

DIAZEPAM E NORDIAZEPAM EM PLASMA: MÉTODOS DE EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO E EM FASE SÓLIDA NO PRÉ-TRATAMENTO DE AMOSTRAS PARA ANÁLISE CROMATOGRÁFICA EM FASE LÍQUIDA

Ellen Figueiredo Freire, Juniella Luiza Miranda, Patrícia Penido Maia, Elisabeth Pizzamiglio Vieira, Keyller Bastos Borges e Maria Elisa Pereira Bastos de Siqueira*

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas, Centro Universitário Federal, Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714, 37130-000 Alfenas - MG

Recebido em 16/4/04; aceito em 10/1/05; publicado na web em 13/4/05

DIAZEPAM AND NORDIAZEPAM IN PLASMA: LIQUID-LIQUID AND SOLID PHASE EXTRACTION IN SAMPLE PRE-TREATMENT FOR HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY ANALYSIS. Analysis of diazepam (DZP) and its active metabolite nordiazepam (NDZP) in plasma is commonly performed in clinical medicine to ensure proper therapeutic effects while minimizing the incidence of toxicity. This study aimed to optimize analytical parameters and compare two pre-treatment techniques, liquid-liquid (LLE) and solid phase extraction (SPE), as well as liquid chromatographic conditions to analyze simultaneously DZP and NDZP in plasma from 20 patients treated with a daily dose of 10 mg. Both techniques showed to be well in line with the international criteria for analytical validation, which permitted to quantify DZP (66.2 – 1148.6 ng mL⁻¹) and NDZP (138.5 - 808.6 ng mL⁻¹) in all samples. The correlation coefficients between SPE and LLE were respectively 0.9729 for DZP and 0.9643 for NDZP.

Keywords: diazepam; nordiazepam; plasma extraction.

INTRODUÇÃO

O diazepam (DZP), assim como os demais benzodiazepínicos, possui propriedades hipnótica, tranqüilizante, antidepressiva, sedativa e relaxante muscular¹. É um fármaco largamente utilizado para aliviar tensão, ansiedade, espasmos musculares e controlar estados epiléticos². Esse fármaco é biotransformado principalmente ao nível hepático por enzimas do sistema microssômico do citocromo P450, CYP2C e CYP3A, sendo três os metabólitos biologicamente ativos: nordiazepam (NDZP), temazepam e oxazepam^{3,4}.

A determinação de fármacos em fluidos biológicos deve ser realizada para atender às necessidades clínicas e toxicológicas, sendo de grande importância no diagnóstico de intoxicações acidentais ou intencionais, em toxicologia forense para esclarecimento da *causa mortis* e na monitorização de pacientes em uso prolongado do medicamento^{5,6}. O estabelecimento do melhor regime terapêutico e estudos farmacocinéticos só podem ser realizados se métodos de análise adequados⁷⁻⁹ estiverem disponíveis.

Os níveis plasmáticos de diazepam, assim como seu metabólito nordiazepam, são encontrados em concentrações da ordem de ng mL⁻¹, o que requer métodos com baixos limites de quantificação¹⁰. Ainda não está estabelecido um intervalo terapêutico para este fármaco que possa ser utilizado para a maioria dos pacientes. Entretanto, valores entre 300 e 400 ng mL⁻¹ de plasma foram relatados por Baldessarini⁷, para o uso do DZP como ansiolítico. Hillestad *et al.*⁸ observaram níveis superiores a 400 ng mL⁻¹, em pacientes que ingeriam doses diárias de 10 mg do fármaco.

Vários processos analíticos têm sido desenvolvidos para a quantificação de benzodiazepínicos em matrizes biológicas. Os métodos mais comuns são a cromatografia gasosa (CG)¹¹ com detector de captura de elétrons e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector de UV¹². Esse último método apre-

senta a vantagem de não necessitar de prévia volatilização ou derivatização do analito¹²⁻¹⁵.

Qualquer que seja a técnica de identificação, as amostras biológicas precisam passar por pré-tratamentos que visam a remoção de interferentes da matriz e a extração e concentração dos analitos de interesse. Este trabalho objetivou a otimização das condições e a comparação das técnicas de extração líquido-líquido (ELL) e em fase sólida (SPE) e a identificação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para análise simultânea de DZP e NDZP em plasma de pacientes em uso do fármaco.

