

Monitoraggio farmacologico della buprenorfina a scopo terapeutico

Giovanni Cangiano¹, Barbara Manera¹, Annarita Cimmino¹, Daniela Giardiello¹, Maurizio D'Amora², Luigi Vrenna¹

¹Azienda Sanitaria Locale Napoli 1 - Dipartimento Farmacodipendenze - Laboratorio Tossicologico di Riferimento Territoriale

²Azienda Sanitaria Locale Napoli 1 - Responsabile Area medicina di laboratorio

ABSTRACT

Pharmacological monitoring of buprenorphine for therapeutic purposes

In this work we highlight the utility of a new chromatographic assay of nor-buprenorphine, the main metabolite of buprenorphine, performed with HPLC technique, with the Remedi multi-columns system. We suggest wide intervals of reference values, expressed as nanograms of nor-buprenorphine per milligram of urinary creatinine, well correlated with the assumed dose of buprenorphine (Subutex), as a valid instrument to evaluate the correctness of the given dose and of the compliance of the patients referring to the Drug Addiction Service.

RIASSUNTO

Col presente lavoro si evidenzia l'utilità di un nuovo metodo cromatografico per la determinazione della norbuprenorfina (NORBUP), il principale metabolita della buprenorfina (BUP), effettuato in HPLC col sistema multicolonnare Remedi. La proposta di ampi intervalli di riferimento, espressi in nanogrammi di NORBUP per milligrammi di creatinina urinaria, ben correlati con la dose di BUP (Subutex) assunta per via sub-linguale, costituisce un valido strumento nella valutazione della congruità delle dosi farmaco somministrate e della compliance del paziente afferente al Servizio Tossicodipendenze.

INTRODUZIONE

Nel trattamento delle tossicodipendenze da oppiacei, le terapie a mantenimento con metadone cloridrato hanno dimostrato un decremento del consumo di sostanze da strada, dei comportamenti criminali e di trasmissione di malattie infettive (1). Nonostante ciò, le sopra citate terapie non sempre sono ben accettate dai pazienti per pregiudizi culturali e per la necessità di un'assunzione quotidiana (2). La Buprenorfina (BUP), oppiaceo semi-sintetico altamente lipofilo, derivato della tebaina (3), avente comportamento di agonista parziale verso i recettori μ e di antagonista verso i recettori κ (4,5,6,7), può in alcuni casi risultare una valida alternativa al trattamento metadonico per il suo minore potenziale d'abuso, per la lieve sintomatologia astinenziale provocata alla sua sospensione e per il maggiore effetto protettivo sulla depressione respiratoria (8).

L'utilizzo di diverse posologie e modalità di somministrazione terapeutiche del farmaco (Subutex) ed il concomitante notevole incremento delle richieste di quantificazione urinaria del suo principale metabolita, nor-Buprenorfina (NORBUP) (9,10,11), ha indotto il nostro laboratorio a ricercare un metodo rapido e più efficace rispetto a quello radioimmunometrico, attualmente in uso. Col presente lavoro si evidenzia l'utilità di un nuovo metodo cromatografico effettuato in HPLC e si propongono degli intervalli di riferimento, espressi in ng NORBUP/ mg creatinina urinaria, per pazienti in trattamento con Subutex nei Servizi Tossicodipendenze (SERT).

MATERIALI E METODI

In uno studio semestrale vengono esaminati circa 1500 campioni di urine appartenenti a pazienti in terapia con BUP da 1 a 20 mg/die ed afferenti al Polo Laboratoristico Tossicologico di Riferimento Territoriale presso il P.O. "C.Ascalesi" dell'Azienda Sanitaria Locale Napoli 1 (ASL NA 1). Il monitoraggio si riferisce a 74 pazienti provenienti dal SERT del Distretto 50 di Napoli. Le determinazioni si effettuano con tecnica cromatografica in HPLC - sistema multicolonna Remedi HS - della ditta Bio-Rad (Milano, Italia), completamente automatico e costituito da 5 diversi reagenti dedicati pronti all'uso e da 5 colonne con funzioni diverse. La corsa cromatografica necessita di un tempo non superiore ai 18 minuti e l'identificazione di NORBUP si effettua per confronto con i dati presenti nella libreria dello strumento (tempo di ritenzione intorno ai 5,2 - 5,6 minuti, massimo di assorbimento evidenziato alla lunghezza d'onda di 213 nm, ecc.) (12,13,14). La metodica consiste nell'aggiungere 0,02 mL di glucuronidasi ad 1 mL di urina centrifugata ed acidificata a pH 5 con acido acetico. Dopo idrolisi enzimatica a 55°C per 90 minuti, il campione viene trattato con 0,2 mL di standard interni e quindi esaminato su Remedi-HS dopo centrifugazione a 10000 giri per 5 minuti. La figura 1 illustra il cromatogramma di un campione di urina sottoposto a procedimento di idrolisi che evidenzia un picco di NORBUP (picco 11), identificato con il primo standard interno n-etil nordiazepam (IS1) ed associato ad una concentrazione di 1600 ng/mL grazie al rapporto con il secondo

