

Prikazi bolesnika/
Case reports

ANALITIČKA POTVRDA TROVANJA KOLHICINOM PRIMENOM METODE TEČNE HROMATOGRAFIJE SA MS I PDA DETEKCIJOM - PRIKAZ SLUČAJA

Correspondence to:

Dipl. bioh. Gordana Brajković,
specijalista toksikološke hemije
Vojnomedicinska akademija,
Centar za kontrolu trovanja, Beograd
+381-11-3609481

E-mail: gocab@panet.rs

ANALYTICAL CONFIRMATION OF COLCHICINE POISONING METHOD OF LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH PDA AND MS DETECTION - CASE REPORT

Gordana Brajković, Miodrag Jovanović, Vesna Kilibarda
Vojnomedicinska akademija, Centar za kontrolu trovanja, Beograd

Ključne reči

Kolhicin; *Colchicum autumnale L.*;
hromatografija, tečna.

Key words

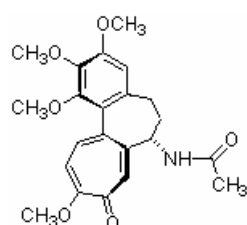
Colchicine; *Colchicum autumnale L.*;
chromatography, liquid.

Apstrakt

The paper describes case of accidental poisoning of colchicine and its severe clinical picture. The patient ate a salad leaf plants autumn crocus (*Colchicum autumnale L.*), which is very similar to the "wild garlic" (*Allium ursinum L.*). Alkaloid was determined by liquid chromatography coupled with diode-array detection (DAD) and confirmed technique of liquid chromatography with mass spectrometry (LC-MS), where data are collected either in full-scan ES+ mode at m/z 100-450. Colchicine was isolated from plasma or urine using a liquid-liquid extraction with chloroform at pH 9.6 with satisfactory extraction recoveries. Separation was achieved on the Symmetry® C8 column with mobile phase acetonitril: dihydrogen sodium phosphate 50 mM pH 3.6 in the gradient mode, and XTerra® RP18 column with a mobile phase: 5 mM ammonium acetate (pH 3.5): acetonitril with 0, 1% acetic acid. The method is validated blood and linear in the range of 20-1000 ng/mL ($r^2 > 0.99$). Limit of detection was 10 ng/mL and limit of quantification was 20 ng/mL. Because of its good sensitivity HPLC-PDA-MS is a reliable technique.

UVOD

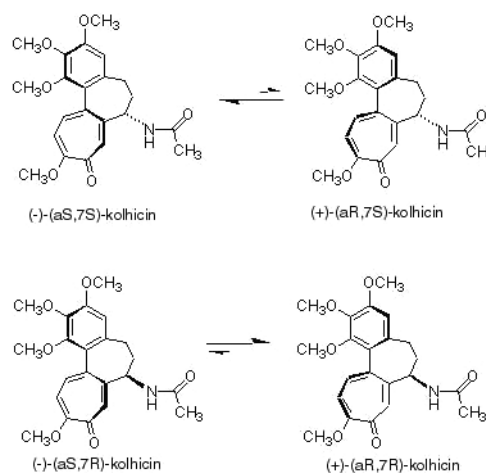
Kolhicin je alkaloid, izolovan iz biljke mrazovac (*Colchicum autumnale L.*) koja je iz porodice ljiljana (*Liliaceae*). Dva francuska hemičara, P.S. Pelletier i J. Caventon su 1820. g. su prvi put izolovali ovaj alkaloid.