PARTE EXPERIMENTAL

Amostragem

Para estudos de otimização e validação analítica, utilizou-se “pool” de plasma de não usuários do fármaco (branco) fortificado com padrões de diazepam, nordiazepam e padrão interno (nitrazepam ou flunitrazepam, dependendo da técnica utilizada). A população de estudo foi constituída de 20 pacientes em tratamento com 10 mg dia⁻¹ de diazepam há pelo menos 30 dias. Todos responderam a um questionário com perguntas sobre características e hábitos pessoais, assim como outros fármacos ingeridos na última semana. O sangue foi coletado em sistema de coleta à vácuo, heparinizado, imediatamente antes da ingestão da próxima dose (estado de equilíbrio dinâmico), sendo o plasma separado até 1 h após a coleta e conservado sob refrigeração a 4 °C por, no máximo, 3 dias antes da análise. Os voluntários foram informados do objetivo do trabalho e assinaram o termo de consentimento de participação aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Efoa/Ceufe.

Soluções-padrão

As soluções-padrão de diazepam e nordiazepam (Sigma®, min. 98%) foram preparadas pela dissolução de cada fármaco em metanol (EM Science®, grau HPLC) para obter a concentração de 1mg mL⁻¹.

*e-mail: marelisa@int.fofa.br

A partir destas, preparou-se soluções de trabalho através de diluições sucessivas para resultar nas seguintes concentrações finais, em plasma 50, 100, 200, 300, 500, 600, 800, 900 e 1200 ng mL⁻¹. Desta mesma maneira também foram preparadas soluções-padrão de outros dois benzodiazepínicos, nitrazepam e flunitrazepam (Sigma®, min. 98%), para serem usadas como padrões internos, na concentração de 100 µg mL⁻¹ de plasma.

Análise cromatográfica

Para quantificar os analitos foi utilizado o cromatógrafo a líquido Shimadzu série LC-10 com injetor automático, equipado com coluna de fase reversa C18 (15 cm x 4,6 mm ID x 5 µm de partícula), pré coluna C18 (4 cm x 4,6 mm ID x 5 µm de partícula) e detector de UV com leitura em 228 nm. A fase móvel consistiu de KH₂PO₄ (Vetec®) 0,01 mol L⁻¹, pH 3,5; acetonitrila (EM Science®) (69:31, v/v), vazão de 1,5 mL min⁻¹, temperatura do forno de 35 °C e volume de injeção de 50 µL.

Técnica de extração líquido-líquido

Após estudos da composição do solvente e pH de maior rendimento na extração, a seguinte técnica é proposta: em um tubo de ensaio, colocar 0,5 mL de plasma, 10 µL de nitrazepam 100 µg mL⁻¹ (padrão interno), 2 mL de solução de fosfato de sódio dibásico pH 9,0 e 5 mL de n-hexano: etanol (90:10, v/v). A seguir, agitar em agitador tipo vórtex por 3 min e centrifugar por 5 min a 715 g. Em um béquer com fundo cônico, colocar 3 mL da fase orgânica e evaporá-la até a secura em banho de água a 60 °C, sob fluxo de nitrogênio. Ressusender o resíduo em 400 µL de fase móvel e injetar 50 µL no CLAE.

Técnica de extração em fase sólida

Primeiramente foram realizados alguns testes para a otimização das condições de condicionamento, lavagem e eluição dos analitos dos cartuchos de SPE (soluções, solventes e vazões).

Estando essas condições definidas, a técnica proposta é: com vazão de 2 mL min⁻¹, condicionar o cartucho SPE C18 com 2 mL de metanol e 1 mL de água milli-Q. A seguir, passar a amostra diluída - 0,5 mL de plasma, 10 µL de flunitrazepam 100 µg mL⁻¹ (padrão interno) e 3 mL de tampão borato alcalino 0,1 mol L⁻¹, pH 9,0. Lavar o cartucho com 3 mL do mesmo tampão, 4 mL de água milli-Q e 1 mL de acetonitrila 5% (v/v). Após secar a coluna, eluir os analitos com 3 mL de n-hexano:metanol (90:10, v/v). Recolher 2 mL da fase orgânica, evaporá-la, sob nitrogênio, a 40 °C e reconstituir o resíduo com 400 µL de fase móvel. Injetar 50 µL no CLAE.

