

*Aktuelne teme/
Current topics*

GASNA HROMATOGRAFIJA SA MASENOM
SPEKTROMETRIJOM KAO SKRINING
METODA U DETEKCIJI KOKAETILENA
NAKON ZLOUPOTREBE KOKAINA I
ETANOLA

GAS CHROMATOGRAPHY WITH MASS
SPECTROMETRY AS A SCREENING
METHOD IN DETECTION OF
COCAETHYLENE AFTER ABUSING OF
COCAINE AND ETHANOL

Correspondence to:

Kristina Denić

Centar za kontrolu trovanja, VMA,
Crnotravska 17, Beograd,
Tel. 00 381 (0)65 2430700

E-mail: denickristina@yahoo.com

Kristina Denić¹, Branislava Rusić¹, Snežana Đorđević¹,
Vera Lukić², Vesna Kilibarda¹, Nataša Perković-
Vukčević¹, Jasmina Jović- Stošić¹

¹ Centar za kontrolu trovanja, Vojnomedicinska akademija, Beograd

² Institut za sudsku medicinu, Medicinski fakultet, Beograd

Ključne reči

kokaetilen, GC-MS metoda, skrining,
zloupotreba kokaina

Key words

cocaethylene, GC-MS method, screening,
cocaine abuse

Sažetak

Zloupotreba kokaina je široko rasprostranjen problem u mnogim zemljama, posebno ako se kombinuje sa etanolom. Etanol menja biotransformaciju kokaina u jetri, što rezultira transesterifikacijom u aktivni metabolit kokaetilen. Kokaetilen produžava efekte kokaina, što je razlog istovremene zloupotrebe kokaina i etanola. Identifikacija kokaetilena u biološkim uzorcima je veoma važan korak u kliničkom praćenju i lečenju otrovanih. U ovom radu je opisana metoda gasne hromatografije sa masenom spektrometrijom (GC-MS) za identifikaciju kokaetilena u uzorcima biološkog materijala. Zahvaljujući kompjuterskoj biblioteci masenih spektara moguće je identifikovati i potvrditi prisustvo kokaetilena u analiziranim uzorcima krvi i urina otrovanog bolesnika. Opisana GC-MS metoda je pouzdana i osetljiva za detekciju kokaetilena u krvi i urinu. Primena GC-MS kao skrining metode u urgentnim situacijama, u slučajevima kada se sumnja na koingestiju etanola sa kokainom, daje pouzdane rezultate, koji su veoma značajni za dalje praćenje i lečenje otrovanog bolesnika.

UVOD

Kokain je potentan simpatikomimetik izolovan iz lišća biljke *Erythroxylon coca*. Zbog psihostimulativnog efekta do kojeg dovodi, njegova zloupotreba je široko rasprostranjena. Dostupan je u obliku hidrohloridne soli i čiste baze ("crack"). Hidrohloridna so se koristi za nazalnu i intravensku primenu, dok se "crack" koristi za pušenje. Način primene i doza unetog kokaina utiču na dužinu trajanja i intenzitet efekata do kojih dovodi. Nakon pušenja i intravenske primene osećaj euforije, pojačane mentalne i fizičke izdržljivosti nastupa brže i jačeg je intenziteta u odnosu na nazalnu primenu ⁽¹⁾. U organizmu se metaboliše do niza strukturno sličnih jedinjenja od kojih puni farmakološki efekat poseduje samo nor-kokain, dok su benzoilekgonin i ekgonin metil

estar delimično aktivni. Poluvreme eliminacije kokaina je oko 1h ⁽²⁾. Neželjeni efekti kokaina zavise od učestalosti i načina primene. Kokain pokazuje izraziti kardiotoksični efekat. Dovodi do razvoja hipertenzije, ventrikularnih aritmija, akutnog infarkta miokarda i hipertrofije leve komore. Upravo su kardio i cerebrovaskularni poremećaji uzrok smrti uživaoca kokaina. Pored pomenutih somatskih poremećaja, kokain dovodi i do paranoidno-psihičnih epizoda okarakterisanih slušnim halucinacijama ^(1,3).

