสอบซ้ำเพื่อกำหนดปริมาณของ 18 benzodiazepines ในผมได้รับการพัฒนาโดยใช้ LC-MS/MS อาสาสมัครสิบสี่คนได้กิน estazolam ชนิดเม็ด 1-6 มิลลิกรัม เส้นผมถูกเก็บ 1 เดือนหลังจากการได้รับยาทั้งหมดมีส่วนประกอบของ proximal ซึ่งให้ผลบวกกับ estazolam ยังมีปริมาณเพิ่มขึ้นตามปริมาณยาที่ให้ estazolam สามารถตรวจพบในส่วนของเส้นผม 2-4 ซม. ในผู้ทดลอง แม้บางคนที่มีความยาวเส้นผม 4-6 ซม. ที่ให้ผลเป็นบวก การวิเคราะห์ผมได้นำไปใช้กับคดีอาญาจริงสองคดี ตัวอย่างเส้นผมเต็มความยาวถูกเก็บ 5 สัปดาห์หลังจากกระทำความผิดถูกตัดเป็นส่วน 2 ซม. จากรากผม ได้ถูกนำมาวิเคราะห์และหาปริมาณ ระดับความเข้มข้นของ clonazepam วัดในสองส่วนแรกสำหรับ V#1 และ V#2 คือ 15.47 และ 11.93 pg / mg ตามลำดับ อย่างไรก็ตามทั้งส่วน 4-6 ซม. และส่วน 6-8 ซม. ของ V#1 ยังคงให้ผลบวกในขณะที่ V#2 ให้ผลลบ มันจำเป็นอย่างมากที่จะต้องมีการตัดเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ผมเป็นส่วนๆในทางอาชญากรรมที่เกี่ยวข้องกับยาเสพติด

_ 2010 Elsevier Ireland Ltd. ลิขสิทธิ์ถูกดอง

1. บทนำ

อาชญากรรมด้านยาเสพติด (DFC) เป็นปัญหาใหญ่ในประเทศจีน ส่วนใหญ่เกิดขึ้นกรณีที่มีการโจรกรรมเกิดขึ้น นอกจากนี้การถูกทำร้ายทางเพศขณะเมาสุราและยาเสพติด (DFSA) มีรายงานมากขึ้น ในประเทศจีน benzodiazepines เป็นสารที่พบบ่อยในกรณีของการเป็นสาเหตุอาชญากรรมด้านยาเสพติด

Benzodiazepines พบมากและบ่อยที่สุดในยากล่อมประสาทและยานอนหลับรวมถึงยาเสพติดทั่วโลกจึงสามารถหาได้อย่างแพร่หลายทั่วโลก ปฏิกริยาหลักด้านเภสัชศาสตร์คือส่งผลช่วยให้หลับ, แก้ไขอาการตื่น ตื่น, คลายกล้ามเนื้อและแก้ไขอาการชัก ผล Benzodiazepines อาจทำให้เกิดการสูญเสียความสามารถในการรับรู้ ปริมาณการรักษาจะมีความเสี่ยงเพิ่มขึ้นที่ปริมาณยาสูงขึ้น

เลือดและปัสสาวะเป็นตัวอย่างทั่วไปสำหรับการตรวจหาปริมาณการรับยา ในกรณีส่วนใหญ่เพราะความจำเสื่อมเกิดจากยาเสพติดจะมีสูงถึง 24-72 ชั่วโมงหรือนานกว่านั้นระหว่างรายงานของเหยื่อและการขอยของยา นอกจากนี้ยาที่ใช้สามารถถูกตรวจพบได้ยากเพราะจะมีขนาดของระดับยาต่ำหรือสารเคมีที่ใช้งานอยู่ไม่แน่นอน ยาบางชนิดสลายอย่างรวดเร็วจากของเหลวในร่างกาย ดังนั้นในกรณีเช่นเลือดและแม่แต่ตัวอย่างปัสสาวะบ่อยครั้งถูกจำกัดในด้านในการตรวจสอบสถานะยา เพื่อยืดระยะเวลาการตรวจวิเคราะห์ ผมได้รับการพิสูจน์แล้วว่าสามารถถูกนำมาใช้ในการแก้ปัญหานี้ได้ ในความเป็นจริงแล้วการประกาศในกรณีของการถูกทำร้ายทางเพศขณะเมาสุราและยาเสพติดแสดงให้เห็นประโยชน์ของการวิเคราะห์ผมในเอกสารหลักฐานที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับยาเสพติด / พิษ

สาขาวิชามีความก้าวหน้าในการตรวจสอบ benzodiazepines หรือสารที่ออกฤทธิ์ทำให้ง่วงซึมในเส้นผมต่อไปนี้เป็นขนาดเดียวเป็นผลจากการใช้ liquid chromatography (LC) คู่กับ MS / MS ในห้องปฏิบัติการทางนิติวิทยาศาสตร์ Kintz และเพื่อนร่วมงานได้เห็นชุดเอกสารรวมทั้งการตรวจทั่วไปและวิธีการเฉพาะ สำหรับ bromazepam, zolpidem, zopiclone และ alprazolam เขาแนะนำให้ตัดเส้นใยออกเป็นสามกลุ่มๆละ 2 ซม. เพื่อที่จะใช้เป็นเอกสารกรณีการถูกทำร้ายทางเพศขณะเมาสุราและยาเสพติด การตรวจสอบยาชนิดเดียวเพื่อจะยืนยันสถานะของยาในชิ้นส่วนใกล้เคียง(รากผม) ซึ่งไม่มีการตรวจสอบในส่วนอื่น ๆ

ในกรอบของการทดลองของการจัดเตรียม "ขั้นตอนการวิเคราะห์" เป็นขั้นตอนตามคำแนะนำที่เป้าหมายของเราคือการใช้วิธี LC-MS/MS ตรวจสอบเพื่อยืนยันระดับปริมาณ 18 benzodiazepines ในเส้นผมและใช้วิธีการพัฒนานิววิธีการตรวจสอบระดับของ benzodiazepine

ในกลุ่มเส้นผมของ (i) อาสาสมัครที่มีสุขภาพดีหลังจากได้รับ estazolam เพียงอย่างเดียวและ (ii) ผู้ที่ตกเป็นเหยื่ออาชญากรรมทั้งสองกลุ่ม

2. อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

2.1. สารเคมีและสารตั้งต้น

Alprazolam, a-hydroxyalprazolam, midazolam, a-hydroxymidazolam, triazolam, a-hydroxytriazolam, estazolam, diazepam, nordiazepam, temazepam, oxazepam, clonazepam, 7-aminoclonazepam, flunitrazepam, 7-aminoflunitrazepam, nitrazepam, 7-aminonitrazepam, flurazepam และ diazepam-d5 ที่ได้จาก Cerilliant (Round Rock, เท็กซัส, อเมริกา) และสถาบันวิจัยเพื่อการควบคุมยาและผลิตภัณฑ์ที่เกี่ยวข้องกับชีววิทยา (ปักกิ่ง, จีน) Acetonitrile, methanol, แอมโมเนียและกรดนำมาจาก Fluka Chemical จำกัด (Buchs, สวิตเซอร์แลนด์) น้ำยาอื่น ๆ ที่ได้นำมาใช้วิเคราะห์และไม่ได้นำมาเติมสารอื่นลงไป น้ำกลั่นบริสุทธิ์โดยใช้ระบบ Milli-Q (Millipore, MA, USA)

Table 1
LC mobile phase gradient composition.

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

^a 20 mM ammonium acetate buffer with 0.1% formic acid, pH 4.0.

