

Analisi automatica del metabolita della buprenorfina, N-dealchil buprenorfina, su campioni d'urina con Sistema Remedi HS

Salvatore Sambataro, Antonino Signorelli, Signorino Barbara, Candia Corsaro

Sezione di Chimica Clinica e Tossicologica, Laboratorio di Igiene e Profilassi, Azienda USL n° 3 - Catania

ABSTRACT

Automated determination of buprenorphine's metabolite in urine samples with Remedi HS System

The determination of N-desalchil-buprenorphine (or nor-buprenorphine), major metabolite of buprenorphine (*Temgesic*, *Subutex*) in urine samples, has been studied. By using reversed-phase high performance liquid chromatography (HPLC) with UV detection, therapeutic concentrations of conjugated and unconjugated N-desalchil-buprenorphine down to 50 ng/ml for the metabolite, or down to 5 ng/ml with selective extraction in SPE and following concentration, can be detected in urine samples. This method has been applied to a variety of urine samples from drug users. The possible analytical interference from several other drugs has been studied.

RIASSUNTO

La determinazione di N-dealchil-buprenorfina (o nor-buprenorfina) maggior metabolita della buprenorfina (*temgesic*, *Subutex*) nei campioni di urina è stata presa in considerazione. Mediante l'uso di HPLC (High performance liquid chromatography) in fase inversa con rivelatore U.V. sono stati analizzati campioni di urine, contenenti concentrazioni terapeutiche di nor-buprenorfina coniugata e non coniugata, inferiori a 50 ng/ml, e valori fino a 5 ng/ml con estrazione selettiva in SPE. Questo metodo è stato applicato con buoni risultati su campioni di urina di pazienti in trattamento farmacologico. Sono state valutate possibili interferenze delle sostanze stupefacenti di uso più comune.

1. INTRODUZIONE

La buprenorfina (PM: 467,33; formula bruta: C₁₉H₄₁NO₄; denominazione scientifica: 21-cicliopropil-7a-[(S)-1-idrossil-1, 2, 2-trimetilpropil]-6, 14-endoetano 6, 7, 8, 14-tetraidrooripavina), denominazione commerciale: *Temgesic*, *Subutex*, derivato semisintetico della tebaina, è un analgesico 30 - 40 volte più potente della morfina (1).

La buprenorfina (BUP), in compresse da 0,2 mg, da 2 mg o da 8 mg è usata, sempre di più, per la terapia sostitutiva nella dipendenza da oppiacei, all'interno di un trattamento medico, sociale e psicologico perché può abbattere i sintomi d'astinenza nei pazienti dipendenti da oppiacei. Essa è un farmaco agonista-antagonista, che si comporta da antagonista se somministrato sotto l'effetto di un agonista puro, per questo deve essere somministrata quando compaiono i primi sintomi vegetativi d'astinenza; diversamente la buprenorfina può indurre sindrome d'astinenza.

La buprenorfina si lega ai recettori k del cervello e la sua attività nella terapia di mantenimento è attribuibile al suo legame reversibile in modo lento con il recettore μ che, in un periodo prolungato, minimizza la necessità degli oppiacei per i pazienti tossicodipendenti: la sua capacità agonista-antagonista, che limita i suoi effetti depressivi, consente un ampio margine di sicurezza, in particolare modo, sulle funzioni cardiaca e respiratoria.

Nel trattamento della tossicodipendenza da oppiacei, il farmaco va somministrato per via sublinguale e la dose varia fra 2 e 16 mg/die, in dipendenza dell'età (oltre i 15 anni) e della fase di trattamento del paziente; il picco d'assorbimento plasmatico si raggiunge dopo 90 minuti ed avviene con una fase rapida di distribuzione con una emivita compresa tra 2 e 3 ore. L'eliminazione è bi- o tri-esponenziale, con una lunga fase di eliminazione di 20-25 ore, dovuta in parte al riassorbimento della buprenorfina dopo idrolisi intestinale del derivato coniugato ed in parte alla natura altamente lipofila della molecola (3) (4).

La buprenorfina è metabolizzata per 17-N-dealchilazione (N-desalchil-buprenorphine o nor-buprenorfina) e glicuronconiugazione della molecola di partenza e del metabolita dealchilato, è eliminata essenzialmente nella feci per escrezione biliare dei metaboliti glicuronati (80%), la parte restante è eliminata con le urine. La dose media letale (DL₅₀) per somministrazione orale nel topo è pari a 260 mg/kg (5).

È importante osservare che l'overdose da buprenorfina non risente dell'azione del naloxone e si deve intervenire con il doxapram (analettico centrale aspecifico) ed a provvedimenti rianimatori.

Come per il metadone, è utile valutare la nor-buprenorfina (Nor-BUP) nelle urine per controllare la compliance di eventuali tossicomani in trattamento sostitutivo.

