



Određivanje morfina, kodeina i 6-monoacetilmorfina metodom HPLC/MS u salivi heroinskih zavisnika

Determination of morphine, codeine and 6-monoacetylmorphine in saliva of substance-abuse patients using HPLC/MS methods

Vesna Milovanović*, Biljana Ćirić†, Jasna Milenković§, Vesna Kilibarda†, Marijana Ćurčić¶, Slavica Vučinić‡, Biljana Antonijević¶

*Agencija za hemikalije Republike Srbije, Beograd, Srbija; Vojnomedicinska akademija, Centar za kontrolu trovanja, †Klinika za urgentnu i kliničku toksikologiju, ‡Odeljenje za toksikološku hemiju, Beograd, Srbija; §Dom zdravlja „Dr Milutin Ivković“, Služba laboratorijske dijagnostike, Beograd, Srbija; ¶Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet, Katedra za toksikologiju „Akademik Danilo Soldatović“, Beograd, Srbija

Apstrakt

Uvod/Cilj. Saliva predstavlja alternativni matriks za identifikaciju sredstava zloupotrebe. Cilj ovog rada bio je optimizacija metode pripreme uzorka salive i određivanja metabolita heroina, morfina i 6-monoacetilmorfina (6-mam), i kodeina *liquid chromatography-mass spectrometry* (LC/MS) metodom i provera metode u realnim uslovima kod heroinomana. **Metode.** Priprema uzoraka vršena je tečno-tečnom ekstrakcijom uz smešu hloroforma i izopropil alkohola u odnosu 9 : 1. Ekstrakti su analizirani tehnikom HPLC/MS: razdvajanje na koloni Waters Spherisorb® 5 µm, ODS2, 4,6 × 100 mm, vršeno je primenom mobilne faze amonijum-acetat : acetonitril u odnosu 80 : 20 pri protoku od 0,3 mL/min. Masena detekcija je vršena u opsegu masa od 100 do 400 m/z. Primenjene su regresiona i korelaciona analiza za nivo verovatnoće 0,05. Određivanje prisustva morfina, kodeina i 6-mam vršeno je u uzorcima salive kod osoba kod kojih je test trakama utvrđeno prisustvo „opijata“ u urinu. **Rezultati.** Kalibracija je vršena u

opsegu koncentracija 0,1–1 mg/L sa koeficijentom determinacije $R^2 > 0,99$. Dobijene su kalibracione krive: za morfin, $y = 385531x + 14584$; kodein, $y = 398036x + 31542$ i 6-monoacetilmorfin, $y = 524162x - 27105$. *Recovery* vrednosti za određivanje morfina i kodeina iznosile su 99%, a za 6-mam 94%. Limit detekcije predložene metode iznosio je 0,01 mg/L, a limit kvantifikacije 0,05 mg/L. U salivi uživalaca heroina koncentracija morfina kretala se u opsegu od 0,54 do 5,82 mg/L, kodeina od 0,05 do 5,33, a 6-mam od 0,01 do 0,68 mg/L i dobijena je statistički značajna korelacija između vrednosti za kodein i 6-mam. **Zaključak.** Predložena HPLC/MS metoda za određivanje sadržaja morfina, kodeina i 6-monoacetilmorfina u salivi je tačna, jednostavna, ekonomična i pogodna za rutinsku primenu, kao i za biomonitoring zloupotrebe heroina.

Ključne reči:

pljuvačka; morfin; kodein; hromatografija, tečna, pod vp; spektrometrija mase; heroin.

Abstract

Background/Aim. Saliva represents an alternative specimen for substances abuse determination in toxicology. Hence, the aim of this study was to optimize a method for saliva specimen preparation for heroin metabolites, morphine and 6-monoacetylmorphine (6-mam), and codeine determination by liquid chromatography-mass spectrometry (LC/MS), and to apply this method on saliva samples taken from the patients. **Methods.** Saliva specimen was prepared using liquid/liquid extraction of morphine, codeine and 6-mam by mixture of chloroform and isopropanol (9 : 1; v/v). Extracts were analysed by HPLC/MS technique: separation column Waters Spherisorb® 5 µm, ODS2, 4,6 × 100 mm;

mobile phase: ammonium acetate : acetonitrile (80 : 20; v/v), mobile phase flow rate 0.3 mL/min; mass detection range: 100–400 m/z. Regression and correlation analyses were performed with the probability level of 0.05. Concentrations of morphine, codeine and 6-mam were determined in saliva samples of the patients with “opiates” in urine identified by the test strips. **Results.** Calibration for each analysed substance was done in the concentration range from 0.1 to 1 mg/L and the coefficient of correlation was $R^2 > 0.99$. We obtained following calibration curves: $y = 385531x + 14584$; $y = 398036x + 31542$; and $y = 524162x - 27105$, for morphine, codeine and 6-mam, respectively. Recovery for morphine and codeine determination was 99%, while for 6-mam it was 94%. Limits of detection and quantification of a

