

RESEARCH ON THE STABILITY OF DILTIAZEM IN *POST-MORTEM* BLOOD

Marianna KISZKA, Roman MADRO

Chair and Department of Forensic Medicine, Medical Academy, Lublin

ABSTRACT: The stability of diltiazem (D) in *post-mortem* blood was evaluated. The influence of time elapsed (up to 21 days), temperature (+25°C, +4°C, -20°C) and sodium fluoride were analysed. An extraction mixture of dichloromethane-ether in a medium alkaline environment was used for isolation of D and deacetyldiltiazem (DAD). Concentrations of xenobiotics were determined by the HPLC method (Hypersil ODS column 250 × 4.0 mm, 5 μm; mobile phase: phosphoric buffer 0.025 M with addition of 0.5% triethylamine pH = 3 – acetonitrile 25:75; eluent flow – 1.5 ml/min; detection – 235 nm). It was shown that freezing of blood at -20°C ensures complete stability of D for at least 3 weeks. A similarly high stability of D was noted in blood samples that were preserved with sodium fluoride and stored at +4°C. The level of D in non-preserved blood samples at a temperature of +4°C gradually decreased (by 12–20% after 2 weeks, 26–39% after 3 weeks). A very rapid decrease in concentration of D was observed at room temperature, by 12–40% after the 1st day and by 42–83% after the 1st week up to a total disappearance after 3 weeks. Decomposition of D was always accompanied by an increase in deacetyldiltiazem concentration (DAD). This shows that DAD should be determined in *post-mortem* diagnostics of this medicine poisonings because it is not only an *in vivo* metabolite but also an *in vitro* product of hydrolysis of D.

KEY WORDS: Diltiazem; Stability; *Post-mortem* blood; Deacetyldiltiazem.

Problems of Forensic Sciences, vol. LVII, 2004, 5–15

Received 8 April 2004; accepted 2 July 2004

INTRODUCTION

Diltiazem (D) is often detected in *post-mortem* material [1, 5, 8, 9, 14, 15, 16]. This popular cardiological drug undergoes intensive metabolism *in vivo*, which leads to deacetyldiltiazem (DAD) and N-demethyldiltiazem, and next to pharmacologically inactive N-demethyldeacetyl-diltiazem [3, 6, 11].

D also undergoes transformation in corpses or during storage of biological material samples for future analysis. DAD is also one of the main products of D decomposition *in vitro*, which arises (as *in vivo*) as a result of hydrolysis under the influence of diltiazem deacetylase [6, 7]. The influence of pH on the stability of D should not be overlooked [9]. Acidification of tissues is

observed just after death and in the next phase – tissues alkalisation of above pH = 7 [12].

The work which has been done so far on the stability of D in biological material has been fragmentary and insufficient from a toxicological point of view. There are several publications concerning the stability of D in plasma, which is a material rarely available after death, because of rapid blood haemolysis [2, 4, 13, 17]. Researches using blood have been few and short-term. They have revealed that the stability of D in blood is less than in plasma because of the influence of haemocyte esterase [2, 13]. A long term experiment by Koves et al. [10] only concerned blood (taken from live persons as well as from corpses) with addition of sodium fluoride (NaF).

Thus, precise evaluation of the stability of D in whole blood (non-preserved and with addition of sodium fluoride) is considered very important, both at a temperature of +25°C (from which knowledge can be gained concerning the rate of changes occurring in bodies just after death) as well as in temperatures of +4°C and –20°C, i.e. within the temperature range in which bodies – or biological material collected from them – are stored.

MATERIAL AND METHODS

Blood taken from four corpses in which xenobiotics were not detected during toxicological analysis was used as research material. The way of preparing the material for analysis and storage and also the time of samples collection for xenobiotics determination are presented in Figure 1.

