

# ANALIZA CALITATIVĂ PRIN GC-MS A URINEI DE ȘOBOLAN TRATAT CU SUBSTANȚE DE ABUZ

A. Al-Baidani\*, D. Bălălău\*\*, Mărgărita Forje\*\*\*, M. Ionică\*\*\*,  
Mihaela Ilie\*\*, Daniela Luiza Baconi\*\*, Mihaela Gheorghe\*\*

## REZUMAT

Lucrarea își propune să identifice în urină de șobolan prin metoda GC-MS substanțe de abuz și metaboliți ai acestora.

S-a lucrat cu șobolani albi, masculi, sușa Wistar, cărora le-au fost administrate codeină, glutetimidă, alprazolam și metadonă, precum și asocierile codeină și glutetimidă, respectiv alprazolam și metadonă.

Au fost identificați în urina colectată la 3 și 9 ore de la administrare următorii compuși: codeină, glutetimidă, metadonă, alprazolam și metaboliți ai acestora ca morfină, 4-hidroxi-glutetimidă, 2-fenilglutarimida, alpha-metadol, normetadol, 2-etil-5-metil-3,3-difenil-1-pirolina (EMDP).

**Cuvinte cheie:** codeină, glutetimidă, metadonă, alprazolam, GC-MS

## ABSTRACT

### GC-MS qualitative analyze of rat urine treated with abuse substances

The paper is aimed at identifying from rat urine certain abuse substances their metabolites by GC-MS.

White Wistar rats were treated with codeine, glutethimide, alprazolam, methadone and combinations of two: codeine and glutethimide and methadone and alprazolam.

The following compounds were identified in the urine collected at 3 and 9 hours following administration: codeine, glutethimide, methadone, alprazolam and their metabolites morphine, 4-hydroxyglutethimide, 2-phenylglutarimide, alpha-methadol, normethadol, 2-ethyl-5-methyl-3,3-diphenyl-1-pirolone (EMDP).

**Key words:** codeine, glutethimide, methadone, alprazolam, GC-MS

## 1. INTRODUCERE

Cele mai multe metode de identificare și dozare a substanțelor de abuz și a metaboliților lor sunt analizate calitativ în secțiunile de Toxicologie Clinică prin metoda GC-MS, care furnizează rezultate cu o precizie și o selectivitate mult mai mare decât alte metode. În cazul dozării metaboliților acestora a fost folosită metoda HPLC.

Studii pe animale vizând identificarea și dozarea metaboliților codeinei din urină de șobolani tratați cu codeină și glutetimidă au fost realizate de un colectiv de la Facultatea de Farmacie U.M.F. „Juliu Hațieganu”, Cluj-Napoca [1, 2, 3], care a folosit o metodă HPLC cu fluorescență nativă pentru dozarea simultană a codeinei, morfinei și morfinei-3-glucuronid din plasmă, obținând ca limite de detecție 50 ng/mL pentru morfină, 25 ng/mL pentru codeină și 20 ng/mL pentru morfină-3-glucuronid. Rezultatele studiului au indicat faptul că în prezența glutetimidei are loc o metabolizare mai intensă a codeinei, concomitent cu o scădere a ratei de glucuronidare a acesteia.

McCormick și colab. [4] descriu o metodă de determinare a alprazolamului din ser, care folosește extracția cu toluen / alcool izoamilic (99:1), urmată de analiză HPLC fază inversă care folosește ca fază mobilă acetonitril / tampon fosfat 4,5 (300 mL/50 mM), adus la pH mai mare sau egal cu 4.5 cu acid ortofosforic; determinarea s-a făcut la 45 °C, limita de cuantificare fiind 2.5 µg/L.

Rogers și colab. [5] au analizat printr-o procedură HPLC

concentrații de alprazolam și metadonă din ser în cazul a trei intoxicații post-mortem. În toate cele trei cazuri alprazolamul a fost detectat doar prin HPLC și nu a putut fi detectat prin GC-MS după extracție alcalină. Faptul că s-au determinat concentrații de metadonă aflate mult sub concentrațiile considerate a fi letale subliniază riscurile co-ingestiei de metadonă și alprazolam.

