Razvoj metode za određivanje metadona i metabolita EDDP-a primjenom HPLC metode

Ružić, Petra

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:996712

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split

SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

I

MEDICINSKI FAKULTET

Petra Ružić

RAZVOJ METODE ZA ODREĐIVANJE METADONA I METABOLITA EDDP-A PRIMJENOM HPLC METODE

Diplomski rad

Akademska godina: 2016./2017.

Mentorica:

prof. dr. sc. Davorka Sutlović

Komentorica:

dr. sc. Maja Veršić Bratinčević, dipl. ing.

U Splitu, rujan 2017.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

I

MEDICINSKI FAKULTET

Petra Ružić

RAZVOJ METODE ZA ODREĐIVANJE METADONA I METABOLITA EDDP-A PRIMJENOM HPLC METODE

Diplomski rad

Akademska godina: 2016./2017.

Mentorica:

prof. dr. sc. Davorka Sutlović

Komentorica:

dr. sc. Maja Veršić Bratinčević, dipl. ing.

U Splitu, rujan 2017.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Kemijsko-tehnološki fakultet i Medicinski fakultet
Integrirani preddiplomski i diplomski studij FARMACIJA
Sveučilište u Splitu, Republika Hrvatska

Znanstveno područje:	Biomedicinske znanosti
Znanstveno polje:	Farmacija
Nastavni predmet:	Farmaceutska toksikologija
Tema rada:	je prihvaćena na __ sjednici Vijeća studija Farmacija te potvrđena na __ sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko tehnološkog fakulteta i __ sjednici fakultetskog vijeća Medicinskog fakulteta.
Mentor:	prof. dr. sc. Davorka Sutlović
Pomoć pri izradi:	dr. sc. Maja Veršić Bratinčević

RAZVOJ METODE ZA ODREĐIVANJE METADONA I METABOLITA EDDP-A PRIMJENOM HPLC METODE

Petra Ružić, broj indeksa: 75

Sažetak:
Ciljevi istraživanja: Razviti metodu za kvalitativno i kvantitativno određivanje metadona i EDDP-a u biološkim uzorcima korištenjem HPLC tehnike, koja se može primijeniti u stvarnoj praksi određivanja nepoznate koncentracije metadona u pacijenata na supstitucijskoj terapiji metadonom.
Materijali i metode: Metodom HPLC su analizirane standardne otopine metadona i EDDP-a, pripremljene razrjeđivanjem standarda metadona i EDDP-a (Lipomed) te otopine Heptanona u metanolu. Nakon što su metadon i EDDP detektirani u standardnim otopinama te nakon ekstrakcije oba analita iz seruma korištenjem tehnike LLE (engl. *liquid-liquid extraction*), ekstrahirani analiti (smjesa metadona i EDDP-a) su u koncentraciji od 1 mg/L i volumenu od 10 µL injektirani u aparat. Optimalna valna duljina je bila 220 nm, kao pokretna faza je korištena smjesa metanola, acetonitrila i vode (v/v/v=9:11:80), pH= 6.0, temperatura sustava je namještena na 30°C, a vrijeme trajanja analize iznosilo je 8 minuta. Protok je bio namješten na 0.6 mL/min do četvrte minute pa na 0.4 mL/min od četvrte do osme minute.
Rezultati: Injektiranjem standardne otopine metadona u prethodno navedenim uvjetima, kao i standardne otopine EDDP-a, oba su spoja na instrumentu detektirana oko šeste minute. Ipak, analiti ekstrahirani iz seruma (smjesa metadona i EDDP-a) su u istim uvjetima na kromatogramu detektirani kao jedan pik, umjesto dva odvojena pika koja su trebala odgovarati dvjema različitim tvarima.
Zaključci: Analizom u prethodno obrazloženim uvjetima metadon i EDDP su kvalitativno dokazani, tj. dokazano je njihovo prisustvo u serumu. Ipak, navedenom metodom nije ih moguće dokazati kvantitativno, što znači da se ona ne može primijeniti u stvarnoj praksi određivanja nepoznate koncentracije lijeka i njegovih metabolita u biološkom uzorku.

Ključne riječi: metadon, EDDP, ekstrakcija tekuće-tekuće, HPLC metoda

Rad sadrži: 42 stranice, 15 slika, 4 tablice, 35 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. izv. prof. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić, mag. med. biochem. - predsjednica Povjerenstva
2. prof. dr. sc. Marija Definis Gojanović, dr. med. - član
3. prof. dr. sc. Davorka Sutlović, dipl. ing. - član-mentor

Datum obrane: 27. rujna 2017.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35 i Medicinskog fakulteta Split, Šoltanska 2.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

Faculty of Chemistry and Technology and School of Medicine
Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy
University of Split, Croatia

Scientific area:	Biomedical sciences
Scientific field:	Pharmacy
Course title:	Pharmaceutical toxicology
Thesis subject:	was approved by Council of Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy, session no.___ as well as by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no.___ and Faculty Council of School of Medicine, session no.___.
Mentor:	Davorka Sutlović - PhD, full prof.
Technical assistance:	Maja Veršić Bratinčević - PhD

DEVELOPMENT OF A HPLC METHOD FOR THE DETERMINATION OF METHADONE AND ITS METABOLITE EDDP

Petra Ružić, index number: 75

Summary:
Objectives: The aim of this study was to develop an analytical method for the HPLC determination of methadone and EDDP in biological fluids, which could be readily applied to the monitoring of methadone levels in biological fluids of patients undergoing methadone maintenance therapy.
Materials and methods: Methadone and EDDP standard solutions were preapared after diluting the Heptanon solution, and both methadone and EDDP reference standards from Lipomed in methanol and then injected in the HPLC. After the methadone and EDDP standard solutions were detected on the instrument and both of the analites were extracted from serum by LLE, 10 µL of the extracted substances (the mixture of methadone and EDDP) was injected in the concetration 1 mg/L. The chromatografic procedure was carried out by setting a detection wavelength at 220 nm, the working temperature at 30°C and using mixture of methanol, acetonitrile and water (v/v/v=9:11:80), pH= 6.0, as mobile phase. The analysis was performed for 8 minutes total. The flow rate of the mobile phase was 0.6 mL/min during the first four minutes and then switched to 0.4 mL/min from the fourth minute to the end of the analysis.
Results: Both of methadone and EDDP standard solutions were eluted around sixth minute. Still, the mixture of methadone and EDDP extracted from the serum was detected as only one peak on the chromatogram, instead of two separate peaks which should have correspond to these two different substances.
Conclusion: Using the HPLC method described herein, the presence of both methadone and EDDP in the serum could be detected. However, their concentration could not be quantified, therefore this method could not be used for the determination of a drug and its metabolites in biological fluids.

Key words: methadone, EDDP, liquid-liquid extraction, HPLC method

Thesis contains: 42 pages, 15 figures, 4 tables, 35 references

Original in: Croatian

Defence committee:
1. Vedrana Čikeš Čulić - PhD, associate prof. - chairperson
2. Marija Definis Gojanović - PhD, full prof. - member
3. Davorka Sutlović - PhD, full prof. - supervisor

Defence date: September 27, 2017.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposed in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35 and Library of School of Medicine, Šoltanska 2.

ZAHVALA

Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Davorki Sutlović na prilici za izradu diplomskog rada na području farmaceutske toksikologije te na stručnom i predanom vođenju pri izradi i pisanju diplomskog rada.

Zahvaljujem svojoj komentorici dr. sc. Maji Veršić Bratinčević na strpljenju te velikodušnoj pomoći tijekom izrade i pisanja diplomskog rada.

Sadržaj

1. UVOD 1
1.1. Definicija ovisnosti i sredstva ovisnosti 3
1.2. Terapija metadonom 4
1.3. Metadon - svojstva i doziranje 5
1.4. Farmakokinetika metadona 6
1.5. Farmakodinamika metadona 7
1.6. Biološki uzorci 7
1.7. Metode ekstrakcije 8
1.7.1. Ekstrakcija tekuće-tekuće 8
1.8. Kromatografske tehnike 9
1.8.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) 10
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA 12
3. MATERIJAL I METODE 14
3.1. Kemikalije 15
3.2. Priprema standardne otopine metadona 15
3.3. Priprema uzorka za analizu: ekstrakcije tekuće-tekuće (engl. *Liquid-Liquid Extraction*, LLE) 17
3.4. Instrumenti 17
3.4.1. Radni uvjeti HPLC metode 18
4. REZULTATI 19
4.1. Usporedba dviju kolona 20
4.2. Usporedba dviju pokretnih faza 21
4.3. Usporedba valnih duljina 22
4.4. Usporedba otapala 23
4.5. Mjerenje različitih koncentracija metadona u standardnim otopinama 24
4.6. Mjerenje različitih koncentracija EDDP-a u standardnim otopinama 25
4.7. Kvalitativna analiza standardnih otopina metadona i EDDP-a te metadona i EDDP-a ekstrahiranih iz seruma 26
4.8. Umjerne krivulje metadona i EDDP-a 27
5. RASPRAVA 28
5.1. Određivanje prisustva metadona i EDDP-a u biološkim uzorcima primjenom HPLC metode 29

6. ZAKLJUČCI 31
7. POPIS CITIRANE LITERATURE 33
8. SAŽETAK 37
9. SUMMARY 39
10. ŽIVOTOPIS 41

1. UVOD

Ovisnost je kronična relapsirajuća bolest te zahtjeva dugotrajno liječenje i strogu kontrolu (1). Predstavlja veliki društveni i javnozdravstveni problem. Nosi povećan rizik od zaraznih bolesti i smrti od predoziranja. Danas postoje razni oblici liječenja ovisnosti, ovisno o stupnju ovisnosti: psihosocijalne intervencije u vanbolničkim ustanovama, savjetovališta u primarnoj zdravstvenoj zaštiti, liječenje u bolničkim uvjetima i supstitucijska terapija. Svakom se pacijentu mora pristupiti individualno (2). Supstitucijska terapija opioidima se kao dugoročna terapija pokazala učinkovitom u smanjenju zlouporabe opioida, širenju zaraznih bolesti i posljedične smrtnosti (3). Metadon je široko primjenjivani opioid koji se koristi u terapiji maligne i neuropatske boli te u liječenju opioidne ovisnosti. Koristan je kao supstitucijska terapija zahvaljujući sporijem razvoju tolerancije i fizičke ovisnosti u odnosu na ostale opioide. Nadalje, simptomi ustezanja nakon naglog prestanka primjene metadona su blaži i podnošljivi (4). Zbog njegovog sedirajućeg djelovanja, pacijenti koji su dugotrajno uzimali opojne droge te oni koji su suočeni s velikom anksioznošću tijekom perioda prestanka uzimanja droge daju mu prednost u supstitucijskoj terapiji. Metadon se smije primijeniti najmanje 8 sati nakon posljednje primijenjene doze heroina, pod uvjetom vidljivih dokaza obustave (2). Danas je najpropisivaniji lijek u supstitucijskoj terapiji i postoje dokazi značajne redukcije zlouporabe droga i rizika od zaraznih bolesti koje se prenose krvlju (AIDS), zahvaljujući njegovoj primjeni u liječenju ovisnosti (5).

Ipak, terapija metadonom pokazuje i nedostatke. Česti su slučajevi smrti povezanih s metadonom. Polipragmazija je potencijalan uzrok smrti, s obzirom da pacijenti često istodobno koriste i druge lijekove, npr. antidepresive i anksiolitike. Smrt može biti posljedica neprilagođene terapije individualnim potrebama pacijenta. Liječnici ponekad započinju terapiju s visokim dozama lijeka umjesto postepenom titracijom doze. Zbog toga se javlja potreba za strogim nadzorom i toksikološkim analizama nad pacijentima na supstitucijskoj terapiji metadonom, kako bi se osigurala njegova pravilna i sigurna primjena te spriječila toksičnost i predoziranje (6)(7).

