

HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY – ELECTROSPRAY IONISATION MASS SPECTROMETRY METHOD FOR DETERMINATION OF METHADONE AND EDDP IN SERUM

Wojciech PIEKOSZEWSKI^{1, 2}, JAN CHROSTEK-MAJ³, Ewa FLOREK⁴,
Mariusz ŚCISŁOWSKI¹

¹*Department of Analytical Toxicology and Therapeutic Drug Monitoring, Jagiellonian University, Cracow*

²*Institute of Forensic Research, Cracow*

³*Toxicology Clinic, Jagiellonian University, Cracow*

⁴*Laboratory of Environmental Research, Department of Toxicology University of Medical Sciences, Poznań*

ABSTRACT: Methadone is narcotic analgesic which is used as analgesic and drug in substitution therapy of opiate addicts. The aim of this study was to develop method of determination of methadone (MD) and its main metabolite – 2-ethylidieno-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidine (EDDP). Methadone and EDDP was isolated from serum in a base medium (pH = 9) by liquid-liquid extraction using hexane. For the analysis of extracts, the high performance liquid chromatography and mass spectrometry (HPLC/MS) method was used in the electrospray ionisation mode (ESI), where the following were used as mobile phases: A – water with 0.1% addition of formic acid and B – acetonitrile with 5% addition of A phase on Finnigan-MAT apparatus. Chromatographic separation was carried out on a LiChroCART[®] column. The method developed was characterised by linearity of concentration ranging from 3 to 500 ng ml⁻¹ and, for EDDP from 5 to 500 ng ml⁻¹. Limit of detection (LOD) equalled 1 and 3 ng ml⁻¹ for methadone and EDDP, respectively. Limit of quantitation (LOQ) was 3 and 5 for MD and EDDP respectively. The recovery fluctuated between 84.3 and 94.3% for methadone and 90.6–98.7% for EDDP. The intra-day precision was below 3% whereas inter-day precision was below 7%. A good correlation between concentration of methadone and dose was shown. The method developed has been introduced to routine methadone monitoring of opiates addicts.

KEY WORDS: Methadone; EDDP; HPLC-ESI/MS.

Problems of Forensic Sciences, vol. LX, 2004, 28–41

Received 15 September 2004; accepted 28 December 2004

INTRODUCTION

Methadone is a synthetic analgesic and as a complete agonist of opioid receptors is used as a second-choice drug in fighting pre- and postoperative

pain and tumour-related pain, as well as a drug administered in substitutive therapy of people addicted to opium alkaloids involved in special programs. It is a racemic drug, whose effect is mainly determined by the L-isomer; however, the D-isomer also causes analgesic action, but when administered in higher doses. Methadone is absorbed fast when administered orally and metabolised in the liver by means of mono- and di- N-demethylation through CYP 3A4 and CYP 2D6 systems. As a result of demethylation, and then cyclisation, new pharmacologically inactive and chemically unstable metabolites are formed: EDDP (2-ethylidieno-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidine) and EMDP (2-ethyl-5-methyl-3,3-diphenylpyrrolidine) which undergo conjugation with glucuronic acid [6, 7, 11]. Additionally, methadol and normethadol are created in small amounts [16].

Chemical analyses of methadone and its metabolites in biological samples in previously published reports have mostly been based on gas chromatography using flame ionisation [8, 9, 10, 15], thermoionic [12] and mass detectors [3, 4]. Methadone has also been determined by means of the HPLC method [18] and immunoenzymatic methods in polarised light, as well as radioimmunoenzymatic ones [5, 14]. The latter, sensitive as they are, are nonspecific methods. Therefore, they are not useful for determination of methadone metabolites. Recent literature provides reports concerning stereoselective analysis of methadone enantiomers and EDDP. They use HPLC methods with an α -glycoprotein [1] or cyclodextrin column [17], gas chromatography [13], and a specific radioimmunoenzymatic method [2]. Only a few papers describe the determination of methadone and its metabolites in biological samples using liquid chromatography coupled with mass spectrometry [19, 20].

The aim of this paper was to develop a methodology for identification and determination of methadone and EDDP in serum using high-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry, using deuterated compounds as internal standards. The methodology developed has been used in methadone and EDDP analysis in the serum of people undergoing a methadone maintenance programme.

EXPERIMENTAL

Chemicals and reagents

(\pm)-Methadone hydrochloride (1 g in substantia) was purchased from Sigma (St. Louis MO); (\pm)-methadone-D₉, EDDP perchlorate and EDDP-D₃ perchlorate all 100 μ g/ml in methanol were purchased from Cerilliant (Austin, Texas, USA); acetonitrile and methanol were obtained from Merck

(Darmstadt, Germany); formic acid – Riedel de Haën (Seelze, Germany) and buffer TRIS (pH = 9) from Serve (Heidelberg, Germany). All reagents were analytical or HPLC grade. Standard solutions were stored at -25°C .