2.2. การเก็บตัวอย่าง

2.2.1. อาสาสมัครสุขภาพดี

อาสาสมัครสุขภาพดีสิบสี่คน (อายุ 23-27 ปี) ได้รับคัดเลือกเข้าเพื่อใช้ศึกษา ผู้ทดลองตกลงในการเข้าร่วมเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาทดลองทางความยินยอมด้วยคำพูด โปรโตคอลทั้งหมดได้รับอนุมัติจากคณะกรรมการตรวจสอบสถาบัน ข้อมูลเบื้องต้นหลังได้ถูกเก็บรวบรวมจาก

ตัวอย่างเช่นความถี่ในการล้างผมและชนิดของผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่ใช้กับเส้นผม ผู้ทดลองส่วนใหญ่มีผมสีดำตรงยกเว้นสำหรับผู้หญิงหนึ่งคนที่มีผมมัด

ตัวอย่างเลือดที่ได้รับก่อนและหลังที่ 1-8 ชั่วโมงหลังจากได้รับ estazolam ทางปากอย่างเดียว (1 mg/tablet) มีปริมาณระดับสารอยู่ระหว่าง 1-6 mg ที่ถูกนำมาใช้ในการศึกษา

เส้นผมถูกเก็บ 1 เดือนหลังจากการเก็บข้อมูล เส้นผมประมาณ 100 เส้นถูกตัดจากจุดยอดใกล้เคียงหนึ่งศีรษะที่สุดเท่าที่เป็นไปได้, ผมที่เพิ่งงอก, และเก็บไว้ในถุงกระดาษสะอาดในอุณหภูมิห้อง

2.2.2. กรณีการถูกทำร้ายทางเพศขณะเมาสุราและยาเสพติด

เด็กผู้หญิงสองคน (V#1 and V#2) ได้รับเชิญให้รับประทานอาหารว่างเวลากลางคืนหลังจากดื่ม เครื่องดื่มที่พวกเขาไม่ได้สติ เมื่อพวกเขาตื่นขึ้นก็ตระหนักว่าพวกเขาถูกข่มขืนและไปพบตำรวจ 18 ชั่วโมงภายหลัง ที่หน่วยกฎหมายแพทย์ของโรงพยาบาลเก็บตัวอย่างเลือดที่พบ clonazepam และ 7-amino clonazepam ในเส้นผม

2.3. การจัดเตรียมตัวอย่าง

2.3.1. ตัวอย่างเส้นผม

เส้นผมถูกตัดแบ่งและล้างสองครั้งด้วยด้วยไดคลอโรมีเทน 5 ml ล้างครั้งสุดท้ายถูกเก็บไว้สำหรับกรวิเคราะห์ต่อไป หลังจากที่ได้ตากในอากาศให้แห้งซึ่งถูกตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาดประมาณ 3 มิลลิเมตรและทำให้เป็นผงในโรงงานแช่แข็ง (Freezer/Mill, SPEX CertiPrep) ผงเส้นผม 20 mg ถูกทำให้เซลล์แตกในอ่างอัลตราโซนิกที่มีฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 1 ml, pH 8.4, 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้องในที่ที่มี diazepam-d5 0.4 ng เป็นมาตรฐานภายใน (IS) ของเหลวที่ได้จากการสกัดด้วย 3 ml ของไดคลอโรมีเทน หลังจากการระเหยกับตัวทำละลายที่ 60 °C ส่วนที่เหลือได้ถูกผสมใหม่กับ 100 ml ของ Acetonitrile - 20 mM ammonium acetate (70:30, v / v) และ 5 ml ถูกฉีดเข้าระบบ LC-MS/MS

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			
Oxazepam	287.2	241.2	30	50	31	8.55
		269.3	30			
Nordiazepam	271.2	140.2	30	60	36	9.14
		208.1	30			
Temazepam	301.2	255.2	30	70	36	9.25
		283.1	30			
Clonazepam	316.2	270.1	30	65	36	9.11
		214.1	30			
7-Aminoclonazepam	286.1	222.2	30	60	34	7.73
		250.1	30			
Nitrazepam	282.2	236.2	30	60	32	8.95
		180.2	30			
7-Aminonitrazepam	252.2	121.1	30	80	37	7.69
		146.2	30			
Flunitrazepam	314.2	268.3	30	65	35	9.62
		239.3	30			
7-Aminoflunitrazepam	284.2	135.2	30	80	39	8.08
		226.2	30			
Triazolam	343.2	308.2	30	70	36	8.93
		315.2	30			
α -Hydroxytriazolam	359.2	331.2	30	80	38	8.23
		176.1	30			
Alprazolam	309.2	281.1	30	70	32	8.94
		274.2	30			
α -Hydroxyalprazolam	325.2	297.2	30	70	35	8.23
		279.2	30			
Midazolam	326.2	291.4	30	70	37	11.65
		244.2	30			
α -Hydroxymidazolam	342.0	324.2	30	60	29	9.26
		203	30			
Estazolam	295.2	267.3	30	70	34	8.67
		205.2	30			
Flurazepam	388.2	315.2	30	55	32	19.66
		288.1	30			
Diazepam-d5 (IS)	290.2	198.2	30	60	45	9.91
		159.2	30			

รูปตัวอย่างเครื่อง LC-MS/MS



2.3.2. ตัวอย่างเลือด

ขั้นตอนการสกัดได้เหมือนกับที่เคยรายงานไว้ก่อนหน้านี้ ตัวอย่างเลือด 1 ml, 10 ng diazepam - D5 (IS) และ 2 ml ของ sodium borate buffer, pH 9.2 ถูกเพิ่มเข้าไป ของเหลวที่สกัดได้ถูกนำมาผสมกับ 3 ml ของ diethyl ether หลังจากการระเหยตัวทำละลายที่ 60 °C ส่วนที่เหลือได้ถูกผสมใหม่กับ 100 ml ของ Acetonitrile - 20 mM ammonium acetate (70:30, v / v) และ 5 ml ถูกฉีดเข้าระบบ LC-MS/MS

2.4. การจัดเตรียมเครื่องมือ

ระบบ liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) ประกอบด้วย Agilent HPLC (Palo Alto, CA, USA) รวมทั้งปั๊มทั้งสอง, อุปกรณ์ในการกำจัดฟองอากาศในสารละลายออนไลน์และระบบส่งเลือดเข้าเครื่องอัตโนมัติ, MDS Sciex API 4000 triple quadrupole mass spectrometer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) ชุดวิเคราะห์ 1.4.2 ซอฟต์แวร์ที่ใช้ในการควบคุมเครื่องมือและเก็บข้อมูล

คอลัมน์วิเคราะห์เป็นคอลัมน์ Resteck Allure PFP Propyl ((100 mm x 2.1 mm i.d., 5 µm) ติดตั้งด้วยคอลัมน์ end-capped C18 guard (12.5 mm x 2.1 mm id, 5 µm) ที่อุณหภูมิห้องตามวิธีการของ Villain, LC mobile phase gradient (ดูตาราง 1 ประกอบ) โดยใช้ความละเอียดของการวิเคราะห์ อัตราการไหล รวมผ่านคอลัมน์เป็น 200 มล. / นาที

เครื่องมือได้ถูกดำเนินการในโหมดไอออนบวก 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 ข้อมูลถูกบันทึกในโหมดการตรวจสอบปฏิกิริยาหลายครั้ง (MRM) Parent ions สอดคล้องกันกับ daughter ions, ตามเวลาที่ตั้งไว้, ความเป็นไปได้ในการแตกตัวออกจากกลุ่มก้อน (DP) และพลังงานของการชน (CE) ที่เหมาะสำหรับการวิเคราะห์และการทำ standard จะแสดงในตารางที่ 2 การเปลี่ยนแปลงครั้งแรกถูกใช้ในการวัดปริมาณ

