



POSSIBILITIES OF USING SALIVA FOR TESTING DRIVERS FOR ESTAZOLAM, DOXEPIN, AND PROMAZINE*

Ewa CHUDZIKIEWICZ¹, Piotr ADAMOWICZ¹, Maria KAŁA¹, Wojciech LECHOWICZ¹, Ewa PUFAL², Marzena SYKUTERA², Karol ŚLIWKA²

¹ *Institute of Forensic Research, Krakow*

² *Chair and Department of Forensic Medicine, Collegium Medicum, Nicolaus Copernicus University, Bydgoszcz*

Abstract

The aim of the study was to demonstrate the usefulness of saliva as a material for determining the presence in the organism of medicines affecting the psychomotor efficiency of drivers. The research material was blood and saliva samples collected from 50 volunteers, who were given successively, per os, a single dose of estazolam, doxepin, and promazine at therapeutic concentrations (1, 50 and 50 mg respectively). The samples were collected 1, 2, and 3 hours, and in the case of estazolam, 4 hours after drug administration. Analytes were extracted using liquid-liquid extraction and determined by high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry operating in atmospheric pressure chemical ionisation mode (HPLC-MS-APCI). Validated methods have a limit of detection (*LOD*) and quantitation (*LOQ*) expressed in ng/ml for estazolam: 0.5 and 1.0; for doxepin 0.1 and 0.5; and for promazine 0.2 and 1.0 respectively. The determined concentrations of estazolam and doxepin in saliva were significantly lower than in blood, but higher in the case of promazine. Mean values of blood/saliva concentration ratios determined at the following sampling points: at 1, 2, 3 (and 4 for estazolam) hours after administration were as follows – for estazolam: 7.1; 11.5; 11.5 and 12.6; for doxepin: 2.9; 2.0 and 1.1 and for promazine: 0.02; 0.14 and 0.13. Correlation coefficients (*R*) of drug concentrations in blood and saliva were: 0.734 and 0.339 for estazolam (*n* = 161) and doxepin (*n* = 134), and 0.104 for promazine (*n* = 102). The conducted research showed that saliva may be a useful material for detection of estazolam, doxepin and promazine after oral administration at single therapeutic doses. Ascertainment of estazolam and doxepin in saliva may be a marker for the presence of these compounds in blood and hence in the organism.

Key words

Estazolam; Doxepin; Promazine; Saliva.

Received 16 November 2005; accepted 30 December 2005

1. Introduction

The use of saliva as a material for the detection of drugs and psychotropic substances has become increasingly widespread over the last few years [6, 7, 10, 11, 12]. Because saliva can be collected easily and the

process of collection itself can be closely observed, it is used to assess the health of individual patients during monitored therapy, to test employees in order to ensure safety at work and to test drivers suspected of driving under the influence of substances that decrease psychomotor efficiency [16, 17], and thus, generally speaking, to test large populations of persons for use of a variety of drugs. For many substances there is a direct physiological correlation between concentrations

* The study presented in this paper was done within the research project No. 6 P0 5D 060 21, which was financially supported by State Committee for Scientific Research.

in blood and saliva. Ascertainment of such a correlation indicates that a positive saliva analysis may be a marker of a drug presence in the organism [4]. A major problem linked to the correlation of concentrations between saliva and blood is contamination of saliva by remnants and debris from food and other substances taken orally or by smoking or by "snorting" *via* the nose. The use of saliva despite these drawbacks is possible thanks to routine methods capable of detection of picogram amounts of drugs using mass spectrometry, while microgram quantities can be detected using thin layer chromatography or gas chromatography coupled with a traditional flame-ionisation detector.

After analysis of 77,000 urine and saliva samples for the presence of psychotropic substances, it transpires that testing saliva yields equal or even higher amounts of positive results for the most popular substances such as opiates, cannabinoids, amphetamines and cocaine [2], compared with urine samples. Morphine, cocaine (and its metabolite – benzoilecgonine), ⁹-tetrahydrocannabinol, amphetamine and its analogues are restricted by law in many countries. The presence of these substances in the blood of drivers is not acceptable. The situation, however, is more complicated when it comes to prescription drugs, which may also affect psychomotor efficiency. That is why multiple researches are conducted to find specific parameters defining the condition of a person after such drug administration. Results shown in this paper are part of a project entitled: "Pharmacological substances and road safety". One of the objectives was to evaluate the influence of some prescribed drugs on selected parameters of the human motor system. The evaluation was carried out at known blood and saliva concentrations of the administered drug. Drugs whose concentrations were determined were selected on the basis of surveys. The aim of the surveys was to find out which types of medicines were being used by drivers. The first questionnaires were sent to 4000 drivers in 1997 [1]. On the basis of answers received from 1161 respondents, it can be stated that 348 (42%) drivers were driving under the influence of prescription drugs, of whom 19% took benzodiazepines, 79% various types of analgesics, and 2% other kinds of medicines. In 2002 a modified questionnaire was sent to 300 drivers. One of the questions concerned the kind of administered medicines – classifying into 4 categories: sedative, antidepressants, neuroleptic and others. Each group contained 9 to 12 substances. Answers were received from 278 persons, of whom 134 stated that they were driving after administration of medicines. 67 drivers confirmed taking sedative drugs, of whom 24 indicated estazolam. 22 persons admitted taking an-

tididepressants, of whom 13 took doxepin. Neuroleptics were taken by 11 respondents – 7 of these taking promazine. In the category of "other", indicated by 96 persons, the following were most frequently mentioned: analgesics, antipyretics, antihistamines and antibiotics. The model compounds – promazine, doxepin and estazolam – which were selected as the basis for studying disturbances of psychomotor efficiency cause many undesired symptoms even at therapeutic doses. These symptoms mean that ill persons should not drive, operate machinery or drink alcohol during treatment. Information concerning the influence of the medicine on the ability to drive is shown as a pictogram on the packaging and in the leaflet attached to the given medicine. Such information is required under European Union Directive: UE 83/570/EEC concerning medicinal drugs and 92/27/EEC concerning labeling of medicinal drugs. The actions of these compounds are described below with special attention to side-effects which may affect psychomotor efficiency.

Estazolam is a triazolobenzodiazepine derivative, which is used in the treatment of insomnia, as an auxiliary medicine in psychosis treatment, as well as an anxiolytic in neurosis. It affects the central nervous system, especially the limbic system and hypothalamus. It also facilitates GABA-ergic transmission. When administered in therapeutic doses, it may cause excessive sleepiness, uncoordinated movement, in some cases tiredness, nausea, dizziness, blurred or double vision, body tremor or memory disturbances.

Doxepin is a tricyclic antidepressant, with strong anxiolytic and sedative action, and also facilitates sleep. Its mechanism of action consists in blocking central and peripheral cholinergic receptors and inhibiting the reuptake of neurotransmitters. It is applied in depressive syndromes with anxiety and extreme fear, as well as in the treatment of neurosis with somatic symptoms and insomnia. It may cause a feeling of tiredness, increased heart rate, mucous membrane dryness, accommodation disturbance and increased intraocular pressure. However, the main side-effect, especially at the beginning of treatment, is feeling very sleepy during the day.

