

*Prikaz bolesnika/
Case reports*

Correspondence to:

Dipl. biol. Gordana Brajković,
specijalista toksikološke hemije
Vojnomedicinska akademija, Centar za
kontrolu trovanja, Beograd
+381-11-3609481

e-mail: gocab@panet.rs

**ANALITIČKA POTVRDA
KRIMINOGENOG TROVANJA
KLOZAPINOM. Prikaz slučaja**

**ANALYTICAL CONFIRMATION
OF CRIMINAL CLOZAPINE POISONING.
Case reports**

Gordana Brajković, Dragana Rančić, Dragana Đorđević,
Vesna Kilibarda, Milica Zlatković i Nadežda Krstić

Vojnomedicinska akademija, Centar za kontrolu trovanja, Beograd

Ključne reči

Klozapin, N-desmetilklozapin; krimi-
nogeno trovanje; toksikološko-hemijska
analiza; tečna hromatografija; gasna hro-
matografija; imunohromatografski test.

Key words

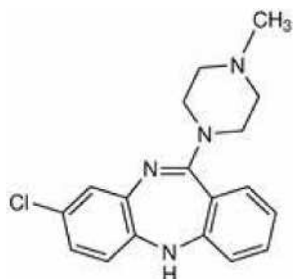
Clozapine; N-desmethylclozapine; crimi-
nal poisoning; toxicology-chemical analy-
sis; liquid chromatography; immunochro-
matographic test; gas chromatography.

Apstrakt

U radu je prikazan slučaj kriminogenog trovanja zbog pljačke muškarca starog 54 godine. Žrtvu je sapatnik u putničkom vozmu ponudio pićem u kojem su bili rastvoreni sedativi. Nekoliko sati kasnije, pacijent sa poremećajem stanja svesti, hospitalizovan je na Klinici za urgentnu toksikologiju, Centra za kontrolu trovanja, Vojnomedicinske akademi-
je. Uzorci krvi i urina poslani su na kompletnu toksikološku analizu, koja uključuje analizu alkohola u krvi metodom gasne hromatografije (GC-FID), analizu droga zloupotrebe u urinu imunohromatografskim testom, kao i analizu lekova metodom tečne hromatografije (HPLC-PDA). Klozapin je detektovan u uzorku krvi u koncentraciji 170 ng/mL. Koncentracija klozapina u urinu bila je 40 ng/mL, a N-dezmetilklozapina 370 ng/mL. Nije detektovano prisustvo drugih lekova, droga zloupotrebe i alkohola. Određivanje klozapina i njegovog metabolita dokazano je metodom HPLC-PDA, a primenjena metoda za klozapin i N-dezmetil klozapin je linearna u opsegu od 50-1000 ng/mL, sa koeficijentima korelacije $r > 0.99$. Limit kvantifikacije (LOQ) bio je za oba jedinjenja 50 ng/L. Prinos ekstrakcije za klozapin i N-dezmetil klozapin iz seruma je 89,5–99,2%. Uzrok trovanja bio je akutna intoksikacija klozapinom.

UVOD

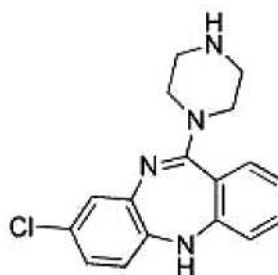
Klozapin je atipični neuroleptik iz grupe tricikličnih derivata dibenzodiazepina. Sintetisan je 60-ih godina prošlog veka i predstavlja prototip druge generacije antipsihotika sa dobrim antidepresivnim i antipsihotičnim dejstvom, a bez izazivanja ekstrapiramidnih nuspojava. Klozapin je poznat pod imenom „Clozaril“ i „Leponex“. Klozapin je žuta kristalna supstanca sa visokom tačkom topljenja 183-184°C. Nerastvoran je u vodi, a rastvorljiv u acetonu i hloroformu. Strukturne formule klozapina i N-desmetilklozapina prikazane su na slikama 1-2.(5)