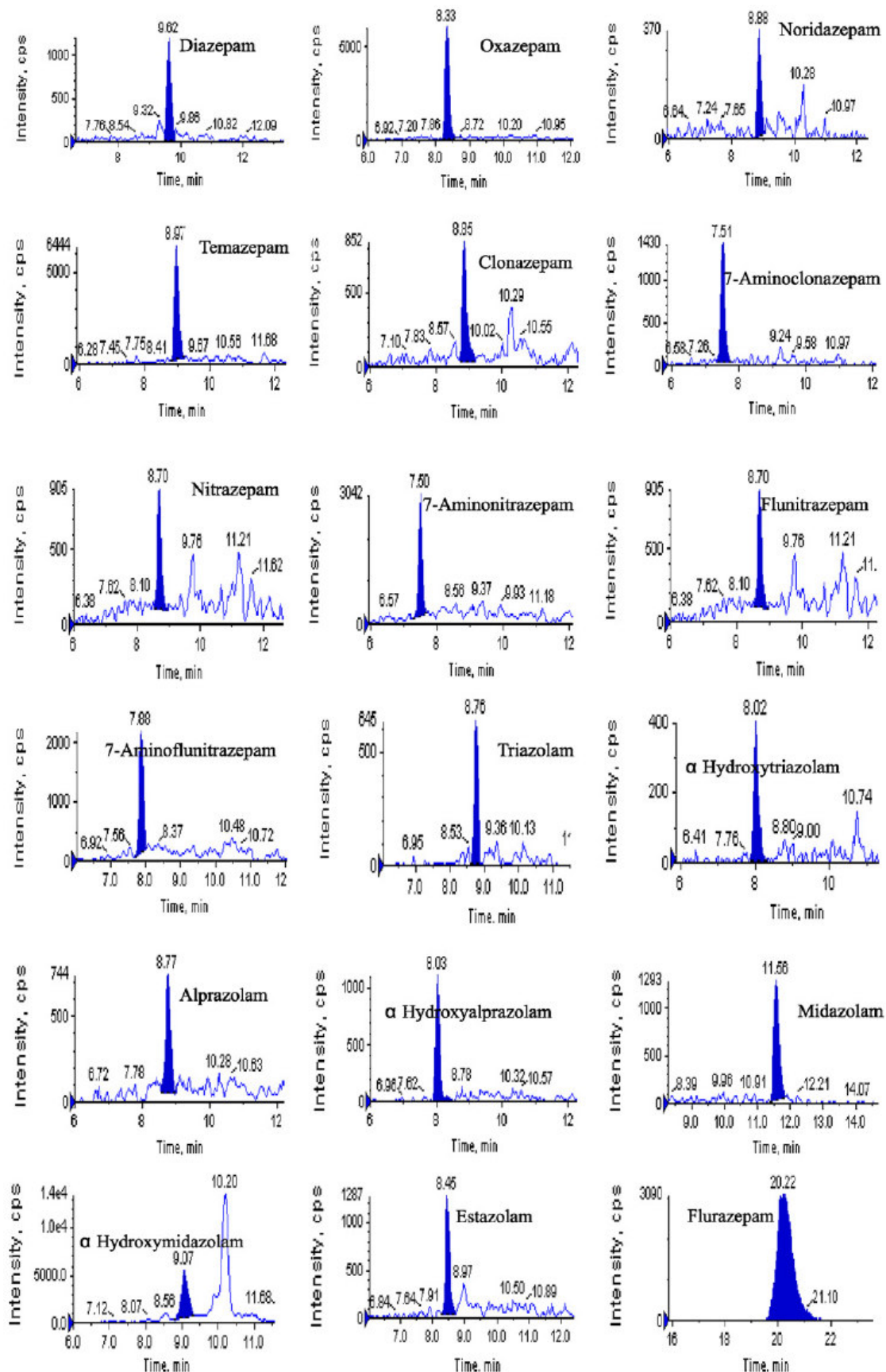


Fig. 1. The ion chromatograms of blank hair spiked with analytes at the Level of LOQ.

2.5. วิธีการตรวจสอบ

วิธีการคือการตรวจสอบตามคำแนะนำโดย Peters และชาวคณะ Standard curves เทียบเป็นจริงได้โดยการเตรียมผงเส้นผมเพียงอย่างเดียว (20 mg) ที่มี 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200 และ 500 pg / mg ผสมกับ 18 benzodiazepines

ความถูกต้องและแม่นยำได้ถูกตรวจสอบโดยใช้ผงผมเป็น blank ที่ประกอบด้วย 18 สารประกอบในปริมาณความเข้มข้นต่ำ, กลางและสูงเมื่อเทียบกับช่วงสอบเทียบ แม่นยำภายในวันที่กำหนดโดย assaying หกตัวอย่างผมได้ถูกแบ่งที่ระดับความเข้มข้นของแต่ละวันเดียวกันและความแม่นยำในแต่ละวันความแม่นยำได้ถูกตรวจสอบโดยการวิเคราะห์เส้นผม 6 เส้นในแต่ละระดับความเข้มข้นในวันเดียวกันและในระหว่างวันความแม่นยำได้ถูกตรวจสอบโดยการวิเคราะห์ซ้ำทุกๆ 4 วัน

การคืนสู่สภาพเดิมได้ถูกกำหนดขึ้นที่ระดับความเข้มข้นต่ำ, กลางและระดับสูงโดยเปรียบเทียบวิเคราะห์พื้นที่จุดสูงสุดในการวิเคราะห์ของสารสกัดตัวอย่างที่ได้ (n = 6) ด้วยตัวอย่าง blank ที่ได้วิเคราะห์ไปในทางเดียวกันหลังจากการสกัด (n = 6)

เพื่อศึกษาความไวของการเกิดปฏิกิริยาและความเป็นไปได้ของสิ่งรบกวนในการทดลอง, แหล่งที่มา 10 แหล่งของผงผมสำหรับการวิเคราะห์

จำกัดการตรวจสอบ (LOD) ได้ประเมินผลด้วยการลดความเข้มข้นของสารในผงผม 18 ชนิดในผงผม blank จนกระทั่งเทียบเท่ากับการตอบสนองสามครั้งพบการเปลี่ยนแปลงสองครั้ง การจำกัดปริมาณ (LOQ) ได้ถูกกำหนดให้เป็นความเข้มข้นต่ำสุดในเส้นโค้งสอบเทียบและการตอบสนองดีกว่าทั้ง 10 ครั้ง

Matrix effects (ME) เป็นการถูกประเมินโดยวิธีการของ Matuszewski และคณะ สัญญาณการวิเคราะห์ในเฟสเคลื่อนที่ (n = 6) เมื่อเปรียบเทียบกับสัญญาณการวิเคราะห์ใน matrix เสริมหลังจากการสกัด (n = 6) และ ME ได้กำหนดเป็น $ME\% = (\text{extracted matrix area/mobile phase area}) \times 100$

3. ผลการทดลอง

3.1. วิธีการตรวจสอบ

การเลือกวิธีการทดลองได้รับการยืนยันโดยไม่มีการรบกวนในจุดสูงสุดที่จำนวนครั้งที่กำหนดไว้สำหรับ 18 benzodiazepines ใน blank ผงผม chromatograms ion ของ blank เส้นผมที่ได้วิเคราะห์และมาตรฐานภายในที่ระดับต่ำสุดของการสอบเทียบจะแสดงในรูป 1