În cazul metadonei, Gagajewski și Apple [6] au stabilit că decesele datorate intoxicației cu metadonă au apărut la concentrații plasmatice de 0.18-3.99 mg/L, în timp ce Mikolaenko [7] găsea că metadona administrată singură a produs deces la o concentrație medie sanguină de 0.27 mg/L. De asemenea, analizând concentrația sanguină a metadonei în 17 cazuri de deces în care aceasta era incriminată, Clark [8] a găsit limite cuprinse între 0.2 și 1.863 mg/L (medie 0,560 mg/L).

Data fiind variabilitatea datelor și a metodelor prezentate în literatură, ne-am propus elaborarea unei metode simple, GC-MS, prin care să urmărim prezența compușilor părinți și a metaboliților acestora în urina de șobolan tratat doar cu codeină, glutetimidă, metadonă, alprazolam, precum și cu asocieri codeină – glutetimidă, metadonă - alprazolam

## 2. MATERIALE ȘI METODE

Au fost folosite următoarele substanțe medicamentoase și vehicule: alprazolam bază (Sigma), suspensie 1,22 g% în 1g %Tween 80, fosfat de codeină (Sigma), soluție 0,42 g%

\*Abdul Al-Baidani, farmacist specialist, doctorand al UMF „Carol Davila”, București, asistent în cadrul Hodeidah University, Hodeidah, Republic of Yemen

\*\*prof dr. farm. Dan Bălălău, dr. chim. Mihaela Ilie, conf. dr. farm. Daniela Luiza Baconi, doctorand farm. Mihaela Gheorghe -Disciplina Toxicologie, Facultatea de Farmacie, UMF „Carol Davila”, București

\*\*\*ing. Mihai Ionică, biochim. Mărgărita Forje – Centrul de Cercetări științifice Medico – Militare, București

în apă distilată, glutetimidă bază (Sigma), suspensie 0,6 g % în 1g % Tween 80, metadonă clorhidrat (Sigma) soluție 0,48 g % în apă distilată, Tween 80 (Merck), suspensie 1% în apă distilată.

Șobolani albi, masculi, sușa Wistar, în vârstă de 12 săptămâni, în greutate de 110 – 185 g, provenind de la Institutul Cantacuzino, Biobaza Băneasa, au fost cazați în cuști individuale, asigurându-li-se condiții adecvate de microclimat, au primit hrană standard și apă ad libitum, dimineața între orele 8-9 a.m și după amiaza între orele 16-17 p.m.. Experimentele s-au desfășurat în conformitate cu cerințele Uniunii Europene privind normele de etică în experimente pe animale.

Au fost alcătuite loturi de experiment de câte 10 șobolani repartizați aleator, cărora li s-au administrat prin gavaj, zilnic, timp de 30 de zile, următoarele doze:

- lotul 1 – martor apă distilată (m. AD) – 0,5 ml/100 g corp
- lotul 2 – martor Tween (m. T) – 0,5 ml/100 g corp
- lotul 3 – fosfat de codeină (C) – 0,5 ml/100 g corp
- lotul 4 – glutetimidă (G) – 0,5 ml/100 g corp
- lotul 5 – fosfat de codeină – 0,5 ml/100 g corp și glutetimidă – 0,5 ml/100 g corp (C+G)
- lotul 6 – metadonă clorhidrat (M) – 0,5 ml/100 g corp
- lotul 7 – alprazolam (A) – 0,5 ml/100 g corp
- lotul 8 – metadonă clorhidrat – 0,5 ml/100 g corp și alprazolam – 0,5 ml/100g corp (M+A)

După administrările din zilele de experiment 1, 6, 11, 16, 21 de la un număr de 3 animale pe lot tratat, am colectat urina la 3 ore și la 9 ore de la administrare, în vederea analizei prin GC-MS.