2. PROCEDIMENTO ANALITICO

2.1 Reagenti

La nor-buprenorfina cloridrato, fornita dalla ditta Bio-Rad, è prodotto dalla Ultrafine Chemicals (Manchester UK).

Gli standard interni, le colonne cromatografiche e gli eluenti per HPLC sono stati forniti dalla ditta Bio-Rad. L'idrolisi enzimatica dei glicuron-detivati nelle urine è stata effettuata con β -glucuronidase / aril sulfatase (EC 3.2.1.31 / EC 3.1.6.1) della ditta Merck.

2.2 Standards e soluzioni

La soluzione madre di Nor-BUP (100 μ g/ml) è in metanolo per HPLC e refrigerata a 8° C. Le soluzioni di lavoro sono state preparate all'occorrenza per diluizione della soluzione madre con urine sicuramente esenti da BUP e trattate con la procedura sotto riportata, al punto 2.4.

2.3 Strumentazione

Le analisi sono state condotte con il REMEDI HS della ditta Bio-Rad, in uso presso il nostro Laboratorio. Il cromatografo è equipaggiato nella configurazione "drug profiling system".

L'urina è una miscela molto complessa, contenente un migliaio di componenti. Per la ricerca di farmaci e droghe mediante cromatografia liquida (HPLC) è necessario allontanare parecchi di questi composti (in particolare, gli acidi organici), sottoponendo il campione ad una purificazione preliminare.

Esistono diversi metodi (6) (7) (8) per automatizzare il pre-trattamento di urine da sottoporre ad analisi HPLC (9). Nel REMEDI HS sono presenti cartucce contenenti fase fissa (sotto brevetto) che trattiene i composti endogeni indesiderati, mentre consente l'analisi di una vasta varietà di farmaci e droghe di interesse tossicologico con differenti proprietà chimiche e farmacologiche. Tale sistema multi-colonna, oltre ad automatizzare il pre-trattamento del cam-

pione, consente una grande riproducibilità di risultati anche quando si sostituiscono le colonne cromatografiche perché esaurite.

Il REMEDI HS esegue lo spettro d'assorbimento del cromatogramma fra 205 nm e 250 nm e paragona gli spettri sconosciuti con quelli presenti nella propria libreria, scegliendo tra una lista di composti che hanno tempi di ritenzione, riferiti agli standards, vicini a quelli presente nella libreria: "Candidate list" (10). (A seguito del presente lavoro, lo spettro della Nor-BUP è stato inserito nella libreria del REMEDI HS col numero 921.

2.4 Preparazione dei campioni d'urine

Prima di procedere all'analisi occorre de-glicuronare l'urina, mediante idrolisi enzimatica. A tal proposito, è stata usata la β -glucuronidase / aril sulfatase (EC 3.2.1.31 / EC 3.1.6.1) della ditta Merck.

Procedura: su 1,0 ml di urine centrifugate va corretto il pH a 5,5 con aliquote di 10 μ l di acido acetico al 30%; si aggiungono 20 μ l di β -glucuronidase / aril sulfatase; si mescolano su vortex per 20 secondi; si incubano a 55°C per 90 minuti; si aggiungono 200 μ l di "internal standard combination" della ditta Bio-Rad (Cod. 195-7137); si centrifugano a 10.000 giri per 5 minuti.

Sul sopranatante, si procede all'analisi cromatografica. Nei cromatogrammi si rileva un picco con un tempo di ritenzione intorno a minuti 5:20 (λ max = 213 nm), che nella "Candidate list" della libreria del REMEDI HS è indicato come LIDOCAINA, NALORFINA ed altri. Questo picco è assente nelle urine di pazienti non sottoposti a trattamento con BUP. Di conseguenza, si è ritenuto che tale picco sia dovuto al metabolita della buprenorfina (Nor-BUP). Una prima conferma di questa ipotesi è stata ottenuta dal confronto degli spettri di questo picco con lo spettro della buprenorfina (N° 426 della libreria del REMEDI HS): il fattore di similarità va da 0,020 a 0,040.

Queste prime valutazioni sono state confermate dallo spettro di massa, ottenuto sottoponendo a spettrometria

Tabella 1

Curva standard (colonne A e B), prove di concentrazione (colonna C) e Bias (colonne D, E ed F)

ng/ml aggiunti	Urina Negativa	Urina Positiva	Curva standard		Bias %*
	r**	r**	y = 959,01 x - 5,13		
			Valori trovati	Valori attesi	
A	B	C	D	E	F
0	0,000	0,133	122		
50	0,068	0,178	166	172	-3,97
100	0,137	0,239	224	222	-0,74
200	0,191	0,333	314	322	-2,54
500	0,622	0,681	648	627	4,10
1.000	0,913	1,293	1235	1.122	10,02
2.000	2,121	1,997	1910	2.122	-10,01

*Bias % = [(valori trovati - valori attesi) / valori attesi] x 100

**r = rapporto (altezza del picco dell'analita)/(altezza del picco dello standard interno)

di massa la frazione di urina raccolta al tempo di ritenzione compreso fra i minuti 5:00 e 5:40.