1.1. Definicija ovisnosti i sredstva ovisnosti

Prema definiciji Svjetske zdravstvene organizacije predloženoj 1969. godine, ovisnost je psihičko, a ponekad i fizičko stanje, koje nastaje interakcijom živog organizma i sredstva ovisnosti. Obilježava je ponašanje koje uvijek uključuje potrebu za ponovnim povremenim ili trajnim uzimanjem sredstva ovisnosti u namjeri da se ostvari psihički učinak ili da se izbjegne nelagoda zbog odsutnosti tog sredstva (8). Razlika između psihičke i fizičke ovisnosti je u tome što je fizička ovisnost stanje organizma u kojem se organizam priviknuo na određeni stimulans te stoga postoji fizička potreba za njim, dok je psihička ovisnost potreba za ponovnim uzimanjem sredstva ovisnosti u svrhu održavanja osjećaja dobrog psihičkog stanja ili otklanjanja nelagode. Uslijed dugotrajnog izlaganja sredstvima ovisnosti, organizam pokazuje znakove prilagodbe i razvija se tolerancija. Tolerancija je pojava kod koje se s vremenom, uz opetovanu primjenu određene droge, smanjuje njezin učinak te se javlja potreba za uzimanjem sve većih količina droge u svrhu postizanja jednakog učinka (9). Može predstavljati ozbiljan problem jer povećava mogućnost ispoljavanja teških nuspojava droge kao što su depresija disanja i smrtni ishod. U slučaju prestanka uzimanja droge ili primjene njezinog antagonista vidljiv je skup simptoma karakterističan za svaku vrstu droge, tzv. apstinencijski sindrom ili sindrom ustezanja. Čak i nakon uspješnog ustezanja i određenog razdoblja bez konzumacije opojne droge, pojedinci mogu imati visoki rizik od relapsa. Relaps se potiče ponovnim izlaganjem opojnoj drogi, kontekstom koji podsjeća na prijašnju uporabu droge ili stresom. Podložnost razvoju ovisnosti je individualna i određena genskim i okolišnim čimbenicima (1). Ipak, sve opojne droge povisuju koncentraciju dopamina u mozgu, a upravo je dopamin odgovoran za ugodu pri konzumaciji droge. Pri kontinuiranom uzimanju opojne droge, mozak na pojačano lučenje dopamina reagira kompenzacijskim mehanizmom kojim smanjuje njegovo lučenje te se zbog toga javlja ponovna potreba za konzumacijom droge u svrhu postizanja istog učinka (tolerancija) (10). U Tablici 1. navedena je podjela sredstava ovisnosti prema kemijskim svojstvima, porijeklu i farmakološkom djelovanju.

Tablica 1. Podjela sredstava ovisnosti (11)

1.	**Prema kemijskim svojstvima**	kisela, bazična, neutralna i amfoterna
2.	**Prema porijeklu**	prirodna, polusintetička i sintetička
3.	**Prema farmakološkom djelovanju**	opijati (narkotici), halucinogeni, stimulansi središnjeg živčanog sustava (SŽS), hipnotici SŽS i druga sredstva ovisnosti

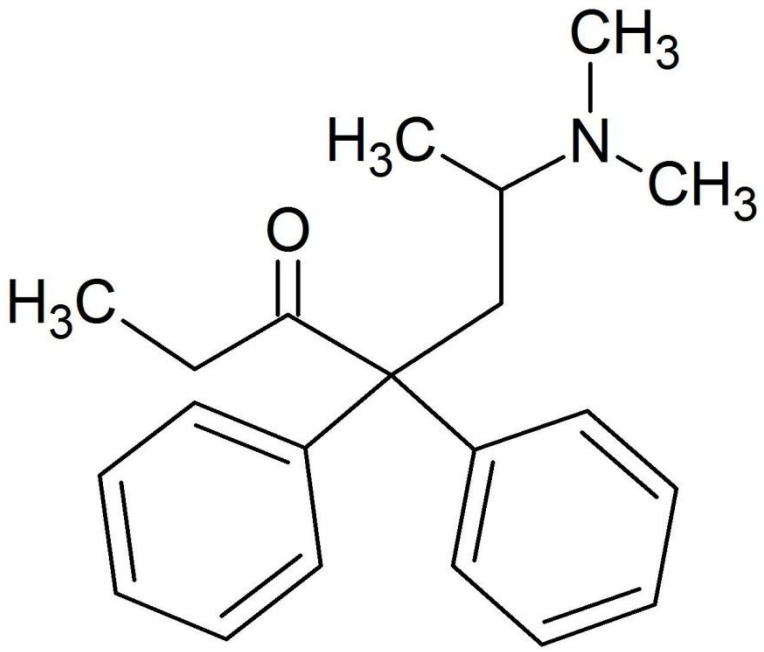
1.2. Terapija metadonom

Metadon pokazuje izrazitu varijabilnost u farmakokinetici od osobe do osobe, zbog čega se u samoj terapiji odvikavanja od opioida primjenjuju individualne, pojedincu prilagođene doze. Također, na farmakokinetiku i farmakodinamiku metadona, pa samim time i na terapijski odgovor, utječu mnogobrojni čimbenici: konzumacija alkohola, pušenje, biljni pripravci koje pacijent uzima, istodobna zlouporaba nekog drugog sredstva ovisnosti, komorbiditeti, stres, trudnoća i genska varijabilnost. Kako bi se provelo optimalno liječenje, važno je pratiti koncentraciju metadona u biološkim uzorcima za vrijeme terapije te imati jasno definiranu i pouzdanu metodu određivanja koncentracije (12)(13).

Metadon ima dugo poluvrijeme eliminacije te je moguća akumulacija lijeka u organizmu između pojedinih doza, što može dovesti do smrtnog ishoda (14). Kod predoziranja metadon izaziva hipotenziju, bradikardiju, mlohavost skeletnih mišića, depresiju disanja te komu koja napreduje do smrti. Prilikom ispitivanja uzroka smrti, uloga metadona uglavnom nije definirana zbog utjecaja različitih faktora na rezultat (okolnosti smrti, psiho-fizičko stanje pacijenta prije smrti ili prisustvo drugih tvari i lijekova u organizmu, najčešće alkohola, benzodiazepina i neuroleptika) (15). Također, metadon može uzrokovati nuspojave kao što su pospanost, mučnina, povraćanje, svrbež kože, suženje zjenice ili hipoksija. Pri planiranju terapije potrebno je obratiti pozornost na kontraindikacije: problemi s radom jetre i bubrega, hipotireoidizam, nizak krvni tlak, istodobna konzumacija alkohola i druge (12)(16).

1.3. Metadon - svojstva i doziranje

Metadon, *(R,S)-6-(dimetilamino)-4,4-difenilheptan-3-on* ($C_{21}H_{27}NO$), prikazan na Slici 1, je sintetički narkotik koji je svoj procvat u medicini ostvario kao analgetik snažnog djelovanja. Sintetiziran je u Njemačkoj u svrhu uklanjanja bolova vojnicima u doba Drugog svjetskog rata (16). Jaki je agonist μ-opioidnih receptora, glavnih analgetskih opioidnih receptora. Ima jači učinak od morfina te je od njega otrovniji. Upravo se zbog toga u slučaju razvoja tolerancije na morfin provodi tzv. „opioidna rotacija“ na metadon. Rezultat je jača analgezija već na 10-20 % ekvivalentne dnevne doze morfina. Metadon je primjenu našao i u detoksifikaciji ovisnika o heroinu (4). U tu svrhu se primjenjuje 20 do 40 mg metadona na dan. Maksimalna dnevna doza iznosi 120 mg. Primijenjena doza se postupno smanjuje svakom pacijentu svakog ili svakog drugog dana, uzimajući u obzir njegov odgovor na tretman i individualne potrebe. Svakako, primijenjena doza uvijek mora biti takva da održava simptome ustezanja na podnošljivoj razini (17).

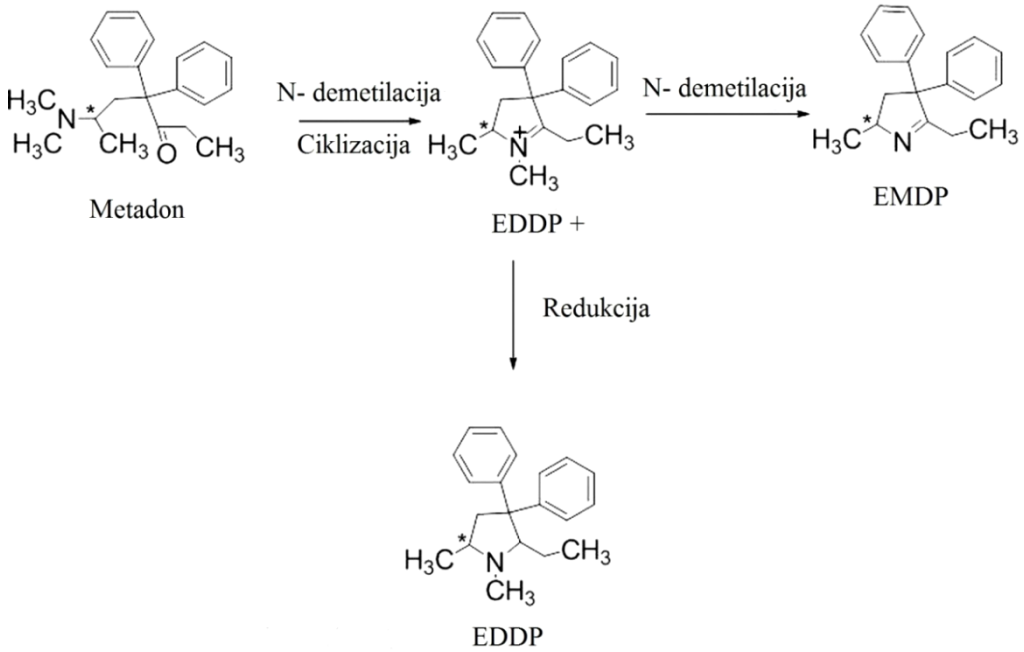


Slika 1. Strukturna formula metadona (18)

1.4. Farmakokinetika metadona

Metadon je slaba baza i lipofilan lijek. Brzo se apsorbira te se već 30 minuta nakon peroralne primjene može detektirati u plazmi. Vršnu koncentraciju postiže 1,5-3 sata nakon primjene. Ima izvrsnu biološku raspoloživost (veću od 80%) i veliki volumen distribucije (17). Nakuplja se u dobro prokrvljenim organima: mozgu, jetri, plućima, bubrezima i slezeni (19). Veže se za proteine plazme (89%), najviše za α-1 kiseli glikoprotein. Pod stresom se koncentracija α-1 kiselog glikoproteina povećava pa se posljedično smanjuje aktivnost metadona. Ima dugo poluvrijeme eliminacije (19-55 sati) i ako se uz to uzme u obzir velika intraindividualna varijabilnost farmakokinetike metadona u ovisnika, treba znati oprezno titrirati dozu kako bi se izbjeglo predoziranje u kratkom vremenskom intervalu (17)(20).

Metadon se N-demetilacijom i spontanom ciklizacijom biotransformira u 2-etildien-1,5-dimetil-3,3-dimetilpirolidin $C_{20}H_{23}N$ (EDDP) i 2-etil-5-metil-3,3-difenil-1-pirolin $C_{19}H_{20}N$ (EMDP), koji se pretvaraju u polarne metabolite konjugacijom s glukuronskom kiselinom te su u urinu prisutni kao glavni produkti metabolizma (Slika 2.). Redukcijom i N-demetilacijom iz metadona nastaju metadol i normetadol, u urinu prisutni u niskoj koncentraciji. Metadon se metabolizira preko citokrom P450 (CYP) 3A4 i citokrom P450 (CYP) 2D6 jetrenih enzima. Aktivnost CYP3A4 se razlikuje među pojedincima, što uzrokuje varijacije u bioraspoloživosti metadona (20).



