



Krytyczna ocena wartości dopuszczalnych stężeń morfiny w moczu w badaniach medycznych i antydopingowych

Critical assessment of threshold limits of morphine concentration in the urine in medical and anti-doping screening

Agnieszka Izdebska¹, Mirosław Szutowski¹, Anna Małkowska¹,
Włodzimierz Tszyszczak², Dorota Kwiatkowska²

¹ Warszawski Uniwersytet Medyczny, Katedra i Zakład Toksykologii

² Instytut Sportu, Pracownia Badań Antydopingowych, Warszawa

Abstract – Introduction. On the basis of morphine concentrations in urine, established as maximum permissible values in medical (300 ng/ml) and anti-doping (1000 ng/ml) examinations, it cannot be univocally assessed if we deal with doping or substance dependence. The consumption of poppy products and drugs may influence on positive results of anti-doping controls and other narcotic tests.

Methods. This problem is exemplified by six volunteers, who consumed poppy seeds (100 g), filling of poppy seed (150 g) and anti-cough tablets containing codeine (30 mg of codeine). Each volunteer collected urine sample in 0, 2, 4, 6, 10, 18 hours since intake. The urine concentration of total morphine, codeine, thebaine, papaverine and noscapine was measured using UPLC/MS/MS with positive ionization ESI.

Results. In urine samples collected between zero to 18 hours from poppy seeds consumption, morphine, codeine and thebaine were detected and in two samples traces of papaverine were found. Noscapine was not detected in any sample. After consumption of two tablets of the Thiocodin drug, the maximum values of morphine in urine concentrations reached 920–5130 ng/ml. Only for one volunteer the morphine in urine concentration did not exceed the limit of 1000 ng/ml.

The results presented here highlight the need for a more realistic approach to detect the presence of morphine uploads in urine, and the necessity to raise the limit of morphine concentration to the values unequivocally indicating intentional and excessive consumption of morphine uploads.

Key words: morphine in urine, interpretation of concentrations, assessment of mandatory limits

Streszczenie – Wstęp. Stężenia morfiny w moczu, ustalone jako dopuszczalne maksymalne wartości w badaniach medycznych (300 ng/ml) i antydopingowych (1000 ng/ml), nie pozwalają jednoznacznie osądzić, czy mamy do czynienia z przypadkiem dopingu czy uzależnienia od substancji psychoaktywnych. Konsumpcja produktów makowych i leków może wpłynąć na pozytywny wynik kontroli antydopingowej i innych testów narkotykowych.



Materiały i metoda. Problem powyższy został przedstawiony na przykładzie 6 ochotniczek, które spożywały nasiona maku (100 g), masę makową (150 g) i tabletki przeciwkaszłowe z kodeiną (30 mg kodeiny). Każda z ochotniczek prowadziła zbiórkę moczu w czasie 0, 2, 4, 6, 10, 18 h od momentu spożycia produktu. W badanych próbkach oznaczano całkowite stężenie morfiny, kodeiny, tebainy, papaweryny i noskapiny metodą UPLC/MS/MS z dodatnią jonizacją ESI.

Wyniki. W próbkach moczu zbieranych w czasie 0–18 h od spożycia maku wykryto morfinę, kodeinę, tebainę oraz w 2 próbkach śladowe ilości papaweryny. W żadnej z próbek nie wykryto noskapiny. Po zażyciu 2 tabletek leku Thiocodin w moczu oznaczono stężenia morfiny osiągające maksymalne wartości w przedziale 920–5130 ng/ml. Tylko u jednej ochotniczki stężenie morfiny w moczu nie przekroczyło granicy 1000 ng/ml.

Przedstawione wyniki wskazują na potrzebę bardziej realistycznego podejścia do faktów obecności opiatów w moczu i na konieczność podwyższenia dopuszczalnego stężenia morfiny w moczu do wartości jednoznacznie wskazujących na celową i nadmierną konsumpcję opiatów.

Słowa kluczowe: morfina w moczu, interpretacja stężeń, ocena obowiązujących limitów

WSTĘP

Spożywanie produktów makowych jest szczególnie utrwalone w kulturze europejskiej. Nasiona maku stanowią często ważny składnik tradycyjnych potraw. Konsumenci rzadko jednak zdają sobie sprawę, że spożywanie produktów makowych może być przyczyną otrzymania pozytywnego wyniku testu na obecność morfiny w moczu. Dotyczy to zarówno przesiewowych testów stosowanych wobec kierowców, jak i badań antydopingowych.

W związku z tym poszukiwane są sposoby pozwalające jednoznacznie określić źródło pochodzenia morfiny. Proponowano wiele metod opierających się na oznaczaniu różnych związków jako markerów (1, 2, 3, 4) lub na porównywaniu stężeń poszczególnych alkaloidów (5, 6). Najczęściej podejmowano badania mające na celu określenie możliwości potwierdzenia bądź wykluczenia stosowania heroiny, a także wskazanie źródła jej pochodzenia (7, 8, 9).

Nie ma prostej metody diagnostycznej pozwalającej wykryć i udowodnić nadużywanie poszczególnych opiatów. Potrzebna jest szczegółowa analiza wyników badań krwi i moczu, uwzględniająca ocenę znalezionych stężeń morfiny, heroiny lub kodeiny i wzajemnych relacji tych stężeń, ocenę stężeń towarzyszących metabolitów i innych alkaloidów, występujących w nasionach maku oraz powstających w trakcie nielegalnego wytwarzania heroiny z opium.

W niniejszej pracy zilustrowano ten problem na przykładzie sześciu ochotniczek spożywających mak, masę makową i zażywających tabletki z kodeiną.

MATERIAŁY I METODY

Badania z udziałem ochotników zostały przeprowadzone za zgodą Komisji Bioetycznej przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym (Nr KB/9/2009). Materiał do badań stanowiły próbki moczu pobrane od ochotników i przechowywane do czasu

analizy w temperaturze 0–4°C. Ochotniczkami było 6 zdrowych kobiet w wieku 23 lat, o podobnym trybie życia. Każda z ochotniczek prowadziła zbiórkę moczu po spożyciu: (1) 100 g naturalnego, nieprzetworzonego maku niebieskiego, niskomorfinowego firmy Polgreen, (2) 150 g masy makowej, (3) 2 tabletek preparatu Thiocodin® (równoważność 30 mg kodeiny). Próbkę zbierano w czasie 0, 2, 4, 6, 10, 18 h od momentu spożycia produktu.

