



## HAIR AS A COMPLEMENTARY MATERIAL IN DRUG TESTING OF DRIVERS FOR BENZODIAZEPINES

Wojciech LECHOWICZ<sup>1</sup>, Vanessa BUNKER<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *Institute of Forensic Research, Krakow*

<sup>2</sup> *Strathclyde University, Glasgow, United Kingdom*

### Abstract

Apart from blood and urine, experts have been discussing the suitability of other endogenous excretions (e.g. saliva and sweat) or body parts (e.g. hair and nails) as being suitable for the detection of drugs. All these specimens should be regarded as complementary rather than alternative materials. Hair does not seem to be an appropriate material for driver drug testing at road sites or (as the sole basis) for explanation of road accident circumstances. At least two aspects of road safety must be discussed. The first is road site control conducted to test for impairment of psychomotor efficiency mentioned above. Blood, saliva and urine may be used. The second is confirmation of abstinence from drugs. Methods of analysing hair content have been successfully used in forensic medicine for years. It is, for example, possible to verify the abuse of drugs in this matrix. The paper presents a quantitation method for benzodiazepines in hair. Liquid-liquid extraction with diisopropyl ether was used for preconcentration of analytes. The most common benzodiazepines group on the Polish drug market was analysed by this method. Liquid chromatography mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionisation was used for hair analysis. Two cases of known history of benzodiazepine ingestion were presented to demonstrate the usefulness of the method.

### Key words

DUI; Hair testing; Benzodiazepines.

*Received 4 December 2005; accepted 30 December 2005*

### 1. Introduction

The results of hair analysis for the presence of intoxicants and/or psychotropic agents have many advantages in comparison with results of analysis of e.g. urine or blood. The slow deposition of the analyte in growing hair means that analysis of an appropriate hair segment allows us to detect substances which were taken a few months earlier. Usually, hair is analysed whose length corresponds to a six month period of taking narcotics, thus about 6–10 cm. From the practical point of view, hair is a good material for analysis, since its collection is simple, as is transportation and storage. Hair is taken for examination from the

back of the head, as then hairs are characterised by the smallest variability of growth and influence of the process of aging and sex. However, obtaining a suitable amount of hair (100–150 mg) for analysis can be a problem. In order to obtain such an amount, quite a large bunch of hair has to be collected from the studied person (the thickness of a pencil). It should be noted that 1 cm of hair weighs only about 0.05 mg.

Doubts can also arise concerning contamination and interpretation of obtained results. Hair care procedures can also significantly influence results of analysis [11].

Apart from analysing hair for the presence of typical intoxicants and psychotropic agents, researchers

also consider medicines, e.g. from the benzodiazepines group. This is because of their effect on the psychomotor efficiency of drivers.

Benzodiazepines are mentioned in the decree of the Minister of Health of 11.06.2006 concerning analysis methods for the presence of substances acting similarly to alcohol. It is believed that there is a particular risk of drivers causing an accident during the first two weeks of use of some benzodiazepines. Testing drivers for the presence of benzodiazepines takes on a special meaning in the light of results of testing of drivers suspected of driving under the influence of psychoactive substances. Drugs from this group are detected in every third case, and in screening analyses of drivers who have not been involved in car accidents, the number of positive samples is 3%.

Benzodiazepine derivatives belong to the psychotropic drugs group; their action is mainly sedative, hypnotic and antianxiety-relieving; their use can easily lead to psychical and physical addiction. Sudden discontinuation of drugs from this group can cause withdrawal symptoms (convulsions). Treatment of insomnia or its prevention by use of benzodiazepines is very common in Poland. It is the most often used drug group for this kind of disease.

The methodology of determination of benzodiazepines in body fluids is well described, unlike methods of hair examination, which have only become a focus of interest for forensic toxicologists in recent years. In the study of benzodiazepines, gas chromatography with flame ionisation detection as well as with electron capture detection proved to be inadequate due to rich biological background and low concentrations of analytes. Most often determination of benzodiazepines in hair is performed by means of immunological methods [7, 8, 9] or chromatographic methods coupled with mass spectrometry. Due to low concentrations, a considerable number of applications utilise chemical ionisation with negative-ion monitoring mode (e.g. GC-MS/NCI) or LC-MS/MS [1, 2, 4, 5].

