—技術報告—

血清中医薬品のスクリーニングを目的としたミックスモード型固相抽出法の検討

大前義仁, 金森達之, 岩田祐子, 辻川健治, 桑山健次, 井上博之, 岸 徹

科学警察研究所

〒277-0882 千葉県柏市柏の葉6-3-1

Study on Mixed-mode Solid-phase Extraction for Drug Screening in Human Serum

Yoshihito Ohmae, Tatsuyuki Kanamori, Yuko Iwata, Kenji Tsujikawa,
Kenji Kuwayama, Hiroyuki Inoue and Tohru Kishi*National Research Institute of Police Science
6-3-1, Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba 277-0882, Japan**(Received 31 March 2003; Accepted 2 July 2003)*

Mixed-mode solid-phase extraction methods were compared for drug screening, prior to gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) and/or liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS). The extractions with Oasis[®] MCX, ISOLUTE[®] HXC and Bond Elut Certify[®] were evaluated by recoveries of acetaminophen, bromvalerylurea, phenobarbital, pentobarbital, amobarbital, chlorpromazine, levomepromazine, promethazine, flunitrazepam, and nitrazepam from human serum. The recoveries were low (0% to 42%) with Bond Elut Certify[®] for drugs examined except for bromvalerylurea (117%). The recoveries with ISOLUTE[®] HXC were high (80% to 110%) for all drugs except acetaminophen (33%). The recoveries with Oasis[®] MCX ranged from 54% to 116% for all drugs including acetaminophen (111%) by using acetonitrile as eluting solvents. The detection limit of each compound ranged 5 to 50 ng on column under scan modes of GC/MS or LC/MS and 0.05 to 0.5 ng on column under SIM modes.

This study suggests that Oasis[®] MCX is a suitable disposable cartridge in routine drug screening in forensic toxicological analysis.

Key words: Mixed-mode Solid-phase extraction, Serum, GC/MS, LC/MS

緒 言

近年, 薬毒物による中毒事故等の発生件数は, ほぼ横ばいの状態と考えられるが, 「医薬品」が中毒の原因とされる件数は, 年々増加傾向にあり, 平成12年では総数の約1割を占めている¹⁾. このような中毒事故等では, まず, 中毒の原因となった物質の

特定が重要であり, さらに血液あるいは血清中の薬物濃度を測定することにより, 中毒レベルを推定する貴重な情報が得られる. 生体試料(血液, 尿, 臓器等)からの薬物分析においては, 前処理法として液-液抽出法や固相抽出法等が広く用いられている.

分析前処理のための固相抽出法は、1970年代前半、従来からの液-液抽出法の持ついくつかの欠点を補う方法として紹介された²⁾。その後、担体の種類や形状、官能基の種類などの開発が進められ、様々な分野における応用例が報告されてきた。しかしながら、これらの報告の多くは、単一もしくは同様な官能基をもつ化合物群を対象とした分析前処理方法であり、一般的な薬毒物スクリーニングを目的とする場合には、現在でも Stas-Otto 法に基づく液-液抽出法が多く利用されていると考えられる^{3,4)}。

近年、ミックスモード型固相抽出カートリッジが開発され、乱用薬物や医薬品の分析前処理への応用が多数報告されている。ミックスモードには一般に、陰イオン交換/逆相系と陽イオン交換/逆相系があるが、前者は主としてバルビツール酸類など酸性化合物の選択的抽出に用いられ⁵⁾、後者は塩基性化合物の選択的抽出や中・酸性化合物と塩基性化合物との分画抽出に利用されている⁶⁻¹³⁾。本研究では、汎用性がより高いと考えられる陽イオン交換/逆相系のミックスモード型固相抽出カートリッジ 3 種類を用い、血清中医薬品の分析前処理法としての有用性を比較・検討した。

