

Dextromethorfan en Dextrorfan in urine m.b.v. Triple Quad LC/MS.

Henk Trumpie
Laboratorium Apotheek Haagse Ziekenhuizen

Inleiding

In het kader van verslavingszorg, workplace testing, medische keuringen of ten behoeve van penitentiaire inrichtingen verricht het AHZ-LAB onderzoek naar de aan-/afwezigheid van drugs. De drugsscreeningen in urine worden in de AHZ uitgevoerd met de Architect C8000 van Abbott. Daarnaast hebben we een drugsscreeningsmethode op de LC/MS om vals positieve en vals negatieve resultaten van de Architect te achterhalen (opiaten, amfetaminen/ecstasy, cocaïne en methadon). De LC/MS drugsscreeningsmethode wordt ook ingezet voor drugs en verwante stoffen in urine waar geen immuno assay voor aanwezig is, b.v. Khat (cathinone, norefedrine en norpseudoefedrine), LSD, ketamine, fenfluramine, mephedrone, buprenorfine, cotinine en methylfenidaat.

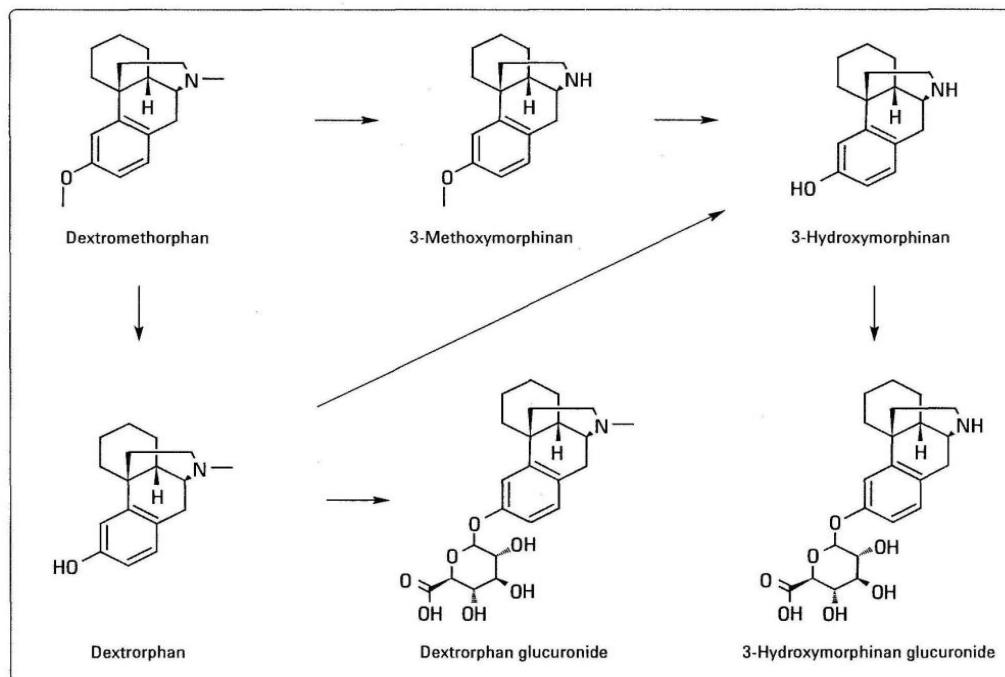
Medio 2010 is door een centrum voor jeugd-GGZ de vraag gesteld of wij dextromethorfan en de metaboliet dextrorfan in urine kunnen bepalen.

In dit centrum worden kinderen en jongeren van 0 tot en met 22 jaar met psychische problemen behandeld. Er zijn jongeren die mogelijk tientallen tabletten/capsules dextromethorfan (Darolan®, hoestpikkel dempend) gebruiken met als doel om gewicht te verliezen. De dextromethorfan stroop wordt i.v.m. de aanwezige suikers vermeden.

Dextromethorfan wordt ook wel als partydrug gebruikt, waarbij de effecten te vergelijken zijn met ecstasy, namelijk euforie, hallucinaties en vervreemding van de werkelijkheid [1,2].