The number of benzodiazepines encompassed by examinations is usually not large – this is mainly due to practical considerations. Yegles, examining hair collected from 21 persons, demonstrated the presence of nordiazepam in 20 cases, diazepam and oxazepam in 15, and flunitrazepam in 8 cases. The maximal concentrations of these drugs were 1.8 ng/mg, 2.2 ng/mg, 3.4 ng/mg and 9.5 ng/mg, respectively. In their conclusion, the authors stated that nordiazepam is the most frequently used drug in the benzodiazepines group [12]. Analysis of hair for the presence of various groups of substances carried out by Kintz revealed the presence of benzodiazepines, whose concentrations

were from 0.37 ng/mg for nitrazepam and 2.41 for nordiazepam. From this group, diazepam and flunitrazepam were also present. Cirimele showed that lorazepam concentrations determined by LC-MS/NCI in hair of 16 cm length increased from the end to the bulb from 31 to 49 pg/mg [3]. However, analysis of volunteers' hair after taking a single dose of clonazepam performed by Negrusz and associates showed the presence of only 7-aminoclonazepam in concentrations below 10 pg/mg [6].

In this paper, a procedure of benzodiazepines determination was proposed by means of liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC-MS with use of atmospheric pressure chemical ionisation).

## 2. Materials and methods

The following standards and solutions: oxazepam, lorazepam, nordiazepam, clorazepate, temazepam, diazepam, estazolam, nitrazepam, clonazepam, flunitrazepam, prazepam (internal standard) (Sigma, USA), acetonitrile (Merck, Germany), water (distilled in quartz distillation apparatus), diisopropyl ether (Sigma, USA), sodium phosphate and hydrophosphate (POCh, Poland) and formic acid (Ubichem, United Kingdom) were used.

Analyses were performed on a liquid chromatograph HP-1100 Series (Agilent Technologies). Chemical ionisation mode at atmospheric pressure (APCI) was applied. A from pseudomolecular ions of the analysed benzodiazepine group were registered.

Optimisation of chosen parameters of the method, in which the height of the peak of the given analyte constituted the criterion of assessment, encompassed the following:

- mass spectrometer parameters (fragmentor voltage, vaporiser temperature, capillary voltage, drying gas temperature, nebuliser pressure, corona current);
- extraction parameters (extraction pH, solvent, time of extraction);
- chromatographic conditions (column, gradient program).

The influence of individual parameters on the intensity of the analyte signal was analysed by means of the flow injection analysis technique (FIA). In Table I, the obtained optimal parameters of the mass spectrometer are presented.

As a result of the research described above, diisopropyl ether was selected as an extractant (Figure 1), the pH of the extraction environment reaction as pH 6–7 and the duration of extraction – longer than 30 seconds.

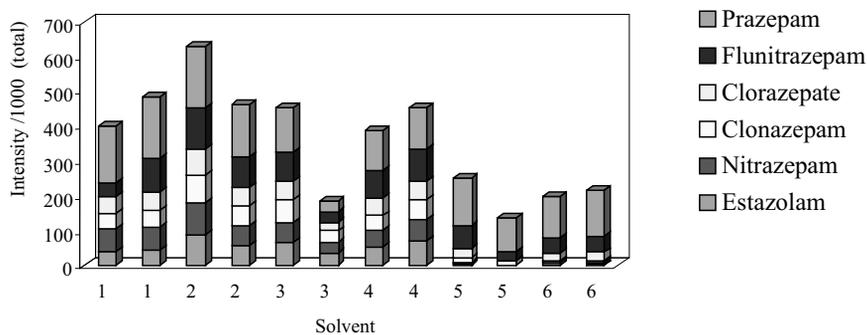


Fig. 1. Optimisation of solvent type for extraction of group II (1 – diisopropyl ether, 2 – diethyl ether, 3 – n-butyl chloride, 4 – n-propyl chloride, 5 – n-pentane, 6 – n-hexane).

TABLE I. MS PARAMETERS

Parameter	Value
Capillary voltage	4200 V
Fragmentor voltage	100 V
Corona current	5 $\mu$ A
Drying gas temperature	320 C
Vaporiser temperature	320 C

TABLE II. GRADIENT PROFILE IN THE LC-MS METHOD

Time [min]	Phase [B]
0	30
15	70
16	30
21	30

In order to remove possible residues that are the result of contact of hair with the external environment that could contain benzodiazepines, hair was subjected to washing. The decontamination stage consisted in washing hair twice with methylene chloride for 5 minutes. Hair was spread out and dried at room temperature. Before beginning extraction, hair was subjected to homogenisation. To this end hair was cut with scissors into short segments (1–2 mm), and then ground in a ball mill. The process of extraction is presented below.

To 50 mg ground hair was added 200  $\mu$ l phosphate buffer (pH 7.4) and 20  $\mu$ l of internal standard at a concentration of 2.5  $\mu$ g/ml (prazepam). Hair was completely dissolved in phosphate buffer at a temperature of 40 C for 24 h. Extraction was performed with 1 ml diisopropyl ether by shaking the sample on a shaker for 30 s. The sample was centrifuged at 6000 rpm. 600  $\mu$ l was taken for evaporation under a stream of nitrogen and the dry residue was dissolved in 50  $\mu$ l of mobile phase (50:50).