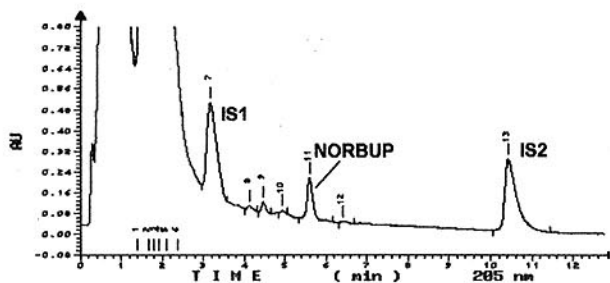


Figura 1
Cromatogramma Remedi di urina sottoposta ad idrolisi enzimatica (presenza di NORBUP)

standard interno clorfeniramina (IS2) (15,16,17).

La presenza di NORBUP, associata al picco cromatografico avente tempo di ritenzione di 5,2-5,6 minuti, è stata confermata in precedenza raccogliendo l'eluato dal Remedi e sottoponendolo ad analisi con tecnica GC-MS presso l'Istituto di Medicina Legale e delle assicurazioni dell'Università "La Sapienza" di Roma. La figura 2 evidenzia l'abbondanza totale (TIC) e quella dei relativi frammenti ottenuti da NORBUP derivatizzata con TMS (18,19).

Concentrazioni inferiori ad 80 ng/mL, limite di rilevazione strumentale, saranno rilevate sottoponendo il campione urinario ad un procedimento di concentrazione in cui vengono opportunamente utilizzati i kit di idrolisi chimica ed enzimatica della morfina della ditta Bio-Rad (20). La metodica prevede l'idrolisi enzimatica di 5 mL di urina centrifugata, acidificata a pH 5 con 2 gocce di soluzione A (acido acetico) e trattata con 0,1 mL di soluzione B (glucuronidasi). Dopo un'attesa di circa 90 minuti in bagnomaria a 55°C, l'idrolisato, dopo opportuna centrifugazione e decantazione, viene trattato con 0,3 mL di tampone 1 del kit di idrolisi chimica: si tappa, si agita per inversione, si aggiungono 0,05 mL di NaOH 40% e si aggiusta il tutto a pH 8-9. Si centrifuga per circa 4 minuti a 4000 giri ed il sovrantante viene caricato su colonna a fase inversa (kit idrolisi chimica), in precedenza condizionata con 2 mL di metanolo e 2 mL di tampone 2 (kit idrolisi chimica). Segue il trattamento della colonna con 1 mL di opportuno tampone di lavaggio in dotazione al kit di idrolisi chimica e la

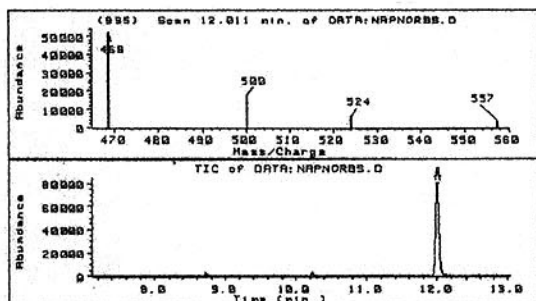


Figura 2
Scansione di NORBUP ed abbondanza dei relativi frammenti

successiva raccolta sotto vuoto (Vacuum Box Bio-Rad) grazie a 0,9 mL di una soluzione di eluizione preparata in precedenza utilizzando 8 volumi di tampone di eluizione (kit di idrolisi chimica) e 2 volumi di metanolo.

