

## ОСТРЫЕ ОТРАВЛЕНИЯ БЕНЗОДИАЗЕПИНАМИ И ОЦЕНКА ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ НАДЕЖНОСТИ МЕТОДОВ ПРИ ИХ ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОМ ИССЛЕДОВАНИИ

**С. Н. Борисевич, О. М. Вергун, А. А. Шмигельский**

Белорусский государственный медицинский университет,

Городская клиническая больница скорой медицинской помощи, Минск

Бензодиазепины – группа транквилизаторов высокой активности с широким терапевтическим действием и относительно малой токсичностью. Она насчитывает около 100 наименований отечественных и импортных лекарственных препаратов и каждый год пополняется за счет синтеза новых соединений подобной структуры. Относительная доступность и широкое использование делает их частой причиной злоупотребления и передозировок как у взрослых, так и у детей. Подростки применяют бензодиазепины в качестве заменителей этанола, причем с подобной целью зарегистрирован прием около 30 таблеток в день. Несмотря на большую частоту отравлений (бензодиазепины занимают первое место среди отравлений препаратами депримирующего действия), смертельные исходы при приеме только этих веществ крайне редки. Опасность представляют смешанные интоксикации, среди которых доминируют комбинации бензодиазепинов с этанолом, антидепрессантами, нейролептиками, сердечными гликозидами, когда черты токсичности второго яда могут быть «замаскированы» бензодиазепинами. Следует отметить ятрогенные передозировки бензодиазепинов, особенно частые при введении этих препаратов в вену. Отравления бензодиазепинами характеризуются симптоматикой, сходной с отравлениями наркотиками, производными фенотиазина, что затрудняет диагностику [1,2]. Решающее значение в экспертной оценке таких отравлений имеют результаты химико-токсикологического исследования.

Непрерывное длительное применение бензодиазепинов приводит к развитию привыкания и может стать причиной психической и физической лекарственной зависимости. Бензодиазепины относятся к опасным психотропным веществам [3].

Все они имеют сходную структуру 1,4- или 1,5-бензодиазепина с различными заместителями, при гидролизе дают бензофеноны, на поиске которых основывается их химико-токсикологический анализ [4].

Бензодиазепины легко всасываются из желудочно-кишечного тракта, максимальное количество в крови обнаруживается спустя 1-3 ч. Связывание с белками плазмы высокое (до 98% у диазепам). Депонируются в жировой

ткани с последующим постепенным высвобождением в кровь, в связи с чем имеют довольно долгий период полувыведения (до 98 ч у диазепам). Выделяются преимущественно с мочой (свыше 60% дозы), а также через пищеварительный тракт. Метаболизм производных бензодиазепина проходит в печени по реакциям окисления, деметилирования, дезаминирования, гидроксирования, восстановления и конъюгации с глюкуроновой кислотой. Часть первичных метаболитов обладает фармакологической активностью [5,6]. В связи со сказанным, у больных с большим количеством подкожной жировой клетчатки и у лиц пожилого возраста отравления транквилизаторами могут быть не тяжелыми, но длительными.

Экспресс-анализ бензодиазепинов проводят иммунными методами, оценивая общее содержание этих соединений (иммуноферментный анализ, радиоиммунный анализ и др.).

Химический анализ бензодиазепинов проводится по двум направлениям: 1) по продуктам гидролиза — аминокбензофенонам и 2) по нативным веществам и метаболитам. Первое направление предусматривает кислотный гидролиз бензодиазепинов и их метаболитов в биообъекте (6 н HCl при 140°C в течение 60 мин), экстракцию образующихся аминокбензофенонов (рН 6-8, гептаном) и анализ экстрактов хроматографическими (ТСХ — тонкослойная хроматография; ГЖХ — газожидкостная хроматография; ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография) и спектральными методами. Это направление обеспечивает оценку суммарного количества бензодиазепинов и их метаболитов без разделения на индивидуальные вещества. ТСХ проводят с подвижной фазой — бензолом. Обнаружение по собственной желтой окраске и флуоресценцией в УФ-свете, при малых концентрациях — по флуоресценции и реакции Браттона-Маршала. Предел обнаружения составляет 1-5 мкг в пятне. Элюаты хроматограмм используют для снятия электронного спектра или газохроматографического исследования. Основные полосы поглощения аминокбензофенонов в этаноле 230-240 и 390-400 нм. Количественное определение предложено проводить фотоколориметрически по окрашенным продуктам реакции образования азокрасителя с бензофеноном [5-8].