Poznato je da se kokain istovremeno zloupotrebljava sa alkoholnim napicima ⁽³⁾. Istovremena upotreba kokaina i etanola rezultuje interakcijama kako na farmakodinamičkom tako i na farmakokinetičkom nivou ⁽⁴⁾. Etanol dovodi do promena u kinetici i metabolizmu kokaina, što za posled-

dicu ima direktnu biosintezu novog, aktivnog metabolita kokaetilena (etil estra benzoilekgonina) (5). Osim toga, u prisustvu etanola se oko 17% metaboličke konverzije kokaina u benzoilekgonin preusmerava na stvaranje kokaetilena (6). Kao i kokain, kokaetilen inhibira ponovno preuzimanje dopamina i serotonina (u manjoj meri) i na taj način ispoljava iste farmakološke i bihevioralne efekte. Poluvreme eliminacije kokaetilena ($t_{1/2} \sim 2h$) je duže u odnosu na kokain. Potenciranje i produžavanje euforičnog efekata kokaina razlog je istovremene upotebe etanola i kokaina. Pored aditivnog farmakološkog efekta, potrebno je istaknuti i povećani rizik od smrtnog ishoda kod osoba koje istovremeno zlopotrebljavaju kokain i etanol u odnosu na one koje koriste samo kokain (5,6). Zbog toga je dokazivanje prisustva kokaetilena u biološkim uzorcima, kao markera istovremene zlopotrebe kokaina i etanola važan korak u praćenju i lečenju otrovanih. Za dobijanje pouzdanih i nedvosmislenih rezultata neophodno je primeniti dovoljno osetljivu metodu da bi se detektovale očekivane niske koncentracije kokaetilena. Od brojnih raspoloživih tehnika kao što su imunohromatografija i tečna hromatografija sa UV i masenom detekcijom, zadovoljavajuće rezultate pokazuje gasna hromatografija sa maseno-spektrometrijskom detekcijom.

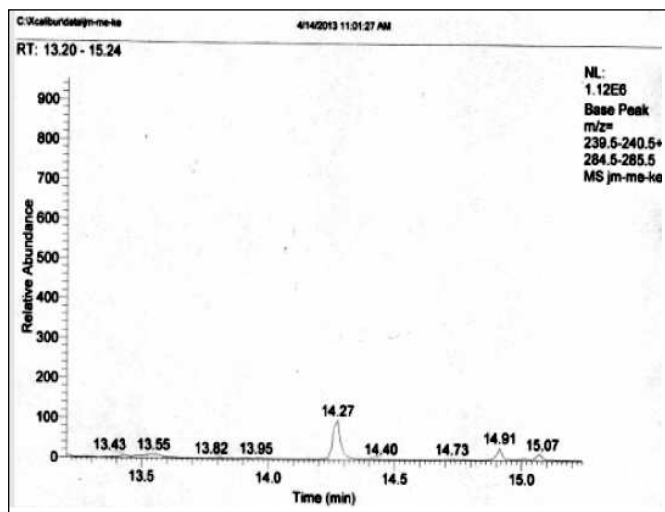
Cilj ovog rada je da prikaže gasnu hromatografiju sa maseno-spektrometrijskim detektorom, kao skrining metodu za detekciju kokaetilena u humanoj krvi i urinu.

MATERIJAL I METODE

Uzorci krvi i urina uzorkovani su od bolesnika otrovanog etanolom i kokainom koji je primljen na kliniku za urgentnu toksikologiju Vojnomedicinske akademije. Uzorak urina najpre je podvrgnut imunohromatografskom skriningu na sredstva zlopotrebe, a potom zajedno sa uzorkom krvi adekvatno pripremljen za dalju analizu.

