

Małgorzata Krajnik¹, Marzena Sykutera², Ewa Pufal²¹Katedra i Zakład Opieki Paliatywnej *Collegium Medicum* im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu²Katedra i Zakład Medycyny Sądowej *Collegium Medicum* im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Szybka i prosta metoda ekstrakcji morfiny z krwi pełnej

Fast and simple method of morphine extraction from the blood

Streszczenie

Wstęp/Materiał i metody. W badaniu oceniano wydajność ekstrakcji morfiny z krwi pełnej metodą cieczer-ciecz za pomocą 3 układów rozpuszczalników organicznych.

Wyniki. Najwyższy procent odzysku morfiny z krwi (92,5%) obserwowano, stosując mieszaninę izopropanolu i chloroformu (9:1), natomiast niższy, choć nadal zadowalający, gdy używano acetonitrylu (72,7%) lub dichlorometanu (67,1%).

Wnioski. Izolacja morfiny z krwi pełnej za pomocą ekstrakcji cieczer-ciecz z zastosowaniem mieszaniny izopropanolu i chloroformu jest metodą szybką, wydajną i łatwą do przeprowadzenia w każdym laboratorium.

Słowa kluczowe: morfina, krew pełna, wydajność ekstrakcji

Abstract

Background/Material and methods. In this study we evaluated the efficiency of morphine extraction from the whole blood by liquid-liquid methods using three types of organic solvents.

Results. The highest average recovery rate was observed for the 9:1 mixture of isopropanol and chloroform (92.5%). Lower, but still satisfactory, recovery rate was observed for acetonitril (72.7%) and dichloromethane (67.1%).

Conclusions. Isolation of morphine from the whole blood by simple solvent extraction with isopropanol-chloroform mixture is fast, efficient and easily accessible for each laboratory.

Key words: morphine, whole blood, extraction recovery rate

Wstęp

Chociaż morfina i diacetylmorfina (heroina) znane są od bardzo dawna, dopiero w ostatnich dekadach zbadano, przynajmniej częściowo, ich metabolizm. Od tamtej pory stale ulepsza się metody laboratoryjne oznaczania tych leków w płynach biologicznych. Rutynowe badania stężenia morfiny we krwi przeprowadza się, kontrolując abstynencję osób

uzależnionych [1–3], a także przy podejrzeniu zatrucia opioidami [4–6], natomiast dotychczas nie określono znaczenia monitorowania stężeń morfiny w innych sytuacjach klinicznych. Przy jej regularnym przyjmowaniu stwierdza się bardzo znaczne różnice między pacjentami. Z wyjątkiem dawki i drogi jej podawania, stanu wydolności nerek oraz równoczesności przyjmowanych leków (np. paracetamolu, środków przeciwwymiotnych) trudno jest określić, jakie

Adres do korespondencji: dr med. Małgorzata Krajnik
Katedra i Zakład Opieki Paliatywnej CM UMK
ul. Marii Skłodowskiej-Curie 9, 85–094 Bydgoszcz
e-mail: kizoppal@cm.umk.pl



Polska Medycyna Paliatywna 2006, 5, 4, 173–176
Copyright © Via Medica, ISSN 1644–115X

