

Bogdan Szukalski, Ewa Mirkiewicz, Ewa Taracha
Zakład Biochemii Instytutu Psychiatrii i Neurologii

ZASTOSOWANIE METOD FPIA I HPTLC DO ANALIZY OPIATÓW I METADONU W MOCZU NARKOMANÓW STOSUJĄCYCH PREPARATY ZE SŁOMY MAKOWEJ

Wprowadzenie

Metoda immunofluorescencji w świetle spolaryzowanym (Fluorescence Polarization Immunoassay - FPIA) jest obecnie najczęściej stosowaną skринingową metodą badania moczu na obecność narkotyków. Jest to nowoczesna technika, której rozpowszechnienie wiąże się z wprowadzeniem w roku 1981 aparatu pomiarowego TDx firmy Abbott. Stosując gotowe zestawy odczynników dla poszczególnych substancji uzależniających (lub grup substancji o zbliżonej strukturze chemicznej) można tą metodą bardzo szybko, tj. w ciągu kilkunastu minut, stwierdzić obecność albo brak w moczu opiatów, amfetamin, benzodiazepin, barbituranów i metadonu, a także rzadziej w Polsce używanych - kokainy, fencyklidyny i kanabinoli. Poza stwierdzeniem obecności narkotyku metoda pozwala ocenić jego przybliżone stężenie w badanym materiale biologicznym. Jednakże jej specyficzność nie jest zbyt wysoka, tzn. stosowane w niej odczynniki nie są swoiste dla jednej substancji, lecz mogą reagować z mniejszą lub większą wydajnością z całą grupą substancji o zbliżonej strukturze. Np. w przypadku opiatów, najczęściej używanych przez polskich narkomanów, odczynniki FPIA reagują nie tylko z morfiną, ale również z heroiną, kodeiną, MAM (monoacetylmorfiną), 3-glukuronianem morfiny itp. Ta niska specyficzność metody może być przyczyną wyników fałszywie dodatnich, tj. wskazujących na obecność narkotyku u osób, które go nie przyjmowały. Aby zmniejszyć liczbę takich wyników wprowadzono pojęcie „progu czułości” (ang. cutoff level lub Minimal Allowable Threshold - MAT) to jest stężenia narkotyku w moczu, które musi być przekroczone, aby można było uznać wynik za dodatni. Polscy narkomani nie używają czystych opiatów, lecz produkowane domowymi sposobami preparaty ze słomy makowej (makiwara, kompot, mleczko makowe), odznaczające się bardzo różnym składem, ich mocz może więc zawierać, oprócz wymienionych wyżej opiatów i ich metabolitów, szereg substancji o podobnej budowie lecz o innym niż heroina i morfina

działaniu uzależniającym [1,2]. Związki te reagują w różnym stopniu z odczynnikami wpływając na wynik badania. Tak więc dodatnie wyniki otrzymane metodą FPIA świadczą jedynie o obecności w badanym materiale związków o strukturze opiatów, nie dostarczają natomiast informacji o tym jakie to są opiaty, co dla lekarza prowadzącego proces odtruwania może być sprawą istotną.

Dlatego wskazane jest potwierdzenie dodatnich wyników otrzymanych metodą FPIA za pomocą postępowania analitycznego opartego na innych zasadach fizykochemicznych, zgodnie zresztą z dość kategorycznym zaleceniem Division of Narcotic Drug ONZ. Warunek ten spełnia chromatografia płytkowa (TLC), a zwłaszcza jej udoskonalona i zminiaturyzowana modyfikacja - wysokosprawna chromatografia cienkowarstwowa (HPTLC-high performance thin layer chromatography). Wykorzystuje ona różną szybkość przechodzenia składników mieszaniny z bardzo cienkiej warstwy adsorbenta nałożonego na płytkę do przesuwającego się wzdłuż płytki rozpuszczalnika. Rozdzielone składniki mieszaniny przeprowadza się w barwne połączenia przy pomocy swoistych odczynników.

