

DETERMINATION OF DILTIAZEM IN *POST-MORTEM* BLOOD BY HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

Marianna KISZKA, Roman MADRO

Chair and Department of Forensic Medicine, Medical Academy, Lublin

ABSTRACT: The analytical conditions used in the determination of diltiazem (D) and deacetyldiltiazem (DAD) in post mortem blood using high-performance liquid chromatography (HPLC) are presented and a simple method of preparing DAD is described. These xenobiotics were isolated from blood by liquid-liquid extraction (LLE) in a moderately alkaline medium with application of a mixture of dichloromethane and ether and determined with a liquid chromatograph (Gilson), using a Hypersil ODS (250 × 4 mm, 5 µm) column, a mobile phase of 1.5 ml/min flow (in an isocratic system of two pumps) consisting of acetonitrile and phosphate buffer at pH = 3 (0.025 M solution of phosphoric acid with addition of 6 ml of triethylamine per 1 litre) in proportions 25:75 and UV detection at 235 nm. Good separation of D and DAD from *post mortem* background was achieved and the average recovery from blood was 78% and 71% respectively. The level of detection of both xenobiotics was about 0.5 µg/ml (with a coefficient of variation CV within the range 2.6–9.1%). The method did allow us to determine concentrations that were twice as low (0.25 µg/ml), but at the cost of a decrease in precision (CV = 16.0–17.8%).

KEY WORDS: Diltiazem; Deacetyldiltiazem; Determination; High-performance liquid chromatography; *Post-mortem* blood.

Problems of Forensic Sciences, vol. LIII, 2003, 22–37

Received 1 April 2003; accepted 12 May 2003

INTRODUCTION

Diltiazem (D) is a medicine that blocks calcium channels in the myocardium and blood vessels. It widens coronary and peripheral blood-vessels, has a negative inotropic effect on the myocardium, impedes conductivity in the dromotropic system of the heart, and acts hypotensively. It is mostly applied in the treatment of angina pectoris, arterial hypertension and arrhythmia. It is absorbed well from the alimentary canal, attaining a maximum concentration in the blood after 3–4 hours, but is strongly affected by the first transition effect. The half-life of this medicine is 4–8 hours. 65% is excreted in faeces, and 35% in urine, mostly in the form of metabolites [16].

Diltiazem is metabolised mainly in the liver. Its deacetylation and N-demethylation lead to creation of deacetyldiltiazem (DAD) and N-demethyldiltiazem (DMD), which show about 20–50% of the pharmacological activity of the parent medicine. Next, both metabolites undergo further transformation to inactive N-demethyldeacetyldiltiazem [4, 11, 12, 14, 20]. The main directions of metabolic transformations of D are presented in Figure 1.

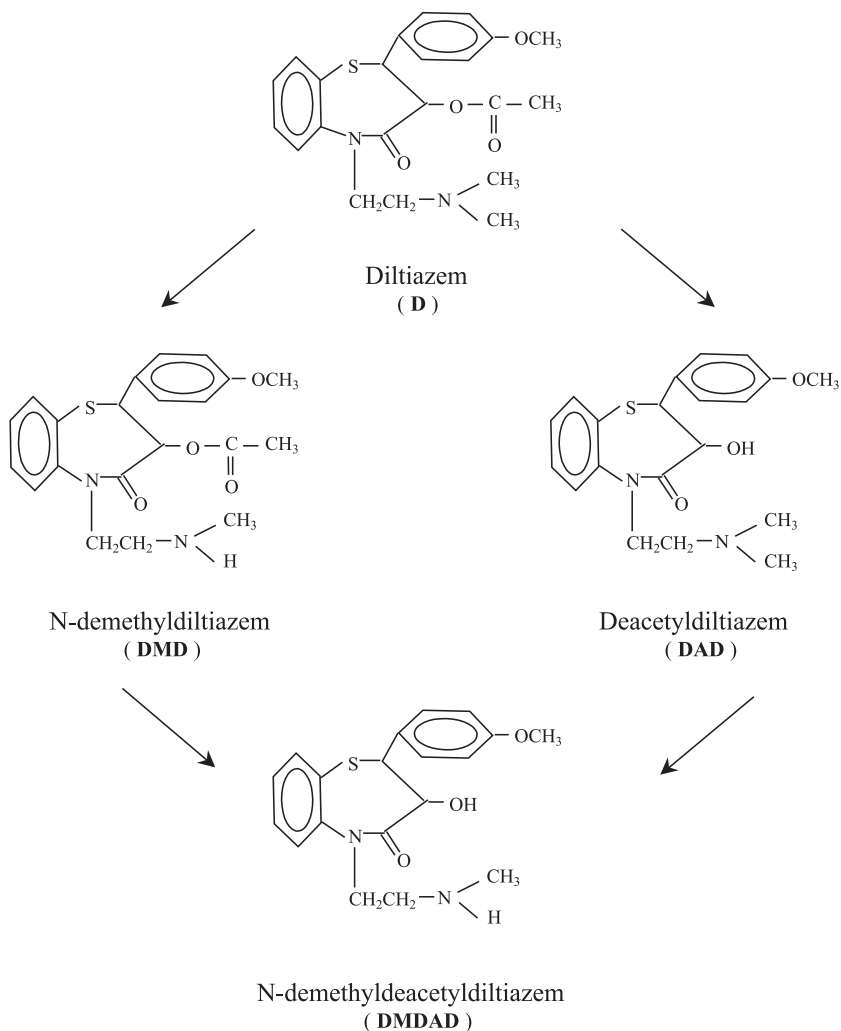


Fig. 1. Main pathways of the metabolism of diltiazem.

Due to its wide use, D is sometimes the cause of acute intoxication or death [2, 10, 13, 17, 18, 22]. In the course of routine work at the Department

of Forensic Medicine in Lublin, the presence of D in *post mortem* material was ascertained in two cases. During quantitative analysis of the medicine in blood (by means of HPLC), in both cases, besides the unchanged medicine, the presence of considerable quantities of its derivatives was also ascertained.

