

APPLICATION OF GAS CHROMATOGRAPHY/ MASS SPECTROMETRY (GC/MS) TO THE ANALYSIS OF BENZODIAZEPINES

Dariusz BŁACHUT¹, Marta BYKAS-STREKOWSKA¹, Ewa TARACHA²,
Bogdan SZUKALSKI²

¹*Department of Criminalistics, Internal Security Agency, Warsaw*

²*Department of Neurochemistry, Institute of Psychiatry and Neurology,
Warsaw*

ABSTRACT: A gas-chromatographic-mass spectrometric method was developed for the simultaneous analysis of 18 benzodiazepines in human urine. Separation of this complex mixture of benzodiazepines was achieved on three capillary columns with phases: SPB-OCTYL, SPB-1, HP-5MS. The thermal instability of benzodiazepines in the chromatographic process may lead to erroneous interpretation of obtained results. This is especially significant in the case of examinations carried out within the framework of expert casework requested by the administration of justice, and thus potentially influencing the outcome of legal proceedings.

The practical usefulness of the developed conditions was checked by means of urinalysis of two patients from the Neurosis Clinic and one patient undergoing methadone treatment at the Department of Detoxification of Institute of Psychiatry and Neurology. Screening tests carried out on these patients to check abstinence compliance revealed compounds from the benzodiazepine group. The urine of the patients from the Neurosis Clinic contained tetrazepam and nordiazepam, whereas that of the patient undergoing methadone therapy contained nordiazepam, amphetamine, promethazine and three of its metabolites, nicotine and three of its metabolites, a metabolite of carbamazepine and also methadone and its two metabolites.

KEY WORDS: Benzodiazepine; Decomposition; Gas chromatography/Mass spectrometry.

Problems of Forensic Sciences, vol. LIX, 2004, 5–37

Received 31 August 2004; accepted 29 September 2004

INTRODUCTION

Beside typical narcotics such as heroin, cocaine, derivatives of Indian hemp and derivatives of phenylisopropylamine (amphetamine), widely used medicines are also abused, which, in addition to their intended pharmacological action, evoke euphoric effects and could lead to dependence. This group includes benzodiazepines, which evoke a good mood (euphoria, “mel-

lowing”, calming down), and increase the psychotropic effects of other psychoactive compounds (cocaine, heroin, derivatives of phenylisopropylamine, alcohol). Some of them have an intoxicating effect and are used in criminal cases as “date rape” type drugs [36], serving to stupefy victims in order to carry out a punishable offence, e.g. rape or underhand obtaining of PIN number or bank account number.

Benzodiazepines are available on the pharmaceutical market and are therefore relatively easy to obtain – in contrast to typical narcotics, which can only be obtained on the illegal market. As a consequence of the non-medical use of benzodiazepines, legal regulations relating to their turnover and use have been introduced. The Drug Counteraction Act [10] in Poland included 34 derivatives of benzodiazepine, listing them on the register of psychotropic compounds, in group VI-P. Flunitrazepam was treated more restrictively by the Polish legislature, being classified into group III-P.

Because of the widespread use of benzodiazepines both in therapy and for non-medical purposes, many methods of benzodiazepines detection and quantification have been developed. Whereas analysis of confiscated evidence material in the form of pills and capsules does not pose any major analytical problems, detection and identification of particular benzodiazepines in urine or blood is a difficult several-step analytical task.

Rapid detection of benzodiazepines in biological material has been made possible by homogenous methods [2, 12, 39], such as the enzymatic-immunological method (EMIT), the fluorescence-polarisation method (FPIA) and the radioimmunological method (RIA). Their advantages are simplicity and speed of test performance, without a troublesome extraction step, and in some cases it is also possible to determine the approximate concentration of analyte. A disadvantage is their low specificity, caused by the phenomenon of cross reactivity with compounds of similar structure. These methods only allow group identification (i.e. the class of compound) and a very approximate estimation of concentration, which is the resultant of concentrations and reactivity of all substances which react with the test. They do not, however, enable identification of individual compounds. Another problem is the too high detection limit, which is also termed the “cut-off value” – it may be insufficiently sensitive for benzodiazepines monitoring as their therapeutic doses are very low. This group includes among others: triazolam (dose 0.125–0.25 mg, concentration in plasma 2–20 ng/ml), flunitrazepam (dose 0.5–1 mg, concentration in plasma 5–15 ng/ml) and loprazolam (dose 0.5–1 mg, concentration in plasma 3–10 ng/ml) [4].

The following chromatographic methods, amongst others, are used routinely for benzodiazepines identification in forensic laboratories: thin layer chromatography (TLC), high performance liquid chromatography (HPLC), gas chromatography (GC), and also spectroscopic methods – mass spectrom-

etry (MS) and infrared spectrometry (FTIR). Chromatographic techniques (GC and HPLC) allow separation of complex mixtures of benzodiazepines and when coupled with spectroscopic methods in a GC/MS system [11, 29, 38], or an HPLC/MS system [21, 25, 37, 40], enable identification of individual benzodiazepines in biological material (urine, blood, saliva, hairs) not only from tablets but also from mixtures with other substances.

Increased sensitivity and selectivity in relation to classic MS detection can be obtained by application of tandem mass spectrometry (MS/MS) [19, 22, 28] and chemical ionisation by negative ions (NICI). Certain structural features of benzodiazepines, i.e. the relatively high content of nitrogen atoms and halogens (increasing the affinity of a molecule with low-energy electrons) and also the presence of condensed rings (stabilising the negative charge of a molecular ion) make these compounds ideal subjects for analysis by GC-NICI. Song et al. [33] determined clonazepam in plasma with a detection limit of 0.25 ng/ml on the basis of the above mentioned technique. The same authors [34] obtained a much lower detection limit of 0.1 ng/ml when they determined flurazepam and its metabolites in rat plasma [34]. The selectivity and sensitivity of the GC/NICI technique turned out to be especially useful in the determination of trace amounts of various derivatives of benzodiazepines and their metabolites in hair [6, 7, 27].

Metabolic processes of benzodiazepines occur in the organism, consisting in hydroxylation of aliphatic fragments and aromatic rings, de-alkylation, reduction of the nitro group and acetylation [35]. Metabolites and also some primary compounds are coupled with glucuronic acid in the final phase of transformation. It is necessary to free them from these compounds before beginning to analyse benzodiazepines by the GC method. This is done by acid or enzymatic hydrolysis.

The first of these leads to the formation of benzophenones, which are characterised by relative volatility and good chromatographic properties [16]. It should also be mentioned that in the 1960s and 1970s, when only packed chromatographic columns were available with thermally unstable stationary phases, transformation of some high molecular-mass benzodiazepines into more volatile benzophenones was the only way of detecting them by the GC technique. Although it is simple to carry out, this method has one serious shortcoming: hydrolysis of various benzodiazepines results in only one benzophenone (Figure 1). This makes identification of the primary compound impossible.

Enzymatic hydrolysis by means of β -glucuronidase is used to break down glucuronate and release benzodiazepine in unchanged form. This enzyme only acts on β -glucosidase bonds of glucuronates and releases a compound coupled with glucuronic acid.

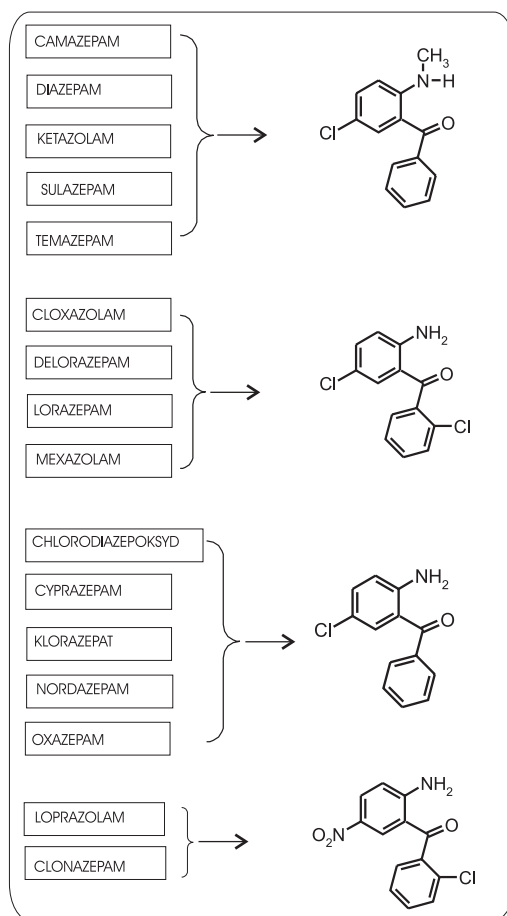


Fig. 1. Benzodiazepines which create the same benzophenone.

An important factor in the analytical cycle when studying biological material is correct procedure of analyte separation from the sample matrix. The following are used for isolation of analytes from a matrix: conventional liquid-liquid extraction (LLE) with the use of various solvents [1], solid phase extraction (SPE) on columns with octadecyl phase [14, 32], octyl phase [13], phenyl phase, cyclohexyl phase [5] and with mixed phases [15, 26], and also solid phase micro-extraction (SPME) [30]. Liquid-liquid extraction is better for broad screening of biological material. However, solid phase extraction generally gives better results (purity of extract, recoveries) in the case of analysis directed towards determination of a selected derivative of benzodiazepine.

A positive result obtained by homogeneous methods has to be verified by a selected confirmatory test. One can choose from among chromatographic

methods (TLC, GC, HPLC, EC) and hyphenated techniques (GC/MS, HPLC/MS, EC/MS) depending on the character of analysis, access to suitable equipment and the initiative of the scientist carrying out the analysis.

Benzodiazepines and their metabolites differ in having various locations of functional groups. Some of these are part of the primary structure of a compound and some of them are the result of metabolic processes. This determines, among other things, the varying thermal stability of benzodiazepines, which should be taken into account during interpretation of spectra obtained by the GC/MS method.

Chromatographic analysis of benzodiazepines is frequently preceded by a derivatization step, which consists in replacement of the labile hydrogen of active functional groups by trimethylsilane groups [33, 38], acetyl groups [3], heptafluorobutyric groups [6, 7] and alkyl groups [17, 24]. The obtained derivatives are thermally stable but they show (e.g. trimethylsilane ethers) sensitivity to traces of water. Therefore, reagents with a modified, spherically extended alkyl system, which create derivatives that are more resistant to the hydrolysis process, are used for silanisation. Tert-butyl dimethylsilane ethers of oxazepam, temazepam, lorazepam, α -hydroxyalprazolam, α -hydroxytriazolam and 2-hydroxyethylflurazepam have excellent spectral properties, their mass spectra being characterised by the presence of an intensive ion $M^{+} - 57$ [9, 20].

