PG9701-0154 (97 頁)

研究計畫編號：DOH97-NNB-1011

科資中心編號：PG9701-0154

行政院衛生署管制藥品管理局

九十七年度委託科技研究計畫

建立 benzodiazepines 類(Nimetazepam, Nitrazepam, Flunitrazepam 及其代謝物)尿液檢體之 LC-MS, GC-MS 檢驗方法及相關性研究

研 究 報 告

執 行 機 構 ：臺北醫學大學

計畫主持人：李慶國

研 究 人 員 ：徐榮發、謝金霖、王光全

執 行 期 間 ：自 97 年 1 月 1 日至 97 年 12 月 31 日止

＊本研究報告僅供參考，不代表本局意見

目　錄

	頁碼
目錄	II
圖.....	II-IV
表 次	V
中文摘要	VI
Abstract	VII
壹、前言	1
貳、材料與方法	3
、結果	10
肆、討論	12
伍、結論與建議	13
陸、參考文獻	14
柒、附錄	16

圖 次

	頁碼
圖 1、2-amino-5-nitrobenzophenone	(27)
圖 2、2-amino-5-nitrobenzophenone 與 HFBA 衍生反應物	(29)
圖 3、Nimetazepam	(31)
圖 4、Flunitrazepam	(33)
圖 5、Flunitrazepam-D7	(35)
圖 6、7-aminoflunitrazepam	(37)
圖 7、7-aminoflunitrazepam-D7	(39)
圖 8、N-desmethylflunitrazepam	(41)
圖 9、N-desmethylflunitrazepam-D4	(43)
圖 10、Nitrazepam	(45)
圖 11、Benzodiazepines 類分析物 GC/MS-TIC 圖	(46)
圖 12、Flunitrazepam GC/MS-MRM 圖	(47)
圖 13、Flunitrazepam_D7 GC/MS-MRM 圖	(48)
圖 14、Nitrazepam GC/MS-MRM 圖	(49)
圖 15、Nimetazepam GC/MS-MRM 圖	(50)
圖 16、2-amino-5-nitrobenzophenone	(51)
圖 17、2-amino-5-nitrobenzophenone-HFBA	(52)
圖 18、7-aminoflunitrazepam GC/MS-MRM	(53)
圖 19、7-aminoflunitrazepam_D7 GC/MS-MRM 圖	(54)

圖 20、N-Desmethylflunitrazepam GC/MS-MRM 圖 (55)
圖 21、N-Desmethylflunitrazepam_D4 GC/MS-MRM 圖 (56)
圖 22、2-amino-5-nitrobenzophenone (57)
圖 23、Nimetazepam (58)
圖 24、Flunitrazepam (59)
圖 25、Flunitrazepam-D7 (60)
圖 26、7-aminoflunitrazepam (61)
圖 27、7-aminoflunitrazepam-D7 (62)
圖 28、N-desmethylflunitrazepam (63)
圖 29、N-desmethylflunitrazepam-D4 (64)
圖 30、Nitrazepm (65)
圖 31、Nitrazepm-D5 (66)
圖 32、7-aminonimetazepam (67)
圖 33、7-acetamidonitrazpam (68)
圖 34、Benzodiazpines 類分析物 HPLC-TIC 圖 (69)
圖 35、2-amino-5-benzophenone LC/MS-MRM 圖 (70)
圖 36 Nimetazepam LC/MS-MRM 圖 (71)
圖 37、Flunitrazepam LC/MS-MRM 圖 (72)

圖 38、Flunitrazepam-D7　LC/MS-MRM 圖　(73)

圖 39、7-aminoflunitrazepam　LC/MS-MRM 圖　(74)

圖 40、7-aminoflunitrazepam-D7　LC/MS-MRM 圖　(75)

圖 41、N-Desmethylflunitrazepam　LC/MS-MRM 圖　(76)

圖 42、N-Desmethylflunitrazepam-D4　LC/MS-MRM 圖　(77)

圖 43、Nitrazepam　LC/MS-MRM 圖　(78)

圖 44、Nitrazepam-D5　LC/MS-MRM 圖　(79)

圖 45、Nimetazepam 的可能代謝物　(80)

圖 46、7-aminonimetazepam 的生成變化　(81)

圖 47、7-acetamidoni 和 nimetazepam, nitrazepam 的時間變化　(81)

圖 48、 0 Hr, 0.5 Hr 尿液代謝　(82)

圖 49、1 Hr, 1.5 Hr 尿液代謝　(83)

圖 50、2 Hr, 2.5 Hr 尿液代謝　(84)

圖 51、 3 Hr, 4 Hr 尿液代謝　(85)

圖 52、 5 Hr, 6 Hr 尿液代謝　(86)

圖 53、12 Hr, 24 Hr 尿液代謝　(87)

圖 54、 48 Hr 尿液代謝　(88)

圖 55、7-aminonimetazepam 的 ^{1}H-NMR data　(89)

表 次

頁碼

表一、Benzodiazepines 類濫用藥物分析物品項 (16)

表二、Benzodiazepines 類濫用藥物純品及其同位素 LC-MS/MS 相關參數 (17)

表三、Benzodiazepines類濫用藥物GC/MS質譜分析條件 (MRM離子)未衍生 (18)

表四、Benzodiazepines類濫用藥物LC-MS/MS質譜分析條件 (MRM離子) (19)

表五、GC-MS 分析物的 tR(SD)、LOQ、LOD (ng/mL)、線性係數及回收率 (20)

表六、LC-MS 分析物的 tR(SD)、LOQ 、LOD (ng/mL)、線性係數 及回收率 (21)

表七:人之尿液定時採尿的 Nimetazepam 代謝變化情形 (22)

中文摘要

關鍵字：一粒眠;液相層析串聯質譜;氣相層析串聯質譜; 濫用藥物

常見濫用藥物被併用 (例如:搖頭丸及 Nimetazepam 併用，搖頭丸、K他命、Nimetazepam 及 Estazolam 併用中的一粒眠 Nimetazepam 及類似物 Nitrazepam 和 Flunitrazepam 的代謝物尿液檢體之 LC-MS/MS 及 GC-MS 檢驗方法開發與此兩種分析儀器比較評估，由檢驗之角度觀之，不同化學結構之藥品成分，由尿中均可檢出個別藥物成分及其相對之代謝物，不會產生相互干擾之現象，此類藥物在尿液中量微，定出實際於鑑定時的指標代謝物，增加實際運用之可信度。另評估 LC-MS/MS 對此類藥物及其代謝物鑑定結果與目前濫用藥物尿液鑑定常用的 GC/MS 法間之差異及關連性。如此，利用液相層析串聯質譜儀高感度不須衍生之特性，於濫用藥物尿液之廣篩，對於部分搖頭族採尿檢驗時之 MDMA 成分鑑定之外，一併鑑定 Nimetazepam，另對性侵害尿液藥物鑑定建立標準可信的分析方法，可以節省鑑定單位之鑑定時間及成本。

Abstract

keyword：Nimetazepam, LC-MS/MS, GC-MS, Abuse drugs

Nimdetazepam has been used along with other abused drugs including Ecstasy "shake-head pill", Ketamine and estazolam.

In this study, we use both LC-MS/MS and GC-MS instruments to establish the elucidation of Nimetazepam and its analogus Nitrazepam and Flunitrazepam, against their urine samples in order to provide a protocol of forensic as well as medical identification. According to the observation, we noted that LC-MS/MS performs the illucidation in a much better outcome than that of GC-MS, a traditional identification instrument, because LC-MS/MS could resolve the starting drug and its metabolites in the urine.

壹、前言

國內毒品之分類依其成癮性、濫用性及對社會危害性可分為4級，規範於毒品危害防制條例，其中，第1級毒品共計9項，第2級毒品共計169項，第3級毒品共計20項，第4級毒品包含毒品先趨原料藥等共計76項，該條例所規範的毒品項目總計274項，而且隨著新興毒品的不斷被查緝，使得管制的毒品總數不斷增加。配合毒品危害防制條例的執行，偵審機關於查獲可疑毒品時，首要的任務即進行成分之鑑驗，包含毒品成分之鑑驗及嫌疑人尿液檢體之毒品成分鑑驗，提供法院以作出正確的判決並將吸毒者進行毒品勒戒。因此，鑑驗結果對於人權之影響性甚大，故鑑驗結果之正確性是十分重要的基本要求。

在毒品成品鑑驗方面，國內各鑑驗機關所使用之分析儀器大都以氣相層析質譜儀(GC/MS)為主要鑑驗工具，藉由汽化物質後以層析管柱進行分離，再以質譜儀為偵檢器，最常選用電子撞擊游離方式得到具特異碎裂之質譜，以作為毒品結構之特徵質譜圖，進而和標準品進行滯留時間及碎裂質譜之比對，以確認毒品結構。然而，氣相層析質譜儀的缺點是，即必須藉由加熱分析物質以達汽化的效果，而對於熱不穩定而言，很容易在加熱的過程中發生化學反應。而經質譜儀檢測出的結果已成為反應後之結構，

並非毒品之原先結構，或是產生鑑驗結果之誤認情形; 對於難氣化的物質則會產生偵測困難。如 2 級毒品安非它命類毒品以及伽瑪羥基丁酸（Gamma Hydroxybutyric Acid、Gammahydroxybutyrate、GHB）等，經氣相層析質譜儀分析結果會檢出熱化學反應之產物，干擾鑑定結果(1,2)，通常在管柱前先衍生化來改善；另氣相層電子撞擊式離子化效率低，只能以化學游離式離子源或提高檢品濃度來改善。因此，液相層析質譜儀之應用於軟游離條件下之操作，具化學游離式氣相層析高離子化效率優點，即顯示出液相層析質譜對毒品結構多樣性鑑驗之重要，可避免因劇烈游離條件而導致干擾誤判之情形發生。而使用液相層析串聯質譜儀(LC-MS/MS)更可提供更具特異性離子以鑑別毒品結構。另外，毒品尿液之鑑驗以液相層析串聯質譜儀(LC-MS/MS)分析已逐漸形成趨勢，可避免以氣相層析質譜儀(GC/MS)分析時所需的繁雜衍生化反應，檢體經酵素分解 conjugate 型態藥物後，直接以固相萃取之前處理後即可進行液相層析分離再以串聯質譜篩選特徵離子以達成快速篩選毒品之目的。

濫用藥物尿液鑑定，依據現行法規以免疫法進行篩檢，氣相層析質譜進行確認。無氣相層析質譜確認鑑定方法者，可以液相層析質譜法及其它適當方法進行鑑定，目前具氣相層析質譜法鑑定者有嗎啡類、安非他命類、大麻、愷他命等。這些氣相層析質譜方法可以很精確的獲得鑑定結果，但

由於各類毒品之前處理方法均不相同，無法同時進行鑑定，以進行濫用藥物尿液鑑定者而言，目前篩檢藥劑分析項目有限，若以傳統氣相層析質譜，進行多種管制藥物鑑定，要花費國家相當多的驗尿費用，因此，本研究嘗試建立 Benzodiazepines 類(Nimetazepam,Nitrazepam,Flunitrazepam 及其代謝物)尿液檢體之 LC-MS,GC-MS 檢驗方法及其相關性研究，評估 LC-MS 替代方法取代 GC-MS 之可行性。

貳、材料與方法

I. Benzodiazepines 類濫用藥用純品及其同位素之質譜資料建立

購得濫用藥用純品及其同位素 Flunitrazepam , Flunitrazepam-D7, 7-aminoflunitrazepam, 7-aminoflunitrazepam-D7, N-desmethylflunitrazepam, N-desmethylflunitrazepam-D4, Nitrazepam, Nitrazepam-D5 (購置於 Cerilliant 公司), 2-amino-5-nitrobenzophenone (購置於 Sigma 公司) , Nimetazepam (購置於印度 Lake 公司) (如表 1 所列),另外將 2-amino-5-nitrobenzehpone 進行 HFBA 衍生物，各別配成標準溶液後再使用 Finnigan MAT GCQ 型的 GC-MS 以 EI 的游離方法，建立 Benzodiazepines 類濫用藥用純品及其同位素之 GC-MS 質譜資料(圖 1-10)，另外，將以上購得濫用藥用純品及其同位素 Flunitrazepam , Flunitrazepam-D7, 7-aminoflunitrazepam, 7-aminoflunitrazepam-D7, N-desmethylflunitrazepam,

N-desmethylflunitrazepam-D4, Nitrazepam, Nitrazepam-D5, 2-amino-5-nitrobenzophenone, Nimetazepam，及利用化學反應將 Nimetazepam 還原成 7-aminonimetazepam ，再進行乙醯化反應,合成出 7-acetamidonitrazepam，個別使用美商應用生命公司的 API 4000Q 型 LC-MS/MS triple quadrupole mass spectrometer，以 ESI 的游離方法，利用 postive 模式尋找最恰當的 pseudomolecular ion 訊息。每個 pseudomolecular ion 使用 product ion scan (PIS)方法，利用 collision-induced dissociation (CID) 得到母-子對(a parent-daughter ion pair)，將顯著且有意義的母-子對選擇做為定量的依據，其他的母-子對做為定性的參考，此步驟中每個純品的所有實驗參數(包括 declustering potential, focus potential, curtain gas, collision gas 等)均不同，依化合物狀態不同而調整成最佳狀態。

II. Benzodiazepines 類(Nimetazepam,Nitrazepam,Flunitrazepam 及其代謝物)混合溶液之 LC-MS,GC-MS 檢驗方法及其相關性研究

由之前建立的 Benzodiazepines 類濫用藥用純品及其同位素的 GC-MS 及 LC-MS 的 MS 資料，然後將 Benzodiazepines 類濫用藥用純品及其同位素進行混合後，進行 LC-MS, GC-MS 的分離及條件評估。

對於 GC-MS 實驗，使用 HP-5MS 毛細管管柱進行分析，Data range from 50~650 (m/z), The temperature of GC injector: 280°C, The program of GC oven:

150°C hold 3 mins,先以 35°C/min 昇溫到 250°C, 250°C hold 4 mins, 再以 30°C /min 昇溫到 300°C, 最後 300°C hold 3 mins.，得到不錯的層析質譜圖(圖 11)，進而進行 Benzodiazepines 類分析物的 GC/MS-TIC 分析 (圖 12-21) 及 MRM 實驗(表三)。

對於 LC-MS 實驗發現利用 Ammonium acetate (縮寫為 NH_4OAc)溶液 pH 調到 4.0 與 CH_3CN 梯度下會有較佳的分離效果，而每個純品的所有 MS 實驗參數(包括 declustering potential, focus potential, curtain gas, collision gas 等)先以之前已經建立好的 MS 條件參數(註一)下進行，經 MRM(註二)實驗(表四)(圖 34-44)後再修正各別之參數。(表二)

(註一) MS/MS 參數尋找之方法

各成分之 MS/MS 參數，取各成分之工作標準液濃度為 100ng/mL infuse 至 MS/MS，先找出成分之 Pseudomolecular ion，執行 PIS(Product Ion Scan) 找出各成份最顯著 2 個子離子，依據每成分之二 MRM 離子對，執行 MRM 實驗，調整包括 DP,CEP,CE,CXP 等離子路徑參數，使各離子感應至最大，記錄各參數如表一.

(註二) MRM techniques：

MRM technique was choosen for quantification and confirmation in this study. Two pairs of MRM ions of each analyte, the prominent two MRM ions were selected to have the accumulation of 4 IP (1 precursor and two daughters ions) in LC-MS^2 analysis. In the MRM of LC-MS, The most prominent MRM ion was chosen for quantification the other was for confirmation. There was the MRM

ion ratio of calibration standard, the ratio of the two MRM ions, had the ion ratio tolerances of ±30% in this study.

依據 SANCO rule,本實驗利用 MRM 技術，每個分子選定二組最顯著 MRM 離子對，來做定性及定量工作，利用標準品及內標準品添加至尿液配製成檢量線標準尿液樣本，經萃取處理後，注入 LC-MS/MS 中，以已知濃度為 X 軸，樣本中各成分最顯著之一組 MRM 與相對應內標準品 MRM 質譜圖面積比為 Y 軸，繪製檢量線，用以標定尿液毒品之濃度。每個分子選定二組最顯著 MRM 離子對比例為 ion tolerance。

LOQ 定義為檢量出之最低濃度，與已知濃度之誤差在±20 者。

LOD 定義為 MRM ion ratio tolerances 符合在 ±30% 之最低濃度。

線性範圍定義為各成分之 LOQ~500ng/mL。

III.選擇 Benzodiazepines 類濫用藥用純品及其同位素同時篩選的方法開發及其在尿中定量分析之評估

在實際採集受試者尿液中往往發現濫用藥物並不是僅有單一種，有時會有多種混合的例子，因此，開發同時偵測多種濫用藥物及尋找低極限值，更高靈敏度的方法是必須的，此部分的執行步驟如下：

執行步驟：

1.選定 Benzodiazepines 類濫用藥用純品及其同位素添加於 MeOH 或 CH_3CN 中進行 LC-MS 預備實驗。

每個純品的所有 MS 實驗參數(包括 declustering potential, focus potential, curtain gas, collision gas 等) 以先前已經建立好的 MS 條件參數進行，因為

結果受到純品間彼此的影響而稍為修正

2.選定 Benzodiazepines 類濫用藥用純品及其同位素添加於空白尿液中，進行 LC-MS 預備實驗。

A.選定適當的固相萃取管進行萃取 –經過參考過去的資料及嘗試發現

(a)萃取管柱: VARIAN 品牌：型號： SPEC®.DAU.3ML COLUMN 對於安非他命類及 Benzodiazepines 濫用藥物系統有不錯的結果，因此配置不同濃度的純品進行回收率及 LOQ 及 LOD 實驗

(b)萃取系統：Zymark 品牌：Rapid Trace SPE Workstation 是可以一次進行 10 個 sample 且是穩定及方便的萃取儀器，因此在同一條件下進行不同濃度樣品實驗**(註三)**

。

(註三:各樣品之配置方式)

利用標準品及內標準品添加至尿液配製成濃度為 LOQ~400ng/mL 之各檢量線標準尿液樣本，另外取不同批號之標準品及內標準品添加至尿液配製成濃度為 125 ng/mL 之品管尿液樣本，以及內標準品添加至尿液配製成之空白樣本，以及內標準品添加至真實尿液之真實尿液樣本。

	final conc. (ng/mL)	取樣 1 μg/mL (μL)	取樣 10 μg/mL (μL)	取樣 100 μg/mL (μL)	內標 10 μg/mL (μL)	final vol. (mL)
no.1	0.1	0.5			125	5
no.2	0.2	1			125	5
no.3	0.5	2.5			125	5
no.4	1	5	-	-	125	5
no.5	2	10	-	-	125	5
no.6	5	25	-	-	125	5
no.7	8	40	-	-	125	5
no.8	10	50	-	-	125	5
no.9	20	100	-	-	125	5
No.10	50	-	25	-	125	5
No.11	80	-	40	-	125	5
No.12	100	-	50	-	125	5
No.13	200	-	100	-	125	5
No.14	300	-	-	15	125	5
No.15	400	-	-	20	125	5

(C) SPE 萃取條件:

步驟	溶劑	溶液排至	每次萃取用量	處理流速
固相活化	甲醇	有機廢液桶	0.5 ml	2 mL/min
暫停		時間	1 min	
載入	濫用藥品	廢水桶	3 ml	2 mL/min
固相清洗	水	廢水桶	1 ml	2 mL/min
氮氣吹乾		時間	2 min	
收集	沖提液	試管	1 ml	2 mL/min
清洗管路	甲醇	取樣管	5 ml	30 mL/min

(D)氮氣吹乾器(Turbo Vap LV EVAPORATOR):在 35 ^{O}C 下,使用氮氣 20 分

鐘吹乾

(E)加入移動相溶劑 NH_4OAc, pH 4.0 到 1 ml

(F)經混合均勻後過濾、進入 LC-MS 實驗或冷藏待用

(G)HPLC 分析條件

使用的 HPLC RP-18 column: Phenomenex 公司 Synergy 150 × 2.1-mm Polar-RP column

The mobile phase was operated at a flow rate of 0.2 mL/min with NH_4OAc (pH 到 4.0) and acetonitrile in a program as below:

Mobile phase A：NH_4OAc solution調pH到4.0

Mobile phase B：CH_3CN

Flow rate : 0.2 mL/min

梯度分析條件:

Step	Total Time(min)	Flow Rate(μl/min)	GradientProfile	A (%)	B (%)
0	3.0	200.00	0.0	70.0	30.0
1	7.0	200.00	2.0	50.0	50.0
2	12.0	200.00	-2.0	30.0	70.0
3	15.0	200.00	0.0	30.0	70.0
4	20.0	200.00	0.0	15.0	85.0

3. 數據處理

選用前述質譜參數及液相層析條件進行 1.萃取回收率評估。2.建立各成分方法偵測極限。3.準確度及精密度等方法確效評估。

參、結果

選擇使用 Benzodiazepines 類濫用藥物進行添加於空白尿液中，進行 LC-MS 預備實驗，經過 HPLC 分離後的 MS 的 TIC 圖顯示在 15 分鍾內可以完成且主要訊號分佈於 10-12 分鐘(圖 34)。而以 GC-MS 進行預備實驗(非衍生化) ，經過 GC 分離後的 MS 的 TIC 圖顯示亦與 LC 時間類似在 15 分鍾內可以完成，且主要訊號分佈於 10-13 分鐘(圖 11)。

GC-MS 實驗，以化合物的同位素當成內標準（若沒有同位素則以相似結構當成內標準）進行在尿液中的 Benzodiazepines 類濫用藥品 LOQ 各項評估，結果得知我們依上述步驟及條件進行實驗，Benzodiazepines 類管制藥品在 GC-MS 未經衍生化反應，其 LOD 都比 LC-MS 高許多，而如果要增加其偵測極限必需進行衍生化反應(我們是利用 HFBA 當反應衍生劑)，但是只有含 NH2 官能基才可能進行此反應，因此我們以 Nimetazepam 的其中一個代謝物 2-amino-5-nitrobenzephenone 進行和 HFBA 的衍生反應，其 LOD 雖然由 30 ng/mL 降到 10 ng/mL，但是仍比使用 LC-MS/MS(LOD 0.5 ng/mL)高出許多，尚且因 Benzodiazepines 的代謝物中必需有 NH2 官能基才可能進行此反應，呈現的數據不足可以觀測 Benzodiazepines (Nimetazepam, Flunitrazepam)的代謝物全貌，與使用 LC-MS/MS 來比較是有許多的不足。

LC-MS 實驗，以化合物的同位素當成內標準（若沒有同位素則以相似結構當成內標準）進行在尿液中的 Benzodiazepines 類濫用藥品回收率、 LOQ 各項評估，結果得知我們依上述步驟及條件進行實驗，Benzodiazepines 類管制藥品 LOD 都可做到 0.05~0.2 ng/mL，LOQ 都可做到 0.2~2.0 ng/mL，而且有好的再現性，回收率多有 94 以上（表六），整體評估使用 LC-MS/MS 方法準確，且可一次對多種藥物定性及定量，而且其分析時間與 GC-MS 相當(可以更快)，故，相較來說，LC-MS 較 GC-MS 可以有較低的 LOD 等，亦會較容易及獲得更多相關代謝物資訊，可大幅節省驗尿費用等。

我們也進行真實的應用評估，定時間收集服用 nimetazepam 人的檢體之尿液進行真實的分析判斷，收集不同時間(0.5 hr, 1 Hr, 1.5 Hr, 2 Hr, 2.5 Hr, 3 Hr, 4 Hr, 5 Hr, 6 Hr, 12 hr, 24 Hr, 48 Hr)的檢體尿液，依照之前的處理方式進行此研究，其結果如表七所示。7-aminonimetazepam, 7-acetamidonitrazpam 經過服用 nimetazepam 後 1.5 小時後就逐漸增加，直到 48 小時時仍可以偵測到大的量，似乎可以提供檢調單位參考，7-aminonimetazepam 和 7-acetamidonitrazpam 可以用來判定是否使用一粒眠的判別參考，其代謝物與時間的變化於圖 46, 47 中呈現，而使用 LC-MS/MS 偵測 nimetazepam 不同時間代謝的產物變化如圖 48-54

* Nimetazepam 的文獻報導，其代謝物有如(圖 45)所列，此類成份除了 Nitrazepam 有標準品外，其餘皆無法獲得，我們委託本系吳教授合成少量 7-aminonimetazepam, 7-acetamidonitrazpam 提供我們建立相關實驗資料

肆、討論

不到一年的時間，又通過管管局的申請向國外購買 Nimetrazepam 等待過程，經過近 5 個月的時間耽延，因此，進行此計劃是非常非常的緊張、匆忙及相關研究人員努力及動用許多學生下才完成。

1.我們已經建立了以 API 4000Q 型 triple quadrupole mass spectrometer，ESI 的游離方法，及 GCQ-MS　EI 游離方法對於 Benzodiazepines 類濫用藥物的資料庫，及 LC-MS/MS 母-子對(a parent-daughter ion pair) 的最佳化參數條件，並且利用 GC-MS 將 Benzodiazepines 類未經衍生化的濫用藥物進行 EI-MS 資料庫的建檔及探討 LOD 等; 建立了利用 postive 模式尋找最恰當的管制藥品的 Benzodiazepines pseudomolecular ion 訊息及 MS 資料，雖然每一總機型的機器對於最佳化參數條件會有所不同，但是對於相同機型的檢驗單位卻會是不錯的參考價值。

2. 選定 Benzodiazepines 類濫用藥用純品同時篩選的方法開發及其在尿中定量分析之評估實驗、利用合成的技術將進行結構修飾，是目前是此計

劃中最具有挑戰性的部份，除了要先將 HPLC 較佳分離的系統得到，SPE 管柱的種類選擇及萃取條件的嘗試都需要有經驗及技術的人員來執行才可能於期限內完成。而且，從合成的技術得到的 benzodiazepines 類多種代謝物，可以更詳細提供此類濫用藥在生物體代謝狀況及同時在尿中偵測多種濫用藥品(代謝物)之可行性及定量分析之評估的。

3. 由人體尿液代謝的初步結果可知，7-aminonimetazepam, 7-acetamidonitrazpam 是可以判定是否使用一粒眠的判別參考，其純品的取得是很重要，而目前 Nimetazepam 相關的代謝物 7-aminonimetazepam, 7-acetamidonitrazpam 都無法或得此純品(我們是請吳建德教授協助合成及少量成品)，目前我們開始純化 7-aminonimetazepam，由其 1H-NMR data (圖 55)，似乎提供我們其一些純度及結構訊息是正向的結果。而另外的其它代謝物 3-OH- Nimetazepam, 3-OGlc- Nimetazepam 我們尚未合成出來，其對於在人體中的 Nimetazepam 代謝是否很重要亦值得往後研究。

4. Nimetazepam屬管制藥品，此藥物在北部各大醫院已經很少被使用（此部份商請本校附設醫院及相關萬芳醫院查詢），因此，人體實驗部分很難找到適當個體數，又因為收集尿液很密集，代謝實驗收集樣本時間較長，志願者難以尋找，找到能夠配合的更不容易，因此，這幾個月來，到目

前為止，只有一位進行此部份Nimetazepam在人之尿液代謝變化的研究，故，實驗樣本數目到現在只有一位，故在研究報告中沒有統計方法論述。另外，我們進行的LC/MS方法已經確認,而標準品尚未齊備(3-OH-Nimetazepam)，俟吳老師合成完成後，配合取得人體實驗樣本，可得更完整之實驗結果。

伍、結論與建議

結論:

1. 本研究計畫目前完成 Benzodiazepines 類的管制藥品的 MS 及其子離子峰的最佳化參數條件，建立了濫用藥物之質譜資料庫(EI, ESI)，能夠提供相關鑑定單位快速及有效進行篩檢。並且亦初部進行 Benzodiazepines 類(含同位素)的空白尿液中快速檢驗方法建立篩選之方法開發與篩檢分析及定量分析之評估
2. 亦完成人體尿液對於不同時間下的 Nimetazepam 代謝物的相關研究，能夠同時且快速篩選 Benzodiazepines 類濫用藥物及代謝物尿液之鑑定，此成果可解決部份多重濫用藥物併用的檢測困難，並且，節省國家相關鑑定單位之鑑定時間及成本。

3. 相較 GC-MS 和 LC-MS 對於此 Benzodiazepines 類濫用藥物及代謝物的研究，LC-MS 方法較傳統 GC-MS 高靈敏、快速、不需衍生及方便等優點，

建議:從目前的研究結果， LC-MS 方法較傳統 GC-MS 高靈敏、快速、不需衍生物等優點，對於濫用藥物的快速檢測是一種有強大功能的工具，值得再繼續對所有相關濫用藥物進行詳細研究。

陸、參考文獻

(1). Yanagi Y., Haga F., Endo M., Kitagawa S., *Xenobiotica.* **1975**, *4*, 245.