Because metabolism of D is intensive both in vivo and in vitro, conditions of quantitative analysis have to be established exactly and, above all, the stability of the drug has to be checked during analysis in order to ensure correct determination of the concentration of the medicine in blood taken from the body (and subsequent correct interpretation of results). The majority of the methods of determination of D and its metabolites by the HPLC method described in the literature relate to plasma [1, 3, 5, 6, 7, 9, 12, 19]. Serum [15] and blood [13] have also been examined. The following methods of isolation of xenobiotics were used: liquid-liquid extraction [5, 7, 9, 12, 13, 15, 19], often combined with re-extraction [7, 9, 12, 13, 15], and, more seldom, extraction from the solid phase [1, 3, 6].

MATERIAL AND METHODS

For the isolation of xenobiotics from blood, extraction in an alkaline environment using a dichloromethane-ether 1:1 mixture (according to the scheme in Figure 2) was applied. The remains after evaporation of extracts were dissolved in 10^{-4} M hydrochloric acid solution and – in parallel – in a mixture of acetonitrile and phosphate buffer (providing the moving phase).

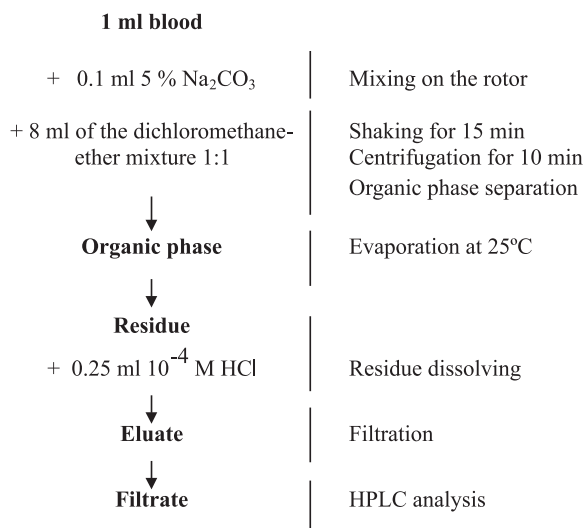


Fig. 2. A scheme of extraction of diltiazem and deacetyldiltiazem from blood.

Determinations were performed with the use of a Gilson liquid chromatograph equipped with a Hypersil ODS column (250×4.0 mm, $5 \mu\text{m}$), to which $10 \mu\text{l}$ of the extract was introduced, a moving phase of 1.5 ml/min flow (in the isocratic system, i.e. in a system of two pumps) composed of acetonitrile and phosphate buffer of about $\text{pH} = 3$ (0.025 M solution of phosphoric acid with addition of 6 ml of triethylamine per litre) in $2:75$ proportions v/v and UV detection at 235 nm.

In the first stage of the experiment, the stability of D in solutions of different pH was checked. To this end, solutions of D (at a concentration of $6 \mu\text{g/ml}$) in deionised water, 10% Na_2CO_3 solution, 0.1 M NaOH and 0.1 M HCl were prepared and analysed after 24 hours of storage at room temperature.

Results of this stage are presented in Figure 3. They were utilised to work out a method of obtaining a deacetyldiltiazem (DAD) standard (DAD is one of the main metabolites of D).

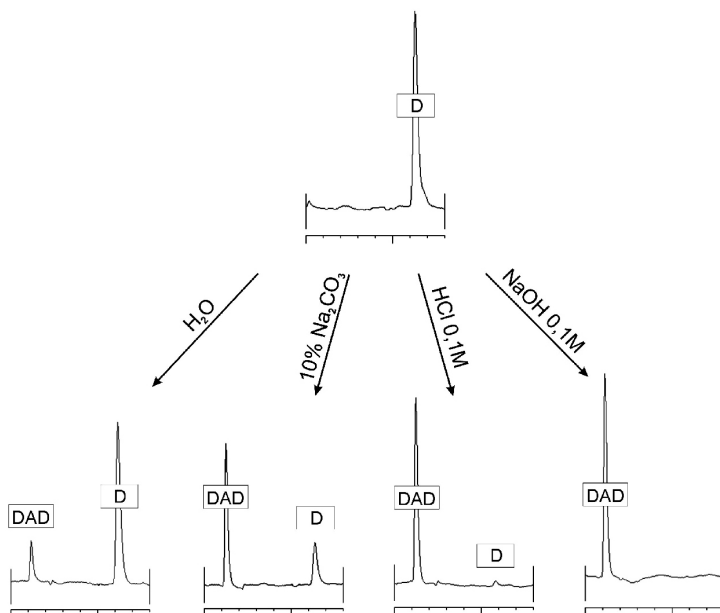


Fig. 3. Decomposition of diltiazem (D) to deacetyldiltiazem (DAD) after 24 -hour storage in solutions of various pH.

Next, standard solutions of DAD obtained in accordance with the procedure presented in Figure 4 were checked using the following methods:

- UV spectrophotometry (a Cecil CE 7200 spectrophotometer) in a solution of 0.1 M hydrochloric acid and ethanol in the range 190 – 350 nm;
- thin-layer chromatography (on plates by Merck coated with F_{254} silica gel) using a mixture of methanol and ammonia water ($100:1.5$, v/v) as

- a developing system and as a chromatogram developing system, applying, in turn: Dragendorff reagent, 10% sulphuric acid, 5% iron chloride solution, potassium iodoplatinate and 10% sulphuric acid;
- c) a combined TLC and HPLC method, i.e. analysis of ethanol eluates of chromatographic zones corresponding to blots of standard D and DAD by the HPLC method;
 - d) HPLC in the above-mentioned analytical conditions.