Instrumentation

A Finnigan-MAT liquid chromatograph coupled with mass detector LCQ (Finnigan-MAT, San Jose, CA, USA) equipped with electrospray ionisation interface and ion trap mass analyser was used for MD and EDDP analysis. The separating column was LiChroCART® (125 × 3 mm I.D., 5 µm particle size) filled with Purospher® RP-18e and a LiChroCART® precolumn (4 × 4 mm I.D., 5 µm particle size) filled with LiChrospher® 60 RP – select B obtained from Merck (Darmstadt, Germany) and the horizontal agitator purchased from Elpin (Poland).

Serum standards and controls

A standard curves was prepared by spiking negative serum with known quantities of methadone (MD), 2-ethylidieno-1,5-dimethylo-3,3-diphenylpyrrolidine (EDDP), methadone- D_9 (MD- D_9) and EDDP- D_3 . Eight points standard curves for MD and EDDP were prepared by spiking aliquots of 1 ml of negative serum. The final concentrations of MD and EDDP were 3, 5, 10, 50, 100, 200, 500, 1000 ng ml⁻¹. Three replicates were measured at each concentration level. Analyte peak area/internal standard peak area ratio was used for creating standard curves. For the examination of intra-day and inter-day precision and recovery, control samples with concentration (MD and EDDP) of 20 and 200 ng ml⁻¹ were prepared.

Analytical procedure

To all standard, control and studied samples (1 ml), 2 ml of TRIS buffer (pH = 9) was added and internal standard (MD- D_9) and (EDDP- D_3) to obtain a final concentration of 50 and 100 ng ml⁻¹ respectively. Such samples were mixed and left to achieve equilibrium for ca. 10 min. Next the samples were extracted by liquid-liquid extraction with 6 ml hexane by shaking for 10 minutes. Organic layer was filtered and evaporated to dryness in a nitrogen stream at a temperature of 50°C and dissolved in 100 µl of mix of mobile phase A and B (95:5, v/v).

LC-ESI/MS analysis

A Finnigan-MAT liquid chromatograph coupled to an LCQ mass detector, operating in electrospray ionisation mode (ESI) was used. For the analysis a gradient elution was applied using a mixture of phase A (1 ml of formic acid added to 999 ml of water) and B (50 ml of phase A mixed with 950 ml of

acetonitrile). Gradient elution at a constant flow rate of 0.4 ml/min was performed as follows: from 0 to 2 min 95% A, linear decrease to 5% A in 10 min, 1 min hold at 5% A, linear increase to 95% A in 2 min with a final hold for 5 min. The overall acquisition time was 20 min.

Ionisation of analytes was carried out using the following settings: sheath gas flow rate (nitrogen): 1 l/min, aux gas flow rate (helium): 0.15 l/min, source voltage: 4.2 kV, capillary temperature: 150°C, capillary voltage: 3 V, tube lens offset: 30 V, the first octupole offset: -3 V, the second octupole offset: -7 V, inter-octupole lens: -16 V.

Data were acquisition in full scan mode. The monitored ions were for MD - 310 m/z (molecular ion), 265 m/z (fragment); MD-D₉ - 319 m/z (molecular ion), 265 m/z (fragment ion); EDDP - 278 m/z (molecular ion), 234 m/z (fragment ion); EDDP-D₃ - 281 m/z (molecular ion), 234 m/z (fragmentation).

Validation

For validation of the method, the following parameters were determined: selectivity, range of linearity, intra- and inter-day precision, recovery, limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ).

Patients

Blood samples (5 ml) were collected in red-top tubes (without anticoagulant) and taken 4 hours after oral administration of methadone from 24 patients participating in the methadone maintenance programme. The drug dosages ranged from 40 to 90 mg. Before the analysis the samples as a serum were stored at a temperature of -20°C.

The study protocol was approved by the Bioethics Committee at the Collegium Medicum, Jagiellonian University in Cracow. The conducted study was in compliance with the Helsinki Declaration of 1964, 1975, 1983, 1989 1996. Participation in the study was voluntary.

RESULTS AND DISCUSSION

Before analysis, the mass detector parameters were optimised. For this, standard solutions of MD and EDDP (both 1.0 µg ml⁻¹) in the mixture of A and B phases 50:50 (v/v) were placed directly in the mass spectrometer (without chromatographic separation). The optimisation of parameters was performed by selection of the value of apparent molecular ion [M+H]⁺ and selecting the option of optimisation in the program, thus optimising: capillary voltage, tube lens offset, the first octupole offset, the second octupole offset,

inter-octupole lens. Two ions for each compound were monitored 310 m/z and 265 m/z for methadone and 278 m/z and 234 m/z for EDDP (Figure 1).