Parâmetros de validação

Para o estudo da linearidade, amostras de "pool" de plasma branco foram fortificadas com quantidades conhecidas de diazepam, nordiazepam e padrão interno, para se obter concentrações entre 50 e 1200 ng mL⁻¹ (6 replicatas/concentração). Para construção da curva, usou-se a área relativa média de cada concentração (área do pico do DZP e do NDZP pela área do padrão interno). O limite de quantificação (LOQ) foi definido como a menor quantidade dos analitos nas amostras com precisão aceitável, isto é, com coeficiente de variação menor que 10%¹⁶.

Para determinar a precisão intra-ensaio foram analisadas amostras de plasma branco fortificadas com concentrações de diazepam e nordiazepam de 100, 300 e 600 ng mL⁻¹ para ELL e de 200, 500 e

800 ng mL⁻¹ para SPE. Para cada concentração foram analisadas 5 replicatas. Amostras de plasma branco fortificadas com 100, 300, 600 ng mL⁻¹ de diazepam e de nordiazepam, além de 900 ng mL⁻¹ para ELL e de 800 ng mL⁻¹ para SPE, em quintuplicata, foram submetidas aos métodos de extração para o cálculo da recuperação relativa.

RESULTADOS

A Figura 1 mostra dois cromatogramas CLAE para amostra do "pool" de plasma branco, extraída por ELL e por SPE, o que denota a ausência de compostos interferentes da matriz na região de interesse por ambas as técnicas. A Figura 2 mostra dois cromatogramas de amostra de um paciente que ingeria 10 mg dia⁻¹, adicionada com os respectivos padrões internos, após ELL e SPE. Para ELL, o padrão interno que apresentou melhor resposta foi o nitrazepam e para SPE, o flunitrazepam.

A faixa de linearidade estudada para ambos os métodos foi de 50 a 1200 ng mL⁻¹ e as curvas analíticas para o diazepam resultaram nas equações da reta (coeficiente de correlação) de $y = 0,009x - 0,28$ ($r = 0,9970$) para a ELL e $y = 0,0011x - 0,0335$ ($r = 0,9978$) para SPE. Para o nordiazepam foram de $y = 0,0092x - 0,6678$ ($r = 0,9910$) para ELL e de $y = 0,0008x - 0,0838$ ($r = 0,9875$) para SPE.

O limite de quantificação (LOQ) foi estabelecido em 50 ng de diazepam por mL de plasma, em ambas as técnicas.

A Tabela 1 apresenta os coeficientes de variação intra-ensaio (% CV) encontrados nos estudos de repetibilidade do método de ELL e SPE, para ambos os analitos estudados. A recuperação relativa média foi de 95,7% para DZP e de 97,7% para NDZP em ELL e de 94,2% para DZP e de 91,4% para NDZP em SPE (Tabela 2).

Usando-se a ELL, os teores plasmáticos de DZP variaram entre 66,2 e 730,0 ng mL⁻¹ (mediana = 255,5; média = 293,8, desvio

