

Schmerzmittelmissbrauch im Visier

Bild: istock/dtiraos



Wenn es um die Extraktion von Drogen- und Arzneimittelwirkstoffen geht, kommt meist die klassische Festphasenextraktion (SPE) zum Einsatz. Eine SPE-Variante, namentlich die Disposable Pipette Extraction (DPX), verspricht eine höhere Effizienz und einen geringeren Lösungsmittelverbrauch.

Von Guido Deußing

Im Jahr 2017 starben laut US-amerikanischer Gesundheitsbehörde CDC (Centers for Disease Control and Prevention) in den USA 70.237 Menschen an einer Überdosis Drogen. In 47.699 Fällen (68 Prozent) führte die missbräuchliche Einnahme von Opioiden den Tod herbei. Gemeint ist nicht zwangsläufig Heroin, das bekannteste halbsynthetische Opioid, gewonnen aus Morphin, das im getrockneten Saft (Opium) des Schlafmohns enthalten ist. Maßgeblichen Anteil hatten Opioid-Analgetika, also Medikamente wie Fentanyl, Oxycodon und Tramadol, die zur Behandlung starker und chronischer Schmerzen eingesetzt werden, wie sie etwa bei Krebserkrankungen auftreten. Opioid-Analgetika werden, wie die Untersuchung tödlich verlaufender Drogenmissbrauchsfälle ergab, häufig zusammen mit Heroin konsumiert [1].

Die in den USA ermittelten Opioid-bedingten Todesfälle erweisen sich als Spitze eines eklatanten Opioid-Missbrauchs. Die Zahl der tatsächlich von Opioiden Abhängigen dürfte weitaus größer sein. Die CDC sprechen gar von einer Opioid-

Epidemie, die in den USA grassiere, gefördert durch eine allzu leichtfertige Handhabung bei der ärztlichen Vergabe Opioid-haltiger Medikamente, wie Medienberichte mutmaßen [2-4]. Mit einer umfangreichen Aufklärungskampagne versuchen die CDC, auf die Gefahren des Opioid-Konsums hinzuweisen [5].

Mehrwert der dispersiven Extraktion

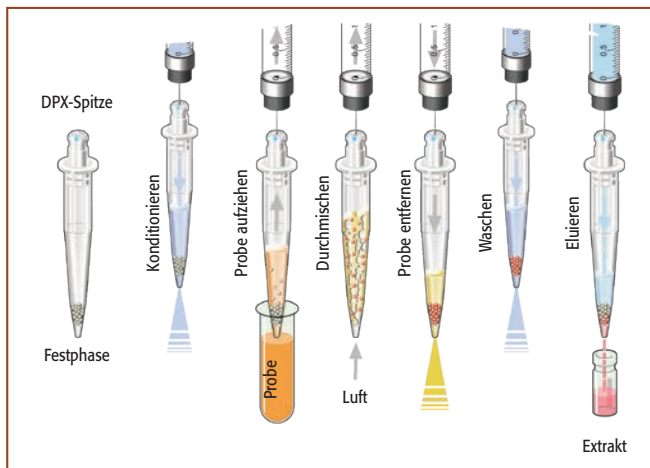
Auch aus forensisch-toxikologischer Sicht stellt der Missbrauch von Opioiden respektive deren Nachweis eine Herausforderung dar – einerseits wegen der Vielzahl am

Markt verfügbarer Präparate, andererseits aufgrund der Probenvorbereitung, die ihrer analytischen Bestimmung vorausgeht. Applikationsexperten der in Linthicum im US-Bundesstaat Maryland ansässigen GERSTEL, Inc. haben sich der Herausforderung gestellt und eine vollständig automatisierte LC-MS/MS-basierte Analysenmethode entwickelt, die es erlaubt, unterschiedlichste Opiode



Foto: GERSTEL

MPS-robotic^{pro} mit DPX-Option und ^mVAP in Kombination mit einem HPLC-QQQ-MS-System, verwendet für die Bestimmung unterschiedlicher Opiode in Urin.



Grafische Darstellung der DPX.

schnell, effizient, sicher, sensitiv und auf komfortable Art und Weise in Urin zu bestimmen [6].