Calibration curves ได้ถูกทำเพื่อแต่ละสารประกอบสำหรับช่วงความเข้มข้นที่แสดงในตารางที่ 3 แต่ละ LOD อยู่ระหว่าง 0.2-5 pg / mg (ตารางที่ 3) การไวต่อปฏิกิริยานี้เพียงพอสำหรับการทดสอบของเส้นผมหลังจากใช้ benzodiazepines ในปริมาณเดียว

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
α -Hydroxytriazolam	5	10-500	$y = 0.0011x + 0.0061$	0.9991
Alprazolam	0.5	1-200	$y = 0.0493x + 0.0491$	0.9999
α -Hydroxyalprazolam	1	10-500	$y = 0.0165x - 0.0015$	0.9995
Midazolam	1	2-200	$y = 0.0596x + 0.0024$	0.9982
α -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

ข้อมูลที่มีความถูกต้องและแม่นยำ (ตารางที่ 4) ได้ถูกกำหนดในช่วงที่ยอมรับได้ ความแม่นยำในแต่ละวันและระหว่างวันน้อยกว่า 20% การคืนสู่สภาพเดิมได้จากตัวอย่างที่มีค่าตั้งแต่ 38% ถึง 104% แม้ว่าการคืนสู่สภาพเดิมของ 7-aminonitrazepam และ 7-amnioclonazepam มีค่าต่ำกว่า 50%, วิธีการแสดงให้เห็นว่าความถูกต้องและความแม่นยำสามารถยอมรับได้สำหรับทั้ง 2 สาร ผลแสดงในตารางที่ 4 แสดงให้เห็นว่า hair matrix ทำให้ ionsuppression มีนัยสำคัญและมีอิทธิพลต่อ benzodiazepines แต่เนื่องจากเราใช้ diazepam - d5 เป็นมาตรฐานภายใน, ที่มีผล ion-suppression ไม่มีนัยสำคัญต่อความถูกต้องของผลการทดลอง

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
α -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
α -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
α -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

3.2. การทดสอบในอาสาสมัคร

estazolam ปริมาณ 1-2 mg เพียงอย่างเดียวไม่ได้มีผลต่อพฤติกรรมของอาสาสมัคร ผู้ที่ได้รับ 4 mg หรือมากกว่า 4 mg ของ estazolam พฤติกรรมปรากฏชัดเจนในช่วงครึ่งชั่วโมงต่อมา พวกเขา มีปฏิกิริยาช้าลง แขนขาอ่อนแรงและง่วงนอน ตรวจเลือดพวกเขาพบความเข้มข้น estazolam ปริมาณ 20 ng / ml 1 ชั่วโมงหลังจากที่ได้รับสาร ตารางระหว่างความเข้มข้นกับเวลา ในตัวอย่างเลือดของอาสาสมัครได้นำเสนอเป็นรูปที่ 2

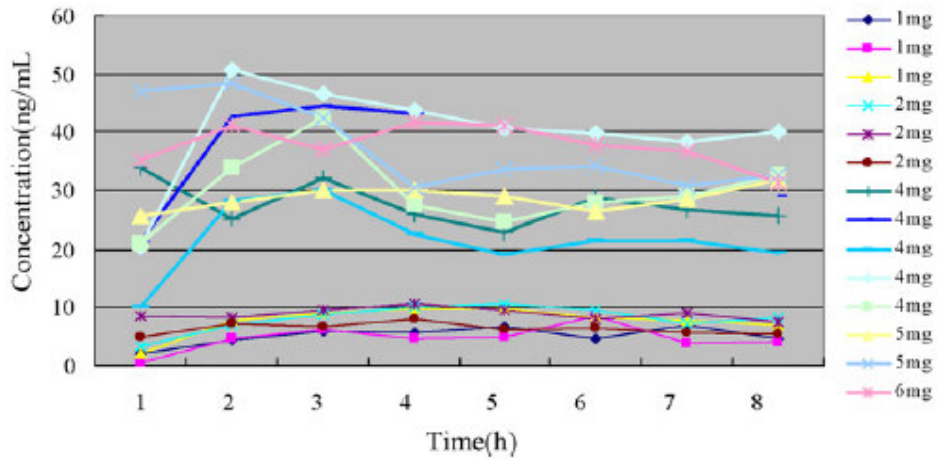


Fig. 2. The concentration–time curve in blood samples of volunteers who took single dose of estazolam.

เส้นผมของอาสาสมัคร 14 รายที่ได้รับการทดสอบโดยได้รับ estazolam ขนาดเดียว ซึ่งกำจัดการปนเปื้อน, การตัดแบ่ง, การวิเคราะห์และการหาปริมาณ ผลแสดงในตารางที่ 5 estazolam ขนาด 1 mg เพียงอย่างเดียวสามารถตรวจพบในผมหลังจากหนึ่งเดือน ดังรูปที่ 3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณและความเข้มข้นระหว่างส่วนต่างๆ 0-2 ซม. ($r = 0.766$) โดยมีค่าแปรปรวนแคบสำหรับอาสาสมัครที่ได้รับปริมาณสารเดียวกัน (น้อยกว่า 40%) ทั้งหมดมีส่วนใกล้เคียงกันซึ่งให้ผลบวกสำหรับ estazolam ที่มีปริมาณเพิ่มขึ้น estazolam สามารถตรวจพบในอาสาสมัครที่ส่วนของเส้นผมขนาด 2-4 ซม. ในเรื่องของผมบาง ไม่เว้นแต่ส่วนของเส้นผมที่มีขนาด 4-6 ซม. จะให้ผลเป็นบวก

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	+ ^a	- ^b	-
2	26	Female	44	12 cm	1	0.61	-	-	-
3	24	Male	58	4 cm	1	+	-	/ ^c	-
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	+	/	-

^a +: detected, but below LOQ.

^b -: not detected.

^c /: sample is absent.

3.3. กรณีการถูกทำร้ายทางเพศขณะเมาสุราและยาเสพติด

Clonazepam และสารหลักของผลิตภัณฑ์ของกระบวนการสันดาป 7-aminoclonazepam ตรวจพบในทั้งสองตัวอย่างเลือดจากสองผู้ประสบภัย ความเข้มข้นของเลือดของ clonazepam และ 7-aminoclonazepam สำหรับ V # 1 คือ 1.05 และ 20.60 ng / มิลลิลิตรตามลำดับ เข้มข้น สำหรับ V # 2 ได้ 0.22 และ 15.34 ng / มิลลิลิตรตามลำดับ

ตัวอย่างเส้นผมเต็มความยาวเก็บ 5 สัปดาห์หลังจากความผิดปกติขึ้นถูกตัดเป็นส่วน 2 ซม. จากรากผมวิเคราะห์และหาปริมาณ รูปที่ 4 และ 5 แสดง chromatograms ของส่วนใกล้เคียง (0-2 ซม.) ของ V#1 และ V#2ผลแสดงในตารางที่ 6

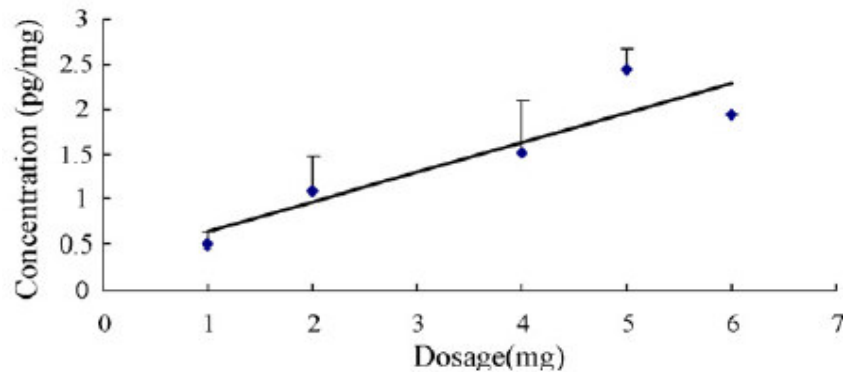


Fig. 3. Estazolam concentrations in hair at different doses.