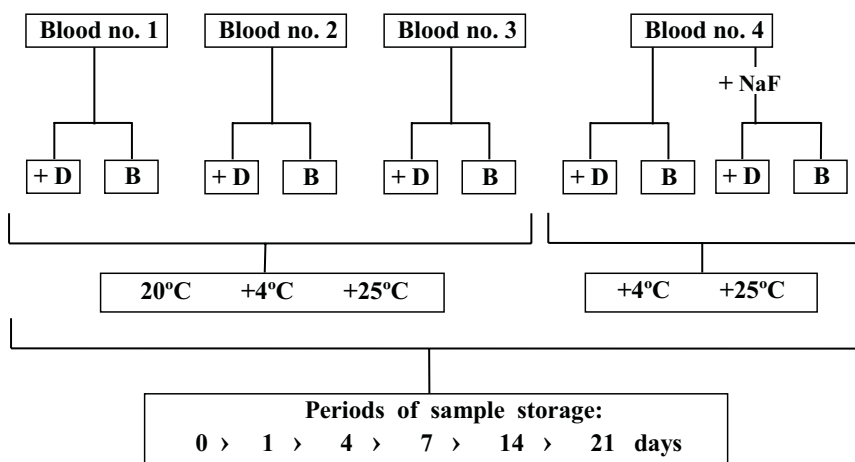


Fig. 1. A diagram of study of diltiazem (D) stability in blood. + NaF – addition of sodium fluoride, 10 mg/ml; + D – addition of diltiazem; 6 µg/ml (triplicate samples); B – background.

D and DAD were determined in blood (after previous extraction by dichloromethane-ether 1:1 in alkaline environment pH = 8–8.5) by the HPLC method (a Hypersil ODS column 250 × 4.0 mm, 5 μm; mobile phase: phosphoric buffer 0.025 M with addition of 0.5% triethylamine at pH = 3 – acetonitrile 25:75; eluent flow – 1.5 ml/min; volume of injected sample – 10 μl; detection – 235 nm). Propranolol, 4 μg/ml blood, was used as an internal standard [9].

RESULTS AND DISCUSSION

The results of the experiment were presented in the form of graphs of dependence of D and DAD concentrations (expressed as percentages of initial concentration of D) on duration of blood sample storage at a given temperature, without preservatives (Figure 2) and with addition of NaF (Figure 3).

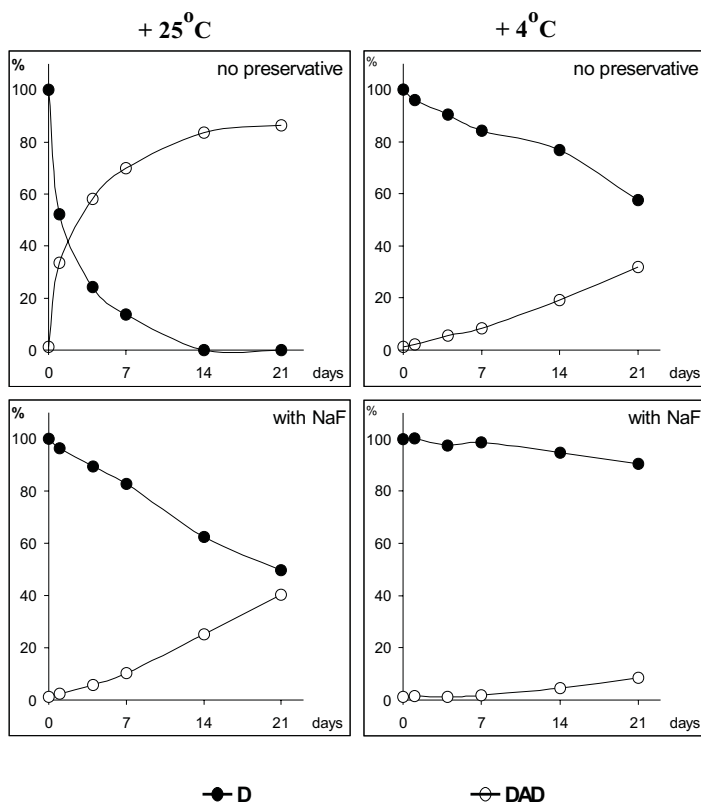


Fig. 2. Stability of diltiazem (D) in non-preserved blood in relation to temperature and storage periods; DAD – deacetyldiltiazem.

