

*Prikaz slučaja/
Case report*

KVANTITATIVNO ODREĐIVANJE META-
DONA I NJEGOVOG METABOLITA EDDP
METODOM TEČNE HROMATOGRAFIJE:
PRIKAZ SLUČAJA

Correspondence to:

Dipl. bioh. **Gordana Brajković,**
Specijalista toksikološke hemije
Centar za kontrolu trovanja,
Vojnomedicinska akademija,
Beograd, Crnotravska 13
Telefon: +381-11-3609481
Mob.tel. 064-14-03-551
E-mail: gordanatox@gmail.com

QUANTITATIVE DETERMINATION OF
METHADONE AND ITS METABOLITE EDDP
USING LIQUID CHROMATOGRAPHY
METHOD: CASE REPORT

Gordana Brajković, Dragana Rančić, Vesna Kilibarda,
Gordana Ercegović, Nataša Vukčević i Nadežda Krstić

Vojnomedicinska akademija, Centar za kontrolu trovanja, Beograd

Ključne reči

Metadon; EDDP; terapija održavanja metadonom, toksikološko-hemijska analiza; tečna hromatografija; masena i UV spektrometrija.

Key words

Methadone; EDDP; methadone maintenance treatment (MMT); toxicology-chemical analysis; liquid chromatography-PDA-MS

Sažetak

Prikazali smo slučaj trovanja muškarca starosti 52 godine, koji je na dugogodišnjoj metadonskoj terapiji odvikavanja od zloupotrebe heroina. Doveden je u Urgentnu toksikološku ambulantu, Vojnomedicinske akademije, nakon što je popio nepoznatu količinu metadona. Bio je u komi bez reakcije na draži, miotičnih zenica, krvnog pritiska 130/70, saturacije 95%, spontanog, normalnog disanja. Klinički predstavlja intoksikaciju opijatima. Screening metodom u urinu dokazano je prisustvo metadona, EDDP, klopazina, N-desmetilklopazina i alprazolama.

Metoda tečne hromatografije sa PDA detekcijom i masenom spektrometrijom (HPLC-PDA-MS) je razvijena za terapijska i toksična određivanja metadona i njegovog glavnog metabolita EDDP u urinu. Urađena je čvrsto-fazna ekstrakcija, a razdvajanje postignuto na koloni Symmetry® C8 i na koloni XTerra® RP18 u gradijent režimu. Granice detekcije (LOD) uspostavljene su između 10 i 50 ng/mL. Linearnost je u opsegu 100-1500 ng/mg, sa prosečnim koeficijentom korelacije (R^2) > 0,99. Metod je brz, osetljiv i specifičan za određivanje metadona i EDDP i pokazao se pogodnim za praćenje nivoa leka u pacijenata na terapiji održavanja metadonom.

UVOD

Metadon (6-(dimetilamino)-4,4-difenilheptan-3-one) $C_{21}H_{27}NO$ je lipofilni, sintetički opijat, analgetik. Koristi se kao standardni tretman detoksikacije od opioidne zavisnosti. Metadon ima slična farmakološka dejstva kao morfin i deluje kao agonist na opioidne μ receptore. Od morfina se razlikuje po tome što je početak akcije sporiji, ima produženu aktivnost delovanja, a simptomi su manje ozbiljni.¹

Metadon ima asimetrični ugljenikov atom u strukturi, odakle potiču dve enantiomerne forme. Zastupljen je u obliku racemske smeše 50:50, R-*levo l*-metadon i S-*dextro d*-metadon. R metadon je aktivna forma i ima osobine opijata.^{1,2} (slika 1)



Slika 1. Strukturna formula metadona (označava hiralni centar)*

Nakon oralne primene u krvi se detektuje u roku od 15-45 minuta a maksimalna koncentracija u plazmi postiže se nakon 2,5-4 sata. Bioraspoloživost je od 36-100%. Farmakološki efekat kod nekih pacijenata može biti mali, kod

drugih prejak i produžen. Postoje razlike i u vremenu za koje se postiže maksimum koncentracije u krvi, 1-6 sati, u proseku 2,2-4,4 h.^{1,2,3,4} Kriva koncentracije metadona u plazmi nakon oralne primene imala bi dve faze, prvu eksponencijalnu, brzu α fazu, koja odgovara prenosu leka u CNS, i drugu sporu β fazu, koja odgovara eliminaciji. $t_{1/2}$ prve faze metadona u plazmi pokazuje značajne razlike između pojedinaca, i raspon je 1,9-4,2 h, prosečno $2,95 \pm 0,92$ h. $t_{1/2}$ druge faze, nestanak leka iz plazme, varira još više od 8,5-47 h.⁵

