

Bogdan Szukalski, Ewa Mirkiewicz, Ewa Taracha
Zakład Biochemii
Instytut Psychiatrii i Neurologii w Warszawie

BADANIA AMFETAMINY I JEJ PSYCHOAKTYWNYCH ANALOGÓW W MOCZU NARKOMANÓW METODĄ FPIA I HPTLC

WSTĘP

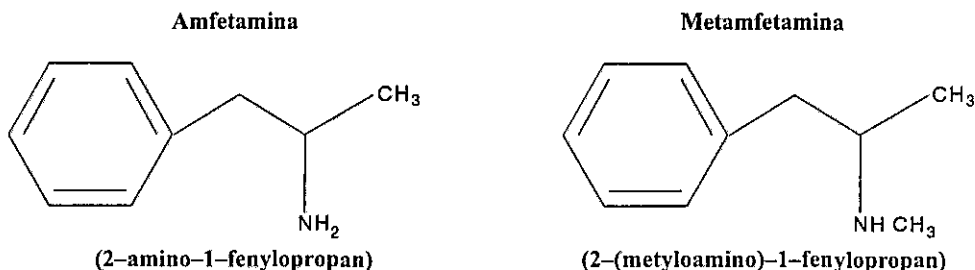
Produkcja amfetaminy w nielegalnych laboratoriach działających w wielu regionach kraju zwiększa dostępność tego narkotyku wśród polskich narkomanów i sprawia, że coraz częściej na oddziały detoksykacyjne – obok pacjentów stosujących przetwory ze słomy makowej – trafiają narkomani uzależnieni od amfetaminy. W USA i krajach zachodniej Europy poważny problem stanowią również analogi strukturalne amfetaminy i metamfetaminy – tzw. „narkotyki zmodyfikowane” (designer drugs). Są to produkty strukturalnej modyfikacji środków psychoaktywnych objętych kontrolą międzynarodową (tj. występujących na listach I i II amerykańskiej Drug Enforcement Agency – DEA), które zachowując wysoką psychoaktywność mogły być legalnie syntetyzowane, choć okresy tej legalności (czyli braku na listach I i II DEA) były bardzo krótkie [5]. Do określenia tego typu związków używany jest również termin „analogi substancji pozostających pod kontrolą” (controlled substances analogues) [14].

Do najbardziej znanych narkotyków zmodyfikowanych należą: tenamfetamina (MDA), 3,4-metylenodioksymetamfetamina (MDMA), 2,5-dimetoksy-4-metyloamfetamina (DOM) i inne. (Ryc. 1 i 2). Według klasyfikacji Drug Enforcement Administration znajdują się one na liście I (Schedule I), grupującej związki o wysokim potencjale uzależniającego, bez wyraźnego zastosowania lekarskiego [3]. Rozpowszechnienie tych narkotyków w Stanach Zjednoczonych wzrosło ostatnio znacznie i ich identyfikacja w materiale biologicznym pochodzącym

od narkomanów należy tam do podstawowych obowiązków laboratoriów toksykologicznych [2, 4, 11].

RYCINA 1

Budowa chemiczna amfetaminy i metamfetaminy



Wśród narkotyków zmodyfikowanych na szczególną uwagę zasługują tzw. entaktogeny (entactogens) stosowane często jako środki odurzające w dyskotekach oraz na tzw. „raving parties” – imprezach mających na celu wspólne przeżywanie oszołomienia narkotycznego. Należą do nich związki posiadające ugrupowanie 3,4-dioksymetylenowe:

3,4 – metylenodioksyamfetamina (MDA)

3,4 – metylenodioxymetamfetamina (MDMA, Ecstasy)

N-etylo-3,4-metylenodioksyamfetamina (MDE, MDEA, „Eve”)

Benzodioksalo-5-butylo-2-amina (BDB) – homolog MDA o łańcuchu dłuższym o grupę metylenową.

N-Metylobenzodioksalo-5-butylo-2-amina (MBDB) – homolog MDMA o łańcuchu bocznym dłuższym o grupę metylenową.

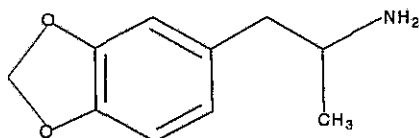
Analogiem strukturalnym amfetaminy jest również różniąca się od niej tylko obecnością grupy hydroksylowej w łańcuchu bocznym – katyna (cathine), narkotyk pochodzenia roślinnego otrzymywany z liści drzewa *Catha edulis* Forsk (Ryc. 2).