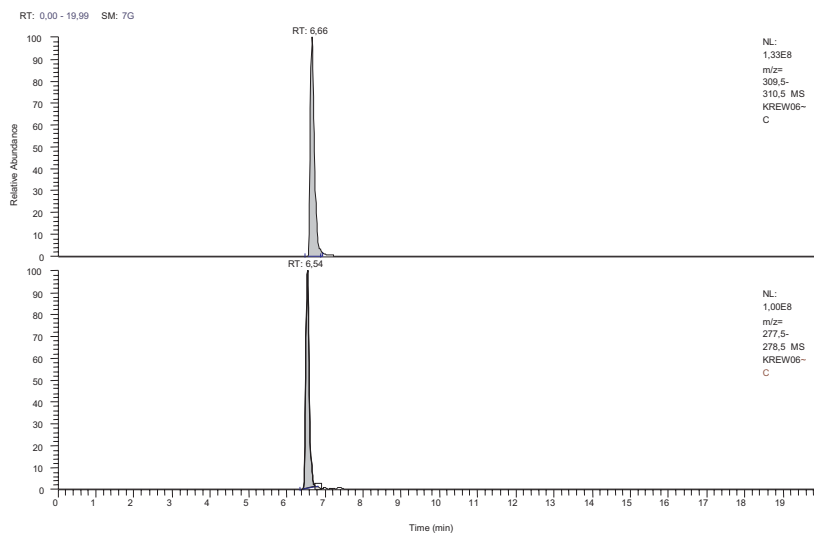


Fig. 1. Mass spectrum of methadone (top) and EDDP (bottom).

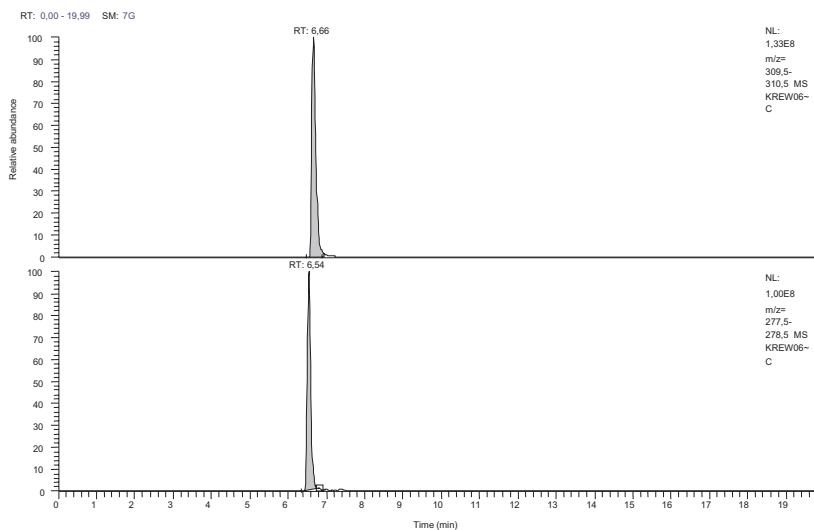


Fig. 2. Ion chromatograms of methadone ($RT=6.66$, top) and EDDP ($RT=6.54$, bottom) in spiked serum sample. Concentration 100 ng ml^{-1} .

The samples of serum fortified with methadone and its metabolite – EDDP were used for the development and validation of the quantification procedure for these compounds. In the conditions provided, a separation of

the two quantified compounds occurred. The retention time of MD (MD-D₃) and EDDP (EDDP-D₃) were approximately 6.66 and 6.54 min. respectively. Chromatographic separation of methadone (top) and EDDP (bottom) is shown in Figure 2.

For study the selectivity of the developed method six blank serum samples were checked for signals interfering with analytes. Under the chromatographic conditions there was no interferences with analytes by any extractable endogenous material present in blank serum. Because subject in methadone program are often poly-drug users interferences from opiates (morphine, codeine, 6-monoacetylmorphine) and amphetamines (amphetamine, methamphetamine, (±)-3,4-methylenedioxyamphetamine, (±)-3,4-methylenedioxymethamphetamine) were checked. There was no interference from drugs mentioned above.

An eight point standard curve was prepared by fortifying negative serum with known quantities of methadone and EDDP and their deuterated analogues were linear in the range 3–500 ng/ml for methadone and from 5 to 500 ng/ml for EDDP. Correlation coefficients of the calibration curves were, $r^2 = 0.9984$ for MD, and $r^2 = 0.9963$ for EDDP. High correlation factors and repeatability confirm the suitability of the method for chromatographic analysis of compounds of interest in biological material.

The intra-day precision was evaluated by analysing five serum samples spiked with analytes to obtain two different levels (20 and 200 ng/ml) in one series (Table I). The relative standard deviation (*RSD*) ranges were from 1.79% to 2.98% for methadone and 1.54% to 2.49% for EDDP. The inter-day precision was determined by analysing of five spiked serum samples on the same level as during study of intra-day precision (Table I).

