

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SABINA HAMBERGER

**OPTIMIZACIJA ANALIZNE METODE HPLC/MS-MS ZA
DOLOČANJE HIDROLIZATOV BENZODIAZEPINOV V URINU**

**OPTIMIZATION OF HPLC/MS-MS ANALYTICAL METHOD FOR
DETERMINATION OF HYDROLYSATES OF BENZODIAZEPINES
IN URINE**

Ljubljana, 2009

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom prof.dr. Marija Sollner Dolenc, mag.farm. in somentorstvom doc.dr. Robert Roškar, mag.farm. Ekperimentalno delo diplomske naloge in HPLC/MS-MS analize smo opravili na Fakulteti za farmacijo.

Zahvaljujem se prof.dr. Sollner Dolenc, mag.farm in doc.dr. Roškar, mag. farm. za vso pomoč pri nastajanju diplomske naloge.

Izjava:

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof.dr. Sollner Dolenc, mag.farm. in somentorstvom doc.dr. Roškar, mag.farm.

KAZALO

POVZETEK.....	1
1. UVOD.....	3
1.1 KRONOLŠKI PREGLED UPORABE NEKATERIH HIPNOTIKOV IN ANKSIOLITIKOV.....	3
1.2 MEHANIZEM DELOVANJA BENZODIAZEPINOV.....	4
1.3 KEMIJSKE LASTNOSTI BENZODIAZEPINOV.....	6
1.4 FARMAKOKINETIKA BENZODIAZEPINOV.....	8
1.4.1 <i>KLASIFIKACIJA BENZODIAZEPINOV</i>	8
1.4.2 <i>VNOS, ABSORPCIJA, DISTRIBUCIJA</i>	10
1.4.3 <i>METABOLIZEM IN IZLOČANJE</i>	12
1.5 UPORABA BENZODIAZEPINOV.....	13
1.6 NEŽELENI UČINKI, ZASTRUPITVE IN ZLORABA BENZODIAZEPINOV.....	16
1.6.1 <i>NEŽELENI UČINKI</i>	16
1.6.2 <i>ODVISNOST IN TOLERANCA</i>	17
1.6.3 <i>ZLORABA IN ZASTRUPITVE Z BENZODIAZEPIN</i>	18
2. LABORATORIJSKA DIAGNOSTIKA BENZODIAZEPINOV.....	21
2.1 BIOLOŠKI MATERIALI.....	22
2.2 ANALITIKA BENZODIAZEPINOV.....	23
2.1.1 <i>IMUNOKEMIJSKE METODE</i>	23
2.1.2 <i>KROMATOGRAFSKE METODE</i>	26
3. NAMEN DELA	35
4. MATERIALI IN METODE.....	36
4.1 MATERIALI.....	36
4.1.1 <i>BIOLOŠKI MATERIAL</i>	36
4.1.2 <i>REAGENTI IN TOPILA</i>	36
4.1.3 <i>STANDARDNE RAZTOPINE</i>	36
4.1.4 <i>INTERNI STANDARD</i>	38
4.1.5 <i>PRIBORI IN APARATURE</i>	38
4.1.6 <i>ANALITSKI SISTEM LC/MS Varian</i>	39
4.2 METODE.....	39
4.2.1 <i>HPLC (LC)</i>	39
4.2.2 <i>MASNA SPEKTROMETRIJA (MS-MS)</i>	40
5. EKSPERIMENTALNO DELO.....	41
5.1 PRIPRAVA STANDARDNIH RAZTOPIN.....	41
5.2 PRIPRAVA ACETATNEGA PUFRA.....	41

5.3 VALIDACIJA METODE NA STANDARDNIH RAZTOPINAH.....	41
5.3.1 <i>SEGMENTNO SNEMANJE SPEKTROV</i>	42
5.3.2 <i>SELEKTIVNOST</i>	43
5.3.3 <i>LINEARNOST</i>	43
5.3.4 <i>TOČNOST</i>	43
5.3.5 <i>PONOVLJIVOST</i>	43
5.3.6 <i>MEJA ZAZNAVANJA (DETEKCIJE) IN</i> <i>MEJA KVANTIFIKACIJE</i>	43
5.4 PRIPRAVA URINSKIH STANDARDOV.....	43
5.4.1 <i>KISLA HIDROLIZA</i>	44
5.4.2 <i>EKSTRAKCIJA</i>	44
5.4.3 <i>ODPAREVANJE TOPILA</i>	44
5.5 LC/MS-MS ANALIZA URINSKIH STANDARDOV.....	44
5.5.1 <i>SELEKTIVNOST</i>	44
5.5.2 <i>LINEARNOST</i>	45
5.5.3 <i>IZKORISTEK EKSTRAKCIJE</i>	45
5.5.4 <i>PONOVLJIVOST EKSTRAKCIJE</i>	45
5.6 PRIPRAVA VZORCEV URINA PREISKOVANCEV.....	45
5.7 ANALIZA URINSKIH VZORCEV PREISKOVANCEV.....	45
6. REZULTATI	46
6.1 IZBIRA MAS POSAMEZNIH BENZOFENONOV.....	46
6.2 VALIDACIJA METODE NA STANDARDNIH RAZTOPINAH.....	47
6.2.1 <i>LINEARNOST</i>	48
6.2.2 <i>NATANČNOST (PONOV LJIVOST)</i>	48
6.2.3 <i>TOČNOST</i>	49
6.3 LC/MS-MS ANALIZA URINSKIH STANDARDOV.....	50
6.3.1 <i>SELEKTIVNOST</i>	50
6.3.2 <i>LINEARNOST</i>	51
6.3.3 <i>IZKORISTEK EKSTRAKCIJE</i>	52
6.3.4 <i>PONOVLJIVOST EKSTRAKCIJE</i>	53
6.3.5 <i>TOČNOST</i>	54
6.3.6 <i>MEJA DETEKCIJE IN MEJA KVANTIFIKACIJE</i>	55
6.4 LC/MS-MS ANALIZA URINSKIH VZORCEV PREISKOVANCEV.....	55
7. RAZPRAVA	57
8. SKLEPI	62

POVZETEK

Benzodiazepine uvrščamo v skupino psihofarmakov, učinkovin delujočih na živčni sistem. Zaradi medsebojnih raznolikosti v jakosti, razpolovni dobi in prisotnosti aktivnih metabolitov je spekter indikacij benzodiazepinov zelo širok. Z njimi zdravimo predvsem različne anksiozne motnje, učinkoviti pa so še kot antikonvulzivi, miorelaksanti, hipnotiki in sedativi. Kljub varnosti pri odmerjanju in malemu številu neželenih učinkov, njihovo neprestano jemanje dostikrat vodi v razvoj odvisnosti in tako v njihovo zlorabo. Zaradi pogostih primerov zastrupitev, ki so navadno posledica zlorabe benzodiazepinov v kombinaciji z drugimi psihoaktivnimi učinkovinami, ima velik pomen njihova analitika. Iz vidika zlorab je najprimernejši biološki vzorec za analizo urin, saj se z njim izločajo presnovki benzodiazepinov. Pri analitiki psihoaktivnih učinkovin lahko uporabimo LC/MS-MS metodo. Sklop separacijske (LC) in detekcijsko-analitske (MS) metode skupaj tvori občutljiv in specifičen analitični sistem.

V diplomski nalogi smo skušali optimizirati postopke priprave vzorcev benzofenonov iz urina, katere smo analizirali z validirano LC/MS-MS metodo.

Na začetku smo benzodiazepine iz vzorca hidrolizirali v prisotnosti kisline v ustrezne benzofenone. Pretvarjanje benzodiazepinov v skupen analit benzofenon omogoča določanje večjega števila različnih benzodiazepinov. Ker se lahko različni benzodiazepini iz urina pretvorijo v enak benzofenon, ta metoda ni primerna za dokazovanje prisotnosti posameznih benzodiazepinov. Hidrolizi je sledila ekstrakcija z etilacetatom, tej pa odparevanje topila. Na koloni LC dela analitskega sistema je potekla separacija analitov. Slednja je temeljila na principu gradientne elucije, pri kateri smo kot mobilno fazo uporabili acetonitril in acetatni pufer s pH 3,8. Posamezne spojine, ki so se na LC delu ločili, smo nato detektirali na detektorju MS dela.

Analiza urinskih vzorcev je najprej potekala po že pripravljeni metodi, pri kateri smo želeli izboljšati ponovljivost ekstrakcije (> 20 %) in izkoristek ekstrakcije (< 54 %). Kljub boljšemu izkoristku (> 56 %) ekstrakcija ni dala ponovljivih rezultatov (> 20 %). Zatem smo oba parametra ekstrakcije preverili še z uporabo modificirane metode. Pri tej smo razširili območje merjenja, skrajšali čas analize, izbrali bolj specifične fragmente in upoštevali odziv internega standarda. Tako optimizirano metodo smo delno validirali in ugotovili, da je selektivna in linearna za vse benzofenone med 5 in 500 µg/L. Kot pri

začetno uporabljeni metodi je tudi tukaj izkoristek ekstrakcije za večino benzofenonov dober (72-96 %), ponovljivost pa slaba (> 20 %). Slednjo močno zvečamo (< 15 %) z uporabo internega standarda (benzofenon klonazepama).

Nazadnje smo primernost modificirane metode preverili še na 14 vzorcih urina preiskovancev zdravljenjih z metadonom. Od 7 pozitivno določenih vzorcev smo največkrat ugotovili sočasno prisotnost benzofenona nordiazepama in benzofenona diazepama. Celokupna koncentracija benzofenonov se je nahajala med 13 in 375 µg/L. Meja kvantifikacije je za benzofenon nitrazepama pri 250 µg/L, za benzofenon nordiazepama pa pri 100 µg/L. Pri benzofenonu diazepama oziroma lorazepama je njena vrednost 25 µg/L, pri benzofenonu bromazepama pa 5 µg/L. Meja detekcije je za vse benzofenone pri 5 µg/L.

1. UVOD

1.1 KRONOLŠKI PREGLED UPORABE NEKATERIH HIPNOTIKOV IN ANKSIOLITIKOV

Zgodovinski pregled nam pokaže, da so bile tako kakor danes tudi v preteklosti psiho-fiziološke, nevrološke in anksiozne motnje zelo pogosto breme tedanje družbe. Te lahko s svojimi znaki in simptomi izredno vplivajo na normalno delovanje obolelega oziroma ga lahko popolnoma onemogočijo. V preteklosti so za blaženje različnih vrst psihopatoloških motenj uporabljali mnogo učinkovin (alkohol, opiat, bromidi itd.). Od leta 1903 do 1912 so zdravniki za preprečevanje zgoraj omenjenih motenj predpisovali barbiturate. Barbiturati so bili takrat najpogosteje predpisani hipnotiki. Danes imajo predvsem vlogo antikonvulzivov. Po letu 1957 jih je predvsem kot anksiolitik vse bolj nadomeščal meprobamat. Kot plod številnih raziskav na področju novih psihofarmakov so še istega leta prvič sintetizirali benzodiazepine (klordiazepoksid). Na evropsko tržišče je prišla ta učinkovina registrirana pod imenom Librium®. Temu se je leta 1963 pridružil diazepam pod zaščitenim imenom Valium®. Diazepam je za zdravljenje anksioznosti neprimerljivo boljši od meprobamata in barbituratov. Pri njegovi uporabi je namreč dosti manjša verjetnost pojava neželenih učinkov in razvoja odvisnosti. Do konca 70. let 20. stoletja so bili benzodiazepini najpogosteje predpisano zdravilo na svetu. V začetku 80. let 20. stoletja je postal buspiron pomembna alternativa benzodiazepinov. Buspiron ima kratko razpolovno dobo (2 do 3 h) in nima aktivnih metabolitov. Ker na gabanergični sistem ne vpliva, nima sedativnih učinkov na posameznika. V interakciji z alkoholom ni nevaren in ne povzroča razvoja tolerance ter odvisnosti kakor benzodiazepini. Njegova slabost je, da učinkuje šele po 2 do 4 tednih terapije za samo specifična stanja anksioznosti. Indiciramo ga pri dolgotrajnem zdravljenju anksioznih stanj z depresijo, ko se želimo izogniti sedativnim učinkom.

Danes se vse pogosteje uveljavljajo tako imenovana Z-zdravila. Gre za anksiolitike oziroma hipnotike, katerih struktura je drugačna od benzodiazepinske, je pirazolo-pirimidinskega tipa. V to skupino zdravil uvrščamo zaleplon, zolpidem in zopiklon. Po svojem delovanju ter afiniteti do razvoja tolerance in odvisnosti ne spominjajo na benzodiazepine. Za razliko od teh so Z-zdravila šibki miorelaksanti in antikonvulzivi. Ker

imajo kratek aktivacijski in razpolovni čas, je njihova uporaba iz vidika preodmerjanja in zlorabe vprašljiva. Verjetnost zastrupitve se močno poveča, če sočasno jemljemo druge sedativne učinkovine oziroma alkohol (1,2,3).

1.2 MEHANIZEM DELOVANJA BENZODIAZEPINOV

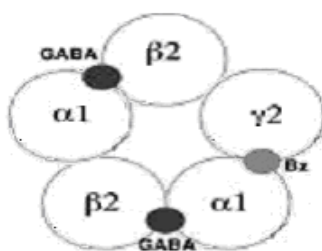
Vnos zdravil lahko povzroči niz različnih učinkov na posameznika. Benzodiazepini vplivajo na gabanergični nevrottransmitterski sistem, ki je del limbičnega sistema.

GABA (gama-aminomaslena kislina) je najpogosteje zastopan zaviralni prenašalec, ki se nahaja v osrednjem živčnem sistemu (preglednica I).

Preglednica I: Od nastanka do razgradnje GABA

NASTANEK \rightleftharpoons	FUNKCIJA \rightleftharpoons	SKLADIŠČENJE / RAZGRADNJA
Sinteza: iz glutamata Izvor: možgani	GABA se veže na svoj receptor, kar povzroči odprtje kanala, skozi katerega se poveča pretok kloridnih ionov v postsinaptično celico	Preko črpalke ponovnega privzema se vrne v presinaptični gabanergični nevron (po tem ima dve možnosti): → shranitev v mešičkih (čaka na ponovno izločanje) → inaktivacija (razgraditev z encimi)

V splošnem gabanergični receptorski sistem razdelimo na GABA-A, GABA-B in GABA-C receptorski sistem. Benzodiazepini delujejo na GABA-A receptorje, ki se nahajajo na kloridnem ionskem kanalu. Slednji je zgrajen iz petih krožno razporejenih proteinskih podenot (α , β in γ). V osrednjem živčnem sistemu človeka ionski kanal tvorijo 2α , 2β in 1γ podenote, ki se lahko pojavljajo v različnih izooblikah. Specifična vezavna mesta za benzodiazepine in GABA se nahajajo med posameznimi podenotami ionskega kanala (slika 1). Pogoji za vezavo benzodiazepinov je prisotnost α_1 , α_2 , α_3 oziroma α_5 podenote skupaj z β in γ podenoto v strukturi ionskih kloridnih kanalčkov.



Slika 1: Primer GABA-A receptorja s podenotami in vezavnim mestom za benzodiazepine

S svojo vezavo benzodiazepini alosterično spremene konformacijo vezavnega mesta za GABA ter tako povečajo afiniteto za njeno vezavo. Specifično vezavno mesto za GABA se nahaja na kloridnem ionskem kanalu med α in β podenoto ionskega kanala. Po vezavi GABA na specifično vezavno mesto pride do odprtja ionskega kanala. Zaradi povečanega pretoka kloridnih ionov v celico pride do hiperpolarizacije membrane. Sledi zaviranje prenosa živčnih impulzov, ki se odraža kot anksiolitičen, sedativen, miorelaksanten oziroma antikonvulziven učinek.

Jakost benzodiazepina je večinoma sorazmerna z njegovo afiniteto do vezave z različnimi izooblikami podenot GABA-A receptorja. Če imajo veliko afiniteto do vezave z α_1 podenoto, vplivajo na sedacijo. Če pa je večja afiniteta do vezave z α_2 oziroma α_3 podenoto, jih povezujemo z anksiolitičnim učinkom. Benzodiazepini nimajo afinitete do vezave z α_4 in α_6 podenoto GABA-A receptorja. Mehanizem delovanja večine anksiolitikov oziroma hipnotikov je dokaj podoben (preglednica II).

Preglednica II: Mehanizem in mesto vezave nekaterih anksiolitikov oz. hipnotikov

Anksiolitik/Hipnotik	Mesto vezave	Delovanje
<i>Barbiturati</i>	- ionski kloridni kanal	- zavrejo polisinaptični prenos v centralnem živčevju - povečajo GABA delovanje
<i>Benzodiazepini</i>	- benzodiazepinski receptor	- povečujejo afiniteto GABA-A receptorja za GABA
<i>Buspiron</i>	- receptor 5-HT _{1A} (serotoninski receptor)	- poveča delovanje benzodiazepinskega receptorja - blokada presinaptičnega receptorja
<i>Flumazenil</i>	- benzodiazepinski receptor	- zavre delovanje benzodiazepinov, zolpidema, itd.
<i>Imidazopiridini (zolpidem)</i>	- benzodiazepinski receptor (mali možgani)	- poveča afiniteto GABA-A receptorja za GABA

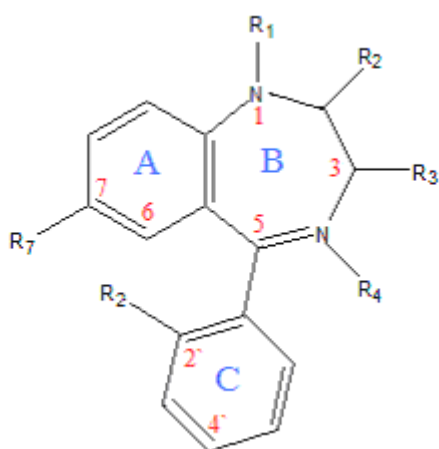
Glede na vezavo in mehanizem je benzodiazepinom najbolj podoben zolpidem. Zolpidem ima največjo afiniteto do vezave z α_1 podenoto. Nobene afinitete nima do vezave z α_4 in α_6

podenoto GABA-A receptorja (4, 5, 6).

Benzodiazepini povečajo vezavo GABA na GABA-A receptor. Tako benzodiazepine in njim podobno delujoče hipnotike oziroma anksiolitike imenujemo indirektni agonisti. Indirektni antagonisti delujejo obratno (flumazenil). Slednji s svojo vezavo na receptor GABA-A zmanjša vezavno sposobnost GABA (7).

1.3 KEMIJSKE LASTNOSTI BENZODIAZEPINOV

Osnovni benzodiazepinski skelet (slika 2) je sestavljen iz obroča A (benzenski obroč) in obroča B (diazepinski obroč). Slednji ima praviloma na 5. mestu fenilni obroč. V diazepinskem obroču se dušik ponavadi nahaja na 1. in 4. mestu (nordiazepam), redkeje pa na 1. in 5. mestu. Primer slednjega je klobazam. V primerjavi z 1,5-benzodiazepini imajo 1,4-benzodiazepini več sedativnega ter hipnotičnega učinka.



Slika 2: Skeletna formula osnovne strukture benzodiazepinov

Jakost delovanja benzodiazepina je odvisna od substituentov vezanih na osnovno benzodiazepinsko molekulo. Če se na 7. mestu benzenovega obroča nahajajo elektron akceptorske skupine (halogeni, CF_3 ali NO_2), se jakost delovanja benzodiazepina poveča (8).

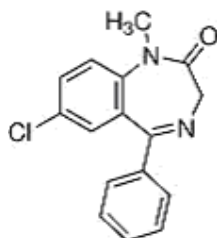
Elektronska gostota arilnega obroča (mesto 5) se poveča, če se na orto mestu nahaja elektronegativni halogen (F, Cl). S tem se poveča lipofilnost in možnost prehoda skozi krvno-možgansko pregrado. Tako je nastop učinka benzodiazepina hitrejši, a tudi izločanje iz telesa.

Na jakost učinkovanja benzodiazepinske molekule vpliva še vezava različnih substituentov na diazepinski obroč (preglednica III).

Preglednica III: Vpliv vezave funkcionalnih skupin in diazepinskega obroča na učinkovitost

Vezavno mesto	Pogosti substituenti (povečanje jakosti učinka)	Opombe
1	- CH ₃	- Substituent H zmanjša jakost delovanja
2		- Odstranitev –CO zmanjša hitrost učinkovanja
3		- Alkil zmanjša jakost učinkovanja (zakasnjeno) - OH omogoča povečano izločanje
4		-substituent (npr. alkil) zavira delovanje
5	- Fenil - α-piridil	- CONH ₂ , - COOH zavirata delovanje

Vezava alkilnega substituenta na mestu 1 diazepinskega obroča poveča afiniteto do vezave GABA-A receptorja. Primer je diazepam (slika 3). Slednji začne učinkovati hitreje od njegovega metabolita desmetildiazepama (nordiazepama), ki ima namesto metilne skupine vezan vodik. Prisotnost karbnilne skupine na mestu 2 diazepinskega obroča običajno ni nujna za učinkovanje benzodiazepina. Kljub temu lahko odstranitev karbnilne skupine vezane na diazepinskem obroču povzroči manjšo jakost delovanja benzodiazepinske molekule.