W Polsce, cieszącej się w Europie nie dobrą sławą czołowego producenta i eksportera nielegalnie otrzymywanej amfetaminy, prawdopodobieństwo pojawienia się na rynku produktów chemicznej modyfikacji tego narkotyku jest dość wysokie. Musimy więc mieć świadomość, że w moczu narkomanów, badanym na obecność amfetaminy, mogą znajdować się również jej analogi strukturalne.

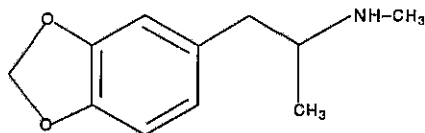
Amfetaminę można wykrywać w moczu za pomocą różnych testów immunologicznych – testu płytkowego Ontrak (Hoffmann-La Roche), testu paskowego Frontline (Boehringer Mannheim), zestawu wielozadaniowego Triage (Merck) a także metody immunofluorescencji w świetle spolaryzowanym – FPIA (Abbott). Najbardziej rozpowszechniona jest ta ostatnia metoda, gdyż pozwala nie tylko wykrywać obecność amfetaminy, ale również określać jej przybliżone stężenie w badanej próbce.

RYCINA 2

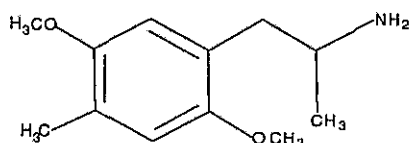
Budowa chemiczna niektórych analogów strukturalnych amfetaminy i metamfetaminy



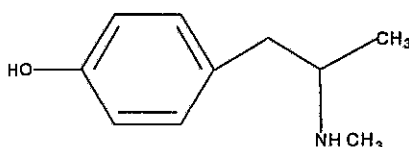
MDA
(3, 4-metyleniodioksyamfetamina)



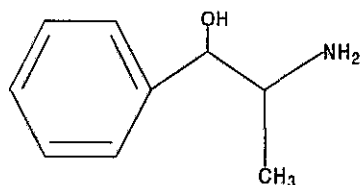
MDMA
(3, 4-metyleniodioksymetametamina)



DOM
(2, 5-dimetoksy-4-metyloamfetamina)



4-OH-MA
(4-hydroksymetametamina)



KATYNA
(2-amino-fenylpropanol-1)

Słabą stroną tej metody, która opiera się na reakcji antygen – przeciwciało, jest jednak niezbyt wysoka specyficzność, gdyż z przeciwciałami skierowanymi przeciw amfetaminie reagują również związki o zbliżonej do amfetaminy budowie chemicznej (tzw. reaktywność krzyżowa). Może to prowadzić do błędnych wyników zarówno jakościowych jak i ilościowych.

Wyniki badania amfetaminy i metamfetaminy metodą immunofluorescencji w świetle spolaryzowanym zależą również od metabolizmu tych narkotyków i obecności w moczu ich metabolitów. Np. aż 15% przyjętej dawki metamfetaminy przekształca się w jej metabolit 4-hydroksymetametaminę [13] (Ryc. 2).

Dlatego wydaje się uzasadnione zbadanie zachowania ważniejszych psychoaktywnych analogów amfetaminy wobec przeciwciał testu amfetaminowego FPIA oraz opracowanie prostego postępowania analitycznego do ich wykrywania i identyfikacji. Dodatni wynik badania moczu metodą FPIA oznacza bowiem jedynie

obecność w nim amfetaminy w stężeniu przekraczającym tzw. próg czułości (cut off level), nie wskazuje natomiast jakie związki składają się na ten wynik. Ich identyfikacja musi się więc odbywać inną metodą, np. metodą chromatografii gazowej (GC), chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią masową (GC/MS) lub wysokosprawnej chromatografii cienkowarstwowej (HPTLC). Wśród nich HPTLC wyróżnia się względną prostotą wykonania, a ponadto nie wymaga kosztownej aparatury i może więc być stosowana w większości naszych laboratoriów toksykologicznych.

MATERIAŁ I METODY

Amfetaminę (siarczan d-amfetaminy), metamfetaminę (chlorowodorek d-metamfetaminy), MDA (chlorowodorek dl-3,4 – metylenodioksyamfetaminy), MDMA (chlorowodorek dl-3,4-metylenodioksymetamfetaminy), DOM (chlorowodorek dl-2,5-dimetoksy- 4 –metyloamfetaminy), 4-hydroksymetamfetaminę (Pholderin) i katynę (chlorowodorek norpseudofedryny) przygotowywano w postaci metalolowych roztworów podstawowych o stężeniu 1 mg/ml, które następnie dodawano do czystego moczu (pH 5–8), aby stężenia poszczególnych związków wynosiły w nim 300, 500, 1000, 1500, 2000, 3000, 5000 i 6000 ng/ml. Amfetamina, metamfetamina, MDA, MDMA, 4-hydroksymetamfetamina i DOM pochodziły z firmy Sigma, natomiast katyna jest darem Division of Narcotic Drugs, Vienna International Centre, ONZ.