Spożywanie wyżej wymienionych produktów i następujące po tym zbiórki moczu odbywały w dwutygodniowych odstępach. Na dwa tygodnie przed rozpoczęciem badania oraz na cały okres jego trwania (4 tygodnie) ochotniczki zobowiązały się, że nie będą spożywać produktów zawierających mak, kodeinę lub inne alkaloidy opium.

W badanych próbkach oznaczano całkowite stężenie morfiny, kodeiny, tebainy, papaweryny, noskapiny. W tym celu opracowano następującą metodę. Do 2 ml moczu dodawano 200 ng standardu wewnętrznego nalorfiny (100 ng/ml moczu), 1 ml 1 M buforu octanowego i 40 µl β-glukuronidazy (250 U, *Helix pomatia*). Hydrolizę enzymatyczną prowadzono przez 2,5 h w temperaturze 56°C. Następnie alkaloidy izolowano metodą ekstrakcji do fazy stałej (SPE) z zastosowaniem kolumnienek C8 firmy Varian. Kolumnienki kondycjonowano 2 ml metanolu, a następnie 2 ml wody. Przed naniesieniem na kolumnienki próbki doprowadzono do pH 7–8, stosując 1 M roztwór wodorotlenku potasu. Po naniesieniu próbki, kolumnę przemywano 2 ml wody, 2 ml 0,1 M buforu octanowego i 2 ml metanolu. Po osuszeniu pod próżnią w ciągu 5 minut, alkaloidy wymywano 3 ml mieszaniny dichlorometanu:izopropanolu:amoniaku (80:20:2) (v:v:v). Eluat odparowywano w strumieniu azotu w temperaturze 50°C. Suchą pozostałość rozpuszczano w 200 µl 10% metanolu i przenoszono do plastikowych fiolek o pojemności 200 µl.

Próbki oznaczano z zastosowaniem chromatografu UPLC Waters Acquity. Warunki oznaczenia: kolumna Acquity UPLC BEH C18 (100 mm × 2,1 mm; średnica ziaren 1,7 µm), temperatura kolumny 45°C, faza ruchoma A – woda + octan amonu (0,5 g/l), B – metanol + octan amonu (0,5 g/l). Zastosowano program gradientowy składu fazy: 90% A, między 0,5 a 3,7 min.: przejście do 90% B, między 3,7 a 3,9 min.: utrzymanie 90% B, między 3,9 a 4,0 min.: przejście do 90% A, do 5 min. utrzymanie 90% A. Szybkość przepływu fazy ruchomej: 0,6 ml/min. Objętość próbki: 5 µl. Czas analizy: 5 minut.

Parametry pracy spektrometru mas

Detektor: Micromass Quattro Premier XE API, metoda jonizacji: jonizacja dodatnia poprzez elektrorozpraszanie w polu elektrycznym (ESI), temperatura źródła jonów: 120°C, temperatura desolvatacji: 300°C, sposób zbierania danych: monitorowanie wybranych reakcji fragmentacji (MRM). Transmisje monitorowanych jonów: morfina 286,38 > 128,09 i 286,38 > 152,29, kodeina 300,2 > 300,33 i 300,2 > 199,19, tebaina 312,21 > 251,2 i 312,21 > 266,17, papaweryna 340,2 > 202,13 i 340,2 > 324,25, noskapina 414,1 > 220,15 i 414,1 > 353,03, nalorfina 312,1 > 270,31 i 312,1 > 70,28.

Krzywe wzorcowe wykreslano w zakresie 5–200 ng/ml, dla morfiny 10–2000 ng/ml. W badanych zakresach uzyskano zależność liniową i odpowiednie współczynniki korelacji: r^2 dla morfiny 0,9998; kodeiny 0,9854; tebainy 0,9825; papaweryny 0,9809; noskapiny 0,9885.

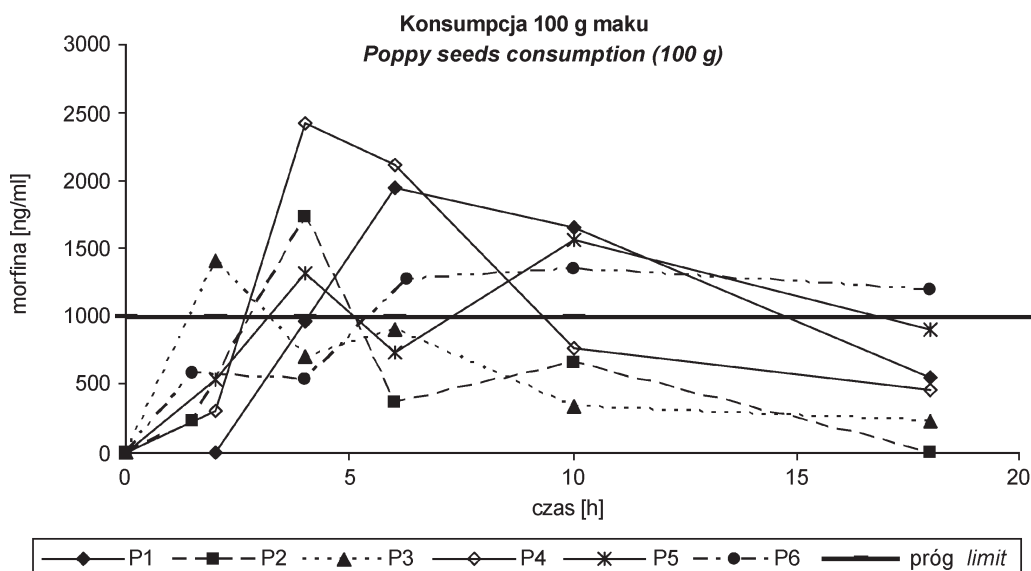
Wartości granicy oznaczalności (LOQ) i odzysku wynosiły odpowiednio dla morfiny 20 ng/ml i 89,3%; dla kodeiny 7,5 ng/ml i 94,7%; dla tebainy 5ng/ml i 88,9%; dla papaweryny 10 ng/ml i 80,0%; dla noskapiny 10 ng/ml i 36,5%.

