

Bogdan Szukalski, Ewa Mirkiewicz, Jerzy Walkowiak, Ewa Taracha
Zakład Biochemii Instytutu Psychiatrii i Neurologii w Warszawie

OPRACOWANIE WARUNKÓW SKRININGOWEJ I KONFIRMACYJNEJ ANALIZY BENZODIAZEPIN W MOCZU NARKOMANÓW

WSTĘP

Wzrastająca liczba publikacji na temat toksyczności barbituranów spowodowała w latach 50. intensyfikację poszukiwań nowych preparatów o działaniu uspokajającym, nasennym i przeciwdrgawkowym. Ich efektem była wykonana w 1957 r. synteza chlordiazepoksydu, triumfalne wprowadzenie go trzy lata później na rynek oraz rejestracja wielu innych leków o strukturze benzodiazepin. Obecnie w użyciu jest ponad 50 preparatów – pochodnych 1,4-benzodiazepiny, które należą do najczęściej przepisywanych leków. W 1977 r. tylko w Ameryce Północnej zużyto 8000 ton leków benzodiazepinowych. W ostatnim 10-leciu do najczęściej stosowanych benzodiazepin należały: diazepam, nitrazepam, flunitrazepam i oksazepam.

Wprowadzenie benzodiazepin do terapii oznaczało istotny postęp w farmakologii chorób psychicznych i somatycznych, gdyż od barbituranów i meprobamatu różnią się one mniejszą toksycznością, wyższą selektywnością działania na ośrodkowy układ nerwowy oraz szerszym „oknem terapeutycznym”.

Benzodiazepiny można podzielić na leki o krótkim działaniu (okres półtrwania <10 godz.) np. oksazepam, o średnio długim działaniu (okres półtrwania 10-24 godz.) np. bromazepam, flunitrazepam oraz o długim działaniu (okres półtrwania > 24 godz.) np. chlordiazepoksyd, klorazepat, diazepam, flurazepam, medazepam, nitrazepam, klobazam.

Poszczególne benzodiazepiny różnią się również nasileniem kierunkowych działań terapeutycznych. Działaniem nasennym i uspokajającym odznacza się flunitraze-

Praca wykonana w ramach działalności statutowej Instytutu Psychiatrii i Neurologii w Warszawie

pam, oksazepam i triazolam, działaniem anksjolitycznym - diazepam i temazepam, działaniem przeciwdepresyjnym – alprazolam, działaniem zwiotczającym mięśnie – diazepam i tetrazepam a działaniem przeciwdrgawkowym – diazepam, klobazam i klonazepam.

Benzodiazepiny posiadają słaby, ale wyraźny efekt euforyzujący, który w połączeniu z działaniem sedatywnym i przeciwlękowym wywołującym stan uspokojenia i wyciszenia, jest przyczyną nadużywania leków tej grupy. Niemedyczne stosowanie benzodiazepin rozpoczęło się w latach 60., jednakże rzadko były one „narkotykami pierwszego wyboru”. Częściej były i są przyjmowane łącznie z innymi środkami psychotropowymi w celu zwiększenia efektów ich działania. Śmiertelne zatrucie samymi benzodiazepinami zdarzają się rzadko, jednak ich interakcje z innymi środkami działającymi na ośrodkowy układ nerwowy – opiatami, alkoholem, barbituranami, fenotiazynami, trójcyklicznymi antydepresantami mogą wywołać objawy zagrażające życiu nawet przy stosunkowo niskich dawkach.

Dawki przyjmowane przez narkomanów przekraczają zwykle 20 a nawet 30-krotnie zalecane przez producentów dawki lecznicze, co wiąże się z rozwojem tolerancji sprawiającej, że po kilku tygodniach leczenia początkowo skuteczna dawka staje się niewystarczająca.

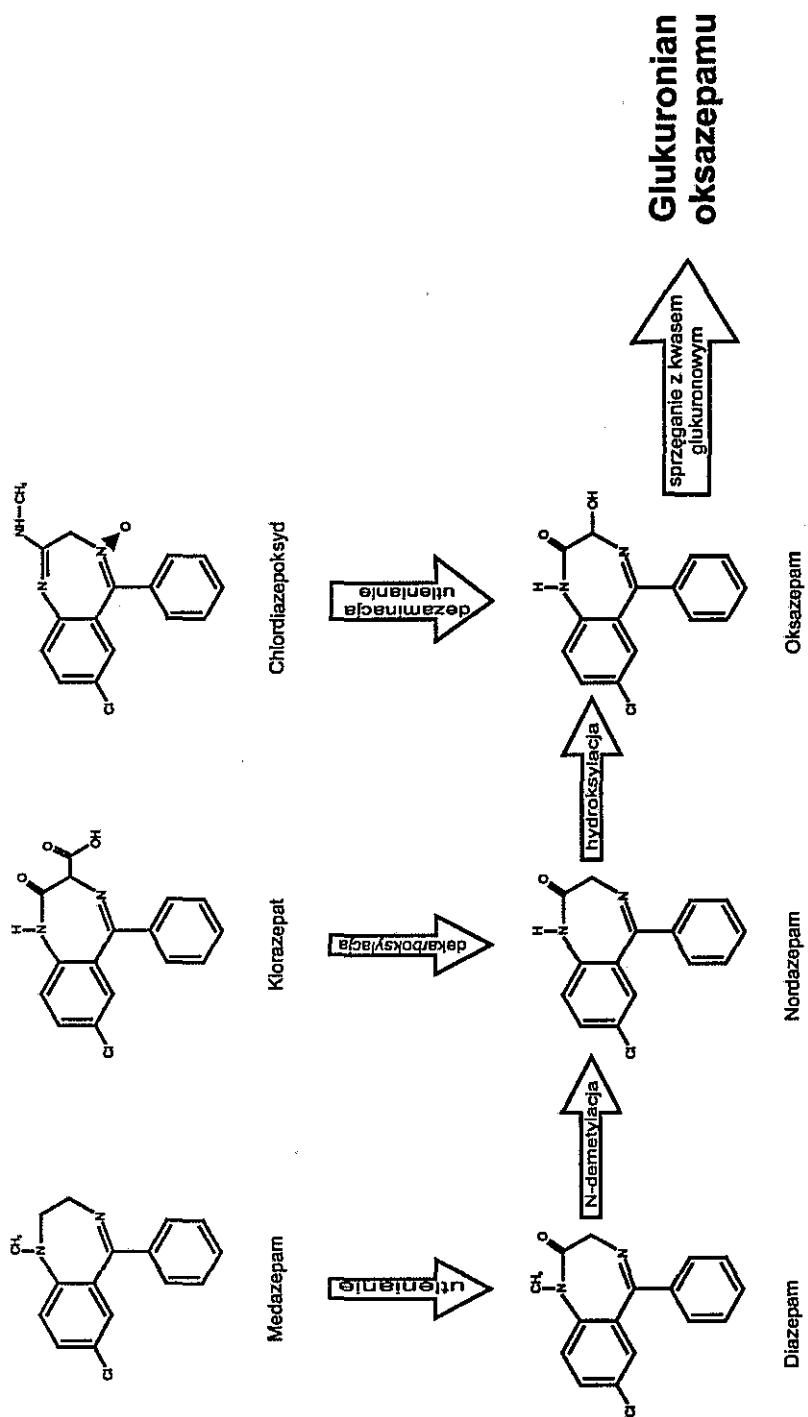
Leki benzodiazepinowe wywołują uzależnienie i nagłe przerwanie ich podawania wyzwała objawy abstynencyjne najsilniej wyrażone między 2 i 10 dniem po odstawieniu, ale mogące utrzymywać się do 1 miesiąca. Należą do nich bezsenność, lęk i niepokój, dysforia, drażliwość, bóle mięśniowe, drzenie mięśniowe, brak łaknienia, nudności, wymioty, nadwrażliwość na hałas, światło i zapachy, zjawisko derealizacji (wrażenie, że otaczająca rzeczywistość uległa zmianie, zwykle na gorsze) oraz depersonalizacji (przekonanie chorego, że zmienia się jego osobowość). Niekiedy mogą wystąpić majaczenia oraz napady drgawkowe (14).