(2). Yanagi Y., Haga F., Endo M., Kitagawa S., *Xenobiotica.* **1976**, *6*, 101

(3). Elian A. A., *Forensic Sci Int.* **2001**,*122*, 43.

(4). .Eliand M., Gattabeni F., *J. Neurochem.* **1983**, *41*, 524.

(5). Kratzsch C. , Tenberken O., Peters F. T., Weber AA, Kraemer T., Maurer H. H. *J. Mass Spectrom.* **2004**, *39*, 856.

(6). Kintz P., Villain M., Concheiro M., Cirimele V., *Forensic Sci. Int.*, **2005**, *150*, 213.

(7). Ahrens B., Schwandt H. J., Schütz H., *Arzneimittelforschung.* **2000**, *50*, 1057.

(8). Dussy F. E., Hamberg C., Briellmann T. A., Int. *J. Legal. Med.* **2006**, *120*, 323.

(9). Villain M., Concheiro M., Cirimele V., Kintz P., *J. Chromatogr B.* **2005**, *825*, 72.

(10). Maurer H., Pfleger K., *J Chromatogr.* **1987**, *422*, 85.

(11). Huang W., Moody D. E., *J. Anal. Toxicol.* **1995**, *19*, 333.

(12). Moriya F., Hashimoto Y., *Forensic Sci. Int.* **2003**, *131*, 108.

(13). Elian A. A. *Forensic Sci. Int.* **1999**, *101*, 107.

柒、附錄

表一: Benzodiazepines 類濫用藥物純品及其同位素分析物品項

1	2-amino-5-nitrobenzophenone
2	Nimetazepam
3	Flunitrazepam
4	Flunitrazepam-D7
5	7-aminoflunitrazepam
6	7-aminoflunitrazepam-D7
7	N-desmethylflunitrazepam
8	N-desmethylflunitrazepam-D4
9	Nitrazepam
10	Nitrazepam-D5

表二: Benzodiazepines 類濫用藥物純品及其同位素 LC-MS/MS 相關參數

Name	DP	CE	CXP
2-amino-5-nitrobenzophenone	92	30	14
Nimetazepam	103	40	14
Flunitrazepam	94	39	5
Flunitrazepam-D7	100	38	14
7-aminoflunitrazepam	94	30	14
7-aminoflunitrazepam-D7	96	30	9
N-desmethylflunitrazepam	90	48	14
N-desmethylflunitrazepam-D4	96	40	14
Nitrazepam	98	40	14
Nitrazepam-D5	98	40	14

表三: Benzodiazepines類濫用藥物GC/MS質譜分析條件(MRM離子)—未衍生

Ananlyte	Name	Q1/Q3
1	Flunitrazepam	312/286,266,239
2	Nimetazepam	294/268,248,221
3	Nitrazepam	280/264,253,234,206
4	2-amino-5-nitrobenzophenone	241/225,195,167

表四: Benzodiazepines類濫用藥物LC-MS/MS質譜分析條件(MRM離子)

Internal standard	Name	Q1/Q3
1	Flunitrazepam-D7	321.3/293.3, 275.3, 246.3
2	7-aminoflunitrazepam-D7	291.2/138.2, 263.4, 231.3
3	N-desmethylflunitrazepam-D4	304.5/258.5, 229.0, 202.1
4	Nitrazepam-D5	287.3/241.3, 185.2, 213.2

Ananlyte	Name	Internal standard	Q1/Q3
1	2-amino-5-nitrobenzophenone	7-aminoflunitrazepam-D7	243.3/226.2, 196.2, 165.2
2	Nimetazepam	Flunitrazepam-D7	296.3/250.3, 221.2, 193.2
3	Flunitrazepam	Flunitrazepam-D7	314.4/268.3, 286.3, 240.3
4	7-aminoflunitrazepam	7-aminoflunitrazepam-D7	284.2/135.3, 227.3, 256.4
5	N-desmethylflunitrazepam	N-desmethylflunitrazepam-D4	300.4/254.3, 225.3, 198.2
6	Nitrazepam	Nitrazepam-D5	282.3/236.3, 207.3, 180.2

表五: GC-MS 分析物的tR(SD)、LOQ 、LOD (ng/mL)、線性係數及回收率

	tR(min), sd(%)	LOQ ng/mL	LOD ng/mL	Linearity r	Recovery （200ng/mL） (Mean ± sd ,%)	
					Interday （P value）	Intraday
2-amino-5-nitrobenzophenone	10.18, 0.01	60	30	0.9991	>0.05	106±5.05
2-amino-5-nitrobenzophenone-HFBA	8.02, 0.01	40	10	0.9996	>0.05	102±2.04
Nimetazepam	12.16, 0.01	120	50	0.9990	>0.05	98.8±1.79
Flunitrazepam	11.50, 0.01	100	30	0.9984	>0.05	101±1.02
Flunitrazepam-D7	11.50					
7-aminoflunitrazepam	12.03, 0.01	120	40	0.9971	>0.05	99.5±3.11
7-aminoflunitrazepam-D7	12.01, 0.01					
N-desmethylflunitrazepam	12.26, 0.01	150	50	0.9989	>0.05	104±3.68
N-desmethylflunitrazepam-D4	12.25, 0.01					
Nitrazepam	12.53, 0.01	80	30	0.9982	>0.05	99.0±2.53
Nitrazepam-D5	12.54,0.01					

表六: LC-MS分析物的tR(SD)、LOQ 、LOD (ng/mL)、線性係數 及回收率

	tR(min),sd(%)	LOQ ng/mL	LOD ng/mL	Linearity r	Recovery（50 ng/mL） (Mean ± sd ,%)	
					Interday （P value）	Intraday
2-amino-5-nitrobenzophenone	13.55, 0.01	2.0 ng/mL	0.5 ng/mL	0.9998	>0.05	97.5 ±4.69
Nimetazepam	12.29, 0.01	0.5 ng/mL	0.1 ng/mL	0.9953	>0.05	111 ±1.33
Flunitrazepam	12.0, 0.00	0.2 ng/mL	0.1 ng/mL	0.9983	>0.05	111 ±2.37
Flunitrazepam-D7						
7-aminoflunitrazepam	6.81, 0.01	1.0 ng/mL	0.2 ng/mL	0.9998	>0.05	94.7 ±1.85
7-aminoflunitrazepam-D7						
N-desmethylflunitrazepam	9.92, 0.01	1.0 ng/mL	0.2 ng/mL	0.9998	>0.05	108 ±1.65
N-desmethylflunitrazepam-D4						
Nitrazepam	10.22, 0.01	0.2 ng/mL	0.05 ng/mL	0.9994	>0.05	105 ±1.30
Nitrazepam-D5						

表七:人之尿液定時採尿的 Nimetazepam 代謝變化情形

Hr \ cpd	7-acetamidonitrazpam (ng/mL)	7-aminonimetazepam (ng/mL)	Nitrazepam (ng/mL)	Nimetazepam (ng/mL)
1	0.23	1.84	ND	12.8
1.5	0.76	4.58	ND	3.98
2	1.42	14.1	0.87	3.12
2.5	4.23	139	3.13	8.94
3	2.09	57.0	0.96	5.54
4	4.44	52.2	1.48	2.48
5	3.97	21.6	0.71	1.17
6	3.46	85.6	1.27	2.87
12	3.98	147	1.50	3.05
24	2.65	46.6	0.94	2.12
48	2.94	136	1.93	2.57

97 年度計畫執行成果報告表

（本資料須另附乙份於成果報告中）

計畫名稱	建立 Benzodiazepines 類(Nimetazepam,Nitrazepam,Flunitrazepam 及其代謝物)尿液檢體之 LC-MS,GC-MS 檢驗方法及其相關性研究		
計畫編號	DOH97-NNB-1011	填寫日期	97.11.12
執行機構	台北醫學大學	計畫主持人	李慶國
計畫期程	☑一年期計畫 ； □多年期計畫，共___年，本年度為第___年		
原計畫書擬達成目標	**A.進行** benzodiazepines 類(Nimetazepam, Nitrazepam, Flunitrazepam 及其代謝物)尿液檢體之 LC-MS, GC-MS **資料之建立** **B.** Nimetazepam, Nitrazepam, Flunitrazepam 及其代謝物同時篩選的方法開發及其在尿液中定量分析之評估		
已達成目標及其他成果	A.已經進行 benzodiazepines 類(Nimetazepam, Nitrazepam, Flu**nitrazepam** 及其代謝物)尿液檢體之 LC-MS, GC-MS 資料之建立 (benzodiazepines 類衍生物之 GC-MS 資料正在建立中) **B.** Nimetazepam, Nitrazepam, Flunitrazepam 及其代謝物同時篩選的方法開發及其在空白尿液中定性分析之評估已完成		

97 年度計畫重要研究成果及對本局之具體建議

（本資料須另附乙份於成果報告中）

計畫編號：	DOH97-NNB-1011		
計畫名稱：	建立 Benzodiazepines 類(Nimetazepam,Nitrazepam,Flunitrazepam 及其代謝物)尿液檢體之 LC-MS,GC-MS 檢驗方法及其相關性研究		
計畫主持人：	李慶國	執行單位：	台北醫學大學

1.本計畫之新發現或新發明

我們利用 LC-MS/MS 偵測在尿中 Benzodiazpines 藥品之可行性及定量分析之評估，由初步的結果看來是可行的且靈敏度亦不錯，因此，可以考慮 Benzodiazpines 藥品此使用 LC-MS/MS 來進行檢測。

**2-amino-5-nitrobenzophenone 在 LC-MS/MS 使用 ESI mode 靈敏度很差，

2.本計畫對民眾具教育宣導之成果

3.本計畫對醫藥衛生政策之具體建議

查緝濫用藥品的首要的任務即是進行成分之鑑驗，包含毒品成分之鑑驗及嫌疑人尿液檢體之毒品成分鑑驗，提供法院以作出正確的判決，故鑑驗結果之正確性是十分重要的基本要求。而鑑驗方面，大都以氣相層析質譜儀(GC/MS)為主要工具，然而，GC 必須藉由加熱分析物質以達汽化的效果，而對於熱不穩定的物質或高沸點物質必須依賴衍生化等方法，而使用

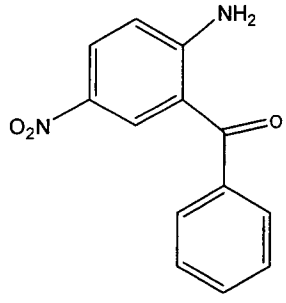
液相層析串聯質譜儀(LC-MS/MS)可提供具特異性離子以鑑別毒品結構。另外，直接以固相萃取之前處理後即可進行液相層析分離再以串聯質譜篩選特徵離子以達成快速篩選毒品之目的。

今年，我們嘗試同時在尿中偵測多種 Benzodiazepines 類(Nimetazepam, Nitrazepam,Flunitrazepam 及其代謝物)濫用藥品之可行性及定量分析之評估，由目前初步的結果看來 LC-MS/MS 是可行的且靈敏度亦勝過未衍生的 Benzodiazepines 類(除了 2-amino-5-nitrobenzophenone 對於 LC-MS/MS ESI mode 不好)。如此，對於目前查緝吸食用混合數種濫用藥品的案例可以迅速且正確的解決。

標準品 Mass Data Library (GC-MS 部份)

Compound 1

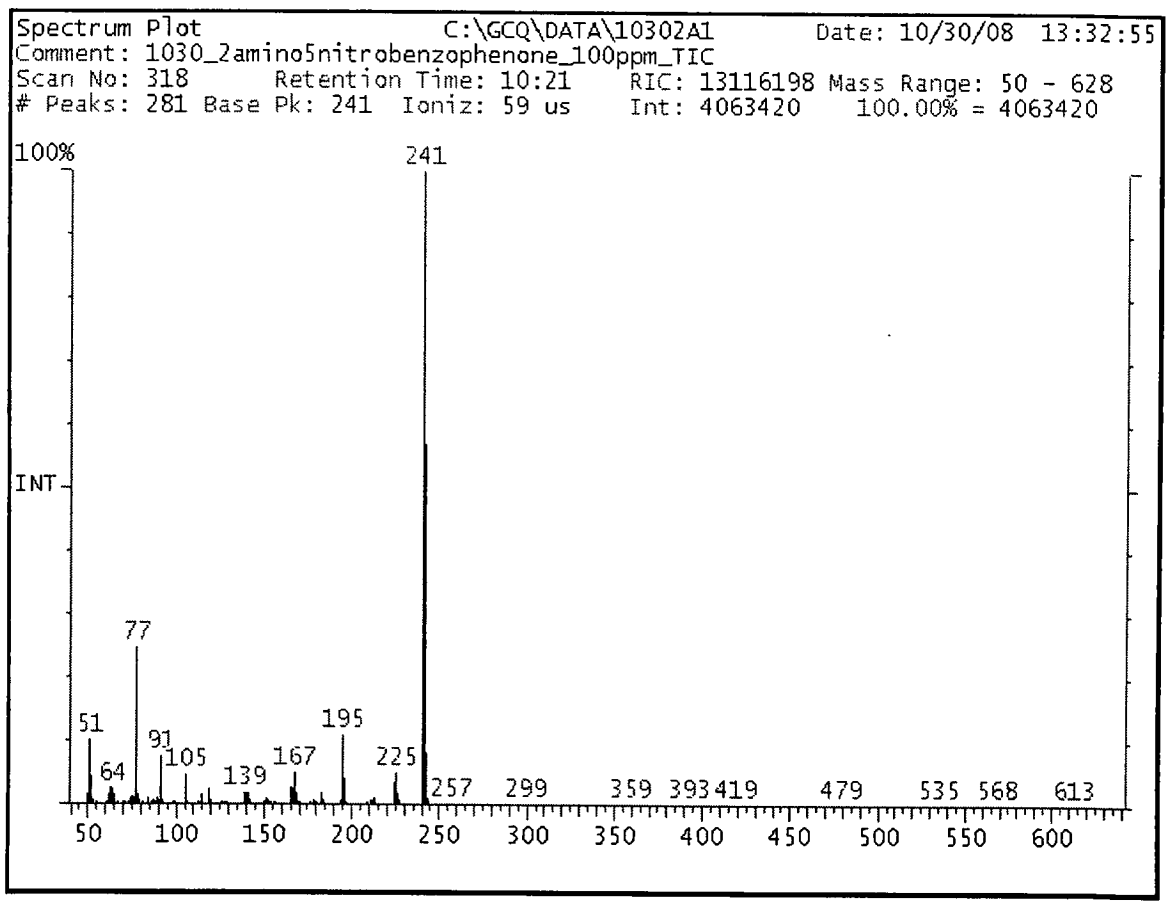
2-amino-5-nitrobenzophenone
C13H10N2O3
Mol. wt 242.0691



GC-MS PIS(+) data
pseudoMass1 241 (100%)

mass fragments 225 (5.01%)、195 (11.03%)、167 (5.09%)

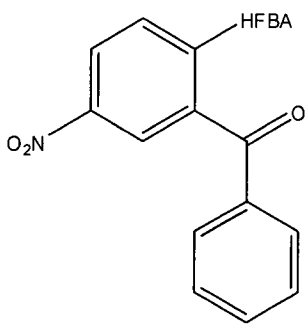
圖 1、2-amino-5-nitrobenzophenone



Compound 2

2-amino-5-nitrobenzophenone 與 HFBA 衍生化反應物

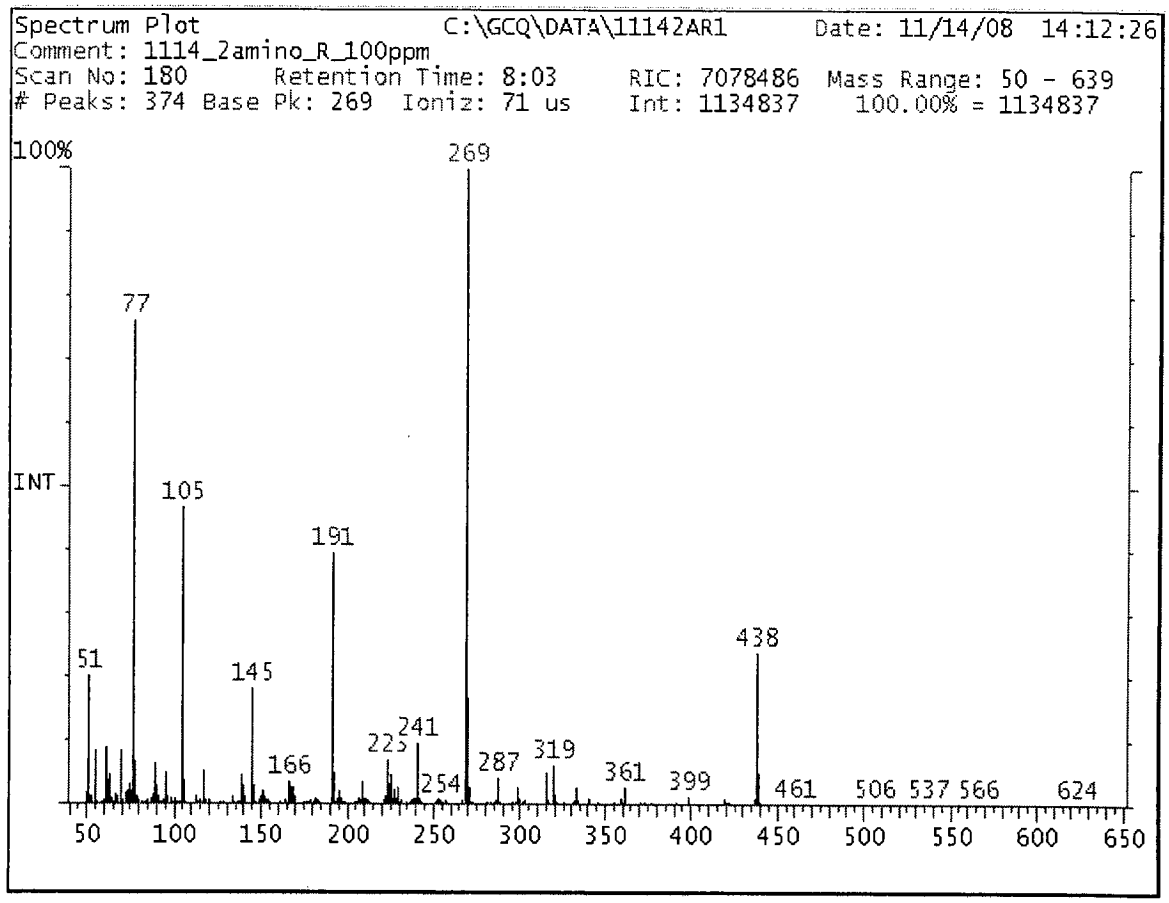
C13H10N2O3
Mol. wt 438



GC-MS PIS(+) data
pseudoMass1 438 (23.92%)

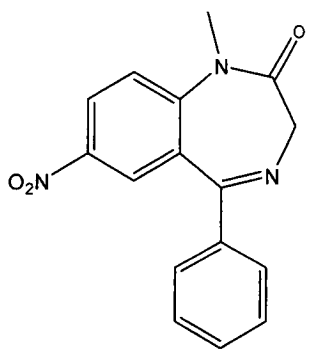
mass fragments 269 (100%)、191 (39.63%)、145 (18.11%)

圖 2、2-amino-5-nitrobenzophenone 與 HFBA 衍生反應物



Compound 3

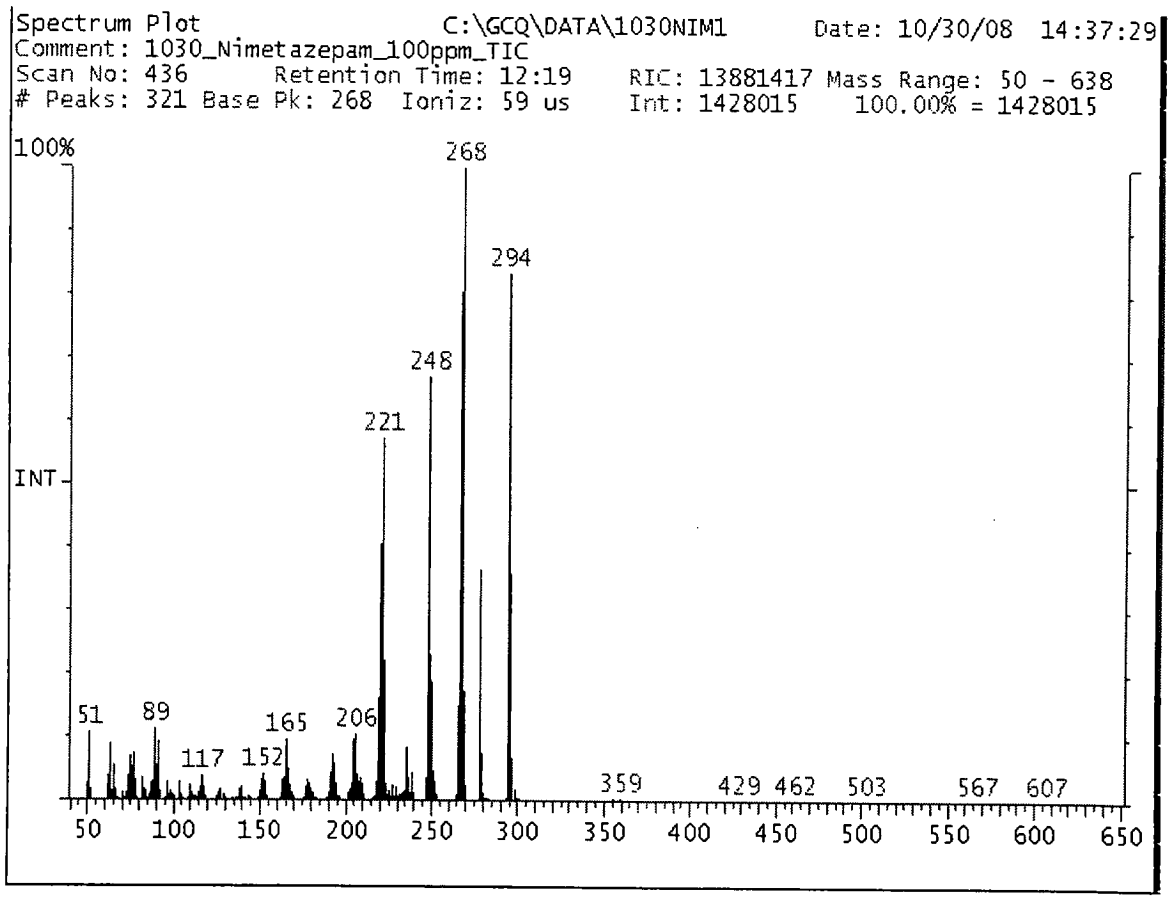
Nimetazepam
C16H13N3O3
Mol. wt 295.0957



GC-MS PIS(+) data
pseudoMass 294 (83.48%)

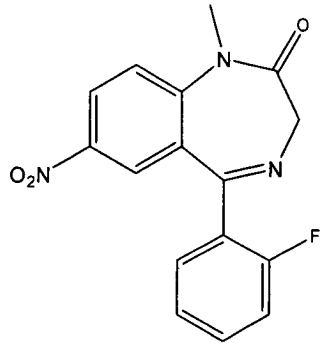
mass fragments 268 (100%)、248 (67.3%)、221 (57.39%)