Separation was performed using a LiChroCART (125  $\times$  4 mm) column with LiChrospher RP select B phase (Merck). The flow rate of the mobile phase was 1 ml/min. Gradient conditions were applied (Table II). 20  $\mu$ l-injections were executed by autosampler. The mobile phase consisted of 0.1% formic acid in acetonitrile (B) and in water (A).

### 3. Validation

The elaborated method was validated using a computer program named Validation Manager (Merck) to aid in calculations. Within and between group precision was calculated on the basis of a series of six repetitions ( $n = 6$ ) of analyses of hair enriched with a mixture of benzodiazepines at concentrations of 0.2 or 0.5 ng/ml. Series were repeated over three days ( $p = 3$ ). The analysed concentration was chosen taking into account the concentrations used for therapeutic purposes. For clonazepam, estazolam, nitrazepam, flunitrazepam are taken at lower doses than the rest of the analysed benzodiazepines. The obtained results are presented in Table III.

With the exception of clorazepate, for which repeatability amounted to  $CV_{wg}$  30%, other values of  $CV$  were satisfactory. It should be noted that clorazepate occurs as a sodium salt, 80% of which undergoes decarboxylation in the stomach to nordiazepam. Clorazepate intake is thus confirmed most often through demonstrating the presence of nordiazepam. Studies of linearity have shown that in all cases the determination coefficient was higher than 0.95 in the tested concentration ranges. Appropriate equations and their determination coefficients are presented in Table IV.

TABLE III. PRECISION OBTAINED DURING VALIDATION (CV [%], ASSAY NUMBER  $n = 6$ ; GROUP NUMBER  $p = 3$ ).

Benzodiazepine	$CV_{wg}$ [%]	$CV_{bg}$ [%]	$CV_{tg}$ [%]	Target concentration [ng/mg]	Calculated concentration [ng/mg]
Clonazepam	19	22	29	0.2	0.19
Clorazepate	30	38	49	0.2	0.18
Diazepam	8	15	17	0.5	0.48
Estazolam	12	17	21	0.2	0.19
Flunitrazepam	10	11	16	0.2	0.18
Lorazepam	6	13	15	0.5	0.47
Nitrazepam	12	16	20	0.2	0.18
Nordiazepam	9	13	16	0.5	0.50
Oxazepam	8	26	28	0.5	0.47
Temazepam	10	9	14	0.5	0.49
Prazepam (IS)	–	–	–	1	–

$CV_{wg}$  – within-group coefficient of variation;  $CV_{bg}$  – between-group coefficient of variation;  $CV_{tg}$  – total coefficient of variation.

TABLE IV. CALIBRATION CURVE EQUATIONS AND THEIR COEFFICIENTS OF DETERMINATION

Benzodiazepine	Calibration line equation	Determination coefficient
Clonazepam	$y = 0.649 x - 0.006$	0.965
Clorazepate	$y = 0.529 x - 0.007$	0.979
Diazepam	$y = 5.744 x - 1.033$	0.995
Estazolam	$y = 0.501 x - 0.011$	0.951
Flunitrazepam	$y = 1.905 x - 0.051$	0.956
Lorazepam	$y = 1.774 x - 0.104$	0.998
Nitrazepam	$y = 0.585 x - 0.004$	0.985
Nordiazepam	$y = 0.477 x - 0.056$	0.994
Oksazepam	$y = 1.135 \cdot 10^{-4} x - 6.054 \cdot 10^{-6}$	0.993
Temazepam	$y = 7.704 x - 0.840$	0.993

The limit of detection  $LOD$  was below 50 pg/mg, and in the case of flunitrazepam below 10 pg/mg. It was established that determinations would be performed in the range 0.25–5 (10) ng/mg, although from analyses of precision and accuracy it can be concluded that repeatability for concentrations of the order of 0.2 ng/ml is characterised by values of  $CV$  below 20% and thus these concentrations can be determined.

#### 4. Results

The elaborated method was used for analysis of real samples taken from two persons (drug addicts), who were known to take benzodiazepines. Analysis of the first segment of length 2 cm showed the presence of drugs from the benzodiazepine group.