Slika 2. Metabolizam metadona (21)

1.5. Farmakodinamika metadona

Metadon svoje djelovanje ostvaruje vezanjem za opioidne receptore u središnjem živčanom sustavu. Opioidni receptori (μ, κ i δ) su vrsta receptora spregnuta s G-proteinima. Metadon je jaki agonist μ-opioidnih receptora preko kojih ostvaruje analgetsko djelovanje, ali i učinke kao što su hipertermija, euforija, tjelesna ovisnost i depresija disanja (22). On je na tržištu prisutan kao racemična smjesa D-izomera (S-metadon) i L-izomera (R-metadon), pri čemu je L-izomer barem 10 puta aktivniji od D-izomera, a D-izomer ima antitusičko djelovanje (17). Ulaskom u mastocite, metadon uzrokuje periferno otpuštanje histamina te posljedično pruritus i crvenilo kože, što se najčešće javlja nakon parenteralne primjene. O takvom učinku metadona treba voditi računa kod primjene u anesteziji u obliku intravenskih bolus doza (23)(24). Učinak metadona traje dulje kod bolesnika koji su na terapiji, nego kod osoba koji ga nisu ranije koristili, a kod kojih se pak očekuje da su osjetljiviji na lijek. Ta se pojava objašnjava činjenicom da se metadon akumulira u tkivima nakon opetovane primjene, čime se stvaraju njegove rezerve. Vezani metadon je u ravnoteži s metadonom koji slobodno cirkulira u plazmi pa se njegova farmakološka aktivnost održava kroz 24 sata. Svakodnevna terapijska doza održava tu ravnotežu (20).

1.6. Biološki uzorci

Biološki uzorci se dijele na uzorke živih osoba i postmortalne uzorke. Za provođenje kvalitetne i pouzdane analize uzorka potreban je odgovarajući uzorak, koji je na pravilan način i na vrijeme prikupljen, pohranjen i pripremljen. Ukoliko nije moguće provođenje analize neposredno nakon uzimanja uzorka, uzorci se pohranjuju u hladnjak. Ako se analiza provodi unutar sljedećih nekoliko dana, uzorak se pohranjuje na +4°C, dok se pri dugotrajnijem čuvanju uzorka on pohranjuje na -20°C ili niže (25). Klinički biološki uzorci u kojima se može određivati prisustvo lijekova i sredstava ovisnosti su krv, serum, plazma, mokraća, slina i kosa. Svaki od uzoraka ima određene prednosti i nedostatke. Prednost uzimanja uzoraka krvi je u tome što osoba kojoj se krv uzima ne može promijeniti sastav uzorka i time utjecati na rezultat. Ipak, uzimanje krvi je invazivna metoda, a vene ovisnika o opojnim drogama su često oštećene, što otežava uzimanje uzorka. Uzorak mokraće je danas uzorak izbora kod utvrđivanja prisustva droga i njihovih metabolita te u slučajevima smrti uzrokovanih trovanjem metadonom (26)(20). Puna krv, plazma i serum su uzorci izbora za terapijsko praćenje lijekova, stoga i praćenje koncentracije metadona u supstitucijskoj terapiji

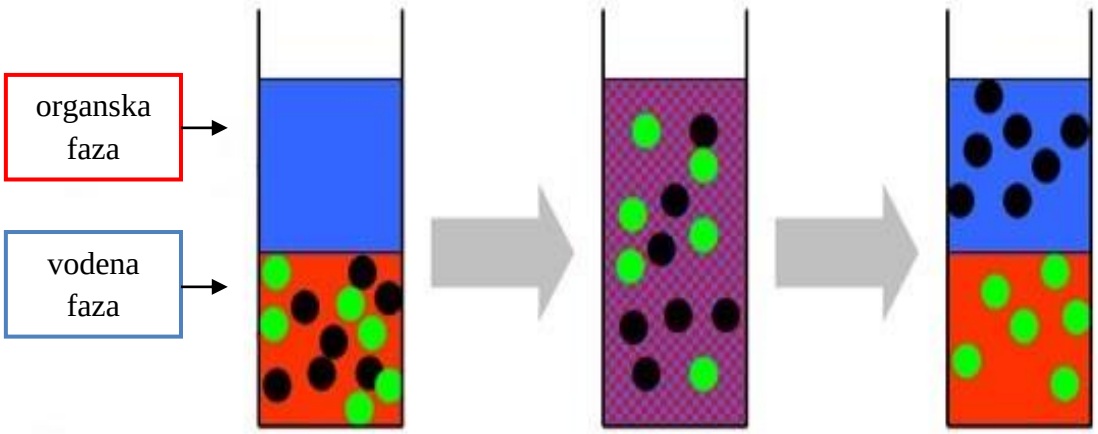
(27). Serum se dobiva centrifugiranjem krvi nakon što uzorak krvi odstoji 20 minuta nakon izuzimanja, odnosno poslije završenog procesa koagulacije (28).

1.7. Metode ekstrakcije

Ekstrakcija je analitička metoda koja omogućuje izoliranje analita iz matice uzoraka, pa tako i iz biološkog materijala. Značaj ekstrakcije u pripremi uzorka za analizu je izbjegavanje interferencija endogenih komponenti iz biološkog materijala s analitom (29). Vrste ekstrakcijskih postupaka su: tekuće-tekuće, tekuće-kruto, kruto-tekuće, fluid u superkritičnim uvjetima-kruto i fluid u superkritičnim uvjetima-tekuće (30). Ekstrakcija tekuće-tekuće (engl. *liquid-liquid extraction,* LLE) i ekstrakcija čvrstom fazom (engl. *solid phase extraction,* SPE) su najčešće korištene metode za pripremu bioloških uzoraka (29).

1.7.1. Ekstrakcija tekuće-tekuće

Ekstrakcija tekuće-tekuće je postupak kojim se otopljena tvar ekstrahira tekućinom iz tekućeg uzorka, pri čemu se otapala međusobno ne miješaju (30). Zahvaljujući jednostavnosti i brzini samog postupka, često se koristi za hitne analize uzoraka koji sadrže nepoznati analit ili kada je potrebno izolirati spojeve različitih fizikalno-kemijskih svojstava. Metoda se temelji na razlikama u pH vrijednosti i topljivosti analita u biološkom uzorku (matrici) i organskom otapalu. Kako većina lijekova posjeduje hidrofobna svojstva, miješanjem se mogu ekstrahirati iz vodenog biološkog uzorka u organsko otapalo (Slika 3.). Uspješnu ekstrakciju će osigurati pravilan izbor otapala i regulacija kiselosti uzorka. Kiseli spojevi su u kiselom mediju relativno netopljivi te se uglavnom mogu ekstrahirati iz kiselih vodenih otopina u organsko otapalo. Za njihovu ekstrakciju pH medija bi trebao biti dvije pH jedinice ispod pK_a analita. Bazični spojevi su uglavnom netopljivi u bazičnom mediju i mogu se ekstrahirati iz alkalnih vodenih otopina u organsko otapalo, pri čemu bi pH uzorka trebao biti dvije pH jedinice iznad pK_a analita. Neionizirani spojevi prelaze iz vodenog medija u organsko otapalo, a ionizirani spojevi ostaju u vodenom sloju. Otapala koja se najčešće koriste su: heksan, toluen, dietileter, klorobutan, diklormetan, kloroform ili njihove smjese (31).



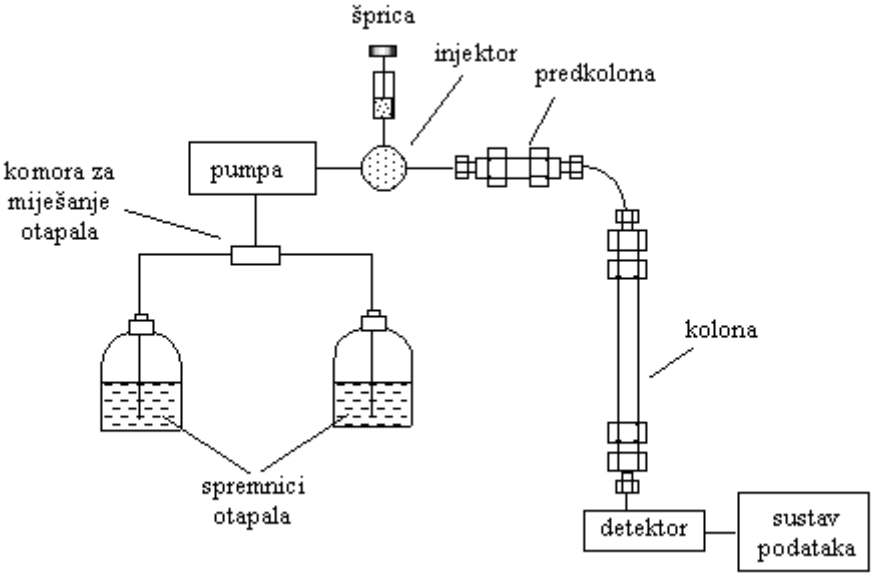
Slika 3. Ekstrakcija tekuće-tekuće: raspodjela otopljene tvari između dvije faze koje se međusobno ne miješaju (32)

1.8. Kromatografske tehnike

Kromatografija predstavlja fizikalne metode razdjeljivanja u kojoj se sastojci raspodjeljuju između dviju faza: nepokretne i pokretne, koja se giba u određenom smjeru. Analizirani uzorak se nalazi u dinamičkoj ravnoteži između pokretne i nepokretne faze i giba se u smjeru gibanja pokretne faze. Nepokretna faza mora osigurati selektivno zadržavanje molekula, tj. vezanje pojedinih sastojaka u različitim vremenskim razdobljima. U kolonskoj kromatografiji nepokretna faza je punilo kromatografskog stupca. S obzirom na prirodu ravnoteže između pokretne i nepokretne faze, kromatografske analize se mogu podijeliti na: razdjelnu kromatografiju, adsorpcijsku kromatografiju, afinitetnu kromatografiju te kromatografiju isključenjem. Kromatografske tehnike se mogu podijeliti i na temelju sastava pokretne faze. Tako razlikujemo plinsku kromatografiju, tekućinsku kromatografiju i fluidnu kromatografiju u superkritičnim uvjetima. Grafički prikaz koncentracije analita u ovisnosti o volumenu eluata ili vremenu naziva se kromatogram. Kromatogramska krivulja (pik) je odziv detektora pri eluiranju jednog sastojka iz kolone. Položaj kromatogramske krivulje pomaže u identifikaciji uzorka, dok površina kromatogramske krivulje služi za kvantitativnu procjenu (30).

1.8.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC)

Tekućinska kromatografija, dostupna još od 1969. godine, doživjela je procvat u primjeni nakon pojave tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (shematski prikazana na Slici 4.). Zahvaljujući uspješnom razdvajanju različitih vrsta uzoraka, visokoj snazi odjeljivanja, brzini te niskom pragu detekcije, HPLC je danas u širokoj upotrebi. Karakteristika HPLC-a je visoki tlak pod kojim prolazi otapalo (pokretna faza), koji je omogućio upotrebu kolona s mnogo manjim promjerom čestica stacionarne faze (3-5 µm), poboljšano odjeljivanje sastojaka i skraćeno vrijeme analize (33).



Slika 4. Shematski prikaz HPLC sustava (34)

Injektor za HPLC

Injektor je dio kromatografa koji omogućuje unošenje uzorka u instrument. Mora osigurati reproducibilnost prilikom injektiranja tekućih uzoraka različitih volumena (0.1-100 mL) pri visokom tlaku, smanjenje oscilacija protoka pokretne faze te što uže pikove. Pored igala koje se mogu koristiti za injektiranje, mnogo češće se koriste ventili. Ventilni injektori omogućuju brzo i reproducibilno injektiranje uzorka različitih volumena.

Pumpe za HPLC

Pumpe HPLC-a omogućuju stalan protok pokretne faze u instrumentu. Moraju osigurati raspon protoka od 0.01 do 10 mL/min, stabilnost protoka (<1%) i maksimalan tlak od 34 500 kPa.

HPLC kolone

Kod odabira kolone važno je obratiti pozornost na njezine dimenzije te na sastav i veličinu čestica nepokretne faze. Kolone su punjene nepokretnom fazom vrlo sitnih čestica (3-10 μm). Uobičajeni unutarnji promjer kolone je 4.0-4.6 mm, a duljina 10-25 cm. Mogu biti staklene ili čelične. Važno je kolone održavati, redovito čistiti i na pravilan način upotrebljavati. Ako kolona nije u uporabi, potrebno ju je zaštititi od isušivanja. Kolona se brže oštećuje i ima kraći rok uporabe ukoliko se ispituju jako kiseli ili jako bazični uzorci, biološki uzorci ili uzorci s krutim česticama.

