—原著—

単回摂取後のエチゾラムおよび主要代謝物の尿中排泄プロファイル

和田美暁, 志摩典明, 鎌田 徹, 松田駿太郎, 石川亜香里, 新田篤志,
浅井龍太郎, 掛橋秀直, 藤井史保子, 佐々木啓子, 鎌田寛恵, 片木宗弘

大阪府警察本部刑事部科学捜査研究所
〒541-0053 大阪市中央区本町 1-3-18

Urinary excretion profiles of etizolam and its main metabolites after a single oral dose

Misato Wada, Noriaki Shima, Tooru Kamata, Shuntaro Matsuta, Akari Ishikawa,
Atsushi Nitta, Ryutaro Asai, Hidenao Kakehashi, Shihoko Fujii, Keiko Sasaki,
Hiroe Kamata and Munehiro Katagi

*Forensic Science Laboratory, Osaka Prefectural Police Head Quarters
1-3-18, Hommachi, Chuo-ku, Osaka 541-0053, Japan*

(Received 30 October 2020; accepted 3 December 2020;

Published online 20 January 2021 in J-STAGE DOI: 10.3408/jafst.801)

In this study, the excretion profiles of etizolam (EZ) and its main metabolites including conjugates in urine have been investigated to obtain fundamental information for proving the drug intake in the cases of drug-related crimes. Urine specimens were collected from three volunteers during about 200 h after a single oral ingestion of EZ (1 mg). Three glucuronides (including diastereomers) of 8- α -hydroxyetizolam (EZ-M3) and 1-hydroxyetizolam (EZ-M6) along with free EZ-M3 and EZ-M6 were detected for the first time directly as metabolites of EZ using liquid chromatography-tandem mass spectrometry with a C18 semi-micro column. EZ, EZ-M3 and EZ-M6 were quantified using the authentic standards, and urinary concentrations of the glucuronides were calculated based on the increased amounts of EZ-M3 and EZ-M6 after enzymatic hydrolysis. The quantitative results demonstrated that the ratios of amounts of EZ-M3 and EZ-M6 including their glucuronides excreted in urine to the dose ranged about 18–22% and 9.5–14%, respectively, although that of the unchanged EZ was less than 0.3%. The glucuronide of EZ-M6 reached the highest concentration (more than 200 ng/mL) of metabolites in the early period (within 12 h) after intake. However, in a latter period (24 h or later) after intake, the concentration of EZ-M3 or its glucuronides was higher than that of glucuronide of EZ-M6 in most of the samples. The conjugation percentages of EZ-M3 and EZ-M6 were calculated to be approximately 50% and 98% or higher, respectively. This study suggested that the detectable duration of EZ-M3 (approximately one week

after intake, Limit of detection: 0.05 ng/mL) is longer than those of EZ and EZ-M6. In addition, the enzymatic hydrolysis prior to analysis is expected to prolong the detectable duration of EZ-M3 slightly.

Key words: Etizolam, Metabolite, Urinary excretion profile, LC-MS/MS, Hypnotics

緒 言

日本国内で処方される催眠作用を有する医薬品は、ベンゾジアゼピン系（フルニトラゼパムなど）、非ベンゾジアゼピン系（ゾルピデムなど）、バルビツール酸系（フェノバルビタールなど）、オレキシン受容体拮抗系（スボレキサントなど）およびメラトニン受容体作動系（ラメルテオン）に大別され、概ね30～40種類の薬物が流通している。これらの薬物は処方箋医薬品ではあるものの比較的入手が容易であるため、その催眠作用を利用して、性犯罪や殺人などの凶悪犯罪に悪用されることが多い。

エチゾラム（EZ）は、吉富製薬（現・田辺三菱製薬）によって1983年に開発・承認された、チエノトリアゾロジアゼピン系（広くはベンゾジアゼピン系）に属する薬物で、鎮静・催眠作用と共に、抗不安、抗うつ、筋緊張弛緩作用を有し、幅広い疾患に適応がある。一方、その臨床での適応に付随して、乱用性が危惧されており、向精神薬として規制する必要性が議論されてきた。国際機関である薬物依存専門委員会（Expert Committee on Drugs Dependence, ECDD）および国際麻薬統制委員会（International Narcotics Control Board, INCB）はEZの乱用性を中等度と評しているものの¹⁾、流通している国（日本、イタリア、インドなど）が少ないこともあって、近年まで Psychotropic Substances（向精神薬）としての規制はなかったが、2019年にECDDによって Psychotropic Substances（Schedule IV）として規制すべきとの通告および勧告がなされた²⁾。一方、日本におけるEZの流通量は発売当初から多く、2010年の統計では、ベンゾジアゼピン系および非ベンゾジアゼピン系を含む乱用症例のなかで第三位の症例数になっており^{3,4)}、乱用リスクの高い薬剤として認められ、国際機関に先立ち

2016年から麻薬および向精神薬取締法の第三種向精神薬として規制されている⁵⁾。

このような歴史を有するEZは、自己による乱用だけでなく、性犯罪や殺人に関連して悪用されるケースも多く、法薬毒物分野において重要な薬物である。通常、催眠作用を示す薬物が性犯罪などに悪用されたケースにおいて、その使用の証明には被害者の尿試料が第一選択として鑑定に供される。薬物の尿中排泄プロファイルは、尿鑑定を実施する際の基礎データとして必須であり、そのデータに基づいて、分析ターゲットとして最適な成分（未変化体あるいは代謝物）の選定やその検出可能期間の推定を行うほか、成分の検出／不検出が被害日時からの経過時間と整合性があるかなど、供述や事件の信憑性を判断するうえでも重要である。これまでに、流通量の多い他の睡眠薬（フルニトラゼパムおよびトリアゾラムなど）では、ヒトについての代謝物を含めた尿中排泄プロファイルが報告されており⁶⁻¹⁰⁾、検出可能期間などについての情報を取得することが可能である。しかしながら、EZについては、国際的な流通が少ないこともあって、ヒトにおける尿中排泄プロファイルに関する報告はなく、1978年にKatoらによってラットを対象にした尿および糞便排泄が報告されているのみである¹¹⁾。当該データは人における知見ではないため種差を考慮する必要があるうえに、当時の分析装置では低濃度領域（sub-ng/mL）の推移や第二相代謝物（抱合代謝物）を十分に検討するには限界があった。

そこで本研究では、EZを単回摂取した被験者3名について、液体クロマトグラフィー／タンデム質量分析（LC-MS/MS）を用いて尿中から未変化体および主要代謝物（第一相および第二相代謝物）を高感度に検出すると共に、摂取証明を行う上で重要なデータとなるそれらの尿中排泄プロファイルを検