czynniki odpowiadają za istnienie tych międzyosobniczych różnic w zakresie stężeń morfiny i jej metabolitów [7]. Ponadto u tego samego chorego obserwuje się zmienność dobową stężenia morfiny we krwi przy jej regularnym podawaniu [8]. Nie wykazano ścisłej zależności efektu analgetycznego oraz występowania objawów niepożądanych od stężeń morfiny w osoczu [9]. Dlatego też, w odróżnieniu od leków przeciwdrgawkowych, monitorowanie stężeń morfiny nie wiąże się z podejmowaniem decyzji terapeutycznych i nie stanowi rutynowego postępowania w praktyce klinicznej. W medycynie paliatywnej oznaczanie stężenia leków opioidowych przeprowadza się głównie w celach badawczych, zwłaszcza oceniając nowe sposoby ich podawania [10–13]. W zależności od wskazań wykorzystuje się różne metody analityczne. Ich wybór w dużej mierze zależy od wymogów czułości analizy. Z wyjątkiem ostrego zatrucia, zazwyczaj stężenia morfiny we krwi są niskie (10–120 ng/ml) [14], a jeszcze niższe (< 10 ng/ml) obserwuje się po podaniu jej w inhalacji [15, Krajnik, wysłane do publikacji]. W przypadku tak niskich spodziewanych stężeń do badań powinno się pobierać co najmniej 2 ml materiału biologicznego. Taką objętość osocza uzyskuje się z 5 ml krwi pełnej. W badaniach farmakokinetycznych, w których korzysta się z wielu próbek pobieranych w niewielkich odstępach czasu, sumaryczna objętość krwi może okazać się zbyt duża przy uwzględnieniu stanu ogólnego chorych na zaawansowane nowotwory. Jeśli udało się uzyskać próbki krwi o niewielkiej objętości, ale co najmniej 2 ml, można oznaczyć morfinę we krwi pełnej. Oprócz zapewnienia wystarczającej ilości materiału biologicznego ważny jest wybór metody analitycznej o odpowiedniej czułości. Obecnie w tym celu najczęściej wykorzystuje się chromatografię cieczową ze spektrometrem masowym (LC/MS, *liquid chromatography mass spectrometry*) [1, 6]. Istotnym etapem analizy jest ekstrakcja morfiny z matrycy biologicznej, na przykład z krwi pełnej. Jeśli jej wydajność nie będzie wystarczająco duża, wynik końcowy może być obciążony dużym błędem. Wydajność oblicza się jako stosunek ilości wzorca leku (morfiny) w matrycy biologicznej (krew) poddanej ekstrakcji i oczyszczaniu do ilości czystego wzorca leku (morfiny) niepodlegającego tym procesom. Izolując leki z płynów biologicznych metodą ekstrakcji ciecz–ciecz, najczęściej stosuje się takie rozpuszczalniki organiczne, jak: dichlorometan, chloroform, izopropanol, acetonitryl oraz ich mieszaniny [16–18].

Celem niniejszego badania było porównanie wydajności ekstrakcji ciecz–ciecz za pomocą różnych rozpuszczalników organicznych w celu opracowa-

nia prostej i dokładnej metody izolacji morfiny z krwi pełnej.

Materiały i metoda

Materiały

Morfinę o stężeniu 1 mg/ml zakupiono w firmie LGC Promochem. Rozpuszczalniki organiczne do ekstrakcji morfiny z krwi (acetonitryl, izopropanol, dichlorometan, chloroform) wyprodukowała firma Sigma Aldrich. Krew pełną liofilizowaną otrzymano z firmy Medichem.

Przygotowanie prób wzorcowych morfiny

Krew pełną liofilizowaną rozpuszczono w wodzie podwójnie destylowanej zgodnie z instrukcją. Do krwi dodano taką ilość morfiny, aby uzyskać stężenie 500 ng/ml.

Izolacja morfiny

Morfinę izolowano z krwi pełnej poprzez ekstrakcję ciecz–ciecz za pomocą 3 metod różniących się wybranym układem rozpuszczalników organicznych, który stanowiły:

- acetonitryl;
- mieszanina izopropanolu i chloroformu (9:1);
- dichlorometan.

Do kolbek stożkowych dodawano po 2 ml krwi zawierającej morfinę i 6 ml jednego z układów rozpuszczalników organicznych. Ekstrakcję prowadzono w środowisku zasadowym. W tym celu do próbek dodawano 0,1 ml 10% NH_3 (pH = 10). W ten sposób przygotowano 21 próbek (po 7 z użyciem każdego z 3 układów rozpuszczalników). Ekstrakcję prowadzono w łaźni ultradźwiękowej przez 90 minut. Fazę organiczną oddzielono i odparowano do sucha w atmosferze azotu. Suchą pozostałość rozpuszczono w 200 μl metanolu. Stężenie morfiny w otrzymanych ekstraktach oznaczano metodą chromatografii cieczowej z detektorem masowym (LC/MS).