WYNIKI

Stężenia alkaloidów opium w moczu po spożyciu maku

W próbkach moczu, zbieranych w czasie 0–18 h od spożycia 100 g maku, wykryto morfinę, kodeinę, tebainę oraz w 2 próbkach śladowe ilości papaweryny. W żadnej z próbek nie wykryto noskapiny. Maksymalne stężenia morfiny występowały u dwóch ochotniczek po 4 h, u kolejnych dwóch po 10 h, oraz po 2 h i 6 h. Wartości maksymalnych stężeń wahały się między 1344 a 2412 ng/ml. U wszystkich ochotniczek po spożyciu maku obserwowano przekroczenie dopuszczalnych w badaniach antidopingowych (1000 ng/ml) stężeń morfiny (rys. 1).

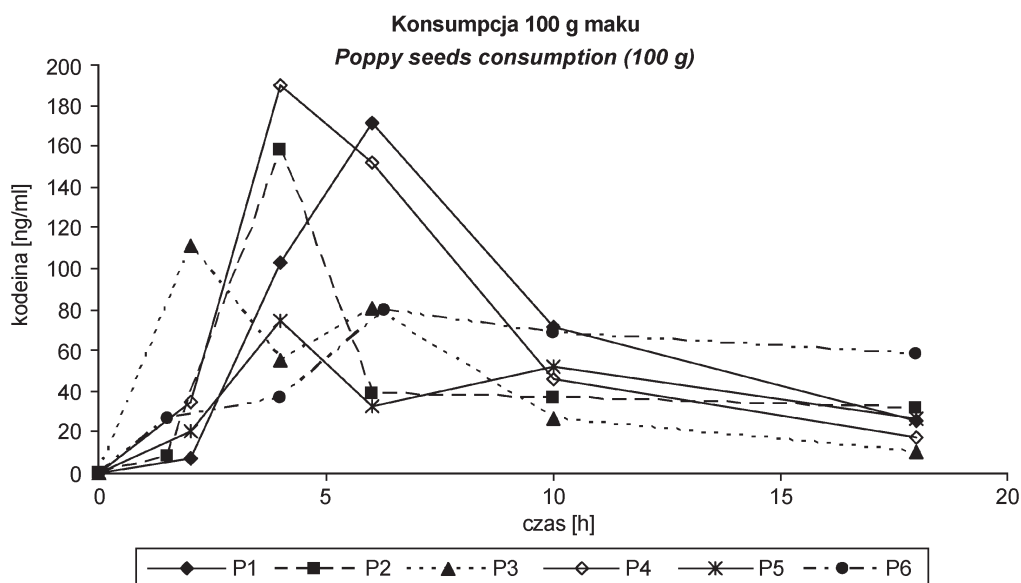
W moczu wszystkich ochotniczek po spożyciu maku wykryto kodeinę. Stężenia maksymalne mieściły się w zakresie 74–190 ng/ml. Kinetyka wydalania kodeiny była całkowicie zbieżna z profilem wydalania morfiny (rys. 2). Stosunek stężenia morfina/kodeina (M/K) przyjmował wartości 8,83–33,86.



Rys. 1.

Stężenie morfiny w moczu poszczególnych ochotniczek po spożyciu maku

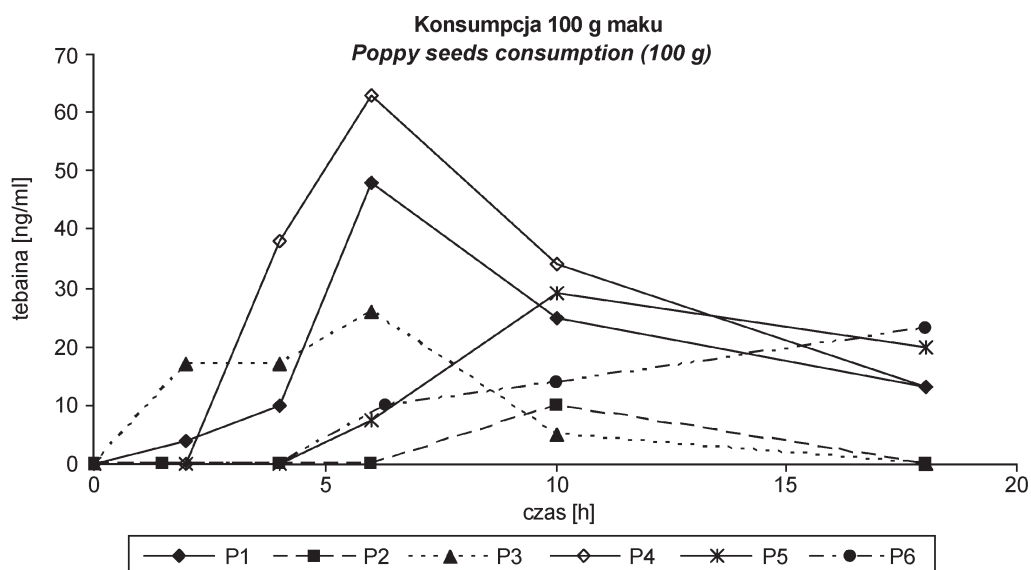
The morphine concentration in urine samples among volunteers after poppy seeds consumption



Rys. 2.

Stężenie kodeiny w moczu poszczególnych ochotniczek po spożyciu maku

The codeine concentration in urine samples among volunteers after poppy seeds consumption



Rys. 3.