Slika 1. Strukturna formula klozapina

C18H19ClN4
Molekulska masa-326,8
CAS-broj-5786-21-0

8-Hloro-11-(4-metil-
1-piperazinil)-5H-diben-
zo[b,e][1,4]diazepin



C17H17ClN4
Molekulska masa-312,798
CAS-broj-6104-71-8

8-Hloro-11-(1-piper-
azinil)-5H-
dibenzo[b,e][1,4]diazepin

Slika 2. Strukturna formula N-desmetilklozapina
(norklozapin)

Klozapin se prvenstveno upotrebljava za lečenje bolesnika koji ne reaguju ili ne podnose klasične neuroleptike. Nije predviđen za prvu liniju terapije naročito kod starih osoba. Terapija klozapinom je indikovana i u slučaju povećane suicidalnosti i agresije. Suzbija niz psihopatoloških fenomena kao psihomotorni nemir, agresivnost, anksioznost, afektivnu turbulenciju, produktivne psihotične fenomene kao halucinacije i sumanute misli. Klozapin ima širi spektar antipsihotičkog dejstva (deprimira pozitivne i negativne simptome) u odnosu na druge neuroleptike, izaziva mali broj ekstrapiramidnih neželjenih dejstava i bez dejstva je na oslobađanje prolaktina.

Efekti klozapina na CNS ispoljavaju se blokadom dopaminskih receptora čime se smanjuju simptomi šizofrenije koji nastaju usled povećane osjetljivosti ili povećanja broja dopaminskih receptora u limbičkom sistemu. Najvažnije dejstvo klozapina je dejstvo na D4 dopaminske receptore. Inače, klozapin je slab blokator dopaminskih receptora, pri čemu se više vezuje za D1 nego za D2 dopaminske receptore. Tipični antipsihotici imaju veliki afinitet za D2 receptore. Klozapin ima relativno nizak afinitet (oko 100 puta manji od haloperidola) za podtip D2 receptora, a ova razlika u afinitetu (tačnije brzu konstantu disocijacije koji ima za rezultat niži afinitet) je odgovorna za „atipičnost“ klozapina. Osim na dopaminske, klozapin deluje antagonistički na muskarinske acetilholinske, histaminske H1, serotoninse 5-HT1C i 5-HT2 i adrenergičke $\alpha 1$ i $\alpha 2$ receptore. (4)

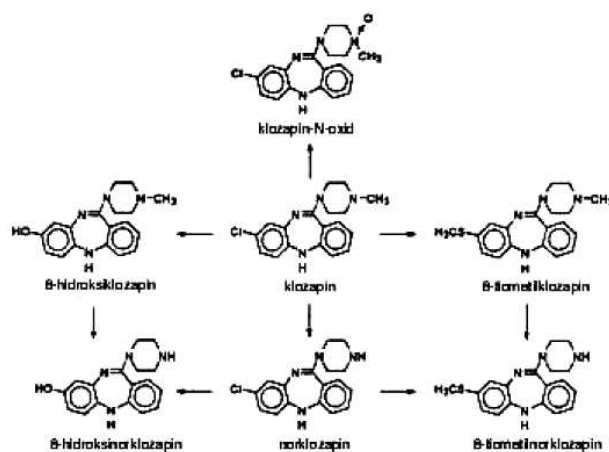
Neželjena dejstva: Antiholinergični efekti nastaju usled blokiranja aktivnosti neurotransmitera acetilholina. Najčešće to su suva usta, zamagljen vid, zatvor, vrtoglavica, gubitak kontrole mokrenja. Sedacija je najčešći neželjeni efekat antipsihotičnih lekova. Sedacija se u određenoj meri javlja kod svih antipsihotika, ali uobičajeno kod onih manje potentnih supstanci (ukoliko lek ima manju potentnost, veća koncentracija i doza je neophodna za smanjenje simptoma). Ovo neželjeno dejstvo može biti korisno kod agitiranih pacijenata, ali može biti problematično ukoliko dovodi do dnevne pospanosti. Snižavanjem dnevne doze ili davanjem celokupne doze uveče, ili uvođenjem leka koji je manje sedativan, može biti od pomoći u ovakvim situacijama. Sedacija je izraženija na početku terapije; većina ljudi razviju jedan stepen tolerancije kako nastavljaju da koriste lek. Retko izaziva tardivnu diskineziju i maligni neuroleptički sindrom, ali su mu karakteristična neželjena dejstva agranulocitoza i dozno-zavisne konvulzije. (2,3)