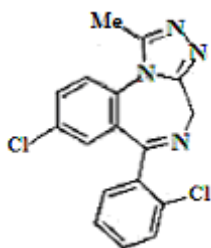


Slika 3: Struktura diazepama

Vpeljava alkilnega fragmenta na mesto 3 benzodiazepinske molekule (flunitrazepam) zmanjša jakost učinkovanja molekule (3-metilflunitrazepam). Hidroksilacija na mestu 3 ponavadi nima bistvenega vpliva na jakost učinkovanja benzodiazepinske molekule. Prisotnost različnih substituentov na istem C atomu (mesto 3) lahko ustvari kiralni center. Pri tem lahko dobimo stereoizomere različne jakosti učinkovanja. Tako ima pri 3-metilflunitrazepamu S(+)-izomer dvakrat večjo jakost učinkovanja od R(+)-izomera. Novejše študije na področju diazepinov temeljijo na dodatku oziroma zamenjavi fenilnih obročev z bolj ugodnimi strukturami. Namesto fenila je pri lorazepamu na mestu 5

halogeniran fenil (halogen je klor), pri bromazepamu 2-piridil. Posebnost v strukturi zadnjega je v njegovi dvojni vlogi, saj blaži anksioznost in hkrati stimulira psihomotoriko. Če v benzodiazepin namesto benzena vpeljemo tieno (klotiazepam), dobimo spojino večje jakosti delovanja. Jakost benzodiazepina se prav tako poveča, ko v osnovno benzodiazepinsko molekulo uvedemo imidazolo (midazolam) ali triazolo skupino (triazolam). Kombinacija teh skupin (tieno in triazolo skupina pri brotizolamu) z osnovnim diazepinskim obročem predstavlja derivate z večjo afiniteto vezave na benzodiazepinski receptor (8, 9).

Pri triazolobenzodiazepinu je jakost učinkovanja lahko odvisna od prisotnosti posameznih substituentov. Večja je, če se na mestu 1 triazolobenzodiazepina (triazolam) nahaja metilna skupina (na sliki 4 je triazolam). Nasprotno na jakost z vezavo na isto mesto vpliva propilna oziroma večja alkilna skupina (10).



Slika 4: Struktura triazolama

1.4 FARMAKOKINETIKA BENZODIAZEPINOV

Benzodiazepini so raznoliki glede na: način oziroma količino vnosa, topnost, afiniteto vezave z različnimi benzodiazepinskimi receptorji, področje uporabe. Zaradi tega jih lahko tudi razvrščamo na različne načine.

1.4.1 KLASIFIKACIJA BENZODIAZEPINOV

Najpogosteje uporabljena delitev je glede na njihovo farmakokinetiko, kjer jih razlikujemo po njihovem razpolovnem času. To je čas, ob katerem plazemska koncentracija zdravila pade na polovico svoje začetne vrednosti. Poznamo ultra kratko, kratko, srednje dolgo in dolgo delujoče benzodiazepine (preglednica IV).

Preglednica IV: Razdelitev benzodiazepinov glede na razpolovni čas (11, 12, 13)

Skupina	Razpolovni čas	Benzodiazepin	Aktivni metaboliti	Zaščiteno ime
Ultra kratko delujoči	1-4 h	<i>Midazolam</i>	Imidazo α -hidroksi derivat	Dormicum [®]
	1-6 h	<i>Triazolam</i>	Triazolo α -hidroksi derivat	Halicon [®]
Kratko delujoči	5–15 h	<i>Oksazepam</i>	Ne	Oksazepam [®] Praxiten [®]
	12-15h	<i>Alprazolam</i>	Ne	Xanax [®] Helex [®]
	12-18 h	<i>Lorazepam</i>	Ne	Loram [®]
	12-20 h	<i>Bromazepam</i>	Ne	Lexaurin [®]
Srednje dolgo delujoči	25 h	<i>Nitrazepam</i>	Ne	Cersan [®]
Dolgo delujoči	20-50 h	<i>Diazepam</i>	Nordiazepam (N-desmetildiazepam)	Apaurin [®] Diazepam [®]
		<i>Flurazepam</i>	Desmetilflurazepam	Fluzepam [®]
	20-80h	<i>Klonazepam</i>	Ne	Rivotril [®]

Zaradi hitrega metabolizma in izločanja iz telesa pri benzodiazepinih s kratkim razpolovnim časom, se uporabljajo na prvem mestu kot uspavala. Kljub številnim prednostim hitrega učinkovanja (ni zakasnelih učinkov), poznamo tudi negativne strani. Za dalj časa trajajoč učinek je potreben večkratni odmerek, ki mu po prekinitvi nemalokrat sledijo odtegnitvene reakcije. Pri srednje dolgo delujočih benzodiazepinih je presnova malo počasnejša, zato odmerek učinkuje nekoliko dlje kot pri kratko delujočih. Ker večina srednje dolgo delujočih benzodiazepinov nima aktivnih presnovkov, se zdravilo ne kopiči dolgo v organizmu. Kopičenje kot temelj delovanja izkoriščamo pri dolgo delujočih benzodiazepinih. Iz izvorne učinkovine z encimsko pretvorbo nastanejo aktivni metaboliti, ki se različno hitro izločajo iz telesa. Biološko aktivne snovi zaradi akumulacije kasneje zapustijo organe, zato lahko povzročijo daljši čas učinkovanja. Posledica tega je lahko podaljšana sedacija osrednjega živčnega sistema, kar se kaže v obliki neželenih učinkov (podpoglavje 1.6.1). Napram kratko delujočim je pri tej skupini benzodiazepinov koncentracija v plazmi konstantna. Njeno vrednost enakomerno zmanjšujemo s postopnim zmanjšanjem odmerka. S tem se izognemo nastopu odtegnitvenega sindroma ob zaključku

zdravljenja (11, 13).

1.4.2 VNOS, ABSORPCIJA, DISTRIBUCIJA

Vrsta vnosa in lipofilne oziroma hidrofilne lastnosti benzodiazepinov imajo največji vpliv na čas začetka in dolžino učinkovanja aktivnih učinkovin v telesu. V telo jih lahko vnesemo intravensko, intramuskularno, peroralno (zaužitje), sublingualno ali rektalno (v obliki svečke). Prednost peroralnega pred ostalimi načini je predvsem v praktičnosti (enostavno odmerjanje), cenovni ugodnosti in varni aplikaciji. Rektalen vnos je zlasti priporočljiv pri bolnikih s slabostjo, težavo pri požiranju oziroma okvaro želodčne sluznice (težava pri vsrkavanju) itd. Problem nepopolne in neenakomerne absorpcije se pojavi pri aplikaciji zdravila pod jezik (sublingualno), zato je ta redko uporabljena (11).

Zdravilo z intravenskim vnosom injiciramo direktno v kri oziroma krvni obtok, zato se hitro porazdeli po organizmu. Bolj ali manj podobno je pri intramuskularnem načinu vnašanja. Mišice so dobro prekrvavljene, zaradi tega se zdravilo večinoma hitro absorbira v krvni obtok. Počasnejša in nepopolna absorpcija se pojavi pri bolj lipofilnih benzodiazepinih, kot je na primer diazepam. Primarna indikacija tega 1,4-benzodiazepina so sicer anksiozne motnje, ima pa tudi status antiepileptika. Ker povzroča amnezijo in sedacijo osrednjega živčevja, se lahko uporablja kot predoperativni anestetik. Intravensko ali intramuskularno vnesemo v telo diazepam, ki je raztopljen v propilen glikolu. Zaradi lipofilnosti odmerjene raztopine je otežena absorpcija skozi stene žil ali mišičnega tkiva. Injekcije so boleče kasneje pa se lahko na mestih vnosa pojavijo še lokalna vnetja. Počasnejša absorpcija diazepam iz mišic povzroča zakasnen pojav farmakoloških učinkov. Nepredvidljivemu delovanju diazepam se lahko izognemo, če ga nadomestimo z midazolamom. Po svojem delovanju in osnovni strukturi spominja na 1,4-benzodiazepin. Midazolam je imidazolobenzodiazepin, čigar fizikalno-kemijske lastnosti so odvisne od pH okolja v katerem se nahaja. Če je pH manj od 4, se odpre eden od njegovih obročev. Zdravilo postane hidrofilno in neaktivno (ne učinkuje). Pri pH več kot 4 je midazolam lipofilen in se ne razgrajuje. Za anestezijo ponavadi injiciramo 25 % raztopino neaktivnega midazolama s pH 3,5. Hidrofilna raztopina se takoj absorbira v krvni obtok. V krvi (pH= 7,35-7,45) se ta imidazolobenzodiazepin spremeni v aktivno lipofilno učinkovino, ki brez težav vstopi v osrednje živčevje. Farmakološki učinek nastopi prej kot pri diazepamu.

Metaboliti midazolama se v perifernih tkivih ne akumulirajo, zato čas delovanja ni daljši od predvidenega. Zaradi naštetih lastnosti je intramuskularni oziroma intravenski vnos midazolama v mnogih primerih ustrežnejši od diazepama (14, 15).

Pri peroralnem vnosu poteka prebavna pot aktivnih učinkovin od ust preko želodca in tankega črevesa (absorpcija skozi steno prebavil) do jeter, kjer poteka njihovo presnavljanje. Zdravilo je absorbirano, ko po prehodu membran celic vstopijo v krvne kapilare. Delež absorbiranih benzodiazepinov prisotnih v plazmi je odvisen od njihove sposobnosti prehajanja skozi membrane celičnih tkiv. Ker so membrane celic prebavnega trakta iz fosfolipidnega dvosloja, lažje oziroma hitreje skozi njih potujejo najbolj lipofilni benzodiazepini. Na hitrost absorpcije lahko vplivajo tudi drugi dejavniki. Če benzodiazepine zaužijemo hkrati s hrano ali sredstvi za nevtralizacijo želodčne kisline (antacidi), upočasnimo njihovo absorpcijo.

Prebavi v zgornjem delu prebavnega trakta sledi prva encimska razgradnja benzodiazepinov, ki poteka v jetrih (podpoglavje 1.4.3). Nato preidejo v sistemski krvni obtok, s pomočjo katerega se vezani na plazemske proteine porazdelijo po celem organizmu. Porazdelitev benzodiazepinov lahko razdelimo na dve stopnji. Prva poteka od osrednjega živčevja do perifernih tkiv (skeletne mišice, prvi prehod jeter). Na porazdelitev aktivnih učinkovin vpliva zlasti njihova afiniteta do krvi oziroma tkiva. V drugi stopnji se benzodiazepin biotransformira (jetra), prefiltrira skozi glomerule ledvic in na koncu izloči z urinom (11, 16, 17).

Pri zdravljenju z anksiolitiki ali hipnotiki težimo k vplivu na osrednji živčni sistem, zato lahko te učinkujejo šele po prehodu krvno-možganske pregrade. Slednja je iz endotelijskih celic možganskih kapilar, ki so tesno povezane z mrežastim spletom transmembranskih proteinov. Za razliko od celičnih membran ostalih tkiv je krvno-možganska pregrada neprepustna za večino molekul. Tesna mrežna povezava teh proteinov uspešno ovira prosto difuzijo v krvi raztopljenih polarnih snovi v notranjost. Izjema so majhne, lipofilne molekule oziroma molekule, ki v možgane vstopajo z aktivnim transportnim mehanizmom. Benzodiazepini skozi krvno-možgansko pregrado prehajajo z različno hitrostjo. Slednja je predvsem odvisna od njihovih fizikalno-kemijskih lastnosti. Od teh so najpomembnejše lipofilnost, vezanost na plazemske proteine (delež) in ionizacijska konstanta. Benzodiazepini prisotni v krvi lahko skozi krvno-možgansko pregrado prehajajo samo v

prosti obliki (nevezani na proteine). Najbolj lipofilni benzodiazepini najhitreje vstopijo v osrednji živčni sistem in se tam specifično vežejo. Poveča se afiniteta za vezavo GABA na njen receptor s tem pa tudi njena aktivnost pri odpiranju kloridnih ionskih kanalov. Membrana se hiperpolarizira, zaradi česar se zmanjša prenos živčnih impulzov. Nastanejo učinki, ki so ponavadi značilni za delovanje benzodiazepinov (11, 16, 17).

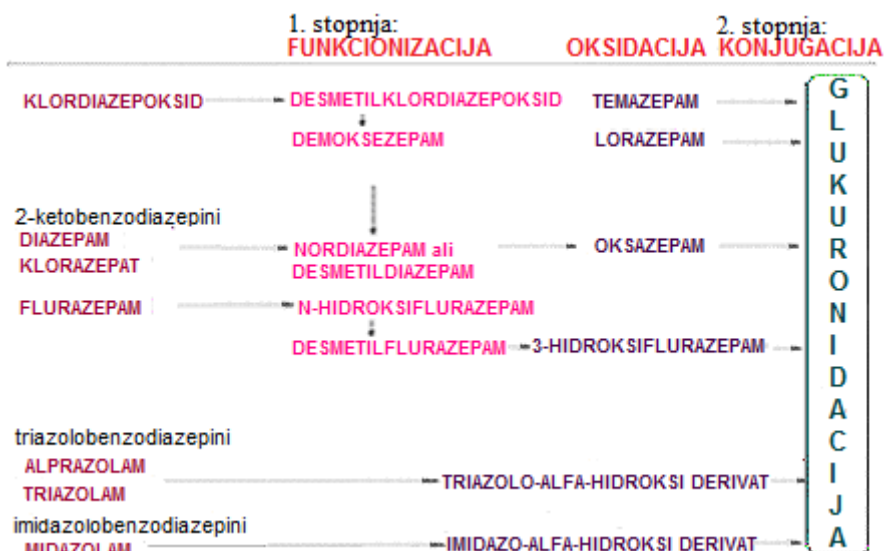
1.4.3 METABOLIZEM IN IZLOČANJE

Jetra, ki so največja žleza telesa, so osrednji organ prebave. Ležijo v trebušni votlini. Zaradi številnih funkcij, ki jih opravljajo, sodelujejo pri mnogo življenjsko pomembnih procesih. Mednje štejemo: proizvodnja žolča in vitaminov (A in K), oskrba telesnih celic s hranilnimi snovmi, sproščanje energije iz presnove (zagotavljanje telesne toplote), skladiščenje (aminokislin, glikogena, maščob, vitaminov, železovih ionov) in razstrupljanje snovi. Poleg vsega naštetega so mesto nastanka (pred rojstvom) oziroma propada (po rojstvu) rdečih krvničk (18).

Pri metabolizmu benzodiazepinov obravnavamo jetra v vlogi biotransformatorja. Metabolizem benzodiazepinov lahko razdelimo na dve stopnji, kjer potekajo številne kemijske reakcije. Prvo stopnjo katalizirajo encimi iz superdružine citokromov P450 (CYP450), ki se nahajajo pretežno v jetrih.

Potek in hitrost metabolizma sta navadno odvisna od vrste benzodiazepinov.

V prvi stopnji se najprej spremeni ali odstrani substituent na mestu 1 ali 2 diazepinskega obroča. Pri tem se osnovna učinkovina pretvori v biološko aktiven metabolit (iz diazepama nastane nordiazepam) (slika 5 prikazuje metabolizem, ki ga pri benzodiazepinih največkrat srečamo). Sledi hidroksilacija na mestu 3 diazepinskega obroča. Dobimo aktivne metabolite (iz nordiazepama nastane oksazepam), ki se nato pretvarjajo zelo počasi (imajo dolgo razpolovno dobo). V drugi stopnji ali glukuronidaciji se tvorijo farmakološko neaktivni konjugati. Nastali hidrofilni presnovki se kmalu izločijo iz organizma.



Slika 5: Shematski prikaz metabolizma pri nekaterih vrstah benzodiazepinov

Na zgoraj opisan način se metabolizirajo 2-ketobenzodiazepini (diazepam, flurazepam). Na mestu 1 diazepinovega obroča flurazepama se odstrani substituent. Nastane aktiven metabolit, ki se počasi biotransformira v 3-hidroksiflurazepam. Ta vstopi v zadnjo stopnjo pretvorbe (konjugacijo). Pri 3-hidroksibenzodiazepinih (oksaepam, lorazepam, temazepam) je drugače. Metabolna pot je enostopenjska (konjugacija). Hiter metabolizem srečamo tudi pri triazolobenzodiazepinih (alprazolam, triazolam) in imidazolobenzodiazepinih (midazolam). Biotransformirajo se s hidroksilacijo metilne skupine triazolovega oziroma imidazolovega obroča. Nastanejo triazolo oziroma imidazolo α -hidroksi derivati, ki se izločijo iz telesa v konjugirani ali nekonjugirani obliki. Pri nitrobenzodiazepinih (nitrazepam) najprej poteče redukcija nitro skupine, ki se pretvori v amino skupino. Ko se slednja acetilira, dobimo neaktiven presnovek z acetamidno skupino. Konjugirani presnovki benzodiazepinov se iz telesa odstranjujejo v urinu (11, 13).

1.5 UPORABA BENZODIAZEPINOV

Leta 1963 se je na tržišču pojavil diazepam (benzodiazepin), registriran kot Valium®. Zaradi hitrega učinkovanja in varnega odmerjanja je njegova uporaba strmo narasla že v samem začetku. Danes diazepam, alprozolam, klonazepam in lorazepam spadajo med 10 najpogosteje predpisanih zdravil razvitega sveta. Redno uživanje benzodiazepinov mnogokrat vodi v razvoj odvisnosti in odtegnitvenih reakcij. Posledično terapije izvajamo pod strogim zdravniškim nadzorom. Pred začetkom terapije z benzodiazepini je potrebno

izključiti morebitne dejavnike, ki bi lahko vplivali na genezo znakov motenj. Primarna indikacija benzodiazepinov so nekatere oblike anksioznih stanj (anksiozne in panične motnje). Zelo so uspešni pri zdravljenju fobij in nespečnosti. Ostale indikacije so: epilepsija, mišični krči, blažnje odtegnitvenih reakcij pri zdravljenju od alkohola, mile oblike depresij (redko), prilagoditvene motnje, obsesivno-kompulzivne motnje, uvod v splošno anestezijo itd. Razpolovna doba in aktivnost metabolitov sta specifični lastnosti, ki najbolj vplivata na indikacijo posameznih benzodiazepinov (19, 20).

Preglednica V prikazuje dostikrat rabljene vrste benzodiazepinov in njihove najpogostejše indikacije.

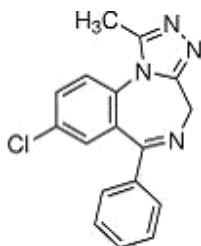
Preglednica V: Najpogostejše indikacije benzodiazepinov (5, 19, 20)

Benzodiazepin	Najpogostejša indikacija
<i>Alprazolam</i>	Anksiozne motnje (napadi panike), socialne fobije
<i>Bromazepam</i>	Anksiozne motnje, napadi panike, abstinenčni simptomi pri odvajanju od alkohola ali opioidov
<i>Klonazepam</i>	Epilepsija, obsesivno-kompulzivne motnje, socialne fobije, abstinenčni simptomi pri odvajanju od alkohola
<i>Lorazepam</i>	Nespečnost (povezana z anksioznostjo), napadi panike
<i>Diazepam</i>	Mišični krči, indukcija anestezije, nespečnost (povezana z anksioznostjo), epilepsija
<i>Flurazepam</i>	Nespečnost (prezgodnje jutranje bujenje)
<i>Nitrazepam</i>	Nespečnost (prezgodnje jutranje bujenje)
<i>Midazolam</i>	Nespečnost (težave pri uvodu v spanec), indukcija anestezije
<i>Oksazepam</i>	Nespečnost (nočno prebujanje povezano z anksioznostjo), splošne anksiozne motnje

Motnje nespečnosti danes zdravimo s sodobnimi nebenzodiazepinskimi hipnotiki, ki imajo v primerjavi z benzodiazepini manjšo afiniteto do razvoja tolerance in odvisnosti. Če pa se le odločimo za benzodiazepine, izberemo take s kratkim razpolovnim časom. Primer za to je midazolam, ki začne učinkovati kmalu po vnosu v organizem. Uporabljamo ga pri nespečnih pacientih, ki imajo težave z uvodom v spanec. Za ohranitev spanca preko cele noči je ustrenejši hipnotik z daljšo razpolovno dobo. V ta namen odmerimo flurazepam, ki tekom svojega metabolizma tvori aktivne presnovke. Ker se ti kopičijo v organizmu, je učinkovanje nekoliko zapoznelo. Največkrat pride do podaljšane sedacije, ki je pri pacientu prisotna tudi v naslednjem jutru. Dolgo delujoč hipnotik lahko nadomestimo z anksiolitikom oksazepamom. Oksazepam se v eni stopnji biotransformira v neaktivno hidrofilno učinkovino, ki se izloči iz telesa. Zaradi hitrega metabolizma in odsotnosti

aktivnih metabolitov je zlasti primeren za zdravljenje nespečnih anksioznih bolnikov z okvarjenim delovanjem jeter. Ker ne povzroča omedlevice, ga najbolj priporočamo pri zdravljenju starostnikov. Pri slednjih namreč omedlevica in posledičen padec krepko povečata možnost zloma kosti (kolkov). Zelo soroden oksazepamu je kratkodelujoč anksiolitik lorazepam, ki se aktivira kmalu po vnosu v organizem. Ker povzroča sedacijo osrednjega živčnega sistema, lahko z njim zdravimo nekatere vrste nespečnosti. Pogostokrat ga srečamo tudi v urgentni medicini, kjer uspešno blaži hude oblike odtegnitvenih simptomov zdravljenih alkoholikov (5, 19, 20).

V Sloveniji je zaradi učinkovitosti pri anksioznih motnjah najpogostejši benzodiazepin alprazolam (3). Prednost tega kratko delujočega benzodiazepina je v njegovi hitri aktivaciji in eliminaciji iz telesa. Za razliko od anksiolitika lorazepama alprazolam nima bistvenega vpliva na sedacijo osrednjega živčevja. Na posameznika učinkuje izrazito antidepresivno. Najdemo ga pod lastniškim imenom Helex[®] ali Xanax[®] (slika 6).