材料および方法

1 試料

中毒事故等の発生件数の多い薬物のうち、アセトアミノフェン（シグマ社から購入）、ブロムワレリル尿素（岩城製薬から購入）、フェノバルビタール（三共・藤永製薬から供与）、ペントバルビタール（東京化成工業から購入）、アモバルビタール（日本新薬から供与）、クロルプロマジン（塩野義製薬から供与）、レボメプロマジン（吉富製薬から供与）、プロメタジン（吉富製薬から供与）、フルニトラゼパム（日本ロシュから供与）、ニトラゼパム（日本アップジョンから供与）の合計10種類の医薬品を用いた。また、内部標準物質としてジアゼパム（住友製薬から供与、IS-1）およびアロバルビタール（岩城製薬から購入、IS-2）を用いた（Table 1）。これらの各医薬品について、メタノールにて保存用標準溶液（1 mg/ml）を調製し、 -20°C 下で保存した。用時これらを混合し、各薬物濃度として10 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Table 1 Drugs used in this study and monitoring ions for quantitation by GC/MS and LC/MS.

Drugs		Monitoring ions (<i>m/z</i>)	
		GC/MS	LC/MS
Acetaminophen	AAP	—	150
Bromvalerylurea	BVU	—	221
Phenobarbital	PHB	204	—
Pentobarbital	PEB	156	—
Amobarbital	AMB	156	—
Chlorpromazine	CPZ	58	—
Levomepromazine	LMZ	58	—
Promethazine	PMZ	72	—
Flunitrazepam	FNP	312	314
Nitrazepam	NTP	280	282
Diazepam	IS-1	256	—
Allobarbital	IS-2	—	207

の標準溶液（10%メタノール）を調製した。

ミックスモード型固相抽出カートリッジとして、Waters 製 Oasis[®] MCX カートリッジ（固相重量60 mg）、IST 製 ISOLUTE[®] HXC カートリッジ（固相重量130 mg）および Varian 製 Bond Elut Certify[®] カートリッジ（固相重量200 mg）を用いた。メンブランフィルターとして、MILLIPORE 製 Ultrafree-MC 0.45 μm Filter Unit を用いた。

ヒト正常血清は ICN Biochemicals 社より購入した。アセトニトリルは HPLC グレードのものをを用い、その他の試薬は、全て市販の特級試薬を用いた。

2 固相抽出法

固相抽出カートリッジに添付されている使用説明書等に記載された各メーカーの推奨法（ジェネリックメソッド）に準じて抽出を行った。薬物添加血清は、各薬物濃度が 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるよう、ヒト正常血清に薬物標準溶液を添加して調製した。

(1) Oasis MCX カートリッジによる抽出法

血清（ブランクおよび薬物添加血清）0.5 ml に 0.1 M 塩酸 1 ml を加え、メタノール 3 ml および蒸留水 3 ml をそれぞれ 2 回通液してコンディショニングした Oasis MCX カートリッジに注入した。カートリッジを 0.1 M 塩酸 2 ml にて洗浄後、メタ

ノール 3 ml にて溶出し、フラクション 1 とした。次いで、25%アンモニア水を 5%含有するメタノール 3 ml にて溶出し、フラクション 2 とした。また、コンディショニングおよび溶出の際に用いる有機溶媒としてメタノールの代わりにアセトニトリル、ジクロロメタン、酢酸エチルおよびメタノール・アセトニトリル (50 : 50) を用いる方法についても検討した。

各フラクションを窒素気流下で乾固後、残さに内部標準物質 (IS-1 および IS-2, 各 5 μ g/ml) を含むメタノール 0.2 ml を加えて溶解し、その 0.1 ml を分取し、GC/MS 用試料とした。残りを窒素気流下で乾固後、残さに後述する LC/MS 用移動相 0.2 ml を加えて溶解し、メンブランフィルターによりろ過したものを LC/MS 用試料とした。

(2) ISOLUTE HCX カートリッジによる抽出法

血清 (ブランクおよび薬物添加血清) 0.5 ml に 50 mM 酢酸アンモニウム (pH 6.0) 1 ml を加え、メタノール 3 ml および 50 mM 酢酸アンモニウム (pH 6.0) 3 ml をそれぞれ 2 回通液してコンディショニングした ISOLUTE HCX カートリッジに注入した。カートリッジを 50 mM 酢酸アンモニウム (pH 6.0) 1 ml および 1 M 酢酸 1 ml にて洗浄後、メタノール 3 ml にて溶出し、フラクション 1 とした。次いで、25%アンモニア水を 5%含有するメタノール 3 ml にて溶出し、フラクション 2 とした。また、1 M 酢酸 1 ml にて洗浄する操作を除いた方法についても検討した。以下、前述と同様に処理し、GC/MS および LC/MS 用試料とした。