$C_{22}H_{25}NO_6$
Molekulska masa-399,43
CAS-broj-64-86-8
N-[(7S)-5,6,7,9-tetrahidro-1,2,3,10-tetrametoksi-9-oksobenzo[a]heptalen-7-il] acetamid

Slika 1. Strukturna formula kolhicina

Kolhicin ima benzo-cikloheptano-tropolonsku strukturu (sl 1.). Ima četiri metoksi grupe od kojih je jedna vezana za tropolonski prsten i lako može da hidrolizuje. Ima i jednu amino grupu čiji bazni karakter je slabo izražen, pa kao slaba baza sa kiselinama praktično ne gradi soli. Biološka aktivnost kolhicina zavisi od tropolonskog prstena i



Slika 2. Stereoizomeri kolhicina

pravilnog položaja njegovih supstituenata. Njegov manje toksičan derivat demekolcin (*kolhamin*, *kolcemid*, *desacetylmethylkolchicin*) upotrebljava se u obliku lekovite masti za lečenje raka kože i u terapiji hroničnih leukoza i nekih oblika zloćudnih tumora u organima gastro-intestinalnog trakta.

Kolhicin ima četiri izomera, (sl. 2) Svaki par ima R ili S konfiguraciju u C-7 Položaj acetilirane amino grupe određuje aktivnost. Izomer (7S)-kolhicin je aktivan. (1)

Kolhicin se brzo apsorbuje iz gastro-intestinalnog trakta. Poluvreme apsorpcije je 15 min. Pik maksimalne koncentracije u plazmi dostiže posle 0,5-2 sata u zavisnosti od uzimane hrane i potom brzo pada u roku od 2 sata. Podležje jednim delom metabolizmu u jetri gde se delimično deacetiluje. Veći deo kolhicina i njegovih metabolita prolazi ekstrahepatocitnu cirkulaciju-efekat prvog prolaza. Ovo objašnjava pojavu drugog pika maksimalne koncentracije u plazmi posle 5-6 sati od unošenja. Poluživot u plazmi je 60 min. Transportuje se 30-50% vezivanjem za proteine plazme. Najviše se akumulira u bubrezima, jetri, slezini, gastro-intestinalnom zidu i leukocitima. Prolazi placentu i pronađen je u majčinom mleku. Kolhicin se izlučuje nepromenjen ili u obliku metabolita. Urinarnom ekskrecijom se izlučuje 16-47 % doze, gde je 50-70 % kolhicina nepromenjeno, a 30-50% kao metaboliti. 20% od doze izluči se urinom u prvih 24 sati i 27,5% u prvih 48 sati. Kolhicin se otkriva u urinu i nakon 7-10 dana od unošenja. Putem žuči se izlučuje 10-25% kolhicina. Velika količina se izlučuje fecesom i to 10-50% u prvih 48 sati. Eliminise se i putem majčinog mleka.

Način delovanja: Kolhicin se vezuje za tubulin i to sprečava njegovu polimerizaciju u mikrotubule narušavajući različite funkcije mikrotubula: razdvajanje hromozomskih parova tokom mitoze, ameboidne pokrete, fagocitozu. Veza kolhicin-tubulin je reverzibilna i poluživot kompleksa je 36 sati. Koristi se kod lečenja gihta. Kristali urata unose se od strane neutrofila i nagomilavaju se unutar tkiva. To izaziva oslobađanje enzima i uništavanje ćelije. Hematocitni faktori koji su se oslobodili privući će još više neutrofila. Kolhicin deluje tako što sprečava fagocitozu i oslobađanje hematocitnih faktora i odgovor. Kolhicin ima i druge osobine kao što su antipiretik efekti, respiratorna depresija i vazokonstrikcija hipertenzije.

Kolhicin je toksičan za gotovo sve organe čoveka. Toksične manifestacije ispoljavaju se nakon 2-12 sati. Simptomatologija se ogleda u izazivanju proliva, redukciji koštane srži, delovanju na srčani mišić, poremećaju funkcije nervnog sistema, pojačanom opadanju kose. Uzrok toksičnog delovanja kolhicina leži u njegovu delovanju na deobu ćelije. Naime kolhicin sprečava stvaranje deobenog vretena neophodnog za pravilnu deobu ćelije. Konzumacija 5 g semena izaziva smrt. Unošenje 7-12 mg je letalno. Kod dece toksična doza je 0,1mg/kg, a smrtonosna iznosi 0,5-0,8mg/kg. Trenutno nema za kolhicin raspoloživog protivotrova. Smrtonosna koncentracija u krvi je 60 ng/mL.(2)

