

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

OPTIMALIZACE METODY PRO ANALÝZY OPIÁTŮ V MOČI POMOCÍ GC-MS

VILMA HABRDOVÁ A MARIE BALÍKOVÁ

Ústav soudního lékařství a toxikologie, 1. lékařská fakulta, Univerzita Karlova v Praze, Na bojišti 3, 121 08 Praha 2
e-mail: vhabr@lf1.cuni.cz

Došlo dne 3.IV.2001

Klíčová slova: moč, opiáty, plynová chromatografie, hmotnostní spektrometrie

Úvod

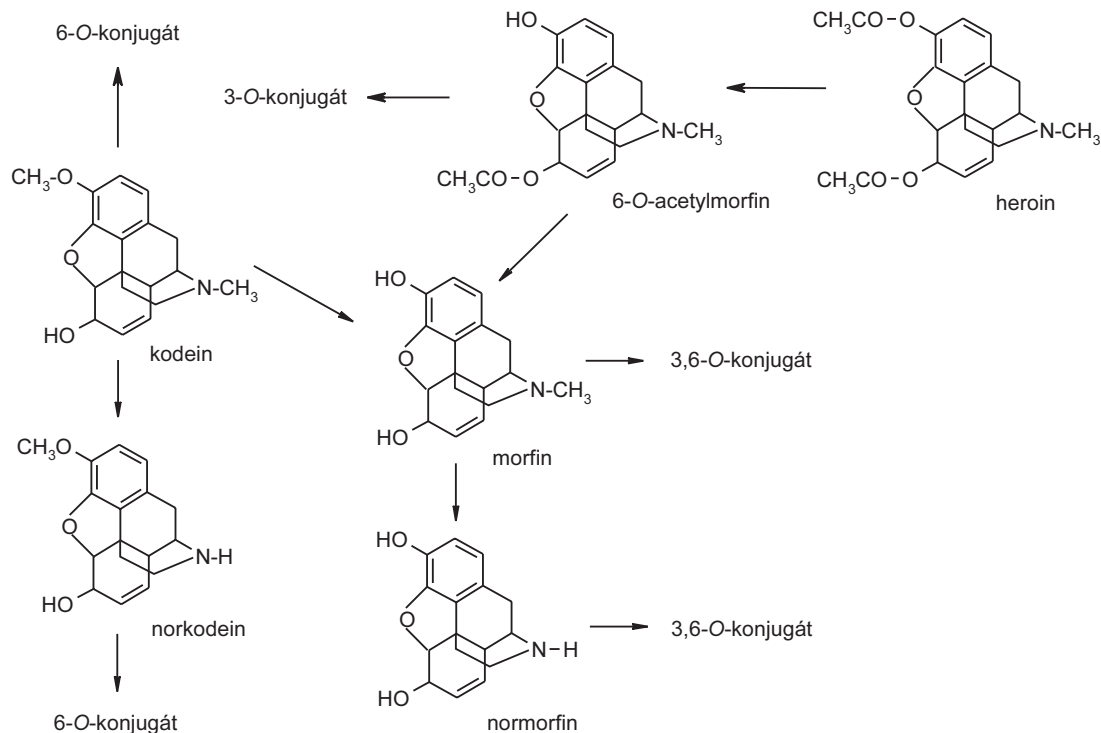
Opiáty jsou terapeuticky užívány jako analgetika k potlačení silných bolestí známého původu, např. v pooperačním stavu či ve finální fázi onemocnění rakovinou, avšak jsou také zneužívány pro svoje euforizující a anxiolytické účinky^{1,2}. Při forenzním jednání může být důležité analytické odlišení aplikace heroinu (3,6-*O*-diacetylmorfin) od ostatních opiátů³.

Heroin (plazmatický poločas 3–5 min) se velmi rychle metabolizuje na 6-monoacetylmorfin (6-MAM, plazmatický

