



APPLICATION OF THE EMIT AND HPLC-DAD METHODS TO DETERMINATION OF THE CONCENTRATION OF BENZODIAZEPINES IN THE SERUM OF POISONED PATIENTS

Ewa GOMÓŁKA^{1,3}, Jolanta WILIMOWSKA¹, Adrianna SULKA¹, Tomasz GAWLIKOWSKI²,
Agnieszka MORAWSKA¹

¹ *Department of Analytical Toxicology and Therapeutic Drug Monitoring, Collegium Medicum, Jagiellonian University, Kraków*

² *Toxicology Clinic, Faculty of Toxicology and Environmental Diseases, Collegium Medicum, Jagiellonian University, Kraków*

³ *Toxicological Laboratory, Department of Laboratory Diagnostics, L. Rydygier's Hospital, Kraków*

Abstract

About 300 cases of benzodiazepine intoxications per year are diagnosed in the Toxicology Clinic, Collegium Medicum, Jagiellonian University in Kraków. Therefore, there is a need for rapid and reliable methods that allow determination of the concentrations of these drugs in body fluids. The aim of this study was to estimate the usefulness of the enzyme multiplied immunoassay technique (EMIT) for determination of benzodiazepines in serum. Blood was collected from patients poisoned with benzodiazepines diagnosed in the Laboratory of Analytical Toxicology and Drug Monitoring UJ CM. EMIT (Viva-E, Siemens) and high pressure liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD) (LaChrom, Merck-Hitachi) were used. The results of benzodiazepines concentrations in serum obtained by the EMIT method in the group of patients ranged from a few to over 5000 ng/ml. The presence of benzodiazepines (parent drugs and their metabolites) was confirmed in all samples by the HPLC-DAD method. Diazepam, estazolam, and nordiazepam (accounting together for more than 60% of the results) and oxazepam, alprazolam, clonazepam, lorazepam, and temazepam were detected most often. The specificity of the analytical method regarding the measured substance and its therapeutic and toxic serum ranges must be considered in interpretation of results obtained by the EMIT method. Confirmation analysis by a reference method should be considered in questionable cases.

Key words

Benzodiazepines; Poisoning; EMIT; HPLC-DAD.

Received 12 January 2010; accepted 10 February 2010

1. Introduction

Benzodiazepines are a widely used group of drugs (including dozens of different derivatives), which have a high therapeutic index and low toxicity, and consequently, are considered safe. In the nineteen sixties, benzodiazepines successfully replaced the more toxic

barbiturates, chloral hydrate, glutethimide and meprobamat. They are used to treat anxiety, insomnia, phobias, panic reactions, mania, chronic pain syndromes, dystonia induced by neuroleptics, neuroleptic malignant syndrome, and muscle spasticity. They are also used as an auxiliary in the treatment of amphetamine and cocaine poisonings, and withdrawal syndromes

(induced by alcohol and sedative-hypnotic drugs). *Ad hoc* use of benzodiazepines is also widespread for seizures and sedation prior to intubation [3, 7, 18].

The various benzodiazepines differ in action, doses, the therapeutic concentration ranges and pharmacokinetic parameters. All benzodiazepines, to a certain extent, show an anxiety relieving, hypnotic, sedative, muscle relaxant and anticonvulsant action. These effects are differently intensified for particular benzodiazepines. For example, alprazolam has strong anxiolytic action, temazepam – hypnotic, and clonazepam – long-term anticonvulsant. Differences in the pharmacokinetic parameters of benzodiazepines concern, for example, the delay in onset of action, and length of action, which results not only from different biological half-lives, but also the solubility in fat and the presence of active metabolites, which are often metabolized more slowly than the unchanged drug. More lipophilic benzodiazepines quickly cross the blood-brain barrier and cause a depressive effect on the CNS, but on the other hand, are rapidly redistributed from the CNS, which reduces the time of their action [3, 7].

Clinical signs of poisoning with benzodiazepines include various degrees of disturbance of consciousness, up to coma (of varying intensity). Slowing of movements and astigmatism, dizziness, dysarthria, impairment of recent memory, and retrograde amnesia, as well as cognitive impairment appear in conscious patients. Hypotonia and slight bradycardia can be present in a physical examination; moisture of the skin is normal, eyeballs positioned centrally or strabismic, reactive pupils, mostly of medium size, possible nystagmus. Muscle tension in the limbs is symmetrically reduced, peristalsis may be sluggish, but is usually audible. Gastrointestinal disorders are rarely reported (nausea, vomiting, diarrhea), and are not characteristic of this type of poisoning. The influence on the cardiovascular and respiratory systems is slight; the following may occur: hypotension and slight bradycardia (without hemodynamic consequences), and ventilation disorders, which are not related to inhibition of the respiratory drive, but to obstruction of the upper air-passages or developing aspiration pneumonia or bronchopneumonia. Essentially “pure” poisonings with benzodiazepines rarely lead to death. A much greater risk occurs in mixed poisonings, when benzodiazepines are combined with tricyclic antidepressants, other sedatives and ethanol. Chronic use (abuse) of benzodiazepines is also noteworthy. Symptoms are analogous to those above, though less severe. They mainly include: psychomotor slowing, impairment of memory and cognitive processes. It is emphasized that these effects may

be irreversible and not subside despite the discontinuation of treatment [3, 7].

In the literature of the 1970’s and 1980’s, there are descriptions of paradoxical agitation and aggression which occurred after administration of benzodiazepines, mainly in elderly people. It is now accepted that these unusual reactions should be associated with pre-existing and unrecognized psychopathologic disorders, including hostility and aggressive behavior. The given poisoned person’s age (older people) and already existing cardiovascular and respiratory diseases (e.g. chronic obstructive pulmonary disease) are also significant and make the prognosis grave [3]. Although benzodiazepines are sold only on prescription, they are often overused (and abused for non-medical purposes) and cause acute poisonings more often than other drugs. Over 300 cases of poisonings by benzodiazepine derivatives were confirmed in the Toxicology Clinic, Collegium Medicum of the Jagiellonian University in 2008 (Figure 1).

