

ZASTOSOWANIE METODY IMMUNOFLUORESCENCJI W ŚWIETLE SPOLARYZOWANYM (FPIA) I METOD CHROMATOGRAFICZNYCH DO ANALIZY P-METOKSYAMFETAMINY (PMA) I P-METOKSYMETFAMETAMINY (PMMA) W MOCZU I MATERIALE NIEBIOLOGICZNYM

Dariusz Blachut¹, Bogdan Szukalski²,

Agnieszka Siwińska-Ziółkowska³, Emilia Widecka³

¹Zakład Kryminalistyki i Chemii Specjalnej Urzędu Ochrony Państwa

²Zakład Neurochemii Instytutu Psychiatrii i Neurologii w Warszawie

³Katedra i Zakład Medycyny Sądowej Akademii Medycznej w Warszawie

WSTĘP

W latach 90. na rynku narkotykowym w USA i w Europie Zachodniej, a także w Polsce, pojawiło się wiele nowych substancji psychoaktywnych pochodnych fenyloizopropylaminy (amfetaminy) i fenyloetyloaminy (9). W tym okresie Polska zyskała nie dobrą sławę jednego z najpoważniejszych nielegalnych producentów amfetaminy wytwarzanej różnymi metodami przez liczne zakonspirowane laboratoria. Znaczna część tej produkcji była i jest przemycana poza granice Polski, głównie do Niemiec i Szwecji. Oprócz amfetaminy wytwarzana jest metamfetamina, a także dwie ich pochodne: 3,4-metylenodioksyetyloamfetamina (MDE, Eve) oraz 3,4-metylenodioksymetamfetamina (MDMA, Ecstasy).

Konsekwencją rozpowszechniania amfetaminy i jej pochodnych jest zwiększająca się liczba zgonów spowodowanych przedawkowaniem tych narkotyków. Z 39 przypadków intoksykacji narkotykami ze skutkiem śmiertelnym, badanych w latach 1999-2000 (do maja włącznie) przez Zakład Medycyny Sądowej AM w Warszawie, blisko połowa (18 przypadków) była wynikiem stosowania związków z grupy amfetamin.

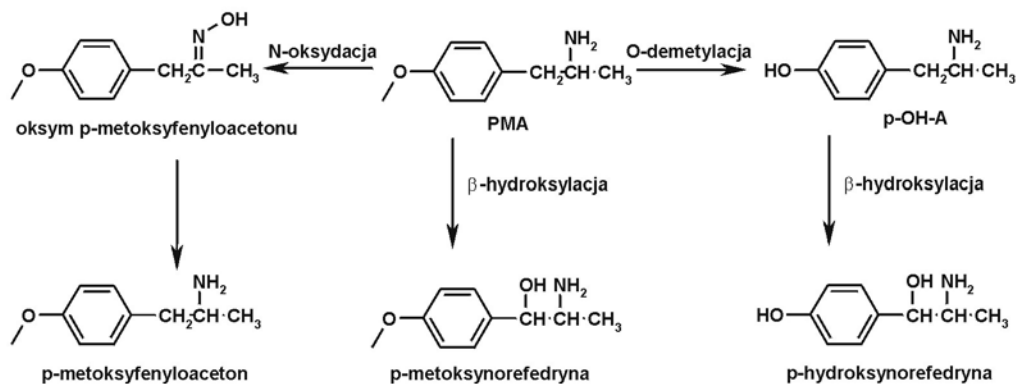
Objęcie kontrolą pojawiających się na rynku narkotyków oraz prekursorów i odczynników używanych do ich produkcji skłania chemików pracujących w nielegalnych laboratoriach do poszukiwania nowych psychoaktywnych pochodnych fenyloizopropylaminy o zmodyfikowanej strukturze i podobnym lub silniejszym działaniu. Wynikiem tej swoistej rywalizacji między prawodawcą, obejmującym kontrolą nowe pochodne pojawiające się na rynku narkotykowym, a chemikami opracowującymi syntezę nowych pochodnych na potrzeby nielegalnego rynku narkotykowego, jest pojawianie się coraz to nowych analogów amfetaminy i metamfetaminy, określanych często mianem „narkotyków zmodyfikowanych” (ang.: *designer drugs*). Lista tych narkotyków jest długa (9). Struktura i własności oraz metody rozdziału i identyfikacji niektórych z nich były przedmiotem artykułów opublikowanych w kwartalniku *Alkoholizm i Narkomania* (2, 15). W niniejszym opracowaniu chcielibyśmy zwrócić uwagę na dwa połączenia, które w ostatnim okresie pojawiły się na polskim rynku narkotykowym w postaci tabletek zawierających również amfetaminę i efedrynę. Są to p-metoksyamfetamina (PMA) i p-metoksymetamfetamina (PMMA). W Gdańsku, w drugiej połowie 2000 r., odnotowano 9 przypadków śmiertelnych zatruc po spożyciu tabletek występujących na nielegalnym rynku pod nazwą UFO, w których skład wchodziły PMA i PMMA (10,17). W tym samym roku trzy osoby uległy śmiertelnemu zatruciu tabletkami z logo „Mitsubishi” i „E”

zawierającymi p-metoksyamfetaminę (11). Habrat i wsp. (7) w artykule pod sugestywnym tytułem „Z UFO w zaświaty” opisali niebezpieczne właściwości p-metoksyamfetaminy oraz zagrożenia związane z jej stosowaniem. Na rynku pozaeuropejskim PMA nie jest nowością, gdyż w latach 70. była ona w Kanadzie przyczyną 9 śmiertelnych zatruc (3), a w latach 90. spowodowała 10 śmiertelnych zatruc w Australii (8). W marcu 2000 r. na przedmieściach Chicago doszło do śmiertelnego zatrucia kilku osób po użyciu nabytych na czarnym rynku tabletek z logo „Mitsubishi”, których głównym składnikiem była PMA. W tym samym czasie do toksykologicznych laboratoriów w stanie Illinois trafiały tabletki z takim samym logo, które sprzedawano na ulicach. Zawierały one PMMA lub mieszaninę PMMA i PMA (4). Efekty wywierane przez te narkotyki wyraźnie się od siebie różnią. PMMA ma działanie podobne do MDMA i zbliżoną toksyczność, podczas gdy PMA przypomina raczej amfetaminę, ale jest od niej znacznie bardziej toksyczna. Z danych policji wynika, że narkotyki te sprzedawane są często jako Ekstazy (3,4-metylenodioxymetamfetamina, MDMA) lub jej substytut (14).

Niebezpieczną cechą obu narkotyków jest mała różnica między dawką skuteczną, tj. wywołującą efekty oczekiwane przez biorcę, a dawką śmiertelną. Np. „efektywna” dawka PMA wynosi 0,75 mg/kg, tj. 52 mg dla osoby o wadze 70 kg, a śmierć może nastąpić już po przyjęciu 140 mg.