Stężenie tebainy w moczu poszczególnych ochotniczek po spożyciu maku

The thebaine concentration in urine samples among volunteers after poppy seeds consumption

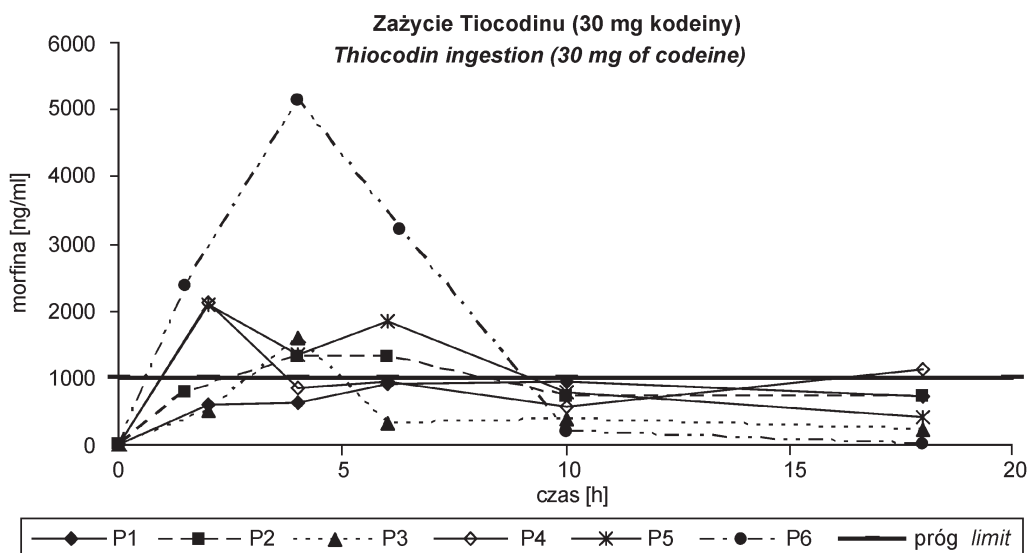
W próbkach moczu po spożyciu maku obecna była tebaina. Maksymalne stężenie tego alkaloidu obserwowano między 4 a 10 h (rys. 3). Stężenia maksymalne mieściły się w zakresie 10–63 ng/ml.

Stężenia alkaloidów opium w moczu po spożyciu masy makowej

W próbkach moczu zebranych w czasie 0–18 h od spożycia 150 g masy makowej oznaczono morfinę, której stężenia nie przekraczały wartości 550 ng/ml. Oznaczone maksymalne stężenia kodeiny wynosiły 8,2–214 ng/ml i w większości nie przekraczały 100 ng/ml. Stosunek stężenia M/K przyjmował wartości 1,44–22,9 i były one nieco niższe niż po spożyciu maku. Tylko w jednym przypadku, dopiero w 18 godzinie zaobserwowano wyższe stężenie morfiny – 1851 ng/ml i odpowiednio wyższe stężenie kodeiny – 174 ng/ml. Wartość progowa 300 ng/ml nie została przekroczona tylko u dwóch ochotniczek. Tebainę wykryto w pojedynczych próbkach, w śladowych ilościach. Tylko jedna próbka (po 6 h) zawierała śladowe ilości papaweryny. W żadnej próbce nie wykryto noskapiny.

Stężenia kodeiny i morfiny w moczu po spożyciu leku Thiocodin®

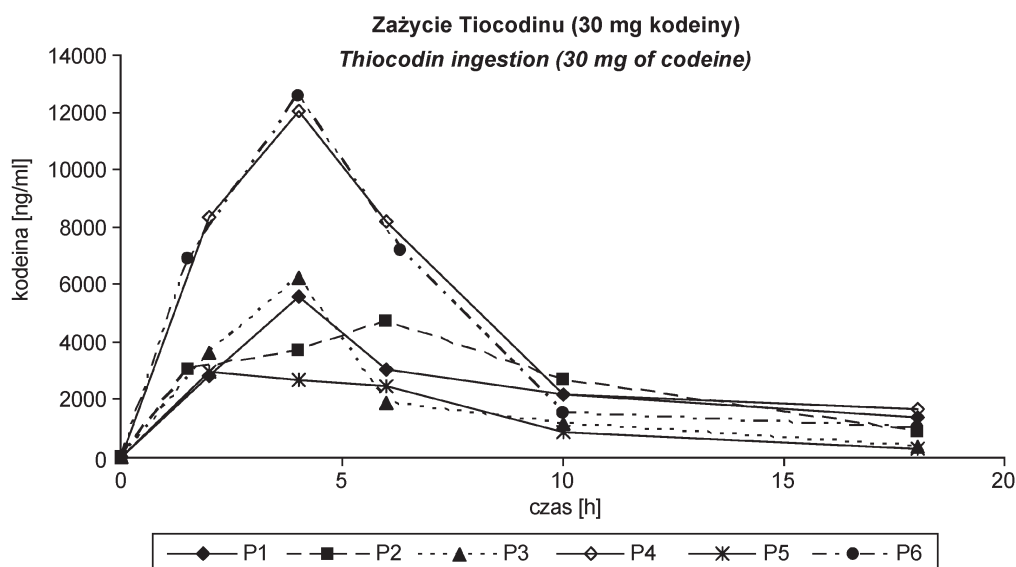
Po zażyciu 2 tabletek leku Thiocodin, równoważnym przyjęciu 30 mg kodeiny, w moczu oznaczono wysokie stężenia nie tylko kodeiny, lecz także morfiny. Maksymalne stężenia morfiny zawierały się w przedziale 920–5130 ng/ml (rys. 4). Tylko u jednej ochotniczki stężenie morfiny w moczu nie przekroczyło 1 µg/ml. Maksymalne stężenia kodeiny wykazywały duże różnice u poszczególnych ochotniczek i zawierały się między 2958 a 12.526 ng/ml (rys. 5). Stosunek stężenia M/K mieścił się w zakresie 0,11–1,26. W próbkach, w których stężenie morfiny przekraczało 1 µg/ml