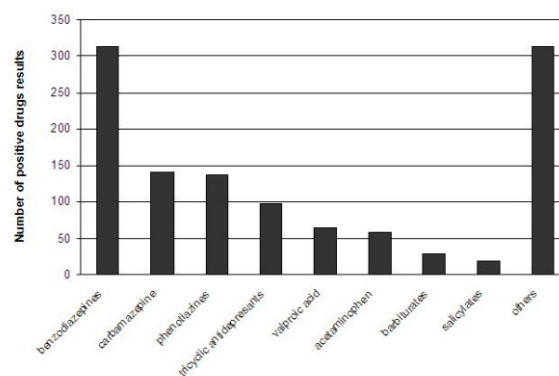


Fig. 1. Number of positive drugs results in Laboratory of Analytical Toxicology and Drug Monitoring CM UJ in Kraków in year 2008.

Toxicological diagnostics of patients poisoned with benzodiazepines encompasses qualitative or semiquantitative determination of drugs in urine and (or) serum. Immunological and chromatographic methods are used for this purpose [2, 5, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 20]. Table I provides a brief description [6]. Clinical toxicological laboratories usually use immunochemical methods that are rapid and easy to automate. They are characterized by sensitivity and specificity sufficient for clinical diagnostics, but do not allow drug identification, which causes difficulties in interpretation of the result.

TABLE I. CHARACTERISTICS OF METHODS USED FOR DETERMINATION OF BENZODIAZEPINES IN BIOLOGICAL FLUIDS [6]

	Method	Sensitivity	Specificity	Time consuming	Cost
Immunoassay	Casette rapid test	+	++	+	+
	EMIT, FPIA, ELISA	++	++	+	++
Chromatography	TLC	++	+++	++	++
	HPLC-UV	+++	+++	++++	+++
	HPLC-DAD	+++	++++	++++	+++
	LC-MS	++++	++++	++++	++++

2. Aim of study

The aim of this study was to compare the results of benzodiazepine determinations in serum obtained by the EMIT method and the reference HPLC-DAD method. The usefulness of the EMIT method for the determination of benzodiazepines in serum of poisoned patients was assessed and attempts to establish rules for interpreting results for toxicological-medical diagnostics were made.

3. Material and methods

3.1. Introductory remarks

Blood samples collected from 63 patients poisoned with benzodiazepines, and treated in the Toxicology Clinic, Jagiellonian University in Kraków in 2008 constituted material for the study. Determinations of drugs for the toxicological diagnostics were performed in the Laboratory of Analytical Toxicology and Therapeutic Drug Monitoring CM UJ.

The EMIT method (Viva-E analyzer, Serum Benzodiazepines reagents by Siemens), which is used for twenty-four-hour routine determinations, was used for testing. Confirmatory analyses were performed by the HPLC-DAD (LaChrom Merck-Hitachi Pump L-7100 Diode Array Detector, L-7455) method. Chromatographic analysis was conducted in two stages. In the first step the drug was identified, and then the quantitative analysis of benzodiazepines was carried out.

3.2. The procedure for extraction of serum samples prior to determination by the HPLC method

200 μ l of phosphate buffer of pH = 7.4 was added to 500 μ l of serum, and vortexed for 10 seconds, and

then 1.2 ml of analytically pure diethyl ether (POCh) was added. Samples were vortexed for another 60 seconds and centrifuged for 5 min at 15,000 rpm. The organic phase was transferred to Eppendorf tubes and evaporated at 40°C under a stream of compressed air. The dry residue was dissolved in 200 μ l of mobile phase.

3.3. HPLC-DAD method for the identification of benzodiazepines

A Supelcosil LC-8 column (Supelco) was applied. Separation was performed in isocratic conditions at a flow rate of 1.2 ml/min. The mobile phase was a mixture of methanol-acetonitrile-ammonium phosphate buffer (pH 6) (31:13:56). The injection volume was 100 μ l. Measurement was carried out at a wavelength of 230 nm. Separation of most commonly used benzodiazepines was achieved in 53 minutes (Figure 2).

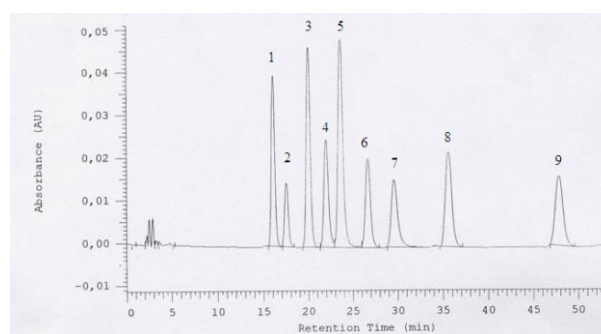


Fig. 2. Resolution of benzodiazepines by HPLC method (1 – nitrazepam, 2 – clonazepam, 3 – estazolam, 4 – oxazepam, 5 – lorazepam, 6 – alprazolam, 7 – temazepam, 8 – nordiazepam, 9 – diazepam).

3.4. HPLC-DAD method for the quantitative analysis of benzodiazepines

A LiChroCART 125-4 Select B column (Merck) was used. Separation was performed in gradient conditions at a flow of 1 ml/min. Components of the mobile phase: A – deionized water with addition of concentrated phosphoric acid (Sigma) in the amount of 100 l/1000 ml of water, B – acetonitrile (HPLC Gradient Grade, Sigma). The composition of the mobile phase was changed during the analysis in the following way: initial conditions – 80% A and 20% B; then it was changed to 60% A and 40% B within 5 min and maintained for another 5 min. next it was changed to 30% A and 70% B within 3 minutes; and then it was changed to 80% A and 20% B within 1 min and maintained in this state for 5 min. Measurement was made at a wavelength of 230 nm. The injection volume was 100 l. Prazepam (LGC Standards) was used as an internal standard. Analysis time was 25 min.

3.5. Validation parameters of HPLC-DAD method

Validation of the benzodiazepines identification method was carried out on the basis of selectivity (optimal separation of the most commonly used drugs was obtained – Figure 2), specificity (serum that was free from the tested analytes was used for the study of the matrix effects) and the limits of detection, which did not differ from the values assigned for the quantitative analysis of benzodiazepines (Table II).