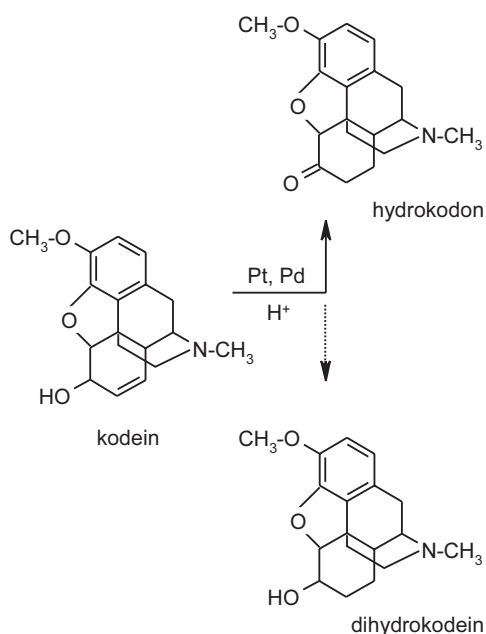
poločas 45 min), který je dále metabolizován na morfin (poločas cca 4 h) a normorfin (obr. 1). V krvi nebo v moči detegovaný 6-MAM je specifickým markerem nedávného užití heroinu. Proto by metoda na průkaz opiátů měla být zaměřena na potvrzení přítomnosti 6-MAM spolu s morfinem a kodeinem, neboť tyto látky bývají nalézány v moči po požití heroinu^{2-4,6}. Kodein je v tomto případě rozkladným produktem příměsi acetylkodeinu v ilegální droze, není metabolitem heroinu.

Kodein a dihydrokodein mají terapeutické užití jako léky tlumící kašel. Mohou však být součástí ilegálně připravované české opiátové speciality – směsi „Brown“ (obr. 2). Ilegální příprava „Brownu“ z kodeinu byla odhalena J. Večerkovou⁷ na přelomu sedmdesátých a osmdesátých let. Obě látky se metabolizují *O*-demethylací na morfin, resp. dihydromorfin, a *N*-demethylací na norkodein, normorfin, resp. nordihydrokodein, nordihydromorfin, a dále konjugací původní formy látky i metabolitů s glukuronovou kyselinou^{1,2,5,6}.

K průkazu škodlivin (nox) a jejich kvantifikaci v biologických vzorcích lze využít různých analytických postupů a metod. Univerzální extrakce látek z biologických tekutin organickým rozpouštědlem (LLE – liquid–liquid extraction) je stále více vytěsňována extrakcí na tuhou fázi (SPE – solid-phase extraction)^{3,8}. Ve forenzní toxikologii je jako metoda konečného potvrzení nálezu vyžadována specifická metoda obvykle na bázi plynové chromatografie spojené s hmotnostní spektrometrií (GC-MS) (cit.^{5,8-13}).



Obr. 1. Schéma biotransformace heroinu, morfinu a kodeinu



Obr. 2. Schéma přípravy ilegální tekutiny „Brown“

V předkládaném příspěvku je detailně hodnocena metoda pro stopové analýzy různých opiátů (dihydrokodein, dihydromorfin, nordihydrokodein, kodein, hydrokodon, morfin, norkodein, 6-monoacetylmorfin) v moči využitím GC-MS. Univerzální způsob ionizace elektronovým nárazem ve sken modu je vhodný pro detekci a identifikaci neznámých sloučenin. Analýza specifikovaných látek, v našem případě směsi opiátů, je však citlivější v SIM modu (selected ion monitoring) a je preferována při kvantifikaci. V literatuře jsou popsány různé způsoby derivatizace opiátů pro stopové analýzy GC-MS (cit. 8–13). Při analýzách toxikologických vzorků metodou GC-MS se často volí převedení analytů na trimethylsilylderiváty^{5,8–10,13}. V dříve publikované práci⁸ jsme k silylaci použili MSTFA (*N*-methyl-*N*-(trimethylsilyl)trifluoroacetamid) a zaznamenali jsme zlepšení opakovatelnosti stanovení hydrokodonu a hydromorfonu ve srovnání se silylací pomocí BSTFA (*N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid). Nicméně opakovatelnost silylace *N*-desmethylmetabolitů opiátů nebyla uspokojivá. Zlepšení jsme zaznamenali při použití MSTFA ve směsi s jodidem amonným stabilizované 1,2-bis(trimethylsilyl)sulfanyljethanem. Tato silylační směs doporučovaná v dopingové analýze¹³ byla použita pro optimalizaci stanovení opiátů ve vzorcích lidské moči *in vitro* obohacené směsí opiátů a deuterovaného morfinu jako vnitřního standardu metodou GC-MS.

Experimentální část

Reagencie

Všechny použité chemikálie byly v kvalitě p.a. Silylační činidla *N*-methyl-*N*-(trimethylsilyl)trifluoroacetamid (MSTFA), *N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid (BSTFA), trimethylchlorsilan (TMCS), stabilizátor 1,2-bis(trimethylsilyl)sulfanyljethan a jodid amonný (NH₄I) pocházela od firmy Fluka Chemie, Švýcarsko.

