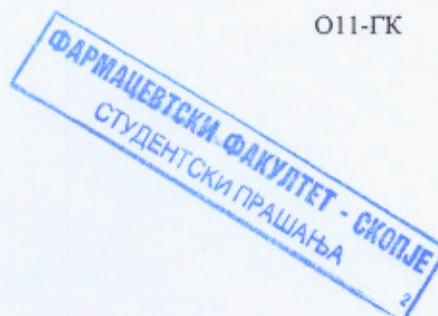




РЕПУБЛИКА СЕВЕРНА МАКЕДОНИЈА  
УНИВЕРЗИТЕТ „СВ. КИРИЛ И МЕТОДИЈ“ ВОСКОПЈЕ  
УНИВЕРЗИТЕТСКА ШКОЛА ЗА ДОКТОРСКИ  
СТУДИИ

011-ГК

Број:  
Датум: \_\_.20\_\_ година  
Скопје



До  
Фармацевтски факултет во Скопје  
Совет на студиската програма по фармација

**ПРИЈАВА**

за учество на годишна конференција во VI семестар во академска 2021/2022 година

Студент	Марија Бујароска
Број на индекс	45/др
Ментор	Проф. д-р Лидија Петрушевска Този
Студиска програма	Трет циклус
Студиска подпрограма	
Поле на истражување	Токсикологија
Тема	Оптимизација и валидација на метод за квантитативно определување на бензодиазепини во крв со примена на гасна хроматографија со масена спектрометрија и негова примена во форензична токсикологија
Година на запишување на докторски студии	2016
Број на остварени кредити	
Забелешка	

Скопје, 05.11.2021 година.

Студент

Ментор

**УНИВЕРЗИТЕТ „СВ. КИРИЛ И МЕТОДИЈ“ ВО СКОПЈЕ**  
**ШКОЛА ЗА ДОКТОРСКИ СТУДИИ**  
**ФАРМАЦЕВТСКИ ФАКУЛТЕТ**  
Студиска програма: трет циклус, докторски студии

---

Кандидат: Марија Бујароска

Број на индекс: 45/др

Вработен во: Институт за судска медицина, криминалистика и медицинска деонтологија, Медицински факултет, Универзитет „Св. Кирил и Методиј“, Скопје

Ментор: Проф. д-р Лидија Петрушевска Този

Студиска година: трета

**ОПТИМИЗАЦИЈА И ВАЛИДАЦИЈА НА МЕТОД ЗА КВАНТИТАТИВНО  
ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА БЕНЗОДИАЗЕПИНИ ВО КРВ СО ПРИМЕНА НА ГАСНА  
ХРОМАТОГРАФИЈА СО МАСЕНА СПЕКТРОМЕТРИЈА И НЕГОВА ПРИМЕНА  
ВО ФОРЕНЗИЧНА ТОКСИКОЛОГИЈА**

**КРАТКА СОДРЖИНА**

Лековите од групата на бензодиазепини се едни од најчесто пропишуваните и употребуваните лекови во светски рамки. Широката употреба на бензодиазепините, како и злоупотребата, а во поново време и регулативите за ограничување на употребата, наметнуваат потреба од воведување на брзи и точни методи за определување на нивната концентрација во биолошки примероци. Бензодиазепините се одамна предмет на анализа во токсиколошките лаборатории, но поради разликите во физичко-хемиските особини на поедини претставници од оваа група на лекови, најчесто, посебни подгрупи на бензодиазепини се определуваат со различни методи со примена на различни техники. Целта на овој труд беше да се спроведе оптимизација на метод, кој ќе овозможи квантитативна анализа на сите бензодиазепини што се регистрирани во нашата земја во еден чекор, соодветно на расположливите лабораториски ресурси. По фазата на оптимизација, методот беше валидиран согласно препораките на интернационалните водичи за валидација на аналитички и бионалитички методи, при што е утврдено дека методот е селективен, специфичен, линеарен во широк концентрациски опсег и добиените резултати се точни и прецизни. Методот беше применет за анализа на 105 *post-mortem* примероци на крв, при што е утврдено дека диазепам е најупотребуваниот лек од оваа група. Од распределбата на резултатите според вид и начин на настанување на смртта, заклучено е дека присуство на бензодиазепини е најчесто потврдено во примероци кои потекнуваат од случаи на самоубиство.

Клучни зборови: бензодиазепини, дериватизација, оптимизација, валидација.

**ABSTRACT**

Benzodiazepines are among the most commonly prescribed and used as well as misused medicines worldwide. The widespread use, abuse, and recently restricting regulations of their use, emerging a development of rapid and accurate methods for their quantitative determination in biological samples. Benzodiazepines have been subject of analysis in toxicology laboratories for a long time ago, but due to the different physicochemical properties of some medicines of this group, different methods using different techniques have been applied for specific subgroups of benzodiazepines. The aim of this paper was to optimize previously developed method to provide a one-step quantitative analysis of all benzodiazepines registered in our country, applicable on the available laboratory resources. Following successful optimization phase, method was validated according to international guidelines for validation of analytical and bioanalytical methods. Validation with respect to selectivity, specificity, recovery, accuracy, precision and linearity has confirmed the applicability of the method in quantitative analysis of benzodiazepines. The described method was applied to analyze 105 *post-mortem* blood samples and it was found diazepam to be the most commonly used drug of this group. Then, the obtained results of benzodiazepines blood analyses were distributed according to the type and manner of death showing that benzodiazepines are most often found in blood samples from suicide cases.

Keywords: benzodiazepines, derivatization, optimization, validation.

## 1. ВОВЕД

Бензодиазепините се група на лекови кои поседуваат седативно-хипнотично, мускулно-релаксантно, анксиолитично и антиконвулзивно дејство, а ефектот го постигнуваат главно преку инхибиција на невротрансмитерскиот процес на GABA рецепторите. [1] Претставниците на оваа група лекови се користат во третман на анксиозност, несоница, панични напади, вовед во анестезија, што ги прави едни од најчесто пропишуваните и употребуваните лекови во клиничката пракса. [2, 3, 4] Како резултат на нивната голема популарност меѓу лекарите кои ги пропишуваат и пациентите, како и поради фактот дека употребата на овие лекови може да создаде толеранција, зависност и нивна злоупотреба, анализите што вклучуваат нивно определување во биолошки течности се од голем интерес и важност за клиничките и форензичните токсиколози. [4, 5, 6] Анализите за определување на бензодиазепини согласно препораките за систематска токсиколошка анализа, вклучуваат иницијален скрининг (базиран на метод на имуно-тестови) и потврден квалитативен или квантитативен метод, кои се изведуваат со примена на хроматографски техники. [6, 7] Течната хроматографија под висок притисок (HPLC) и гасната хроматографија (GC) во комбинација со различни детектори се најчесто употребувани техники за определување на бензодиазепини. Иако примената на течна хроматографија во спрега со масен детектор (LC-MS/MS) има предности при определување на ниски концентрации за некои лекови од групата на бензодиазепини, најчесто употребувана техника, особено во форензичната пракса е гасната хроматографија со масена спектрометрија (GC-MS). [6, 8] Изборот на метод за квантитативно определување се прави во зависност од целната концентрација (определување на терапевтски, токсични и/или летални концентрации) и карактеристиките на супстанцијата што треба да се определи. Притоа, избраниот метод треба да се карактеризира со соодветна сензитивност и специфичност, да обезбеди точни и прецизни резултати и да биде линеарен во дефинираниот концентрациски опсег, согласно препораките и критериумите поставени во интернационалните водичи за аналитички и биоаналитички методи. [6-11] Во форензичната токсикологија, од особена важност е да се воведат метод кој ги задоволува горенаведените критериуми и тоа во опсег што ги опфаќа токсичните и леталните концентрации со цел поставување

на дијагноза за интоксикација. Исто така е важно точно определување на терапевтските концентрации со цел да се добие појасна слика за околностите во време на и пред настанување на смртта, од причина што постојат сомнежи за поврзаноста на употребата на бензодиазепини и настанување на смрт од различни причини. [12-14] Дополнително, со имплементирање на европските закони во нашата земја, односно во последната измена на законот за безбедност во сообраќајот, бензодиазепините се вклучени во категорија на контролирани супстанции. [15] Со овој закон одамна е регулирана дозволената концентрација на етил алкохол во крвта на возачите. Етил алкохолот и бензодиазепините освен влијанието врз способноста за управување со моторни возила, се поврзуваат со зголемен ризик од склоност кон извршување на самоубиство, а нивната заедничка употреба дополнително ги потенцира седативните ефекти и може да доведе до респираторна депресија, кома и смрт. [3, 12, 16]