proposed method were 0.01 mg/L and 0.05 mg/L, respectively. Concentration of morphine in the saliva of the heroin users ranged between 0.54 and 5.82 mg/L, concentration of codeine between 0.05 and 5.33, and 6-mam between 0.01 and 0.68 mg/L. A statistically significant correlation between codeine and 6-mam concentrations was obtained. **Conclusion.** A proposed HPLC/MS method for morphine,

codeine and 6-mam determination in saliva is accurate, simple, cheap and suitable for routine analysis and monitoring of heroin abuse.

Key words:

saliva; morphine; codeine; chromatography, high pressure liquid; mass spectrometry; heroin.

Uvod

Zloupotrebu psihoaktivnih supstanci u Srbiji karakteriše porast korišćenja svih vrsta droge, naročito sintetičke, kao i veliki broj slučajeva istovremenog korišćenja različitih vrsta droge. Prema podacima zdravstvenih centara u Srbiji, među registrovanim zavisnicima sredstava zloupotrebe dominantni su oni koji ova sredstva primenjuju intravenskim putem (65%)¹. U periodu od januara 2008. do avgusta 2009. godine u Odeljenje za toksikološku hemiju Centra za kontrolu trovanja Vojnomedicinske akademije (VMA) u Beogradu primljena su 804 zahteva za analizu psihoaktivnih supstanci u urinu, među njima najveći broj iz Toksikološke ambulante i Klinike za toksikologiju VMA. Od tog broja, primenom komercijalnih test traka za detekciju psihoaktivnih supstancija, pozitivna reakcija na „opijate“ ustanovljena je kod 275 uzoraka urina (neobjavljeni podaci).

U cilju biomonitoringa zloupotrebe heroina uobičajena je identifikacija kodeina, morfina i 6-monoacetilmorfina kao njegovih metabolita. Heroin se u potpunosti eliminiše iz organizma za oko 24 časa jer se u organizmu veoma brzo hidrolizuje do 6-monoacetilmorfina (6-mam), koji se dalje nešto sporije hidrolizuje do morfina, kao glavnog metabolita. U plazmi, takođe, dokazani su i acetilkodein i kodein, kao nečistoće ilegalnog heroina². Metabolit 6-mam, 6-O-acetilmorfin, specifičan je za heroin, i njegovo određivanje u biološkom materijalu od velikog je značaja kada se sumnja na trovanje heroinom, jer se sam heroin teško može detektovati zbog brzog metabolizma³.

Urin i krv su uobičajeni biološki materijali koji se koriste za detekciju i određivanje sredstava zloupotrebe. Upotreba salive kao alternativnog matriksa za detekciju ovih supstancija je sve veća u poslednjih nekoliko godina, zahvaljujući, pre svega, farmakokinetičkim istraživanjima koja su potvrdila zadovoljavajuću korelaciju između njihovog sadržaja u salivi i krvi⁴.

Uzorkovanje salive je jednostavno i neinvazivno, a činjenica da sakupljanje salive može direktno da se nadgleda, bez narušavanja privatnosti ispitanika, smanjuje mogućnost falsifikovanja uzoraka, što je pogodnost u okolnostima testiranja vozača, radnika, ali i opšte populacije⁵. Pored toga, sa analitičkog stanovišta značajno je što je saliva kao matriks relativno neopterećena endogenim materijama koje bi mogle da interferiraju sa određivanjem same supstancije⁶, a koncentracija ukupnih proteina u salivi čini svega 1% ukupnih proteina plazme, što je čini praktično deproteinizovanom tečnošću⁷. Zbog toga se saliva smatra dobrom alternativom za krv i za urin za dokazivanje skorašnje upotrebe sredstava zloupotrebe⁸. Za određivanje koncentracije

sredstava zloupotrebe u salivi, najčešće se koriste tehnike gasne i tečne hromatografije sa masenom detekcijomposle pripreme materijala tečno-tečnom ili tečno-čvrstom ekstrakcijom⁴.

Cilj ovog rada bio je optimizacija metoda pripreme uzorka salive i određivanje kodeina, i glavnih metabolita heroina, morfina i 6-monoacetilmorfina, *high-performance liquid chromatography mass spectrometry* (HPLC/MS) metodom.

Metode

Aparati

Za analizu su korišćeni tečni hromatograf Waters Alliance® (Waters Corporation, Milford, MA, USA), kolona Waters Spherisorb® 5 µm, ODS2, 4,6 × 100 mm (Waters Corporation, Milford, MA, USA), petlja 50 µL i maseni spektrometar Waters Micromass® ZQ™ (Waters Corporation, Milford, MA, USA).