In the second stage, the usefulness of the HPLC method in the determination of D and DAD in blood was evaluated. For this purpose, precisely defined quantities of standard solutions of D and DAD were added to samples of post mortem blood (in which the presence of pharmacological substances had previously been excluded) in order to obtain the following concentrations: 0.25, 0.5, 1.0, 3.0 and 6.0 $\mu\text{g/ml}$, and then the samples were subjected to extraction according to the scheme presented in Figure 2 and to analysis by the HPLC method described above.

The content of D and DAD in extracts from blood was determined by the external standard method from calibration curves prepared from standards in the range 0.25–6.0 $\mu\text{g/ml}$ of blood, which were subjected to identical analytical procedure to the blood samples.

To determine the recovery of xenobiotics from blood, calibration curves were used that had been obtained by appropriate dilution and analysis of the same standard solutions of D and DAD by the HPLC method (omitting the extraction stage). The above analytical procedure was used for determination of D and DAD in post-mortem blood in two cases of fatal poisoning with this medicine.

RESULTS AND DISCUSSION

Results of the first stage of research, i.e. the influence of pH on the stability of D in its solutions kept for 24 hours at room temperature, are presented in Figure 3. One can observe there that after this time of storage, hydrolysis of D always occurred (for the DAD peak appeared in HPLC chromatograms), the intensity of which depended on the pH of the environment: about 10% of D decomposed in deionised water, and about 70% in carbonate solution, whereas in alkaline solution the decomposition of D was complete, and in acidic solution it was almost complete, which was utilised to obtain DAD.

Results of analysis of the standard solution of DAD (obtained according to the scheme in Figure 4) are presented in Table I. Maximum absorption of DAD was identical to that of D (240 and 236 nm in ethanol and hydrochloric acid solution respectively). Both xenobiotics can, however, be differentiated by the TLC method. In the widely used methanol-ammonia system, various

values of R_f were obtained for the parent medicine (0.64) and its metabolite (0.55). The time of retention (RT) of ethanol eluates of TLC blots was characteristic both for D (11.2 min for the blot of $R_f = 0.64$) and for DAD (6.1 min for the blot of $R_f = 0.55$).

TABLE I. RESULTS OF THE ANALYSIS OF DILTIAZEM (D) AND DEACETYLDILTIAZEM (DAD) PREPARED ACCORDING TO THE SCHEME IN FIGURE 4

Drug	UV spectrophotometry (absorption maximum) [nm]		TLC method $R_f \times 100$	TLC+HPLC method Eluate of TLC spot RT [min]	HPLC method RT [min]
	Ethanol	0.1 M HCl			
D	240	236	64	11.2	11.2
DAD	240	236	55	6.1	6.1

Analysis by the HPLC method of the DAD standard obtained in the manner presented in Figure 4 showed, however, that hydrolysis of D in an acidic environment leads to complete decomposition of this substance. For a peak of $RT = 11.2$ was not observed on the HPLC chromatogram. Hydrolysis of D in an acidic environment in the conditions presented in Figure 4 makes it possible to obtain a DAD standard that is useful for quantitative analysis.

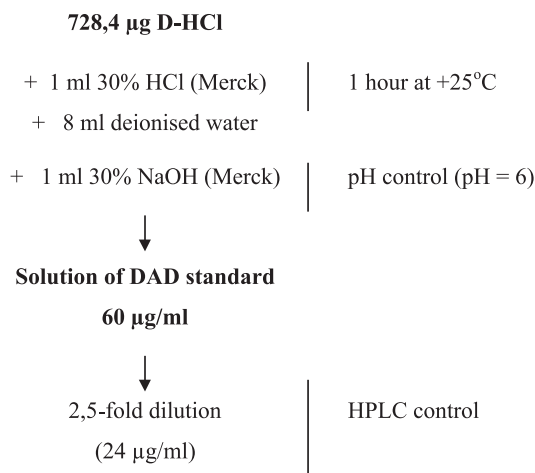


Fig. 4. A scheme of deacetyldiltiazem (DAD) preparation from diltiazem hydrochloride (D-HCl).

Coors et al. [7] did not state how they obtained the DAD (produced in their own laboratory), which they used when determining D and this metabolite in plasma with the use of capillary electrophoresis. Devarajan et al. [8],

during determination of diltiazem hydrochloride in pharmaceutical preparations (by the method of HPTLC combined with densitometric analysis) engendered decomposition of D by cooking in a solution of hydrochloric acid at pH = 1–2 for 20 min and then storage of the solution (after dilution with water) at a temperature of 60°C for 7 days. Analysis of the solution obtained in this way also showed two blots and two peaks, which the authors identified as D and DAD.

It should be emphasised that the procedure for obtaining DAD presented in Figure 4 has to be strictly complied with. Shortening the time of hydrolysis will not allow decomposition of the whole of D, whereas its prolongation will lead to the appearance of an additional peak of *RT* that is shorter than DAD (probably of a product of its decomposition). The order of subsequent stages of the method is also important, i.e. neutralising with a solution of sodium hydroxide after earlier addition of water, because omission of the dilution stage results in a mixture of D and DAD being obtained, probably due to reacylation.

Results of the second stage of the research are presented in Figure 5 and in Table II.

TABLE II. EVALUATION OF THE METHOD OF DILTIAZEM (D) AND DEACETYLDILTIAZEM (DAD) DETERMINATION IN POST MORTEM BLOOD

Initial concentration [µg/ml]		Recovery [%] ± standard deviation <i>n</i> = 8	Coefficient of variation [%]	Determined concentration [µg/ml] ± standard deviation <i>n</i> = 8	Coefficient of variation [%]
D	0.250	74.7 ± 10.7	14.4	0.261 ± 0.042	16.0
	0.500	78.8 ± 6.2	7.9	0.506 ± 0.046	9.1
	1.000	80.6 ± 6.5	8.0	0.953 ± 0.055	5.8
	3.000	75.3 ± 5.9	7.8	2.965 ± 0.137	4.6
	6.000	79.4 ± 3.5	4.5	6.069 ± 0.187	3.1
DAD	0.250	69.7 ± 11.4	16.3	0.239 ± 0.043	17.8
	0.500	66.7 ± 5.5	8.2	0.491 ± 0.030	6.1
	1.000	72.6 ± 4.4	6.1	1.059 ± 0.078	7.4
	3.000	74.6 ± 5.0	6.7	3.005 ± 0.160	5.3
	6.000	72.1 ± 3.6	5.1	5.946 ± 0.156	2.6