Oznaczenia wykonywano metodą immunofluorescencji w świetle spolaryzowanym (FPIA) [8,15] przy użyciu zestawu TDx Amphetamine /Metamphetamine Assay System (100–test Kit Nr 12610Q101).

Materiałem użytym do identyfikacji amfetaminy i jej strukturalnych analogów był mocz 10 pacjentów Oddziału Detoksykacyjnego Instytutu Psychiatrii i Neurologii, wybranych spośród 106 uczestników programu metadonowego. W moczu tych pacjentów badanie skriningowe wykazało obecność związków z grupy amfetamin, co stanowi dowód nieprzestrzegania przez nich abstynencji, będącej warunkiem udziału w programie metadonowym.

Do rozdziału i identyfikacji poszczególnych związków składających się na „pulę amfetamin” zastosowano metodę wysokosprawnej chromatografii cienkowarstwowej [6,7].

Izolację amfetamin z moczu przed analizą chromatograficzną prowadzono metodą ekstrakcji ciecz–ciało stałe (Solid Phase Extraction – SPE) [1,7,12] stosując kolumny (Bond Elut Certify Extraction Columns – Varian) z sorbentem krzemionkowym, umieszczone w specjalnym urządzeniu do prowadzenia ekstrakcji pod regulowaną próżnią (Analytichem Vac Elut SPS 24TM–Varian). Kolumnę przygotowano do analizy przepuszczając kolejno 2 ml metanolu i 2 ml 0,1 M buforu fosforanowego o pH 6, a następnie podawano na nią próbkę badanego moczu (najczęściej 10 ml), płukano kolumnę 2 ml 1 M kwasu octowego i suszono pod próżnią w ciągu 5 minut. Wysuszoną kolumnę płukano 10 ml metanolu i powtórnie suszo-

no przez 2 minuty. Zaadsorbowane amfetaminy eluowano 2 ml 2% roztworu amoniaku w octanie etylowym. Eluat odparowywano do sucha i rozpuszczano w 50 μ l metanolu. Na płytki chromatograficzne наносono 1–10 μ l ekstraktu, co odpowiada 0,2–2 ml moczu.

Zastosowana w pracy metoda ekstrakcji ciecz–ciało stałe izoluje z moczu, poza amfetaminą i jej psychoaktywnymi analogami, również metadon i jego metabolit 2–etylideno–1,5–dimetylo–3,3–difenylpirolidynę (EDDP), które po wywołaniu chromatogramów ninhydriną pojawiają się na nich w postaci fioletowych plam.

Do rozdziału amfetamin zastosowano dwa warianty chromatografii: wariant klasyczny i tzw. chromatografię z odwróconymi fazami (Reversed Phase Chromatography), w której faza ruchoma jest bardziej polarna niż nieruchoma [10].

W wariacie klasycznym używano płytki 10 x 10 cm pokryte żelalem krzemionkowym (Silica – gel G 60 F₂₅₄ – Merck), a w wariacie z odwróconymi fazami – płytki takiej samej wielkości pokryte adsorbentem RP–18_{254S} – (Merck). Chromatogramy rozwijano w komorach szklanych (Camag, Muttenz) na drodze o długości 7 cm, stosując następujące układy rozwijające:

Układ 1. Metanol: stężony roztwór NH₃ = 100: 1,5

Układ 2. Toluen: aceton: etanol – 25% roztwór NH₃ = 45:45:7:3

Układ 3. Chloroform: metanol = 90:10

Układ 4. Octan etylu: metanol: woda = 95: 3,5: –1,5 z dodatkiem 7 μ l stężonego roztworu amoniaku na 1 ml mieszaniny

Układ 5. Aceton z dodatkiem 5 μ l stężonego roztworu amoniaku na 1 ml acetonu.

Układ 6. (do chromatografii z odwróconymi fazami). Metanol: woda: 37% roztwór kwasu solnego = 50: 50: 1.

Czas rozwijania chromatogramów wynosił 8–10 minut.

Rozdzielone związki lokalizowano na chromatogramach za pomocą lampy UV (254 nm) oraz odczynników: ninhydrynowego i Fast Black K (FBK)

Odczynnik ninhydrynowy. 10% roztwór ninhydriny w etanolu.