Hemikalije i reagensi

U radu su korišćene komercijalno dostupne hemikalije i reagensi: azot čistoće 99,9999%; metanol, HPLC čistoće, i amonijum-acetat (Merck, Darmstadt, Germany); hloroform, izopropil alkohol, amonijum-hidroksid i glacijalna sirćetna kiselina (Zorka Pharma p.a., Šabac, Srbija); acetonitril HPLC čistoće (J.T. Backer, Deventer, Netherlands); analitički standardi morfina, kodeina, 6-monoacetilmorfina (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA).

Osnovni rastvori morfina, kodeina i 6-monoacetilmorfina pripremljeni su u metanolu, u koncentraciji 1 g/L, svaki pojedinačno. Radni rastvori standarda koncentracije 0,10, 0,20, 0,30, 0,50 i 1,00 mg/L dobijeni su razblaživanjem osnovnih standarda u mobilnoj fazi.

Uzorkovanje i priprema uzoraka

Radom su obuhvaćeni rezultati dobijeni na uzorcima od 11 heroinskih zavisnika, muškog pola, starosti između 22 i 36 godina, od kojih je devet primenilo heroin *i.v.* putem, a dva ušmrkavanjem. Pet ispitanika nalazilo se u stanju kome, dva su bila somnolentna, a preostala četiri u svesnom stanju. Uzorkovanje salive je vršeno pomoću stimulatora lučenja salive – štapića sa sunderčićem (Doa Multidiagnost S6 test®, Biognost, Zagreb, Hrvatska) natopljenim limunskom kiselinom. Uzorci su čuvani u hemijski čistim PVC posudama na temperaturi -20°C do određivanja.

Za pripremu uzoraka salive korišćena je tečno-tečna ekstrakcija. U uzorke dobijene rekonstitucijom uparene smeše standarda opijata (0,2 mL) u 2 mL *pool*-a salive, do-

dato je 3 mL smeše rastvarača hloroforma i izopropil alkohola u odnosu 9 : 1, i 100 μ L amonijum-hidroksida da bi se postigla optimalna sredina za ekstrakovanje opijata (pH 9). Ekstrakcija iz 1 mL uzorka salive bolesnika vršena je dodavanjem 6 mL smeše rastvarača hloroforma i izopropil alkohola u odnosu 9 : 1, uz 200 μ L amonijum-hidroksida. Posle 20 min mućkanja na horizontalnoj mućkalici, uzorci su centrifugirani 10 min na 4 000 obrtaja/min. Organski sloj je zatim uparen i izvršena je rekonstitucija u 1 mL mobilne faze. Ovako pripremljen ekstrakt analiziran je metodom HPLC/MS.

Metoda HPLC/MS

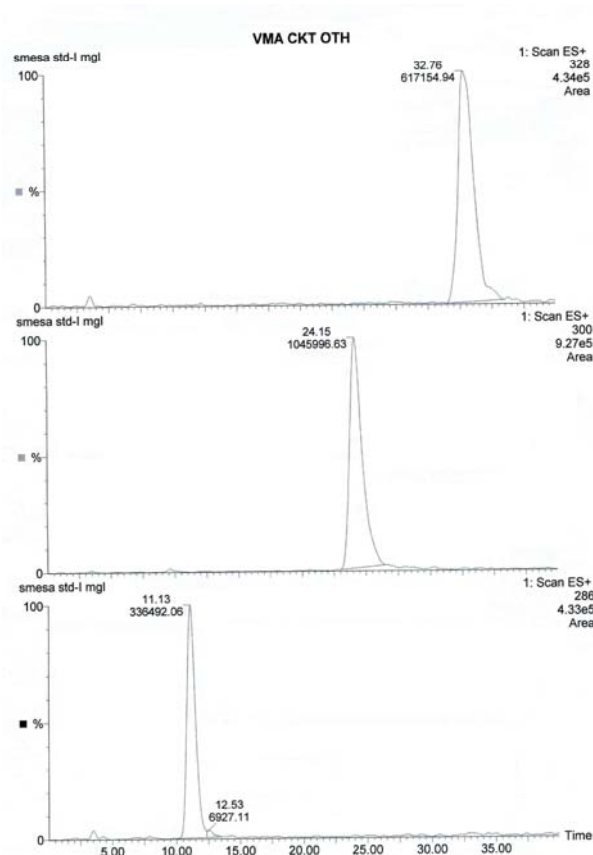
Hromatografski uslovi za HPLC-ESI-MS bili su sledeći: razdvajanje na koloni Waters Spherisorb® 5 μ m, ODS2, 4,6 \times 100 mm vršeno je primenom mobilne faze koja se sastoji iz komponente A (5 mM amonijum-acetata + 0,1% sirćetne kiseline, pH = 3,5) i B (acetonitril + 0,1% sirćetne kiseline) u odnosu 80 : 20, pri protoku od 0,3 mL/min. Temperatura u autosempleru iznosila je 20°C, a injekciona zapremina 50 μ L. Masena detekcija vršena je u opsegu masa od 100 do 400 m/z, centroidni mod, *interscan delay* 0,1 s, *scan time* 0,5 s, bez splitovanja, četiri načina snimanja (sa naponom na konusu 70, 60, 50 i 38 V i elektrosprej mod ES+); temperatura izvora bila je 150°C, temperatura desolvacije 430°C; protok gasa: desolvacioni 362 L/h, konusni 135 L/h; napon na kapilari 3 kV. Kalibracija i optimizacija aparata vršena je u odnosu na standard morfina (jon 286) koncentracije 10 mg/L, pri protoku 10 μ L/min.