Detektori za HPLC

Osjetljivost detektora predstavlja odnos visine pika i visine bazne linije. Odabir detektora ovisi o njegovoj osjetljivosti i selektivnosti, linearnom radnom području, jednostavnosti uporabe, cijeni te dostupnosti rezervnih dijelova. Najčešće korišteni detektor kod HPLC metode je optički detektor. Ipak, u analizi lijekova i droga najčešće je korišten UV/VIS detektor, koji je osjetljiv za mnoge spojeve i ne smetaju mu male fluktuacije protoka ili temperature za vrijeme analize. Mjeri apsorpciju UV ili vidljivih zraka na spojevima otopljenima u efluentu, koji izlazi iz kolone. Preostali detektori koji se mogu koristiti u HPLC tehnikama su: poboljšani tip UV detektora (DAD), detektor refrakcijskog indeksa (RI), fluorescentni detektor i elektrokemijski detektor (35).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi rada:

1. Odrediti prisustvo metadona i njegovog metabolita EDDP-a iz standardnih otopina koristeći HPLC tehniku.
2. Odrediti optimalnu ekstrakcijsku tehniku za određivanje metadona i metabolita metadona iz bioloških uzoraka.
3. Razviti metodu za određivanje metadona i EDDP-a u biološkim uzorcima korištenjem HPLC tehnike.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Kemikalije

U ovom radu korištene su sljedeće kemikalije:

- kemikalije za izradu pokretnih faza: mravlja kiselina, acetonitril, voda, metanol, natrijeva lužina i klorovodična kiselina
- kemikalije za ekstrakciju: acetonitril i voda
- kemikalije za izradu standardnih otopina: Heptanon 10 mg/ml oralne kapi, otopina, standard metadona d,l-Metadon (Lipomed) i standard EDDP-a EDDP perklorat (Lipomed)

3.2. Priprema standardne otopine metadona

Standardne otopine metadona pripremljene su razrjeđivanjem otopine Heptanona u metanolu te razrjeđivanjem standarda metadona (Lipomed) u metanolu. Otopina Heptanona sadrži 10 mg metadona u 1 mL otopine, stoga masena koncentracija metadona u 10 mL originalnog pakovanja iznosi 10 000 mg/L. Razrjeđivanjem primarne otopine u metanolu pripremljene su otopine masenih koncentracija 5 mg/L i 2.5 mg/L (Tablica 2.). Masena koncentracija standarda metadona (Lipomed) iznosi 1000 mg/L. Razrjeđivanjem otopine standarda pripremljeno je 5 različitih otopina (Tablica 3.), od kojih su u instrument injektirane sljedeće masene koncentracije: 1 mg/L, 0.8 mg/L i 0.6 mg/L. Dobiveni standardi su se tijekom rada u laboratoriju injektirali u instrument u navedenim volumenima: 5 µL, 10 µL, 25 µL i 50 µL.

Standardne otopine EDDP-a pripremljene su razrjeđivanjem otopine standarda EDDP-a (Lipomed) masene koncentracije 1000 mg/L. Također, i kod standardnih otopina EDDP-a, u instrument su injektirane koncentracije: 1 mg/L, 0.8 mg/L i 0.6 mg/L (Tablica 4.).

Tablica 2. Priprema standardnih otopina metadona iz otopine Heptanona, pri čemu je: γ_1= 10 000 mg/L, γ_2 = 1000 mg/L, γ_3 = 100 mg/L, γ_4 = 10 mg/L i γ_5 = 5 mg/L.

Redni broj otopine	Masena koncentracija dobivene otopine (mg/L)	Volumen standardne otopine (mL)	Volumen metanola (mL)	Ukupni volumen dobivene otopine (mL)
1.	1000	0.1 γ_1	0.9	1
2.	100	0.1 γ_2	0.9	1
3.	10	0.1 γ_3	0.9	1
4.	**5**	**0.5 γ_4**	**0.5**	**1**
5.	**2.5**	**0.5 γ_5**	**0.5**	**1**

Tablica 3. Priprema standardnih otopina metadona iz otopine standarda, pri čemu je: γ_1 = 1000 mg/L, γ_2 = 100 mg/L, γ_3 = 10 mg/L i γ_4 = 1 mg/L.

Redni broj otopine	Masena koncentracija dobivene otopine (mg/L)	Volumen standardne otopine metadona (mL)	Volumen metanola (mL)	Ukupni volumen dobivene otopine (mL)
1.	100	0.1 γ_1	0.9	1
2.	10	0.1 γ_2	0.9	1
3.	**1**	**0.1 γ_3**	**0.9**	**1**
4.	**0.8**	**0.8 γ_4**	**0.2**	**1**
5.	**0.6**	**0.6 γ_4**	**0.4**	**1**

Tablica 4. Priprema standardnih otopina EDDP-a iz otopine standarda, pri čemu je: γ_1 = 1000 mg/L, γ_2 = 100 mg/L, γ_3 = 10 mg/L i γ_4 = 1 mg/L.

Redni broj otopine	Masena koncentracija dobivene otopine (mg/L)	Volumen standardne otopine EDDP-a (mL)	Volumen metanola (mL)	Ukupni volumen dobivene otopine (mL)
1.	100	0.1 γ_1	0.9	1
2.	10	0.1 γ_2	0.9	1
3.	**1**	**0.1 γ_3**	**0.9**	**1**
4.	**0.8**	**0.8 γ_4**	**0.2**	**1**
5.	**0.6**	**0.6 γ_4**	**0.4**	**1**

3.3. Priprema uzorka za analizu: ekstrakcije tekuće-tekuće (engl. *Liquid-Liquid Extraction*, LLE)

Primjenom ekstrakcije tekuće-tekuće metadon i EDDP izolirani su iz seruma. Za pripremu biološkog uzorka ukupnog volumena 1 mL, pomiješano je 200 µL metadona, 100 µL EDDP-a i 700 µL seruma primjenom rotora (150 rpm) kroz 5 minuta. Potom se uzorak centrifugirao 10 minuta na 2600 rpm-a, na temperaturi 20°C. Nakon centrifugiranja, u epruvetu se odvoji supernatant, 4 mL organske faze (gornji sloj), te se ispari do suha u struji tekućeg dušika. Uzorak se otopi u smjesi vode i acetonitrila (v/v=80:20), ukupnog volumena 200 µL. U HPLC se injektira 10 µL dobivene otopine.

3.4. Instrumenti

U istraživanju su korišteni sljedeći instrumenti:

- HPLC 1: Shimadzu, tip: LC-10 series (Slika 5.)
- HPLC 2: Shimadzu, tip: LC-20 series (Slika 6.)
- detektor (HPLC 1 i 2): UV/VIS
- centrifuga 5810 R; Eppendorf
- rotor za ekstrakciju, Vorteks; IKA
- pH-metar: pH 197i, WTM
- uređaj za evaporaciju
- plin dušik čistoće 5,0; Messer

Slika 5. HPLC LC-10 series, Shimadzu

Slika 6. HPLC LC-20 series, Shimadzu

3.4.1 Radni uvjeti HPLC metode

Za vrijeme rada u Laboratoriju za kemijsko-toksikološke analize KBC-a Split, korišteni su i mijenjani različiti parametri HPLC sustava, s ciljem uspostave optimalnih radnih uvjeta za razvoj HPLC metode. Radni uvjeti na kojima se provodilo ispitivanje su:

1. HPLC LC-10 series, Shimadzu i HPLC LC-20 series, Shimadzu
2. kolone: 1 (RESTEK Ultra C18- 5µm, 250 x 4.6 mm) i 2 (INERTSIL ODS-4,5µm, 250 x 6 mm)
3. pokretne faze: smjesa acetonitrila i 0.2 % mravlje kiseline u vodi (v/v=45:55) i smjesa metanola, acetonitrila i vode (v/v/v=9:11:80), pH= 6.0
4. valne duljine: 205 nm, 210 nm i 220 nm
5. protok pokretne faze: 0.4 mL/min, 0.6 mL/min i 0.8 mL/min
6. temperature: 23°C, 30°C, 35°C, 40°C
7. volumen injektora: 5 µL , 10 µL, 25 µL i 50 µL
8. otapala korištena za pripremu standardnih otopina metadona i EDDP-a: voda, metanol i smjesa metanola, acetonitrila i vode (v/v/v=9:11:80), pH= 6.0.
9. ukupno trajanje analize: 8 min, 10 min, 15 min i 20 min

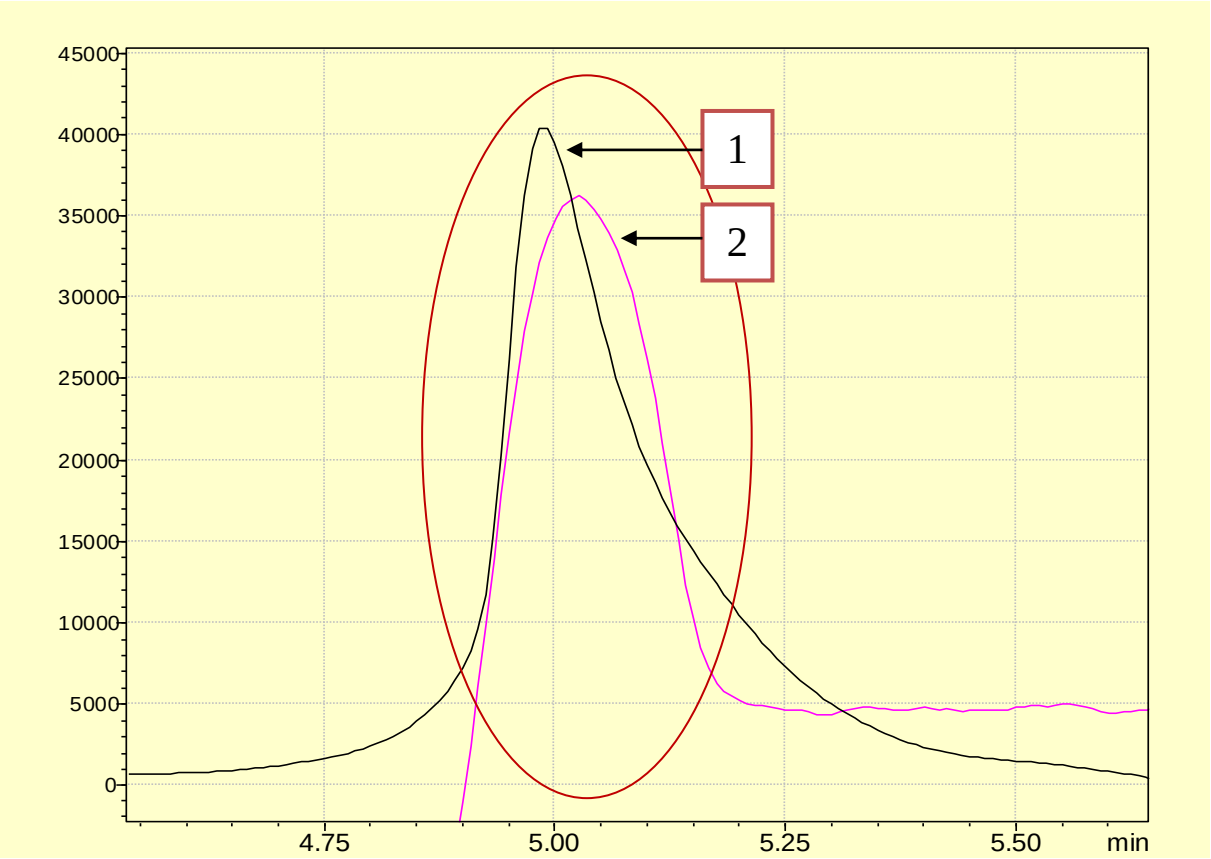
Optimalni radni uvjeti su:

- pokretna faza: smjesa metanola, acetonitrila i vode (v/v/v=9:11:80), pH= 6.0
- valna duljina: 220 nm
- protok pokretne faze: 0.6 mL/min
- temperatura: 30°C
- volumen injektora: 10 µL
- otapalo za pripremu standardnih otopina metadona i EDDP-a: metanol
- ukupno trajanje analize: 8 min

4. REZULTATI

4.1. Usporedba dviju kolona

Analizom na HPLC-u, uzorci su razdvojeni korištenjem dviju kolona (RESTEK Ultra C18- 5µm, 250 x 4.6 mm i INERTSIL ODS-4, 5µm, 250 x 6 mm), kako bi se utvrdilo utječe li odabir kolone na odziv standardnih otopina metadona i EDDP-a na detektoru. Dokazano je, i prikazano na slici (ispod), kako nema značajnih razlika u odzivu između dviju navedenih kolona.