Metadon se dobro vezuje za proteine i to najviše za α_1 kiseli glikoprotein, zatim za albumin i lipoproteine. U slobodnoj frakciji je oko 13%. Step en vezivanja za proteine značajan je za metadonsku aktivnost. U stresnim situacijama se povećava koncentracija α_1 kiselog glikoproteina, tako da se smanjuje aktivnost leka. Dokazano je da postoji značajna razlika u periodu delovanja leka kod hronične i akutne administracije. Efekat metadona traje duže kod bolesnika koji su na terapiji nego kod osoba koji ga nisu ranije koristili, a kod kojih bi se očekivalo da su osetljiviji na lek. Predloženo je sledeće objašnjenje. Metadon se akumulira u tkivima kada se daje više puta, čineći na taj način rezervu. Vezani metadon je u ravnoteži sa cirkulišućim lekom u plazmi, održavajući farmakološku aktivnost 24 h. Svakodnevna doza održava tu ravnotežu sa kratkoročnim oscilacijama, dok jedna doza (100 mg na dan) leka pokazuje farmakološku aktivnost u proseku oko 6h.⁶

Eliminacija metadona vrši se njegovom biotransformacijom, N-demetilacijom i spontanom ciklizacijom u njegov primarni, neaktivni metabolit 2-etiliden-1,5-dimetil-3,3-dimetilpiridin $C_{20}H_{23}N$ (EDDP) (slika 2) i 2-ethyl-5-metil-3,3-difenilpirolin $C_{19}H_{20}N$ (EMDP).⁷

Eliminiše se urinom i fecesom. EDDP čini 17-57% ukupne doze. Uneta količina leka i pH urina utiče na odnos EDDP/metadon u urinu i on varira od pacijenta (srednja vred \pm SD u rasponu 0,4-1,30). Acidifikacija urina povećava

izlučivanje metadona, a smanjuje metabolite. Poluživot eliminacije je oko 22 h (5-130 h). Aktivni oblik R – enantiomer može se detektovati i nakon 40 h od unošenja. Metadon se metaboliše sporije od heroina i time omogućava da telo i mozak izbegnu stresne uspone i padove. Citohrom P450 (CYP) 3A4, (CYP) 2D6 su izoforme koje učestvuju u metabolizmu metadona. Aktivnost (CYP) 3A4 značajno varira među pojedincima, a takva varijabilnost odgovorna je za velike razlike u bioraspoloživosti metadona. Tokom održavanja terapije metadonom nekada je potreban tretman i sa drugim lekovima: psihotropnim, antibioticima, antikonvulzivima, antiretrovirusnim lekovima, koji mogu da izazovu farmakološke interakcije. (CYP) 3A4

uključen u metabolizam benzodiazepina, antagonist kalcijuma, antikonvulziva, alkohola, opijata (kodein, tramadol), antibiotika. Pacijenti koji uzimaju kombinovane terapije moraju pažljivo da se prate. Mora se uzeti u obzir priroda interakcije metadona sa drugim lekovima. Interakcije se mogu predvideti na osnovu razumevanja indukcije/redukcije enzima. Farmakokinetičke interakcije metadona sa drugim lekovima nemaju po život pacijenta opasne posledice, ali izazivaju smanjenje koncentracije i efekte leka, što može da izazove povećan rizik od recidiva heroinske zavisnosti. Rifampicin, karbamazepin, fenobarbiton, fenitoin, nevirapin, buprenorfin, antiretrovirus smanjuju koncentraciju metadona u krvi, verovatno zato što aktiviraju (CYP) 3A4, podstičući metabolizam metadona i njegovu eliminaciju. Inhibitori (CYP) 3A4 kao što su flukonazol, (CYP) 2D6 paroksetin povećavaju koncentraciju metadona u krvi. (CYP) 2D6 koji je uključen u metabolizam podleže genetičkom polimorfizmu. Identifikovani su razni (CYP) 2D6 aleli.^{4,5}

Radene su neuropsihološke studije da bi se pronašla veza između režima doziranja metadonom i kognitivnih performansi, nakon hronične zloupotrebe heroina. Analizirani su efekti metadona na moždane funkcije. Zaključeno je da ne utiče radikalno na kognitivne funkcije, ali da postoji blago sedativno dejstvo.⁸

Negativni efekti i toksičnost usled predoziranja ili suicida metadonom, slični su kao kod morfina. Ovo uključuje mučninu, povraćanje, sedaciju, vrtoglavicu, konfuziju, hipotenziju, poremećaj srčanog ritma, duboku, respiratornu depresiju, plućni edem i komu. Fatalna koncentracija metadona u krvi kreće se u opsegu 0,2-4,5 mg/L.⁹