Za statističku obradu podataka korišćeni su programi Microsoft Office Excel i Statistica. Primenjena je regresiona i korelaciona analiza za nivo verovatnoće 0,05. Maseni spektri su obrađeni kompjuterskim programom Waters MassLynx™ (Waters Corporation, Milford, MA, USA).

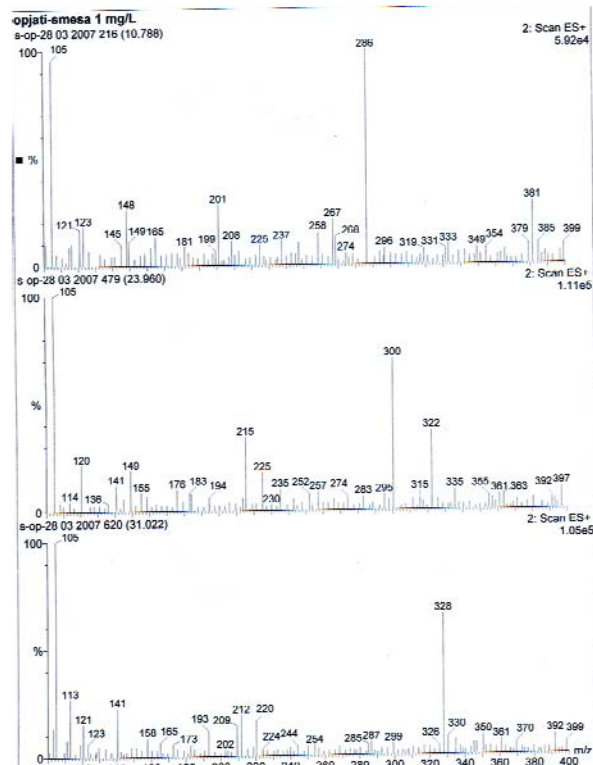
Rezultati

Pod zadatim hromatografskim uslovima retenciona vremena standarda pripremljenih u *pool*-u salive odgovarala su retencionim vremenima standarda u mobilnoj fazi i to: za morfin 11,1 min, za kodein 24,1 min i za 6-monoacetilmorfin 32,8 min, sa odstupanjem do 10%. Na slici 1 prikazani su hromatogrami morfina, kodeina i 6-monoacetilmorfina iz smeše standarda u mobilnoj fazi, a na slici 2 maseni spektri ispitivanih supstancija u kojima su identifikovane karakteristične jonske mase morfina (286 m/z), kodeina (300 m/z) i 6-monoacetilmorfina (328 m/z). Poređenja radi, na slikama 3 i 4 dati su hromatogram i maseni spektar ovih supstancija iz uzorka salive osobe (J.T.) kod koje je prethodno utvrđeno prisustvo „opijata“ u urinu.