討し、分析ターゲットとして最適な成分や摂取証明が可能な期間について考察した。

材料および方法

1. 実験材料

EZ, ならびにその代謝物である 8 位エチル基 α -水酸化体 (EZ-M3) および 1 位メチル基水酸化体 (EZ-M6) は、吉富製薬 (現・田辺三菱製薬) から提供を受けた。エチゾラム-d3 (EZ-d3, 内部標準物質) のメタノール溶液 (100 μ g/mL) および β -グルクロニダーゼ Type K-A (from *E. coli*, グルクロニダーゼ活性: 1,660 units/mg protein) はいずれも Sigma-Aldrich 製を使用した。EZ, EZ-M3 および EZ-M6 は、1 mg/mL のメタノール溶液を標準溶液として調製後冷凍保存し、EZ-d3 と共に使用直前に適宜超純水あるいはブランク尿で希釈して用いた。ブランク尿は富士フィルム和光純薬製アジア人ヒト尿を使用した。移動相の調製に使用した 1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液 (高速液体クロマトグラフ用) およびメタノール (LC/MS 用), ならびにその他の有機溶媒 (特級) はいずれも富士フィルム和光純薬から購入した。

2. EZ 摂取者からの採尿

本研究は、日本法科学技術学会倫理審査委員会の審査と承認 (承認番号: 31M5) を受けた手順に基づき行った。なお、本研究で対象となった被験者においては、本研究に参加する 1 ヶ月前まで遡り、EZ を摂取していないことを確認している。

本研究では、デパス®錠 1 mg (EZ として 1 mg を含有) を単回経口摂取した被験者 3 名 (Subjects 1-3: 30代男性, 40代男性, 40代男性) から、摂取直前、および摂取後最長 215 時間にわたって概ね 4 ~ 8 時間毎に、尿試料 (尿量を記録したうえで約 10 mL) の提供を受けた。尿試料は分析まで -20 °C で保存した。

3. 前処理 (試料調製)

3.1 除タンパク処理 (定性分析および抱合体分析用)

尿 100 μ L にメタノールを 3 倍量 (300 μ L) 加えて攪拌後、遠心 (9,000 rpm, 5 min, 4 °C) して除タンパク処理を行った。遠心後、上清 100 μ L に蒸

留水 100 μ L を加えて混和し、その 5 μ L を LC-MS/MS に供した。また、 β -グルクロニダーゼによる加水分解は、尿 100 μ L に 10% 酢酸および 0.5 mol/L の酢酸緩衝液 (pH 5) を添加して pH 5 に調整した後、 μ -グルクロニダーゼ 0.1 mg (166 unit) を加え、37 °C の温浴中で 3 時間インキュベートして行った。その後、上述の方法でメタノールによる除タンパク処理を行った後、上清 100 μ L に蒸留水 100 μ L を加えて混和し、その 5 μ L を LC-MS/MS に供した。

3.2 液-液抽出 (定量分析用)

尿 100 μ L に、内部標準物質として EZ-d3 水溶液 (1 ng/mL) 100 μ L を添加し、10% 酢酸および 0.5 mol/L の酢酸緩衝液 (pH 5) を用いて pH 5 に調整した後、クロロホルム/2-プロパノール (3:1, v/v) 1000 μ L を加えて攪拌した。その後、遠心分離 (9000 rpm, 10 min, 4 °C) を行った後、有機層 (下層) を分取し、窒素気流下、40 °C で穏やかに蒸発乾固した。得られた残さを 10% メタノール水溶液 100 ~ 1000 μ L に再溶解した後、5 μ L を LC-MS/MS に供した。また、 β -グルクロニダーゼによる加水分解は、尿 100 μ L に、EZ-d3 水溶液 (1 ng/mL) 100 μ L を添加した後、10% 酢酸および 0.5 mol/L の酢酸緩衝液 (pH 5) を用いて pH 5 に調整し、 β -グルクロニダーゼ 0.1 mg (166 unit) を加え、37 °C の温浴中で 3 時間インキュベートして行った。その後、上述の方法で抽出、蒸発乾固操作および再溶解を行った後、5 μ L を LC-MS/MS に供した。

有機溶媒の取り扱いにはドラフト内で実施すると共に、各有機溶媒の廃棄は溶媒ごとに適切に行った。

4. LC-MS/MS

4.1 定性分析および抱合体分析

液体クロマトグラフに島津製作所製 Prominence, 質量分析装置に AB Sciex 製 Triple TOF 5600 を使用し、各成分のプロトン化分子をプリカーサイオンとしてプロダクトイオンスペクトルの測定を以下の条件で実施した。

カラム: 化学物質評価研究機構製 L-column2 ODS (1.5 mm i.d. $\times$ 150 mm, 粒子径 5 μ m), カラム温度: 40 °C, 移動相 A: 5% メタノール (10 mmol/L 酢酸アンモニウム含有), 移動相 B: 95% メタノール (10 mmol/L 酢酸アンモニウム含有),

グラジエント条件：B 0%–リニアグラジエント（0–15 min）–B 100%（15–20 min），流速：0.1 mL/min，ライン内径：130 μ m，エレクトロード内径：100 μ m，イオン化法：エレクトロスプレーイオン化（ESI）ポジティブモード，イオン化電圧：5.5 kV，ターボスプレー温度：500 °C，デクラスタリング電圧（DP）：80 V，コリジョンエネルギー（CE）：35 eV。

質量校正は分析毎に外部標準法で実施し，質量校正用の標準試料として ESI ポジティブモード用の Positive Calibration Solution（AB Sciex 製）を用いた。

4.2 定量分析およびインソース衝突誘起解離（In-Source CID）分析

液体クロマトグラフに島津製作所製 Prominence，質量分析装置に AB Sciex 製 QTRAP6500 を使用し，以下の条件で測定を実施した。

カラム：化学物質評価研究機構製 L-column2 ODS（1.0 mm i.d. $\times$ 50 mm，粒子径 3 μ m），カラム温度：40 °C，移動相 A：5% メタノール（10 mmol/L 酢酸アンモニウム含有，組成：メタノール 50 mL + 超純水 940 mL + 1 mol/L 酢酸アンモニウム 10 mL），移動相 B：95% メタノール（10 mmol/L 酢酸アンモニウム含有，組成：メタノール 950 mL + 超純水 40 mL + 1 mol/L 酢酸アンモニウム 10 mL），グラジエント条件：B 0%–リニアグラジエント（0–10 min）–B 100%（10–20 min），流速：0.05 mL/min，ライン内径：50 μ m，エレクトロード内径：50 μ m，イオン化法：ESI ポジティブモード，イオン化電圧：5.5 kV，ターボスプレー温度：500 °C。

定量分析は選択反応モニタリング（SRM）により実施し，各成分の SRM トランジションは，Table 1 に示すように，プロトン化分子をプリカーサイオンとし，各成分の構造を反映したプロダクトイオンを選択して構築した。

In-Source CID 分析は，DP を 250 V，プリカーサイオンを m/z 359.1（EZ-M3 および EZ-M6 のプロトン化分子），CE を 35 eV に設定し，プロダクトイオンスキャンを実施した。

Table 1 Optimized SRM parameters of EZ, EZ-M3, RZ-M6 and an internal standard (IS).