Kolony pro extrakci na tuhou fázi Bond Elut Certify pocházely od firmy Varian, USA. Velikost kolony: 10 ml na 130 mg sorbentu, typ sorbentu: směšná pevná fáze C8 a SCX (silně kyselé měnič kationů na bázi benzensulfonové kyseliny).

Referenční standardní substance použité pro analýzy GC-MS

Dihydrokodein hydrogentartarát, relativní molekulová hmotnost M_r 451,5, dihydromorfin báze, M_r 287,4 (Napp Research Centre, UK), nordihydrokodein trifluoroacetát monohydrát, M_r 418,3, morfin (*N*-C[²H₃]) monohydrát, M_r 306,4 (Lipomed, Švýcarsko), kodein-fosfát seskvihydrát, M_r 406,4, morfin hydrochlorid trihydrát, M_r 375,8, 6-*O*-acetylmorfin-hydrochlorid monohydrát, M_r 381,9 (UNDCP Vídeň, Rakousko), hydrokodon hydrogentartarát, M_r 449,5 (Sigma, USA), norkodein hydrochlorid trihydrát, M_r 375,8 (Makor Chemie, Izrael).

Podmínky analýzy GC-MS

K analýze sloužil plynový chromatograf HP 6890 s hmotnostním detektorem MSD 5973 vybavený automatickým dávkovačem vzorků (Hewlett Packard, USA), kolona HP-5 MS, 30m × 250 μm × 0,25 μm (Hewlett Packard, USA), nosný plyn helium při konstantní průtokové rychlosti 1 ml.min⁻¹, teploty: splitless injektor 250 °C, přechodník (auxiliary) 270 °C, teplotní program na kapiláře: 85 °C po 2 min, 30 °C.min⁻¹ do 220 °C, dále 3 °C.min⁻¹ do 260 °C, dále 15 °C.min⁻¹ do 280 °C, 280 °C konstantně po dobu 3,5 min, celková doba analýzy 25 min.

Při pokusech byla použita ionizace elektronovým nárazem (EI) v SIM modu za standardních podmínek uvedených v tabulce I.

Pracovní postupy

Příprava pracovního roztoku a vzorků moči *in vitro*

Z každé referenční substance byl připraven zásobní roztok v methanolu o koncentraci 200 μg.ml⁻¹. Pracovní roztok byl

Tabulka I
GC-MS podmínky pro stanovení opiátů v SIM modu

| Analyt ^a | Počátek akvizice [min] | Monitorované <i>m/z</i> | Prodleva [ms] |
|-------------------------|------------------------|-------------------------|---------------|
| DHC.TMS | 13,00 | 373, 315, 282, 236 | 25 |
| DHM.2TMS | 13,41 | 431, 416, 373, 236 | 25 |
| NDHC.2TMS | 14,00 | 431, 416, 316 | 20 |
| COD.TMS | 14,00 | 371, 356, 343 | 20 |
| HC.TMS | 14,48 | 371, 356, 313, 234 | 25 |
| MO-D ₃ .2TMS | 15,00 | 432, 417, 404 | 20 |
| MO.2TMS | 15,00 | 429, 414, 401, 236 | 20 |
| NCOD.2TMS | 15,30 | 429, 414, 292, 250 | 25 |
| 6-MAM.TMS | 16,15 | 399, 340, 324, 287 | 25 |

^a DHC dihydrokodein, DHM dihydromorfin, NDHC nordihydrokodein, COD kodein, HC hydrokodon, HM hydromorfon, MO morfin, NCOD norkodein, 6-MAM 6-*O*-acetylmorfin, MO-D₃ vnitřní standard deuterovaný morfin, TMS trimethylsilyl

směsí analytů připravenou smísením zásobních roztoků o konečné koncentraci 20 ng.μl⁻¹ pro každou substanci.

Stanovení přesnosti a hodnocení výtěžnosti extrakce bylo prováděno v matrici lidské moči prosté opiátů a jiných léčiv. Vzorky moči byly obohacovány standardní směsí opiátů tak, aby bylo dosaženo výsledných koncentračních hladin 10, 100, resp. 500 ng.ml⁻¹. Jako vnitřní standard pro stanovení byl použit roztok deuterovaného morfinu o koncentraci 50 ng v 10 μl methanolu. Tento podíl vnitřního standardu byl přidán k 1 ml vzorku moči před extrakcí. Vzorky o odpovídající 100% extrakční výtěžnosti byly simulovány odpařením příslušného množství směsi standardů opiátů a vnitřního standardu a následnou silylací odparku.