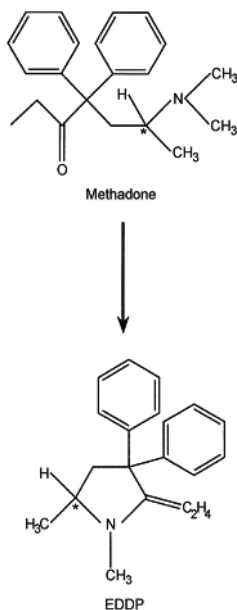
Preporučena metadonska doza TDM (*Therapeutic Drug Monitoring*) je 60-100 mg/dan. Terapijske koncentracije u krvi za recemat R i S iznose 0,4 mg/L, a za R formu 0,25 mg/L. Farmakokinetika metadona varira od osobe do osobe. Posle primene jednake doze, dobijaju se znatno različite koncentracije u subjektima, zato mora pažljivo da se klinički prate objektivni i subjektivni simptomi kod doziranja pacijenta.^{1,10}

PRIKAZ SLUČAJA

Muškarac, u dobi od 52 godine, primljen je na lečenje zbog akutne intoksikacije opijatima. Pacijent je dovežen u komi, miotičnih zenica, spontanog disanja, saturacije 95%, krvnog pritiska 130/70, frekvence 60 otkucaja u minuti. Po primeni Naloxona delimično oporavlja stanje svesti. Naknadno je dobijen podatak da je višegodišnji opijatni zavisnik, na metadonskoj terapiji. Toksikološkim analizama urina dokazano je prisustvo metadona u koncentraciji 2640 ng/mL, EDDP 1701 ng/mL, klopazina 270 ng/mL, N-dezmetil klopazina 800 ng/mL, alprazolama 1 ng/mL. Pacijent je uz antidotsku terapiju i kristaloidne rastvoren lečen dvojnomo antibioticom terapijom zbog desnostrane bronhopneumonije. Opušten je oporavljen, nakon 4 dana, sa savetom da se javi nadležnom psihijatru.

MATERIJAL I METODE

Uzorak urina pacijenta, dostavljen je iz Urgentne ambulante. Hloroform, amonijak, acetonitril i metanol (HPLC čistoće) nabavljeni su od firme Merck, Darmstadt, Nemačka. Reagensi mobilne faze: natrijum dihidrogen fosfat koji



Slika 2. Metabolički put N-demetilacije metadona u EDDP (* označava hiralni centar)

su korišćeni za analizu dobijeni su od *Sigma-Aldrich*, p.a. Korišćeni su sledeći standardi i referentni materijali: *Batch No 03-D-06*; *Liquichek, Urine Toxicology Control, A human urine drugs of abuse control United States, Bio-Rad Laboratories, level S2-low opiate, lot 73650*; *Liquichek, Urine Toxicology Control A human urine drugs of abuse control United States, Bio-Rad Laboratories, level S3-, lot 67110*; *Liquichek, Urine Toxicology Control, A human urine drugs of abuse control United States, Bio-Rad Laboratories, level C2, lot 67850*; *Liquichek, Urine Toxicology Control, A human urine drugs of abuse control United States, Bio-Rad Laboratories, level C3, lot 68400*.

Metadon i metabolit EDDP je određen tehnikom tečne hromatografije u sprezi sa PDA detektorom i bibliotekom UV spektara. Hromatografski uslovi za HPLC-PDA: Mobilna faza: acetonitril : natrijum dihidrogen fosfat 50 mM pH 3,6 doteran sa H₃PO₄ (20%). Mobilna faza je filtrirana i degazirana preko membranskog filtra; kolona *Symmetry® C8 4,6x250 mm Waters* sa predkolonom *Sentry Guard Symmetry® C18*, temperatura kolone: 30°C, brzina protoka mobilne faze: 1-1,5 mL/min gradijent: PDA detektor: λ = 200,5 nm; retenciono vreme za metadon: Rt≈16,22; za EDDP Rt≈15,06.

Određivanje metadona i EDDP vršeno je i tečnom hromatografijom sa maseno-spektrometrijskim detektorom LC-MS. Hromatografski uslovi za LC-MS: Tečno-maseni hromatograf *Waters Alliance 2695, Mass Lynx*, kolona *XTerra® RP18 3,5 μm 2,1 mm x 150 mm*, temperatura kolone 20°C. Mobilna faza: Komponenta A: 5 mM amonijum formijat pH 3,5 doteran sa mravljom kiselinom. Komponenta B: acetonitril sa 0,1% mravljom kiselinom. Autosempler: temperatura 20°C, dužina analize 26 min. Temperatura izvora 125°C, temperatura desolvacije 430°C; Protok gasa: desolvacioni 400L/h, konusni 50L/h.

Protok mobilne faze: 0,2 mL/min, gradijent; Napon na kapilari 4 kV. Maseni spektrometrijski detektor je optimiziran i podešen na pozitivan mod ES⁺, opseg masa od 100-500, *scan time* 1. retenciono vreme za metadon: Rt≈14,65; za EDDP Rt≈14,14.