Compound	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	DP (V)	EP (V)	CE (eV)	CXP (V)
EZ	343.1	<u>314.1</u>	91	10	31	6
		259.1	91	10	45	6
EZ-M3	359.1	<u>341.1</u>	81	10	27	6
		315.1	81	10	27	6
EZ-M6	359.1	<u>286.1</u>	96	10	31	6
		341.1	96	10	43	6
EZ- <i>d</i> ₃ (IS)	346.1	<u>317.1</u>	91	10	31	6

The transition for quantification is underlined. Q1, quadrupole 1; Q3, quadrupole 3; DP, declustering potential; EP, entrance potential; CE, collision energy; CXP, collision cell exit potential; EZ, etizolam; EZ-M3, 8- α -hydroxyetizolam; EZ-M6, 1-hydroxyetizolam; EZ-*d*₃, etizolam-*d*₃.

結果および考察

1. EZ および代謝物の検出

Kato らのラットを用いた報告によると¹¹⁾，EZ は摂取量の約30%が尿中に排泄され，その多くは代謝物として排泄されることが示されている．代謝物としては，8 位エチル基 α -水酸化体（EZ-M3）および 1 位メチル基水酸化体（EZ-M6）が同定されており，これらはさらに第二相代謝（グルクロン酸抱合）を受けることが， β -グルクロニダーゼによる加水分解により間接的に確認されている．一方，ヒトにおいても代謝物の検出例が報告されており，EZ と共に EZ-M3 および EZ-M6 が検出されている^{12,13)}．特に主代謝物は EZ-M3 と考えられており，これを摂取証明の指標として，いくつかの分析法が推奨されている^{14,15)}。

本研究では，第一相代謝物である EZ-M3 および EZ-M6 と共に，これまで直接検出の報告がない第二相代謝物（抱合体）をターゲットとして，EZ 単回摂取者の尿を対象に代謝物の探索を行った．その結果を Fig. 1 に示す．未変化体 EZ が 17.2 分に検出されると共に，EZ-M3 および EZ-M6 が，それぞれ 15.1 分および 16.4 分に検出され，いずれも標準物質の保持時間および質量スペクトルによく一致した．さらに，EZ-M3 および EZ-M6 の抱合体を採

(A) Before enzymatic hydrolysis

(B) After enzymatic hydrolysis

(C)

Fig. 1 Extracted ion chromatograms obtained from a urine specimen collected from Subject 3 (8–11 h) (A) before and (B) after enzymatic hydrolysis, and (C) product ion mass spectra of EZ and its metabolites obtained by liquid chromatography-high-resolution tandem mass spectrometry (LC-HR-MS-MS). Each protonated molecule was selected as a precursor ion.

EZ, etizolam; EZ-M3, 8- α -hydroxyetizolam; EZ-M6, 1-hydroxyetizolam; (a), EZ-M3-glucuronide 1 (EZ-M3-G1); (b), EZ-M3-glucuronide 2 (EZ-M3-G2); (c), EZ-M6-glucuronide (EZ-M6-G).

索したところ、硫酸抱合体は不検出であったものの、グルクロン酸抱合体と考えられる3つのピーク (Peaks (a)–(c), 各成分のプロトン化分子: Peak (a), m/z 535.1054; Peak (b), m/z 535.1051; Peak (c), m/z 535.1053) が検出され、グルクロン酸抱合体のプロトン化分子の計算精密質量 ($[C_{23}H_{24}ClN_4O_7S]^+$: 535.1049) との誤差はいずれも 1 ppm 未満であった。また、それらのプロトン化分子 (m/z 535.1) をプリカーサイオンとして測定したプロダクトイオンスペクトルには、グルクロン酸が脱離したアグリコン (EZ-M3 および EZ-M6) 由来のイオン (m/z 359.073~359.075) ならびにそれらに特徴的なプロダクトイオン (m/z 341) が併せて観察された (Fig. 1C)。しかしながら、EZ-M3 および EZ-M6 は構造異性体の関係にあるため、上記イオン以外に各アグリコンに特徴的なイオンが観察されなかったプロダクトイオンスペクトルのみではピーク (a)–(c) が、EZ-M3 および EZ-M6 のいずれのグルクロン酸抱合体であるかを特定

することは困難であった。そこで、In-Source CID 法によって、ピーク (a)–(c) のアグリコンの特定を試みた。インソースにおいて高電圧 (DP: 250 V) を印加し、グルクロン酸を脱離させて得られるアグリコン (m/z 359.1) をプリカーサイオンとしてプロダクトイオンスキャンを実施した。その結果、ピーク (a) および (b) は EZ-M3, ならびにピーク (c) は EZ-M6 のプロダクトイオンスペクトルと良く一致したため、ピーク (a) および (b) は EZ-M3 のグルクロン酸抱合体 (ピーク (a): EZ-M3-glucuronide-1 (EZ-M3-G1), ピーク (b): EZ-M3-glucuronide-2 (EZ-M3-G2)), ならびにピーク (c) は EZ-M6 のグルクロン酸抱合体 (EZ-M6-glucuronide (EZ-M6-G)) であることが推定された (Fig. 2)。なお、EZ-M3 は不斉炭素を有するため、これに D-グルクロン酸が付加することによって、ジアステレオマー (EZ-M3-G1 および EZ-M3-G2) として2成分にピーク分離して検出されたものと考えられる。

Fig. 2 Extracted ion chromatograms obtained from an urine specimen collected from Subject 3 (8–11 h) and product ion mass spectra of peaks (a)–(c) obtained by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS-MS). Each aglycone (m/z 359.1) of the glucuronides was selected as a precursor ion. Declustering potential (DP) and collision energy (CE) were set at 250 V and 35 eV, respectively. (a), EZ-M3-glucuronide 1 (EZ-M3-G1); (b), EZ-M3-glucuronide 2 (EZ-M3-G2); (c), EZ-M6-glucuronide (EZ-M6-G).