Svi delovi mrazovca sadrže kolhicin. Najveća koncentracija kolhicina je u semenkama (0,2 do 0,8%) i u lukovicima (0,4 do 0,6%) dok je u lišću niska. U mrazovcu su prisutni i neki drugi toksini vrlo slični kolhicinu poput dezacetilmetilkolhicina, dezacetiltiokolhicina, kolhikozida, dimetildezacetilkolhicina. Izolovan ima izgled bleđožutog praška koji na svetlosti potamni i skoro je bez mirisa, ukus gorak i odbojan. Slabo je rastvorljiv u vodi, a dobro se rastvara u hloroformu i etanolu.

Optimalna temperatura na kojoj se čuva je od -15 °C do -25 °C, u tamnim bocama (na svetlu se razlaže na lumikolhicin). Sušenjem biljke kolhicin se ne razlaže jer je termostabilan.

Višegodišnja zeljasta biljka, visoka 20-45 cm, sa krtolastom, jajastom lukovicom veličine 2,5-4,5 cm. Cveta od avgusta do novembra. Cvet veoma liči na cvet od šafrana, pa ga u nekim krajevima nazivaju jesenji šafran. Nema neki naročit miris. Rasprostranjena je po brdsko-planinskim livadama i pašnjacima.(6)



Slika 3. Biljka u cvatu mrazovac (*Colchicum autumnale*)

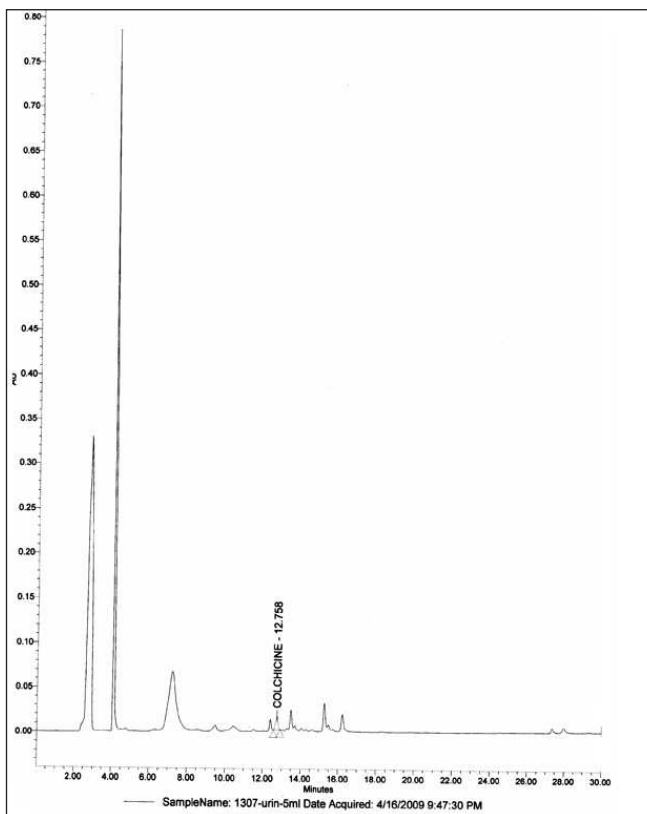
MATERIJAL I METODE

Uzorci krvi i urina uzeti su od pacijentkinje P. M. Prema preporuci, biološki uzorci (krv, urin i tkiva organa) uzimaju se zaštićeni od svetlosti i čuvaju na temperaturi od -20°C. Nivo kolhicina je veći u krvi nego u plazmi. Hloroform, amonijak, acetonitril i metanol (HPLC čistoće) nabavljeni su od firme Merck, Nemačka. Reagensi mobilne faze natrijum dihidrogen fosfat i standard koji su korišćeni za analizu dobijeni su od *Sigma-Aldrich*, p.a. Kolhicin 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 4,6x250mm Waters sa pretkolonom Sentry Guard Symmetry® C18, temperatura kolone: 30° C , brzina protoka mobilne faze: 1-1,5 mL/min gradijent: PDA detektor: $\lambda = 244,0$ nm; retenciono vreme za kolhicin: Rt□12,758.