All'eluato vengono aggiunti 0,1 mL di tampone 1 e 0,2 mL di soluzione di standard interni: la soluzione ottenuta viene miscelata, centrifugata e analizzata sullo strumento Remedi. Il risultato si confronta con quello ottenuto da urine di riferimento a titolo noto di NORBUP.

La resa di estrazione, superiore al 70%, consente di quantificare fino a circa 22 ng/mL di NORBUP: concentrazioni inferiori vengono invece misurate con metodo radioimmunologico (RIA) (11,12) ed effettuato con reagenti della ditta DPC (Los Angeles, CA).

La creatinina urinaria viene determinata con la metodica di Jaffé (22,23) utilizzando specifici reagenti funzionanti sull'analizzatore AU600 della ditta Olympus (Milano, Italia).

Le elaborazioni statistiche, effettuate con Excel 2000 (24), si riferiscono a profilo di imprecisione, recupero e linearità nell'intervallo analitico 80-8000 ng/mL. Vengono inoltre considerate la correlazione col metodo RIA nell'intervallo 0-100 ng/mL di NORBUP e gli intervalli di riferimento espressi in ng NORBUP/ mg creatinina urinaria e riferiti ai mg di farmaco somministrato per via sub-linguale (9,25).

RISULTATI

In figura 3 è rappresentato il profilo di imprecisione della determinazione cromatografica di NORBUP: nell'intervallo 80-8000 ng/mL si evidenzia un coefficiente di variazione percentuale non superiore al 3% .

Concentrazioni inferiori ad 80 ng/mL vengono identificate sullo strumento con difficoltà (0,007 - 0,008 AU) e mostrano una elevata imprecisione (circa il 14%) già a concentrazioni di 62,5 ng/mL.

Nello stesso intervallo analitico il metodo presenta linearità contraddistinta dalla regressione $y = 0,999x - 69,26$ e da un coefficiente di correlazione equivalente a 0,9978. In figura 4 vengono mostrati i recuperi percentuali

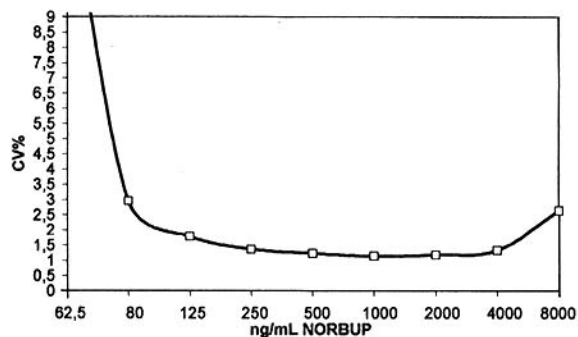


Figura 3
Profilo di imprecisione di NORBUP - tecnica HPLC

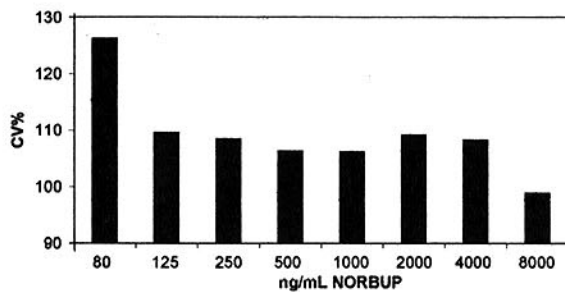


Figura 4
Prove di recupero di NORBUP - tecnica HPLC

ricavati da un campione a titolo elevato di NORBUP e progressivamente diluito con urina esente da NORBUP: si ottengono risultati compresi tra il 98,9 ed il 126,3%.

Contenuti di NORBUP inferiori ad 80 ng/mL, riscontrati in buona parte dei pazienti in trattamento con 1 mg di farmaco, vengono rilevati trattando il campione idrolizzato (5 mL) con la procedura di concentrazione da noi proposta (estrazione in fase solida). Concentrazioni inferiori a 22 ng/mL vengono misurate in RIA ed in seguito opportunamente corrette utilizzando una correlazione proposta e in accordo con i dati presenti in letteratura sulla cross-reattività esistente tra il monoclonale anti-BUP del kit RIA nei confronti di NORBUP da misurare (21).