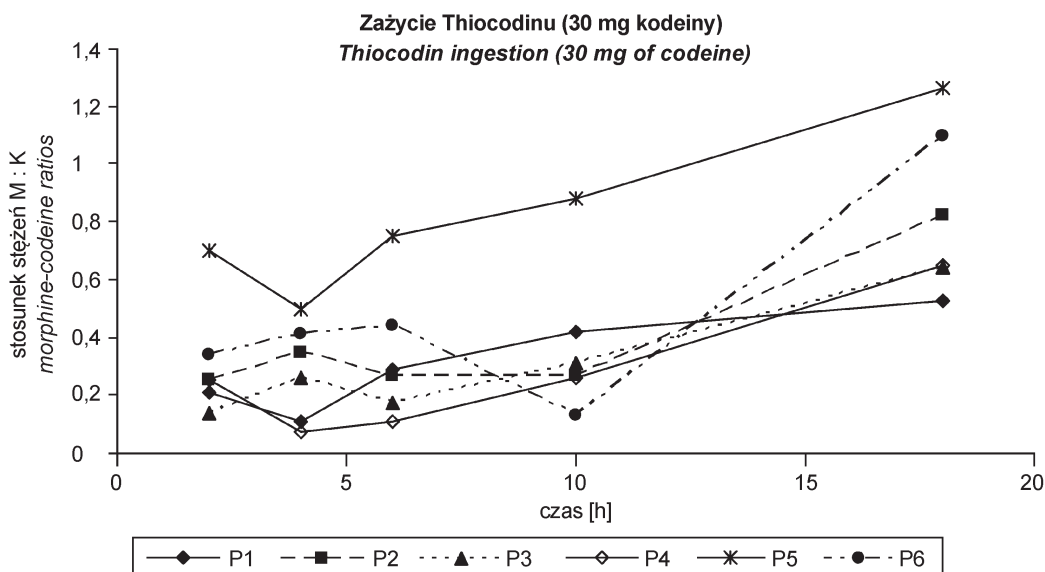
Rys.4.

Stężenie morfiny w moczu poszczególnych ochotniczek po zażyciu Thiocodinu

The morphine concentration in urine samples among volunteers after Thiocodin ingestion



Rys. 5.
Stężenie kodeiny w moczu poszczególnych ochotniczek po zażyciu Thiocodinu
The codeine concentration in urine samples among volunteers after Thiocodin ingestion



Rys. 6.
Stosunek stężeń morfiny do kodeiny u poszczególnych ochotniczek po Thiocodinie
Distribution of morphine-codeine ratios in urine samples among volunteers after Thiocodin ingestion

wartość M/K wynosiła < 1 . Z upływem czasu wartość stosunku M/K zwiększa się (rys. 6, czas 18 godzin po zażyciu kodeiny). Wskazuje to na szybszą eliminację z organizmu kodeiny niż morfiny.

Indywidualne zróżnicowanie metabolizmu kodeiny do morfiny

Analizując wartości stosunku stężeń morfiny do kodeiny w próbkach moczu pobranych w czasie od 0 do 10 godzin, w układzie wymuszonego przejścia przez „0”, można było określić aktywność izoformy CYP2D6 w O-demetylacji kodeiny do morfiny u poszczególnych osób (tabela 1). Wyniki wskazują na znaczące zróżnicowanie tej aktywności. Największą aktywnością O-demetylacji kodeiny wykazały się osoby P6 i P5. Dodatkowym potwierdzeniem dla zwiększonej aktywności O-demetylacji jest relatywnie najniższa zawartość kodeiny w porównaniu do ilości morfiny w moczu, właśnie u tych osób (P6 i P5), spożywających te same dawki maku lub masy makowej (tabela 1).

Tabela 1. Wartości stosunków stężeń kodeiny do morfiny i tebainy do morfiny w próbkach moczu poszczególnych ochotniczek
Distribution of codeine-morphine ratios and thebaine-morphine ratios in urine samples among volunteers

Ochotnik <i>Volunteer</i>	Mak <i>Poppy seeds</i>		Masa makowa <i>Filling of poppy seed</i>	
	Kodeina/morfina <i>Codeine-morphine</i>	r ²	Kodeina/morfina <i>Codeine-morphine</i>	r ²
P1	0,0727	0,7871	0,3459	0,7665
P2	0,0872	0,9613	0,1761	0,3892
P3	0,0810	0,9850	0,1605	0,8109
P4	0,0745	0,9775	0,1012	0,8373
P5	0,0410	0,8047	0,0777	0,8727
P6	0,0546	0,9347	0,0708	0,2031
	Mak <i>Poppy seeds</i>		Thiocodin	
	Tebaina/morfina <i>Thebaine-morphine</i>	r ²	Morfina/kodeina <i>Morphine-codeine</i>	r ²
P1	0,0196	0,8369	0,1844	0,2310
P2	0,0019	0,0029	0,2900	0,9330
P3	0,0177	0,6468	0,2248	0,8935
P4	0,0230	0,7302	0,1271	0,2982
P5	0,0118	0,3687	0,6550	0,8934
P6	0,0108	0,5895	0,4014	0,9754

Uwzględniono stosunki z każdej zebranej próbki moczu i ostateczną wartość policzono metodą najmniejszych kwadratów.

The ratios were taken for every collected urine sample and the final value was calculated by the least squares method.

DYSKUSJA

Pod koniec lat osiemdziesiątych, w początkowej fazie wprowadzania w USA na szeroką skalę testów wykrywających nadużywanie środków odurzających w wojsku i miejscach pracy, powszechnie akceptowanym granicznym stężeniem dla morfiny

i kodeiny w moczu było stężenie 300 ng/ml ustalone przez NIDA (National Institute on Drug Abuse) (5). Poziom ten został zaakceptowany również w Europie, a po dzień dzisiejszy szereg testów skriningowych, wykrywających morfinę, kodeinę i opiaty, posiada wartość *cutoff* 300 ng/ml.