### Prepararea probelor

La 2 ml probă de urină se adaugă 5ml tampon fosfat, 1ml cloroform, 1ml dicloretan, 1ml diclorometan și 400 μl soluție standard intern, conținând 5 mg de midazolam. Amestecul se agită în sistem vortex timp de 10min, se centrifughează la 500 rpm timp de 10 minute. Se separă faza organică și se aduce la sec, apoi se completează până la 200 μl cu același amestec de solvenți organici.

Probele astfel extrase se introduc în flacoane cu conuri de sticlă și se așează în caruselul autosamplerului gaz-cromatografului, de unde vor fi injectate automat.

### Aparat

Determinările au fost realizate pe un sistem GC/MS Varian tip Saturn 2000, având următoarea configurație:

- gaz-cromatograf Varian 3800 CP cu componentele: injector universal Capillary model 1078, coloană capilară de 30 m, diametrul interior - 0.25 mm, cu fază staționară – factor FOUR VF 5MS, control electronic al debitului de gaz purtător (He 5.0), autosampler 8200;
- linie de transfer de 22 cm;
- spectrometru de masă Varian SATURN 2000 cu componentele: filtru de masă cu trapă ionică (ITD), permițând configurații de tip MS/MS, SIS (single ion storage), SECI (selected ejection chemical ionisation), MICI (monitoring ion chemical ionisation), pompă turbomoleculară de vid înalt model

V 70, pompă rotativă de vid preliminar model Varian DS 102, gaz purtător - heliu 5.0, bibliotecă de spectre de masă: Pflieger - Maurer - Weber (PMW), NIST 2002, Wiley 6

Programul de temperatură:

- gaz-cromatograf: cuptorul de coloană: temp. inițială 150°C, menținută 1 min., creștere cu 20°/min la 290°C, menținut timp de 8 minute; temp. injectorului: 300°C;
- spectrometru de masă: temperatură trapă ionică 170°C, temperatură manifold: 80°C, temperatură linie transfer 260°C.

### 3. REZULTATE ȘI DISCUȚII

În cazul analizei calitative am urmărit punerea în evidență în probele de urină a xenobiotului părinte și a metabolizilor acestuia prin compararea cu spectrele de masă din bibliotecile de spectre menționate anterior.

În cazul loturilor tratate cu codeină, peak-ul compusului părinte a apărut la 8.271 min., pentru care s-au obținut în spectrul de masă următorii ioni mai importanți (m/z): 73, 117, 162, 198, 221, 281, 299, 326.

Prezența metabolitului principal al codeinei – morfina (peak la 8.788 min) – a fost confirmată în urma analizei cromatogramei corespunzătoare pentru urina colectată la 3 ore. S-au obținut următorii ioni mai importanți (m/z): 71, 96, 134, 168, 210, 248, 261, 285, 312, 326.

Pentru loturile tratate cu glutetimidă s-a obținut peak-ul compusului-părinte la 5.736 min. Spectrul de masă pentru acest peak confirmă prezența glutetimidei, cu ioni mai importanți (m/z): 91, 102, 117, 131, 161, 169, 177, 189.

Metabolitul glutetimidei 4-hidroxi-glutetimidă (timp de retenție 5.852), cu ionii principali obținuți (m/z): 91, 102, 117, 132, 160, 178, 189 a fost recunoscut conform bibliotecii de spectre ca fiind iso-hidroxietyl glutetimid trifluoroacetat. Spectrul celui alt metabolit principal – 2-fenilglutarimida, cu timp de retenție 5.184 min. a prezentat ionii principali (m/z): 51, 78, 91, 103, 104, 119, 189.

În cazul șobolanilor tratați cu codeină și glutetimidă au putut fi identificate pe cromatograme de urină ambele substanțe (figura nr. 1).

Pentru șobolanii tratați cu metadonă s-a obținut peak-ul la 6.937 min. Spectrul de masă obținut a prezentat ionii principali (m/z): 70, 71, 72, 73, 74, 75.