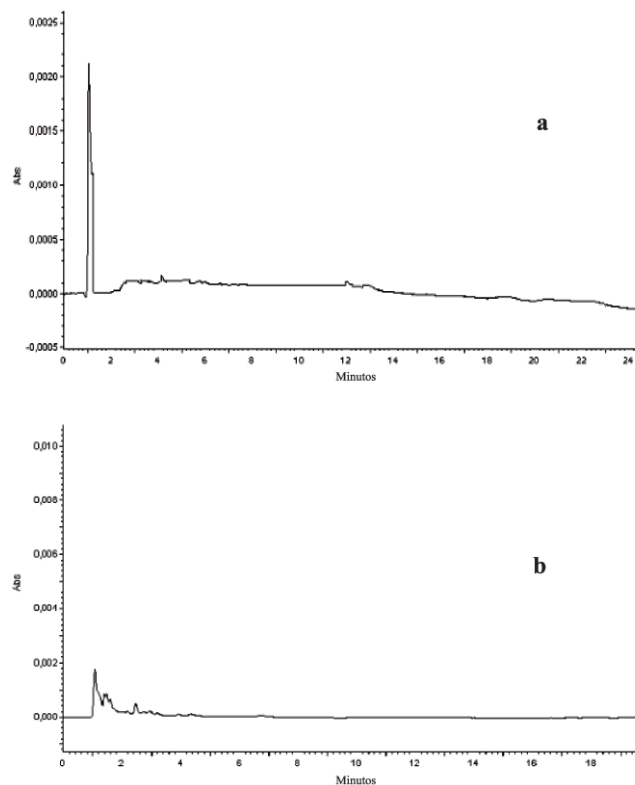


Figura 1. Cromatogramas de amostra de plasma branco extraída por ELL (a) e por SPE (b)

padrão = 184,9) e os do nordiazepam entre 138,5 e 951,3 ng mL⁻¹ (mediana = 377,4; média = 460,5, desvio padrão = 221,8).

Após extração por SPE, as concentrações plasmáticas ficaram entre 118,3 e 934,2 ng mL⁻¹ (mediana = 284,4; média = 396,4, desvio padrão = 298,1) para o DZP e entre 215,1 e 830,3 ng mL⁻¹ (mediana

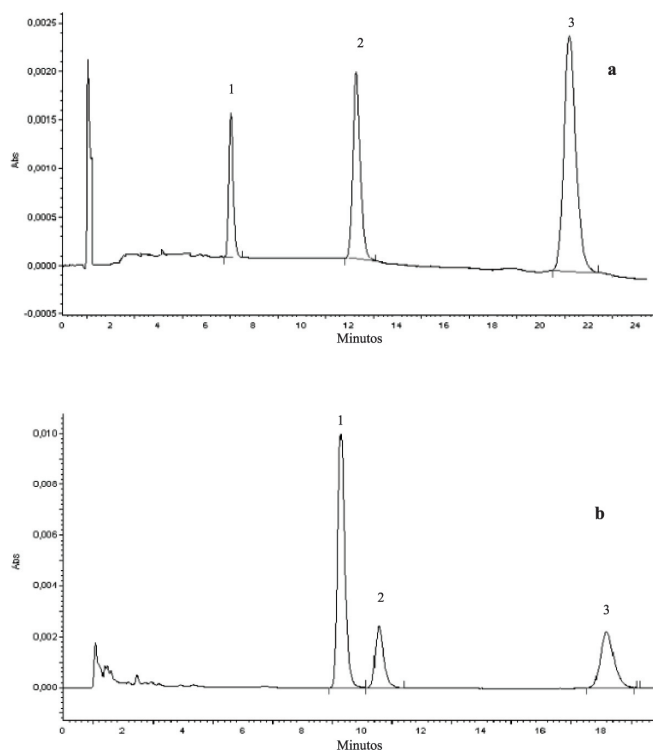


Figura 2. Cromatogramas de amostra de plasma de paciente extraído por (a) ELL e (b) por SPE (302,9 ng mL⁻¹ de diazepam e 356,0 ng mL⁻¹ de nordiazepam): (a) 1 - nitrazepam, 2 - nordiazepam e 3 - diazepam; (b) 1 - flunitrazepam, 2 - nordiazepam e 3 - diazepam

Tabela 1. Coeficientes de variação dos estudos de repetibilidade dos dois métodos de extração: líquido-líquido (ELL) e em fase sólida (SPE)

| Concentração (ng mL ⁻¹) | Coeficiente de variação (%) (n = 5) | | | |
|--|-------------------------------------|------|---------------|------|
| | Diazepam | | N-nordiazepam | |
| | ELL | SPE | ELL | SPE |
| 100 | 2,38 | | 2,87 | |
| 200 | | 8,95 | | 1,40 |
| 300 | 1,50 | | 2,78 | |
| 500 | | 8,82 | | 3,51 |
| 600 | 2,34 | | 1,27 | |
| 800 | | 5,08 | | 3,36 |

Tabela 2. Recuperação relativa (valores médios) dos métodos de extração: líquido-líquido (ELL) e em fase sólida (SPE)

| Concentração (ng mL ⁻¹) | Recuperação (%) (n = 5) | | | |
|--|-------------------------|------|---------------|------|
| | Diazepam | | N-nordiazepam | |
| | ELL | SPE | ELL | SPE |
| 100 | 90,2 | 92,7 | 93,4 | 87,2 |
| 300 | 96,9 | 91,9 | 96,8 | 91,5 |
| 600 | 94,5 | 92,9 | 98,4 | 90,2 |
| 800 | | 99,1 | | 96,6 |
| 900 | 101,1 | | 102,1 | |

= 376,5; média = 455,0, desvio padrão = 166,8) para o NDZP.