Płytki spryskane odczynnikami ninhydrynowym ogrzewano w piecu o temperaturze 120°C przez 15 minut.

Odczynnik Fast Black K [9]

Roztwór A: 1% wodny roztwór Fast Black K

Roztwór B: 1 M roztwór wodorotlenku sodowego

Płytki spryskiwano roztworem A, następnie – roztworem B. Bardziej intensywne zabarwienie uzyskiwano spryskując wysuszony chromatogram powtórnie roztworem A.

Wartości hR_f charakteryzujące szybkość migracji badanych substancji na chromatogramach, obliczono wg wzoru:

$$hR_f = (I_N / I_R) \times 100$$

gdzie I_N – droga przebyta przez cząsteczkę narkotyku

I_R – droga przebyta przez czoło fazy ruchomej.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

W Tabeli 1. zestawiono reaktywność krzyżową metamfetaminy, jej głównego metabolitu – 4–hydroksymetamfetaminy oraz narkotyków zmodyfikowanych: MDA i MDMA przy różnych stężeniach tych związków w próbce moczu. Tabela 2. zawiera analogiczne dane dla DOM i katyny. Reaktywność krzyżową (w %) obliczano jako stosunek średniej z sześciu odczytów stężenia uzyskanych metodą FPIA do stężenia związku w próbce pomnożony przez 100.

TABELA 1

Reaktywność krzyżowa analogów amfetaminy z przeciwciałami testu amfetaminowego FPIA

Stęż. w moczu (ng/ml)	Metamfetamina		MDA		MDMA		p-hydroksy MA	
	Stęż. odczytane (ng/ml)	Reakt. krzyż. (%)	Stęż. odczytane (ng/ml)	Reakt. krzyż. (%)	Stęż. odczytane (ng/ml)	Reakt. krzyż. (%)	Stęż. odczytane (ng/ml)	Reakt. krzyż. (%)
300	559,2	186,0	510	170,0	439	146,4	584	194,5
500	790,0	158,0	680	136,0	616	123,2	697	139,4
1000	1032,0	103,2	1130	113,0	1084	108,4	1186	118,7
1500	1326,0	88,4	1446	96,4	1380	92,0	1702	113,5
2000	1464,0	73,2	2200	110,0	1760	88,0	2158	108,0
3000	2133,0	71,1	4140	138,0	2460	82,0	2947	98,2
4000	2800,0	70,0	5440	136,0	3080	77,0	3820	95,5
5000	3320,0	66,4	6150	123,0	3500	70,0	–	–
6000	3720,0	62,0	6180	103,0	3900	65,0	4826	80,4

Oznaczenia - patrz ryc. 2.

Z wyjątkiem katyny, która praktycznie nie reaguje z przeciwciałami testu, reaktywność krzyżowa pozostałych związków zmienia się wyraźnie ze wzrostem ich stężenia.

Dla metamfetaminy ulega ona obniżeniu od 186 % dla 300 ng/ml do 62% dla 6000 ng/ml. Podobny profil zmian zanotowano dla MDMA i 4 hydroksymetamfetaminy.

Dla MDMA reaktywność krzyżowa ulega obniżeniu od 146,4% dla 300 ng/ml do 65% dla 6000 ng/ml, a dla 4–hydroksymetamfetaminy od 194,5 % dla 300 ng/ml do 80,4% – dla 6000 ng/ml.

Również dla DOM reaktywność krzyżowa obniża się ze wzrostem stężenia w sposób ciągły, jednak uzyskane wartości są bardzo niskie: dla 300 ng/ml reaktywność krzyżowa wynosi zaledwie 7,6 % a dla 6000 ng/ml – tylko 2% (Tabela 2).

Dla MDA zmiany reaktywności krzyżowej zależne od stężenia związku w próbce mają charakter dwufazowy: najpierw następuje obniżenie od 170% dla 300 ng/ml do 96,4% dla 1500 ng/ml, następnie wzrost do 138% – dla 4000 ng/ml i ponowny spadek do 103% dla 6000 ng/ml.