Readers interested in the methodology of benzodiazepines analysis are advised to refer to a monographic publication [31], review articles [8, 23] and numerous original papers.

AIM OF THE RESEARCH

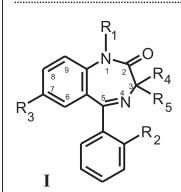
The aim of this study was to work out conditions of separation and identification of 18 benzodiazepines by the use of chromatographic techniques (GC/MS and GC/FID) and to apply the elaborated method to identification of benzodiazepines in patients' urine samples. An additional aim was to evaluate the thermal durability of analysed benzodiazepines, because it was observed that some of them did not give an analytical signal in the form of an individual peak. This indicates that in the injector of the chromatograph and also during elution they are partially or totally decomposed. The phenomenon of thermal decomposition of benzodiazepines has been described earlier [18]. However, it seems to be advisable to define the quantitative nature of this phenomenon in the GC/MS system that has been applied in the described research.

MATERIALS AND METHODS

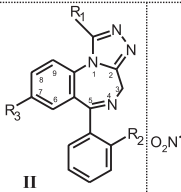
Standards and reagents

Standards of 7-aminoflunitrazepam, alprazolam, bromazepam, camazepam, chlorodiazepoxide, clobazam, clonazepam, nordiazepam, diazepam, estazolam, flunitrazepam, flurazepam, dipotassium clorazepate, loprazolam, lorazepam, lormetazepam, medazepam, nitrazepam, oxazepam, temazepam, tetrazepam, triazolam are from Sigma Chemicals Co. (St. Louis, USA). Their structures are presented in Figure 2.

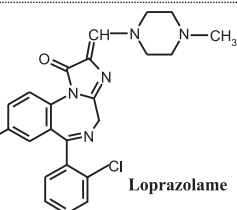
Compound	Group	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	Carbon atom's number
Diazepam	I	CH ₃	H	Cl	—	—	—
Flurazepam		(CH ₂) ₂ N(C ₂ H ₅) ₂	F	Cl	—	—	—
Medazepam		CH ₃	H	Cl	—	—	2: CH ₂
Chlorodiazepoksyde		—	H	Cl	—	—	2: CNHCH ₃ ; 4: N→O
Bromazepam		H	—	Br	—	—	5: C-pirydyne
Nitrazepam		H	H	NO ₂	—	—	—
Clonazepam		H	Cl	NO ₂	—	—	—
Flunitrazepam		CH ₃	F	NO ₂	—	—	—
Lorazepam		H	Cl	Cl	H	OH	—
Lormetazepam		CH ₃	Cl	Cl	H	OH	—
Oxazepam		H	H	Cl	H	OH	—
Temazepam		CH ₃	H	Cl	H	OH	—
Dipotassium clorazepate		H	—	Cl	H	COOK	2: OH, OK
Estazolame	II	H	H	Cl	—	—	—
Alprazolame		CH ₃	H	Cl	—	—	—
Triazolame		CH ₃	Cl	Cl	—	—	—



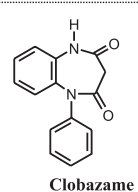
I



II



Loprazolame



Clobazame

Fig. 2. The structure of analysed benzodiazepines.

Solvents and other reagents were produced by Merck KgaA (Darmstadt, Germany), Lancaster (Morecambe, United Kingdom) and Sigma Chemicals Co. (St. Louis, USA) and they did not require additional purification.

Standards of benzodiazepines were prepared as 1 mg/ml solutions in a mixture of methanol and ethyl acetate (1:4).

Materials

Urine of patients from the Detoxification Department (sample no. 3025) and Institute of Psychiatry and Neurology (samples no. 3526 and 4278) – in whom screening analysis had revealed the presence of substances from the benzodiazepine group – was used to verify the applied methodology.

Solid phase extraction

The extraction was performed by means of columns (Bond Elut Certify Extraction Columns – Varian) with siliceous sorbent, which were located in an appliance with a regulated vacuum (Analytchem Vac Elut SPS 24TM – Varian). Columns were prepared by bathing under low pressure with 2 ml of methanol and 2 ml of 0.1 M phosphoric buffer (pH 6), and next 5 ml of centrifuged urine mixed with 2 ml of 0.1 M phosphoric buffer was put onto a column. The column was not allowed to dry. Columns were washed with 1 M acetic acid (1 ml), dried for 5 minutes with maximum air flow, washed once again with methanol (6 ml) and dried for 2 minutes. Elution was carried out with 2% (v/v) solution of ammonia (25%) in ethyl acetate (2 ml). The eluate was dried in a stream of dry nitrogen and the dry remains were dissolved in 50 μ l of ethyl acetate. 1 μ l of extract was injected onto the capillary column, which was the equivalent of 0.1 ml urine.

Acid hydrolysis of loprazolam

2 ml of water and 2 ml of hydrochloric acid were added to 2 mg of loprazolam and heated for half an hour in a reverse cooler. The solution was neutralised by solid sodium hydrocarbonate and extracted by methylene chlorine. The extract was evaporated to dryness, dissolved in 30 μ l of ethyl acetate and analysed by the chromatographic method.

Equipment

Gas chromatograph HP 5890, series II, with a flame ionisation detector (FID)

The temperature of the injector was 250°C, and the detector: 280°C. Helium was used as the carrier gas. Analytical conditions, which were different for various columns used for analysis, are presented in Table I.

- a) – FID detection, capillary column HP-35, 30 m × 0,25 mm × 0,25 μm, temperature programme: 100°C (1 min) – 250°C (0 min), ramp 12°C/min; 250°C (0 min) – 300°C (9 min), ramp 6°C/min, split 1:30;
- b) – FID detection, capillary column HP-50+, 15 m × 0,25 mm × 0,5 μm, temperature programme: 125°C (1 min) – 235°C (2 min), ramp 12°C/min, 235°C (2 min) – 300°C (5 min), ramp 7°C/min, split 1:20;
- c) – FID detection, capillary column SPB-Octyl, 30 m × 0,32 mm × 0,25 μm, temperature programme: 110°C (2 min) – 300°C (7 min), ramp 12°C/min, split 1:20;
- d) – FID detection, capillary column SPB-1, 12 m × 0,20 mm × 0,33 μm, temperature programme: 120°C (2 min) – 300°C (3 min), ramp 12°C/min, split 1:20;
- e) – MS detection, capillary column HP-5MS, 30 m × 0,25 mm × 0,25 μm, temperature programme: 110°C (2 min), ramp 15°C/min to 255°C (1 min); ramp 8°C/min to 300°C (5 min), injection option: split 50:1 (injection with a split stream);
- f) – product of decomposition is only present;
- g) – peaks of primary compound and at least one of the decomposition products are observed; M) –metabolite and benzodiazepine medicine; the peak with the highest intensity is underlined.

Gas chromatograph HP 6890 coupled to mass detector HP 5973

An HP-5MS capillary column, 30 m × 0.25 mm × 0.25 μm was used for analysis of urine samples. The temperature of the injector was 250°C. Helium was applied as the carrier gas and the flow capacity was 0.6 ml/min. Registration of the total ion current was carried out in the mass range from 40 to 400 amu. The following oven temperature programme was applied: an initial temperature of 110°C, which was maintained for 2 minutes, and then was increased by 15°C/min up to 255°C and by 8°C/min up to 300°C. The final temperature was maintained for 5 minutes. The duration of analysis was about 23 minutes. Analysis of standards was performed in split injection option 1:50, and urine extract – in splitless injection option. The sample injection volume V was 0.4 μl.

Types of tested columns and chromatographic parameters are presented in Table I.

RESULTS AND DISCUSSION

Decomposition of benzodiazepines during chromatographic analysis

During analysis of nitrazepam and clonazepam, apart from the peaks of these substances, other peaks were also observed, caused by products of their partial thermal decomposition: 7-aminonitrazepam and 7-aminoclonazepam. The chromatogram of clonazepam together with MS spectra of the primary compound and the product of its decomposition are presented in Figure 3.

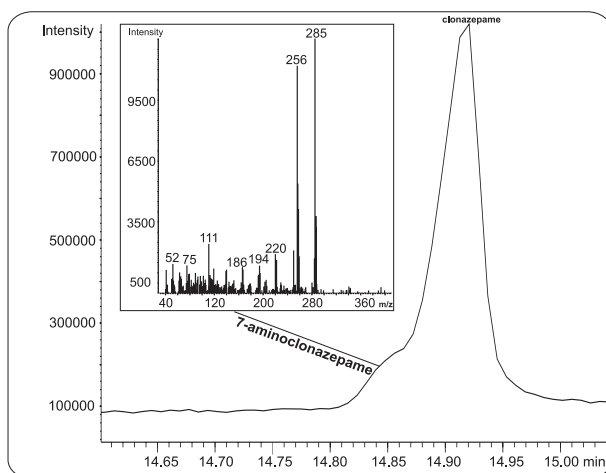


Fig. 3. Chromatographic peak of clonazepam – the primary compound and product of its decomposition – 7-aminoclonazepam with MS spectra.

Thus, aromatic 7-nitro compounds (nitrazepam and clonazepam) are partially reduced to appropriate amines during chromatographic analysis. This process depends on the type of column and the temperature of elution (Figure 4). A higher temperature and longer duration of stay of analyte in a column cause an increase in quantity of degradation products.

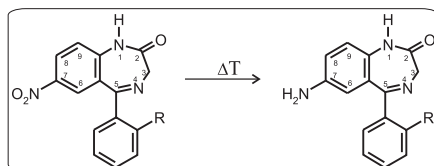


Fig. 4. Thermal decomposition of nitrazepam ($R = H$) and clonazepam ($R = Cl$).

A single peak was obtained during chromatographic analysis of chlorodiazepoxide, whose mass spectrum corresponded to a compound of molecular mass 283 amu. The molecular mass of chlorodiazepoxide is 299 amu. Therefore, it is the spectrum of the compound without an oxygen atom (Figure 5).

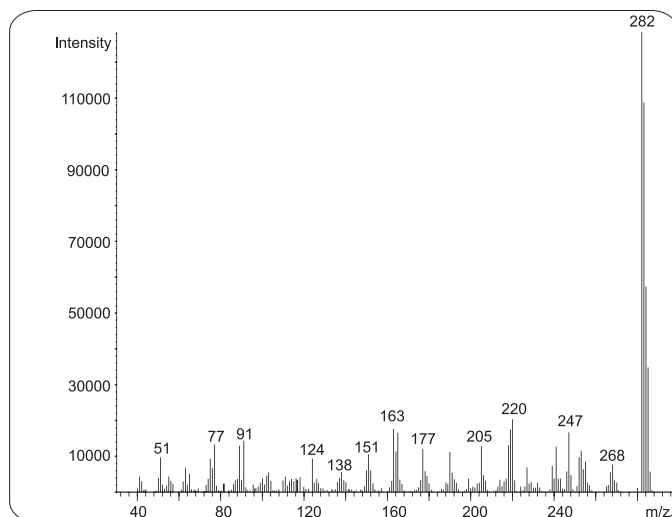


Fig. 5. Mass spectrum of product of thermal decomposition of chlorodiazepoxide.