Tak więc osoby przyjmujące PMMA w dawkach, w jakich brały MDMA, mogą uzyskać oczekiwane efekty, natomiast biorcy PMA, pragnąc uzyskać efekty zbliżone do tych, jakie wywoływała MDMA, przyjmują zwykle kilka porcji w krótkich odstępach czasu, przekraczając śmiertelną dawkę narkotyku (5). U osób przyjmujących PMA obserwowano hipertermię przekraczającą 42°C, znaczny wzrost ciśnienia krwi (240/130), hiperwentylację (130-150), przyspieszenie tętna do 140 uderzeń na minutę, silne pobudzenie motoryczne, skurcze mięśni, zlewne poty, drgawki, szczękocisk i zatrzymanie akcji serca. Związek ten wykazuje również działanie halucynogenne pięciokrotnie silniejsze od meskaliny (1,8).

PMMA zsyntetyzowano po raz pierwszy w 1938 roku, ale jej właściwości farmakologiczne były przez wiele lat nieznanne. Później pojawiła się na rynku narkotykowym jako substytut MDMA, gdyż podobnie jak Ekstazy ma umiarkowane właściwości halucynogenne i jest stymulatorem ośrodkowego układu nerwowego. PMMA wywołuje wyraźne zmniejszenie stężenia serotoniny i kwasu 5-hydroksyindolooctowego w wielu regionach mózgu oraz zmniejszenie liczby miejsc wiążących serotoninę. Jednak jej neurotoksyczność wobec układu serotonergicznego, tj. zdolność do nieodwracalnego uszkodzenia neuronów serotonergicznnych, nie jest tak duża jak np. chloroamfetaminy (PCA). O ile w pochodnych niepodstawionych w pierścieniu N-metylacja bardzo wyraźnie nasila neurotoksyczność (np. amfetamina – słabe działanie neurotoksyczne, a metamfetamina – silne), to w parametoksy pochodnych nie obserwuje się takiego wpływu N-metylacji (brak wyraźnej różnicy w neurotoksyczności PMA i PMMA) (6).



Ryc.1. Przemiany p-metoksyamfetaminy (PMA) w organizmie ludzkim. p-OH-A = p-hydroksyamfetamina.

Szlak metaboliczny PMA w organizmie ludzkim obejmuje proces oksydacyjnej dezaminacji do p-metoksyfenyloacetonu poprzez związek pośredni o strukturze oksymu. W procesie β -hydroksylacji łańcucha bocznego w cząsteczce PMA powstaje p-metoksynorefedryna, a β -hydroksylacja p-hydroksyamfetaminy prowadzi do p-hydroksynorefedryny. Głównym metabolitem jest p-hydroksyamfetamina (p-OH-A), powstająca w wyniku O-demetylacji grupy p-metoksylowej do odpowiedniego fenolu. Metabolity te wydalane są w moczu przeważnie w postaci glukuronianów. Na uwagę zasługują p-OH-A i p-hydroksynorefedryna, gdyż wykazują pewną aktywność biologiczną (4) (ryc.1).

Metaboliczne przemiany PMMA w organizmie żywym nie były dotąd przedmiotem szczegółowych badań, ale pewne wnioski dotyczące ich przebiegu można wyciągnąć z wyników uzyskanych dla orto-izomeru tego związku – N,a-dimetylo-o- -metoksyfenetylaminy (metoksyfenamina, Orthoxine-Upjohn) (12, 13). Podobnie jak w przypadku PMA ważnym szlakiem metabolicznym PMMA jest O-demetylacja z utworzeniem p-hydroksymetamfetaminy (p-OH-MA) oraz N-demetylacja przekształcająca PMMA w PMA.

Wykrywanie amfetaminy i metamfetaminy w materiale biologicznym (najczęściej w moczu) nie jest obecnie trudne, gdyż dysponujemy szeregiem prostych w wykonaniu, gotowych testów, jak test płytkowy Ontrak (Hoffmann-La Roche), test paskowy Frontline (Boehringer Mannheim), oraz metoda immunofluorescencji w świetle spolaryzowanym FPIA (Abbott), pozwalająca nie tylko wykrywać obecność amfetaminy i jej pochodnych, ale również określić przybliżone stężenie amfetamin w badanej próbce. Brak natomiast prostych, specyficznych metod wykrywania psychoaktywnych analogów amfetaminy i metamfetaminy, m.in. PMA i PMMA. Ponieważ podstawowym narzędziem analitycznym w większości polskich laboratoriów toksykologicznych jest metoda FPIA, ważne wydaje się sprawdzenie jej przydatności do wykrywania przynajmniej niektórych narkotyków zmodyfikowanych, zwłaszcza pojawiających się ostatnio na polskim rynku narkotykowym PMA i PMMA. Odpowiedź na to pytanie wymaga ustalenia, w jakim stopniu związki te reagują z przeciwciałami testu skalibrowanego przez producenta na amfetaminę. Wysoka reaktywność krzyżowa metoksyanalogów amfetaminy z przeciwciałami testu amfetaminowego dawałaby podstawę do wykorzystania metody FPIA w skryningu próbek moczu na występowanie tych analogów. Przy małej reaktywności wykrycie związku tą metodą nie jest możliwe. Wówczas konieczne jest zastosowanie innych metod, bardziej czasochłonnych i wymagających kosztownej aparatury, jak wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC), chromatografia gazowa (GC) oraz chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas (GC/MS).

MATERIAŁ I METODY

Wzorce amfetaminy (A), metamfetaminy (MA), α -fenyloetyloaminy, 3,4-metylenodioksyamfetaminy (MDA), 3,4-metylenodioksymetamfetaminy (MDMA), 3,4-metylenodioksyetyloamfetaminy (MDE) i p-metoksyamfetaminy (PMA) pochodziły z firmy Sigma (St. Louis, MO, USA). Pozostałe substancje wzorcowe, tj. p-metoksymetamfetaminę (PMMA), p-hydroksyamfetaminę (p-OH-A), p-hydroksymetamfetaminę (p-OH-MA) oraz p-hydroksyetyloamfetaminę (p-OH-EA) otrzymano na drodze syntezy metodą redukcyjnego aminowania odpowiedniego ketonu chlorowodorkiem alkiloaminy (lub octanem amonu) wobec cyjanoborowodoru sodowego (NaCNBH_3), a następnie O-demetylację aminy za pomocą kwasu bromowodorowego. Otrzymane aminy oczyszczano metodą destylacji próżniowej i wytrącano w postaci chlorowodorków suchym chlorowodorem w układzie izopropanol : eter dietylowy (1:1).

Rozpuszczalniki, substraty do syntezy oraz inne odczynniki pochodziły z firm Merck, Lancaster oraz Sigma i używane były bez dodatkowego oczyszczenia.