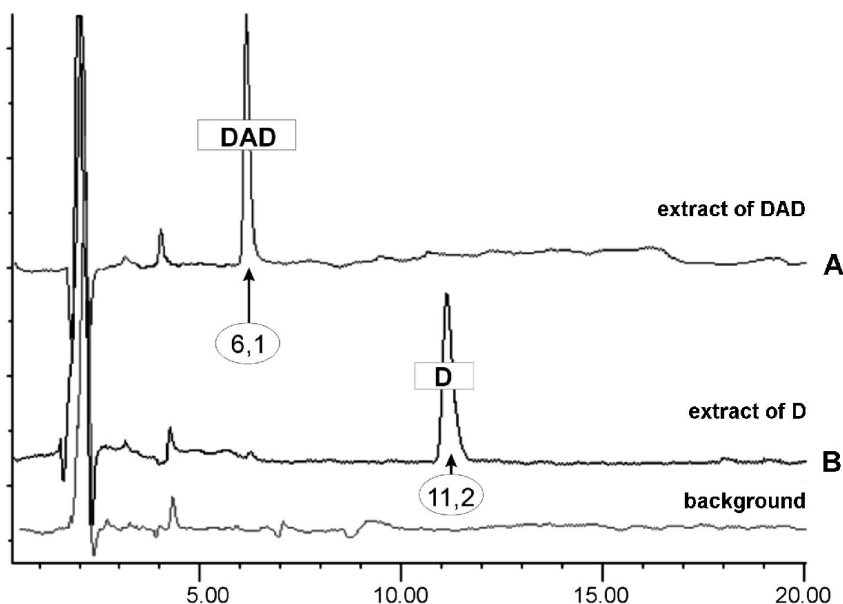


Fig. 5. HPLC chromatograms of extracts of blood supplemented with: A – deacetyl-diltiazem (DAD) to 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$, B – diltiazem (D) to 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Good isolation of D ($RT = 11.2$) and its metabolite DAD ($RT = 6.1$) from the biological background was achieved (Figure 5). The method of extraction shown in Figure 2 ensured sufficient stability of D, because in chromatograms of extracts of standard D no additional DAD peak was observed. Maintaining a moderately alkaline environment of extraction ($\text{pH} = 8\text{--}8.5$) turned out to be very important – this prevented the decomposition of D to DAD, which was observed at higher pH. It was also very important to dissolve evaporated extracts in a solution of hydrochloric acid, because then there was no interference from the biological background – whereas dissolution of extracts in a moving phase caused the appearance of additional peaks with a retention time similar to that of DAD.

The average recovery of D and DAD from blood (Table II) was 78% and 71%, respectively, but no perceptible dependence between recovery and the concentration of xenobiotics in this biological material was ascertained. The analytical method used allowed us to determine D and DAD with satisfactory accuracy at a concentration of 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (the coefficient of variability CV was situated within 2.6–9.1%), although it was possible to determine concentrations that were twice as low (0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$), but at a cost of a decrease in the precision of the method ($CV = 16.0\text{--}17.8\%$).

The use of a similar method of extraction allowed other authors [5, 7, 19] to achieve significantly lower limits of detection of D and DAD (to several

ng/ml). However, they examined plasma, which is an environment that is incomparably “purer” than *post-mortem* blood at varying degrees of biodegradation. The procedure presented in the current paper involves an increase in the limit of determination of xenobiotics (due to the relation between the volume of the chromatograph sample introduced onto the column of the chromatograph – 10 μl , and the entire volume of the eluate – 250 μl), but protects against background interference, which is significant in a simple single-stage extraction from *post-mortem* blood. The application of reextraction [9, 12, 15] enables one to obtain purer extracts and raises the sensitivity of the detection, but at the same time increases the possibility of errors and lengthens the time of analysis.

The sensitivity of the method achieved in this study should be considered suitable for the requirements of post mortem diagnosis of poisoning with D, especially if one takes into account that the therapeutic concentration of the medicine in blood is 0.05–0.4 $\mu\text{g/ml}$, the toxic concentration – above 0.8 $\mu\text{g/ml}$, and lethal – above 6 $\mu\text{g/ml}$ [17, 18, 21, 22, 23].

Chromatograms of extracts from blood obtained in two cases of poisoning with D, in which identical analytical procedures were applied (to those used in the course of the above-described research), are presented in Figure 6. Two pairs of peaks situated near to one another are visible on both chromatograms, two of which were identified as D ($RT = 11.2$) and its metabolite DAD ($RT = 6.1$). However, the two remaining peaks ($RT = 9.9$ and 5.2) were not identified due to lack of standards. From data provided in the literature, one may suppose that these are DMD and DMDAD respectively.

The ratios of concentrations D/DAD in blood samples of no. 1 and no. 2 were 5.7/21.5 $\mu\text{g/ml}$ and 6.3/3.7 $\mu\text{g/ml}$ respectively. Thus, a different degree of deacetylation of D was ascertained – this is one of the main metabolic processes of this medicine – and also of decomposition of D *in vitro* [9, 11, 24]. Therefore, one cannot determine the degree of progress of the metabolism of D *in vivo* on the basis of the ratio of concentrations D/DAD. Instead, the level of both xenobiotics should be determined, since only in this way can the approximate maximum concentration of the medicine in post mortem blood be established.

CONCLUSIONS

1. The presented analytical procedure (extraction and analysis by the HPLC method) enables one to determine both D and DAD in *post-mortem* blood at concentrations similar to the upper limit of therapeutic levels, i.e. from 0.5 $\mu\text{g/ml}$.