Im dłuższy okres półtrwania benzodiazepiny, tym objawy odstawienne są silniej wyrażone.

Dotychczas nie zanotowano przypadków produkcji benzodiazepin w nielegalnych laboratoriach, co można tłumaczyć niezbyt prostą syntezą, niewysoką ceną leków oraz ich względną dostępnością – można je na przykład kupić od ludzi starych, którzy bez trudu otrzymują recepty na nasenne benzodiazepiny.

W lutym 1984 roku Komisja Narkotyków ONZ na ósmej, specjalnej sesji podjęła decyzję o objęciu 33 benzodiazepin kontrolą międzynarodową. Decyzja ta nakłada na laboratoria toksykologiczne obowiązek opracowania i wdrożenia miarodajnych metod analizy tych związków występujących zarówno in substantia (próbki zatrzymane przez policję) jak i w materiale biologicznym pochodzącym od narkomanów. Ponieważ jednak analiza kilkudziesięciu różnych benzodiazepin jest trudnym zadaniem analitycznym, Komisja zaleca skupienie uwagi na kilku najbardziej rozpowszechnionych i najczęściej nadużywanych w danym regionie.

Klasyczne leki benzodiazepinowe posiadają strukturę 5-arylo-1,4-benzodiazepin, w których pierścień benzenowy jest połączony z 1,4-diazepiną za pośrednictwem



Ryc. 1. Schemat przemian 1,4-benzodiazepin.

węgli 6 i 7. Aryl w pozycji 5 to najczęściej niepodstawiony rodnik fenyłowy (np. w chlordiazepoksydzie, diazepamie, oksazepamie, nitrazepamie, medazepamie, klobazamie i klorazepacie) lub rodnik fenyłowy podstawiony w pozycji 2 atomem halogenu (np. we flurazepamie i flunitrazepamie). Inne benzodiazepiny zawierają dodatkowy pierścień imidazolowy lub triazolowy połączony z 1,4-diazepiną w pozycji 1 i 2 (np. w alprazolamie i triazolamie) (7, 8).

Metabolizm benzodiazepin polega na hydroksylacji zarówno łańcuchów alifatycznych, jak i pierścieni aromatycznych, dealkilacji, redukcji i acetylacji, po których często następuje sprzężanie z kwasem glukuronowym, dzięki czemu tworzą się produkty o wysokiej polarności, przystosowane do wydalenia z moczem.

Metabolity powstające w wyniku tak zwanych reakcji I fazy wykazują często aktywność biologiczną podobną do aktywności związku macierzystego lub nawet wyższą.

Chlordiazepoksyd, klorazepat, medazepam i diazepam mają wspólne torry metaboliczne. Ulegają one N-demetylacji, dekarboksylacji, dezaminacji i utlenianiu przekształcając się w nordazepam, a ten ulega hydroksylacji z utworzeniem oksazepamu. Wprowadzona grupa hydroksylowa reaguje z kwasem glukuronowym tworząc glukuronian oksazepamu, który zostaje wydalony z moczem (Ryc. 1.).