Целта на овој труд е да се оптимизира и валидира претходно развиениот метод за квантитативно определување на психоактивни супстанции во крв во токсиколошката лабораторија при Институтот за судска медицина, на Медицинскиот факултет во Атина, така што ќе се воспостави квантитативен метод за определување на бензодиазепини во крв. Оптимизираниот метод треба да опфаќа концентрациски опсег кој ги задоволува потребите на клиничката и форензичката пракса, за секој бензодиазепин поединечно, а изборот на бензодиазепини е направен врз основа на регистрираните бензодиазепини во РС Македонија и достапноста на лабораторијата до аналитички стандарди во моментот на валидација на методот. Обработката на резултатите добиени со овој метод опфаќа распределба на случаите според начинот на настанување на смртта и присуството на бензодиазепини, што понатаму може да се примени во проценка на ризикот поврзан со употреба на овие супстанции и настанување на насилна смрт. Во оваа проценка се опфатени и резултатите од постморталните примероци на крв во кои беше потврдено присуство на етанол и/или бензодиазепини поради тоа што овие аналити се најчесто детектирани во примероци од случаи обдуцирани на Институтот за судска медицина, криминалистика и медицинска деонтологија во Скопје.

## 2. ОПТИМИЗАЦИЈА И ВАЛИДАЦИЈА НА МЕТОД

### 2.1. Материјали

Како материјали во овој труд беа користени *post-mortem* примероци на крв земени за време на обдукција на Институтот за судска медицина, криминалистика и медицинска деонтологија, Медицински факултет, Скопје, во период од две години (2019-2020). Инклузивен фактор во изборот на примерок е позитивен резултат за присуство на бензодиазепини (добиеен со примена на скрининг методи) во најмалку еден примерок на биолошка течност (крв, урина, очна вода, желудочна содржина) од истиот случај. Во експериментите беа користени и примероци на крв од базен на полна крв (за кои е претходно потврден негативен резултат за присуство на бензодиазепини). Од овие примероци беа подготвени стандардните примероци за калибрација, како и контролните примероци, со додавање на стандардни раствори на бензодиазепини. Сите примероци на крв беа складирани во епрувети со NaF, и тоа, во периодот на складирање на температура од  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , а за време на анализирање или реанализирање на температура од  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . За подготовка на стандардни раствори беа користени аналитички стандарди со концентрација од  $1\text{ mg/mL}$  од следните бензодиазепини: Diazepam, Nordiazepam (Desmethyldiazepam), Oxazepam, Temazepam, Lorazepam, Bromazepam, Clobazam, Midazolam, Prazepam, Clonazepam, 7-aminoclonazepam,

Alprazolam, Flurazepam, Medazepam, Nitrazepam, Diazepam-d5, Oxazepam-d5 и Bromazepam-d4. За подготовка на примероците беа користени следниве хемикалии: ацетатен пуфер со pH 7, метанол (Methanol  $\geq$  99,9%), 2-пропанол (2-propanol 99,9%), дихлорметан (Dichloromethane 99,9%), ацетонитрил (Acetonitrile 99,8%), сите со степен на чистота за течна хроматографија (HPLC или LC grade), средства/реагенси за дериватизација и тоа: Trifluoroacetic acid for GC derivatization (TFA), Acetic anhydride for GC derivatization (AA), Pentafluoropropionic anhydride for GC derivatization (PFPA), N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA), N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide + 1% trimethylchlorosilane (BSTFA + 1% TMCS), N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (MSTFA) и N-Methyl-N-tert-butyl dimethylsilyl trifluoroacetamide (MTBSTFA). За подготовка на примероците беа користени колони за цврсто-фазна екстракција (Bond Elut C18, Agilent). За анализирање на примероците беше користена гасна хроматографија со масена спектрометрија (GC-MS Agilent), со капиларна колона DB-5 MS со димензии 30 m X 0,25 mm X 0,25  $\mu$ m и хелиум гас.

## 2.2. Подготовка на примероци, стандардни и контролни примероци

Стандардните и контролните примероци беа подготвени на следниот начин: на 1 mL крв (од базенот на полна крв) се додаваат 4 mL ацетатен пуфер со pH 7, 50  $\mu$ L смеса од аналитички стандарди (која ги содржи сите горенаведени бензодиазепини, во соодветна концентрација за секое калибрациско или контролно ниво) и 50  $\mu$ L интерен стандард (ИС) што содржи смеса од Diazepam – d5, Oxazepam – d5 и Bromazepam – d4 во концентрација од 1  $\mu$ g/mL. Примероците за анализа беа подготвени на истиот начин, без додавање на смеса од аналитички стандарди. На овој начин подготвените примероци се вортексираат и се центрифугираат 10 минути на 3000 rpm, по што следи цврсто-фазна екстракција.

## 2.3. Метод

Методот за квантитативно определување на бензодиазепини во крв вклучува три фази (екстракција, дериватизација и хроматографска анализа), што всушност претставуваат три засебни методи, за кои е потребна оптимизација, а перформансите на секоја од нив се проверува, односно потврдува, со соодветни параметри во тек на валидацијата. Методот што е користен во овој труд е експериментален метод за квантитативно определување на психоактивни супстанции кои подлежат на злоупотреба и психоактивни лекови во еден чекор, воведен во токсиколошката лабораторија при Институтот за судска медицина на Медицинскиот факултет во Атина. Оптимизацијата и валидацијата, вклучително сите активности и резултати презентирани во овој труд се однесуваат исклучиво на лековите од групата на бензодиазепини.

Екстракција – претходно поставената постапка за цврсто-фазна екстракција вклучува: кондиционирање на колона за екстракција со метанол и пуфер, додавање на супернатант од примерокот подготвен на погоре опишаниот начин, перење на колоната за екстракција (прочистување на примерок), сушење на колона и елуција со смеса на органски растворувачи.

Дериватизација – елуатот добиен по цврсто фазна-екстракција се упарува до суво под струја на азот и дополнително се суши 10 минути на 75 °C под струја на азот. Во оладената епрувета се додаваат 50  $\mu$ L ацетонитрил и 50  $\mu$ L средство/реагенс за дериватизација, по што епруветата се инкубира во песочна бања во определен временски период.

Хроматографска анализа – 1  $\mu\text{L}$  од дериватизиранiot примерок се инјектира со "splitless mode" на GC-MS и се анализира во "SIM mode". Изборот на јони (најмалку три  $m/z$ ) за секоја супстанција беа дефинирани по оптимизација на фазата на дериватизација. Квантитативниот метод користи метод на интерес стандард и "weight method"  $1/C^2$ .

Опсег на квантификација – концентрациите од сите калибрациски нивоа, рамномерно распределени во дефинираниот калибрациски опсег за секој бензодиазепин поединечно (Табела 1) треба да ги исполнуваат критериумите предвидени со валидацијата и од таа причина може да се променат во тек на валидацијата на методот.

Таб.1. Калибрациски нивоа и опсег на калибрација за вкупно 15 бензодиазепини

Ниво на калибрација	D	N	O	T	L	B	C	M	P	Cl	ACl	A	Me	Ni	F
1 (ng/mL)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	20	10	5	10	20	10
2 (ng/mL)	20	20	20	20	20	20	20	20	20	40	20	10	20	40	20
3 (ng/mL)	50	50	50	50	50	50	50	50	50	100	50	15	50	100	50
4 (ng/mL)	150	150	150	150	150	150	150	150	150	300	150	75	150	300	150
5 (ng/mL)	500	500	500	500	500	500	500	500	500	1000	500	250	500	1000	500
6 ( $\mu\text{g/mL}$ )	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	0,5	1	2	1

D – Diazepam, N – Nordiazepam, O – Oxazepam, T – Temazepam, L – Lorazepam, B – Bromazepam, C – Clobazam, M – Midazolam, P – Prazepam, Cl – Clonazepam, ACl – 7-Aminoclonazepam, A – Alprazolam, Me – Medazepam, Ni – Nitrazepam, F – Flurazepam.