Już na początku lat dziewięćdziesiątych prowadzona na szeroką skalę przez Departament Obrony USA (DOD) rutynowa kontrola próbek moczu na zawartość opiatów wykazała dużą liczbę fałszywie pozytywnych oznaczeń, co wiązało się z koniecznością wykonania kosztownych uzupełniających badań potwierdzających. Wśród 1,1 miliona próbek moczu, testowanych na opiaty od 1 stycznia 1992 do 31 marca 1993 roku przez 5 certyfikowanych laboratoriów, 317.500 próbek było analizowanych przez 3 zespoły MRO (Medical Review Officers). Stwierdzono, że 87% próbek moczu, dających pozytywny wynik testu na opiaty, było fałszywie pozytywnych. Wykryta morfina pochodziła z konsumpcji nasion maku i zażywania środków leczniczych (10). W konsekwencji DOD zaproponował zastosowanie w teście potwierdzającym, wykonywanym metodą GC-MS, wartości *cutoff* dla morfiny i kodeiny odpowiednio: 4000 i 2000 ng/ml moczu (5).

W 1995 roku opiniotwórczy Urząd ds. Uzależnień i Zdrowia Psychicznego USA (The Substance Abuse and Mental Health Services Administration, SAMHSA) zmodyfikował sugerowane wcześniej kryteria pozytywnego testu dla morfiny w moczu z 300 ng/ml na 2000 ng/ml w teście wstępnym. Rząd Federalny przyjął tę modyfikację i zalecił stosowanie wyższej granicznej wartości jako kryterium testu pozytywnego w oficjalnym dokumencie (10). W 2008 roku DOD potwierdził zasadność stosowania wartości 2000 ng/ml morfiny w moczu w teście wstępnym, zaś w teście potwierdzającym podwoił tę wartość do 4000 ng/ml z dodatkowym potwierdzającym oznaczaniem 6-acetylmorfiny (10 ng/ml), wskazującym na spożycie heroiny (11).

W kontroli antydopingowej dopuszczalne stężenie morfiny w moczu zostało określone przez Światową Agencję Antydopingową (WADA) na poziomie 1000 ng/ml. Wartość ta figuruje na aktualnej liście substancji zakazanych (12) i w dokumencie technicznym WADA (13) precyzującym warunki uznawania wyniku za stanowiący przekroczenie dopuszczalnej granicy.

W polskim prawodawstwie test na obecność morfiny w moczu przeprowadza się m.in. u kierowców podejrzanych o kierowanie pojazdem pod wpływem substancji psychoaktywnych, ale nie precyzuje się poziomu granicznego testu pozytywnego. Określa się jedynie granicę oznaczalności metody użytej do analizy – LOQ = 20 ng/ml dla morfiny we krwi i 200 ng/ml moczu dla morfiny i 6-acetylmorfiny (14).

Problemy i trudności interpretacyjne związane ze stwierdzeniem obecności opiatów w moczu w aspekcie konsumpcji maku były przedmiotem szeregu publikacji (5, 6, 15, 16). W polskim piśmiennictwie również sygnalizowano problem przy okazji dodatniego wyniku testu narkotykowego u chłopca, który spożył ciastko z makiem (17). Według statystyk WADA w 2009 roku było 17 przypadków pozytywnych, to jest z przekroczeniem progu 1000 ng/ml. Były to dane ze wszystkich 35 akredytowanych laboratoriów, gdzie przebadano 277.928 próbek. Próbkę pozytywną na obecność narkotyków stanowiły 0,5% wszystkich pozytywnych próbek. Najczęściej wśród narkotyków była wykrywana morfina (70,8%).

Przeprowadzone badania wykazały, że w przypadku spożycia 100 g maku, przyjęcie za wartość graniczną stężenia morfiny 1000 ng/ml moczu, daje 37% wyników potencjalnie fałszywych. Przy wartości 2000 ng/ml moczu odsetek pozytywnych wyników spada do 6,7% (dwa wyniki). W przypadku spożycia 150 g masy makowej tylko jedna próbka przekroczyła wartość 1000 ng/ml, a żadna nie przekroczyła progu 2000 ng/ml. W literaturze spotykane są doniesienia o zmniejszeniu stężenia alkaloidów w nasionach maku przeznaczonych do celów spożywczych w następstwie ich przetwarzania (6, 18). Procesy technologiczne polegające na płukaniu, rozdrabnianiu i podgrzewaniu ziaren maku wpływają znacząco na spadek zawartości alkaloidów makowych (16).

Wytwarzana endogennie morfina z egzogennej kodeiny, przyjmowanej w formie leków przeciwkaszlowych, stanowi istotny czynnik powodujący przekroczenie dopuszczalnych stężeń granicznych. W przeprowadzonych w tej pracy badaniach po zażyciu 30 mg kodeiny u pięciu ochotniczek (37% prób) nastąpiło przekroczenie granicznego stężenia morfiny 1000 ng/ml moczu, a u szóstej w 10 godzinie stężenie morfiny było bliskie dopuszczalnej granicy (0,92 µg/ml). Poziom 2000 ng/ml został przekroczony w 5 próbach co stanowi 17%. O-demetylacja kodeiny zachodzi w organizmie człowieka przy udziale izoformy CYP2D6 (19). Charakterystyczny dla tej izoformy jest polimorfizm genetyczny, również widoczny w zakresie granicznych stężeń morfiny. Z danych przedstawionych w tabeli 1 widać, że ochotniczki P5 i P6 po zażyciu dwóch tabletek tiokodinu najwydajniej metabolizowały kodeinę do morfiny. U tych samych ochotniczek P5 i P6 po spożyciu maku lub masy makowej wystąpiła najniższa wartość stosunku stężenia kodeiny do morfiny w moczu, świadcząca o najintensywniejszym procesie biotransformacji kodeiny u tych osób.

Obecność innych alkaloidów niż morfina i kodeina

Opium i przetwory z maku są surowcami zawierającymi liczne alkaloidy, przeważnie pochodne fenantrenu, benzyloizochinoliny i protoberberyny. Podejmowano liczne próby identyfikacji tych alkaloidów w moczu, jak np. tebainy (3, 4), papaweryny i noskapiny (9), retikuliny (2), neopiny (1).

W badanych próbkach moczu, obok morfiny i kodeiny, poszukiwano tebainy, papaweryny i noskapiny. W czasie 0–18 godzin od spożycia 100 g maku wykryto morfinę, kodeinę, tebainę oraz w 2 próbkach śladowe ilości papaweryny. W żadnej z próbek nie wykryto noskapiny.