Второе направление, более сложное, но более информативное, позволяет обнаруживать индивидуальные вещества и их метаболиты. Оно включает экстракцию бензодиазепинов из биообъекта органическими растворителями при рН 6-8 или сорбцию на полисорбе-1 и последующий анализ хроматографическими методами. Для определения методом ТСХ применяют системы хлороформ-метанол (9:1), этилацетат-метанол-аммиак (85:10:5), метанол [8,9].

Для ГЖХ обнаружения производных бензодиазепина используется общая система: фаза типа SE-30 или OV-17, температура колонки 230X, детектор пламенно-ионизационный или электронного захвата. Возможные осложнения в анализе связаны с термолабильностью бензодиазепинов и их водорастворимых метаболитов [9-11]. Газовую хроматографию с масс-

спектральным детектором (ГХ/МС) проводят в элюатах с ТСХ-пластин по нативным соединениям или дериватам. Хроматографические условия такие же, как для других лекарственных соединений [12].

Возможен ВЭЖХ-анализ производных бензодиазепаина по нативным веществам или продуктам гидролиза. Используется колонка с обращенно-фазным сорбентом типа С18. Подвижная фаза: смесь ацетонитрила - 0,05 М водного двузамещенного фосфата аммония 35:65 (для нативных веществ) и 55:45 (для бензофенонов). Детектирование в УФ-свете проводится при 220-230 нм [6]. Фирмой Bio-Rad (США) предлагается специальный набор реагентов, колонок и программа определения бензодиазепинов в моче на стандартном ВЭЖХ-анализаторе REMEDI HS. Для определения в этой системе общей концентрации бензодиазепинов в набор входят реагенты для ферментного гидролиза их глюкуронидов. Процесс проводится автоматически [13].

Цель настоящего исследования – оценка диагностической надежности методов обнаружения бензодиазепинов, а также характера и выявляемости острых отравлений бензодиазепинами по г. Минску за 2011г.

### **М а т е р и а л и м е т о д ы**

Обследована группа пациентов, поступивших с предварительным диагнозом «острое отравление бензодиазепинами» в Республиканский токсикологический центр по лечению острых отравлений химической этиологии психических больных Городской клинической больницы скорой медицинской помощи в течение 2011года. В основную группу вошли 1556 пациентов в возрасте от 18 до 60 лет. Биологическим материалом для лабораторных исследований явилась моча пациентов.

### **Р е з у л ь т а т ы и о б с у ж д е н и е**

Взятие биологического материала производили не позднее чем через час после поступления больного в отделение. Исследование биоматериала проводилось в течение 2 ч после отбора. Указанный диагноз подтверждался данными иммуноферментного анализа (экспресс-тесты) как предварительного метода исследования и тонкослойной хроматографией (подтверждающий метод).

При исследовании как предварительным, так и подтверждающим методами из 1556 случаев диагноз отравления бензодиазепинами подтвердился в 1117 случаях, что составляет 71,7%.

Оценка диагностической надежности метода осуществлялась путем установления показателей диагностической чувствительности (ДЧ), диагностической специфичности (ДС), диагностической эффективности (ДЭ), а также прогностической ценности положительного (ПЦ+) и отрицательного (ПЦ-) результатов теста [14].