(3) Bond Elut Certify カートリッジによる抽出法

血清 (ブランクおよび薬物添加血清) 0.5 ml に 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.0) 1.5 ml を加え、メタノール 2 ml および 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.0) 2 ml をそれぞれ 2 回通液してコンディショニングした Bond Elut Certify カートリッジに注入した。カートリッジを蒸留水 1 ml および 0.01 M 酢酸 0.5 ml にて洗浄後、アセトン・クロロホルム (50 : 50) 4 ml にて溶出し、フラクション 1 とした。次いで、25%アンモニア水を 2%含有する酢酸エチル 2 ml にて溶出し、フラクション 2 とした。以下、前述と同様に処理し、GC/MS および LC/MS 用試料

とした。

3 ガスクロマトグラフィー/質量分析 (GC/MS)

各試料の 2 μ l をスプリットレス注入し、下記の条件で GC/MS を行った。定量分析は SIM モードで行い、IS-1 を用いた内部標準法により回収率を求めた。定量分析に用いた各薬物の m/z を Table 1 に示す。アセトアミノフェンおよびブロムワレリル尿素については、GC/MS による検出が困難であったため、後述する LC/MS で分析した。

装置 : 島津製 GC-17A ガスクロマトグラフおよび QP-5050A 質量分析計, カラム : J & W 製 DB-5 ms (30 m $\times$ 0.25 mm i.d., 膜厚 0.25 μ m), カラム温度 : 100°C で 2 分間保持後, 300°C まで 10°C/分 で昇温, 注入口温度 : 280°C, インターフェイス温度 : 250°C, キャリアガス : ヘリウム (1.0 ml/分), イオン化法 : 電子イオン化 (EI) 法, イオン化電圧 : 70 eV, イオン化電流 : 60 μ A, 測定モード : Scan および SIM モード。

4 液体クロマトグラフィー/質量分析 (LC/MS)

各試料中のアセトアミノフェンおよびブロムワレリル尿素について、下記の条件で LC/MS を行った。定量分析は SIM モードで行い、IS-2 を用いた内部標準法により回収率を求めた。定量分析に用いた各薬物の m/z を Table 1 に示す。

HPLC : Waters 製 2690 Separations Module, MS : Micromass 製 ZQ 質量分析計, カラム : 昭和電工製 Shodex MSpak GS-320 2D (2.0 mm i.d. $\times$ 150 mm), カラム温度 : 40°C, 移動相 : 10 mM 酢酸アンモニウム (pH 6.8) — アセトニトリル (80 : 20, v/v), 流速 : 0.1 ml/分, イオン化法 : エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法, ネガティブモード, キャピラリー電圧 : 2.5 kV, コーン電圧 : 30 V, ソースブロック温度 : 100°C, 脱溶媒ガス温度 : 300°C, 測定モード : Scan および SIM モード, 試料注入量 : 40 μ l。

フルニトラゼパムおよびニトラゼパムは、血清中濃度が低くなると GC/MS による検出が困難であったため、LC/MS でも分析することとし、ESI ポジティブモード, キャピラリー電圧 3.5 kV で測定した。

結果および考察

1 各薬物の検出限界

固相抽出法の検討に先立ち、今回用いた10種類の薬物の本分析条件におけるオンカラムでの検出限界（マスキロマトグラム上で $S/N > 3$ ）について検討した（Table 2）。GC/MS の Scan モードにおいて、各薬物の検出限界は 5～20 ng、SIM モードで 0.05～5 ng、LC/MS の Scan モードにおいて 1～50 ng、SIM モードで 0.05～5 ng であり、SIM モードを用いることにより、治療レベルの血清中濃度での測定が可能と考えられた。

Table 2 Detection limits for drugs used in the study.

