



## **BENZYDAMINE (TANTUM) IN DRIVER'S BLOOD. ANALYTICAL AND EVALUATION PROBLEMS**

Krzysztof TUTAJ, Grzegorz BUSZEWICZ, Roman MAĐRO

*Chair and Department of Forensic Medicine, Medical University, Lublin, Poland*

### **Abstract**

A case is presented in which benzydamine, recommended on the Internet as a “recreational” agent, was determined in a blood sample taken from a driver suspected of driving under the influence of substances acting similarly to ethyl alcohol, in accordance with forensic requirements. It was determined by the high performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionisation-mass spectrometry method. A simple liquid-liquid extraction in alkaline reaction with application of ethyl acetate was used. A good linearity of benzydamine determination was obtained in the range 10–1000 ng ml<sup>-1</sup>. Detection and quantification limits of, respectively, 3 ng ml<sup>-1</sup> and 10 ng ml<sup>-1</sup> were obtained. Tandem mass spectrometry (MS-MS) and the method of standard addition were used with the aim of differentiation between benzydamine and methadone. The benzydamine was disregarded by the judge in the trial, because it was not on the list of intoxicating and psychotropic substances. However, this compound has similar effects to alcohol and hallucinogenic specimens when it is orally consumed. Nevertheless, the driver was convicted, as 11-nor-9-carboxy-<sup>9</sup>-tetrahydrocannabinol (THC-COOH) at a concentration of 66 ng ml<sup>-1</sup> was determined in his blood.

### **Key words**

Benzydamine; Blood; HPLC-APCI-MS.

*Received 20 June 2008; accepted 30 June 2008*

### **1. Introduction**

In the 1970's, Eggers [5] showed that hallucination could be caused by consumption of compounds which were not commonly considered as hallucinogenic compounds. Benzydamine (BZ; 1-Benzyl-3-[3-(dimethyl-amino)propoxy]-1H-indazole) was mentioned among them. The first information about intentional (“recreational”) consumption of BZ concerned a 22-year old man who, according to information published on the Internet, took 500 mg in the form of Tantum Rosa preparation. This is used for irrigation (douche) by women. It caused 12-hour hyperactivity, excitement and hallucination as well as muscle weakness for ca. 48 hours [1]. BZ is a component of various medicines (e.g. Tantum, Hascosept, Difflam), which can be bought

without prescription, i.e. over-the-counter (OTC). It is an externally applied drug. It has local anti-inflammatory, analgesic, anaesthetic and antiseptic activity. It is absorbed into the blood to a minimal degree. Oral consumption, i.e. contrary to the manufacturer's recommendations, causes a reaction similar to delirants and stimulators [1, 7]. According to information obtained from Internet discussion groups, 15 minutes after consumption of 500 mg of BZ, weak visual and auditory hallucinations and “spectral shapes” should occur. Additionally, it was mentioned (in these Internet discussion groups) that auditory and visual hallucinations occur after consumption of larger doses (up to 3000 mg) as well as impairment of motor system and mental functions. Moreover, pupil enlargement, hepatodynia and kidney pain, dehydration and insomnia could be

also observed. Therefore, BZ can be considered as an unconventional drug of abuse or “recreation drug”, which can be bought without prescription in spite of having psychotropic activity.

A maximum concentration of  $\sim 800 \text{ ng ml}^{-1}$  after consumption of 100 mg BZ was achieved after 2 h, and the half-life period was  $\sim 13 \text{ h}$  [4]. A maximum concentration of BZ ( $454 \text{ ng ml}^{-1}$ ) in male blood was observed at 90 minutes after consumption of 50 mg (it was also determined at a concentration of  $5 \text{ ng ml}^{-1}$  after 56 hours).  $61 \text{ ng ml}^{-1}$  was determined immediately after 5 mg subcutaneous injection. Moreover, its concentration was  $37 \text{ ng ml}^{-1}$  3 h after rinsing of oral cavity with a solution containing 50 mg BZ [2]. When applied locally (i.e. in accordance with recommendations), high BZ concentrations were observed only in tissues around the site of local application, and its redistribution from tissues to blood stream was minimal [4, 8]. BZ concentration in serum after mouth rinsing, vaginal irrigation or per rectum application is much lower than after oral consumption. Some papers have been published concerning determination of BZ in biological material by high-performance liquid chromatography coupled with fluorometric detection [11, 13] or mass spectrometry [6, 9, 11]. The mentioned methods were only applied in specific research on metabolism and pharmacokinetics of BZ. Until now, no papers have been published evaluating their usefulness for forensic toxicology. Simultaneous determination of BZ and methadone (MET) by detection with multiple reaction monitoring mode was possible using the LC-MS-MS procedure worked out by Stanley and Foo [12]. These compounds are characterised by the same transformation of the pseudomolecular ion, i.e. transition,  $m/z$  310  $\rightarrow$  265, and very similar retention times ( $RT$ , which for BZ is 9.00 min, and for MET 9.17 min). This makes the usefulness of this method for forensic purposes debatable because of a possible shift of  $RT \pm 0.2 \text{ min}$ . In this situation, when ion  $m/z$  310 (Figure 1) occurred during a screening analy-

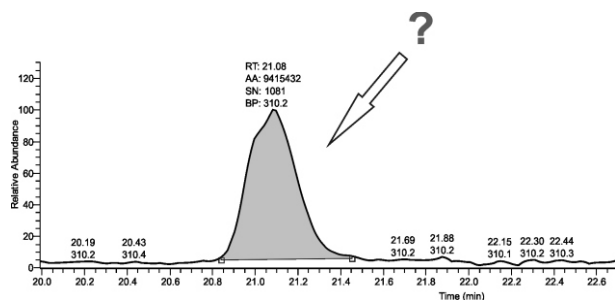


Fig. 1. A fragment of a chromatogram which was difficult to interpret and was the basis for deciding to perform additional analysis to differentiate between (MET) and benzydamine (BZ).

sis of a driver’s blood sample by the HPLC-MS method, an additional analysis was carried out with the aim of confirming or rejecting the presence of these compounds (i.e. MET and BZ).