Reagensi:

- Metanol (p.a.) i destilovana voda - J.T.Baker, HPLC Grade purity
- Ethylacetate – for GC, Merck
- Reagens za derivatizaciju BSTFA (N, O-bis(trimetil) silil trifluoroacetamid), Serva



Slika 1. GC-MS hromatogram uzorka urina

- Thermo Scientific cartridges (Hypersep Retain-PEP 60mg/3ml SPE Column)

Hromatografski uslovi za GC-MS:

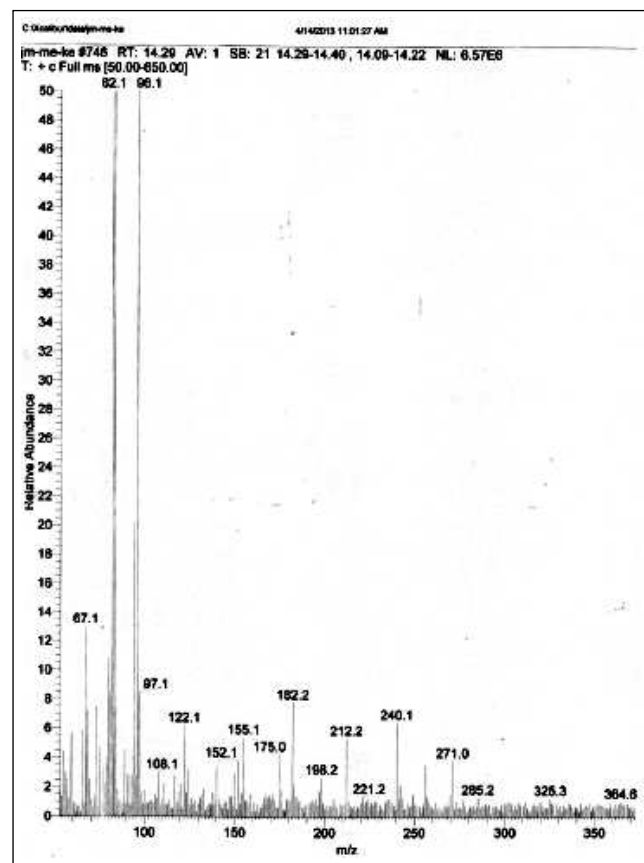
- Gasni hromatograf - Trace GC Ultra Thermo Scientific
- Kolona: TG-5 MS, 30 m x 0,25 mm, debljina filma 0,25 μ m
- Temperatura injektora 200°C
- Temperatura transfer linije 200°C
- Temperaturni program kolone: početna temperatura kolone iznosila je 50°C u toku 1 min, a zatim je kolona zagrejana do 300°C sa porastom temperature od 10°C/min. Kolona je grejana na 300°C u toku 7,5 min.
- MS detektor: opseg merenja m/z 50-650
- EI jonski mod

Priprema uzoraka za analizu:

Uzorci krvi i urina pripremani su čvrsto-faznom ekstrakcijom na Thermo Scientific kertridžima. Aktivacija kertridža vršena je metanolom i vodom. Nakon nanošenja uzorka i pranja kertridža 5% metanolom, analit je eluiran metanolom. Tako pripremljen uzorak analiziran je HPLC-PDA tehnikom. Ekstrakt je zatim derivatizovan pomoću BSTFA i analiziran GC-MS metodom.

REZULTATI

Primenom imunohromatografskog testa u uzorku urina pacijenta dokazano je prisustvo kokaina. Za potvrdu dobijenih rezultata imuno testom korišćena je HPLC-PDA tehnika kojom je dokazano prisustvo kokaina i njegovog metabolita benzoilekgonina.



Slika 2. Maseni spektar kokaetilena

U uzorku krvi GC-FID tehnikom (gasna hromatografija sa plameno jonizacionim detektorom) dokazano je prisustvo etanola u koncentraciji od 0,3 %.

Zbog pozitivnog rezultata na prisustvo etanola u krvi i kokaina u urinu korišćena je GC-MS tehnika za potvrdu prisustva kokaetileni u uzorcima krvi i urina (karakteristični joni m/z 82, 96, 240, 285).