Badanie struktury

Strukturę otrzymanych związków potwierdzano metodą chromatografii gazowej sprzężonej z detekcją mas (GC-MS) oraz metodą spektrometrii w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR)

Wodne roztwory substancji wzorcowych (1 mg/ml) alkalizowano 10% roztworem węgla sodowego (100 μ l) i ekstrahowano chloroformem (1 μ l). Warstwę organiczną po suszeniu bezwodnym Na_2SO_4 używano do analizy metodą GC-MS.

Derywatywacja narkotyków

Ekstrakt wzorca (100 μ l), tabletki (100 μ l) lub moczu (500 μ l) odparowywano w temperaturze 40°C w strumieniu azotu. Do pozostałości dodawano 400 μ l bezwodnika kwasu pentafluoropropionowego (PFPA) i ogrzewano w temperaturze 120°C przez 15 minut. Nadmiar PFPA usuwano w strumieniu azotu, a pozostałość (olej lub sucha pozostałość) rozpuszczano w 400 μ l octanu etylu i 1 ml tak otrzymanego roztworu podawano na kolumnę chromatograficzną.

Pomiary reaktywności krzyżowej PMA, PMMA, MDA, MDE, p-OH-A i p-OH-MA wykonywano za pomocą analizatora TDx metodą immunofluorescencji w świetle spolaryzowanym przy użyciu zestawu TDx do oznaczania amfetaminy i metamfetaminy w moczu (16). Związki te przygotowano w postaci roztworów metanolowych o stężeniu 1 mg/ml (w postaci wolnej zasady), a następnie dodawano do „czystego” moczu (pH 5-8), aby uzyskać stężenia 50, 100, 200, 500, 1000, 1500 i 2000 ng/ml. Sporządzając wykresy zależności krzyżowej, stężenia dodane odkładano na osi odciętych, a stężenia odczytane – na osi rzędnych.

Do rozdziału i identyfikacji narkotyków w moczu i materiale niebiologicznym zastosowano technikę GC-MS używając chromatograf gazowy HP 6890 sprzężony z detektorem mas HP 5973 oraz chromatograf gazowy Agilent 6850 z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (FID). Do analizy ilościowej stosowano chromatograf gazowy HP 5890 serii II z detektorem FID wyposażony w autostrzykawkę HP 6890 Series Injector. Typ kolumny kapilarnej oraz warunki analizy chromatograficznej podano przy opisie chromatogramów.

Materiałem użytym do weryfikacji opracowanej metodyki był mocz 23-letniego mężczyzny zmarłego nagle, prawdopodobnie w wyniku intoksykacji narkotykiem oraz znalezione przy denacie fragmenty tabletki o barwie czerwonej. Materiał pochodził z Zakładu Medycyny Sądowej AM w Warszawie.

Mocz: do 1 ml moczu dodawano 40 μ l 20% roztworu wodorotlenku sodowego i ekstrahowano 10 ml cykloheksanu. Warstwę organiczną odparowywano w strumieniu azotu. Suchą pozostałość poddawano derywatywacji za pomocą PFPA. Po usunięciu nadmiaru reagenta pozostałość rozpuszczano w 400 μ l octanu etylu i analizowano metodą GC-MS (objętość nstrzyku $V = 1\mu$ l).

Fragmety tabletki znalezione przy denacie rozcierano i 10-15 mg proszku rozpuszczano w 1 ml wody zawierającej standard wewnętrzny – chlorowodorek p-metoksypropyloamfetaminy w stężeniu 5 mg/ml, alkalizowano dodając 80 ml 25% amoniaku i otrzymany roztwór ekstrahowano 1 ml octanu etylu.

Roztwory kalibracyjne, zawierające siarczan amfetaminy (od 0,5 do 2 mg), chlorowodorek efedryny (od 0,5 do 3 mg), chlorowodorek p-metoksyamfetaminy (od 1 do 8 mg) oraz chlorowodorek p-metoksymetyloamfetaminy (od 1 do 8 mg) otrzymano rozpuszczając odważone substancje wzorcowe w 1 ml wody zawierającej standard wewnętrzny – chlorowodorek p-metoksypropyloamfetaminy w stężeniu 5 mg/ml. Roztwory po zalkalizowaniu (80 μ l 25% amoniaku) ekstrahowano octanem etylu (1 ml). Przed analizą chromatograficzną ekstrakty suszono bezwodnym Na_2SO_4 . Użyto krótką kolumnę kapilarną z fazą niepolarną SE-30, 10m x 0,32mm x 0,25 μ m. Oznaczenie prowadzono w warunkach izotermicznych $t=140^\circ\text{C}$. Gazem nośnym był hel, ciśnienie na czole kolumny wynosiło 25 kPa. Dozowanie prowadzono w opcji dzielenia (ang.: *split*) 100:1, objętość nstrzyku 1 μ l. Całkowity czas pojedynczej analizy nie przekraczał 2,5 minuty.

Do wyznaczenia prostych kalibracyjnych a następnie obliczenia zawartości analitów w próbce badanej i próbce kontrolnej wykorzystano pakiet HP GC ChemStation Rev.A.06.03 Software.

W celu scharakteryzowania metody wykonano test powtarzalności oznaczenia (w obrębie serii pomiarów wykonanych jednego dnia). Materiałem badanym była próbka kontrolna o zawartości amfetaminy, efedryny, PMA i PMMA zbliżonej do tej, jaką obserwowano w przypadku badanego fragmentu tabletki. Próbkę kontrolną otrzymano poprzez zmieszanie odpowiednich ilości chlorowodorów PMA, PMMA i efedryny oraz siarczanu amfetaminy z laktozą. Zawartość pochodnych amfetaminy w tak otrzymanej próbce wyniosła: amfetamina 1,2 %; efedryna 4,7 %; PMA 18,8 %; PMMA 12,6 % (w przeliczeniu na wolne zasady).

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Na ryc. 2 przedstawiono wykresy obrazujące reaktywność krzyżową PMA, PMMA, MDA i MDE – psychoaktywnych analogów amfetaminy i metamfetaminy oraz p-OH-A i p-OH-MA – głównych metabolitów amfetaminy, metamfetaminy, PMA i PMMA – z przeciwciałami amfetaminowego testu TDx.

Największe wartości reaktywności krzyżowej otrzymano dla PMMA i MDA (odpowiednio 150% i 100% dla stężenia 500 ng/ml). Test amfetaminowy TDx mógłby więc być użyty do wykrywania tych związków w moczu, w którym nie ma innych związków reagujących z przeciwciałami testu. W obecności takich połączeń otrzymany wynik będzie wypadkową reaktywności krzyżowej każdej z pochodnych. Wyraźną, chociaż znacznie niższą reaktywność krzyżową wykazują hydroksylowe metabolity p-OH-A i p-OH-MA (odpowiednio 40% i 60% dla stężenia 500 ng/ml). Oznacza to, że w przypadku braku w badanym moczu związków macierzystych metabolity te mogą być wykryte za pomocą testu TDx. Natomiast reaktywność krzyżowa PMA i MDE wobec przeciwciał testu amfetaminowego jest bardzo niska (zaledwie 20% dla stężenia 500 ng/ml), a więc praktycznie nie można ich wykryć metodą FPIA.