Drugs	GC/MS		LC/MS	
	Scan	SIM	Scan	SIM
Acetaminophen	—	—	1.0	0.05
Bromvalerylurea	—	—	50.0	5.0
Phenobarbital	10.0	0.5	—	—
Pentobarbital	5.0	0.1	—	—
Amobarbital	5.0	0.1	—	—
Chlorpromazine	5.0	0.05	—	—
Levomepromazine	5.0	0.05	—	—
Promethazine	5.0	0.05	—	—
Flunitrazepam	10.0	0.5	1.0	0.25
Nitrazepam	20.0	5.0	5.0	0.25

Values are expressed as ng on column.

2 薬物添加血清試料からの回収率の検討

各固相抽出カートリッジに添付されている使用説明書に記載されたジェネリックメソッドにより、ヒト血清から10種類の薬物の回収を試みた（Table 3）。いずれのカートリッジを用いても、中性および酸性薬物はフラクション 1（中・酸性画分）に溶出し、フルニトラゼパムを除く塩基性薬物はフラクション 2（塩基性画分）に溶出した。フルニトラゼパムは、Oasis MCX ではフラクション 2 に溶出し、ISOLUTE HCX および Bond Elut Certify ではフラクション 1 に溶出した。

Oasis MCX では、各薬物はフラクション 1 もしくはフラクション 2 のいずれかに十分、分画されており、回収率は、概ね70%以上と良好であったが、レボメプロマジン、フルニトラゼパムおよびニトラゼパムの回収率が50～60%程度であった。ISOLUTE HCX でも、各薬物はフラクション 1 もしくはフラクション 2 のいずれかに十分、分画されており、回収率は、概ね80%以上と良好であったが、アセトアミノフェンの回収率は著しく低かった（1.8%）。Bond Elut Certify では、ブロムワレリル尿素を除き、全般的に回収率が良くなかった。なお、ブランク血清からは薬物を検出しなかった。また、薬物添加血清中のメタノール濃度はわずかであり、3種類の固相抽出カートリッジを用いた抽出において

Table 3 Recoveries of drugs from human serum by the mixed-mode solid-phase extraction with the manufacture-recommended procedures.

Drugs	Oasis MCX		ISOLUTE HCX		Bond Elut Certify	
	Frac. 1	Frac. 2	Frac. 1	Frac. 2	Frac. 1	Frac. 2
Acetaminophen	74.3 ± 3.2	tr.	1.8 ± 0.3	tr.	29.1 ± 1.4	tr.
Bromvalerylurea	103.1 ± 3.7	n.d.	104.9 ± 2.3	n.d.	116.8 ± 3.5	n.d.
Phenobarbital	108.8 ± 6.0	1.9 ± 1.9	100.3 ± 5.3	tr.	tr.	n.d.
Pentobarbital	87.3 ± 7.1	1.2 ± 1.3	93.6 ± 2.4	2.4 ± 0.1	6.0 ± 1.5	tr.
Amobarbital	88.5 ± 7.0	1.2 ± 1.1	94.1 ± 2.7	tr.	5.5 ± 1.4	tr.
Chlorpromazine	n.d.	90.9 ± 10.1	tr.	93.4 ± 0.9	tr.	42.4 ± 2.8
Levomepromazine	tr.	53.0 ± 4.6	tr.	81.1 ± 0.8	tr.	32.8 ± 1.9
Promethazine	n.d.	83.9 ± 8.4	tr.	92.8 ± 1.2	tr.	40.5 ± 2.7
Flunitrazepam	tr.	60.6 ± 8.4	91.6 ± 6.5	tr.	4.0 ± 1.5	tr.
Nitrazepam	n.d.	53.8 ± 9.7	1.2 ± 2.4	107.2 ± 7.2	n.d.	n.d.

Human sera were spiked with 10 drugs at a concentration of 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$. The values (%) represent the mean $\pm$ S.D. of four determinations. n.d.; not detected, tr.; trace.