Dextromethorfan wordt gemetaboliseerd naar dextrorfan (O-demethylering) en 3-methoxymorphinan (N-demethylering). Deze metabolieten worden gemetaboliseerd naar 3-hydroxymorphinan (N-O-dimethylering). Dextrorfan en 3-hydroxymorphinan worden ook als glucuroniden uitgescheiden [2,3]. Zie figuur 1.

Met dextromethorfan kan de enzymactiviteit van CYP2D6 worden vastgesteld om snelle en trage metaboliseerders te onderscheiden. Hierbij wordt gekeken in urine naar de verhouding dextromethorfan en zijn metaboliet dextrorfan. Bij een trage metaboliseerder komt veel vrije dextromethorfan in de urine voor in tegenstelling tot een snelle metaboliseerder waar dextromethorfan voornamelijk als dextrorfan/dextrorfanglucuronide wordt uitgescheiden [2,3].



Figuur 1. Metabolisme dextromethorfan.

Dextromethorfan en zijn metabolieten zijn in urine minimaal 9 maanden bij -20°C, minimaal 24 uur bij kamertemperatuur en 3 vries/dooi cycli stabiel [4].

Dextromethorfan heeft grote structuur overeenkomsten met codeïne, mogelijk dat dextromethorfan crossreactiviteit geeft op de immuno assay opiaten analyse. Zie kader blz

Bij LC/MS is de grootste valkuil ionsuppressie. Ionsuppressie is het verstoren van de ionisatie van de te bepalen component in de interface door andere componenten (bv. endo- en exogene stoffen), die tegelijkertijd met de te bepalen component elueren. Het achterblijven van het signaal is ionsuppressie. Het toenemen van het signaal is ionenhancement.

Bij een semi-kwantitatieve analyse met een beperkt aantal monsters voeren wij een ionsuppressietest uit.

Dit is een 1 punts standaard additie methode. Aan een patiëntmonster wordt een hoeveelheid standaard toegevoegd, in de verhouding patiënt:standaard=3:1. De gevonden concentratie voor dit monster moet liggen tussen de 80 en 120 % t.o.v. de theoretische concentratie.

De bestaande drugsscreeningsmethode op de LC/MS is de uitgangsmethode voor het opzetten van dextromethorfan en dextrorfan in urine. De monstervoorbewerking en de chromatografie worden voor een groot deel overgenomen.

Bij de analyse wordt zowel naar de vrije componenten gekeken (dextromethorfan en dextrorfan) als naar de totale concentratie dextrorfan (=vrije dextrorfan + dextrorfanglucuronide). Voor het bepalen van de totale concentratie dextrorfan zal de urine worden gehydrolyseerd.

Reagentia en standaarden

LC/MS eluens A: 0,1% mierenzuur en 5% acetonitril in 10 mM ammoniumformiaat

LC/MS eluens B: 0,1% mierenzuur in acetonitril

Alle chemicaliën zijn van MS kwaliteit, afkomstig van Biosolve BV.

Interne standaard chloorhaloperidol ca. 8 ng/ml water, bij een groot aantal analyses wordt chloorhaloperidol als interne standaard gebruikt omdat het niet als geneesmiddel voorkomt.

Natriumacetaat buffer 1 M, pH 5,0

Glucuronidase, Sigma G-8885

Blanco urine

QC monster (is een oud positief patiëntmonster)

Dextromethorfan HBr H_2O ($\text{C}_{18}\text{H}_{25}\text{NO}$ HBr H_2O): Sigma D-2531

molwt dextromethorfan HBr H_2O : 370,3, molwt base 271,4

Dextrorfan tartraat ($\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{NO}$ $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_6$): Sigma D-127

molwt dextrorfan tartraat: 407,5, molwt base 257,4

Bereiding standaarden

Weeg af ca. 10 mg dextromethorfan HBr in 50,0 ml methanol (=stock 1).

Weeg af ca. 10 mg dextrorfan tartraat in 50,0 ml methanol (=stock 2).

Verdun 1,0 ml stock 1 + 1,0 ml stock 2 naar 50,0 ml met methanol:water=1:1 (werkoplossing).

Standaard 1: 15 μl werkoplossing + 985 μl blanco urine (ca. 40 $\mu\text{g/l}$ per component).

Standaard 2: 100 μl werkoplossing + 900 μl blanco urine (ca. 270 $\mu\text{g/l}$ per component).