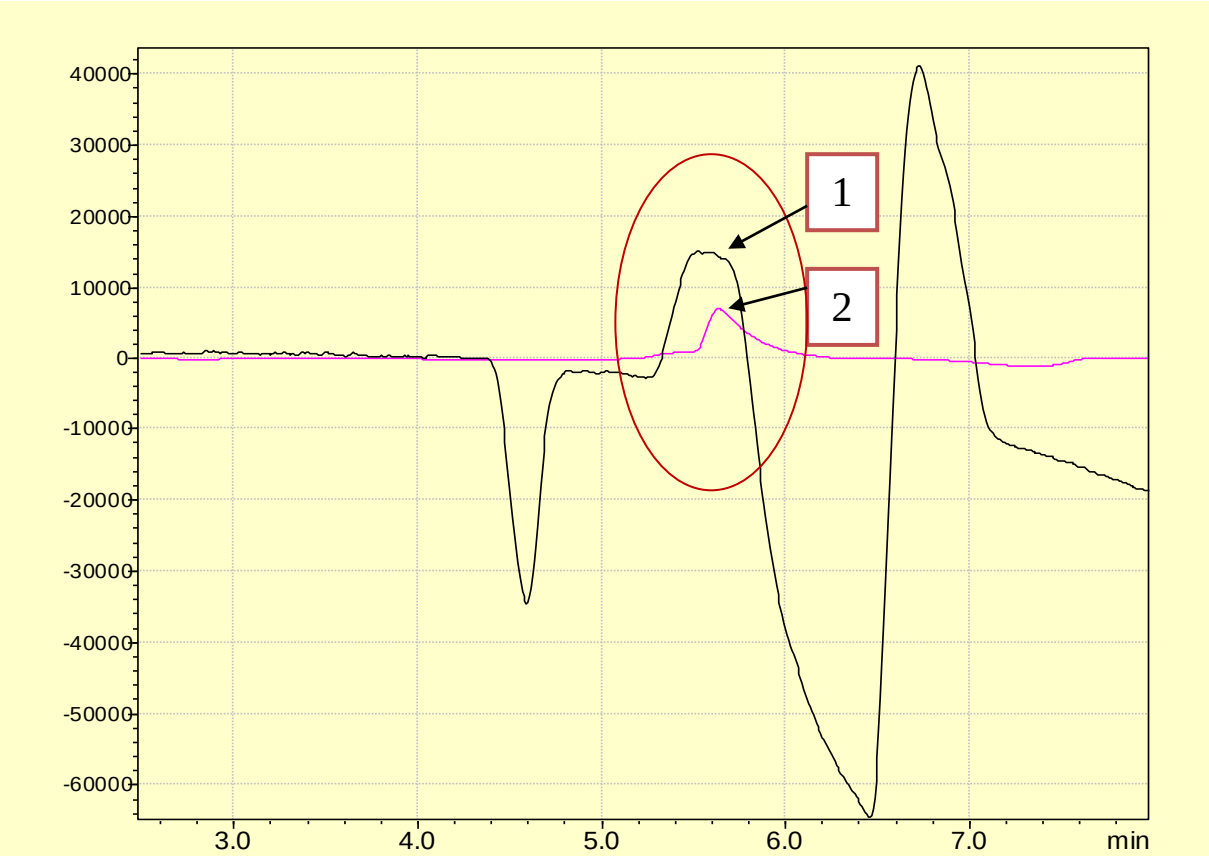


Slika 7. Usporedba rezultata dobivenih analizom standarda metadona koncentracije 1 mg/L upotrebom različitih kolona za HPLC analizu:

1- uzorak standarda metadona koncentracije 1 mg/L ispitivan kolonom RESTEK
2- uzorak standarda metadona koncentracije 1 mg/L ispitivan kolonom INERTSIL

4.2. Usporedba dviju pokretnih faza

Prilikom kromatografske analize standardnih otopina metadona i EDDP-a, ispitivalo se djelovanje dviju pokretnih faza. Kao prva pokretna faza korištena je smjesa acetonitrila i 0.2 % mravlje kiseline u vodi (v/v = 45:55), dok je druga pokretna faza bila smjesa metanola, acetonitrila i vode (v/v/v=9:11:80). Usporedbom dobivenih kromatograma vidljivo je da druga mobilna faza daje bolji odziv, zbog čega se i koristila u daljnjim ispitivanjima.

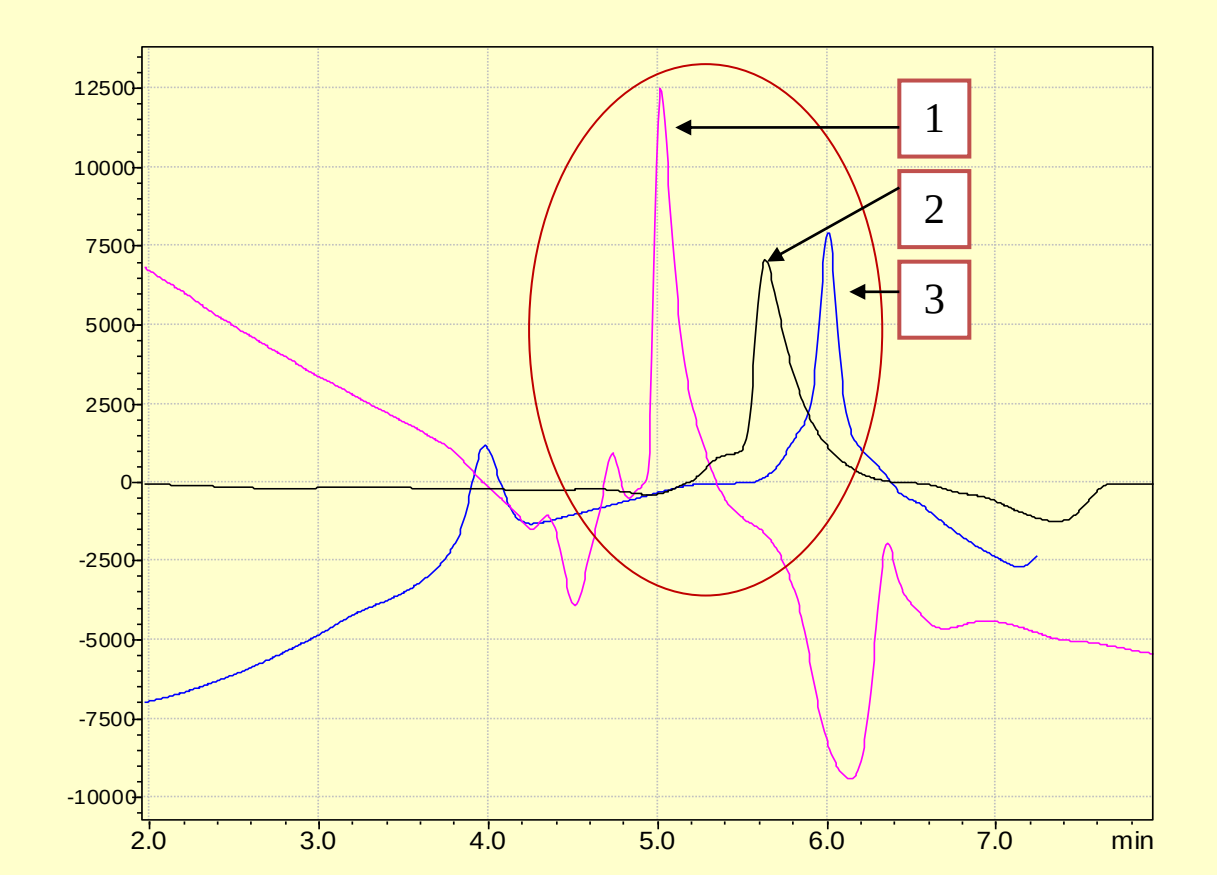


Slika 8. Usporedba rezultata dobivenih analizom standarda metadona koncentracije 1 mg/L upotrebom različitih mobilnih faza za HPLC analizu:

1- smjesa acetonitrila i 0.2 % mravlje kiseline u vodi (v/v = 45:55)
2- smjesa metanola, acetonitrila i vode (v/v/v=9:11:80)

4.3. Usporedba valnih duljina

Ispitivane su tri različite valne duljine s ciljem utvrđivanja optimalne vrijednosti koja bi omogućila istovremenu detekciju metadona i EDDP-a. Standardne otopine metadona i EDDP-a ispitivane su pri valnim duljinama: 205 nm, 210 nm, i 220 nm. Najbolji odziv postignut je na 220 nm, iako kromatogram br. 3 daje vizualno najljepši odziv (Slika 9.).

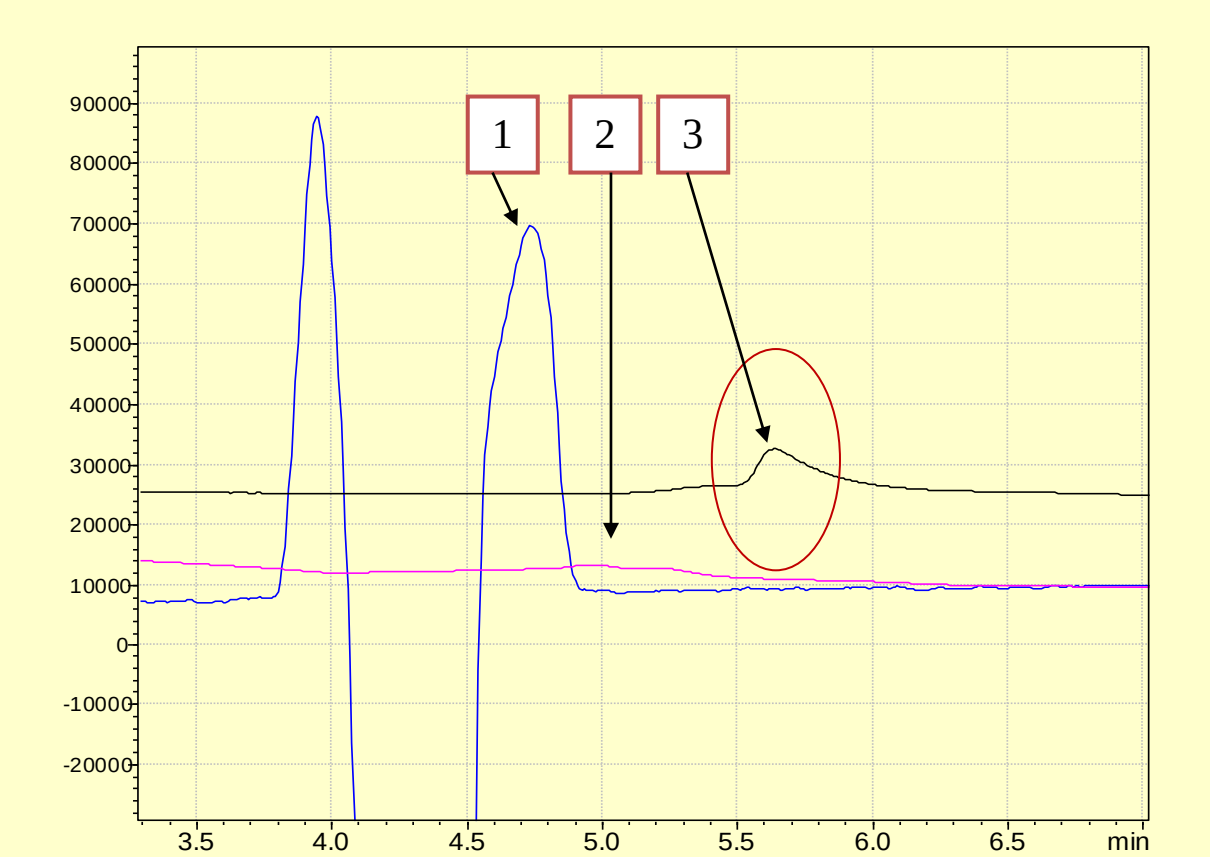


Slika 9. Usporedba rezultata dobivenih analizom standarda metadona koncentracije 1 mg/L pri različitim valnim duljinama:

1- valna duljina 205 nm
2- valna duljina 220 nm
3- valna duljina 210 nm

4.4. Usporedba otapala

U pripremi standardnih otopina metanola i EDDP-a korištena su različita otapala: voda, metanol i smjesa metanola, acetonitrila i vode (v/v/v=9:11:80), odnosno smjesa otapala korištena i kao mobilna faza u kromatografskoj analizi. Od navedenih otapala, samo su standardne otopine pripremljene u metanolu dale kvalitetan odziv na kromatogramu.