Metoda nie wymaga kosztownej aparatury, można więc było zaadaptować ją w skromnych warunkach naszego laboratorium.

Podjęte badania miały na celu:

a) opracowanie warunków analizy metodą HPTLC naturalnych opiatów: morfiny i kodeiny oraz syntetycznego opioidu - metadonu i jego głównego metabolitu: 2-etylideno-1,5-dimetylo-3,3-difenylpiperolidyny (EDDP)

b) zbadanie relacji między sumarycznymi wynikami uzyskanymi metodą immunofluorescencyjną a zawartością naturalnych opiatów: morfiny i kodeiny oraz metadonu i EDDP

c) ustalenie przy jakich najniższych stężeniach opiatów w moczu osób stosujących domowej produkcji preparaty ze słomy makowej można na płycie chromatograficznej wykryć morfinę, kodeinę i metadon.

Material i metody

Badaniami objęto 25 pacjentów wybranych ze względu na obecność opiatów w moczu z dużej grupy leczonych metadonem. Materiałem do badań był mocz pobierany pod kontrolą, aby uniknąć zafałszowania. Jego hydrolizę prowadzono ogrzewając 10 mL moczu i 2,5 mL stężonego HCl przez 20 min. w temp. 120°C.

Do analizy opiatów i metadonu zastosowano metodę immunofluorescencji w świetle spolaryzowanym (FPIA), [9,12] oraz metodę wysokosprawnej chromatografii płytkowej (HPTLC) [7,8].

Do analizy opiatów i metadonu zastosowano metodę immunofluorescencji w świetle spolaryzowanym (FPIA), [9,12] oraz metodę wysokosprawnej chromatografii płytkowej (HPTLC) [7,8].

Izolację substancji z materiału biologicznego prowadzono metodą ekstrakcji w fazie stałej (Solid-Phase Extraction, SPE) [3,6,11]. Stosowano kolumny (Bond Elut Certify Extraction Columns-Varian) wypełnione krzemionkowym sorbentem, umieszczone w specjalnym urządzeniu próżniowym (Analytichem Vac Elut SPS 24™-Varian). Po przepuszczeniu moczu (10 mL), kolumnę płukano wodą destylowaną (5 mL), buforem octanowym o pH 4 (2,5 mL) i metanolem (5 mL) a następnie eluowano zatrzymane związki mieszaniną chlorku metylenu i alkoholu izopropylowego (80:20 v/v) z dodatkiem 2% stężonego roztworu amoniaku (2 mL). Eluat odparowywano do sucha i rozpuszczano w 100/μL metanolu. Na płytkę наносono 1-8μL ekstraktu, co odpowiada 0,1-0,8 μL moczu. Używano płytki HPTLC, 10 x 10 cm, Cilica gel G 60 F₂₅₄ (Merck). Chromatogramy rozwijano w komorach szklanych (Camag, Müttenz, Switzerland) na drodze długości 7 cm, stosując jako fazę ruchomą mieszaninę octanu etylu, metanolu i stężonego roztworu amoniaku w stosunku 85:10:5. Czas rozwijania wynosił 8-10 minut.

Lokalizację związków na chromatogramach ustalano za pomocą lampy UV (254 nm) oraz odczynników: Dragendorffa [5] i zakwaszonego jodoplatynianu [10]. Wzorce morfiny, kodeiny i metadonu otrzymano jako dar z Laboratory Section of the United Nations Division of Narcotic Drugs (Vienna, Austria). Wzorzec EDDP pochodzi z firmy Sigma.

Wartości *hRf* charakteryzujące szybkość migracji badanych substancji na chromatogramach obliczano wg wzoru:

$$hRf = \frac{l_N}{l_R} \times 100$$

gdzie: l_N - droga przebyta przez cząsteczki narkotyku,
 l_R - droga przebyta przez czoło fazy ruchomej.