Jak wykazały badania innych autorów, nawet jeśli spożywa się mak o bardzo dużej zawartości papaweryny (3,3 µg/g) i noskapiny (94 µg/g), to ze względu na bardzo szybki metabolizm tych alkaloidów, w moczu możemy wykryć tylko ich metabolity (9). Tak więc papaweryna i noskapina, mało przydatne jako wskaźniki konsumpcji maku, zostały zaproponowane jako markery stosowania nielegalnej heroiny – znajdują się tam bowiem w dużych ilościach (noskapina 0–61%, papaweryna 0,1–19,7%) i dzięki temu mogą występować w stanie niezmienionym w moczu (20).

Stosunkowo największe szanse na bycie markerem spożycia produktów makowych ma tebaina. Alkaloid ten występuje zarówno w nasionach maku, jak i w opium.

Tebaina została wykryta u osób spożywających mak i przyjmujących opium doustnie. W wyniku palenia opium nie obserwuje się w moczu tebainy, gdyż jest ona związkiem termolabilnym (3, 4, 6).

Oprócz morfiny, po spożyciu maku, w próbkach moczu wszystkich ochotniczek została wykryta tebaina. Najwyższe oznaczone stężenie tebainy wynosiło 63 ng/ml. Pozostałe maksymalne stężenia u poszczególnych ochotniczek wynosiły 10–48 ng/ml (rys. 3). Po konsumpcji masy makowej śladowe ilości tebainy wykrywane były w pojedynczych próbkach. Wyniki te wskazują na ograniczoną możliwość zastosowania tebainy jako swoistego markera spożycia produktów makowych. Jej oznaczenie może potwierdzić konsumpcję tych produktów, jednak ze względu na różnice międzyosobnicze w kinetyce, brak tebainy w moczu nie wyklucza jednoznacznie maku jako źródła morfiny.

Prawdopodobnie masa makowa zawierała mniej alkaloidów niż nieprzetworzony mak. Badania prowadzone przez Sprolla (18) wykazują, że mielenie, płukanie w gorącej wodzie (60°C) i suszenie nasion maku pozwala zmniejszyć poziom morfiny przeciętnie o 70%. Oprócz małej zawartości alkaloidów w masie makowej, otrzymane po jej spożyciu niskie stężenia alkaloidów w moczu mogły być związane z ich powolnym i niecałkowitym wchłanianiem. Stosowane do produkcji masy makowej produkty spożywcze mogą wpływać na dostępność alkaloidów. Tłumaczyłoby to obserwowane w naszym badaniu duże różnice w kinetyce wydalania oznaczanych związków, występujące właśnie po spożyciu masy makowej.

Morfina i kodeina

Stosując odpowiednio czułe metody, zawsze obok morfiny, w moczu wykryjemy kodeinę. Wynika to z dwukierunkowego przebiegu procesów biotransformacji. Jednak aktywność O-metylotransferazy katalizującej metylację morfiny do kodeiny (21) jest znacząco niższa od aktywności O-demetylazy kodeiny. U dwóch ochotniczek, które w naszych badaniach wykazały się najwyższą zdolnością do biotransformacji kodeiny do morfiny, po spożyciu maku, mimo przeważającego stężenia morfiny, również znacząco obniżyło się stężenie kodeiny w moczu.

Konsumpcja maku i jego przetworów jest na tyle charakterystyczna, że możemy wnioskować o pochodzeniu morfiny i kodeiny, stwierdzonych w analizowanej próbce moczu. El-Sohly i Jones (22) zaproponowali sposób na wykluczenie maku jako źródła morfiny. Wysoki poziom morfiny w moczu (powyżej 5000 ng/ml) wskazuje na nadużywanie heroiny, morfiny lub kodeiny. Równoczesna obecność wysokich stężeń kodeiny (powyżej 300 ng/ml) i wartość stosunku stężeń morfina/kodeina < 2 , jest dowodem nadużywania kodeiny i wyklucza spożycie maku jako jedynego źródła alkaloidów. Również Pelders i wsp. (23) badając inter- i intraosobnicze różnicowanie wydalania morfiny i kodeiny po spożyciu różnych produktów, zawierających mak i jego przetwory, wywnioskowali, że pozytywne wyniki w próbkach – w których stężenie morfiny w moczu przekracza 1000 ng/ml, a jednocześnie nie występuje kodeina lub stężenie kodeiny jest wyższe niż 300 ng/ml – nie są spowodowane spożyciem maku. Prezentowane wyniki naszej pracy potwierdzają te zależności (rys. 4–6).

W przypadkach przekroczenia dopuszczalnych stężeń morfiny w moczu, tzn. gdy jest niższe od stężenia kodeiny, można sądzić, że morfina pochodzi z metabolizmu kodeiny. W próbkach zebranych po konsumpcji maku lub masy makowej, stosunek stężenia M/K wynosił w przybliżeniu 9–33 dla maku i 1,5–10 dla masy makowej. Natomiast po zażyciu 30 mg kodeiny (2 tabletki Thiocodinu) pojawiająca się w moczu morfina pochodziła wyłącznie z metabolizmu kodeiny, a stosunek stężenia M/K wynosił 0,11–1,26. Przy przekroczeniu 1000 ng/ml stężenia morfiny w moczu, stężenie kodeiny znacząco przewyższało stężenie morfiny, a stosunek stężenia M/K był < 1 . W przeprowadzonych badaniach wartość stosunku M/K w moczu wzrastała wraz z upływem czasu od przyjęcia kodeiny, przekraczając po 18 godzinach wartość stosunku stężenia M/K = 1. Wiąże się to z szybszą eliminacją z organizmu kodeiny niż morfiny.

Podsumowanie

W miarę obniżania się granic wykrywalności narkotyków, dzięki bardziej czułym metodom ich oznaczania, maleje wartość dowodowa wyników, które uzyskuje się w niskim zakresie stężeń. Przyjęcie niskich wartości *cutoff* pociąga za sobą konieczność weryfikacji wszystkich pozytywnych wyników, w tym coraz większej liczby wyników pozytywnie fałszywych.