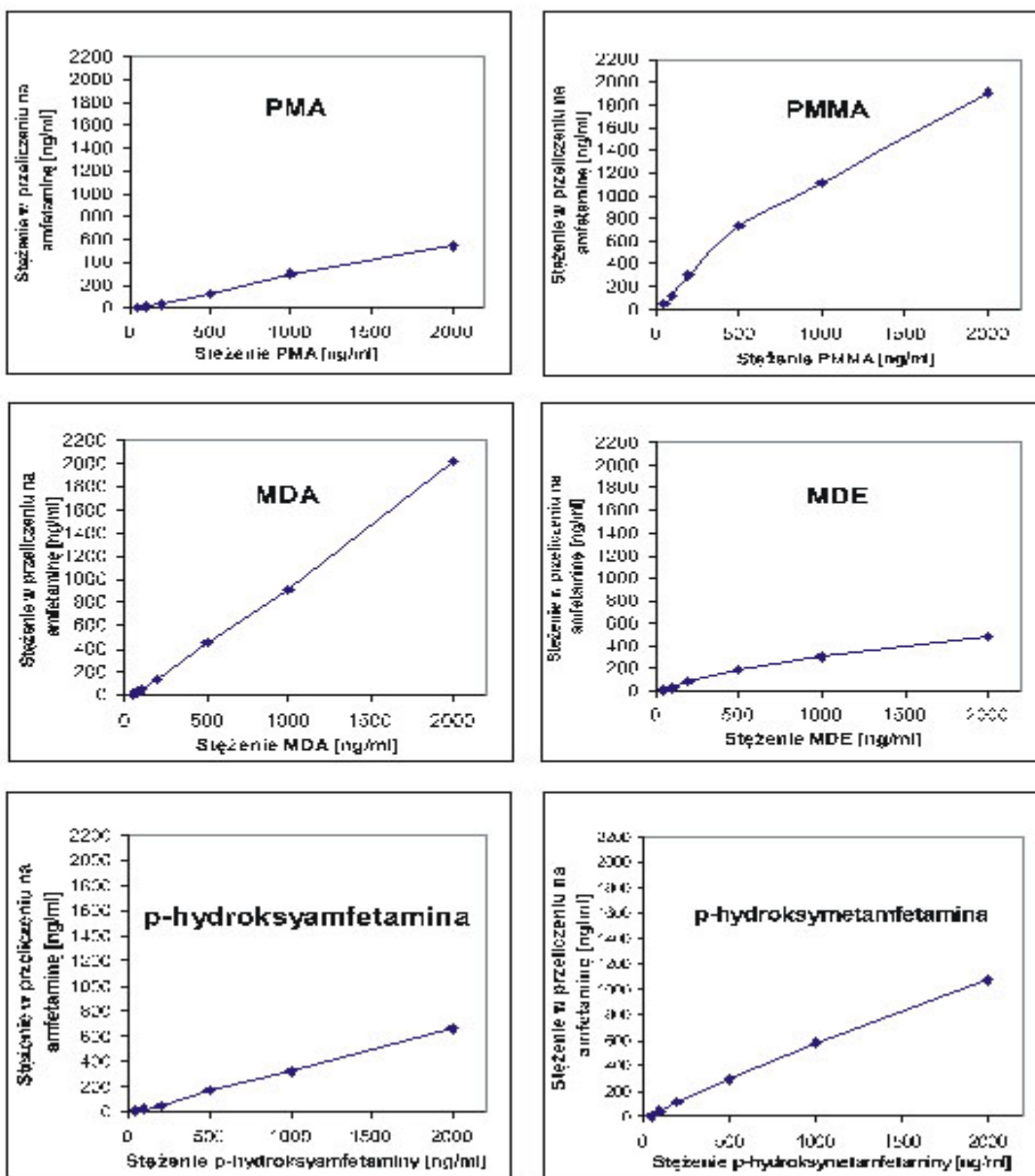
Ryc. 3A przedstawia chromatogram uzyskany metodą GC mieszaniny 11 psychoaktywnych pochodnych amfetaminy i metamfetaminy. Zawiera on oprócz PMA, PMMA i ich metabolitów – p-OH-A i p-OH-MA, także amfetaminę, metamfetaminę, MDA, MDE, MDMA, p-OH-EA i α -fenyloetyloaminę – związki obecne na polskim rynku narkotykowym i mogące się znaleźć, obok PMA i PMMA, w badanym materiale biologicznym.

Z 11 składników mieszaniny, dobrze oddzielone piki uzyskano dla α -fenyloetyloaminy, amfetaminy, metamfetaminy, PMA i MDE, natomiast pary związków: PMMA i p-OH-A, MDA i p-OH-MA oraz MDMA i p-OH-E nie rozdzielały się w sposób zadowalający. Zastosowano więc derywatyzację mieszaniny analitów PFPA i otrzymane pochodne analizowano metodą GC. Uzyskano 11 dobrze rozdzielonych pików, pozwalających zidentyfikować poszczególne narkotyki (ryc. 3B).

Opracowaną metodykę rozdziału i identyfikacji psychoaktywnych pochodnych amfetaminy i metamfetaminy zastosowano do badania moczu osoby zmarłej w wyniku przedawkowania narkotyków oraz znalezionych przy denacie fragmentów tabletki. Wstępna analiza moczu i tabletek wykonana za pomocą testów barwnych, metodą FPIA i chromatografii cienkowarstwowej wykazała w obu przypadkach obecność związków z grupy amfetaminy. Wyniki badania moczu za pomocą metody GC-MS z rejestracją wybranych jonów (SIM) po derywatywacji ekstraktu bezwodnikiem kwasu pentafluoropionowego, przedstawia ryc. 4. Zidentyfikowano PMA, PMMA, amfetaminę i efedrynę, które na chromatogramie tworzą rozdzielone piki. Metoda derywatywacji umożliwiła dobrą separację efedryny i PMA, które bez przekształcenia w pochodne nie ulegały rozdzielaniu. Rejestrowano następujące grupy jonów: PFP - amfetamina (m/z 190, 118, 91), PFP-efedryna (m/z 204, 160, 119), PFP-PMA (m/z 311, 148, 121) i PFP-PMMA (m/z 325, 204, 148).

Ryc. 5A przedstawia chromatogram ekstraktu fragmentu tabletki bez derywatywacji. W tym przypadku rozdział PMA i efedryny jest niezadowalający. Natomiast po derywatywacji ekstraktu otrzymano na chromatogramie cztery bardzo dobrze oddzielone piki pentafluoropochodnych amfetaminy, efedryny PMA i PMMA. (ryc. 5B).