Omówienie wyników

W tabeli 1 zebrano wyniki oznaczania opiatów i metadonu w moczu 25 pacjentów leczonych metadonem. Każdy mocz badano metodą FPIA a następnie weryfikowano otrzymany wynik metodą HPTLC. W przeciwieństwie do FPIA, za pomocą której oznacza się sumarycznie mieszaninę opiatów i związków pokrewnych, wysokosprawna chromatografia cienkowarstwowa pozwala rozdzielić poszczególne związki, w tym morfinę i kodeinę - główne

składniki preparatów otrzymywanych ze słomy makowej. W jednym postępowaniu analitycznym (na jednej płycie) pozwala ponadto wykrywać metadon i jego główny metabolit - EDDP. W zastosowanych warunkach wartości hRf dla tych związków wynoszą: morfina - 16, kodeina - 22, metadon- 62, EDDP - 65.

Tabela 1

Wyniki badania opiatów i metadonu w moczu pacjentów metodą FPIA i HFTLC

Pacjent	Opiaty w ng/mL (met. FPIA)	Metadon w ng/mL (met. FPIA)	Morfina* (met. HPTLC)	Kodeina* (met. HPTLC)	Metadon* (met. HPTLC)	EDDP* (met. HPTLC)
1	106	>1000	-	-	++	-
2	>1000	nie ozn.	+++	++	++	-
3	610	910	-	-	++	+
4	455	439	+	-	++	-
5	>1000	>1000	++	-	++	++
6	>1000	>2000	+++	+++	+++	++
7	>1000	527	+	++	+	+
8	>1000	>2000	+++	+	++	++
9	>1000	"0"	-	++	-	-
10	>1000	nie ozn.	+++	++	++	+
11	>1000	>2000	++	++	++	++
12	>1000	>1000	++	-	++	+
13	>1000	521	+	-	+	-
14	>1000	>1000	++	+	++	+
15	829	196	+	-	+	-
16	728	>1000	+	+	+++	++
17	>1000	46	+++	-	+	-
18	>1000	>1000	++	-	++	+
19	>1000	>1000	++	-	++	+
20	>1000	>2000	+	-	+	+
21	>1000	130	++	-	+	-
22	>1000	588	++	+	++	+
23	>1000	>1000	++	+	++	+
24	>1000	>2000	++	+	+	+
25	128	nie ozn.	-	-	+++	+++

*Semikwantytatywna ocena plam na chromatogramach:

+++ duża plama intensywnie zabarwiona

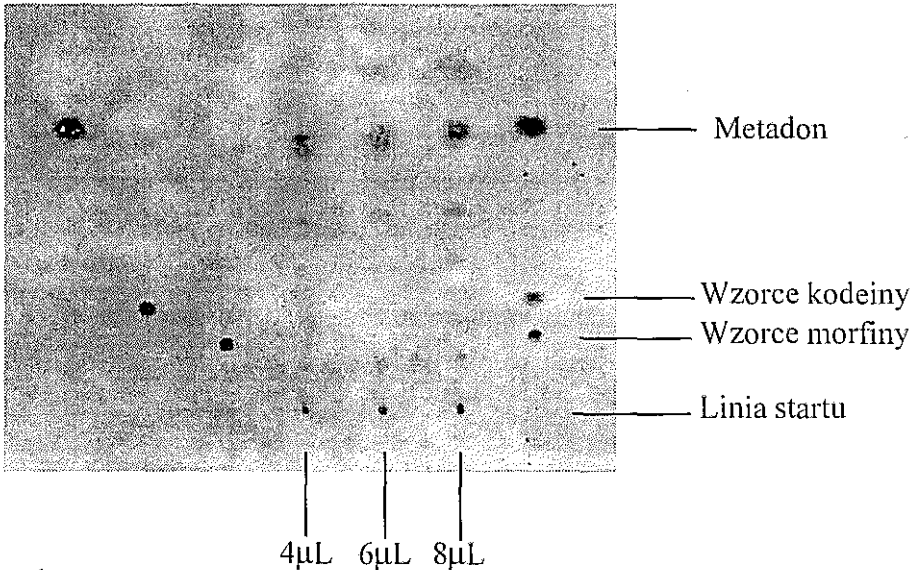
++ plama o średniej intensywności zabarwienia

+ mała plama o niewielkiej intensywności zabarwienia

- brak plamy.