Promazine is an aliphatic derivative of phenothiazine. It has a moderate sedative effect on humans, weak antipsychotic and antiautistic activity, has a slight effect on the extrapyramidal and autonomic nervous system. It is applied in psychosis, especially in elderly people with visible psychomotor stimulation. The most common side effects of promazine treatment seem to be: sleepiness, drowsiness, apathy, fatigue, anxiety, confusion and disorientation, dizziness, low-

ered blood pressure, possibility of occurrence of disturbances in heart rate and blurred vision.

2. Aim of the study

The aim of the study was to evaluate the usefulness of saliva as a material for testing drivers for the presence of estazolam, doxepin and promazine.

3. Materials and methods

3.1. Reagents

Estazolam standard was obtained from Pliva, Poland, estazolam-D₅, promazine, doxepin, and trimipramine from Sigma, USA, acetonitrile, hexane, isoamyl alcohol from Merck, Germany, distilled water was prepared using quartz distillation apparatus, formic acid was obtained from Ubichem, UK, diisopropyl ether from Sigma, USA, sodium hydroxide and constituents of phosphoric buffer from POCh, Poland.

3.2. Specimens

Specimens used for the research were blood and saliva samples collected from 50 volunteers (men aged 19–23, body mass 70–80 kg, height 175–180 cm), who had not had any previous history of taking medicines that were the subject of the study. Volunteers were given estazolam, doxepin, and promazine once at therapeutic doses. The drugs were administered at intervals of at least one week and the doses were: 1 mg for estazolam and 50 mg for doxepin and promazine. Blood and saliva samples were collected simultaneously at 1, 2 and 3 hours after administration of the medicine and for estazolam also after 4 hours. Additionally, 3.5 hours after administration of estazolam, volunteers received a calculated amount of alcohol leading to a concentration of 0.5‰. Saliva samples were collected without stimulation by spitting into polypropylene tubes. After the collection process, saliva samples were centrifuged. Blood was collected in heparinised vials. Both materials were stored in a freezer (at a temperature of –20 °C) until analysis.

3.3. Extraction

Liquid-liquid extraction was used for isolation of analytes from biological material. Deuterated derivatives were used as internal standards for estazolam: estazolam-D₅ at 50 ng/ml in blood and 5 ng/ml in sa-

liva. For doxepin and promazine in blood and saliva, trimipramine was used as an internal standard at a concentration of 20 ng/ml. Two blood and two saliva samples of 0.2 ml each were collected for extraction of estazolam and 1 ml for doxepin and promazine.

Estazolam was extracted from an acidic medium (pH 5, addition of 0.2 ml of phosphoric buffer) with diisopropyl ether (1.2 ml) by vortex-mixing for 30 s at 50 Hz. After centrifugation, 1 ml of organic phase was transferred to another tube and evaporated to dryness at 40 °C under a stream of nitrogen. The dry residue was dissolved in 0.1 ml of HPLC mobile phase and 20 µl of sample was injected into the HPLC-MS system using an autosampler [8].

Promazine and doxepin were extracted from a strongly alkaline medium (pH 13, addition of 3 ml 0.6 M NaOH) with n-hexane/isoamyl alcohol mixture (99:1 v/v) by shaking for 10 min. After centrifugation, the organic layer (3 ml) was condensed to approximately 0.5 ml using a TurboVap (Zymark) under a stream of nitrogen. Afterwards, re-extraction by vortex-mixing was conducted with addition of 0.1 ml of 0.1% formic acid for 5 min. After centrifugation, 20 µl of aqueous phase was injected into the system using an auto-sampler. The extraction yield [%] for each analyte from blood and saliva ($n = 5$) was 74 and 71 for estazolam (determined at concentrations of 30 ng/ml and 4 ng/ml of estazolam), 89 and 94 for doxepin (determined at 15 ng/ml in blood and 10 ng/ml in saliva) and 84 and 79 for promazine (at 15 and 100 ng/ml respectively).

3.4. Equipment

Analyses were conducted using an HP-1100 Agilent Technologies liquid chromatograph coupled with a mass spectrometer operating in atmospheric pressure chemical ionisation mode. Separation was performed on a LiChroCART 55 4 column with Purospher STAR RP-18e packing. The mobile phase was 0.1% (v/v) formic acid in water and acetonitrile. Analysis was carried out with a mobile phase composition gradient (Figure 1).

3.5. Determination

Pseudomolecular ions $[M+H]^+$ were monitored with (m/z): 295 for estazolam, 300 for estazolam-D₅, 280 for doxepin, 285 for promazine and 295 for trimipramine. Methods of determination of these medicines in blood and saliva were optimised and validated. Obtained limits of detection (LOD) and quantitation (LOQ) expressed in ng/ml were as follows: 0.5 and 1.0 for estazolam, 0.1 and 0.5 for doxepin, and 0.2 and

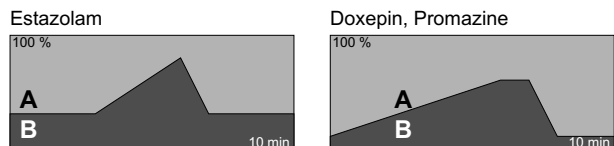


Fig. 1. Programmed gradient of mobile phase composition for determination of estazolam, doxepin and promazine (A – 0.1% formic acid in water, B – 0.1% formic acid in acetonitrile).

1.0 for promazine. The linearity range (*LOL*) for all three compounds in saliva and blood ranged from the *LOQ* to 200 ng/ml.

4. Results and discussion

Proper validation of the methods allowed us to apply them to determination of estazolam, doxepin and promazine in blood and saliva. Figures 2, 3 and 4 show typical chromatograms obtained during analysis. 163 blood and 161 saliva samples were examined for the presence of estazolam. Statistical elaboration of results is shown in Table I. Doxepin was determined in 134 blood and 135 saliva samples, and results are presented in Table II. The concentration of promazine was determined in 102 blood and 119 saliva samples and results are shown in table III. The correlation between concentrations of estazolam, doxepin, and promazine in blood and saliva for all examined persons is shown in Figures 5, 6 and 7.