Instrumentatie en chromatografische condities

LC: Agilent Technologies 1290 Infinity (binaire pomp/ontgasser, injector met thermostaat, kolomthermostaat)

Kolom: Zorbax SB-C₁₈: 2,1 x 30 mm, 1,8 μm deeltjes.

Gradient:

t=0 min, 0% B; t=6 min, 42% B; t=6,1 min, 90% B; t=8 min, 90% B; t=8,1 min, 0% B; t=11 min, 0% B.

Flow: 0,3 ml/min

Injector: 8°C

Kolomthermostaat: 50°C

Injectievolume: 1 μl (voorbewerking zonder hydrolyse), 2 μl (voorbewerking met hydrolyse)

retentietijden dextrorfan: 2,95 min

dextromethorfan 4,58 min

chloorhaloperidol 5,88 min

MS: Agilent Technologies 6460 Triple Quad LC/MS met ESI interface

In onderstaande tabel staan de belangrijkste parameters voor de MS.

	Dextrorfan	Frag in V	CE in V	Dextro- methorfan	Frag in V	CE in V	Chloor- haloperidol	Frag in V	CE in V
Precursor (amu)	258,2	135		272,2	125		392,0	130	
Quantifier (amu)	157,1		40	128,0		72	138,9		40
Qualifier (amu)	128,0		72	171,2		40	181,0		20
Ratio	65			80			81		

Precursor: geladen molekuulion in atomaire massa unit (amu)

Quantifier: product ion met de hoogste respons in amu

Qualifier: product ion met de een na hoogste respons in amu

Ratio: (respons qualifier/respons quantifier)x 100 %,

Frag in V = Fragmentor voltage in V: is de optimale spanning waarbij zoveel mogelijk precursor ionen in het eerste massa filter (= 1^{ste} quadrupool) komen.

CE in V = Collision energy in V: is de optimale spanning waarbij zoveel mogelijk product ionen uit de precursor worden gevormd in de botsingscel (= 2^{de} quadrupool)

Dwelltime is de tijd dat er naar 1 transitie (=overgang) wordt gekeken, voor alle transities is de dwelltime 30 ms, dit geeft ca. 40 data punten per piek, waardoor de piek goed wordt beschreven.

De eerste 2 minuten van een run wordt het eluens verworpen, vervolgens wordt er geschakeld naar de MS.

ESI interface:

Er wordt gewerkt in de + mode, gas temperatuur 350°C, gas flow 9 l/min, druk 20 psi, sheath gas temperatuur 300°C, sheath gas flow 11 l/min, capillary 2000 V (is de spanning tussen inlaat interface en inlaat MS, in de + mode staat hier een negatieve potentiaal over).

Methode

Werkwijze vrije dextromethorfan en vrije dextrorfan in urine:

Pipetteer in autosampler vial 50 µl standaard 1, standaard 2, QC monster, blanco urine en patiëntmonster (duplo).

Om op ionsuppressie te testen: pipetteer 37,5 µl patiëntmonster + 12,5 µl standaard 2 in een autosampler vial.

Voeg 1,0 ml interne standaard toe aan alle vials en meng. Injecteer 1 µl op de LC/MS.

Werkwijze totaal dextromethorfan/dextrorfan in urine (som vrije en gebonden component):

Hydrolyse: pipetteer 250 µl standaard 1, standaard 2, QC monster, blanco urine en patiëntmonster (duplo) in glazen extractiebuisen. Voeg 250 µl natriumacetaat buffer pH 5,0 en 25 µl glucuronidase toe, sluit de buis en meng. Hydrolyseer 2 uur bij 60°C.

Centrifugeer 10 minuten bij 3500 rpm (= 2530 g).

Pipetteer 50 µl van de heldere bovenlaag in een autosampler vial.

Om op ionsuppressie te testen pipetteer 37,5 µl patiëntmonster + 12,5 µl standaard 2 in een autosampler vial.

Voeg 1,0 ml interne standaard toe aan alle vials en meng. Injecteer 2 µl op de LC/MS.