Na slikama 1. i 2. prikazani su hromatogram uzorka urina i maseni spektar kokaetileni nakon GC-MS analize.

DISKUSIJA

Kokaetilen je znatno toksičniji od kokaina i ima duže poluvreme eliminacije. Kokaetilen potencira direktne kardiotoksične i indirektne neurotoksične efekte kokaina. Zbog toga konzumiranje kokaina zajedno sa etanolom može biti udruženo sa značajnim porastom verovatnoće nastajanja neuroloških ili kardioloških poremećaja⁽⁷⁾. Za adekvatno zbrinjavanje otrovanih bolesnika koji su istovremeno upotrebljavali kokain i etanol, od velikog je značaja detektovati prisustvo kokaetileni u biološkim uzorcima. Dokazivanje prisustva kokaetileni u krvi značajno je za monitoring farmakoloških efekata, dok potvrda njegovog prisustva u urinu ukazuje na eliminaciju ovog metabolita iz organizma. Detekcija kokaetileni daje nedvosmislen podatak o istovremenom uzimanju navedenih psihoaktivnih supstanci. To je posebno važno u situacijama kada je uživatelj kokaina uneo malu količinu etanola (dovoljnu za sintezu kokaetileni) koja se posle određenog vremena ne može detektovati primenom standardnih metoda za određivanje koncentracije etanola.

Prisustvo kokaetileni u krvi iako ne povećava procenat trovanja sa letalnim ishodom, značajno povećava verovatnoću zbrinjavanja otrovanih u jedinicama intenzivne nege⁽⁸⁾.

U literaturi su opisane različite metode za određivanje metabolita kokaina. Najbrži rezultati mogu se dobiti primenom imuno testova. Na ovaj način mogu se odrediti jedinjenja iz iste grupe (iste hemijske strukture u osnovi) ali se ne može odrediti struktura svakog pojedinačnog jedinjenja. Primenom HPLC-PDA tehnike mogu se detektovati samo neki od metabolita kokaina, kao što je benzoilekgonin. Zbog svog zanemarljivog farmakološkog efekta, praćenje ovog metabolita nema klinički značaj. S druge strane, detekcija kokaetileni je s kliničkog aspekta daleko značajnija, ali je zbog slabe osetljivosti HPLC-PDA tehnike onemogućena. Zbog toga je neophodno primeniti maseno spektrometrijsku metodu koja ima veću osetljivost.

Primenom tačne hromatografije sa maseno-spektrometrijskom detekcijom moguće je potvrditi prisustvo kokaina i njegovih metabolita, kao i prisustvo kokaetileni kod osoba koje su zloupotrebljavale i alkohol zajedno sa kokainom⁽⁹⁾.

Tečna hromatografija sa maseno-spektrometrijskim detektorom (LC-MS) je veoma moćna analitička metoda. Zahvaljujući velikoj osetljivosti, selektivnosti i specifičnosti mogu se u ciljanim analizama detektovati i tragovi analita u različitim matriksima. Međutim, primena ove metode u rutinskim analizama, kada je neophodan skrining, ograničena je različitim faktorima, kao što su sastav mobilne faze, uticaj komponenti matriksa na mogućnost detekcije analita, kao i nemogućnost primene univerzalne biblioteke koja bi omogućila identifikaciju velikog broja različitih jedinjenja pod istim analitičkim uslovima⁽⁹⁻¹⁰⁾.

Gasna hromatografija sa masenom spektrometrijom (GC-MS) je kao i LC-MS metoda veoma specifična i osetljiva. Zahvaljujući primeni kompjuterskih biblioteka masenih spektara, može se koristiti i kao skrining metoda za identifikaciju nepoznatog uzročnika trovanja, jer daje nedvosmisleno potvrdu identiteta ispitivanog jedinjenja. Kao takva, ova tehnika pogodna je za potvrdu prisustva očekivanih niskih koncentracija kokaetileni u analiziranim biološkim uzorcima. To je posebno važno u urgentnim stanjima kada je neophodno u što kraćem vremenskom periodu izdati pouzdan i tačan rezultat⁽¹¹⁻¹⁵⁾.