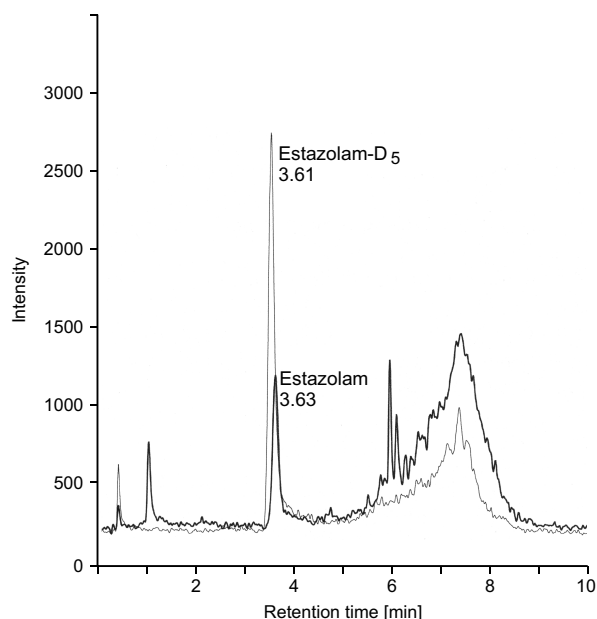


Fig. 2. SIM chromatogram of an extract of blood containing estazolam (18.8 ng/ml, 4 h).

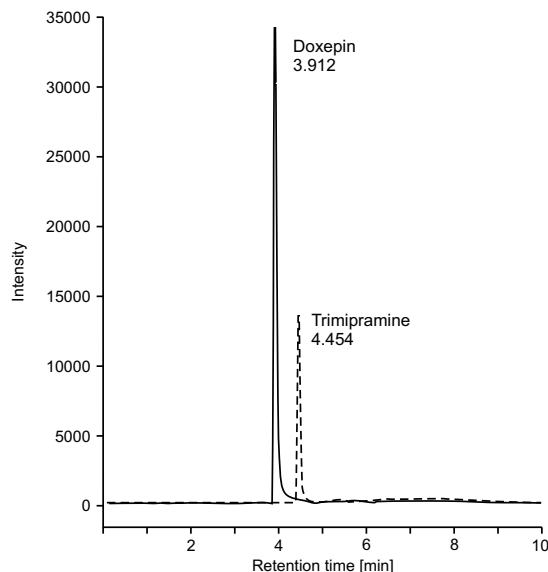


Fig. 3. SIM chromatogram of an extract of saliva containing doxepin (11.2 ng/ml, 2 h).

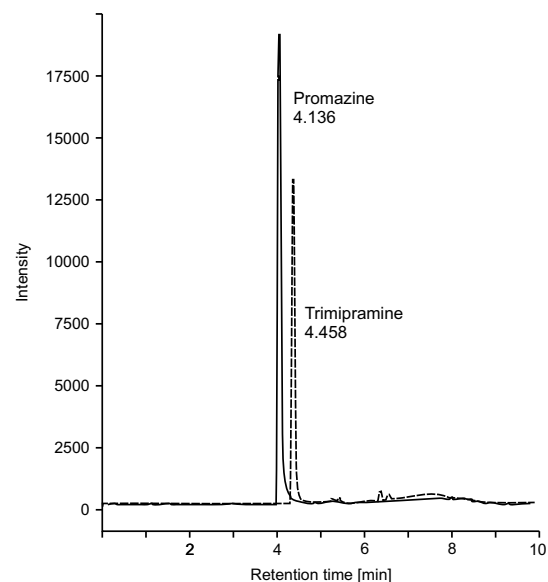


Fig. 4. SIM chromatogram of an extract of saliva containing promazine (24.2 ng/ml, 2 h).

Mean concentrations (ranges) of estazolam expressed in ng/ml in blood 1, 2, 3 and 4 hours after administration were 34 (1.2–86.4); 40 (4.6–91.7); 40 (12.17–81.9) and 46 (16.9–128) respectively. Results were much higher than mean concentrations determined in saliva: 4.9 (0.6–36.3); 3.5 (0.7–7.8); 3.5 (1.4–7.0) and 3.7 (1.0–6.6) respectively. Mean values of estazolam blood/saliva concentration ratio were 7.1; 11.5; 11.5 and 12.6 at appropriate sampling points. The rise of mean estazolam concentration in blood (46) and in saliva (3.7) at the fourth hour after administration was most likely caused by taking alco-

TABLE I. COMPARISON OF ESTAZOLAM CONCENTRATIONS [ng/ml] IN BLOOD AND SALIVA

Sampling point [h]	1		2		3		4	
Material	Blood	Saliva	Blood	Saliva	Blood	Saliva	Blood	Saliva
Mean [ng/ml]	34.52	4.87	40.41	3.5	40.75	3.53	46.19	3.66
<i>SD</i>	22.4	5.62	23.71	2.07	22.2	1.97	24.78	1.86
<i>RSD</i> [%]	65	116	59	59	54	56	54	51
Median [ng/ml]	29.25	1.87	33.29	1.81	27.16	2.1	39.93	2.08
C_{Min} [ng/ml]	1.19	0.57	4.58	0.67	12.17	1.39	16.88	0.98
C_{Max} [ng/ml]	86.4	36.31	91.7	7.78	81.9	7.05	128	6.55
<i>N</i>	43	43	43	42	41	40	36	36
$C_{\text{blood}}/C_{\text{saliva}}$	7.1	11.5	11.5	12.6				

TABLE II. COMPARISON OF DOXEPIN CONCENTRATIONS [ng/ml] IN BLOOD AND SALIVA

Sampling point [h]	1		2		3	
Material	Blood	Saliva	Blood	Saliva	Blood	Saliva
Mean [ng/ml]	10.8	3.7	20.2	10.2	16.0	14.0
<i>SD</i>	16.5	5.5	29.5	16.9	14.7	15.5
<i>RSD</i> [%]	152.9	148.5	146.1	165.5	91.5	110.8
Median [ng/ml]	4.8	1.2	10.8	5.2	12.7	8.5
C_{Min} [ng/ml]	0.0	0.05	1.3	0.3	1.5	0.8
C_{Max} [ng/ml]	88.1	26.8	131.9	89.7	88.1	74.2
<i>N</i>	44	45	45	45	45	45

TABLE III. COMPARISON OF PROMAZINE CONCENTRATIONS [ng/ml] IN BLOOD AND SALIVA

Sampling point [h]	1		2		3	
Material	Blood	Saliva	Blood	Saliva	Blood	Saliva
Mean [ng/ml]	14.1	687.2	20.92	143.5	17.2	128.4
<i>SD</i>	17.2	2255.9	34.00	359.8	30.7	465.7
<i>RSD</i> [%]	121.7	328.3	162.53	250.8	177.9	362.6
Median [ng/ml]	6.6	48.9	10.48	20.3	6.9	6.8
C_{Min} [ng/ml]	0.4	0.3	0.14	0.2	1.1	0.2
C_{Max} [ng/ml]	76.5	11500.0	164.6	2004.7	132.2	2804.9
<i>N</i>	30	40	38	39	34	40
$C_{\text{blood}}/C_{\text{saliva}}$	0.02		0.14		0.13	

hol by examined persons at 30 min before collection of samples. A statistically significant rise in estazolam concentration in both biological fluids after administration of alcohol was shown by Lechowicz et al. [8], but only in the most numerous group of volunteers, i.e.