## 2. Aim of work

The main aim of the work was to validate the HPLC-APCI-MS technique applied in analysis of compounds acting similarly to ethyl alcohol as well as to evaluate its usefulness for identification and determination of BZ in blood for forensic purposes. Moreover, the technique was tested in practice during analysis of a blood sample of a driver who was suspected of driving under the influence of a substance acting similarly to alcohol.

## 3. Materials and methods

### 3.1. Case description

A driver – a 29-year-old man, 181 cm tall, 83 kg – constituted a threat on the road, as he had overtaken cars waiting at traffic lights and driven on a hard shoulder pavement. He was stopped by the Police. It was observed that a passenger was hiding something under a passenger seat. Policemen smelt the characteristic smell of marijuana during the control. A green-brown plant substance and glass “pipe” were found in a plastic bag under the passenger seat. The driver was tested using breathalyser shortly after being stopped, and neither a state of drunkenness nor a state after drinking alcohol were ascertained. The driver’s blood was collected in two test-tubes (BD Vacutainer) at 9 pm, i.e. ca. 4 hours after the incident, and an analysis was requested with the aim of determining compounds which have a similar influence on the human body to ethyl alcohol.

### 3.2. Materials

The following materials were used for calibration: blood (other than evidence blood; it was free from ethyl alcohol and substances having a similar influence on the human body to ethyl alcohol), BZ and anhydrous ethyl acetate (Sigma, USA), amphetamine D-11 and diazepam D-5, MET (in the form of methanol solutions at  $1 \text{ mg ml}^{-1}$  concentration, Cerilliant, USA), methanol and acetonitrile at LC-MS purity (Riedel-de Haën, Germany), ammonium formate and formic acid (Fluka Chemie, Germany), ammonium

carbonate (J. T. Baker, USA) as well as deionised water which was filtered by application of Mili-Q system (Milipore, USA).

### 3.3. Equipment

A Thermo Finnigan Surveyor liquid chromatograph was used. It was equipped with a gradient pump and an automatic injector coupled with an ion trap mass spectrometer LCQ Advantage Max (Finnigan, San Jose, USA), in which chemical ionisation under atmospheric pressure (APCI) in positive ion mode was applied. X'calibur software was used to control the liquid chromatograph and the mass spectrometer, and for data processing.

### 3.4. Liquid-liquid extraction

25  $\mu\text{l}$  of each internal standard solution (i.e. amphetamine D-11 and diazepam D-5 at 10  $\mu\text{g ml}^{-1}$  with the aim of obtaining concentrations of 500  $\text{ng ml}^{-1}$ ) was added to 0.5 ml of analysed blood. After that, 0.5 ml of carbonate buffer (pH 9) was added and the sample was mixed. Extraction, by shaking with 5 ml of ethyl acetate, was performed for 15 minutes. Next, the samples were centrifuged at 2000 g for 10 minutes, and the supernatant was put into test-tubes (Eppendorf, 2 ml) and evaporated to dry residue at 45°C (in nitrogen stream). The dry residue was dissolved in 50  $\mu\text{l}$  of mobile phase before analysis.

### 3.5. HPLC-APCI-MS procedure

Chromatographic separation of extracts was carried out on a Purospher 125  $\times$  3 RP-18e 5- $\mu\text{m}$  column with a LiChroCART 4-4 Purospher RP-18e pre-column (Merck, Germany) with application of a two-component mobile phase, which, at the beginning, consisted of 95% phase A (25 mM solution of ammonium formate at pH 4.5 made by addition of formic acid) and 5% phase B (acetonitrile) with a flow of 0.4 ml/min. After 2 minutes, the proportions of the mobile phase were changed gradually up to obtaining 100% phase B at 43 minutes. The starting proportions, i.e. 95% A and 5% B, were restored over a 15 minute period after the 45-minute analysis. The whole chromatographic procedure took 60 min. The injection volume was 20  $\mu\text{l}$ .

The optimal parameters of the mass spectrometer were: temperature of ion source = 450°C; ionisation gas, nitrogen = 70 arb (arbitrary unit of LCQ instrument); support gas, nitrogen = 10 arb; capillary temperature = 180°C and corona current = 5  $\mu\text{A}$ . Ions in

the range from 90 to 650 amu (full scan mode) were analysed during quantitative analysis. The signal from pseudomolecular ions  $[\text{M}+\text{H}]^+$  was recorded at  $m/z = 310$  for BZ and MET,  $m/z = 147$  for amphetamine D-11 and  $m/z = 290$  for diazepam D-5 (Table I).

Tandem mass spectrometry MS-MS was used for discrimination between BZ and MET. Normalised collision energy = 45% was used, and daughter ions were monitored in full scan mode in the range 85–400 amu.