Do analizy ilościowej opracowano warunki rozdziału na kolumnie kapilarnej zawierającej fazę niepolarną (SE-30). Otrzymano rozdział związków na tyle zadowalający, aby można było oznaczyć



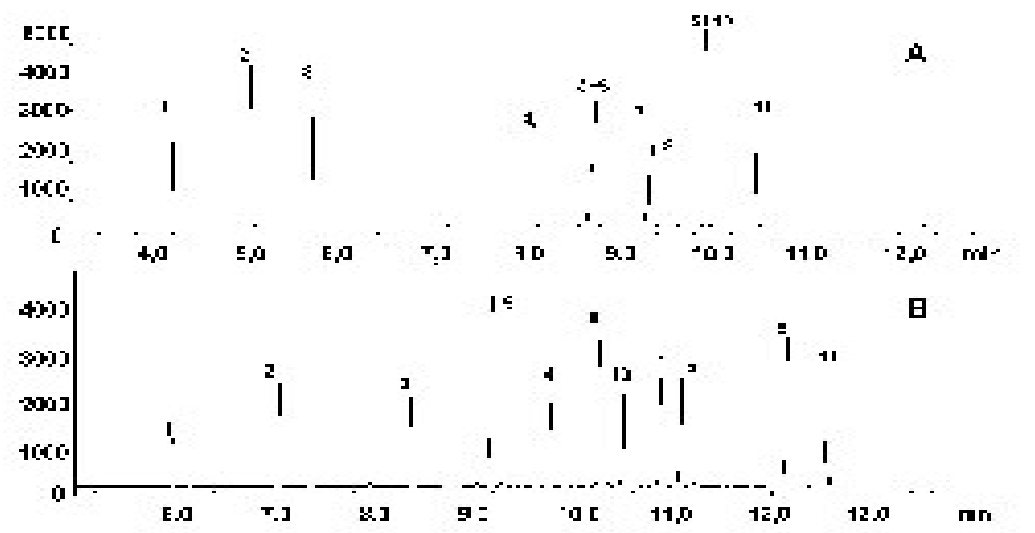
Ryc. 2. Reaktywności krzyżowe psychoaktywnych analogów amfetaminy oraz ich metabolitów z przeciwciałami testu amfetaminowego TDx. Oś x – stężenie dodane; oś y – stężenie znalezione.

wszystkie cztery składniki. Ich zawartość (w przeliczeniu na wolną zasadę) w badanych fragmentach tabletek wynosi: PMA – 16%, PMMA – 13 %, efedryny – 4%, amfetaminy – 1 %. Vehiculum tabletek stanowiła mieszanina skrobi i laktozy.

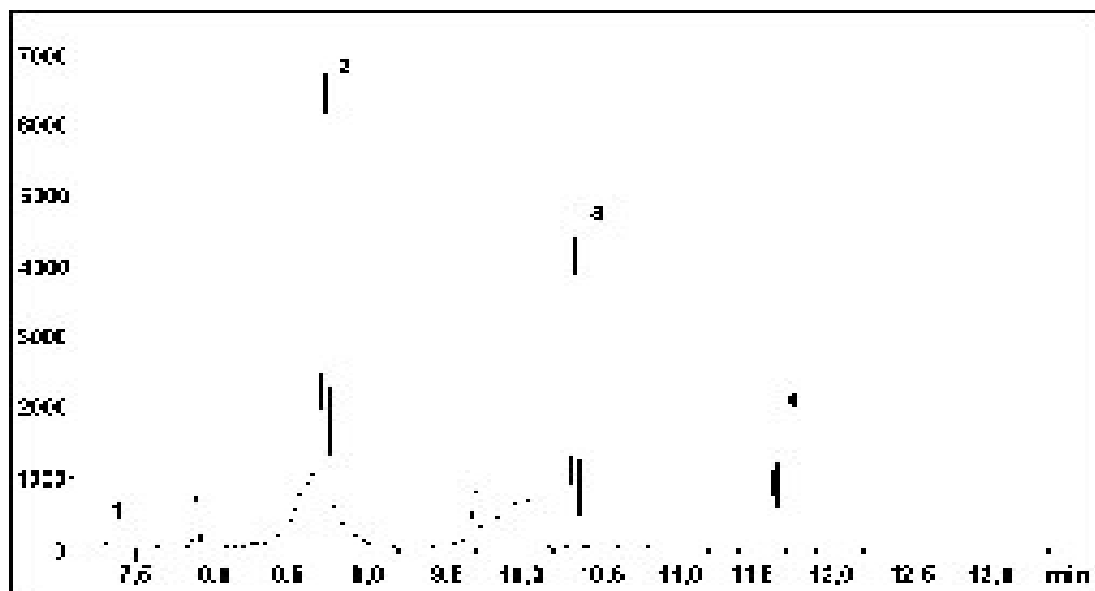
Poprawność opracowanej metody analizy ilościowej pochodnych amfetaminy w materiale niebiologicznym zbadano wykonując analizę próbki kontrolnej zawierającej pochodne amfetaminy w ilości zbliżonej, jakie oznaczano we fragmencie tabletki. Wyniki testu zestawiono w tabeli 1.

Współczynniki korelacji liniowej prostych kalibracyjnych wynosiły odpowiednio: dla amfetaminy $r^2=0,995$, dla efedryny $r^2=0,996$, dla PMA i PMMA $r^2=0,998$.

Dalsza analiza składników tabletki występujących w ilościach śladowych ujawniła obecność następujących substancji chemicznych: p-metoksyetyloamfetamina, p-hydroksymetamfetamina i p-