One could conclude that chlorodiazepoxide, containing in its structure an N-oxygen system, undergoes thermal decomposition – this is a quantitative process (Figure 6) that takes place in the injector during sample injection onto a chromatographic column.

Mass spectra of lorazepam and oxazepam are characterised by molecular ions m/z $[M_{\text{oxazepam}-18}]^{+}$ and m/z $[M_{\text{lorazepam}-18}]^{+}$. Mass spectra of products of decomposition of both compounds are presented in Figures 7 and 8.

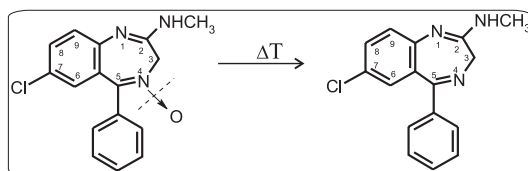


Fig. 6. Thermal decomposition of chlorodiazepoxide.

One could conclude on the basis of obtained spectra that compounds with α -hydroxyketone structure (lorazepam and oxazepam) undergo a thermal

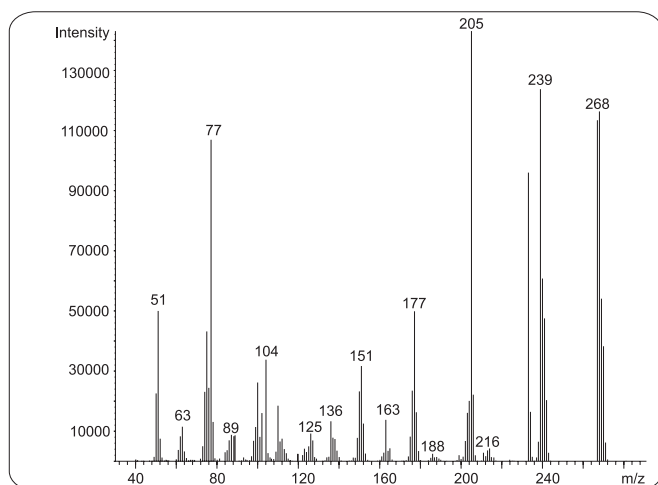


Fig. 7. The mass spectrum of product of oxazepam decomposition.

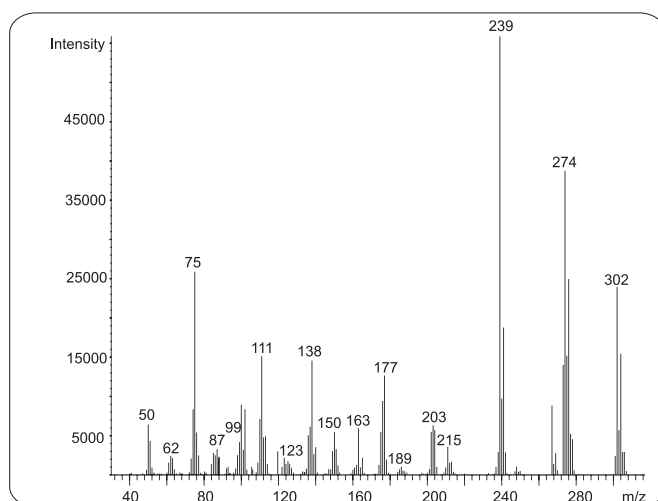


Fig. 8. The mass spectrum of product of lorazepam decomposition.

regrouping process, in the course of which dehydration occurs leading to contraction of the ring and creation of a durable aromatic structure (Figure 9).

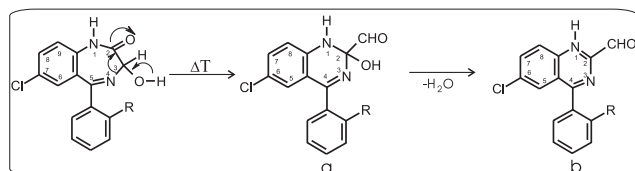


Fig. 9. Thermal regrouping (a) and decomposition (b) of oxazepam ($R = H$) and lorazepam ($R = Cl$).

Two well-separated peaks are present on chromatograms of lormetazepam and temazepam. The more intensive one corresponds to the product of regrouping of the primary particle. The second one, which corresponds to a product with a 2,3-diketone grouping, is caused by decomposition. Its mass spectrum is characterised by the presence of a molecular ion lighter by 2 amu than the primary benzodiazepine molecule (Figures 10 and 11).

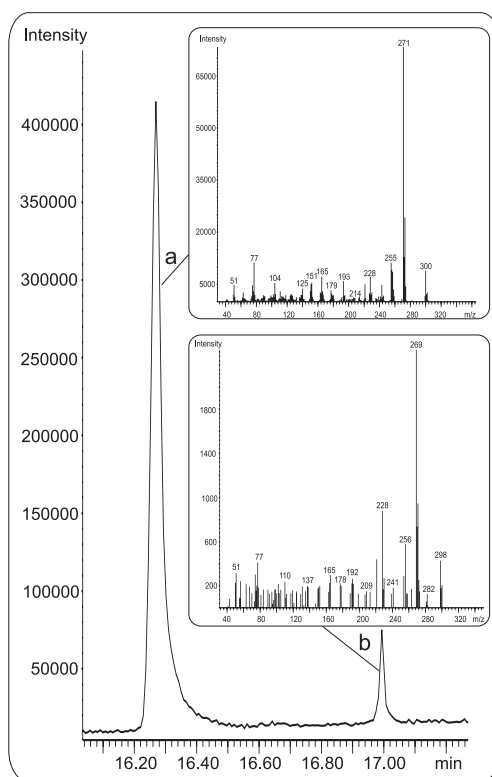


Fig. 10. Chromatogram of temazepam and MS spectrum of: a) – product of regrouping of primary molecule, b) – product of decomposition.

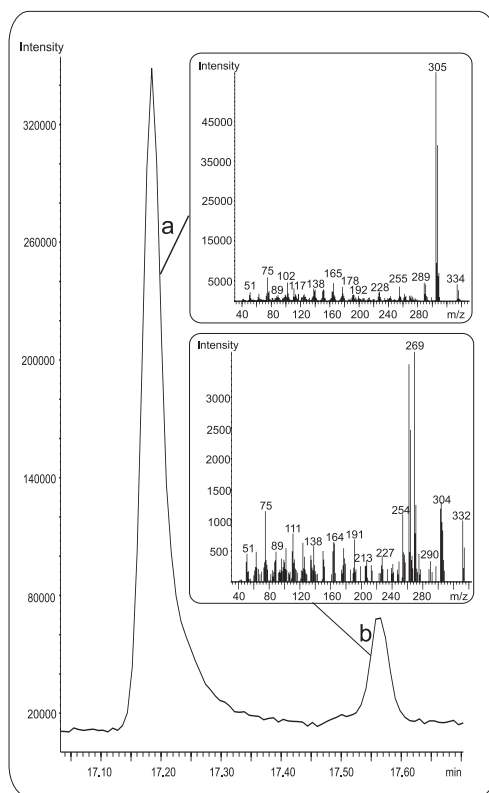


Fig. 11. Chromatogram of lormetazepam and MS spectrum of: a) – product of re-grouping of primary molecule, b) – product of decomposition.

Lormetazepam and temazepam, which contain N-methyl- α -hydroxyketone groups, lose a hydrogen atom during partial decomposition to α,β -diketones. Temazepam and lormetazepam, in spite of a structural similarity to their N-demethylation analogues (oxazepam and lorazepam), undergo decomposition by another mechanism (Figure 12).

The amount of benzodiazepine introduced onto the chromatographic column is also important [18]. The shape of the peak is asymmetrical and the

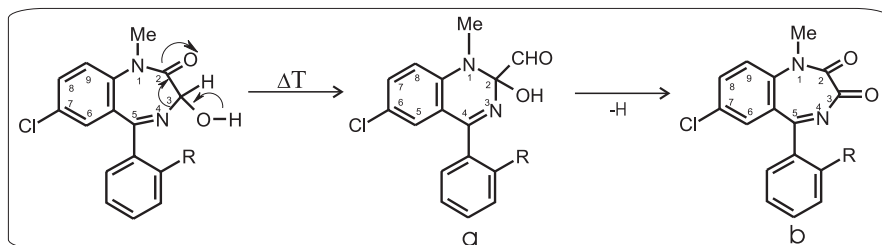


Fig. 12. Thermal decomposition of temazepam ($R = H$) and lormetazepam ($R = Cl$).

mass spectrum of the product of decomposition is practically invisible when a very small sample is injected.

Analysis of the dipotassium salt of clorazepat is noteworthy, because it requires isolation from an acid environment – in contrast to all analysed benzodiazepines in the presented research. The dipotassium salt of 7-chloro-5-phenyl-2,2-dihydroxy-1H-1,4-benzodiazepin-3-carboxy acid, undergoes decarboxylation and dehydration during chromatographic analysis, being transformed into nordiazepam (Figure 13).

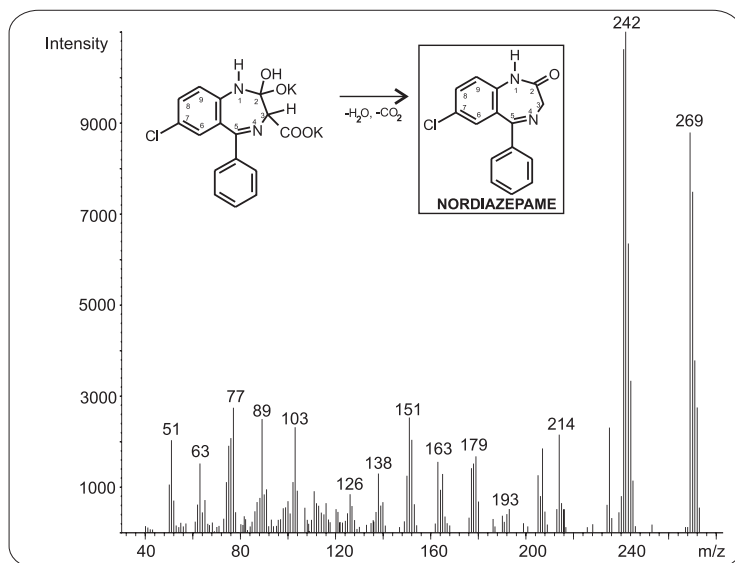


Fig. 13. MS spectrum of nordiazepam, product of thermal decomposition of dipotassium clorazepat.