圖 3、Nimetazepam



Compound 4

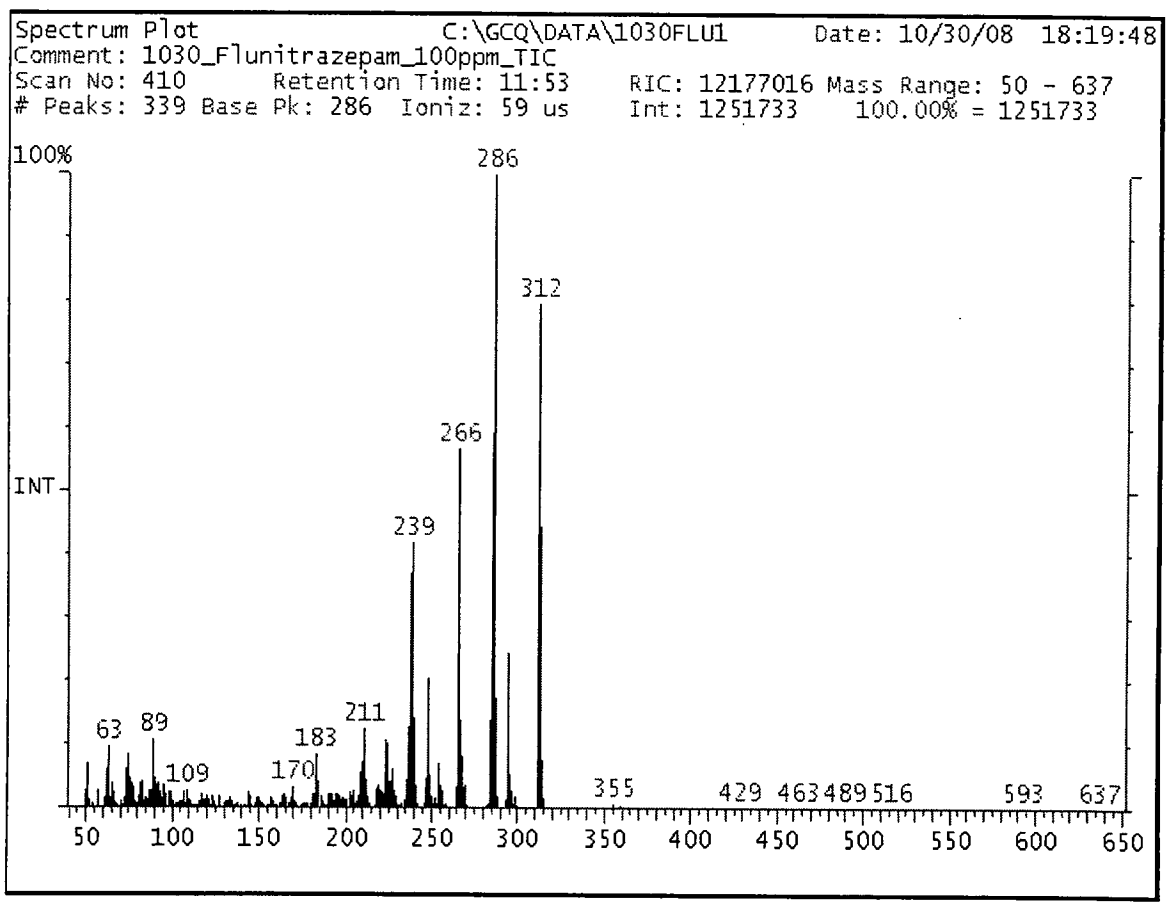
Flunitrazepam
C16H12FN3O3
Mol. wt 313.0863



GC-MS PIS(+) data
pseudoMass 312 (79.66%)

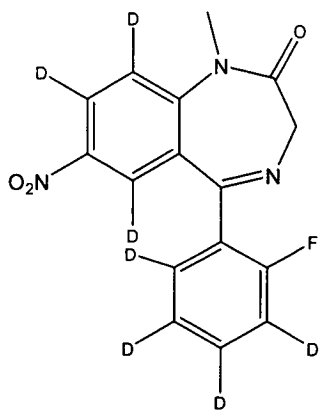
mass fragments 286 (100%)、266 (56.82%)、239 (41.96%)

圖 4、Flunitrazepam



Compound 5

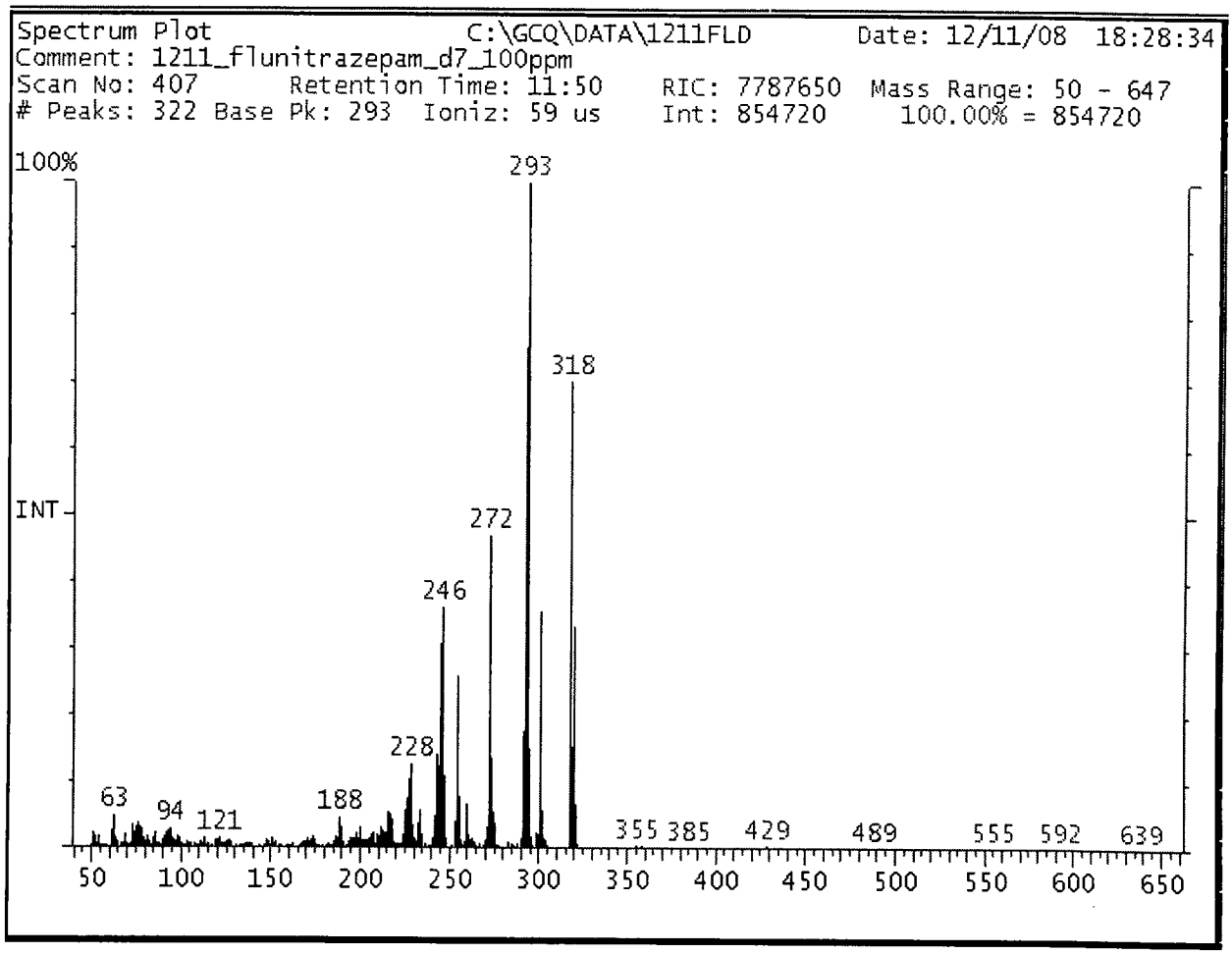
Flunitrazepam-D7
C16H5D7FN3O3
Mol. wt 320.13



GC-MS PIS(+) data
pseudoMass 318 (70.37%)

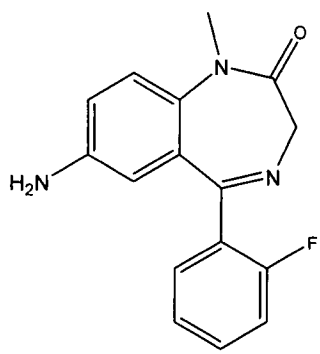
mass fragments 293 (100%)、272 (47.13%)、246 (36.39%)

圖 5、Flunitrazepam-D7



Compound 6

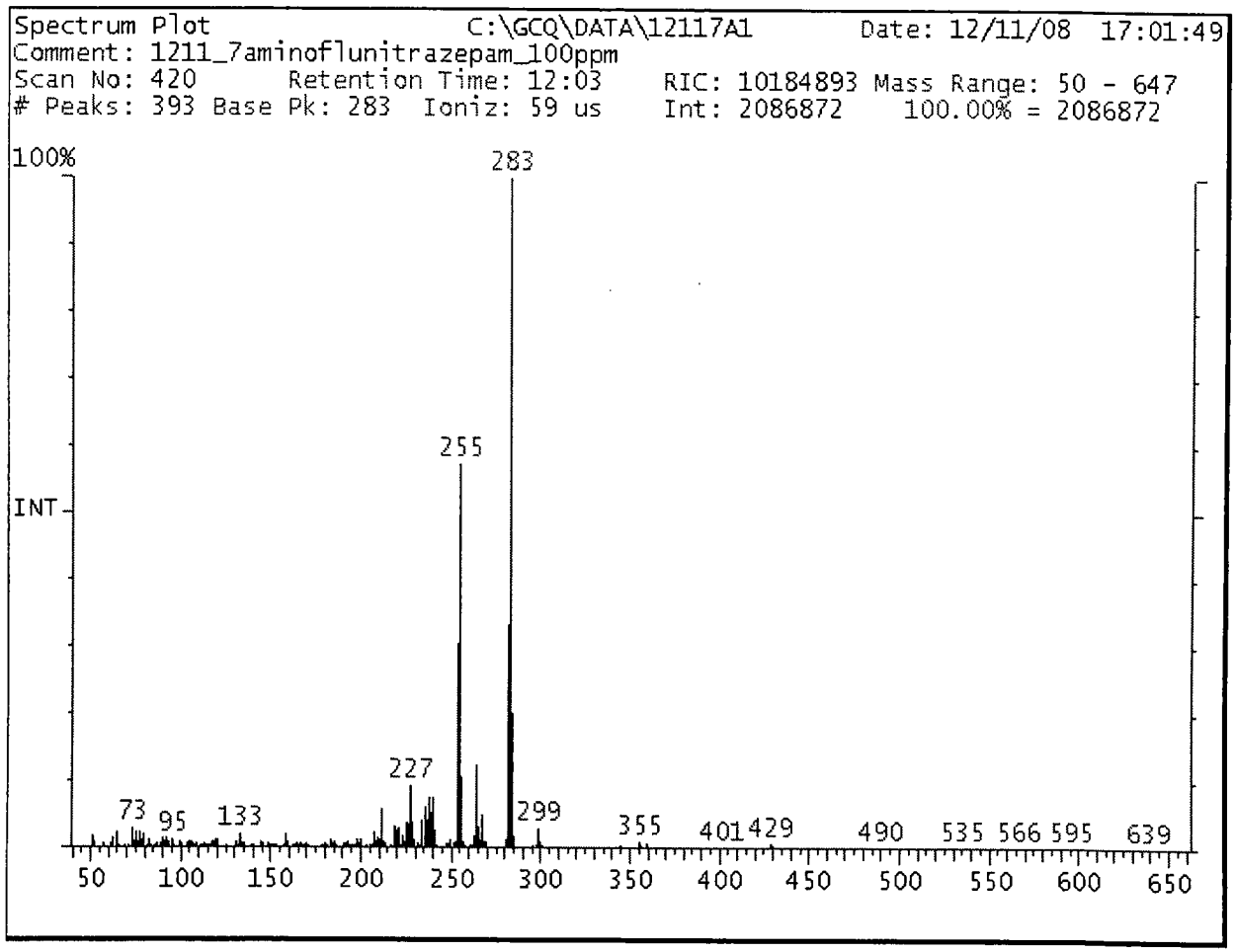
7-aminoflunitrazepam
C16H14FN3O
Mol. wt 283.11



GC-MS PIS(+) data
pseudoMass 283 (100%)

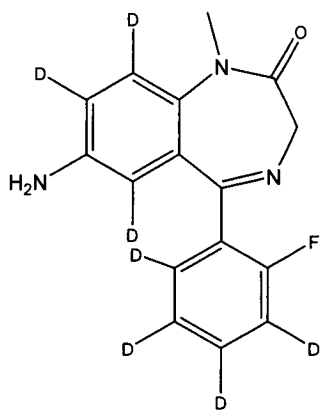
mass fragments 264 (12.54%)、255 (57.49%)、254 (30.5%)

圖 6、7-aminoflunitrazepam



Compound 7

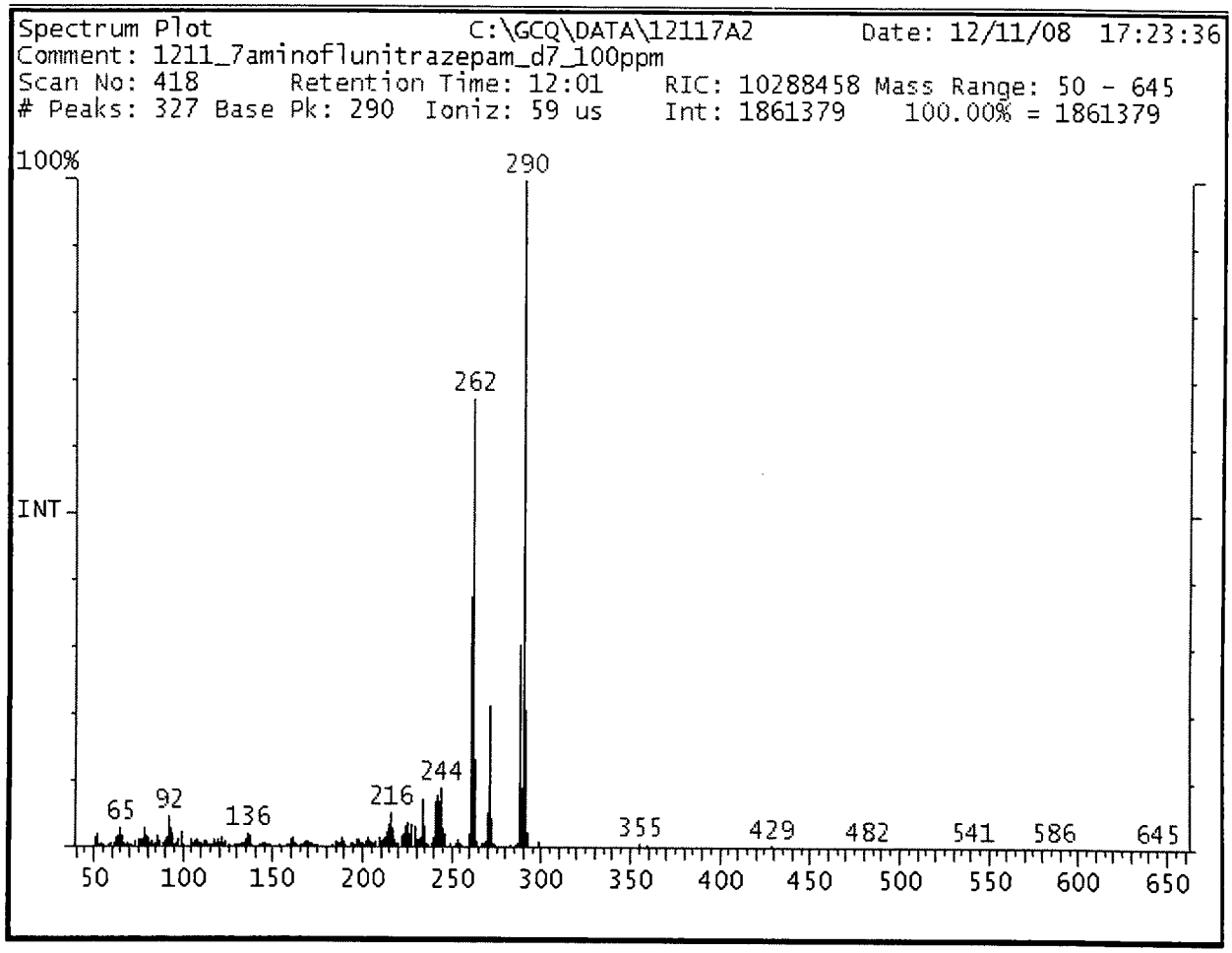
7-aminoflunitrazepam-D7
C16H7D7FN3O
Mol. wt 290.16
1



GC-MS PIS(+) data
pseudoMass 290 (100%)

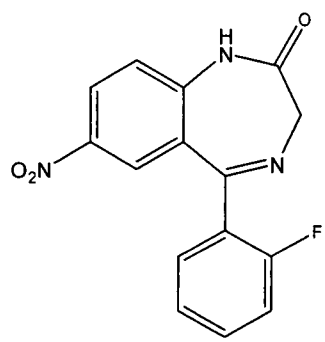
mass fragments 288 (30.61%)、271 (21.27%)、262 (67.51%)、261 (37.62%)

圖 7、7-aminoflunitrazepam-D7



Compound 8

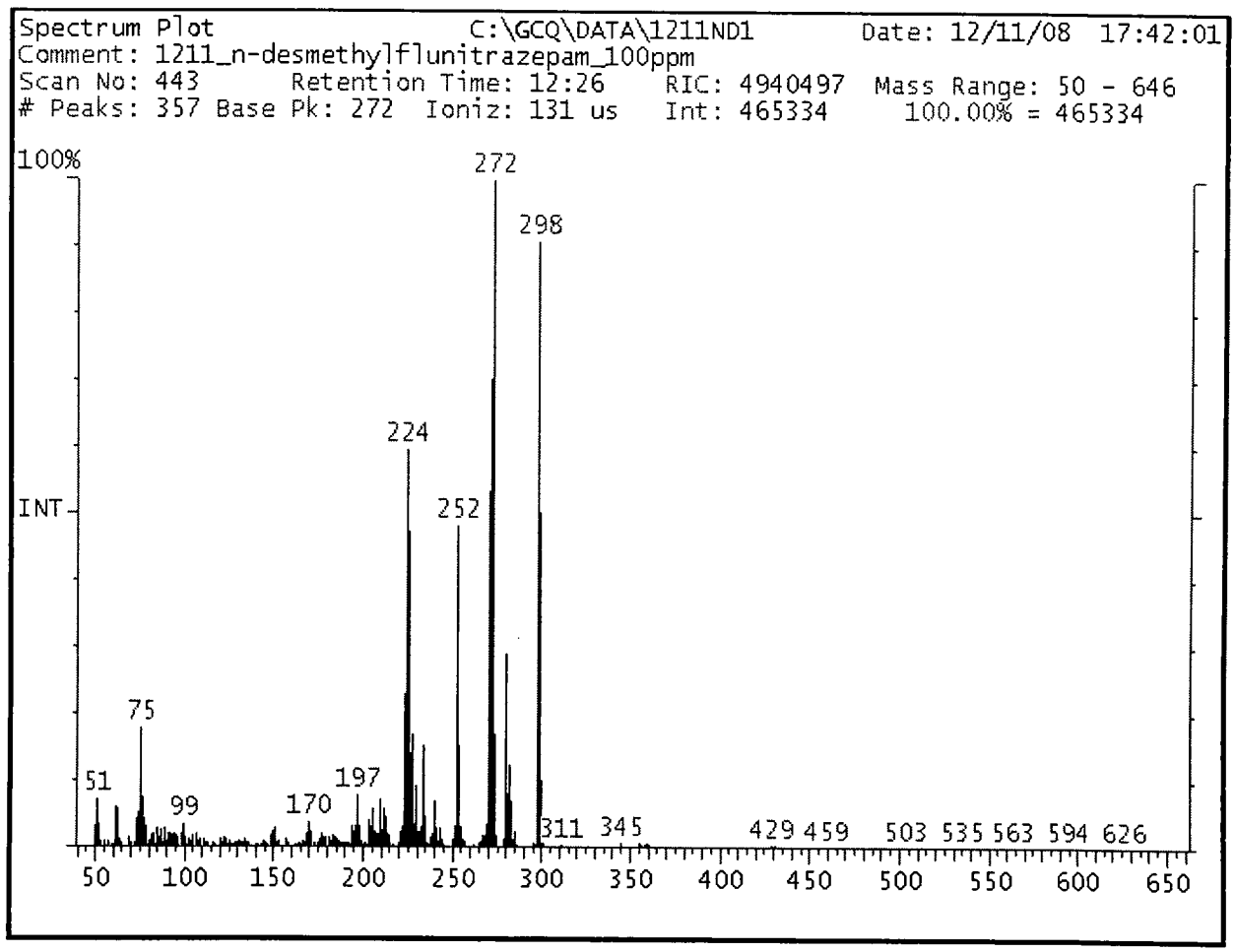
N-desmethylflunitrazepam
C15H10FN3O3
Mol. wt 299.07



GC-MS PIS(+) data
pseudoMass 298 (82.96%)

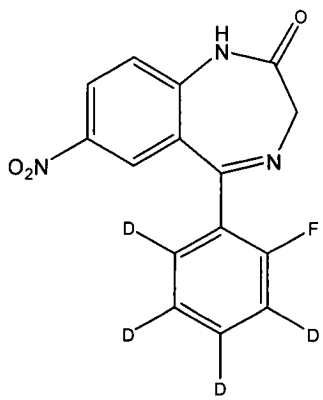
mass fragments 272 (100%)、252 (54.93%)、224 (72.03%)

圖 8、N-desmethylflunitrazepam



Compound 9

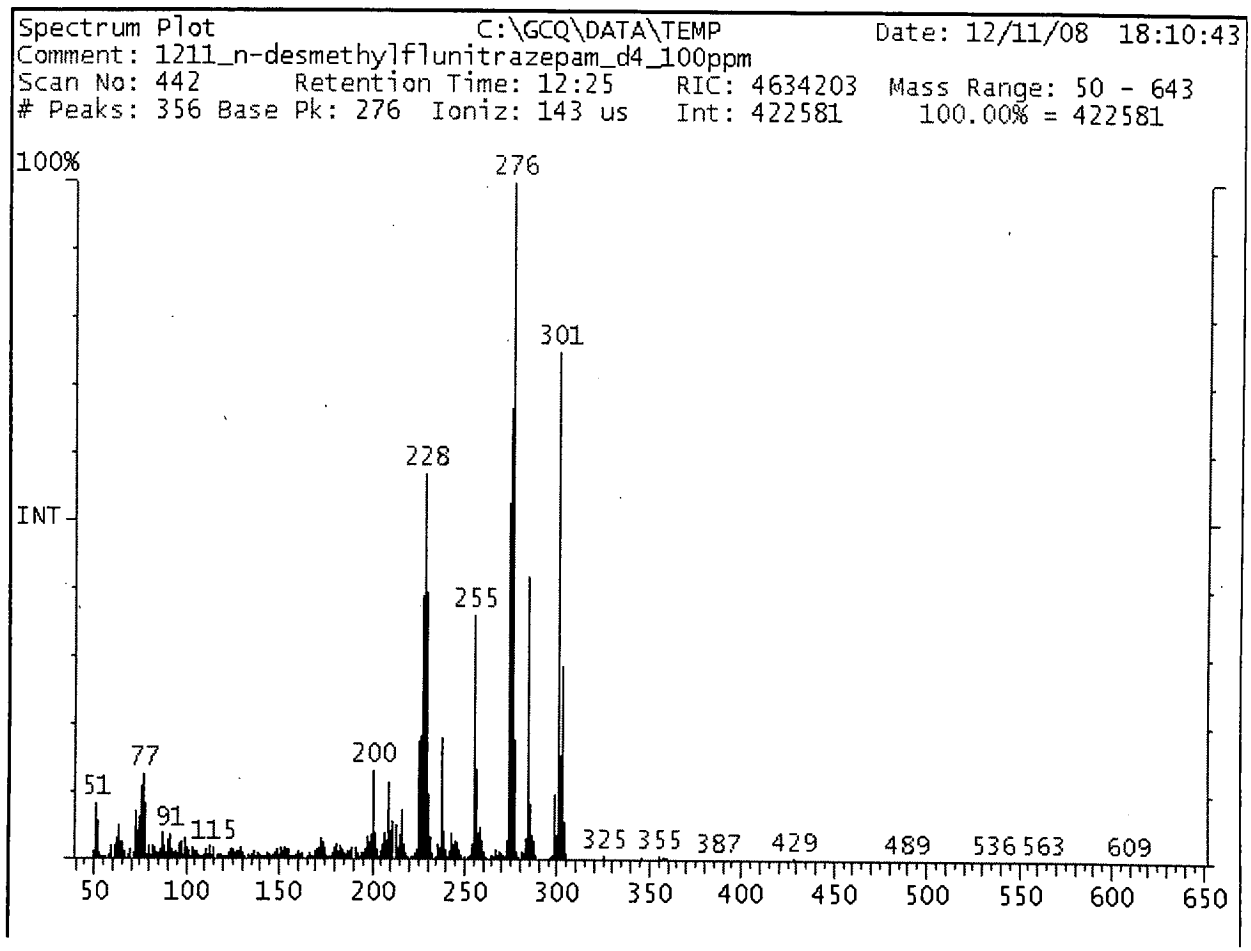
N-desmethylflunitrazepam-D4
C15H6D4FN3O3
Mol. wt 303.10



GC-MS PIS(+) data
pseudoMass 301 (75.22%)

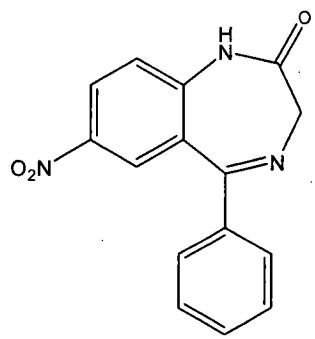
mass fragments 276 (100%)、255 (36.13%)、228 (57.04%)

圖 9、N-desmethylflunitrazepam-D4



Compound 10

Nitrazepam
C15H11N3O3
Mol. wt 281.08



GC-MS PIS(+) data
pseudoMass 280 (84.97%)

mass fragments 264 (100%)、253 (73.18%)、234 (84.6%)、206 (73.04%)