In person I, the following were detected: flunitrazepam 0.7 ng/mg, nordiazepam 1.0 ng/mg, oxazepam 0.5 ng/mg, diazepam 0.9 ng/mg, temazepam < 0.1 ng/mg (about 0.05 ng/ml). In person II, the following were de-

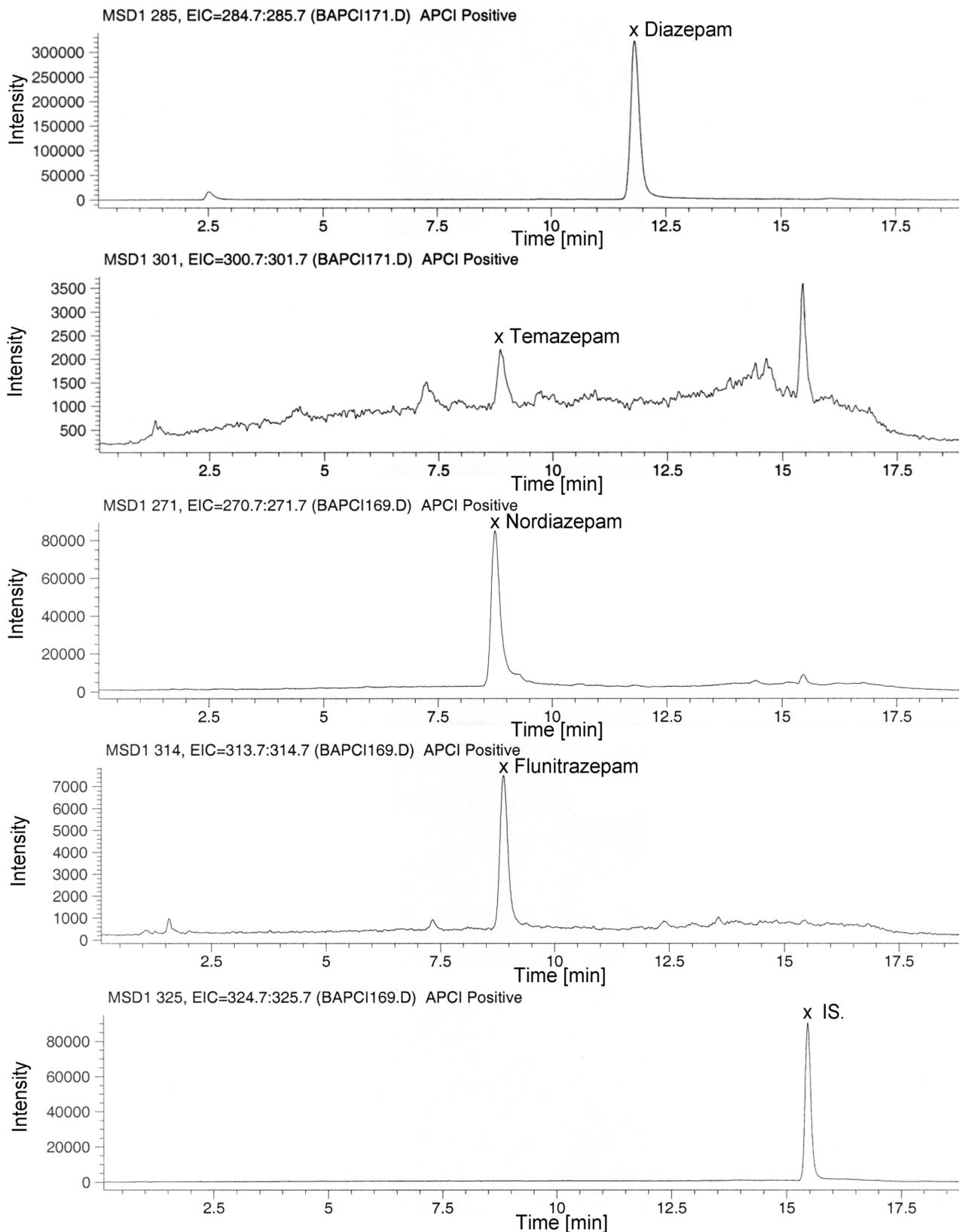


Fig. 2. Chromatograms obtained for analysis of hair taken from person II.

tected: nordiazepam 1.3 ng/mg, diazepam 3.0 ng/mg, oxazepam < 0.1 ng/mg, temazepam < 0.1 ng/mg, flunitrazepam < 0.1 ng/mg (Figure 2). Because of the small amount of hair, a single sample of mass 50 mg was prepared for analyses. Determined concentrations were typical for persons who regularly (for therapeutic purposes) take benzodiazepines. As the quoted literature shows, concentrations of this order are also recorded in drug-addicts.