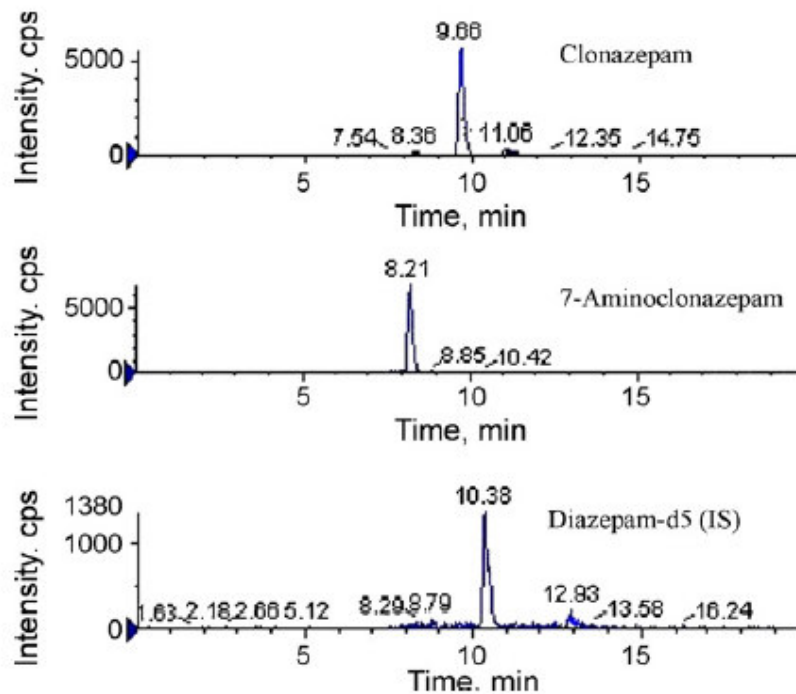


Fig. 4. Chromatogram of the proximal segment of V#1.

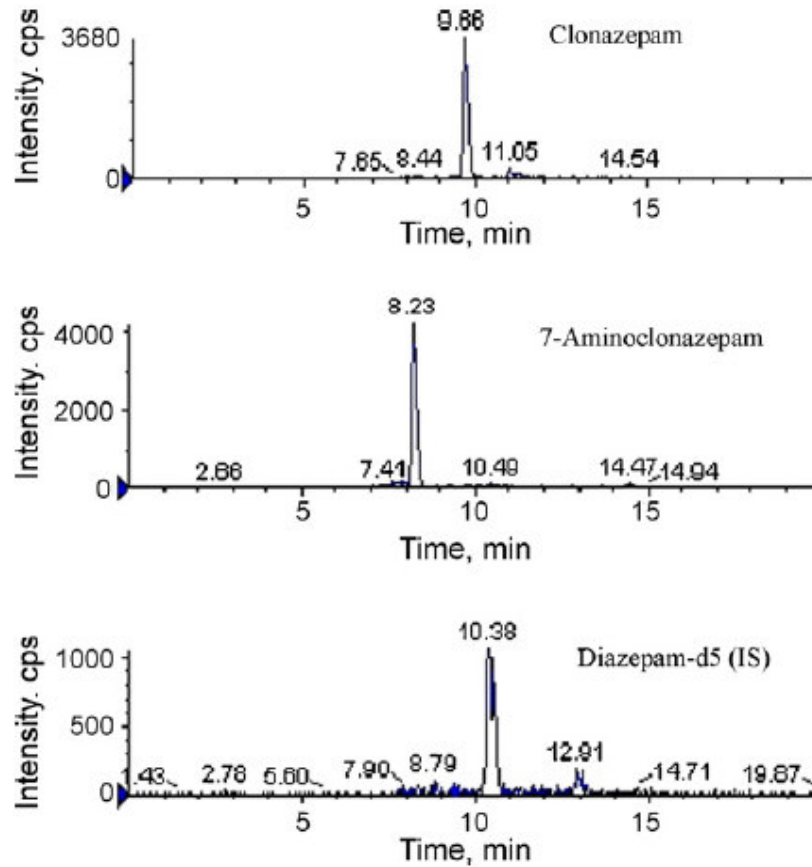


Fig. 5. Chromatogram of the proximal segment of V#2.

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	- ^a	1.31	-
4-6 cm	1.63	-	-	-
6-8 cm	+ ^b	-	-	-
8-10 cm	-	-	-	-
10-12 cm	-	-	-	-
12-14 cm	-	-	-	-
14-16 cm	-	-	-	-

^a -: not detected.

^b +: detected, but below LOQ.

สองส่วนแรกสำหรับ V#1 และ V#2 มีทั้งให้ผลบวกสำหรับ clonazepam (15.47 pg / mg สำหรับส่วนแรกและ 5.31 pg / mg สำหรับส่วนที่สองของ V # 1; 11.93 pg / mg สำหรับส่วนแรก และ 1.31 pg / mg สำหรับส่วนที่สองของ V # 2) นอกจากนี้ 7-aminoclonazepam อาจพบในกลุ่มแรก (เช่น 0-2 ซม.) สำหรับเหยื่อทั้งสองมีความเข้มข้น 45.30 pg / mg (V # 1) และ 33.47

pg / mg (V # 2) ซึ่งมีความเข้มข้นสูงกว่าเปรียบเทียบกับ ระดับการ clonazepam พบ ทั้ง 4-6 ซม. และส่วน ซม. 6-8 ของ V1 # ยังคงให้ผลบวกในขณะที่ผู้ V # 2 ให้ผลลบ

เพื่อปรับแต่งปรับรูป clonazepam ในผม ตัวอย่างผม V # 1 ได้ถูกตัดออกเป็นส่วนๆ ละ 0.5 ซม. ดังแสดงในรูป 6 การแบ่งส่วนพบปริมาณ clonazepam สูงขึ้น ที่ 0.5-1 ซม. ตามมาด้วย 1-1.5 ซม. สำหรับ 7-aminoclonazepam, ความเข้มข้นสูงพบได้ในส่วนที่สอดคล้องกับความยาว 0-0.5 และ 0.5-1 ซม.