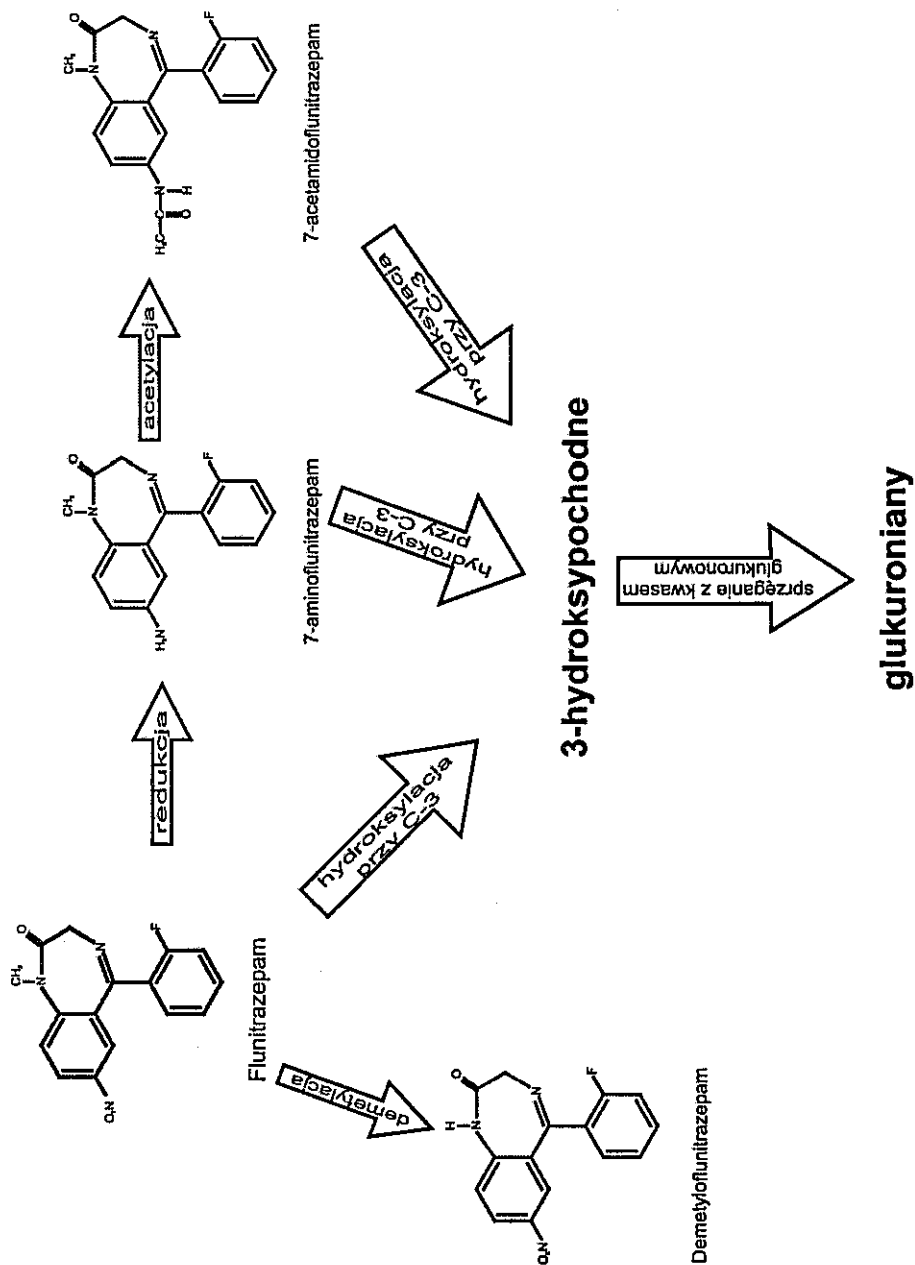
Metabolizm 7-nitro-1,4-benzodiazepin, do których należy flunitrazepam, nitrazepam, nimetazepam i klonazepam, polega na redukcji grupy nitrowej do aminowej i acetylacji tej ostatniej. Np. flunitrazepam ulega redukcji do 7-aminoflunitrazepamu a następnie acetylacji do 7-acetamidoflunitrazepamu. Zarówno związek macierzysty, jak i metabolity ulegają następnie hydroksylacji w pozycji 3 i sprzęgnięciu z kwasem glukuronowym. Flunitrazepam i nitrazepam mogą również ulegać N-demetylacji (Ryc. 2), a nitrazepam – rozerwaniu pierścienia z utworzeniem 2-amino-5-nitrobenzofenonu (15).

Bromazepam ulega hydroksylacji w pozycji 3 i sprzężaniu z kwasem glukuronowym oraz w niewielkim stopniu przemianie polegającej na rozerwaniu pierścienia z utworzeniem 2-(2-amino-5-bromobenzoilo)-pirydyny.

Tak więc w moczu osoby przyjmującej benzodiazepinę może występować substancja macierzysta, jej metabolity oraz glukuroniany metabolitów. Substancje te można poddać hydrolizie do aminobenzofenonów, a następnie reakcji dwuazowania do związków dwuazoniowych, które z odczynnikiem Brattona-Marshalla dają intensywnie zabarwione związki azowe. Zaletą takiego postępowania jest wyraźnie wyższa czułość tej reakcji niż reakcji barwnych związków macierzystych.

Produkty hydrolizy badanych benzodiazepin i barwy odpowiadających im związków azowych zestawiono w tabeli 1.

Widać z niej, że niektóre benzodiazepiny w wyniku hydrolizy przekształcają się w identyczne aminobenzofenony. I tak produktem hydrolizy chlordiazepoksydu, oksazepamu i klorazepatu jest aminochlorobenzofenon (ACB) a diazepam i medazepam – metyloaminochlorobenzofenon (MACB). Pozostałe benzodiazepiny dają inne, charakterystyczne dla nich, produkty hydrolizy.



Ryc. 2. Schemat przemian 7-nitro-1,4-benzodiazepin (na przykładzie flunitrazepamu).

TABELA 1
Produkty hydrolizy badanych benzodiazepin i zabarwienie ich dwuazowych pochodnych (15).

Nazwa benzodiazepiny	Nazwa aminobenzofenonu	Barwa związku azowego
Chlordiazepoksyd	Aminochlorobenzofenon (ACB)	fioletowa
Klorazepat	Aminochlorobenzofenon (ACB)	fioletowa
Oksazepam	Aminochlorobenzofenon (ACB)	fioletowa
Diazepam	Metyloaminochlorobenzofenon MACB)	żółta → fioletowa
Medazepam	Metyloaminochlorobenzofenon MACB)	żółta → fioletowa
Nitrazepam	Aminonitrobenzofenon (ANB)	czerwona → fioletowa
Flurazepam	Aminochlorofluorobenzofenon (ACFB)	fioletowa
Flunitrazepam	Metyloaminonitrofluorobenzofenon (MNFB)	żółta → fioletowa
Klobazam	1-amino-2-(fenylo)-4-chlorobenzen	fioletowa
Bromazepam	(2-amino-5-bromobenzoiło)-pirydyna (ABBP)	czerwona → fioletowa