Analiza metodą chromatografii cieczowej z detektorem masowym

Analizę przeprowadzono z użyciem chromatografu cieczowego firmy Agilent Technologies (Waldbronn, Niemcy) składającego się z pompy binarnej i autosamplera (objętość nastrzyku 10 μl). Rozdział chromatograficzny przeprowadzono na kolumnie Eclipse XDB C18 (150 \times 4,6 mm, 5 μm). Jako fazę ruchomą zastosowano mieszaninę acetonitryl–kwasy trójchlorooctowy (90:10 v/v) z przepływem 0,4 ml/min przy temperaturze 25°C. Do detekcji użyto spektrometru masowego firmy Agilent Technologies (1100

Tabela 1. Wydajność ekstrakcji morfiny z krwi pełnej

Table 1. Recovery rates of morphine isolated from blood

Materiał biologiczny	Wydajność ekstrakcji ($x_{sr} \pm SD$) (%)*		
	Acetonitryl	Izopropanol:chloroform (9:1)	Dichlorometan
Krew pełna	72,7 \pm 3,95	92,5 \pm 2,92	67,1 \pm 6,21

*stężenie morfiny = 500 ng/ml; n = 7; SD (standard deviation) — odchylenie standardowe

Series) z jonizacją przez rozpylenie w polu elektrycznym pod ciśnieniem atmosferycznym przy następujących parametrach detektora masowego: napięcie fragmentora — 70 V, napięcie kapilary — 4000 V, temperatura gazu — 350°C, ciśnienie gazu (azot) — 30 psi, przepływ gazu suszącego — 13 l/min.

Morfinę analizowano, stosując opcję monitorowania wybranego jonu (SIM) — 286 m/z. Czas retencji dla morfiny (t_R) wynosił 3 minuty.

Wyniki

W przypadku każdej z 3 metod ekstrakcji obliczono jej wydajność, którą przedstawiono jako średnią otrzymaną z analizy 7 różnych próbek. Uzyskane w ten sposób średnie wartości wydajności ekstrakcji morfiny z krwi pełnej z użyciem 3 różnych układów rozpuszczalników organicznych przedstawiono w tabeli 1.

Dyskusja

Ekstrakcja jest bardzo ważnym etapem analizy ilościowej substancji w płynach biologicznych. Jeśli wydajność ekstrakcji jest zbyt mała, czyli dochodzi do znacznej utraty analizowanej substancji, wynik końcowy może być obciążony zbyt dużym błędem i tym samym niemiarodajny. W piśmiennictwie wydajność ekstrakcji określa się jako odzysk całkowity. Przyjmuje się, że jeśli po ekstrakcji i oczyszczeniu uzyskuje się mniej niż 50% ilości badanego leku, to metoda izolacji nie jest wystarczająco dokładna [19].

W niniejszym badaniu matrycą biologiczną była krew pełna. Morfinę oznacza się we krwi pełnej wtedy, gdy albo nie jest już możliwe uzyskanie surowicy (np. materiał pobrany ze zwłok), albo z pobranej ilości krwi nie można otrzymać wystarczającej do badań objętości osocza. Zastosowanie przedstawionych metod izolacji morfiny z krwi pełnej za pomocą ekstrakcji ciecz–ciecz z użyciem 3 układów rozpuszczalników umożliwi osiągnięcie zadowalających wartości odzysku całkowitego — wyższe niż 50%. Największą średnią wydajność ekstrakcji równą 92,5% uzyskano wte-

dy, gdy jako układ rozpuszczalników organicznych zastosowano mieszaninę izopropanol:chloroform (9:1). Ta metoda ekstrakcji jest prosta do wykonania, nie wymaga zastosowania kosztownej aparatury, dlatego można ją stosować w każdym laboratorium.