圖 10、Nitrazepam

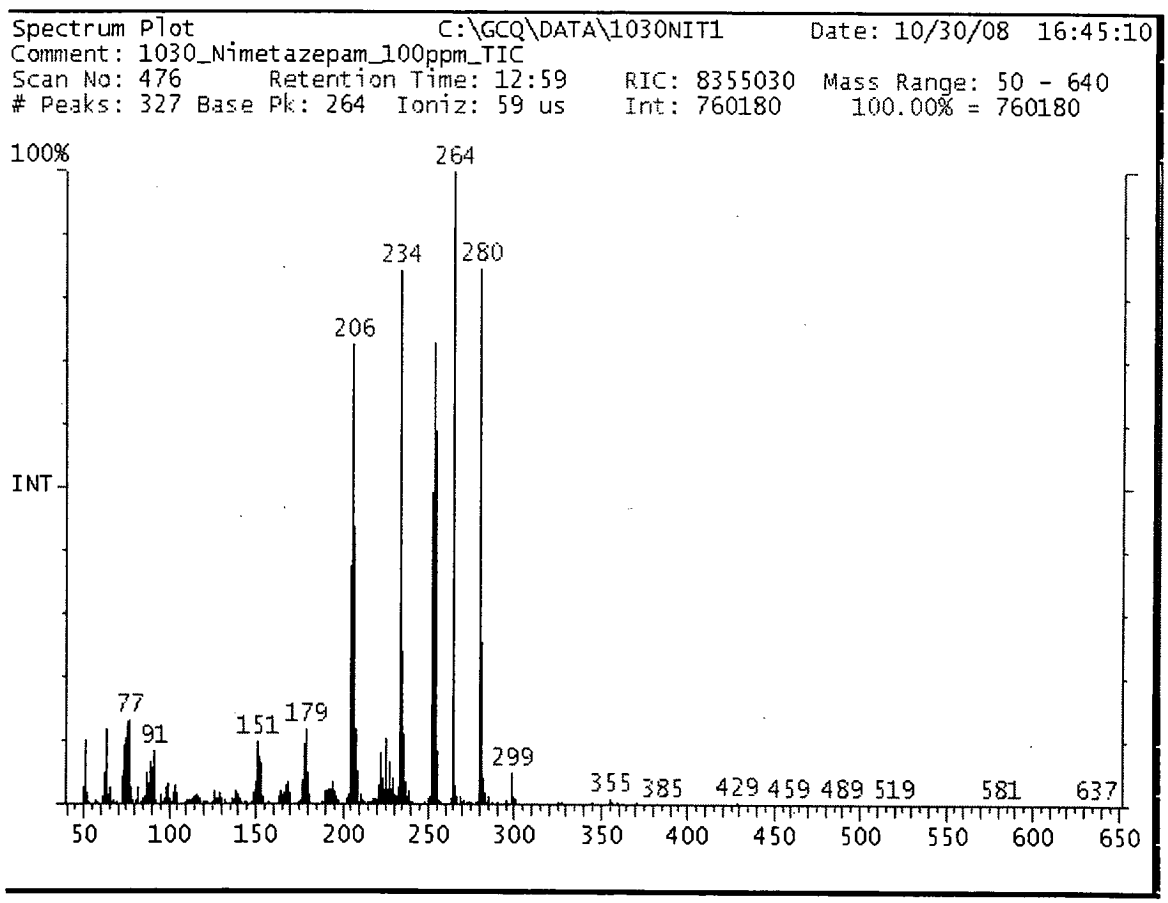


圖 11、Benzodiazepines 類分析物 GC/MS-TIC 圖

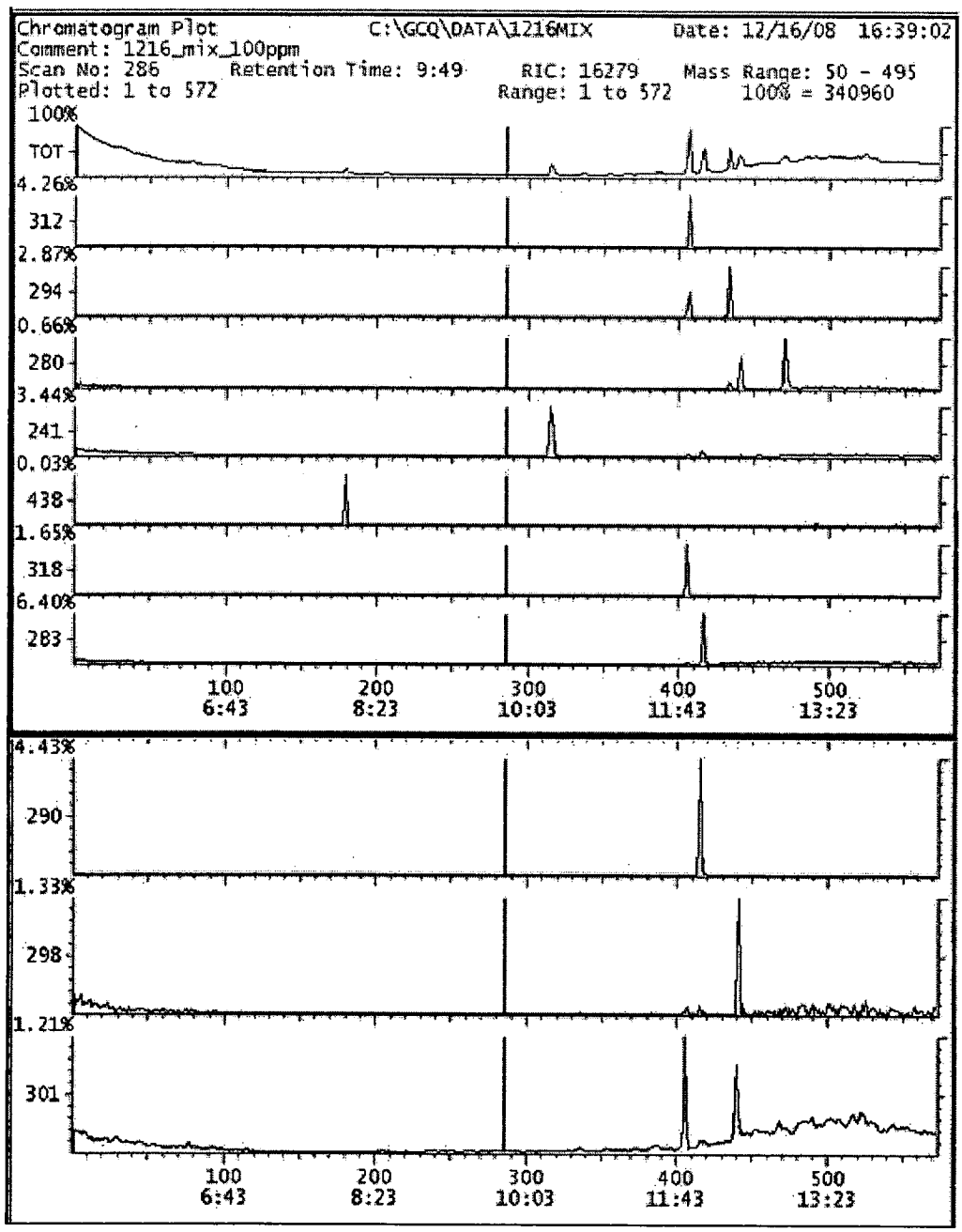


圖 12、Flunitrazepam　GC/MS-MRM 圖

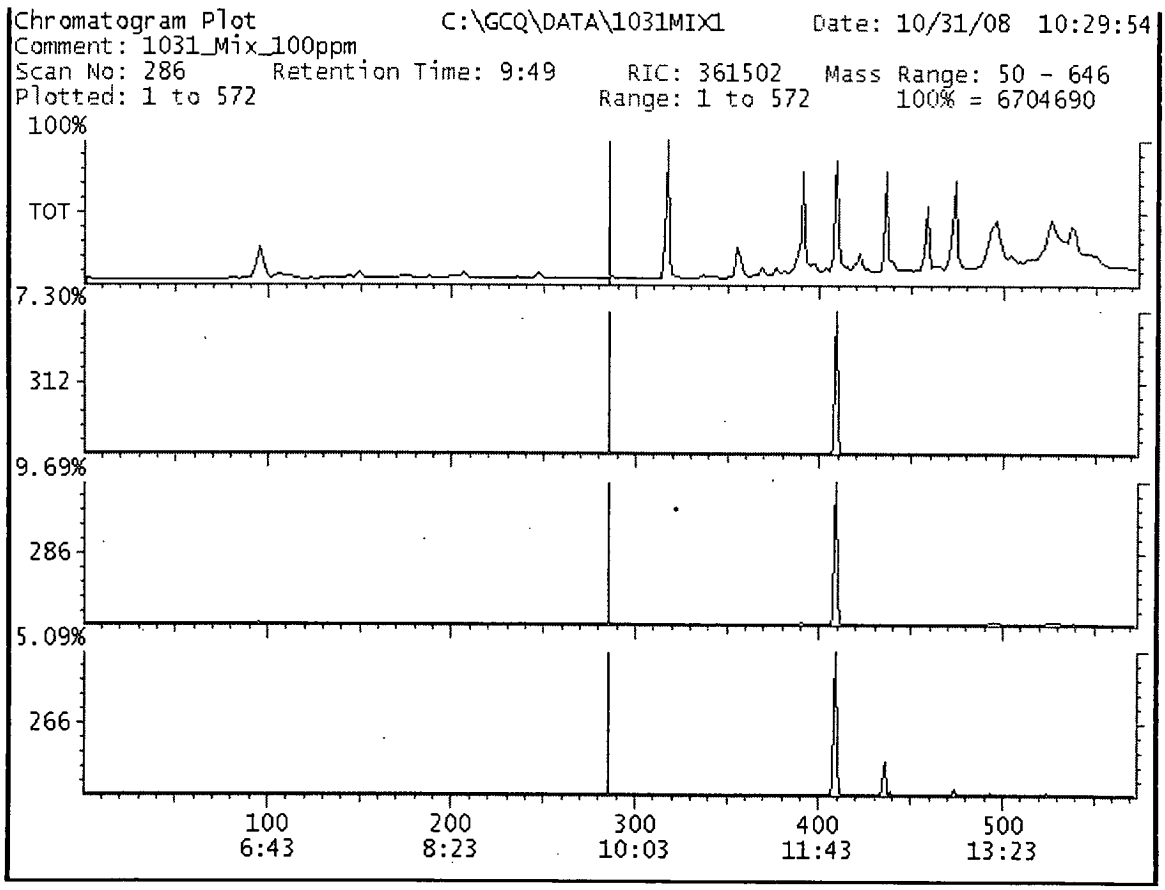


圖 13、Flunitrazepam_D7　GC/MS-MRM 圖

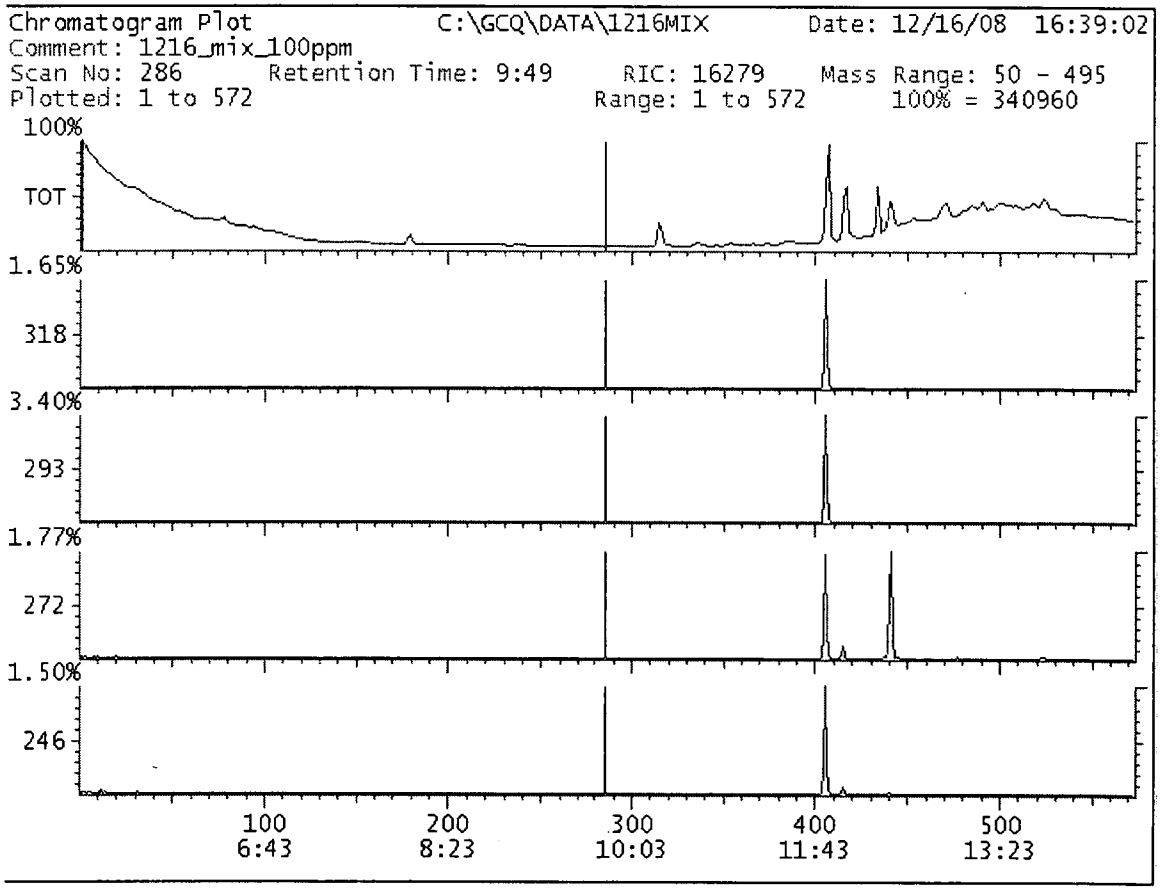


圖 14、Nitrazepam　GC/MS-MRM 圖

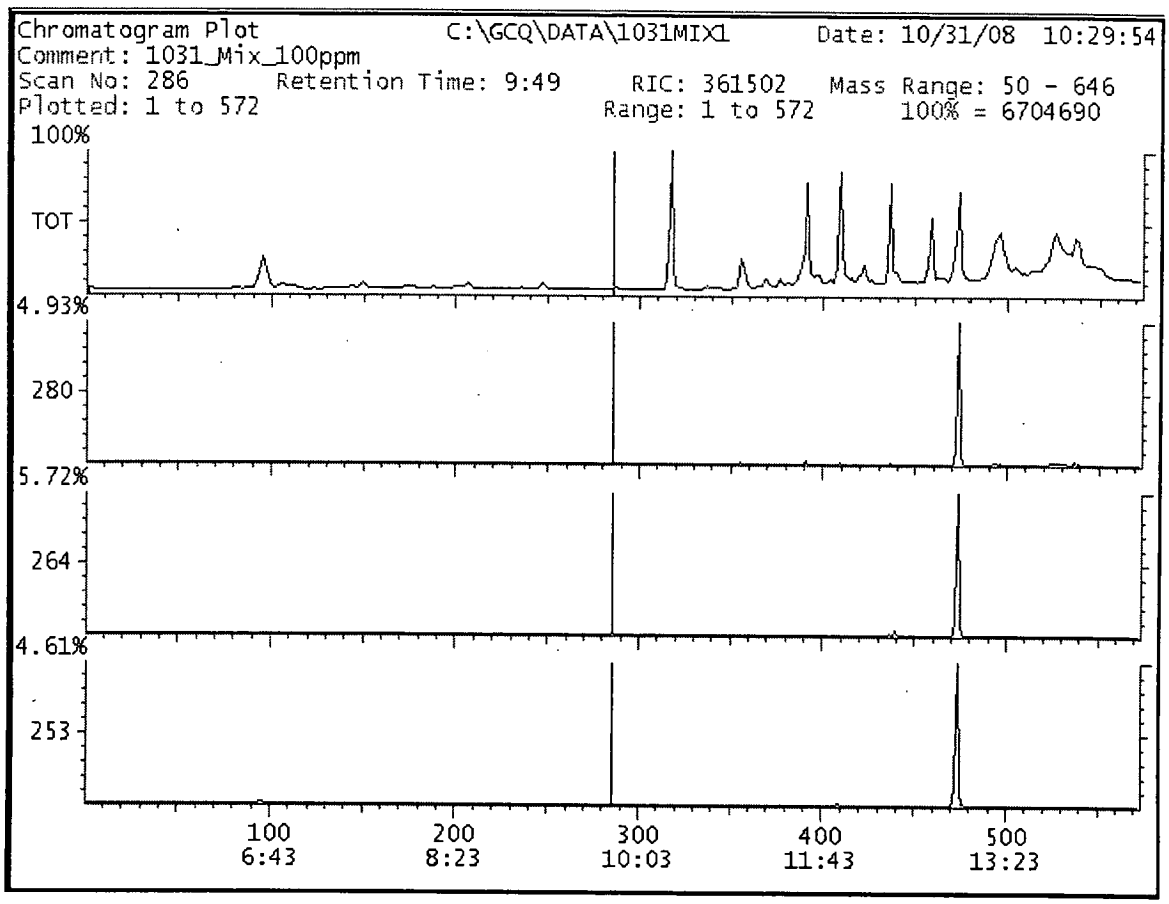


圖 15、Nimetazepam GC/MS-MRM 圖

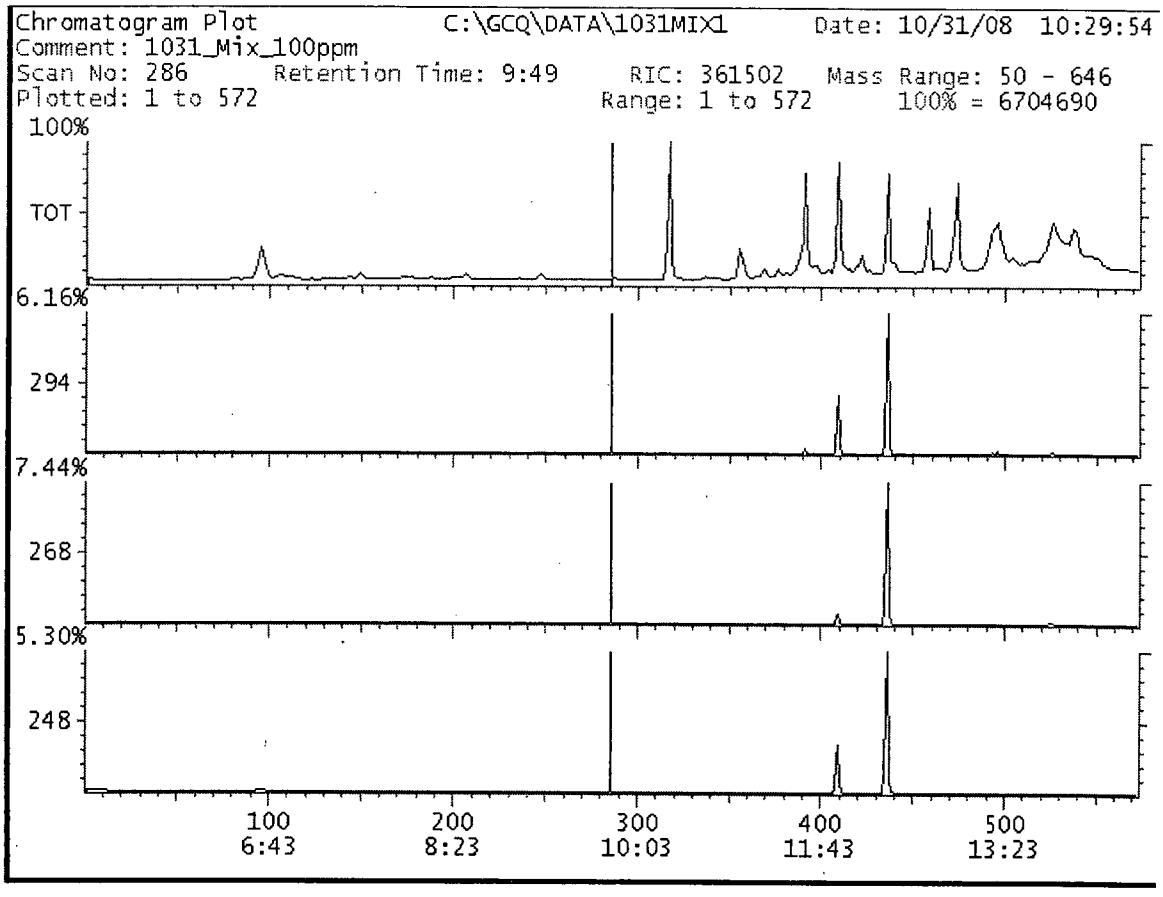


圖 16、2-amino-5-nitrobenzophenone　GC/MS-MRM 圖

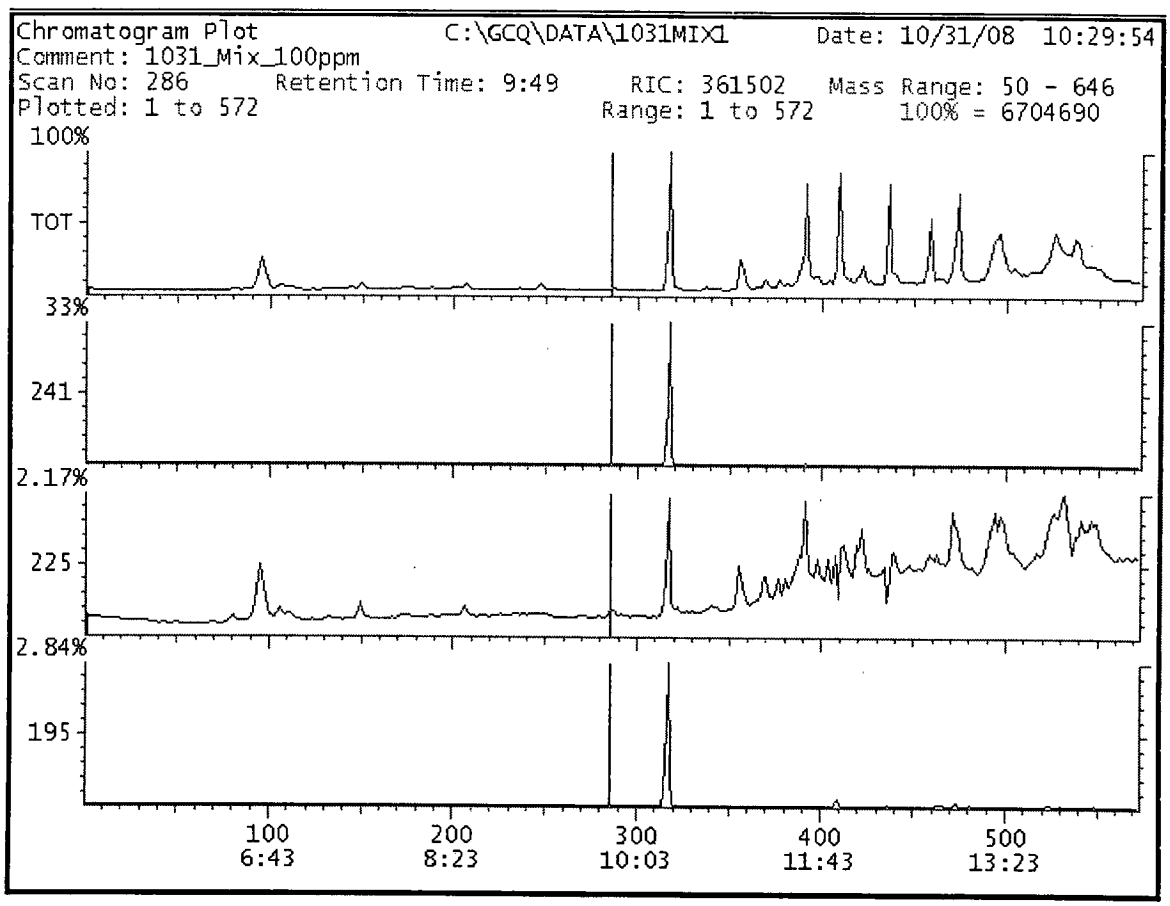


圖 17、2-amino-5-nitrobenzophenone-HFBA GC/MS-MRM 圖

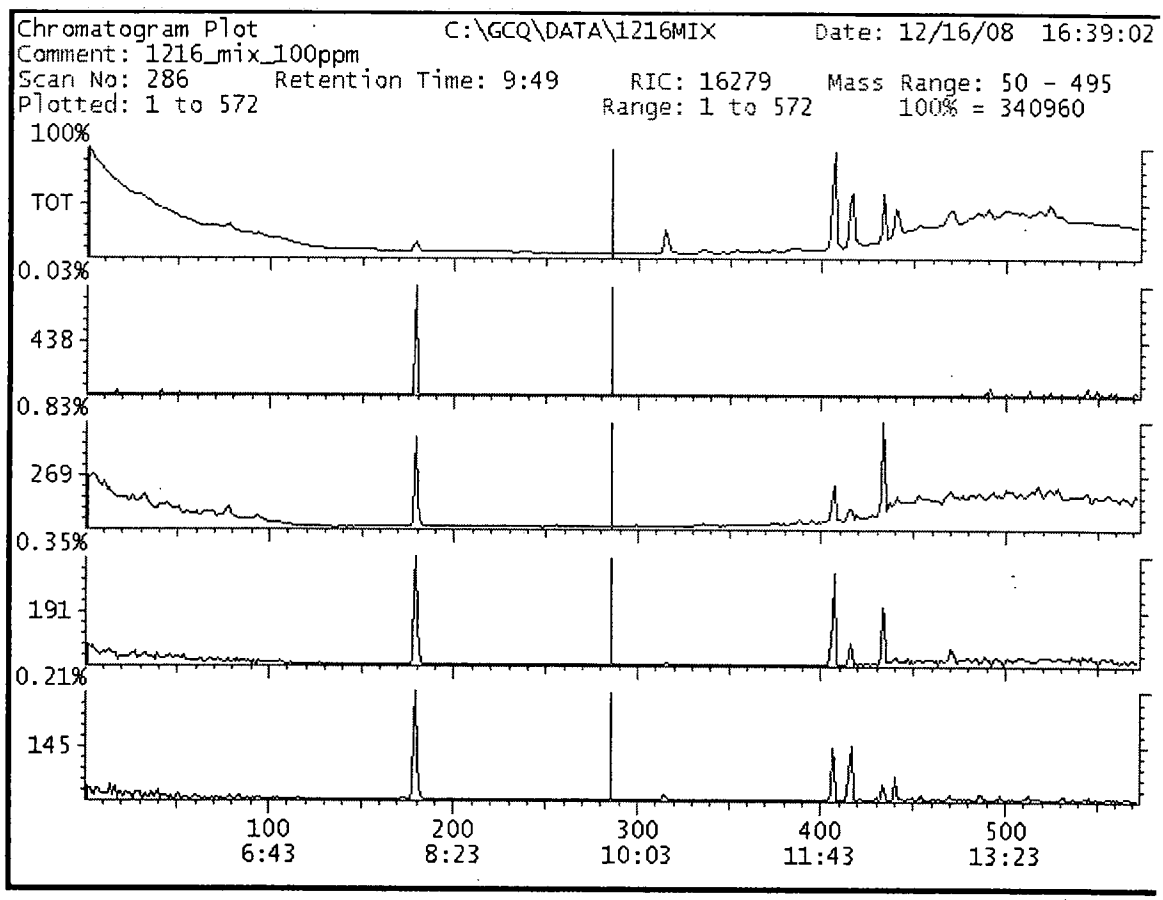


圖 18、7-aminoflunitrazepam　GC/MS-MRM 圖

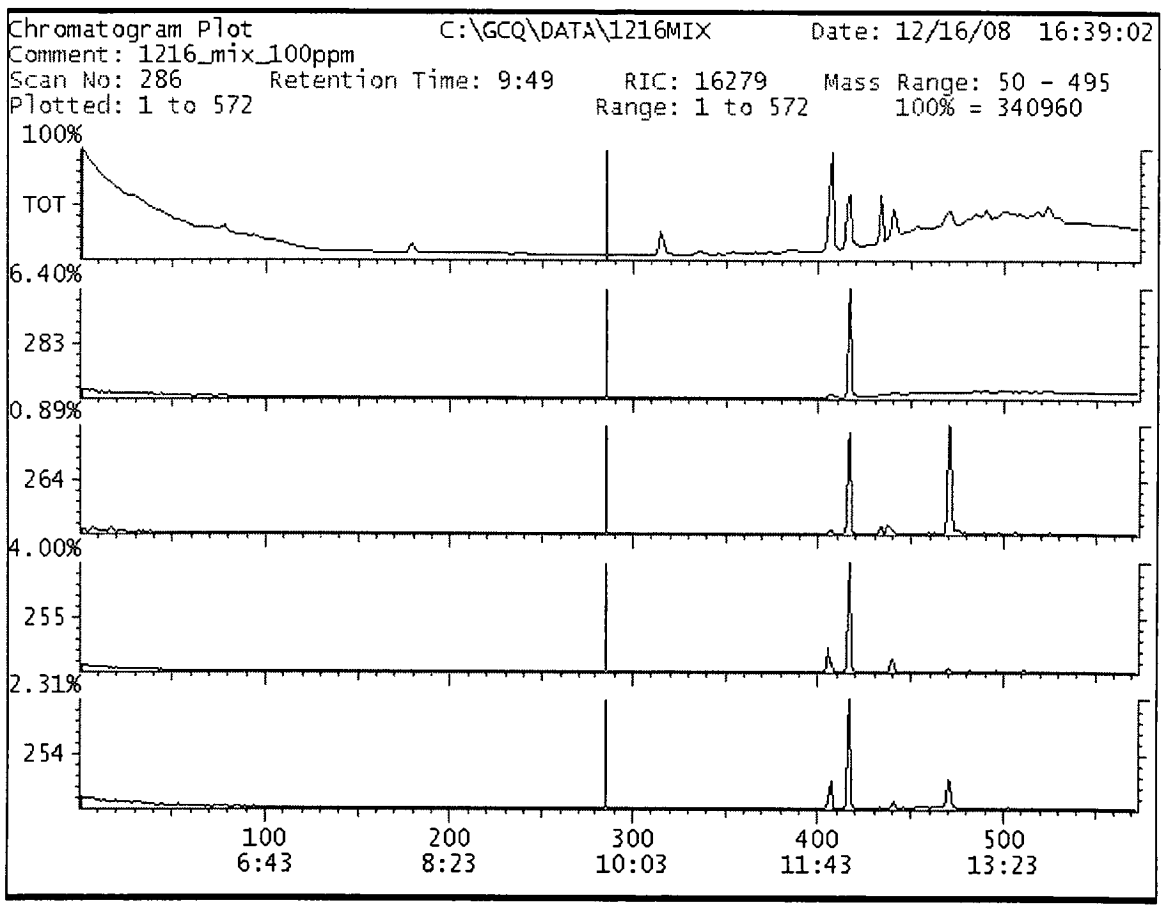


圖 19、7-aminoflunitrazepam_D7　GC/MS-MRM 圖

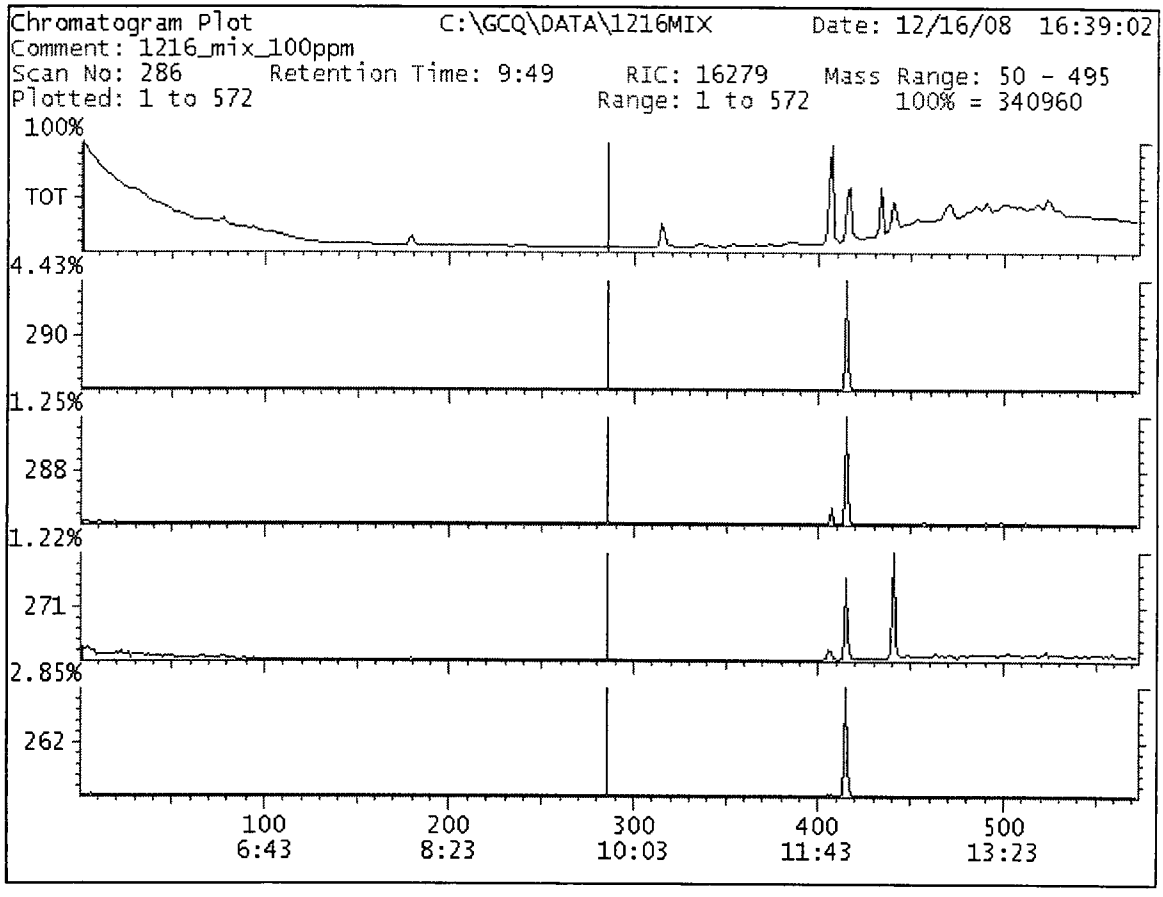


圖 20、N-Desmethylflunitrazepam GC/MS-MRM 圖

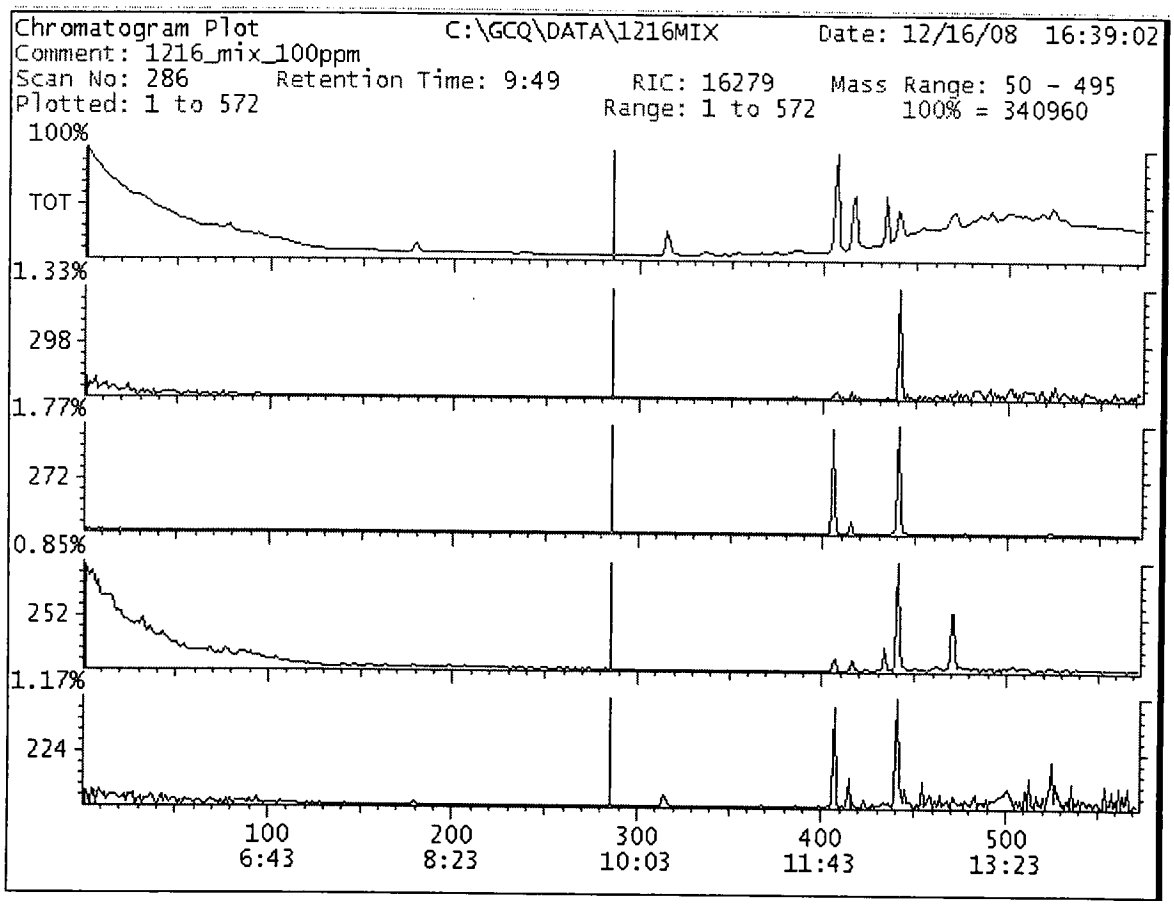
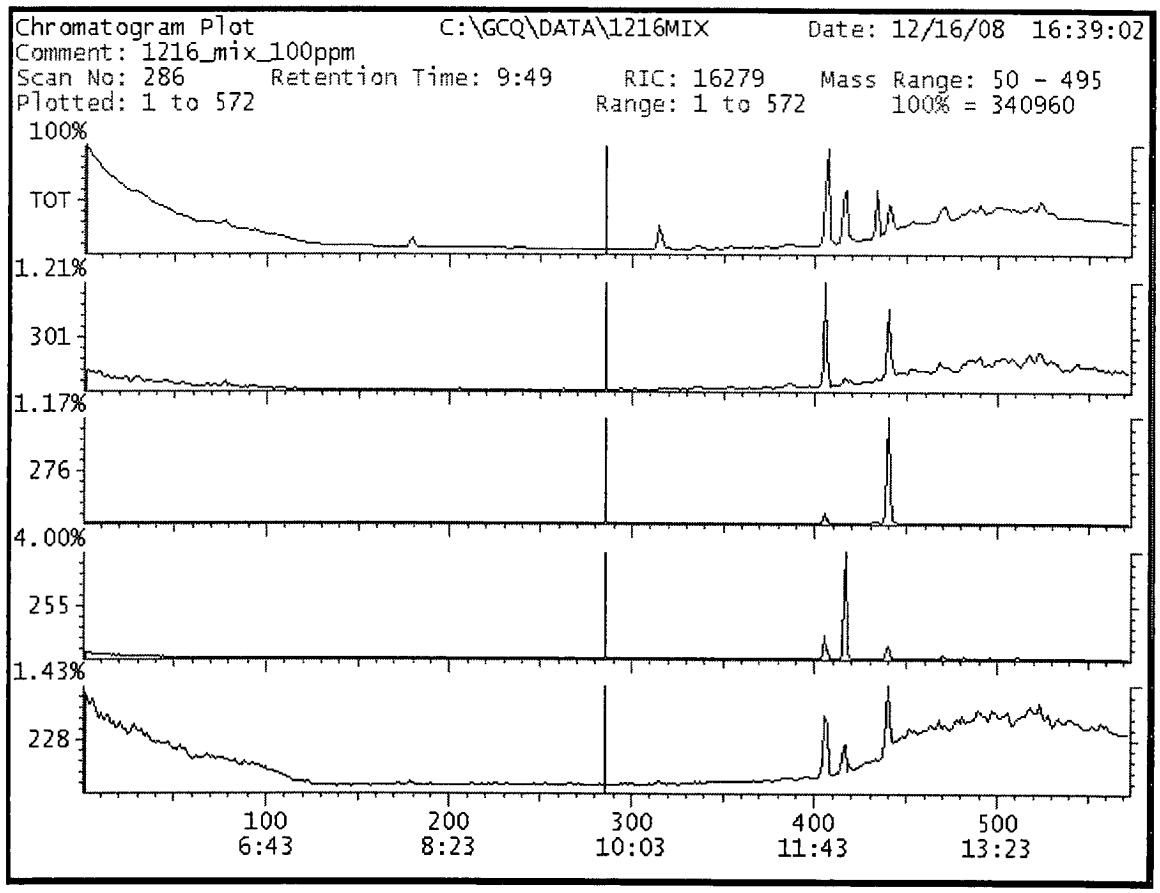


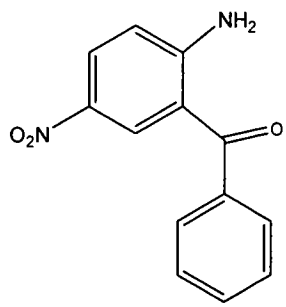
圖 21、N-Desmethylflunitrazepam_D4　GC/MS-MRM 圖



標準品 Mass Data Library (LC-MS 部份)

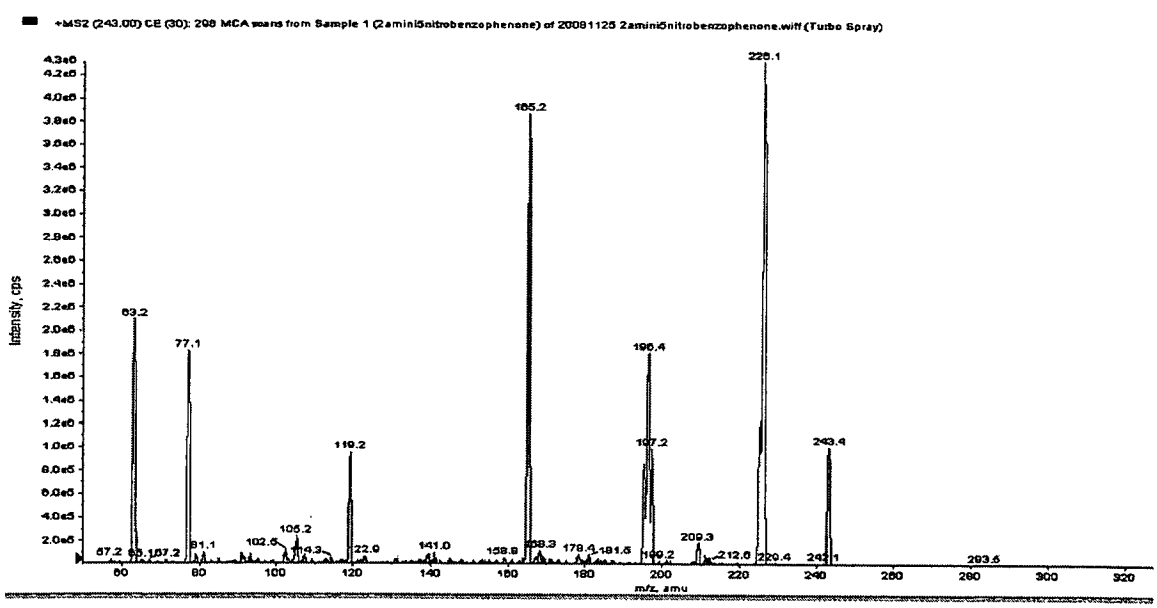
Compound 1

2-amino-5-nitrobenzophenone
C13H10N2O3
Mol. wt 242.07