11 out of 25 persons in whom peak concentration of estazolam in blood occurred 2 hours after administration of medicine. In 36 volunteers out of a group of 50, maximal concentration of estazolam occurred at the same time.

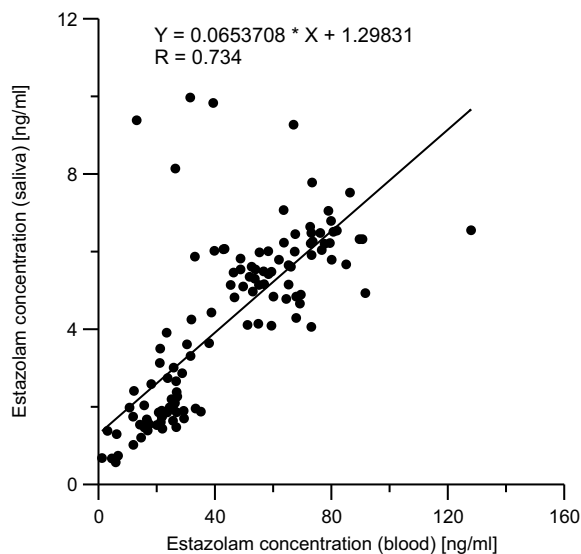


Fig. 5. Correlation between blood and saliva estazolam concentrations.

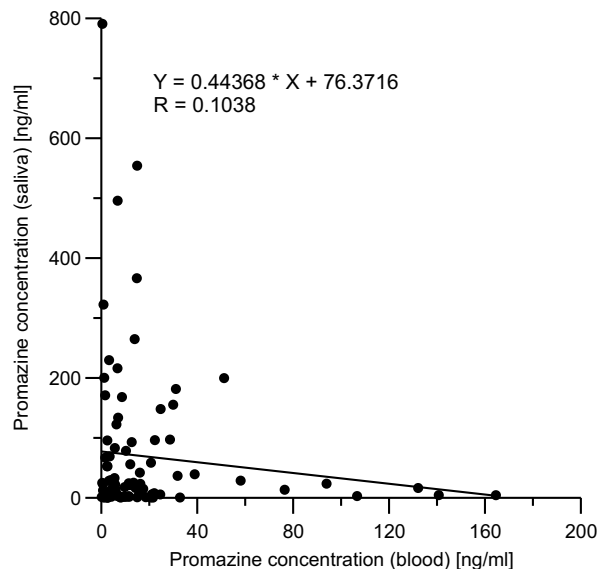


Fig. 7. Correlation between blood and saliva promazine concentrations.

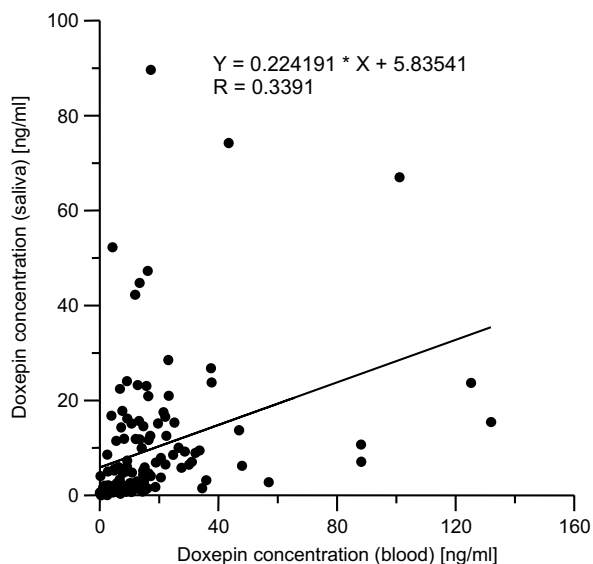


Fig. 6. Correlation between blood and saliva doxepin concentrations.

Determined concentrations of doxepin (Table II) in blood also appeared to be higher than corresponding saliva levels, and mean values of blood/saliva concentration ratio were 2.9; 2.0 and 1.1, at 1, 2, and 3 hours after administration respectively.

For promazine (Table III), average saliva levels were much higher than in blood during the whole period of examination, which is illustrated by mean blood/saliva ratios equalling 0.02, 0.14, and 0.13 at 1, 2, and 3 hours after administration. A comparison of average values obtained in the second and third hour shows that an equilibrium of promazine concentrations in saliva and blood occurred. From a thorough

analysis of particular ratios, it transpires that for 37% of samples collected after 1 hour, and 13% collected at the next two sampling times, blood/saliva concentration ratios of promazine were extremely low; equal or lower than 0.005. High concentrations of promazine lasting for three hours in the saliva may indicate its deposition in the mouth.

Correlation coefficients of concentrations in simultaneously collected blood and saliva samples were 0.734 for estazolam, 0.339 for doxepin and 0.104 for promazine. These values show good correlation of estazolam in saliva and blood, weaker for doxepin and no correlation for promazine. Ascertainment of estazolam and doxepin in saliva may be a marker for the presence of these compounds in blood and therefore in the whole organism, whereas no such conclusion may be drawn for promazine.

The obtained results are consistent with data collected from the literature concerning benzodiazepines [6, 15]. Lower concentrations in saliva, their good correlation in saliva with the free fraction in plasma, but no relationship to lower psychomotor efficiency was ascertained for diazepam, nordiazepam, oxazepam, nitrazepam and chlordiazepoxide. A similar relationship was observed for flunitrazepam and for its metabolite – 7-amino-flunitrazepam, but these compounds were not stable in saliva even after addition of sodium fluoride and storage in a fridge [15]. Other groups of compounds were also investigated. Concentrations of carbamazepine in saliva correlated well with its blood level and even with applied doses. Correlation of concentrations of phenytoin in saliva varied between the free and complete fraction and was dependent on the

speed of saliva secretion, and its concentrations in saliva were not consistent with therapeutic effects [9]. A positive result of saliva analysis also constituted good confirmation of the presence of barbiturates (amobarbital, hexobarbital, pentobarbital and phenobarbital) determined simultaneously in plasma, serum and blood, although in the majority of cases, the saliva level was strongly dependent on pH, and the concentration of studied barbiturates was lower in saliva [6]. Similar effects were confirmed for primidone, ethosuxymide, but the effects were opposite for valproic acid [9]. No data concerning doxepin and promazine was found in the literature.

In recent years, most researches have focused on evaluation of the usefulness of saliva analysis for detection of the most common addictive drugs such as opiates, methadone, cocaine, amphetamines and tetrahydrocannabinols [2, 3, 13, 14, 15]. Data from these studies show that obtained saliva concentrations vary a lot and depend on many parameters. Amphetamine and its analogues, cocaine, benzoilecgonine [5, 14] and in most cases methadone and Δ^9 -tetrahydrocannabinol [11, 15] appear at higher concentrations in saliva than in blood only a short time after administration.