Fig. 3 Proposed metabolic pathways for EZ in humans.

EZ, etizolam; EZ-M3, 8- α -hydroxyetizolam; EZ-M6, 1-hydroxyetizolam; EZ-M3-G1, EZ-M3-glucuronide 1; EZ-M3-G2, EZ-M3-glucuronide 2; EZ-M6-G, EZ-M6-glucuronide.

また、 β -グルクロニダーゼでの加水分解によってピーク(a)-(c)はいずれも消失し、EZ-M3 および EZ-M6 の有意な増加が確認された (Fig. 1)。このことは、これらのピークが EZ-M3 および EZ-M6 のグルクロン酸抱合体であることを強く支持するものである。

従って、EZ の代謝経路は Fig. 3 に示す通りであると考えられる。

2. 分析バリデーション

EZ, EZ-M3 および EZ-M6 の定量分析に先立ち、本法のバリデーションを実施した (Table 2)。回収率はいずれの成分も90%以上、検出限界 (S/N ≥ 5) および定量限界 (S/N ≥ 10) はそれぞれ0.05 ng/mL および0.1 ng/mL であった。検量線は0.1~300 ng/mL の範囲で良好な直線性を示したほか、真度および精度はそれぞれ11%および7%未満で、定量値の信頼性を十分に担保できる良好な結果が得られた。尿から抽出された夾雑物によるイオンサプレッションは5%未満であり、本法はマトリックスによる影響が少ないことが示された。

3. EZ 単回摂取後の尿中排泄プロファイル

3.1 EZ, EZ-M3 および EZ-M6 の濃度推移

本研究では EZ 錠 (1 mg) の単回摂取者3名 (30 および40歳代の男性) について、摂取後最長215時間にわたって採尿を実施し、当尿試料について酵素加水分解を行わずに定量分析を実施した。その結果を Table 3 に示す。未変化体 EZ については、摂取後7あるいは8時間までに最高濃度 (3.1~3.8 ng/mL) に達し、その後は徐々に減少して、摂取後32~44時間で本法の検出限界である0.05 ng/mL 付近にまで減少した。また、代謝物である EZ-M6 も、EZ と同様の濃度レベルで、摂取後7~16時間までに最高濃度 (1.4~3.2 ng/mL) に達した後、摂取後38~48時間には検出限界 (0.05 ng/mL) 付近にまで減少した。一方、EZ-M3 は最高濃度が46~81 ng/mL で、EZ および EZ-M6 と比較して高濃度であったほか、摂取後32~36時間で最高濃度に達する被験者 (Subject 2) もあり、最高濃度に到達する時間の個人差が比較的大きかった。また、いずれの被験者においても、時間経過に伴う濃度減少は緩や

Table 2 Validation data for the LC-MS-MS procedure established in the present study.

	Analyte		
	EZ	EZ-M3	EZ-M6
Recovery (%) ^{a)}			
(10 ng/mL)	110 ± 4	94 ± 9	109 ± 15
(100 ng/mL)	101 ± 8	96 ± 4	95 ± 7
Correlation coefficient (r) ^{b)}	0.999	0.999	0.999
Accuracy relative error (%)			
Intra-day			
(0.5 ng/mL)	6.8	-4.3	4.6
(5 ng/mL)	-1.4	1.4	-1.3
(50 ng/mL)	3.2	-0.6	2.1
Inter-day			
(0.5 ng/mL)	5.2	4.2	10.0
(5 ng/mL)	-0.8	10.1	8.3
(50 ng/mL)	-6.1	0.6	7.1
Precision RSD (%)			
Intra-day			
(0.5 ng/mL)	2.6	3.4	3.4
(5 ng/mL)	4.9	2.7	3.1
(50 ng/mL)	6.5	4.3	3.7
Inter-day			
(0.5 ng/mL)	3.8	7.1	4.1
(5 ng/mL)	5.3	1.8	2.6
(50 ng/mL)	3.8	6.8	5.3

EZ, etizolam; EZ-M3, 8- α -hydroxyetizolam; EZ-M6, 1-hydroxyetizolam.

^{a)} The recoveries were calculated by comparing peak areas of the analytes extracted from spiked samples with those spiked in urinary extract (n = 5).

^{b)} Linearity ranges were tested with eight different concentrations (0.1–300 ng/mL) of analytes spiked into drug-free urine.

かで、摂取後50時間付近においても10 ng/mL以上の濃度で検出され、摂取後6–7日まで検出が可能であった（検出限界：0.05 ng/mL）。Fracasso らの報告によると¹⁶⁾、EZ-M3の血中消失半減期（ $t_{1/2}$ ）は8.2時間（n = 5）であり、EZの $t_{1/2}$ （3.4時間，n = 5）と比較して有意に長いことが示されているため、EZ-M3の尿中濃度の緩やかな減少は、EZ-M3の $t_{1/2}$ に相関していることが示唆された。

また、摂取量（EZ 1 mg）に対する各成分の累積

排泄量の割合（モル換算）は、EZが0.15–0.27%、EZ-M3が10–13%、EZ-M6が0.10–0.14%であり（Table 3）、EZ-M3は遊離体として尿中に排泄される量が多く、摂取後6–7日まで検出が可能であった。

さらに、尿中に排泄されるグルクロン酸抱合体の割合を検討するために、各被験者の尿試料1点ずつ（Subject 1, 8–12 h; Subject 2, 7–11 h; Subject 3, 8–11 h）について、酵素加水分解後に定量分析を実施したところ、Table 3に示すように、加水分解前と比較して、EZ-M3は2.0–2.2倍に増加し（加水分解前：33–74 ng/mL，加水分解後：73–150 ng/mL），EZ-M6は80–160倍に増加した（加水分解前：0.70–1.1 ng/mL，加水分解後：56–180 ng/mL）。EZ-M6はほとんどがグルクロン酸抱合体として尿中に排泄されることが示され、被験者や摂取後の時間帯によっては、加水分解することによりEZ-M3よりも高濃度で検出されることが示された。

3.2 グルクロン酸抱合体の濃度推移

本研究では、EZ-M3およびEZ-M6と共に、これらのグルクロン酸抱合体（EZ-M3-G1, EZ-M3-G2, EZ-M6-G）を初めて直接検出した。そこで、各グルクロン酸抱合体の濃度推移についても検討するために、Triple TOF 5600を用いて、プロトン化分子（ m/z 535.105）の面積値を、摂取後概ね50時間まで経時的に測定した（Table 4）。また、前項で酵素加水分解を実施した試料について、加水分解前後のEZ-M3およびEZ-M6の濃度増加分にに基づき、以下の計算式により間接的にグルクロン酸抱合体の濃度を算出した（Table 4, []内の数値）。なお、EZ-M3-G1およびEZ-M3-G2については、LC-MS/MSに対する検出感度が同等と仮定して各濃度を算出した。