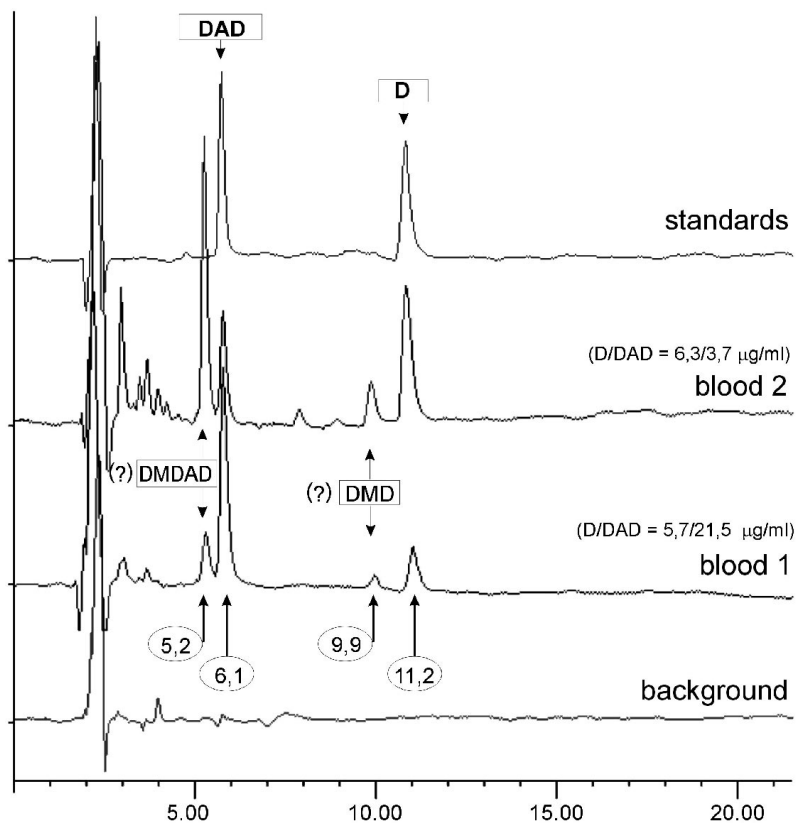


Fig. 6. HPLC chromatograms of blood extracts in two cases of poisoning with diltiazem (D – diltiazem, DAD – deacetyldiltiazem, DMD – N-demethyldiltiazem, DMDAD – N-demethyldeacetyldiltiazem).

2. In the diagnosis of fatal poisonings with D in blood received from a corpse, the level of DAD should also be determined: it is not only one of the main metabolites of D, but also a product of decomposition of this xenobiotic in blood *in vitro*.
3. The conditions of controlled hydrolysis of D in the acidic environment presented in this paper make it possible to obtain DAD which is suitable as a standard for quantitative analysis.

References:

1. Ascalone V., Locatelli M., Malavasi B., Determination of diltiazem and main metabolites in human plasma by automated solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography: a new method overcoming in-

- stability of compounds and interference problems, *Journal of Chromatography B* 1994, vol. 657, pp. 133–140.
2. Beno J. M., Nemeth D. R., Diltiazem and metoclopramide overdose, *Journal of Analytical Toxicology* 1991, vol. 15, pp. 285–287.
 3. Bouliou R., Bonnefous J. L., Ferry S., Solid-phase extraction of diltiazem and its metabolites from plasma prior to high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography B* 1990, vol. 528, pp. 542–546.
 4. Caille G., Boucher S., Spenard J. [et al.], Diltiazem pharmacokinetics in elderly volunteers after single and multiple doses, *European Journal of Drug Metabolism & Pharmacokinetics* 1991, vol. 16, pp. 75–80.
 5. Carignan G., Carrier K., Laganier S. [et al.], Simultaneous determination of diltiazem and quinidine in human plasma by liquid chromatography, *Journal of Chromatography B* 1995, vol. 672, pp. 261–269.
 6. Christensen H., Carlson E., Asberg A. [et al.], A simple and sensitive high-performance liquid chromatography assay of diltiazem and main metabolites in renal transplanted patients, *Clinica Chimica Acta* 1999, vol. 283, pp. 63–75.
 7. Coors C., Schultz H. G., Stache F., Development and validation of a bioanalytical method for the quantification of diltiazem and deacetyldiltiazem in plasma by capillary zone electrophoresis, *Journal of Chromatography A* 1995, vol. 717, pp. 235–243.
 8. Devarajan P. V., Dhavse V. V., High-performance thin-layer chromatographic determination of diltiazem hydrochloride as bulk drug and in pharmaceutical preparations, *Journal of Chromatography B* 1998, vol. 706, pp. 362–366.
 9. Dube L. M., Mousseau N., McGilveray I. J., High-performance liquid chromatographic determination of diltiazem and four of its metabolites in plasma: evaluation of their stability, *Journal of Chromatography A* 1988, vol. 430, pp. 103–111.
 10. Engelhart D. A., Lavins E. S., Seligman S. S. [et al.], Diltiazem and pentoxyfylline determination in post-mortem specimens, *Journal of Analytical Toxicology* 1997, vol. 21, pp. 576–579.
 11. Fraile L. J., Aramayona J. J., Bregante M. A. [et al.], Deacetylation of diltiazem by several rabbit tissues, *Pharmaceutical Research* 1996, vol. 13, pp. 1875–1880.
 12. Hussain D. M., Tam Y. K., Finegan B. A. [et al.], Simple and sensitive by high-performance liquid chromatographic method for determination of diltiazem and six of its metabolites in human plasma, *Journal of Chromatography B* 1992, vol. 582, pp. 203–209.
 13. Kalin J. R., Wood K. M., Lee A. J., A possible suicide by diltiazem overdose, *Journal of Analytical Toxicology* 1994, vol. 18, pp. 180–182.
 14. Levebvre M., Lacasse Y., Spenard J. [et al.], Pharmacokinetics and pharmacodynamics of a slow-release after the administration of single and repeated doses to healthy volunteers, *Biopharmaceutics & Drug Disposition* 1994, vol. 15, pp. 227–242.