5. Conclusions

- Saliva may be a useful material for detection of estazolam, doxepin and promazine after administration of single therapeutic doses.
 - Observed saliva levels of estazolam were 7 to 12 times lower than in blood, and mean concentration in saliva up till 4 hours after administration was approx. 4 ng/ml.
 - Results obtained for blood and saliva showed good correlation for estazolam after a single dose in a 4 hour period compared to analogous results for doxepin and promazine. Ascertainment of estazolam in saliva is thus a good indicator of its presence in blood. The presence of doxepin in saliva seems to be a weaker indication of its presence in blood.
 - Additional administration of alcohol influences the pharmacokinetics of estazolam, raising its concentration in investigated samples. Concentrations of doxepin in saliva were 2 to 3 times lower than in blood, while mean saliva concentration was about 10 ng/ml. Promazine levels in saliva in most cases were higher than in blood and no correlation between these concentrations was found. That is why it is impossible to confirm promazine presence in blood after saliva analysis alone.
- Determination of the mentioned medicines in saliva and blood after single therapeutic doses requires the use of a sensitive analytical method such as LC-MS – applied in this study.
 - Because of very low peak levels of estazolam in saliva (about 10 times lower than in blood) detection of this compound with available simple devices (testers) is practically impossible.

References

1. Chacia T., Piekoszewski W., Chłobowska Z. [et al.], Determination of benzodiazepines in the blood of car drivers, *Problems of Forensic Sciences* 2000, 44, 43–54.
2. Cone E. J., Presley L., Lehrer M. [et al.], Oral fluid testing for drugs of abuse: positive prevalence rates by Intercept™ immunoassay screening and GC-MS-MS confirmation and suggested cut-off concentrations, *Journal of Analytical Toxicology* 2002, 26, 541–546.
3. Huestis M. A., Cone E. J., Alternative testing matrices, [in:] *Drug abuse handbook*, Karch S. B. [ed.], CRC Press, New York 1998.
4. Huestis M. A., Cone E. J., Relationship of Δ^9 -tetrahydrocannabinol concentrations in oral fluid and plasma after controlled administration of smoked Cannabis, *Journal of Analytical Toxicology* 2004, 28, 394–399.
5. Jufer R. A., Wstadik A., Walsh S. L. [et al.], Elimination of cocaine and metabolites in plasma, saliva, and urine following repeated oral administration to human volunteers, *Journal of Analytical Toxicology* 2000, 24, 467–477.
6. Kidwell D. A., Holland J. C., Athanasis S., Testing for drugs of abuse in saliva and sweat, *Journal of Chromatography B* 1998, 713, 111–135.
7. Kintz P., Samyn N., Use of alternative specimens: drugs of abuse in saliva and doping agents in hair, *Therapeutic Drug Monitoring* 2002, 24, 239–246.
8. Lechowicz W., Adamowicz P., Chudzikiewicz E. [et al.], The interaction between alcohol and estazolam, *Problems of Forensic Sciences* 2004, 58, 45–57.
9. Liu H., Delgado M. R., Therapeutic drug monitoring using saliva samples. Focus on anticonvulsants, *Clinical Pharmacokinetics* 1999, 36, 453–470.
10. Niedbala S. R., Kardos W. K., Fries T. [et al.], Immunoassay for detection of cocaine/metabolites in oral fluids, *Journal of Analytical Toxicology* 2001, 25, 62–68.
11. Niedbala S. R., Kardos W. K., Fritch F. D. [et al.], Detection of marijuana use by oral fluid and urine analysis following single dose administration of smoked and oral marijuana, *Journal of Analytical Toxicology* 2001, 25, 289–303.
12. Niedbala S. R., Kardos W. K., Waga J. [et al.], Laboratory analysis of remotely collected oral fluids specimens for

- opiates by immunoassay, *Journal of Analytical Toxicology* 2001, 25, 310–315.
13. Piekoszewski W., Janowska E., Stanaszek R. [et al.], Determination of opiates in serum, saliva and hair addicted persons, *Przegląd Lekarski* 2001, 58, 287–289.
 14. Samyn N., van Haeren C., On-site testing of saliva and sweat with Drugwipe, and determination of concentrations of drugs of abuse in saliva, plasma and urine of suspected users, *International Journal of Legal Medicine* 2000, 113, 150–154.
 15. Spiehler V., Drugs in saliva, [in:] Clarke's analysis of drugs and poisons, Moffat A. C., Osselton M. D., Widdop B. [eds.], Pharmaceutical Press, London 2004.
 16. Steinmeyer S., Bregel D., Warth S. [et al.], Improved and validated method for the determination of δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC), 11-hydroxy-THC and 11-nor-9-carboxy-THC in serum, and in human liver microsomal preparations using gas chromatography-mass spectrometry, *Journal of Chromatography B* 2002, 772, 239–248.
 17. Verstraete A., ROSITA, Roadside Testing Assessment, Ghent University, Belgium 2001.

Correspondence author

Ewa Chudzikiewicz
Instytut Ekspertyz Sądowych
ul. Westerplatte 9
31-033 Kraków
e-mail: echudzikiewicz@ies.krakow.pl

MOŻLIWOŚCI WYKORZYSTANIA ŚLINY W BADANIACH KIEROWCÓW NA OBECNOŚĆ ESTAZOLAMU, DOKSEPINY I PROMAZYNY*

1. Wstęp

Wykorzystanie śliny jako materiału używanego do wykrywania leków oraz środków odurzających w organizmie człowieka od paru lat staje się coraz bardziej powszechne [6, 7, 10, 11, 12]. Ze względu na łatwość pobierania tego płynu ustrojowego i możliwość kontroli (pod ścisłą obserwacją) samego procesu pobierania, ślina jest używana do oceny stanu zdrowia poszczególnych osób, w terapii monitorowanej, podczas testowania pracowników w celu zapewnienia bezpieczeństwa pracy lub przy badaniu kierowców podejrzanych o prowadzenie samochodu pod wpływem środków obniżających sprawność psychofizyczną [16, 17], a więc, ogólnie rzecz biorąc, do badania dużych grup ludzi pod kątem użycia różnego rodzaju środków psychoaktywnych. Dla wielu leków istnieje bezpośredni fizjologiczny związek pomiędzy jego stężeniem we krwi i ślinie. Stwierdzenie korelacji stężeń leku w tych dwóch płynach ustrojowych wskazuje, że pozytywny wynik badania śliny może być wskaźnikiem obecności danego środka w organizmie [4]. Istotnym problemem związanym z korelacją jego stężeń w ślinie i krwi jest zanieczyszczenie śliny związane z pozostałościami (zaleganiem) w jamie ustnej środków przyjętych doustnie, przez palenie lub przez wciąganie nosem.

Wykorzystanie śliny we wszystkich wymienionych sytuacjach jest możliwe dzięki rutynowemu wykrywaniu pikogramowych ilości leków metodą spektrometrii mas w porównaniu do mikrogramowych poziomów koniecznych podczas detekcji przy użyciu techniki chromatografii cienkowarstwowej czy nawet gazowej z tradycyjną detekcją płomieniowo-jonizacyjną.

