

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 rozdziału 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.