The limit of detection (*LOD*) and determined (*LOQ*) were determined by software Xcalibur[®] for LC/MS handling, on the basis of the algorithms provided by the manufacturer. *LOD* for MD and EDDP was 1 ng/ml and 3 ng/ml respectively, which were the lowest concentrations of drugs at which the signal to noise ratio *S/N* was 3. The limit of quantification for both analytes was 3 ng/ml (MD) and 5 ng/ml (EDDP, Table I). In the LC/MS method with electrospray ionisation described by Souverian the limit of quantification of methadone was 10 ng/ml and EDDP 25 ng/ml [20]. Rossas et al. [19] used the LC/MS method for determination of methadone and its metabolite enantiomers in saliva with *LOQ* of 5 and 0.5 ng/ml respectively.

The recovery of methadone ranged from 87.5 to 93.7% and 90.6 to 95.5% for EDDP The obtained results are presented in Table I.

TABLE I. VALIDATION PARAMETERS OF HPLC-ESI/MS DETERMINATION OF METHADONE AND EDDP IN SERUM

Analyte	Linearity [ng ml ⁻¹]	Limit of detection (LOD) [ng ml ⁻¹]	Limit of quantification (LOQ) [ng ml ⁻¹]	Recovery [%] (n = 5)	Precision R.S.D [%], (n = 5)			
					Intra-day precision		Inter-day precision	
					20 ng ml ⁻¹	200 ng ml ⁻¹	20 ng ml ⁻¹ 200 ng ml ⁻¹	20 ng ml ⁻¹ 200 ng ml ⁻¹
Methadone	3–500	1	3	87.5 ± 3.2	90.6 ± 3.7	2.98 1.79	5.61 4.11	
EDDP	5–500	3	5	92.7 ± 2.9	95.5 ± 3.2	2.49 1.54	4.55 2.87	

The developed and validated method was applied to determination of methadone and its metabolite in the serum of selected (24) patients receiving methadone during opiates addiction therapy. The concentrations of studied compounds were dose dependent with coefficient of correlation 0.9444 (Figure 3).

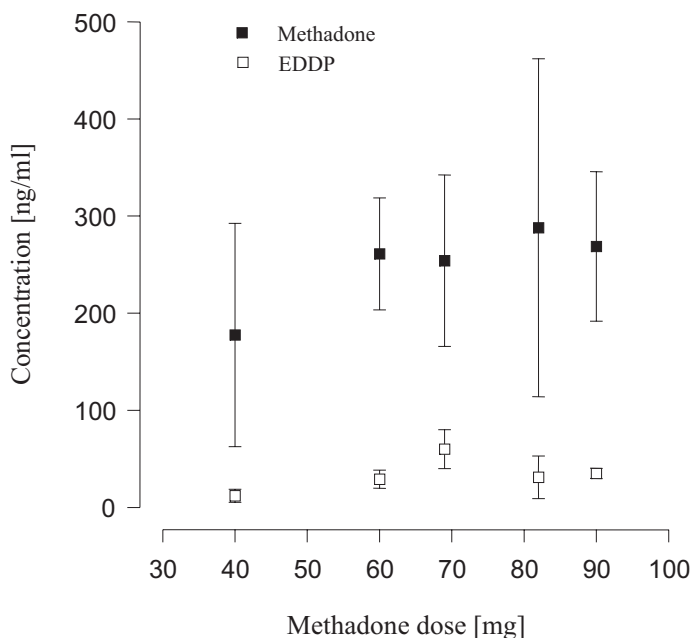


Fig. 3. Dose-concentration (MD, EDDP) relationship in 24 opiate addicts.

The ratio of methadone/EDDP was very changeable in spite of the fact that the blood was sampled from each patient at the same time after drug administration (Figure 4).

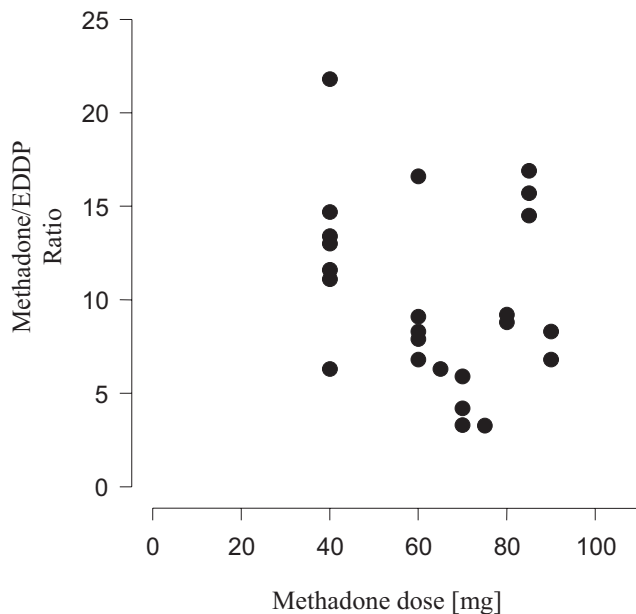


Fig. 4. Relationship between methadone/EDDP ratio and methadone concentration.