Z analizy 77 000 prób śliny i moczu na obecność różnych środków psychoaktywnych wynika, że badania prób śliny dostarczyły równoważną lub nawet większą liczbę wyników pozytywnych w porównaniu z próbami moczu, biorąc pod uwagę grupę najbardziej popularnych środków uzależniających, tj. opiatów, kannabinoli, amfetamin i kokainy [2].

Morfina, kokaina (i jej metabolit – benzoilokgona), tetrahydrokannabinol, amfetamina oraz jej analogi objęte są kontrolą prawną w wielu krajach. We krwi kierowców ich obecność nie jest dopuszczalna. Taka sytuacja nie jest jednak możliwa w przypadku leków, które również mogą wpływać na sprawność psychofizyczną

kierowców. Dlatego podejmuje się liczne badania w poszukiwaniu parametrów określających stan osoby po przyjęciu środków farmakologicznych.

Badania przedstawione w niniejszej pracy zostały wykonane w ramach projektu badawczego pt. „Środki farmakologiczne a bezpieczeństwo ruchu drogowego”. Jednym z celów tego projektu była ocena wpływu leków na wybrane parametry motoryki człowieka. Ocenę tę przeprowadzano przy znanym stężeniu podanego leku we krwi i w ślinie. Leki, których stężenie wyznaczano w tych materiałach, zostały wybrane do badań na podstawie ankiet. Celem badań ankietowych było rozpoznanie rodzaju leków przyjmowanych przez kierowców. Pierwsze ankiety zostały rozesłane do 4000 kierowców w 1997 roku [1]. Na podstawie odpowiedzi uzyskanych od 1161 respondentów należy stwierdzić, że wśród 348 (42%) kierowców, którzy prowadzili samochody pod wpływem leków, 19% przyjmowało benzodiazepiny, 79% różne środki przeciwbólowe, a 2% inne środki. W 2002 zmodyfikowaną ankietę rozesłano do 300 kierowców. Jedno z pytań ankiety dotyczyło rodzaju przyjmowanych leków, przy czym leki podzielone były na 4 grupy: uspokajające, przeciwdepresyjne, neuroleptyczne oraz inne. W każdej grupie wymienione były nazwy od 9 do 12 środków farmakologicznych. Odpowiedzi otrzymano od 278 respondentów, z których 134 stwierdziło, że prowadziło samochód i przyjmowało leki. W grupie leków uspokajających, których przyjmowanie zadeklarowało 67 ankietowanych, aż 24 osoby wskazały estazolam. Wśród leków przeciwdepresyjnych 13 z 22 osób, które przyznały się do zażywania tego typu środków, zaznaczyło doksepinę. W grupie neuroleptyków przyjmowanych przez 11 osób, 7 osób wskazało promazyne. Wśród innych leków, których przyjmowanie zadeklarowało 96 osób, najczęściej wymieniane były środki przeciwbólowe, przeciwgorączkowe, przeciwhistaminowe i antybiotyki.

Wybrane do badania zaburzeń sprawności psychomotorycznej związku modelowe, czyli estazolam, doksepina i promazyne, już w dawkach terapeutycznych wywołują liczne objawy niepożądanego działania. Objawy te powodują, że chorzy podczas leczenia nie powinni prowadzić pojazdów, obsługiwać maszyn i przyjmować napojów alkoholowych. Informacje dotyczące wpływu leku na zdolność do prowadzenia pojazdów są umieszczone w formie piktogramu na opakowaniu leku oraz w formie tekstowej na ulotce dołączonej do każdego z tych leków. Informacje takie są wymogiem dyrektywy UE 83/570/EEC o przepisach dotyczących preparatów leczniczych oraz 92/27/EEC o oznakowaniu preparatów

* Badania przedstawione w niniejszej pracy zostały wykonane w ramach projektu badawczego zatytułowanego „Środki farmakologiczne a bezpieczeństwo ruchu drogowego” (grant KBN nr 6 P0 5D 060 21).

lecniczych. Poniżej scharakteryzowano działanie tych leków ze szczególnym uwzględnieniem objawów niepożądanego działania, które w istotny sposób mogą wpływać na obniżenie sprawności psychomotorycznej kierowcy.

Estazolam to pochodna triazolobenzodiazepiny, która stosowana jest w leczeniu bezsenności, jako lek pomocniczy w terapii psychoz oraz jako lek przeciwlękowy w nerwicach. Działa na CUN, w szczególności na układ limbiczny i podwzgórze, ułatwia przekazywanie GABA-ergiczne. Przyjmowany w dawkach terapeutycznych może powodować nadmierną senność, niezborność ruchów, rzadziej uczucie zmęczenia, nudności, zawroty głowy, zamazane lub podwójne widzenie, drżenie ciała i zaburzenia pamięci.

Doksepina to trójpierścieniowy lek przeciwdepresyjny działający silnie przeciwlękowo i uspokajająco oraz ułatwiający zasypianie. Jej mechanizm działania polega na blokowaniu receptorów cholinergicznym centralnym i obwodowym oraz hamowaniu wchłaniania zwrotnego neuroprzekazników. Stosowana jest w leczeniu zespołów depresyjnych objawiających się niepokojem i wysokim poziomem lęku oraz w nerwicach z objawami somatycznymi i bezsennością. Może spowodować u pacjentów uczucie zmęczenia, przyspieszenie akcji serca, suchość błon śluzowych jamy ustnej, zaburzenie akomodacji i zwiększenie ciśnienia śródgałkowego. Główną jednak dolegliwością, zwłaszcza na początku leczenia, jest odczuwanie nadmiernej senności w ciągu dnia.

Promazyna jest pochodną alifatyczną fenotiazyny. Wykazuje umiarkowane działanie uspokajające, niewielkie przeciwwytwórcze oraz przeciwautystyczne, ma słaby wpływ na układ pozapiramidowy i autonomiczny. Stosowana jest w psychozach, zwłaszcza wieku podeszłego, przebiegających z pobudzeniem psychomotorycznym. Najczęściej występujące objawy niepożądane przy leczeniu promazyną to senność, ospałość, apatia, zmęczenie, niepokój, stan splątania i dezorientacji, zawroty głowy, obniżenie ciśnienia tętniczego krwi, możliwość wystąpienia zaburzeń rytmu serca oraz niewyraźne, zamazane widzenie.

2. Cel pracy

Celem niniejszej pracy była ocena przydatności śliny do badania kierowców na obecność estazolamu, doksepiny i promazyny.

3. Materiały i metody

3.1. Odczynniki

Zastosowano substancje wzorcowe: estazolam (Pliva, Polska), estazolam-D₅, promazynę, doksepinę, trimipraminę (Sigma, Stany Zjednoczone) oraz odczynniki: acetonitryl, heksan, alkohol izoamylowy (Merck, Niemcy), wodę destylowaną (z destylarki kwarcowej), kwas mrówkowy (Ubichem, Wielka Brytania), eter diizopropylowy (Sigma, Stany Zjednoczone), wodorotlenek sodu oraz składniki buforu fosforanowego (POCH, Polska).