Slika 6a: Struktura alprazolama Slika 6b: Xanax[®] 1 mg tablete (Pfizer)

Od dolgo delujočih benzodiazepinskih anksiolitikov se v zelo veliki meri uporablja diazepam. Z njim zdravimo anksiozne motnje in epilepsijo, ima pa tudi vlogo anestetika. Zelo učinkovito lajša simptome, ki spremljajo abstinenčne krize zdravljenih alkoholikov. Podobne indikacije ima klonazepam. Odmerjamo ga pri začetnem odpravljanju odtegnitvenih reakcij zdravljenih alkoholikov. Zaradi težavnega odmerjanja klonazepam danes vse bolj nadomeščamo z novejšimi dalj časa delujočimi sedativi.

Dolžina zdravljenja je odvisna od pacienta samega in od narave (vrste in intenzivnosti) njegove motnje. Odmerjanje je najstrožje definirano in kontrolirano pri rizičnih skupinah, ki se na zdravila odzivajo drugače kot večina obolelih. Bolniki s povečanim tveganjem so: otroci, starostniki in drugi. Med zadnje štejemo (19, 20, 21):

- bolnike, ki prejemajo še drugo terapijo (možnost interakcij med zdravili)
- bolnike z oslabljenim ali okvarjenim delovanjem organov (predvsem prebavil)
- bolnike, ki so odvisni od psihoaktivnih substanc ali alkohola (medsebojno delovanje)

1.6 NEŽELENI UČINKI, ZASTRUPITVE IN ZLORABA BENZODIAZEPINOV

Zdravljenje z benzodiazepini je zaradi številnih ugodnih učinkov zelo razširjeno. Ko določamo optimalno terapevtsko koncentracijo, je začetno postavljen odmerek majhen. Sčasoma njegovo koncentracijo višamo, dokler ne najdemo ustreznega odziva. Iskanje koncentracije z optimalnim učinkom je pri benzodiazepinih manj tvegano. Za to je zaslužen visok terapevtski indeks oziroma široko terapevtsko okno. Ta predstavlja razliko med minimalno terapevtsko in minimalno toksično koncentracijo. Ker je pri benzodiazepinih razlika velika, je verjetnost zastrupitve manjša. Dokaj redek razvoj neželenih učinkov, tolerance in odvisnosti jim dajejo dodatno prednost pred večino anksiolitikov in hipnotikov.

1.6.1 NEŽELENI UČINKI

Neželene učinke v večji meri povzročajo benzodiazepini z daljšim razpolovnim časom in aktivnimi metaboliti. Daljše kopičenje v telesu povzroča sedacijo osrednjega živčnega sistema. Slednje lahko opazimo kot anterogradno amnezijo, depresijo, mišično oslabelost, zaspanost, utrujenost, motnje koncentracije, koordinacije in psihomotorike.

Anterogradno amnezijo, ki spremlja hipnotično-sedativne učinke benzodiazepinov lahko izkoriščamo v predoperativne namene, endoskopiji in na drugih področjih medicine. Značilna je predvsem za intravenozni vnos diazepama. Redkeje se pojavi pri intramuskularnem oziroma najmanj pri peroralnem načinu vnašanja benzodiazepinov v organizem. Pri teh vrstah vnosa se lahko pojavi pri bromazepamu, diazepamu, flunitrazepamu, lorazepamu, midazolamu in drugih. Če želimo blažje pomirjevalno oziroma uspavalno sredstvo, se tako uporabi slednjih raje izognemo (19, 20, 22).

Benzodiazepini v kombinaciji s psihoaktivnimi učinkovinami oziroma alkoholom reagirajo paradoksnostno in stimulirajo osrednji živčni sistem. Ponavadi to spremljajo: asocialno vedenje, blodenje, vznemirjenost, bojazen, motnje spomina, razdražljivost, tresenje, večja napetost mišic. Pojav simptomov in njihova izrazitost sta različna glede na vrsto

benzodiazepinov. Najbolj burno reagira alkohol v kombinaciji s kratko delujočimi benzodiazepini velike jakosti (triazolam, alprazolam). Nihanje plazemske koncentracije pri teh je največje oziroma najhitrejše, zato so simptomi najizrazitejši. Intenzivnost reakcij se stopnjuje pri odmerkih večjih koncentracij. Pri alkoholikih zdravljenih z benzodiazepini se paradokсне reakcije lahko kažejo v obliki nasilnih izbruhov (19, 23).

Posebno pozornost moramo nameniti neželenim učinkom pri starostnikih, nosečnicah in doječih materah. Pri nosečnicah učinkovina potuje po popkovnici do posteljice. Benzodiazepini so zlasti nevarni v prvem tromesečju nosečnosti, ko z njihovim vnosom ogrožamo normalno rast in oblikovanje organov ploda. Prirojene hibe, ki se lahko razvijejo, so: razcepljeno nebo oziroma ustnica, anomalije možganov (lahko duševna zaostalost). Pri novorojenčku se lahko prav tako pojavi abstinenčni sindrom. Ker aktivna učinkovina prehaja tudi v materino mleko, je dojenje v obdobju terapije prepovedano. Z dojenjem namreč preide benzodiazepin v organizem dojenčka, ki postane od njega odvisen. Prekinitev dojenja pogostokrat povzroči pojav odtegnitvenega sindroma dojenčkov. Izpostavljenost benzodiazepinom pri dojenčkih se kaže kot: sedacija, motnje pri hranjenju ter ne pridobivanje na telesni teži (24). Pri starejših bolnikih zdravljenih z benzodiazepini je pojav neželenih učinkov pogostejši kot pri ostalih populacijah. Starostniki neredko prejemajo še druga zdravila, ki pa lahko ob navzočnosti benzodiazepinov različno učinkujejo na organizem. Največkrat se okrepijo neželene reakcije, kot so zbeganost, sedacija in motnje spomina. Ob uporabi dolgo delujočih benzodiazepinov se močno zmanjšajo kognitivne funkcije. Lahko pride do padcev in s tem zlomov kosti, pri dolgotrajnem zdravljenju z benzodiazepini sta pogosta depresija in čustvena otopelost (25).

1.6.2 ODVISNOST IN TOLERANCA

Odvisnost od benzodiazepinov lahko nastopi z njihovim konstantnim vnašanjem v telo. Duševno odvisnost povzročajo anksiolitiki in hipnotiki, ki z zaviralnim delovanjem možganov blažijo ali odstranijo vznemirjenost in tesnobo odvisnika. Poleg tega ga navdajo s pretiranim občutkom sreče. Telesna ali fiziološka odvisnost se pojavi, ko se organizem privadi na redno prisotnost benzodiazepina. Jakost, razpolovna doba zdravila s presnovki in dolžina uporabe določajo čas nastanka odvisnosti. Odvisnost se hitreje razvije pri kratko delujočih benzodiazepinih velike jakosti (alprazolam) kot pri dolgo delujočih (diazepam).

Verjetnost njenega nastanka je prav tako večja pri odvisnikih od ostalih psihoaktivnih substanc, kroničnih nespečih oziroma psihičnih bolnikih. Posledica razvoja odvisnosti je odtegnitvena kriza, ki je po simptomih podobna abstinenčni krizi alkoholikov. Reakcije odtegnitve se lahko začnejo med daljšim zdravljenjem ali po njem. Benzodiazepini so koristni pri alkoholni detoksifikaciji, vendar lahko sami po sebi v nizkih koncentracijah okrepijo željo alkoholu. Ob ukinjanju terapije je zato najboljša preventiva postopno zmanjševanje odmerka. Jakost odtegnitvenih reakcij je najintenzivnejša pri učinkovinah s kratkim razpolovnim časom. Pri normalnih vrednostih koncentracij se lahko pojavijo naslednji simptomi: tesnoba, tresenje, razdražljivost, glavobol, slabost, potenje, nespečnost, motnje pozornosti in pospešeno bitje srca. Ostale simptome srečamo pri pacientih, ki daljše obdobje prejemajo visoke odmerke. Nekateri od teh simptomov so: delirij, depersonalizacija, motnje zaznav in paranoja (19, 21, 22).

1.6.3 ZLORABA IN ZASTRUPITVE Z BENZODIAZEPINI

Z nepravilnim odmerjanjem oziroma zlorabo zdravil lahko pride do zastrupitev. Po podatkih iz Registra zastrupitev RS je bilo od leta 2001 do 2005 zastrupljenih 1838 oseb, ki so bile starejše od 16 let. V 67,1 % teh zastrupitev so bila vzrok zdravila. Največkrat so bila zlorabljena zdravila iz skupine zdravil (ATC klasifikacija), ki delujejo na živčevje. Od teh je bil najpogostejši alprazolam. Slednjemu so po pogostosti sledili še diazepam, zolpidem ter četrti bromazepam (26).

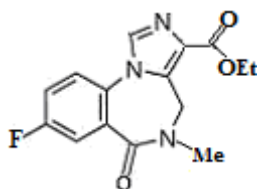
Zlorabe benzodiazepinov so zaradi varne in kontrolirane uporabe dokaj redke. Razdelimo jih lahko na nenamerne in namerne zlorabe. Slednje omenjamo zlasti v povezavi s posamezniki odvisnimi od psihoaktivnih substanc. Odvisniki jih začnejo namerno jemati zaradi nastalega občutka blaženosti. Velikokrat jih srečamo pri odvajanju od heroina. Heroinski odvisniki jih uživajo lahko iz različnih razlogov. Indikacija kot del vodenega metadonskega programa omili nekatere spremljajoče abstinenčne simptome. V tem primeru jih uporabimo predvsem proti nespečnosti, oslabelosti in duševnim motnjam (anksioznost, depresije). Kljub temu da ima metadon daljši razpolovni čas kot benzodiazepini, se količinska poraba slednjih tekom zdravljenja močno poveča. O namerni zlorabi ponavadi govorimo, ko gre za samovoljno jemanje benzodiazepinov. Namen je načrtno podaljšanje blaženja abstinenčnih simptomov oziroma stopnjevanje euforije. Sočasno odmerjanje opioidov in benzodiazepinov poveča sedacijo in zmanjša kognitivne

funkcije.

Odvisnost od psihoaktivnih učinkovin zdravimo individualno. Na izbor benzodiazepinov, ki jih pri tem uporabimo, vpliva njihova jakost, čas aktivacije, čas izločanja in razvoj odvisnosti. Najpogostejši so kratko delujoči benzodiazepini, kot sta lorazepam in alprazolam. Od dolgo delujočih pretežno prevladuje diazepam (20).

Danes se vse pogosteje srečujemo z namerno zlorabo flunitrazepama (Rohypnol[®]). Slednji je benzodiazepin, ki ga na območju Evrope predpisujejo pri prehodni nespečnosti ali kot predanestetično sredstvo. Ker pri človeku povzroči omotičnost, zmedenost in anterogradno amnezijo, ga pogosto izrabljajo posiljevalci. V primeru suma na posilstvo z zlorabo flunitrazepama moramo njegovo navzočnost potrditi v najkrajšem možnem času. S pomočjo plinske kromatografije v sklopu s tandemsko masno spektrometrijo (GC/MS-MS) oziroma tekočinske kromatografije povezane z masno spektrometrijo (LC/MS) iščemo tudi metabolita desmetilflunitrazepam in 7-aminoflunitrazepam (27).

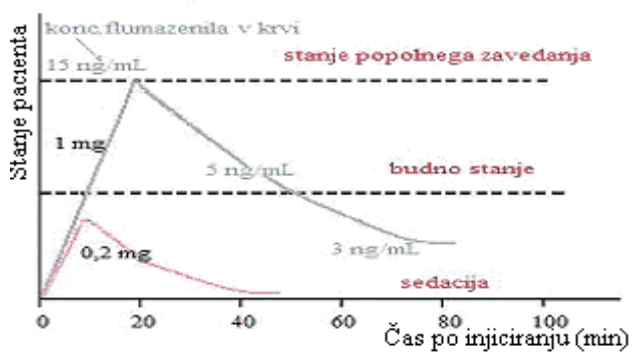
Do nenamernega zlorabljanja benzodiazepinov pride pri bolnikih, ki ne upoštevajo indicirane koncentracije zdravila ali poteka zdravljenja. Zaradi razvoja tolerance na predpisano zdravilo tekom zdravljenja lahko pride do prevelikega odmerjanja. Namerno in nenamerno zlorabljanje se lahko konča z zastrupitvijo. Blago zastrupitev prepoznamo po motnjah koordinacije gibov in govora, motnje zavesti, težave z dihanjem. Pri hujših zastrupitvah pride do zastoja dihanja, kome ali celo smrti. V tem primeru je nujna intubacija in umetno vzdrževanje življenjskih funkcij. Zastrupitev z benzodiazepini zdravimo z metodami, s katerimi postopoma zmanjšamo njihovo prihodnjo absorpcijo. Običajno najprej izpiramo želodec, uporabimo aktivno oglje oziroma laksativ ter injiciramo antidot (28). Posledice delovanja benzodiazepinov, kot sta sedacija osrednjega živčevja in motnje v psihomotoriki, prekinimo s flumazenilom (slika 7).



Slika 7: Struktura flumazenila

Flumazenil (Anexate[®]) je specifični antagonist benzodiazepinov, ki se veže na vezavna mesta za benzodiazepine na GABA receptorju. Prednost tega antidota je v njegovi hitri aktivaciji. V telo ga ponavadi vnesemo intravenozno. Pri 0,2 mg flumazenila dosežemo maksimalno terapevtsko koncentracijo že po 10 min. Omenjen odmerek pogostokrat najprej injiciramo na vsake 15 s, nato pa na vsake 60 s. Ko plazemska koncentracija flumazenila doseže vrednosti med 10-30 ng/mL, pride do reverzibilnega delovanja na sedacijo osrednjega živčnega sistema. V roku 1 h zavre delovanje benzodiazepinov in njihove posledice. Slednje so zlasti pri hudih zastrupitvah lahko prisotne dalj časa od učinkovanja flumazenila. Ponoven pojav sedacije preprečimo z zaporednimi odmerki nizkih koncentracij, ki jih običajno injiciramo na 1 h.

Slika 8 prikazuje vpliv 0,2 mg oziroma 1 mg odmerjenega flumazenila na koncentracijo predhodno vnesenega midazolama oziroma na stanje pacienta.



Slika 8: Vpliv flumazenila na koncentracijo midazolama in stanje pacienta

Neželeni učinki, ki jih lahko opazimo v prvih dneh po injiciranju, so: glavobol, povečano znojenje, bruhanje, omotica in zamegljen vid. Flumazenil ne vpliva na delovanje drugih GABA agonistov (barbituratov, etanola, splošnih anestetikov) in narkotikov. Zaradi odtegnitvenih reakcij se njegove rabe izogibamo tudi pri bolnikih z epilepsijo in uporabnikih tricikličnih antidepresivov (29, 30).

Alternativna načina vnosa flumazenila sta lahko peroralni in intranazalni. Ker se ga samo 16 % absorbira vsrka v kri, je tak način odmerjanja pri zastrupitvah z benzodiazepini redko uporabljen. Podobno je pri vnosu skozi nosnici (intranazalno). Absorpcija flumazenila je tudi na tem vstopnem mestu nepopolna (50 %), zato moramo v obe nosnici nameriti popolnoma enak odmerek flumazenila. Tak način vnosa uporabimo le, ko je onemogočeno intravenozno odmerjanje (30).

2. LABORATORIJSKA DIAGNOSTIKA BENZODIAZEPINOV

Merjenje koncentracije benzodiazepinov v bioloških materialih se uporablja za opazovanje uspešnosti terapije ali pa je del toksikoloških preiskav.

Cilj vseh terapij je optimalno učinkovito zdravljenje, pri katerem ne pride do nastanka neželenih učinkov oziroma zastrupitve. Odziv bolnika na terapijo z zdravili je v veliki meri odvisen od narave (lastnosti) zdravila. Raven slednjega lahko spremljamo, če poznamo širino njegovega terapevtskega okna. To je razmerje med minimalno učinkovito in minimalno toksično koncentracijo. Širše je terapevtsko okno oziroma območje, bolj varno je zdravilo. Ker je terapevtsko območje benzodiazepinov široko, malo večji odmerek od predpisanega ponavadi ne povzroči zastrupitve. Poleg narave zdravila na potek in rezultat zdravljenja vpliva mnogo dejavnikov. Najpomembnejše so starost, zdravstveno stanje in genetska zasnova preiskovanca. Vsak posameznik zdravilo različno hitro absorbira, metabolizira, shranjuje in izloča. Na delovanje zdravila pri zdravljenju lahko vplivajo tudi ostale aktivne učinkovine, ki so sočasno prisotne v organizmu. Med njimi lahko pride do interakcij. Posledica tega je sprememba v osnovnem delovanju aktivne učinkovine, ki je lahko toksično.

V 70. letih 20. stoletja se je pričelo uveljavljati terapevtsko spremljanje koncentracij zdravil (Therapeutic Drug Monitoring-TDM). S TDM intervalno spremljamo koncentracijo specifičnih zdravil v krvi preiskovanca. Na začetku zdravljenja s TDM ugotovimo odmerek, ki bi zagotovil optimalne rezultate zdravljenja brez toksičnih učinkov. To naredimo tako, da preiskovancu v kratkem časovnem obdobju odmerimo aktivno učinkovino različnih koncentracij. Pri izbiri slednjih upoštevamo prej omenjene raznolikosti v lastnostih posameznika in zdravila. Po vsakem odmerku spremljamo raven njegove koncentracije v krvi organizma. Če je odmerjena koncentracija previsoka, za naslednji odmerek uporabimo nižjo. Ko enkrat najdemo ustrezen terapevtski odmerek, skušamo njegovo koncentracijo v krvi tekom zdravljenja ohranjati konstantno. Odmerek redno prilagajamo spremembam v organizmu posameznika vse do zaključka zdravljenja.

S TDM spremljamo koncentracijo aktivne učinkovine pri zdravljenju: z ozkim terapevtskim oknom, za zdravljenje dolgotrajnih (kroničnih) ali do življenjskih bolezni. Pri teh ob neustreznem odmerjanju obstaja večja možnost za nastanek nezaželenih ali toksičnih

učinkov.

Vrsta biološkega materiala, ki ga analiziramo, zavisi od namena analize, tipa in časa odmerjenih zdravil, splošnega stanja preiskovanca. Pri tem danes uporabljamo različne toksikološke metode in tehnike (31).

2.1 BIOLOŠKI MATERIALI

Odvzeti želimo čim manjši volumen vzorca, ki je potreben za izbrano metodo. Za analizo lahko vzorčimo urin, kri, lase ali slino. Pri izbiranju je najodločilnejši faktor namen preiskave (preglednica VI). Tesno je povezan z razpolovno dobo zdravila in posledično s časom zadrževanja presnovkov v posameznem biološkem materialu. Čim dlje se zadržuje v telesu, več časa ga lahko detektiramo.

Preglednica VI: Izbira biološkega materiala glede na namen preiskave (32, 33)

Biološki material	Čas zadrževanja	Najprimernejši namen preiskave
Slina	Krajši	Pregled nekaj preteklih dni (na delovnem mestu, ob nezgodah)
Kri	Dokaj kratek	Pogled na določen trenutek (ob kriminalnem dejanju)
Urin	Dokaj dolg	Detekcija ob rednem, nerednem ali enkratnem odmerjanju
Lasje	Daljši	Spremljanje navad, vpogled v neko obdobje

Najpogostejši vir informacij o stanju telesa sta v laboratorijski praksi urin in kri. Z analizo krvi dobimo podatke o vplivu psiho-aktivnih snovi na preučevano stanje. Ponavadi so primeri preučevanja nedavne kršitve zakona in prometne nezgode (32). V urinu so koncentracije benzodiazepinov oziroma benzofenonov višje kot v krvi. Kljub temu pa nam rezultati iz urina ne pomagajo pri ovrednotenju niti količine niti časa (trenutka) vnosa. Podatki iz urinskega vzorca nas seznanijo o navzočnosti v telesu pri rednem, nerednem ali celo enkratnem (v zadnjem času) odmerjanju benzodiazepinov. Detekcijska doba benzodiazepinov v slini je krajša (do 3 dni po vnosu), zato dobljeni rezultati niso zanesljivi. Njeno nasprotje so lasje, ki nam dajo boljši vpogled v navade uživalca. Čim večjo dolžino pramena odrežemo (od korena navzdol proti konicam), tem daljše obdobje lahko spremljamo. Metode detekcije metabolitov benzodiazepinov v lasih so zanesljive, a dražje. S tem namenom raje vzorčimo urin (33).

2.2 ANALITIKA BENZODIAZEPINOV

Laboratorijsko diagnostiko benzodiazepinov v splošni klinični in forenzični praksi lahko razčlenimo na dve stopnji. V prvi stopnji z imunokemijskimi metodami preverjamo prisotnost benzodiazepinov oziroma njihovih presnovkov. Zaradi možnosti pojava lažno pozitivnih in lažno negativnih rezultatov ponavadi izvedemo drugo stopnjo. V slednji s kromatografskimi metodami dodatno potrdimo ali ovržemo prvoten rezultat. Uporabljeno metodo izberemo glede na vrsto preiskovanega zdravila, opremo in izkušnost osebja. S tem zagotavljamo večjo zanesljivost oziroma zmanjšamo število napak, ki lahko nastanejo med obdelavo vzorca (34).

2.2.1 IMUNOKEMIJSKE METODE

V drugi polovici 20. stoletja se razvijejo imunokemijske metode, ki se uporabljajo za določanje benzodiazepinov v urinu.