Inicijalna doza kod šizofrenije je 12,5 mg jednom ili dvaput dnevno, sa postepenim povećanjem od 200-400 mg dnevno. Maksimalna dnevna doza je 900 mg. Toksične koncentracije klozapina u krvi su od 0,6-1,0 mg/L. (5)

Klozapin se apsorbira 60-70% zbog metabolizma prvog prolaza. Maksimalna koncentracija u krvi od oralnog doziranja postiže se nakon 1-4 h. Brzo se distribuira i prelazi krvno-moždanu barijeru i u majčino mleko. Vezan je 95% za proteine plazme. Poluživot u plazmi je od 6-17 h. (1) Metabolizuje se u jetri preko sistema citohrom P450 izoenzima gde je primarni CYP1A2, ali važnu ulogu imaju i CYP2C19, 2D6, 2E1, 3A4, N-demetilacijom, N-oksidacijom, tiometil konjugacijom i oksidacijom hlora. Samo desmetil metabolit (norklozapin) je farmakološki aktivan oblik. Ekskretuje se oko 50% urinom, a 30% fecesom. Eritromicin, ciprofloksacin, risperidon i kofein utiču na povećanje koncentracije klozapina u krvi tako što inhibiraju CYP3A4, CYP1A2, CYP2D6. Jedinjenja koja povećavaju aktivnost CYP (karbamazepin, duvan) smanjuju koncentraciju klozapina u krvi. (5)

Materijal i metode

Uzorci krvi i urina uzeti su od pacijenta S.O. Hloroform, amonijak, acetonitril i metanol (HPLC čistoće) nabavljeni su od firme Merck, Nemačka. Reagensi mobilne faze natrijum dihidrogen fosfat i standardi klozapina i N-desmetilklozapina koji su korišćeni za analizu dobijeni su od Sigma-Aldrich. Klozapin je određen tehnikom tečne hromatografije u sprezi sa PDA detektorom i bibliotekom UV spektara. Hromatografski uslovi za HPLC-PDA: Mobilna faza: acetonitril : natrijum dihidrogen fosfat 50 mM, pH 3,6 doteran sa H3PO4 (20%). Mobilna faza je filtrirana i degazirana preko membranskog filtra; kolona Symmetry® C8 4,6x250 mm Waters sa pretkolonom



Slika 3. Klozapin i metaboliti klozapina

Sentry Guard Symmetry® C18, temperatura kolone: 30°C, brzina protoka mobilne faze: 1-1,5 mL/min gradijent; PDA detektor: $\lambda = 254,0$ nm; retenciono vreme za klozapin: $R_t=13,711$ min, a retenciono vreme za N-desmetilklozapin: $R_t=13,253$ min.

Izolovanje klozapina rađeno je na Oasis® HLB ketridžima zapremine 3 mL, čija je veličina pora 30 im, metodom čvrstofazne ekstrakcije. Nakon centrifugiranja uzorak seruma je ekstrahovan. Kolona HLB ketridža je kondicionirana sa 1 mL metanola, a potom uravnotežena sa 1 mL vode. Posle aktivacije na kolonu je nanet uzorak seruma i propušten uz protok 2 mL/min. Kolona je isprana sa 1 mL 5% metanola. Eluiranje je vršeno 1 mL metanola i nakon toga uzorak je hromatografisan.