TABLE I. CHROMATOGRAPHIC PARAMETERS OF ANALYSED ANALYTES

Analyte	Retention time [min.]	Monitored ion [m/z]
Benzydamine	21.20	310
Methadone	22.56	310
Amphetamine D-11	10.22	147
Diazepam D-5	25.97	290

### 3.6. Calibration curve

A calibration curve was drawn up by addition of BZ to blank blood, i.e. blood which had been checked to be free of ethyl alcohol and substances acting similarly to ethyl alcohol. BZ was added in such amounts that the obtained concentrations were: 10, 50, 100, 200, 500, 1000  $\text{ng ml}^{-1}$ . Samples were extracted in the way described in the liquid-liquid extraction section. A standard procedure was used for obtaining of a calibration curve.

## 4. Method validation

The procedure for obtaining a calibration curve described above was performed six times at 1–7 day intervals with the aim of method validation. This allowed method specificity to be ascertained (Figure 2A). A very satisfactory limit of detection (*LOD*) was obtained, which was 3  $\text{ng ml}^{-1}$  (Figure 2B) at a noise to signal ratio (*N/S*) = 4. The limit of quantification (*LOQ*) was set as 10  $\text{ng ml}^{-1}$ , i.e. the lowest concentration of BZ used for the calibration curve (Figure 2C). The recovery level of BZ for 50 and 1000  $\text{ng ml}^{-1}$ , which was calculated as the ratio of the analytical signal obtained for a sample after blood extraction to the signal obtained for a "blank" extract sample, to which BZ was added, was respectively: 85.5% ( $\pm 6.2\%$ ,  $n = 6$ ); and 78.8% ( $\pm 1.3\%$ ;  $n = 6$ ).

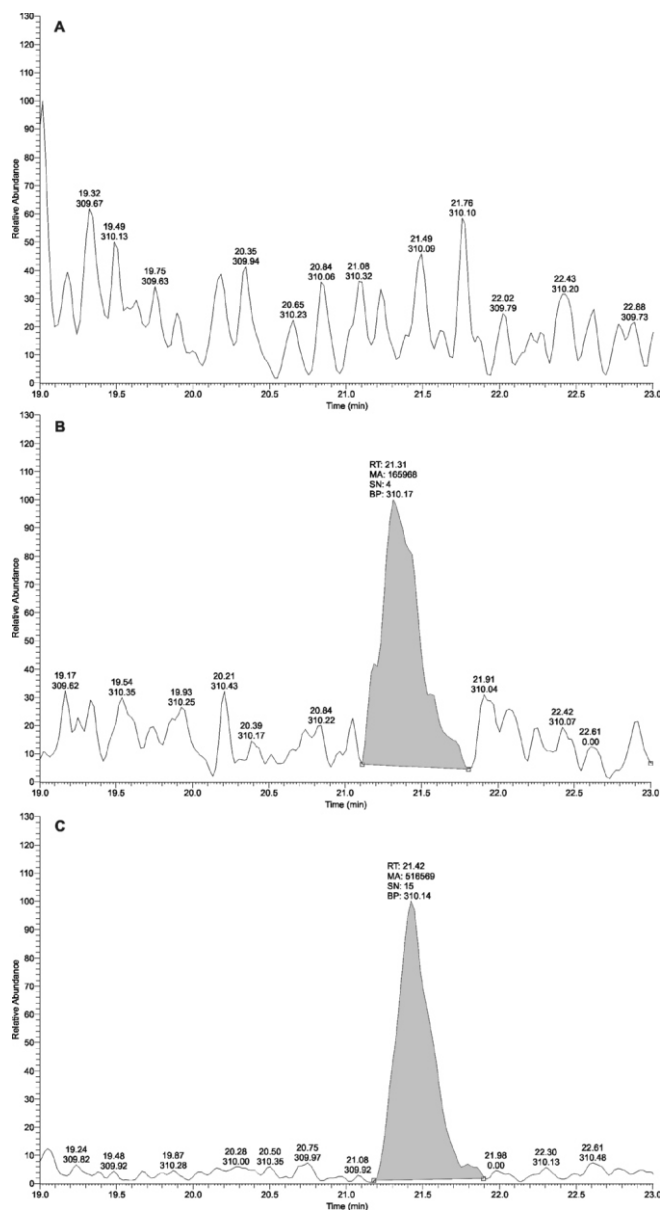


Fig. 2. A fragment of chromatogram which presents results of blood sample analysis: A – “blank”, B – with addition of benzylamine equal to  $LOD$ , i.e.  $3 \text{ ng ml}^{-1}$ , C – with addition of benzylamine equal to  $LOQ$ , i.e.  $10 \text{ ng ml}^{-1}$ .

TABLE II. VALIDATION PARAMETERS OF THE LC-APCI-MS METHOD USED FOR BENZYDAMINE DETERMINATION

Provided concentration [ $\text{ng ml}^{-1}$ ]	Mean found concentration [ $\text{ng ml}^{-1}$ ]	$SD$ [ $\text{ng ml}^{-1}$ ]	Precision [% $RSD$ ]	Accuracy [%]	$n$
10	12	1.32	11.32	116.69	6
50	45	2.91	6.39	90.97	12
100	90	4.89	5.43	90.20	6
200	199	6.94	3.50	99.32	6
500	517	26.28	5.09	103.31	6
1000	958	41.97	4.38	95.77	12

Amphetamine D-11 was used as an internal standard, because the correlation coefficient for this compound was higher than for diazepam D-5. The linearity in the whole range of BZ concentrations, i.e. from  $10 \text{ ng ml}^{-1}$  to  $1000 \text{ ng ml}^{-1}$ , was acceptable and its parameters are presented in Figure 3. Fully satisfactory accuracy and precision of BZ determination are presented in Table II.