Rispetto alla determinazione cromatografica, quella in RIA è lineare fino a 10 ng/mL e pertanto non consente la misura diretta, senza diluire il campione, di contenuti elevati di NORBUP urinaria; inoltre, la tecnica radioimmuno-metrica non è capace di discriminare l'eventuale presenza di BUP. La minima quantità di BUP rilevabile in HPLC (tempo di ritenzione superiore ai 9,5 minuti) è di circa 320 ng/mL: piccole quote di quest'ultima accompagnate da elevati contenuti di NORBUP si evidenziano solamente in concomitanza di elevate assunzione del farmaco. La figura 5 evidenzia la corretta somministrazione di elevate dosi del farmaco effettuata per via sub-linguale (elevati contenuti di NORBUP e tracce di BUP) mentre in figura 6 viene rappresentato l'esempio di una somministrazione effettuata per via orale (contemporaneo notevole aumento di NORBUP e BUP).

L'analisi RIA risulta positiva anche "grattando" una compressa di Subutex in urina non contenente NORBUP: nel cromatogramma di figura 7 l'elevata concentrazione di BUP sovrappone completamente (o parzialmente) il picco del secondo standard interno (IS2). La presenza di BUP "aggiunta" nelle urine può meglio evidenziarsi cromatografando direttamente, senza procedimento di idrolisi, una urina a cui è stato aggiunto solamente il primo standard interno (IS1), così come illustrato in figura 8.

La concentrazione di NORBUP (in ng/mL), riferita alla creatinina urinaria (in mg/mL), acquista validità solo se inserita in un programma individuale a fine terapeutico riabilitativo. Infatti, per un eccessivo carico idrico o per volontaria diluizione del campione, si può avere un risul-

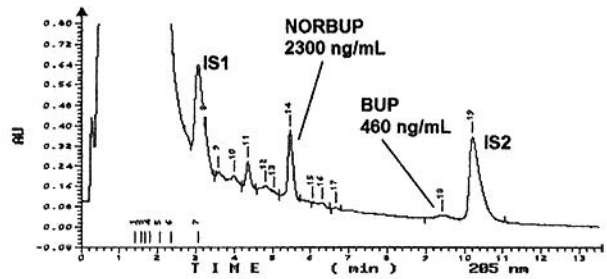


Figura 5
Cromatogramma di urina idrolizzata di paziente sottoposto ad elevata somministrazione di Subutex

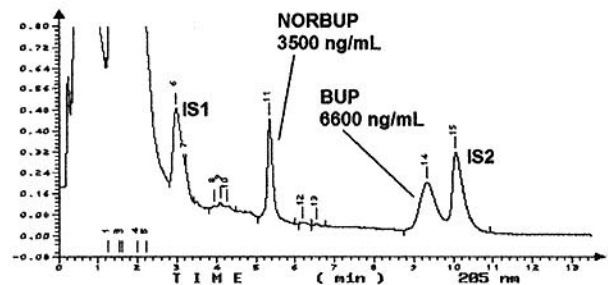


Figura 6
Cromatogramma di urina idrolizzata indicante somministrazione effettuata per via orale

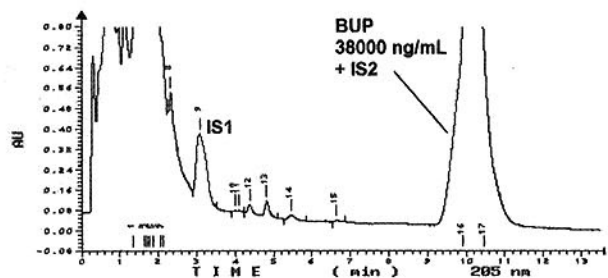


Figura 7
Cromatogramma di urina idrolizzata indicante adulterazione con BUP

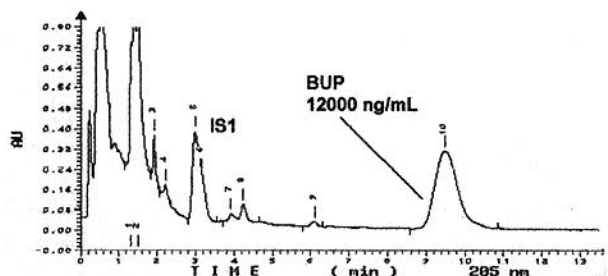


Figura 8
Cromatogramma di urina non idrolizzata in cui non è presente IS2

tato falsamente negativo; valori più elevati si ottengono in urine più concentrate. La figura 9 mette in evidenza un'ampia variazione di concentrazioni di NORBUP, espresse in ng/mL di urina, in un paziente sottoposto a terapia con 6 mg/die e controllato nel tempo.