Rezultati

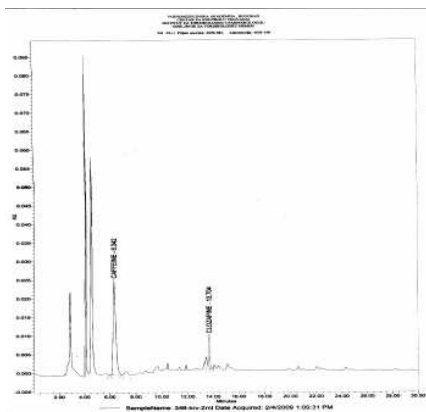
Dostavljeni su uzorci krvi i urina pacijenta O.S. sa zahtevom da se izvrši analiza na prisustvo alkohola i sredstava zloupotrebe, kao i toksikološki skrining. Toksikološko-hemijskom analizom primenom tečne hromatografije (HPLC) sa PDA detektorom i poređenjem retencionih vremena i UV spektara sa UV bibliotekom u uzorku krvi koji je dostavljen dokazano je prisustvo klozapina u koncentraciji od 170 ng/mL i prisustvo kofeina 2711 ng/mL, čiji su UV spektri potvrđeni. U uzorku urina, koji je dostavljen u večernjim satima, dokazano je prisustvo N-desmetilklozapina u koncentraciji od 370 ng/mL, klozapina 40 ng/mL, kofeina i furosemda. Toksikološko-hemijskom analizom primenom gasne hromatografije sa plameno jonizacionim detektorom (FID) – “head space” tehnika, u uzorku krvi nije dokazano prisustvo alkohola. Toksikološko-hemijskom analizom primenom imunohromatografskog testa – test traka u uzorku urina nije dokazano prisustvo ukupnih opijata, morfinske strukture, kanabinoida, kokaina, metamfetamina i ukupnih benzodiazepina.

Uvedena je metoda HPLC/PDA za dokazivanje i određivanje klozapina i njegovog metabolita N-desmetilklozapina u biološkom materijalu.

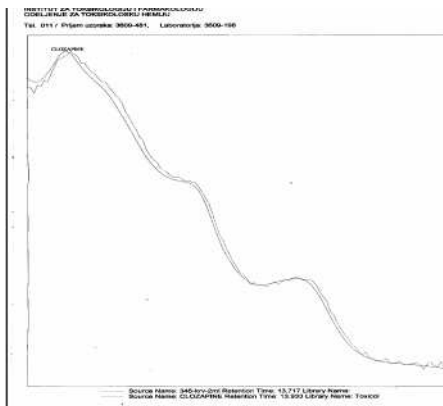
Na slikama 4, 5 i 6 prikazani su hromatogrami i UV spektri klozapina u uzorku seruma i urina koji se poklapaju sa UV spektrima iz biblioteke spektara.

Metoda je validovana i linearna u rasponu 50-1000 ng/mL ($r^2 > 0,99$). Granica detekcije je 25 ng/mL, a limit kvantifikacije je 50 ng/L sa prinosom za klozapin i N-desmetilklozapin od 89,5 – 99,2%. Korišćenjem veće zapremine uzorka od 5 mL možemo postići LOD i LOQ 5 i 10 ng/mL.

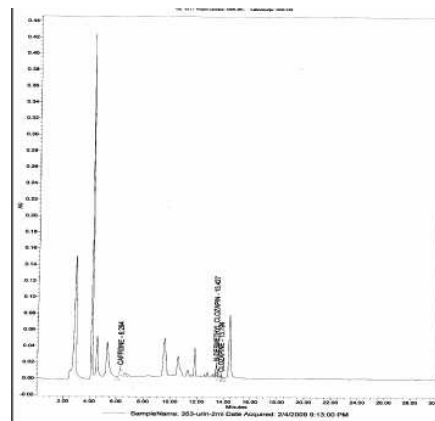
Na slikama 7-8 prikazani su UV hromatogrami i UV spektri standarda klozapina i N-desmetilklozapina koji se poklapaju sa UV spektrima iz biblioteke spektara.