Показатели надёжности методов выявления бензодиазепинов в моче при острых отравлениях составляют величины, представленные в таблице 1. Полученные результаты показывают высокую диагностическую чувствительность (ТСХ - 100%, ИФА -100%) и высокую диагностическую специфичность (ТСХ - 100%, ИФА – 100%) методов. Предсказательная ценность положительного результата (ТСХ – 100%, ИФА - 100%) и предсказательная ценность отрицательного результата (ТСХ - 100%, ИФА – 100%) дают основание рекомендовать эти методы для выполнения скрининговых исследований; метод ТСХ целесообразно использовать для осуществления дифференциальной диагностики (целенаправленные исследования и дополнительное подтверждение) злоупотреблений бензодиазепинами и их производными.

Количество острых отравлений медикаментами несколько лет подряд занимает лидирующую позицию в г.Минске в отличие от данных по республике, где преобладают отравления алкоголем и его суррогатами.

Мы проанализировали острые отравления по Минску и определили, что на протяжении последних 8 лет число отравлений бензодиазепинами остается на одном уровне и составляет 1,87-2,4% от общего количества отравлений (таблица 2) и [15] (в сравнении с отравлениями барбитуратами).

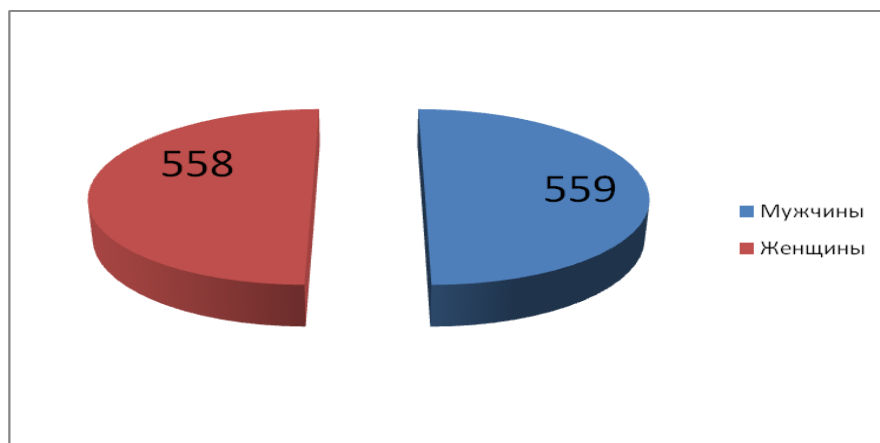
Распределение отравлений бензодиазепинами по половому признаку - примерно поровну (рисунок 1), но интересным является сезонность увеличения количества отравлений – в зимний период преобладают отравления бензодиазепинами у женщин, а летом – у мужчин (рисунок 2). Это можно объяснить тем, что бензодиазепины назначаются при различной психиатрической патологии, при которой наблюдаются сезонные рецидивы.

**Таблица №1 Показатели диагностической чувствительности, специфичности и эффективности, предсказательной ценности отрицательного и положительного результатов**

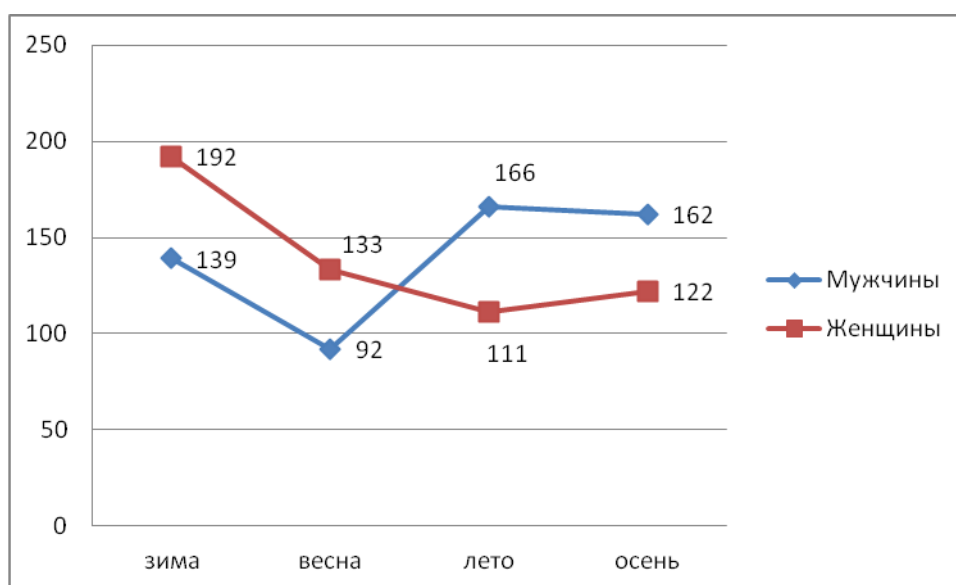
	ДЧ, %	ДС, %	ДЭ, %	ПЦ+, %	ПЦ-, %
<b>ТСХ</b>	100	100	100	100	100
<b>ИФА</b>	100	100	100	100	100