W Polsce ważny problem stanowią benzodiazepiny używane przez narkomanów opiatowych jako zwiększający efekt dodatek do preparatów otrzymanych ze słomy makowej lub dobierane jako uzupełnienie otrzymywanego w celach leczniczych metadonu. Dlatego kontrola zachowania abstynencji przez pacjentów uczestniczących w programach metadonowych obejmuje również badanie moczu na obecność benzodiazepin, najczęściej przy użyciu metody immunofluorescencji w świetle spolaryzowanym (FPIA). Pozwala ona wykryć obecność benzodiazepin oraz określić ich przybliżoną zawartość w moczu, nie dostarcza jednak informacji o tym, jakie to są benzodiazepiny. Nie wiadomo również, w jakim stopniu poszczególne związki reagują z przeciwciałami testu. Znaczne różnice w tym zakresie mogą uniemożliwić wykrycie jednych benzodiazepin mimo ich obecności w badanej próbce (wyniki fałszywie ujemne) lub znacznie zawyżyć ilościowe wyniki innych. Ustalenie reaktywności poszczególnych benzodiazepin wobec przeciwciał użytych w metodzie FPIA może pomóc lepiej ocenić jej skuteczność przy analizie tej grupy związków, a zastosowanie wysokosprawnej chromatografii płytkowej (HPTLC) i wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) – umożliwić identyfikację poszczególnych benzodiazepin.

MATERIAŁ I METODY

Bromazepam, nitrazepam, flurazepam, flunitrazepam, chlordiazepoksyd, diazepam, oksazepam, medazepam, klobazam, klorazepat oraz 2-amino-5-chlorobenzofenon (ACB) (wszystkie firmy Sigma) przygotowano w postaci roztworów metanolowych o stężeniu 5mg/ml, które następnie dodawano do czystego moczu (pH 5-8), aby stężenia poszczególnych związków wyniosły w nim 300, 500, 1500, 2000 i 2500 ng/ml.

Oznaczenia wykonywano metodą immunofluorescencji w świetle spolaryzowanym (FPIA) (5) przy użyciu zestawu TDx Benzodiazepines Assay System (1, 13), kalibrowanego przez producenta wobec nordazepamu. Reaktywność poszcze-

gólnych benzodiazepin wobec przeciwciał testu (w%) obliczano jako stosunek średniej z odczytów do stężenia związku z próbówce pomnożony przez 100.

Materiałem użytym do identyfikacji benzodiazepin był mocz pacjentów Oddziału Detoksykacyjnego, w którym badanie skringowe wykazało obecność benzodiazepin.

Izolację benzodiazepin z moczu przed rozdzieleniem chromatograficznym prowadzono metodą ekstrakcji ciecz – ciało stałe (3,10) stosując kolumny z sorbentem krzemionkowym (Bond Elut Certify Extraction Columns – Varian) oraz urządzenie do ekstrakcji z regulowaną próżnią (Analychem Vac Elut SPS 24™ – Varian).

Kolumnę przygotowano do ekstrakcji przepuszczając pod niewielką próżnią kolejno 2 ml metanolu i 2 ml 0,1 M buforu fosforanowego o pH 6 i po podaniu badanego materiału (5 ml moczu z dodatkiem 2 ml 0,1 M buforu fosforanowego o pH 6) płukano ją mieszaniną buforu fosforanowego o pH 6 i metanolu (80:20) oraz 1 ml 1M kwasu octowego. Kolumny suszono przez 5 minut pod próżnią (380 mm Hg) i powtórnie płukano 1 ml heksanu.

Benzodiazepiny eluowano z kolumny za pomocą 4 ml chlorku metylenu, eluat odparowywano do sucha w strumieniu azotu w temperaturze nie przekraczającej 40°C i suchą pozostałość rozpuszczano w 50 µl metanolu.

Do rozdzielenia mieszaniny benzodiazepin zastosowano metodę wysokosprawnej chromatografii cienkowarstwowej (HPTLC) (9, 11, 12) oraz metodę wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) (4, 6).

Rozdział mieszaniny benzodiazepin metodą HPTLC prowadzono na płytkach o wymiarach 10 x 10 cm pokrytych żelem krzemionkowym (Silica-gel G 60F₂₅₄-Merck), stosując następujące układy rozwijające:

- A. Chloroform – Aceton (4:1)
- B. Octan etylu – Metanol – Stężony roztwór NH₃ (85: 10: 5)
- C. Octan etylu
- D. Chloroform – Metanol (9:1)
- E. Cykloheksan – Toluen – Dietyloamina (75:15:10)
- F. Octan etylu – Metanol – Woda – Stężony roztwór NH₃ (43:5:1,5:0,5)

Do lokalizacji benzodiazepin na chromatogramach stosowano:

- Światło lampy UV (254 nm)
- Roztwór kwasu siarkowego, ogrzewanie przez 5 minut w temperaturze 80°C i światło lampy UV (366 nm).

- Odczynnik jodoplatynianowy (50 mg chlorku platynowego + 1 g jodku potasu + 20 ml wody)

- Odczynnik Brattona – Marshalla (1 g N-(1-naftylo)-etylenodiaminy w 100 ml mieszaniny wody i acetonu (8,7:2)

- 9 N roztwór kwasu siarkowego
- 1% wodny roztwór azotynu sodowego
- 5% wodny roztwór amidosulfonianu amonowego.

Analizę mieszaniny benzodiazepin metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) prowadzono w następujących warunkach (2, 16):

- Kolumna o długości 150 mm wypełnieniem Spherisorb ODS 5 μm
- Faza ruchoma: 0,02 M roztwór KH_2PO_4 o $\text{pH}=4,4$ – metanol-acetonitryl (66,4:5,7:27,9)
- Szybkość przepływu fazy ruchomej: 1 ml/min
- Detektor spektrofotometryczny przy długości fali $\lambda=234$ nm
- Zawór dozujący z pętlą o pojemności 20 ml
- Temperatura kolumny: 26°C - 31°C (ponieważ stosowano termostat powietrzny, bez możliwości chłodzenia, była ona zależna od temperatury otoczenia).

Do analizy metodą HPLC używano wodnych roztworów o stężeniu około 100 mg/ml. Ponieważ stosowano zawór dozujący z pętlą o pojemności 20 μl , na kolumnę chromatograficzną wstrzykiwano około 2 μg badanego związku.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

W tabeli 2 zestawiono wartości reaktywności krzyżowej 10 benzodiazepin wobec przeciwciał testu FPIA. W formie graficznej zależności te przedstawia ryc.3.