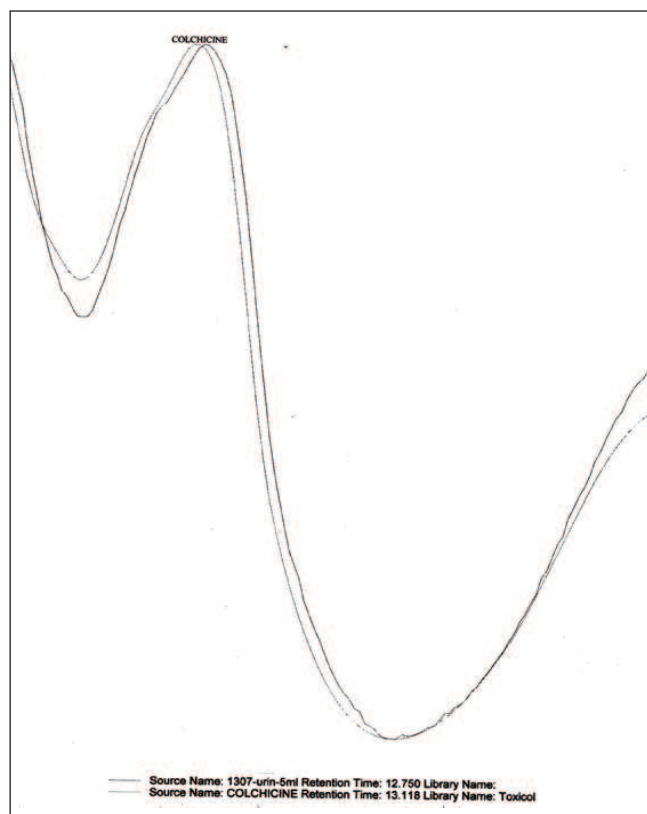
Određivanje kolhicina vršeno je tačnom hromatografijom sa maseno-spektrometrijskim detektorom LC-MS. Hromatografski uslovi za LC-MS: Tačno-maseni hromatograf Waters Alliance 2695, Mass Lynx, Kolona XTerra® RP18 3,5 μ m 2,1mm x 150mm, temperatura kolone 20°C. Mobilna faza: Komponenta A: 5 mM amonijum acetat pH 3,5 doteran sa sirćetnom kiselinom Komponenta B: acetonitril sa 0,1% sirćetnom kiselinom. Autoempler: temperatura 20°C, dužina analize 26min. Temperatura izvora 125°C, temperatura desolvacije 430°C; Protok gasa: desolvacioni 400L/h, konusni 50L/h

Protok mobilne faze: 0,2mL/min, gradijent; Napon na kapilari 4 kV. Maseni spektrometrijski detektor je optimiziran i podešen na pozitivan mod ES+, opseg masa od 100-450, scan time 1. retenciono vreme za kolhicin: Rt□13,01.