2.5 Determinazione quantitativa della Nor-BUP

Poiché lo scopo di questa ricerca è di controllare la compliance di eventuali tossicomani in trattamento sostitutivo, ci si è preoccupati di eseguire solo la curva di calibrazione della Nor-BUP per valutare l'efficienza del sistema analitico ed eventuali interferenze di droghe d'abuso.

La curva standard (Figura 1), è stata preparata con urina esente da Nor-BUP, dove sono state aggiunte concentrazioni note di Nor-BUP: 50, 100, 200, 500, 1.000 e 2.000 ng/ml (colonna A della Tabella 1). L'urina, così additivata, è stata sottoposta alla procedura descritta alla sezione 2.4; ogni punto della curva è stato misurato tre volte in giorni diversi. La curva standard è stata costruita con i valori medi della risposta cromatografica (colonna B della Tabella 1: r = altezza del picco della Nor-BUP / altezza del picco dello standard interno IS2 - chlorpheniramine -, presente nel internal standard combination della ditta Bio-Rad).

2.6 Validazione del metodo

La validazione del metodo è stata eseguita nell'arco di una settimana: i campioni della curva di calibrazione sono stati analizzati tre volte a giorni alterni: le medie delle risposte cromatografiche sono riportate nella colonna B della Tabella 1.

Il livello di Nor-BUP in un campione d'urina positiva

Tabella 2
Risultati del CQ su 12 campioni a livelli basso (50 ng/ml) e 12 campioni livello alto (100 ng/ml)

Statistica	Urina addizionata di Nor-BUP	
	50 ng/ml	100 ng/ml
Mediana	47,45	98,51
Media	47,03	98,27
Dev. Standard.	3,53	2,95
CV %	7,52	3,00

Tabella 3
Prove di interferenza di alcune sostanze d'abuso presenti nell'urina. Tutti i valori sono espressi in ng/ml

Sostanza d'abuso presente	Nor-BUP trovata	Sostanza d'abuso presente	Nor-BUP trovata		
Oppiacei	1200	94	Benodiazepine	370	93
Oppiacei	620	109	Benodiazepine	600	91
Cocaina	850	112	Amfetamine	1100	102
Cocaina	2100	95	Amfetamine	1400	115
Metadone	480	105	Barbiturici	380	98
Metadone	970	108	Barbiturici	570	118
Cannabinoidi	>100	93	Cannabinoidi	60	98

(122 ng/ml) e nei campioni di questa, additivati con le concentrazioni utilizzate per costruire la curva di calibrazione (colonna D della Tabella 1), è stato determinato attraverso la risposta cromatografica (colonna C), come descritto sopra. Sulla colonna E sono riportati i valori attesi; la colonna F riporta il Bias %.

Il CQ è stato effettuato per tutti i sei giorni, analizzando urina negativa additivata con soluzione di Nor-BUP a due concentrazioni, 50 e 100 ng/ml: tali dosaggi sono stati effettuati in doppio, inserendo i due campioni a concentrazione nota sia all'inizio sia alla fine della seduta analitica. Tutti i campioni sono stati trattati con la procedura descritta alla sezione 2.4.

Nella Tabella 2 sono riportati i risultati del CQ sui 12 campioni a concentrazione 50 ng/ml e su altrettanti campioni a 100 ng/ml.

3. DISCUSSIONE DEI RISULTATI

Alle condizioni cromatografiche sopra descritte la Nor-BUP è separata ottimamente dai composti endogeni presenti nell'urina: tempo di ritenzione 5:20 min.

È stata valutata anche l'interferenza delle più comuni sostanze d'abuso, del metadone e dei loro metaboliti; a tal proposito sono state eseguite 14 analisi su campioni d'urine con concentrazioni di sostanze d'abuso riportate nella

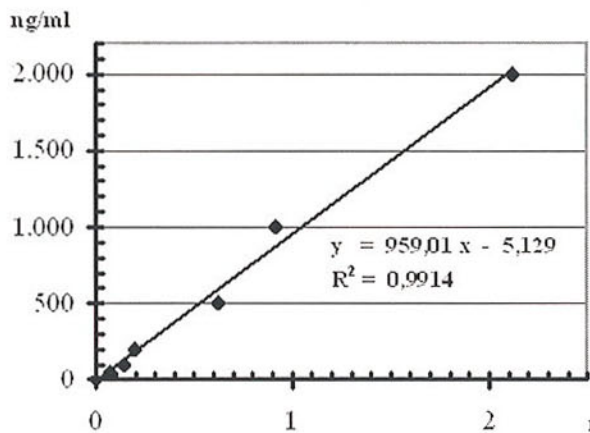


Figura 1
Curva standard (y: ng/ml di Nor-BUP; x: rapporto r tra altezza del picco della Nor-BUP e altezza del picco dello standard interno)

Tabella 3 ed additivate con 100ng/ml di Nor-BUP.