Spośród badanych benzodiazepin najwyższy stopień wiązania z przeciwciałami wykazuje diazepam. Wartości reaktywności tego leku są wysokie i wzrastają ze wzrostem stężenia od 62% dla 300 mg/ml do 102% dla 2000 mg/ml. Jego strukturę należy więc uznać za optymalną dla reakcji z przeciwciałami testu FPIA. Charakteryzuje się ona obecnością grupy metylowej przy N1 i atomem chloru w pierścieniu benzenowym.

Wysoką reaktywność przy niskich stężeniach wykazuje medazepam (>100 – 90%) od 300 ng/ml-500 ng/ml, jednak przy stężeniach wyższych maleje ona i dla 2000 ng/ml wynosi tylko 55%.

Struktura medazepamu różni się od diazepamu tylko brakiem grupy ketonowej przy C-2.

Do grupy benzodiazepin odznaczających się wysoką reaktywnością ($\sim 75\%$) należy oksazepam a także klorazepat, którego reaktywność nie zmienia się praktycznie w granicach stężeń 300-1500 ng/ml.

Trzy benzodiazepiny – flunitrazepam, flurazepam i nitrazepam zachowują się wobec przeciwciał prawie identycznie, przy czym ich reaktywność krzyżowa, zwłaszcza dla nieco wyższych stężeń, nie przekracza 50%. Porównanie budowy tych związków pokazuje, że analogie nie są tak duże, jak można by oczekiwać na podstawie zachowania wobec przeciwciał. Wprawdzie wszystkie mają podstawnik przy C-7, jednak we flurazepampie jest nim atom chloru, a we flunitrazepampie i nitrazepampie – grupa nitrowa. Ponadto nitrazepam różni się od dwóch pozostałych związków brakiem podstawnika przy N-1.

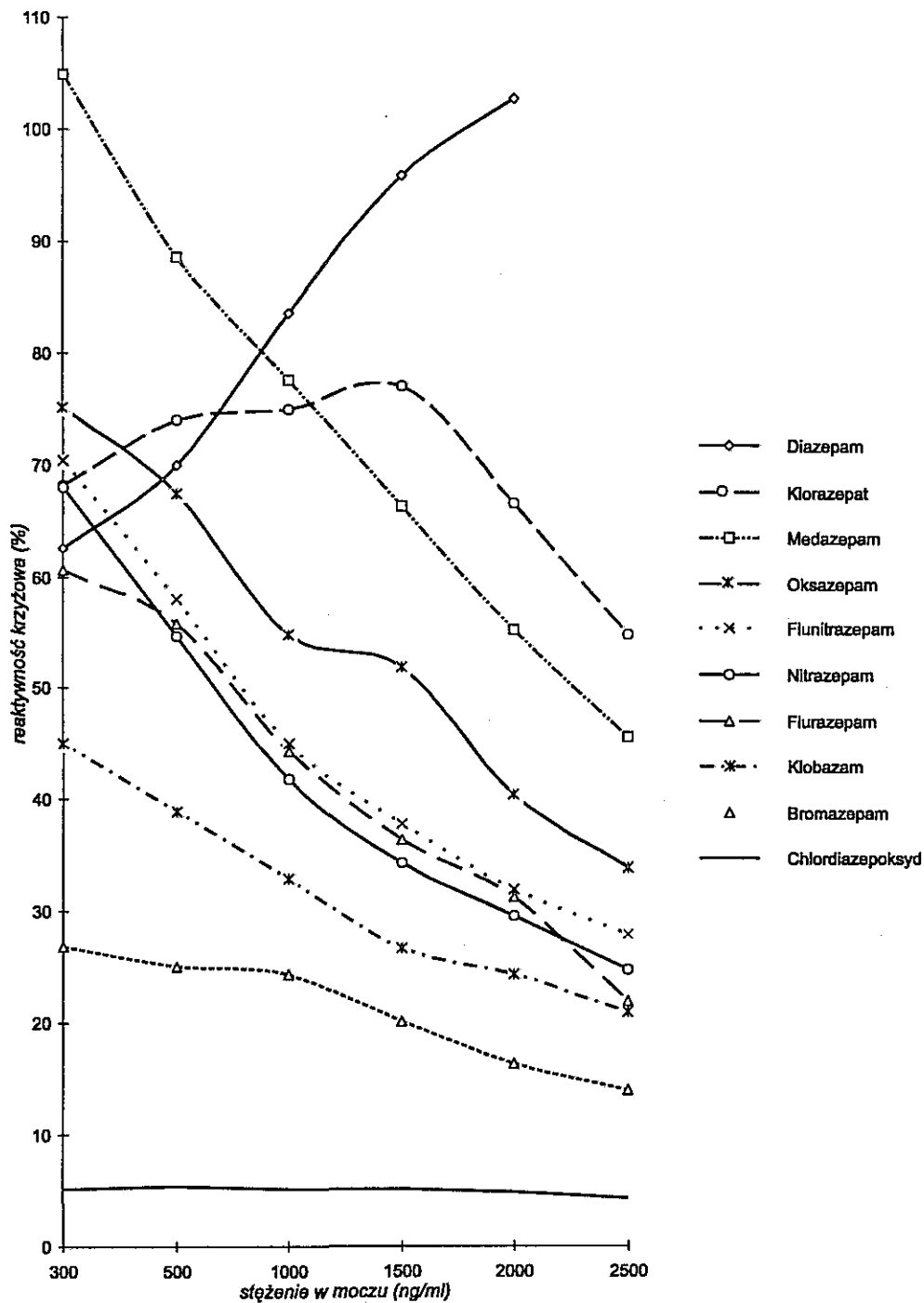
Podobny kształt krzywej, ale niższe wartości reaktywności uzyskano dla klobazamu (45-25%) i bromazepamu ($\sim 20\%$). W tym ostatnim przypadku reaktywność prawie nie zależy od stężenia.

Bardzo niską reaktywność krzyżową nie ulegającą zmianie ze wzrostem stężenia, wykazuje chlordiazepoksyd, który jest praktycznie niewykrywalny metodą FPIA. Pod

TABELA 2
Reaktywność związków z grupy benzodiazepin wobec przeciwciał testu FPIA.