Limits of linearity, detection, and quantitation, as well as precision and recovery were determined for

different drugs in quantitative analysis. The method for determination of the concentrations based on ratios of peak areas of tested drugs to internal standard peak was applied. The limits of detection and quantification were determined respectively as a three times, and ten times noise to internal standard signal ratio (measured as peak area) for the analysis of blank serum, using calibration curves. The accuracy and precision of the method were determined by analysis of 5-component series serum samples enriched by tested drugs at levels of 200 and 800 ng/ml. Accuracy was calculated from formula 1:

$$Accuracy = \frac{c_t - c_0}{c_t} 100\%, \quad \{1\}$$

where: c_t – theoretical concentration, c_0 – determined concentration. The coefficient of variation (CV) for the obtained series of results was assumed as a measure of precision and calculated from equation 2:

$$CV = \frac{SD}{c_{sr}} 100\%, \quad \{2\}$$

where: SD – standard deviation, c_{sr} – mean concentration. Recovery for individual analytes was determined from formula 3:

$$Recovery = \frac{c_{pr\ wzb} - c_{rz}}{c_{wzb}} 100\%, \quad \{3\}$$

where: $c_{pr\ wzb}$ – concentration in enriched sample, c_{rz} – concentration in real sample, c_{wzb} – enrichment concentration.

TABLE II. VALIDATION PARAMETERS OF THE HPLC-DAD METHOD FOR DETERMINATION OF BENZODIAZEPINES IN SERUM

Benzodiazepine	Parameter									
	LOL [ng/ml]	Equation (mean values)	R^2	LOD [ng/ml]	LOQ [ng/ml]	Accuracy [%]		CV [%]		Recovery [%]
						200 ng/ml	800 ng/ml	200 ng/ml	800 ng/ml	
Alprazolam	100–1500	$y = 0.0023x - 0.0624$	0.996	30	100	5.2	4.3	11	2.1	78.1
Clonazepam	100–1500	$y = 0.0010x - 0.0080$	0.996	15	50	2	4.9	7.5	5.5	83.6
Diazepam	100–1500	$y = 0.0023x - 0.0111$	0.997	8	26	4.7	1.5	8.9	8.5	72.2
Estazolam	100–1500	$y = 0.0167x - 0.1507$	0.999	9	31	9.1	6	4.5	3.9	84.9
Lorazepam	100–1500	$y = 0.0037x - 0.0290$	0.997	10	32	10.7	4	9.1	8.8	83.1
Nitrazepam	100–1500	$y = 0.0031x - 0.0915$	0.999	30	100	7.7	5.9	4.3	3.7	85.6
Nordiazepam	100–1500	$y = 0.0013x - 0.0102$	0.992	14	45	11	6.7	7.2	3.8	77.1
Oksazepam	100–1500	$y = 0.0020x - 0.0177$	0.994	12	41	6.9	2.9	9.7	9.2	87.3
Temazepam	100–1500	$y = 0.0013x - 0.0136$	0.993	16	53	6.3	4.6	9.6	9.1	86.9

Validation parameters are summarized in Table II. The lower values of ranges of linearity (*LOL*) represent the lowest concentration of calibrator. In cases where *LOL* and *LOD* are different, the linearity of the method is maintained between these values.

4. Results

Benzodiazepines concentrations obtained by EMIT ranged from tens to more than 5000 ng/ml in the analyzed serum samples. The applied reference HPLC-DAD method confirmed the presence of benzodiazepines in all samples – parent drugs and their metabolites. Identification was consistent with medical history. Diazepam, estazolam, and nordiazepam (accounting together for more than 60% of all results) were mostly determined in the tested material. Subsequently, the presence of oxazepam, alprazolam, clonazepam, lorazepam and temazepam was ascertained (Figure 3).

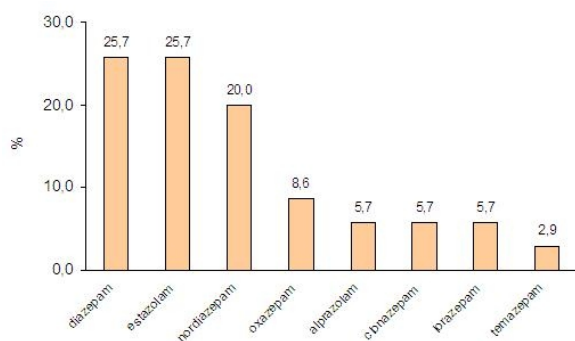


Fig. 3. Benzodiazepines identified in serum of poisoned patients treated in Toxicology Clinic CM UJ in Kraków.

Comparison of the EMIT and HPLC methods for all obtained results (all derivatives of benzodiazepines) indicated lack of correlation ($R^2 = -0.0628$). The results obtained by the EMIT method were higher for some derivatives (diazepam, alprazolam, temazepam), comparable for others (nordiazepam) and lower for others still (estazolam, clonazepam, lorazepam), in comparison to HPLC. Next, the results of determinations of individual derivatives were analyzed. R^2 coefficients for the most frequently determined benzodiazepines were high and amounted to 0.7345 (estazolam), 0.6173 (nordiazepam), 0.8504 (alprazolam) and 0.986 (diazepam) (Figure 4). For the remaining derivatives, the number of observations was small, and the correlation coefficients did not exceed a value of 0.3.

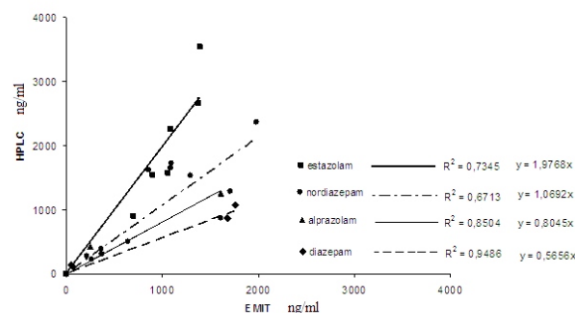


Fig. 4. A comparison of the serum benzodiazepines derivatives results (alprazolam, diazepam, estazolam and nordiazepam) by EMIT and HPLC methods.

5. Discussion of results

To date, monitoring of benzodiazepines concentrations in serum during treatment is not performed routinely. They are safe, but pose the risk of addiction, and very often – more often than other drugs – are the cause of poisonings. The problem of benzodiazepine abuse, acute poisonings, poisonings in the course of dependence and treatment of withdrawal symptoms caused by benzodiazepines has been discussed in many papers [3, 7, 9, 11, 21]. For correct diagnosis in such cases, performance of toxicological determinations is useful, especially with mixed poisonings, when benzodiazepines are consumed with other psychoactive substances.