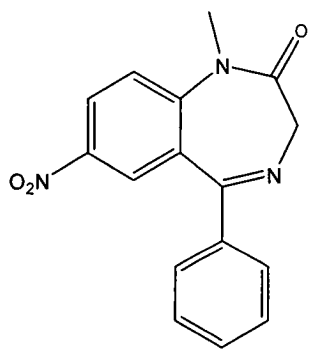
PIS(+) data
pseudoMass1 (%)
mass fragments 243.3 (100%)

圖 22、2-amino-5-nitrobenzophenone



Compound 2

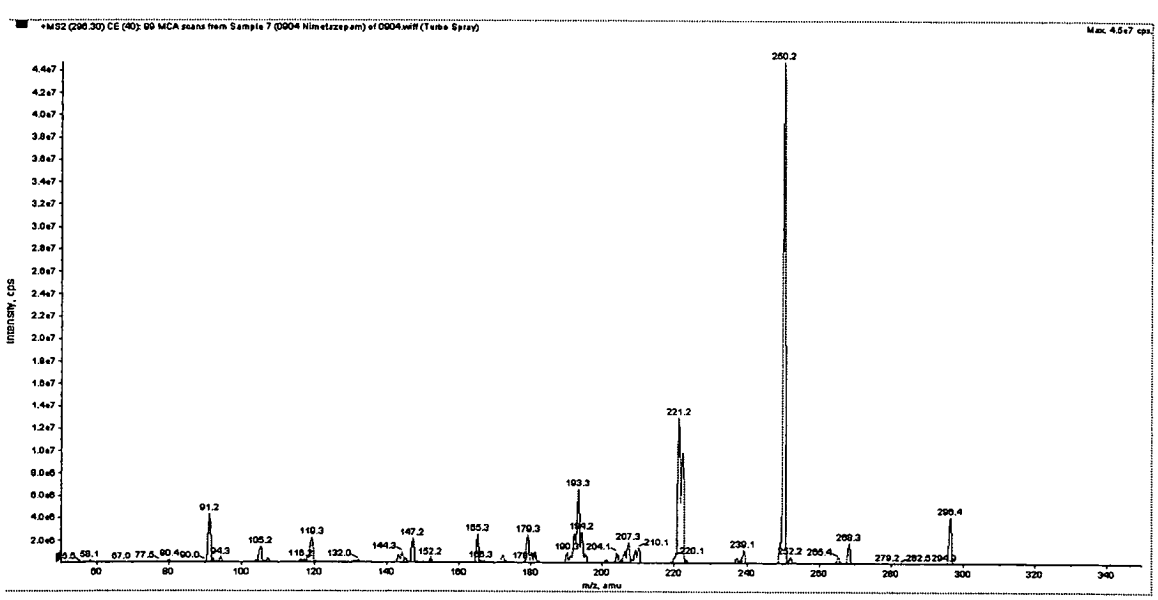
Nimetazepam
C16H13N3O3
Mol. wt 295.10



PIS(+) data
pseudoMass 296.4 (9.2%)

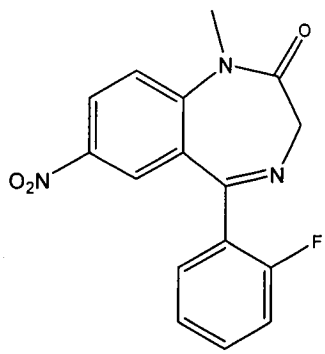
mass fragments 250.2 (100%)、221.2 (29.0%)、193.2 (14.7%)

圖 23、Nimetazepam



Compound 3

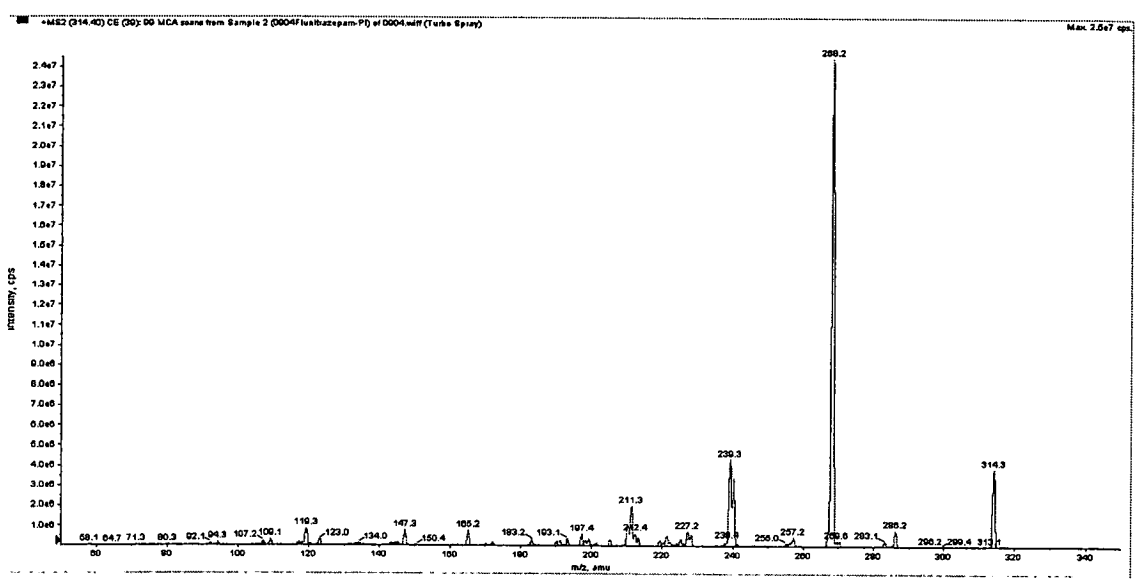
Flunitrazepam
C16H12FN3O3
Mol. wt 313.09



PIS(+) data
pseudoMass 314.4 (15.60%)

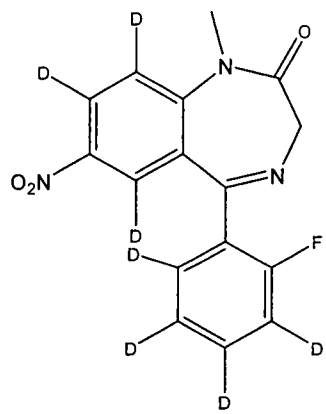
mass fragments 286.3 (3.1%)、268.2 (100%)、240.3 (13.7%)

圖 24、Flunitrazepam



Compound 4

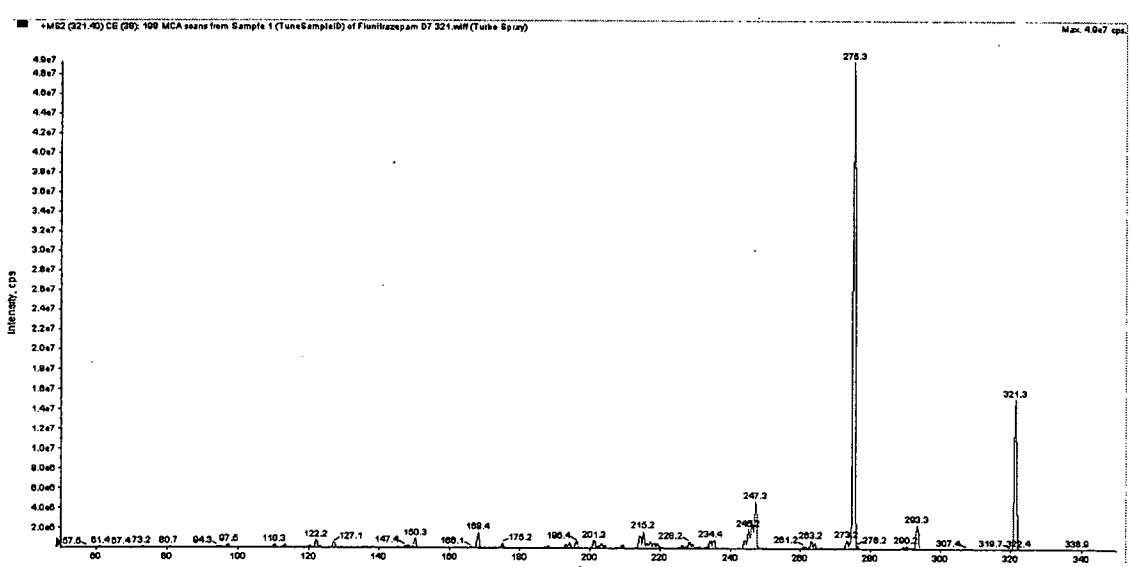
Flunitrazepam-D7
C16H5D7FN3O3
Mol. wt 320.13



PIS(+) data
pseudoMass 321.3 (30.7%)

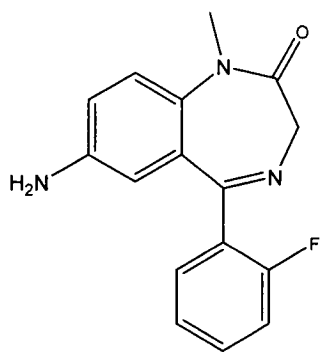
mass fragments 293.3 (4.9%)、275.3 (100%)、246.3 (5.7%)

圖 25、Flunitrazepam-D7



Compound 5

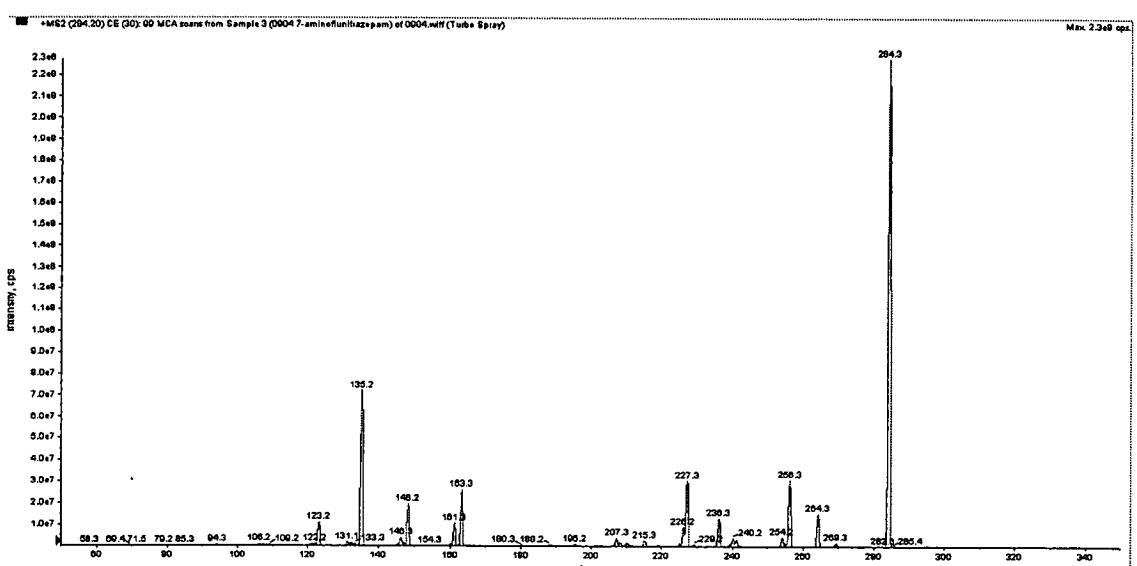
7-aminoflunitrazepam
C16H14FN3O
Mol. wt 283.11



PIS(+) data
pseudoMass 284.3 (100%)

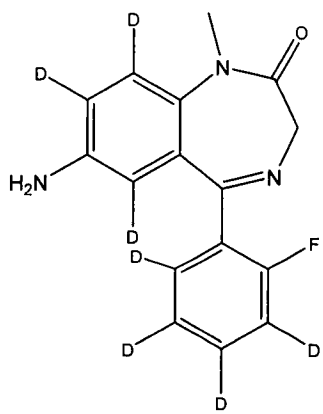
mass fragments 256.4 (13.0%)、227.3 (13.4%)、135.3 (31.5%)