Ihre Methode unterscheidet sich von gängigen Vorgehensweisen insbesondere hinsichtlich der Art, wie die Analyten hydrolysiert und extrahiert würden: Statt der klassischen Festphasenextraktion über gepackte Säulen wenden Foster et al. die Disposable Pipette Extraction (DPX) an. Bei der DPX handelt es sich um eine SPE-Variante, bei der das Sorbens nicht gepackt vorliegt, sondern innerhalb einer Pipettenspitze frei beweglich ist. Dadurch wird beim Extraktionsvorgang, initiiert durch das Ansaugen der Probenflüssigkeit in die Pipettenspitze, einerseits der Stoffaustausch mit der flüssigen Probe um ein Vielfaches beschleunigt, andererseits ist auch das benötigte Probenvolumen deutlich geringer. Diese Aspekte, verbunden mit der Möglichkeit, den Analysenablauf einschließlich Probenvorbereitung, Chromatographie und Detektion intelligent zu automatisieren, ließen Foster et al. die DPX als Verfahren der Wahl erscheinen.

Erfolgreiche Automatisierung

Es bedarf einer Vielzahl unterschiedlicher Probenvorbereitungsschritte, bevor sich durch die Analyse von Urin qualitative wie quantitative Rückschlüsse auf die konsumierten Opiode ziehen lassen. Am Anfang steht die enzymatische Hydrolyse der Analyten aus ihrer konjugierten Form (Glucuronide) in die molekulare Ausgangsform. Als Biokatalysator dient hierbei β -Glucuronidase; das Enzym ist in der Lage, mehrere Drogenklassen innerhalb von 30 Minuten mit hoher Leistung, sicher und reproduzierbar zu hydrolysieren, insofern pH-Wert, Temperatur und Einwirkdauer richtig eingestellt und gut aufeinander abgestimmt sind, berichten Foster et al.

Um schließlich noch die geforderten niedrigen Detektionsgrenzen für die jeweiligen Drogenverbindungen und ihre Metaboliten zu erreichen, sind störende Matrixbestandteile, etwa Salze, zu entfernen, wie sie in Urin natürlicherweise vorhanden sind oder im Zuge der Hydrolyse als Nebenprodukte anfallen können.

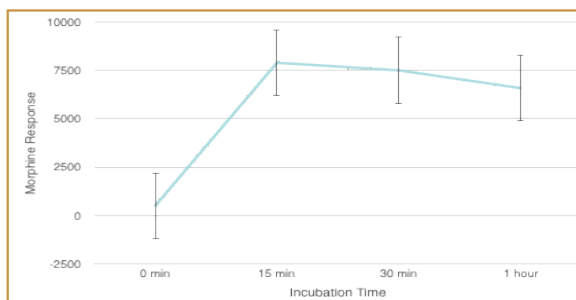
Zur Vorbereitung und Aufgabe der Urinproben verwendeten Foster et al. einen MultiPurposeSampler (GERSTEL-MPS). Das System in der Ausführung „ro-

botic^{PRO4} war für die vollständig automatisierte Durchführung der DPX sowie weitere Probenvorbereitungsschritte ausgestattet, u. a. mit einer MultiPositionEvaporation-Station (GERSTEL-^mVAP) zwecks Eindampfens der Proben und Lösungsmittelwechsels. Für die Analyse setzten Foster et al. ein online gekoppeltes Agilent-1260-HPLC-System, eine Poroshell-120-EC-C18-Säule (3,0 x 50 mm, 2,7 mm; Agilent Technologies) und ein Triple-Quadrupol-Massenspektrometer (QQQ-MS) mit Jet-Stream-Elektrospray-Quelle (Agilent Ultivo) ein. Die Methodenentwicklung erfolgte unter Einsatz realer Urinproben, die mit einer Masterlösung aus unterschiedlichen Opioiden dotiert waren. Bei den eingesetzten Wirkstoffen handelte es sich vornehmlich um Analgetika, die zum Teil dem hiesigen Betäubungsmittelgesetz (BtMG) unterliegen, namentlich Buprenorphin, Codein, Fentanyl, Furanylfentanyl, Hydrocodon, Hydromorphon, Meperidin, Methadon, Morphin, Norbuprenorphin, Norfentanyl, Oxycodon, Oxymorphin, Sufentanil und Tramadol. Als interne Standards wurden deuterierte Analoga von Morphin, Norbuprenorphin, Tramadol, Buprenorphin, Meperidin, Fentanyl, Norfentanyl und Methadon verwendet, die als Lösung in einer Methanol-Wasser-Mischung (1:9) angesetzt waren.