TABELA 2

Reaktywność krzyżowa DOM i katyny z przeciwciałami testu amfetaminowego FPIA

DOM			Katyna (Norpseudoefedryna)		
Stęż. w moczu (mg/ml)	Stęż. odczytane (mg/ml)	Reakt. krzyż. (%)	Stęż. odczytane (mg/ml)	Reakt. krzyż. (%)	
300	22	7,6	0,03	0,01	
500	30	6,0	0,06	0,02	
1000	46	4,6	2,07	0,21	
1500	51	3,4	2,64	0,17	
2000	60	3,0	2,81	0,14	
3000	84	2,8	2,95	0,10	
4000	96	2,4	3,20	0,07	
5000	100	2,0	3,30	0,07	
6000	120	2,0	3,60	0,06	

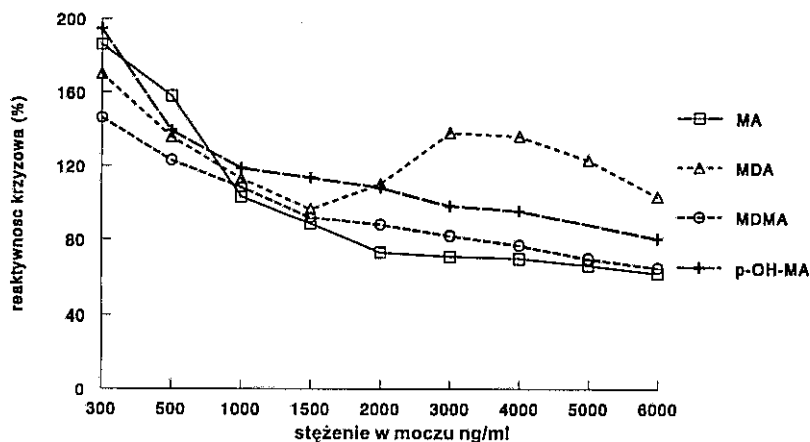
Ryc. 3. przedstawia zależność odpowiedzi testu amfetaminowego od stężenia psychoaktywnych analogów amfetaminy w próbce. Pokazuje on nieliniowy charakter zmian reaktywności krzyżowej dla metamfetaminy, MDMA, MDA i 4-hydroksymetamfetaminy.

Podobne zależności dla DOM przedstawia Ryc. 4.

Wyniki te wskazują, że mocz zawierający metamfetaminę, MDMA, 4-hydroksymetamfetaminę i MDA w stężeniach poniżej 6000 ng/ml daje wyraźnie dodat-

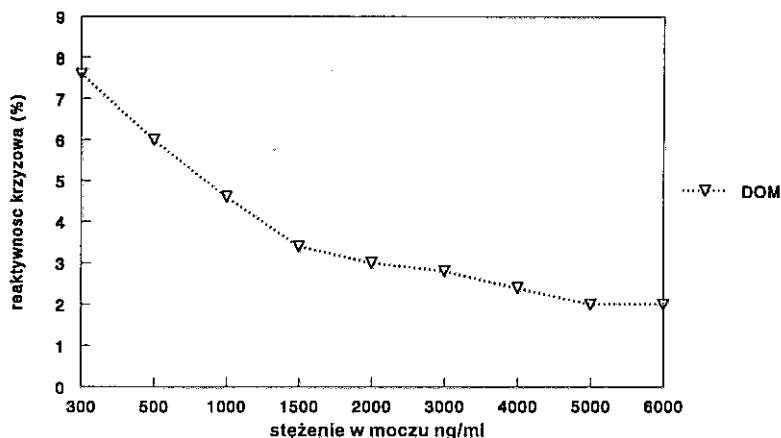
RYCINA 3

Reaktywność krzyżowa analogów amfetaminy jako funkcja stężenia



RYCINA 4

Zależne od stężenia zmiany reaktywności krzyżowej DOM



ni wynik testu amfetaminowego. A zatem dodatni wynik testu amfetaminowego może oznaczać obecność nie tylko amfetaminy, ale również jej niektórych psychoaktywnych analogów i metabolitów, jednakże identyfikacji związku odpowiedzialnego za dodatni wynik testu nie da się przeprowadzić tą metodą.

Z otrzymanych wyników można również wyciągnąć pewne wnioski na temat zależności między budową chemiczną poszczególnych analogów amfetaminy a ich zdolnością do wiązania się z przeciwciałami testu amfetaminowego. Otóż ugrupowanie dioksymetylenowe nie wpływa w widoczny sposób na proces wiązania z przeciwciałem (MDMA, MDA). Bez większego wpływu na zdolność wiązania pozostaje również grupa hydroksylowa w pierścieniu aromatycznym (4-hydroksymetamfetamina) oraz N-metylacja czyli zablokowanie I-rzędowej grupy aminowej przez rodnik metylowy (metamfetamina). Natomiast obecność w pierścieniu benzenowym grup metoksylowych wyraźnie obniża zdolność wiązania związku z przeciwciałami testu amfetaminowego (DOM). Jeszcze silniejszy wpływ na wiązanie z przeciwciałami ma obecność grupy hydroksylowej w łańcuchu bocznym, która praktycznie pozbawia związek zdolności wiązania (katyna).