は100%水溶液の場合と何ら回収率等に変わりはなかった。

3 固相抽出法の改良

3種の固相抽出カートリッジのうち、Oasis MCXおよびISOLUTE HCXの抽出方法を改良し、回収率の改善を試みた。Oasis MCXでは、レボメプロマジン、フルニトラゼパムおよびニトラゼパムの回収率の改善を目指し、活性化および溶出の際に用いる有機溶媒としてメタノールの代わりに、アセトニトリル、ジクロロメタン、酢酸エチルおよびメタノール・アセトニトリル (50 : 50) を用いる方法を検討した。ISOLUTE HCXでは、アセトアミノフェンの回収率が著しく低かったことから、その原因を検討したところ、1 M 酢酸にて洗浄する過程で溶出していることが判ったため、この洗浄操作を除くことにした。この操作を除くことによる明らかなバックグラウンドの上昇は認められなかった。以後の分析においては、溶出されたフラクション1とフラクション2を合わせて窒素気流下で乾固し、GC/MSおよびLC/MS分析に供した。

改良抽出法による各薬物の回収率をTable 4に示す。Oasis MCXでは、メタノールの代わりにアセトニトリルを用いることにより、アセトアミノフェンで37%、ペントバルビタールで17%、アモバルビ

タールで9%、フルニトラゼパムで18%、ニトラゼパムで62%の回収率の向上が認められ、検討した薬物の大半について70%以上の回収率が得られた。レボメプロマジンでは、回収率に大きな改善はみられなかった。また、ジクロロメタン、酢酸エチルおよびメタノール・アセトニトリル (50 : 50) を用いた場合、ペントバルビタール、アモバルビタール等では、10~20%の回収率の向上が認められたが、逆に、アセトアミノフェン、プロメタジン等では回収率の低下がみられた。ISOLUTE HCXでは、アセトアミノフェンの回収率は約33%に回復したものの、十分な結果とはいえなかった。その他の薬物については、前述と同様、80%以上の良好な回収率が得られた。

Yawney *et al.*¹³⁾は、Oasis MCXと溶出溶媒としてアセトン・クロロホルム (50 : 50) 系を用い、全血中の薬物スクリーニング法を報告しているが、フェノバルビタール、ペントバルビタールおよびアモバルビタールの回収率は、それぞれ92.7%、89.5%および90%であり、アセトニトリル系を用いる本法の方が回収率は良好であった。クロルプロマジンについては同程度であったが、ベンゾジアゼピン系薬物など、いくつかの薬物については十分に検討されていない。ベンゾジアゼピン系薬物は、そのpKa

Table 4 Recoveries of drugs from human serum by the mixed-mode solid-phase extraction with modified procedures.

Drugs	Oasis MCX				ISOLUTE HCX
	CH ₃ CN	CH ₂ Cl ₂	CH ₃ COOC ₂ H ₅	CH ₃ OH-CH ₃ CN (50 : 50)	
Acetaminophen	111.1 ± 0.6	1.4 ± 0.8	63.2 ± 5.4	90.5 ± 4.4	32.8 ± 2.5
Bromvalerylurea	96.5 ± 5.6	91.8 ± 5.9	102.2 ± 3.6	94.2 ± 4.7	80.2 ± 3.2
Phenobarbital	115.0 ± 8.2	136.6 ± 3.8	118.2 ± 5.2	107.6 ± 0.9	109.9 ± 3.4
Pentobarbital	105.3 ± 6.6	113.8 ± 6.8	106.9 ± 5.8	108.6 ± 4.8	102.2 ± 1.5
Amobarbital	98.7 ± 6.7	107.7 ± 3.8	100.1 ± 5.6	103.4 ± 4.3	102.2 ± 1.8
Chlorpromazine	77.1 ± 1.2	19.8 ± 1.1	86.0 ± 2.3	83.5 ± 3.8	92.8 ± 1.4
Levomepromazine	54.3 ± 3.1	23.2 ± 2.1	61.5 ± 2.1	43.4 ± 3.9	93.5 ± 2.1
Promethazine	72.9 ± 2.5	19.3 ± 1.9	74.8 ± 8.8	69.2 ± 3.6	99.0 ± 1.2
Flunitrazepam	78.5 ± 3.1	51.8 ± 7.0	62.9 ± 6.1	5.5 ± 1.2	85.5 ± 4.0
Nitrazepam	116.1 ± 8.1	73.1 ± 14.5	59.1 ± 7.0	41.0 ± 5.9	82.0 ± 5.5

Human sera were spiked with 10 drugs at a concentration of 2 µl/ml. The values (%) represent the mean ± S.D. of four determinations.