This observation indicated that there was variability in metabolism (pharmacokinetics) between patients and supported the need to monitor methadone concentration during methadone maintenance programmes.

CONCLUSION

The developed method of methadone and EDDP quantification in serum with the use of the deuterated analogues for internal standards is characterised by selectivity and sensitivity and appropriate validating parameters – linearity, precision and accuracy, allowing routine monitoring of methadone therapy and determination of these compounds in poisoning cases.

Low case study of determination of methadone and EDDP in methadone maintenance programme shown on differences in pharmacokinetics of the drugs in this population of the patients or can suggest some uncontrolled taking of methadone.

Applying of LC/MS method for monitoring methadone treated opiate addicts allowed not only for monitoring it but also for checking the taking other than opiates psychoactive compounds e.g. amphetamines.

References:

1. Angelo H. R., Beck N., Kristensen K., Enantioselective high-performance liquid chromatographic method for the determination of methadone and its main metabolite in urine using an AGP and a C8 column coupled serially, *Journal of Chromatography B* 1999, vol. 724, pp. 35–40.
2. Bartos F., Olsen G. D., Leger R. N. [et al.], Stereospecific antibodies to methadone. I. Radioimmunoassay of d,l-methadone in human serum, *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology* 1977, vol. 16, pp. 131–143.
3. Baugh L. D., Liu R. H., Walia A. S., Simultaneous gas chromatography/mass spectrometry assay of methadone and 2-ethyl-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidine (EDDP) in urine, *Journal of Forensic Sciences* 1991, vol. 36, pp. 548–555.
4. Bermejo A. M., Seara R., Dos Santos Lucas A. C. [et al.], Use of solid-phase microextraction (SPME) for the determination of methadone and its main metabolite, EDDP, in plasma by gas chromatography-mass spectrometry, *Journal of Analytical Toxicology* 2000, vol. 24, pp. 66–78.
5. Cheever M. L., Armendariz G. A., Moody D. E., Detection of methadone, LAAM, and their metabolites by methadone immunoassays, *Journal of Analytical Toxicology* 1999, vol. 23, pp. 500–505.
6. Chikhi-Chorfi N., Pham-Huy C., Galons H. Manuel N. [et al.], Rapid determination of methadone and its major metabolite in biological fluids by gas-liquid chromatography with thermionic detection for maintenance treatment of opiate addicts, *Journal of Chromatography B* 1998, vol. 718, pp. 278–284.
7. Danysz A., Gryglewski R., Farmakologia, PZWL, Warszawa 1982.
8. Fransioli M. G., Szabo E. T., Sunshine I., Detection of methadone and propoxyphene in stored tissue, *Journal of Analytical Toxicology* 1980, vol. 4, pp. 46–48.
9. Greizerstein H. B., McLaughlin I. G., Sensitive method for the determination of methadone in small blood samples, *Journal of Chromatography* 1983, vol. 264, pp. 312–315.
10. Inturrisi C. E., Verebely K., A gas-liquid chromatographic method for the quantitative determination of methadone in human plasma and urine, *Journal of Chromatography* 1972, vol. 65, pp. 361–369.
11. Iribarne C., Berthou F., Baird S. [et al.], Involvement of cytochrome P450 3A4 enzyme in the N-demethylation of methadone in human liver microsomes, *Chemical Research in Toxicology* 1996, vol. 9, pp. 365–371.
12. Jacob P., Rigod J. F., Pond S. M. [et al.], Determination of methadone and its primary metabolite in biologic fluids using gas, *Journal of Analytical Toxicology* 1981, vol. 5, pp. 292–295.
13. Kristensen K., Angelo H. R., Stereospecific gas chromatographic method for determination of methadone in serum, *Chirality* 1992, vol. 4, pp. 263–267.

14. Ling G. S. F., Umans J. G., Inturrissi C. E., Methadone: radio-immunoassay and pharmacokinetics in the rat, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1981, vol. 217, pp. 147–151.
15. Lynn R. K., Leger R. M., Gordon W. P. [et al.], New gas chromatographic assay for the quantification of methadone. Application in human and animal studies, *Journal of Chromatography* 1977, vol. 131, pp. 329–340.
16. Moore C., Guzaldo F., Hussain M. J. [et al.], Determination of methadone in urine using ion trap GC/MS in positive ion chemical ionisation mode, *Forensic Sciences International* 2001, vol. 119, pp. 155–160.
17. Pham-Huy C., Chikhi-Chorfi N., Galons H. [et al.], Enantioselective high-performance liquid chromatography determination of methadone enantiomers and its major metabolite in human biological fluids using a new derivatized cyclodextrin-bonded phase, *Journal of Chromatography B* 1997, vol. 700, pp. 155–163.
18. Pierce T. L., Murray A. G. W., Hope W., Determination of methadone and its metabolites by high performance liquid chromatography following solid-phase extraction in rat plasma, *Journal of Chromatographic Sciences* 1992, vol. 30, pp. 443–447.
19. Rosas M. E. R., Preston K. L., Epstein D. H. [et al.], Quantitative determination of the enantiomers of methadone and its metabolite (EDDP) in human saliva by enantioselective liquid chromatography with mass spectrometric detection, *Journal of Chromatography B* 2003, vol. 796, pp. 355–370.
20. Souverain S., Rudaz S., Ortelli D. [et al.], Use of large particles support for fast analysis of methadone and its primary metabolite in human plasma by liquid chromatography-mass spectrometry, *Journal of Chromatography B* 2003, vol. 784, pp. 117–123.