W tabeli 3 zestawiono wartości hR_f amfetaminy, metamfetaminy, MDA, MDMA, DOM, katyny i 4 – hydroksymetamfetaminy w sześciu układach rozwijających oraz wyniki barwienia rozwiniętych chromatogramów za pomocą odczynnika Fast Black K i ninhydryny.

Układy 1, 2, 3, 4 i 5 stosowano w klasycznym wariacie chromatografii a układ 6 – w chromatografii z fazami odwróconymi. Do dalszej pracy wybrano układy 2 i 6.

Układ 2 daje dobry rozdział amfetaminy, metamfetaminy, katyny i 4-hydroksymetamfetaminy, natomiast amfetamina MDA i DOM oraz metamfetamina i MDMA mają w nim zbliżone wartości hR_f .

TABELA 3

Wartości R_F w 6 układach rozwijających oraz barwy plam amfetaminy i jej analogów z FBK i ninhydriną

Związek	Układy rozwijające						Barwa plam		
	Wariant klasyczny					RPC	FBK	Ninhydr.	UV 254 nm
	1	2	3	4	5	6			
d-Amfetamina	1,0	40,0	4,2	14,3	46,4	60,0	F	R	Sł. widoczna
d-Metamfetamina	14,0	15,7	2,8	57,0	6,4	57,0	P	R	Sł. widoczna
dl-MDA	17,1	35,7	2,8	16,4	44,3	59,3	F	R	Sł. widoczna
dl-MDMA	11,4	12,8	2,8	5,7	6,0	54,2	P	R	Sł. widoczna
dl-DOM	12,8	34,2	2,8	8,6	35,7	33,1	F	R	Sł. widoczna
4-OH-MA	-	14,3	-	-	-	74,2	R-F	R	Sł. widoczna
Katyna	20,0	58,5	0	30,0	75,7	69,0	F	R	Sł. widoczna

RPC = chromatografia z odwróconymi fazami

FBK = Fast Black K

F = fioletowa

P = pomarańczowa

R = różowa

R-F = różowo-fioletowa

W układzie 6 DOM dobrze oddziela się od pozostałych związków, a także lepiej niż w układzie 2 dzieli się metamfetamina i MDMA. Tak więc identyfikacja psychoaktywnych analogów amfetaminy i metamfetaminy wymaga wykonania chromatogramów w układzie 2 i 6.

Przy wywoływaniu chromatogramów odczynnikiem FBK na łososiowo – różowym tle pojawiają się plamy o zabarwieniu fioletowym (aminy pierwszorzędowe – amfetamina, MDA, DOM) lub o zabarwieniu pomarańczowym (aminy drugorzędowe – metamfetamina, MDMA i 4-OH-MA).

Plamy amin drugorzędowych pojawiają się natychmiast po spryskaniu FBK, natomiast aminy pierwszorzędowe stają się widoczne dopiero, gdy chromatogram wywołany FBK spryska się 1 M roztworem NaOH. Powtórne spryskanie takiego chromatogramu roztworem FBK powoduje intensyfikację zabarwienia plam.

Kwaśny układ rozwijający, stosowany w chromatografii z odwróconymi fazami, sprzyja występowaniu bardziej intensywnej plam po wybarwieniu zarówno odczynnikiem Fast Black K, jak i ninhydriną. W tych warunkach nawet katyna daje bardzo wyraźną silnie wysyconą plamę.

Tabela 4 zawiera wyniki analizy amfetaminy, metamfetaminy i ich psychoaktywnych analogów strukturalnych w moczu 10 pacjentów leczonych metadonem. Stężenia „puli amfetamin” oznaczanych metodą FPIA wahały się od 558 ng/ml do > 6000 ng/ml.

TABELA 4

Wyniki badania moczu narkomanów metodą FPIA i HPTLC

FPIA		HPTLC								
Pacjent	Amfeta (ng/ml)	A	MA	MDA	MDMA	DOM	Katyna	4 OH MA	Metadon	EDDP
1. T.W.	>6000	+	+	-	-	-	-	-	+	+
2. K.W.	558	-	-	-	-	-	-	-	+	+
3. J.K.	>6000	+	-	-	-	-	-	-	+	+
4. K.L.	>6000	++	-	-	-	-	-	-	++	++
5. K.W.	720	śląd	-	-	-	-	-	-	++	++
6. K.W.	3220	+	-	-	-	-	-	-	+	+
7. R.K.	>6000	++	-	-	-	-	-	-	-	-
8. A.Ch.	>6000	++	-	-	-	-	-	-	-	-
9. K.M.	1266	+	-	-	-	-	-	-	+	+
10. A.B.	2426	+	-	-	-	-	-	-	+	+