**Таблица №2 Количество исследований с положительным результатом на наличие бензодиазепинов в биологических образцах в УЗ ГКБСМП (2004-2011 г.г.)**

год	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
число отравлений	1118	1198	1022	974	993	854	1109	1117



**Рисунок №1** Количество выявленных отравлений в УЗ ГКБСМП за 2011г и распределение их в зависимости от пола



**Рисунок 2.** Сезонное распределение отравлений бензодиазепинами в зависимости от пола

Современные иммунохимические методы анализа наркотических и психотропных средств отличаются высокой чувствительностью, специфичностью, простотой исполнения, позволяют одновременно анализировать большое число проб, не требуют дополнительной и специальной очистки пробы или концентрирования и поэтому очень удобны для скрининг-диагностики. В Российской Федерации выпускаются готовые коммерческие наборы реагентов для иммуноферментной скрининг-диагностики основных классов психотропных веществ с гарантированным пределом их обнаружения 300-500 мкг/л. Для отечественных лабораторий импортные тест-системы являются дорогостоящими, поэтому актуальной задачей является разработка отечественных диагностикумов для иммуноферментного исследования с более высокой диагностической чувствительностью. Это направление анализа обеспечит снижение

материальных и временных затрат на определение бензодиазепинов и других психоактивных веществ в образцах различных типов.

## **В ы в о д ы**

1. Метод иммуноферментного анализа (экспресс-тесты) может использоваться в качестве предварительного для скринингового исследования наличия бензодиазепинов, их производных и метаболитов в биологических средах. Метод тонкослойной хроматографии, дающий возможность идентифицировать не только групповую принадлежность, но и определенное лекарственное вещество, может использоваться в качестве подтверждающего метода. Оба метода обладают высокой диагностической надежностью. Перспективным с точки зрения авторов является метод иммуноферментного анализа. Это направление анализа обеспечит снижение материальных и временных затрат на определение бензодиазепинов и других психоактивных веществ в образцах различных типов.

2. На протяжении последних 8 лет число отравлений бензодиазепинами остается на одном уровне и составляет 1,87-2,4% от общего количества отравлений, что связано со строгим учетом назначения и продажи этих препаратов. При этом, в зимний период преобладают отравления бензодиазепинами у женщин, а летом – у мужчин, что объясняется тем, что эти препараты назначаются при различной психиатрической патологии, при которой наблюдаются сезонные рецидивы.

## **Л И Т Е Р А Т У Р А**

1. Клиническая токсикология детей и подростков / под ред. Марковой И.В., Афанасьева В.В., Цыбулькина Э.К., Неженцева М.В. – СПб., 1998.
2. Элленхорн М. Дж. Медицинская токсикология. Диагностика и лечение отравления у человека. – М., 2003. – Т.1.
3. Постановление МЗ РБ от 28 мая 2003 г. № 26 «Об утверждении республиканского перечня наркотических средств, психотропных веществ и их прекурсоров, подлежащих государственному контролю в Республике Беларусь».
4. Recommended methods for testing benzodiazepine derivatives under international control / United Nations. – New York, 1988.
5. Токсикологическая химия / под ред. Плетеновой Т.В. – М., 2008.