圖 26、7-aminoflunitrazepam



Compound 6

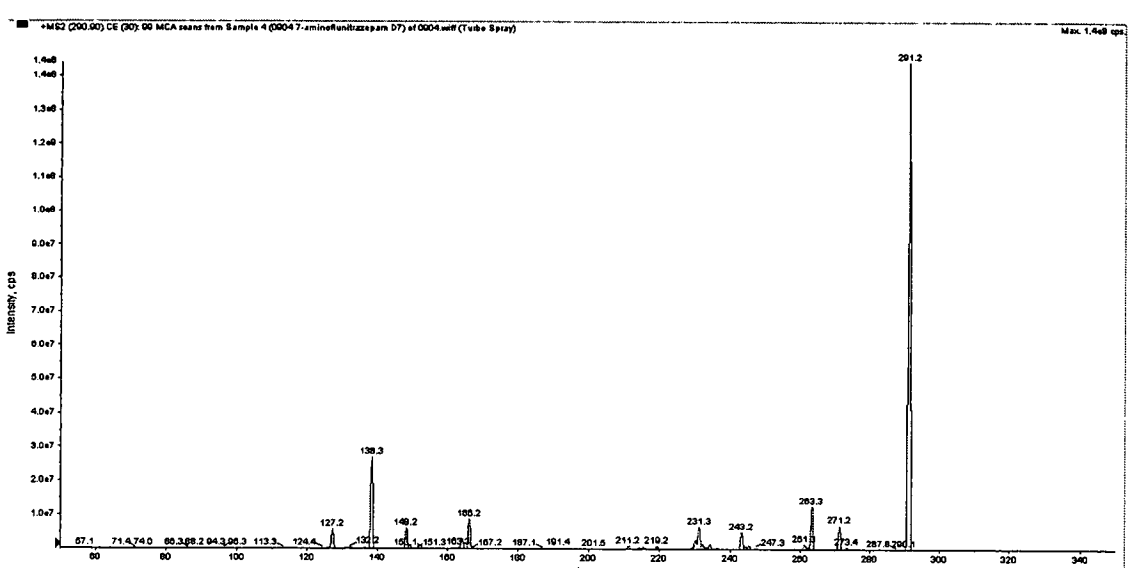
7-aminoflunitrazepam-D7
C16H7D7FN3O
Mol. wt 290.16



PIS(+) data
pseudoMass 291.2 (100%)

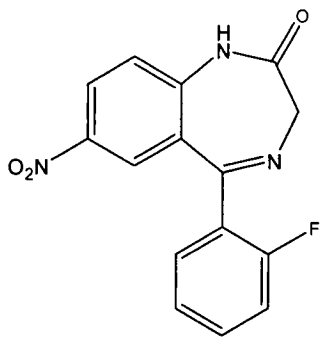
mass fragments 263.4 (8.6%)、231.3 (4.4%)、138.2(17.1%)

圖 27、7-aminoflunitrazepam-D7



Compound 7

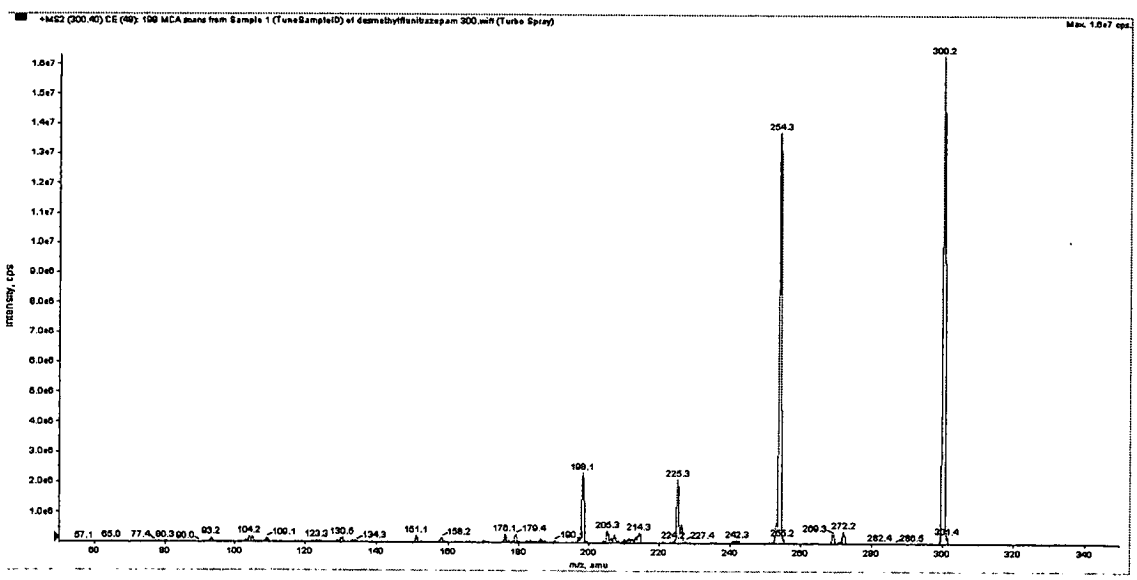
N-desmethylflunitrazepam
C15H10FN3O3
Mol. wt 299.07



PIS(+) data
pseudoMass 300.2 (100%)

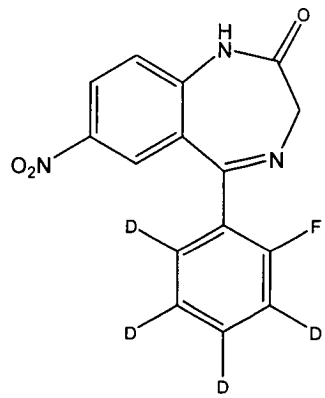
mass fragments 254.3 (84.2%)、225.3 (13.0%)、198.2 (13.5%)

圖 28、N-desmethylflunitrazepam



Compound 8

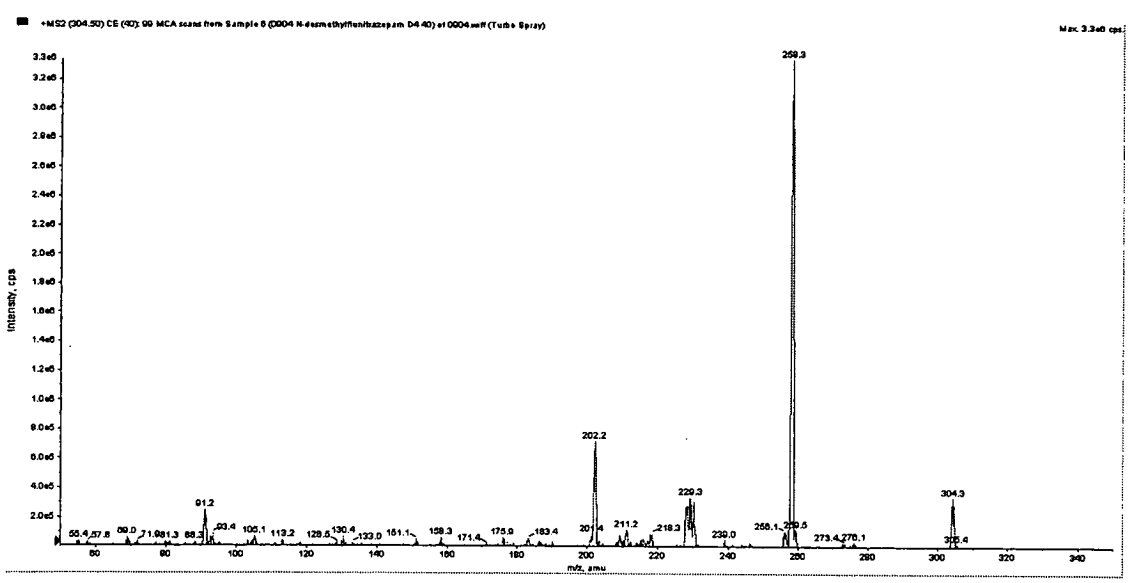
N-desmethylflunitrazepam-D4
C15H6D4FN3O3
Mol. wt 303.10



PIS(+) data
pseudoMass 304.3 (10.2%)

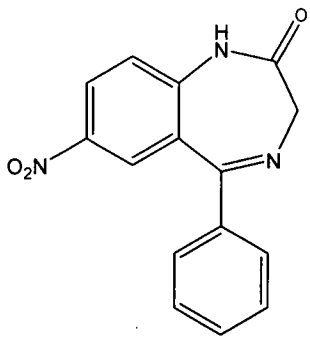
mass fragments 258.3 (100%)、229.1 (9.88%)、202.2(21.6%)

圖 29、N-desmethylflunitrazepam-D4



Compound 9

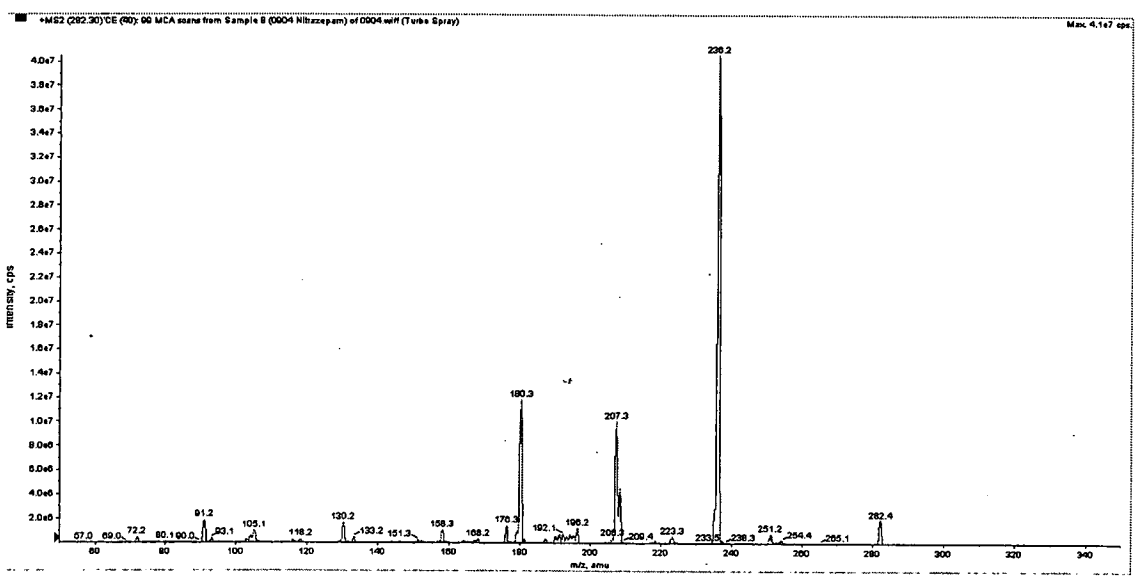
Nitrazepm
C15H11N3O3
Mol. wt 281.08



PIS(+) data
pseudoMass 282.3 (4.8%)

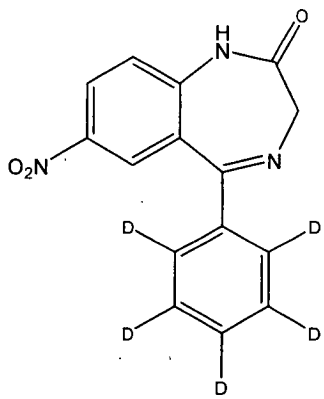
mass fragments 236.2 (100%)、207.3 (24.8%)、180.3 (29.1%)

圖 30、Nitrazepm



Compound 10

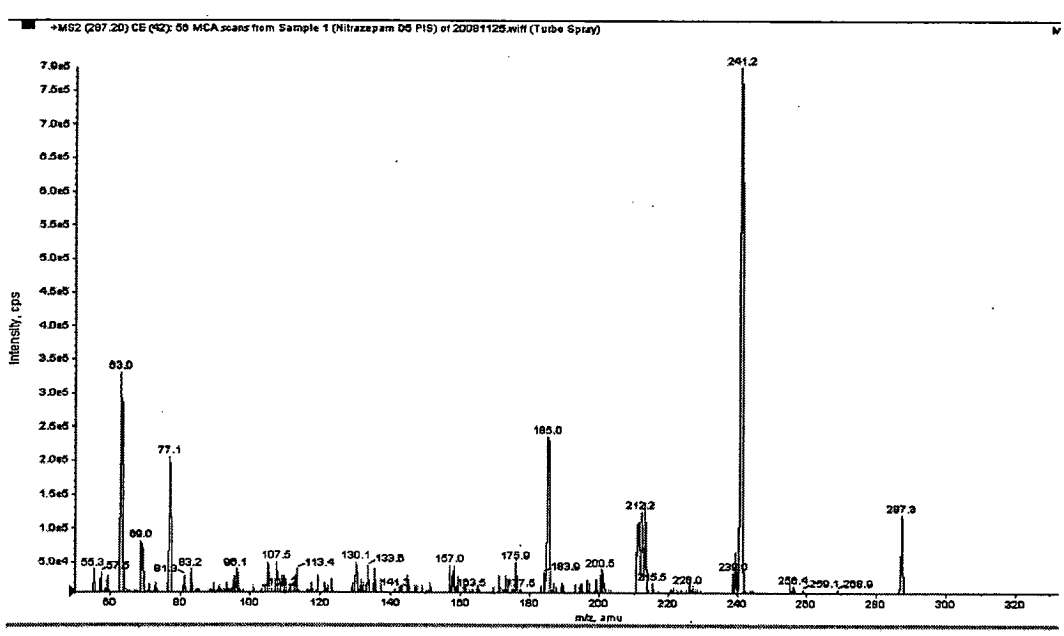
Nitrazepam-D5
C15H6D5N3O3
Mol. wt 286.11



PIS(+) data
pseudoMass 287.3 (%)

mass fragments 241.3 (%)、213.2 (%)、185.2 (%)

圖 31、Nitrazepam-D5



Compound 11

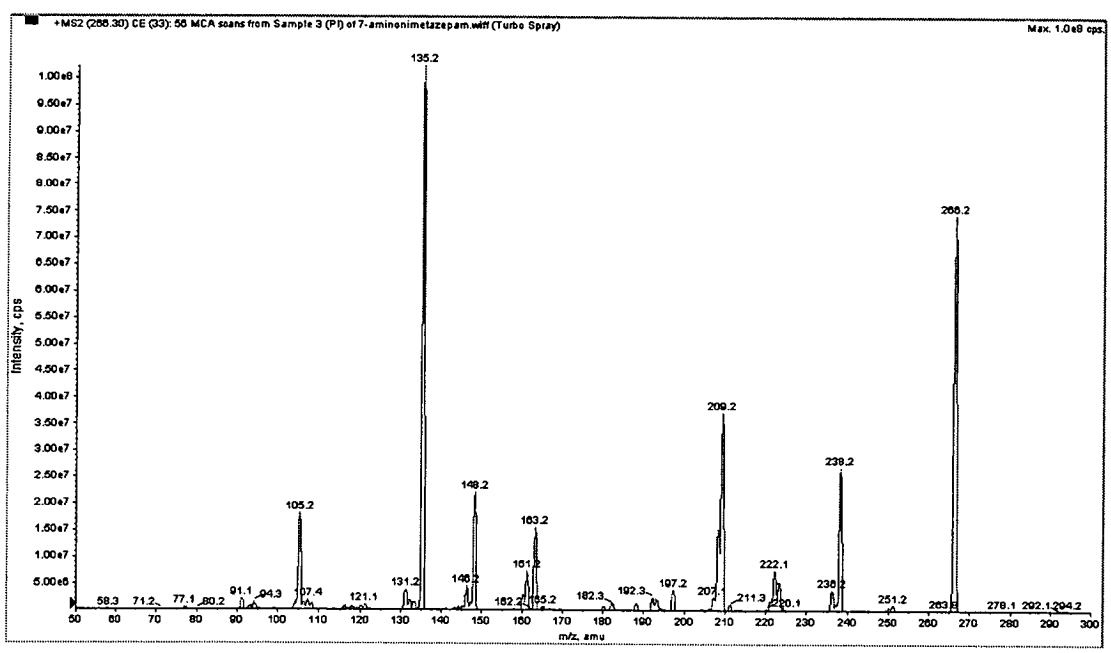
7-aminonimetazepam (Nimetazepam 還原的產物)

C16H15N3O
Mol. wt 265.12

PIS(+) data
pseudoMass 266.3 (75 %)

mass fragments 238.2 (27 %)、209.2 (38 %)、135.2 (100 %)

圖 32、7-aminonimetazepam



Compound 11

7-acetamidonitrazpam (7-aminonimetazepam 乙醯化反應的產物)

C18H17N3O2
Mol. wt 307.13

PIS(+) data
pseudoMass 308.4 (48 %)

mass fragments 262.4 (100 %)、221.1 (82 %)、209.1 (53 %)