## 2.4. Оптимизација на метод

### 2.4.1. Оптимизација на екстракција

Во фазата на екстракција беше направена оптимизација на два чекори, и тоа прочистување на примерок и елуција.

Оптимизацијата на прочистување на примерок, односно минимизирање на матрикс ефектот (позадински шум што го создаваат интерференциите од самиот примерок, во овој случај полна крв) беше спроведена така што беа тестирани пет различни начини на прочистување на примерокот, кои вклучуваат: подготовка на примерок со преципитација со ацетонитрил, перење на колоната за екстракција со вода и перење на колоната за екстракција со вода со различни удели на метанол односно 10%, 30% и 50%. По три примероци полна крв оптеретени со ИС и смеса од аналитички стандарди на бензодиазепини во концентрација од 10, 20 и 200 ng/mL беа екстрахирани со петте различни чекори на прочистување и анализирани на GC-MS. Ниските концентрации беа тестирани со цел да се провери кој начин на прочистување ќе го зголеми приносот на супстанциите од интерес, а високата концентрација е тестирана со цел да се провери дали со зголемување на уделот на метанол во водата за перење настанува несакано извлекување т.е. предвремена елуција на супстанциите од интерес, што би довело до губење на дел од бензодиазепините.

Оптимизацијата на фазата на елуција беше спроведена со цел да се провери ефикасноста на различни смеси на органски растворувачи во извлекувањето на бензодиазепините (зголемен принос т.е. поголемо "recovery") и влијанието на изгледот на хроматограмите, односно влијание врз матрикс ефектот. Две серии на примероци од крв со додадени ИС и смеса од аналитички стандарди на бензодиазепини во

концентрации од 1, 2, 5, 10, 20, 50, 200 и 500 ng/mL беа елуирани со две различни смеси на органски растворувачи, смеса А: DCM<sup>1</sup>:ISO<sup>2</sup>:NH<sub>3</sub><sup>3</sup> (85:15:2) и смеса В: DCM<sup>1</sup>:MeOH<sup>4</sup>:NH<sub>3</sub><sup>3</sup> (85:15:2).

#### 2.4.2. Оптимизација на дериватизација

Оптимизацијата на дериватизација вклучи тестирање на седум средства за дериватизација. TFA, AA и PFPA ги дериватизираат супстанциите преку ацилација, а BSTFA, BSTFA + 1% TMCS, MSTFA и MTBSTFA ги дериватизираат супстанциите преку силирање на функционалните групи. За оптимизација на овој чекор беа направени три теста: 1. Аналитички стандарди на нитразепам, клоназепам, бромазепам и бромазепам-d4 со концентрација од 500 ng/mL беа дериватизирани со TFA, AA, PFPA и MTBSTFA со цел да се провери кој начин на дериватизација (ацилација или силирање) е соодветен за оваа група лекови. 2. Три серии на смеса од аналитички стандарди на сите анализирани бензодиазепини, со концентрации од 20, 50 и 100 ng/mL беа дериватизирани со BSTFA, BSTFA + 1% TMCS, MSTFA и MTBSTFA. 3. Три серии на примероци на крв со додадени ИС и смеса од аналитички стандард во концентрации соодветни за секое калибрациско ниво беа подготвени со погоре опишаната постапка. Првата серија примероци беа дериватизирани со MSTFA 30 минути на 75 °C, втората серија со MTBSTFA 30 минути на 75 °C и третата серија со MTBSTFA 30 минути на 90 °C.

#### 2.5. Валидација на метод

Валидацијата на методот беше спроведена согласно ревидираните упатства на интернационалните водичи, а вклучува определување на селективност, специфичност, лимит на детекција (limit of detection, LOD), лимит на квантификација (limit of quantification, LOQ), линеарност, несакан пренос на аналитот од интерес при последователните анализи (carry over), точност (интер- и интра-дневна), прецизност (интер- и интра-дневна) и стабилност на примероците.

Селективност: за изведување на тестот за селективност беа подготвени шест слепи примероци. Критериумите за прифаќање на резултатите од спроведениот тест се отсуство на аналитички одговор на RT на сите супстанции од интерес.

Специфичност: за изведување на тестот за специфичност беа применети шест примероци со додадени стандардни раствори од потенцијални интерферирачки супстанции (морфин, кодеин, хероин, папаверин, носкапин, меконин, хидрокотарнин, 6-ацетилморфин, метадон, кокаин, екгонинметил естер, бензоилекгонин, амфетамин, метамфетамин, тетрахидроканабинол, тетрахидроканабинолна киселина, кветиапин) со концентрации во опсег на калибрациските криви за секоја од наведените супстанции. Критериумите за прифаќање на резултатите од спроведениот тест се идентични како во тестот за селективност.

Лимит на детекција (LOD): за определување на LOD беа подготвени примероци со додадена смеса на ИС и смеса на аналитички стандарди на бензодиазепини во концентрации од 1, 2, 5, 10, 50 и 200 ng/mL. Критериум за определување на LOD претставува определување на најниската концентрација која постигнува повторлив

<sup>1</sup> дихлорометан

<sup>2</sup> 2-пропанол

<sup>3</sup> амонијак

<sup>4</sup> метанол

аналитички одговор во однос 3:1, споредено со аналитичкиот одговор на позадинскиот шум снимен при анализа на слепите примероци и/или концентрација која ги задоволува критериумите за идентификација (однос на интензитетот на специфичните јони).

Лимит на квантификација (LOQ): за определување на LOQ беа подготвени четири примероци со додадена смеса на ИС и смеса на аналитички стандарди на бензодиазепини во концентрации соодветни на секое калибрациско ниво. Критериумот за определување на LOQ претставува определување на најниската концентрација која постигнува повторлив аналитички одговор во однос 10:1, споредено со аналитичкиот одговор на позадинскиот шум снимен при анализа на слепите примероци.

Ефикасност на екстракција/принос (recovery): за определување на ефикасноста на екстракцијата беа подготвени шест примероци со додадени ИС и смеса на аналитички стандарди на бензодиазепини во концентрација од 200 ng/mL, екстрахирани со погоре опишаната постапка и анализирани. Дополнителни шест примероци беа подготвени на истиот начин со тоа што ИС беше додаден во елуатот (по екстрахирање на примерокот).

Линеарност: за изведување на тестот за линеарност беа подготвени стандардни примероци во шест концентрациски нивоа (Табела 1). Заедно со стандардните примероци беа анализирани слепа и негативна проба. Анализите беа повторувани во четири последователни дена, а линеарноста е изразена преку факторот на корелација ( $R^2$ ).

Carry over (ефект на пренос): овој тест беше изведен со анализирање на негативен примерок, веднаш по анализирањето на примерок со концентрација соодветна на највисокото калибрациско ниво за секоја супстанција соодветно. Постапката беше повторена при секоја калибрација. Критериумите за прифаќање на резултатите од овој тест се отсуство на аналитички одговор на RT на супстанциите од интерес или аналитичкиот одговор да биде помал од 10% од LOQ за секоја супстанција соодветно.

Точност (интер- и интра-дневна): за изведување на овој тест беа подготвени по шест контролни примероци (QC) во три концентрациски нивоа (Табела 2). Сетот од шест примероци за секое контролно ниво (QC1 – контролен примерок 1, QC2 – контролен примерок 2, QC3 – контролен примерок 3) беше анализиран во иста секвенца со стандардните примероци и беше конструирана соодветна калибрациска крива за секоја супстанција соодветно. Оваа постапка беше повторена во тек на четири последователни дена. Критериумот за прифаќање на резултатите од овој тест е процентот на грешка за секое контролно ниво да не биде поголем од 15% во споредба со теоретската вредност.

Таб.2. Контролни нивоа за вкупно 15 бензодиазепини

QC (ng/ml)	D	N	O	T	L	B	C	M	P	Cl	ACl	A	Me	Ni	F
QC1	30	30	30	30	30	30	30	30	30	60	30	15	30	60	30
QC2	100	100	100	100	100	100	100	100	100	200	100	50	100	200	100
QC3	800	800	800	800	800	800	800	800	800	1600	800	400	800	1600	800

D – Diazepam, N – Nordiazepam, O – Oxazepam, T – Temazepam, L – Lorazepam, B – Bromazepam, C – Clobazam, M – Midazolam, P – Prazepam, Cl – Clonazepam, ACl – 7-Aminoclonazepam, A – Alprazolam, Me – Medazepam, Ni – Nitrazepam, F – Flurazepam.