3.2. Materiał

Materiał do badań stanowiły próby krwi i śliny pobrane od 50 ochotników (mężczyźni, wiek 19–23 lat, masa ciała 70–80 kg, wzrost 175–180 cm), którzy nie przyjmowali wcześniej leków stanowiących przedmiot badań. Ochotnikom podano jednorazowo estazolam, doksepinę i promazynę w dawkach terapeutycznych. Leki były podawane w odstępach co najmniej tygodniowych, a ich dawki wynosiły dla estazolamu 1 mg, a dla doksepiny i promazyny po 50 mg. Próby krwi i śliny pobierano równocześnie po 1, 2 i 3 godzinach od podania leku, zaś w przypadku estazolamu dodatkowo po 4 godzinach, przy czym po 3,5 godzinach po zażyciu estazolamu ochotnicy otrzymali alkohol w dawce prowadzącej do stężenia wynoszącego 0,5‰.

Próbki śliny pobierano bez stymulacji przez spluwanie do polipropylenowych probówek. Krew pobierano do heparynizowanych naczyń. Po pobraniu próbki śliny wiorowano. Oba rodzaje materiału przechowywano w zamrażarce (w temperaturze –20 °C) od momentu pobrania do czasu wykonania analizy.

3.3. Ekstrakcja

Do wyosabniania leków z płynów ustrojowych zastosowano ekstrakcję ciecz-ciecz. Jako wzorce wewnętrzne użyto dla estazolamu jego deuterowaną pochodną – estazolam-D₅ w stężeniu 50 ng/ml dla krwi i 5 ng/ml dla śliny. Jako wzorec wewnętrzny do oznaczania doksepiny i promazyny we krwi i ślinie zastosowano trimipraminę w stężeniu 20 ng/ml. Do ekstrakcji pobierano po dwie próbki krwi i śliny o objętości 0,2 ml dla estazolamu i 1 ml dla doksepiny i promazyny.

Estazolam ekstrahowano ze środowiska kwaśnego (pH 5, 0,2 ml buforu fosforanowego) eterem diizopropylowym (1,2 ml) przez wstrząsanie za pomocą wortexu (30 s, 50 Hz). Po odwirowaniu pobierano 1 ml fazy organicznej, którą odparowywano w temperaturze 40 °C przy nadmuchu azotu. Suchą pozostałość rozpuszczano w 0,1 ml fazy ruchomej i 20 µl próbki wprowadzano na kolumnę przy użyciu automatycznego podajnika próbek [8].

Promazyne i doksepiny ekstrahowano ze środowiska silnie alkalicznego (pH 13, 3 ml 0,6 M NaOH) mieszaniną n-heksanu z alkoholem izoamylovym (99:1, v/v) (5 ml) przez wytrząsanie za pomocą wytrząsarki (10 min). Po odwirowaniu warstwę organiczną (3 ml) zagęszczano do około 0,5 ml w urządzeniu TurboVap w strumieniu azotu. Następnie prowadzono reekstrakcję do 0,1 ml 0,1% wodnego roztworu kwasu mrówkowego przez 5 min wytrząsanie za pomocą wortexu. Po odwirowaniu warstwę wodną (20 µl) wprowadzano na kolumnę za pomocą automatycznego podajnika próbek.

Wydajność ekstrakcji [%] dla każdego leku z krwi i śliny ($n = 5$) wynosiła 74 i 71 dla estazolamu (wyznaczona odpowiednio przy stężeniach 30 i 4 ng/ml), 89 i 82 dla doksepiny (dla stężeń 15 ng/ml we krwi i 10 ng/ml w ślinie) oraz 84 i 79 dla promazyny (odpowiednio przy 15 i 100 ng/ml).

3.4. Aparatura

Badania wykonano metodami chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas (LC-MS) przy zastosowaniu aparatu firmy Agilent Technologies, serii HP-1100. Stosowano pozytywny chemiczny rodzaj jonizacji pod ciśnieniem atmosferycznym (APCI). Rozdział prowadzono, używając kolumny LiChroCART 55 4 z wypełnieniem Purospher STAR RP-18e. Fazę ruchomą stanowił 0,1% (v/v) kwas mrówkowy w wodzie i acetonitrylu. Analizy wykonano w warunkach gradientu składu fazy (rycina 1).

3.5. Oznaczanie

Zarejestrowano pozorne jony molekularne $[M+H]^+$ (m/z) estazolamu – 295, estazolamu D₅ – 300, doksepiny – 280, promazyny – 285 i trimipraminy – 295. Metody oznaczania leków we krwi i ślinie zostały zoptymalizowane i zwalidowane. Uzyskane granice wykrywalności (LOD) i oznaczalności (LOQ), wyrażone w ng/ml, wynosiły odpowiednio 0,5 i 1,0 dla estazolamu, 0,1 i 0,5 dla doksepiny oraz 0,2 i 1,0 dla promazyny. Zakres liniowości (LOL) dla wszystkich trzech związków we krwi i ślinie wynosił od LOQ do 200 ng/ml.

4. Wyniki i dyskusja

Właściwe parametry walidacji metod pozwoliły na zastosowanie ich do oznaczania estazolamu, doksepiny i promazyny we krwi i ślinie. Na rysunkach 2, 3 i 4 przedstawiono typowe chromatogramy uzyskane podczas przeprowadzonych analiz. Przebadano 163 próbki krwi i 161 próbek śliny na zawartość estazolamu, a dane statystyczne uzyskanych wyników przedstawiono w tabeli I. Doksepiny oznaczono w 134 próbkach krwi i 135 prób-

kach śliny, zaś odpowiednie dane statystyczne zebrano w tabeli II. Stężenie promazyny wyznaczono w 102 próbkach krwi i 119 próbkach śliny, zaś odpowiednie dane zebrano w tabeli III. Korelację stężeń estazolamu, doksepiny i promazyny we krwi i ślinie dla wszystkich przebadanych osób przedstawiono na rysunkach 5, 6, i 7.

Średnie (zakres) stężenia estazolamu we krwi po 1, 2, 3 i 4 godzinach od podania jednorazowej dawki leku wynosiły odpowiednio: 34 (1,2–86,4); 40 (4,6–91,7); 40 (12,17–81,9) i 46 (16,9–128) ng/ml i były znacznie wyższe od średnich stężeń estazolamu wyznaczonych w ślinie: 4,9 (0,6–36,3); 3,5 (0,7–7,8); 3,5 (1,4–7,0) i 3,7 (1,0–6,6). Średnie wartości stosunku stężeń estazolamu we krwi i ślinie – $C(\text{krew})/C(\text{ślina})$ – wynosiły 7,1; 11,5; 11,5 i 12,6 w odpowiednich godzinach pobierania materiałów. Wzrost średniego stężenia estazolamu we krwi (46) i ślinie (3,7) w czwartej godzinie po przyjęciu leku spowodowany był najprawdopodobniej podaniem ochotnikom alkoholu pół godziny przed pobraniem śliny i krwi. Statystycznie znamiennej wzrost stężenia estazolamu w obu płynach ustrojowych po podaniu alkoholu wykazał Lechowicz i in. [8], ale tylko w najliczniejszej grupie ochotników, czyli u 11 z 25 osób, u których maksymalne stężenie estazolamu we krwi występowało po 2 h od podania leku. W grupie 50 ochotników maksymalne stężenie estazolamu w tym samym czasie występowało u 36 osób.