Dále byly zjišťovány parametry kalibračních závislostí pro jednotlivé látky. Kalibrační vzorky o koncentracích 0, 5, 10, 50, 100, 500, 1000, 3000 a 5000 ng.ml⁻¹ byly připraveny přidávkem odpovídajícího množství směsi opiátů k 1 ml vzorků negativní moči.

Úprava vzorku a derivatizace

1 ml moči s přidávkem stanovených opiátů a vnitřního standardu byl extrahován na kolonkách Bond Elut Certify⁸. Ke každému vzorku byl před extrakcí přidán 1 ml pufru TRIS (tris(hydroxymethyl)aminomethan, pH 9). Po promíchání byl takto upravený vzorek aplikován na kolonku SPE předtím kondicionovanou 2 ml methanolu a 2 ml deionizované vody. Balastní látky zachycené na kolonce byly odstraněny promytím 2 ml deionizované vody, 1 ml octanového pufru (pH 4) a 2 ml methanolu. Analyty byly eluovány z vysušené kolonky do vialky dvakrát 1 ml denně čerstvě připravované směsi dichlormethan/propan-2-ol/hydroxid amonný (25%), 78:20:2 (v/v/v). Po odpaření rozpouštědel byl suchý extrakt silylován 100 μl zvoleného silylačního činidla při 80 °C po dobu 20 min. Alternativně byla použita tato činidla: MSTFA nebo MSTFA + 5 % TMCS nebo BSTFA nebo BSTFA + 5 % TMCS, resp. MSTFA/NH₄I/stabilizátor. 1 μl byl analyzován pomocí GC-MS.

Výsledky

Záměrem práce bylo nalézt optimální metodu GC-MS pro stanovení škály uvedených opiátů včetně problematických *N*-desmethylmetabolitů a ketosloučenin hydrokodonu a hydromorfonu. Jak vyplývá z tabulky II, derivatizace samotných standardních substancí bez rušivých vlivů biologické matrice pomocí BSTFA nebo BSTFA + 5 % TMCS nevedla k uspokojivé opakovatelnosti stanovení nordihydrokodeinu a norkodeinu. Hodnoty opakovatelnosti (variační koeficient CV (%)) pro tyto látky byly lepší při použití MSTFA nebo MSTFA + 5 % TMCS, resp. MSTFA/NH₄I/stab. V tabulce III jsou již uvedeny výsledky opakovatelnosti stanovení ve vzorcích moče při silylaci MSTFA a MSTFA/NH₄I/stab. Experimenty hodnotící přesnost stanovení na koncentračních hladinách 10, 100 a 500 ng.ml⁻¹ vykázaly hodnoty variačních koeficientů v rozsahu 0,5 až 16,2 % (průměr 5,9 %, medián 4,7 %) pro jednotlivé opiáty. Výjimku tvoří hydrokodon na hladině 500 ng.ml⁻¹, jehož CV byl 21,3 %. Hydrokodon obsahuje ketoskupinu, která může enolizovat. Problematičnost derivatizace sloučenin tohoto typu je obecně známa.

Tabulka II

Opakovatelnost silylace čistých standardních látek různými činidly – variační koeficienty CV (%). Množství teoreticky odpovídá 500 ng.ml⁻¹ moči při 100% výtěžnosti extrakce (*n* = 6)

| Analyt ^a | CV | | | | |
|---------------------|---------------------------------|-------|------------------|-------|------------------|
| | MSTFA + NH ₄ I+stab. | MSTFA | MSTFA + 5 % TMCS | BSTFA | BSTFA + 5 % TMCS |
| DHC | 0,9 | 1,8 | 2,0 | 3,9 | 4,8 |
| DHM | 1,2 | 1,3 | 1,4 | 5,0 | 6,1 |
| NDHC | 9,0 | 6,8 | 7,7 | 25,1 | 49,6 |
| COD | 0,6 | 1,3 | 1,6 | 3,7 | 4,5 |
| HC | 1,3 | 2,3 | 8,1 | 7,0 | 4,2 |
| MO | 0,9 | 0,9 | 1,7 | 4,5 | 5,2 |
| NCOD | 7,2 | 5,2 | 6,2 | 12,4 | ^b |
| 6-MAM | 0,7 | 1,7 | 1,6 | 2,7 | 5,5 |