Прецизност (интер- и интра-дневна): за изведување на овој тест беа користени истите примероци опишани во тестот за определување на точност. Критериумот за прифаќање на добиените резултати е вредноста за релативна стандардна девијација (RSD) за секоја концентрација да не биде повисока од 15%. Прецизноста на мерењата може да се изрази и преку вредноста на %RSD на отсечката (се пресметува од равенките на права добиени од сите калибрации), која не смее да надминува 5%.

Стабилност: подготвени (стандардни и контролни) примероци беа анализирани во три последователни дена со цел да се определи стабилност на подготвен примерок (on tray/processed sample stability). Тестот беше спроведен во два наврати. Критериумот за прифаќање на резултатот е разликата во концентрацијата на секое ниво да не биде поголема од 10% од таа на свежо подготвен примерок, за секој бензодиазепин соодветно.

### 3. РЕЗУЛТАТИ

#### 3.1. Резултати од оптимизација на метод

##### 3.1.1. Резултати од оптимизација на екстракција

Врз основа на резултатите добиени од спроведените тестови беше заклучено дека средство од избор за перење на колоните во фазата на екстракција, е вода. Ниту вклучувањето на преципитација, ниту вклучувањето на метанол во чекорот на перење, не го зголемуваат приносот на екстрахирани бензодиазепини, дополнително, внесувањето на метанол доведе до губење на супстанциите од интерес кај примероците кои содржат високи концентрации (несакана, предвремена елуција).

Со анализа на резултатите добиени при тестирањето на двете смеси за елуција беше заклучено дека во оваа фаза од екстракцијата ќе се користи смесата A: DCM : ISO: NH<sub>3</sub> (85:15:2). Иако при елуција со смесата B: DCM : MeOH<sub>4</sub> : NH<sub>3</sub> (85:15:2) доаѓа до минимално подобрување на приносот на екстракција за определени бензодиазепини, хроматограмите од овие примероци имаат зголемен матрикс ефект, што претставува пречка при евалуација на резултатите и влијае на селективноста на методот.

##### 3.1.2. Резултати од оптимизација на дериватизација

Во фазата на оптимизација на дериватизација беше забележано дека тестираните супстанции не стапуваат во реакција на дериватизација со примена на средства за ацилација, но со примена на средство за силирање беа добиени задоволителни резултати. Сите силирачки средства за дериватизација формираа соодветни деривати со третираните супстанции, но стабилноста на дериватите се разликуваше во зависност од употребениот реагенс. При анализа на резултатите од третиот тест беше заклучено дека супстанција од избор за дериватизација е MTBSTFA, при што реакцијата се изведува во услови на инкубација во времетраење од 30 минути на 75 °C.

#### 3.2. Резултати од валидација на метод

При евалуација на резултатите од спроведените тестови за валидациските параметри беше забележано дека клоназепам, 7-аминоклоназепам и нитразепам не ги исполнуваат зададените критериуми, и од таа причина се исклучени од понатамошна обработка. Со примена на овој метод истите можат да бидат определени квалитативно, но квантитативните резултати не се во согласност со валидациските параметри.

Добиените резултати за валидациските параметри за останатите тринаесет бензодиазепини потврдуваат дека применетиот метод е селективен и специфичен за нивно определување, односно не беа забележани интерференции од слепата проба (влијание на матрицот) и од смесата со потенцијални интерферирачки супстанции на RT на секој од определуваните бензодиазепини и соодветните ИС. LOD за секој од определуваните бензодиазепини е 3 ng/mL, додека LOQ е 10 ng/mL, концентрација еднаква на најниското калибрациско ниво, освен за алпразолам (соодветно на второто калибрациско ниво). Применетиот метод се карактеризира со добра ефикасност на екстракција (Табела 3). Методот е линеарен во дефинираниот опсег на калибрација и овозможува точна и прецизна квантификација на секој бензодиазепин соодветно, што може да се заклучи од резултатите за интер- и интра-дневна точност и интер- и интра-дневна прецизност (Табела 3). Прецизноста на мерењата дополнително беше потврдена преку вредноста за %RSD на нагибот на отсечката, односно за секој бензодиазепин поединечно вредноста беше помала од 5%.

Таб.3. Резултати од тестовите за LOQ, "recovery", линеарност, точност и прецизност

	<sup>1</sup> Rec (%)	<sup>2</sup> R <sup>2</sup>	<sup>4</sup> IAA			<sup>5</sup> IEA			<sup>6</sup> IAP			<sup>7</sup> IEP		
			<sup>3</sup> QC1	<sup>3</sup> QC2	<sup>3</sup> QC3	<sup>3</sup> QC1	<sup>3</sup> QC2	<sup>3</sup> QC3	<sup>3</sup> QC1	<sup>3</sup> QC2	<sup>3</sup> QC3	<sup>3</sup> QC1	<sup>3</sup> QC2	<sup>3</sup> QC3
<i>Diazepam</i>	82,63	0,999	8,78	3,39	6,06	0,58	0,00	1,61	5,79	3,1	2,77	6,66	3,21	3,74
<i>Nordiazepam</i>	89,5	0,996	3,52	6,22	8,53	0,5	2,11	6,09	5,23	3,82	3,87	4,61	3,98	3,42
<i>Oxazepam</i>	93,35	0,998	8,13	7,85	9,77	3,99	3,37	7,24	3,60	6,51	4,05	3,38	4,93	3,50
<i>Temazepam</i>	96,16	0,996	5,27	9,29	4,51	1,47	5,88	2,35	6,93	9,19	1,65	6,16	5,82	2,24
<i>Lorazepam</i>	94,17	0,997	7,84	3,66	8,42	2,29	0,26	0,41	4,78	9,85	3,77	5,56	6,95	5,38
<i>Bromazepam</i>	103,78	0,997	3,39	7,55	4,62	1,43	1,35	2,18	9,35	5,96	3,20	5,78	6,57	2,87
<i>Clobazam</i>	84,24	0,994	11,5	6,26	3,27	4,40	3,68	2,48	5,11	3,94	4,90	5,75	3,60	3,69
<i>Midazolam</i>	89,4	0,995	8,26	1,88	2,67	4,63	0,13	0,04	7,04	6,36	5,31	6,76	4,29	3,74
<i>Prazepam</i>	90	0,992	3,64	4,25	5,83	1,85	1,69	3,39	7,40	6,26	6,84	5,05	5,68	5,49
<i>Alprazolam</i>	73,63	0,994	11,41	7,47	7,20	6,54	7,46	3,3	11,41	5,06	9,23	7,34	4,08	8,16
<i>Medazepam</i>	84,7	0,995	4,03	3,04	12,18	1,07	2,47	9,28	4,03	8,91	4,82	7,25	7,94	4,60
<i>Flurazepam</i>	96,13	0,993	4,47	10,77	13,03	1,79	8,43	11,31	4,47	6,79	3,06	3,99	4,02	3,33

<sup>1</sup>Rec (%) – ефикасност на екстракција/принос, изразена во процент на екстрахиран аналит; <sup>2</sup>R<sup>2</sup> – фактор на корелација; <sup>3</sup>QC – контролен примерок; <sup>4</sup>IAA – intra-day accuracy (интра-дневна точност, изразена како % на грешка); <sup>5</sup>IEA – inter-day accuracy (интер-дневна точност, изразена како % на грешка); <sup>6</sup>IAP – intra-day precision (интра-дневна прецизност, изразена како RSD%); <sup>7</sup>IEP – inter-day precision (интер-дневна прецизност изразена како RSD%).

Бидејќи во слепата проба анализирана веднаш по стандардниот примерок со највисока концентрација беше забележан пренос на некои од определуваните бензодиазепини, во секвенцата е вклучена анализа на слепа проба по секој примерок (стандарден, контролен или непознат примерок), со што се елиминира овој ефект. Со анализа на резултатите од тестот за стабилност беше заклучено дека подготвените примероци се стабилни 48 часа.