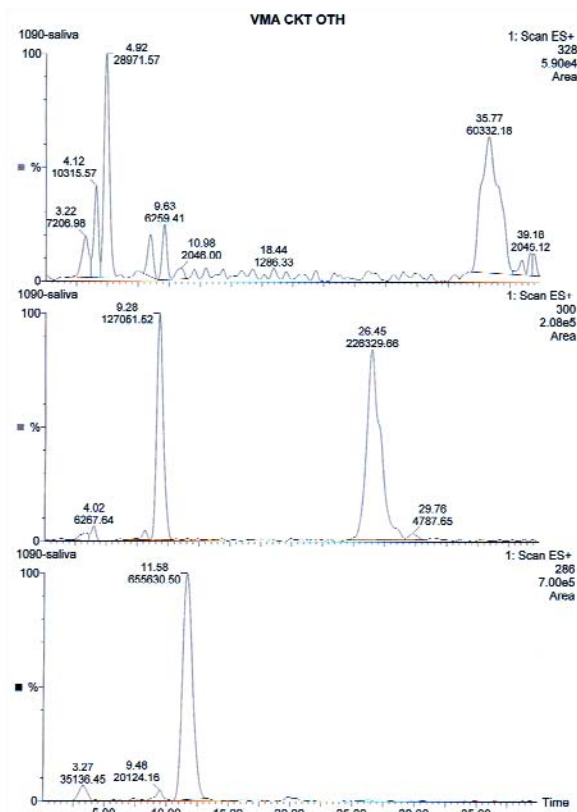
Zavisnost površine hromatografskog pika i koncentracije ispitivanih supstancija u salivi ispitana je regresionom analizom i dobijene su linearne kalibracione krive za analite od interesa sa koeficijentom determinacije $R^2 > 0,99$. Kalibracija je vršena u opsegu koncentracija 0,1–1 mg/L (0,1; 0,2; 0,3; 0,5; 1 mg/L) i dobijene su sledeće jednačine: za morfin, $y = 385531x + 14584$; za kodein, $y = 398036x + 31542$; za 6-mam, $y = 524162x - 27105$.



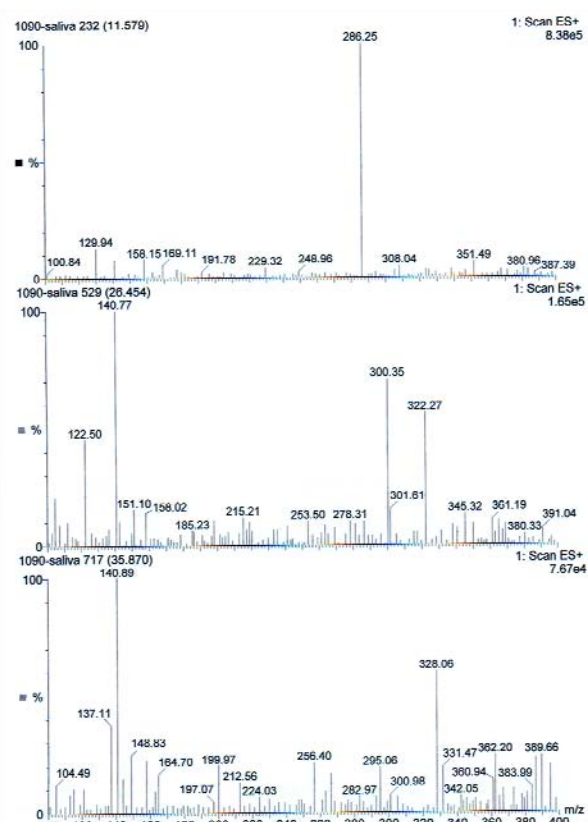
Sl. 1 – Hromatogram smeše standarda morfina, kodeina i 6-mam u mobilnoj fazi



Sl. 2 – Maseni spektar smeše standarda morfina, kodeina i 6-monoacetilmorfina (6-mam) u mobilnoj fazi
Morfin – 286 m/z; kodein – 300 m/z; 6-mam – 328 m/z



Sl. 3 – Hromatogram uzorka salive bolesnika koji je imao pozitivnu reakciju na opijate u urinu



Sl. 4 – Maseni spektar uzorka salive bolesnika koji je imao pozitivnu reakciju na opijate u urinu
Morfina – 286,25 m/z; kodeina – 300,35 m/z;
6-monoacetilmorfina (6-mam) – 328,06 m/z

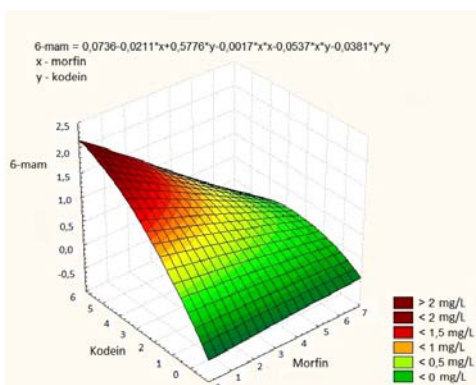
Korelacionom analizom potvrđena je tačnost metode sa koeficijentima korelacije: 0,9970 za morfin, 0,9982 za kodein i 0,9981 za 6-monoacetilmorfin. Dobijene su sledeće *recovery* vrednosti: za morfin 99%, za kodein 99% i za 6-monoacetilmorfin 94%. Računat na bazi pojedinačnih koncentracija analita *recovery* je varirao u rasponu 74–123% za morfin, 97–106% za kodein i 28–91% za 6-mam. Množenjem šuma aparata sa 3 i 5, izračunati su limit detekcije (LOD) od 0,01 mg/L, i limit kvantifikacije (LOQ) od 0,05 mg/L za sve ispitivane supstance.