6. Еремин С.К., Изотов Б.Н., Веселовская Н.В. Анализ наркотических средств. – М., 1993.
7. Борисевич С.Н. Методы лабораторной диагностики острых отравлений: учеб.-метод. пособие. – Минск, 2010.
8. Веселовская Н.В., Уфимцева Е.В., Белова М.В., Изотов Б.Н. // Вопросы наркологии. – 1994.- № 3.- С. 53-58.
9. Лошинин А.Н. Газохроматографический анализ производных 1,4-бензодиазепина в биологических жидкостях / Автореф. Дисс. к. фарм. н. – М., 1980.
10. Лисовик Ж.А. Газовая хроматография в клинической токсикологии // В сб.: Прикладная хроматография. – М., 1984. – С. 221-227.
11. Clarke E.G.C. Isolation and Identification of Drugs in Pharmaceutical, Body Fluids and Post-Mortem Material. – London, 1986.
12. Black D.A., Clark G.D., Haver V.M., Garbin G.A., Saxon A.G. // J. Anal. Toxicol. – 1994.- V. 18.- P. 185-188.
13. Orsulac P.V. / Akers, Barber Evaluation of the Bio-Rad Urine Benzodiazepines by REMEDI HS // In: 5<sup>th</sup> International Congress of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology. – Vancouver, Canada, 1997.
14. Камышников В.С. Клиническая лабораторная диагностика. – Минск, 2005.
15. Борисевич С.Н., Вергун О.М., Шмигельский А.А. // Здоровоохранение. – 2011. - № 4. – С. 52-55.

### **Р е з ю м е**

Цель настоящего исследования – оценка диагностической надежности методов обнаружения бензодиазепинов, характера отравлений и выявляемости острых отравлений бензодиазепинами по г. Минску за 2011г.

Обследована группа пациентов, поступивших с предварительным диагнозом «острое отравление бензодиазепинами» в Республиканский токсикологический центр по лечению острых отравлений химической этиологии психических больных Городской клинической больницы скорой медицинской помощи в течение 2011года. В основную группу вошли 1556

пациентов в возрасте от 18 до 60 лет. Биологическим материалом для лабораторных исследований явилась моча пациентов.

На протяжении последних 8 лет число отравлений бензодиазепинами остается на одном уровне и составляет 1,87-2,4% от общего количества отравлений, что связано со строгим учетом назначения и продажи этих препаратов. При этом в зимний период преобладают отравления бензодиазепинами у женщин, а летом – у мужчин, что объясняется тем, что эти препараты назначаются при различной психиатрической патологии, при которой наблюдаются сезонные рецидивы.

Используемые в настоящее время в химико-токсикологической службе нашей страны хроматографические методы анализа биоматериала на наличие бензодиазепинов являются чувствительными, специфичными и надежными, однако требующими процедуры пробоподготовки. Перспективным с нашей точки зрения является метод иммуноферментного анализа в качестве предварительного. Это направление анализа может обеспечить снижение временных затрат на определение бензодиазепинов и других психоактивных веществ в образцах различных типов.

## ***LABORATORY DIAGNOSIS OF ACUTE INTOXICATION WITH BENZODIAZEPINES***

***S.N.Borisevitch, O.M.Vergun, A.A.Shmigelsky***

*The group of patients admitted to the Republican Toxicological Center for Managing Acute Intoxications of Chemical Etiology in Psychic Patients of the City Clinical Hospital for Emergent Medical Assistance (Minsk) in 2011 with the primary diagnosis of acute intoxication with benzodiazepines was examined. The basic group enrolled 1556 patients aged 18 to 60. The patients urine samples served as the biological material. The diagnosis was confirmed in the immune ferment assay (preliminary method) and TLC as the confirming method in 71,7% cases. The method of the immune ferment assay the authors consider to be perspective. This technigue of identification can provide reduction of the material and time expenditures on the benzodiazepines.*

***Key words:*** *benzodiazepines, acute intoxications, the immune ferment assay.*

### **Адрес для корреспонденции:**

Борисевич Светлана Николаевна.

Белорусский государственный медицинский университет

220116, Минск, пр. Дзержинского, 83; сл. тел. (8-017) 272-62-79.