Metabolitul metadonei alpha-metadol, cu timp de retenție 6.486 min, a prezentat ionul principal (m/z) la 72. Metabolitul normetadol (timp de retenție 8.154 min.) a fost identificat pe baza spectrului de masă cu ionii (m/z): 58, 73, 84, 100, 106. De asemenea, a fost identificat metabolitul 2-etil-5-metil-3,3-difenil-1-pirolina (EMDP), la timp de retenție 7,504 min., având ionii principali (m/z): 115, 130, 145, 165, 170, 198.

În cazul alprazolamului, peak-ul compusului-părinte a apărut foarte slab sau de loc în urina de 3 ore, dar a putut fi identificat în urina de 9 ore la timpul de retenție 13.926 min. Am obținut următorii ioni principali (m/z): 242, 267, 281, 310.

În cazul loturilor tratate cu alprazolam, metabolizii acestuia nu au putut fi identificați. De altfel, literatura menționează că metabolizii sunt excretați în urină în procente mici, după cum urmează: α-hidroxi-alprazolam – 15%, derivat benzofenonic al alprazolamului – 9%, cantități mici de 4-hidroxi-alprazolam și desmetilalprazolam [9].

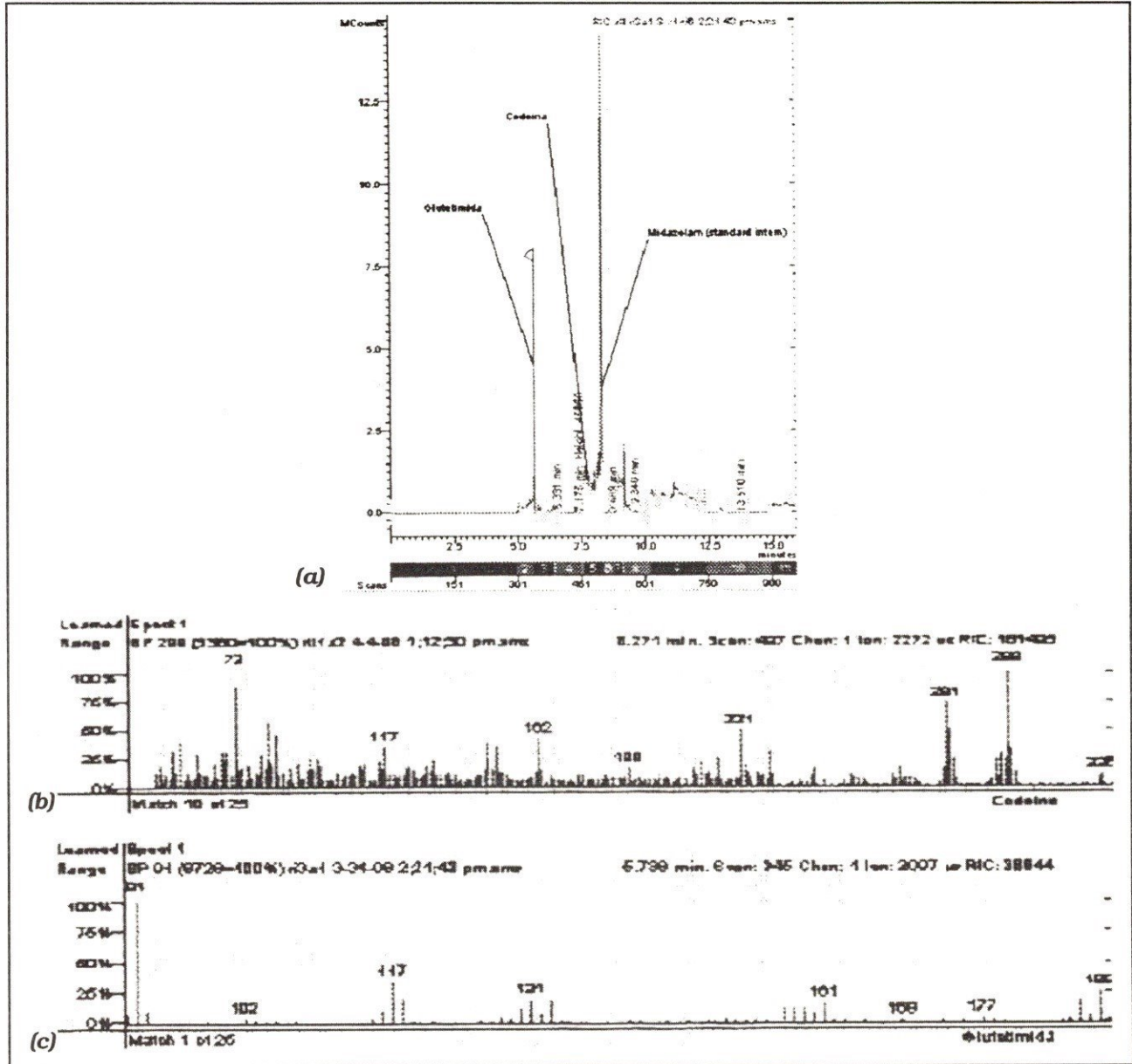


Fig. 1 Cromatograma (a) și spectrele de masă ale codeinei (b) și glutetimidei (c)

Totuși, pentru lotul tratat cu metadonă și alprazolam, au putut fi identificați din urina de 9 ore compușii utilizați în tratament (figura nr. 2).

#### 4. CONCLUZII

Prin analiza GC-MS au putut fi identificați din urină următorii compuși și metaboliți ai acestora: codeina, morfina, glutetimida, metadona, alprazolam, 4-hidroxi-glutetimida, 2-fenilglutarimida, alpha-metadol, normetadol, 2-etil-5-metil-

3,3-difenil-1-pirolina (EMDP).

În cazul alprazolamului, identificarea nu a putut fi făcută decât în urina colectată la 9 ore de la administrare. De asemenea, în cazul alprazolamului nu au putut fi identificați metaboliții.

În cazul loturilor cărora li s-au administrat asocieri de substanțe (codeină și glutetimidă, respectiv metadonă și alprazolam), ambii compuși au fost identificați pe cromatogramele respective.