## 5. Results and discussion

The presence of BZ in driver's blood was confirmed by the method of addition of BZ and MET to analysed blood (Figure 4) and by the MS-MS method (Figure 5). The BZ concentration determined in the analysed sample, by the method described in the “Methods and materials” section, was  $108 \text{ ng ml}^{-1}$  (Figure 1). 11-nor-9-carboxy- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (THC-COOH) was determined at a concentration of  $66 \text{ ng ml}^{-1}$  in the analysed blood by application of the GC-MS method (modification of method proposed by Rojek and Kłys [10]).

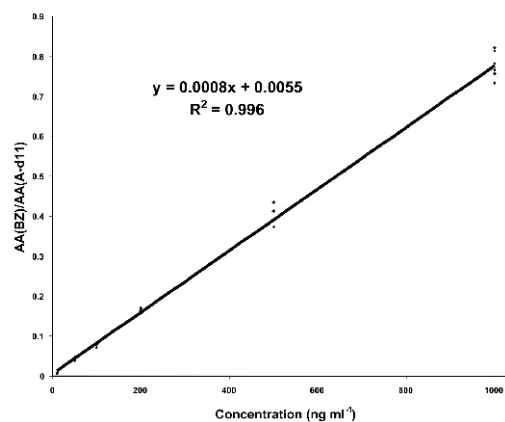


Fig. 3. Calibration curve for benzylamine in the range of concentration from  $10$  to  $1000 \text{ ng ml}^{-1}$ .

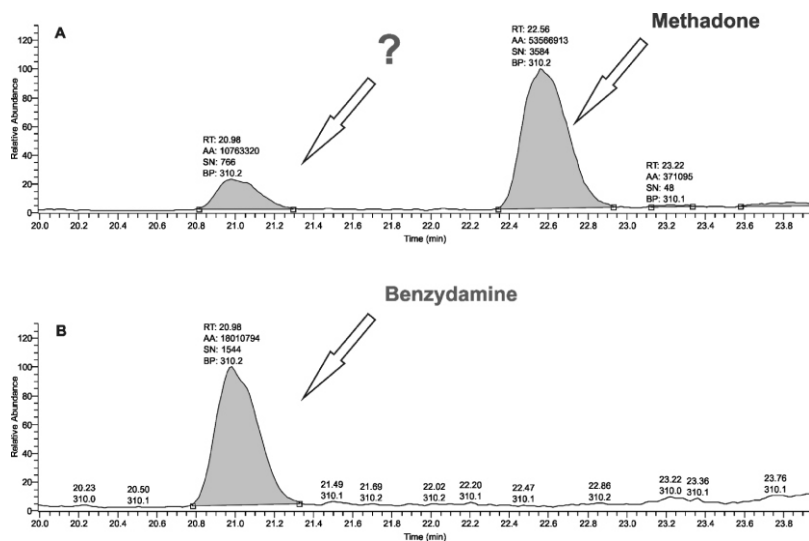


Fig. 4. Fragments of a chromatogram presenting: A – driver's blood with addition of  $100 \text{ ng ml}^{-1}$  methadone, B – driver's blood with addition of  $100 \text{ ng ml}^{-1}$  benzylamine.

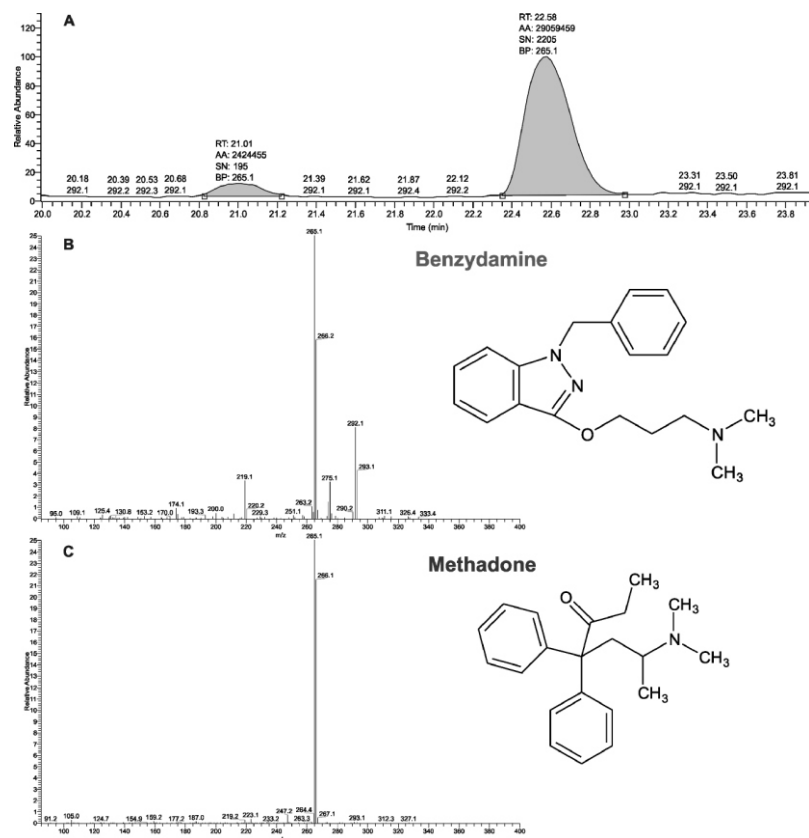


Fig. 5. A – a fragment of an MS-MS chromatogram obtained for driver's blood with addition of  $100 \text{ ng ml}^{-1}$  methadone, B – mass spectrum of benzylamine, C – mass spectrum of methadone obtained by the LC-APCI-MS-MS method.

Other intoxicants and psychotropic specimens were not detected.