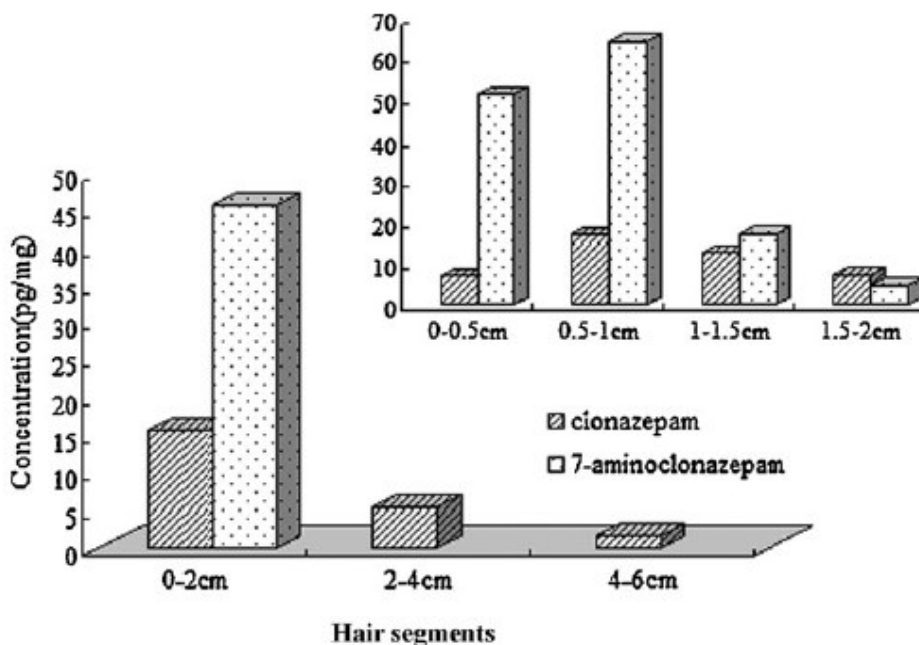


Fig. 6. Hair Segment Analysis of V#1.

4. อภิปรายผล

วิธี LC-MS/MS ถูกพัฒนาขึ้นพร้อมกันกับการตรวจวัด 18 benzodiazepines ในตัวอย่างเส้นผมสามารถขยายช่วงการตรวจในอาชญากรรมด้านยาเสพติด ซึ่งมีความไวสูง มันเป็นวิธีการทดสอบที่มีประโยชน์เพื่อยืนยันการติดตาม ปริมาณของ benzodiazepines ในเส้นผมหลังจากได้รับสารเพียงอย่างเดียว

Benzodiazepines เป็นยาที่พบบ่อยที่สุดในอาชญากรรมด้านยาเสพติด Triazolam เป็นที่นิยมมากที่สุดหลายปีที่ผ่านมาในประเทศจีนซึ่งนำไปสู่ปัญหาสังคมที่รุนแรง ดังนั้นในปี 2005 triazolam ได้รับการจดทะเบียนโดยสำนักงานอาหารและยา (SFDA) ให้อยู่ในระดับที่ 1 เป็นยาที่ส่งผลต่อการเจ็บป่วยทางจิต ซึ่งต้องได้รับการควบคุมเข้มงวดในการผลิตการขายและการบริโภค ในขณะที่คดีที่เกี่ยวข้องกับ triazolam ได้ลดลงอย่างมาก, benzodiazepines อื่น ๆ ได้ถูก

เข้ามาแทน Estazolam เป็นยาชนิด benzodiazepine ที่ใช้ส่วนใหญ่ในประเทศจีนในการรักษาอาการนอนไม่หลับ ซึ่งมีคุณสมบัติช่วยคลายกังวล, ยากันชัก, ยากล่อมประสาทและคลายกล้ามเนื้อ ดังแสดงในบางกรณีให้มีความเป็นไปได้มากกว่า nitrazepam หรือ diazepam ในที่สุดการศึกษา ใน estazolam มาจากประเทศในเอเชียมีรายงานน้อยกว่าจากประเทศตะวันตก

อาสาสมัคร 14 รายมีส่วนร่วมในการทดลอง estazolam ความรู้จากการศึกษานี้เป็นครั้งแรกเพื่อศึกษาการกระจายของ estazolam ในเส้นผมหลังได้รับสารเพียงอย่างเดียว การศึกษาก่อนหน้าเอกสารต่างๆของการตรวจสอบ zolpidem, zopiclone, bromazepam, clonazepam และ lorazepam ในผมและหลังจากได้รับสารเพียงอย่างเดียวจากอาสาสมัคร 2 หรือ 3 ราย Negrusz และคณะตรวจสอบ flunitrazepam และสารหลักที่ได้จากการสันดาป 7-aminoflunitrazepam ในเส้นผมเก็บจากอาสาสมัครสุขภาพดีสิบรายหลังจากที่ได้รับยา Rohypnol ขนาด 2 mg เพียงอย่างเดียว

ข้อมูลเกี่ยวกับปริมาณความหนาแน่นของสารที่เกี่ยวข้องกับความไวต่อปฏิกิริยาของวิธีการที่สามารถใช้ให้เกิดประโยชน์ในการแปลผลการวิเคราะห์ของเส้นผม กับ LOD 0.2 pg / mg และ LOQ 0.5 pg / mg วิธีของเราคือการแสดงเพื่อให้สามารถตรวจจับ estazolam 1 mg เพียงอย่างเดียวหลังจากหนึ่งเดือน

กลไกปฏิกิริยาของยาการรวมตัวกันในเส้นผมไม่ได้รับการทำให้เป็นที่ยอมรับ รูปแบบทั้งสามของการรวมตัวกันได้รับการเสนอ ยาเสพติดสามารถเข้าไปยังเส้นผมโดย (1) แพ้แบบ active หรือ passive จากกระแสเลือดโดยทางปมของเส้นผม (2) การแพร่จากเหงื่อและต่อมสารคัดหลั่งอื่น ๆ ที่เจริญเติบโตขึ้นหรือเส้นใยผมที่เจริญเติบโตเต็มที่ หรือ (3) ยาภายนอกจากไอหรือผงแพร่ไปยังเส้นใยผมที่เจริญเติบโตเต็มที่ แท้จริงการรวมกันของเส้นทางการเหล่านี้จะมีความเป็นไปได้มากที่สุด estazolam ไม่พบในการล้างด้วยไดคลอโรมีเทนในน้ำสุดท้าย ด้วยการทดสอบด้วยคำพูดและขั้นตอนการล้างเป็นปัจจัยการปนเปื้อนจากภายนอกในการศึกษาครั้งนี้

ยกเว้นสารปริมาณต่ำ ส่วนผม 2-4 ซม. ได้ถูกทดสอบว่าให้ผลบวกทั้งในการทดสอบควบคุมและกรณีการถูกทำร้ายทางเพศขณะเมาสุราและยาเสพติด เมื่อปริมาณสารเพิ่มขึ้น estazolam สามารถตรวจพบในบางกลุ่ม 4-6 ซม. มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในระหว่างที่ Kintz และคณะทำการหาผลการทดลอง แต่การทดลองผิดพลาดเช่นการเก็บรวบรวมและการตัดแบ่งเป็นส่วนๆในตัวอย่างเส้นผมจะเป็นปัจจัยอย่างหนึ่ง ผลการทดลองที่ได้ตามลำดับคือส่วนที่ตัดความยาว 0.5 cm ไปจนถึง 2 cm นอกจากนี้ยังมีการเพิ่มขึ้นของ clonazepam และความเข้มข้นของ 7-aminoclonazepam ที่สอดคล้องกันตามระยะเวลาอัตราการเจริญเติบโตของเส้นผมตามปกติ ดังนั้นเราจึงเชื่อว่าข้อมูลหลายส่วนที่นำเสนอข้างต้นเชื่อถือในทั้งหมด