OZNACZANIE METADONU I EDDP W SUROWICY METODĄ CHROMATOGRFII CIECZOWEJ SPRZĘŻONEJ ZE SPEKTROMETRIĄ MAS

Wojciech PIEKOSZEWSKI, JAN CHROSTEK-MAJ, Ewa FLOREK,
Mariusz ŚCISŁOWSKI

WSTĘP

Metadon jest syntetycznym lekiem przeciwbólowym i jako antagonistą receptorów opioidowych jest stosowany jako lek uzupełniający w leczeniu bólu przed- i pooperacyjnego, bólu w chorobach nowotworowych i w terapii substytucyjnej osób uzależnionych od opiatów. Metadon jest lekiem stosowanym w formie mieszaniny racemicznej, którego bardziej aktywnym przeciwbólowo składnikiem jest izomer L. Lek ten szybko wchłania się z przewodu pokarmowego i ulega metabolizmowi w wątrobie w wyniku mono- i dimetylacji przy udziale cytochromu CYP 3A4 i CYP 2D6. W wyniku demetylacji i cyklizacji powstają nowe nieaktywne farmakologicznie, niestabilne metabolity: EDDP (2-etylenodieno-1,5-dimetylo-3,3-difenylpirolidyna) i EMDP (2-etylo-5-metylo-3,3-difenylpirolidyna) [6, 7, 11]. Dodatkowo w wyniku metabolizmu w nieznacznych ilościach powstają: metadol i normetadol [16].

Opisywane do tej pory metody oznaczania metadonu w materiale biologicznym to chromatografia gazowa z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym [8, 9, 10, 15], termioionowym [12] oraz masowym [3, 4]. Metadon był oznaczany również metodą HPLC [18], metodami immunoenzymatycznymi i radioimmunologicznymi [5, 14]. W ostatnich latach w piśmiennictwie odnaleźć można informacje na temat stereoselektywnej analizy metadonu i EDDP. W tym celu była wykorzystywana metoda HPLC z kolumnami α -glikoproteinowymi [1] lub cyklodekstranowymi [17], a także metoda chromatografii gazowej [13] i radioimmunologiczna [2]. Niewiele jest natomiast informacji na temat zastosowania do oznaczania metadonu i jego metabolitów w materiale biologicznym chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas [19, 20].

Celem pracy było opracowanie metody identyfikacji i oznaczania metadonu oraz EDDP w osoczu z zastosowaniem chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas z wykorzystaniem deuterowanych związków jako wzorców wewnętrznych. Opracowana metodyka została wykorzystana do oznaczeń metadonu i jego metabolitu we krwi pobranej od pacjentów leczonych metadonem.

CZEŚĆ DOŚWIADCZALNA

Odczynniki

Chlorowodorek (\pm)-metadonu był zakupiony w firmie Sigma (St. Louis, Stany Zjednoczone); nadchloran (\pm)-metadonu-D₉, EDDP i nadchloran EDDP-D₃ w roztworze 100 μ g/ml w metanolu pochodziły z firmy Cerilliant (Austin, Stany Zjednoczo-

ne); acetonitryl i metanol pochodziły z firmy Merck (Darmstadt, Niemcy); kwas mrówkowy – z firmy Riedel de-Haën (Seelze, Niemcy), zaś bufor TRIS (pH = 9) z Serve (Heidelberg, Niemcy). Wszystkie odczynniki posiadały czystość do HPLC. Substancje wzorcowe przechowywano w temperaturze -25°C .

Aparatura

Do oznaczeń metadonu i EDDP wykorzystano chromatograf cieczowy Finnigan-MAT sprzężony z detektorem masowym LCQ (Finnigan-MAT, San Jose, Stany Zjednoczone). Do analizy zastosowano kolumnę LiChroCART[®] (125 × 3 mm I.D., 5 μm) z wypełnieniem Purospher[®] RP-18e oraz prekolumny LiChroCART[®] (4 × 4 mm I.D., 5 μm) z wypełnieniem LiChrospher[®] 60 RP-select B, zakupionymi w firmie Merck (Darmstadt, Niemcy).