A Figura 3 denota a correlação dos resultados de diazepam e nordiazepam em plasma de pacientes, obtidos pelas duas técnicas de pré-tratamento das amostras.

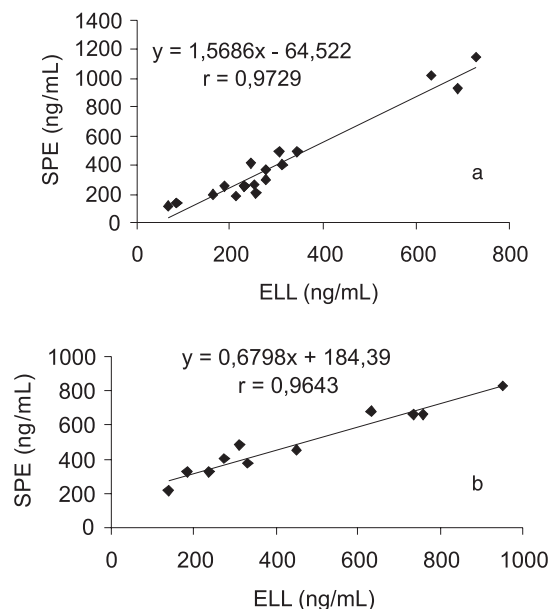


Figura 3. Correlação de resultados de (a) diazepam e (b) nordiazepam em plasma de pacientes sob tratamento com o fármaco pelas técnicas de extração líquido-líquido (ELL) e em fase sólida (SPE)

DISCUSSÃO

Para a otimização da extração por fase sólida, avaliou-se diferentes tipos de cartuchos C18. As colunas C18 normalmente são industrializadas com 200 ou 500 mg de fase sólida e a escolha depende do volume e complexidade da amostra, assim como dos teores dos analitos a serem retidos. Pelos testes realizados com plasma e concentrações dos analitos no intervalo terapêutico, o uso da SPE C18 500 mg forneceu resultados melhores em relação à de 200 mg, sendo então a escolhida para a análise.

Também foram observadas variações na velocidade de eluição e recuperação ao se usar cartuchos de diferentes procedências. Por este motivo, procurou-se usar durante a otimização da técnica cartuchos de mesma marca. Mesmo assim, foram observadas variações nas vazões dos solventes usados no sistema a vácuo de extração, tendo sido necessário fazer ajustes na pressão para possibilitar vazões mais constantes. Os cartuchos de SPE são normalmente de polipropileno, podendo adsorver o analito na parede e aumentar a interferência na análise¹⁷.

Na otimização da técnica de extração em fase sólida faz-se necessário escolher as condições de condicionamento, lavagem e eluição de analitos de acordo com o tipo de fase usada. A fase octadecila ligada ao silanol (Si-C₁₈H₃₇) permite a interação com fármacos mais apolares, entre os grupos CH_n do adsorvente e do analito (van der Waals). Consequentemente, a retenção do DZP pode ter sido mais eficaz que seu metabólito, mais polar, o NDZP. O pré-condicionamento das colunas com MeOH/H₂O (polar) facilita a ligação de compostos apolares às cadeias adsorventes, enquanto o solvente menos polar (n-hexano/MeOH) usado na eluição dos analitos é capaz de desfazer a interação apolar. O tempo necessário para a cromatografia de todos os analitos dos extratos de plasma foi de 20 min/amostra, após otimização da vazão e tipo da fase

móvel, assim como da melhor temperatura (35 °C) de manutenção da coluna cromatográfica.