Izolovanje metadona i EDDP rađeno je na *Oasis® HLB* ketridžima zapremine 3 mL, čija je veličina pora 30 im, metodom čvrsto-fazne ekstrakcije. Nakon centrifugiranja uzorak seruma je ekstrahovan. Kolona HLB ketridža je kondicionirana sa 1 mL metanola, a potom uravnotežena sa 1 mL vode. Posle aktivacije na kolonu je nanet uzorak urina

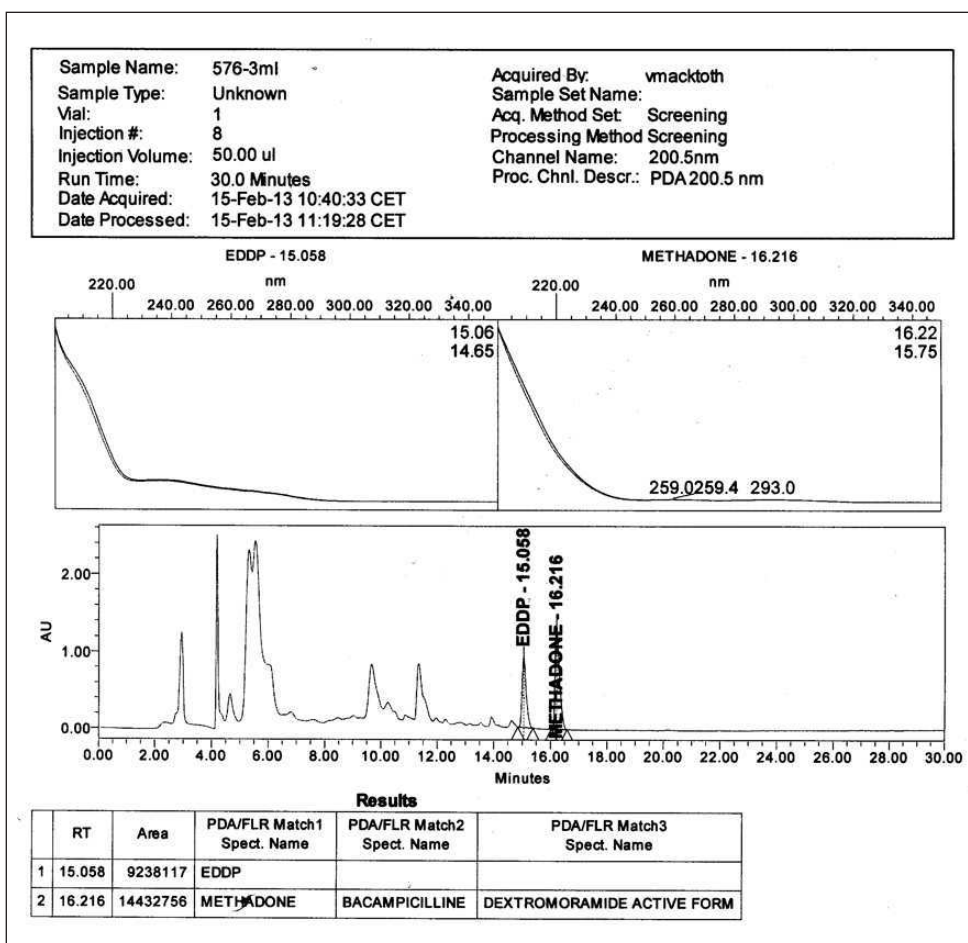
i propušten uz protok 2 mL/min. Kolona je isprana sa 1 mL 5% metanola. Eluiranje je vršeno 1 mL metanola i nakon toga uzorak je hromatografisan HPLC-PDA-MS metodom.

Određivanje koncentracije vršeno je poređenjem površine pikova analiziranih jedinjenja sa odgovarajućim pikovima referentnih materijala urina poznate koncentracije.