^a viz tabulka I, ^b nehodnoceno, nereprodukovatelné výsledky

Tabulka III

Opakovatelnost stanovení (variační koeficienty CV (%)) vybraných opiátů v moči pomocí GC-MS v SIM modu při použití MSTFA (cit.⁸) a MSTFA/NH₄I/stab., koncentrace směsi opiátů (c) 10, 100 a 500 ng.ml⁻¹

| Analyt ^a | MSTFA (<i>n</i> = 9) | | MSTFA/NH ₄ I/stab. (<i>n</i> = 6) | | |
|---------------------|-----------------------|--------------|---|------|------|
| | 10 | 100 | 10 | 100 | 500 |
| DHC | 6 | 10 | 8,3 | 2,3 | 3,3 |
| DHM | – | – | 1,4 | 4,7 | 2,4 |
| NDHC | – | – | 16,2 | 15,2 | 8,4 |
| COD | 6 | 4 | 11,7 | 2,1 | 4,2 |
| HC | 23 | 21 | 8,1 | 7,7 | 21,3 |
| HM | 20 | 23 | – | – | – |
| MO | ^b | 4 | 5,2 | 1,8 | 0,5 |
| NCOD | ^b | ^b | 9,6 | 9,5 | 5,2 |
| 6-MAM | – | – | 2,8 | 3,3 | 2,1 |

^a viz tab I., ^b nehodnoceno, nereprodukovatelné výsledky

Časová stabilita připravené silylační směsi MSTFA/NH₄I/stab. skladované při 4 °C byla průběžně kontrolována pomocí GC-MS analýz standardních směsí opiátů. Bylo zjištěno, že používání dva měsíce skladované silylační směsi nevede k významným změnám v opakovatelnosti stanovení.

Hodnoty výtěžnosti extrakce opiátů z moče na koncentračních hladinách 100 a 500 ng.ml⁻¹ byly počítány z hodnot koncentrací jednotlivých opiátů (koncentrace vypočtena z poměrů ploch měřených substancí k vnitřnímu standardu, *n* = 6) a vztaheny k hodnotám koncentrací pro referenční silylované směsi standardů (*n* = 6). Hodnoty výtěžností se pohybovaly v rozsahu 87–110 % vyjma hydrokodonu, jehož výtěžnost byla jen 55 %. Výtěžnosti *N*-desmethylmetabolitů opiátů jsou vlivem interferencí zdánlivě vyšší než 100 % (viz tabulka IV).

Měření kalibračních závislostí jsme určili rozsah linearity pro individuální opiáty 0–500 ng.ml⁻¹ s korelačním koeficientem > 0,9887 (viz tabulka V). Zjištěná mez stanovitelnosti (LOQ) při poměru S/N > 10 se pohybovala kolem 10 ng.ml⁻¹,

Tabulka IV

Výtěžnost extrakce (%) jednotlivých opiátů na koncentračních hladinách (c) 100 a 500 ng.ml⁻¹ (n = 6)

| Analyt ^a | 100 | 500 |
|---------------------|-----|-----|
| DHC | 100 | 98 |
| DHM | 87 | 89 |
| NDHC | 223 | 103 |
| COD | 102 | 99 |
| HC | 55 | 55 |
| MO | 100 | 98 |
| NCOD | 394 | 110 |
| 6-MA | 106 | 108 |

^a viz tab I.

Tabulka V

Kalibrační závislosti stanovení jednotlivých opiátů v rozsahu 0–500 ng.ml⁻¹; x koncentrace stanovované látky (ng.ml⁻¹), y odezva detektoru – plocha pod píkem

| Analyt ^a | Rovnice lineární regrese | Korelační koeficient R ² |
|---------------------|--------------------------|-------------------------------------|
| DHC | y = 0,0233x + 0,2792 | 0,9937 |
| DHM | y = 0,0310x + 0,3712 | 0,9943 |
| NDHC | y = 0,0136x + 0,0988 | 0,9976 |
| COD | y = 0,0197x + 0,2133 | 0,9965 |
| HC | y = 0,0119x + 0,2785 | 0,9887 |
| MO | y = 0,0212x + 0,2442 | 0,9965 |
| NCOD | y = 0,0115x + 0,1316 | 0,9940 |
| 6-MAM | y = 0,0260x + 0,1563 | 0,9982 |