### 3.3. Примена на презентираниот метод

Вкупно 105 примероци на крв беа анализирани со примена на презентираниот метод. Примероците на крв потекнуваат од случаи обдуцирани на Институтот за судска

медицина, криминалистика и медицинска деонтологија при Медицинскиот факултет во Скопје. За секој од овие 105 случаи претходно беше добиен позитивен резултат за присуство на бензодиазепини со примена на скрининг методи, во најмалку еден примерок на биолошка течност од истиот случај. Кај 7 од анализирани примероци на крв не беше определено присуство на бензодиазепини. Во Табела 4 е прикажано во колку случаи е определен секој бензодиазепин поединечно (три од случаите со потврдено присуство на бензодиазепини не се прикажани во табелите подолу поради достапност на некои од потребните податоци). Во Табела 5 е прикажана распределбата на вкупно 300 смртни случаи според начинот на настанување на смртта и според присуството на бензодиазепини и/или алкохол.

Таб.4. Број на случаи во кои е определено присуството на секој од бензодиазепините анализирани со презентираниот метод

	D	N	O	T	L	B	C	M	P	Cl	ACl	A	Me	Ni	F
Бр.	72	84	54	19	2	7	0	3	0	1	1	4	0	0	0

D – Diazepam; N – Nordiazepam; O – Oxazepam; T – Temazepam; L – Lorazepam; B – Bromazepam; C – Clobazam; M – Midazolam; P – Prazepam; Cl – Clonazepam; ACl – 7-Aminoclonazepam; A – Alprazolam; Me – Medazepam; Ni – Nitrazepam; F – Flurazepam.

Таб.5. Распределба на случаи според начин на настанување на смрт и присуство на етил алкохол и/или бензодиазепини

Начин на настанување на смрт	природна		насилна		убиство		само-убиство		несрекен случај	
	бр.	%	бр.	%	бр.	%	бр.	%	бр.	%
без алкохол, без бензодиазепини	57	67,1	106	49,3	11	68,7	35	46,7	60	48,4
само со алкохол	5	5,9	37	17,2	1	6,3	4	5,3	32	25,8
само со бензодиазепини	21	24,7	63	29,3	4	25	33	44	26	20,9
со алкохол и со бензодиазепини	2	2,4	9	4,2	0	0	3	4	6	4,8
вкупно	85		215		16		75		124	

#### 4. ДИСКУСИЈА

Методите за квантитативно определување на бензодиазепини во биолошки примероци вклучуваат постапка на подготовка на примерок (екстракција) и хроматографска анализа. Бидејќи биолошките примероци содржат голем број на интерферирачки супстанции кои може да пречат при анализата на хроматограмите, некои методи за подготовка на примерок вклучуваат предтретман кој вклучува третирање на примерокот со реагенси (најчесто органски растворувачи) со цел таложување/преципитација на протеините. [17, 18] Оптимизацијата на екстракцијата покажа дека преципитацијата на примероците од крв со ацетонитрил не придонесува за зголемување на ефикасноста на екстракција, ниту пак овозможува определување на бензодиазепините во пониски концентрации. Од овие причини, а вклучително и фактот што преципитацијата одзема дополнително време, екстракцијата на бензодиазепините од примероците беше направена без предтретман. Течно течната и цврсто-фазната екстракција претставуваат универзални екстрактивни постапки во определувањето на бензодиазепините. [6] Бидејќи бензодиазепините се слабо базни и липофилни соединенија [19], за нивна екстракција од биолошки примерок се користат катјон изменувачки [20-22] или неутрални силика колони. [17, 23, 24] Во ова истражување,

висока ефикасност на екстракција беше постигната со користење на силика колони за екстракција и елуција со смеса од дихлорометан, 2-пропанол и амонијак. Некои бензодиазепини се неиспарливи и термолабилни и пред нивно анализирање со гасна хроматографија потребно е примерокот да се дериватизира со што се добиваат постабилни деривати и подобри хроматографски карактеристики (форма на пик, зголемување на аналитичкиот одговор во однос на позадинскиот шум – *signal-to-noise ratio*). [8] При оптимизацијата на овој чекор, беа тестирани два начини на дериватизација, најчесто опишани во литературата, односно дериватизација со ацилација, која иако често применувана [17, 22, 24-26], не даде задоволувачки резултати за ниту еден од испитуваните бензодиазепини, за разлика од постапката на силирање. При тестирањето на четири силирачки реагенси за дериватизација беше забележано дека секој од нив успешно создава деривати на бензодиазепините, освен за бромазепам, кој не секогаш влегува во реакција на дериватизација. Најдобри резултати за бромазепам се добија со примена на MTBSTFA. Нитро-бензодиазепините како клоназепам и нитразепам, кои многу брзо преминуваат во соодветни 7-амино-метаболити, исто така претставуваат предизвик за дериватизација и препорачливо е да се анализираат со примена на посебни специфични методи за нивно определување, особено во *post-mortem* примероци. [8] Сепак, во литературата постојат податоци кои ја оправдуваат употребата на MTBSTFA за дериватизација на нитразепам врз основа на резултати од студии слични на опишаните во делот за оптимизација на дериватизацијата. [25] Дополнително, капиларната колона употребена за хроматографско разделување со стационарна фаза 5% Diphenyl / 95% Dimethylpolysiloxan, која всушност е стандарден избор за стационарна фаза во форензичната токсикологија, е компатибилна за анализа на бензодиазепини. [17, 25, 27-29]

Со тестовите за валидација беше потврдено дека методот е селективен и специфичен за сите определувани бензодиазепини. Резултатите за клоназепам, 7-аминоклоназепам и нитразепам не ги задоволија критериумите за линеарност во дефинираниот опсег и од оваа причина беа исклучени од понатамошна евалуација. Причина за несоодветната линеарност не е изборот на средства за дериватизација напротив, нивните деривати беа задоволителни за евалуација, карактеризирајќи се со добар интензитет на специфичните јони, како и добра повторливост. Причината е веројатно несоодветноста на употребениот ИС, односно, овие супстанции се дериватизираат на различен начин од користените ИС (Diazepam – d5, Oxazepam – d5 и Bromazepam – d4), а бидејќи концентрацијата на бензодиазепините се определува преку односот на површините на аналитот со ИС, не може да се постигне добра линеарност во дефинираниот опсег на калибрација. Овој проблем може да се надмине доколку во методот како ИС се користи и една од овие супстанции во деутеризиран облик, кој не беше расположлив во лабораторијата во моментот на валидацијата. Линеарноста за останатите бензодиазепини (диазепам, нордиазепам, оксазепам, темазепам, лоразепам, бромазепам, клобазам, мидазолам, празепам, флуразепам, медазепам) беше потврдена во опсег од 10-1000 ng/mL, додека за алпразолам во опсег од 10-500 ng/mL. Посакуваната концентрација за LOQ за алпразолам од 5 ng/mL (со цел да се опфатат ниските терапевтски концентрации) не даде резултати кои ги задоволуваат критериумите за овој параметар, од причина што алпразолам е слабо испарлива супстанција, која не влегува во реакција на дериватизација бидејќи нема реактивен водороден атом, што ја прави предизвикувачка за определување со гасна хроматографија. Сепак, вредностите за LOD, LOQ и линеарност во даден концентрациски опсег, како и ефикасноста на екстракцијата, се слични или подобри од досега објавените методи кои користеле иста или слична технологија за анализа на дел

од определуваните бензодиазепини. [17, 25, 27, 28] Методот се карактеризира со висок степен на точност и прецизност, што може да се забележи од ниските вредности за процентот на грешка на определуваната концентрација во испитуваните контролни примероци (Табела 3). Стабилноста на подготвениот примерок беше тестирана во период од 72 часа од подготвувањето. Стабилноста во овој период беше потврдена за сите супстанции, освен за бромазепам, чиј дериват започнува процес на дегарација по 48 часа кај некои од примероците. Со анализа на резултатите од овој тест беше забележано дека интензитетот на дериватите на клоназепам, 7-аминоклоназепам и нитразепам се зголемуваат. Наша претпоставка е дека процесот на дериватизација во определен степен сеуште се случува во самата вијала на собна температура. Иако овие супстанции не беа вклучени во валидацијата на методот, овој податок може да служи како насока за подобрување на условите за дериватизација. Сепак, со воведување на соодветна супстанција како ИС се очекува избегнување и на овој проблем, бидејќи промените на ист начин и во иста мера ќе ги влијаат и на анализот и на ИС, а нивниот однос ќе остане непроменет.