- [EZ-M3-G1の濃度] = [EZ-M3の濃度増加分] × [EZ-M3-G1の分子量（534）/EZ-M3の分子量（358）] × [(EZ-M3-G1の面積値）/（EZ-M3-G1の面積値 + EZ-M3-G2の面積値）]
- [EZ-M3-G2の濃度] = [EZ-M3の濃度増加分] × [EZ-M3-G2の分子量（534）/EZ-M3の分子量（358）] × [(EZ-M3-G2の面積値）/（EZ-M3-G1

Table 3 Urinary concentrations of EZ, EZ-M3 and EZ-M6 after a single ingestion of EZ (1 mg).

Subject 1			EZ		EZ-M3		EZ-M6		Subject 2			EZ		EZ-M3		EZ-M6		Subject 3			EZ		EZ-M3		EZ-M6		Abso- lute amount (ng)	
Collec- tion interval (h)	Urine volume (mL)	Concen- tration (ng/ mL)	Concen- tration (ng/ mL)	Abso- lute amount (ng)	Concen- tration (ng/ mL)	Abso- lute amount (ng)	Concen- tration (ng/ mL)	Abso- lute amount (ng)	Collec- tion interval (h)	Urine volume (mL)	Concen- tration (ng/ mL)	Concen- tration (ng/ mL)	Abso- lute amount (ng)	Concen- tration (ng/ mL)	Abso- lute amount (ng)	Concen- tration (ng/ mL)	Abso- lute amount (ng)	Collec- tion interval (h)	Urine volume (mL)	Concen- tration (ng/ mL)	Concen- tration (ng/ mL)	Abso- lute amount (ng)	Concen- tration (ng/ mL)	Abso- lute amount (ng)	Concen- tration (ng/ mL)	Abso- lute amount (ng)		
0-8	200	3.8	760	68	13600	3.2	640	3.2	640	0-7	290	3.1	899	41	11890	1.4	406	1.4	406	0-8	400	3.8	1520	31	12400	0.86	344	
8-12	340	0.95	323	33	11220	0.70	238	0.70	238	7-11	340	1.1	374	38	12920	1.0	340	1.0	340	8-11	100	1.6	160	74	7400	1.1	110	
12-16	350	0.49	172	27	9450	0.39	136.5	0.39	136.5	11-15	680	0.56	381	21	14280	0.39	265	0.39	265	11-16	150	1.8	270	81	12150	1.5	225	
16-20	430	0.28	120	34	14620	0.23	98.9	0.23	98.9	15-19	350	0.46	161	25	8750	0.35	123	0.35	123	16-20	120	1.8	216	67	8040	0.54	65	
20-24	200	0.31	62	42	8400	0.33	66	0.33	66	19-24	200	0.52	104	41	8200	0.38	76	0.38	76	20-24	130	1.3	169	60	7800	0.52	68	
24-31	270	0.21	57	54	14580	0.25	67.5	0.25	67.5	24-32	300	0.32	96	30	9000	0.25	75	0.25	75	24-32	430	0.52	223.6	40	17200	0.28	120	
31-34	370	—	—	12	4440	0.10	37	0.10	37	32-36	120	0.18	21.6	46	5520	0.21	25	0.21	25	32-36	300	0.12	36	24	7200	0.16	48	
34-38	330	0.12	40	21	6930	0.11	36.3	0.11	36.3	36-40	140	—	—	45	6300	0.12	17	0.12	17	36-40	370	0.11	40.7	14	5180	—	—	
38-43	330	—	—	20	6600	0.10	33	0.10	33	40-44	130	—	—	33	4290	0.11	14	0.11	14	40-44	150	0.13	19.5	26	3900	0.11	17	
43-46	470	—	—	14	6580	—	—	—	—	44-48	210	—	—	22	4620	—	—	—	—	44-48	180	—	—	18	3240	0.10	18	
46-49	100	—	—	31	3100	—	—	—	—	48-55	410	—	—	17	6970	—	—	—	—	48-56	360	—	—	15	5400	—	—	
49-55	190	—	—	30	5700	—	—	—	—	55-59	450	—	—	7.1	3195	—	—	—	—	56-60	300	—	—	11	3300	—	—	
55-56	80	—	—	7.4	592	—	—	—	—	59-63	790	—	—	3.6	2844	—	—	—	—	60-64	280	—	—	8.3	2324	—	—	
56-58	770	—	—	2.2	1694	—	—	—	—	63-68	410	—	—	5.5	2255	—	—	—	—	64-68	250	—	—	7.3	1825	—	—	
58-60	450	—	—	4.3	1935	—	—	—	—	68-72	790	—	—	2.4	1896	—	—	—	—	68-72	170	—	—	5.9	1003	—	—	
60-62	280	—	—	9.9	2772	—	—	—	—	72-79	1000	—	—	1.8	1800	—	—	—	—	72-80	260	—	—	7.4	1924	—	—	
62-66	440	—	—	3.2	1408	—	—	—	—	79-83	540	—	—	1.5	810	—	—	—	—	80-84	210	—	—	4.5	945	—	—	
66-72	300	—	—	9.8	2940	—	—	—	—	83-87	210	—	—	2.1	441	—	—	—	—	84-88	230	—	—	3.2	736	—	—	
72-80	430	—	—	6.8	2924	—	—	—	—	87-91	170	—	—	2.5	425	—	—	—	—	88-92	370	—	—	1.8	666	—	—	
80-82	330	—	—	2.6	858	—	—	—	—	91-96	140	—	—	2.5	350	—	—	—	—	92-96	260	—	—	2.2	572	—	—	
82-84	320	—	—	2.3	736	—	—	—	—	96-103	220	—	—	3.0	660	—	—	—	—	96-104	550	—	—	1.3	715	—	—	
84-87	440	—	—	2.6	1144	—	—	—	—	103-107	190	—	—	2.0	380	—	—	—	—	104-108	260	—	—	1.3	338	—	—	
87-90	400	—	—	2.2	880	—	—	—	—	107-111	200	—	—	1.8	360	—	—	—	—	108-112	180	—	—	1.1	198	—	—	
90-93	410	—	—	4.3	1763	—	—	—	—	111-115	230	—	—	1.1	253	—	—	—	—	112-116	190	—	—	0.75	143	—	—	
93-97	120	—	—	1.6	192	—	—	—	—	115-120	350	—	—	0.77	270	—	—	—	—	116-121	230	—	—	0.63	145	—	—	
97-104	230	—	—	4.6	1058	—	—	—	—	120-127	340	—	—	0.67	228	—	—	—	—	125-130	150	—	—	0.88	132	—	—	
104-106	500	—	—	0.54	270	—	—	—	—	127-132	170	—	—	0.53	90	—	—	—	—	140-144	260	—	—	0.21	55	—	—	
106-107	500	—	—	0.56	280	—	—	—	—	132-135	340	—	—	0.22	75	—	—	—	—	153-156	130	—	—	0.16	21	—	—	
107-112	300	—	—	2.1	630	—	—	—	—	135-139	130	—	—	0.43	56	—	—	—	—	166-168	230	—	—	—	—	—	—	
112-116	330	—	—	1.4	462	—	—	—	—	139-144	190	—	—	0.23	44	—	—	—	—	171-177	310	—	—	—	—	—	—	
116-122	180	—	—	3.5	630	—	—	—	—	147-153	200	—	—	0.23	46	—	—	—	—	186-190	190	—	—	—	—	—	—	
122-128	460	—	—	1.0	460	—	—	—	—	163-167	120	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
128-130	530	—	—	0.39	207	—	—	—	—	177-179	110	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
130-134	350	—	—	1.0	350	—	—	—	—	188-192	180	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
134-137	490	—	—	0.46	225	—	—	—	—	201-203	130	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
137-139	350	—	—	0.20	70	—	—	—	—	211-215	150	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
139-142	330	—	—	0.46	152	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
142-144	320	—	—	0.32	102	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
144-153	350	—	—	0.83	291	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
155-159	280	—	—	0.35	98	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
163-170	270	—	—	0.46	124	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
180-183	340	—	—	0.11	37	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
190-193	240	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
Total (ng)	1533	—	—	130504	1353	—	—	—	—	Total (ng)	2036	—	—	109217	1341	—	—	—	—	Total (ng)	2655	—	—	—	104951	1014	—	—
Ratio of the total amount to dose (%)	0.15	—	—	13	0.14	—	—	—	—	Ratio of the total amount to dose (%)	0.20	—	—	10	0.13	—	—	—	—	Ratio of the total amount to dose (%)	0.27	—	—	10	0.10	—	—	