Stężenie w moczu (ng/ml)	Bromazepam		Nitrazepam		Oksazepam		Flunitrazepam		Flurazepam	
	Stężenie odczytane (ng/ml)	Reaktywność (%)	Stężenie odczytane (ng/ml)	Reaktywność (%)	Stężenie odczytane (ng/ml)	Reaktywność (%)	Stężenie odczytane (ng/ml)	Reaktywność (%)	Stężenie odczytane (ng/ml)	Reaktywność (%)
300	80,5	26,8	204,1	68,0	225,0	75,1	210,8	70,3	180,2	60,7
500	125,0	25,1	273,3	54,6	337,0	67,4	290,5	58,0	278,3	55,7
1000	243,0	24,3	418,4	41,8	548,2	54,8	450,8	45,1	443,5	44,4
1500	301,2	20,1	516,3	34,4	775,2	51,9	566,3	37,8	545,6	36,4
2000	328,2	16,4	591,0	29,6	808,9	40,4	640,5	32,0	625,0	31,3
2500	350,3	14,0	620,4	24,8	850,3	34,0	700,4	28,0	550,1	22,0

Stężenie w moczu (ng/ml)	Medazepam		Klobazam		Klorazepat		Chlodiazepoksyd		Diazepam	
	Stężenie odczytane (ng/ml)	Reaktywność (%)	Stężenie odczytane (ng/ml)	Reaktywność (%)	Stężenie odczytane (ng/ml)	Reaktywność (%)	Stężenie odczytane (ng/ml)	Reaktywność (%)	Stężenie odczytane (ng/ml)	Reaktywność (%)
300	314,3	104,8	135,2	45,1	204,3	68,1	15,3	5,1	187,8	62,8
500	443,2	88,6	195,1	39,0	370,1	74,0	27,2	5,4	350,2	70,0
1000	775,9	77,6	330,2	33,0	749,5	75,0	52,4	5,2	834,5	83,6
1500	994,6	66,3	400,4	26,7	1155,5	77,0	77,8	5,2	1439,1	96,0
2000	1104,9	55,2	485,7	24,3	1331,7	66,6	98,2	4,9	2056,5	102,8
2500	1140,0	45,6	525,1	21,0	1370,0	54,8	108,4	4,3	---	---



Ryc. 3. Zależność reaktywności krzyżowej benzodiazepin od stężenia.

względem strukturalnym wyróżnia się on obecnością ugrupowania N-tlenkowego, które nie występuje w innych benzodiazepinach, oraz grupy metyloaminowej w pozycji 2, którą w innych benzodiazepinach zajmuje najczęściej grupa ketonowa.

Metoda ekstrakcji w fazie stałej przy użyciu kolumn Bond Elut Certify Extraction Columns – (Varian), prowadzona w warunkach zalecanych przez producenta, okazała się nieskuteczna w odniesieniu do bromazepamu, chlordiazepoksydu, klorazepatu i flurazepamu, które nie są zatrzymywane przez kolumnę. Natomiast klobazam, flunitrazepam oraz najbardziej rozpowszechnione – diazepam, oksazepam i nitrazepam – ulegają adsorpcji na wypełnieniu kolumny i mogą być ekstrahowane tą metodą.

W tabeli 3 zestawiono wartości współczynników R_f dla 10 benzodiazepin w sześciu układach (A-F) rozwijanych metodą wysokosprawnej chromatografii płytkowej (HPTLC).

Żaden z tych układów nie daje dobrego rozdziłu wszystkich badanych benzodiazepin, można go natomiast uzyskać stosując kolejno układy E i C. W układzie E

TABELA 3
Wartości R_f (x100) benzodiazepin w 6 układach rozwijających

Nazwa związku	Układy rozwijające					
	A	B	C	D	E	F
Bromazepam	9	60	17	39	4	65
Chlordiazepoksyd	10	47	11	53	3	52
Klobazam	53	60	54	73	13	70
Diazepam	54	77	53	72	29	72
Flunitrazepam	52	73	52	71	16	72
Flurazepam	3	70	3	41	36	50
Medazepam	52	74	43	73	46	70
Nitrazepam	34	67	52	57	1	70
Oksazepam	19	36	36	47	1	59
Klorazepat (kwas)	44	-	-	65	4	-

TABELA 4
Wyniki oznaczania benzodiazepin w moczu metodą FPIA i HPTLC

Mocz	Metoda FPIA (ng/ml)	Metoda HPTLC
1	890	diazepam
2	>2400	oksazepam*, diazepam**
3	>2400	diazepam***, oksazepam***
4	1199	oksazepam
5	769	oksazepam****
6	>2400	oksazepam*, diazepam*

* duża intensywna plama

** śladowe ilości

*** bardzo duża intensywna plama

**** słaba plama

rozdzielają się: klobazam, diazepam, flunitrazepam, flurazepam i medazepam, a bromazepam i chlordiazepoksyd oraz nitrazepam i oksazepam tworzą wspólne plamy. Te dwie pary związków rozdzielają się dobrze w układzie C.

W tabeli 4 zestawiono wyniki oznaczenia „puli” benzodiazepin metodą FPIA oraz identyfikacji poszczególnych związków metodą HPTLC.

W próbkach moczu pacjentów, u których wynik skriningowego badania na benzodiazepiny był dodatni, zidentyfikowano oksazepam i diazepam lub mieszaninę tych związków. Nie stwierdzono natomiast obecności 2-amino-5-chlorobenzofenonu – produktu hydrolizy oksazepamu.

Stosując metodę wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) uzyskano następujące średnie czasy retencji dla badanych związków:

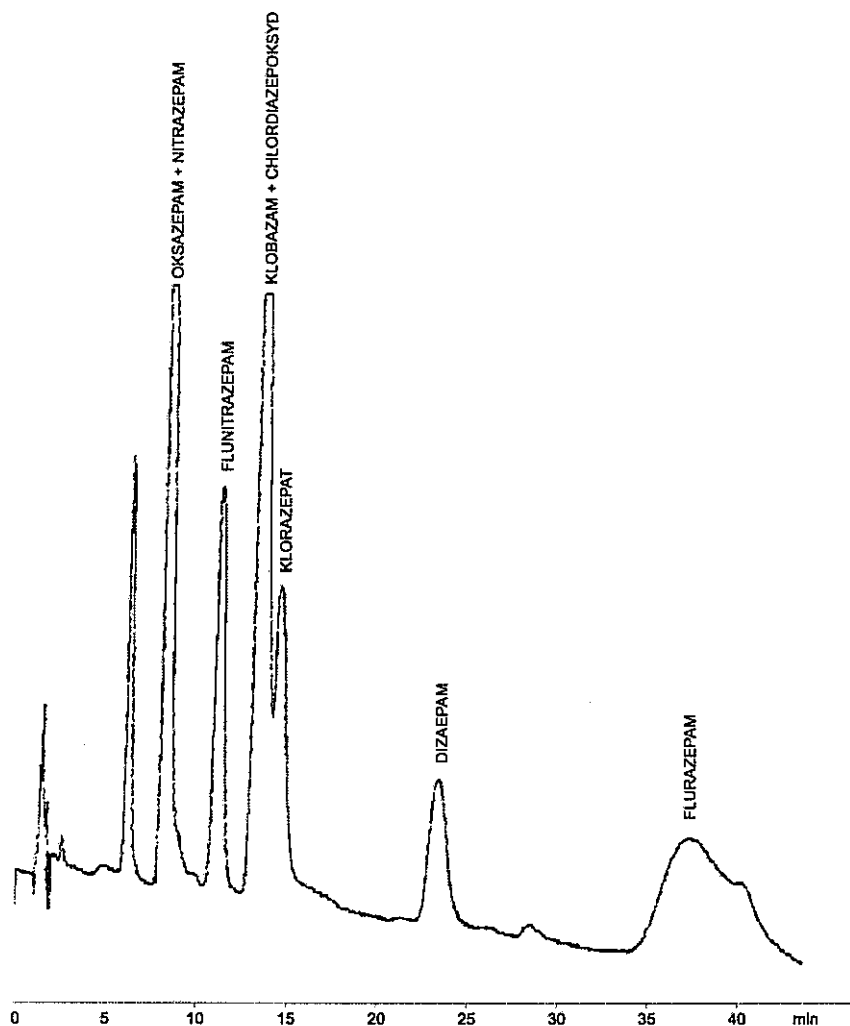
- nitrazepam 8,11 min:
- oksazepam 8,15 min
- flunitrazepam 10,98 min
- klobazam 13,24 min
- chlordiazepoksyd 13,25 min
- klorazepat 14,23 min
- diazepam 22,98 min
- flurazepam 38,87 min
- medazepam >60 min

Dla bromazepamu otrzymano bardzo rozmyty pik, co może wskazywać, że tworzy go więcej niż jedna substancja na przykład wzorzec zawiera jakieś zanieczyszczenia lub uległ częściowemu rozkładowi.

Ryc. 4. przedstawia chromatogram mieszaniny benzodiazepin otrzymaną metodą HPLC. Uzyskano 6 pików utworzonych przez mieszaninę oksazepamu i nitrazepamu, flunitrazepam, mieszaninę klobazamu i chlordiazepoksydu, klorazepat, diazepam i flurazepam.

Stężenia poszczególnych związków w mieszaninie były rzędu 1, g/ml, co oznacza, że na kolumnę chromatograficzną podawano po około 20 ng każdego związku. Uzyskane wyniki pozwalają przypuszczać, że dla syntetycznych roztworów granica detekcji wynosi przynajmniej 400 pg lub nawet mniej.

Próbowano zmodyfikować nieco fazę ruchomą, aby poprawić rozdział badanych związków. W tym celu stosowano różne wartości pH buforu fosforanowego (4,0; 3,7 i 3,5) jednak bez istotnego wpływu na rozdział badanych związków. Obniżanie pH powoduje nieznaczne skrócenie czasów retencji poprawiając jedynie wygląd (symetryczność) otrzymanych pików. Również zmiany proporcji składników fazy ruchomej nie wpływają w sposób istotny na rozdział badanych substancji. Wprowadzanie zmian składu i pH fazy ruchomej jest bardzo czasochłonne, ponieważ wymaga każdorazowo długotrwałego (często kilkugodzinnego) równoważenia kolumny chromatograficznej. Ponieważ otrzymanie całkowitego rozdziału wszystkich 10 badanych związków w zastosowanych warunkach nie jest możliwe, bardziej celowe byłoby oznaczanie sumy nie ulegających rozdziałowi par związków i poszukiwanie takich warunków chromatograficznych, w których związki te uległyby rozdzieleniu.



Ryc. 4. Chromatogram mieszaniny benzodiazepin otrzymany metodą HPLC.

WNIOSKI

1. Reaktywność 10 badanych benzodiazepin wobec przeciwciał użytych w metodzie FPIA różni się w bardzo szerokich granicach, co sprawia, że poziomy detekcji poszczególnych związków wykazują duże różnice.

2. Wysoką reaktywność wykazuje diazepam, medazepam i klorazepat, które mogą być z powodzeniem oznaczane metodą FPIA.

3. Flunitrazepam, flurazepam i nitrazepam zachowują się wobec przeciwciał bardzo podobnie w szerokim zakresie stężeń. Ich reaktywność nie jest jednak wysoka.

4. Bardzo niską reaktywność, nie ulegającą zmianie ze wzrostem stężenia, wykazuje chlordiazepoksyd, co stawia pod znakiem zapytania możliwość wykrywania tego związku metodą FPIA.

5. Metoda HPTLC może służyć do rozdzielenia i identyfikacji 10 benzodiazepin, ale wymaga zastosowania dwóch układów rozwijających.

6. Metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej w zastosowanych warunkach nie udaje się rozdzielić klobazamu i chlordiazepoksydu oraz nitrazepam i oksazepam.

STRESZCZENIE

Podjęto próbę porównania przydatności trzech metod analitycznych opartych na różnych zasadach fizyko-chemicznych (FPIA, HPTLC i HPLC) do wykrywania i identyfikacji 10 leków benzodiazepinowych, objętych kontrolą międzynarodową. Efektywność metody immunofluorescencji w świetle spolaryzowanym oceniano badając reaktywność poszczególnych benzodiazepin wobec przeciwciał testu przy różnych stężeniach. Metoda FPIA daje miarodajne wyniki dla medazepam, diazepam, oksazepam i klorazepatu, gdyż stopień wiązania tych związków z przeciwciałami jest wysoki w szerokim zakresie stężeń.