## 5. Conclusions

The presented method can be used for hair analysis for the presence of benzodiazepines used for therapeutic purposes (a few weeks therapy) or for monitoring persons abusing drugs from this group. Low concentrations in hair after a single dose, especially in the case of benzodiazepines, whose doses are low (e.g. flurazepam, flunitrazepam or lorazepam) make it impossible or difficult to use this method because – as the quoted papers show – their concentrations are below the limit of quantification in the presented method. Because of the long biological half-life of benzodiazepines, their effects can last for several days after the end of therapy.

The answer to the question concerning whether a suspect was being treated with benzodiazepines at the moment of the accident can be obtained upon analysis of an appropriate segment of hair. Thus, the described method should be useful for testing drivers, when appropriate changes in the law make it possible to use the results of this kind of analysis.

Hair can be and is used (Austria, Germany) for the purpose of testing drivers before issuing or renewing a driving license. It serves as a complementary material, supplementing body fluids such as blood, urine and saliva, and, furthermore, serves as additional material aiding in interpretation in medical examinations. The results of hair analyses can also be used in epidemiological studies of drivers [10]. In this respect, they are significantly better than other types of material, both as a complementary material and as a means of verifying the authenticity of answers of surveyed drivers.

## References

1. Cirimele V., Kintz P., Ludes B., Screening for forensically relevant benzodiazepines in human hair by gas chromatography-negative ion chemical ionization-mass spec-

trometry, *Journal of Chromatography B* 1997, 700, 119–129.

2. Cirimele V., Kintz P., Mangin P., Determination of chronic flunitrazepam abuse by hair analysis using GC-MS-NCI, *Journal of Analytical Toxicology* 1996, 20, 596–598.
3. Cirimele V., Kintz P., Mangin P., Detection and quantification of Lorazepam in human hair by GC-MS/NCI, *International Journal of Legal Medicine* 1996, 108, 265–267.
4. Höld K. M., Crouch D. J., Wilkins D.G. [et al.], Detection of alprazolam in hair by negative ion chemical ionization mass spectrometry, *Forensic Science International* 1997, 84, 201–209.
5. Kronstrand R., Nyström I., Josefsson M. [et al.], Segmental ion spray LC/MS/MS analysis of benzodiazepines in hair of psychiatric patients, *Journal of Analytical Toxicology* 2002, 26, 519–523.
6. Negrusz A., Bowen A. M., Moore C. M. [et al.], Deposition of 7-aminoclonazepam and clonazepam in hair following a single dose of Klonopin™, *Journal of Analytical Toxicology* 2002, 26, 471–478.
7. Negrusz A., Moore C., Deitermann D. [et al.], Highly sensitive micro-plate enzyme immunoassay screening and NCI-GSMS confirmation of flunitrazepam and 1<sup>st</sup> major metabolite 7-aminoflunitrazepam in hair, *Journal of Analytical Toxicology* 1999, 23, 429–435.
8. Segura J., Redón A., González G. [et al.], Immunological analysis of hair to detect benzodiazepines consumption, *Sanz L Review of Toxicology* 1997, 14, 30–35.
9. Sramek J. J., Baumgartner W. A., Ahrens T. N. [et al.], Detection of benzodiazepines in human hair by radioimmunoassay, *Annals of Pharmacotherapy* 1992, 26, 469–472.
10. Tagliaro F., De Battisti Z., Lubli G. [et al.], Integrated use of hair analysis to investigate the physical fitness to obtain the driving licence: a casework study, *Forensic Science International* 1997, 17, 129–135.
11. Yegles M., Marson Y., Wennig R., Influence of bleaching on stability of benzodiazepines in hair, *Forensic Science International* 2000, 107, 87–92.
12. Yegles M., Mersch F., Wennig R., Detection of benzodiazepines and other psychotropic drugs in human hair by GC/MS, *Forensic Science International* 1997, 84, 211–218.

## Corresponding author

Wojciech Lechowicz  
Instytut Ekspertyz Sądowych  
ul. Westerplatte 9  
PL 31-033 Kraków  
e-mail: wlechowicz@ies.krakow.pl

## WŁOSY JAKO MATERIAŁ KOMPLEMENTARNY W BADANIACH KIEROWCÓW NA OBECNOŚĆ W ICH ORGANIZMACH ŚRODKÓW DZIAŁAJĄCYCH PODOBNIEM DO NARKOTYKÓW