Vários são os solventes indicados na literatura para ELL de DZP do plasma, como clorofórmio⁴, éter etílico¹⁸, n-hexano: diclorometano¹⁹, acetato de etila²⁰. Entretanto, para possibilitar a extração simultânea de DZP e seu metabólito ativo (NDZP), que apresenta características químicas diferentes do DZP, foi necessário modificar o solvente por adição ao n-hexano (apolar) de metanol (mais polar), o que possibilitou boa recuperação de ambos os analitos. A adição de solução de fosfato dibásico, pH=9,0, também é necessária para melhorar a extração dos analitos, bases fracas, de amostra de plasma¹⁷.

Neste trabalho, notou-se valores significativamente mais elevados (teste t Student, $p \leq 0,05$) de DZP após extração por SPE em relação à extração por ELL, não sendo a diferença significativa para o nordiazepam. Provavelmente, as diferentes afinidades dos dois analitos pelo sistema solvente e pH usados na ELL e na eluição por SPE levam a seus comportamentos diversos. Entretanto, é muito importante otimizar a técnica para extração, identificação e quantificação simultânea de DZP e NDZP numa mesma amostra, e numa única corrida cromatográfica, quando o paciente faz uso prolongado deste fármaco, pois, dependendo do tempo decorrido entre a ingestão do medicamento e a coleta do sangue vai haver predominância do metabólito ativo, como ficou evidenciado em diversos pacientes. Ao nordiazepam é atribuído o efeito sedativo prolongado do diazepam⁷.

Ambas as técnicas de extração apresentaram resultados adequados no que se refere à otimização das condições e aos parâmetros de validação, permitindo sua aplicação na monitorização de pacientes sob tratamento com diazepam. Embora os resultados da SPE se apresentassem dentro dos padrões aceitos de validação quando se usa material biológico e esta técnica tenha a vantagem do consumo reduzido de solventes e, conseqüentemente, baixa exposição do analista, a ELL mostrou-se mais eficiente, mais precisa e com gasto de menor tempo de análise. É importante ressaltar que se usou um sistema "manifold" (Supelco®), processo manual de passagem das amostras e soluções através dos cartuchos C18, não sendo possível controlar o uso concomitante de mais de 3 deles devido às variações nas vazões, o que resultou em maior gasto de tempo nesta extração. Houve correlação significativa entre os resultados de DZP e de NDZP obtidos após pré-tratamento das amostras por ambas as técnicas, com coeficiente de correlação de Pearson de 0,9729 para o DZP e 0,9643 para o NDZP (Figura 3).

Quanto ao limite de quantificação por CLAE (50 ng mL⁻¹) foi menor que o reportado para CG/DCE, de 20 ng mL⁻¹¹⁸. Entretanto, este fato não constitui uma desvantagem, pois níveis plasmáticos acima de 100 ng mL⁻¹ são encontrados com baixas doses diárias de diazepam (5 mg dia⁻¹). O intervalo linear é abrangente, permitindo detectar desde níveis terapêuticos de baixas doses (5 mg dia⁻¹) até níveis para altas doses (40 mg dia⁻¹).

A especificidade dos métodos pode ser atestada no cromatograma do branco do "pool" de plasma (Figura 1), com a ausência de interferentes da amostra na região de eluição dos benzodiazepínicos. O oxazepam, outro dos metabólitos ativos do DZP, apresentou pico com tempo de retenção diferente dos demais metabólitos nas condições cromatográficas utilizadas. Alguns dos pacientes relataram o uso de outros fármacos ingeridos simultaneamente ao DZP, como haloperidol (Haldol, 2 pacientes), prometazina (Fenergam, 1 paciente), carbamazepina (Tegretol, 2 pacientes), atenolol (1 paciente), omeprazol (2 pacientes) e diclofenaco de sódio (1 paciente), sendo que nenhum destes fármacos mostrou interferência na análise cromatográfica do DZP e NDZP.