Among the methods used for the determination of benzodiazepines in poisoned patients are immunological methods (commonly used) and chromatographic ones (considered as reference methods) [2, 4, 5, 8, 10, 12, 14, 15, 16, 17, 19, 20]. Chromatographic methods are characterized by high specificity and sensitivity, but are too labour-consuming and time-consuming, which disqualifies them from rapid toxicological diagnostics. It is recommended to use them as confirmatory methods. Immunological methods are less specific and sensitive, but rapid and fully automated. Different kinds of immunochemical methods used for determination of benzodiazepines (FPIA, RIA, EIA, EMIT) are presented in the literature as likely to give false negative results. Discrepancies were related to those situations where the measured value was close to the cut-off value, or where the analyzed substance was benzodiazepine derivatives for which the sensitivity of the method was reduced [2, 8, 17, 20].

An important point is that for the instrumental immunological method, the cut-off point can be changed

depending on the requirements of the user. Lowering the cut-off value allows reduction of the risk of obtaining false-negative results. A cut-off value of 70 ng/ml was accepted for the determination of benzodiazepines in serum by the EMIT method (apparatus Viva, Siemens) used in the Laboratory of Analytical Toxicology and Therapeutic Drug Monitoring, Jagiellonian University. 100% conformity of results by the methods was obtained in the described study with such a cut-off value. Each positive result obtained by the EMIT method was confirmed by the HPLC-DAD method. However, the result of lowering the cut-off value is an increase in the probability of obtaining a false positive result. Therefore, in clinical practice, the result of the determination is always interpreted in the context of the medical history, concerning the circumstances of the poisoning and the observed clinical symptoms. If the result of determination obtained in the Toxicological Laboratory is inconsistent with the picture of poisoning, confirmatory analysis should be performed with the use of, e.g., the HPLC-DAD method.

However, interpretation problems of the analyzed results are more complex. Benzodiazepines are a large group of medicines that vary in pharmacological and pharmacokinetic parameters [1, 7, 21]. Due to differences in the therapeutic and toxic concentration ranges of individual benzodiazepines (Table III), correct interpretation of the result of determination can not be done without knowing the type of drug. The interpretation is also hampered by differences in the sensitivity of the method for respective drugs (Table IV). Differences in sensitivity are also illustrated in Figure 4. Equations presented in the chart can be used to calcu-

late the concentration of the specific benzodiazepine on the basis of the result obtained by the EMIT method. If the compound is not identified, it cannot be concluded whether the determined concentration of drug is within the therapeutic or toxic range. Despite this, the EMIT method along with other immunological methods is a recommended and useful method for rapid diagnostics of poisoned patients. Nevertheless, one should remember that immunological methods are designed to detect groups of compounds rather than individual substances. A number of aspects, primarily the data obtained in medical history should be considered during interpretation of the results: what benzodiazepine derivative has been taken, in what amount, time elapsed since use, how long the drug has been taken by the patient, what the dosage scheme was, whether the patient is addicted, whether he took other psychoactive substances, and what these substances were. Confirmatory testing should be performed in situations where the patient's state is serious, it is not possible to obtain a reliable medical history, there are discrepancies between the state of the patient and the test result, or if the patient or the family put forward a claim and challenge the results of determinations. Only the reference method (e.g. HPLC-DAD) allows us to resolve unclear issues that arise from limitations of routinely used immunological methods.

TABLE III. CHARACTERISTICS OF BENZODIAZEPINES

Benzodiazepine	Therapeutic dose [mg]	Therapeutic serum concentration [ng/ml]	Toxic serum concentration [ng/ml]	Protein binding [%]	Time of beginning of acting [h]	$T_{1/2}$ [h]
Alprazolam	1–3	20–60	100–400	70	1–2	6–20
Diazepam	5–30	125–750	1500–5000	99	<1	20–50
Estazolam	2–6	55–100	>1200	90	1–2	18
Clonazepam	2–8	30–120	100–400	85	1–2	18–45
Clorazepate	8–25	100–2600	>5000	97	<1	40
Lorazepam	2–10	20–250	300–600	90	1–2	9–20
Midazolam	3–15	80–250	300–600	95	<1	2
Nitrazepam	5–10	35–170	600–1800	85	1–2	15–35
Oxazepam	1–60	1000–2000	300–500	95	2–3	5–18
Temazepam	7–30	300–900	>1000	85	2–3	10–25

TABLE IV. BENZODIAZEPINES CONCENTRATIONS THAT GIVE A RESULT OF 200 ng/ml BY EMIT (VIVA-E, SIEMENS) (THE METHOD IS CALIBRATED ON LORMETAZEPAM)

Benzodiazepine	Concentration [ng/ml]
Alprazolam	65
Bromazepam	630
Chlordiazepoxide	3300
Diazepam	44
Estazolam	55
Flunitrazepam	140
Clonazepam	260
Lorazepam	600
Midazolam	130
n-desmethyldiazepam	110
Nitrazepam	140
Oxazepam	250
Prazepam	90
Temazepam	140

6. Conclusions

1. The EMIT method is useful for determination of benzodiazepines in serum in diagnostics of poisoned patients.
2. The proposed cut-off value for the determination of benzodiazepines in serum is 70 ng/ml.
3. When interpreting the results of determinations by the EMIT method, the specificity of the method in relation to a particular benzodiazepine should be taken into account and the result should be related to appropriate therapeutic and toxic ranges.
4. Confirmatory determination by the reference method is necessary if:
 - there is no correlation between medical history and analytical result (especially in pediatric patients and the elderly);
 - it is not possible to obtain a reliable medical history;
 - mixed poisonings (with other medicinal drugs, ethanol, narcotic drugs);
 - the credibility of the result is challenged by the patient (the patient's family), the case involves a claim and may have legal consequences.