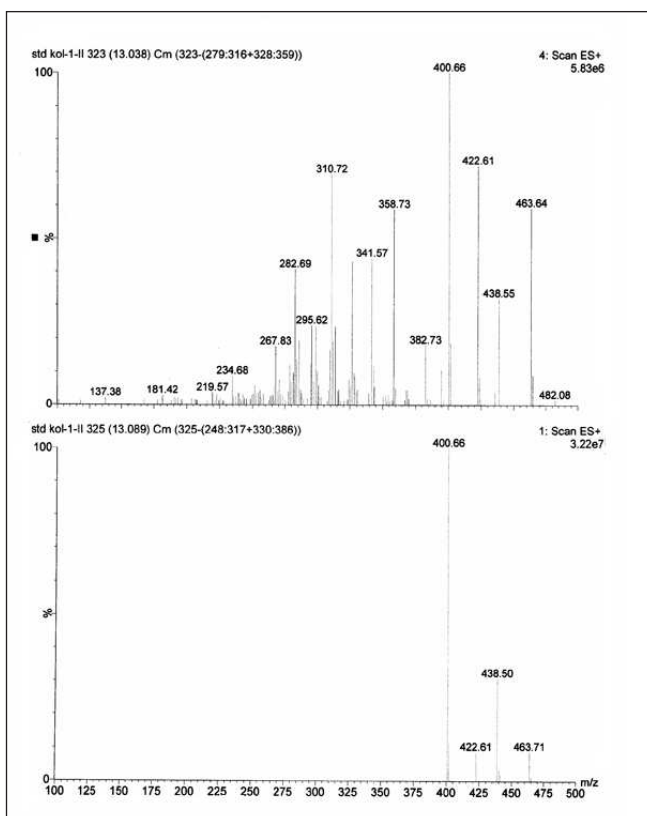
Uzorak urina dobijen od pacijenta zapremine 5ml zaalkalisan je sa NH₄OH (pH 9,6) i ekstrahovan hloroformom. Posle ekstrakcije suvi ostatak rekonstituisan je u metanolu i analiziran HPLC-PDA metodom. Određivanje koncentracije vršeno je poređenjem površine pikova analiziranih jedinjenja sa odgovarajućim pikovima urina opterećenih standardnim rastvorom poznate koncentracije.



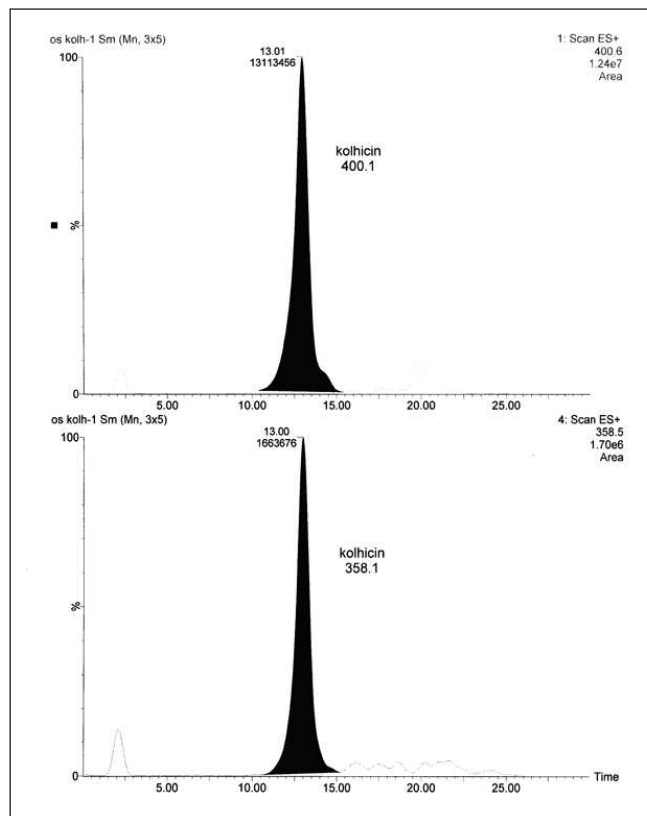
Slika 4. UV hromatogram kolhicina iz uzorka urina