15. Paczkowski D., Dąbrowski R., Sitkiewicz D. [et al.], Analysis of diltiazem and deacetyldiltiazem by high-performance liquid chromatography, *Polish Journal of Pharmacology* 1995, vol. 47, pp. 429–434.
16. Podlewski J. K., Chwalibogowska-Podlowska A., *Leki współczesnej terapii*, Wydawnictwa Fundacji Büchnera, Warszawa 1999.
17. Pufal E., Lis G., Sykutera M., Oznaczanie leków z grupy blokerów kanałów wapniowych w materiale sekcyjnym, *Archiwum medycyny sądowej i kryminologii* 1999, t. 49, s. 255–265.
18. Roper T. A., Sykes R., Gray C., Fatal diltiazem overdose: report of four cases and review of the literature, *Postgraduate Medical Journal* 1993, vol. 69, pp. 474–476.
19. Scully P., Meehan E., Kelly J. G., High-performance liquid chromatographic assay for diltiazem in small-volume blood specimens and application to pharmacokinetic studies in rats, *Journal of Chromatography A* 1996, vol. 729, pp. 297–300.
20. Tawashi M., Marc-Aurele J., Bichet D. [et al.], Pharmacokinetics of oral diltiazem and five of its metabolites in patients with chronic renal failure, *Biopharmaceutics & Drug Disposition* 1991, vol. 12, pp. 95–104.
21. Uges D. R. A., Therapeutic and toxic drug concentration, *The Bulletin of the International Association of Forensic Toxicologists* 1996, vol. 26, suppl., pp. 1–34.
22. Wiese J., Klug E., Schneider V. [et al.], Tödliche Diltiazemvergiftung, *Zeitschrift für Rechtsmedizin* 1988, Bd. 100, S. 171–176.
23. Winek C. L., Wahba W. W., Winek C. L. Jr. [et al.], Drug and chemical blood-level data 2001, *Forensic Science International* 2001, vol. 122, 107–123.
24. Yeung P. K., Mosher S. J., Klassen G. A. [et al.], Stability of diltiazem and its metabolites in plasma during storage, *Therapeutic Drug Monitoring* 1991, vol. 13, pp. 369–374.

OZNACZANIE DILTIAZEMU WE KRWI SEKCYJNEJ METODĄ WYSOKOSPRAWNEJ CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ

Marianna KISZKA, Roman MADRO

WSTĘP

Diltiazem (D) jest lekiem blokującym kanały wapniowe w mięśniu sercowym i naczyniach krwionośnych. Rozszerza naczynia wieńcowe i obwodowe, działa inotropowo ujemnie na mięsień sercowy, hamuje przewodnictwo w układzie bodźco-przewodzącym serca, działa hipotensyjnie. Stosowany jest głównie w leczeniu dusznicy bolesnej, nadciśnienia tętniczego i arytmii. Dobrze wchłania się z przewodu pokarmowego, osiągając po 3–4 godzinach maksymalne stężenie we krwi, ale w znacznym stopniu podlega efektowi pierwszego przejścia. Okres półtrwania tego leku wynosi 4–8 godzin. Wydalany jest w 65% z kałem, a w 35% z moczem, głównie w postaci metabolitów [16].

Diltiazem metabolizowany jest przede wszystkim w wątrobie. Jego deacetylacja i N-demetylacja prowadzą do powstania deacetylodiltiazemu (DAD) i N-demetylodiltiazemu (DMD), które wykazują około 20–50% aktywności farmakologicznej leku macierzystego. Następnie oba metabolity podlegają dalszej przemianie do nieczynnego N-demetylodeacetylodiltiazemu [4, 11, 12, 14, 20]. Główne kierunki przemian metabolicznych D przedstawia rycina 1.

Ze względu na szerokie zastosowanie, D bywa przyczyną ostrych zatruc lub zgonów [2, 10, 13, 17, 18, 22]. W praktyce Zakładu Medycyny Sądowej w Lublinie dwukrotnie stwierdzono obecność D w materiale sekcyjnym. Podczas oceny ilościowej leku we krwi (metodą HPLC) w obu przypadkach, oprócz leku niezmienionego, stwierdzono także obecność znacznych ilości pochodnych. Intensywny metabolizm D, zarówno *in vivo* jak też *in vitro* sprawia, że prawidłowe oznaczenie stężenia leku we krwi pobranej ze zwłok (i późniejsza interpretacja wyników) wymaga dokładnego określenia warunków analizy ilościowej, a przede wszystkim sprawdzenia stabilności leku podczas analizy. Większość opisanych w literaturze przedmiotu sposobów oznaczania D i jego metabolitów metodą HPLC dotyczy osocza [1, 3, 5, 6, 7, 9, 12, 19]. Badano również surowicę [15] i krew [13]. Do wyosobniania ksenobiotyków stosowano ekstrakcję ciecz-ciecz [5, 7, 9, 12, 13, 15, 19], często połączoną z reekstrakcją [7, 9, 12, 13, 15], rzadziej ekstrakcję z fazy stałej [1, 3, 6].

MATERIAŁ I METODY

Do izolacji ksenobiotyków z krwi zastosowano ekstrakcję w środowisku zasadowym przy użyciu mieszaniny dichlorometan-eter 1:1 (według schematu na rycinie 2). Pozostałości po odparowaniu ekstraktów rozpuszczano w 10^{-4} M roztworze kwasu solnego oraz – równolegle – w mieszaninie acetonitryl-bufor fosforanowy (stanowiącej fazę ruchomą).

Oznaczenia przeprowadzono przy użyciu chromatografu cieczowego firmy Gilson wyposażonego w kolumnę Hypersil ODS (250 × 4,0 mm, 5 μm), do której wprowadzono 10 μl ekstraktu fazy ruchomej o przepływie 1,5 ml/min (w układzie izokratycznym – w systemie dwu pomp) złożonej z acetonitrylu i buforu fosforanowego o pH = 3 (0,025 M roztwór kwasu fosforowego z dodatkiem 6 ml trietylaminy na 1 l) w proporcjach 2:75 v/v oraz detekcji UV przy 235 nm.