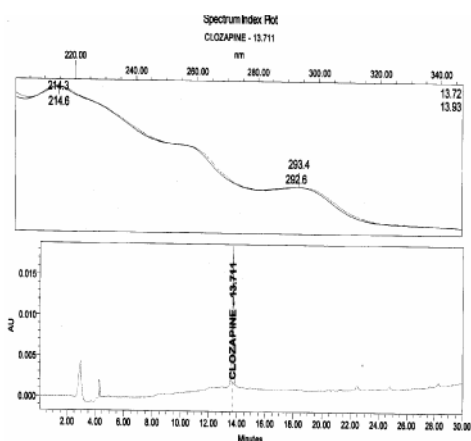
Slika 4. HPCL hromatogram klozapina



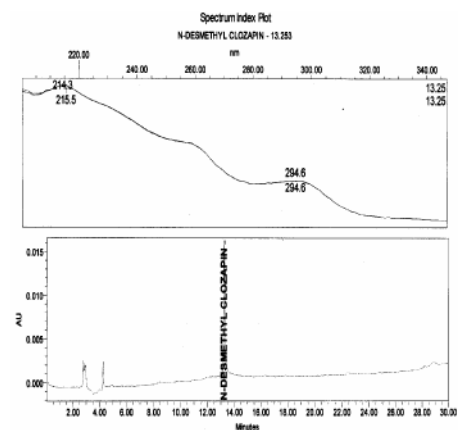
Slika 5. UV spektar klozapina iz uzorka krvi i iz biblioteke



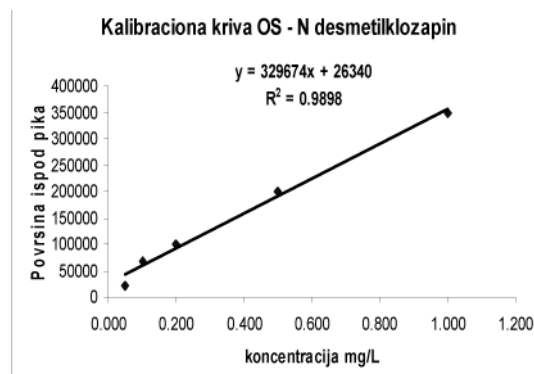
Slika 6. HPLC hromatogram klozapina i desmetilklozapina iz uzorka urina



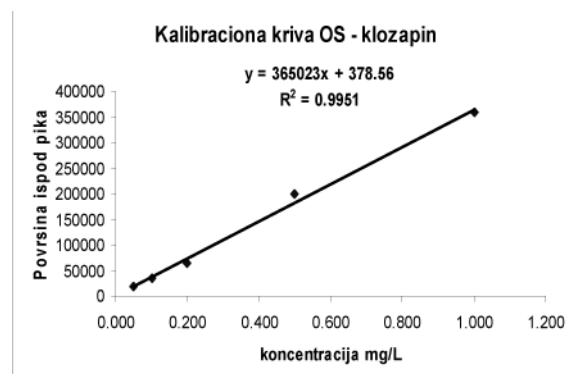
Slika 7. HPCL hromatogram i UV spektar klozapina



Slika 8. HPCL hromatogram i UV spektar N-desmetilklozapina



Slika 9. Kalibraciona kriva i regresiona jednačina za opterećeni serum standardnim rastvorima N-desmetilklozapina



Slika 10. Kalibraciona kriva i regresiona jednačina za opterećeni serum standardnim standardnim rastvorima klozapina

Kalibracione krive za klozapin i N-desmetilklozapin su konstruisane metodom najmanjih kvadrata, sa srednjim vrednostima površine pikova za svaku koncentraciju, korišćenjem programa Excel 5. Istim programom su izračunati koeficijenti korelacije (r) i jednačina prave $y = a \pm bx$.

Na slikama 9-10 prikazane su kalibracione krive za klozapin i N-desmetilklozapin na HPLC-u.

Prikaz slučaja trovanja klozapinom

Pacijent S.O. životne dobi 54 godine, dovežen je u prepodevnim satima u toksikološku ambulantu pospan, bradipsihičan, dizartričan, miotičnih zenica, TA 120/80 mmHg, frekvence oko 100/min, urednog ostalog fizikalnog nalaza. Dao je podatak da je tog jutra doputovao vozom iz Beča, kao i da je tokom puta

bio izrazito malaksao, pospan, uz kočenje vilice i trnjenje jezika, a sve to nakon što je popio kafu i sok, koji mu je dao nepoznati saputnik u kupeu. Nije mogao u potpunosti da rekonstruiše navedene događaje. Pregledan je u ambulanti železničke stanice, odakle je upućen u našu ustanovu.