On this basis, it was concluded in the expert report that the driver was after the use of psychotropic substances (THC, marijuana). The accused tried to explain in the court that he was only a passive smoker. The second case (expert) report prepared by the authors of this paper disproved this defence strategy, because the concentration of THC-COOH was higher than concentrations that have been determined amongst persons exposed to marijuana smoke [3]. The influence of BZ on the driver's behaviour was not taken into account during the trial as it was not on the list of substances acting similarly to ethyl alcohol or intoxicants and psychotropic specimens. However, the driver, before his blood sample was collected, e.g. at the moment he was stopped, could have been under the influence of the joint activity of BZ and THC. This means that it is very probable that his psychomotor functions were disturbed to a higher level than could be ascribed to the influence of THC.

It could be concluded, beyond any reasonable doubt, that BZ was consumed for "recreational" purposes in the analysed case. It was not possible to reach a concentration of  $108 \text{ ng ml}^{-1}$  of this substance after external application, in the light of current knowledge about absorption and distribution of this substance. Thus, it was confirmed that there is a legal issue linked with consumption of specimens containing BZ – it is not just a theoretical problem, but one that exists in practice. At the same time, there is a lack of suitable and clear-cut legal regulations to counteract its abuse: i.e., there should be, on the one hand, a prohibition of non-restricted sale of substances containing BZ and, on the other hand, it should be included on the appropriate drug register.

## 6. Conclusions

1. Specimens containing benzydamine are consumed with the aim of evoking states similar to narcotic states. Therefore, there are grounds for testing for this compound in drivers' blood.
2. Therefore, if ion  $m/z = 310$  occurs during a standard analysis, in the authors' opinion, determination should be repeated using the MS-MS method with application of full scan mode and the method of addition of BZ and MET should also be applied. This is the only way which allows categorical identification of these compounds.
3. Analytical procedures presented in this paper have demonstrated that it is possible to determine concentration of BZ in blood in accordance with forensic toxicology requirements. Moreover, according to information published in scientific journals, it is possible to infer on this basis about ways of administering preparations (medications) containing BZ.

## References

1. Anand J. S., Lukasik-Głębocka M., Korolkiewicz P. R., Recreational abuse with benzydamine hydrochloride (Tantum Rosa), *Clinical Toxicology* 2007, 45, 198–199.
2. Baldock G. A., Brodie R. R., Chasseaud L. F. [et al.], Pharmacokinetics of benzydamine after intravenous, oral, and topical doses to human subjects, *Biopharmaceutics & Drug Disposition* 1991, 12, 481–492.
3. Busuttil A., Obafunwa J. O., Bulgin S., Passive inhalation of cannabis smoke: a novel defence strategy?, *Journal of Clinical Forensic Medicine* 1996, 3, 99–104.
4. Chasseaud L. F., Catanese B., Pharmacokinetics of benzydamine, *International Journal of Tissue Reactions* 1985, 7, 195–204.
5. Eggers C., Non-delirious toxic psychoses in children, *Zeitschrift für Kinderheilkunde* 1975, 19, 71–86.
6. Fisher M. B., Yoon K., Vaughn M. L. [et al.], Flavin-containing monooxygenase activity in hepatocytes and microsomes: in vitro characterization and in vivo scaling of benzydamine clearance, *Drug Metabolism and Disposition* 2002, 30, 1087–1093.
7. Gómez-López L., Hernández-Rodríguez J., Pou J. [et al.], Acute overdose due to benzydamine, *Human & Experimental Toxicology* 1999, 18, 471–473.
8. Muller-Peddinghaus R., Neue pharmakologische und biochemische Befunde zum Wirkmechanismus den nicht-steroidalen Antiflogistikums Benzydamin, *Arzneimittelforschung* 1987, 37, 635–645.
9. Pike M. G., Mays D. C., Macomber D. W. [et al.], Metabolism of a disulfiram metabolite, S-methyl N,N-diethyl-

dithiocarbamate, by flavin monooxygenase in human renal microsomes, *Drug Metabolism and Disposition* 2001, 29, 127–132.

10. Rojek S., Kłys M., Analysis of  $\Delta^9$ -THC and its metabolites: 11-OH- $\Delta^9$ -THC and THC-COOH in blood by gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry (GC-MS-MS) and its application to medico-legal investigations, *Problems of Forensic Sciences* 2007, 70, 173–186.
11. Santi A., Anfossi P., Coldham N. G. [et al.], Biotransformation of benzydamine by microsomes and precision-cut slices prepared from cattle liver, *Xenobiotica* 2002, 32, 73–86.
12. Stanley S. M. R., Foo H. C., Screening for basic drugs in equine urine using direct-injection differential-gradient LC-LC coupled to hybrid tandem MS/MS, *Journal of Chromatography B* 2006, 836, 1–14.
13. Störmer E., Roots I., Brockmöller J., Benzydamine N-oxidation as an index reaction reflecting FMO activity in human liver microsomes and impact of FMO3 polymorphism on enzyme activity, *British Journal of Clinical Pharmacology* 2000, 50, 553–561.