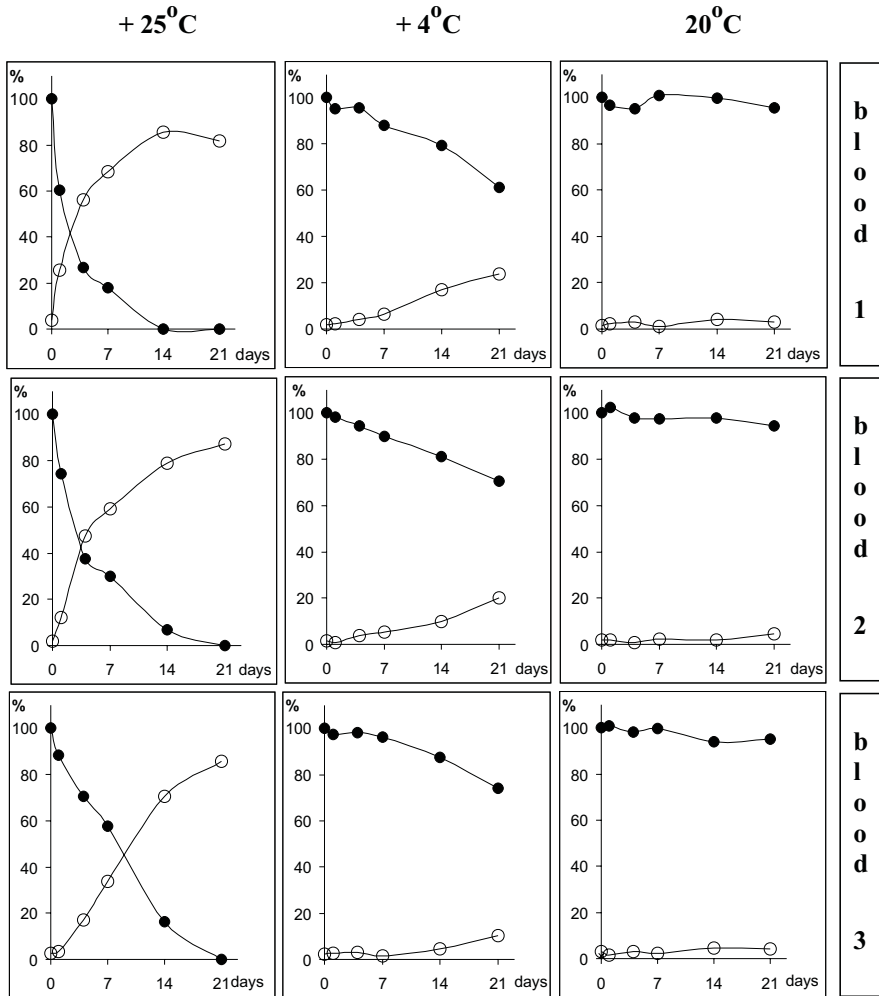


Fig. 3. Stability of diltiazem (D) in blood without and with addition of sodium fluoride (NaF) in relation to temperature and storage periods; DAD – deacetyldiltiazem.

In the case of non-preserved blood (Figure 2), the level of D was only stable in frozen samples; at higher temperatures its gradual decomposition was observed. At a temperature of +25°C losses varied in the range 12–40% after 1 day and 42–83% after 7 days up to complete decomposition after 2–3 weeks. At a temperature of +4°C, D revealed satisfactory stability (4–20% loss) up to 1–2 weeks, but after 3 weeks losses were 26–39%. However, the rate of decrease of D concentration in each of the 3 analysed blood samples varied, which should be related to varying enzymatic activity, also conditioned by individual changes in pH during *post-mortem* transformations.

Therefore, obtained results were consistent with conclusions in the research of Bonneus et al. [2] relating to inhibition of D decomposition due to freezing of blood. The loss of D at room temperature observed by these authors (about 14% in the course of 1 hour) was significantly higher than shown in Figure 2. This leads to the conclusion that the decomposition of D shortly after death could reach this rate, since the presented results were obtained from analysis of blood from corpses, whereas the blood used in the experiments of Bonneus et al. was taken from living persons.