Wyznaczone stężenia doksepiny (tabela II) we krwi również przewyższały odpowiednie stężenia tego leku w ślinie, a średnie wartości stosunku stężeń $C(\text{krew})/C(\text{ślina})$ wynosiły 2,9; 2,0 i 1,1 odpowiednio po 1, 2 i 3 godzinach od przyjęcia leku.

Dla promazyny (tabela III) średnie stężenia w ślinie znacznie przewyższały w całym badanym okresie stężenia we krwi, co obrazują średnie stosunki stężeń $C(\text{krew})/C(\text{ślina})$ wynoszące 0,02; 0,14 i 0,13 po 1, 2 i 3 godzinach. Z porównania ich średnich wartości w drugiej i trzeciej godzinie wynika, że wystąpiła równowaga stężeń promazyny pomiędzy krwią i śliną. Z analizy poszczególnych stosunków wynika, że dla 37% próbek pobranych po jednej godzinie i 13% próbek pobranych w następnych odstępach czasu stosunki stężeń promazyny ślina/krew były bardzo niskie (równe lub niższe niż 0,005). Wysokie stężenie promazyny utrzymujące się w ślinie przez trzy godziny może wskazywać na jej zaleganie w jamie ustnej.

Współczynniki korelacji stężeń leków w równocześnie pobranych próbkach krwi oraz śliny wynosiły 0,734 dla estazolamu, 0,339 dla doksepiny i 0,104 dla promazyny. Wartości tych współczynników wskazują na dobrą korelację stężeń estazolamu w ślinie i krwi, słabszą dla doksepiny i brak korelacji dla promazyny. Stwierdzenie estazolamu i doksepiny w ślinie może być zatem wskaźnikiem obecności tych leków we krwi, a tym samym

w organizmie, natomiast wykazanie promazyny w ślinie nie jest równoważne z jej obecnością we krwi.

Uzyskane podczas opisanych tu badań wyniki są zgodne z danymi zaczerpniętymi z piśmiennictwa, a dotyczącymi innych benzodiazepin [6, 15]. Niższe stężenia w ślinie i dobrą ich korelację w ślinie z wolną frakcją leków w osoczu, ale brakiem zależności pomiędzy stężeniem a obniżeniem sprawności psychomotorycznej, stwierdzono dla diazepam, nordiazepam, oksazepam, nitrazepam i chlordiazepoksydu. Podobną zależność wykazano dla flunitrazepamu oraz jego metabolitu – 7-aminoflunitrazepamu, ale te związki nie były trwałe w ślinie nawet po dodaniu do niej fluorku sodu i przechowywaniu w lodówce [15]. Inne grupy leków również zostały zbadane. Stężenia karbamazepiny w ślinie korelowały dobrze z jej stężeniem we krwi, a nawet z podaną dawką. Korelacja stężeń fenytoiny w ślinie różniła się dla frakcji wolnej oraz całkowitej i była zależna od szybkości wydzielania śliny, a jej stężenia w ślinie nie znajdowały się w zgodności z efektami działania terapeutycznego [9]. Pozytywny wynik badania śliny stał się również dobrym potwierdzeniem obecności barbituranów (amobarbitalu, heksobarbitalu, pentobarbitalu i fenobarbitalu) oznaczanych równocześnie w osoczu, surowicy i krwi, chociaż w większości przypadków poziom leku w ślinie był bardzo zależny od jej pH, a stężenie badanych barbituranów było niższe w ślinie [6]. Podobny efekt wykazano dla prymidonu, etosuksymidu, natomiast odmienny dla kwasu walproinowego [9]. W dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono danych odnoszących się do doksepiny i promazyny.

W ostatnich latach opublikowano liczne prace dotyczące badania przydatności śliny do wykrywania najczęściej nadużywanych środków uzależniających, czyli opiatów, metadonu, kokainy, amfetamin i tetrahydrokannabinolu [2, 3, 13, 14, 15]. Z analizy wyników tych ostatnich badań wynika, że stężenia związków z wymienionych grup w ślinie bardzo się różnią i zależą od wielu czynników. Amfetamina i jej pochodne, kokaina, benzoilokgonina [5, 14], a także w większości przypadków metadon i tetrahydrokannabinol [11, 15], występują w ślinie w wyższych stężeniach niż we krwi w krótkim czasie od przyjęcia środka.

5. Wnioski

- Ślina może być przydatnym materiałem do wykrywania estazolamu, doksepiny i promazyny po dostnym przyjęciu pojedynczych, terapeutycznych dawek tych leków.
- Obserwowane stężenia estazolamu w ślinie były od 7 do 12 razy niższe niż we krwi, a średnie stężenie w ślinie do 4 godzin od podania leku wynosiło około 4 ng/ml.

- Zestawienie wyników badania krwi oraz śliny wykazało dobrą korelację stężeń dla estazolamu po przyjęciu jednorazowej terapeutycznej dawki leku do 4 godzin od chwili podania w porównaniu do analogicznych badań prowadzonych dla doksepiny i promazyny. Stwierdzenie estazolamu w ślinie jest zatem dobrym wskaźnikiem istnienia tego leku we krwi. Ustalenie obecności doksepiny we krwi po badaniu śliny jest słabsze.
- Dodatkowe przyjęcie alkoholu wpłynęło na farmakokinetkę estazolamu, podnosząc jego stężenie w badanych płynach ustrojowych. Stężenia doksepiny w ślinie były od 2 do 3 razy niższe niż we krwi, przy czym średnie stężenie w ślinie wynosiło około 10 ng/ml. Stężenia promazyny w ślinie w większości przypadków były wyższe niż we krwi i nie stwierdzono zależności między tymi stężeniami. Z obecności promazyny w ślinie nie można zatem wnioskować o jej pozostawaniu we krwi.
- Oznaczanie wymienionych leków w ślinie i we krwi po przyjęciu pojedynczych dawek terapeutycznych wymaga zastosowania odpowiednio czulej metody instrumentalnej, np. metody LC-MS, jaką zastosowano w niniejszej pracy.
- Ze względu na niskie stężenie estazolamu w ślinie (około 10-krotnie niższe niż we krwi), wykrycie tego leku za pomocą dostępnych urządzeń (testerów) do wykrywania benzodiazepin w ślinie jest praktycznie niemożliwe.