圖 33、7-acetamidonitrazpam

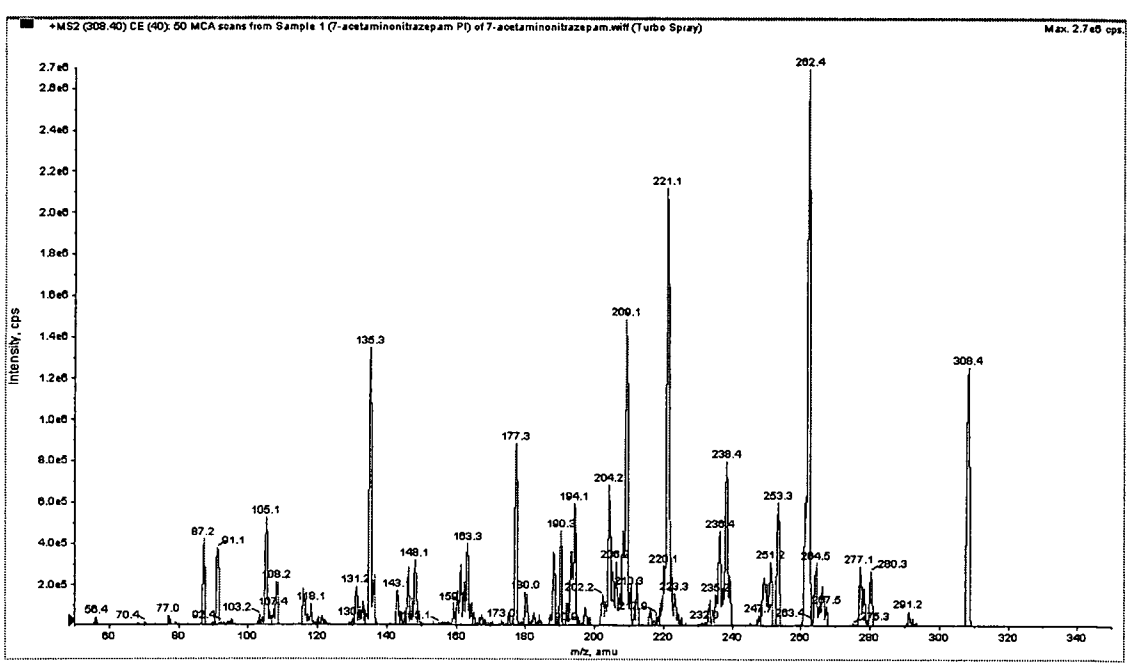


圖 34、Benzodiazpines 類分析物 HPLC-TIC 圖

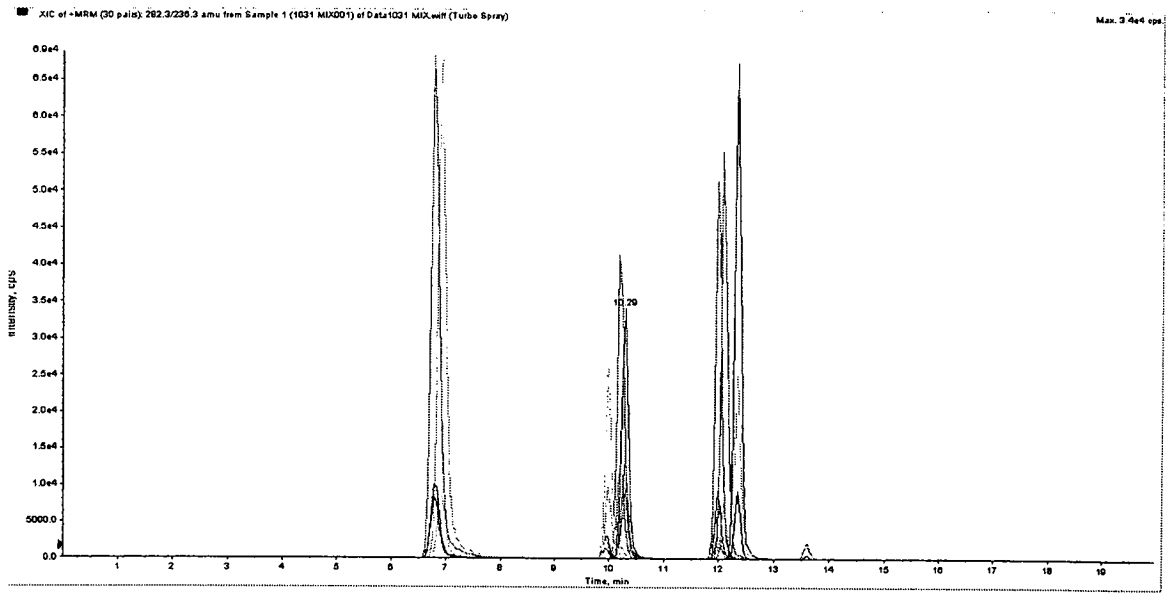


圖 35、2-amino-5-benzophenone LC/MS-MRM 圖

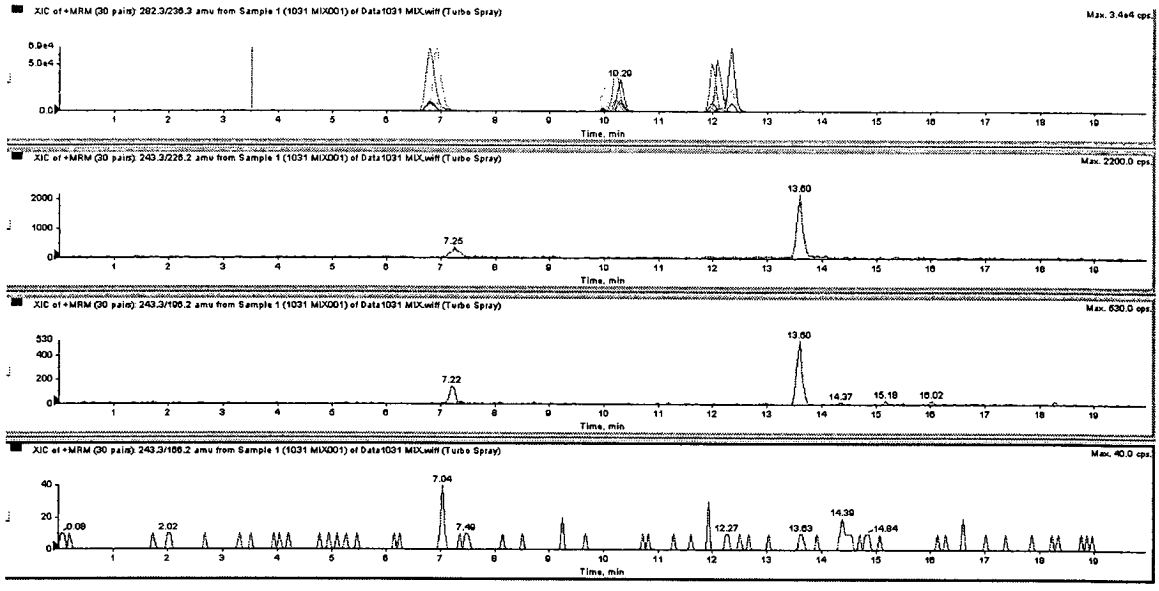


圖 36、Nimetazepam　LC/MS-MRM 圖

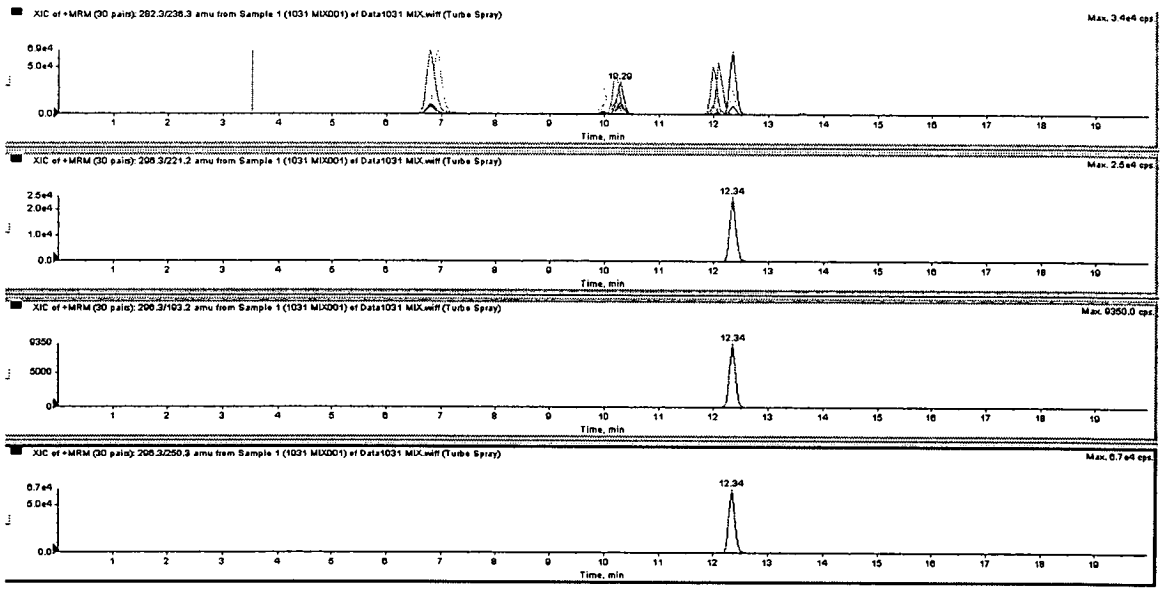


圖 37、Flunitrazepam　LC/MS-MRM 圖

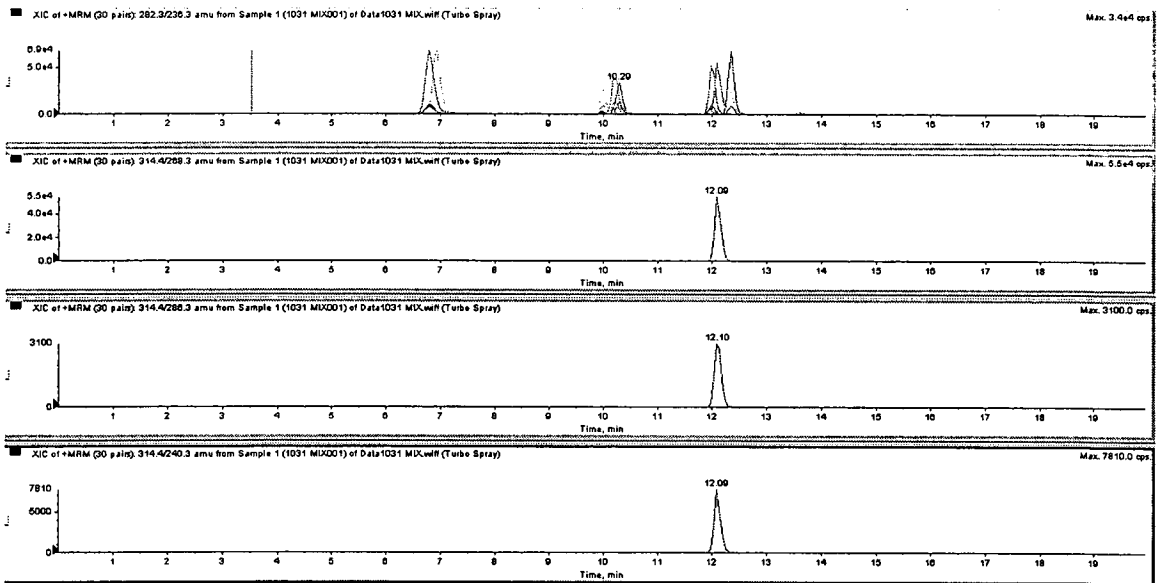


圖 38、Flunitrazepam-D7　LC/MS-MRM 圖

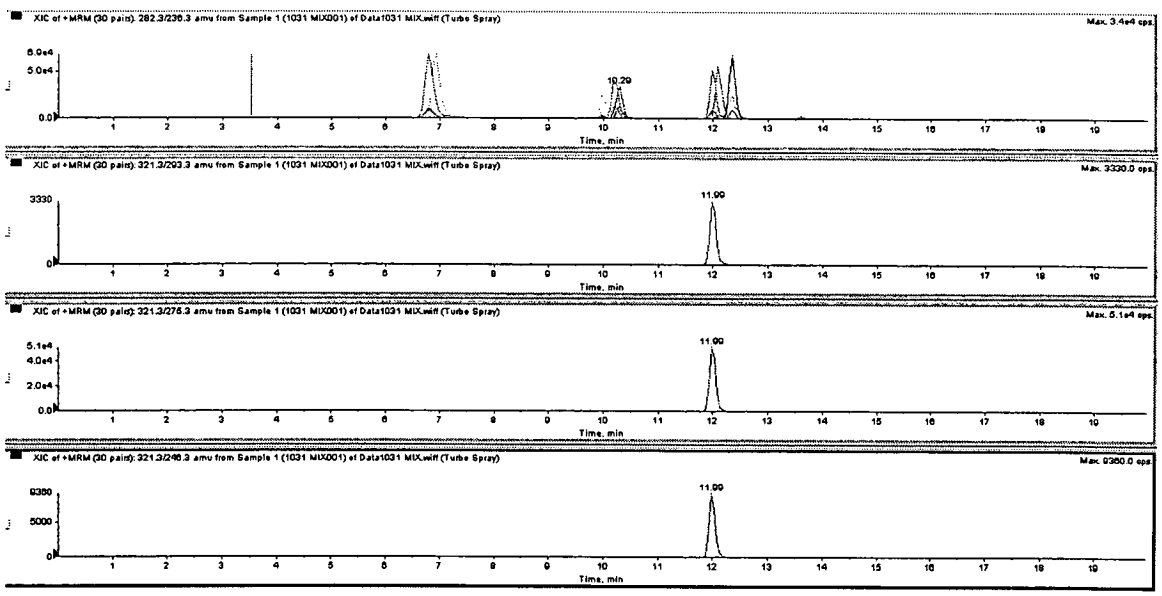


圖 39、7-aminoflunitrazepam　LC/MS-MRM 圖

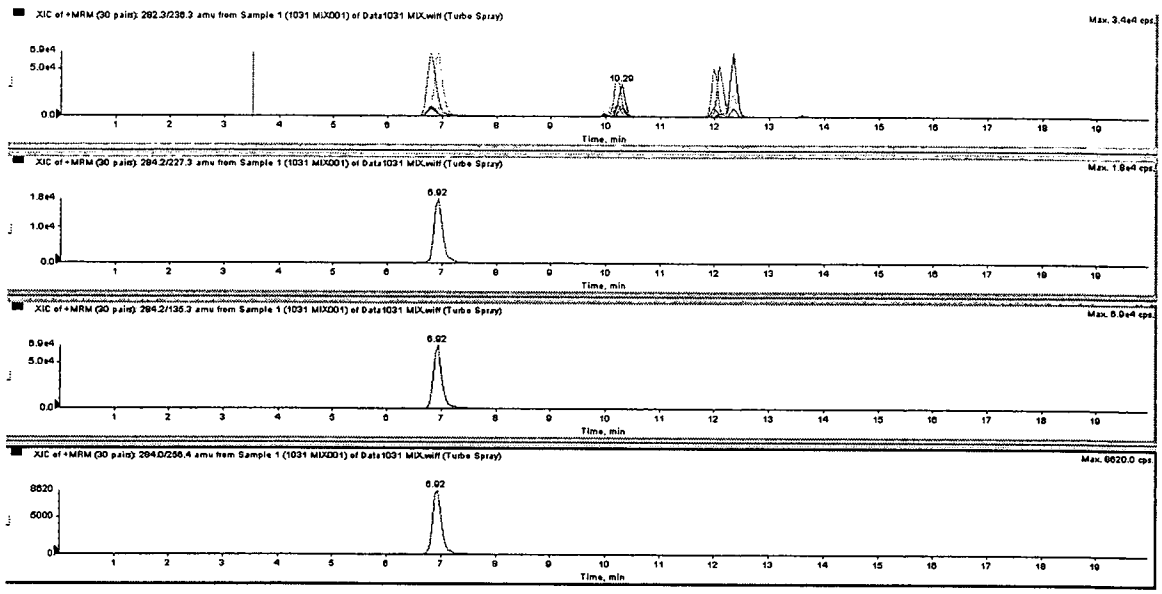


圖 40、7-aminoflunitrazepam-D7　LC/MS-MRM 圖

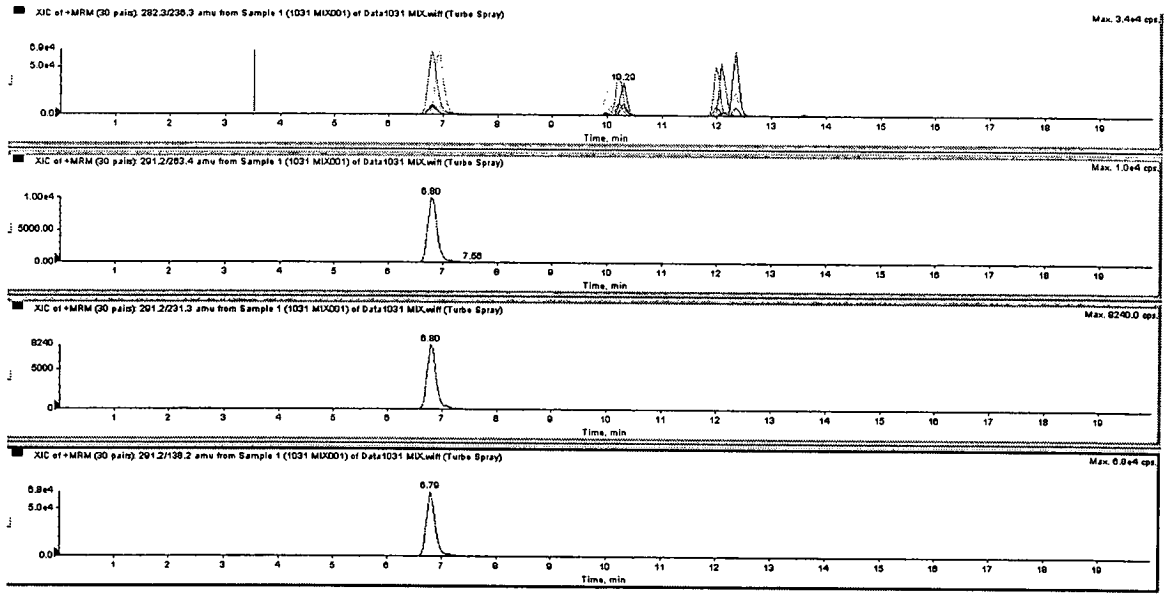


圖 41、N-Desmethylflunitrazepam　LC/MS-MRM 圖

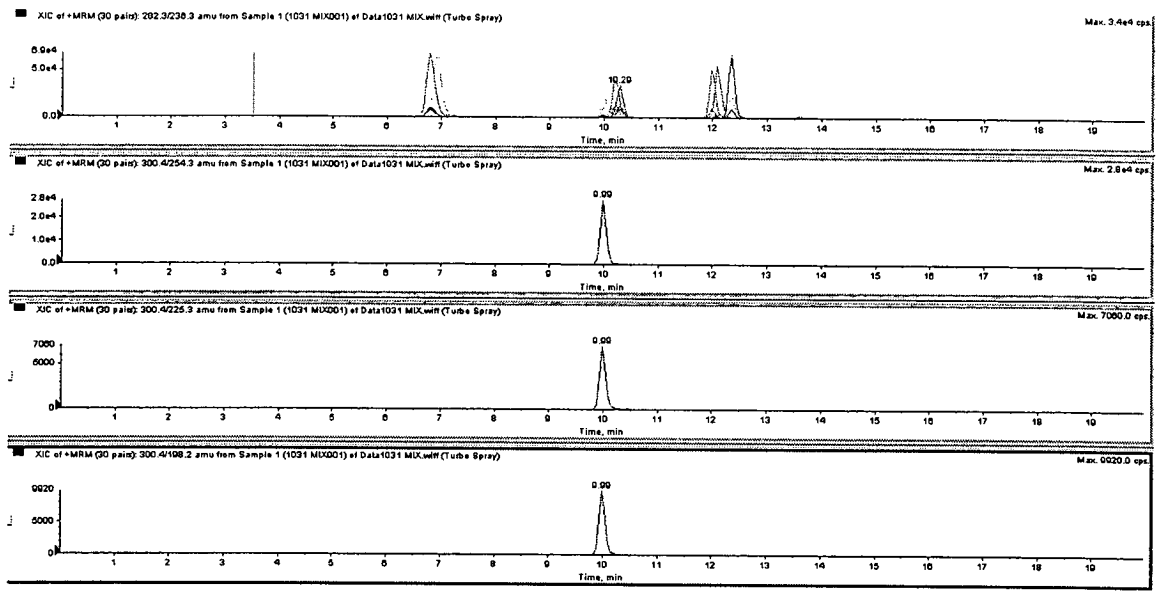


圖 42、N-Desmethylflunitrazepam-D4　LC/MS-MRM 圖

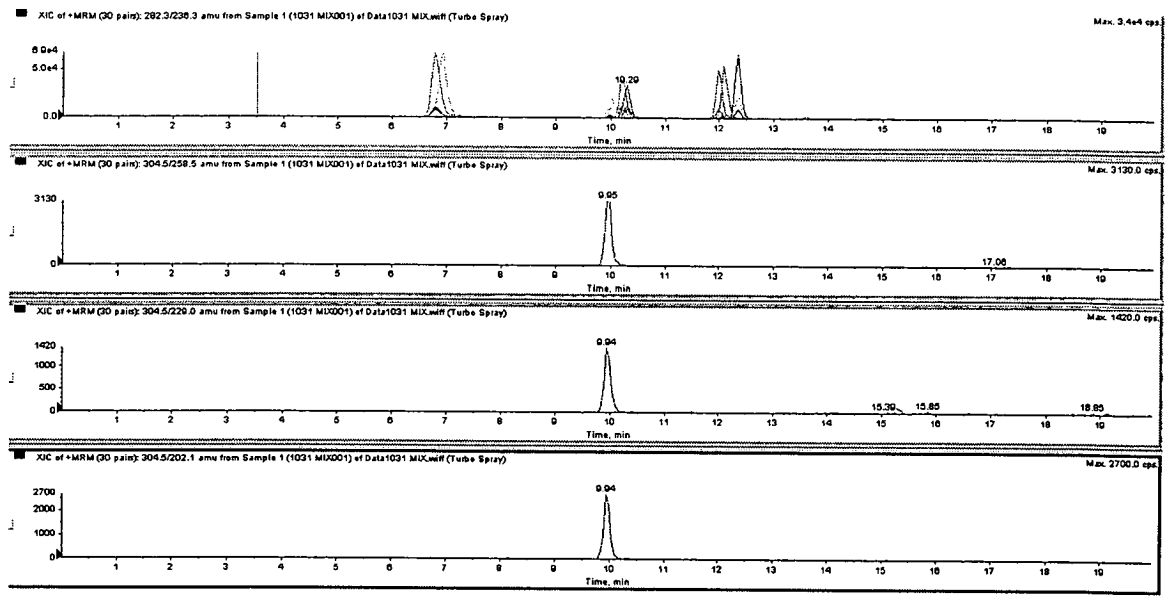


圖 43、Nitrazepam　LC/MS-MRM 圖

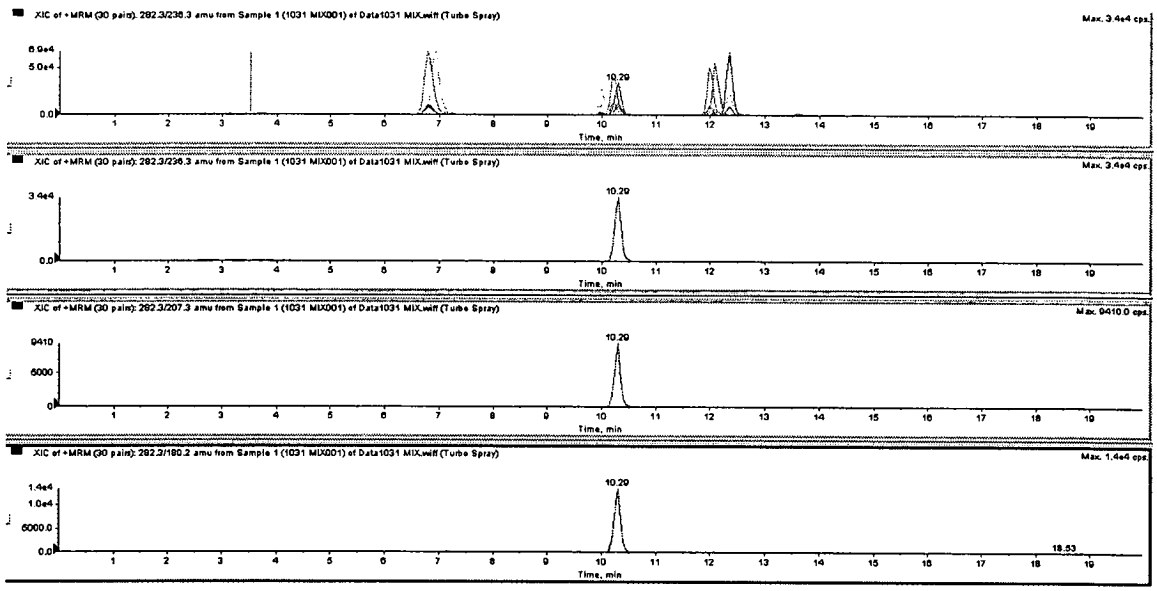


圖 44、Nitrazepam-D5　LC/MS-MRM 圖

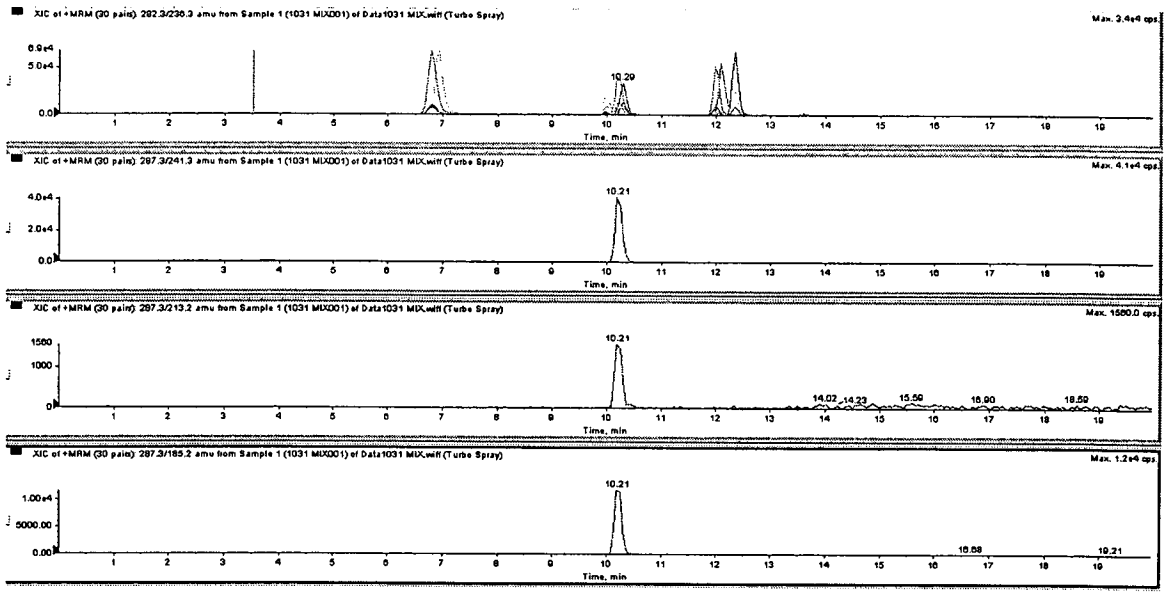
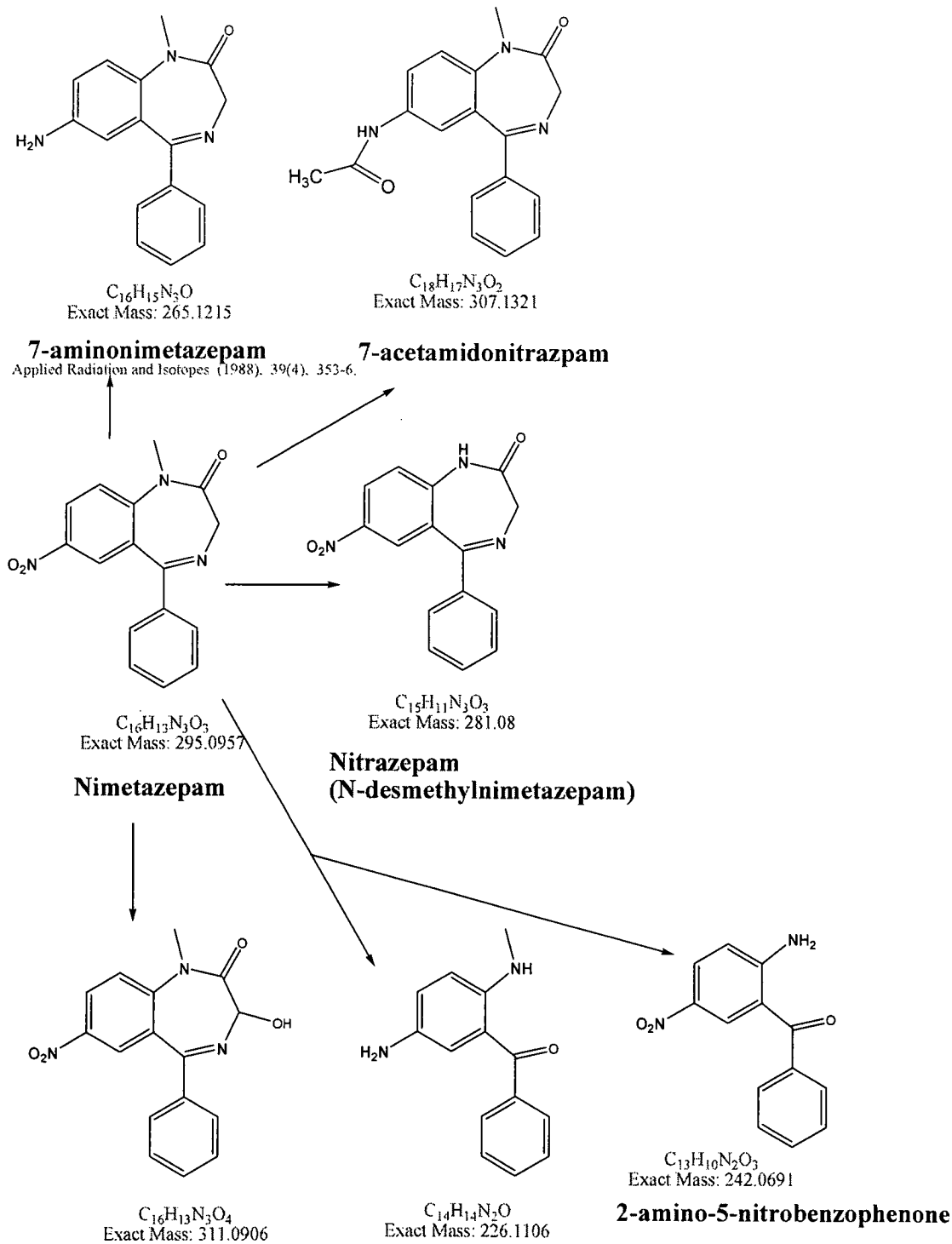


圖 45: Nimetazepam 的可能代謝物



Applied Radiation and Isotopes (1988), 39(4), 353-6.

Chinese Chemical Letters Vol. 13, No. 5, pp 412 – 415 OK
Journal of Medicinal Chemistry (1977), 20(6), 776-81.OK

圖 46: 7-aminonimetazepam 的生成變化

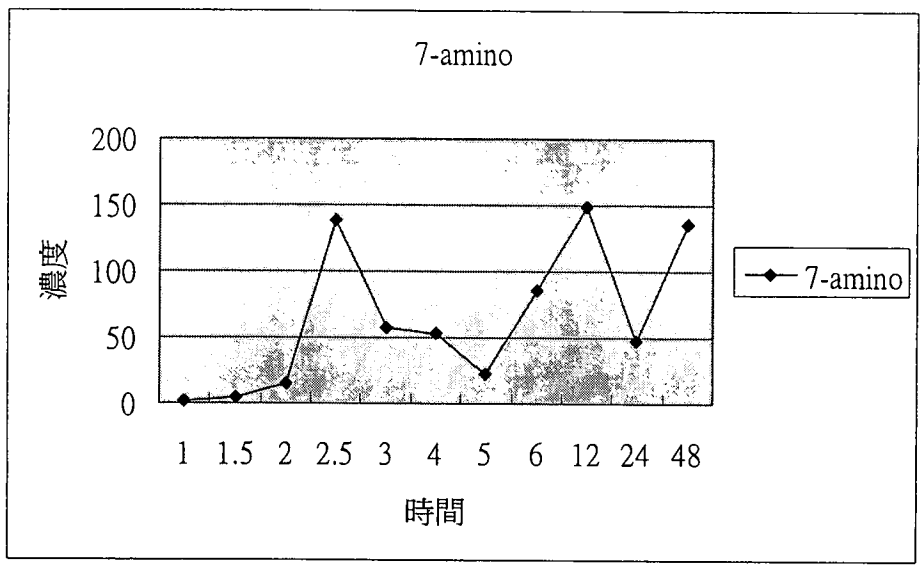


圖 47: 7-acetamidonitrazpam 和 nimetazepam, nitrazepam 的時間變化

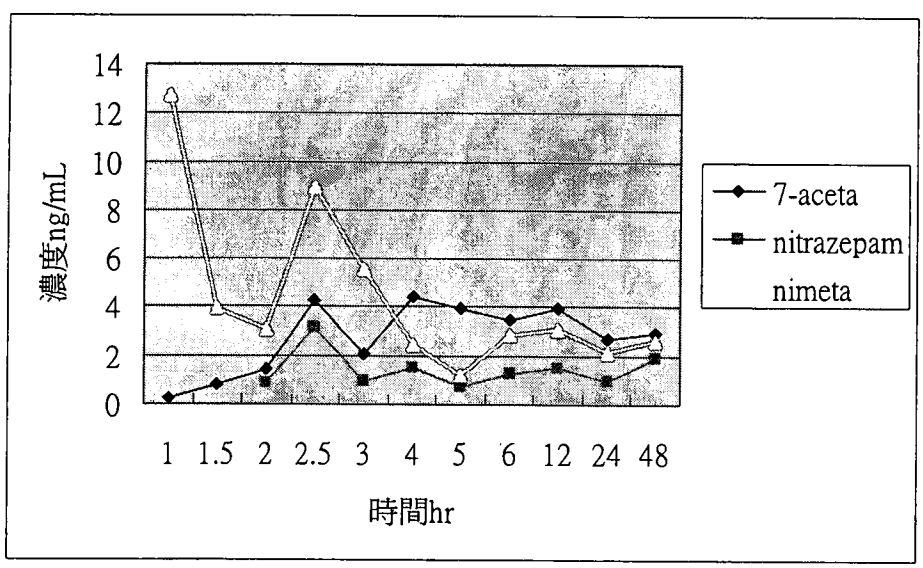
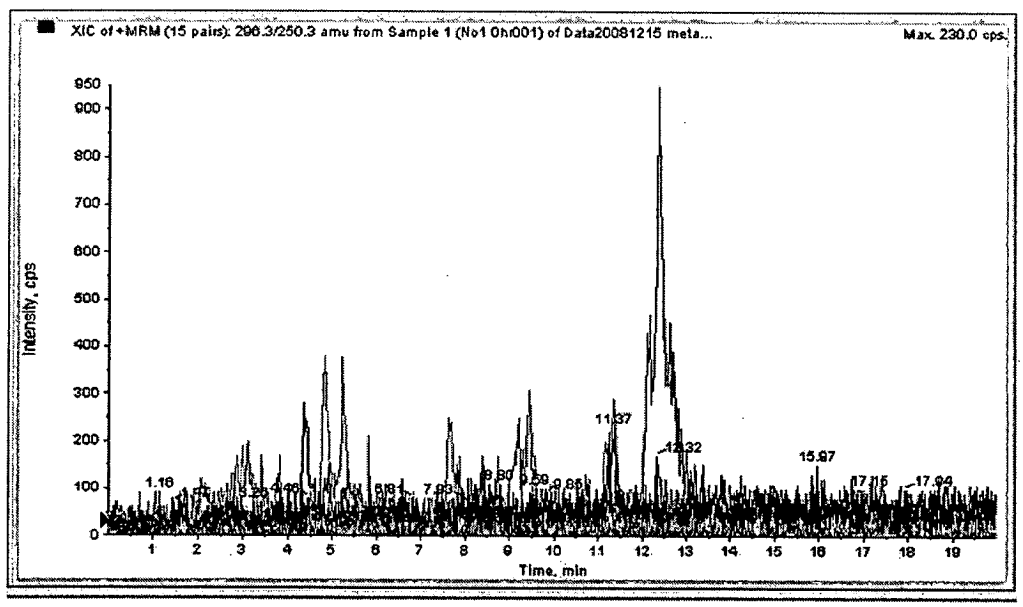