### Corresponding author

Grzegorz Buszewicz  
Katedra i Zakład Medycyny Sądowej  
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie  
ul. Jaczewskiego 8  
PL 20-090 Lublin  
e-mail: g.buszewicz@am.lublin.pl

## BENZYDAMINA (TANTUM) WE KRWI KIEROWCY. PROBLEMY ANALITYCZNE I OPINIODAWCZE

### 1. Wstęp

W latach 70. ubiegłego wieku Eggers [5] wskazał na możliwość występowania halucynacji spowodowanych spożyciem związków, które nie są uważane powszechnie za halucynogenne, a wśród nich wymienił benzydaminę (BZ, 1-benzyl-3-[3-dimetylamino]propoksy]-1H-indazol). Pierwsze w Polsce doniesienie celowego „rekreacyjnego” użycia BZ dotyczyło 22-letniego mężczyzny, który, kierując się informacją znalezioną w Internecie, przyjął 500 mg tej substancji w postaci preparatu Tantum Rosa używanego przez kobiety do irygacji, czego skutkiem była trwająca 12 godzin hiperaktywność, podniecenie, halucynacje oraz ok. 48 godzinne osłabienie mięśni [1]. BZ jest składnikiem wielu leków (m.in. Tantum, Hascosept, Difflam), które są powszechnie dostępne bez recepty (OTC – ang. over-the-counter). Przeznaczona jest do stosowania zewnętrznego. Miejscowo działała przeciwwzapalnie, przeciwbólowo, znieczulająco i antyseptycznie. Do krążenia wchłania się w minimalnym stopniu. Przyjęta doustnie, czyli sprzecznie z zaleceniami producenta, wykazuje natomiast działanie podobne do środków powodujących majaczenie (ang. delirants) oraz stymulantów [1, 7]. Według internetowych grup dyskusyjnych, po 15 minutach od zażycia BZ w dawce 500 mg powinny wystąpić lekkie przywidzenia i przesłyszenia oraz „widmowe kształty”. Jest tam także mowa o tym, że przy spożyciu wyższych dawek (sięgających nawet 3000 mg) pojawiają się halucynacje wzrokowe i słuchowe oraz dochodzi do upośledzenia funkcji motorycznych i umysłowych, a „podróżom” tym towarzyszą na ogół powiększenie źrenic, ból wątroby i nerek, odwodnienie organizmu i bezsenność. W tym świetle BZ można więc zaliczyć do tzw. nadużywanych niekonwencjonalnych leków (ang. unconventional drugs of abuse) lub „leków rekreacyjnych”, które są dostępne bez recepty, mimo że wykazują działanie psychoaktywne.

Po podaniu doustnym w dawce 100 mg BZ osiąga maksymalne stężenie  $\sim 800 \text{ ng ml}^{-1}$  po 2 h, a czas jej półtrwania wynosi  $\sim 13 \text{ h}$  [4]. Maksymalne stężenie BZ we krwi mężczyzny obserwowane w 90 minucie po doustnym jej podaniu w dawce 50 mg wynosiło  $454 \text{ ng ml}^{-1}$  (zaś wykrywana była w stężeniu  $5 \text{ ng ml}^{-1}$  jeszcze po 56 godzinach), natychmiast po podskórnym podaniu 5 mg stwierdzono  $61 \text{ ng ml}^{-1}$ , zaś 3 h po przepłukaniu jamy ustnej roztworem zawierającym 50 mg BZ osiągnęło  $37 \text{ ng ml}^{-1}$  [2]. Przy zastosowaniu miejscowym (tj. zgodnym z zaleceniami) wysokie stężenia BZ występują jedynie w tkankach otaczających miejsce aplikacji, a jej redystrybucja z tkanek do krwiobiegu jest minimalna

[4, 8]. Po płukaniu ust, przemywaniu pochwy i podawaniu *per rectum*, stężenie BZ w surowicy krwi jest więc wielokrotnie mniejsze niż po podaniu doustnym. Istnieje kilka doniesień na temat oznaczania BZ w materiale biologicznym w oparciu o wysokosprawną chromatografię cieczową w połączeniu z detekcją fluorymetryczną [11, 13] lub masową [6, 9, 11]. Wspomniane metody stosowane były jednak w ukierunkowanych badaniach metabolizmu i farmakokinetyki BZ. Oceny ich przydatność do analizy toksykologicznej dla celów sądowych nie znaleziono. W metodzie LC-MS-MS opracowanej przez Stanleya i Foo [12] możliwe jest równoczesne oznaczenie BZ oraz metadonu (MET) przy detekcji prowadzonej w trybie MRM (ang. multiple reaction monitoring mode). Związki te charakteryzuje bowiem identyczna transformacja jonu pseudomolekularnego (ang. transition,  $m/z$  310 265) oraz znacznie zbliżony czas retencji ( $RT$ , który dla BZ wynosi 9,00 min, a dla MET 9,17 min), co czyni dyskusyjną przydatność tej metody dla potrzeb sądowych ze względu na możliwy dryft  $RT = \pm 0,2 \text{ min}$ . W tej sytuacji, gdy w trakcie przesiewowej analizy metodą HPLC-MS krwi kierowcy pojawił się sygnał jonu  $m/z$  310 (rycina 1), podjęto działania zmierzające do potwierdzenia lub wykluczenia obecności obu tych substancji (tj. MET i BZ).

### 2. Cel pracy

Głównym celem pracy była walidacja techniki HPLC-APCI-MS stosowanej w analizie związków działających podobnie do alkoholu, a ponadto ocena jej przydatności do identyfikacji i oznaczania BZ we krwi dla potrzeb sądowych oraz sprawdzenie jej w praktyce do zbadania konkretnej próbki krwi pobranej od uczestnika ruchu drogowego podejrzanego o kierowanie pojazdem pod wpływem środka działającego podobnie do alkoholu.