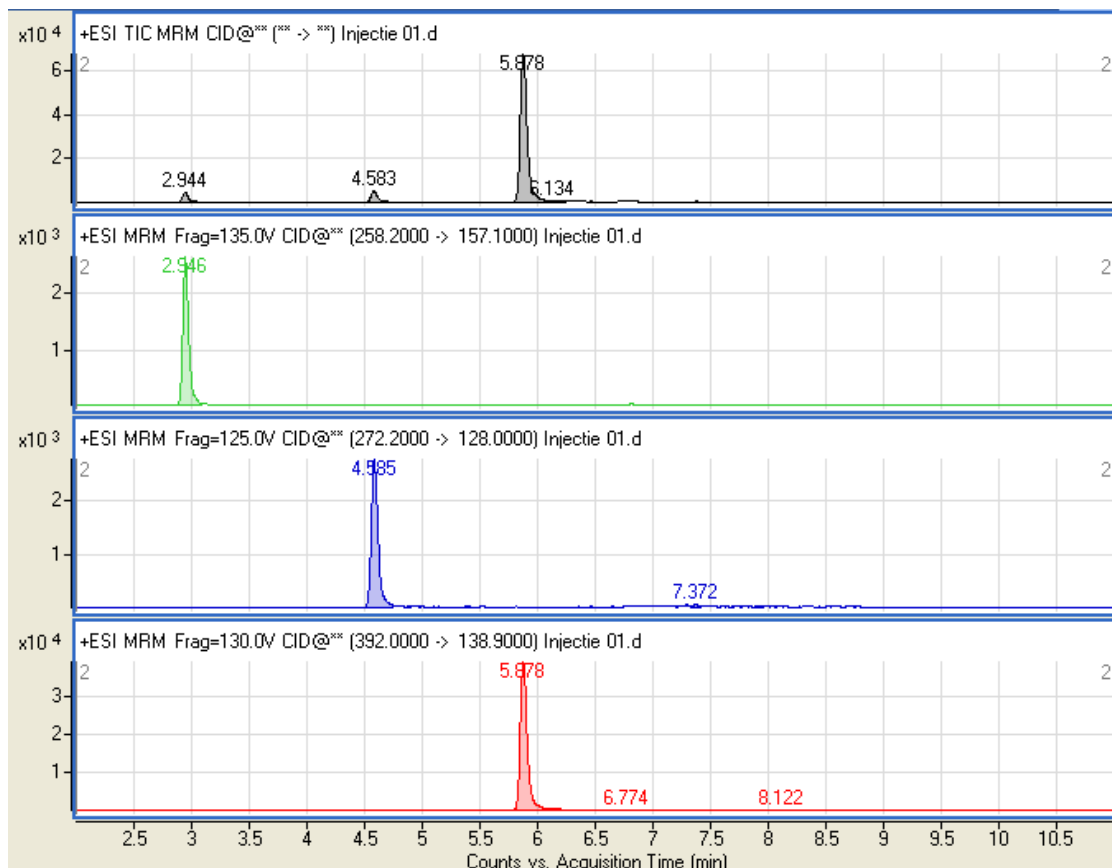
De creatinineconcentratie in de urinemonsters wordt bepaald op de Architect (Abbott) om te controleren of er niet is geknoeid met de urine.

De kalibratielijn wordt berekend op oppervlakte met de kleinste kwadratenmethode (model: $y = b + mx$).

Er wordt zonder weegfactor gewerkt en de oorsprong wordt als punt in de berekening meegenomen, omdat de kalibratie uit slechts 2 punten bestaat.

Discussie en resultaten

In onderstaande chromatogrammen is standaard 1 na hydrolyse weergegeven. Concentraties dextromethorfan 47 µg/l, dextrorfan 37 µg/l. Van boven naar beneden: het TIC chromatogram (total ion chromatogram), de quantifier overgangen van respectievelijk dextrorfan, dextromethorfan en chloorhaloperidol.



In totaal zijn 10 monsters geanalyseerd. Patiënt 2 is 7 keer gescreend op dextromethorfan/dextrorfan. In onderstaande tabel de resultaten van de analyse.

monster	vrij dextromethorfan in µg/l	vrij dextrorfan in µg/l	totaal dextromethorfan in µg/l	totaal dextrorfan in µg/l
pat 1	3500	5400	3400	47500
pat 2-1	< 10	< 10	< 10	< 10
pat 2-2	< 10	< 10	< 10	< 10
pat 2-3	290	5000	330	50000
pat 2-4	14500	12000	15500	84000
pat 2-5	7500	25000	8000	114000
pat 2-6	60	2400	65	23000
pat 2-7	470	7400	500	49000
pat 3	15000	3000	16000	17000
pat 4	<10	<10	<10	10

Er worden bij de patiënten soms hoge concentraties dextromethorfan/dextrorfan gemeten. Range dextromethorfan 0–16000 µg/l, range vrije dextrorfan 0–25000 µg/l en range totaal dextrorfan 0–114000 µg/l.