Loprazolam, due to its too high molecular mass, does not give a signal in the form of a chromatographic peak, when injected on tested columns. However, the product of its acid hydrolysis, 2-amine-5-nitro-2-chlorobenzophenone, gives an analytical signal in the form of a peak (Figure 14). This makes identification of loprazolam possible. It should, however, be remembered that the product of acid hydrolysis is identical to the product of clonazepam hydrolysis. This may constitute an analytical trap for the person performing the analysis for forensic purposes.

The thermal decomposition of benzodiazepines during chromatographic analysis constitutes an important analytical problem, which may lead to incorrect interpretation of results of forensic expert studies carried out at the behest of the administration of justice, and thus potentially having an influence on legal proceedings. In the case of studies using the GC/MS method, the basis of identification is the results of a performed instrumental analy-

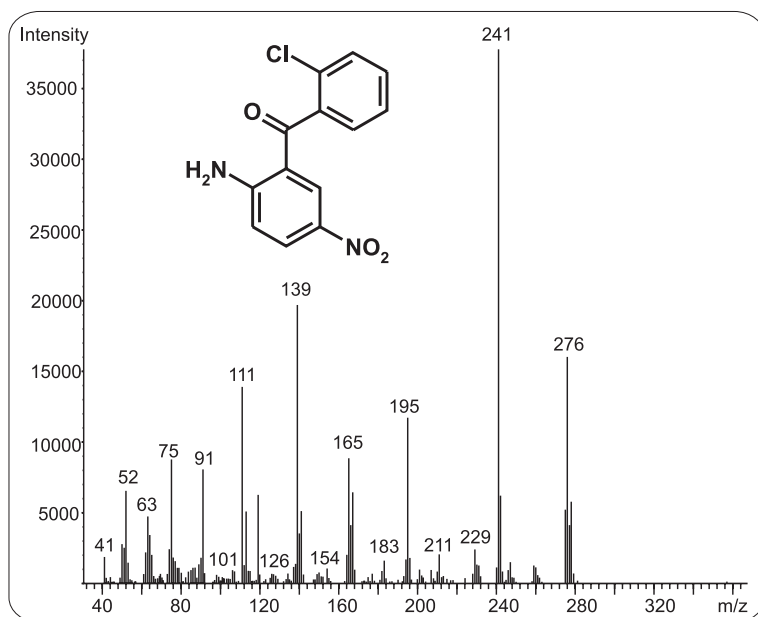


Fig. 14. The MS spectrum of the product of acid hydrolysis of loprazolam.

sis. These results indicate the presence of a particular compound in analysed evidence material (a mass spectrum is the basis of identification in mass spectrometry). It is always necessary to prove that the product of thermal decomposition of the analysed benzodiazepine which has been identified by the mass detector is specific for the benzodiazepine that was injected onto the chromatographic column. An expert who issues an opinion has to remember that the mass spectrum of a product of decomposition only constitutes indirect evidence of the presence of a particular benzodiazepine in the evidence material. This is especially significant in a situation where the result of identification of a particular compound can result in legal penalties as indicated in legislation.

Summarising, it should be concluded that:

1. Partial decomposition of temazepam, nitrazepam, clonazepam and oxazepam leads to obtaining chromatograms containing peaks of primary compounds and peaks of products of decomposition.
2. Decomposition or regrouping of chlorodiazepoxide, lorazepam and clorazepatic acid leads to a chromatographically stable product.
3. Active functional groups in the structure of an analyte could cause irreversible adsorption on the stationary phase of a column and hence an incorrect peak shape (e.g. "tailing"). This concerns derivatives that contain hydroxyl groups and – to a lesser degree – primary and secondary amine groups.

Separation of a complex mixture of benzodiazepines and their identification in urine

The effectiveness of separation of benzodiazepines was analysed on 5 capillary columns which had various chromatographic parameters: length, internal diameter and thickness of stationary phase. The polarity of phases of applied columns increased according to the following series: SPB-Octyl < SPB-1 < HP-5MS < HP-35 < HP-30+. The absolute retention times of individual compounds or products of their decomposition are presented in Table I.

Chromatograms of all thermally stable derivatives were obtained in applied analytical conditions thanks to the use of columns with non-polar stationary phases (SPB-1, SPB-Octyl, HP-5MS); the following compounds and products of their decomposition have similar retention times: nordiazepam/chlorodiazepoxide and alprazolam/camazepam on a column with an HP-5MS phase, flunitrazepam/bromazepam, camazepam/alprazolam on a column with an SPB-1 phase and flurazepam/nitrazepam on a column with an SPB-Octyl phase. An increase in polarity of phase (HP-35 and HP-50+) had a negative influence on chromatographic parameters of analysed compounds: an increase in the breadth of the half height of peaks, a significant reduction in their intensity and the occurrence of so-called tailing.

Unsatisfactory results were obtained when derivatives with a triazole group were analysed, i.e. alprazolam, triazolam and estazolam.

The chromatogram of a mixture of 18 benzodiazepines obtained by the GC/MS method is presented in Figure 15.

Optimal conditions of separation of the above mentioned standard substances were applied to analysis of biological material.

A chromatogram of the urine extract of a patient undergoing methadone treatment (sample no. 3025) is presented in Figure 16.

A peak of nordiazepam and a peak of amphetamine were identified, and also the following peaks: methadone and its metabolites, nicotine and its metabolites, promethazine and its metabolites and a metabolite of carbamazepine (Table II). The presence of nordiazepam and amphetamine peaks is evidence that a patient did not comply with abstinence rules for patients undergoing methadone treatment, and the presence of promethazine and its metabolites was evidence that the patient took medicine not prescribed by a doctor. The presence of nicotine and its metabolites proves that the patient is a smoker. Methadone was administered to the patient at a dose of 80 mg/day as part of therapy for patients addicted to opiates, and carbamazepine, whose metabolite is 9-formylacrydyne, at a dose of 15 mg/kg of body weight per day in order to prevent convulsions.

Figures 17 and 18 present two chromatograms of urine extracts of patients of the Clinic of Neurosis in Warsaw.

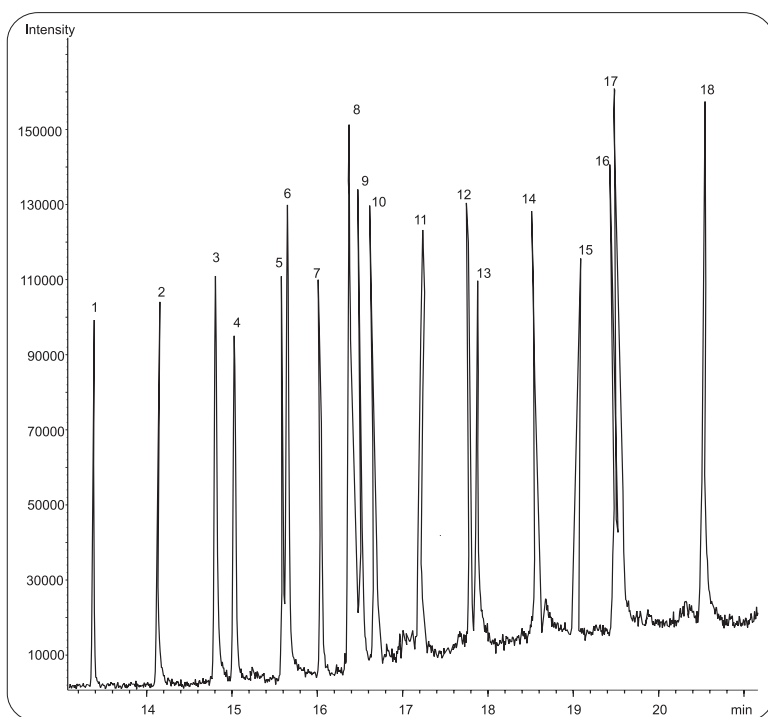


Fig. 15. Chromatogram of a mixture of eighteen benzodiazepine medicines. 1 – medazepam; 2 – oxazepam; 3 – lorazepam; 4 – diazepam; 5 – dipotassium clorazepat; 6 – chlorodiazepoxide; 7 – clobazam; 8 – temazepam; 9 – flunitrazepam; 10 – bromazepam; 11 – lormetazepam; 12 – flurazepam; 13 – nitrazepam; 14 – clonazepam; 15 – estazolam; 16 – alprazolam; 17 – camazepam, 18 – triazolam.

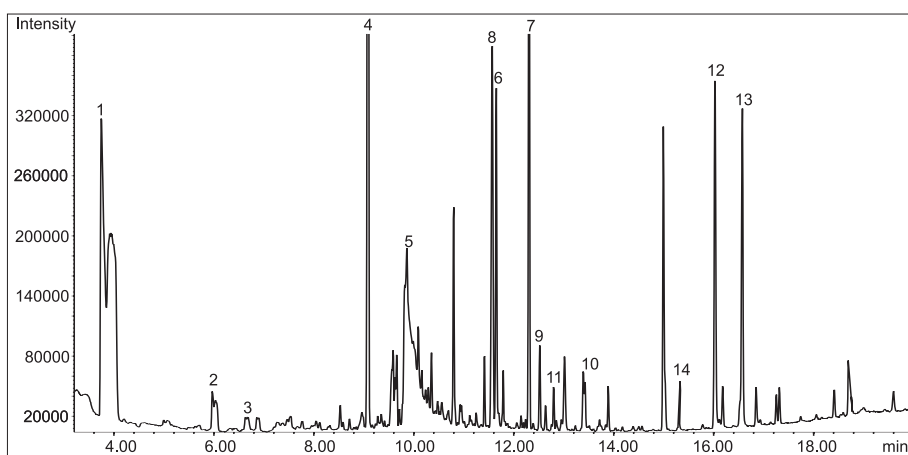


Fig. 16. Chromatogram of total ion current (TIC) of a patient's urine extract (sample no. 3025). Identified compounds are presented in Table II.