Fleming i saradnici su opisali GC-MS metodu za određivanje koncentracije kokaina, benzoil-ekgonina, kokainmetil estra i kokaetileni u SIM modu („single ion monitoring“) nakon čvrsto-fazne ekstrakcije uzoraka urina⁽¹¹⁾.

Uzorci biološkog materijala se posle ekstrakcije moraju derivatizovati da bi mogli da se analiziraju GC-MS metodom. Contreras i sar. preporučuju derivatizaciju pomoću anhidrida pentafluoropropionske kiseline i heksafluoroizopropanola⁽¹²⁾.

S obzirom na to da se uz kokain često zloupotrebljavaju i druge psihoaktivne supstance, mogućnost skrininga GC-MS metodom je značajna za njihovu detekciju i adekvatno zbrinjavanje otrovanog.

GC-MS metoda se može koristiti za identifikaciju i kvantifikaciju psihoaktivnih jedinjenja kao što su kokain i metaboliti, kanabinoidi, amfetamini, opijati morfinske strukture, hipnotici, antidepresivi i antipsihotici u biološkom uzorku. Uzorci se analiziraju nakon derivatizacije N-metil-N-(trimetilsili) trifluoroacetamidom. Ova analitička metoda se primenjuje u analizi prisustva navedenih jedinjenja osoba koje su primljene u hitnu pomoć⁽¹³⁾.

Etanol inhibira hidrolizu kokaina do benzoilekgonina i ekgonin-metilestra posredstvom enzima karbiksilesteraze. Usled inhibicije ovog enzima može doći i do promene u metabolizmu lekova koji mogu biti koingestirani zajedno sa kokainom i etanolom, zbog čega je neophodan monitoring otrovanog^(16,17). U skladu sa tim za analizu uzoraka je potrebno primeniti skrining metodu koja će dati pouzdane rezultate. Iz tog razloga je u analizi uzoraka krvi i urina pacijenta nakon ingestije kokaina i etanola korišćena GC-MS metoda. Rezultati naše analize potvrdili su prisustvo kokaina, benzoil-ekgonina kao i kokaetileni, s obzirom na to da je alkohol u krvi bio pozitivan.

Zaključak

Identifikacija kokaetileni u uzorcima biološkog materijala je veoma značajna u cilju potvrde ko-ingestije kokaina i etanola. S obzirom na to da etanol menja metabolizam kokaina i produžava njegove efekte, GC-MS metoda je veoma pouzdana i osetljiva metoda za detekciju kokaetileni. Zahvaljujući korišćenju biblioteke masenih spektara u identifikaciji kokaetileni, ovo je metoda izbora, posebno u slučajevima kada je potrebno dokazati njegovo prisustvo u uzorcima otrovanih pacijenata u nedostatku analitičkog standarda. Na ovaj način omogućeno je bolje praćenje i lečenje otrovanih.

Abstract

Abuse of cocaine is a widespread problem in many countries, especially if it is abused with ethanol. Ethanol alters the hepatic biotransformation of cocaine, resulting in transesterification to an active metabolite, cocaethylene. Cocaethylene prolongs cocaine effects which is the reason of cocaine and ethanol coconsumption. Identification of cocaethylene in biological samples is very important step in clinical monitoring and treatment of intoxicated patient. We described gas-chromatography-mass spectrometric method (GC-MS) for identification of cocaethylene in biological samples. Thanks to computer mass spectrum library it was possible to identify and confirm the presence of cocaethylene in analysed blood and urine samples of intoxicated patient.

Described GC-MS method is accurate and sensitive in detecting cocaethylene in human blood and urine. The use of this GC-MS as a screening method in emergency situations, in cases of suspected ethanol and cocaine co-consumption, gives the reliable results which is very important in further monitoring and treatment of intoxicated patient.