Z tabeli wynika, że wszyscy badani, z wyjątkiem dwóch (Nr 1 i 25), złamali abstynencję, przy czym u 19 osób stężenie opiatów było bardzo wysokie (>1000 ng/mL). U czterech z nich stężenie metadonu było niższe od przyjętego dla tej metody progu czułości, co uznaje się za wynik ujemny i może wskazywać iż nie wzięli oni jednej lub więcej codziennych dawek leku.

Ryc. 1. przedstawia chromatogram moczu Nr 1, w którym oznaczanie opiatów metodą FPIA dało wynik 106 ng/mL, a więc znacznie poniżej progu czułości, wynoszącego dla tej metody 300 ng/mL. Taki wynik odczytuje się jako brak opiatów w moczu. Potwierdza to badanie metodą HPTLC: na chromatogramie brak plam morfiny i kodeiny nawet po podaniu na płytkę 8 μ L ekstraktu.

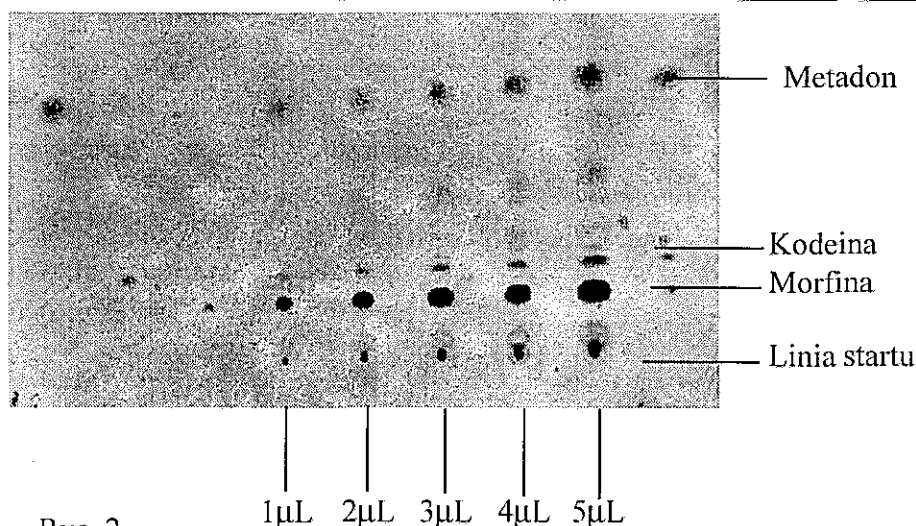


Ryc. 1.

Chromatogram moczu Nr 1 wywołany odczynnikiem Dragendorffa. Na niesiono wzorce morfiny, kodeiny i metadonu oraz 4, 6 i 8 μ L eluatu z kolumn SPE.

Wysokie stężenie metadonu (> 1000 ng/mL) znajduje potwierdzenie na chromatogramie w postaci dużych intensywnych plam tego związku. Brak natomiast plamy EDDP, co może wskazywać, że pacjent otrzymuje metadon od bardzo niedawna, gdyż przy długotrwałym stosowaniu leku stosunek stężeń EDDP i związku macierzystego jest na ogół większy od 1 [4].