Vsi imunokemijski testi temeljijo na reakciji med antigenom in protitelesom. Pri tem pride do tekmovanja med označeno spojino in domnevno prisotno preiskovano spojino za vezavo na omejeno količino specifičnih protiteles. Nastane imunski kompleks, ki ga lahko kvantitativno in kvalitativno merimo.

Kvantitativne imunokemijske metode so: encimsko imunološka (EIA), radioimunološka (RIA), fluoroimunološka (FIA) tehnika. Podatke o koncentracijah benzodiazepinov v urinu pridobivamo s pomočjo detektorjev. RIA testi uporabljajo za označevanje radioaktivne izotope, ki so vezani v nastalem imunskem kompleksu. Prisotnost iskane učinkovine je sorazmerna spremembi radioaktivnosti, ki jo zaznamo z gamma števcem. Podobna RIA tehniki je FIA. Za označevanje uporablja fluorofor, ki ga obsevamo s svetlobo. V primeru fluoro-polarizacijske imunološke tehnike (FPIA) je to polarizirana svetloba. Sledi emisija fluorescenčne svetlobe, ki jo merimo z detektorjem. V EIA testih reagent označujemo z encimom. Ko je slednji vezan v označeno molekulo, se nahaja v aktivni obliki. Aktivna oblika encima katalizira reakcijo nastanka obarvanega produkta. Če v urinu ni benzodiazepinov, se encimsko označena molekula veže na protitelesa. Encim se pri tem deaktivira, zato reakcija nastanka obarvanega produkta ne poteče. Koncentracija iskane aktivne snovi je sorazmerna encimski aktivnosti v reakciji. EIA tehnika je v primerjavi z RIA manj zapletena in hitrejša. Na encimsko aktivnost lahko vplivajo temperaturne spremembe in prisotnost soli. EIA je zato manj občutljiva tehnika. Prednost EIA je v

avtomatizaciji. Na ta način povečamo število testiranih vzorcev in s tem zmanjšamo stroške analize. Pri EIA testih za dokazovanje prisotnosti benzodiazepinov v vzorcu se pogosto srečamo z multi-encimsko imunološko tehniko (EMIT). Bistvo EMIT tehnike je, da tekom analize uporabljamo encimski substrat specifičen za iskani analit in koencim. Na področju TDM sta se od imunokemijskih metod najbolj uveljavili EMIT in FPIA tehnika (34, 35, 36).

Kvalitativen pristop je osnovan na metodah suhe kemije, kjer so protitelesa in reagenti vezani na trdno fazo reagenčnega traku. Izvedba je enostavna, hitra in ne vključuje instrumentov. Benzodiazepine lahko v urinu detektiramo s testnimi ploščicami (slika 9a) ali testnimi lističi (slika 9b). Pri obeh testih večinoma preverjamo prisotnost benzodiazepinov z določanjem njihovega glavnega metabolita oksazepam.



Slika 9a: Testna ploščica s kapalko (iCassette™)

Slika 9b: Testni listič (ACON Lab.)

a) Testna ploščica za detekcijo benzodiazepinov v urinu

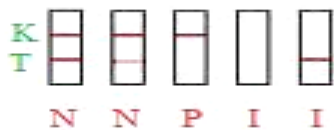
Na aplikativno mesto urinske ploščice nanese urin, ki potuje proti testnem okencu po principu kapilarnega efekta. Spremljamo obarvanje kontrolnega in testnega območja. V kontrolnem okencu so nanešena živalska protitelesa. Ko vzorec pripotuje do kontrolnega okenca, se tu pojavi rdečkasto-vijolična črtica. Če te ni, rezultati testa niso veljavni.

Benzodiazepini iz urina se vežejo na protitelesa. Če je koncentracija benzodiazepinov v vzorcu večja od postavljene meje zaznavanja, se v testnem okencu črtica ne pojavi. Pozitiven rezultat testa lahko upoštevamo le, če je v kontrolnem okencu rdečkasto-vijolična črtica (37).

b) Testni lističi za detekcijo benzodiazepinov v urinu

Kljub drugačni izvedbi je princip preverjanja prisotnosti s testnimi lističi podoben kot pri testni ploščici. Testni listič potopimo v urin za 10 do 15 sekund. Pri tem pazimo na nivo urina, ki ne sme biti višji od maksimalne meje za vzorec. Slednja je na testnem lističu

ponazorjena z ravno črtico, pravokotno na smer potovanja urina. Potovanje vzorca poteka vzdolž lističa po principu kapilarnega efekta. Po približno 5 do 10 minutah pogledamo rezultate. Najprej preverimo veljavnost testa. Dobljen rezultat testa je veljaven le, če se na kontrolnem delu lističa pojavi rdeča črtica. Če je koncentracija benzodiazepinov v urinu preiskovanca nad mejo detekcije testa, ostane testni del neobarvan. O negativnem testu govorimo, ko se testni del obarva rožnato ali rdeče. V tem primeru je koncentracija benzodiazepinov manjša od meje detekcije oziroma benzodiazepinov v urinu ni (38). Slika 10 prikazuje obarvanost kontrolnega (K) oziroma testnega (T) dela testnega lističa, če je rezultat negativen (N), pozitiven (P) oziroma neveljaven (I).



Slika 10: Negativen, pozitiven in neveljaven rezultat testnega lističa

Veliko faktorjev vpliva na zanesljivost izmerjenih rezultatov opisanih imunokemijskih testov. Napake lahko nastanejo kjerkoli v procesu priprave, analize oziroma tolmačenju rezultatov. Problem obstoja lažno pozitivnih pripisujemo predvsem nezadovoljivi specifičnosti oziroma selektivnosti. Analizo motijo zdravila in ostale aktivne snovi v urinu, ki so po strukturi podobne benzodiazepinom. Zaradi navzkrižnih reakcij dobimo lažno pozitivne rezultate. Lažno negativni rezultati se pojavijo, ko je koncentracija benzodiazepinov v urinu manjša od meje zaznavanja. Vzrok je lahko v njihovem metabolizmu ali vnosu premajhne količine benzodiazepinov.

Imunokemijski testi za določanje benzodiazepinov v urinu ponavadi temeljijo na detekciji oksazepamov. Tako z njimi ne moremo detektirati tistih benzodiazepinov, ki se ne metabolizirajo prek oksazepamov. Posledica so lažno negativni rezultati. Z osnovno FPIA ne zaznamo vnosa lorazepamov, nitrazepamov, flunitrazepamov, klordiazepoksida in triazolamov.

Pred analizo lahko urin encimsko hidroliziramo. S tem lahko znižamo mejo zaznavanja in izboljšamo občutljivost za vse naštetih benzodiazepinov razen flunitrazepamov (39). Nova postavljena meja zaznavanja ne sme biti prenizka, saj drugače dobimo lažno pozitivne rezultate. Napačni rezultati testov so lahko povezani tudi z motnjami iz urinskega vzorca. Velikokrat so za to odgovorni preiskovanci sami. Slednji z načrtnim poseganjem v svoje

vzorci spreminjajo njihovo osnovno sestavo. Najpogostejša načina sta redčenje urina in vnos interferenčnih snovi. Te lahko motijo detekcijo testa ali uničijo v urinu prisotne benzodiazepine oziroma benzofenone. Posledica so lažno negativni rezultati, ki ne prikazujejo dejanskega stanja v vzorcu (34).

c) Testni lističi za preverjanje pristnosti urinskega vzorca

Najboljši semi-kvantitativni test za odkrivanje nepravilnosti v urinskem vzorcu je urinski testni listič, ki ga pokrivajo reagenčna polja. Na slednjih se nahajajo specifični reagenti, s katerimi preverjamo lastnosti vzorčnega urina kot so: pH, specifična teža, prisotnost glutaraldehida, kreatinina, nitritov in oksidantov. Njihove vrednosti so pri razredčenem oziroma nepristnem urinskem vzorcu drugačne kot pri izvornem urinu. Izvedba tega testa je zelo podobna običajnemu preverjanju prisotnosti benzodiazepinov v urinu s testnimi lističi. Najprej listič za kratek čas potopimo v vzorec. V času 3 do 5 minut pride do reakcije med urinom in reagenti na blazinicah lističa. Vsaka blazinica se obarva z določenim odtenkom. S pomočjo specifičnega obarvanja posameznih blazinic preverjamo določene značilnosti urinskega vzorca. Nastale odtenke barve reagenčnih polj primerjamo s priloženo barvno skalo proizvajalca (40).

Imunokemijske metode moramo potrditi z bolj zanesljivimi kromatografskimi metodami. Učinkovit analitski sistem je sestavljen iz občutljive EMIT oziroma EIA in natančnega sistema GC/MS ali LC/MS. Zaradi variabilnosti v encimski aktivnosti oziroma uporabe radioaktivnih snovi pri EIA oziroma RIA, ju nadomestimo z bolj občutljivo FPIA.

Fluorescenca ozadja moti učinkovito ločevanje molekul vzorca. V Abbott Laboratories za analizo zdravil zlorabe so razvili TDx Abuse Drug Assay. Novi analitski sistem združuje imunokemijske tehnike s fluorescenčnimi detektorji v zelo občutljive in specifične fluorescentne imunokemijske tehnike (34).

2.2.2 KROMATOGRFSKE METODE

Pred kromatografsko analizo moramo biološki vzorec ustrezno pripraviti. Ponavadi izvedemo ekstrakcijo kot tisti predanalitski postopek, s katerim zdravilo oziroma njegove metabolite izoliramo iz vzorca. Največkrat naredimo ekstrakcijo tekoče-tekoče, ki temelji na porazdelitvi molekul vzorca med molekule tekočega organskega topila. Pri tem dobimo vodno in organsko fazo. Če je iskana učinkovina bolj topna v organskem topilu, se pri

ekstrakciji porazdeli v večji meri v organsko fazo. Topilo iz organske faze do suhega odparimo. Kar preostane, raztopimo v topilu oziroma mobilni fazi in nanesimo na kolono (34).

V širšem smislu kromatografske metode razvrščamo po nahajališču stacionarne faze. Poznamo kromatografijo v stolpcu (koloni) in kromatografijo na ploskvi. Mobilna faza ploskovne kromatografije se pod vplivom gravitacije ali kapilarnih sil giblje skozi stacionarno fazo. Nahajališče stacionarne faze je ravna plošča (tankoplastna kromatografija ali TLC) ali v porah papirja (papirna kromatografija). Pri kolonski kromatografiji se stacionarna faza nahaja v koloni, preko katere zaradi gravitacije ali pritiska potuje mobilna faza. Komponente vzorca ločujemo na podlagi hitrosti, s katero jih mobilna faza spira čez kolono stacionarne faze. Predstavnice te kromatografije so: tekočinska (LC), plinska (GC) in kromatografija superkritičnih tekočin (SFC). V okviru ploskovne oziroma kolonske kromatografije so tehnike, kjer uporabljamo mobilne faze različnih agregatnih stanj (preglednica VII) (41).

Preglednica VII: Agregatno stanje mobilne faze nekaterih tehnik kromatografije

Kromatografija	Tekočinska (LC)	Plinska (GC)	Superkritičnih tekočin (SFC)	Tankoplastna (TLC)
Agregatno stanje	Tekočina	Plin	Superkritična tekočina	Tekočina

Mobilno fazo superkritične tekočinske kromatografije (SFC) izpostavimo posebnim pogojem (kritični temperaturi in pritisku). Zaradi superkritičnih pogojev se sočasno obnaša kot plin in tekočina. SFC uporabimo v primerih, ko tekočinska in plinska kromatografija nista uspešni. Zlasti učinkovita je pri analizi nehlapljivih ali temperaturno nestabilnih molekul brez kromofornih skupin, ki ponavadi absorbirajo UV-svetlobo. Industrijski zgled SFC je ekstrakcija (odstranjevanje) kofeina iz kavnih zrn. Kot superkritično tekočino apliciramo ogljikov dioksid (41).

Pri analitiki drog v urinu so najvažnejše: tankoplastna kromatografija, tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC), plinska kromatografija (GC) in kombinirane metode z masno spektrometrijo (34).

a) Plinsko-tekočinska kromatografija (GC)

Včasih moramo vzorec predhodno derivatizirati. S tem mu omogočimo potovanje po koloni. Po uparitvi vzorca za GC ga z dovajanjem inertnega plina prenesemo preko kolone do detektorja. Kot mobilno fazo vpeljemo inertni plin, ki je lahko argon, dušik, helij ali vodik. Kolona je napolnjena s tekočo stacionarno fazo. Hitrost prehajanja skozi kolono je odvisna od porazdeljevanja molekul med mobilno in stacionarno fazo. Molekule ločimo glede na karakteristične retencijske čase. Po separaciji ugotovljamo prisotnost učinkovin v preiskovanem vzorcu. Detektorji, ki jih lahko za ta namen apliciramo, so: plamensko ionizacijski (FID), toplotno prevodni (TCD), termoionski (TID), detektor na zajetje elektronov (ECD). Pomanjkljivost GC je predvsem dolgotrajnost celotnega postopka, saj lahko naenkrat izvajamo analizo le enega vzorca (34, 41).

b) Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC)

Tekočinsko kromatografijo na splošno razdelimo na običajno tekočinsko kromatografijo (LC) in tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC). Razlika med njima je v učinkovitosti ločevanja molekul vzorca. Kljub enaki osnovi obeh kromatografij je HPLC pri ločevanju neprimerljivo uspešnejša. Razlog je v ustvarjanju visokih pritiskov na mobilno fazo in zamenjavi polnila kolone. Z zmanjšanjem velikosti zrn polnila povečamo stično površino med delci. S tem zožimo prehod med delci, skozi katerega potuje mobilna faza. V običajnem primeru pride do zastoja pretoka mobilne faze skozi kolono. Pri HPLC vzdržujemo normalno pretočnost z izvajanjem visokih pritiskov na mobilno fazo. Adsorpcija molekul vzorca pri HPLC poteka med tekočo in trdno fazo v koloni. Med analizo posameznih vzorcev kolono spiramo. Elucija je proces dovajanja mobilne faze. Pri tem vzorec z učinkovino odstranjujemo iz stacionarne faze. Pri gradientni eluciji tekom analize spreminjamo sestavo mobilne faze. Sestava mobilne faze izokratske elucije ostaja enaka. Hitrost potovanja učinkovin skozi kolono je odvisna od časa zadrževanja v mobilni fazi. Hitrejše so tiste, ki se dalj časa zadržujejo na mobilni fazi. Za kolono namestimo detektor, ki določa prisotnost učinkovin v vzorcu. Po naravi je detektor lahko: elektrokemijski, fluorescenčni, infrardeči, masni, ultravijolični. Slabost GC in HPLC je dolgotrajnost analize in predanalitskega dela, kamor prištevamo predpripravo vzorca in ekstrakcijo. Zaradi manj zapletene predpriprave vzorca je čas analize pri HPLC krajši kot pri GC (34, 41).

S kromatografskimi metodami ločujemo posamezne molekule zdravil le po enem parametru. Ker ima večje število molekul lahko enak retencijski čas, verodostojnost rezultata potrdimo z drugo metodo. Če povežemo GC ali LC z masno spektrometrijo (MS) GC/MS ali LC/MS, pridobimo na občutljivosti in specifičnosti (34).

c) GC/MS

Če povežemo separacijsko metodo GC z detekcijsko-analitsko MS, dobimo sistem GC/MS. Slednji je najbolj točna, občutljiva in zanesljiva metoda za identifikacijo hlapljivih organskih molekul. Njena uporaba strmo naraste po 1970, ko se začne uveljavljati v TDM. Danes z GC/MS potrjujemo prisotnost drog v bioloških vzorcih, ki so bili pri imunokemijskih metodah pozitivni. Poleg tega lahko dokaj natančno določimo čas zadnjega vnosa, skupni časa zlorabljanja in stopnjo zastrupitve npr. z benzodiazepini. Slabost GC/MS je, da mora biti injiciran vzorec hlapljiv in termostabilen, oziroma da se lahko derivatizira. Ostale pomanjkljivosti so: draga oprema in potreba po strokovno usposobljenem osebju. Kljub temu je varčnejša od ostalih kromatografskih tehnik, saj ponavadi predhodno ne potrebuje zahtevne in dolgotrajne ekstrakcije. S tem privarčujemo na času, denarju in zmanjšamo možnost človeških napak (2).

č) LC/MS

Enako kot GC/MS, se LC/MS začne pogosteje uporabljati po 1970. Razlikujeta se predvsem po tem, da pri LC/MS ne izvajamo derivatizacije metabolitov niti temperaturnega razkroja vzorca. LC/MS združuje dve napredni metodi, ki se med seboj dopolnjujeta. Z LC dobimo dvodimenzionalne podatke o jakosti signala in o času prihoda učinkovine iz kolone. S pomočjo MS določimo točno molekulsko maso fragmentov benzodiazepinov, ki jih na kromatogramu opazimo v obliki kromatografskih vrhov. Z molekulsko maso učinkovine lahko identificiramo vzorec, določimo čistost vzorca, preverimo aminokislinske substituentne in preračunamo število disulfidnih mostov. V primerjavi z UV detekcijo je MS veliko bolj specifična, občutljiva in hitrejša. Bistvena razlika med HPLC in kromatografijo pri LC-MS je, da je območje merjenja LC-MS metode bolj specifično. Ko v LC-MS analitski sistem uvedemo še en MS, pridobimo na selektivnosti in občutljivosti merjenja (42).

Osnovne funkcije v masni spektrometriji so: ionizacija, razvrščanje ter merjenje fragmentov iskane učinkovine. Rezultat merjenja je masni spekter. S tem prikazujemo ione prisotne v učinkovini vzorca, ki so razdeljeni glede na razmerje masa proti naboju (m/z).

Delovanje LC-MS sistema:

- Ločevanje

Ločevanje vzorčnih komponent poteka na koloni LC dela. LC v LC/MS sistemu za ločevanje uporablja porazdelitveno kromatografijo. V porazdelitveni kromatografiji razlikujemo več načinov izvedbe, ki so odvisni od sestave mobilne faze. Pri LC-MS uporabljamo le reverzno-fazno kromatografijo, kjer je mobilna faza (topilo) polarna, stacionarna faza pa nepolarna (43).

Pri kromatografskem delu sistema vzorec najprej potuje od injektorja do kolone. Injiciran volumen vzorca lahko vpliva na dobljene rezultate. Natančnost rezultatov je večja, če je injiciran volumen ves čas enak. Retencijski čas vzorca je obratno sorazmeren s polarnostjo mobilne faze. Mobilna faza z večjim deležem organskega modifikatorja je manj polarna. Zaradi krajšega retencijskega časa zapusti kolono eluent hitreje kot v primeru ko imamo manj polarno mobilno fazo.

- Ionizacija

Iz HPLC kolone pride eluent, ki predstavlja vzorec raztopljen v polarni mobilni fazi. V nadaljevanju iz eluenta odstranimo hlapljivo topilo (mobilno fazo). Pri tem dobimo vzorec z našim analitom, ki ga nato ioniziramo.

Glede na vir ionizacije poznamo:

- API (ionizacija pod atmosferskim pritiskom)
- EI (ionizacija z elektroni)
- CI (kemijska ionizacija)
- FAB (obstreljevanje s hitrimi atomi)
- MALDI (laserska ionizacija v matriksu)
- PBI (ionizacija z žarenjem)
- TSI (termorazprševalna ionizacija)

Starejši LC/MS sistemi nimajo vsakdanjega načina ločevanja molekul ionizacije. Pri TSI se tako molekule mobilne faze in analita ionozirajo istočasno, saj jih predhodno nismo ločili. Ionizacija poteče v vakuumskem prostoru. Na podoben način delujejo še: FAB, PBI,

MALDI. Srečamo jih v analitični toksikologiji le nekaterih molekul. MALDI apliciramo pri analitiki toplotno labilnih molekul kot so: peptidi in proteini. V danes pogostejših masnih spektrometrih LC/MS sistemov se spojine ionizirajo pod atmosferskim pritiskom. Sledi razvrščanje ionov glede na razmerje med maso in nabojem.

Z uporabo API (ionizacija pod atmosferskim pritiskom) močno povečamo robustnost in zanesljivost metode. Med predstavnice družine API ionizacije štejemo: ESI (elektrozprševalna ionizacija), APCI (kemijska ionizacija pod atmosferskim pritiskom), APPI (fotoionizacija pod atmosferskim pritiskom), SSI (razprševalna ionizacija s hitrostjo zvoka) (42, 43).

- ESI

Po 1990 se v MS vse bolj uveljavlja ESI. Poznamo pozitivno ESI (nastanejo kationi) in negativno ESI (nastanejo anioni). Danes je ESI najpogostejši način ionizacije v analitični toksikologiji. Pred ionizacijo se moramo seznaniti z nekaterimi dejavniki, ki lahko vplivajo na zanesljivost LC/MS metode. Izogibati se moramo ne hlapljivim pufrom, saj se lahko tekom ionizacije nalagajo na vir ionizacije. Visoke koncentracije pufrov zmanjšujejo ionizacijo iskane učinkovine. Poleg določane učinkovine se v LC eluentu lahko nahajajo ostali ioni. Če je njihova koncentracija visoka, tekmujejo za ionizacijo z našim analitom. S tem se zmanjša odziv masnega analizatorja za našo učinkovino. pH eluenta ne sme biti enak kot je pH mobilne faze, ki omogoča optimalno kromatografsko ločevanje.