Table 4 Estimated concentrations of glucuronides in urine after a single ingestion of EZ.

Subject 1		EZ-M3-G1			EZ-M3-G2			EZ-M6-G		
Collection interval (h)	Urine volume (mL)	Area [M+H] ⁺	Estimated concentration (ng/mL)	Absolute amount (ng)	Area [M+H] ⁺	Estimated concentration (ng/mL)	Absolute amount (ng)	Area [M+H] ⁺	Estimated concentration (ng/mL)	Absolute amount (ng)
0-8	200	85500	71	14200	101000	83	16600	565000	350	70000
8-12	340	43500	[36]	12240	28000	[23]	7820	133000	[82]	27880
12-16	350	33700	28	9800	20700	17	5950	76400	47	16450
16-20	430	28000	23	9890	11400	9.4	4042	43200	27	11610
20-24	200	56200	47	9400	21200	17	3400	59300	37	7400
24-31	270	64700	54	14580	24200	20	5400	43300	27	7290
31-34	370	13900	12	4440	2700	2.2	814	6400	3.9	1443
34-38	330	23100	19	6270	5900	4.8	1584	11800	7.3	2409
38-43	330	24200	20	6600	5000	4.1	1353	8900	5.5	1815
43-46	470	11100	9.2	4324	2700	2.2	1034	2100	1.3	611
46-49	100	38900	32	3200	9200	7.6	760	6700	4.1	410
Total (ng)				94944			48757			147318
Ratio of detected amounts to dose (%)				6.1			3.1			9.4
Subject 2		EZ-M3-G1			EZ-M3-G2			EZ-M6-G		
Collection interval (h)	Urine volume (mL)	Area [M+H] ⁺	Estimated concentration (ng/mL)	Absolute amount (ng)	Area [M+H] ⁺	Estimated concentration (ng/mL)	Absolute amount (ng)	Area [M+H] ⁺	Estimated concentration (ng/mL)	Absolute amount (ng)
0-7	290	33300	28	8120	56300	47	13630	354000	230	66700
7-11	340	31300	[26]	8840	37100	[31]	10540	203000	[130]	44200
11-15	680	18300	15	10200	16700	14	9520	56400	36	24480
15-19	350	31400	26	9100	20500	17	5950	77300	50	17500
19-24	200	69300	58	11600	37200	31	6200	110000	70	14000
24-32	300	52300	43	12900	23400	20	6000	44600	29	8700
32-36	120	67700	56	6720	30900	26	3120	65100	42	5040
36-40	140	43300	36	5040	18000	15	2100	30800	20	2800
40-44	130	39100	32	4160	17300	15	1950	20700	13	1690
44-48	210	16600	14	2940	6600	6.0	1260	9900	6.3	1323
Total (ng)				79620			60270			186433
Ratio of detected amounts to dose (%)				5.1			3.9			12
Subject 3		EZ-M3-G1			EZ-M3-G2			EZ-M6-G		
Collection interval (h)	Urine volume (mL)	Area [M+H] ⁺	Estimated concentration (ng/mL)	Absolute amount (ng)	Area [M+H] ⁺	Estimated concentration (ng/mL)	Absolute amount (ng)	Area [M+H] ⁺	Estimated concentration (ng/mL)	Absolute amount (ng)
0-8	400	34600	29	11600	61300	51	20400	389000	240	96000
8-11	100	60000	[51]	5100	75900	[63]	6300	432000	[270]	27000
11-16	150	91400	78	11700	93500	78	11700	421000	260	39000
16-20	120	65100	55	6600	70300	58	6960	291000	180	21600
20-24	130	44400	38	4940	38300	32	4160	149000	93	12090
24-32	430	32200	27	11610	22800	19	8170	64800	41	17630
32-36	300	15900	14	4200	8100	6.7	2010	27500	17	5100
36-40	370	11500	10	3700	6600	5.5	2035	14100	8.8	3256
40-44	150	18800	16	2400	13100	11	1650	22300	14	2100
44-48	180	8500	7.2	1296	7300	6.1	1098	6900	4.3	774
Total (ng)				63146			64483			224550
Ratio of detected amounts to dose (%)				4.0			4.1			14

The numbers in parentheses were calculated based on increased amounts of EZ-M3 and EZ-M6 after enzymatic hydrolysis. EZ, etizolam; EZ-M3, 8- α -hydroxyetizolam; EZ-M6, 1-hydroxyetizolam; EZ-M3-G1, EZ-M3-glucuronide 1; EZ-M3-G2, EZ-M3-glucuronide 2; EZ-M6-G, EZ-M6-glucuronide.