### 1. Wstęp

Wynik badania włosów na obecność środków odurzających i (lub) substancji psychotropowych posiada wiele zalet w porównaniu z wynikami badań np. moczu lub krwi. Powolne odkładanie się analitu we wzrastającym włosie powoduje, że analizując odpowiedni segment włosa, można wykryć substancje przyjmowane kilka miesięcy wcześniej. Przeciętnie analizuje się włosy, których długość odpowiada sześciomiesięcznemu okresowi przyjmowania narkotyków, a więc około 6–10 cm. Z praktycznego punktu widzenia włosy są dobrym materiałem do analizy, gdyż ich pobieranie jest proste, podobnie jak przewożenie i przechowywanie. Włosy do badań pobiera się z tylnej części głowy, gdyż wówczas charakteryzują się najmniejszą zmiennością wzrostu oraz wpływem procesów starzenia oraz wpływu płci. Problemem może być natomiast posiadanie odpowiedniej ilości włosów do analizy (100–150 mg). Uzyskanie ich sprawia, że należy pobrać całkiem spory pęk włosów od osoby badanej (grubości ołówka). Należy pamiętać, iż 1 cm włosa waży jedynie około 0,05 mg. Wątpliwości, jakie mogą się pojawić, dotyczą również zjawiska kontaminacji oraz interpretacji uzyskanych wyników. Także zabiegi pielęgnacyjne mogą w znaczący sposób wpłynąć na wynik analizy [11].

Oprócz badań włosów na obecność typowych środków odurzających i substancji psychotropowych, badaniami obejmuje się również leki np. z grupy benzodiazepin. Spowodowane jest to ich wpływem na sprawność psychomotoryczną kierowcy. Benzodiazepiny są wymieniane w rozporządzeniu Ministra Zdrowia z dnia 11.06.2003 r. dotyczącym sposobu przeprowadzania badań na obecność substancji podobnie działających do alkoholu. Uważa się, że u kierowców szczególnie niebezpieczeństwo spowodowania wypadku występuje podczas pierwszych dwóch tygodni stosowania niektórych benzodiazepin. Badania kierowców na obecność benzodiazepin nabierają szczególnego znaczenia w świetle wyników badań kierowców podejrzanych o prowadzenie pojazdów pod wpływem substancji psychoaktywnych. Leki z tej grupy wykrywane są w co trzecim przypadku, a w badaniach przesiewowych kierowców, którzy nie brali udziału w wypadkach drogowych, liczba próbek pozytywnych stanowi 3%.

Pochodne benzodiazepiny należą do grupy leków psychotropowych; działają głównie uspokajająco, nasennie i przeciwlękowo, łatwo prowadzą do uzależnienia

psychicznego i fizycznego. Nagłe odstawienie leków z tej grupy może spowodować wystąpienie objawów abstynencji (drgawki). Leczenie bezsenności lub przynajmniej jej zapobieganie z użyciem benzodiazepin jest bardzo powszechnym zjawiskiem w Polsce. Jest to grupa leków najczęściej stosowana w tego typu dolegliwościach.

Metodyka badań benzodiazepin w płynach ustrojowych jest dobrze opisana w przeciwieństwie do metod badania włosów, które od kilku lat cieszą się zainteresowaniem toksykologów sądowych. W badaniach benzodiazepin zarówno chromatografia gazowa z detekcją płomieniowo-jonizacyjną, jak i detekcją wychwytu elektronów, okazały się niewystarczające ze względu na zarówno bogate tło biologiczne, jak i niskie stężenia analitów. Oznaczanie benzodiazepin we włosach wykonywane jest najczęściej przy użyciu metod immunologicznych [7, 8, 9] oraz przy użyciu metod chromatograficznych sprzężonych ze spektrometrią mas. Ze względu na niskie stężenia znaczną liczbę aplikacji stanowią metody wykorzystujące chemiczną jonizację w trybie monitorowania jonów ujemnych (np. GC-MS/NCI) lub LC-MS/MS [1, 2, 4, 5].

Liczba benzodiazepin obejmowana badaniami jest zazwyczaj mała, co wynika raczej z praktycznego punktu widzenia. Yegles, badając włosy pobrane od 21 osób, wykazał obecność nordiazepamu w 20 przypadkach, diazepamu i oksazeapmu w 15, a flunitrazepam w 8 przypadkach. Maksymalne stężenia tych leków wynosiły odpowiednio 1,8 ng/mg, 2,2 ng/mg, 3,4 ng/mg oraz 9,5 ng/mg. W konkluzji autorzy stwierdzili, że nordiazepam jest najczęściej używanym lekiem spośród benzodiazepin [12]. Badania włosów na obecność różnych grup substancji prowadzone przez Kintza wykazały obecność benzodiazepin, których stężenia wynosiły od 0,37 ng/mg dla nitrazepamu oraz 2,41 dla nordiazepamu. Z grupy tej obecne były również diazepam oraz flunitrazepam. Cirimele wykazał, że stężenie lorazepamu wyznaczone metodą LC-MS/NCI wzrastało w badanych przez niego włosach o długości 16 cm od ich końca do cebulki od wartości 31 do 49 pg/mg [3]. Natomiast badania włosów ochotników prowadzone przez Negrusza oraz współpracowników po przyjęciu jednorazowej dawki klonazepam wykazały jedynie obecność 7-aminoklonazepam w stężeniach poniżej 10 pg/mg [6].