Презентирианиот метод беше применет за анализа на 105 *post-mortem* примероци на крв за кои скрининг анализата на достапните биолошки течности (крв, урина, очна вода, желудочна содржина) од истите случаи соодветни на анализираниите примероци покажа присуство на бензодиазепини. Согласно СТА [7], примерок од избор за скрининг е урина. Доколку урината не е достапна, како примерок за скрининг се користат крв и очна вода. Позитивните резултати добиени при скрининг треба да се потврдат со соодветен метод. Примерок од избор за квантитативно определување е крвта, бидејќи концентрацијата во крв се користи за толкување на влијанието на определена супстанција во времето на настанување на смрт. Од вкупно 105 анализирани примероци на крв, кај 7 не беше потврдено присуство на бензодиазепини. Кај 6 од овие примероци детектирано е присуство на бензодиазепини во урина, што укажува на тоа дека во моментот на настанување на смрт бензодиазепините биле во фаза на елиминација, а кај 1 бензодиазепини во крв биле најдени во концентрација околу LOD на применетиот скрининг метод. Овој пример ја потврдува потребата од примена на потврдни методи за секој позитивен резултат добиен при скрининг. Понатаму, од вкупно 98 случаи за кои беше потврдено присуство на бензодиазепини и определена нивната концентрација, кај 72 беше определено присуство на диазепам, а кај 84 нордизепам (неговиот главен метаболит). Во дел од овие примероци истовремено беше определено присуство на темазепам (во 19 примероци) и оксазепам во (54 примероци), при што треба да се има предвид фактот дека тие исто така се создаваат во процесот на метаболизам на диазепам. Од останатите бензодиазепини, определено е присуство на бромазепам, алпразолам, лоразепам, клоназепам, 7-аминоклоназепам и мидазолам кај помалку од десет примероци. Флуразепам, медазепам, нитразепам, празепам и клобазам не беа определени во ниту еден од анализираниите примероци. Добиените резултати за присуство на бензодиазепини, вклучително и резултати за присуство на етил алкохол се распределени по случаи според видот на смрт, односно природна или насилна смрт. Случаите на насилната смрт потоа се поделени според начинот на настанување, односно на убиство, самоубиство и несреќен случај. Ваквата распределба е направена со цел понатамошна обработка на податоците според различни променливи како што се пол, возраст, присуство на етил алкохол (и негова концентрација), присуство на еден или повеќе бензодиазепини (и негова/нивна концентрација), присуство на двете гупи супстанции (и нивна концентрација), вид на смрт и начин на нејзино настанување. Оваа анализа има за цел определување на ризик и неговиот обем од настанување на насилна смрт при употреба на овие две групи на супстанции. Поврзаноста на употребата на бензодиазепини и настанувањето на насилна

смрт е од особен интерес со оглед на нивното воведување во групата на супстанции чија употреба е забранета при управување со моторни возила. Резултатите од студиите за проценка на нивното влијание врз намалување на способноста за управување со моторни возила се двосмислени. Според едни, употребата на бензодиазепини влијае на однесувањето и движењето, но нема влијание врз ориентацијата во време и простор [30], а други студии приложуваат цврсти докази за поврзаноста помеѓу употребата на бензодиазепини и придонесот во настанување на сообраќајна несреќа. [31] Авторите кои ја обработувале оваа тема користеле различни методологии, што влијае врз различното толкување на резултатите, но сите се единствено согласни во фактот дека ефектите од бензодиазепините врз способноста за управување со моторни возила се дозно-зависни. Во Законот за безбедност во сообраќајот на РС Македонија нема поставено концентрациски граници, односно за бензодиазепини постои т.н. "нула толеранција".

Најголем дел од досега обработените случаи на насилна смрт, класифицирани како несреќен случај (вкупно 124) во нашата студија, се настанати како резултат на ненамерна интоксикација или сообраќајна несреќа. Кај 20,9% од нив е определено присуство на бензодиазепини, додека кај 25,4% е определено присуство на етил алкохол. Кај 4,8% од смртните случаи класифицирани како несреќен случај е определено присуство и на бензодиазепини и на алкохол. Оттука потекнува интересот за понатамошна евалуација на поврзаноста на употребата на овие супстанции и ризикот од настанување на насилна смрт. Освен за сообраќајни несреќи, бензодиазепините претставуваат и ризик за настанување на несреќни случаи кај геријатриска популација (намалена ориентација, пад од висина или на рамна површина), за што исто така постојат спротивставени ставови. [32-34] Без оглед на возраста, присуство на бензодиазепини во најголем процент е потврдено кај случаите на самоубиство (44%). Бројни податоци од литературата ги наведуваат бензодиазепините и етил алкохолот како најчесто присутни во примероци од случаи на самоубиство [12, 13, 35, 36], што се разликува од нашите податоци во однос на етил алкохол, бидејќи е определен само кај 5,3% од случаите на самоубиство. Во сите цитирани студии податоците се интерпретирани преку користење на класични статистички пресметки. Нашата цел опфаќа примена на хемометриска анализа за да се добие детален приказ за евентуалната поврзаност на погоре дефинираните променливи во комбинација со употребата на алкохол и/или бензодиазепини и ризикот од настанување на насилна смрт и да се испита предиктивната моќ на експерименталниот модел. Воспоставувањето на еден ваков модел со соодветна предиктивна моќ претставува голем придонес за форензичната хемија, со можност да се користи и во други области од форензиката. [37] Всушност, релевантната проценка на ризикот од употреба на определени супстанции (бензодиазепини и етил алкохол во конкретниот случај) може да се користи како основа за воведување на максимална дозволена концентрација на бензодиазепини кај учесниците во сообраќајот. Истовремено, развојот на ваков апликативен модел претставува значаен придонес за научната јавност која интензивно работи на добивање на убедливи податоци за поврзаноста на бензодиазепините и ризикот од настанување на смрт, со цел да се спречи или намали негативното влијание од нивната употреба врз јавното здравје. [4]

## 5. ЗАКЛУЧОК

Ова истражување опфаќа оптимизација и валидација на GC-MS метод за квантитативно определување на бензодиазепини во крв. Оптимизацијата на екстракцијата покажа дека не е потребен предретман на примероците со

преципитација што го скратува времето потребно за нивна подготовка. Валидацијата на методот покажа одлични карактеристики за селективност, специфичност, ефикасност на екстракција, линеарност, точност и прецизност согласно најновите критериуми во интернационалните водичи. Предноста на овој метод е тоа што овозможува квантитативно определување на вкупно тринаесет бензодиазепини во еден чекор, а недостаток што е применлив само за квалитативно определување на клоназепам, 7-аминоклоназепам и нитразепам. Со детална анализа на резултатите од сите спроведени тестови е изведен заклучок дека овој недостаток на методот може да се надмине со воведување на уште еден ИС од групата на нитро-бензодиазепини. Методот е линеарен во широк концентрациски опсег и може да се примени како во клиничката, така и во форензичката пракса, а и за анализа на други биолошки течности освен крв. Квантитативен резултат се добива за само неколку часа, што е од особена важност во ургентни клинички центри. Определените граници на детекција (LOD) и квантификација (LOQ) од 3 ng/mL и 10 ng/mL соодветно, овозможуваат методот да се применува за следење на терапевтски концентрации односно терапевтски мониторинг. Во ова истражување методот беше применет за анализа на примероци на крв од обдуцирани случаи во тек на две години (2019-2020), при што е забележано дека диазепам претставува најупотребуваниот бензодиазепин во нашата земја, додека пак флуразепам, медазепам, нитразепам, празепам и клобазам не беа определени во ниту еден од анализираните примероци. Со распределба на случаите по видот и начинот на настанување на смрт забележано е дека бензодиазепините се најзастапени во примероци од случаи на самоубиство. Бидејќи добиените резултати понатаму ќе се користат во студија за проценка на ризик од употребата на бензодиазепини за настанување на насилна смрт, од особена важност беше обезбедувањето на точни и прецизни резултати за сите бензодиазепини регистрирани во РС Македонија, што е постигнато со презентираниот метод и покрај наведениот недостаток (само кај два случаи беше определено присуство на спорните бензодиазепини).