REZULTATI

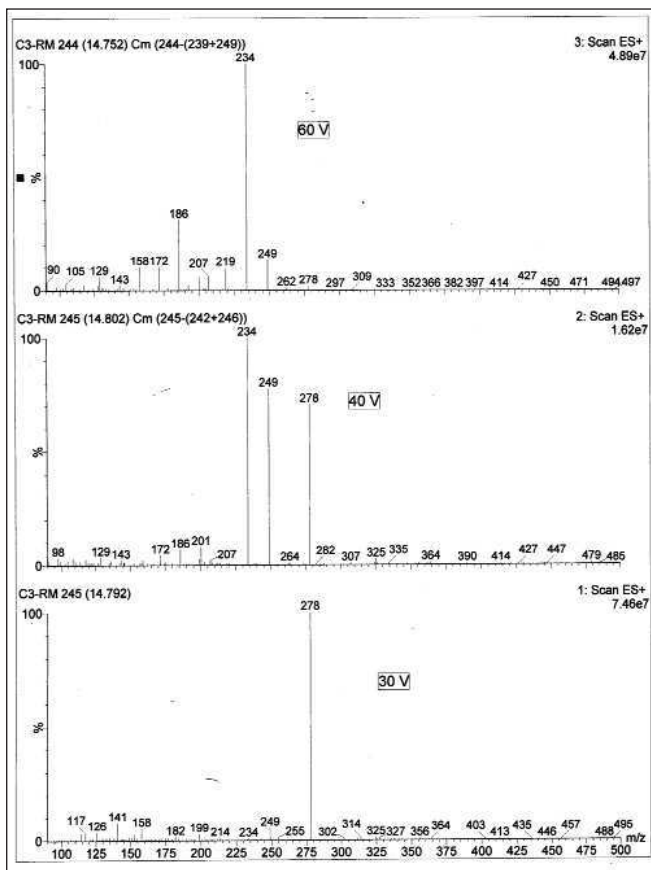
Uvedene su metode HPLC/PDA-MS za dokazivanje i određivanje metadona u biološkom materijalu. Na slici 3 prikazan je hromatogram uzorka urina pacijenta i UV spektri metadona i EDDP koji se poklapaju sa UV spektrima biblioteke spektara.

Na slikama 4,5,6 prikazani su MS spektri i hromatogrami metadona i EDDP u referentnom materijalu urina a *human urine drugs of abuse control United States, Bio-Rad Laboratories, level C3, lot 68400* nakon hromatografisanja na LC-MS-u, selektovani na jone m/z 265 i 310 za metadon i 278 i 234 za EDDP na voltazama 30mV, 40mV i 60 mV .

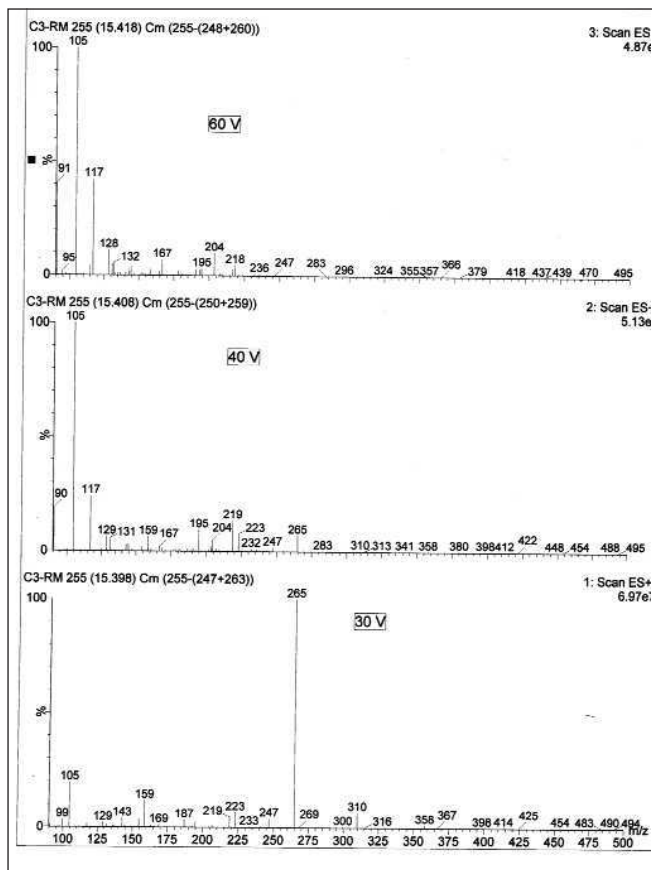


Slika 3. Hromatogram i UV spektri metadona i EDDP u uzorku urina pacijenta

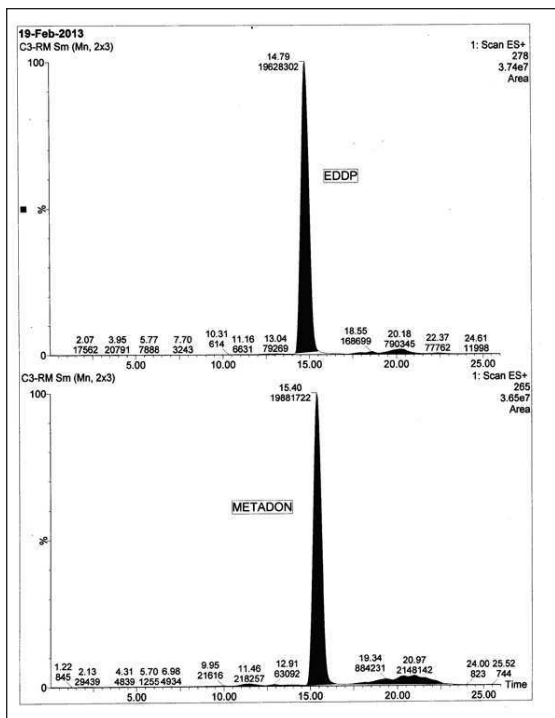
Metoda za metadon HPLC-PDA-MS je validovana i linearna u rasponu 50-1500 ng/mL ($r^2 > 0,99$). Granica detekcije je između 10 i 50 ng/mL, a limit kvantifikacije je 100 ng/mL, sa greškom ponovljivosti RSD 3 i greškom reproduktivnosti RSD 5.