Slika 5. UV spektar kolhicina i uzorka urina i biblioteke



Slika 6. Maseni spektri kolhicina



Slika 7. LC-MS hromatogrami kolhicina

REZULTATI

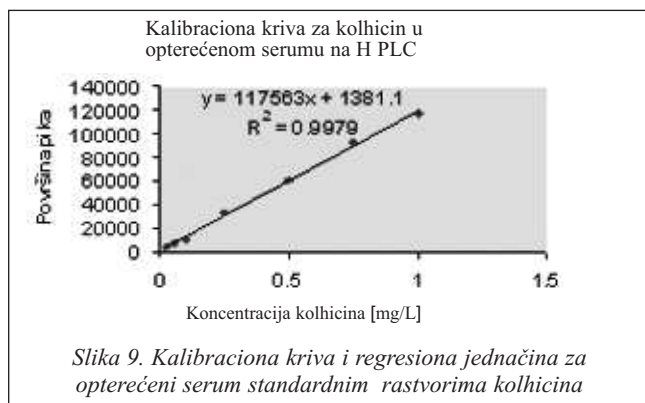
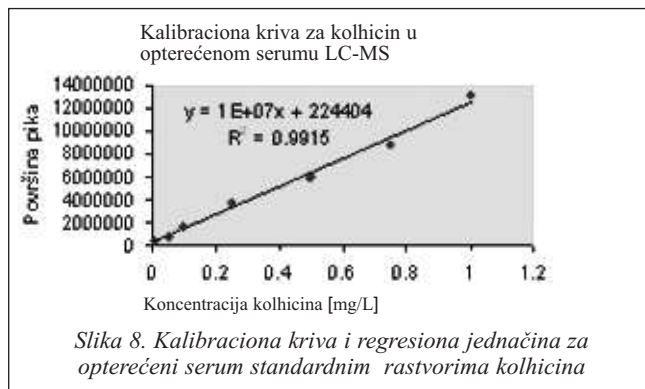
Uvedene su metode HPLC/PDA-MS za dokazivanje i određivanje kolhicina u biološkom materijalu.

Na slikama 4-5 prikazani su hromatogram i UV spektar kolhicina u uzorku urina koji se poklapa sa UV spektrom iz

biblioteke spektara.

Na slikama 6-7 prikazani su hromatogrami i MS spektri kolhicina selektovani na jone 400,1 i 358,1.

Metoda je validovana i linearna u rasponu 20-1000 ng/mL ($r^2 > 0,99$). Granica detekcije je 10ng/mL, a limit kvantifikacije je 20ng/L sa prinosom od 68,5 – 74,2%. Korišćenjem veće zapremine uzorka od 5ml možemo postići



LOD i LOQ 2 i 4 ng/ml.

Kalibracione krive za kolhicin su konstruisane metodom najmanjih kvadrata, sa srednjim vrednostima površine pika za svaku koncentraciju, korišćenjem programa Excel 5. Istim programom su izračunati koeficijenti korelacije (r) i jednačina prave $y = a \pm bx$.

Na slikama 8-9 prikazane su kalibracione krive kolhicina na HPLC i LC-MS.

Primenom uvedenih metoda, izvršena je analiza uzorka krvi i urina. HPLC-PDA metodom kolhicin je dokazan samo u uzorku urina u koncentraciji od 150 ng/mL, čiji je UV i maseni spektar potvrđen.

Prikaz slučaja trovanja kolhicinom

U aprilu 2009. godine, bračni par 60-godišnjaka boravio je u vikend kući nedaleko od grada u kojem žive. U želji da napravi salatu od biljke „divlji luk“ – (*Allium ursinum* L.), supruga je ubrala biljku za koju je verovala da je „divlji luk“ i napravila salatu.

Nakon 2 sata javile su se mučnine, povraćanje i obilne prolivaste stolice. Odmah se javila lekaru, koji je posle sprovedene infuzione terapije otpustio na dalje kućno lečenje. Sledećeg dana više nije bilo prolivastih stolica ali su se mučnina i jaki bolovi u trbuhu održavali. Drugog dana nakon ingestije primljena je u Intenzivnu negu, Klinike za Infektivne bolesti u gradu kojem živi, gde je nastavljeno sa intenzivnim lečenjem. Kako se stanje pacijentkinje i pored sprovedenih mera lečenja stalno pogoršavalo, a dobijen je podatak o ingestiji nepoznate biljke, pacijentkinja je upućena na dalje lečenje u Kliniku za urgentnu i kliničku toksikologiju, Centra za kontrolu trovanja.