圖 48 : 0 Hr, 0.5 Hr 尿液代謝

0 hr



0.5 hr

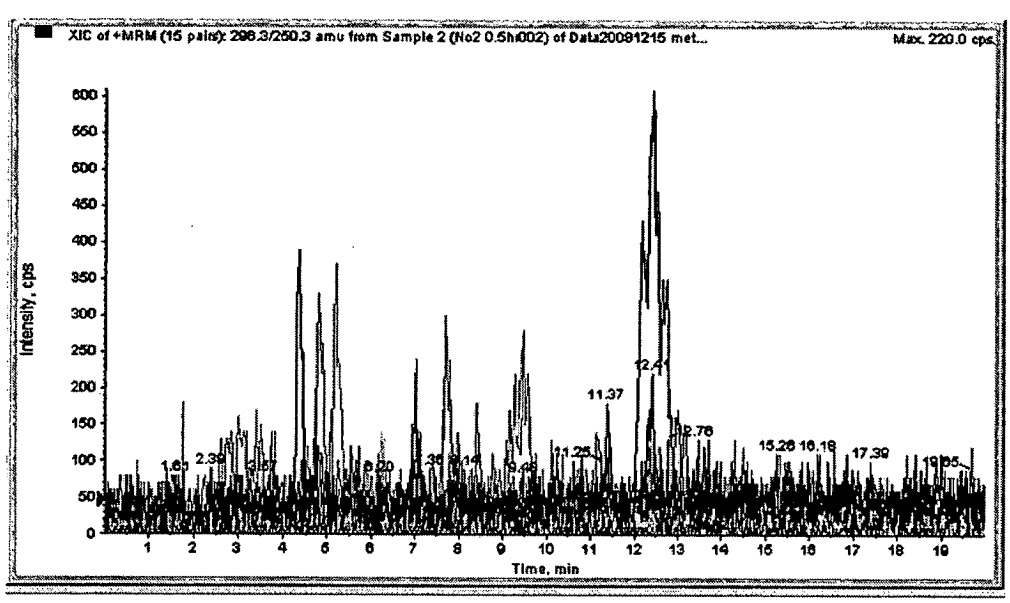
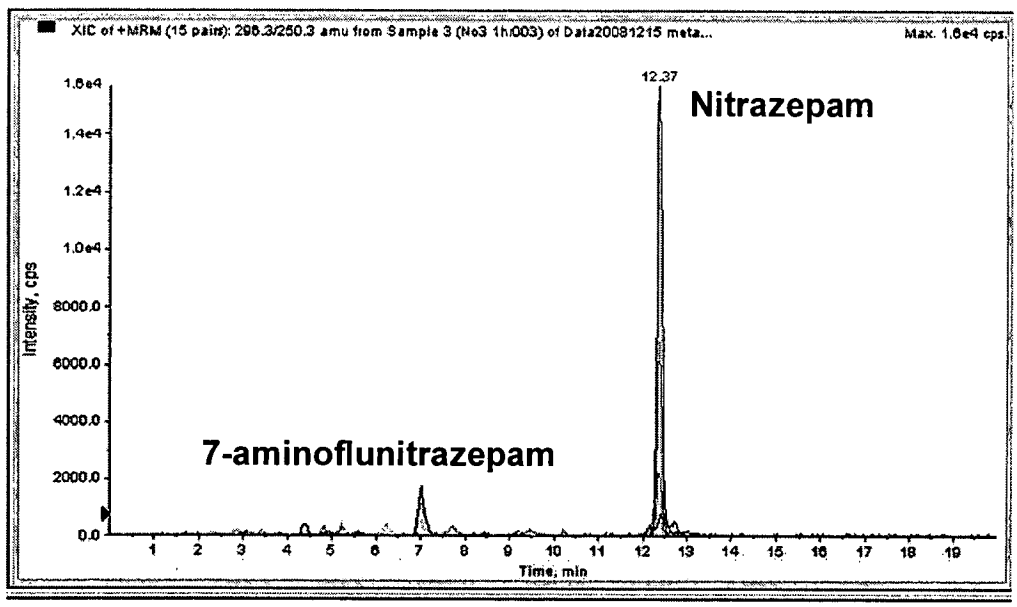


圖 49: 1 Hr, 1.5 Hr 尿液代謝

1 hr



1.5 hr

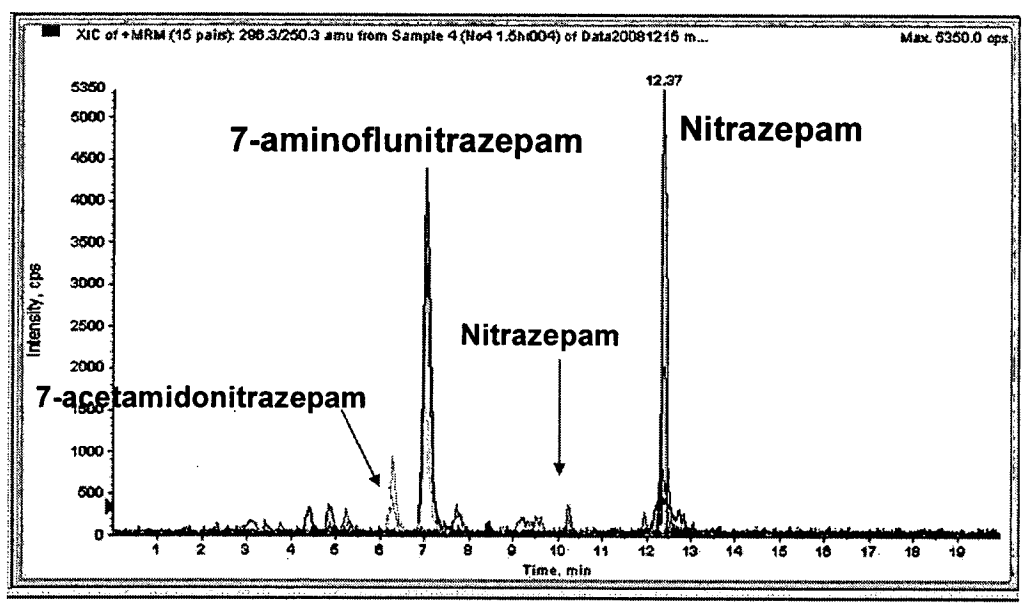
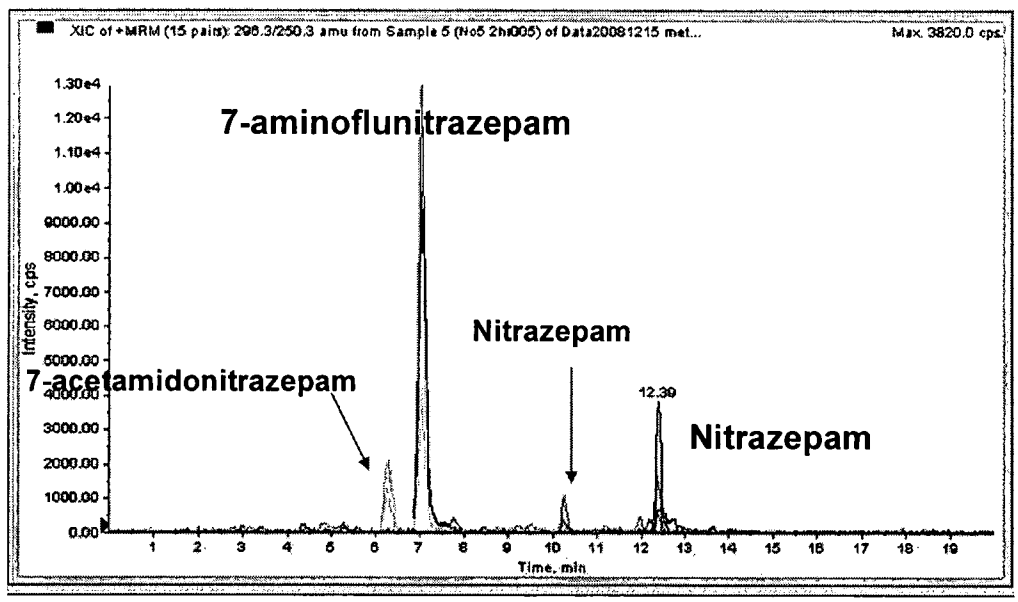


圖 50: 2 Hr, 2.5 Hr 尿液代謝

2 hr



2.5 hr

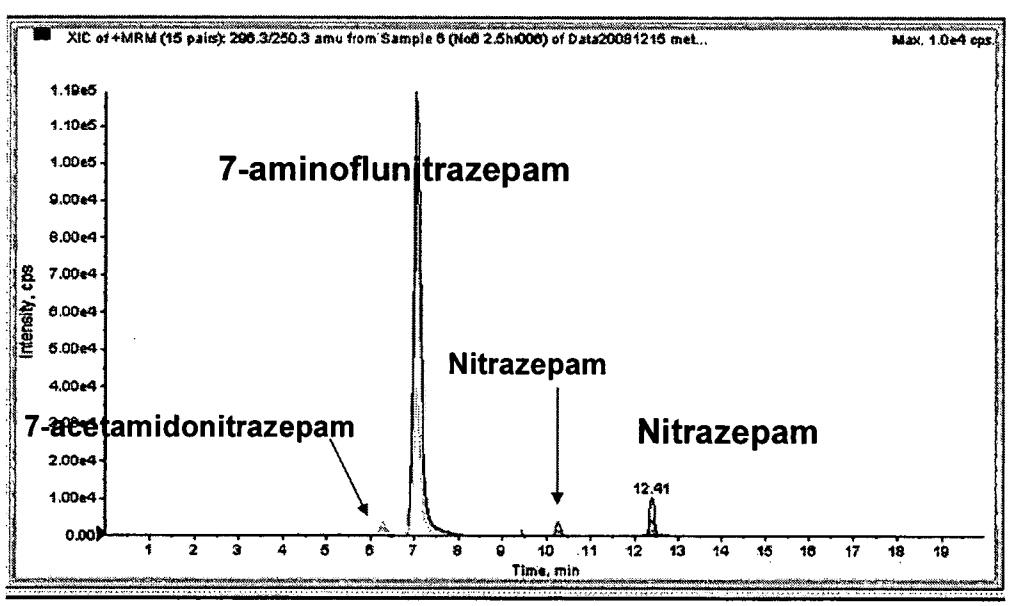
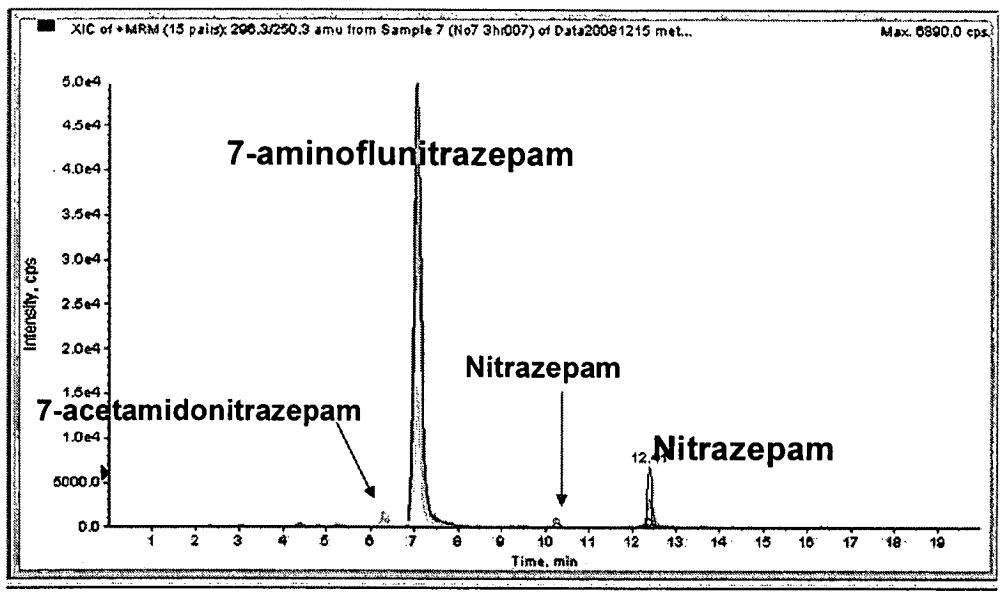


圖 51: 3 Hr, 4 Hr 尿液代謝

3 hr



4 hr

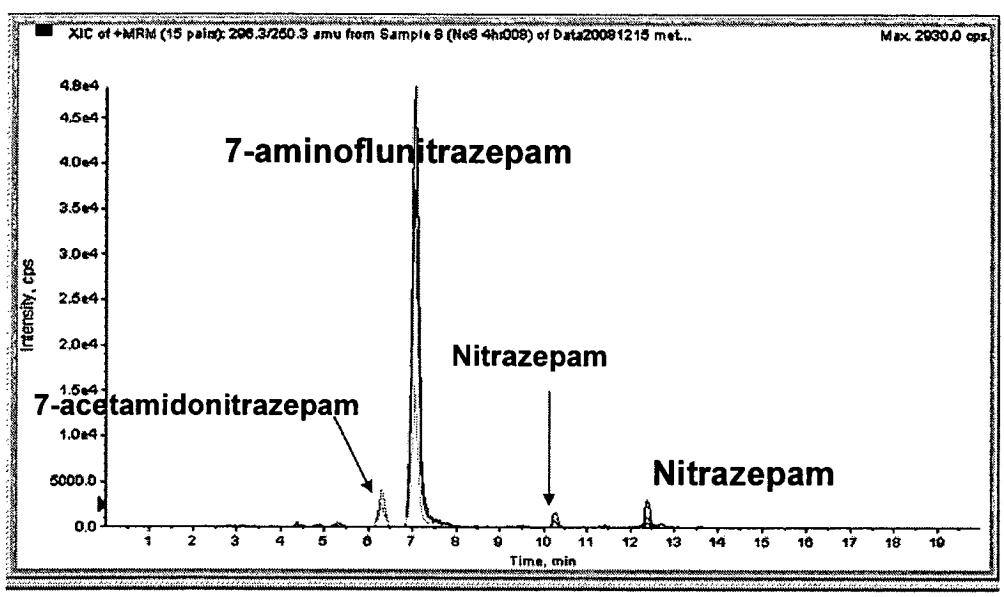
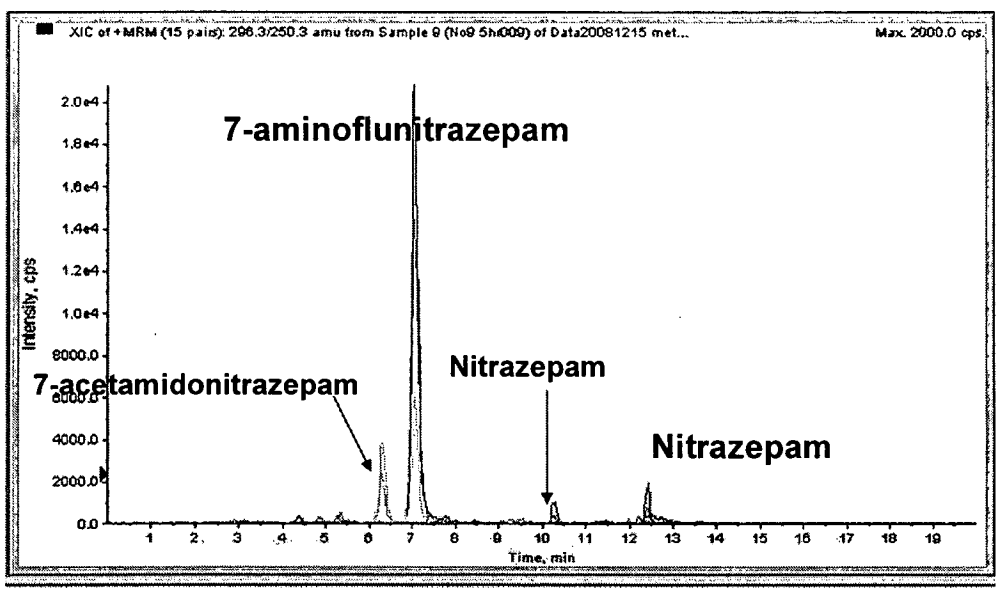


圖 52: 5 Hr, 6 Hr 尿液代謝

5 hr



6 hr

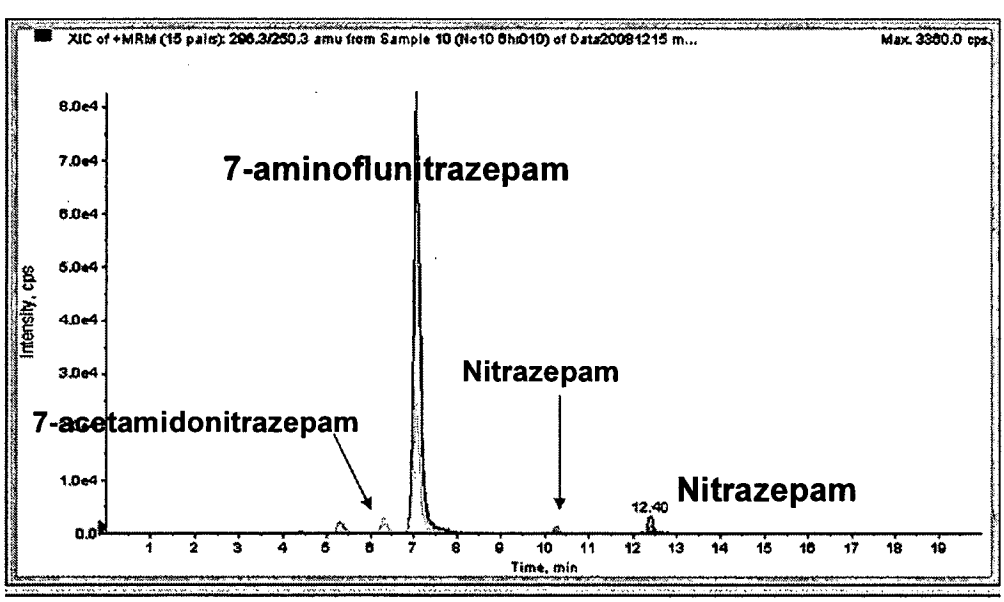
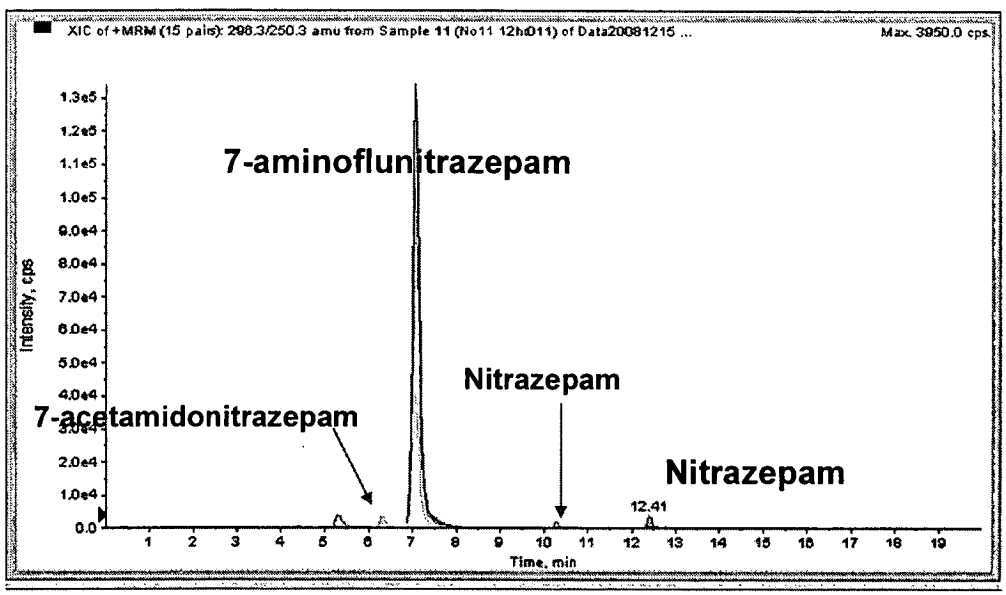


圖 53: 12 Hr, 24 Hr 尿液代謝

12 hr



24 hr

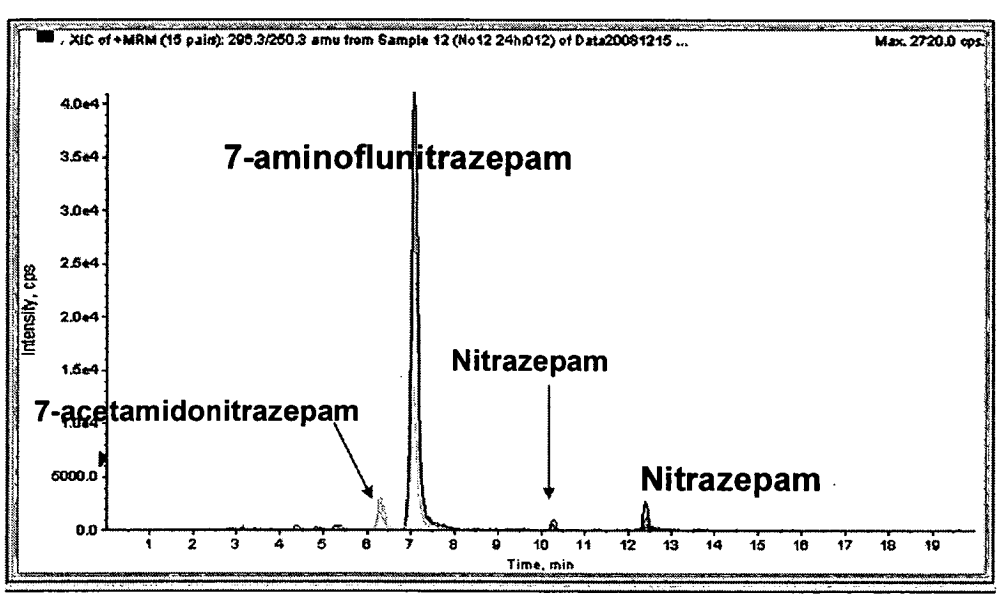


圖 54: 48 Hr 尿液代謝

48 hr

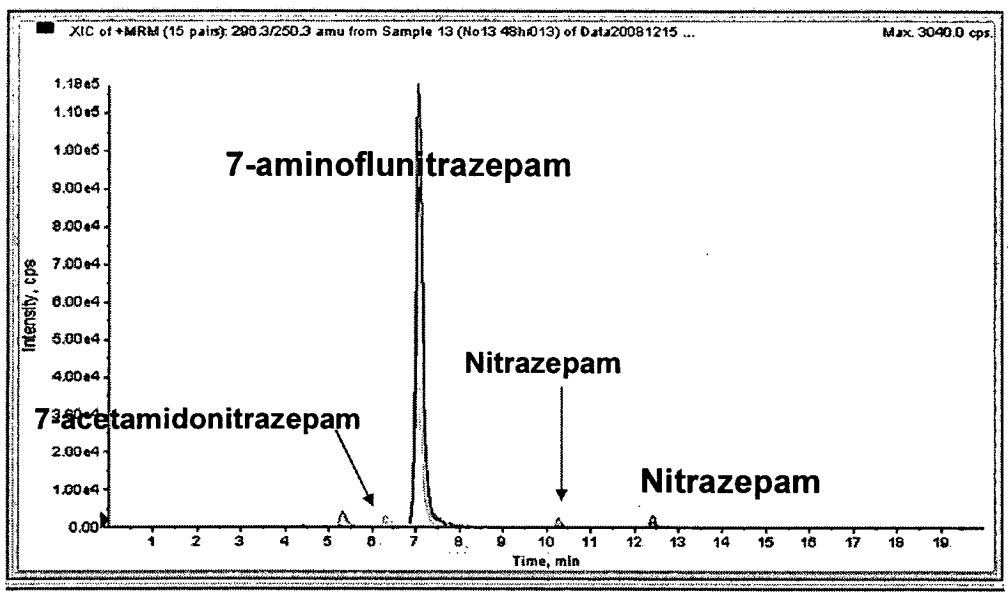
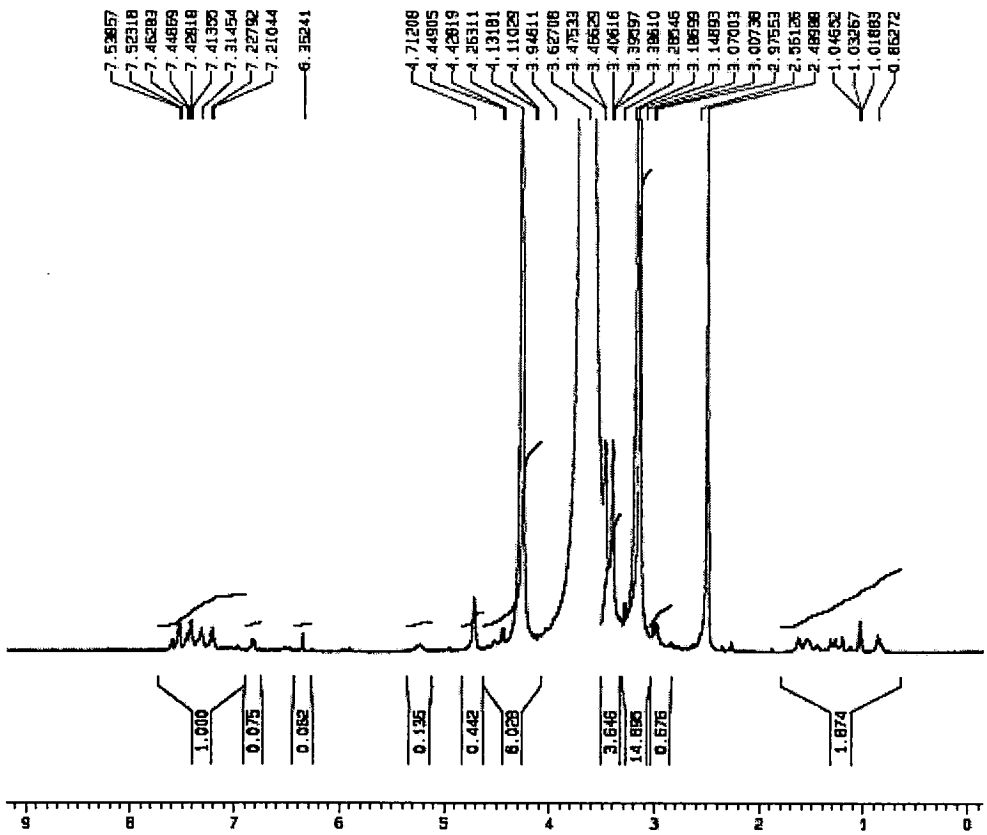



圖 55: 7-aminonimetazepam 的 ^{1}H-NMR data