Próby wzorcowe i kontrolne

Krzywa kalibracyjna została przygotowana przez dodanie do surowicy „zerowej” (niezawierającej żadnych leków) ściśle określonej ilości metadonu (MD), EDDP, metadonu-D₉ (MD-D₉) i EDDP-D₉. Stężenia przygotowanych roztworów wzorcowych MD i EDDP wynosiły: 3, 5, 10, 50, 100, 200, 500 i 1000 ng/ml. Analizę każdej próbki wzorcowej przeprowadzono trzykrotnie. W celu sporządzenia krzywej kalibracyjnej wykorzystano stosunek pola pod pikiem badanego związku do odpowiedniego standardu wewnętrznego. Dla oszacowania powtarzalności opracowanej metody, a także odzysku, przygotowano próbki kontrolne o stężeniu analitów 20 i 200 ng/ml.

Procedura analityczna

Do wszystkich prób wzorcowych, kontrolnych i badanych (1 ml) dodawano 2 ml buforu TRIS (pH = 9) oraz standardy wewnętrzne (MD-D₉ i EDDP-D₉) w ilości pozwalającej na osiągnięcie stężenia końcowego odpowiednio 50 i 100 ng/ml. Tak przygotowane próbki mieszano i pozostawiano na 10 min. Następnie dodawano 6 ml heksanu i całość wytrząsano przez 10 min. Fazę organiczną po przesączeniu odparowywaniu w strumieniu azotu w temperaturze 50°C , a otrzymaną suchą pozostałość rozpuszczano w 0,1 ml mieszaniny faz A i B w stosunku 95:5, v/v.

Analiza metodą LC-ESI/MS

Do badań zastosowano chromatograf cieczowy Finnigan-MAT sprzężony ze spektrometrem mas LCQ pracujący w opcji jonizacji przez elektrorozpylanie (ESI). Zastosowano gradient składu fazy ruchomej A (1 ml kwasu mrówkowego i 999 ml wody) i B (50 ml fazy A i 950 ml acetonitrylu). Zmiany składu fazy ruchomej były następujące: od 0 do 2 min 95% A, następnie skład ten ulegał zmniejszeniu do 5% A w ciągu 10 minut i był utrzymywany przez 1 min. Po upływie tego czasu zawartość fazy A wzrastała do 95% w ciągu 2 minut i była utrzymywana przez kolejne 5 min. Szybkość przepływu fazy była stała i wynosiła 0,4 ml/min. Jonizacja analitów dokonywała się w następujących warunkach: przepływ gazu rozpraszającego (azot): 1 l/min, przepływ gazu osłonowego (hel): 0,15 l/min, napięcie źródła: 4,2 kV, temperatura kapilary: 150°C , napięcie kapilary: 3 V, napięcie soczewki: 30 V, napięcie pierwszego oktupola: -3 V, napięcie drugiego oktupola: -7 V, napięcie pośredniego oktupola: -16 V. Prowadzono monitorowanie jonów 310 m/z (jon molekularny) i 267 m/z

(jon fragmentacyjny) dla MD, dla MD-D₉ – 319 m/z (jon molekularny), 265 m/z (jon fragmentacyjny); dla EDDP – 278 m/z (jon molekularny), 234 m/z (jon fragmentacyjny); dla EDDP-D₃ – 278 m/z (jon molekularny) i 234 m/z (jon fragmentacyjny).

Walidacja

Opracowano następujące parametry walidacyjne metody: selektywność, zakres liniowości, precyzję w ciągu dnia i pomiędzy dniami, odzysk, limit wykrywalności (*LOQ*) i limit oznaczalności (*LOD*).

Pacjenci

Próby krwi (5 ml) od 24 pacjentów leczonych metadonem były pobierane do probówek bez antykoagulantu w 4 godziny po podaniu leku. Dawka metadonu wahała się od 40 do 90 mg. Do czasu analizy próby surowicy były przechowywane w temperaturze –20°C. Protokół badań został zaakceptowany przez Lokalną Komisję Bioetyczną przy Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. Badania zostały przeprowadzone zgodnie z Deklaracją Helsińską z lat 1964, 1975, 1983, 1989, 1996, a udział w nich był dobrowolny.

WYNIKI I ICH DYSKUSJA

Przed przystąpieniem do badań dokonano optymalizacji parametrów pracy detektora masowego. Do spektrometru masowego wprowadzono wzorcowy roztwór MD i EDDP (1 µg/ml) w mieszaninie fazy A i B 50:50 (v/v). Optymalizację przeprowadzono zgodnie z zaleceniami producenta aparatu. Optymalizowano napięcie źródła, temperaturę kapilary, napięcie kapilary, napięcie soczewki oraz napięcie pierwszego i drugiego oktopola. Monitorowano dwa jony każdego analitu – 310 i 265 m/z dla metadonu i 278 i 234 m/z dla EDDP (rycina 1).