Posle validacije metode, analizirano je 11 uzoraka salive bolesnika primljenih u Toksikološku ambulantu Centra hitne pomoći VMA i Kliniku za toksikologiju Centra za kontrolu trovanja VMA za koje je prethodno test trakama potvrđeno prisustvo opijata u urinu. Sadržaj ispitivanih supstancija u salivi bolesnika prikazan je u tabeli 1. Vrednosti

Tabela 1
Koncentracije morfina, kodeina i 6 monoacetilmorfina (6-mam) u salivi korisnika opijatne droge

Bolesnik	Koncentracija u salivi (mg/L)		
	morfina	kodeina	6-mam
M.N.	5,42	0,33	0,01
T.N.	3,31	0,05	0,02
M.M.	1,80	0,29	0,08
Ž.M.	0,54	–	0,03
B.I.	1,06	–	0,27
P.B.	5,82	0,85	0,08
K.N.	4,50	5,33	0,65
M.A.	3,16	1,98	0,68
L.M.	1,34	–	–
I.D.	0,77	–	–
J.T.	1,87	0,22	0,09

koncentracija su se kretale u opsegu 0,54–5,82 mg/L za morfin, 0,05–5,33 za kodein, a za 6-monoacetilmorfin 0,01–0,68 mg/L. Koncentracije niže od LOQ dobijene su izračunavanjem posle merenja u koncentrisanim uzorcima. U cilju ispitivanja korelacije između koncentracija morfina, kodeina i 6-monoacetilmorfina u salivi ispitanika, primenili smo dva scenarija. U prvom scenariju uključili smo samo ispitanike kod kojih su izmerene vrednosti sve tri supstancije, a u drugom sve ispitanike, pri čemu smo u slučajevima kod kojih supstancije nisu detektovane koristili vrednost 0. Bez obzira na primenjeni scenario, statistički značajna korelacija dobijena je između vrednosti za kodein i 6-mam sa koeficijentom korelacije 0,84 u prvom, i 0,82 u drugom slučaju, uz nivo značajnosti $p = 0,02$ za oba scenarija. Jednačina koja opisuje korelaciju između koncentracija kodeina i 6-mam za prvi scenario iznosila je $y = 0,1312x + 0,0596$, a za drugi $y = 0,1293x + 0,0665$ sa koeficijentima determinacije (R^2) 0,70 i 0,67. Na slici 5 dat je trodimenzionalni prikaz koreliranih parametara.



Sl. 5 – Trodimenzionalni prikaz zavisnosti koncentracija morfina, kodeina i 6-monoacetilmorfina (6-mam) u salivi grupe bolesnika sa pozitivnom reakcijom na opijate u urinu

Diskusija

Saliva pripada kategoriji tzv. alternativnih uzoraka sa sve većim značajem za primenu u kliničko-toksikološkoj analizi⁴. Priprema uzoraka salive u svrhu određivanja lekova i sredstava zloupotrebe podrazumeva upotrebu tečno-čvrste⁹,^{10–13}, ili tečno-tečne ekstrakcije¹⁴. Zapremina prikupljenog uzorka salive je često mala, pa se za detekciju supstanci primenjuju tehnike gasne¹⁰ i tečne^{9, 11, 12, 15–17} hromatografije sa masenom detekcijom⁴, i tako se obezbeđuje visoka specifičnost i osetljivost. Metoda LC-MS primenjuje se kao potvrđni test za drogu u salivi¹¹. U ovom radu, uzorci salive pripremani su tečno-tečnom ekstrakcijom, i dobijene su zadovoljavajuće *recovery* vrednosti. Morfin, kodein i 6-mam identifikovani su na osnovu retencionih vremena i masenih spektara čime je postignuta neophodna specifičnost analize, a linearost je dobijena u opsegu 0,1–1 mg/L. Pri hromatografskoj analizi uzoraka salive pripremljenih ekstrakcionom procedurom navedenom u ovom radu nije primećeno prisustvo dodatnih pikova koji bi mogli da potiču od interferirajućih supstancija, što ukazuje na selektivnost primenjenog postupka. Osnovne prednosti predložene metode, u odnosu na metode opisane u literaturi, su jednostavnost pripreme uzorka i izvođenja hromatografske procedure i ekonomičnost. Predložena metoda, takođe, ima zadovoljavajuće karakteristike u pogledu osetljivosti, tačnosti i specifičnosti.