W niniejszej pracy zaproponowano procedurę oznaczania benzodiazepin metodą chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas (LC-MS z wykorzysta-

niem chemicznej jonizacji pod ciśnieniem atmosferycznym).

## 2. Materiały i metody

Zastosowano następujące wzorce oraz odczynniki: oksazepam, lorazepam, nordiazepam, klorazepat, temazepam, diazepam, estazolam, nitrazepam, klonazepam, flunitrazepam, prazepam (standard wewnętrzny) (Sigma, Stany Zjednoczone), acetonitryl (Merck, Niemcy), wodę (destylowana w destylarce kwarcowej), eter diizopropylowy (Sigma, Stany Zjednoczone), fosforan i wodorofosforan sodu (POCH, Polska) oraz kwas mrówkowy (Ubichem, Wielka Brytania).

W badaniach użyto chromatograf cieczowy sprzężony ze spektrometrem mas HP 1100 firmy Agilent Technologies. Aparat był wyposażony w komorę do chemicznej jonizacji pod ciśnieniem atmosferycznym (APCI). Rejestrowano sygnał pochodzący od pozornych jonów molekularnych badanej grupy benzodiazepin.

Optymalizacja wybranych parametrów metody, w której kryterium oceny stanowiła wysokość pików danego analitu, obejmowała:

- parametry spektrometru mas (napięcie fragmentora, temperatura odparownika, napięcie kapilary, temperatura gazu osuszającego, ciśnienie gazu nebulizującego, prąd korony);
- parametry ekstrakcji (pH środowiska, rozpuszczalnik, czas ekstrakcji);
- warunki chromatograficzne (kolumna, profil gradientu).

Badania wpływu poszczególnych parametrów na intensywność sygnału analitu wykonano techniką przepływowej analizy wstrzykowej (FIA). W tabeli I zamieszczono uzyskane optymalne parametry spektrometru mas.

Efektom powyżej opisanych badań był wybór eteru diizopropylowego jako ekstrahenta (rycina 1), odczynu środowiska ekstrakcji o wartości pH 6–7 oraz czasu ekstrakcji powyżej 30 sekund.

Dla usunięcia ewentualnych pozostałości będących wynikiem kontaktu włosów z zewnętrznym środowiskiem mogącym zawierać benzodiazepiny, włosy poddano myciu. Etap dekontaminacji polegał na dwukrotnym myciu włosów chlorkiem metylenu przez 5 min. Włosy rozłożono i suszono w temperaturze pokojowej. Przed przystąpieniem do ekstrakcji poddano je homogenizacji. W tym celu włosy pocięto nożyczkami na małe odcinki (1–2 mm), a następnie mielono w młynie kulowym. Poniżej podano przebieg ekstrakcji.

Do 50 mg zmieszanych w włosów dodano 200 µl buforu fosforanowego (pH 7,4) i 20 µl standardu wewnętrznego o stężeniu 2,5 µg/ml (prazepam). Włosy roztworzono w buforze fosforanowym w temperaturze 40 °C przez 24 godziny. Ekstrakcję przeprowadzono z użyciem

1 ml eteru diizopropylowego przez wstrząsanie próbki na wstrząsarce przez 30 s. Próbkę odwirowywano przy 6000 obr/min. 600 µl pobrano do odparowania w strumieniu azotu, a pozostałość rozpuszczano w 50 µl fazy ruchomej (50:50).

Rozdział prowadzono na kolumnie LiChroCART (125 × 4 mm) z wypełnieniem LiChrospher RP select B firmy Merck. Natężenie przepływu fazy ruchomej wynosiło 1 ml/min. Stosowano elucję gradientową (tabela II). Wstrzyknięcia realizowane były przez automatyczny podajnik próbek i posiadały 20 µl. Fazę ruchomą stanowiły: woda (A), acetonitryl (B) z dodatkiem kwasu mrówkowego w ilości 1000 µl/l fazy A i B.