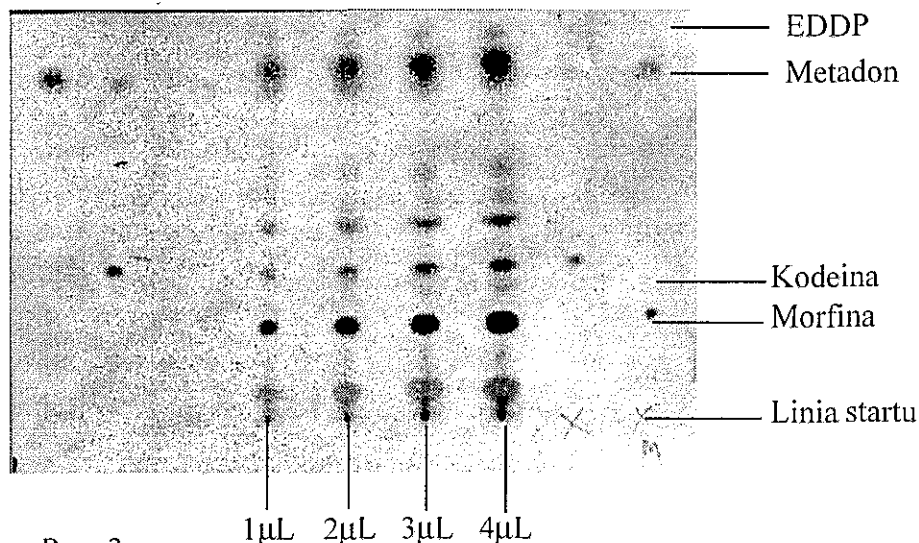
Ryc. 2. przedstawia chromatogram moczu Nr 2 o wysokiej zawartości opiatów (>1000 ng/mL). Na chromatogramie plama morfiny jest bardzo intensywna a ponadto towarzyszy jej dość duża plama kodeiny. Metadonu nie oznaczano



Ryc. 2.

Chromatogram moczu Nr 2 wywołany odczynnikami Dragendorffa. Naniesiono wzorce morfiny, kodeiny i metadonu oraz 1, 2, 3, 4 i 5 µL eluatu z kolumny SPE metodą FPIA, gdyż ilość moczu była niewystarczająca, wykryto go natomiast metodą HPTLC nawet przy naniesieniu na płytkę tylko 1/µL ekstraktu.

Ryc. 3 przedstawia chromatogram moczu Nr 6. Zarówno stężenie opiatów (>1000 ng/mL) jak i metadonu (>2000 ng/mL) wielokrotnie przekracza wartość progu czu-

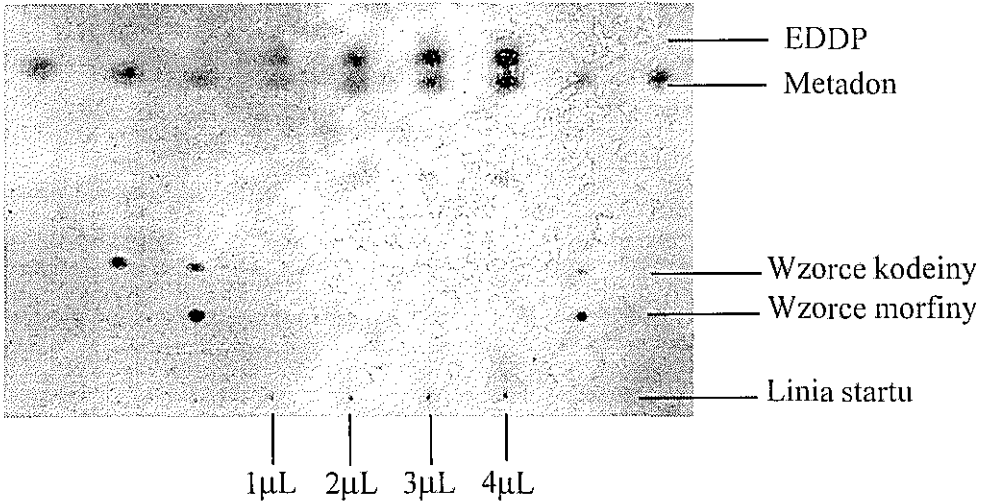


Ryc. 3.