Fokus auf die Durchführung

Die Bestimmung von Opioiden mittels LC/MS- oder GC/MS-Verfahren ist Routine und soll daher an dieser Stelle nur gestreift werden. Anders die Probenvorbereitung, die unter Einsatz der DPX automatisiert auf dem GERSTEL-MPS, sprich einem gängigen Probenvorbereitungsroboter, erfolgt. Gesteuert wird der MPS mittels GERSTEL-MAESTRO-Software, die sich in diverse Chromatographie-Softwareprogramme integrieren lässt. Für die Analyse verwendeten Foster et al. Urinproben von jeweils 250 μ L Volumen, die zunächst von Hand in saubere 2-mL-Autosamplervials pipettiert und mit magnetischen Kappen für den späteren Transport im Autosampler verschlossen wurden, der die weitere Probenvorbereitungssequenz (Prep-Sequenz) vollständig automatisiert durchführt:

Hydrolyse: Der MPS fügt der Urinprobe 135 μ L der oben genannten Masterlösung hinzu. Anschließend wird das Vial zur ^mVAP-Station bewegt, wo die Probe 30 Minuten bei 55 °C inkubiert und bei 250 U/min durchmischt wird. Danach überführt der MPS 250 μ L der hydrolysierten



Bildung von Morphin aus Morphin-6 β -D-Glucuronid in Abhängigkeit von der Hydrolysezeit.

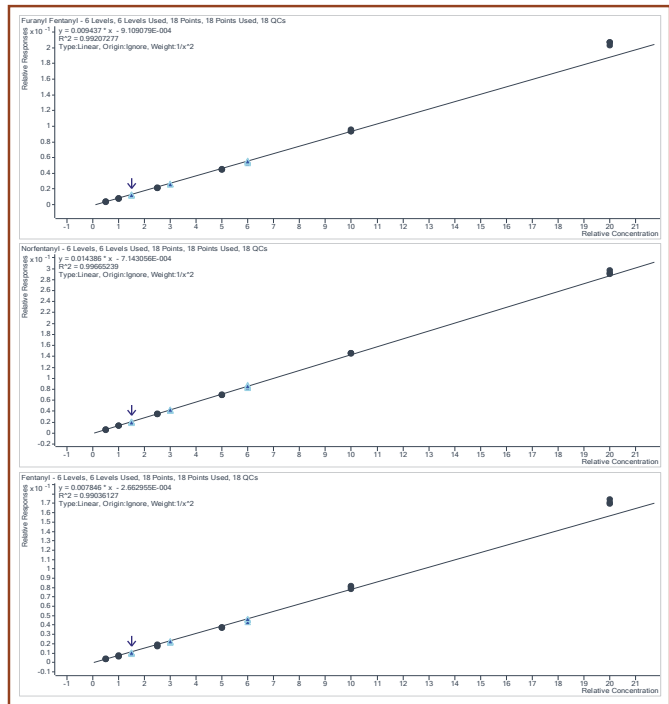
Urinprobe in ein sauberes, leeres, oben offenes Shell-Vial, fügt 100 µL einer zweiprozentigen Ameisensäure-Lösung in Wasser sowie 125 µL Acetonitril hinzu. Der Roboter zieht die Probe in eine leere Pipettenspitze, durchmischt sie durch Ansaugen von Luft und gibt sie zurück ins Vial. **DPX-Extraktion:** Der MPS konditioniert eine DPX-CX-Spitze mit 500 µL einer 30-prozentigen Acetonitril-Wasser-Lösung, saugt die gesamte hydrolysierte Urinprobe an und mischt Probe und Sorbens dispersiv durch Ansaugen von Luft. Die Probe wird 30 Sekunden equilibriert und in das Shell-Vial dispensiert. Die Extraktion der hydrolysierten Urinprobe wird wiederholt. Der MPS wäscht das DPX-CX-Sorbens mit 500 µL einer zehnpromzentigen Acetonitril-Wasser-Lösung, dann mit der gleichen Menge reinen Acetonitrils. Die Analyten werden aus dem DPX-CX-Sorbens eluiert unter Einsatz von 750 µL einer Lösung aus Methylenchlorid, Isopropylalkohol und Ammoniumhydroxid (78:20:2). Das Eluat wird in einem sauberen 2-mL-Autosamplervial aufgefangen, die DPX-CX-Spitze wird in der Waste-Station entsorgt und 600 µL des Eluats werden in ein sauberes und leeres 2-mL-Autosamplervial, das mit einer magnetischen Kappe versehen ist, transferiert.