## 6. ЛИТЕРАТУРА

- [1] Hobbs W.R., Rall T.W., and Verdoorn T.A. Hypnotics and sedatives; Ethanol. In: Hardman JG, Limbuid LE, Molinoff PB, Ruddon RW, Gilman AG, eds. Goodman and Gilman's The Pharmacological basis of Therapeutics, 9th ed. New York, NY: McGraw-Hill, 1996. pp 367-373.
- [2] Shumiala A., But J., Iqbal J. 2018. "Abuses and Misuses of Benzodiazepines and Antidepressants; A review." *Mod Appl Pharm Pharmacol*. 1(3).MAPP.000521
- [3] UNODC, Global SMART Update Volume 18, September 2017 [https://www.unodc.org/documents/scientific/Global\\_SMART\\_Update\\_2017\\_Vol\\_18.pdf](https://www.unodc.org/documents/scientific/Global_SMART_Update_2017_Vol_18.pdf)
- [4] Charlson, F., Degenhardt, L., McLaren, J., Hall, W., Lynskey, M 2009. "A systematic review of research examining benzodiazepine-related mortality." *Pharmacoepidemiol Drug Saf*. 18(2):93-103.
- [5] Bystritsky, A., Khalsa, S.S., Cameron. M.E, Schiffman, J. 2013. "Current diagnosis and treatment of anxiety disorders." *P T*. 38(1):30-57.
- [6] Uddin, M.A., Samanidou, V.F., Papadoyannis I.N. 2014. "An Overview on Total Analytical Methods for the Detection of 1,4-Benzodiazepines." *Pharm Anal Acta*. 5(6).
- [7] The International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT) – Committee of Systematic Toxicological Analysis. "Laboratory Guidelines." *TIAFT-Bulletin*. XXXI 4:23–26.

- [8] Uddin, M.A., Samanidou, V.F., Papadoyannis I.N. 2013. "Bio-Sample Preparation and Gas Chromatography Determination of Benzodiazepines – A Review." *J Chromatog Sci.* 21(7):587-598.
- [9] European Medicines Agency (EMA). Guideline on bioanalytical method validation EMEA/SHMP/EWP/192217/2009 Rev. 1, adopted by CHMP 21 July 2011.
- [10] Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie (GTFCh). Requirements for the validation of analytical methods, APPENDIX B To the GTFCh Guidelines for quality assurance in forensic-toxicological analyses, Version 1, Date: 1st of June 2009
- [11] American Academy of Forensic Sciences (AAFS). Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology, ASB Standard 036, 1st ed., 2017
- [12] Brådvik, L., Löwenhiem, P., Rank, A., Berglund, M. 2019. "From Substance Use disorders in Life to Autopsy Findings: A Combined Case-Record and Medico-Legal Study." *Int J Environ Res Public Health.* 16(5):1.
- [13] Gravensteen, I.K., Ekberg, Ø., Thiblin, I., Helweg-Larsen, K., Hem, E., Rodge, S., Tøllefsen, I. 2019. "Psychoactive substances in natural and unnatural deaths in Norway and Sweden – a study on victims of suicide and accidents compared with natural deaths in psychiatric patients." *BMC Psychiatry.* 19:33
- [14] Paterno, E., Glynn, R., Levin, R., Lee, M., and Huybrechts, K. 2017. "Benzodiazepines and risk of all-cause mortality in adults: cohort study." *BMJ.* 358:j2941
- [15] Службен весник на Република Македонија. 2015. "Закон за безбедност во сообраќајот на патиштата." 169:2.
- [16] White, J.M., Irvine, R.J. 1999. "Mechanism of fatal opioid overdose." *Addiction.* 94(7):961-972
- [17] Inoue, H., Maeno, Y., Iwasa, M., Matoba, R., Nagao, M. 2000. "Screening and determination of benzodiazepines in whole blood using solid-phase extraction and gas chromatography - mass spectrometry." *Forensic Sci Int.* 113(1-3):367-73.
- [18] Yuan, H., Mester, Z., Lord, H., Pawliszyn, J. 2000. "Automated in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry for the determination of selected benzodiazepines." *J Anal Toxicol.* 24(8):718-725.
- [19] Uddin, M.N., Samanidou, V.F., Papadoyannis, I.N. 2010. "Stability study of six 1,4-Benzodiazepines in bio-fluids stored at -20°C." *Chiang Mai J. Sci.* 37: 451-463.
- [20] Rasanen, I., Neuvonen, M., Ojanperä, I., Vuori, E. 2000. "Benzodiazepine findings in blood and urine by gas chromatography and immunoassay." *Forensic Sci Int.* 12(2-3):191-200.
- [21] Nguyen, H., Nau, D.R. 2000. "Rapid method for the solid-phase extraction and GC-MS analysis of flunitrazepam and its major metabolites in urine." *J Anal Toxicol.* 24(1):37-45.
- [22] Negrusz, A., Bowen, A.M., Moore, C.M., Dowd, S.M., Strong, M.J., Janicak, P.G. 2002. "Deposition of 7-aminiclonazepam and clonazepam in hair following a single dose of Klonopin." *J Anal Toxicol.* 471-8.
- [23] Ahn, S.H., Maeng, H.J., Koo, T.S., Kim, D.D., Shim, C.K., Chung, S.J. 2006. "Quantification of clonazepam in human plasma by gas chromatography-mass spectrometry." *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 834(1-2):128-33.



- [24] ElSohly, M.A., Feng, S., Salamone, S.J., Brenneisen, R. 1999. "GC-MS determination of flunitrazepam and its major metabolite in whole blood and plasma." *J Anal Toxicol.* 23(6):486-9.
- [25] Gunnar, T., Ariniemi, K., Lillsunde, P. 2005. "Determination of 14 benzodiazepines and hydroxyl metabolites, zaleplon and zolpidem as tert-butyldimethylsilyl derivatives compared with other common silylating reagents in whole blood by gas chromatography-mass spectrometry." *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 818(2):175-89.
- [26] Yegles, M., Marson, Y., Wennig, R. 2000. "Influence of bleaching on stability of benzodiazepines in hair." *Forensic Sci Int.* 107(1-3):87-92.
- [27] Nakamae, T., Shinozuka, T., Sasaki, C., Ogamo, A., Murakami-Hashimoto, C., Irie, W., Terada, M., Nakamura, S., Furukawa, M., Kurihara, K. 2008. "Estiazolam and its major metabolites in two unnatural death cases." *Forensic Sci Int.* 182(1-3):e1-6.
- [28] Tiscione, N.B., Shan, X., Alford, I., Yeatman, D.T. 2008. "Quantitation of benzodiazepines in whole blood by electron impact-gas chromatography-mass spectrometry." *J Anal Toxicol.* 32(8):644-52.
- [29] Papoutsis, I.I., Athanaselis, S.A., Nikolaou, P.D., Pistos, C.M., Spiliopoulou, C.A., Maravelias, C.P. 2010. "Development and validation of an EI-GC-MS method for the determination of benzodiazepine drugs and their metabolites in blood: Application in clinical and forensic toxicology." *J Pharm Biomed Anal.* 52(4):609-14.
- [30] Smink, B.E., Lusthof, K.J., de Gier, J.J., Uges, D.R., Egberts, A.C. 2008. "The relation between the blood benzodiazepine concentration and performance in suspected impaired drivers." *J Forensic Leg Med.* 15(8):483-8.
- [31] Longo, M.C., Lokan, R.J., White, J.M. 2001. "The relationship between blood benzodiazepine concentration and vehicle crash culpability." *J Traffic Med.* 29(1-2): 36-43.
- [32] Jaussent, I., Ancelin, M.L., Berr, C., Pérès, K., Scali, J., Besset, A., Ritchie, K., Dauvilliers, Y. 2013. "Hypnotics and mortality in an elderly generation population: a 12-year prospective study." *BMC Med.* 11:212.
- [33] Hogan, D.B., Maxwell, C.J., Fung, T.S., Ebly, E.M. 2003. "Canadian Study of Health and Aging. Prevalence and potential consequences of benzodiazepine use in senior citizens: results from the Canadian Study of Health and Aging." *Can J Clin Pharmacol.* 10(2):72-7.
- [34] Weich, S., Pearce, H.L., Croft, P., Singh, S., Crome, I., Bashford, J., Frisher, M. 2014. "Effects of anxiolytic and hypnotic drug prescription on mortality hazards: retrospective cohort study." *BMJ.* 348:g1996.
- [35] Holmgren, A., Jones, A.W. 2010. "Demographics of suicide victims in Sweden in relation to their blood-alcohol concentration and circumstances and manner of death." *Forensic Sci Int.* 198(1-3):17-22.
- [36] Nordrum, I., Eide, T.J., Jørgensen, L. 2000. "Alcohol in a series of medico-legally autopsied deaths in northern Norway 1973-1992." *Forensic Sci. Int.* 110(2):127-37.
- [37] Kumar, R., Sharma, V. 2018. "Chemometrics in forensic science." *TrAC.* 105:191-201.