の幅が広いことから、系統的薬物分析の過程では抽出されにくいことが報告されている^{8,11)}。Oasis MCX とアセトニトリルを用いた方法および改良 ISOLUTE HCX 法では、フルニトラゼパムとニトラゼパムの回収率は概ね80%以上であり、満足できる結果を得た。

Oasis MCX はポリマー担体を使用しており、ISOLUTE HCX や Bond Elut Certify などのシリカ担体と比較して保水力に優れることなどの理由から、再現性の良さが指摘されているが²⁾、今回の結果から両者に有意な差は認められず、いずれのカートリッジを用いても再現性は良好であった。

以上の結果から、Oasis MCX を使用し、溶出溶媒として、アセトニトリルを用いる方法が最適な抽出法と考えられた。Fig. 1 にその方法を示す。また、本法を用いて抽出した薬物添加血清の GC/MS (Scan モード) による分析例を Fig. 2 に示す。全イオンクロマトグラム (Fig. 2b, 2c) において、血清由来の夾雑物によると考えられるピークが多数認められたが、各薬物はその影響をほとんど受けずに検出することが可能であった。アセトアミノフェンおよびブロムワレリル尿素については、今回用いた薬

物濃度では GC/MS クロマトグラム上で明瞭なピークとして検出することができなかった。この両薬物ならびに低濃度で GC/MS 分析が困難なフルニトラゼパムおよびニトラゼパムについての LC/MS 分析例 (Scan モード) を Fig. 3 に示す。これらの薬物はマスキロマトグラム (Fig. 3b, 3c) 上で血清由来の夾雑物の影響をほとんど受けずに検出することが可能であった。

Fig. 2 Total ion chromatograms of GC/MS obtained from (a) an authentic standard solution (10 ng on column), (b) an extract from blank serum with the optimized Oasis MCX procedure and (c) an extract from serum spiked with 10 drugs at a concentration of 2 µg/ml.

Fig. 1 Optimized extraction procedure with the Oasis MCX cartridge for 10 drugs in serum.

Fig. 3 Total ion chromatograms and mass chromatograms of LC/MS obtained from (a) an authentic standard solution (100 ng on column), (b) an extract from blank serum with the optimized Oasis MCX procedure and (c) an extract from serum spiked with 10 drugs at a concentration of 2 µg/ml.

本研究では、各薬物の血清中濃度を $2\text{ }\mu\text{g/ml}$ 一定として回収率を求め、最適な抽出法を検討した。この濃度は、今回検討した中性および酸性薬物に対しては治療濃度域であるが、塩基性薬物については中毒域に達する^{3,15)}。また、フルニトラゼパムやニトラゼパムについては代謝物である 7-アミノ体の同時分析も必須と考えられた^{15,16)}。今後、塩基性薬物については治療濃度域での回収率を検討し、さらに、代謝物を含む薬物のデータを追加することにより、本法の有用性がさらに検証できるものと考えられた。

結 語

中毒事故等の発生件数の多い薬物のうち、アセトアミノフェン、フェノバルビタール、クロルプロマジン、レボメプロマジン、フルニトラゼパム等10種類の医薬品のスクリーニング法として、市販のミックスモード型固相抽出カートリッジを用いた血清中からの抽出法ならびに GC/MS および LC/MS を組み合わせた分析法の検討を行った。Oasis MCX カートリッジを使用し、溶出溶媒としてアセトニトリルを用いることにより、検討した医薬品の大半について70%以上の良好な回収率が得られた。GC/MS と LC/MS を併用することにより、検討した医薬品は全て Scan モードでの分析が可能であった。また、SIM モードを用いて分析することにより、治療レベルの血清中濃度でも測定が可能であり、本法は、血清中医薬品の一般的分析前処理法として有用であると考えられた。