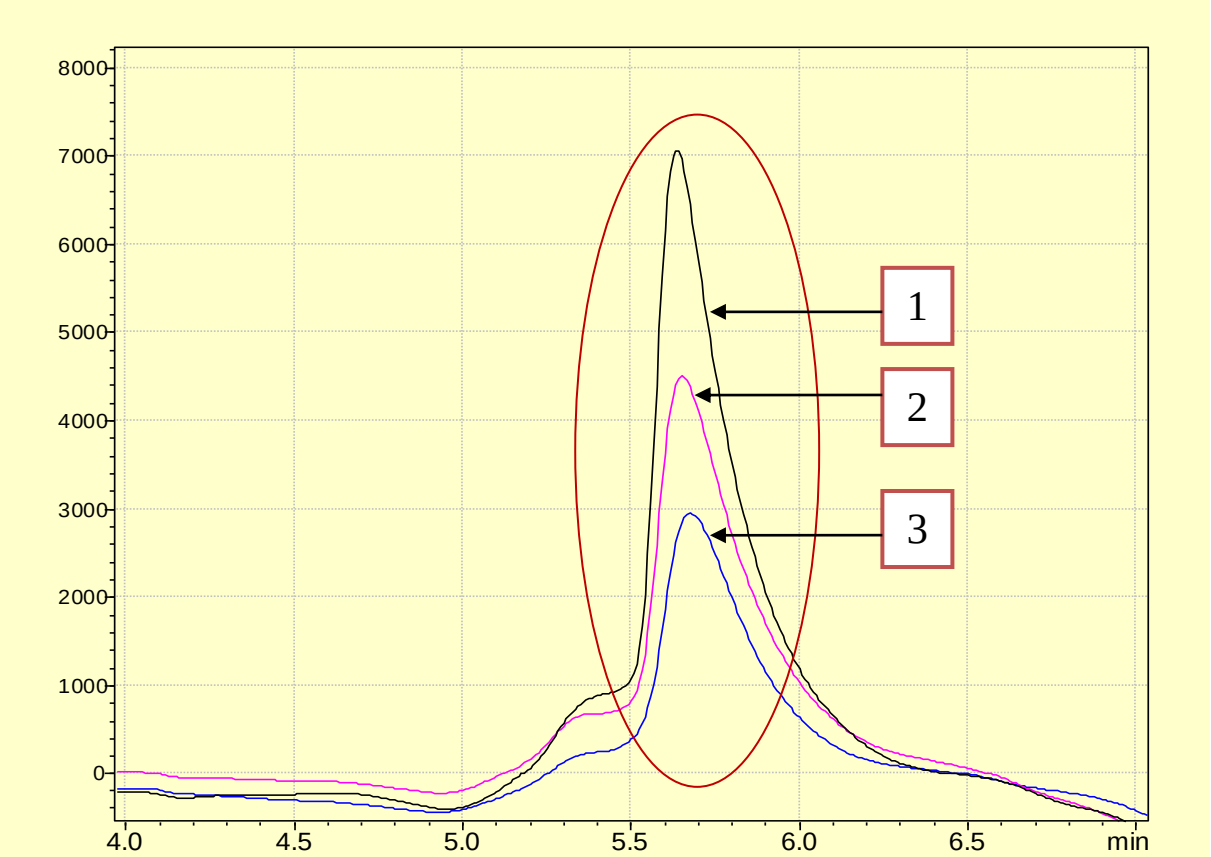


Slika 10. Usporedba kromatograma otapala korištenih pri izradi standardnih otopina:

1- voda
2- smjesa metanola, acetonitrila i vode (v/v/v=9:11:80)
3- metanol

4.5. Mjerenje različitih koncentracija metadona u standardnim otopinama

HPLC metodom mjerene su različite koncentracije standardnih otopina metadona, 1 mg/L, 0.8 mg/L i 0.6 mg/L, kako bi se utvrdila reproducibilnost pri određivanju različitih koncentracija. Detektorom je potvrđeno prisustvo metadona u otopini pripremljenoj razrjeđivanjem otopine Heptanona, a potom i prisustvo svih triju koncentracija metadona u otopinama pripremljenim iz standarda metadona (prikazano na Slici 11.). Detektor je sukladno njihovim vrijednostima dao odgovarajuće odzive.

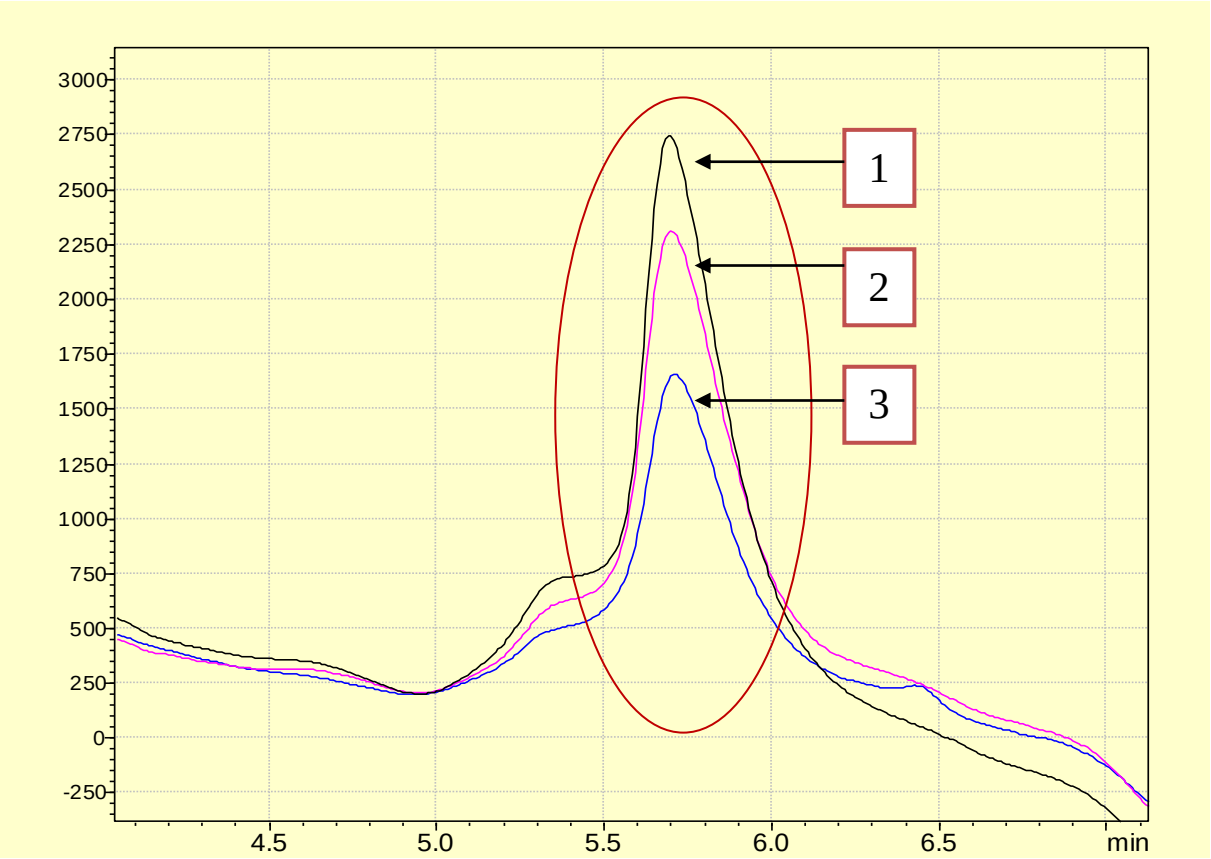


Slika 11. Koncentracije metadona u standardnim otopinama: visine pikova rastu usporedno s porastom koncentracije.

1- γ = 1 mg/L
2- γ = 0.8 mg/L
3- γ = 0.6 mg/L

4.6. Mjerenje različitih koncentracija EDDP-a u standardnim otopinama

HPLC metodom su mjerene različite koncentracije standardnih otopina EDDP-a: 1 mg/L, 0.8 mg/L i 0.6 mg/L. Kao i u slučaju metadona, detektor je detektirao sve tri koncentracije te sukladno njima dao odgovarajuće odzive.

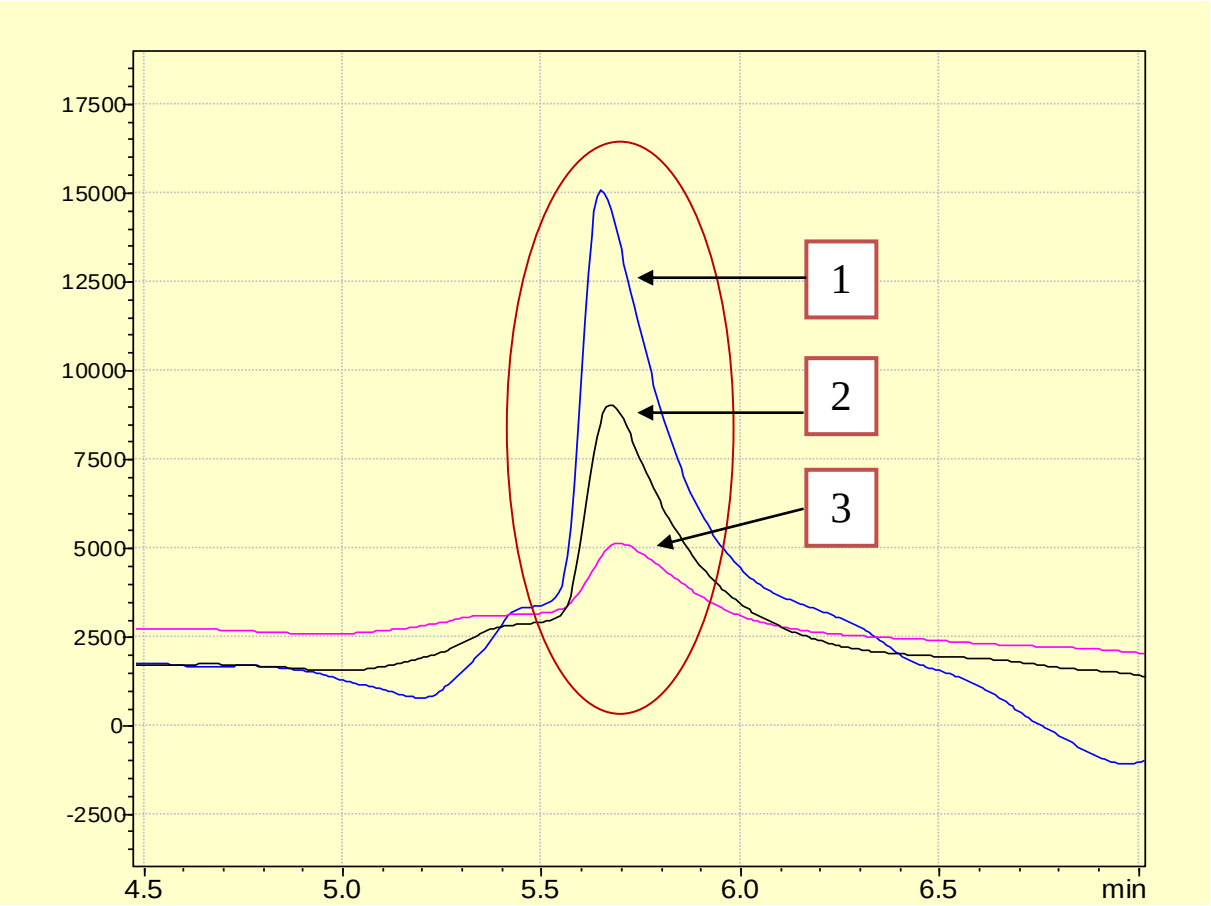


Slika 12. Koncentracije EDDP-a u standardnim otopinama: visine pikova rastu usporedno s porastom koncentracije.