Ločevanje poteče na HPLC koloni. Pri tem dobimo eluent, ki predstavlja naš vzorec raztopljen v polarni mobilni fazi (topilu). LC eluent se pod atmosferskim pritiskom skozi jekleno iglo razprši v komoro. Zaradi visoke napetosti na konici kapilare, se ustvarja močno električno polje. Nastane aerosol z nabitimi kapljicami. Z dovajanjem vročega sušilni plina (dušika), začne iz kapljic izparevati topilo. Volumen kapljic se postopoma zmanjšuje. Z naraščanjem gostote naboja v kapljicah, raste jakost odbojnih sil med ioni. Ko ta preseže jakost kohezivnih sil med ioni, se tvorijo mikrokapljice. Mikrokapljice so ioni, odcepljeni iz površine kapljic. Po popolni odparitvi topila iz kapljic, prehajajo ioni skozi vzorčno odprtino do masnega analizatorja. Pri pozitivni ESI lahko nastanejo naslednji kationi: $(M+H)^+$, $(M+Na)^+$, $(M+K)^+$, $(M+NH_4)^+$ itd. (43).

ESI in APCI ionizacija v LC-MS oziroma LC/MS-MS sta povzročili velik napredek v kvantifikaciji specifičnih zdravil in njihovih metabolitov. Srečujemo ju pri preiskavah spolnih zlorab, ki so povezane z predhodno zlorabo zdravil. Takrat so koncentracije

učinkovin v urinu ponavadi nizke (44). Uporabljamo ju tudi pri farmakokinetičnih študijah zdravil, kjer preučujemo po kolikšnem času se učinkovina z aktivnimi metaboliti izloči iz organizma. ESI je ustrezna ionizacijska tehnika pri analitiki toplotno občutljivih biomolekul, kot so: proteini, peptidi in oligonukleotidi. Za razliko od ESI apliciramo APCI predvsem pri analizi manj polarnih molekul (43).

- Razvrščanje ionov

Po ionizaciji ioni pripotujejo do masnega analizatorja, kjer se razvrščajo glede na maso in naboj (m/z). Poznamo veliko masnih analizatorjev. Aplikacija je odvisna od parametrov, ki so potrebni pri določeni vrsti analize. Analizator deluje pod vakuumom, ki omogoča nadaljevanje poti ionov do detektorja. Nižji je pritisk, lažje prehajajo ioni do detektorja. Na občutljivost in masno ločevanje ionov lahko vplivamo z zagotavljanjem vakuuma v analizatorju. Odsotnost molekul zraka omogoča lažje prehajanje (manjša možnost trkov) ionov analita do detektorja. Posledica je večja občutljivost metode in ločljivost ionov glede na maso in naboj.

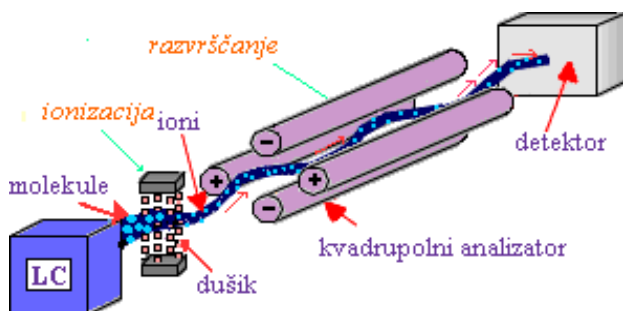
Pri MS lahko uporabljamo kvadрупolni, TOF (temelječ na času potovanja), IT (temelječ na ionski pasti) itd. Pri HPLC v kombinaciji z MS-MS je najpogostejši trojni kvadрупolni analizator (43).

- Kvadрупolni in trojni kvadрупolni analizator

Sestavljajo ga štiri v kvadrat (kvadрупol) postavljene palice.

Napetosti na palicah generira elektromagnetno polje. V središče kvadrata so usmerjeni le tisti ioni z ustreznim razmerjem med maso in nabojem (m/z), ostali ioni zaradi nastalega elektromagnetnega polja trčijo v palice. Na potovanje ionov vpliva enosmerna (DC) in izmenična napetost (RF). Kvadрупol ima vlogo masnega filtra. Tako do detektorja pridejo le ioni, ki imajo ustrezno m/z razmerje. Ostali ioni se na poti do detektorja izgubijo.

Slika 11 je shematski prikaz potovanja delcev od kolone na LC do detektorja na MS delu.



Slika 11: Potovanje delcev od kolone do detektorja

Ione lahko merimo v izbranem spektralnem območju (SCAN) ali pri posameznem (SIM) m/z . V SCAN spektralnem območju se nahajajo mase neznanih učinkovin, ki so v vzorcu prisotne v dovolj veliki koncentraciji. Z izbiro različnih SIM dobimo nekatera m/z , ki so karakteristična za prej znano učinkovino. SIM je občutljivejši in natančnejši od SCAN načina.

Pri MS-MS imamo tri kvadrupole. V prvem kvadrupolu se pod vplivom električnega polja izbere ione analita glede na maso in naboj. Ioni z ustreznim m/z razmerjem potujejo do drugega kvadrupola. Drugi kvadrupol je kolizijska celica. Izvorni (starševski) ioni se v kolizijski celici fragmentirajo pod kontroliranimi pogoji. Pod visokim pritiskom dovajamo plin (dušik, helij). Zaradi povečanja kinetične energije ionov, naraste število njihovih trkov. Posledica je razpad (fragmentacija) starševskih ionov. Nastanejo produkti (hčerinski ioni), ki potujejo do zadnjega kvadrupola. V tretjem kvadrupolu poteče selekcija hčerinskih ionov, katerih število merimo na detektorju (43).

- Ovrednotenje intenzitete signala

Detektor je naprava, ki jo največkrat najdemo v obliki elektronske pomnoževalke.

Ko hčerinski ioni zadenejo detektor, jih pretvori v merljiv električni signal in njihov tok ojači. Analogni signal nato z računalniškim sistemom spremenimo v digitalno obliko. Dobimo masni spekter, ki nam pove število ionov z določeno maso (43).

V današnjem času se analitika benzodiazepinov pojavlja na področju urgentne, forenzične ter splošne klinične medicine. Hude oblike zastrupitev so lahko usodne, zato moramo ukrepati čimhitreje. Ker je pacient v teh primerih ponavadi nesodelujoč (nezavesten), mu za analizo odvzamemo kri. Za razliko od krvi v urinu spremljamo predvsem daljša obdobja odmerjanja benzodiazepinov.

Najprej izvedemo kvalitativno oziroma kvantitativno imunokemijsko metodo. Testni lističi so najpogostejši in najhitrejši način za ugotavljanje prisotnosti benzodiazepinov oziroma benzofenonov v urinu. Od kvantitativnih metod se danes večinoma pojavljata encimsko imunološka in radioimunološka metoda. Problem večine imunokemijskih metod so napačni rezultati. Te so predvsem pri benzodiazepinih, ki že v majhnih koncentracijah učinkujejo na posameznika. Ker vrednost slednjih dostikrat ne preseže oziroma je na meji zaznavanja imunokemijskega testa, so rezultati lažno negativni. Primeri takih benzodiazepinov so: midazolam, flunitrazepam in lorazepam. Pogostejši in težavnejši so

lažno pozitivni rezultati. Pri encimsko imunoloških tehnikah nastanejo kot posledica navzkrižnih reakcij protiteles z ostalimi aktivnimi učinkovinami, ki so poleg iskanih prisotne. Radioimunološke tehnike so zanesljivejše, a zaradi velikih stroškov analize in uporabe radioaktivnih izotopov manj priljubljene. Danes obe vrsti tehnik vse bolj nadomešča novejša fluoroimunološka tehnika, TDx Abuse Drug Assay (podpoglavje 2.2.1). Vse pozitivne rezultate imunokemijskih metod nato potrdimo z bolj zanesljivo kromatografsko metodo. Slednja v kombinaciji z masno spektrometrijo daje bolj občutljive in specifične rezultate. Pri klinični analitiki benzodiazepinov in njihovih hidrolizatov so sprva uporabljali plinsko kromatografijo povezano z masno spektroskopijo (GC/MS ali GC/MS-MS). Postopoma jo je vse bolj nadomeščala tekočinska kromatografija (visoke ločljivosti) v povezavi z masno spektrometrijo (LC/MS ali LC/MS-MS). Slednja se je najprej pojavljala le v forenzični medicini, danes pa je že nepogrešljiv del laboratorijske diagnostike benzodiazepinov v splošni klinični praksi (34, 44).

3. NAMEN DELA

Benzodiazepine indiciramo pri anksioznih stanjih, nepečnostih, fobijah, epilepsijah, mišičnih krčih in alkoholnih oziroma heroinskih odtegnitvenih reakcijah. Zaradi širokega spektra uporabe in ugodnega profila neželenih učinkov je njihova raba zelo pogosta. Porast zlorabe benzodiazepinov poveča potrebo po ustrezni toksikološki identifikaciji. Pri ljudeh se kot biološka materiala za določanje njihove prisotnosti uporabljata predvsem urin in kri. V urinu se nahaja višja koncentracija presnovkov benzodiazepinov, zato je pri analitiki zlorab primernejši od krvi.

Namen diplomske naloge je razvoj postopkov priprave vzorcev hidrolizatov benzodiazepinov v urinu preiskovancev, ki so na zdravljenju z metadonom.

Na začetku bomo vzorce ustrezno pripravili, zatem pa jih analizirali s predhodno validirano LC/MS-MS metodo. Priprava vzorcev urina s predhodno dodanimi standardi bo razdeljena na tri stopnje. Najprej bo potekala kislá hidroliza vzorcev. Ker se bodo benzodiazepini iz vzorca pretvorili v skupen analit benzofenon, bomo lahko določili večje število različnih benzodiazepinov oziroma njihovih metabolitov. V nadaljevanju bomo benzofenone iz vzorcev izolirali z ekstrakcijo z etilacetatom, postopek katere bomo skušali izvesti tako, da bo čimbolj ponovljiv in da bodo izkoristki čim večji. Topilo bomo odparili na rotavaporju. Osušene vzorce bomo do ustrezne koncentracije raztopili v 50 % metanolu in jih posamično injicirali v LC/MS-MS analitski sistem. Posamezni benzofenoni se bodo ločili na LC delu, detektirali pa na MS delu. Na slednjem bo najprej njihova potekla ESI ionizacija. Zatem bomo z ustrezno nastavitvijo parametrov na MS delu določali vsebnost benzofenonov v vzorcih. Povezava LC/MS-MS bo omogočila večjo občutljivost in specifičnost meritev.

Primernost metode bomo najprej preverili po že pripravljeni metodi (45), pri kateri želimo izboljšati izkoristek (< 54 %) in ponovljivost (> 20 %) ekstrakcije. Oba parametra bomo nato preverili še z uporabo optimizirane metode, ki jo bomo pred tem delno validirali. Pri tej metodi bomo skušali razširiti območje merjenja, skrajšati čas analiz, izbrati bolj specifične fragmente in uporabiti interni standard. Validacijski parametri, ki jih bomo pri tem določali, so: selektivnost, linearnost, izkoristek ekstrakcije, ponovljivost ekstrakcije, točnost, mejo kvantifikacije in mejo detekcije. Ustreznost metode bomo nazadnje preverili še na realnih vzorcih urina, katerih priprava bo potekala po zgoraj opisanem postopku.

4. MATERIALI IN METODE

4.1 MATERIALI

4.1.1 BIOLOŠKI MATERIAL

- urinski vzorci zdravega preiskovanca
- 14 urinskih vzorcev preiskovancev, ki so na zdravljenju odvisnosti od heroina z metadonom, iz Zdravstvenega doma Nova Gorica

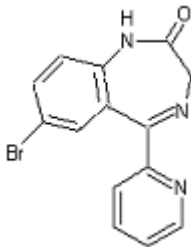
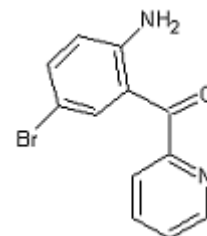
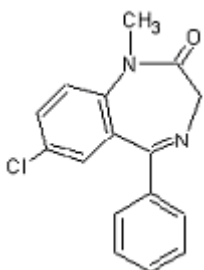
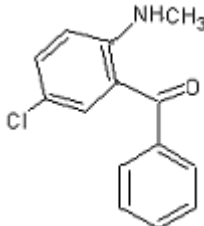
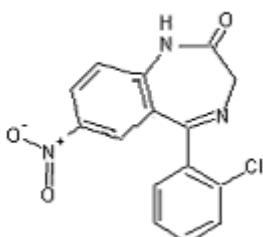
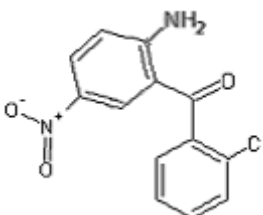
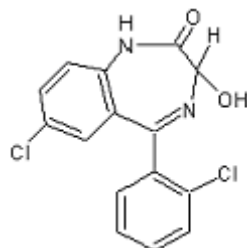
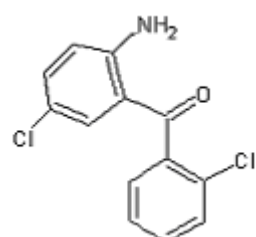
4.1.2 REAGENTI IN TOPILA:

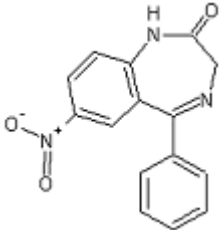
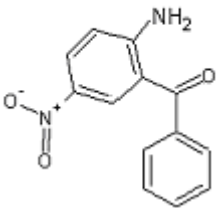
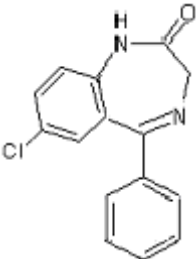
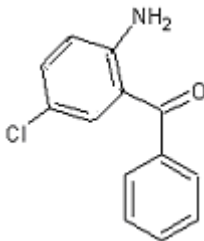
- BIDEŠTILIRANA VODA (pridobljena na Fakulteti za farmacijo)
- AMONIJEV ACETAT, p.a., $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ (Merck)
- OCETNA KISLINA, 100 % p.a., CH_3COOH (Merck)
- KLOROVODIKOVA KISLINA ,37 % p.a., HCl (Merck)
- AMONIAK, 25 % p.a., NH_3 (Merck)
- VODOVODNA VODA
- ETILACETAT, $\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$ (Merck)
- NATRIJEV SULFAT (sušilno sredstvo), p.a., Na_2SO_4 (Merck)
- METANOL, 100 % p.a., CH_3OH (Sigma-Aldrich)
- ACETONITRIL (HPLC grade), CH_3CN (Sigma-Aldrich)

4.1.3 STANDARDNE RAZTOPINE:

Iz standardov benzofenonov (preglednica VIII) pripravljenih na Fakulteti za farmacijo smo naredili standardne raztopine benzofenona bromazepama, diazepama, klonazepama, lorazepama, nitrazepama oziroma nordiazepama s koncentracijo 100 mg/L.

Preglednica VIII: Strukture benzodiazepinov in benzofenonov

Benzodiazepin in njegova molekulska formula	Struktura benzodiazepina	Struktura benzofenona
Bromazepam $C_{14}H_{10}BrN_3O$	M= 316 	M= 277 
Diazepam $C_{16}H_{13}ClN_2O$	M= 285 	M= 246 
Klonazepam $C_{15}H_{10}ClN_3O_3$	M= 316 	M= 277 Interni standard 
Lorazepam $C_{15}H_{10}Cl_2N_2O_2$	M= 321 	M= 266 

<p>Nitrazepam</p> <p>$C_{15}H_{11}N_3O_3$</p>	<p>M= 281</p> 	<p>M= 242</p> 
<p>Nordiazepam</p> <p>$C_{15}H_{11}ClN_2O$</p>	<p>M= 271</p> 	<p>M= 232</p> 

4.1.4 INTERNI STANDARD

Za interni standard smo uporabili standardno raztopino benzofenona klonazepama, ki smo jo pripravili iz standarda Fakultete za farmacijo.

4.1.5 PRIBOR IN APARATURE

- PRECIZNATEHTNICA AG 245 (Mettler Toledo)
- PRECIZNA TEHTNICA PG 803 (Mettler Toledo)
- MAGNETNO MEŠALO (Hanna Instruments)
- CENTRIFUGA Sigma 3K30
- pH METER MP 220 (Mettler Toledo)
- POVRATNI HLADILNIK, OLJNA KOPEL, MAGNETNA GRELNA PLOŠČA RCT Basic (Kika labortechnik), TERMOMETER HEJU M.S.
- ULTRAZVOČNA KADIČKA Sonis 4 (Iskra)
- VODNA KOPEL B-480 (Büchi), ROTAVAPOR R114 (Büchi)
- AVTOMATSKE PIPETE (Brandt): 100-1000 μ L, 20-200 μ L
- TERMOMETER (Hg)
- STEKLOVINA: ročne pipete, 500 mL bučke za mobilno fazo, 500 mL čaša, 50 mL bučke, lij, lij ločnik, valj, 50 mL in 100 mL erlenmajerice, natehtalka, vialo

- OSTALO: sistem in pribor za filtriranje mobilne faze (stekleni lij, filter papir, filter mrežica, gumijast zamašek, prižema, vodna črpalka, erlenmajerica), pH papir, magnetnetki, kapalka, spatula, grob filter papir, žlička

4.1.6 ANALITSKI SISTEM LC/MS Varian (Walnut Creek, California, ZDA):

- dve izokratski črpalki: Varian Prostar 210
- razplinjevalec: MetaChem
- termostat za kolono: Varian Prostar 510
- avtomatski vzorčevalnik: Prostar 420
- predkolona: Luna C₁₈ (2); 4 × 2,0 mm (Phenomenex)
- kolona: Luna C₁₈ (2); 50 × 2,0 mm (Phenomenex)
- masni analizator 1200L QUADROPOLE MS-MS
- program za obdelavo podatkov: Varian MS Workstation Version 6.5

4.2 METODE

Pri temeljnem instrumentalnem delu smo uporabili analitski sistem LC/MS-MS. Kompleksna naprava sklaplja dve različni eksperimentalni tehniki, ki se medsebojno dopolnjujeta. LC del namreč omogoča učinkovito ločevanje komponent, MS pa njihovo občutljivo in specifično detekcijo.

4.2.1 HPLC (LC)

- Pogoji merjenja:
 - Injicirani volumen: 50 µL
 - Temperatura kolone: 50°C
- Priprava mobilne faze:
 - Mobilna faza A (pufer amonijevega acetata):

V 0,5 L bidestrirane vode smo raztopili 192,5 mg amonijevega acetata. Pripravljeno raztopino smo nakisali z očetno kislino do pH= 3,8 in jo filtrirali. Preden smo mobilno fazo vpeljali v analitski sistem smo jo razplinili v ultrazvočni kadički (degaziranje). Tako smo preprečili ovire pri delovanju detektorja (pojav šumov).

- Mobilna faza B (acetonitril):

Tudi to mobilno fazo smo morali pred uporabo razpliniti v ultrazvočni kadički.

- Gradientna elucija (spreminjanje sestave mobilne faze B):
 - 0 - 7,5 min pri hitrosti pretoka 0,4 mL/min: 35 - 80 % mobilne faze B
 - 7,5 - 9 min pri hitrosti pretoka 0,7 mL/min: 35 % (stabilizacija sistema)

4.2.2 MASNA SPEKTROMETRIJA (MS-MS)

Masno spektrometerijo smo izvedli na Varian 1200L QUADROPOLE MS-MS analizatorju. Pri tem smo v različnih časovnih intervalih opazovali različne m/z.

- Vir ionizacije: + ESI
- Nastavitve masnega analizatorja:
 - igla: 5000 V
 - ščitek pred vstopom v kapilaro: 600V
 - sušilni plin dušik: 350°C, 21 Psi
 - kolizijski plin argon: 1,76 Torr
 - napetost na detektorju: 1450 V
 - mase merjenih fragmentov benzofenonov in kolizijska energija (CE):
 - klonazepam (interni standard): 260 - 195; CE: - 10
 - bromazepam: 277 - 106; CE: - 10
 - lorazepam: 266 - 154; CE: - 10
 - nordiazepam: 232 - 154; CE: - 8
 - diazepam: 228 - 193; CE: - 10
 - nitrazepam: 226 - 195; CE: - 10

5. EKSPERIMENTALNO DELO

5.1 PRIPRAVA STANDARDNIH RAZTOPIN

Na precizni tehtnici smo natehtali po 5 mg vsakega standarda benzofenona in ga raztopili v 50 mL 100 % metanola. Dobili smo 6 osnovnih raztopin standardov, koncentracije 100 mg/L. V 10 mL bučko smo dodali po 100 μ L osnovne raztopine vsakega standarda in s 50 % metanolom dopolnili do oznake. Nastala je standardna raztopina benzofenonov s koncentracijo 1000 μ g/L. 750 μ L slednje smo nato prenesli v 1 mL bučko, ji dodali 250 μ L 50 % metanola in dobili raztopino koncentracije 750 μ g/L. Na podoben način smo pripravili tudi standardne raztopine ostalih koncentracij, 10-500 μ g/L (preglednica IX).

Preglednica IX: Priprava standardnih raztopin različnih koncentracij

Koncentracija pripravljenih standardnih raztopin (μ g/L)	Dodan volumen standardnih raztopin s 1000 μ g/ L (μ L)	Dodan volumen 50 % metanola (μ L)
750	750	250
500	500	500
250	250	750
100	100	900
50	50	950
25	25	975
10	20	1980

5.2 PRIPRAVA ACETATNEGA PUFRA

Na precizni tehtnici smo natehtali 192,5 mg amonijevega acetata, ki smo ga v bučki raztopili v 0,5 L bidestilirane vode. Vsebino bučke smo prelili v čašo, kamor smo nato potopili kalibriran pH-meter. S postopnim dodajanjem očetne kisline smo raztopino nakisali do pH= 3,8.