Valores bastante diferentes de DZP e NDZP foram verificados

no plasma dos pacientes frente à ingestão de mesma dose diária de diazepam, de 10 mg dia⁻¹. Largas variações individuais também foram observadas por Urias e Siqueira¹⁹ para doses iguais em pacientes de clínicas psiquiátricas. Apesar de o fármaco ter sido recebido pelo médico do paciente, é praticamente impossível saber se o mesmo está realmente ingerindo a dose indicada. Resultados de 2 pacientes não foram considerados no estudo estatístico, pois estavam anormalmente elevados (acima de 1300 ng mL⁻¹), não esperados para doses de 10 mg dia⁻¹ de DZP, sendo que valores acima de 900 ng mL⁻¹ são compatíveis com casos de intoxicação pelo fármaco. Este fato corrobora a importância de se individualizar a dose diária do medicamento com base no nível plasmático ótimo para cada paciente, objeto da monitorização terapêutica.

CONCLUSÕES

Ambas as técnicas de pré-tratamento das amostras de plasma, ELL e SPE, apresentaram características que permitem suas aplicações na determinação simultânea do diazepam e seu principal metabólito ativo neste meio, o nordiazepam, para fins de monitorização terapêutica ou de diagnóstico de intoxicações por este fármaco. Entretanto, a SPE apresentou maior variabilidade que a ELL, ainda que a extração tenha sido mais segura e com menor gasto de solventes. Os métodos validados apresentam condições de repetibilidade, linearidade, recuperação relativa e limites de quantificação que lhes permitem o uso em análises rotineiras do diazepam e nordiazepam em plasma com finalidades diversas.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, à FAPEMIG e à Finep, através do FNDCT/CT/INFRA/Efoa, convênio 0990/01 pelos auxílios recebidos.

REFERÊNCIAS

- Sultan, S. M.; El-Mubarah, A. H.; *Talanta* **1996**, *43*, 569.
- Loscher, W.; *Ther. Drug Monitor.* **1982**, *4*, 315.
- St-Pierre, M.; Pang, K. S.; *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1993**, *265*, 1437.
- Azzam, R. M.; Notarianni, L. J.; Ali, H. M.; *J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.* **1998**, *708*, 304.
- De Haro, L.; Valli, M.; Bourdon, J. H.; Iliadis, A.; Hayeek-Lanthois, M.; Arditti, J.; *Vet. Hum. Toxicol.* **2001**, *43*, 174.
- Bianchi, G. N.; *Psychopharmacology* **1974**, *35*, 112.
- Baldessarini, R.J. Em *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*; Hardman, J. G.; Limbird, L. E., eds.; 10a ed., MacMillan: New York, 2001, cap. 19.
- Hillestad, L.; Hansen, T.; Melson, H.; *Clin. Pharmacol. Ther.* **1974**, *16*, 485.
- Smith-Kielland, A.; Skuterud, B.; Olsewn, K. M.; Märland, J.; *J. Clin. Lab. Invest.* **2001**, *61*, 237.
- Karnes, H. T.; Beightol, L. A.; Seraphin, R. J.; Farthing, D.; *J. Chromatogr.* **1988**, *424*, 398.
- Gaillard, Y.; Gay'Montchamp, J. P.; Ollagnier, M.; *J. Chromatogr.* **1993**, *622*, 197.
- Mahjoub, A. E.; Staub, C.; *J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.* **2000**, *742*, 381.
- Chiba, K.; Horii, H.; Chiba, T.; Kato, Y.; Hirano, T.; Ishizaki, T.; *J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.* **1995**, *66*, 77.
- Kunick, P. K.; *J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.* **2001**, *750*, 41.
- Zhong, X. B.; Yang, Z. H.; Wu, C.; *Chin. J. Hosp. Pharm.* **1997**, *17*, 439.
- Chassin, A. A.; Nascimento, E. S.; Ribeiro-Neto, L. M.; Siqueira, M. E. P. B.; Andraus, M. H.; Salvadori, M.; Fernicola, N. A. G. G.; *Rev. Bras. Toxicol.* **1998**, *11*, 1.
- Arthur, C. L.; Pawliszyn, J.; *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 2145.
- Duthel, J. M.; Constant, H.; Vallon, J. J.; *J. Chromatogr.* **1992**, *579*, 85.
- Urias, T. S.; Siqueira, M. E. P. B.; *Anais da FeSBE 2002* (em CD-ROM), Salvador, Brasil, 2002.
- Ahrens, B.; Schwandt, H. J.; Schutz, H.; *Arzneim.-Forsch.* **2000**, *50*, 1057.