Tokom opservacije registrovano je pogoršanje stanja svesti pacijenta do nivoa izrazite pospanosti, uz konfuznost, dezorijentisanost, nepovezan govor, povremene halucinacije, ataksiju. Pregledan je od strane neurologa, učinjen MSCT glave, osnovne laboratorijske analize krvi (nalazi uredni) u cilju isključivanja neuroloških i metaboličkih uzroka ovakvog stanja. Toksikološkim analizama krvi dokazano je prisustvo klozapina u koncentraciji 170 ng/mL i kofeina 2711 ng/mL. U krvi nije bilo etil, niti metil alkohola. Analizom urina dokazano je prisustvo N-desmetilklozapina 370 ng/mL, klozapina 40

ng/mL, prisustvo kofeina i furosemda (terapija).

Na osnovu anamneze, kliničke slike i učinjenih ispitivanja, zaključeno je da se u pacijenta radilo o akutnom kriminogenom trovanju lekom (klozapin), koje se manifestovalo poremećajem svesti do nivoa izrazite somnolencije, uz bradipsihičnost, dizatriju, konfuznost, povremene halucinacije, miozu zenica, graničnu tahikardiju, te izrazitu nestabilnost pri hodu, odnosno ataksiju.

Pacijent je izlečen otpušten drugog dana iz Klinike za urgentnu toksikologiju, VMA.

Diskusija

U navedenom slučaju kriminogenog trovanja toksikološko-hemijskom analizom krvi dokazano je prisustvo klozapina u koncentraciji od 170 ng/mL i prisustvo kofeina u koncentraciji od 2711 ng/mL. Metabolit klozapina nije dokazan verovatno zbog kratkog proteklog vremena od konzumiranja leka do vađenja krvi i farmakokinetičkih karakteristika klozapina, tj. poluživota nakon pojedinačne doze od je 6-17 h. Prisustvo kofeina takođe usporava metabolizam klozapina.⁽⁹⁾ U uzorku urina nakon 8 h od vađenja krvi dokazano je prisustvo klozapina u koncentraciji 370 ng/mL i prisustvo metabolita klozapina.

Primena tehnike tečne hromatografije sa PDA detekcijom je od velikog značaja za praćenje terapijskih i toksičnih koncentracija klozapina i njegovog aktivnog metabolita N-desmetilk-

lozapina u urgentnim i sudsko-medicinskim analizama. Metoda čvrsto-tečne ekstrakcije je brza i jednostavna za pripremu uzorka a ujedno efikasna, ekonomična i laka za rad. Metoda je validovana i linearna u rasponu 50-1000 ng/mL ($r^2 > 0,99$). Granica detekcije je 25 ng/mL, a limit kvantifikacije je 50 ng/L sa prinosom od 89,5–99,2%. Korišćenjem veće zapremine uzorka možemo postići niži LOD i LOQ.

U radovima je prikazana priprema uzoraka za detekciju i kvantifikaciju klozapina i njegova dva metabolita N-desmetilklozapina i N-oksid-klozapina SPE ekstrakcijom uz primenu tečne hromatografije sa PDA i MS detekcijom gde su prinos ekstatkije, granica kvantifikacije i linearnost za klozapin i N-desmetilklozapin bili vrlo slični našim vrednostima. (6,7,8,10)

Zaključak

Određivanje koncentracije klozapina i desmetilklozapina u uzorcima je značajno u urgentnoj toksikologiji zbog trovanja koja su česta, ali i zbog praćenja terapijskih koncentracija u krvi. Postupak pripreme je jednostavan, a detekcija na HPLC-PDA precizna i specifična. Ova tehnika je razvijena za screening toksikološki značajnih jedinjenja u biološkom materijalu. Zahvaljujući biblioteci spektara koju poseduje, primenjuje se kao screening tehnika za istovremenu identifikaciju velikog broja toksikološki značajnih jedinjenja.