La Nor-BUP trovata, praticamente non risente dalla presenza delle sostanze d'abuso riportate in Tabella 3

La precisione del metodo è stata determinata con analisi replicate su due differenti urine contenenti 50 e 100 ng/ml (CQ) di Nor-BUP, come descritto alla sezione 2.6. La Tabella 2 riporta le Dev. STANDARD ed i CV % per le due urine di controllo (50 e 100 ng/ml). L'accuratezza è espressa in Bias %.

Il limite di determinazione della Nor-BUP è di 30 ng/ml.

La relazione tra r (rapporto: altezza del picco della Nor-BUP / altezza del picco dello standard interno IS2) sull'asse x e ng/ml (urina esente da Nor-BUP additivata di Nor-BUP: 50, 100, 200, 500, 1.000 e 2.000 ng/ml) sull'asse y. è: $y = 959,01 x - 5,13$; il coefficiente di correlazione trovato è: $R^2 = 0,991$.

Ad oggi, a seguito di richiesta dei SERT, sono state sottoposte a cromatografia le urine dei pazienti in trattamento con buprenorfina (oltre 1500 campioni) ed i risultati analitici sono stati concordi con la compliance verificata dai responsabili dei SERT. Il cut-off assunto è di 50 ng/ml.

4. SENSIBILITÀ DEL METODO

La sensibilità del metodo può essere elevata sotto 30 ng/ml, adottando la seguente procedura.

Procedura: su 5,0 ml di urine centrifugate va corretto il pH a 5,5 con aliquote di 10 µl di acido acetico al 30%; si aggiungono 100 µl di β-glucuronidase / aril sulfatase; si mescolano su vortex per 20 secondi; si incubano a 55 °C per 90 minuti; si aggiunge 1 ml di tampone carbonato (g 8,4 di NaHCO₃ e g 5,3 di Na₂CO₃ in 100 ml); si aggiungono 200 µl di "internal standard combination" della ditta Bio-Rad (Cod. 195-7137); si centrifuga a 10.000 giri per 5 minuti; si condiziona una colonna cromatografica SPE C18 con 1 ml di metanolo e con 2 ml di tampone; vi si versa l'urina, si lava con 2 ml di tampone carbonato e 500 µl di

miscela acqua - metanolo (60 - 40); si estrae la Nor-BUP con 1 ml di dietil-etero; la soluzione eterea si fa evaporare sotto vuoto e si riprende con 1 ml di fisiologica. e si procede all'analisi cromatografica.

Seguendo questa procedura si possono rilevare 5 - 6 ng/ml di Nor-BUP.

BIBLIOGRAFIA

1. Cowan A, Levis JW, Macfarlane LR. Agonist and antagonist properties of buprenorphine, a new antinociceptive agent. *Br J Pharmacol* 1977;60:537-45.
2. Marcus AW. Methodology of monitored release of a new preparation: Buprenorphine. *Br Med J* 1979;2:163-8.
3. Bullingham RES, Mcauay HJ, Moore A, Bennett MRD. Buprenorphine kinetics. *Clin Pharmacol and Therap* 1980;28:667-74.
4. Heel RC, Brogden RM, Spieght TME Avery GS. Buprenorphine: a review of its pharmacological properties and therapeutics and therapeutic efficacy. *Clin Ther* 1979;5:61-5.
5. Rossano CL. Activity and tolerability of buprenorphine after paranteral and sublingual administration. *Clin Ther* 1982;5:61-4.
6. Lagrange F, Pehourcq F, Baumevielle M, Begaud B. Determination of buprenorphine in plasma by liquid chromatography: application to heroin-dependent subjects. *J Pharm Biomed Anal* 1998;16:1295-1300.
7. Vincent F, Bessard J, Vacheron J, Mallaret M, Bessard G. Determination of buprenorphine and nor-buprenorphine in urine and hair by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *J Anal Toxicol* 1999;23:270-79.
8. Gopal S, Tzeng T, Cowan A. Development and validation of a sensitive analytical method for the simultaneous determination of buprenorphine and nor-buprenorphine in human plasma. *European J Pharm Biopharm* 2001;51: 147-51.
9. Debrabandere L, Van Boven M, Daenens P. Analysis of buprenorphine in urine specimens. *Journal Forensic Sci* 1992;37:82-9.
10. Hber R, Zech K. Selective sample handling and detection in HPLC, Part A. Elsevier - Amsterdam 1988; 81.