W pierwszym etapie eksperymentu sprawdzono stabilność D w roztworach o różnym pH. W tym celu sporządzono roztwory D (o stężeniu 6 μg/ml) w wodzie dejonizowanej, 10% roztworze Na₂CO₃, 0,1 M NaOH oraz 0,1 M HCl, które analizowano po 24 godzinach przechowywania w temperaturze pokojowej.

Wyniki tego etapu przedstawia rycina 3. Posłużyły one do opracowania sposobu otrzymywania wzorca deacetylodiltiazemu (DAD), tj. jednego z głównych metabolitów D.

Następnie wzorcowe roztwory DAD uzyskane zgodnie z procedurą przedstawioną na rycinie 4 sprawdzano przy użyciu:

- a) spektrofotometrii UV (spektrofotometr Cecil CE 7200) w roztworze 0,1 M kwasu solnego i etanolu w zakresie 190–350 nm;
- b) metody chromatografii cienkowarstwowej TLC (na płytkach firmy Merck pokrytych żelazem krzemionkowym F₂₅₄) przy użyciu mieszaniny metanol- woda amoniakalna (100:1.5, v/v) jako układu rozwijającego oraz systemu wywołującego chromatogramy stosując kolejno: odczynnik Dragendorffa, 10% kwas siarkowy, 5% roztwór chlorku żelazowego, jodoplatynian potasowy i 10% kwas siarkowy;
- c) połączonej metody TLC i HPLC, tj. analizy metodą HPLC etanolowych eluatów stref chromatograficznych odpowiadających pląmom wzorców D i DAD;
- d) metody HPLC w warunkach analitycznych podanych wyżej.

W drugim etapie oceniano przydatność metody HPLC do oznaczania D i DAD we krwi. W tym celu do próbek krwi sekcyjnej (w których uprzednio wykluczono obecność środków farmakologicznych) dodawano ściśle określone ilości wzorcowych roztworów D i DAD (do uzyskania stężeń 0,25; 0,5; 1,0; 3,0 i 6,0 μg/ml), a następnie poddawano je ekstrakcji według schematu przedstawionego na rycinie 2 oraz analizie omówioną wcześniej metodą HPLC.

Zawartość D i DAD w ekstraktach z krwi oznaczano metodą standardu zewnętrznego z krzywych kalibracji sporządzonych z wzorców w zakresie 0,25–6,0 μg/ml krwi, które poddano identycznej procedurze analitycznej jak próbki krwi.

Do określenia odzysku ksenobiotyków z krwi zastosowano krzywe kalibracji wykonane przez odpowiednie rozcieńczenie i analizę metodą HPLC tych samych roztworów wzorcowych D i DAD (z pominięciem etapu ekstrakcji).

Powyższe postępowanie analityczne zastosowano do oznaczania D i DAD we krwi sekcyjnej w dwu przypadkach śmiertelnego zatrucia tym lekiem.

WYNIKI, ICH OMÓWIENIE I Dyskusja

Na rycinie 3 przedstawiono rezultaty pierwszego etapu badań, tj. wpływu pH na stabilność D w jego roztworach przechowywanych przez 24 godziny w temperaturze pokojowej. Wynika z niej, że po tym czasie zawsze dochodziło do hydrolizy D (bowiem

na chromatogramach HPLC pojawiał się pik DAD), której nasilenie zależało od pH środowiska, gdyż w wodzie dejonizowanej rozkładało się około 10% D, a w roztworze węglanu 70% tej substancji. Natomiast w roztworze zasady rozkład D był całkowity, a w roztworze kwasu prawie całkowity, co wykorzystano do otrzymywania DAD.

Wyniki analizy wzorcowego roztworu DAD (otrzymanego według schematu na rycinie 4) przedstawiono w tabeli I. Maksimum absorpcji DAD było identyczne, jak D (240 i 236 nm odpowiednio w etanolu i roztworze kwasu solnego). Oba ksenobiotyki można jednak różnicować metodą TLC. W powszechnie stosowanym układzie metanol-amoniak uzyskano bowiem różne wartości R_f dla leku macierzystego (0,64) i jego metabolitu (0,55). Czas retencji (RT) etanolowych eluatów plam TLC był przy tym charakterystyczny zarówno dla D (11,2 min dla plamy o $R_f = 0,64$), jak i DAD (6,1 min dla plamy o $R_f = 0,55$).

Analiza metodą HPLC wzorca DAD uzyskanego w sposób przedstawiony na rycinie 4 wykazała natomiast, że hydroliza D w kwaśnym środowisku prowadzi do całkowitego rozkładu tej substancji. Na chromatogramie HPLC nie stwierdzono bowiem pików o $RT = 11,2$. Hydroliza D w środowisku kwaśnym w warunkach przedstawionych na rycinie 4 umożliwia zatem uzyskanie wzorca DAD przydatnego do analizy ilościowej.

Coors i in. [7] nie podali sposobu otrzymywania DAD (produkowanego we własnym laboratorium), który stosowali przy oznaczaniu D i tego właśnie metabolitu w osoczu przy użyciu elektroforezy kapilarnej. Devarajan i in. [8] podczas oznaczania chlorowodorku diltiazemu w preparatach farmaceutycznych (metodą HPTLC połączoną z analizą densytometryczną) wywoływali rozkład D przez gotowanie w roztworze kwasu solnego o $pH = 1-2$ przez 20 min, a następnie przechowywanie (po rozcieńczeniu wodą) roztworu przez 7 dni w temperaturze $60^\circ C$. Analiza tak otrzymanego roztworu również wykazała dwie plamy i dwa piki, które autorzy zidentyfikowali jako D oraz DAD.