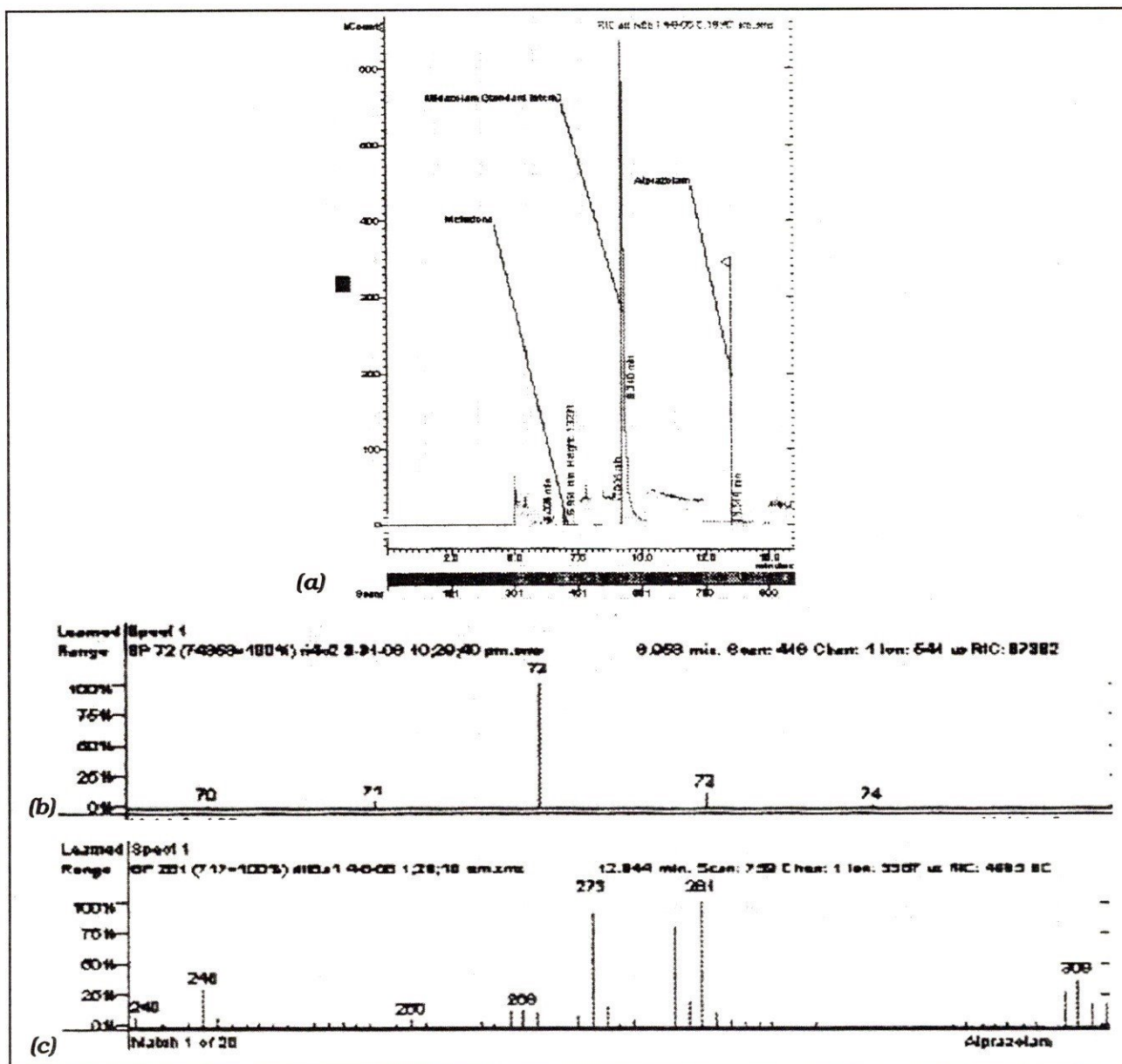


Fig. 2. Cromatograma (a) și spectrele de masă ale metadonei (b) și alprazolamului (c)

## BIBLIOGRAFIE

1. Popa D.S., Loghin F., Anton R., Moroșan C., Curea E. – Studiul interacțiunii farmacodinamice codeină – glutetimidă – Farmacia, 2002, L (1):65 – 72
2. Popa D.S., Loghin F., Rotaru O., Curea E. – Sub-chronic toxicity of codeine – glutethimide combination in rats – Farmacia, 2001, XLIX(1): 19-28
3. Loghin F., Popa D-S, Socaciu C – Influence of glutethimide on rat brain mononucleotides by sub-chronic codeine treatment – J. Cell. Mol. Med., 2001, 5(4):409-426
4. McCormick S. R., Nielsen J., Jatlow P. – Quantification of Alprazolam in Serum or Plasma by Liquid Chromatography – Clin. Chem., 1984, 30 (10): 1652-1655
5. Rogers WO, Hall MA, Brissie RM, Robinson CA.

– Detection of alprazolam in three cases of methadone/benzodiazepine overdose – J Forensic Sci., 1997, 42(1):155-6

6. Gagajewski A, Apple FS. Methadone-related deaths in Hennepin County, Minnesota: 1992-2002 – Forensic Sci. 2003;48(3):668-71

7. Mikolaenko I, Robinson CA Jr, Davis GG. – A review of methadone deaths in Jefferson County, Alabama – Am J Forensic Med Pathol. 2002, 23(3):299-304

8. Clark JC, Milroy CM, Forrest AR – Deaths from methadone use – J Clin Forensic Med. 1995; 2(3):143-4

9. \*\*\* - Clarke's Analysis of Drugs and Poisons in Pharmaceuticals, Body Fluids and Postmortem Material – Eds. Moffat A.C., Osselson M.D., Widdop B., Galichet L.Y., third edition, The Pharmaceutical Press, London, Chicago, 2004