1- γ = 1 mg/L
2- γ = 0.8 mg/L
3- γ = 0.6 mg/L

4.7. Kvalitativna analiza standardnih otopina metadona i EDDP-a te metadona i EDDP-a ekstrahiranih iz seruma

Primjenom HPLC tehnike, na uspostavljenim optimalnim radnim uvjetima, provelo se kvalitativno određivanje standardnih otopina metadona i EDDP-a te smjese metadona i EDDP-a izoliranih iz seruma. Smjesa metadona i EDDP-a, za koju je bilo očekivano da će proizvesti dva odvojena pika, kao odziv je proizvela jedan kromatogram.

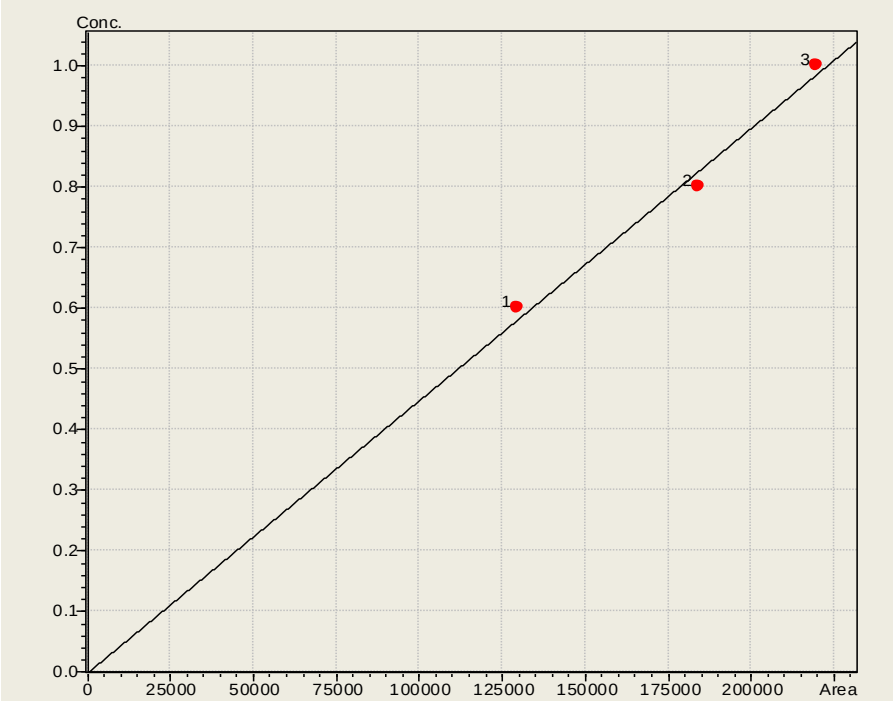


Slika 13. Usporedba koncentracija metadona i EDDP-a iz standardnih otopina s koncentracijama metadona i EDDP-a izoliranih iz seruma:

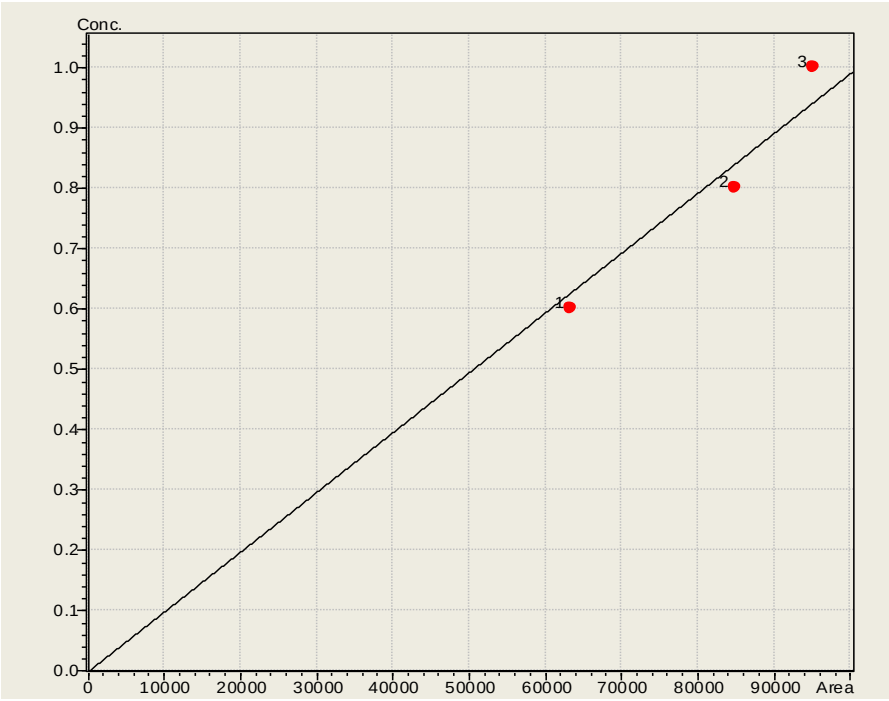
1- smjesa metadona i EDDP-a, γ =1 mg/L
2- metadon, γ =1 mg/L
3- EDDP, γ =1 mg/L

4.8. Umjerne krivulje metadona i EDDP-a

Na slikama 14. i 15. prikazane su umjerne krivulje metadona i EDDP-a dobivene analizom standardnih otopina koristeći HPLC tehniku, koje omogućuju kvantitativne analize metadona i EDDP-a u biološkim i nebiološkim uzorcima.



Slika 14. Grafički prikaz umjerne krivulje metadona



Slika 15. Grafički prikaz umjerne krivulje EDDP-a

5. RASPRAVA

5.1. Određivanje prisustva metadona i EDDP-a u biološkim uzorcima primjenom HPLC metode

Jedna od metoda izbora za kvalitativnu i kvantitativnu analizu metadona u biološkim uzorcima je upravo tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC). Korištenjem i prilagodbom različitih parametara za vrijeme provođenja HPLC analize, utvrđeni su optimalni uvjeti za dokazivanje prisustva metadona i EDDP-a u serumu. Korištena su dva HPLC instrumenta: Shimadzu, tip: LC-10 series i Shimadzu, tip: LC-20 series. Također, korištene su dvije različite kolone: RESTEK Ultra C18- 5µm, 250 x 4.6 mm i INERTSIL ODS-4, 5µm, 250 x 6 mm. Nisu primijećene nikakve razlike u analizi za vrijeme korištenja navedenih instrumenata i kolona. U analizi su ispitane i dvije različite mobilne faze. Smjesa metanola, acetonitrila i vode (v/v/v=9:11:80), korištena kao pokretna faza, dala je bolji odziv od smjese acetonitrila i 0.2 % mravlje kiseline u vodi (v/v = 45:55). Pretpostavlja se da je boljem odzivu na kromatogramu, upotrebom smjese metanola, acetonitrila i vode, doprinijela istovremena upotreba metanola kao otapala u pripremi uzoraka za analizu. Namještanjem različitih valnih duljina za detekciju ispitivanih tvari, na valnoj duljini od 220 nm izlazili su najstabilniji kromatogrami pri različitim koncentracijama analita, što je i prikazano na Slici 9. Ista je valna duljina uspješno primijenjena i u radu znanstvenika V. F. Samanidou, K. Anastasiadou i I. N. Papadoyannis, koji su uspješno razvili metodu određivanja metadona i EDDP-a primjenom HPLC-a (12). Na početku ispitivanja, analiti koji su injektirani bili su pripremljene standardne otopine metadona i EDDP-a, u koncentracijama: 1 mg/L, 2.5 mg/L, 5 mg/L, 0.6 mg/L i 0.8 mg/L. Korištena su tri različita otapala za pripremu standardnih otopina: voda, metanol i smjesa metanola, acetonitrila i vode (v/v/v=9:11:80), koja je ujedno korištena kao pokretna faza. Iščitavanjem iz kromatograma (Slika 10.) je vidljivo kako metanol daje najkvalitetniji odziv te se pokazao najboljim izborom u pripremi standardnih otopina metadona i EDDP-a.

Nakon što su metadon i EDDP detektirani u standardnim otopinama u prethodno obrazloženim uvjetima te nakon ekstrakcije oba analita iz seruma korištenjem tehnike LLE (engl. *liquid-liquid extraction*), ekstrahirani analiti (smjesa metadona i EDDP-a) su u koncentraciji od 1 mg/L i volumenu od 10 µL injektirani u aparat. Temperatura sustava je namještena na 30°C, a vrijeme trajanja analize iznosilo je 8 minuta. Protok je bio namješten na 0.6 mL/min. Nakon završene analize izašao je jedan pik oko šeste minute. S obzirom da su injektiranjem standardne otopine metadona, kao i standardne otopine EDDP-a, oba spoja detektirana oko šeste minute, dalo se naslutiti da su se u prethodnom slučaju dva pika spojila.

Sljedeći razuman korak je bio prilagoditi protok tako da se omogući razdvajanje pikova, odnosno detekcija oba analita iz uzorka. Protok je stoga namješten na 0.6 mL/min do četvrte minute pa na 0.4 mL/min od četvrte do osme minute. Suprotno očekivanjima, pikovi se nisu razdvojili. Na temelju takvog kromatograma, ne može se utvrditi točna koncentracija metadona i EDDP-a u biološkom uzorku.

Zaključno, metadon i EDDP su ovom metodom kvalitativno dokazani, tj. u serumu je dokazano njihovo prisustvo. Ipak, analizom u prethodno navedenim uvjetima nisu utvrđene koncentracije metadona i EDDP-a u serumu, što znači da se ona ne može primijeniti u stvarnoj praksi određivanja nepoznate koncentracije lijeka u biološkom uzorku. Zahvaljujući dokazanom prisustvu metadona i EDDP-a, dobivene su baždarne krivulje ispitivanih analita, prikazane na slikama 12 i 13.

Neke dosadašnje studije imaju zadovoljavajuće rezultate te razvijene i validirane metode određivanja metadona i EDDP-a primjenom HPLC metode. Konkretno, znanstvenici V. F. Samanidou, K. Anastasiadou i I. N. Papadoyannis u svojoj studiji opisuju uspješno razvijenu metodu za određivanje metadona i EDDP-a u serumu i urinu. U njihovom je istraživanju za analitičku pripremu uzorka također primijenjena ekstrakcija tekuće-tekuće te je korišten metanol kao otapalo za pripremu standardnih otopina. Valna duljina koja je u njihovoj studiji omogućila detekciju metadona i EDDP-a ista je kao i u ovom istraživanju. Ipak, ispitivanje se provodilo na sobnoj temperaturi, za razliku od ovog istraživanja gdje je temperatura sustava iznosila 30°C. Nadalje, u njihovom radu optimalni volumen injektiranja iznosio je 20 µL, a protok pokretne faze bio je 1.2 mL/min. Mobilna faza koja je ostvarila najbolji odziv bila je smjesa amonij acetata i acetonitrila (v/v=10:90). Navedena je studija proizvela uvjete za određivanje nepoznate koncentracije metadona i EDDP-a u biološkim uzorcima, primjenjive u toksikološkim analizama.

Ovo je istraživanje omogućilo dokazivanje prisustva metadona i EDDP-a, no ne i kvantitativnu analizu u biološkom uzroku. Potrebna su daljnja ispitivanja primjenom drugačijih vrijednosti te kombinacija parametara. Smatra se kako podatci dostupni u literaturi ne odgovaraju uvjetima laboratorija ili samog instrumenta te je neophodna prilagodba metode postojećim laboratorijskim uvjetima.

6. ZAKLJUČCI

1. HPLC metoda je primjenjiva za pojedinačnu kvalitativnu i kvantitativnu analizu metadona i EDDP-a u biološkim uzorcima.

2. Primjenom ove metode moguće je kvalitativno dokazati prisustvo metadona i EDDP-a u biološkom uzorku seruma.

3. Nedostatak metode je nemogućnost simultanog određivanja koncentracija metadona i EDDP-a u serumu, tj. kvantitativnog dokazivanja.