U večernjim satima u našu Kliniku je primljena 60-godišnja žena sa jakim bolovima u trbuhu i mučninom.

Na prijemu je svesna, orijentisana, afebrilna, eupnoična, bledje kože, 16 respiracija u minuti, TA 120/80 mmHg, puls

oko 80/min, suvog i obloženog jezika. Na plućima se čuju retki pukoti, parakardijalno desno. Trbuh meteorističan, napet, difuzno bolno osetljiv. U laboratorijskim analizama beleže se normalne vrednosti crvene loze upadljiv pad leukocita na 1.09×10^9 i trombocita na $36,3 \times 10^9$. U bi-hemijskim analizama nema većih odstupanja osim povišenih vrednosti ureje na 25.2 mmol/l, i transaminaza : AST 557 IU/L i ALT 76 IU/L. Toksikološkim analizama u urinu je dokazano prisustvo KOLHICINA 150 ng/mL, tramadola 4650 ng/mL (iz terapije) i ranitidna 8970 ng/mL (iz terapije).

Na osnovu anamneze, kliničke slike i učinjenih ispitivanja zaključeno je da se kod pacijentkinje radilo o akcidentalnom trovanju biljnim alkaloidom-kolhicinom iz biljke „jesenji mrazovac“ (*Colchicum autumnale*). Trovanje je bilo teškog stepena i manifestovalo se gastrointestinalnom simptomatologijom, razvojem agranulocitoze i teškom miopatijom, a komplikovalo sepsom, akutnom respiratornom insuficijencijom i flebotrombozom dubokih vena leve noge.

Pacijentkinja je otpuštena iz Klinike nakon 45 dana lečenja i upućena u zdravstvenu ustanovu u mestu u kojem živi radi daljeg lečenja i rehabilitacionog tretmana.

DISKUSIJA

U navedenom slučaju trovanja kolhicin je određen samo u uzorku urina i to u koncentraciji 150 ng/mL. U uzorku krvi nije dokazano njegovo prisustvo što se objašnjava brzom eliminacijom kolhicina ($T_{1/2} = 20$ min.)⁽³⁾ i dugim proteklim vremenom od ingestije do prijema uzorka (30 h).

Osetljivost metode može biti glavni kriterijum za metod određivanja kolhicina jer se ovaj preparat nalazi u niskim terapeutskim i toksičnim koncentracijama. Terapijska koncentracija u plazmi iznosi od 0,5-2,4 ng/mL, a smrtonosna 60 ng/mL. Primena tehnike tačne hromatografije sa PDA i MS detekcijom je od velikog značaja u urgentnim i sudsko-medicinskim analizama. Metoda je validovana i linearna u rasponu 20-1000 ng/mL ($r^2 > 0,99$). Granica detekcije je 10ng/mL, a limit kvantifikacije je 20ng/L sa prinosom od 68,5 – 74,2%. Korišćenjem veće zapremine uzorka od 5ml možemo postići LOD i LOQ 2 i 4 ng/ml.