### 3. Opis przypadku, materiały, aparatura i metody

#### 3.1. Opis przypadku

Kierowca, o którym mowa wyżej (mężczyzna lat 29, wzrost 181 cm, waga 83 kg), spowodował zagrożenie w ruchu drogowym, gdyż ominął oczekujące na światłach pojazdy i przejechał powierzchnią wyłączoną z ruchu drogowego. Został więc zatrzymany przez policję. Zaobserwowano przy tym, że pasażer samochodu cho-

wał coś pod siedzeniem pasażera. Podczas kontroli policjanci wyczuli woń charakterystyczną dla palonej marihuany, a pod siedzeniem pasażera (w woreczku foliowym) znaleziono substancję roślinną koloru zielono-brunatnego oraz szklaną „lufkę”. Wkrótce po zatrzymaniu kierowcę przebadano za pomocą elektronicznego urządzenia kontrolno-pomiarowego i wykluczono nie tylko stan nietrzeźwości, ale również stan po użyciu alkoholu. O godzinie 21.00 (tj. ok. 4 godziny po zdarzeniu) od kierowcy pobrano krew do dwóch fiolek (BD Vacutainer) i zlecono jej badanie pod kątem obecności w niej „środków działających podobnie do alkoholu (narkotyków)”.

### 3.2. Materiał

Materiał służący do wykonania kalibracji stanowiły: krew (inna niż dowodowa, przebadana i wolna od etanolu oraz środków podobnie do niego działających), BZ i bezwodny octan etylu (Sigma, Stany Zjednoczone), amfetamina D-11 i diazepam D-5 oraz MET (w postaci roztworów metanolowych w stężeniu  $1 \text{ mg ml}^{-1}$ , Cerilliant, Stany Zjednoczone), a ponadto metanol i acetonitryl o czystości LC-MS (Riedel-de Haën, Niemcy), mrówczan amonu i kwas mrówkowy (Fluka Chemie, Niemcy), węglan amonu (J. T. Baker, Stany Zjednoczone) oraz woda dejonizowana filtrowana przy użyciu Mili-Q system (Milipore, Stany Zjednoczone).

### 3.3. Aparatura

Użyto chromatografu cieczowego Thermo Finnigan Surveyor wyposażonego w pompę gradientową i automatyczny dozownik sprzężony ze spektrometrem mas typu pułapka jonowa LCQ Advantage Max (Finnigan, San Jose, Stany Zjednoczone), w którym zastosowano chemiczną jonizację pod ciśnieniem atmosferycznym (APCI) w trybie jonów dodatnich. Chromatograf cieczowy i spektrometr masowy pracowały przy tym pod kontrolą programu X'calibur, który wykorzystano również do obróbki danych.

### 3.4. Procedura ekstrakcji ciecz-ciecz

Do 0,5 ml krwi dodawano po 25  $\mu\text{l}$  roztworu standardów wewnętrznych (tj. amfetaminy D-11 oraz diazepam D-5 w stężeniach  $10 \text{ ng ml}^{-1}$  dla osiągnięcia stężeń wynoszących  $500 \text{ ng ml}^{-1}$ ), a następnie 0,5 ml buforu węglanowego (pH = 9) i mieszano. Ekstrakcja (przez wytrząsanie z 5 ml octanu etylu) trwała 15 minut. Następnie próbki wirowano przy 2000 g przez 10 minut, po czym supernatant przenoszono do próbek (typu Eppendorf, 2 ml) i odparowywano do sucha w temperaturze  $45^\circ\text{C}$  (w strumieniu azotu). Przed oznaczeniem suchą pozostałość rozpuszczano w 50  $\mu\text{l}$  fazy ruchomej.

### 3.5. Procedura chromatograficzna HPLC-APCI-MS

Rozdział chromatograficzny ekstraktów przeprowadzono na kolumnie Purospher 125  $\times$  3 RP-18e 5- m z prekolumną LiChroCART 4-4 Purospher RP-18e (Merck, Niemcy) z zastosowaniem dwuskładnikowej fazy ruchomej składającej się początkowo z 95% fazy A (25 mM roztwór mrówczanu amonu o pH 4,5 ustalonym przez dodatek kwasu mrówkowego) i 5% fazy B (acetonitryl) o przepływie 0,4 ml/min. Po 2 min proporcje fazy ruchomej zmieniały się stopniowo do osiągnięcia w 43 min 100% fazy B. Stan wyjściowy, tj. 95% A i 5% B, przywracano stopniowo później od 45 min przez 15 min. Cała procedura chromatograficzna trwała więc 60 min. Objętość nastrzyku ekstraktów wynosiła 20  $\mu\text{l}$ .

Optymalnymi parametrami dla pracy spektrometru masowego były: temperatura źródła jonów –  $450^\circ\text{C}$ ; gaz jonizujący – azot, 70 arb (*arbitrary unit of LCQ instrument*); gaz pomocniczy – azot, 10 arb; temperatura kapilary –  $180^\circ\text{C}$  oraz prąd korony – 5 A. Do analizy ilościowej zastosowano opcję monitorowania jonów w zakresie 90–650 amu (*full scan mode*). Sygnał pochodzący od pozornych jonów molekularnych  $[\text{M}+\text{H}]^+$  rejestrowano przy wartościach  $m/z = 310$  dla BZ i MET,  $m/z = 147$  dla amfetaminy D-11 oraz  $m/z = 290$  dla diazepam D-5 (tabela I).

Spektrometrię mas MS-MS wykorzystano dla różnicowania BZ od MET. Zastosowano przy tym znormalizowaną energię kolizji = 45%, zaś jony potomne monitorowano w trybie pełnego skanowania w zakresie 85–400 amu (*full scan*).