Tabulka VI

Zjištěná mez detekce (LOD, S/N > 3) a mez stanovitelnosti (LOQ, S/N > 10) pro jednotlivé opiáty v moči

| Analyt ^a | LOD [ng.ml ⁻¹] | LOQ [ng.ml ⁻¹] |
|---------------------|----------------------------|----------------------------|
| DHC | 2 | 7 |
| DHM | 2 | 7 |
| NDHC | 4 | 12 |
| COD | 4 | 12 |
| HC | 3 | 10 |
| MO | 3 | 10 |
| NCOD | 3 | 10 |
| 6-MAM | 3 | 10 |

^a viz tab. Imez detekce (LOD) při poměru S/N > 3 byla kolem 3 ng.ml⁻¹ pro jednotlivé látky (viz tabulka VI).

Zjištěné přesnosti stanovení považujeme za přijatelné pro toxikologickou praxi, kde hraje významnou roli vliv komplikované biologické matrice s velkou individuální variabilitou. Pro spolehlivou detekci předem neznámých analytů v toxikologických vzorcích ve sken modu je vyžadována vyšší kon-

centrace látek (pro opiáty přibližně 50 ng.ml⁻¹), aby se získala hmotnostní spektra dostatečně kvalitní pro srovnání s referenční databází. Odbornými směrnici EU (cit.¹⁴) doporučená mez (limit) pozitivivity pro průkaz celkového morfinu v moči je 200 ng.ml⁻¹, což naše metoda spolehlivě splňuje.*Tato práce vznikla za finanční podpory výzkumného záměru č. 111100005 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy.*

LITERATURA

1. Wenke M.: *Farmakologie*. Avicenum, Praha 1990.
2. Casy A. F., Parfitt R. T.: *Opioid Analgetics*. Plenum Press, New York 1986.
3. Mauer H. H.: *J. Chromatogr.* 580, 3 (1992).
4. Galloway J. H., Ashford M., Marsh I. D., Holden M., Forrest A. R. W.: *J. Clin. Pathol.* 51, 326 (1998).
5. Balíková M., Marešová V., Habrdová V.: *J. Chromatogr., B: Biomed. Appl.* 752, 179 (2001).
6. Večerková J.: *Biotransformace léčiv a její význam pro toxikologickou praxi*. Karolinum, Praha 1997
7. Večerková J.: *Cesk. Kriminol.* 25, 216 (1992).
8. Balíková M., Marešová V., Habrdová V.: *Soud. Lekars.* 45, 11 (2000).
9. Bowie L. J., Kirkpatrick P. B.: *J. Anal. Toxicol.* 13, 326 (1989).
10. Broussard L. A., Presley L. C., Pittman T., Clouette R., Wimbish G. H.: *Clin. Chem. (Washington, D.C.)* 43, 1029 (1997).
11. Meatherall R.: *J. Anal. Toxicol.* 23, 177 (1999).
12. Kushnir M. M., Crockett D. K., Nelson G., Urry F. M.: *J. Anal. Toxicol.* 23, 262 (1999).
13. Chundela Z.: *Dizertační práce*. Univerzita Karlova v Praze, Praha 1998.
14. de la Torre R., Segura J., de Zeeuw R., Williams J.: *Ann. Clin. Biochem.* 34, 339 (1997).

V. Habrdová and M. Balíková (*Institute of Forensic Medicine and Toxicology, 1st Faculty of Medicine, Charles University, Prague*): **Optimization of Analysis of Opiates in Urine by GC-MS**

This paper describes optimization of the GC-MS method used in toxicological laboratories for trace analysis of opiates in biological matrices. Urine samples were extracted on SPE cartridges and derivatized by silylation. The precision (repeatability) of the method for determination of *N*-desmethyl metabolites of opiates was rather irreproducible when using silylation with *N*-methyl-*N*-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (MSTFA) for derivatization. The results improved when MSTFA in a mixture with NH₄I and stabilized with 1,2-bis[(trimethylsilyl)sulfanyl]ethane was used. The GC-MS method in the SIM mode is suitable for detection and quantification of traces of specific opiates in urine with the limit of detection ca. 3 ng.ml⁻¹ and the limit of quantification 10 ng.ml⁻¹. The precision of the method (variation coefficient) obtained for individual analytes at concentration levels 10, 100 and 500 ng.ml⁻¹ ranged between 0.5 and 16.2 %. Standard calibration curves for individual opiates were linear between 0 and 500 ng.ml⁻¹ with correlation coefficients above 0.9937.