Należy podkreślić, że procedura otrzymywania DAD ukazana na rycinie 4 musi być ściśle przestrzegana. Skrócenie czasu hydrolizy nie pozwala bowiem na rozkład całej porcji D, natomiast jego wydłużenie prowadzi do pojawienia się dodatkowego pików o RT krótszym niż DAD (prawdopodobnie produktu jego rozkładu). Istotna jest też kolejność dalszych etapów metody, tj. zubożenie roztworem wodorotlenku sodowego po wcześniejszym dodaniu wody, gdyż pominięcie etapu rozcieńczenia sprawia, że otrzymuje się mieszaninę D i DAD prawdopodobnie w wyniku reaktylacji.

Rezultaty drugiego etapu badań przedstawiono na rycinie 5 i w tabeli II.

Uzyskano dobry rozdział D ($RT = 11,2$) i jego metabolitu DAD ($RT = 6,1$) od tła biologicznego (rycina 5). Metoda ekstrakcji przedstawiona na rycinie 2 zapewniała dostateczną stabilność D, gdyż na chromatogramach ekstraktów wzorcowego D nie obserwowano dodatkowego pików DAD. Bardzo ważne okazało się przy tym zachowanie umiarkowanie zasadowego odczynu środowiska ekstrakcji ($pH = 8-8,5$), które zapobiegało rozkładowi D do DAD obserwowanemu przy wyższym pH. Istotne znaczenie miało również rozpuszczenie odparowanych ekstraktów w roztworze kwasu solnego, gdyż nie zachodziła wówczas interferencja tła biologicznego, podczas gdy rozpuszczanie ekstraktów w fazie ruchomej powodowało pojawienie się dodatkowych pików o czasie retencji zbliżonym do DAD.

Średni odzysk D i DAD z krwi (tabela II) wynosił odpowiednio 78% i 71%, przy czym nie stwierdzono uchwytnej zależności między odzyskiem a stężeniem kseno-

biotyków w tym materiale biologicznym. Zastosowana metoda analityczna pozwoliła również na oznaczenie z zadowalającą dokładnością D i DAD w stężeniu 0,5 µg/ml (współczynnik zmienności CV mieścił się w granicach 2,6–9,1%), chociaż możliwe było oznaczenie dwukrotnie niższych stężeń (0,25 µg/ml), jednak kosztem zmniejszenia precyzji metody (CV = 16,0–17,8%).

Zastosowanie zbliżonej metody ekstrakcji pozwoliło innym autorom [5, 7, 19] na uzyskanie o wiele niższych limitów detekcji D i DAD (do kilku ng/ml). Badali oni jednak osocze, które jest środowiskiem nieporównywalnie bardziej „czystym” niż krew sekcyjna o różnym stopniu biodegradacji. Przedstawiona w niniejszej pracy procedura wiąże się z podwyższeniem granicy oznaczania ksenobiotyków (ze względu na relację między objętością wprowadzaną do kolumny chromatografu – 10 µl a całkowitą objętością eluatu – 250 µl), ale zabezpiecza przed interferencją tła, co jest istotne przy prostym sposobie jednostopniowej ekstrakcji z krwi sekcyjnej. Zastosowanie reekstrakcji [9, 12, 15] pozwala wprowadzić na uzyskanie bardziej czystych ekstraktów i podnosi czułość detekcji, ale jednocześnie zwiększa możliwość błędów oraz wydłuża czas analizy.

Uzyskaną w tej pracy czułość metody należy uznać za odpowiednią dla potrzeb pośmiertnej diagnostyki zatruc D, zwłaszcza jeśli uwzględni się, że terapeutyczne stężenie leku we krwi wynosi 0,05–0,4 µg/ml, toksyczne – powyżej 0,8 µg/ml, a śmiertelne – powyżej 6 µg/ml [17, 18, 21, 22, 23].

Na rycinie 6 przedstawiono chromatogramy ekstraktów z krwi uzyskane w dwóch przypadkach zatrucia D, w których zastosowano identyczne (z użytymi w toku wcześniej omówionych badań) procedury analityczne. Na obu chromatogramach widoczne są dwie pary położonych blisko siebie pików, z których dwa zidentyfikowano jako D ($RT = 11,2$) i jego metabolit DAD ($RT = 6,1$), natomiast pozostałych dwu pików ($RT = 9,9$ i $5,2$) nie zidentyfikowano ze względu na brak wzorców. W oparciu o dane z piśmiennictwa można przypuszczać, że są to odpowiednio DMD i DMDAD.

Relacje między stężeniami D/DAD w próbkach krwi nr 1 i nr 2 wynosiły odpowiednio: 5,7/21,5 µg/ml oraz 6,3/3,7 µg/ml. Stwierdzono zatem różny stopień deacetylacji D, tj. jednego z głównych procesów metabolicznych tego leku, ale również procesu rozkładu D *in vitro* [9, 11, 24]. W związku z tym na podstawie stosunku stężenia D do DAD nie można wnioskować o stopniu zaawansowania metabolizmu D *in vivo*. Należy natomiast oznaczać poziom obu ksenobiotyków, gdyż tylko w ten sposób można określić przybliżone maksymalne stężenie leku we krwi sekcyjnej.

WNIOSKI

1. Przedstawiona procedura analityczna (ekstrakcja i analiza metodą HPLC) pozwala na oznaczenie we krwi sekcyjnej zarówno D jak i DAD w stężeniach zbliżonych do górnej granicy poziomów terapeutycznych, tj. od 0,5 µg/ml.
2. W diagnostyce śmiertelnych zatruc D we krwi pobranej ze zwłok należy określić również poziom DAD, który jest nie tylko jednym z głównych metabolitów D, ale także produktem rozkładu tego ksenobiotyku we krwi *in vitro*.
3. Przedstawione w tej pracy warunki kontrolowanej hydrolizy D w środowisku kwaśnym umożliwiają uzyskanie DAD, który nadaje się jako wzorzec do analizy ilościowej.