TABLE II. ANALYTICAL PARAMETERS OF COMPOUNDS IDENTIFIED IN ANALYSED SAMPLE OF URINE (SAMPLE No. 3025)

No.	Compound	Retention time [min]	Formula	Elementary ions [m/z] in mass spectrum ^{a)}
1	Amphetamine	3.86	$C_9H_{13}N$	44, 91, 65, 120
2	Nicotine	5.97	$C_{10}H_{14}N_2$	84, 133, 161, 162
3	Nornicotine	6.68	$C_9H_{12}N_2$	119, 70147, 80
4	Cotinine	9.08	$C_{10}H_{12}N_2O$	98, 176, 118, 119
5	3-hydroxycotinine	9.93	$C_{10}H_{12}N_2O_2$	106, 192, 135, 93
6	Metabolite of carbamazepine ^{b)}	11.64	$C_{14}H_9NO$	179, 207, 178, 151
7	Methadone	12.30	$C_{21}H_{27}NO$	72, 165, 223, 294
8	Metabolite of methadone ^{c)}	11.57	$C_{20}H_{23}N$	277, 276, 262, 220
9	Metabolite of methadone ^{d)}	12.52	$C_{18}H_{19}NO$	265, 193, 115, 130
10	Promethazine	13.38	$C_{17}H_{20}N_2S$	72, 180, 198, 213
11	Metabolite of promethazine ^{e)}	13.04	$C_{16}H_{18}N_2S$	213, 58, 198, 180
12	Metabolite of promethazine ^{f)}	16.02	$C_{16}H_{18}N_2OS$	212, 58, 180, 229
13	Metabolite of promethazine ^{g)}	16.57	$C_{17}H_{20}N_2OS$	72, 58, 213, 198
14	Nordiazepam ^{h)}	15.31	$C_{15}H_{11}ClN_2O$	242, 241, 269, 270

a) – peak with the highest intensity on MS spectrum is underlined; b) – 9-formylacrydyne; c) – EDDP: 3,3-diphenyl-1,5-dimethyl-2-ethylidenepirolidyne; d) – 3,3-diphenyl-1,5-dimethyl-2-pirolidynon; e) – product of dimethylation of promethazine-norpromethazine; f) – product of hydroxylation of norpromethazine; g) – sulphoxide of promethazine; h) –metabolite of diazepam.

The dominant peak of tetrazepam and three peaks corresponding to the amide of nicotinic acid, caffeine and theobromine (Table III) can be observed in Figure 17. The peak of tetrazepam constitutes evidence of taking of this preparation by the patient.

TABLE III. ANALYTICAL PARAMETERS OF COMPOUNDS IDENTIFIED IN ANALYSED SAMPLE OF URINE (SAMPLE No. 3526)

No.	Compound	Retention time [min]	Formula	Elementary ions [m/z] in mass spectrum ^{a)}
1	Amide of nicotinic acid	8.41	C ₆ H ₆ N ₂ O	122, 78, 106, 51
2	Caffeine	12.11	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂	194, 109, 55, 67
3	Theobromine	12.24	C ₇ H ₈ N ₄ O ₂	180, 55, 67, 109
4	Tetrazepam	16.64	C ₁₆ H ₁₇ ClN ₂ O	253, 288, 259, 225

a) – peak with the highest intensity on MS spectrum is underlined.

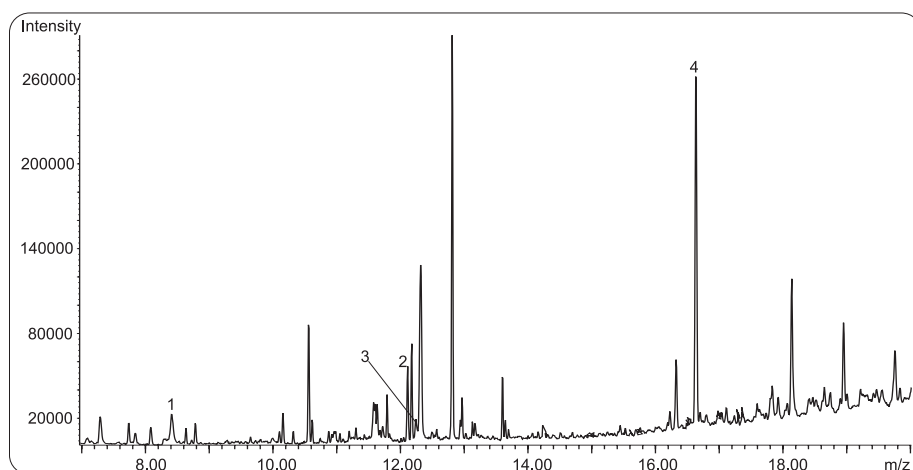


Fig. 17. Chromatogram of the total ion current (TIC) of extract of patient urine (sample no. 3526). Identified compounds are presented in Table III.

The distinct peak of nordiazepam and four peaks corresponding to nicotine and its three metabolites can be observed in Figure 18 (Table IV).

CONCLUSIONS

The developed conditions of analysis of 18 benzodiazepines in urine allow – in contrast to screening methods – identification of individual benzodiazepines present in urine, thus not only showing that a patient has failed to observe abstinence, but also enabling determination of which benzodiaz-

epine has been taken. This is an important factor in disciplining the patient to maintain abstinence.

TABLE IV. ANALYTICAL PARAMETERS OF COMPOUNDS IDENTIFIED IN ANALYSED SAMPLE OF URINE (SAMPLE No. 4287)

No.	Compound	Retention time [min]	Formula	Elementary ions [m/z] in mass spectrum ^{a)}
1	Nicotine	6.02	$C_{10}H_{14}N_2$	<u>84</u> , 133, 161, 162
2	Nornicotine	6.69	$C_9H_{12}N_2$	119, 70, 147, 80
3	Cotinine	9.11	$C_{10}H_{12}N_2O$	98, 176, 118, 119
4	3-hydroxycotinine	9.94	$C_{10}H_{12}N_2O_2$	106, 192, 135, 93
5	Nordiazepam	15.31	$C_{15}H_{11}ClN_2O$	242, 241, 269, 270

a) – peak with the highest intensity on MS spectrum is underlined.

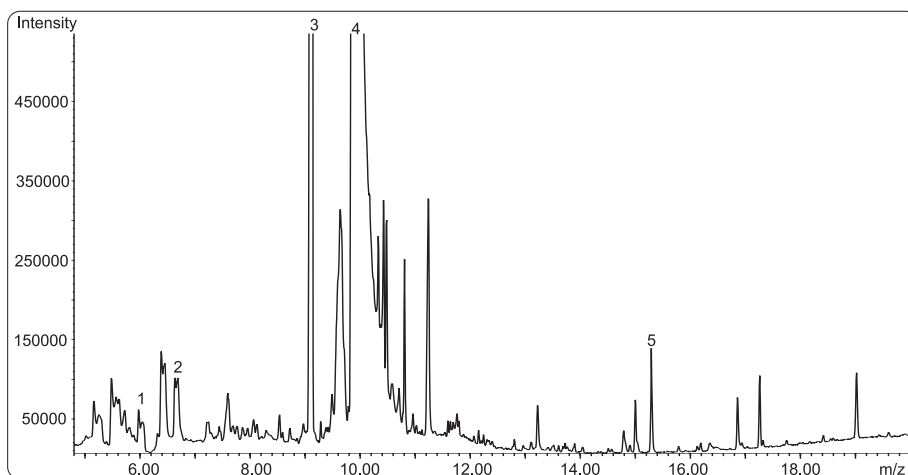


Fig. 18. Chromatogram of total ion current (TIC) of extract of patient urine (sample no. 4287). Identified compounds are presented in Table IV.

The applied analytical procedure also allows detection of many other psychoactive compounds, which – beside benzodiazepine – can be found in the urine of drug addicts who do not observe abstinence.

References:

1. Aebi B., Sturny-Jungo R., Bernhard W. [et al.], Quantitation using GC-TOF-MS: example of bromazepam, *Forensic Science International* 2002, vol. 128, pp. 84–89.
2. Augsburg M., Rivier L., Mangin P., Comparison of different immunoassays and GC-MS screening of benzodiazepines in urine, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 1998, vol. 18, pp. 681–687.
3. Borrey D., Mayer E., Lambert W. [et al.], Simultaneous determination of fifteen low-dosed benzodiazepines in human urine by solid-phase extraction and gas chromatography – mass spectrometry, *Journal of Chromatography B* 2001, vol. 765, pp. 187–197.
4. Borrey D., Meyer E., Lambert W. [et al.], Sensitive gas chromatographic – mass spectrometric screening of acetylated benzodiazepines, *Journal of Chromatography A* 2001, vol. 910, pp. 105–118.
5. Casas M., Berueta L. A., Gall B. [et al.], Solid-phase extraction of 1,4-benzodiazepines from biological fluids, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 1993, vol. 11, pp. 277–284.
6. Cirimele V., Kintz P., Mangin P., Determination of chronic flunitrazepam abuse by hair analysis using GC-MS-NCI, *Journal of Analytical Toxicology* 1996, vol. 20, pp. 596–598.
7. Cirimele V., Kintz P., Staub C. [et al.], Testing human hair for flunitrazepam and 7-amino-flunitrazepam by GC/MS-NCI, *Forensic Science International* 1997, vol. 84, pp. 189–200.
8. Drummer O. H., Methods for the measurement of benzodiazepines in biological samples, *Journal of Chromatography B* 1998, vol. 713, pp. 201–225.
9. Duthel J. M., Constant H., Vallon J. J. [et al.], *Journal of Chromatography* 1992, vol. 579, pp. 85–91.
10. *Dziennik Ustaw* nr 75 z dnia 14.07.1997 r., poz. 468, wraz z późniejszymi zmianami.
11. ElSohly M. A., Feng S., Salamone S. J. [et al.], GC-MS determination of flunitrazepam and its major metabolite in whole blood and plasma, *Journal of Analytical Toxicology* 1999, vol. 23, pp. 486–489.
12. Frazer A. D., Meatheral R., Comparative evaluation of five immunoassays for the analysis of alprazolam and triazolam metabolites in urine: effect of lowering the screening and GC-MS Cut-Off Values, *Journal of Analytical Toxicology* 1996, vol. 20, pp. 248–254.
13. Gaillard Y., Gay-Montchamp J. P., Ollagnier M., Simultaneous screening and quantitation of alpidem, zolpidem, buspirone and benzodiazepines by dual-channel gas chromatography using electron-capture and nitrogen-phosphorus detection after solid-phase extraction, *Journal of Chromatography B* 1993, vol. 622, pp. 197–208.
14. Guichard J., Panteix V., Dubost V. [et al.], Simultaneous high-performance liquid chromatographic assay of droperidol and flunitrazepam in human plasma. Application to haemodilution blood samples collected during clinical anaesthesia, *Journal of Chromatography B* 1993, vol. 612, pp. 269–275.