Saliva je lako dostupna za neinvazivno uzorkovanje koje može da se nadgleda, i relativno je neopterećena materijama koje bi mogle da interferiraju sa određivanjem analita. Pored navedenih prednosti upotrebe salive kao biološkog materijala, postoje i određena ograničenja. Naime, saliva se teško sakuplja kod dehidriranih, predoziranih zavisnika kod kojih se kao jedan od simptoma javlja suvoća usta, posebno ako uzimaju i stimulanse kao što je amfetamin. U poređenju sa urinom, u salivi je kraći period detekcije aktivnih supstanci, a i različiti načini sakupljanja salive (stimulisano i nestimulisano uzorkovanje) utiču na prinos analita od interesa. Savremeni analitički pristup problematici identifikacije i određivanja izdvaja primenu HPLC/MS metode zbog toga što se ovom tehnikom obezbeđuje visoka specifičnost i osetljivost, naročito ako se ima u vidu da je koncentracija metabolita u salivi često niža od koncentracije u tradicionalnim uzorcima^{4, 15}.

Difuzija jedinjenja iz krvi u salivu zavisi od unete doze i klirensa, osobina jedinjenja (pKa, liposolubilnosti, stepena vezivanja za proteine plazme, naelektrisanja, molekulske mase i prostorne konformacije), ali i od osobina salive (pH, brzine protoka, sastava)¹⁸. Vremenski period tokom koga supstance mogu da se detektuju u salivi zavisi i od puta unosa. Posle *iv* primene heroin se detektuje u prvom satu, a posle pušenja i ušmrkavanja tokom 24 h. Za morfin vreme detekcije je 0,5–24 h posle *im* primene, dok se kodein može naći u salivi 2–12 h nakon peroralnog uzimanja^{6, 19, 20}. U ovom radu, vrednosti dobijene određivanjem morfina, kodeina i za 6-mam u salivi ispitanika nalazile su se u širokom opsegu koncentracija (tabela 1). Iako nismo imali podatke o dozama i vremenu proteklom od primene droge za ispitanike čiji su uzorci uzimani u rad, poznato je da koncentracije u salivi zavise i od kontaminacije usne duplje samim sredstvom zloupotrebe, naročito u prvom satu od primene^{6, 21}. Pored doze i vremena, kontaminacija usne duplje mogla bi značajno da doprinese rasponu u dobijenim koncentracijama. Pujadas i sar.¹⁰ u salivi bolesnika primljenih u jedinicu hitne pomoći zbog različitih povreda, posle tečno-čvrste ekstrakcije, metodom GC/MS odredili su vrednosti za morfin 34,6 ng/mL (0,0346 mg/L), za 6-mam 83,9 ng/mL (0,0839 mg/L) i kodein 372,0 ng/mL (0,372 mg/L). Metodom LC/MS-MS prilikom testiranja vozača, Wood i sar.⁹ izmerili su koncentracije 6-mam od 238 i 291 µg/L (0,238 i 0,291 mg/L), morfina 725 i 1063 µg/L (0,725 i 1,063 mg/L) i kodeina 107 i 132 µg/L (0,107 i 0,132 mg/L), a Oiestad i sar.²⁰ 0,04–11 µmol/L (0,011–3,139 mg/L) i 0,024–20 µmol/L (0,007–5,987 mg/L) za morfin odnosno kodein. Kod trudnica zavisnih od heroina, na metadonskoj terapiji, istom metodom dobijene su nešto niže vrednosti: 1,1–51,3 µg/L (0,0011 i 0,0513 mg/L) za morfin, 1,3–6,4 µg/L (0,0013 i 0,0064 mg/L) za kodein i 1,4–434,0 µg/L (0,0014 i 0,434 mg/L) za 6-mam¹⁷.

U ovom radu koncentracije dobijene kod svih ispitanika opadale su po sledećem redosledu: morfin > kodein > 6-mam, osim kod jednog pacijenta kod kojeg je koncentracija kodeina bila veća od koncentracije morfina. Korelisanjem izmerenih vrednosti dobijena je statistički značajna korelacija između koncentracija kodeina i 6-mam, a na bazi prikazane jednačine (slika 5), moguće je predvideti koncentraciju jednog od metabolita što ima praktični značaj pri proceni ekspozicije heroinu, uključujući dinamiku i obim izloženosti.

Zaključak

Predložena metoda HPLC/MS za određivanje sadržaja morfina, kodeina i 6-mam u salivi je tačna, jednostavna i ekonomična, pa je zbog toga pogodna za rutinsku primenu. Imajući u vidu činjenicu da ova metoda daje metabolički profil heroina, možemo reći da poseduje relativno visok informativni potencijal o vremenu i načinu njegove zloupotrebe.

Zahvalnica

Ovaj rad delom je podržalo Ministarstvo za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije (projekat TR 20212A i projekat III 46009).