5.3 VALIDACIJA METODE NA STANDARDNIH RAZTOPINAH

S pomočjo masnega spektrometra smo zaznavali fragmente karakteristične za posamezne benzofenone. Pri izbiri fragmentov in pogojev merjenja smo si pomagali s podatki iz že pripravljene metode (45). Najprej smo analizirali standardne raztopine benzofenonov s koncentracijo 250 μ g/L. Kromatografska separacija je potekala na koloni Luna C₁₈ (2);

50×2,0 mm. V časovnem intervalu 0-9 min smo na osnovi masnega spektra izbrali različne fragmente za posamezne benzofenone.

Pred uporabo modificirane metode za analizo vzorcev urina smo potrdili njeno primernost (delna validacija). Na standardnih raztopinah benzofenonov, koncentracije 10-1000 µg/L, smo preverili selektivnost, točnost, natančnost in linearnost (43,46).

5.3.1 SEGMENTNO SNEMANJE SPEKTROV

Določevanje benzofenona bromazepama, diazepama, klonazepama, lorazepama, nitrazepama in nordiazepama je potekalo s snemanjem njihovih nastalih fragmentov. Slednje smo snemali smo v dveh segmentih:

- Od 0 do 5,3 min (prvi segment) smo posneli mase: 226-195, 260-195, 277-106
- Od 5,3 do 9,1 min (drugi segment) smo posneli mase: 228-193, 232-154, 266-154

S pregledom masnih spektrov lahko izvemo, če so v vzorcu prisotne posamezne učinkovine. Za razliko od običajnega nam segmentno snemanje omogoča podrobnejši vpogled v območje mas izbranega segmenta. Ker so vrhovi fragmentov učinkovin slednjega bistveno višji od interferenc iz ozadja, pridobimo na občutljivosti merjenja.

5.3.2 SELEKTIVNOST

Selektivnost je sposobnost analitske metode, da nam omogoča uspešno ločitev in ovrednotenje analita ločeno od ostalih učinkovin iz vzorca. Metoda je selektivna, ko pri analizi vzorca za različno koncentracijo našega analita dobimo različen odziv. V okviru selektivnosti kromatografskih tehnik je pomemben parameter resolucija. Večja je, boljša je selektivnost kromatografske metode. Na kromatogramu to opazimo kot dobro ločitev kromatografskega vrha analita od ostalih izmerjenih vrhov.

5.3.3 LINEARNOST

Metoda je linearna, če sta koncentracija analita in njegov odziv linearno povezana. Linearnost razmerja med obema spremenljivkama preverimo na umeritveni premici s splošno enačbo $y=a+bx$. Pri tem y predstavlja površino kromatografskega vrha, x pa koncentracijo merjenega analita. Z b označimo naklon premice, z a odsek na ordinati. Ob uporabi internega standarda je y razmerje površin analita in internega standarda. Rezultat podamo s Pearsonovim (R) oziroma determinacijskim koeficientom (R^2). Pearsonov

(korelacijski) koeficient nam pove velikost linearne povezave med spremenljivkama x in y. Determinacijski koeficient nam pove kolikšen del variance ene spremenljivke lahko pojasimo z variiranjem druge. Metoda je linearna, če je R^2 bioloških vzorcev večji od 0,95.

5.3.4 TOČNOST

Točnost je definirana kot ujemanje med izmerjenim rezultatom in dejansko vrednostjo. Če izmerjeno vrednost odziva analita vstavimo v enačbo umeritvene premice, izračunamo pripadajočo koncentracijo. Točnost najpogosteje podamo v obliki relativne napake oziroma »bias« (%). Slednja v območju analize urina ne sme biti večja od 15 %. Pri meji kvantifikacije napaka ne sme presegati 20 %.

5.3.5 PONOVLJIVOST

Natančnost je sposobnost analizne metode, da zagotavlja kar se da ponovljive rezultate. V okviru natančnosti smo opazovali ponovljivost metode. S ponovljivostjo zagotavljamo natančnost metode, ki poteka v kratkem časovnem obdobju pod enakimi pogoji delovanja. Podamo jo kot absolutno oziroma relativno standardno odstopanje. Pri absolutnem standardnem odstopanju izračunamo standardni odklon (SD), pri relativnem pa relativni standardni odklon (RSD). Vrednost RSD mora biti enaka oziroma manjša od 15 %, pri meji kvantifikacije pa od 20 %. Z izračunom RSD dobimo vpogled v razpršenost rezultatov okoli povprečne vrednosti.

5.3.6 MEJA ZAZNAVANJA (DETEKCIJE) IN MEJA KVANTIFIKACIJE

Meja detekcije (LOD) je najmanjša koncentracija analita, ki jo lahko zanesljivo (ločeno od ozadja) zaznamo. Na njeno vrednost vpliva razmerje signal:šum, ki je običajno vsaj 3:1. Meja kvantifikacije (LOQ) je najmanjša koncentracija, ki jo lahko zanesljivo kvantitativno ovrednotimo. Njena vrednost je zanesljiva, če meritvam zagotavljamo primerno točnost ($\text{bias} \pm 20\%$) in ponovljivost ($\text{RSD} \leq 20\%$). Razmerje signal:šum mora biti vsaj 10:1.

5.4 PRIPRAVA URINSKIH STANDARDOV

Predhodno smo pripravili raztopino standarda določene koncentracije. Slednjo smo nato vnesli v po 2 paralelna vzorca slepega urina. V prvi paralelni vzorec slepega urina smo raztopino standarda dodali pred segrevanjem na oljni kopeli, v drugi pa pred ekstrakcijo.

5.4.1 KISLA HIDROLIZA

Najprej smo 10 min pri 3500 obratih/min centrifugirali odvzet slepi urin. S tem smo oborili delce (proteine), ki so plavali v urinu. V dve 50 mL bučki smo odpipetirali po 3-5 mL centrifugiranega slepega urina in 7 mL klorovodikove kisline. Prvi paralelki nakisanega urinu smo dodali še raztopino standarda ustrezne koncentracije. Vsako bučko smo nato 1h segrevali na oljni kopeli (120 °C) ob konstantem mešanju magnetnega mešala. Po odstitvi iz kopeli smo ju ohladili na sobno temperaturo in z amoniakom naalkalili do pH 9-11. Naalkaljen vzorec obeh paralelk smo filtrirali skozi grob filter papir (odstranitev večjih delcev nečistoč). Filtratu druge paralelke smo dodali standard enake koncentracije kot prvemu.

5.4.2 EKSTRAKCIJA

V liju ločniku smo prefiltrirano vodno fazo 4-krat ekstrahirali s po 10 mL etilacetata. Pri ekstrakciji smo v liju ločniku videli ločitev dveh faz. Vodna faza je bila spodaj, organska (lažja) zgoraj. Po separaciji smo slednji dodali sušilno sredstvo natrijev sulfat in jo po 20 min konstantnega mešanja prefiltrirali skozi grob filter papir.

5.4.3 ODPAREVANJE TOPILA:

Odparevanje organskega topila (etilacetat) je potekalo s pomočjo vodne kopeli s temperaturo 60 °C in rotavaporja pri znižanem tlaku.

5.5 LC/MS-MS ANALIZA URINSKIH STANDARDOV

Ustreznost priprave vzorca in LC/MS-MS metode smo potrdili še na urinskih standardih benzofenonov. Analiza je najprej potekala po že pripravljeni metodi (45), pri kateri smo uporabili kolono Luna C₁₈ (2); 250×4,6 mm. Na šestih paralelkah s koncentracijo 50 µg/L smo preverili izkoristek in ponovljivost ekstrakcije. Zatem smo izvedli delno validacijo modificirane metode, kjer je bila uporabljena kolona Luna C₁₈ (2); 50×2,0 mm. Analizirali smo 4 do 6 paralelnih urinskih standardov v koncentracijskem območju 5-500 µg/L.

5.5.1 SELEKTIVNOST

Ker so na našo analizo vplivale endogene snovi iz urina, smo morali izmeriti njihov vpliv. V analitski sistem smo injicirali 2 alikvota urina pripravljenega po postopku iz podpoglavja

5.4. Prvemu smo pred ekstrakcijo dodali raztopino standarda benzofenonov. Kot drugi alikvot smo vzeli slepi urin brez dodatka benzofenonov. Oba smo analizirali in ju glede na njun odziv primerjali. Odziv iz slepega urina smo upoštevali kot ozadje vzorca.

5.5.2 LINEARNOST

Linearnost modificirane metode smo preverili z umeritveno premico 4 oziroma 6 paralelk urinskih standardov na koncentracijo. Uporabili smo urinske standarde koncentracij: 5, 10, 25, 100, 250 in 500 µg/L. Z Excelom smo izračunali vrednost determinacijskega koeficienta (R^2) posameznega benzofenona v urinskih standardih.

5.5.3 IZKORISTEK EKSTRAKCIJE

Urinske standarde smo analizirali z uporabo dveh metod. Pri prvi metodi je bila koncentracija urinskih standardov 50 µg/L. Nato smo z modificirano metodo analizirali standarde s koncentracijo 25 in 100 µg/L. Odzive ekstrahiranih (urinski standardi) in neekstrahiranih (standardne raztopine) vzorcev smo primerjali in izrazili z % ekstrakcije

5.5.4 PONOVLJIVOST EKSTRAKCIJE

Ponovljivost ekstrakcije smo preverili z dvema metodama. Z že pripravljeno metodo smo izmerili odzive 4 oziroma 6 paralelk urinskih standardov koncentracije 50 µg/L, z modificirano pa koncentracije 25 in 100 µg/L. Pri urinskih vzorcih koncentracije 25, 100 in 250 µg/L smo upoštevali odziv internega standarda. Rezultat smo podali v obliki standardnega odklona (SD) oziroma relativnega standardnega odklona (RSD).

5.6 PRIPRAVA VZORCEV URINA PREISKOVANCEV

14 vzorcev urina preiskovancev smo pripravili po enakem postopku kot vzorce urinskih standardov. Za razliko od teh realnim vzorcem urina standardov nismo naknadno dodali.

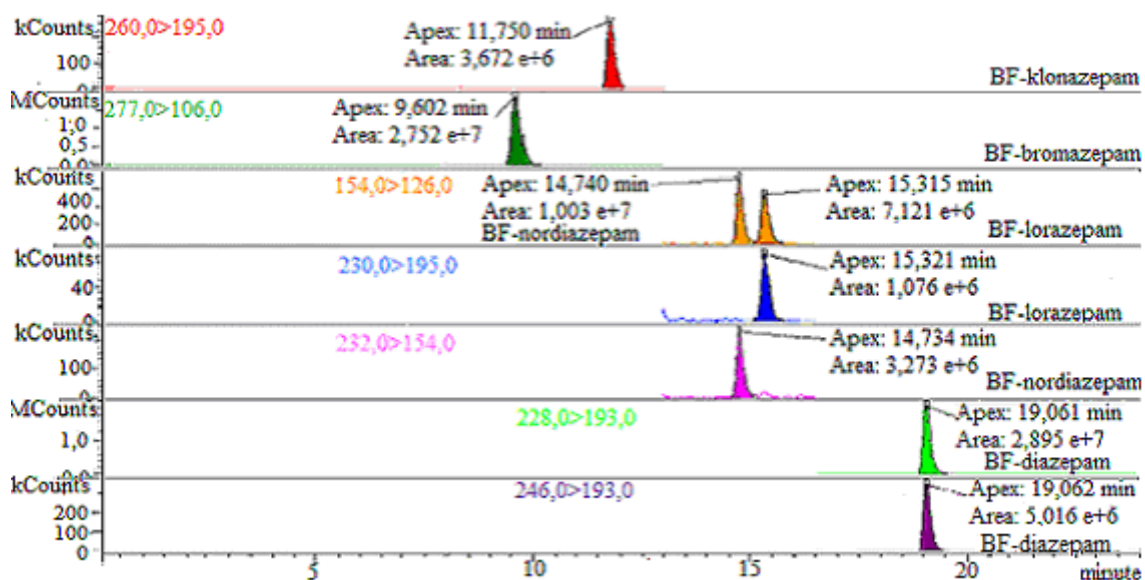
5.7 ANALIZA URINSKIH VZORCEV PREISKOVANCEV

Z validirano LC/MS-MS metodo smo na koncu analizirali še vzorce urina preiskovancev.

6. REZULTATI

6.1 IZBIRA MAS POSAMEZNIH BENZOFENONOV

Na začetku smo analizo standardnih raztopin vseh benzofenonov (BF) izvedli po že pripravljeni metodi (45) (slika 12).



Slika 12: Kromatogram standardov benzofenonov (prva metoda)

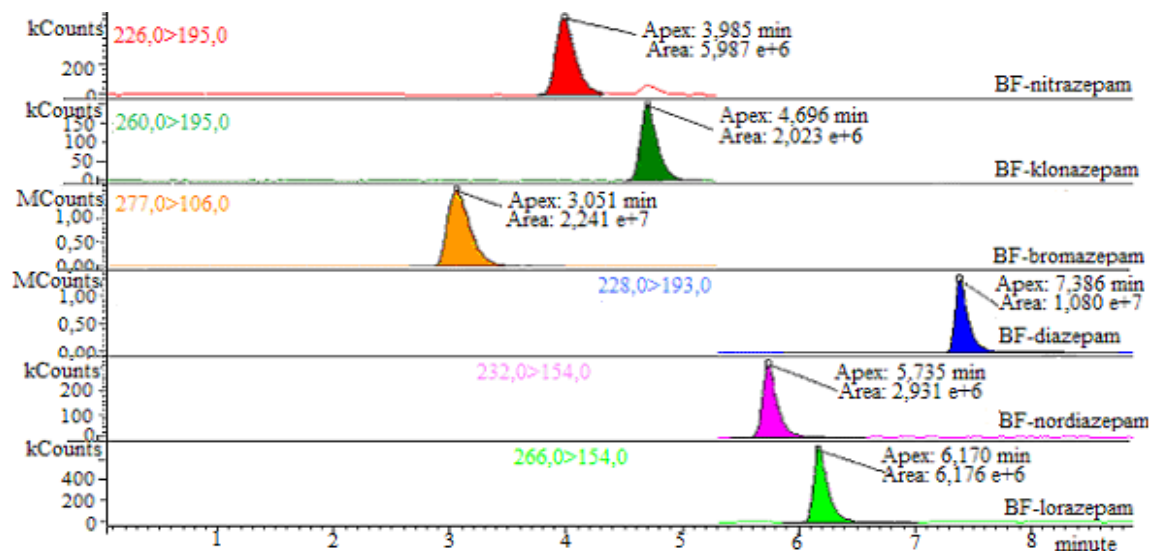
Opazovanje mas je potekalo v treh segmentih (preglednica X).

Preglednica X: Opazovanje mas v različnih časovnih intervalih (prva metoda)

Segment	Časovni interval	Benzofenon	Retencijski čas	Fragmenti
Prvi	0,05-13,01 min	BF-bromazepam	9,60 min	277-106
		BF-klonazepam	11,75 min	260-195
Drugi	13,02-16,49 min	BF-nordiazepam	14,73 min	232-154
			14,74 min	154-126
		BF-lorazepam	15,32 min	230-195
			15,32 min	154-126
Tretji	16,50-24,14 min	BF-diazepam	19,06 min	246-193
			19,06 min	228-193

Pri optimizaciji metode smo posneli fragmente benzofenona bromazepama, diazepama, klonazepama, lorazepama, nitrazepama oziroma nordiazepama. Snemanje je potekalo v dveh segmentih (preglednica XI). Pri izbiri posameznih fragmentov so nam bili v pomoč

podatki iz že pripravljene metode. Izbrani kromatografski vrhovi za posamezne benzofenone (slika 13) so bili kar se da ločeni med seboj. V nasprotnem primeru bi bili analizni rezultati nezanesljivi.



Slika 13: Kromatogram standardov benzofenonov (modificirana metoda)

Preglednica XI: Opazovanje mas v različnih časovnih intervalih (modificirana metoda)

Segment	Časovni interval	Benzofenon	Retencijski čas	Fragmenti	Izbrani fragmenti
Prvi	0,04-5,30 min	BF-bromazepam	3,05 min	277-106	277-106
		BF-nitrazepam	3,99 min	226-195 154-126	226-195
		BF-klonazepam	4,70 min	260-195	260-195
Drugi	5,31-9,12 min	BF-nordiazepam	5,74 min	232-154 154-126	232-154
		BF-lorazepam	6,17 min	266-154 154-126 230-195	266-154
		BF-diazepam	7,39 min	228-193 246-193	228-193

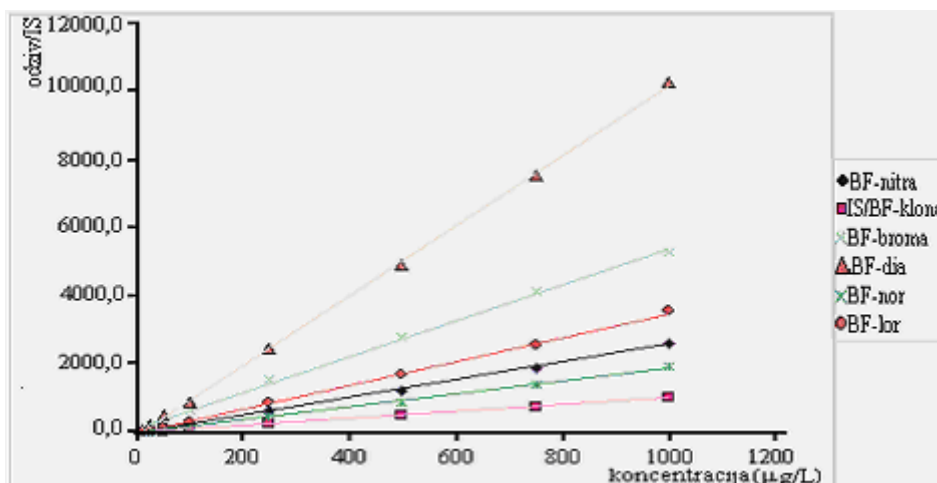
6.2 VALIDACIJA METODE NA STANDARDNIH RAZTOPINAH BENZOFENONOV

Primernost optimizirane LC/MS-MS metode za analizo smo preverili na standardnih raztopinah in urinskih standardih benzofenona bromazepama (BF-broma), diazepama (BF-dia), klonazepama (BF-klona), lorazepama (BF-lor), nitrazepama (BF-nitra) in

nordiazepama (BF-nor). Modificirano metodo smo delno validirali na standardnih raztopinah, koncentracij od 10 do 1000 µg/L. Določali smo naslednje validacijske parametre: linearnost, ponovljivost in točnost.

6.2.1 LINEARNOST

Pri linearnosti smo opazovali razmerje med odzivom in koncentracijo standarda benzofenona v koncentracijskem območju med 10 in 1000 µg/L. Ob tem smo upoštevali odziv internega standarda benzofenona klonazepama (IS). Dobljenim odzivom (odziv BF/odziv IS) pri pripadajočih koncentracijah posameznih benzofenonov smo naredili umeritveno premico (slika 14).



Slika 14: Umeritvena premica benzofenonov v standardnih raztopinah z upoštevanjem IS

Iz enačb premice smo izračunali R^2 vrednosti benzofenonov (preglednica XII).

Preglednica XII: R^2 vrednosti v standardnih raztopinah z upoštevanjem IS

Benzofenon	BF-nitra	BF-broma	BF-dia	BF-nor	BF-lor
R^2	0,9987	0,9985	0,9995	0,9986	0,9993

Ker je R^2 pri vseh benzofenonih v standardih večja od 0,95, je metoda linearna.

6.2.2 NATANČNOST (PONOVLJIVOST)

Preverili smo skladnost rezultatov posameznih meritev. Slednji so predstavljali povprečje štirih odzivov na posamezno koncentracijo. Ponovljivost rezultatov smo izrazili v obliki

relativnega standardnega odstopanja (RSD). Pri vrednotenju rezultatov smo upoštevali odziv internega standarda (preglednica XIII).

Preglednica XIII: Relativno standardno odstopanje pri različnih koncentracijah z uporabo IS (BF-klona); n=4

Dejanska konc. (µg/L)	BF-nitra RSD (%)	BF-broma RSD (%)	BF- dia RSD (%)	BF-nor RSD (%)	BF-lor RSD (%)
10	18,37	19,91	12,88	19,18	6,34
25	9,73	19,61	3,00	9,36	6,65
50	4,84	7,95	4,90	6,10	7,23
100	2,85	3,79	2,57	7,04	5,06
250	2,60	4,80	2,17	1,17	5,61
500	2,84	6,07	3,87	1,42	3,91
750	3,22	4,54	5,86	4,54	1,00
1000	2,53	5,67	4,43	0,65	6,13

6.2.3 TOČNOST

Pri točnosti metode smo primerjali izračunano (povprečje štirih meritev) z dejansko vrednostjo koncentracije. Rezultat smo podali kot napako (%) - »bias« (preglednica XIV).