Più contenuta è la variazione dei valori di NORBUP se riferiti alla concentrazione della creatinina (in mg/mL) ed espressi in ng NORBUP / mg creatinina (26,27,28).

Nella figura 10 sono riportati, per somministrazione, l'intervallo di riferimento ed il valore centrale di NORBUP riferita alla creatinina. Questi ultimi, a loro volta, se rapportati alla rispettiva dose di farmaco (da 2 a 20 mg), fanno ottenere in media, per ogni mg di farmaco somministrato, un contenuto nelle urine di circa 83 ± 37 ng di NORBUP per ogni mg di creatinina (20).

I differenti valori sono riassunti in un referto riepilogativo (29,30), per pazienti in terapia appartenenti ad uno stesso SERT. Oltre alla dose somministrata, vengono specificate la concentrazione del metabolita, quella della creatinina, il valore di NORBUP riferito alla creatinina ed i relativi intervalli di riferimento.

Difficile è l'identificazione di NORBUP in presenza di coeluenti quali fluvoxamina, i metaboliti dell'amitriptilina (vedi cromatogramma di figura 11), della venlafaxina, del tramadolo, ecc.

Anche alte concentrazioni di MDMA e citalopram interferiscono con il dosaggio di NORBUP. Tali interferenze saranno ben risolte in GC-MS o facendo ricorso ad una diversa separazione isocratica a fase inversa su uno strumento aperto ed usando la fase mobile del Remedi diluita con acqua al 35%, la rivelazione a 213 nm ed un campione concentrato come da protocollo proposto.

Ulteriore pregio costituito dal sistema multicolonnare Remedi è rappresentato dalla possibilità di rilevare contemporaneamente oltre a BUP e NORBUP e in un tempo ragionevole (circa 2 ore, idrolisi enzimatica compresa), singole sostanze quali la morfina e i suoi metaboliti, la cocaina, i derivati amfetaminici, il metadone ed il suo metabolita, ecc. Per completare la sorveglianza tossicologica dei pazienti in trattamento con Subutex può essere utile associare alla corsa cromatografica i metodi immunoenzimatici per la determinazione di THC, barbiturici, benzoilecgonina (BEG) e benzodiazepine (BZD). Alcune BZD risultate negative all'esame EMIT (lorazepam, lormetazepam, bromazepam e nortclobazam) devono essere verificate in HPLC usando colonne cromatografiche specifiche da inserire nel sistema Remedi. La presenza di BEG e di alcuni barbiturici viene evidenziata in HPLC non sottoponendo il campione urinario ad idrolisi enzimatica.

DISCUSSIONE

Il dosaggio della NORBUP, effettuato in HPLC - sistema multicolonnare Remedi - necessita di un semplice pre-trattamento del campione urinario rappresentato dall'idrolisi enzimatica in ambiente acido. In un tempo inferiore alle 2 ore è possibile quantificare la NORBUP ed eventualmente, se presenti, il metadone ed il suo princi-

pale metabolita, la morfina ed i suoi derivati, i derivati amfetaminici, la cocaina, alcuni antidepressivi ed altre sostanze psicotrope. La contemporanea rilevazione in HPLC di discrete concentrazioni di BUP, riscontrate anche in campioni non sottoposti ad idrolisi, può indicare una non corretta modalità di assunzione del farmaco; elevate quote di BUP, riscontrate anche in campioni non sottoposti ad idrolisi, indicano adulterazione del campione. La linearità del metodo cromatografico è compresa tra 80 ed 8000