+ wyraźna plama

++ intensywna plama

4-OH-MA = 4-hydroksymetamfetamina

EDDP = 2-etylideno-1,5-dimetylo-3,3-difenylpirolidyna

Dwa wyniki (558 ng/ml i 720 ng/ml) nie przekraczały progu czułości dla amfetaminy, wynoszącego 1000 ng/ml, natomiast w pięciu moczach stężenia amfetaminy były bardzo wysokie – powyżej 6000 ng/ml.

Badanie moczu pacjentów metodą HPTLC wykazało w 8 przypadkach, w których metodą FPIA uzyskano wyniki znacznie przekraczające próg czułości, obecność dużej, intensywnej plamy amfetaminy, w 1 przypadku (wynik metodą FPIA 720 ng/ml, a więc nieco poniżej progu czułości) – słabą plamę amfetaminy a w 1 przypadku (wynik metodą FPIA 558 ng/ml – znacznie poniżej progu czułości) – brak plamy tego narkotyku.

Czułość HPTLC jest więc zbliżona do czułości FPIA to znaczy, że stężenie amfetaminy niższe od progu czułości dla FPIA jest również trudne do wykrycia za pomocą HPTLC. W jednym moczu – obok amfetaminy – wykryto metamfetaminę. Żaden z badanych moczy nie zawierał psychoaktywnych analogów amfetaminy – MDA, MDMA, DOM i katyny, co dowodzi, że polscy narkomani, oprócz preparatów ze słomy makowej, stosują na razie głównie amfetaminę, prawdopodobnie z powodu małej dostępności na polskim rynku jej psychoaktywnych analogów.

U dwóch pacjentów, których mocz zawierał duże ilości amfetaminy (>6000 ng/ml) nie wykryto metadonu ani jego metabolitu – EDDP, co wskazuje, że nie przyjmowali

oni otrzymywanej w celach leczniczych dawki metadonu. Jest to informacja istotna dla lekarzy Oddziału Detoksykacyjnego, gdyż daje podstawę do ostrzeżenia tych pacjentów lub wykluczenia ich z programu metadonowego.

WNIOSKI

1. Metoda FPIA może służyć do wykrywania metamfetaminy, MDMA, MDA i 4-hydroksymetamfetaminy, gdyż reaktywność krzyżowa tych związków z przeciwciałami testu amfetaminowego jest wysoka w szerokim zakresie stężeń.

2. Ujemny wynik badania moczu tą metodą nie oznacza braku strukturalnych analogów amfetaminy, gdyż niektóre związki nie reagują z przeciwciałami testu (katyna), lub reagują z nimi w stopniu niewystarczającym do uzyskania wyniku dodatniego (DOM).

3. Dodatni wynik badania może oznaczać obecność amfetaminy, metamfetaminy, ich niektórych psychoaktywnych analogów lub metabolitów.

4. Wynik ilościowy próby zależy od sumy reaktywności krzyżowych związków macierzystych, ich analogów oraz metabolitów występujących w próbce.

5. Identyfikacja psychoaktywnych analogów amfetaminy wymaga zastosowania innej metody analitycznej (GC, GC/MS lub HPTLC).

6. Metoda HPTLC może służyć do identyfikacji ważniejszych psychoaktywnych analogów amfetaminy w moczu narkomanów, jednak czułość jej jest dość niska (800–1000 ng).

7. Wariant chromatografii cienkowarstwowej z odwróconymi fazami stanowi cenne uzupełnienie techniki HPTLC przy analizie analogów amfetaminy.

8. W badanych moczach nie wykryto psychoaktywnych analogów amfetaminy – MDA, MDMA, DOM i katyny, co wskazuje, że na razie na polskim rynku, obok preparatów ze słomy makowej, dominuje amfetamina.

Bogdan Szukalski, Ewa Mirkiewicz, Ewa Taracha

Detection of amphetamine and its psychoactive analogues in the urine of drug abusers by means of the FPIA and HPTLC methods.