LITERATURA

- Pilgrim J, Woodford N, Drummer O, Cocaine in sudden and unexpected death: A review of 49 post-mortem cases, *Forensic Science International* 2013; 227 52–59
- Paul B, Lalani S, Bosy T, Jacobs A, Huestis M, Concentration profiles of cocaine, pyrolytic methylecgonidine and thirteen metabolites in human blood and urine: determination by gas chromatography–mass spectrometry, *Biomed. Chromatogr.* 2005; 19: 677–688
- National institute of drug abuse, www.drugabuse.gov, 2010
- Cami J, Farré M, González ML, Segura J, de la Torre R, Cocaine metabolism in humans after use of alcohol. Clinical and research implications, *Recent Dev Alcohol.* 1998;14:437-55
- Harris D, Everhart T, Mendelson J, Jones R, The pharmacology of cocaethylene in humans following cocaine and ethanol administration, *Drug and Alcohol Dependence* 2003; (72):169–182
- Natekar A, Matok I, Walasek P, Rao C, Clare-Fasullo G, Koren G, Cocaethylene as a hair biomarker to predict heavy alcohol exposure among cocaine users, *J Popul Ther Clin Pharmacol* 2012; 19(3):e466-e472
- Farooq MU, Bhatt A, Patel M, Neurotoxic and cardiotoxic effects of cocaine and ethanol, *J Med Toxicol.* 2009 Sep;5(3):134-8
- Wiener SE, Sutijono D, Moon CH, Subramanian RA, Calaycay J, Rushbrook JI, Zehtabchi S, Patients with detectable cocaethylene are more likely to require intensive care unit admission after trauma, *Am J Emerg Med.* 2010 Nov;28(9):1051-5
- Snozek CL, Bjergum MW, Langman LJ, Cocaine and metabolites by LC-MS/MS., *Methods Mol Biol.* 2012;902:91-103.
- Dams R, Huestis M, Lambert W, Murphy C, Matrix Effect in Bio-Analysis of Illicit Drugs with LC-MS/MS: Influence of Ionization Type, Sample Preparation, and Biofluid, *J Am Soc Mass Spectrom* 2003, 14, 1290–1294
- Fleming SW, Dasgupta A, Garg U. Quantitation of cocaine, benzoylecgonine, ecgonine methyl ester, and cocaethylene in urine and blood using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), *Methods Mol Biol.* 2010;603:145-56
- Contreras MT, González M, González S, Ventura R, Valverde JL, Hernández AF, Pla A, Vingut A, Segura J, de la Torre R, Validation of a procedure for the gas chromatography-mass spectrometry analysis of cocaine and metabolites in pericardial fluid, *J Anal Toxicol.* 2007 Mar; 31(2):75-80
- 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 chromatography-mass spectrometry, *J Pharm Biomed Anal.* 2007 Jun 28;44(2):594-601
- Rees KA, McLaughlin PA, Osselton MD, Validation of a gas chromatography-ion trap-tandem mass spectrometry assay for the simultaneous quantification of cocaine, benzoylecgonine, cocaethylene, morphine, codeine, and 6-acetylmorphine in aqueous solution, blood, and skeletal muscle tissue, *J Anal Toxicol.* 2012 Jan-Feb; 36(1):1-11
- Alvarez I, Bermejo AM, Tabernero MJ, Fernández P, López P, Determination of cocaine and cocaethylene in plasma by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2007 Jan 1;845(1):90-4
- Parker RB, Laizure SC. The effect of ethanol on oral cocaine pharmacokinetics reveals an unrecognized class of ethanol-mediated drug interactions, *Drug Metab Dispos.* 2010 Feb;38(2):317-22
- Herbst ED, Harris DS, Everhart ET, Mendelson J, Jacob P, Jones RT. Cocaethylene formation following ethanol and cocaine administration by different routes, *Exp Clin Psychopharmacol.* 2011 Apr;19(2):95-104