Piśmiennictwo

1. Rook E.J., Huitema A.D.R., van den Brink W., van Ree J.M., Beijnen J.H. Population pharmacokinetics of heroin and its major metabolites. *Clin. Pharmacokinet.* 2006; 45: 401–417.
2. Girardin F., Rentsch K.M., Schwab M.A. i wsp. Pharmacokinetics of high doses of intramuscular and oral heroin in narcotic addicts. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2003; 74: 341–352.
3. Smith M.L., Shimomura E.T., Summers J. i wsp. Urinary excretion profiles for total morphine, free morphine, and 6-acetylmorphine following smoked and intravenous heroin. *J. Anal. Toxicol.* 2001; 25: 504–514.
4. Merigian K., Blaho K. The role of pharmacology and forensics in the death of an asthmatic. *J. Anal. Toxicol.* 1995; 19: 522–528.
5. Thiblin I., Eksborg S., Petersson A., Fugelstad A., Rajs J. Fatal intoxication as a consequence of intranasal administration (snorting) or pulmonary inhalation (smoking) of heroin. *Forensic Sci. Int.* 2004; 139: 241–247.
6. Bogusz M.J., Maier R.D., Driessen S. Morphine, morphine-3-glucuronide, morphine-6-glucuronide, and 6-monoacetylmorphine determined by means of atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry-liquid chromatography in body fluids of heroin victims. *J. Anal. Toxicol.* 1997; 21: 346–355.
7. Klepstad P., Dale O., Kaasa S. i wsp. Influences on serum concentrations of morphine, M6G and M3G during routine clinical drug monitoring: a prospective survey in 300 adult cancer patients. *Acta Anaesthesiol. Scand.* 2003; 47: 725–731.
8. Vermeire A., Remon J.P., Rosseel M.T., Belpaire F., Devouilder J., Bogaert M.G. Variability of morphine disposition during long-term subcutaneous infusion in terminally ill cancer patients. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 1998; 53: 325–330.
9. Klepstad P., Borchgrevink P.C., Dale O. i wsp. Routine drug monitoring of serum concentrations of morphine, morphine-3-glucuronide and morphine-6-glucuronide do not predict clinical observations in cancer patients. *Palliative Med.* 2003; 17: 679–689.
10. Illum L., Watts P., Fisher A.N. i wsp. Intranasal delivery of morphine. *J. Pharmacol. Exper. Therap.* 2002; 301: 391–400.
11. Dershwitz M., Walsh J.L., Morishige R.J. i wsp. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of inhaled versus intravenous morphine in healthy volunteers. *Anesthesiology* 2000; 93: 619–628.

12. Pichini S., Altieri I., Pellegrini M., Zuccaro P., Pacifici R. The role of liquid chromatography-mass spectrometry in the determination of heroin and related opioids in biological fluids. *Mass Spectrometry Rev.* 1999; 18: 119–130.
13. Ward M.E., Woodhouse A., Mather L.E. i wsp. Morphine pharmacokinetics after pulmonary administration from a novel aerosol delivery system. *Clin. Pharmacol. Therap.* 1997; 62: 596–609.
14. Moffat A.C. (red.). Clarke's isolation and identification of drugs in pharmaceuticals, body fluids, and post-mortem material. Wyd. II. The Pharmaceutical Press, Londyn 1986.
15. Chrubasik J., Wiist H., Friedrich G., Geller E. Absorption and bioavailability of nebulized morphine. *Br. J. Anaesth.* 1988; 61: 228–230.
16. Meatherall R. GC-MS confirmation of codeine, morphine, 6-acetylmorphine, hydrocodone, hydromorphone, oxycodone, and oxymorphone in urine. *J. Anal. Toxicol.* 1999; 23: 177–186.
17. Sticht G., Käferstein H. Bestimmung von opiaten. *Toxi-chem Krimtech* 1995; 62: 31–33.
18. Meatherall R. GC-MS quantitation of codeine, morphine, 6-acetylmorphine, hydrocodone, hydromorphone, oxycodone, and oxymorphone in blood. *J. Anal. Toxicol.* 2005; 29: 301–308.
19. Moniczewski A., Gawlik M. Analiza toksykologiczna. W: Brandys J. (red.). Toksykologia. Wybrane zagadnienia. Wyd. I. Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków 1999: 11–76.