De vraag of iemand dextromethorfan heeft gebruikt is bij 7 van de 10 monsters zonder hydrolyse met ja te beantwoorden.

Bij 3 monsters is hydrolyse nodig, waarbij in de urine van patiënt 2-1 en patiënt 2-2 geen dextromethorfan/dextrorfan wordt aangetoond. De urine van patiënt 4 is net positief, namelijk 10 µg/l aan totaal dextrorfan.

De ondergrens van 10 µg/l kan omlaag wanneer lagere standaarden worden genomen en eventueel de werkwijze wordt aangepast (minder verdunnen en/of meer injecteren).

De concentraties van vrij en totaal dextromethorfan zijn zoals verwacht nagenoeg hetzelfde.

Dextromethorfan wordt alleen in de vrije vorm uitgescheiden, er vindt geen binding plaats met glucuronzuur. De verschillen in concentraties van vrij en totaal dextromethorfan worden veroorzaakt door de spreiding in de analyse.

Crossreactiviteit dextromethorfan/dextrorfan op de immuno assay drugsscreeningen op de Architect?

Volgens de bijsluiters van de Architect geeft dextromethorfan de volgende crossreactiviteiten: opiaten <0,3%; amfetamine <0,1%; ecstasy niet getest; cocaïne <0,2%; methadon <0,12%; benzodiazepinen <0,02% en cannabis <0,002%.

In de urinemonsters van patiënt 1, 2-3 t/m 2-7, 3 en 4 is een volledige drugsscreening uitgevoerd op de Architect (urinemonsters zijn niet gehydrolyseerd).

In onderstaande tabel de resultaten van de creatinine bepaling en de opiaten screening.

monster	creatinine in mmol/l	opiaten in µg/l
pat 1	3,1	72
pat 2-3	6,5	67
pat 2-4	18,0	134
pat 2-5	7,9	209
pat 2-6	13,9	39
pat 2-7	2,8	79
pat 3	3,1	34
pat 4	21.9	0

M.u.v. de opiaten zijn alle drugsscreeningen negatief (ruim onder de cut-off waarden). Bij de opiaten meten we bij patiënt 2-5 209 µg/l (cut-off opiaten 200 µg/l). Het is dus niet uit te sluiten dat dextromethorfan en de metabolieten een positieve opiaten uitslag op de immuno assay kunnen geven, maar de concentratie dextromethorfan en metabolieten moet dan wel erg hoog zijn. Er lijkt een verband te bestaan tussen de gemeten opiaten concentratie op de Architect en de totale dextrorfan concentratie. Dextrorfan is mogelijk verantwoordelijk voor de crossreactiviteit op de opiaten screening op de Architect, maar de crossreactiviteit is wel laag nl. ca. 0,2%.

In de urinemonsters is de creatinine akkoord, er is niet geknoeid met de urine.

Conclusie

De vraag of iemand dextromethorfan heeft gebruikt is snel en eenvoudig met deze LC/MS analyse in urine te beantwoorden.

Literatuur:

1. Geneesmiddelenbulletin, Potentieel misbruik van dextromethorfan bevattende hoestmiddelen, december 2005; 39(12), 142-143.
2. Patrick D. Perkins, Identification of dextromethorphan metabolites in urine, Application Note, Agilent Technologies.
3. Aiming Yu and Robert L. Haining, Comparative contribution to dextromethorphan bij cytochrome P450 isoforms in vitro: can dextromethorphan be used as a dual probe for both CYP2D6 and CYP3A activities? Drug metabolism and disposition 29: 1514-1520.
4. Vengurlekar S.S., Heitkamp J., McCush F., Velagaleti P.R., Brison J.H., Bramer S.L., A sensitive LC-MS/MS assay for the determination of dextromethorphan and metabolites in human urine. J Pharm Biomed Anal, 2002 aug 22;30(1): 113-124.