Slika 4. Maseni spektri EDDP u referentnom materijalu urina

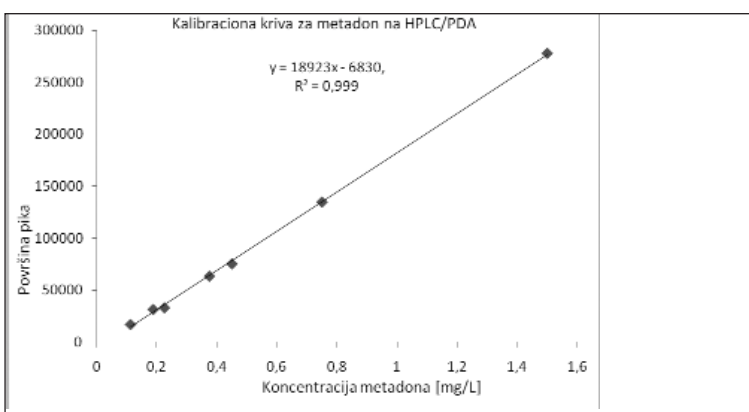


Slika 5. Maseni spektri metadona u referentnom materijalu urina

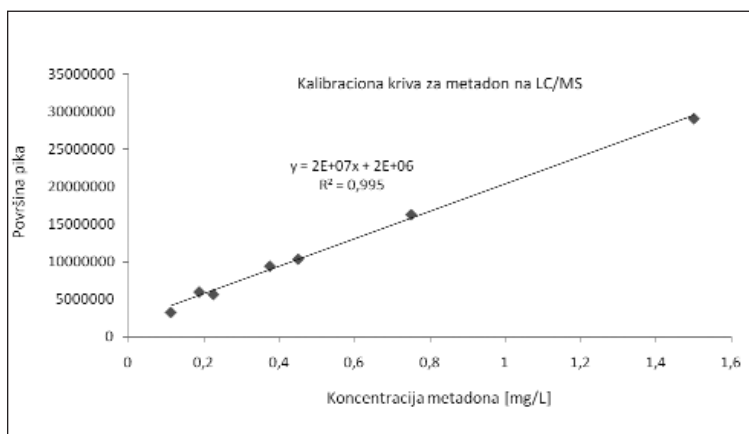


Slika 6. Hromatogram metadona i EDDP u referentnom materijalu urina na LC-MS-u

Kalibraciona kriva za metadon je konstruisana metodom najmanjih kvadrata, sa srednjim vrednostima površine pikova za svaku koncentraciju, korišćenjem programa Excel 5. Istim programom su izračunati koeficijenti korelacije (r) i jednačina prave $y = a \pm bx$.



Slika 7. Kalibraciona kriva i regresiona jednačina za metadon na HPLC-u



Slika 8. Kalibraciona kriva i regresiona jednačina za metadon na LCMS-u

Na slici 7 i 8 prikazane su kalibracione krive metadona na HPLC-u i LC/MS-u.

Primenom HPLC-PDA-MS metode, izvršena je analiza uzorka urina i utvrđeno prisustvo metadona 2640 ng/mL, EDDP 1701 ng/mL (glavnog metabolita metadona), klozapina 200 ng/mL, N-desmetilklozapina 800 ng/mL i alprazolama 1 ng/mL.

DISKUSIJA

Trovanje ili predoziranje su glavni uzroci smrtnosti kod upotrebe metadona.⁹ Opisali smo slučaj trovanja metadonom, čoveka 52 godine i uvođenje analitičke metode za njegovo određivanje. Metadon intoksikacija je simptomatska i razmatra se u kontekstu sa letargijom, miozom i respiratornom depresijom. Početno upravljanje se sastoji u uspostavljanju disanjnih puteva, davanju naloksona i toksikološkoj analizi urina, radi kompletne dijagnoze. Primenom HPLC-PDA-MS metode, izvršena je analiza uzorka urina i utvrđeno je prisustvo metadona 2640 ng/mL, EDDP 1701 ng/mL, klozapina 200 ng/mL sa metabolito N-desmetilklozapinom 800 ng/mL i alprazolama 1 ng/mL. U radovima nema zabeleženih mogućih interakcija metadona sa klozapinom. Benzodiazepini mogu da izazovu respiratornu depresiju kao i metadon pa se efekat umnožava.