Ochotniczki, które spożywały mak lub dwie tabletki zawierające 30 mg kodeiny mogły zostać posądzone o nadużywanie morfiny. Przy wartości granicznej dla morfiny rzędu 1000 ng/ml uwidoczniły się różnice międzyosobnicze, wynikające ze zmiennej aktywności enzymów uczestniczących w biotransformacji kodeiny do morfiny. Przy nieznacznym przekroczeniu wartości 1000 ng/ml jest niezwykle trudno oszacować i określić źródło pochodzenia morfiny. Powstaje również pytanie, czy dawka morfiny powodująca przekroczenie wspomnianego stężenia granicznego może wpłynąć na wynik sportowy. W tej sytuacji jedynym racjonalnym, jak się wydaje, rozwiązaniem jest wprowadzenie wyższych dopuszczalnych granicznych stężeń morfiny i kodeiny w moczu, które w sposób wiarygodny będą wskazywać na stosowanie dopingu lub na uzależnienia od substancji psychoaktywnych.

PIŚMIENNICTWO

1. Al-Amri AM, Smith RM, El-Haj BM (2005) The GC-MS detection and characterization of neopine resulting from opium use and codeine metabolism and its potential as an opiate-product-use marker. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 382, 830–835.
2. Al-Amri AM, Smith RM, El-Haj BM, Juma'a (2004) The GC-MS detection and characterization of reticuline as a marker of opium use. *Forensic Science International*, 142, 61–69.
3. Cassella G, Wu AHB, Shaw BR, Hill DW (1997) The Analysis of Thebaine in Urine for the Detection of Poppy Seed Consumption. *Journal of Analytical Toxicology*, 21 (5), 376–383.
4. El-Haj BM, Al-Amri AM, Ali HS, Ahmed I (2007) GC-MS detection and characterization of thebaine as a urinary marker of opium use. *Forensic Toxicology*, 25, 62–68.
5. Selavka CM (1991) Poppy seed ingestion as a contributing factor to opiate-positive urinalysis results: The Pacific perspective. *Journal of Forensic Sciences*, 36 (3), 685–696.

6. Meadway C, George S, Braithwaite R (1998) Opiate concentrations following the ingestion of poppy seed products – evidence for “the poppy seed defence”. *Forensic Science International*, 96, 29–38.
7. O’Neal CL, Poklis A (1998) The detection of acetylcodeine and 6-acetylmorphine in opiate positive urines. *Forensic Science International*, 95, 1–10.
8. Lurie IS, Toske SG (2008) Applicability of ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for heroin profiling. *Journal of Chromatography A*, 1188, 322–326.
9. Trafkowski J, Madea B, Musshoff F (2006) The significance of Putative Urinary Markers of Illicit Heroin Use After Consumption of Poppy Seed Products. *Therapeutic Drug Monitoring*, 28 (4), 552–558.
10. Notices, Substance Abuse and Mental Health Services Administration (1995) Changes to the Testing Cutoff Levels for Opiates for Federal Workplace Drug Testing Programs. *Federal Register*, 60 (221), 57587–57589.
11. Granger E (2008) Memorandum, subject: *Modification of the Department of Defense Opiate Drug Testing Procedures*. Office of the Assistant Secretary of Defense (Health Affairs), USA, <http://www.tricare.mil/tma/ddrp/Program-Policy-Archives.aspx>
12. The 2011 prohibited list world anti-doping code. <http://www.wada-ama.org/>
13. WADA Technical Document – TD2010DL, Decision limits for the confirmatory quantification of threshold substances, effective day 01 September, 2010.
14. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 11 marca 2004 r. – zmieniające rozporządzenie w sprawie wykazu środków działających podobnie do alkoholu oraz warunków i sposobu przeprowadzania badań na ich obecność w organizmie (Dz. U. z dnia 31 marca 2004 r. Nr 52, poz. 524).
15. Jankovičová K, Ulbrich P, Fuknová M (2009) Effect of poppy seed consumption on the positive results of opiates screening in biological samples. *Legal Medicine*, 11, 416–418.
16. Lachenmeier DW, Sproll C, Musshoff F (2010) Poppy seed foods and opiate drug testing – where are we today? *Therapeutic Drug Monitoring*, 32 (1), 11–18.
17. Woźny E, Abramowska M, Dziklińska A, Kwiatkowska D, Pokrywka A, Wejman D, Siwińska A (2006) Dylematy oznaczania opiatów. *Alkoholizm i Narkomania*, 19 (2), 207–210.
18. Sproll C, Perz RC, Buschmann R, Lachenmeier DW (2007) Guidelines for reduction of morphine in poppy seed intended for food purposes. *European Food Research and Technology*, 226, 307–310.
19. Kirchheiner J, Schmidt H, Tzvetkov M, Keulen J-Tha, Lötsch J, Roots I, Brockmöller J (2007) Pharmacokinetics of codeine and its metabolite morphine in ultra-rapid metabolizers due to CYP2D6 duplication. *Pharmacogenomics Journal*, 7, 257–265.
20. Kaa I (1994) Impurities, adulterants and diluents of illicit heroin samples. *Forensic Science International*, 64, 171–179.
21. Boerner U, Abbott S (1973) New observations in the metabolism of morphine. The formation of codeine from morphine in man. *Experientia*, 29 (2), 180–181.
22. ElSohly MA, Jones AB (1989) Morphine and codeine in biological fluids: Approaches to source differentiation. *Forensic Science Review*, 1, 13–22.
23. Pelders MG, Ross JJW (1996) Poppy seeds: differences in morphine and codeine content and variation in inter- and intra- individual excretion. *Journal of Forensic Sciences*, 41 (2), 209–212.

Adres do korespondencji
Anna Małkowska
Katedra i Zakład Toksykologii WUM
ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa
tel./fax (22) 572 0760
e-mail: amalkowska@wum.edu.pl

otrzymano: 19.11.10
przyjęto do druku: 10.02.11