の面積値+EZ-M3-G2の面積値)]

- [EZ-M6-Gの濃度]=[EZ-M6の濃度増加分]×
[EZ-M6-Gの分子量(534)/EZ-M6の分子量
(358)]

さらに、各被験者について、算出した濃度および各プロトン化分子の面積値に基づき、比例計算により他の試料の抱合体濃度についても算出した (Table 4)。

その結果、3種の抱合体が、分析を実施した摂取後50時間弱までのすべての試料で検出され、その濃度はいずれも1 ng/mL以上であった。また、摂取後約50時間までの、摂取量 (EZ 1 mg) に対する各成分の累積排泄量の割合 (モル換算、摂取後48あるいは49時間までの累積) は、EZ-M3-G1が4.0-6.1%、EZ-M3-G2が3.1-4.1% (EZ-M3-G1およびEZ-M3-G2の合計は8.1-9.2%)、EZ-M6-Gが9.4-14%であった。さらに、摂取量に対する総EZ-M3 (EZ-M3+EZ-M3-G1+EZ-M3-G2) および総EZ-M6 (EZ-M6+EZ-M6-G) は、それぞれ18-22%および9.5-14%であったことから (Table 3 および Table 4)、尿中に最も多く排泄される代謝物はEZ-M3であることが示された。一方、グルクロン酸抱合体のなかでは、EZ-M6-Gが最も多く排泄されることが示され、EZ-M6は98%以上がグルクロン酸抱合体として排泄されることが明らかとなった (Table 5)。一方、EZ-M3は、摂取後48時間あるいは49時間までの累計で算出すると、概ね50%がグルクロン酸抱合体として排泄されることが示された。

また、各グルクロン酸抱合体の濃度推移に着目すると、以下の傾向が観察された。その典型的な一例 (Subject 2) を Fig. 4 に示す。グルクロン酸抱合体のなかで最も高濃度を示したのはEZ-M6-Gで、摂取後12時間までに200 ng/mL以上に達しており、摂取後初期 (15-16時間まで) においては、EZ-M3-G1 および EZ-M3-G2 と比べて数倍の濃度で検出されている。一方、それ以降、特に摂取後24時間以降において、EZ-M6-Gは、EZ-M3-G1 および EZ-M3-G2 と同程度、あるいはそれらよりも低い濃度で検出される傾向にあった。これは、EZ-M3のグルクロン酸抱合体の方が、EZ-M6-Gよりも尿中濃度の減少が緩やかであることを示すもので

Table 5 Ratios of the amounts of metabolites excreted in urine to dose after a single ingestion EZ.

Subject 1		Total EZ-M3		Total EZ-M6	
Collection interval (h)		Ratio of detected amounts to dose (%)		Ratio of detected amounts to dose (%)	
0-12		5.6	[58]	6.4	[99]
12-24		5.8	[47]	2.3	[99]
24-34		3.4	[47]	0.57	[98]
34-49		3.8	[42]	0.34	[98]
Total		19	[49]	10	[99]

Subject 2		Total EZ-M3		Total EZ-M6	
Collection interval (h)		Ratio of detected amounts to dose (%)		Ratio of detected amounts to dose (%)	
0-11		5.0	[53]	7.2	[99]
11-24		6.4	[53]	3.6	[99]
24-36		3.2	[57]	0.89	[99]
36-48		2.6	[43]	0.38	[99]
Total		17	[52]	12	[99]

Subject 3		Total EZ-M3		Total EZ-M6	
Collection interval (h)		Ratio of detected amounts to dose (%)		Ratio of detected amounts to dose (%)	
0-11		4.7	[60]	7.9	[99]
11-24		5.6	[52]	4.7	[99]
24-36		4.0	[42]	1.5	[99]
36-48		2.0	[40]	0.40	[99]
Total		16	[50]	14	[99]

EZ, etizolam; EZ-M3, 8- α -hydroxyetizolam; EZ-M6, 1-hydroxyetizolam.

The numbers in parentheses indicate the ratios (%) of glucuronides to total EZ-M3 or total EZ-M6.

ある。さらに、EZ-M3-G1 および EZ-M3-G2 を比較すると、摂取後初期 (7-8 時間) ではEZ-M3-G2の方が高濃度であったのに対し、摂取後24時間以降はいずれの被験者においてもEZ-M3-G1の方が高濃度に転じた。従って、EZ摂取後、より長期間にわたって検出される抱合体はEZ-M3-G1であり、各グルクロン酸抱合体の濃度比によってEZ摂取

Fig. 4 Urine excretion profile of glucuronides of EZ-M3 and EZ-M6 (subject 2).

EZ, etizolam; EZ-M3, 8- α -hydroxyetizolam; EZ-M6, 1-hydroxyetizolam; EZ-M3-G1, EZ-M3-glucuronide 1; EZ-M3-G2, EZ-M3-glucuronide 2; EZ-M6-G, EZ-M6-glucuronide.

取からの経過時間を推定できる可能性が示唆される。

3.3 EZ 摂取を証明するための分析

本研究の結果から、EZ の代謝物は比較的高い割合でグルクロン酸抱合体として排泄されることが明らかとなった。しかしながら、法科学分野における薬物鑑定において、成分の同定を行うためには基本的に標準物質が必要とされる。本研究で対象としたグルクロン酸抱合体 (EZ-M3-G1, EZ-M3-G2 および EZ-M6-G) は現状で標準物質の入手が困難であるため、EZ の摂取証明では、酵素加水分解を行った後 EZ, EZ-M3 および EZ-M6 をターゲットに分析を進めることが推奨される。

本研究で明らかになった尿中排泄プロファイルから考察すると、酵素加水分解を行うことで摂取後初期には EZ-M6 が最も高濃度で検出されると共に未変化体 EZ および EZ-M3 が併せて検出される。摂取後50時間以降になると、EZ および EZ-M6 は不検出あるいは検出限界付近になるため、EZ-M3 をターゲットとして分析することが適切であると考えられる。なお、本研究の分析条件 (検出限界: 0.05 ng/mL) では、EZ-M3 を遊離体として摂取後約1週間検出することが可能であり、さらに酵素加水分解により検出期間の延長が期待できる。しかしなが