HPLC-MS-PDA^{11,12,13,14} metoda je praktična alternativa za screening i potvrdu u različitim matricama biološkog materijala uključujući urin, krv, majčino mleko, lavat, kosu, tkiva organa. Razvijenom HPLC-MS-PDA metodom sa datim hromatografskim uslovima, moguća je brza analiza legalnih i ilegalnih droga i njihovih metabolita u uzorcima urina, kao pokazatelja potencijalne izloženosti. Pouzdanost kliničke i forenzičke toksikološke analize zavisi u velikoj meri od pripreme uzoraka. Priprema uzoraka je važan korak analitičkog procesa, onoliko koliko ima uticaja na tačnost, preciznost, reprezentativnost i kvalitet rezultata. SPE je izabrani postupak za prečišćavanje uzorka zbog svojih prednosti: smanjenja vremena i jednostavnosti pripreme, automatizacije, izbegavanja emulzije, manje potrošnje organskih rastvarača, a procenjena tačnost i preciznost za metadon je dobra.^{11,12,13,14,15,16} Metoda za metadon je validovana i linearna u rasponu 100-1500 ng/mL ($r^2 > 0,99$). Granica detekcije je između 10 i 50 ng/mL, a limit kvantifikacije je 100 ng/L, sa greškom ponovljivosti RSD 3 i greškom reproduktivnosti RSD 5.

U radovima je prikazano određivanje metadona i u drugim biološkim uzorcima. Analiza kose ima veći retrospektivni vremenski okvir od urina. Analiziranjem uzorka kose može se detektovati zloupotreba droge nedeljama, pa čak i mesecima unazad. Uz derivatizaciju upotrebom MTB-STFA i gasno masene hromatografije može se detektovati metadon uz istovremeno određivanje i drugih psihoaktivnih supstanci.¹⁷

U oblasti toksikologije dah se koristio kao uzorak samo za određivanje alkohola. Nedavno je otkriveno da uz upotrebu osetljivih tehnika kao što je tandem masena spektrometrija moguće je iz daha odrediti i metadon. Izdahnuti dah se kondenzuje, ekstrahuje i hromatografiše.¹⁸

Zloupotreba droga je značajan izvor ekonomskih i socijalnih problema. Progresivne promene ličnosti opijatnih zavisnika su teret za njihove porodice i zajednicu. Psihološka i socijalna manifestacija zavisnosti heroinom zahteva integrisanu intervenciju u medicini i psihijatriji. Da bi lečenje zavisnosti, rehabilitacija i sprečavanje recidiva bilo efikasno, klinička intervencija bolesnika se prilagođava fazi bolesti. Cilj lečenja metadonom je da se pacijent odgovarajućom dozom stabilizuje uz povlačenja potrebe za heroinom i simptoma apstinencije. Time započinje proces oporavka. Glavni cilj farmakoterapije i psihosocijalnog tretmana je dugoročnim lečenjem dati priliku postepenog vraćanja na bio-psiho-socijalno funkcionisanje, normalni život, lična zadovoljstva, socijalni ugled, fizičko i mentalno zdravlje pacijenta.

ZAKLJUČAK

Određivanje koncentracije metadona u uzorcima je značajno radi ocenjivanja efikasnosti terapije i prilagođavanja doze metadona stvarnim potrebama pacijenta. Merenje koncentracije metadona u krvi nije uvek dovoljno da bi se predvideli efekti leka, već mora da se poveže sa drugim farmakokinetičkim parametrima. Potrebno je često uraditi i urin na zloupotrebu droga. Postupak pripreme je jednostavan a detekcija na HPLC-MS-PDA je precizna i specifična kojom se mogu pratiti terapijske i toksične koncentracije metadona, a pogodan je i za prikazivanje širokog spektra droga zloupotrebe.

Abstract

We present a case of a 52-year old man, on long methadone maintenance treatment (MMT) with a history of intermittent heroin abuse, after ingesting an unknown quantity of methadone, come to the Emergency Department at the Military Medical Academy. Vital signs were: coma with no response to stimuli; miotic pupils; heart rate 55/min; blood pressure 130/70 mmHg; normal eupneic; and room air oxygen saturation 95%. Clinically, this patient demonstrated opioid intoxication. A urine drug screen was positive for methadone, EDDP, clozapine, alprazolam

A method was developed for the quantitative analysis of methadone of therapy and of abuse and his metabolite in urine. A fast liquid chromatographic assay with mass and photo diode array spectrometric detection (HPLC/PDA/MS) has been developed for the simultaneous determination of methadone, its primary metabolite, 2-ethylidene-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidine (EDDP) in human urine. The extraction procedure was performed with automatic solid phase extraction, and the compounds were separated with a Symmetry® C8 and XTerra® RP18 column using a gradient mode. Limits of detection (LOD) were established between 10 and 50 ng/ml. Linearity was obtained over a range of 100–1500 ng/ml with an average correlation coefficient (R^2) of >0.99. Using a rapid, sensitive and highly specific method was developed for quantization of methadone and EDDP and the method proved to be suitable for evaluation of urine obtained from patients