The experiment also showed a clear stabilising influence of sodium fluoride on the durability of D in *post-mortem* blood (Figure 3). In non-preserved blood almost half of the medicine underwent decomposition in the course of 2–7 days at a temperature of +25°C and at the earliest after 3 weeks at a temperature +4°C, while in blood with NaF a similar decomposition at a temperature of +25°C was observed only in the third week, and at a temperature of +4°C the loss of D was only 10% at the end of the experiment. Thus, the stability of D in blood with addition of NaF (up to a concentration of 10 mg/ml) at a temperature of +25°C was close to that obtained by cooling of non-preserved blood to +4°C. Storage of blood with sodium fluoride at a temperature of +4°C stabilised the level of D similarly to freezing of non-preserved samples.

Koves et al. reached similar conclusions [10]. Until now they have been the only persons to express an opinion on the influence of NaF on the speed of D decomposition at temperatures of +25°C and +4°C. They observed decomposition of D in 36 samples of blood taken from corpses and stored at a temperature of +4°C for 92 days – both insignificant and complete decomposition were ascertained. These divergent results should be linked to the low enzymatic activity of preserved blood and also the fact that some of the samples were probably not preserved¹. Analysing blood² with addition of sodium fluoride, they ascertained that half of the initial D concentration underwent degradation after 19 days of storage at a temperature of +25°C, but when it was cooled to +4°C only after 124 days, and, furthermore, even after 1 year of storage it did not decompose completely.

The present research (Figure 2 and 3) showed that the decrease in D concentration was accompanied by an adequate increase in DAD level. This indicates that this compound is the main and rather stable product of hydrolysis (dependent on blood enzymatic activity and temperature), which is effectively prevented (or at least efficiently slowed) by preservation of blood with NaF. Therefore, results of earlier studies [4, 10, 13] and Koves et al.'s conclu-

¹ This resulted from a fact that the authors assumed that *post-mortem* blood is generally preserved by sodium fluoride.

² Blood was took from a live person but it underwent putrefaction for 3 weeks before the experiment.

sions [10], which drew attention to the fact that omission of DAD determination in a toxicological analysis could lead to serious interpretation errors, were confirmed. The possibility of determination of the *in vivo* concentration of D in blood and the possibility of evaluation of the degree of advancement of its metabolism only exist when material is collected from a live person and is immediately and correctly preserved and also the concentration of D and DAD are very rapidly determined. However, in the case of material collected from a corpse, the level of DAD should be considered the total (combined) level – produced by both *in vivo* D metabolism and its *post-mortem* biodegradation (it is impossible to separate the two). *Post-mortem* decomposition is certainly more efficient in the period when the body is cooling down (just after death) than in blood taken from a corpse that has been stored for several days (up to 50% decomposition of D to DAD was possible in 24 hours – see Figure 2).

Even freezing of blood or its preservation and storage at a suitable temperature does not eliminate the above mentioned problems, but only arrests a process which may earlier have caused not only the breakdown of D, but also increase of DAD, especially if stabilising procedures were introduced after a significant delay. Failure to determine DAD is a mistake, since only the sum of D and DAD concentrations makes possible exclusion or confirmation of the toxic effect of diltiazem.

CONCLUSIONS

1. DAD is not only an active metabolite of D that arises during a person's life, but is also a stable product of its rapid *post-mortem* degradation.
2. Freezing of blood samples or their preservation by NaF and cooling down to +4°C effectively prevents further *post-mortem* degradation of the amount of D that has remained unchanged.
3. The possibility of determination of real *in vivo* D and DAD concentrations is possible only when a sample of blood taken from a live person is immediately preserved (NaF) and quickly determined.
4. The level of D in *post-mortem* blood is always lower (in relation to the real concentration at the time of death) because of *post-mortem* hydrolysis of D to DAD.
5. In cases of suspected poisoning by D, toxicological analysis of *post-mortem* blood should include parallel DAD determination.