Preglednica XIV: Točnost metode z upoštevanjem odziva IS (BF-klona)

Benzofenon	BF-nitra	BF-broma	BF-dia	BF-nor	BF-lor
Dejanska konc. (µg/L)	Konc. (µg/L)	Konc. (µg/L)	Konc. (µg/L)	Konc. (µg/L)	Konc. (µg/L)
	Bias (%)	Bias (%)	Bias (%)	Bias (%)	Bias (%)
10	6,87	24,82	3,98	3,01	6,30
	-31,30	148,20	-60,20	-69,90	-37,00
25	22,63	29,10	21,10	20,03	20,20
	-9,50	16,40	-15,60	-19,90	-19,20
50	45,95	56,75	44,60	45,55	47,30
	-8,10	13,50	-10,80	-8,90	-5,40
100	97,40	99,90	105,30	101,40	100,00
	-2,60	-0,10	5,30	1,40	0
250	246,50	240,25	252,25	258,00	251,50
	-1,40	-3,90	0,90	1,20	0,60
500	518,50	491,00	514,50	525,00	516,50
	3,70	-1,80	2,90	5,00	3,30
750	770,25	735,00	754,50	761,25	759,00
	2,70	-2,00	0,60	1,50	1,20
1000	977,00	1021,00	989,00	979,00	985,00
	-2,30	2,10	-1,10	-2,10	-1,50

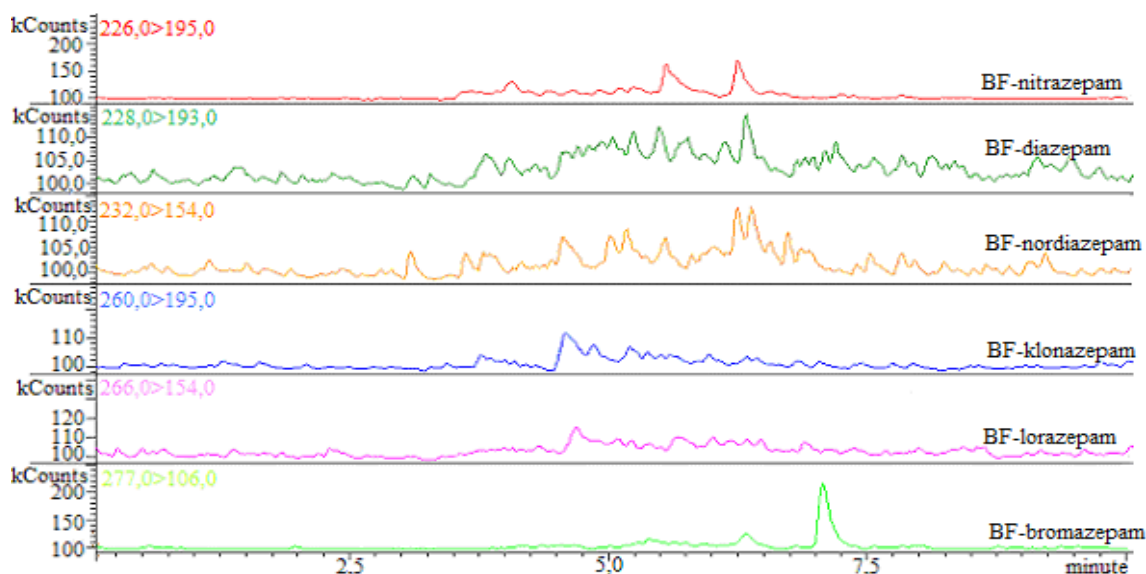
Metoda je pri vseh benzofenonih točna v območju koncentracij 25-1000 µg/L.

6.3 LC/MS-MS ANALIZA URINSKIH STANDARDOV

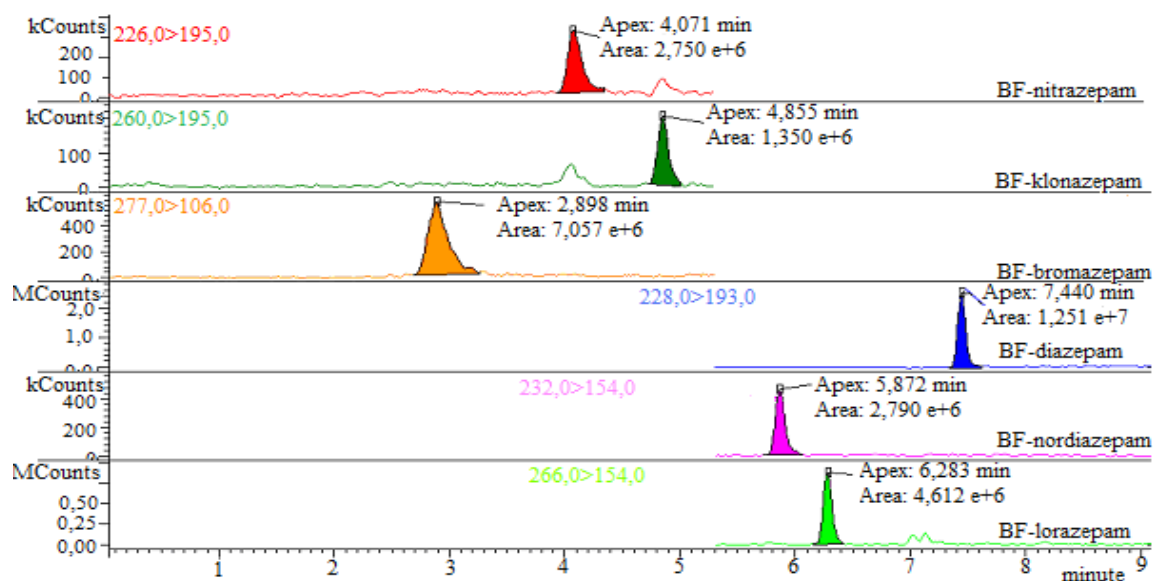
Po delni validaciji LC/MS-MS metode na standardnih raztopinah smo to naredili še na urinskih standardih benzofenonov. Sprva je analiza potekala po že pripravljeni metodi (45), kjer smo uporabili kolono Luna C₁₈ (2); 250×4,6 mm. V urinskih standardih koncentracije 50 µg/L smo določili izkoristek in ponovljivost ekstrakcije. Nato smo uporabili modificirano metodo, kjer je bila kolona Luna C₁₈ (2); 50×2,0 mm. Analizirali smo urinske standarde s koncentracijami od 5 do 500 µg/L. Preverili smo sledeče validacijske parametre: selektivnost, linearnost, izkoristek ekstrakcije, ponovljivost ekstrakcije, točnost, meja kvantifikacije oziroma detekcije.

6.3.1 SELEKTIVNOST

Selektivnost LC/MS-MS modificirane metode smo ugotavljali z analizo slepega urina (slika 15) in urinskega standarda (slika 16), katerih odzive smo primerjali.



Slika 15: Slepi urin

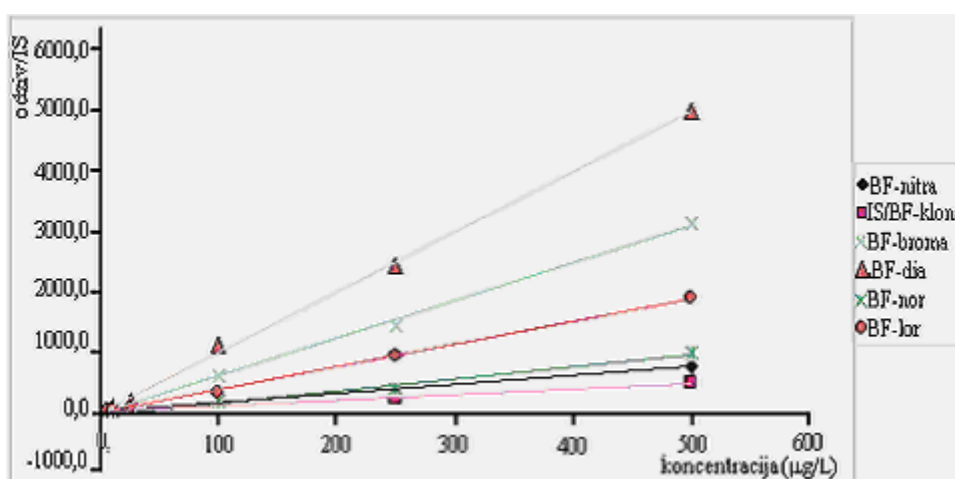


Slika 16: Urinski standard

Iz slik je razvidno, da ni prisotnih interferenc, ki bi motile analizo benzofenonov. Metoda je torej selektivna za vse benzofenone.

6.3.2 LINEARNOST

Linearnost metode smo preverili na urinskih standardih, koncentracij od 5 do 500 $\mu\text{g/L}$. Naredili smo umeritveno premico posameznih benzofenonov. Sorazmernost odziva s koncentracijo benzofenonov smo povečali, da smo ob vrednotenju rezultatov analize upoštevali odziv internega standarda (benzofenon klonazepama) (slika 17).



Slika 17: Umeritvene premice benzofenonov v urinskih standardih z upoštevanjem IS

Iz enačb premice smo benzofenonom izračunali R^2 vrednosti (preglednica XV).

Preglednica XV: R^2 vrednosti v urinskih standardih z upoštevanjem IS (BF-kлона)

Benzofenon	BF-nitra	BF-broma	BF-dia	BF-nor	BF-lor
R^2	0,9938	0,9988	0,9989	0,9910	0,9997

Vrednosti R^2 benzofenonov v urinskih standardih presežejo 0,95, zato je metoda linearna.

6.3.3 IZKORISTEK EKSTRAKCIJE

Izkoristek ekstrakcije smo najprej določali po že pripravljeni metodi. Izmerili smo odziv ekstrahiranega urinskega standarda in ga primerjali z odzivom neekstrahiranega standarda benzofenonov. Izkoristek ekstrakcije smo določali na šestih paralelnih vzorcih s koncentracijo 50 $\mu\text{g/L}$ (preglednica XVI).

Preglednica XVI: Izkoristek ekstrakcije (%) pri koncentraciji 50 $\mu\text{g/L}$

Benzofenon	Fragment	Izkoristek ekstrakcije (%)
BF-nitrazepam	154-126	59,08
	226-195	60,03
BF-klonazepam	260-195	66,89
BF-bromazepam	277-106	37,15
BF-diazepam	228-193	78,07
	246-193	74,06
BF-nordiazepam	232-154	56,55
BF-lorazepam	154-126	121,81
	230-195	77,49

Izkoristek ekstrakcije se razlikuje glede na vrsto benzofenona. Večinoma se njegova vrednost nahaja nad 50 %, pri BF-nordiazepama znaša 56,5 %. Največji odklon od povprečja smo zasledili pri BF-lorazepama (121,8 %) in BF-bromazepama (37,1 %). Presežek lorazepama lahko pripišemo neustrezni pripravi vzorca, vnosu interferenc oziroma neprimerni izbiri fragmenta. Slednjemu smo se izognili z izborom najustreznejšega fragmenta za posamezne benzofenone (glej sliko 12). Velika izguba BF-bromazepama je najverjetneje posledica neučinkovite ekstrakcije z etilacetatom.

Pri uporabi modificirane metode smo preverili izkoristek ekstrakcije na urinskih standardih, koncentracij 25 in 100 $\mu\text{g/L}$ (preglednica XVII).

Preglednica XVII: Izkoristek ekstrakcije (%) pri koncentraciji 25 oziroma 100 µg/L

Benzofenon	BF-nitra	BF-klona	BF-broma	BF-dia	BF-nor	BF-lor
Izkoristek (%) pri 25 µg/L	72,00	95,80	83,2	78,10	96,10	89,20
Izkoristek (%) pri 100 µg/L	75,80	86,90	83,6	85,20	66,80	85,70

Napram slabemu izkoristku ekstrakcije pri benzofenonu bromazepamu pri prvi metodi je ta ob uporabi modificirane metode dober za vse benzofenone.

6.3.4 PONOVLJIVOST EKSTRAKCIJE

Ponovljivost izmerjenih vrednosti smo ugotavljali z izračunom standardnega odklona (SD) oziroma relativnega standarda odklona (RSD). Kot pri izkoristku smo ponovljivost ekstrakcije urinskih standardov benzofenonov preverili z dvema metodama. S prvo (že pripravljena) metodo smo izračunali ponovljivost (RSD) šestih paralelnih urinskih standardov s koncentracijo 50 µg/L (preglednica XVIII).

Preglednica XVIII: RSD (%) pri koncentraciji 50 µg/L; n=6

Benzofenon	Fragment	RSD (%)
BF-nitrazepam	154-126	21,60
	226-195	19,60
BF-klonazepam	260-195	20,60
BF-bromazepam	277-106	15,80
BF-diazepam	228-193	33,50
	246-193	33,20
BF-nordiazepam	232-154	20,30
BF-lorazepam	154-126	30,80
	230-195	18,60

Z modificirano metodo smo preverili ponovljivost ekstrakcije na 4, 6 ali 8 paralelkah pri koncentracijah 25, 100 in 250 µg/L. Iz dobljenih odzivov in ob upoštevanju odziva internega standarda smo izračunali povprečno vrednost (\bar{Y}), standardni odklon (SD) in relativni standardni odklon (RSD) (preglednica XIX a, b in c).

Preglednica XIX a: \bar{y} , SD, RSD (%) pri koncentraciji 25 $\mu\text{g/L}$ z in brez uporabe IS; n=8

Benzofenon	\bar{y} ($\times 10^7$)	SD	RSD (%)	\bar{y} z IS	SD z IS	RSD (%) z IS
BF-nitrazepam	2,71	0,74	27,30	48,63	4,42	9,10
BF-klonazepam	1,41	0,29	20,20	25	0	0
BF-bromazepam	7,02	1,69	24,00	128,49	8,89	6,90
BF-diazepam	11,17	2,88	25,80	222,71	21,09	9,50
BF-nordiazepam	2,57	0,44	17,00	47,49	6,88	14,50
BF-lorazepam	4,42	0,92	20,80	80,32	5,91	7,40

Preglednica XIX b: \bar{y} , SD, RSD (%) pri koncentraciji 100 $\mu\text{g/L}$ z in brez uporabe IS; n=4

Benzofenon	\bar{y} ($\times 10^7$)	SD	RSD (%)	\bar{y} z IS	SD z IS	RSD (%) z IS
BF-nitrazepam	6,08	1,67	27,50	215,64	24,87	11,50
BF-klonazepam	2,95	0,38	12,90	100,00	0	0
BF-bromazepam	17,24	4,33	25,10	637,92	45,58	7,10
BF-diazepam	33,91	10,98	32,40	1131,82	75,66	6,70
BF-nordiazepam	4,25	1,22	28,70	168,27	14,82	8,80
BF-lorazepam	10,79	2,36	21,90	349,56	45,27	12,90

Preglednica XIX c: \bar{y} , SD, RSD (%) pri koncentraciji 250 $\mu\text{g/L}$ z uporabo IS; n=4-6

Standard	BF-nitra	BF-klona	BF-broma	BF-dia	BF-nor	BF-lor
\bar{y}	407,91	250	1453,31	2438,138	414,15	936,52
SD	48,28	0	63,46	102,05	48,94	20,19
RSD (%)	11,80	0	4,40	4,20	11,80	2,20

Relativno standardno odstopanje je na začetku (brez uporabe internega standarda) veliko (RSD > 15%). Z upoštevanjem odziva internega standarda smo ugotovili, da je metoda ponovljiva (RSD ne preseže 15 %).

6.3.5 TOČNOST

Točnost modificirane metode smo preverili pri koncentracijah 5, 10, 25, 100, 250 in 500 $\mu\text{g/L}$, katerih rezultate smo podali kot relativno napako oziroma »bias« (%) (preglednica XX).

Preglednica XX: Točnost (%) metode pri urinskih standardih

Benzofenon	BF-nitra	BF-broma	BF-dia	BF-nor	BF-lor
Dejanska konc. (µg/L)	Konc. (µg/L)	Konc. (µg/L)	Konc. (µg/L)	Konc. (µg/L)	Konc. (µg/L)
	Bias (%)	Bias (%)	Bias (%)	Bias (%)	Bias (%)
5	-6,24	6,44	2,81	12,66	7,00
	-224,76	28,77	-43,92	153,21	40,07
10	0,65	10,51	8,46	19,81	13,57
	-93,52	5,06	15,44	98,12	35,69
25	19,02	24,41	20,98	31,42	24,33
	-23,93	-2,34	-16,08	25,69	-2,67
100	128,98	106,26	112,75	92,19	94,84
	28,98	6,26	12,75	-7,81	-5,16
250	237,26	255,59	244,61	215,91	248,56
	-5,10	2,23	-2,16	-13,64	-0,58
500	492,03	505,13	500,39	518,03	501,69
	-1,59	1,03	0,08	3,61	0,34

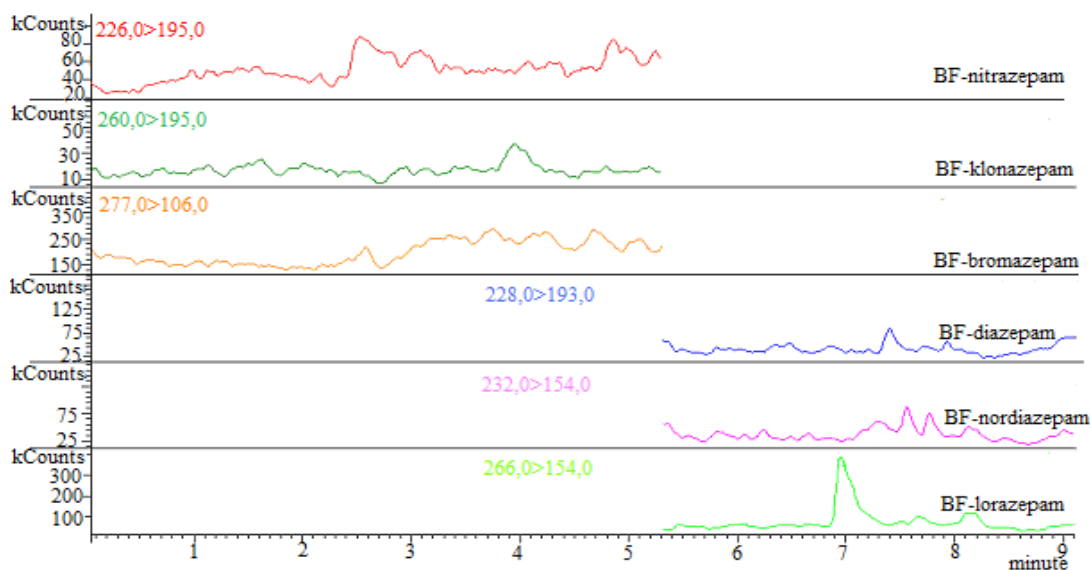
Iz preglednice je razvidno, da je metoda točna za večino benzofenonov v koncentracijskem območju 25-500 µg/L. Izjema je benzofenon nitrazepama oziroma nordiazepama pri koncentraciji 25 oziroma 100 µg/L, kjer napaka preseže 20 %.

6.3.6 MEJA DETEKCIJE IN MEJA KVANTIFIKACIJE

Meja kvantifikacije je pri benzofenonu nitrazepama pri 250 µg/L, pri benzofenonu nordiazepama pa 100 µg/L. Pri benzofenonu diazepama oziroma lorazepama je meja določitve 25 µg/L, pri benzofenonu bromazepama pa 10 µg/L. Najmanjša koncentracija benzofenonov, ki jo še lahko zanesljivo detektiramo ločeno od ozadja (razmerje signal:šum > 3:1), je 5 µg/L.

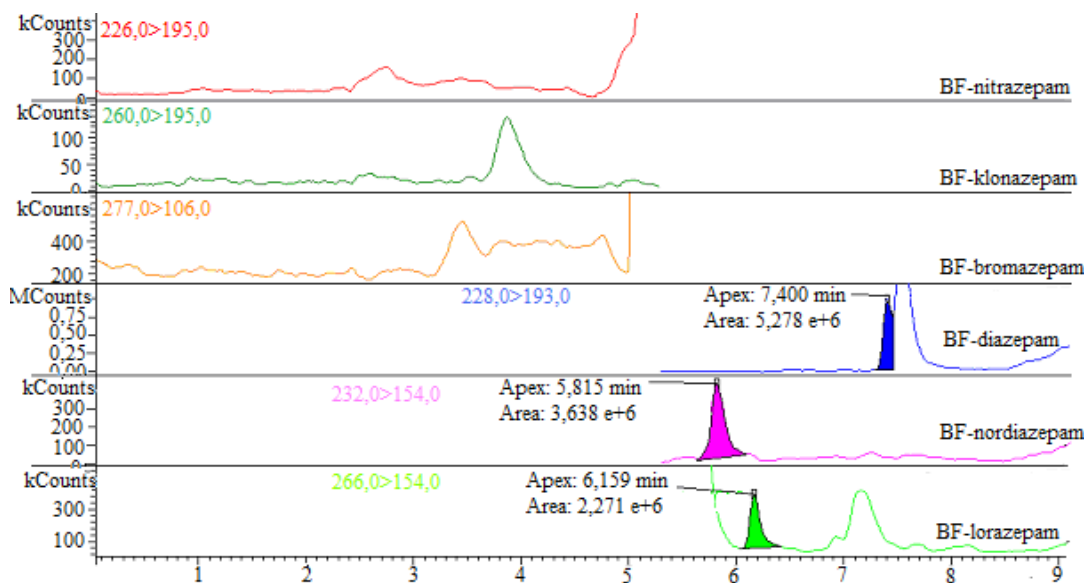
6.4 LC/MS-MS ANALIZA URINSKIH VZORCEV PREISKOVANCEV

Validirano optimizirano LC/MS-MS metodo smo nato prenesli še na realne vzorce. V analitski sistem smo injicirali 14 predhodno pripravljenih vzorcev urina preiskovancev. Rezultati analize so pokazali, da je bilo 7 preiskovancev pozitivnih na prisotnost benzofenonov v urinu. Ostali so bili negativni (slika 18).



Slika 18: Primer negativnega vzorca urina

Od pozitivnih je 1 vzorec vseboval samo benzofenon diazepam, v šestih pa je bil prisoten še benzofenon nordiazepam. V urinu enega izmed teh preiskovancev smo odkrili tudi navzočnost benzofenona lorazepam (slika 19). Koncentracija vseh benzofenonov je bila med 13 in 375 $\mu\text{g/L}$.