References

1. Baselt R. C. E., Disposition of toxic drugs and chemicals in men, Biomedical Publications P.O., California 2002.
2. Borrey D., Meyer E., Duchateau L. [et al.], Longitudinal study on the prevalence of benzodiazepine (mis)use in a prison: importance of the analytical strategy, *Addiction* 2003, 98, 1427–1432.
3. Brent J., Wallace K., Burkhart K. [et al.], Critical care toxicology. Diagnosis and management of the critically poisoned patient, Elsevier, Mosby 2005.
4. Bugey A., Staub C., Rapid analysis of benzodiazepines in whole blood by high-performance liquid chromatography: use of a monolithic column, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2004, 35, 555–562.
5. Dussy F. E., Hamberg C., Briellmann T. A., Quantification of benzodiazepines in whole blood and serum, *International Journal of Legal Medicine* 2006, 120, 323–330.
6. Ellenhorn M. J., Barceloux D. G., Ellenhorn's medical toxicology, Elsevier, New York 1997.
7. Haddad L., Shannon M., Winchester J., Clinical management of poisoning and drug overdose, W. B. Saunders, Maryland 1998.
8. Huang W., Moody D. E., Immunoassay detection of benzodiazepines and benzodiazepine metabolites in blood, *Journal of Analytical Toxicology* 1995, 19, 333–342.
9. Isbister G. K., O'Regan L., Sibbritt D. [et al.], Alprazolam is relatively more toxic than other benzodiazepines in overdose, *British Journal of Clinical Pharmacology* 2004, 58, 88–95.
10. Kroener L., Musshoff F., Madea B., Evaluation of immunochemical drug screenings of whole blood samples. A retrospective optimization of cutoff levels after confirmation-analysis on GC-MS and HPLC-DAD, *Journal of Analytical Toxicology* 2003, 27, 205–212.
11. Kurihara T., More rational use of benzodiazepines in the outpatient clinic, *Internal Medicine* 2007, 46, 255–256.
12. Laloup M., Ramirez Fernandez Mdel M., De Boeck G. [et al.], Validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of 26 benzodiazepines and metabolites, zolpidem and zopiclone, in blood, urine, and hair, *Journal of Analytical Toxicology* 2005, 29, 616–626.
13. Lu N. T., Taylor B. G., Drug screening and confirmation by GC-MS: comparison of EMIT II and Online KIMS against 10 drugs between US and England laboratories, *Forensic Science International* 2006, 157, 106–116.
14. Maurer H. H., Current role of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical and forensic toxicology, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2007, 388, 1315–1325.
15. Pistos C., Stewart J. T., Direct injection HPLC method for the determination of selected benzodiazepines in plasma using a Hisep column, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2003, 33, 1135–1142.

16. Quintela O., Cruz A., Castro A., [et al.], Liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry for the determination of nine selected benzodiazepines in human plasma and oral fluid, *Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2005, 825, 63–71.
17. Rasanen I., Neuvonen M., Ojanperä I. [et al.], Benzodiazepine findings in blood and urine by gas chromatography and immunoassay, *Forensic Science International* 2000, 112, 191–200.
18. Rund D. A., Ewing J. D., Mitzel K. [et al.], The use of intramuscular benzodiazepines and antipsychotic agents in the treatment of acute agitation or violence in the emergency department, *Journal of Emergency Medicine* 2006, 31, 317–324.
19. Samanidou V. F., Pechlivanidou A. P., Papadoyannis I. N., Development of a validated HPLC method for the determination of four 1,4-benzodiazepines in human biological fluids, *Journal of Separation Science* 2007, 30, 679–687.
20. Schwenzer K. S., Pearlman R., Tsilimidos M. [et al.], New fluorescence polarization immunoassays for analysis of barbiturates and benzodiazepines in serum and urine: performance characteristics, *Journal of Analytical Toxicology* 2000, 24, 726–732.
21. Szukalski B., Narkotyki. Kompendium wiedzy o środkach uzależniających, Wydawnictwo Instytut Psychiatrii i Neurologii, Warszawa 2005.

Corresponding author

dr Ewa Gomółka
Pracownia Toksykologii Analitycznej
i Terapii Monitorowanej CM UJ
Os. Złotej Jesieni 1
PL 31-826 Kraków
e-mail: egomolka@cm-uj.krakow.pl

ZASTOSOWANIE METODY EMIT ORAZ HPLC-DAD DO WYZNACZENIA STĘŻENIA BENZODIAZEPIN W SUROWICY ZATRUTYCH PACJENTÓW

1. Wstęp

Benzodiazepiny to szeroko stosowana grupa leków (obejmująca kilkadziesiąt różnych pochodnych), którą cechuje wysoki wskaźnik terapeutyczny oraz mała toksyczność, a co za tym idzie, bezpieczeństwo stosowania. W latach sześćdziesiątych ubiegłego stulecia benzodiazepiny z powodzeniem zastąpiły bardziej toksyczne barbiturany, wrodzian chloralu, glutetimid i meprobamat. Stosuje się je w leczeniu lęku, bezsenności, fobii, reakcji panicznych, manii, przewlekłych zespołów bólowych, dystonii wywołanych przez neuroleptyki, złośliwego zespołu neuroleptycznego oraz spastyczności mięśni. Ponadto są stosowane wspomagająco w leczeniu zatruc amfetaminą i kokainą oraz zespołów odstawiennych (alkoholowych i wywołanych przez odstawienie leków nasenno-uspokajających). Powszechne jest również doraźne stosowanie benzodiazepin w napadach drgawek oraz celem sedacji przed intubacją [3, 7, 18].

Poszczególne benzodiazepiny różnią się między sobą działaniem, dawkami, zakresami stężeń terapeutycznych oraz parametrami farmakokinetycznymi. Wszystkie benzodiazepiny w pewnym stopniu wykazują działanie przeciwlękowe, nasenne, uspokajające, zwiotczające mięśnie i przeciwdrgawkowe. Wymienione efekty są różnie nasilone dla poszczególnych benzodiazepin. Przykładowo alprazolam wykazuje silne działanie przeciwlękowe, temazepam – nasenne, a klonazepam – długotrwałe przeciwdrgawkowe. Różnice w parametrach farmakokinetycznych benzodiazepin dotyczą np. czasu, po jakim lek zaczyna działać oraz długości jego działania, co wynika nie tylko z różnych biologicznych okresów półtrwania, ale też rozpuszczalności w tłuszczach i obecności aktywnych metabolitów, które często metabolizują wolniej niż lek niezmieniony. Benzodiazepiny bardziej lipofilne szybciej pokonują barierę krew-mózg i wywołują depresyjny wpływ na OUN, a z drugiej strony są szybciej redystrybuowane z OUN, co ogranicza czas ich działania [3, 7].