References:

1. Beno J. M., Nemeth D. R., Diltiazem and metoclopramide overdose, *Journal of Analytical Toxicology* 1991, vol. 15, pp. 285–287.
2. Bonnefous J. L., Boulieu R., Lahet C., Stability of diltiazem and its metabolites in human blood samples, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1992, vol. 81, pp. 341–344.
3. 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.
4. 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.
5. Engelhart D. A., Lavins E. S., Seligman S. S. [et al.], Diltiazem and pentoxyfylline determination in *postmortem* specimens, *Journal of Analytical Toxicology* 1997, vol. 21, pp. 576–579.
6. 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.
7. Fraile L. J., Aramayona J. J., Bregante M. A. [et al.], Enhanced diltiazem deacetylase activity in pre-term and full-term rabbits compared with adult, *Biology of Neonate* 1997, vol. 72, pp. 51–61.
8. 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.
9. Kiszka M., Madro R., Determination of diltiazem in *post-mortem* blood by high-performance liquid chromatography, *Problems of Forensic Sciences* 2003, vol. 53, pp. 22–37.
10. Koves E. M., Lawrence K., Mayer J. M., Stability of diltiazem in whole blood: forensic implication, *Journal of Forensic Sciences* 1998, vol. 43, pp. 587–597.
11. 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.
12. Markiewicz J., Swoistość sądowych badań chemiczno-toksykologicznych, *Z zagadnień kryminalistyki* 1971, z. VI, s. 22–29.
13. McLean A. M., Cefali E. A., Roden J. S. [et al.], Stability of diltiazem in different biological fluids, *Biopharmaceutics & Drug Disposition* 1991, vol. 12, pp. 327–334.
14. 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.
15. 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.

16. Wiese J., Klug E., Schneider V. [et al.], Todliche Diltiazemvergiftung, *Zeitschrift für Rechtsmedizin* 1988, Bd. 100, S. 271–176.
17. 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.

BADANIE TRWAŁOŚCI DILTIAZEMU WE KRWI SEKCYJNEJ

Marianna KISZKA, Roman MAĐRO

WSTĘP

Diltiazem (D) jest często wykrywany w materiale pośmiertnym [1, 5, 8, 9, 14, 15, 16]. Ten popularny lek kardiologiczny podlega zażyciowo intensywnemu metabolizmowi, który prowadzi do deacetylodiltiazemu (DAD) i N-demetylodiltiazemu, a następnie do farmakologicznie nieczynnego N-demetylodeacetylo-diltiazemu [3, 6, 11].

D ulega również przemianom w zwłokach lub podczas przechowywania próbek materiału biologicznego przeznaczonego do analizy. Jednym z głównych produktów rozkładu D *in vitro* jest również DAD, który powstaje (podobnie jak zażyciowo) w wyniku hydrolizy pod wpływem deacetylazy diltiazemowej [6, 7]. Nie można przy tym pominąć wpływu pH na stabilność D [9]. Po zgonie obserwuje się bowiem początkowo zakwaszanie tkanek, a w kolejnej fazie ich alkalizację powyżej pH = 7 [12].

Dotychczasowe doniesienia na temat trwałości D w materiale biologicznym są fragmentaryczne i niewystarczające z punktu widzenia toksykologii sądowej. Kilka publikacji dotyczy stabilności D w osoczu, które (z powodu szybkiej hemolizy krwi) jest materiałem rzadko dostępnym po zgonie [2, 4, 13, 17]. Badania wykorzystujące krew są natomiast nieliczne i krótkoterminowe. Wykazały one, że trwałość D we krwi jest mniejsza niż w osoczu ze względu na wpływ esterazy krwinkowej [2, 13]. Długoterminowy eksperyment Koves i in. [10] dotyczył tylko krwi (pobranej zarówno od osób żywych, jak i ze zwłok) z dodatkiem fluorku sodu (NaF).

Za bardzo ważne uznano więc dokładne ocenienie stabilności D we krwi pełnej (niekonserwowanej oraz z dodatkiem fluorku sodu) zarówno w temperaturze +25°C (co jest istotne dla poznania tempa przemian zachodzących w zwłokach wkrótce po zgonie), jak i w temperaturze +4°C oraz -20°C, tj. w zakresie temperatur, w których przechowuje się zwłoki lub pobrany z nich materiał biologiczny.

MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań stanowiła krew pobrana z czterech zwłok, w których analiza toksykologiczna nie wykazała żadnych ksenobiotyków. Sposób przygotowania materiału do badań i jego przechowywania oraz czas pobierania próbek do oznaczania ksenobiotyków przedstawia rycina 1.