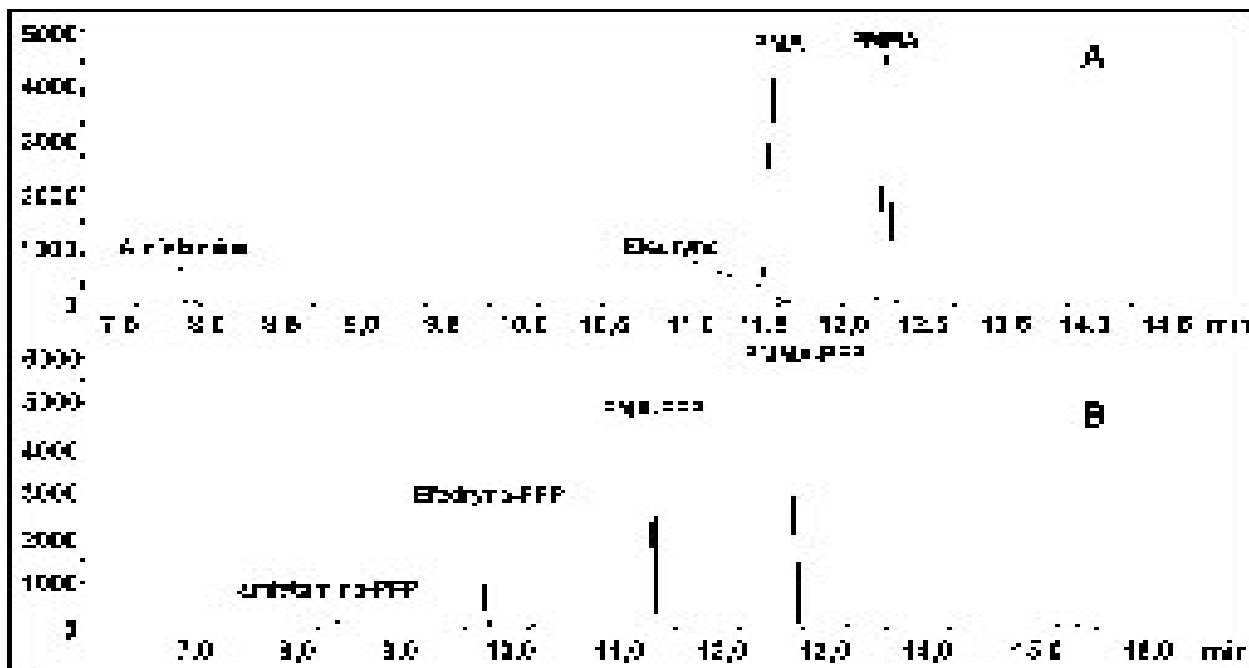


Ryc. 3. Rozdziel chromatograficzny jedenastu analogów amfetaminy, A – mieszanina wolnych zasad; B – mieszanina pochodnych pentafluoropropionowych; 1 = *α*-fenyloetyloamina; 2 = amfetamina; 3 = metyloamfetamina; 4 = PMA; 5 = PMMA; 6 = *p*-OH-A; 7 = MDA; 8 = *p*-OH-MA; 9 = MDMA; 10 = *p*-OH-EA; 11 = MDE. Warunki analizy: chromatograf gazowy Agilent 6850, detektor FID $t=250^{\circ}\text{C}$, temperatura komory nastrzykowej $t=250^{\circ}\text{C}$, opcja nastrzyku z dzieleniem (split) 30:1, gaz nośny hel o przepływie stałym $F=1,5\text{ ml/min}$, kolumna kapilarna HP-5 30 m \times 0,25 mm \times 0,25 mm, program temperaturowy 100°C (1,0 min), przyrost 10°C/min do 280°C (3,0 min).

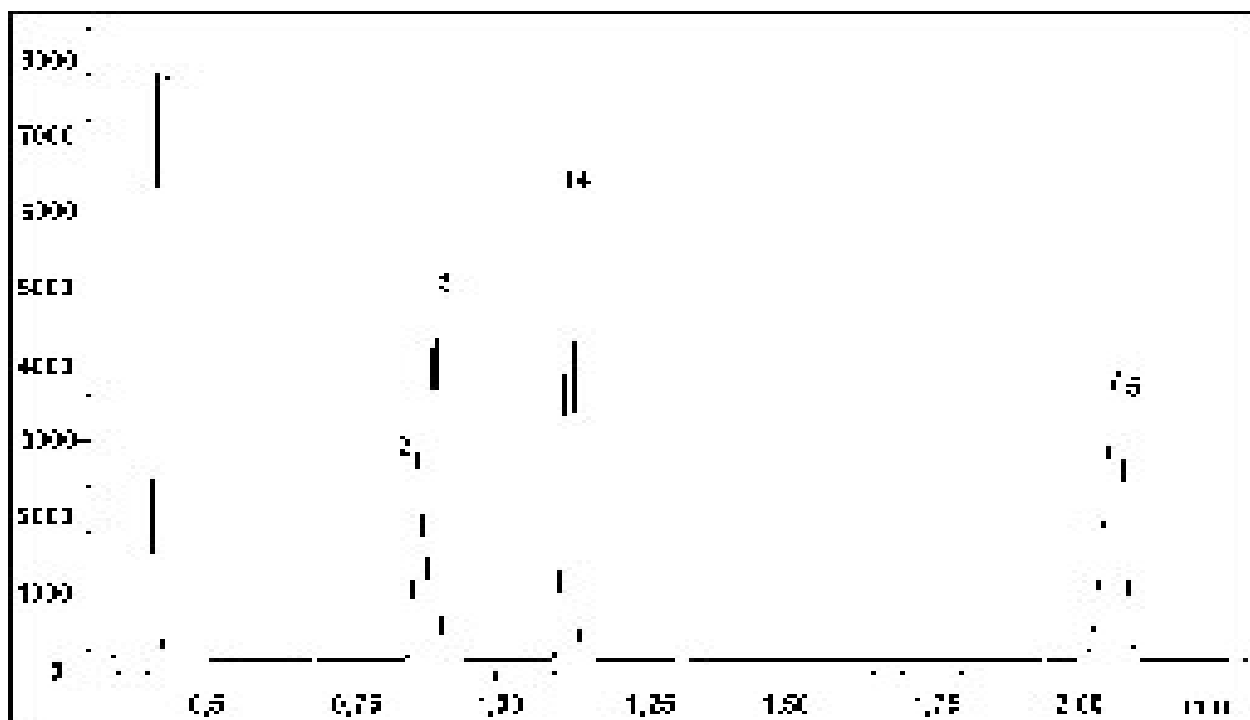


Ryc. 4. Chromatogram ekstraktu moczu po derywatacji bezwodnikiem kwasu pentafluoropropionowego uzyskany metodą GC-MS-SIM. 1 = PFP-amfetamina; 2 = PFP-efedryna; 3 = PFP-*p*-metoksyanfetamina (PMA); 4 = PFP-*p*-metoksymetyloamfetamina (PMMA). Warunki analizy: system GC-MS HP 6890/HP 5973, jonizacja elektronowa EI = 70 eV, temperatura komory nastrzykowej $t=250^{\circ}\text{C}$, opcja nastrzyku bez dzielenia (splitless), gaz nośny hel o przepływie stałym $F = 0,6\text{ ml}$, kolumna kapilarna BP-5 20 m \times 0,22 mm \times 0,25 mm, program temperaturowy 90°C (2,0 min), przyrost 8°C/min do 285°C (2,0 min).

metoksydimetyloamfetamina. Substancje te są produktami ubocznymi powstającymi w trakcie procesu syntezy PMA lub PMMA. Obecność N-etylo- i N,N-dimetylo pochodnych PMA w tabletkach jest wynikiem



Ryc. 5. Chromatogram GC-MS ekstraktu tabletki. A – analiza wykonana bez derywatywacji; B – analiza pochodnych PFP. Warunki analizy: system GC-MS (Ryc.4), zmodyfikowano program temperaturowy: 85°C (2,0 min), przyrost 7°C/min do 275°C (2,0 min).