Abstract

This report presents a case of criminal poisoning involved in the robbery of a 54-year-old man. The aforementioned victim was offered a drink by a fellow traveller on a passenger train. The drink contained a dissolved sedative. The victim had no medical history of disease. Several hours later, the severely disoriented subject was hospitalized at the Clinical for Toxicology, Poison Control Centre, Military Medical Academy in Belgrade. Blood and urine were submitted for a full toxicological analysis, including an alcohol analysis by headspace gas chromatography with flame ionization detection (GC-FID); a drugs of abuse screen using an immunochromatographic test; and a drug screen using liquid chromatography-photodiode array detection (HPLC-PDA). Clozapine was identified in the victim's blood at 170 ng/mL, respectively. Concentration of clozapin in urine was 40 ng/mL, and concentration of N-desmethyclozapin was 370 ng/mL. No other drugs and alcohol were detected. The determination of clozapine in the biological sample was achieved by the HPLC-PDA method. The applied method for clozapine and N-desmethylclozapine was linear in the range of 50-1000 ng/mL with the correlation coefficient $r > 0,99$, for booth. The limit of quantification (LOQ) was 50 ng/L. Recovery of the extraction of clozapine and for N-desmethylclozapin from serum was 89,5 –99,2%. The cause of poisoning was attributed to acute clozapine intoxication.

LITERATURA

- Ackenheil, M. (1989) Clozapine: Pharmacokinetic investigations and biochemical effects in man. *Psychopharmacology (Berl)*, 99 Suppl: S32-7
- Amsler, H.A., Teerenhovi, L., Barth, E., Harjula, K., Vuopio, P. (1977) Agranulocytosis in patients treated with clozapine. A study of the Finnish epidemic. *Acta Psychiatr Scand*, 56(4): 241-8
- Battegay, R., Cotar, B., Fleischhauer, J., Rauchfleisch, U. (1977) Results and side effects of treatment with clozapine (leponex R). *Compr Psychiatry*, 18(5): 423-8
- Boyson, S.J., McGonigle, P., Luthin, G.R., Wolfe, B.B., Molinoff, P.B. (1988) Effects of chronic administration of neuroleptic and anticholinergic agents on densities of D2 dopamine and muscarinic cholinergic receptors in rat striatum. *J Pharmacol Exp Ther*, 244(3): 987-93
- Clarke's Analysis of Drugs and Poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material. 3 Edition, 2004. London, Pharmaceutical press 848-849.
- Mercolini L, Bugamelli F, Kenndler E, Boncompagni G, Franchini L, Raggi MA: Simultaneous determination of the antipsychotic drugs levomepromazine and clozapine and their main metabolites in human plasma by a HPLC-UV method with solid-phase extraction. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2007 Feb 1;846(1-2):273-80. Epub 2006 Oct 12.
- Niederländer HA, Koster EH, Hillhorst MJ, Metting HJ, Eilders M, Ooms B, de Jong GJ: High throughput therapeutic drug monitoring of clozapine and metabolites in serum by on-line coupling of solid phase extraction with liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2006 Apr 13;834(1-2):98-107. Epub 2006 Mar 9.
- Rao LV, Snyder ML, Vallaro GM: Rapid liquid chromatography/tandem mass spectrometer (LCMS) method for clozapine and its metabolite N-desmethyl clozapine(norclozapine) in human serum. *J Clin Lab Anal*. 2009;23(6):394-8.
- Raaska K, Raitasuo V, Laitila J, Neuvonen PJ: Effect of caffeine-containing versus decaffeinated coffee on serum clozapine concentration in hospitalized patients. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2004; 94: 13-8.
- Titier K, Bouchet S, PÂ©hourcq F, Moore N, Molimard M: High-performance liquid chromatographic method with diode array detection to identify and quantify atypical antipsychotics and haloperidol in plasma after overdose. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2003 May 5;788(1):179-85.