D i DAD oznaczano we krwi (po uprzedniej ekstrakcji mieszaniną dichlorometan-eter 1:1 w środowisku alkalicznym o pH = 8–8,5) metodą HPLC (kolumna Hyper-sil ODS 250 × 4,0 mm, 5 μm; faza ruchoma: bufor fosforanowy 0,025 M z dodatkiem 0,5% trietylaminy o pH = 3 – acetonitryl 25:75; przepływ eluentu – 1,5 ml/min; objętość wprowadzanej próbki – 10 μl; detekcja – 235 nm). Jako standardu wewnętrznego użyto propranololu w ilości 4 μg/ml krwi [9].

WYNIKI I ICH DYSKUSJA

Wyniki eksperymentu przedstawiono graficznie w postaci wykresów zależności stężenia D i DAD (wyrażonych w procentach początkowego stężenia D) od czasu przechowywania próbek krwi w określonej temperaturze, bez środków konserwujących (rycina 2) oraz z dodatkiem NaF (rycina 3).

We krwi niekonserwowanej (rycina 2) poziom D był stabilny tylko w próbkach zamrożonych, natomiast w wyższych temperaturach obserwowano jego stopniowy rozkład. W temperaturze $+25^{\circ}\text{C}$ straty wahały się w granicach 12–40% po 1 dniu i 42–83% po 7 dniach aż do całkowitego rozkładu po 2–3 tygodniach. W temperaturze $+4^{\circ}\text{C}$ D wykazywał natomiast zadowalającą stabilność (4–20% ubytku) do 1–2 tygodni, ale po 3 tygodniach straty sięgały 26–39%. Tempo spadku stężenia D w każdej z 3 przebadanych próbek krwi było jednak różne, co wiązać należy z ich różną aktywnością enzymatyczną uwarunkowaną także indywidualnymi zmianami pH w przebiegu przemian pośmiertnych.

Uzyskano zatem wyniki zgodne z ustaleniami zawartymi w publikacji Bonneusa i in. [2] odnośnie do zahamowanie rozkładu D dzięki zamrożeniu krwi. Obserwowany przez tych autorów ubytek D w temperaturze pokojowej (o 14% w ciągu 1 godziny) był jednak znacznie większy niż wynika to z ryciny 2, co prowadzi do wniosku, że rozkład D wkrótce po zgonie może osiągać takie właśnie tempo, gdyż wyniki prezentowanej pracy uzyskano, badając krew ze zwłok, a krew użyta w doświadczeniu Bonneusa i in. pochodziła od osób żywych.

Eksperyment wykazał także wyraźny stabilizujący wpływ fluorku sodu na trwałość D we krwi sekcyjnej (rycina 3). We krwi niekonserwowanej prawie połowa leku ulegała rozkładowi w przybliżeniu w ciągu 2–7 dni w temperaturze $+25^{\circ}\text{C}$ i najwcześniej po 3 tygodniach w temperaturze $+4^{\circ}\text{C}$, podczas gdy we krwi z NaF podobny rozkład w temperaturze $+25^{\circ}\text{C}$ obserwowano dopiero w trzecim tygodniu, a w temperaturze $+4^{\circ}\text{C}$ pod koniec eksperymentu ubytek D wynosił zaledwie 10%. Trwałość D we krwi z dodatkiem NaF (do stężenia 10 mg/ml) w temperaturze $+25^{\circ}\text{C}$ była więc zbliżona do tej, jaką zapewniało schłodzenie krwi niekonserwowanej do $+4^{\circ}\text{C}$, a przechowywanie krwi fluorkowanej w temperaturze $+4^{\circ}\text{C}$ stabilizowało poziom D podobnie jak zamrożenie próbek niekonserwowanych.