Objawy kliniczne zatrucia benzodiazepinami obejmują różnego stopnia zaburzenia świadomości do śpiączki (o różnej głębokości) włącznie. U osób przytomnych występuje spowolnienie i niezborność ruchów, zawroty głowy, dyzartria, zaburzenia pamięci świeżej i niepamięć wsteczna, jak również upośledzenie procesów poznawczych. W badaniu fizykalnym może być obecna hipotonia i nieznaczna bradykardia; wilgotność skóry jest normalna, gałki oczne ustawione centralnie bądź w zezie rozbieżnym, źrenice reaktywne, przeważnie średniej wielkości, możliwy oczopląs. Napięcie mięśniowe w kończy-

nach jest symetrycznie obniżone, perystaltyka może być leniwa, ale zazwyczaj jest słyszalna. Rzadko opisywane są zaburzenia ze strony przewodu pokarmowego (nudności, wymioty, biegunka) i nie są one charakterystyczne dla tego rodzaju zatruc. Wpływ na układ krążenia i układ oddechowy jest niewielki, może wystąpić niedociśnienie i niewielka bradykardia (bez konsekwencji hemodynamicznych) oraz zaburzenia wentylacji, które jednak nie są związane z hamowaniem napędu oddechowego, ale niedrożnością górnych dróg oddechowych lub rozwijającym się zachłystowym lub odoskrzelowym zapaleniem płuc. Zasadniczo „czyste” zatrucia benzodiazepinami rzadko prowadzą do zgonu. O wiele większe ryzyko pojawia się przy zatruciach mieszanych, gdy benzodiazepiny łączone są z trójpierścieniowymi lekami przeciwdepresyjnymi, innymi lekami nasenno-uspokajającymi oraz etanolem. Na uwagę zasługuje również fakt przewlekłego stosowania (nadużywania) benzodiazepin. Objawy są analogiczne do wymienionych powyżej, choć mniej nasilone. Głównie obejmują spowolnienie psychoruchowe, upośledzenie pamięci i procesów poznawczych. Podkreśla się, że efekty te mogą być nieodwracalne i nie ustąpić pomimo odstawieniu leku [3, 7].

W literaturze lat siedemdziesiątych i osiemdziesiątych ubiegłego wieku pojawiły się opisy paradoksalnego pobudzenia i agresji, jakie występowały, głównie u osób starszych, po podaniu benzodiazepin. Obecnie przyjmuje się, że te nietypowe reakcje należy wiązać z wcześniej już istniejącymi, a nierozpoznanymi zaburzeniami psychopatologicznymi, w tym wrogości i zachowań agresywnych. Nie bez znaczenia jest również wiek chorego (osoby starsze) oraz istniejące już wcześniej u zatrutych schorzenia układu krążenia i układu oddechowego (np. przewlekła obturacyjna choroba płuc), które czynią rokowanie poważnym [3]. Pomimo tego, że leki z grupy benzodiazepin sprzedawane są wyłącznie na receptę, często są nadużywane (również w celach niemedycejskich) i stanowią przyczynę ostrych zatruc częściej niż inne leki. W Klinice Toksykologii CM UJ potwierdzono w 2008 roku ponad 300 przypadków zatruc pochodnymi benzodiazepin (rycina 1).

Diagnostyka toksykologiczna pacjentów zatrutych benzodiazepinami obejmuje oznaczenie jakościowe lub ilościowe leków w moczu i (lub) surowicy. W tym celu stosowane są metody immunologiczne oraz chromatograficzne [2, 5, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 20]. Tabela I przedstawia ich krótką charakterystykę [6]. Kliniczne laboratoria toksykologiczne korzystają zwykle z szybkich i łatwych do automatyzacji metod immunochemicznych. Cechują się one czułością i specyficnością wystarczającą

jąca do celów diagnostyki klinicznej, jednak nie umożliwia identyfikacji leku, czego konsekwencją jest utrudniona interpretacja wyniku.

2. Cel pracy

Celem pracy było porównanie wyników oznaczeń benzodiazepin w surowicy uzyskanych metodą EMIT oraz metodą referencyjną HPLC-DAD. Dokonano oceny przydatności metody EMIT do oznaczeń benzodiazepin w surowicy pacjentów zatrutych oraz podjęto próbę ustalenia zasad interpretacji wyników dla potrzeb toksykologicznej diagnostyki medycznej.

3. Materiał i metody

3.1. Uwagi wstępne

Materiał do badań stanowiły próby krwi 63 pacjentów zatrutych benzodiazepinami, a leczonych w Klinice Toksykologii CM UJ w Krakowie w 2008 roku. Oznaczenia leków dla potrzeb diagnostyki toksykologicznej wykonano w Pracowni Toksykologii Analitycznej i Terapii Monitorowanej CM UJ.

Do badań zastosowano metodę EMIT (analyzer Viva-e, odczynniki Serum Benzodiazepines firmy Siemens) stosowaną do rutynowych, całodobowych oznaczeń. Oznaczenia potwierdzające wykonano metodą HPLC-DAD (LaChrom Merck-Hitachi, Pump L-7100, Diode Array Detector L-7455). Analizę chromatograficzną prowadzono dwuetapowo. W pierwszym etapie identyfikowano lek, w drugim dokonano analizy ilościowej benzodiazepin.

3.2. Procedura ekstrakcji prób surowicy przed oznaczeniem metodą HPLC

Do 500 µl surowicy dodawano 200 µl buforu fosforowego pH = 7,4, po czym mieszano przez 10 s na wortexie i dodawano 1,2 ml eteru dietylowego cz.d.a (POCh). Próby mieszano na wortexie 60 s i wirowano 5 min przy 15000 rpm. Fazę organiczną przenoszono do probówek Eppendorfa i odparowywano w temperaturze 40°C w strumieniu sprężonego powietrza. Pozostałość po odparowaniu rozpuszczano w 200 µl fazy ruchomej.