ในกรณีการถูกทำร้ายทางเพศขณะเมาสุราและยาเสพติดของเราพบตัวอย่างเลือดที่ clonazepam ความเข้มข้นต่ำคือ 1.05 และ 0.22 ng / ml, ความเข้มข้นของ 7-aminoclonazepam มี 20.60 และ 15.34 ng / ml ตามลำดับเนื่องจากมีความล่าช้าไป 18 ชั่วโมง และความแตกต่างแต่ละบุคคลในการสันดาปอาหาร แม้ว่าปริมาณการให้ยายังไม่ทราบ มีอาการ เป็นพิษที่สำคัญสำหรับเหยื่อทั้งสอง พวกเขามีอาการโคม่าหลังจากดื่ม เช่นกรณีเมื่อ V # 1 ถูก นำไปยังสถานที่อยู่อาศัยโดยสงสัยว่าขาข้างหนึ่งของเธอถูกเผลออย่างรุนแรงจากท่อของ รถจักรยานยนต์โดยไม่ทราบสาเหตุ ส่วนของเส้นผมของ V # 1 ความยาว 0-2 ซม. ให้ผลเป็นบวก ของ clonazepam ที่ระดับ 15.47 pg / mg และ 7-aminoclonazepam ที่ระดับ 45.30 pg / mg ในขณะที่เดียวกัน V # 2 อยู่ที่ระดับ 11.93 pg / mg สำหรับ clonazepam และ 33.47 pg / mg สำหรับ 7 - aminoclonazepam สาร clonazepam ทั้งสองสามารถตรวจพบในงานวิจัย Che`ze และคณะรายงานการไวต่อการเกิดปฏิกิริยาโดยใช้ LC-MS/MS ที่สำคัญด้วย LOD 0.5 pg / mg สำหรับ clonazepam และ 1 pg / mg สำหรับ 7-aminoclonazepam หลังจากได้รับ clonazepam 2 mg เพียงอย่างเดียว , 7- aminoclonazepam ถูกนำเสนอในผมผมที่ 22 pg / mg ในส่วนแรก 1 ซม. ในขณะที่ clonazepam ไม่ถูกตรวจพบ วิธีนี้ใช้ได้ในการที่นิติเวชหนึ่งที่พบ เฉพาะ 7- aminoclonazepam ที่ปริมาณอย่างน้อย 3.2 pg / mg ในผมส่วน axillary 4 เดือน ต่อมา ผลแตกต่างกันอาจขึ้นอยู่กับความแตกต่างของแต่ละบุคคลในปริมาณความเข้มข้นเลือด, อัตราการรวมตัวกันของยา, สีผม, สภาพด้านกายภาพของผม, อายุ, เพศ, น้ำหนัก เป็นต้น

คำอธิบายสำหรับการขยายวงของผมที่ให้ผลบวกจากปริมาณหนึ่งก็คือว่ายาเสพติดและ สารที่รวมอยู่ในตัวของผมในระหว่างเส้นผมผ่านโดยการแพร่จากเหงื่อหรือสารหลังอื่น ๆ Henderson และคณะรายงานว่า deuterated โคเคนถูกพบในหลายส่วนหลังจากได้รับสารเพียง อย่างเดียว รวมทั้งเหงื่อหรือสารคัดหลังอื่น ๆ เป็นเส้นทางสำหรับการสะสมยาในเส้นผม Raul และ คณะเสนอว่า cortisol และ cortisone รวมตัวกันไปยังเส้นผมไม่ผ่านกระแสเลือด แต่ส่วนใหญ่ผ่าน การแพร่จากเหงื่อ ผู้ที่กำยาล่าช้าและผู้ที่มีความเสียหายได้รับการประเมินการรวมตัวกันของโคเคน, flunitrazepam และนิโคตินและแสดงให้เห็นสะสมของยาเสพติดเล็กน้อยไปยังเส้นผมจากต่อม เหงื่อ Negrusz และคณะพบว่า 7- aminoflunitrazepam ถูกตรวจพบ 24 ชั่วโมงหลังการได้รับ flunitrazepam และยังคงอยู่ในผมตลอดจนกระทั่ง 28 วันในระยะเวลาดำเนินการทดลอง (0.6-8.0 pg mg /) ของห้าในสิบของอาสาสมัคร แต่การศึกษาที่ใช้ NCI - MS ที่จริง Kintz และเพื่อนร่วมงานได้ พบกรณีดังกล่าว ในกรณีการถูกทำร้ายทางเพศขณะเมาสุราและยาเสพติดพวกเขาพบ bromazepam, เป้าหมายวิเคราะห์ในช่วง 2-7 pg / mg ในสี่ส่วนต่อเนื่องกัน' ซึ่งที่ได้รับ "การ เกิดขึ้นของสารเพียงชนิดเดียวซึ่งเป็นการยาก " พวกเขาถือว่าผลมันอาจเกิดจากการแพร่

เราหาความเข้มข้นของ 7-aminoclonazepam ที่มีนัยสำคัญสูงกว่า clonazepam ในผม หลังจากได้รับสารเพียงอย่างเดียวซึ่งสอดคล้องกับที่รายงานโดย Che`ze และคณะ Nakahara และคณะแสดงให้เห็นว่าที่ความเข้มข้นแตกต่างกันของยาในผมขึ้นอยู่กับคุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ และในกลุ่มทำงานของสาร อะมิโนแทนทีในส่วบนวงเบนซีนเพิ่มขึ้นในการรวมตัวกันของยาใน เส้นผมและแทนที่ไฮดรอกซีพบว่าผลที่ได้เป็นลบ

สรุปงานวิจัยทั้งหมดคนจีนที่มีผมสีดำ การได้รับ estazolam เพียงอย่างเดียว 1 mg สามารถตรวจพบในเส้นผมส่วน proximal (0-2 cm) มีความสัมพันธ์ที่ติระหว่างปริมาณและความเข้มข้นส่วนของเส้นผม 0-2 ซม. ในช่วงค่าความคลาดเคลื่อนที่แคบสำหรับอาสาสมัครที่ได้รับยาใน ปริมาณเดียวกัน จนกระทั่งกลไกของยาที่เกิดการรวมตัวกันเหล่านี้ไปยังผมจะเข้าใจดีขึ้นและ สาเหตุของการผันแปรระหว่างบุคคล มันจำเป็นที่จะต้องมีการชี้แจงจะต้องปฏิบัติมากขึ้นเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ผมในอาชญากรรมด้านยาเสพติด

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอขอบคุณมูลนิธิวิทยาศาสตร์ธรรมชาติแห่งชาติและสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์ แห่งชาติได้ให้การสนับสนุนทางการเงิน (No. 20975070 and No. GY0903)

อ้างอิง

- [1] Z.M. Guo, Review: drugs facilitated in robbery cases, Chin. Forensic Sci. Technol. 2 (2003) 44–45.
- [2] Z.L. Jiang, J.Y. Tan, L.J. Yao, Screening analysis of benzodiazepine medicines and selected metabolites in plasma and urine using gas chromatography with nitrogen phosphorus detection, J. Anal. Sci. 21 (2005) 639–642.
- [3] Y. Zhu, J.Y. Tan, Detection of benzodiazepines and the metabolites in urine using GC–MS, Guangdong Police Technol. 70 (2003) 21–25.
- [4] J.H. Xiong, Determination of triazolam in human urine by GC-uECD, Chin. J. Forensic Med. 21 (2006) 101–102.
- [5] M. LeBeau, W. Andollo, W.L. Hearn, et al., Recommendations for toxicological investigations of drug-facilitated sexual assaults, J. Forensic Sci. 44 (1999) 227– 230.
- [6] B. Marc, Current clinical aspects of drug-facilitated sexual assaults in sexually abused victims examined in a forensic emergency unit, Ther. Drug Monit. 30 (2008) 218–224.
- [7] H. Schloegl, S. Dresen, K. Spaczynski, M. Stoertzel, F.M. Wurst, W. Weinmann, Stability of ethyl glucuronide in urine, post-mortem tissue and blood samples, Int. J. Legal Med. 120 (2006) 83–88.
- [8] M. Pavlic, K. Libiseller, P. Grubwieser, H. Schubert, W. Rabl, Medicolegal aspects of tetrazepam metabolism, Int. J. Legal Med. 121 (2007) 169–174.
- [9] M. Villain, M. Che` ze, A. Tracqui, B. Ludes, P. Kintz, Windows of detection of zolpidem in urine and hair: application to two drug facilitated sexual assaults, Forensic Sci. Int. 143 (2004) 157–161.