## 3. Walidacja

Opracowaną metodę poddano walidacji, stosując komputerowy program wspomagający obliczenia o nazwie Validation Manager firmy Merck. Precyzję wewnątrz- oraz międzygrupową obliczono na podstawie serii sześciu powtórzeń ( $n = 6$ ) analiz włosów wzbogaconych mieszaniną benzodiazepin o stężeniu 0,2 lub 0,5 ng/mg. Serie powtarzano w ciągu trzech dni ( $p = 3$ ). Stężenie badane dobrano na podstawie podziału ze względu na wysokość stężeń terapeutycznych. Klonazepam, estazolam, nitrazepam, flunitrazepam przyjmowane są bowiem w dawkach niższych niż pozostałe benzodiazepiny objęte badaniami. Uzyskane wyniki zamieszczono w tabeli III.

Z wyjątkiem klorazepatu, dla którego powtarzalność wynosiła  $CV_{wg}$  30%, pozostałe wartości  $CV$  były zadawalające. Należy zaznaczyć, że klorazepat występuje w postaci soli potasowej, która już w żołądku ulega w 80% dekarboksylacji do nordiazepamu. Fakt przyjęcia klorazepatu potwierdza się więc najczęściej poprzez wykazanie obecności nordiazepamu. Badania liniowości wykazały, że we wszystkich przypadkach ich współczynnik determinacji był wyższy niż 0,95 w badanym zakresie stężeń. Odpowiednie równania wraz z współczynnikami determinacji zamieszczono w tablicy IV.

Granica detekcji  $LOD$  wynosiła poniżej 50 pg/mg, a w przypadku flunitrazepamu poniżej 10 pg/mg. Założono, że oznaczenia wykonywane będą w zakresie 0,25–5 (10) ng/mg, choć z badań precyzji i dokładności można wnioskować, że powtarzalność dla stężeń rzędu 0,2 ng/mg charakteryzuje się wartościami  $CV$  poniżej 20% i stężenia te mogą być oznaczane.

## 4. Wyniki badań

Opracowaną metodę użyto do analizy próbek rzeczywistych pobranych od dwóch osób (narkomanów), o których wiadomo było, że przyjmowały benzodiazepiny.



piny. Analiza pierwszego segmentu o długości 2 cm wykazała obecność leków z grupy benzodiazepin.

U osoby I wykryto: flunitrazepam 0,7 ng/mg, nordiazepam 1,0 ng/mg, oksazepam 0,5 ng/mg, diazepam 0,9 ng/mg, temazepam < 0,1 ng/mg (około 0,05 ng/mg). U osoby II: nordiazepam 1,3 ng/mg, diazepam 3,0 ng/mg, oksazepam < 0,1 ng/mg, temazepam < 0,1 ng/mg, flunitrazepam < 0,1 ng/mg (rycina 2). Ze względu na niewielką ilość włosów do badań sporządzono po jednej próbce o masie 50 mg. Wyznaczone stężenia były typowe dla osób regularnie (w celach terapeutycznych) przyjmujących benzodiazepiny. Jak wynika z cytowanego piśmiennictwa, również tej wielkości stężenia rejestrowane są u narkomanów.

## 5. Wnioski

Zaprezentowana metoda nadaje się do analizy włosów na obecność benzodiazepin w przypadku stosowania ich w celach terapeutycznych (kilkutygodniowa terapia) lub monitorowania osób nadużywających leki z tej grupy. Niskie stężenia we włosach po jednorazowym przyjęciu szczególnie w przypadku benzodiazepin, których dawki są niskie (np. flurazepam, flunitrazepam lub lorazepam) uniemożliwia lub w znacznym stopniu utrudnia stosowanie tej metody, gdyż – jak wynika z cytowanych prac – stężenia ich są niższe niż granice oznaczalności w prezentowanej metodzie. Ponieważ benzodiazepiny charakteryzują się długimi biologicznymi okresami półtrwania, to ich wpływ może utrzymywać się przez kilka dni po zakończeniu terapii. Odpowiedź na pytanie, czy w chwili zdarzenia podejrzany znajdował się w trakcie leczenia benzodiazepinami, może być udzielona na podstawie badań odpowiedniego fragmentu włosów. Opisana metodyka badania włosów powinna więc okazać się przydatna w badaniach kierowców, gdy odpowiednie zmiany w prawie umożliwią wykorzystanie wyników takiej analizy.

Włosy mogą być i są wykorzystywane (Niemcy, Austria) w celach kontroli (badań) kierowców przed wydaniem lub zwrotem prawa jazdy. Stanowią one materiał komplementarny zarówno dla płynów ustrojowych takich jak krew, mocz oraz ślina, ale również pod względem interpretacyjnym do badania lekarskiego. Wyniki badań włosów mogą być także wykorzystywane w badaniach epidemiologicznych wśród kierowców [10]. Pod tym względem znacznie przewyższają one inne rodzaje materiałów, również jako element uzupełniający bądź weryfikujący prawdziwość deklaracji ankietowanych kierowców.