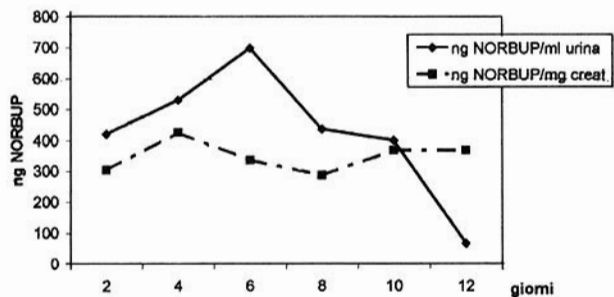


Figura 9
Monitoraggio di NORBUP con e senza "correzione" di creatinina urinaria

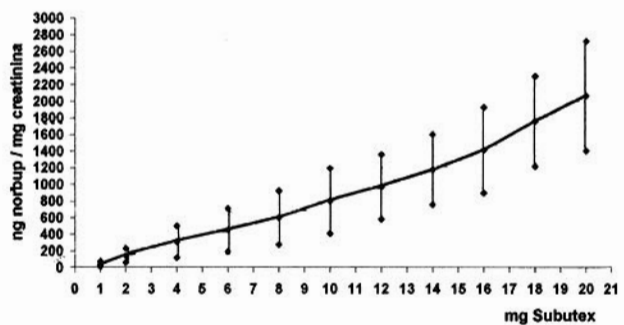


Figura 10
Correlazione NORBUP "corretta" / mg farmaco somministrato

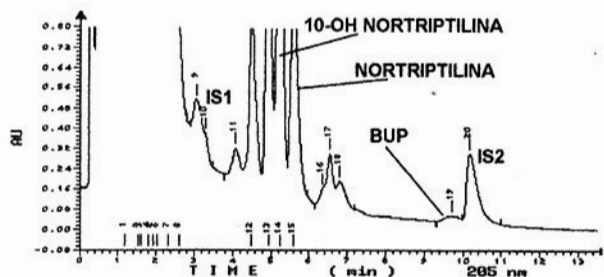


Figura 11
Coeluzione di NORBUP e metaboliti di amitriptilina

ng/mL di NORBUP; nello stesso intervallo analitico si riscontra un buon profilo di imprecisione ($CV\% < 3\%$) ed un accettabile recupero percentuale (98,9 - 126,3%). Contenuti di NORBUP inferiori ad 80 ng/mL, riscontrati in buona parte dei pazienti in trattamento con 1 mg di farmaco, vengono misurati con procedimento di concentrazione da noi proposto e successiva analisi sullo strumento Remedi. La determinazione con metodo RIA, opportunamente corretto, sarà indispensabile per quantificare NORBUP inferiore a 22 ng/mL. La presenza di interferenti (specie alcuni antidepressivi) mascheranti NORBUP al Remedi viene risolta in GC-MS oppure con sistema isocratico a fase inversa capace di evidenziare il metabolita, opportunamente estratto con metodica di concentrazione, alla lunghezza d'onda di 213 nm. Lo studio effettuato su circa 1500 campioni di urine appartenenti a pazienti in terapia con dosi da 1 a 20 mg/die ha evidenziato una discreta corrispondenza tra i valori di concentrazione di NORBUP (espressi in ng/mL), riferiti alla creatinina urinaria (espressa in mg/mL) e la dose di Subutex somministrata (in mg) per via sub-linguale. Per ogni milligrammo di farmaco somministrato vengono mediamente rilevati nelle urine 83 ± 37 ng di NORBUP per milligrammo di creatinina. Gli ampi intervalli di riferimento proposti rappresentano un utile strumento per la valutazione della congruità delle dosi del farmaco e nella compliance del paziente afferente al SERT.