Próby surowicy wzbogacone metadonem i EDDP były wykorzystane do opracowania i walidacji metody analitycznej. W wybranych warunkach następowało całkowite rozdzielenie oznaczanych związków. Czas retencji metadonu i jego deuterowanego analogu wynosił 6,66 min, a EDDP i EDDP-D₃ – 6,54 min. Rozdział chromatograficzny metadonu (górze) i EDDP (dół) został przedstawiony na rycinie 2.

Badając selektywność metody, wprowadzono na kolumnę chromatograficzną ekstrakt z 6 różnych prób surowicy. Nie zaobserwowano interferencji żadnych substancji endogennych zawartych w surowicy z oznaczanymi związkami. Ponieważ uczestnicy programu metadonowego często przyjmują inne środki psychotropowe, sprawdzono możliwość wpływu na wyniki analiz najczęściej wykrywanymi w materiale biologicznym pochodzącym od osób uzależnionych związkami (morfina, kodeina, 6-monoacetylmorfina, amfetamina MDA, MDMA). Nie wykazano interferencji MD i EDDP z wymienionymi wyżej związkami.

Krzywa kalibracyjna przygotowana przez dodanie do 8 prób surowicy „zerowej” odpowiednich ilości metadonu i EDDP i ich deuterowanych analogów wykazywała liniowość w zakresie stężeń od 3–500 ng/ml dla metadonu i 5–500 ng/ml dla EDDP. Współczynnik korelacji otrzymanej krzywej kalibracyjnej r^2 wynosił 0,9984 dla metadonu i 0,9963 dla EDDP. Te wysokie współczynniki korelacji potwierdzają przy-

datność opracowanej metody do oznaczania metadonu i jego metabolitów w surowicy pacjentów.

Precyzję metody w ciągu dnia badano, analizując 5 próbek z dodatkiem oznaczanych związków w stężeniach 20 i 200 ng/ml (tabela I). Względny współczynnik zmienności (*RSD*) wynosił dla metadonu 1,79% i 2,89%, a dla EDDP 1,54% i 2,49% (w zależności od stężenia). Wyznaczona precyzja opracowanej metody pomiędzy dniami dla badanych związków była na identycznym poziomie (tabela I). Granice wykrywalności (*LOD*) i oznaczalności (*LOQ*) były wyznaczane z wykorzystaniem oprogramowania Xcalibur® w oparciu o algorytm zaproponowany przez producenta aparatu. *LOD* dla metadonu wynosiła 1 ng/ml, a dla EDDP 3 ng/ml, co odpowiadało stężeniu analitów w przypadku, gdy stosunek sygnału do szumów wynosił 3. Granica oznaczalności wynosiła odpowiednio 3 i 5 ng/ml dla metadonu i EDDP (tabela II). Metoda LC/MS z jonizacją przez elektrorozpylanie opisana przez Souveriana charakteryzowała się granicą oznaczalności wynoszącą 10 ng/ml dla MD i 25 ng/ml dla EDDP [20]. Rossas i współpracownicy opisali natomiast metodę oznaczania metadonu i jego metabolitu w ślinie, której granica oznaczalności wynosiła odpowiednio 5 i 0,5 ng/ml [19].

Odzysk opracowanej przez autorów niniejszej pracy metody wahał się od 87,5% do 93,7% dla metadonu i od 90,6% do 95,5% dla EDDP (tabela I).

Opracowana i zwalidowana metoda została zastosowana do oznaczania metadonu w rzeczywistych próbkach pochodzących od pacjentów uzależnionych od opiatów i leczonych metadonem. Oznaczenia przeprowadzone w grupie 24 osób wykazały, że stężenie metadonu we krwi zależy od podanej dawki, a współczynnik korelacji dla tej zależności wynosi 0,9444 (rycina 3).

Stosunek stężeń metadonu do EDDP pomimo tego, że krew pobierano od każdego pacjenta w takim samym czasie od podania leku, był bardzo zmienny (rycina 4). Świadczy to o znacznej zmienności w szybkości metabolizmu (farmakokinetyki) metadonu i wskazuje na konieczność monitorowania leczenia tym lekiem poprzez oznaczanie jego stężenia we krwi.

WNIOSKI

Opracowana metoda oznaczania metadonu i jego metabolitu w surowicy z zastosowaniem deuterowanych analogów jako wzorców wewnętrznych charakteryzują się specyficnością, czułością, powtarzalnością i zakresem liniowości na poziomie wskazującym na jej przydatność do rutynowego oznaczania metadonu we krwi pacjentów leczonych tym lekiem. Wyniki badań przeprowadzonych na stosunkowo nielicznej grupie pacjentów leczonych metadonem wskazują na znaczne różnice w szybkości metabolizmu tego leku lub na dodatkowe niekontrolowane jego przyjmowanie. Opracowana metoda pozwala nie tylko na monitorowanie stężenia metadonu, ale również na kontrolę nielegalnego przyjmowania przez pacjentów programu metadonowego innych substancji psychoaktywnych.