- [10] J.P. Goulet, M. Cheze, G. Pepin, Determination of endogenous levels of GHB in human hair. Are there possibilities for the identification of GHB administration through hair analysis in cases of drug-facilitated sexual assault? *J. Anal. Toxicol.* 27 (2003) 574–580.
- [11] G. Frison, D. Favretto, L. Tedeschi, S.D. Ferrara, Detection of thiopental and pentobarbital in head and pubic hair in a case of drug-facilitated sexual assault, *Forensic Sci. Int.* 133 (2003) 171–174.
- [12] G. Pepin, M. Cheze, G. Duffort, F. Vayssette, Interest of hair and tandem mass spectrometry for chemical submission: about nine cases, *Toxicol. Anal.* 14 (2002) 395–406.
- [13] M. Cheze, M. Villain, G. Pepin, Determination of bromazepam, clonazepam and metabolites after a single intake in urine and hair by LC–MS/MS, application to forensic cases of drug facilitated crimes, *Forensic Sci. Int.* 145 (2004) 123–130.
- [14] P. Kintz, V. Cirimele, C. Jamey, B. Ludes, Testing for GHB in hair by GC/MS/MS after a single exposure: application to document sexual assault, *J. Forensic Sci.* 48 (2003) 195–200.
- [15] P. Kintz, M. Villain, M. Cheze, G. Pepin, Identification of alprazolam in hair in two cases of drug-facilitated incidents, *Forensic Sci. Int.* 153 (2005) 222–226.
- [16] M.P. Juhascik, A. Negrusz, D. Faugno, et al., An estimate of the proportion of drugfacilitation of sexual assault in four U.S. localities, *J. Forensic Sci.* 52 (2007) 1396–1400.
- [17] P. Kintz, Bioanalytical procedures for detection of chemical agents in hair in the case of drug-facilitated crimes, *Anal. Bioanal. Chem.* 388 (2007) 1467–1474.
- [18] M. Villain, M. Concheiro, V. Cirimele, P. Kintz, Screening method for benzodiazepines and hypnotics in hair at pg/mg level by liquid chromatography–mass spectrometry/mass spectrometry, *J. Chromatogr B: Analyt Technol. Biomed. Life Sci.* 825 (2005) 72–78.
- [19] M. Villain, M. Cheze, V. Dumestre, P. Kintz, Hair to document drug-facilitated crimes: four cases involving bromazepam, *J. Anal. Toxicol.* 28 (2004) 516–519.
- [20] M. Villain, M. Cheze, B. Ludes, P. Kintz, Testing for zopiclone in hair application to drug-facilitated crimes, *Forensic Sci. Int.* 145 (2004) 117–121.
- [21] M. Shen, P. Xiang, B.H. Shen, D. Ma, Screening for 132 drugs in blood by LC–MS/MS with multiple-reaction monitoring, *Chin. J. Forensic Sci.* 1 (2006) 14–20.
- [22] F. Peters, O. Drummer, F. Musshoff, Validation of new methods, *Forensic Sci. Int.* 165 (2007) 216–224.
- [23] B.K. Matuszewski, M.L. Constanzer, C.M. Chavez-Eng, Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC–MS/MS, *Anal. Chem.* 75 (2003) 3019–3030.
- [24] R.C. Irving, S.J. Dickson, The detection of sedatives in hair and nail samples using tandem LC–MS–MS, *Forensic Sci. Int.* 166 (2007) 58–67.
- [25] <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?sid=7847377> (accessed 29 Sep 2009).
- [26] B.H. Shen, M. Shen, X.Y. Zhuo, Screening of benzodiazepines and their metabolites in urine, *Fa Yi Xue Za Zhi* 18 (2002) 22–25.
- [27] Y. Harahap, L. Sasongko, B. Prasaja, et al., Comparative bioavailability of two estazolam tablet formulations in Indonesian healthy volunteers, *Arzneimittelforschung* 58 (2008) 501–504.
- [28] M. Nakamura, T. Ohmori, Y. Itoh, M. Terashita, K. Hirano, Simultaneous determination of benzodiazepines and their metabolites in human serum by liquid chromatography–tandem mass spectrometry using a high-resolution octadecyl silica column compatible with aqueous compounds, *Biomed. Chromatogr.* 23 (2009) 357–364.
- [29] P. Adamowicz, M. Kafa, Date-rape drugs scene in Poland, *Przegl Lek* 62 (2005) 572–575.

- [30] P. Kintz, M. Villain, V. Cirimele, G. Pe'pin, B. Ludes, Windows of detection of lorazepam in urine, oral fluid and hair, with a special focus on drug-facilitated crimes, *Forensic Sci. Int.* 145 (2004) 131–135.
- [31] A. Negrusz, C.M. Moore, K.B. Hinkel, et al., Deposition of 7-aminoflunitrazepam and flunitrazepam in hair after a single dose of Rohypnol, *J. Forensic Sci.* 46 (2001) 1143–1151.
- [32] F.B. Musshoff, B. Madea, New trends in hair analysis and scientific demands on validation and technical notes, *Forensic Sci. Int.* 165 (2007) 204–215.
- [33] P. Kintz, *Analytical and practical aspects of drug testing in hair* Taylor & Francis Group, LLC, 2007.
- [34] Y. Nakahara, K. Takahashi, R. Kikura, Hair analysis for drugs of abuse. X. Effect of physicochemical properties of drugs on the incorporation rates into hair, *Biol. Pharm. Bull.* 18 (1995) 1223–1227.
- [35] G.L. Henderson, M.R. Harkey, C. Zhou, R.T. Jones, P. Jacob, Incorporation of isotopically labeled cocaine into human hair: race as a factor, *J. Anal. Toxicol.* 22 (1998) 156–165.
- [36] P. Xiang, M. Shen, X.Y. Zhuo, Hair analysis for ketamine and its metabolites, *Forensic Sci. Int.* 162 (2006) 131–134.
- [37] R. Wennig, Potential problems with the interpretation of hair analysis results, *Forensic Sci. Int.* 107 (2000) 5–12.
- [38] E.J. Cone, Mechanisms of drug incorporation into hair, *Ther. Drug Monit.* 18 (1996) 438–443.
- [39] G.L. Henderson, M.R. Harkey, C. Zhou, R.T. Jones, P. Jacob, Incorporation of isotopically labeled cocaine and metabolites into human hair. 1. Dose–response relationships, *J. Anal. Toxicol.* 20 (1996) 1–12.
- [40] J.S. Raul, V. Cirimele, B. Ludes, P. Kintz, Detection of physiological concentrations of cortisol and cortisone in human hair, *Clin. Biochem.* 37 (2004) 1105–1111.
- [41] P.R. Stout, J.A. Ruth, Deposition of [3H] cocaine, [3H] nicotine, and [3H] flunitrazepam in mouse hair melanosomes after systemic administration, *Drug Metab. Dispos.* 27 (1999) 731–735.
- [42] Y. Nakahara, R. Hanajiri, Hair analysis for drugs of abuse XXI. Effect of parasubstituents on benzene ring of methamphetamine on drug incorporation into rat hair, *Life Sci.* 66 (2000) 563–574.