3.3. Metoda HPLC-DAD identyfikacji benzodiazepin

Zastosowano kolumnę Supelcosil LC-8 (Supelco). Rozdział prowadzono w warunkach izokratycznych przy przepływie 1,2 ml/min. Fazą ruchomą była mieszanina metanol-acetonitryl-bufor amonowo-fosforanowy (pH = 6) (31:13:56). Objętość nastrzyku wynosiła 100 µl. Pomiaru dokonano przy długości fali 230 nm. W czasie 53 min

uzyskano rozdział najczęściej stosowanych benzodiazepin (rycina 2).

3.4. Metoda HPLC-DAD analizy ilościowej benzodiazepin

Zastosowano kolumnę Lichrocart 125-4 Select B (Merck). Rozdział prowadzono w warunkach gradientowych przy przepływie 1 ml/min. Składniki fazy ruchomej: A – woda dejonizowana z dodatkiem stężonego kwasu fosforowego (Sigma) w ilości 100 µl/1000 ml wody; B – acetonitryl (HPLC Gradient Grade, Sigma). Skład fazy ruchomej w czasie analizy zmieniał się następująco: warunki początkowe – 80% A i 20% B; w ciągu 5 min doprowadzano do 60% A i 40% B i utrzymywano taki stan przez 5 min, a następnie w ciągu 3 min zmieniano do 30% A i 70% B; w ciągu 1 min doprowadzano do 80% A i 20% B i utrzymywano taki stan przez 5 min. Pomiaru dokonano przy długości fali 230 nm. Objętość nastrzyku wynosiła 100 µl. Zastosowano prazepam (LGC Standards) jako wzorzec wewnętrzny. Czas analizy wyniósł 25 min.

3.5. Parametry walidacyjne metody HPLC-DAD

Charakterystykę metody identyfikacji benzodiazepin przeprowadzono w oparciu o selektywność (uzyskano optymalny rozdział najczęściej stosowanych leków – ryцина 2), specyficzność (do badania wpływu matrycy wykorzystano surowicę wolną od badanych analitów) oraz granice detekcji, które nie różniły się od wartości wyznaczonych dla analizy ilościowej benzodiazepin (tabela II).

W analizie ilościowej wyznaczono dla poszczególnych leków zakresy liniowości, granice detekcji, granice oznaczalności, dokładność, precyzję i odzysk. Zastosowano metodę oznaczania stężeń w oparciu o wyznaczone stosunki powierzchni pików badanych leków do pików wzorca wewnętrznego. Granice detekcji i oznaczalności wyznaczono odpowiednio jako trzykrotną oraz dziesięciokrotną wartość stosunku sygnału szumu do sygnału wzorca wewnętrznego (mierzone jako powierzchnia pików) dla analizy ślepej próby surowicy, wykorzystując krzywe kalibracyjne. Dokładność i precyzję metody wyznaczono w oparciu o analizę 5-elementowych serii prób surowicy wzbogaconych badanymi lekami na poziomach 200 i 800 ng/ml. Dokładność obliczono ze wzoru 1:

$$\text{Dokładność} = \frac{c_t - c_0}{c_t} 100\%, \quad \{1\}$$

gdzie: c_t – teoretyczna wartość stężenia, c_0 – wyznaczona wartość stężenia. Za miarę precyzji przyjęto współczynnik zmienności (CV) dla uzyskanych serii wyników obliczony ze wzoru 2:

$$CV \frac{SD}{c_{\text{sr}}} 100\%, \quad \{2\}$$

gdzie: SD – odchylenie standardowe, c_{sr} – stężenie średnie. Odzysk dla poszczególnych analitów wyznaczono ze wzoru 3:

$$\text{Odzysk} \frac{c_{\text{pr wzb}}}{c_{\text{wzb}}} \frac{c_{\text{rz}}}{c_{\text{wzb}}} 100\%, \quad \{3\}$$

gdzie: $c_{\text{pr wzb}}$ – stężenie w próbce wzbogaconej, c_{rz} – stężenie w próbce rzeczywistej, c_{wzb} – stężenie wzbogacenia.

Parametry walidacyjne zebrano w tabeli II. Dolne wartości zakresów liniowości (LOL) oznaczają stężenia najniższego kalibratora. W przypadkach, gdy LOL i LOD są różne, pomiędzy tymi wartościami zachowana jest liniowość metody.

4. Wyniki

W badanych próbach surowicy krwi wyniki stężeń benzodiazepin uzyskane metodą EMIT mieściły się w zakresie od kilkudziesięciu do ponad 5000 ng/ml. Zastosowana metoda referencyjna HPLC-DAD potwierdziła we wszystkich próbach obecność benzodiazepin – leków macierzystych oraz ich metabolitów. Identyfikacja była zgodna z wywiadem lekarskim. Najczęściej w badanym materiale oznaczano diazepam, estazolam i nordiazepam (stanowiące razem ponad 60% wszystkich wyników). W dalszej kolejności stwierdzano obecność oksazepam, alprazolamu, klonazepam, lorazepam i temazepam (rycina 3).

Przy porównaniu metod EMIT i HPLC dla wszystkich uzyskanych wyników (wszystkich pochodnych benzodiazepin) stwierdzono brak korelacji ($R^2 = -0,0628$). Wyniki uzyskane metodą EMIT w porównaniu z HPLC były dla niektórych pochodnych wyższe (diazepam, alprazolam, temazepam), dla innych porównywalne (nordiazepam) lub niższe (estazolam, klonazepam, lorazepam). W następnej kolejności przeanalizowano wyniki oznaczeń poszczególnych pochodnych. Współczynniki R^2 dla najczęściej oznaczanych benzodiazepin były wysokie i wynosiły: 0,7345 (estazolam), 0,6173 (nordiazepam), 0,8504 (alprazolam), 0,986 (diazepam) (rycina 4). Dla pozostałych pochodnych liczba obserwacji była niewielka, a współczynniki korelacji nie przekraczały wartości 0,3.

5. Dyskusja wyników

Do dnia dzisiejszego nie ma wskazań do oznaczania leków z grupy benzodiazepin w celu monitorowania ich stężenia w surowicy w trakcie leczenia. Są one bezpieczne, jednak stwarzają ryzyko uzależnienia i bardzo

często, częściej niż inne leki, są przyczyną zatruc. Problem nadużywania benzodiazepin, zatruc ostrych, zatruc w przebiegu uzależnienia oraz leczenia objawów odstawiennych spowodowanych benzodiazepinami poruszany jest w wielu pracach [3, 7, 9, 11, 21]. Dla prawidłowej diagnozy przydatne jest wówczas wykonanie oznaczeń toksykologicznych, szczególnie przy zatruciach mieszanym, gdy benzodiazepiny są spożywane z innymi substancjami psychoaktywnymi.