Chromatogram moczu Nr 6 wywołany odczynnikami Dragendorffa. Naniesiono wzorce morfiny, kodeiny, metadonu i EDDP oraz 1, 2, 3, i 4 µL eluatu z kolumny SPE.

łości. Na chromatogramie, nawet przy nałożeniu tylko 1 μL eluatu, plamy morfiny, kodeiny i metadonu są bardzo intensywne. Występuje również plama EDDP, ale ilościowa proporcja metadon/EDDP jest przesunięta wyraźnie na korzyść związku macierzystego.

Ryc. 4. przedstawia chromatogram moczu Nr 25. Stężenie opiatów oznaczone metodą FPIA wynosi w nim 128 ng/mL, co odczytuje się jako wynik ujemny (poniżej progu czułości). Na chromatogramie brak plam morfiny i kodeiny nawet gdy objętość nałożonego ekstraktu wynosi 5/ μL . Metadonu nie



Ryc. 4.

Chromatogram moczu Nr 25 wywołany odczynnikami Dragendorffa. Na niesiono wzorce morfiny, kodeiny i metadonu oraz 1, 2, 3 i 4 μL eluatu z kolumny SPE.

oznaczano metodą FPIA (brak moczu na powtórne badanie), natomiast analiza metodą HPTLC wskazuje na występowanie dużych jego ilości. Obecny jest również EDDP, przy czym plama metabolitu jest większa i intensywniejsza niż związku macierzystego, co może wskazywać, że terapia metadonem trwa od dawna.

Dzięki wysokiej czułości reakcji metadonu z odczynnikami Dragendorffa można wykryć ten związek na chromatogramach nawet przy bardzo małej jego zawartości w moczu.

I tak w moczu Nr 15 metodą FPIA stwierdzono bardzo niskie (196 ng/mL) stężenie metadonu, a na chromatogramie obecna była plama tego związku. To

samo dotyczy moczy Nr 17 i 21. Chociaż stężenie metadonu było w nich bardzo niskie (odpowiednio - 46 ng/mL i 130 ng/mL) na chromatogramach odnotowano obecność związku. Daje to podstawę do rozważenia możliwości stosowania do analizy metadonu metody HPTLC zamiast drogiej metody immunofluorescencyjnej (1 oznaczenie kosztuje ponad 150.000 zł). Wymaga to jednak potwierdzenia tych wyników na większej liczbie przypadków. W przypadku opiatów, wyraźne plamy morfiny i/lub kodeiny uzyskuje się na ogół dopiero dla stężeń przekraczających próg czułości (mocze Nr 4, 15, 16), prawdopodobnie dlatego, że wynik uzyskany metodą FPIA zależy od mieszaniny kilku związków.

Streszczenie

Zastosowano metodę ekstrakcji w fazie stałej (Solid Phase Extraction, SPE) do izolacji z moczu opiatów i metadonu oraz metodę wysokosprawnej chromatografii cienkowarstwowej (HPTLC) do rozdzielania i semikwantytatywnej oceny stężeń morfiny, kodeiny, metadonu i jego metabolitu (EDDP).

W moczu 25 pacjentów poddanych długotrwałej terapii metadonowej oznaczano opiaty i metadon metodą immunofluorescencji w świetle spolaryzowanym (FPIA) oraz dla potwierdzenia i poznania składu opiatów - metodą HPTLC. Stwierdzono zgodność wyników otrzymanych obu metodami oraz wykazano, że na „pule” opiatów oznaczanych metodą immunofluorescencyjną składają się głównie morfina i kodeina, a to co oznacza się w moczu jako metadon stanowi w rzeczywistości mieszaninę tego związku i jego metabolitu EDDP. Na płytkach chromatograficznych wykrywano stężenia metadonu niższe od progu czułości, co stwarza możliwość analizy tego związku w moczu metodą HPTLC zamiast kosztowną metodą immunofluorescencyjną.