Ryc. 6. Chromatogram roztworu kalibracyjnego. 1 = amfetamina (2,0 mg/ml); 2 = efedryna (0,5 mg/ml); 3 = PMA (2,1 mg/ml); 4 = PMMA (3,2 mg/ml); 5 = p-metoksypropyloamfetamina (5 mg/ml) (standard wewnętrzny).

zastosowania w procesie syntezy reagentów zanieczyszczonych etyloaminą i dimetyloaminą (dla metody katalitycznego redukcyjnego aminowania) lub N-etyloformamidem i dimetyloformamidem (dla metody Leuckarta). Hydroksypochodna powstaje prawdopodobnie w trakcie syntezy PMMA i jest wynikiem O-demetylacji zachodzącej w trakcie etapu produkcji narkotyku przebiegającego przy zbyt niskim pH środowiska. Widma masowe N-etylo i N,N-dimetylo- pochodnych PMA przedstawiono na ryc.7.

TABELA 1

Wyniki testu powtarzalności analizy ilościowej efedryny, PMA i PMMA oraz amfetaminy w próbce kontrolnej.

Substancja	Zawartość nominalna % [wag]	Zawartość zmierzona % [wag]	Odchylenie standardowe SD	Współczynnik zmienności CV %	Przedział ufności wartości średniej
amfetamina	1,2	1,3	0,17	12,1	1,12-1,48
efedryna	4,7	4,4	0,21	4,9	4,18-4,62
PMA	18,8	19,4	0,92	4,7	18,44-20,36
PMMA	12,6	11,7	0,98	8,4	10,67-12,73

a – substancje oznaczano w przeliczeniu na wolną zasadę.

b – wartość średnia, ilość oznaczeń n=6.

c – współczynnik Studenta $t=2,571$ dla poziomu ufności $p=95\%$.

Podobieństwo widm, mogące prowadzić do mylnej identyfikacji określonej pochodnej wynika z faktu, że oba związki są strukturami o bardzo zbliżonej budowie chemicznej. Pochodne amfetaminy, różniące się lokalizacją niewielkich podstawników w obrębie pierścienia aromatycznego, w łańcuchu bocznym lub przy atomie azotu określa się niekiedy jako regioizomery. Widma masowe regioizomerów charakteryzują się niewielkimi różnicami i z tego powodu ich jednoznaczne odróżnienie bez pomocy innych metod instrumentalnych (FTIR, ^1H i ^{13}C NMR), lub dodatkowych zabiegów na etapie przygotowania analizy (np. derywatywacja) może być utrudnione. Praca przedstawiająca szerzej powyższe zagadnienia oraz omawiająca problemy związane z identyfikacją powstających zanieczyszczeń będzie tematem odrębnej publikacji.

WNIOSKI

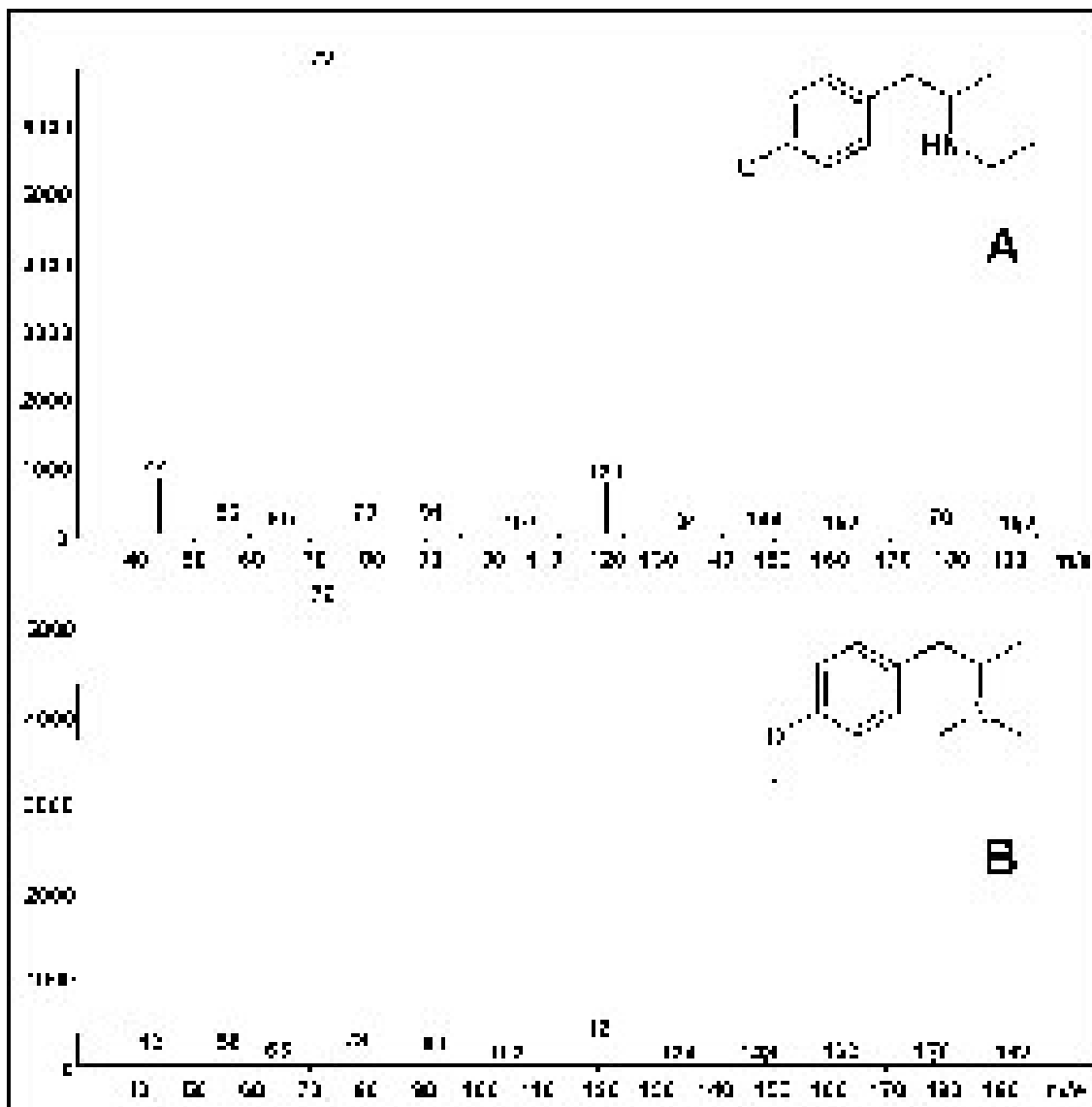
1. Test amfetaminowy TDx może służyć do skринingowego badania próbek moczu na obecność PMMA i MDA, jeśli w próbkach nie występują inne związki reagujące z przeciwciałami testu. PMMA i MDA występujące w próbkach wraz z amfetaminą i metamfetaminą powodują zawyżone wyniki ilościowe.

2. Metabolity PMA i PMMA – p-OH-A i p-OH-MA – mogą być wykryte za pomocą testu TDx, ale w stężeniach od 500 ng/ml.

3. PMA i MDE reagują z przeciwciałami testu amfetaminowego w stopniu znikomym i nie mogą być wykryte za pomocą testu TDx.