Do podobnych wniosków doszli także Koves i in. [10], którzy dotychczas jako jedyni wypowiedzieli się odnośnie do wpływu NaF na tempo degradacji D w temperaturze $+25^{\circ}\text{C}$ i $+4^{\circ}\text{C}$. W 36 próbkach krwi pobranej ze zwłok i przechowywanej w temperaturze $+4^{\circ}\text{C}$ stwierdzili bowiem po 92 dniach zarówno nieznacznym, jak i całkowity rozkład D, co wiązać należy z niską aktywnością enzymatyczną zakonserwowanej krwi oraz tym, że część materiału prawdopodobnie nie została zakonserwowana¹. Badając krew² z dodatkiem fluorku wykazali natomiast, że połowa wyjściowego stężenia D ulegała degradacji po 19 dniach przechowywania jej w temperaturze $+25^{\circ}\text{C}$, a wówczas gdy została schłodzona do $+4^{\circ}\text{C}$ – dopiero po 124 dniach, przy czym we krwi schłodzonej lek ten nie ulegał kompletnemu rozkładowi nawet po upływie 1 roku.

¹ Wynika to z faktu, iż autorzy jedynie założyli, że krew sekcyjna jest „zwykle” konserwowana fluorkiem sodu.

² Krew pobrana została od osoby żywej, ale przed eksperymentem poddano ją rozkładowi gnilnemu przez 3 tygodnie.

Przeprowadzone badania (rycina 2 i 3) wykazały ponadto, że obniżaniu poziomu D towarzyszył adekwatny wzrost stężenia DAD, co wskazuje, że związek ten jest głównym i dość stabilnym produktem hydrolizy (zależnej od aktywności enzymatycznej krwi i temperatury), której zapobiega skutecznie (lub co najmniej wydajnie spowalnia) zakonserwowanie krwi przy użyciu NaF. Potwierdzono zatem wyniki wcześniejszych ustaleń na ten temat [4, 10, 13] i wniosek Kovesa i in. [10], którzy zwrócili uwagę na fakt, że pominięcie DAD w analizie toksykologicznej może prowadzić do poważnych błędów interpretacyjnych. Szansa oznaczenia zażyciowego stężenia D we krwi i możliwość oceny stopnia zaawansowania jego metabolizmu istnieje bowiem tylko wówczas, gdy materiał ten pobrano od osoby żywej natychmiast i właściwie zakonserwowano oraz bardzo szybko oznaczono w nim zarówno D, jak i DAD. Natomiast w przypadku materiału pobranego ze zwłok poziom DAD traktować należy jako sumaryczny i niemożliwy do rozdzielenia; efekt zażyciowego metabolizmu D oraz jego pośmiertnej biodegradacji, która w okresie stygnięcia ciała jest z pewnością znacznie bardziej wydajna od tej, którą stwierdzono doświadczalnie (w ciągu jednej doby możliwy był nawet pięćdziesięcioprocentowy rozkład D do DAD – por. rycina 2) we krwi pobranej ze zwłok przechowywanych przez kilka dni.

Nawet zamrożenie krwi lub jej zakonserwowanie i umieszczenie w odpowiedniej temperaturze nie jest więc w stanie wyeliminować omawianych wyżej trudności, a jedynie zatrzymać proces, który wcześniej może nie tylko spowodować rozkład D, ale również spowodować ubytek DAD, zwłaszcza gdy procedury stabilizacyjne wdrożono ze znacznym opóźnieniem. Zrezygnowanie z oznaczania DAD jest natomiast błędem, gdyż tylko łączna suma stężeń D i DAD umożliwia wykluczenie lub potwierdzenie toksycznego działania diltiazemu.

PODSUMOWANIE

1. DAD jest nie tylko zażyciowo powstającym aktywnym metabolitem D, ale również stabilnym produktem jego szybkiej pośmiertnej degradacji.
2. Zamrożenie próbek krwi lub ich zakonserwowanie NaF i schłodzenie do +4°C skutecznie zapobiega dalszej pośmiertnej degradacji tej ilości D, która pozostała w stanie niezmiennym.
3. Możliwość określenia rzeczywistego zażyciowego stężenia D i DAD stwarza jedynie natychmiastowe zakonserwowanie (NaF) krwi pobranej od osoby żywej i szybko wykonane oznaczenie.
4. Poziom D we krwi sekcyjnej jest zawsze zaniżony (w stosunku do rzeczywistego stężenia w chwili zgonu) z powodu pośmiertnej hydrolizy D do DAD.
5. W przypadku podejrzenia zatrucia D analiza toksykologiczna krwi sekcyjnej powinna uwzględniać równoległe oznaczanie DAD.