15. Huang Z. P., Chen X. H., Wijsbeek J. [et al.], An enzymic digestion and solid phase extraction procedure for the screening of acid, neutral, and basic drugs in liver using gas chromatography analysis, *Journal of Analytical Toxicology* 1996, vol. 20, pp. 248–254.
16. Japp M., Garthwaite K., Geeson A. V. [et al.], Collection of analytical data for benzodiazepines and benzophenones, *Journal of Chromatography* 1988, vol. 439, pp. 317–339.
17. Joern W. A., Confirmation of low concentrations of urinary benzodiazepines, including alprazolam and triazolam, by GC/MS: an extractive alkylation procedure, *Journal of Analytical Toxicology* 1992, vol.16, pp. 363–367.
18. Joyce J. R., Bal T. S., Ardrey R. E. [et al.], The decomposition of benzodiazepines during analysis by capillary gas chromatography/mass spectrometry, *Biomedical Mass Spectrometry* 1984, vol. 11, pp. 284–289.
19. Kavvadias D., Abou-Mandour A. A., Czygan F. C. [et al.], Identification of benzodiazepines in *Artemisia dracuncululus* and *Solanum tuberosum* rationalizing their endogenous formation in plant tissue, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2000, vol. 269, pp. 290–295.
20. King J. W., King J. L., Solid-phase extraction on on-disc derivatization of the major benzodiazepines in urine using enzyme hydrolysis and Toxi-Lab VC MP3 column, *Journal of Analytical Toxicology* 1996, vol. 20, pp. 262–265.
21. Kleinschnitz M., Herderich M., Schreier P., Determination of 1,4-benzodiazepine by high performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography B* 1996, vol. 676, pp. 61–67.
22. Marland A., Sarkar P., Leavitt R., The urinary elimination profiles of diazepam and its metabolites, nordiazepam, temazepam, and oxazepam, in the equine after a 10-mg intramuscular dose, *Journal of Analytical Toxicology* 1999, vol. 23, pp. 29–34.
23. Maurer H., Pflieger K., Identification and differentiation of benzodiazepines and their metabolites in urine by computerized gas chromatography-mass spectrometry, *Journal of Chromatography B* 1987, vol. 422, pp. 85–101.
24. Meatherall R., GC-MS confirmation of urinary benzodiazepine metabolites, *Journal of Analytical Toxicology* 1994, vol. 18 pp. 369–381.
25. Miki A., Tatsuno M., Katagi M. [et al.], Simultaneous determination of eleven benzodiazepine hypnotics and eleven relevant metabolites in urine by column-switching liquid chromatography-mass spectrometry, *Journal of Analytical Toxicology* 2002, vol. 26, pp. 87–93.
26. Needleman S. B., Porvaznik M., Identification of parent benzodiazepines by gas chromatography/mass spectroscopy (GC/MS) from urinary extracts treated with α -glucuronidase, *Forensic Science International* 1995, vol. 73, pp. 49–60.
27. Negrusz A., Moore C., Deitermann D. [et al.], Highly sensitive micro-plate enzyme immunoassay screening and NCI-GC-MS confirmation of flunitrazepam and its major metabolite 7-aminoflunitrazepam in hair, *Journal of Analytical Toxicology* 1999, vol. 23, pp. 429–435.

28. Pirnay S., Ricordel I., Libong D. [et al.], Sensitive method for detection of 22 benzodiazepines by gas chromatography-ion trap tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A* 2002, vol. 954, pp. 235–245.
29. Podkovik B. I., Gas chromatographic determination of midazolam in low-volume plasma samples, *Journal of Chromatography B* 1996, vol. 681, pp. 405–411.
30. Reubsæet K. J., Norli H. R., Rasmussen K. E., Determination of benzodiazepines in human urine and plasma with modified solid phase micro extraction and gas chromatography; rationalisation of method development using experimental design strategies, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 1998, vol. 18, pp. 667–680.
31. Schütz H. [ed.], Basic data, analytical methods, pharmacokinetics and comprehensive literature, [in:] *Benzodiazepines – a handbook*, Springer Verlag, Heidelberg 1982.
32. Segura M., Barbosa J., Torrens M. [et al.], Analytical methodology for the detection of benzodiazepine consumption in opioid-dependent subjects, *Journal of Analytical Toxicology* 2001, vol. 25, pp. 130–136.
33. Song D. M., Zhang S., Kohlhof K., Quantitative determination of clonazepam in plasma by gas chromatography-negative ion chemical ionization mass spectrometry, *Journal of Chromatography B* 1996, vol. 686, pp. 199–204.
34. Song D. M., Zhang S., Kohlhof K., Determination of chlorodiazepoxide in mouse plasma by gas-chromatography-negative ion chemical ionization mass spectrometry, *Journal of Chromatography B* 1994, vol. 660, pp. 95–101.
35. Szukalski B., Błachut D., Bykas-Strękowska M., Benzodiazepiny. Część I. Właściwości, metabolizm, ryzyko nadużywania, *Farmacja Polska* 2003, t. 59, s. 457–465.
36. Szukalski B., Bykas-Strękowska M., Błachut D. [i in.], Flunitrazepam – benzodiazepina wykorzystywana w celach przestępczych. Identyfikacja metodą chromatografii gazowej ze spektrometrią mas (GC/MS), *Alkoholizm i Narkomania* 2002, t. 15, s. 355–364.
37. Toyooka T., Kumaki Y., Kanbori M. [et al.], Determination of hypnotic benzodiazepines (alprazolam, estazolam, and midazolam) and their metabolites in rat hair and plasma by reversed-phase liquid-chromatography with electron ionization mass spectrometry, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2003, vol. 30, pp. 1773–1787.
38. Valentine J. L., Middleton R., Sparks C., Identification of urinary benzodiazepines and their metabolites: comparison of automated HPLC and GC-MS after immunoassay screening of clinical specimens, *Journal of Analytical Toxicology* 1996, vol. 20, pp. 416–424.
39. Verstraete A. G., Belpaire F. M., Leroux-Roels G. G., Diagnostic performance of the EMIT-tox benzodiazepine immunoassay, FPIA serum benzodiazepine immunoassay, and radioreceptor assay in suspected acute poisoning, *Journal of Analytical Toxicology* 1996, vol. 22, pp. 27–32.

40. Verveij A. M. A., Hordijk M. L., Lipman P. J. L., Liquid chromatographic-thermospray tandem mass spectrometric quantitative analysis of some drugs with hypnotic, sedative and tranquillising properties in whole blood, *Journal of Chromatography B* 1996, vol. 686, pp. 27–34.

ZASTOSOWANIE POŁĄCZONEJ CHROMATOGRAFII GAZOWEJ I SPEKTROMETRII MASOWEJ (GC/MS) DO ANALIZY BENZODIAZEPIN

Dariusz BŁACHUT, Marta BYKAS-STREKOWSKA, Ewa TARACHA,
Bogdan SZUKALSKI

WSTĘP

Oprócz typowych narkotyków, jak heroina, kokaina, przetwory konopi indyjskich i pochodne fenyloizopropylaminy (amfetaminy), nadużywane są również szeroko stosowane leki, które oprócz ukierunkowanego działania farmakologicznego wywołują efekty euforyzujące i mogą doprowadzić do uzależnienia. Do tej grupy należą benzodiazepiny, które wywołują dobre samopoczucie (stan euforii, wyciszenie, uspokojenie), wzmacniają efekty psychotropowe innych substancji psychoaktywnych (kokainy, heroiny, pochodnych fenyloizopropylaminy, alkoholu), a niektóre z nich działają odurzająco i są wykorzystywane w celach przestępczych jako narkotyki typu *date rape drugs* [36] służące do oszłamiania ofiary w celu dokonania czynu zabronionego, np. gwałtu, podstępnego uzyskania numeru PIN-u, konta bankowego itp.

W odróżnieniu od typowych narkotyków, których źródłem pozyskiwania może być wyłącznie nielegalny rynek, benzodiazepiny są dostępne w obrocie farmaceutycznym i stosunkowo łatwe do zdobycia. Konsekwencją stosowania leków benzodiazepinowych do celów pozamedycznych było wprowadzenie regulacji prawnych dotyczących ich obrotu i stosowania. W Polsce ustawa o przeciwdziałaniu narkomanii [10] objęła kontrolą 34 pochodnych benzodiazepiny, wymieniając je w wykazie substancji psychotropowych w grupie VI-P. Ustawodawca polski bardziej restrykcyjnie potraktował flunitrazepam, zaliczając go do grupy III-P.

W związku z szerokim stosowaniem benzodiazepin zarówno w terapii, jak i w celach niemedycznych, opracowano liczne metody ich wykrywania oraz oznaczania. O ile jednak badanie skonfiskowanego materiału dowodowego w postaci tabletek i kapsułek nie sprawia na ogół większych trudności analitycznych, to wykrywanie i identyfikacja poszczególnych benzodiazepin w moczu i krwi jest zadaniem trudnym, wymagającym kilkuetapowego postępowania analitycznego.

Szybkie wykrywanie obecności benzodiazepin w materiale biologicznym umożliwiają metody homogeniczne [2, 12, 39], w tym metoda enzymatyczno-immunologiczna (EMIT), metoda fluorescencyjno-polaryzacyjna (FPIA) oraz metoda radioimmunologiczna (RIA). Ich zaletą jest prostota i szybkość wykonania testu, bez kłopotliwego etapu ekstrakcji, a niekiedy również możliwość określenia przybliżonego stężenia analitu. Wadą jest niska specyficzność powodowana zjawiskiem reaktywności krzyżowej ze związkami o podobnej budowie. Metody te pozwalają jedynie na grupową identyfikację klasy związków oraz bardzo przybliżone określenie stężenia, które jest wypadkową stężeń i reaktywności wszystkich substancji reagujących z testem, nie dają natomiast możliwości identyfikacji poszczególnych związków. Problemem jest także zbyt wysoki poziom limitu detekcji określany jako *cut-off value*, bowiem może

on okazać się niewystarczający przy monitoringu benzodiazepin, których dawki terapeutyczne są bardzo małe. Należą do nich m.in. triazolam (dawka 0,125–0,25 mg, stężenie w osoczu 2–20 ng/ml), flunitrazepam (dawka 0,5–1 mg, stężenie w osoczu 5–15 ng/ml) i loprazolam (dawka 0,5–1 mg, stężenie w osoczu 3–10 ng/ml) [4].

W laboratoriach kryminalistycznych do identyfikacji benzodiazepin stosuje się rutynowo metody chromatograficzne, w tym chromatografię cienkowarstwową (TLC), wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC), chromatografię gazową (GC), a także metody spektroskopowe – spektrometrię mas (MS) oraz spektrometrię w podczerwieni (FTIR). Techniki chromatograficzne (GC i HPLC), które pozwalają rozdzielać złożone mieszaniny benzodiazepin, a sprzężone z technikami spektroskopowymi w układy GC/MS [11, 29, 38] oraz HPLC/MS [21, 25, 37, 40], umożliwiają identyfikację poszczególnych benzodiazepin w materiale biologicznym (mocz, krew, ślina, włosy) nie tylko w tabletkach, ale także w mieszaninach z innymi substancjami.