ら、酵素加水分解を行っても EZ-M3 の増加は約2倍に留まり大幅な検出期間の延長は望めないため、性犯罪事案などの被害から1週間以上申告が遅れた場合には、尿よりも検出可能期間の長い毛髪鑑定を視野に入れて検討する必要があると考えられる。

また、法科学分野では犯罪事実などの立証のため、鑑定結果を基に薬物の摂取時期について見解を求められることがある。そのようなケースでは、EZ と共に5種類の代謝物をそれぞれ分析し、それらの濃度と共に各成分の濃度比を比較検討することで、摂取してからの概ねの経過日時を推定することも可能と考えられる。

結 語

EZ は、国内で流通量の多い処方箋医薬品の1つであり、その催眠作用から犯罪に悪用されることが多く、実際の鑑定でも検出例の多い薬物である。本研究では、性犯罪などで想定される単回摂取の条件下で、第二相代謝物 (グルクロン酸抱合体) を初めて検出すると共に、それらを含む主要代謝物の尿中排泄プロファイルを明らかにした。その結果、未変化体 EZ が尿中に排泄される割合は投与量の0.3%未満であったのに対し、主代謝物である EZ-M3 および EZ-M6 が排泄される割合は、グルクロン酸抱

合体を含めると、それぞれ投与量の概ね10～20%であることが示された。従って、EZ摂取の指標としては、主代謝物であるEZ-M3およびEZ-M6をターゲットとすることが適切であると考えられ、特にEZ-M3は尿中濃度の減少が緩やかであり、摂取後約1週間まで検出が可能であることが示唆された(検出限界: 0.05 ng/mL)。また、EZ-M3およびEZ-M6がグルクロン酸抱合体として尿排泄される割合は、それぞれ約50%および98%以上であることが示され、酵素加水分解による各遊離体の増加幅は約2倍および50倍以上と見込まれるため、加水分解処理による検出可能期間の若干の延長も期待できる。本研究のデータは、第二相代謝物を含む主要代謝物の尿中排泄プロファイルを示したものであり、EZの摂取証明を行う上で有用な知見になるものと考えられる。

利益相反

本研究について、申告すべき利益相反関連事項はない。

引用文献

- 1) World Health Organization, WHO Expert Committee on Drug Dependence – Twenty-sixth Report/WHO Technical Report Series **787**, pp. 10–11, 1989.
- 2) World Health Organization, 42nd Expert Committee on Drug Dependence Critical Review Report: Etizolam, 2019, available from [https://www.who.int/medicines/access/controlled-substances/Final_Etizolam.pdf?ua=1], accessed Oct 23, 2020.
- 3) 松本俊彦, 処方薬乱用・依存からみた今日の精神科薬物治療の課題: ベンゾジアゼピンを中心に, 臨床精神薬理, **16**, 803–812, 2013.
- 4) 松本俊彦, 嶋根卓也, 尾崎 茂, 乱用・依存の危険性の高いベンゾジアゼピン系薬剤同定の試み: 文献的対照群を用いた乱用者選択率と医療機関処方率に関する予備的研究, 精神医学, **54**, 201–209, 2012.
- 5) 厚生労働省, 新たに3物質を向精神薬に指定, available from [https://www.mhlw.go.jp/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/iyakuhin/yakubuturanyou/oshirase/20160914-1.html], accessed Oct 23, 2020.
- 6) Salamone SJ, Honasoge S, Brenner C, McNally AJ, Passarelli J, Goc-Szcutnicka K, Brenneisen R, elSohly MA and Feng S, Flunitrazepam Excretion Patterns using the Abuscreen OnTrak and OnLine Immunoassays: Comparison with GC-MS. *J. Anal. Toxicol.*, **21**, 341–345, 1997.
- 7) Negrusz A, Moore CM, Stockham TL, Poiser KR, Kern JL, Palaparthi R, Le NL, Janicak PG and Levy NA, Elimination of 7-aminoflunitrazepam and flunitrazepam in urine after a single dose of Rohypnol®. *J. Forensic Sci.*, **45**, 1031–1040, 2000.
- 8) Snyder H, Schwenzer KS, Pearlman R, McNally AJ, Tsilimidos M, Salamone SJ, Brenneisen R, ElSohly MA and Feng S, Serum and urine concentrations of flunitrazepam and metabolites, after a single oral dose, by immunoassay and GC-MS. *J. Anal. Toxicol.*, **25**, 699–704, 2001.
- 9) Forsman M, Nystrom I, Roman M, Berglund L, Ahlner J and Kronstrand R, Urinary detection times and excretion patterns of flunitrazepam and its metabolites after a single oral dose. *J. Anal. Toxicol.*, **33**, 491–501, 2009.
- 10) Tsujikawa K, Kuwayama K, Miyaguchi H, Kanamori T, Iwata Y, Inoue H and Kishi T, Urinary excretion profiles of two major triazolam metabolites, alpha-hydroxytriazolam and 4-hydroxytriazolam. *J. Anal. Toxicol.*, **29**, 240–243, 2005.
- 11) Kato Y and Nishimine H, Absorption, distribution and excretion of a new thienodiazepine derivative (Y-7131) in rats and mice. *Arz. Forsch.*, **28**, 1170–1173, 1978.
- 12) Nakamae T, Shinozuka T, Sasaki C, Ogamo A, Murakami-Hashimoto C, Irie W, Terada M, Nakamura S, Furukawa M and Kurihara K., Case report: Etizolam and its major metabolites in two

- unnatural death cases. *Forensic Sci. Int.*, **182**, 1–6, 2008.
- 13) Namera A, Makita R and Nagao M, Comparison of four immunoassay screening devices for detection of benzodiazepine and its metabolites in urine: mainly detection of etizolam, thienodiazepine and its metabolites. *Jpn. J. Toxicol.*, **24**, 27–34, 2011.
- 14) Miki A, Tatsuno M, Katagi M, Nishikawa M and Tsuchihashi H, Simultaneous Determination of Eleven Benzodiazepine Hypnotics and Eleven Relevant Metabolites in Urine by Column-Switching Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *J. Anal. Toxicol.*, **26**, 87–93, 2002.
- 15) Drummer OH, Rago MD and Gerostamoulos D, Analysis of benzodiazepines for drug-facilitated assaults and abuse settings (urine). *LC-MS in Drug Analysis*, 23–39, 2019.
- 16) Fracasso C, Confalonieri S, Garattini S and Caccia S., Single and multiple dose pharmacokinetics of etizolam in healthy subjects. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **40**, 181–185, 1991.