Trzy związki – flurazepam, flunitrazepam i nitrazepam zachowują się wobec przeciwciał prawie identycznie. Ich reaktywność przy wyższych stężeniach nie przekracza 50%.

Podobny kształt krzywej, ale niższe wartości reaktywności, uzyskano dla klobazamu i bromazepam. W tym ostatnim przypadku reaktywność prawie nie zależy od stężenia.

Bardzo niską reaktywność wobec przeciwciał FPIA wykazuje chlordiazepoksyd, który jest praktycznie niewykrywalny tą metodą.

Zadowolający rozdział 10 badanych benzodiazepin metodą wysokosprawnej chromatografii płytkowej można uzyskać stosując kolejno dwa układy rozwijające: E i C. Słabo rozdzielające się w układzie E bromazepam i chlordiazepoksyd oraz nitrazepam i oksazepam można rozdzielić w układzie C. Do sprawdzenia przydatności

HPTLC jako metody identyfikacji poszczególnych benzodiazepin w materiale biologicznym wykorzystano mocz pacjentów, u których wynik skriningowego badania na benzodiazepiny był dodatni. Zidentyfikowano u nich oksazepam, diazepam lub mieszaninę tych związków.

Słowa kluczowe: benzodiazepiny, FPIA, HPTLC, HPLC

Bogdan Szukalski, Ewa Mirkiewicz, Jerzy Walkowiak, Ewa Taracha
Development of conditions for screening and confirmation analysis of benzodiazepines in urine of drug addicts

SUMMARY

An attempt was made to compare the usefulness of three analytical methods, based on different physicochemical principles (FPIA, HPTLC, and HPLC), in detection and identification of 10 benzodiazepines subjected to international control. The ef-

fectiveness of the immunofluorescence in the polarized light procedure was evaluated by studying the antibody reactivity of each benzodiazepine at different concentrations. The FPIA method gives reliable results for medazepam, diazepam, oxazepam, and clorazepate, since the degree of their binding to antibodies is high over a wide concentration range.

Three compounds - flurazepam, flunitrazepam, and nitrazepam react with antibodies in almost identical way. At higher concentrations their reactivity does not exceed 50%.

A similar shape of the curve but lower reactivity was observed with clobazam and bromazepam. The reactivity of the latter was practically independent of its concentration.

The reactivity of chlordiazepoxide towards the FPIA antibodies is very low, and this compound is practically undetectable by this method.

A satisfactory separation of the ten benzodiazepines tested can be achieved with high performance thin layer chromatography method by consecutive application of two developing systems: E and C. Bromazepam and chlordiazepoxide as well as nitrazepam and oxazepam, which do not separate well in E, can be separated by development in C. The urine of patients, whose benzodiazepine screening test results were positive, was used to test the suitability of HPTLC as a method for identification of benzodiazepines in biological material. Oxazepam, diazepam or a mixture of the two was identified in these samples.

Key words: Benzodiazepines; FPIA, HPTLC, HPLC

PIŚMIENNICTWO

1. *ADx-Benzodiazepines Urine Assay Product information*, Abbott Laboratories USA, Abbott Park, IL, 1988.
2. Akerman K.K., Jolkkonen J., Parviainen M., Pentilla I., *Analysis of low-dose benzodiazepines by HPLC with automated solid-phase extraction*, Clin. Chem., 1996, 42, 1412-1416.
3. Casas M., Berrueta L.A., Gallo B., Vincente F., *Solid phase extraction of 1,4-benzodiazepines from biological fluids*. J. Pharm. Biomed. Anal., 1993, 11, 277-284.
4. Chopineau J., Rivault F., Sautou V., Sommier M.F., *Determination of temazepam and its active metabolite, oxazepam in plasma, urine and dialysate using solid-phase extraction followed by high performance liquid chromatography*, J. Liq. Chromatogr., 1994, 17, 373-383.
5. Dandliker W.B., Kelly R.J., Dandliker J., Farquhar J., Levin J., *Fluorescence polarisation immunoassay. Theory and experimental method*, Immunochem., 1973, 10, 219-227.
6. Ferrava S.D., Tedeshi L., Frison G., Castagua F., *Solid-phase extraction and HPLC-UV confirmation of drugs of abuse in urine*, J. Annal. Toxicol., 1992, 16, 217-222.
7. Hagan R.L., *Clarification of benzodiazepine structural classes*, J. Anal., 1995, Toxicol., 19, 58.
8. Hagan R.L., *Annelated benzodiazepines: A brief overview of their chemistry, disposition and analysis*, Calif Assoc. Toxicol. Newsletter, 1995, 22-23.

9. Jork H., *Quantitative HPTLC in the field of pharmaceutical applications. Proceedings of the Fourth Intern. Symposium on Instrumental High Performance Thin Layer Chromatography*, Eds. H. Traitler, A. Studer, R. Keiser, Selvino/Bergamo, Italy, 1997, s. 193.
10. King J.W., King L.J., *Solid-Phase Extraction and On-Disc Derivatization of the Major Benzodiazepines in Urine Using Enzyme Hydrolysis and Toxi-Lab VC MP 3 Column*; *J. Anal. Toxicol.*, 1996, 20, 262-265.
11. Lillsunde P., Korte T., *Drug screening in urine using solid phase extraction and combined thin-layer chromatography and gas chromatography/mass spectrometry identification*. *J. Anal. Toxicol.*, 1991, 15, 71-81.
12. Meatherall R., *Optimal enzymatic hydrolysis of urinary benzodiazepine conjugates*, *J. Anal. Toxicol.*, 1994, 18, 382-384.
13. Meatherall R., *Benzodiazepine screening using EMIT[®] and TDx[®]: Urine hydrolysis required*, *J. Anal. Toxicol.*, 1994, 18, 385-390.
14. Pużyński S., *Leki psychotropowe. Podręczny poradnik terapii*, Springer PWN, 1996.
15. Suchtz H., *Benzodiazepines II – A Handbook, Basic Data, Analytical Methods, Pharmacokinetics and Comprehensive Literature*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, 1989.
16. Shimamine M., Masunari T., Nakahara Y., *Studies on identification of drugs of abuse by diode array detection I. Screening test and identification of benzodiazepines by HPLC-DAD with ICOS software system Eisei, Shikenjo, Hokoku* 1993, 111, 47-56.