謝 辞

本研究にあたり、薬物の標準品を供与頂いた各製薬会社に深謝致します。

文 献

- 1) 科警研資料：薬物による中毒事故等の発生状況(平成12.1～平成12.12) 第44報 (2002)。
- 2) Huck, C. W. and Bonn, G. K.: Recent developments in polymer-based sorbents for solid-phase extraction. *J. Chromatogr. A*, **885**, 51-72 (2000)。
- 3) 日本薬学会編：薬毒物化学試験法と注解 第4版 (1992)。
- 4) Liu, R. H. and Gadzala, D. E.: Sample pretreatment. In: *Handbook of Drug Analysis*, pp. 35-53, American Chemical Society, Washington, DC, (1997)。
- 5) Pocci, R., Dixit, V. and Dixit, V. M.: Solid-phase extraction and GC/MS confirmation of barbiturates from human urine. *J. Anal. Toxicol.*, **16**, 45-47 (1992)。
- 6) Chen, X-H., Wijsbeek, J., Veen, J. V., Franke, J-P. and de Zeeuw, R. A.: Solid-phase extraction for the screening of acidic, neutral and basic drugs in plasma using a single-column procedure on Bond Elut Certify. *J. Chromatogr.*, **529**, 161-166 (1990)。
- 7) Chen, X-H., Franke, J-P., Wijsbeek, J. and de Zeeuw, R. A.: Isolation of acidic, neutral and basic drugs from whole blood using a single mixed-mode solid-phase extraction column. *J. Anal. Toxicol.*, **16**, 351-355 (1992)。
- 8) Chen, X-H., Wijsbeek, J., Franke, J-P. and de Zeeuw, R. A.: A single-column procedure on Bond Elut Certify for systematic toxicological analysis of drugs in plasma and urine. *J. Forensic Sci.*, **37**, 61-71 (1992)。
- 9) Black, D. A., Clark, G. D., Haver, V. M., Garbin, J. A. and Saxon, A. J.: Analysis of urinary benzodiazepines using solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Anal. Toxicol.*, **18**, 185-188 (1994)。
- 10) Nguyen, H. and Nau, D. R.: Rapid method for the solid-phase extraction and GC-MS analysis of flunitrazepam and its major metabolites in urine. *J. Anal. Toxicol.*, **24**, 37-45 (2000)。
- 11) Soriano, T., Jurado, C., Menendez, M. and Repetto, M.: Improved solid-phase extraction method for systematic toxicological analysis in biological fluids. *J. Anal. Toxicol.*, **25**, 137-143 (2001)。
- 12) Clauwaert, K. M., Van Bocxlaer, J. F., Lambert, W. E., Van den Eeckhout, E. G. and

- Lemiere, F.: Narrow-bore HPLC in combination with fluorescence and electrospray mass spectrometric detection for the analysis of cocaine and metabolites in human hair. *Anal. Chem.*, **70**, 2336–2344 (1998).
- 13) Yawney, J., Treacy, S., Hindmarsh, K. W. and Burczynski, F. J.: A general screening method for acidic, neutral and basic drugs in whole blood using the Oasis MCX[®] column. *J. Anal. Toxicol.*, **26**, 325–332 (2002).
- 14) Bogusz, M. J., Maier, R.-D., Schiwy-Bochat, K.-H. and Kohis, U.: Applicability of various brands of mixed-phase extraction columns for opiate extraction from blood and serum. *J. Chromatogr. B*, **683**, 177–188 (1996).
- 15) Baselt, R. C.: Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man Fifth Ed., Chemical Toxicology Institute, California, (2000).
- 16) Saito, T., Kusakabe, T., Jin, Z. B., Hasegawa, I., Yukawa, N. and Takeichi, S.: Determination of ten benzodiazepines in human whole blood by capillary gas chromatography with micro-electron capture detection. *Jpn. J. Forensic Toxicol.*, **20**, 268–276 (2002).