Wśród metod stosowanych do oznaczeń benzodiazepin u pacjentów zatrutych wyróżnia się metody immunologiczne (najczęściej stosowane) oraz chromatograficzne (uznane za referencyjne) [2, 4, 5, 8, 10, 12, 14, 15, 16, 17, 19, 20]. Metody chromatograficzne cechuje duża specyficzność i czułość, lecz są zbyt pracochłonne i czasochłonne, co dyskwalifikuje je przy wykorzystaniu do szybkiej diagnostyki toksykologicznej. Zaleca się stosowanie ich jako metod potwierdzających. Metody immunologiczne są mniej specyficzne i czułe, lecz są szybkie i w pełni zautomatyzowane. W literaturze przedmiotu różne rodzaje metod immunochemicznych stosowanych do oznaczeń benzodiazepin (FPIA, RIA, EIA, EMIT) przedstawione zostały jako mogące dawać wyniki fałszywie ujemne. Rozbieżności dotyczyły tych sytuacji, gdy mierzona wartość mieściła się w pobliżu wartości odcięcia (*cut-off*) lub gdy oznaczano pochodne benzodiazepin, w stosunku do których czułość metody była obniżona [2, 8, 17, 20].

Ważną informacją jest, że punkt odcięcia przy stosowaniu instrumentalnej metody immunologicznej może być zmieniony w zależności od potrzeby użytkownika. Obniżenie wartości punktu odcięcia pozwala na ograniczenie ryzyka uzyskania wyników fałszywie ujemnych. Dla metody EMIT (aparat Viva-e, Siemens) stosowanej w Pracowni Toksykologii Analitycznej i Terapii Monitorowanej CM UJ przyjęto dla oznaczeń stężeń benzodiazepin w surowicy wartość odcięcia wynoszącą 70 ng/ml. Przy takiej wartości odcięcia w opisanych badaniach uzyskano 100% zgodność metod. Każdy wynik pozytywny uzyskany metodą EMIT został potwierdzony metodą HPLC-DAD. Skutkiem obniżenia wartości odcięcia jest jednak wzrost prawdopodobieństwa uzyskania wyniku fałszywie dodatniego. Dlatego w praktyce klinicznej wynik oznaczenia zawsze jest interpretowany w kontekście wywiadu dotyczącego okoliczności zatrucia oraz obserwowanych objawów klinicznych. Jeżeli wynik oznaczenia uzyskany w Pracowni Toksykologicznej jest niezgodny z obrazem zatrucia, należy wykonać analizę potwierdzającą z zastosowaniem np. metody HPLC-DAD.

Jednak problemy interpretacyjne wyników oznaczeń są bardziej złożone. Leki z grupy benzodiazepin stanowią liczną grupę specyfików różniących się parametrami farmakologicznymi oraz farmakokinetycznymi [1, 7, 21]. Ze względu na różnice w zakresach stężeń terapeutycznych i toksycznych poszczególnych benzodiazepin (ta-

bela III) nie można dokonać prawidłowej interpretacji wyniku oznaczenia, nie znając rodzaju leku. Interpretację utrudniają również różnice w czułości metody w stosunku do poszczególnych leków (tabela IV). Różnice w czułości ilustruje też wykres na rycinie 4. Przedstawione na wykresie równania mogą być wykorzystane do obliczenia stężenia danej benzodiazepiny na podstawie wyniku uzyskanego metodą EMIT. Bez identyfikacji związku nie można wypowiedzieć się, czy oznaczone stężenie leku mieści się w zakresie terapeutycznym czy toksycznym. Pomimo tego metoda EMIT obok innych metod immunologicznych jest polecaną, przydatną metodą szybkiej diagnostyki zatrutych pacjentów. Trzeba jedynie pamiętać, że metody immunologiczne są przeznaczone do wykrywania grupy związków, a nie poszczególnych substancji. Przy interpretacji wyniku należy uwzględnić szereg aspektów, przede wszystkim dane uzyskane w wywiadzie lekarskim: jaka pochodna benzodiazepiny została spożyta, w jakiej ilości, jaki minął czas od zażycia leku, jak długo lek był zażywany przez pacjenta, jaki był schemat dawkowania, czy pacjent jest uzależniony, czy zażył inne substancje psychoaktywne i jakie to były substancje. W sytuacjach, gdy stan pacjenta jest bardzo ciężki, nie ma możliwości uzyskania wiarygodnego wywiadu, istnieją rozbieżności między stanem pacjenta a wynikiem badania lub gdy pacjent lub rodzina wysuwają roszczenia i kwestionują wyniki oznaczeń, należy wykonać badania potwierdzające. Jedynie zastosowanie metody referencyjnej (np. HPLC-DAD) pozwala rozstrzygnąć niejasne kwestie, które wynikają z ograniczeń rutynowo stosowanych metod immunologicznych.

- wiarygodność wyniku jest kwestionowana przez pacjenta (rodzinę pacjenta), sprawa jest roszczeniowa i może mieć konsekwencje prawno-sądowe.

6. Wnioski

1. Metoda EMIT jest przydatna do oznaczeń benzodiazepin w surowicy w diagnostyce zatruc pacjentów.
2. Proponowana wartość odcięcia dla oznaczeń benzodiazepin w surowicy wynosi 70 ng/ml.
3. Przy interpretacji wyników oznaczeń metodą EMIT należy uwzględnić specyficzność metody w stosunku do danej benzodiazepiny oraz odnosić wynik do odpowiednich zakresów terapeutycznych i toksycznych.
4. Wykonanie oznaczenia potwierdzającego metodą referencyjną konieczne jest, gdy:
 - nie ma korelacji między wywiadem i wynikiem oznaczenia (szczególnie u pacjentów pediatrycznych i osób starszych);
 - nie ma możliwości uzyskania wiarygodnego wywiadu;
 - mamy do czynienia z zatruciem mieszanym (z innymi lekami, etanolem, narkotykami);