### 3.6. Krzywa kalibracyjna

Krzywą kalibracyjną sporządzono przez dodawanie BZ do przebadanej wcześniej (pod kątem etanolu i środków podobnie działających) krwi wzorcowej („blank”), w takiej ilości, aby otrzymane stężenia wynosiły: 10, 50, 100, 200, 500, 1000  $\text{ng ml}^{-1}$ . Próbkę ekstrahowano w sposób przedstawiony w procedurze. Krzywą kalibracyjną utworzono w sposób standardowy.

## 4. Walidacja metody

W tym celu w odstępach 1–7 dni przeprowadzono sześciokrotnie opisaną wyżej kalibrację w pełnym zakresie. Wykazano w ten sposób specyficzność metody (rycina 2A). Osiągnięto bardzo dobrą granicę detekcji (*LOD*), która przy stosunku szumu do sygnału ( $N/S = 4$ ) wynosiła 3  $\text{ng ml}^{-1}$  (rycina 2B). Za limit oznaczalności (*LOQ*) przyjęto 10  $\text{ng ml}^{-1}$ , tj. najmniejsze stężenie BZ użyte dla krzywej kalibracyjnej (rycina 2C). Wielkość odzysku BZ dla 50 i 1000  $\text{ng ml}^{-1}$ , którą kalkulowano jako stosunek sygnału analitu uzyskanego z próbki po



ekstrakcji krwi do sygnału uzyskanego z próbki ekstraktu „blank”, do którego dodawano BZ, wynosiła odpowiednio: 85.5% ( $\pm 6.2\%$ ,  $n = 6$ ); i 78.8% ( $\pm 1.3\%$ ;  $n = 6$ ).

Jako standard wewnętrzny zastosowano amfetaminę D-11, ponieważ w jej przypadku uzyskany współczynnik korelacji był wyższy niż dla diazepam D-5. Stwierdzono liniowość uzyskanej krzywej kalibracyjnej w całym zakresie stężeń BZ (tj. od 10 ng ml<sup>-1</sup> do 1000 ng ml<sup>-1</sup>), której parametry przedstawia rycina 3. W pełni zadowalającą dokładność i precyzję oznaczeń BZ zawiera zaś tabela II.

## 5. Omówienie wyników badań i dyskusja

Obecność BZ we krwi kierowcy potwierdzono metodą dodatku wzorców BZ i MET do badanej krwi (rycina 4) oraz metodą MS-MS (rycina 5). Stężenie BZ w tej próbce oznaczone w sposób opisany w rozdziale 4 tej pracy wynosiło 108 ng ml<sup>-1</sup> (rycina 1). W badanej krwi stwierdzono również obecność (zmodyfikowaną metodą GC-MS według Rojek i Kłys [10]) 11-nor-9-karboxydelta-9-tetrahydrokannabinolu (THC-COOH) w stężeniu 66 ng ml<sup>-1</sup>. Nie stwierdzono natomiast innych środków odurzających i psychotropowych.

Na tej podstawie w opinii przyjęto, że kierowca znajdował się w stanie po użyciu substancji psychotropowej (THC, marihuany). Oskarżony przed sądem próbował to tłumaczyć, utrzymując, że był jedynie biernym palaczem, ale druga opinia autorów niniejszej pracy tę linię obrony obaliła, ponieważ stężenie THC-COOH było wyższe od tych, które stwierdzano u osób eksponowanych na dym z marihuany [3]. W trakcie procesu pominięto natomiast oddziaływanie BZ na organizm kierowcy, gdyż nie znajduje się ona w wykazie środków działających podobnie do alkoholu oraz środków odurzających i substancji psychotropowych. Tymczasem kierowca, przed pobraniem próby krwi np. w chwili zatrzymania, mógł znajdować się pod skojarzonym działaniem BZ i THC, w związku z czym prawdopodobne jest, iż jego funkcje psychomotoryczne były zaburzone w stopniu wyższym od tego, jakie przypisać należałoby wyłącznie działaniu THC.

Nie ulega ponadto wątpliwości to, że w omawianym przypadku BZ została zastosowana doustnie w celach „rekreacyjnych”. W świetle wiedzy na temat wchłaniania i dystrybucji tej substancji wykluczone było bowiem osiągnięcie stwierdzonego stężenia (108 ng ml<sup>-1</sup>) po aplikacji zewnętrznej. Potwierdzono zatem, że nie tylko teoretycznie, ale również w praktyce istnieje problem prawny związany z doustnym przyjmowaniem preparatów zawierających BZ, do przeciwdziałania któremu brak właściwych, jednoznacznych przepisów prawnych, tj. z jednej strony zniesienie wolnej sprzedaży preparatów zawierających BZ, a z drugiej wpisanie jej do odpowiedniego wykazu leków.

## 6. Wnioski

1. Preparaty zawierające benzydaminę są używane doustnie w celu wywołania stanów zbliżonych do narkotycznych. Istnieje zatem uzasadniona podstawa do monitorowania we krwi kierowców także tego związku chemicznego.
2. W związku z powyższym, jeżeli w trakcie rutynowej analizy pojawi się jon  $m/z = 310$ , to zdaniem autorów niniejszej pracy oznaczenie należy powtórzyć z wykorzystaniem metody MS-MS ze skanowaniem pełnego zakresu jonów potomnych (full scan) oraz metody dodatku wzorca BZ i MET, gdyż tylko w ten sposób można jednoznacznie zidentyfikować oba te związki.
3. Procedury analityczne przedstawione w tej pracy wyjaśniają zaś, że możliwe jest zgodne z wymaganiami toksykologii sądowej oznaczanie stężenia BZ we krwi, a z przeglądu piśmiennictwa wynika, że można na tej podstawie wnioskować odnośnie do sposobu zaaplikowania preparatu zawierającego BZ.