L I T E R A T U R A

1. *Vlada Republike Srbije, Ministarstvo zdravlja*. Anti-drug strategy in the Republic of Serbia within 2009–2013. Official Gazette Republic of Serbia, No. 55/05, 71/05 – correction 101/07 and 65/08. (Serbian)
2. *Rook EJ, Hillebrand MJ, Rosing H, van Ree JM, Beijnen JH*. The quantitative analysis of heroin, methadone and their metabolites and the simultaneous detection of cocaine, acetylcodeine and their metabolites in human plasma by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2005; 824(1–2): 213–21.
3. *Cone EJ, Huestis MA*. Interpretation of oral fluid tests for drugs of abuse. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1098: 51–103.
4. *Pil K, Verstraete A*. Current developments in drug testing in oral fluid. *Ther Drug Monit* 2008; 30(2): 196–202.
5. *Kidwell DA, Holland JC, Athanasielis S*. Testing for drugs of abuse in saliva and sweat. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1998; 713(1): 111–35.
6. *Cone EJ*. Saliva testing for drugs of abuse. *Ann N Y Acad Sci* 1993; 694: 91–127.
7. *O'Neal CL, Crouch DJ, Rollins DE, Fatab A, Cheever ML*. Correlation of saliva codeine concentrations with plasma concentrations after oral codeine administration. *J Anal Toxicol* 1999; 23(6): 452–9.
8. *Samyn N, De Boeck G, Wood M, Lamers CT, De Waard D, Brookhuis KA*, et al. Plasma, oral fluid and sweat wipe ecstasy concentrations in controlled and real life conditions. *Forensic Sci Int* 2002; 128(1–2): 90–7.
9. *Wood M, Laloup M, Ramirez Fernandez Mdel M, Jenkins KM, Young MS, Ramaekers JG*, et al. Quantitative analysis of multiple illicit drugs in preserved oral fluid by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Forensic Sci Int* 2005; 150(2–3): 227–38.
10. *Pujadas M, Pichini S, Civit E, Santamariña E, Perez K, de la Torre R*. A simple and reliable procedure for the determination of psychoactive drugs in oral fluid by gas chromatography-mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 2007; 44(2): 594–601.
11. *Concheiro M, de Castro A, Quintela O, Cruz A, López-Rivadulla M*. Confirmation by LC-MS of drugs in oral fluid obtained from roadside testing. *Forensic Sci Int* 2007; 170(2–3): 156–62.
12. *Concheiro M, de Castro A, Quintela O, Cruz A, López-Rivadulla M*. Determination of illicit and medicinal drugs and their metabolites in oral fluid and preserved oral fluid by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 2008; 391(6): 2329–38.
13. *Santos V, López KJ, Santos LM, Yonamine M, Carmona MJ, Santos SR*. Determining plasma morphine levels using GC-MS after solid phase extraction to monitor drug levels in the postoperative period. *Clinics (Sao Paulo)* 2008; 63(3): 307–14.
14. *Fernández P, Morales L, Vázquez C, Lago M, Bermejo AM*. Comparison of two extraction procedures for determination of drugs of abuse in human saliva by high-performance liquid chromatography. *J Appl Toxicol* 2008; 28(8): 998–1003.
15. *Sergi M, Bafile E, Compagnone D, Curini R, D'Ascenzo G, Romolo FS*. Multiclass analysis of illicit drugs in plasma and oral fluids by LC-MS/MS. *Anal Bioanal Chem* 2009; 393(2): 709–18.
16. *Öiestad EL, Jobansen U, Christophersen AS*. Drug screening of preserved oral fluid by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 2007; 53(2): 300–9.
17. *Dams R, Choo RE, Lambert WE, Jones H, Huestis MA*. Oral fluid as an alternative matrix to monitor opiate and cocaine use in substance-abuse treatment patients. *Drug Alcohol Depend* 2007; 87(2–3): 258–67.
18. *Tenover JO*. Human Saliva: Clinical Chemistry and Microbiology. II. Boca Raton (FL): CRC Press; 1989.
19. *Jenkins KM, Young MS, Mallet CR, Elian AA*. Mixed-mode solid-phase extraction procedures for the determination of MDMA and metabolites in urine using LC-MS, LC-UV, or GC-NPD. *J Anal Toxicol* 2004; 28(1): 50–8.
20. *Yamada H, Oguri K*. Morphine and its analogues. In: *Suzuki O, Watanabe K*, editors. *Drugs and poisons in humans*. New York: Springer-Verlag; 2005. p. 195–206.
21. *Jenkins AJ, Oyler JM, Cone EJ*. Comparison of heroin and cocaine concentrations in saliva with concentrations in blood and plasma. *J Anal Toxicol* 1995; 19(6): 359–74.

Primljen 05. III 2010.
Revidiran 12. IV 2010.
Prihvaćen 19. IV 2010.