Summary

The aim of the study was to assess the FPIA usefulness for detection of major designer drugs (MDMA, MDA and DOM), a plant derivative characterized by a chemical structure resembling that of amphetamine, cathine, as well as the main metabolite of methamphetamine - 4-hydroxymethamphetamine. For that purpose cross-reactivity of these compounds against antibodies of the amphetamine test, and the cross-reactivity - concentration relationship were determined. Reactivity levels are high for a quite broad spectrum of MDMA, MDA, and 4-hydroxymethamphetamine concentrations, which allows to detect these compounds using the FPIA method. However, this is not possible in the case of DOM, since it reacts very weakly with the

amphetamine test antibodies, and in the case of cathine, which practically does not react with these antibodies at all.

On the grounds of the obtained findings conclusions can be drawn as to the effect of some molecular structure aspects and of some functional groups occurring in it on binding of the compound with the amphetamine test antibodies.

Amphetamine, MDA, MDMA, DOM, cathine and 4-hydroxymethamphetamine were isolated from drug abusers' urine using the solid-phase extraction method, then were separated by means of the HPTLC method, and identified on chromatograms by means of staining with the Fast Black K reagent and ninhydrin. For the compounds under study R_f values were determined in six developing systems, out of which 2 were selected for further analysis. This method was used in the urinalysis of 10 drug abuse cases treated with methadone, who had taken amphetamine besides methadone. In 8 cases amphetamine only was detected in the urine samples, while in one case - both amphetamine and methamphetamine. In none of the urine samples psychoactive analogues of amphetamine (MDA, MDMA, DOM, and cathine) were found, which indicates their so far limited availability on the Polish drug market.

Key words: amphetamine/designer drugs/entactogens/cross-reactivity/thin-layer chromatography

PIŚMIENNICTWO

1. Breiter J., Hegler R., Lang H., *Evaluation of column extraction: A new procedure for the analysis of drugs in body fluids*. Forensic. Sci., 7, 131–135 (1976).
2. Brown C., Osterloh J., (1987) *Multiple severe complications from recreational ingestion of MDMA („ecstasy“)*. J. Am. Med. Assoc., 258, 780–81.
3. *Controlled Substance Analogue Act of 1985 Report of the Committee on the Judiciary U.S. Senate 21 Nov. 85 and Designer Drug Enforcement Act of 1986 Report to Accompany H.R. 5246 19 Sep. 86.*
4. Hayner G.N., McKinney H., (1986) *MDMA – The dark side of ecstasy*. J. Psychoactive Drugs, 18, 34–47.
5. Henderson G.L., (1988) *Designer drugs: past history and future prospects*. J. Forensic. Sci., 33, 569–575.
6. Jork H., *Quantitative HPTLC in the field of pharmaceutical applications. Proceedings of the Fourth Intern. Symposium on Instrumental High Performance Thin Layer Chromatography*, Eds. H. Traitler, A. Studer, R.E. Kaiser, Selvino/Bergamo, Italy 1987, p. 193.
7. Lillsunde P., Korte T., *Drug screening in urine using solid phase extraction and combined thin-layer chromatography and gas chromatography/mass spectrometry identification*. J. Anal. Toxicol., 15, 71–81 (1991).
8. Matsumoto H., Szukalski B., Podleśny J., Gaździk J., Wereżyńska T., Maszkiewicz J., (1989) *Zastosowanie metody immunofluorescencyjnej w świetle spolaryzowanym (FPIA) w diagnostyce laboratoryjnej uzależnień*, Ter. Monitor., 2, 23–27.

9. Ojanperä I., Whl K., Hase T.A., *Fast Black K Salt: A versatile thin layer chromatographic visualisation reagent for the differentiation of aliphatic amines*. *Analyst.*, 115, 263–267 (1990).
10. Ojanperä I., Lillsunde P., Vartiovaara J., Vuori E., *Screening for Amphetamine with a Combination of Normal and Reversed Phase Thin Layer Chromatography and Visualisation with Fast Black K Salt*, *J. Planar Chromatogr.*, 4, 373–378 (1991).
11. Roberts R.D., (1987) *MDA, MDMA i MDEA*, *Toxi-Lab. News*, 6, 1–2.
12. Scheurer J., Moore C.M., *Solid Phase Extraction of Drugs from Biological Tissues – A Review*, *J. Anal. Toxicol.*, 16, 264–269 (1992).
13. Shimosato K., Tomita M., Ijiri I., *Urinary excretion of p-hydroxylated methamphetamine metabolites in man: I. A method for determination by high-performance liquid chromatography – electrochemistry*. *Arch. Toxicol.*, 59, 135–40 (1986).
14. Shulgin A.T., *How similar is substantially similar*. *J. Forensic Sci.*, 35, 10–12 (1990).
15. *TDx system assays: amphetamine/metamphetamine*, Abbott Laboratories Diagnostic Division, 12, 1 (1987).