BIBLIOGRAFIA

- Maremmanni I, Guelfi G. Metadone: le ragioni per l'uso. Pacini, Pisa. 1996.
- Nardini CF. Counseling nella tossicodipendenza da eroina. Ed. Bandone, Sarzana. 1999.
- Baselt RC. Disposition of toxic drugs and chemicals in man. Chemical Toxicology Institute. Foster City, CA. 2000.
- Leander JD. Buprenorphine has potent kappa opioid receptor antagonist activity. *Neuropharmacol.* 1987;26:1445-1447.
- Leander JD. Buprenorphine has potent kappa opioid receptor antagonist in pigeons and mice. *Eur. J. Pharmacol.* 1987;151:457-461.
- Emrich HM. Possible antidepressive effect of opioid: action of buprenorphine. *Ann. NY Acad. Sci.* 1982;398:108-112.
- Boas RA, Williger JW. Clinical actions of fentanyl and buprenorphine. The significance of receptor binding. *Br. J. Anaesth.* 1985;57:192-196.
- Serpelloni G, Pirastu R, Brignoli O. Medicina delle tossicodipendenze. SEMG, Firenze. 1996.
- Brewster D, Humphrey MJ, McLeavy MA. Biliary excretion, metabolism and enterohepatic circulation of buprenorphine. *Xenobiotica*, 1981;11:189-196.
- Cone EJ, Gorodetzky CW, Yousefnejad D, Buchwald WF, Johnson RE. The metabolism and excretion of buprenorphine. *Drug Metab. Disp.* 1984;12:577-581.
- Hand CW, Balswin D, Moore RA, Allen MC, McQuay HJ. Radioimmunoassay of buprenorphine with iodine label: analysis of buprenorphine and metabolites in human plasma. *Ann. Clin. Biochem.* 1986;23:47-53.
- Carlucci G. Cromatografia liquida ad alta efficienza (HPLC). Applicazione all'analisi di farmaci in matrici biologiche. Libreria Universitaria Benedetti. L'Aquila. 2000.
- Bovati ML, Delor de Ferrabonc F, Donzelli G, Tamburini M. Aspetti teorici e applicazioni cliniche in HPLC. *Bio-Rad.* 1995.
- Gheduzzi A, Rovida C. L'analisi HPLC in fase inversa: lavorare nelle condizioni ottimali. Chemtek Analitica srl - Angola Emilia. 2001.
- Cangiano G, D'Amora M, Fuscone A, Garofano R, Vrenna L et al. Cromatografia liquida (HPLC) applicata alla determinazione delle droghe d'abuso urinarie di campioni provenienti dai Ser.T. *Bio-Rad.* 2000.
- Cangiano G, D'Amora M, Manera B, Cimmino A, Vrenna L. Dosaggio cromatografico della buprenorfina: dati preliminari. *Atti del XIV Congresso Internazionale dei Biologi - Altavilla Milicia.* 2001.
- Sambataro S, Signorelli A, Barbaria S, Corsaro C. Analisi automatica del metabolita della buprenorfina, N-dealchil buprenorfina su campioni d'urina con sistema Remedi HS. *Biochim Clin.* 2002; 26: 77-80.
- Hesse M, Meier H, Zeeh B. Metodi spettroscopici nella chimica organica. EdiSES, Napoli. 1996;219-311.
- Silverstein RM, Webster FX. Identificazione spettroscopica di composti organici. Casa Editrice Ambrosiana, Milano. 1999;2-70.
- Cangiano G, Manera B, Cimmino A, D'Amora M, Vrenna L et al. Dosaggio della norbuprenorfina in HPLC: limiti e vantaggi nell'utilizzo per i servizi per le farmacodipendenze [abstract]. *Biochim Clin* 2002;3:246.
- Bartlett AJ, Lloyd-Jones JG, Rance MJ, Flockhart IR, Dockray GJ et al. The radioimmunoassay of buprenorphine. *Eur J Clin Pharmacol.* 1980;18:339-45.
- Spandrio L. Manuale di laboratorio. Principi generali e diagnostica chimico-clinica. Edizione Piccin. 1985;1:791-795.
- Pasquinelli F. Diagnostica e tecniche di laboratorio. Edizioni Rosini. 1979;1:597-599.
- Kelly J. Excel 2000. Editore Apogeo. 1999.
- Weinberg DS et al. Sublingual absorption of selected opioid analgesic. *Clin. Pharmacol. Ther.* 1988;44:335-342.
- Ferrara SD. Il Laboratorio di farmacologia e tossicologia clinica. Stupefacenti. Ed. med. Scient., Torino. 1989.
- Cangiano G, Coppola A, D'Aniello MA, Lombardi L. Immunometria delle farmacodipendenze: caratteristiche metodologiche del dosaggio EMIT e suo utilizzo nelle terapie metadoniche. [abstract]. *Biochim Clin.* 1998;5-6, 396.
- Cangiano G, Coppola A, D'Aniello MA, Lombardi L, Vrenna L et al. The methadone's dosage and the urinary creatinine in the therapies of methadone. [abstract]. IFCC WordLab, Firenze. Ediz. Walter de Gruyter, Berlin-New York. 1999;T352.
- Prague CN, Irwin MR. Microsoft Access 2000. Editrice Tecniche Nuove. 1999.
- Cangiano G, D'Amora M, Ingala F, Vrenna L. Utilizzo di Access 2000 nei dosaggi in HPLC di farmaci e droghe d'abuso. [abstract]. *Biochim Clin.* 2001;2:140.