Zwiększoną czułość i selektywność w stosunku do klasycznej detekcji MS uzyskuje się przy zastosowaniu tandemowej spektrometrii mas (MS/MS) [19, 22, 28] oraz jonizacji chemicznej jonów ujemnych (NICI). Właściwości strukturalne benzodiazepin, tj. relatywnie duża zawartość atomów azotu oraz halogenu (zwiększająca powinowactwo cząsteczki do niskoenergetycznych elektronów) a także obecność skondensowanych pierścieni (stabilizująca ładunek ujemny jonu molekularnego) czynią te związki idealnymi przedmiotami badań techniką GC-NICI. Song i in. [33] w oparciu o powyższą technikę oznaczali klonazepam w osoczu z limitem detekcji 0,25 ng/ml. W oznaczeniu flurazepamu i jego metabolitów w osoczu szczura ci sami autorzy [34] osiągnęli jeszcze niższy limit detekcji wynoszący 0,1 ng/ml. Selektywność i czułość techniki GC-NICI okazała się szczególnie przydatna w oznaczaniu śladowych ilości różnych pochodnych benzodiazepin i ich metabolitów we włosach [6, 7, 27].

W organizmie zachodzą procesy metaboliczne benzodiazepin, które polegają na hydroksylacji fragmentów alifatycznych oraz pierścieni aromatycznych, dezalkilacji, redukcji grupy nitrowej i acetylacji [35]. W końcowej fazie przemian metabolity, a także niektóre związki macierzyste, ulegają sprzężeniu z kwasem glukuronowym. Przed przystąpieniem do analizy benzodiazepin metodą GC konieczne jest uwolnienie ich z tych połączeń. Wykonuje się to w oparciu o hydrolizę kwaśną lub enzymatyczną.

Pierwsza z nich prowadzi do powstania benzofenonów, które charakteryzują się względną lotnością i dobrymi właściwościami chromatograficznymi [16]. Warto dodać, że w latach 60. i 70. XX stulecia, kiedy dysponowano wyłącznie pakowanymi kolumnami chromatograficznymi o niestabilnych termicznie fazach stacjonarnych, przeprowadzenie szeregu benzodiazepin o wyższej masie cząsteczkowej w znacznie lotniejsze benzofenony było jedynym sposobem ich detekcji techniką GC. Mimo prostoty wykonania, metoda ma jeden poważny mankament: w wyniku hydrolizy szeregu benzodiazepin powstaje jeden benzofenon (rycina 1), co uniemożliwia identyfikację związku macierzystego.

W celu rozkładu glukuronianu i uwolnienia benzodiazepiny o niezmienionej strukturze, stosuje się hydrolizę enzymatyczną za pomocą β -glukuronidazy. Enzym ten działa wyłącznie na wiązania β -glikozydowe glukuronianów, uwalniając związek sprzężony z kwasem glukuronowym.

Istotnym elementem cyklu analitycznego przy badaniu materiału biologicznego jest właściwa procedura oddzielenia analitu od matrycy próbki. Do izolacji analitów

z matrycy stosuje się nadal konwencjonalną ekstrakcję ciecz-ciecz (LLE) z użyciem różnych rozpuszczalników [1], ekstrakcję do fazy stałej (SPE) na kolumnach z fazą oktadecylową [14, 32], oktylową [13], fenylową, cykloheksylową [5] oraz z fazami mieszanymi [15, 26], a także mikroekstrakcję do fazy stałej (SPME) [30]. Przy szerokim skryningu materiału biologicznego korzystniej jest zastosować ekstrakcję typu ciecz-ciecz. Natomiast ekstrakcja do fazy stałej daje z reguły lepsze rezultaty (czystość ekstraktu, odzysk) w przypadku metodyki ukierunkowanej na oznaczenie wybranej pochodnej benzodiazepiny.

Pozytywny wynik uzyskany metodami homogenicznymi musi być zweryfikowany wybraną techniką konfirmacyjną (ang. confirmatory test). Jej wybór spośród technik chromatograficznych (TLC, GC, HPLC, EC) oraz technik łączonych (GC/MS, HPLC/MS, EC/MS) zależy od charakteru analizy, wyposażenia w odpowiednią aparaturę oraz od inwencji osoby wykonującej analizę.

Benzodiazepiny i ich metabolity różnią się inaczej usytuowanymi grupami funkcyjnymi, z których część jest pierwotnym elementem struktury związku, a część wynikiem procesów metabolicznych. Warunkuje to, między innymi, różną stabilność termiczną benzodiazepin, o czym należy pamiętać przy interpretacji widm uzyskanych dzięki analizie metodą GC/MS.

Analizę chromatograficzną benzodiazepin poprzedza zwykle proces derywacji, polegający na wymianie labilnego wodoru aktywnych grup funkcyjnych na grupy trójmetylosilanowe [33, 38], acetylowe [3], heptafluorobutyrowe [6, 7] oraz alkilowe [17, 24]. Otrzymane pochodne są termicznie trwałe, jednak wykazują (np. etery trójmetylosilanowe) wrażliwość na ślady wody. Z tego względu do silanizacji stosuje się odczynniki ze zmodyfikowanym, sferycznie rozbudowanym układem alkilowym, które tworzą pochodne bardziej odporne na proces hydrolizy. Doskonale własności spektralne posiadają etery tert-butyldimetylosilanowe oksazepamu, temazepamu, lorazepamu, α -hydroksyalprazolamu, α -hydroksytriazolamu i 2-hydroksyetylflurazepamu, których widma masowe charakteryzują się obecnością intensywnego jonu o $M^{+} - 57$ [9, 20].

Czytelników zainteresowanych metodyką analizy benzodiazepin odsyłamy do opracowań monograficznych [31] i przeglądowych [8, 23] oraz licznych prac oryginalnych.

CEL PRACY

Celem pracy było opracowanie warunków rozdziału i identyfikacji 18 benzodiazepin przy użyciu technik chromatograficznych (GC/MS i GC-FID) i zastosowanie tej metody do identyfikacji benzodiazepin w próbkach moczu pacjentów. Dodatkowym celem była ocena trwałości termicznej badanych benzodiazepin, ponieważ stwierdzono, że część z nich nie daje sygnału analitycznego w postaci pojedynczego piku, co wskazuje, że w komorze nastrzykowej chromatografu, a także w trakcie elucji, dochodzi do ich częściowej lub całkowitej ich dekompozycji. Zjawisko termicznego rozkładu benzodiazepin opisano wcześniej [18], jednak wydawało się wskazane określenie ilościowej charakterystyki tego zjawiska w zastosowanym w opisanych badaniach układzie GC/MS.

MATERIAŁ I METODY

Wzorce i odczynniki

Wzorce 7-aminoflunitrazepamu, alprazolamu, bromazepamu, kamazepamu, chlorodiazepoksydu, klobazamu, klonazepamu, nordiazepamu, diazepamu, estazolamu, flunitrazepamu, flurazepamu, klorazepatu dipotasowego, loprazolamu, lorazepamu, lormetazepamu, medazepamu, nitrazepamu, oxazepamu, temazepamu, tetrazepamu i triazolamu pochodziły z firmy Sigma Chemicals Co. (St. Louis, Stany Zjednoczone). Ich budowę przedstawiono na rycinie 2.

Rozpuszczalniki oraz inne odczynniki pochodziły z firm: Merck KgaA (Darmstadt, Niemcy), Lancaster (Morecambe, Wielka Brytania) oraz Sigma Chemicals Co. (St. Louis, Stany Zjednoczone) i nie wymagały dodatkowego oczyszczania.

Wzorce benzodiazepin przygotowano w postaci roztworów o stężeniu 1 mg/ml w mieszaninie metanolu i octanu etylu (1:4).

Material

Materiałem użytym do weryfikacji zastosowanej metodyki był moczu pacjentów Oddziału Detoksykacyjnego (próbka nr 3025) oraz Kliniki Nerwic (próbki nr 3526 i 4278) Instytutu Psychiatrii i Neurologii w Warszawie, u których badanie skrynyngowe wykazało obecność substancji z grupy benzodiazepin.

Ekstrakcja do fazy stałej

Ekstrakcję prowadzono przy użyciu kolumniek (Bond Elut Certify Extration Columns – Varian) z sorbentem krzemionkowym, umieszczonych w urządzeniu z regulowaną próżnią (Analychem Vac Elut SPS 24TM – Varian). Kolumnieki przygotowywano, przepuszczając pod obniżonym ciśnieniem 2 ml metanolu i 2 ml 0,1 M buforu fosforanowego (pH = 6), a następnie, nie dopuszczając do wyschnięcia fazy, nanoszono 5 ml odwirowanego moczu zmieszanego z 2 ml 0,1 M buforu fosforanowego. Kolumnieki płukano 1 M kwasem octowym (1 ml), suszono przez 5 minut przy maksymalnym przepływie powietrza, ponownie płukano metanolem (6 ml) i suszono przez 2 minuty. Elucję prowadzono 2% (v/v) roztworem amoniaku (25%) w octanie etylu (2 ml), eluat odparowywano do sucha w strumieniu azotu, a suchą pozostałość rozpuszczano w 50 µl octanu etylu. Na kolumnę chromatograficzną podawano 1 µl ekstraktu, co odpowiadało 0,1 ml moczu.

Hydrolyza kwaśna loprazolamu

Do 2 mg loprazolamu dodano 2 ml wody oraz 2 ml kwasu solnego i ogrzewano przez pół godziny pod chłodnicą zwrotną. Roztwór zobojętniano stałym wodorowęglanem sodu i poddano ekstrakcji chlorkiem metylenu. Ekstrakt odparowano do sucha, rozpuszczono w 30 µl octanu etylu i poddano analizie chromatograficznej.

Aparatura

Chromatograf gazowy HP 5890, seria II, z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (FID)

Temperatura komory nastrzykowej wynosiła 250°C, a detektora 280°C. Jako gaz nośny stosowano hel. Warunki analizy, zależne od rodzaju użytej kolumny kapilarnej, przedstawiono w opisie tabeli I.

Chromatograf gazowy HP 6890 sprzężony z detektorem masowym HP 5973

Do analizy próbek moczu użyto kolumny kapilarnej HP-5MS, 30 m × 0,25 mm × 0,25 μm. Temperatura komory nastrzykowej wynosiła 250°C. Gazem nośnym był hel, objętość przepływu wynosiła 0,6 ml/min. Rejestrację całkowitego prądu jonowego prowadzono w zakresie mas od 40 do 400 amu. Temperaturę pieca zaprogramowano następująco: początkowa temperatura 110°C utrzymywała się przez 2 minuty, następnie wzrastała o 15°C/min do 255°C i o 8°C/min do 300°C i tę temperaturę utrzymywano przez 5 minut. Czas trwania analizy wynosił ok. 23 minut. Analizę wzorców prowadzono w opcji nastrzyku split 1:50, a ekstraktu moczu – w opcji nastrzyku *splitless*. Objętość nastrzyku V wynosiła 0,4 μl.