УНИВЕРЗИТЕТ „СВ. КИРИЛ И МЕТОДИЈ“ ВО СКОПЈЕ  
ШКОЛА ЗА ДОКТОРСКИ СТУДИИ  
ФАРМАЦЕВТСКИ ФАКУЛТЕТ

Студиска програма: трет циклус, докторски студии од областа медицински науки  
и здравство, поле фармација

---

РЕЦЕНЗИЈА

на семинарски труд

Рецензентската комисија во состав проф. д-р Лидија Петрушевска-Този (ментор), проф. д-р Верица Попоска и проф. д-р Тања Петреска Ивановска, до Стручниот совет на докторските студии на програмата ФАРМАЦИЈА при Фармацевтскиот факултет ја доставува рецензијата за оценка на семинарскиот труд од 5 семестар на Докторските студии од кандидатот Марија Бујароска под наслов „ОПТИМИЗАЦИЈА И ВАЛИДАЦИЈА НА МЕТОД ЗА КВАНТИТАТИВНО ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА БЕНЗОДИАЗЕПИНИ ВО КРВ СО ПРИМЕНА НА ГАСНА ХРОМАТОГРАФИЈА СО МАСЕНА СПЕКТРОМЕТРИЈА И НЕГОВА ПРИМЕНА ВО ФОРЕНЗИЧНА ТОКСИКОЛОГИЈА“.

ИЗВЕШТАЈ

Во приложениот семинарски труд, докторандот опишува оптимизација и валидација на метод за квантитативно определување на бензодиазепини во крв со примена на гасна хроматографија со масена спектрометрија по соодветна подготовка на примероците со примена на цврсто-фазна екстракција. Истражувањето е поттикнато од неопходноста за развој на брзи и точни методи за определување на концентрацијата на бензодиазепини во биолошки примероци како една од најчесто применуваните анализи во клиничките и форензично-токсиколошките лаборатории. Во трудот како цел е наведено постигнување на задоволителни резултати за валидациските критериуми за што поголем број претставници од групата на бензодиазепини. Бидејќи лековите од оваа група поседуваат различни физичко-хемиски особини, како и различни вредности за терапевтските и токсичните концентрации, нивното определување со примена на еден метод е своевиден аналитички предизвик. Докторандот наведува дека методот користен во овој труд е експериментален метод за квантитативно определување на психоактивни супстанции кои подлежат на злоупотреба и психоактивни лекови во еден чекор, воведен во токсиколошката лабораторија при Институтот за судска медицина, на

Медицинскиот факултет во Атина, а активностите и резултатите презентирани во овој труд се однесуваат исклучиво на лековите од групата на бензодиазепини.

Со цел воведување на метод за квантитативно определување на сите бензодиазепини регистрирани во Република Северна Македонија, докторандот во рамки на ова истражување врши оптимизација на критичните чекори на методот. Во оваа смисла е опишан процесот на избор на реагенси и услови за подготовка на примерок, со цел обезбедување на ефикасност на екстракција за сите испитувани бензодиазепини. Опсежни тестови се опишани при оптимизација на постапката за дериватизација, која претставува посебен предизвик. Исто така, испитани се следниве аналитички критериуми: селективност, специфичност, ефикасност на екстракција, линеарност, точноста и прецизноста и стабилноста.

Во ова истражување се користени примероци на крв од реални случаи, за кои е претходно потврдено присуство на бензодиазепини со примена на рутински скрининг методи (Институт за судска медицина, криминалистика и медицинска деонтологија, Медицински факултет, Скопје) и примероци од базен на полна крв. Стандардните контролни примероци и примероците за валидација се подготвени од комерцијално достапни аналитички стандарди на Diazepam, Nordiazepam (Desmethyldiazepam), Oxazepam, Temazepam, Lorazepam, Bromazepam, Clobazam, Midazolam, Prazepam, Clonazepam, 7-aminoclonazepam, Alprazolam, Flurazepam, Medazepam, Nitrazepam и смеса од Diazepam-d5, Oxazepam-d5 и Bromazepam-d4 за подготовка на интересен стандард.

Кандидатот истакнува дека добиените резултати од валидацијата на методот ги исполнуваат критериумите за селективност, специфичност, ефикасност на екстракција, линеарност, точноста и прецизноста, од каде произлегува дека методот е применлив за определување на концентрација на бензодиазепини во примероци од полна крв. Со тестот на испитување на стабилноста на дериватизираните примероци од полна крв заклучено е дека анализата треба да се спроведе најдоцна 48 часа од подготовката на примерокот.

Валидираниот метод е применет за анализа на 105 *post-mortem* примероци на крв, а од добиените резултати докторандот изведува заклучок дека диазепам претставува најчесто користен бензодиазепин во Република Северна Македонија. Со распределба на добиените резултати според видот и начинот на настанување на смртта, докторандот потенцира дека присуство на бензодиазепини во најголем процент е потврдено кај случаи на самоубиство.

Во делот дискусија кандидатот ја образложува потребата од воспоставување на рутински применлива квантитативна анализа за бензодиазепини во крв, којашто офаќа широк концентрациски опсег со цел определување на интоксикација како причина за смрт, степен на интоксикација за клинички потреби, како и регулирање на безбедноста во сообраќајот. Притоа, со споредбена анализа на валидираниот метод и други објавени методи во литературата ги наведува предностите на опишаниот метод од аспект на опсегот на квантификација на секој бензодиазепин поединечно и изведувањето на анализата во еден чекор (од подготовка на примерок до квантификација). Во дискусијата докторандот напоменува дека методот има еден недостаток, односно валидацијата не е целосно спроведена за три лекови од испитуваната група (клоназепам, 7-аминоклоназепам и нитразепам) поради достапноста до соодветен интересен стандард во моментот на валидација на методот.

Врз основа на добиените резултати докторандот изведува заклучок дека воспоставениот метод се карактеризира со задоволителни својства за селективност,

специфичност, ефикасност на екстракција, линеарност, точност и прецизност согласно критериумите во интернационалните водичи и може да се користи за определување на концентрација на вкупно тринаесет бензодиазепини регистрирани во Република Северна Македонија. Методот е применлив во клиничка и форензична токсикологија, а исто така и во итни ситуации, односно анализата во еден чекор овозможува добивање на резултат за неколку часа. Докторандот исто така ја потенцира понатамошната примена на добиените резултати во проценка на ризикот поврзан со употреба на бензодиазепини и настанување на насилна смрт.

## ОЦЕНКА

Комисијата оценува дека во пријавениот труд под наслов „ОПТИМИЗАЦИЈА И ВАЛИДАЦИЈА НА МЕТОД ЗА КВАНТИТАТИВНО ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА БЕНЗОДИАЗЕПИНИ ВО КРВ СО ПРИМЕНА НА ГАСНА ХРОМАТОГРАФИЈА СО МАСЕНА СПЕКТРОМЕТРИЈА И НЕГОВА ПРИМЕНА ВО ФОРЕНЗИЧНА ТОКСИКОЛОГИЈА“ на докторандот Марија Бујароска е оптимизиран и валидиран GC-MS метод за квантитативно определување на бензодиазепини во крв, кој може да има клучна примена во форензичните токсиколошки лаборатории со оглед на едноставноста и краткотрајноста на анализата, како и валидациските параметри што ја потврдуваат неговата соодветност за апликативни цели. Дополнително, воспоставениот метод може да послужи и за анализирање на поврзаноста на употребата на бензодиазепини и ризикот од настанување на насилна смрт кај корисниците.

Рецензентска комисија:

Проф. д-р Лидија Петрушевска-Този (ментор),

Проф. д-р Верица Попоска

Проф. д-р Тања Петреска Ивановска

Скопје, 22.10.2020