4. Nemogućnost kvantitativnog dokazivanja pripisuje se neodgovarajućim uvjetima laboratorija ili samog instrumenta te su u cilju razvoja ove metode neophodna daljnja ispitivanja s drugačijim parametrima (uvjeti instrumenta ili kemikalije korištene u analizi).

7. POPIS CITIRANE LITERATURE

1. Katzung BG, Susan B. Masters AJT. Temeljna i klinička farmakologija. 11th ed. Zagreb: Medicinska naklada Zagreb; 2011. str. 556.

2. Savić MM. Lekovi u terapiji bolesti zavisnosti. Arh Farm (Belgr). 2012;62(2):147–55.

3. Ferri M, Minozzi S, Bo A, Amato L. Slow-release oral morphine as maintenance therapy for opioid dependence. Cochrane Database of Systematic Reviews 2013, Issue 6. Art. No.: CD009879. DOI: 10.1002/14651858.CD009879.pub2.

4. Katzung BG, Susan B. Masters AJT. Temeljna i klinička farmakologija. In: Temeljna i klinička farmakologija. 11th ed. Medicinska naklada Zagreb; 2011. str. 545.

5. Jovović IVM. Programi smanjenja štete. 2nd ed. Zagreb: : Udruga za unapređenje kvalitete življenja LET, Zagreb;

6. Modesto-Lowe V, Brooks D, Petry N. Methadone deaths: Risk factors in pain and addicted populations. J Gen Intern Med. 2010;25(4):305–9.

7. Leavitt SB. Methadone Dosing and Safety in the Treatment of Opioid Addiction. Addict Treat Forum. 2003;1–8.

8. WHO expert of comittee on drug dependence. GENEVA: World Health Organization; 1969.

9. Sutlović D. Osnove forenzičke toksikologije. In: Osnove forenzičke toksikologije. Split: Redak; 2011. str. 59.

10. URL: http://www.drugabuse.gov/sites/default/files/drugfacts_understanding_addiction_final_0.pdf (pristup: 01.04.2017.)

11. Sutlović D. Osnove forenzičke toksikologije. In: Osnove forenzičke toksikologije. 2nd ed. Split: Redak; 2011. str. 60.

12. Samanidou VF, Anastasiadou K, Papadoyannis NI. Development and Validation of a Rapid HPLC Method for the Determination of Methadone and its Main Metabolite EDDP in Biological Fluids, Following SPE. J Liq Chromatogr Relat Technol. 2006;29(6):889–902.

13. Popa D-S, Kiss B, Vlase L, Muntean D, Loghin F, Methadone isolation from human plasma by liquid-liquid exraction and solid-phase extraction. Comparative study. Farmacia. 2008;LVI, 2:115–21.

14. URL: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0379073804001033?via%3Dihub (pristup: 01.04.2017.)

15. URL: http://dx.doi.org/10.1111/j.1360-0443.2004.00790.x(pristup: 01.04.2017.)

16. URL: http://www.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova/Heptanon-10-mg-ml-otopina-za-injekciju/12512/ (pristup: 02.04.2017.)

17. URL: http://www.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova/Metadon-Molteni-5-mg-ml-oralna-otopina/11938/ (pristup: 02.04.2017.)

18. URL: http://www.aleretoxicology.co.uk/en/home/support/drugs-library/methadone.html (pristup: 03.04.2017.)

19. Katzung BG, Susan B. Masters AJT. Temeljna i klinička farmakologija. In: Temeljna i klinička farmakologija. 11th ed. Medicinska naklada Zagreb; 2011. str. 532.

20. Of QD, Eddp ITSM, Chromatography UL, Njegovog DI, Eddp M. medicinska revija medical review Case report Methadone and is metabilite eddp usin liquid chromatography method : Case report. 2013;5(3):297–302.

21. Amunugama HT, Zhang H, Hollenberg PF. Mechanism-based inactivation of cytochrome P450 2B6 by methadone through destruction of prosthetic heme. Drug Metab Dispos. 2012;40(9):1765–70.

22. Katzung BG, Susan B. Masters AJT. Temeljna i klinička farmakologija. In: Temeljna i klinička farmakologija. 11th ed. Medicinska naklada Zagreb; 2011. p. 534, 539.

23. Katzung BG, Susan B. Masters AJT. Temeljna i klinička farmakologija. In: Temeljna i klinička farmakologija. 11th ed. Medicinska naklada Zagreb; 2011. p. 540.

24. Bowdle TA, Even A, Shen DD, Swardstrom M. Methadone for the induction of anesthesia: plasma histamine concentration, arterial blood pressure, and heart rate. Anesth Analg. 2004;98:1692–1697, table of contents.

25. Sutlović D. Osnove forenzičke toksikologije. In: Osnove forenzičke toksikologije. 2nd ed. Split: Redak; 2011. str. 311, 320.

26. Skender L. Identifikacija zlouporabe droge. Zagreb: Institut za medicinska israživanja i medicinu rada; 1997. str. 403–411.

27. URL: http://doi.wiley.com/10.1002/%28SICI%291520-636X%281999%2911%3A5/6%3C487%3A%3AAID-CHIR22%3E3.0.CO%3B2-3 (pristup: 08.04.2017.)

28. URL: https://analizakrvi.wordpress.com/category/laboratorijske-tehnike/bioloski-materijal/ (pristup: 08.04.2017.)

29. Sutlović D. Osnove forenzičke toksikologije. In: Osnove forenzičke toksikologije. 2nd ed. Split: Redak; 2011. str. 337.

30. Kašelan M, Medić-Šarić M, Turina S. Plošna kromatografija. In: Plošna Kromatografija. 1st ed. zagreb: Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu; 2006.

31. Sutlović D. Osnove forenzičke toksikologije. In: Osnove forenzičke toksikologije. 2nd ed. Split: Redak; 2011. str. 342.

32. URL: https://socratic.org/questions/how-does-solid-phase-extraction-differ-from-solvent-extraction (pristup: 09.04.2017.)

33. Sutlović D. Osnove forenzičke toksikologije. In: Osnove forenzičke toksikologije. 2nd ed. Split: Redak; 2011. str. 351,352.

34. URL: http://free-zg.t-com.hr/Svjetlana_Luterotti/09/091/09131.htm (pristup: 10.04.2017.)

35. Sutlović D. Osnove forenzičke toksikologije. In: Osnove forenzičke toksikologije. 2nd ed. Split: Redak; 2011. str. 532, 533, 534.

8. SAŽETAK

Ciljevi istraživanja: Razviti metodu za kvalitativno i kvantitativno određivanje metadona i EDDP-a u biološkim uzorcima korištenjem HPLC tehnike, koja se može primijeniti u stvarnoj praksi određivanja nepoznate koncentracije metadona u pacijenata na supstitucijskoj terapiji metadonom.

Materijali i metode: Standardne otopine metadona pripremljene su razrjeđivanjem otopine Heptanona u metanolu te razrjeđivanjem standarda metadona (Lipomed) u metanolu. Razrjeđivanjem primarne otopine Heptanona u metanolu pripremljene su otopine masenih koncentracija 5 mg/L i 2.5 mg/L. Razrjeđivanjem otopine standarda pripremljeno je 5 različitih otopina, od kojih su u instrument injektirane sljedeće masene koncentracije: 1 mg/L, 0.8 mg/L i 0.6 mg/L. Standardne otopine EDDP-a pripremljene su razrjeđivanjem otopine standarda EDDP-a (Lipomed) te su dobivene otopine također injektirane u instrument u koncentracijama 1 mg/L, 0.8 mg/L i 0.6 mg/L. Dobiveni standardi su se tijekom rada u laboratoriju injektirali u instrument u navedenim volumenima: 5 µL, 10 µL, 25 µL i 50 µL. Nakon što su metadon i EDDP detektirani u standardnim otopinama te nakon ekstrakcije oba analita iz seruma korištenjem tehnike LLE (engl. *liquid-liquid extraction*), ekstrahirani analiti (smjesa metadona i EDDP-a) su u koncentraciji od 1 mg/L i volumenu od 10 µL injektirani u aparat. Optimalna valna duljina je bila 220 nm, kao pokretna faza je korištena smjesa metanola, acetonitrila i vode (v/v/v=9:11:80), pH= 6.0, temperatura sustava je namještena na 30°C, a vrijeme trajanja analize iznosilo je 8 minuta. Protok je bio namješten na 0.6 mL/min do četvrte minute pa na 0.4 mL/min od četvrte do osme minute.

Rezultati: Injektiranjem standardne otopine metadona u prethodno navedenim uvjetima, kao i standardne otopine EDDP-a, oba su spoja na instrumentu detektirana oko šeste minute. Ipak, analiti ekstrahirani iz seruma (smjesa metadona i EDDP-a) su u istim uvjetima na kromatogramu detektirani kao jedan pik, umjesto dva odvojena pika koja su trebala odgovarati dvjema različitim tvarima.

Zaključci: Analizom u prethodno obrazloženim uvjetima metadon i EDDP su kvalitativno dokazani, tj. dokazano je njihovo prisustvo u serumu. Ipak, navedenom metodom nije ih moguće dokazati kvantitativno, što znači da se ona ne može primijeniti u stvarnoj praksi određivanja nepoznate koncentracije lijeka i njegovih metabolita u biološkom uzorku.

9. SUMMARY

Diploma Thesis Title: Development of a HPLC Method for the Determination of Methadone and its Metabolite EDDP.

Objectives: The aim of this study was to develop an analytical method for the HPLC determination of methadone and EDDP in biological fluids, which could be readily applied to the monitoring of methadone levels in biological fluids of patients undergoing methadone maintenance therapy.

Material and Methods: Methadone standard solutions were preapared after diluting the Heptanon solution and the methadone reference standard from Lipomed in methanol. By diluting the Heptanon solution, two standard solutions were preapared in the following concentrations: 5 mg/L i 2.5 mg/L. By diluting the methadone standard reference from Lipomed, five standard solutions were preapared, from which the three of them were injected in the instrument in the following concentrations: 1 mg/L, 0.8 mg/L i 0.6 mg/L. EDDP standard solutions were preapared by diluting EDDP reference standard from Lipomed to the following concentrations: 1 mg/L, 0.8 mg/L i 0.6 mg/L. During the analysis in the laboratory a 5 µL, 10 µL, 25 µL i 50 µL aliquots of the preapared standard solutions were injected in the HPLC. After the methadone and EDDP standard solutions were detected on the instrument and both of the analites were extracted from serum by LLE, 10 µL of the extracted substances (the mixture of methadone and EDDP) was injected in the concetration 1 mg/L in the instrument. The chromatografic procedure was carried out by setting a detection wavelength at 220 nm, the working temperature at 30°C and using mixture of methanol, acetonitrile and water (v/v/v=9:11:80), pH= 6.0, as mobile phase. The analysis was performed for 8 minutes total. The flow rate of the mobile phase was 0.6 mL/min during the first four minutes and then switched to 0.4 mL/min from the fourth minute to the end of the analysis.

Results: Both of methadone and EDDP standard solutions were eluted around sixth minute. Still, the mixture of methadone and EDDP extracted from the serum was detected as only one peak on the chromatogram, instead of two separate peaks which should have correspond to these two different substances.

Conclusion: Using the HPLC method described herein, the presence of both methadone and EDDP in the serum could be detected. However, their concentration could not be quantified, therefore this method could not be used for the determination of a drug and its metabolites in biological fluids.

10. ŽIVOTOPIS

Petra Ružić je rođena 21.3.1994. godine u Splitu. U istom gradu završava svoje osnovnoškolsko, srednjoškolsko i fakultetsko obrazovanje. S odličnim uspjehom završava Osnovnu školu Skalice (2000.-2008. godina). Godine 2012. maturira s vrlo dobrim uspjehom u Prvoj gimnaziji. Iste godine upisuje Integrirani preddiplomski i diplomski studij farmacije Sveučilišta u Splitu. Godine 2017. sudjeluje u Natjecanju u kliničkoj suradnji studenata farmacije i medicine na Medicinskom fakultetu te osvaja 1. mjesto. Od 1. ožujka do 1. rujna 2017. godine odrađuje stručno osposobljavanje u Ljekarnama Splitsko-dalmatinske županije, u ljekarničkoj jedinici Spinut.