4. Zastosowane warunki analizy GC-MS po derywatywacji badanego materiału pozwalają wykryć i zidentyfikować PMA i PMMA w obecności amfetaminy, metamfetaminy, MDA, MDMA i MDE oraz hydroksylowych metabolitów p-OH-A i p-OH-MA

5. Głównymi psychoaktywnymi składnikami fragmentu tabletki znalezionej przy denacie były PMA i PMMA, co wraz z wynikami analiz wykonanych w Gdańsku (10, 17) i Krakowie (11) może wskazywać, że te niebezpieczne narkotyki zmodyfikowane są już obecne na polskim rynku narkotykowym. Identyfikacja śladowych ilości N-etylo PMA, N,N-dimetylo PMA i p-hydroksymetamfetaminy może być pomocna w określeniu metody syntezy narkotyku.



Ryc. 7. Widma masowe (EI = 70 eV): (A) p-metoksyetyloamfetaminy; (B) p-metoksydimetyloamfetaminy.

STRESZCZENIE

Badano przydatność testu amfetaminowego TDx do wykrywania narkotyków, tj. zmodyfikowanych pochodnych amfetaminy. Reaktywność krzyżowa przeciwciał testu wobec PMMA i MDA jest duża (ponad 100% dla stężenia 500 ng/ml), co stwarza możliwość użycia metody FPIA do skriningowego badania moczu na obecność tych narkotyków, jeśli mocz nie zawiera innych związków reagujących z przeciwciałami. Przy spełnieniu tego warunku możliwe jest również wykrycie hydroksylowych metabolitów – p-OH-A i p-OH-MA, chociaż reaktywność przeciwciał jest w tym przypadku znacznie niższa (dla stężenia 500 ng/ml odpowiednio 40% i 60%). Natomiast reaktywność krzyżowa PMA i MDE jest znikoma i ich wykrycie przy użyciu testu TDx jest praktycznie niemożliwe.

Metodą chromatografii gazowej z detekcją mas (GC-MS) i zastosowaniem derywatywacji rozdzielono i zidentyfikowano PMA, PMMA i ich hydroksylowe metabolity w obecności innych psychoaktywnych związków występujących na polskim rynku narkotykowym: amfetaminy, metamfetaminy, α -fenyloetyloaminy, MDMA, MDA i MDE.

W moczu 23-letniego mężczyzny, zmarłego nagle prawdopodobnie w wyniku przedawkowania narkotyków, oraz we fragmencie tabletki znalezionej przy denacie wykryto PMA, PMMA, efedrynę i amfetaminę. Oznaczona zawartość tych narkotyków we fragmencie tabletki wynosiła: PMA – 16%, PMMA – 13 %, efedryna – 4%, amfetamina – 1 %. Stwierdzono również, że badany materiał zawiera śladowe ilości p-metoksyetyloamfetaminy, p-metoksydimetyloamfetaminy oraz p-hydroksymetamfetaminy.

Słowa kluczowe: p-metoksyamfetamina (PMA), p-metoksymetamfetamina (PMMA), chromatografia gazowa (GC), spektrometria mas (MS), reaktywność krzyżowa, FPIA.

PIŚMIENNICTWO

1. Angrist B.M., Schweitzer J.W., Gershon S.: *Investigation of p-methoxyamphetamine excretion in amphetamine induced psychosis*. Nature, 1970, 225, 651-652.
2. Błachut D., Mirkiewicz E., Bykas M., Marczak Z., Taracha E., Szukalski B.: *Zastosowanie połączonej chromatografii gazowej i spektrometrii masowej (GC/MS) do analizy złożonych mieszanin psychoaktywnych amin*. Alkoholizm i Narkomania, 2000, 13, 255-267.
3. Cimbure B.: *PMA deaths in Ontario*. Canad. Med. Assoc. J., 1974, 110, 1263-1267.
4. Clark C.C.: *The identification of methoxy-N-methylamphetamines*. J. Forensic Sci., 1984, 29, 1056-1071.
5. DalCason T.A.: *The identification of 4-methoxyamphetamine and 4-methoxymethamphetamine (PMMA)*. Microgram, 2000, 33, 207-222.
6. Glennon R.A., Young R., Dukat M., Cheng Y.: *Initial characterization of PMMA as a discriminative stimulus*. Pharm. Bioch. Behavior, 1997, 57, 151-158.
7. Habrat B., Baran-Furga H., Chmielewska K.: *Z UFO w zaświaty*. Wiedza i Życie, marzec 2001, 31-32.
8. James R.A., Dinan A.: *Hyperpyrexia associated with fatal paramethoxyamphetamine (PMA) abuse*. Med. Sci. Law, 1998, 38, 83-85.
9. King L.A., Poortman van der Meer A.J.: *New synthetic drugs in the European Union*. Sci. Justice, 2001, 41, 200-202.
10. Kłys M., Jankowski Z., Bystrowska B., Bujak-Giżycka B., Nowak G.: *Znaczenie interakcji toksycznej w orzecznictwie sądowo-lekarskim. Złożone zatrucie śmiertelne pochodnymi amfetaminy i kokainą („UFO”?)*. Arch. Med. Sąd. Krym. 2001, 51 133-143.
11. Lechowicz W., Chudzikiewicz E., Janowska E., Stanaszek R.: *Przypadki złożonych zatruc p-metoksyamfetaminą (PMA) oraz innymi fenyloalkiloaminami*. Z Zagadnień Nauk Sądowych, 2002, 48, 118-126.
12. Midha K.K., Coots R.T.: *Human metabolism of methoxyphenamine*. J. Chromatogr. 1977, 144, 280-283.
13. Niwaguchi T., Inone T.: *Excretion of methoxyphenamine and its metabolites in rat urine*. J. Chromatogr. 1978, 161, 223-229.
14. Steele T.D., Katz J.L., Ricaurte G.A.: *Evaluation of the neurotoxicity of N-methyl-1-(4-methoxyphenyl)-2-aminopropane (para-methoxymethamphetamine, PMMA)*. Brain Res. 1992, 589, 349-352.
15. Szukalski B.: *Amfetamina, metamfetamina i ich psychoaktywne analogi strukturalne*. Alkoholizm i Narkomania, 1995 nr 3 (20), 33-55.
16. *TDx System Assay: Amphetamine/Methamphetamine*., Abbott Laboratories Diagnostic Division, 1987, 12, 1.
17. Wiergowski M., Chodorowski Z., Sein Anand J., Reguła K., Szpiech B.: *Przypadki śmiertelnych zatruc tabletkami UFO w regionie gdańskim w roku 2000 oraz możliwość szybkiego diagnozowania zatruc na podstawie analizy fizykochemicznej płynów ustrojowych oraz badania lekarskiego*. Materiały XII Zjazdu Polskiego Towarzystwa Medycyny Sądowej i Kryminologii, Warszawa, 12-15 września 2001 r. 2001. 51-52.