Tečno-tečna ekstrakcija sa hloroformom je brza i jednostavna za određivanje alkaloida u uzorcima. U radovima je prikazana tečno-tečna ekstrakcija sa dihlormetanom (pH 8-9,6) čiji je prinos 69,5-74,9%. (4,7,8) i u skladu je sa našim rezultatima. Detekcija kolhicina, izvršena veoma osetljivom tehnikom gasne hromatografije sa MS-MS detekcijom linearna je u opsegu 0,5-50 ng/mL ($r^2 > 99$), sa limitom detekcije 0,05-0,1 ng/mL, limitom kvantifikacije 0,5 ng/mL. (4,7,8)

U literaturi su prikazane brojne publikacije trovanja kolhicinom sa smrtnim ishodom koja su kategorisana u slučajna trovanja, zabune usled konzumiranja biljke, samoubistva i neadekvatne doze u terapiji.⁽⁷⁾

ZAKLJUČAK

Određivanje koncentracije kolhicina u uzorcima je značajno u urgentnoj toksikologiji zbog slučajnih trovanja koja su kod nas retka, kao i u sudskoj medicini. Postupak pripreme je jednostavan a detekcija na HPLC-MS-PDA je precizna i specifična kojom se mogu pratiti gornje terapijske i toksične koncentracije. Ova tehnika je razvijena za screening toksikološki značajnih jedinjenja u biološkom

Apstrakt

U radu je opisan prikaz slučaja zadesnog trovanja kolhicinom i njegove teške kliničke slike. Pacijentkinja je pojela salatu od lišća biljke mrazovac (*Colchicum autumnale* L) koja je vrlo slična "divljem luku" (*Allium ursinum* L.). Alkaloid je određen tehnikom tečne hromatografije sa UV detektorom koji apsorbuje u UV oblasti od 190-400 nm (HPLC-PDA) i potvrđen tehnikom tečne hromatografije sa masenom spektrometrijom (LC-MS) gde su podaci prikupljeni u pozitivnom režimu ES+, opseg masa m/z 100-450. Kolhicin je izolovan iz plazme i urina tečno-tečnom ekstrakcijom u hloroformu pri pH 9,6 sa zadovoljavajućim prinosom ekstrakcije. Razdvajanje je postignuto na koloni Symmetry® C8 sa mobilnom fazom acetonitril : natrijum dihidrogen fosfat 50 mM pH 3,6 u gradijent modu i na koloni XTerra® RP18 sa mobilnom fazom: 5 mM amonijum acetat (pH 3,5) : acetonitril sa 0,1% sirćetnom kiselinom. Metoda je validovana u krvi i linearna je u rasponu 20-1000 ng/mL ($r^2 > 0,99$). Granica detekcije je 10 ng/mL, a limit kvantifikacije je 20 ng/mL. Zbog svoje dobre osetljivosti HPLC-PDA-MS je pouzdana tehnika.

LITERATURA

1. Boye, O.; Brossi, A. *The Alkaloids*; Brossi, A., Cordell, G.A., Eds.; Academic Press: New York, 1992; Vol. 41, 125-178.
2. *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material*. 3 Edition, 2004. London, Pharmaceutical press 848-849.
3. C. V.Clevenger, T.F. August and L.M. Shaw. *Colchicine poisoning: report of a fatal case with body fluid analysis by GC-MS and histopatologic rxamination of postmortem tissues*. J. Anal. Toxicol 15; 151-154 (1991).

4. E. Abe, ASL Hurtel, C Duverneuil, I Etting, E. Guillot, P Mazancourt, JC Alvarez: *A novel LC-ESI-MS-MS method for sensitive quantification of colchicines in human plasma: application to case reports*. J Anal Toxicol 2006; 30: 210-215.
5. G.R. Jones, P.P. Singer, and B. Bannach. *Application of LC-MS analysis to a colchicine fatality*. J. Anal. Toxicol 2002; 26(6):365-9.
6. N. Kovačević. *Osnovi farmakognozije* Srpska školska knjiga. (2002).
7. M Chèze, M Deveaux, G Pèpin: *Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of colchicines in postmortem*

body fluids Case reports of two fatalities and revive of the literature. J Anal Toxicol 2006; 30:593-598.

8. P.Kintz, C. Jamey, A. Tracqui, and P.Mangin. *Colchicine poisoning: report of fatal case and presentation of an HPLC procedure for body fluid and tissue analyses* J. Anal. Toxicol 21: 70-72 (1997).