LITERATURA:

- Eap CB, Buclin T, Baumann P: Interindividual Variability of the Clinical Pharmacokinetics of Methadone; Clin Pharmacokinet 2002; 41 (14): 1153-1193.
- Gerber JG, Rhodes RJ, Gal J: Stereoselective metabolism of methadone N-demethylation by cytochrome P4502B6 and 2C19; Chirality. 2004; 16(1):36-44.
- Kelly T, Doble P, Dawson M: Chiral analysis of methadone and its major metabolites (EDDP and EMDP) by liquid chromatography-mass spectrometry; J. Chromatogr. B Analyt Technol Biomed Life Sci; 2005; 814(2):315-323.
- Clarke's Analysis of Drugs and Poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material. 3 Edition, London, Pharmaceutical press; 2011;1648-1651.
- Ferrari A, Coccia CPR, Bertolini A, Sternieri E: Methadone-metabolism, pharmacokinetics and interactions; Pharmacol. Research; 2004; 50:551–559.
- Dole VP and Kreek MJ: Methadone Plasma Level: Sustained by a Reservoir of Drug in Tissue; Proc. Nat. Acad. Sci. USA; 1973; 70(1): 10.
- Foster DJR, Somogyi AA, Bochner F: Stereoselective quantification of methadone and its major oxidative metabolite, 2-ethylidene-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidine, in human urine using high-performance liquid chromatography; J. Chromatogr. B Analyt Technol Biomed Life Sci; 2000; 744(1):165-76.
- Polunina AG, Davydov DM, Kozlov AA: Brain Disintegration in Heroin Addicts: The Natural Course of the Disease and the Effects of Methadone Treatment: Heroin Addict Relat Clin Probl 2007; 9(2): 17-26.
- Corkery JM, Schifano F, Ghodse AH, Oyefeso A: The effects of methadone and its role in fatalities; Hum Psychopharmacol Clin Exp 2004; 19: 565–576.
- Langleben DD, Ruparel K, Elman I, Winokur SB, B.A. Ramapriyani Pratiwadi, B.S.E. James Loughhead, Ph.D. Charles P. O'Brien, M.D., Ph.D. Anna R. Childress, Ph.D.: Acute Effect of Methadone Maintenance Dose on Brain fMRI Response to Heroin-Related Cues; Am J Psychiatry 2008; 165:390–394.
- Bogusz MJ, Maier RD, Krieger KD, Kohls U: Determination of Common Drugs of Abuse in Body Fluids Using One Isolation Procedure and Liquid Chromatography-Atmospheric-Pressure Chemical-Ionization Mass Spectrometry; J Anal Toxicol, 1998; 22:549-558.
- Fernández P, Lago M, Lorenzo RA, Carro AM, Bermejo AM, Taberero MJ: Microwave-Assisted Extraction and HPLC-DAD Determination of Drugs of Abuse in Human Plasma; J Anal Toxicol; 2007; 31: 388-393.
- Feng J, Wang L, Dai I, Harmon T, and Bernert JT: Simultaneous Determination of Multiple Drugs of Abuse and Relevant Metabolites in Urine by LC-MS-MS; J Anal Toxicol; 2007; 31: 360-367.
- Wolff K, Sanderson M, Hay A W N, Ralstrick D: Methadone Concentrations in Plasma and Their Relationship to Drug Dosage; Clin. Chem. 1991; 37(2): 205-209.
- Quintela O, López P, Bermejo AM, López-Rivadulla M: Determination of methadone, 2-ethylidene-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidine and alprazolam in human plasma by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry; J. Chromatogr. B Analyt Technol Biomed Life Sci; 2006; 834(1-2): 188–194.
- Nikolaou PD, Papoutsis II, Maravelias I C P, Spiliopoulou CA., Pistos CM, Calokerinos AC, Politou J A: Development and Validation of an EI-GC-MS Method for the Determination of Methadone and its Major Metabolites (EDDP and EMDP) in Human Breast Milk; J Anal Toxicol.; 2008; 32: 478-484.
- Paterson S, Troup NM, Cordero R, Dohnal M, Carman S: Qualitative Screening for Drugs of Abuse in Hair Using GC-MS; J Anal Toxicol; 2001; 25:203-208.
- Beck O, Sandqvist S, Eriksen P, Franck J, Palmkog G: Determination of Methadone in Exhaled Breath Condensate by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry; J Anal Toxicol; 2011; 35; 129-133.