Slika 19: Primer vzorca urina pozitivnega na diazepam, nordiazepam in lorazepam

7. RAZPRAVA

Benzodiazepini so skupina psihoaktivnih učinkovin, ki zavirajo delovanje živčnega sistema. Pri tem pride do anksiolitičnega, antikonvulzivnega, miorelaksantnega oziroma sedativnega učinka. V primerjavi s sorodno delujočimi učinkovinami imajo benzodiazepini večjo terapevtsko širino in manj neželenih učinkov, zato je njihova raba močno razširjena. Posledica nenehnega vnašanja je odvisnost in odtegnitevena kriza, ki lahko vodi v zlorabo. Običajno se benzodiazepini izrabljajo sočasno z ostalimi psihoaktivnimi učinkovinami kot na primer opoidi (metadon). Heroinski odvisniki jih v času zdravljenja z metadonom jemljejo zlasti z namenom podaljšanja oziroma stopnjevanja učinkovanja metadona. Uspešnost odtegnitvenega programa lahko spremljamo s toksikološko analizo učinkovin v prisotnih v krvi oziroma urinu posameznika. Zaradi neinvazivnosti pri odvzemu in višjih koncentracij benzodiazepinov je urin na tem področju primernejši vir identifikacije kot kri. Klinična in forenzična toksikološka analitika terapevtskih učinkovin običajno združuje dve vrsti metod: detekcijsko (imunokemijska) in potrditveno (kromatografsko). Z imunokemijsko metodo preverimo prisotnost benzodiazepinov v vzorcu urina. Ker so rezultati lahko lažno negativni oziroma pozitivni (pogosteje), jih je potrebno potrditi z zanesljivejšo metodo. Pri tem se uporablja plinska (GC) oziroma tekočinska kromatografija (LC) v kombinaciji z masno spektrometrijo (MS). Sklop ene ali druge kromatografije z masno spektrometrijo zagotavlja primerno selektivnost in občutljivost merjenja.

V diplomski nalogi smo skušali optimizirati postopke priprave vzorcev hidrolizatov benzodiazepinov v urinu preiskovancev, ki so na metadonski terapiji. Pripravljene vzorce smo analizirali z LC/MS-MS metodo, ki smo jo predhodno validirali na standardnih raztopinah ter urinskih standardih. Primernost metode in priprave vzorca smo najprej preverili po že pripravljeni metodi (45), kateri smo želeli izboljšati ponovljivost ekstrakcije (> 20 %) in izkoristek ekstrakcije (< 54 %). Pri tej metodi smo uporabili kolono Luna C₁₈ (2); 250×4,6 mm. Na urinskih standardih s koncentracijo 50 µg/L smo določili izkoristek ekstrakcije in njeno ponovljivost. Pri izbiri ustreznih analitskih pogojev smo si pomagali s podatki iz prej pripravljene metode. Za razliko od slednje smo dodatno analizirali še benzofenon nitrazepam. V nadaljevanju smo metodo nekoliko optimizirali. Tako smo pri modificirani metodi skrajšali čas analize, razširili območje merjenja, izbrali

bolj specifične fragmente in upoštevali odziv internega standarda. Kolona, ki smo jo pri tem uporabili, je bila Luna C₁₈ (2); 50×2,0 mm.

Na začetku smo pripravili standardno raztopino benzofenonov s koncentracijo 1000 µg/L. Slednjo smo primerno redčili s 50 % metanolom in pri tem dobili standardne raztopine s koncentracijami od 10 do 1000 µg/L. Vsako raztopino smo posamično injicirali v injektor LC dela. Od tam je potovala do kolone, kjer se je porazdelila med mobilno in stacionarno fazo. Mobilna faza je bila sestavljena iz acetatnega pufra (mobilna faza A) s pH 3,8 in acetonitrila (mobilna faza B). Izvajali smo gradientno elucijo. V časovnem intervalu od 0 do 7,5 min pri pretočni hitrosti 0,4 mL/min je bila vsebnost mobilne faze B 35-80 %, od 7,5 do 9 min pri pretočni hitrosti 0,7 mL/min pa 35 %. Na kromatogramu smo opazovali in pazili na ločljivost izbranih vrhov benzofenonov. Dobra resolucija med vrhovi benzofenonov je namreč osnova za zagotavljanje selektivnosti metode. Vsi fragmenti izbrani za posamezne benzofenone se eluirajo v času od 0 do 9 min.

Iz standardnih raztopin benzofenonov smo pripravili urinske vzorce v koncentracijskem območju 5-500 µg/L. Dvema paralelkama slepega urina smo dodali ustrezne količine standardov. Prvi paralelki smo dodali pred ekstrakcijo, drugi pa po njej.

Urine z benzodiazepini smo kislo hidrolizirali v pripadajoče benzofenone. Zaradi pretvarjanja benzodiazepinov v skupen analit benzofenon smo lahko določili večje število različnih benzodiazepinov oziroma njihovih presnovkov, ki se nahajajo v urinu. Slednji se lahko pretvorijo v enake benzofenone, zato metoda ni toliko primerna (specifična) za analitiko posameznih benzodiazepinov. Benzofenone smo nato iz urina izolirali z ekstrakcijo z etilacetatom. Na ta način smo lahko zmanjšali vpliv domnevnih interferenc iz matriksa (ozadje) na občutljivost metode. Da bi bila ekstrakcija kar se da učinkovita, smo jo na posameznem vzorcu ponovili štirikrat. Ekstraktu z benzofenoni (organska faza) smo dodali sušilno sredstvo (natrijev sulfat). S tem smo lahko odstranili vodo, ki po ekstrakciji ostane v organski fazi. Slednjo smo prefiltrirali, topilo iz filtrata pa odparili na rotavaporju. Osušen vzorec z benzofenoni smo raztopili v metanolu. Pripravljene urinske vzorce smo injicirali v LC/MS-MS analitski sistem, čigar primernost smo v nadaljevanju preverili.

Visoko gostotne komponente iz matriksa lahko zamašijo notranjost kolone in komponente masnega analizatorja, zato smo vzorce najprej vodili na predkolono, Luna C₁₈ (2);

4×2,0 mm. Nato smo jih po ločevanju na koloni usmerili proti MS-delu, kjer smo najprej preverili selektivnost metode. Pri tem smo analizirali dva urinska vzorca. V prvi alikvot smo dodali vse standarde benzofenonov, drugi pa je kot slepi vzorec služil za preverjanje ozadja. Primerjali smo odziv obeh alikvotov in ugotovili, da je metoda selektivna za vse benzofenone. Preden lahko iz dobljenih odzivov določimo pripadajoče koncentracije benzofenonov, moramo ugotoviti njihovo medsebojno povezavo. S tem namenom smo vsem benzofenonom v urinskih standardih in standardnih raztopinah naredili umeritveno premico. Ker je bila vrednost determinacijskega koeficienta obeh umeritvenih premic (standardnih raztopin in urinskih standardov) pri vseh benzofenonih večja od 0,95, je metoda v območju analize linearna. Pri analizi standardnih raztopin smo upoštevali odziv internega standarda (benzofenon klonazepama). Ponovljivost injiciranja standardov je bila dobra pri vseh merjenih koncentracijah (10-1000 µg/L). Točnost metode je za standardne raztopine v območju koncentracij 25-1000 µg/L.

V nadaljevanju smo skušali ugotoviti, kako učinkovita je bila ekstrakcija. Z uporabo dveh metod smo merili spremembe v odzivnosti v standardih urina pred in po ekstrakciji. Izkoristek ekstrakcije določen po že pripravljene metodi je bil dober za večino benzofenonov (nad 56 %). Izjemi sta benzofenon bromazepama (masa 277-106) s 37,1 % in benzofenon lorazepama (masa 154-126) s 121,8 % izkoristkom. Ker je metoda selektivna za vse benzofenone, odstopajoče vrednosti obeh nista rezultat navzkrižnih reakcij. Slab izkoristek benzofenona bromazepama lahko pripišemo izgubam med ekstrakcijo oziroma separacijo na kromatografskem delu. Prebitek benzofenona lorazepama je najverjetneje nastal zaradi napak v času priprave vzorca oziroma izbire neprimerne fragmenta. Ker je ponovljivost ekstrakcije pri večini benzofenonov precej slaba (RSD > 15 %), dobljeni rezultati niso zanesljivi.

Po optimizaciji metode je bilo podobno. Kljub velikemu izkoristku, vrednosti so med 72 in 96 %, ekstrakcija ni dala ponovljivih rezultatov. Z uporabo internega standarda (benzofenon klonazepama) smo ocenili napake, ki so nastale zaradi razlik v pripravi posameznih vzorcev. Ugotovili smo, da se je ponovljivost ekstrakcije za vse benzofenone močno izboljšala (RSD < 15 %). Točnost metode smo določili s primerjavo izračunane koncentracije (iz umeritvene premice) in dejanske vrednosti. Pri 500, 250 in 100 µg/L je metoda točna za vse razen za benzofenon nitrazepama. Meja kvantifikacije slednjega je pri 250 µg/L. Najnižja točno določena koncentracija je pri benzofenonu nordiazepama

100 µg/L, pri benzofenonu diazepama oziroma lorazepama 25 µg/L. Le benzofenon bromazepama ima mejo kvantifikacije pri 10 µg/L. Mejo detekcije smo določili pri 5 µg/L.

Optimizirano pripravo vzorca in LC/MS-MS metodo smo na koncu preizkusili še na realnih urinih preiskovancev. Uporabili smo 14 urinskih vzorcev odvisnikov od heroina, ki so na metadonski odtegnitveni terapiji v Zdravstvenem domu Nova Gorica. Na podlagi rezultatov smo ugotovili, da je bilo 7 preiskovancev pozitivnih na prisotnost benzofenonov. Ostali so bili negativni. Od pozitivno določenih je bil le 1 vzorec pozitiven na diazepam, 6 še hkrati na nordiazepam. V enem izmed slednjih vzorcev smo poleg nordiazepama in diazepama potrdili tudi prisotnost lorazepama. Vsi benzofenoni so se nahajali v območju koncentracij, 13-375 µg/L.

8. SKLEPI

V diplomski nalogi smo skušali optimizirati pripravo vzorcev hidrolizatov benzodiazepinov iz urina. Te smo analizirali z LC/MS-MS analitskim sistemom, čigar ustreznost smo predhodno preverili.

Pripravljene vzorce urina smo najprej analizirali po že pripravljeni metodi (45). Pri tej smo določali izkoristek ekstrakcije in ponovljivost ekstrakcije ter ju skušali izboljšati. Izkoristek ekstrakcije je za večino benzofenonov dober (56-78 %), a je ponovljivost slaba (> 20 %). Izjema je benzofenon lorazepam oziroma bromazepam, čigar prebitek oziroma majhen izkoristek je najverjetneje posledica napak med pripravo vzorca. Eden od možnih razlogov za prebitek benzofenona lorazepam je tudi izbira neustreznih fragmentov.

V nadaljevanju smo izkoristek ekstrakcije in njeno ponovljivost preverili še z uporabo optimizirane metode, pri kateri smo razširili območje merjenja, skrajšali čas analize, izbrali bolj specifične fragmente in upoštevali odziv internega standarda. Na kromatogramu benzofenonov v vzorcu urina se mase izbranih benzofenonov eluirajo ločeno od interferenc iz ozadja, zato je metoda selektivna za vse izbrane benzofenone. Slednjim smo v urinskih vzorcih naredili umeritveno premico in ugotovili, da je metoda linearna v območju koncentracij 5-500 µg/L ($R^2 > 0,95$). Preverili smo učinkovitost ekstrakcije kot separacijske tehnike. Izkoristek ekstrakcije je dober pri vseh benzofenonih (72-96 %), njena ponovljivost pa tako kot pri začetno uporabljeni metodi slaba (> 20 %). Z uporabo internega standarda (benzofenon klonazepam) se ponovljivost metode drastično zveča. Ker relativni standardni odklon ne preseže 15 %, je metoda ponovljiva. Pri večini benzofenonov je točnost zadovoljiva pri 500, 250 in 100 µg/L. Meja kvantifikacije benzofenona nitrazepam oziroma nordiazepam je 250 µg/L oziroma 100 µg/L. Pri benzofenonu diazepam oziroma lorazepam ta znaša 25 µg/L. Najmanjša koncentracija benzofenona bromazepam, ki jo lahko točno kvantificiramo, je 10 µg/L. Meja detekcije je za vse benzofenone 5 µg/L.

Na koncu smo analizirali 14 realnih vzorcev urina heroinskih odvisnikov zdravljenih z metadonom. 7 preiskovancev je bilo na prisotnost benzofenonov pozitivnih. Od teh je 1 vzorec vseboval le benzofenon diazepam, 6 pa še dodatno benzofenon nordiazepam. Eden od slednjih je bil pozitiven tudi na lorazepam. Njihove koncentracije so bile v območju 13-375 µg/L.

V ustaljeni laboratorijski diagnostiki navzočnost benzodiazepinov v urinu običajno najprej ugotavljamo z imunokemijsko metodo. Pri tem se uporabljajo testni lističi, encimsko imunološka oziroma radioimunološka tehnika. Zaradi pojava lažnih rezultatov vse pozitivne vrednosti preverimo s potrditveno metodo, ki je bolj občutljiva in specifična. Najzanesljivejšo analitiko benzodiazepinov v urinu nam omogoča sklop kromatografije in masne spektrometrije. Z LC/MS-MS metodo smo lahko določili vse izbrane benzodiazepine. Skoraj vsi slednji spadajo med najpogosteje rabljena in tako tudi zlorabljena zdravila. Na podlagi tega lahko sklepamo, da bi bila uporabljena metoda lahko primerna za aplikacijo v splošni toksikološki analitiki.

9. LITERATURA

1. Ashton CH: History of benzodiazepine: What the textbooks may not tell you. 3rd Annual Benzodiazepine Conference, 12 Oct 2005, Banger, Main (<http://psychmedaware.org/HistoryBenzodiazepines.html>-6.9.2008)
2. Foltz RL, Fentiman AF, Foltz RB: Diazepam and its major metabolite N-desmethyldiazepam. GC/MS Assays for abused drugs in body fluids-NIDA Research Monograph 32, DHHS, 1980: 1-3, 128
3. Schmitzer Z: Anksiolitiki. Zbornik Nefrotske, stresne, somatoforme motnje v splošni medicini in psihiatriji, Psihiatrična bolnica Begunje 1996: 138-43
4. Martin IL, Dunn SMJ: GABA Receptors. Tocris Reviews No. 20; 2002: 1-4
5. Singer K: Recent advances in benzodiazepines. J Hong Kong Med Ass 1986; 38(2): 69-74
6. Moehler H, Fritschy JM, Rudolph U: A new benzodiazepine pharmacology. JPET 2002; 300: 2-3
7. Gamma-Aminobutyric Acid (GABA). Alternative Medicine Review 2007; 12(3): 274-9 (www.thorne.com/media/GABAMono12-3.pdf- 6.9.2008)
8. Danneberg P, Weber KH: Chemical structure and biological activity of the diazepam. Br J Clin Pharmacol 1983; 16: 231-43
9. Glennon RA, Young R: The study of structure-activity relationships using drug discrimination methodology. Methods of assessing the reinforcing properties of abused drugs; Springer-Verlag, New York, 1987: 373-90

10. Nakajima R, Hattori C, Nagawa Y: The study of structure-activity relationships of s-triazolo-1,4 benzodiazepines in central nervous depressant action. *Japan J Pharmacol* 1971; 21(4): 489-95
11. Programme on substance abuse: Rational use of benzodiazepines. WHO/PSA/96.11, WHO 1996: 6-13
12. Register zdravil RS, IVZ, Ljubljana 2007
13. Navodila za zdravila: Oksazepam[®], Xanax[®], Helex[®], Loram[®], Lexaurin[®], Apaurin[®], Diazepam[®], Fluzepam[®], Rivotril[®] (www.zdravila.net- 12.11.2008)
14. Hung OR, Dyck JB, Varvel J, Shafer SL, Stanski DR: Comparative absorption kinetics of intramuscular midazolam and diazepam. *Can J Anaest* 1996; 43(5): 450-5
15. Peterson LJ: Clinical assessment of new i.v. sedation. *J Dent Res* 1984; 63(6): 838-41
16. Alavijeh MS, Chishty M, Qaiser MZ, Palmer AM: Drug metabolism and Pharmacokinetics, The blood-brain barrier and Central nervous system. *Neuro Rx[®]: J Am Society for Experimental Neuro Therapeutics* 2005; 2(4): 554-71
17. Lee G, Dallas S, Hong M, Bendayan R: Drug transporters in the central nervous system: Brain barriers and Brain parenchyma considerations. *Pharmacol Rev* 2005; 53(4): 569-96
18. Pocajt M, Širca M: Anatomija in fiziologija za medicinske šole, 3.izdaja, DZS, Ljubljana, 1999: 99, 103-4
19. Pary R, Lewis S: Prescribing benzodiazepines in clinical practise. *Resident & Staff Physician* 2008; 54(1)

20. Longo LP, Johnson B: Addiction: Part 1. Benzodiazepines-Side Effects, Abuse Risk and Alternatives. *Am Fam Physician* 2000; 61: 2121-8
21. Mimica N, Folgenović Šmalc V, Uzun S, Rušinović M: Benzodiazepini za i protiv. *Medicus* 2002; 11(2): 183-8
22. Rickels K: Benzodiazepines: Clinical Use Patterns; Kales A: Benzodiazepine Hypnotics: Carryover Effectiveness, Rebound Insomnia and Performance Effects; Hollister LE: Dependence on Benzodiazepines. *Benzodiazepines: A Review of Research Results*, NIDA Research Monograph 33, DHHS, 1980: 43-60; 61-9; 70-82
23. Paton C: Benzodiazepines and disinhibition: a review. *Psychiatric Bulletin* 2002; 26: 460-2
24. Lee Oei J: Benzodiazepines. Background Papers to the National clinical guidelines for the management of the drug use during pregnancy, birth and early development years of the newborn, NSW Department of health (Ed.), Sydney, 2006: 117-20
25. Marušič A, Vovk T: Problematika rabe anksiolitikov pri motnjah razpoloženja-kritična populacija starostnikov. *Nacionalni bilten o zdravilih: Farmakon* 27; 2007: 3-4
26. Brvar M, Možina M: Zastrupitve z zdravili v Sloveniji. *Zdrav Vestn* 2008; 77: 39-45
27. Schwartz RH, Weaver AB: Rohypnol, The date rape drug. *Clin Pediatr.* 1998; 37: 321-2
28. Sprenger H, Sharpe MD, Mc Lachlan S: Flumazenil as diagnostic tool in differential of coma in a critically ill patient. *Can J Anaest* 1994; 41(1): 52-5
29. Lastnosti zdravila flumazenil:
www.umm.edu/altmed/drugs/flumazenil-054925.htm#Drug%20Interactions-12.11.2008

30. Scheepers LD, Montgomery CJ, Kinahan AM, Dunn GS, Bourne RA, McCormack JP: Plasma concentrations of flumazenil following intranasal administration in children. Can J Anaesth 2000; 47(2): 120-4
31. Rose S: Toxicology testing-prevention of adverse drug reactions. Clinical Lab Products 2008; 7
32. http://www.alwaystestclean.com/blood_drug_test.htm-12.10.2008
33. http://www.alwaystestclean.com/urine_drug_test.htm-12.10.2008
34. Hawks RL: Analytical Methodology; Blanke RV: Accuracy in urinalysis; Hawks RL, Chiang CN: Examples of specific drug assays. Urine testing for drugs of abuse, NIDA Research Monograph 73, DHHS 1986: 31-42; 43-53, 111
35. Vozelj M: Temelji imunologije, 1.izdaja, DZS, Ljubljana, 2000: 103, 111-3
36. EMIT[®] homogenous enzyme immunoassays in principle. Syva[®] Products 2004, Dade Behring
37. Priložena navodila: Syva[®] RapidTest d.a.u.[®] BZO Assay, Dade Behring www.drugperspectives.com/content/benz.pdf-4.11.2008
38. Benzodiazepinski urinski testni listič-opis: BZO One Step Benzodiazepines Test Strip www.rapiddrugdetection.com/pdf_files/package_benzodiazepine.pdf-4.11.2008
39. Beck O, Lafolie P, Hjemdahl P, Borg S, Gudrun O, Wirbing P: Detection of benzodiazepine intake in therapeutic doses by immunoanalysis of urine: two techniques evaluated and modified for improved performance. Clin Chem 1992; 38(2): 271-5

40. Priložena navodila: Urine Adulteration Test Strip, DIPRO med Handels GmbH
www.dipro.co.at/pdf/dipro_pdf_4535e74fc426f.pdf- 4.11.2008
41. Kujundžić N, Živčić-Alegretti V, Živković A: Osnove analitičke kemije, 1. izdaja, Školska knjiga, Zagreb, 1999: 645-8,674-5, 692-4, 708-14
42. Basics of LC/MS. Agilent Technologies 2001: 4-6
(www.agilent.com/chem- 8.9.2008)
43. Poletini A: Applications of LC-MS in Toxicology, 6th Ed., Pharmaceutical Press, 2006: 1-3, 6-8, 11, 12, 27, 37, 38, 50-53,57-64, 72-86, 88, 111, 112
44. Quintela O, Sauvage FL, Charvier F, Gaulier JM, Lachatre G, Marquet P: Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry for detection of low concentrations of 21 benzodiazepines, metabolites, and analogs in urine: method with forensic applications. Clin Chem 2006; 52 (7): 1346-55
45. Šporar I: Razvoj LC/MS-MS analizne metode za določanje hidrolizatov benzodiazepinov v urinu. Diplomaska naloga 2007
46. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. FDA/Center For Drug Evaluation and Research; 2001 (www.fda.gov/cder/guidance/index.htm-8.9.2008)