Eindampfen: Der MPS transportiert das Vial mit dem Eluat in die ^mVAP-Station, wo es bei 55 °C, 100 mbar und 250 U/min für die Dauer von zehn Minuten bis zur Trockene eingedampft wird. Die Aufnahme und Mischung des Rückstands erfolgt mit 250 µL einer 0,05-prozentigen ameisen-säuren Lösung, bestehend aus 5 mM Ammoniumformiat (A) und Methanol (B) in einem Mischungsverhältnis von 90:10. Anschließend transportiert der MPS das Vial zurück auf seine Ursprungsposition. Es folgt die Injektion von 2 µL ins HPLC-System, das auf eine Flussrate von 0,5 mL/min eingestellt ist und mit einem Eluentengradienten von A und B betrieben wird. Die Säulentemperatur beträgt 55 °C. Das QQQ-MS wird im positiven Ionenmodus (ESI) betrieben.

Blick auf das Ergebnis

Zur Bestimmung der optimalen Bedingungen für die Hydrolyse variierten Foster et al. die Dauer der Inkubation (0, 15, 30 und 60 Minuten). Sie verwendeten Urinproben, die mit jeweils 150 ng/mL Morphin-6β-D-Glucuronid dotiert waren. Nach 15 Minuten Inkubation zeigte das resultierende Morphin einen Maximalwert. Um sicherzustellen, dass alle Opiode vollständig und reproduzierbar hydrolysiert werden, wählten Foster et al. eine Inkubationszeit von 30 Minuten. Die Applikationsexperten schreiben, die Quantifizierungsgrenzen für alle Analyten hätten um den Faktor zwei niedriger gelegen als verlangt. Die lineare Regressionsanalyse habe für alle mit dieser Methode analysierten Opiode R²-Werte von 0,99 oder größer ergeben. Die Richtigkeit der Messung betrug für alle Analyten im Durchschnitt 95,2 Prozent, die Präzision bzw. die relative Standardabweichung (RSD) im Schnitt 3,9 Prozent.

Die hier beschriebene Methode erweise sich nicht allein in Bezug auf US-amerikanische Verhältnisse als beachtlich effizient, sondern auch mit Blick auf die Entwicklungen hierzulande, sagt GERSTEL-Applikationsexperte



Repräsentative Kalibrationsgeraden von Fentanyl, Norfentanyl und Furanyl-fentanyl.

Dr. Oliver Lerch vom Stammsitz des Unternehmens in Mülheim an der Ruhr: „Zwei Drittel der tödlich verlaufenen Drogenmissbrauchsfälle in Deutschland lassen sich laut ‚Drogen- und Suchtbericht 2018‘ auf die Einnahme opioidhaltiger Substanzen zurückführen.“ Zugleich hätten auch polyvalente Vergiftungen unter Beteiligung von Opioiden zugenommen [1], was den Einsatz leistungsstarker Analysemethoden in der forensischen Toxikologie rechtfertige. Auch für die Bestimmung von Opioiden aus der Matrix Serum habe das Unternehmen in Zusammenarbeit mit dem Institut für Rechtsmedizin der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf eine vollständig automatisierte SPE-GC/MS-Methode entwickelt [7, 8], berichtet Dr. Oliver Lerch.

Referenzen

- [1] Die Drogenbeauftragte der Bundesregierung: Drogen- und Suchtbericht 2018. <http://bit.ly/2KgEire>
- [2] Adelheid Müller-Lissner: Fluch und Segen von Schmerzmitteln. Tagesspiegel, 23. 1. 2018, <http://bit.ly/2WlaZVb>
- [3] Katharina Kort: Pharmafirmen sollten die Kosten für die US-Opioid-Epidemie tragen. Handelsblatt, 10. 3. 2019, <http://bit.ly/2WN3BmA>
- [4] Opioidkrise. Wikipedia, <http://bit.ly/2FidTFc>
- [5] Opioid Overdose. CDC Injury Center, <http://bit.ly/2KjK0sn>
- [6] Fredrick D. Foster, John R. Stuff, Jacqueline Whitecavage: Automated Hydrolysis, Extraction and Determination of Opioids in Urine using a Novel Robotic Autosampler and LC-MS/MS Platform. GERSTEL Application Note No. 199/2018, <http://bit.ly/2lbK0Ix>
- [7] Oliver Lerch, Oliver Temme, Thomas Daldrup, Comprehensive Automation of the SPE-GC/MS Analysis of Opioids, Cocaine and Metabolites from Serum and Other Matrices, GERSTEL Application Note 7/2013, <http://bit.ly/2lpxLbk>
- [8] Oliver Lerch, Oliver Temme und Thomas Daldrup, Comprehensive automation of the solid phase extraction gas chromatographic mass spectrometric analysis (SPE-GC/MS) of opioids, cocaine, and metabolites from serum and other matrices, Analytical and Bioanalytical Chemistry 18 (2014) 4443-4451, <http://bit.ly/2kdmNww>