B.Szukalski, E.Mirkiewicz, E.Taracha

The Applicability of FPIA and HPTC method to analysis of opiates and methadone in poppy straw product drug user urine.

Summary

The Solid Phase Extraction (SPE) method was utilized to isolate opiates and methadone from urine and HPTLC method was used for separation and semi-quantitative evaluation of concentration of morphine, codeine, methadone and its metabolite (EDDP).

Opiates and methadone were identified with the use of immunofluorescence in polarized light (FPIA) method in the urine of 25 patients undergoing long-term methadone treatment and additionally in order to confirm and identify opiate compositions HPTLC method was applied. The compatibility of results with the use of the two methods was ascertained and it was discovered that the set of opiates identified with the use of FPIA method consists mostly of morphine and codeine, and the substance identified in urine as methadone, is a composite of methadone and EDDP. On chromatographic plates the concentration of methadone lower than sensitivity threshold was detected, which establishes opportunity to analyze the composition in urine with use of HPTLC method instead of expensive immunofluorescent method.

Key words: FPIA, HPTLC, opiates, morphine, codeine, methadone.

Piśmiennictwo

1. Borkowski T., Kała M., Gut W., Janowska E., Lech M.: Diagnostyka chemiczno-analityczna narkomanii w Polsce. Część I. Poznanie składu przetworów maku stosowanych przez narkomanów w Polsce, Z Zagadnień Kryminalistyki TOM XXIII, Wydawnictwo Prawnicze, Warszawa, 1990, s.46-63.

2. Borkowski T., Kała M., Chacia T., Gut W., Janowska E., Lech M.: Diagnostyka chemiczno-analityczna narkomanii w Polsce. Część II. Określenie składu opiatów i zawartości morfiny w słomie makowej z różnych regionów kraju, Z Zagadnień Kryminalistyki, tom XXIII, Wydawnictwo Prawnicze, Warszawa, 1990, s. 64-69.

3. Breiter J., Hegler R., Lang H.: Evaluation of column extraction: A new procedure for the analysis of drugs in body fluids. Forensic. Sci., 1976, 7, 131-135.

4. Clarke's Isolation and Identifikation of Drugs, Ed. A.C. Moffat, The Pharmaceutical Press, London, 1986, s.743.

5. Gübitz G., Wintersteiger R.: Identification of Drugs of Abuse by High Performance Thin-Layer Chromatography. J.Anal. Toxicol., 1990, 4, 141-144.

6. Huang W., Andollo W., Hearn W.L.: A Solid Phase Extraction Technique for the Isolation and Identifikation of Opiates in Urine. J. Anal. Toxicol., 1992, 16, 307-310.

7. Jork H.: Quantitative HPTLC in the field of pharmaceutical applications. Proceedings of the Fourth International Symposium on Instrumental High Performance Thin Layer Chromatography, H. Traitler, A. Studer, R.E Kaiser, Eds. Selvino/Bergamo, Italy, 1987, p.193.

8. Lillsunde P., Korte T.: Drug screening in urine using solid phase extraction and combined thin-layer chromatography and gas chromatography/mass spectrometry identification *J.Anal. Toxicol.*, 1991, 15, 71-81.

9. Matsumoto H., Szukalski B., Podleśny J., Gaździk J., We-reżyńska T., Maszkiewicz J.: Zastosowanie metody immunofluorescencyjnej w świetle spolaryzowanym (FPIA) w diagnostyce laboratoryjnej uzależnień. *Ter. Monitor.*, 1989, 2, 22-37.

10. Recommended Methods for the Detection and Assay of Heroin and Cannabinoids in Biological Specimens, United Nations, New York, 1993.

11. Scheurer J., Moore C.M.: Solid-Phase Extraction of Drugs from Biological Tissues - A Review, *J. Anal. Toxicol.*, 1992, 16, 264-269.

12. Ulotka informacyjna: The TDx System Abbott introduces a new analyser for abused drug testing.