Rodzaje użytych kolumn oraz parametry chromatograficzne przedstawiono w opisie tabeli I.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Dekompozycja benzodiazepin podczas analizy chromatograficznej

Podczas analizy nitrazepam i klonazepam, oprócz pików macierzystych związków, obserwowano dodatkowe piki produktów ich częściowego rozkładu termicznego: 7-aminonitrazepamu i 7-aminoklonazepamu. Chromatogram klonazepamu wraz z widmami MS związku macierzystego i produktu jego rozkładu przedstawiono na rycinie 3.

Tak więc aromatyczne 7-nitrozwiązki (nitrazepam i klonazepam) ulegają podczas procesu chromatograficznego częściowej redukcji do odpowiednich amin w stopniu zależnym od rodzaju kolumny oraz temperatury elucji (rycina 4). Wyższa temperatura i dłuższy czas przebywania analizowanej substancji na kolumnie wywołuje wzrost ilości produktów degradacji.

W trakcie analizy chromatograficznej chlorodiazepoksydu otrzymano pojedynczy pik, którego widmo masowe odpowiada związkowi o masie cząsteczkowej 283 a.j.m. Masa cząsteczkowa chlorodiazepoksydu wynosi 299 a.j.m, a zatem jest to widmo związku pozbawionego atomu tlenu (rycina 5).

Wynika z tego, że chlorodiazepoksyd zawierający w strukturze układ N-tlenkowy ulega przebiegającej ilościowo termicznej deoksydacji (rycina 6), która zachodzi w komorze nastrzykowej podczas wprowadzania związku na kolumnę chromatograficzną.

Widmo masowe lorazepamu i oxazepamu charakteryzują się jonem molekularnym o m/z $[M_{\text{oksazepam}-18}]^{+*}$ oraz m/z $[M_{\text{lorazepam}-18}]^{+*}$. Widma MS produktów dekompozycji obu związków przedstawiono na rycinie 7 i 8.

Na podstawie uzyskanych widm można stwierdzić, że związki o strukturze α -hydroksyketonów (lorazepam i oxazepam) ulegają procesowi przegrupowania termicznego, w trakcie którego zachodzi dehydratacja prowadząca do kontrakcji pierścienia i utworzenia trwałej aromatycznej struktury (rycina 9).

Na chromatogramach lormetazepamu i temazepamu widoczne są dwa dobrze rozdzielone piki. Jeden, bardziej intensywny, odpowiada produktowi przegrupowania cząsteczki macierzystej, a drugi, odpowiadający produktowi z ugrupowaniem 2,3-diketonu, jest efektem dekompozycji. Jego widmo masowe charakteryzuje się występowaniem jonu molekularnego mniejszego o 2 ajm od macierzystej benzodiazepiny (rycina 10 i 11).

Lormetazepam i temazepam, zawierające układ N-metylo- α -hydroksyketonu, ulegają częściowo rozkładowi, tracąc cząsteczkę wodoru z utworzeniem α,β -diketonów.

Temazepam i lormetazepam, pomimo pokrewieństwa strukturalnego z ich N-demetylowanymi analogami – oxazepamem i lorazepamem – ulegają dekompozycji według innego mechanizmu (rycina 12).

Istotna jest ilość benzodiazepiny wprowadzonej na kolumnę chromatograficzną [18]. Przy niewielkich ilościach kształt otrzymanego piku jest niesymetryczny, a widmo masowe produktu dekompozycji praktycznie niewidoczne.

Na uwagę zasługuje analiza soli dwupotasowej klorazepatu, wymagającej izolacji ze środowiska kwaśnego, w przeciwieństwie do wszystkich analizowanych w tej pracy benzodiazepin. Sól dipotasowa kwasu 7-chloro-5-fenyl-2,2-dihydroksy-1H-1,4-benzodiazepino-3-karboksyłowego, ulegając procesowi dekarboksylacji i dehydratacji w warunkach chromatografii gazowej, przekształca się w nordiazepam (rycina 13).

Loprazolam, ze względu na zbyt dużą masę cząsteczkową, nie daje sygnału w postaci piku chromatograficznego na testowanych kolumnach. Natomiast produkt jego kwaśnej hydrolizy, 2-amino-5-nitro-2-chlorobenzofenon, daje sygnał analityczny w postaci piku chromatograficznego o charakterystycznym widmie masowym (rycina 14). Umożliwia to identyfikację loprazolamu. Należy jednak pamiętać, że powstały produkt kwaśnej hydrolizy jest identyczny z produktem hydrolizy klonazepamu. Może to stanowić pułapkę analityczną dla osoby wykonującej analizę do celów kryminalistycznych.

Termiczny rozkład benzodiazepin podczas analizy chromatograficznej stanowi ważny problem analityczny, który może prowadzić do błędnej interpretacji wyników ekspertyz wykonywanych na zlecenie organów sprawiedliwości, a więc mogących mieć wpływ na wynik postępowania sądowego. W przypadku badań metodą GC/MS podstawą identyfikacji jest wynik przeprowadzonej analizy instrumentalnej, który wskazuje na obecność określonego związku w badanym materiale dowodowym (w spektrometrii mas jest to widmo masowe). Należy zawsze udowodnić, że produkt rozkładu termicznego analizowanej benzodiazepiny, zidentyfikowany przez detektor masowy, jest specyficzny dla tej benzodiazepiny, która została wprowadzona na kolumnę chromatograficzną. Ekspert wydający opinię musi pamiętać, że widmo masowe produktu rozkładu stanowi tylko pośredni dowód obecności określonej benzodiazepiny w materiale dowodowym. Jest to szczególnie istotne w sytuacji, gdy wynik identyfikacji danego związku pociąga za sobą sankcje prawne wynikające z ustawy.

Podsumowując, należy stwierdzić, iż:

1. Częściowa dekompozycja temazepamu, nitrazepamu, klonazepamu i oxazepamu prowadzi do otrzymania chromatogramów zawierających piki związku macierzystego oraz piki produktów rozkładu. Wyniki są najczęściej niepowtarzalne i zależą od rodzaju związku i zastosowanych warunków chromatograficznych.
2. Rozkład lub przegrupowanie chlorodizepoksydu, lorazepamu i kwasu klorazepatowego prowadzi do stabilnego chromatograficznie produktu.
3. Aktywne grupy funkcyjne w strukturze analitu mogą powodować nieodwracalną adsorpcję na fazie stacjonarnej kolumny i w efekcie nieprawidłowy kształt piku (np. „ogonowanie”). Dotyczy to pochodnych zawierających grupy hydroksylowe oraz – w mniejszym stopniu – pierwszo- i drugorzędowe grupy aminowe.

Rozdział złożonej mieszaniny benzodiazepin i identyfikacja benzodiazepin w moczu

Efektywność rozdziału benzodiazepin badano na 5 kolumnach kapilarnych o różnych parametrach chromatograficznych: długości, średnicy wewnętrznej oraz grubości fazy stacjonarnej. Polarność faz zastosowanych kolumn wzrastała zgodnie z następującym szeregiem: SPB-Octyl < SPB-1 < HP-5MS < HP-35 < HP-30+. Bez względu na czasy retencji poszczególnych substancji lub ich produktów rozkładu przedstawiono w tabeli I.

W zastosowanych warunkach analizy, dzięki użyciu kolumn z niepolarną fazą stacjonarną (SPB-1, SPB-Oktyl, HP-5MS), otrzymano chromatogramy wszystkich termicznie stabilnych pochodnych; zbliżone czasy retencji mają następujące związki i produkty ich rozkładu: nordiazepam/chlorodiazepoksyd oraz alprazolam/kamazepam na kolumnie z fazą HP-5MS, flunitrazepam/ bromazepam, kamazepam/alprazolam na kolumnie z fazą SPB-1 oraz flurazepam/nitrazepam na kolumnie z fazą SPB-Oktyl. Wzrost polarności fazy (HP-35 i HP-50+) wpływał ujemnie na właściwości chromatograficzne badanych związków: wzrost szerokości połówkowej pików, znaczne obniżenie ich intensywności i występowanie tzw. „ogonowania”.

Nie uzyskano satysfakcjonujących wyników analizy pochodnych z układem triazolowym, tj. alprazolamu, triazolamu i estazolamu.

Chromatogram mieszaniny 18 benzodiazepin otrzymany przy użyciu metody GC/MS przedstawiono na rycinie 15.

Zoptymalizowane warunki rozdziału wyżej wymienionych substancji wzorcowych zastosowano do analizy materiału biologicznego.

Chromatogram ekstraktu moczu pacjenta uczestniczącego w programie leczenia metadonem (próbka nr 3025) przedstawiono na rycinie 16.

Zidentyfikowano pik nordiazepamu oraz amfetaminy, a także piki: metadonu i jego metabolitów, nikotyny i jej metabolitów, prometazyny i jej metabolitów oraz metabolit karbamazepiny (tabela II). Obecność piku nordiazepamu i amfetaminy świadczy o złamaniu abstynencji obowiązującej pacjentów uczestniczących w programie metadonowym, a obecność prometazyny i jej metabolitów – o samowolnym przyjęciu przez pacjenta preparatu leczniczego nie zleconego przez lekarza. Obecność nikotyny oraz jej metabolitów dowodzi, że pacjent jest palaczem tytoniu. Metadon podawano pacjentowi w dawce 80 mg/dobę w ramach terapii uzależnienia

od opiatów, a karmazepinę, której metabolitem jest 9-formyloakrydyna, w dawce 15 mg/kg m.c. na dobę w celu zapobieżenia drgawkom.

Ryciny 17 i 18 przedstawiają dwa chromatogramy ekstraktów moczu pacjentów leczonych w Klinice Nerwic w Warszawie.

Na rycinie 17 widać dominujący pik tetrazepamu oraz cztery piki odpowiadające amidowi kwasu nikotynowego, kofeinie i teobrominie (tabela III). Pik tetrazepamu stanowi dowód przyjęcia tego preparatu przez badanego pacjenta.

Na rycinie 18 widać wyraźny pik nordiazepamu oraz cztery piki odpowiadające nikotynie i jej trzem metabolitom: nornikotynie, kotyninie, 3-hydroksynikotynie (tabela IV).

WNIOSKI

Opracowane warunki analizy 18 benzodiazepin w moczu pozwalają – w odróżnieniu od metod skryningowych – zidentyfikować poszczególne benzodiazepiny obecne w moczu, a więc nie tylko stwierdzić fakt złamania przez pacjenta abstynencji, ale również ustalić, jaką benzodiazepinę przyjął. Stanowi to ważny czynnik dyscyplinujący pacjenta do zachowania abstynencji.

Zastosowana procedura analityczna umożliwi również wykrycie wielu innych związków psychoaktywnych, które – obok benzodiazepin – mogą znaleźć się w moczu nieprzestrzegających abstynencji narkomanów.