

ZASTOSOWANIE POŁĄCZONEJ CHROMATOGRAFII GAZOWEJ I SPEKTROMETRII MASOWEJ (GC/MS) DO ANALIZY ZŁOŻONYCH MIESZANIN PSYCHOAKTYWNYCH AMIN

Dariusz Blachut¹, Ewa Mirkiewicz², Marta Bykas¹, Zdzisława Marczak¹,
Ewa Taracha², Bogdan Szukalski²

¹ Zakład Kryminalistyki i Chemii Specjalnej Urzędu Ochrony Państwa

² Zakład Biochemii Instytutu Psychiatrii i Neurologii w Warszawie

GAS CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY (GC/MS) APPLICATION IN THE ANALYSIS OF COMPLEX MIXTURES OF PSYCHOACTIVE AMINES.

ABSTRACT – Conditions have been developed for separation and identification of amphetamine and its eleven structural analogs, using the gas chromatography-mass spectrometry method. Separation of this complex mixture of amines was achieved on three capillary columns with phases: SPB-Octyl, BP-1 and MDN-35. On the column with SPB-5 the separation of ephedrine and p-methoxyamphetamine, as well as MDMA and p-hydroxyethylamphetamine was unsatisfactory, while MDA and p-hydroxymetamphetamine have not been separated at all. Good conditions for separation and identification of all the twelve amines were attained as a result of their derivatisation with the trifluoroacetic anhydride, characterized by a 100% efficacy with no by-products.

Practical usefulness of the developed conditions was checked by means of urinalysis in a patient undergoing methadone treatment, in whom amphetamine was detected in a screening test. Urinalysis not only confirmed the presence of the drug, but also detected the presence of nicotine and its two metabolites, as well as of methadone and three metabolites. Moreover, Selegiline (a medicine for Parkinson's disease) was detected.

Key words: amphetamine, designer drugs, gas chromatography, mass spectrometry.

WSTĘP

Według różnych szacunków nielegalna produkcja amfetaminy w Polsce stanowi 15-20% rynku europejskiego. Tak duża skala produkcji przyczynia się do wzrostu dostępności narkotyku wśród polskich narkomanów i coraz częściej na Oddziały Detoksykacyjne, obok pacjentów stosujących opiaty, trafiają osoby uzależnione od amfetaminy.

Jednakże problem stosowania amin psychoaktywnych do celów pozamedycznych nie ogranicza się do amfetaminy i metamfetaminy, gdyż na nielegalnym rynku poja-

wiło się wiele produktów ich modyfikacji strukturalnych, tzn. narkotyków zmodyfikowanych (designer drugs). Dochodzi do swoistej rywalizacji pomiędzy prawodawcą, obejmującym kontrolą nowe związki psychoaktywne pojawiające się na rynku, a nielegalnymi producentami próbującymi wprowadzić nowe narkotyki.

Wśród narkotyków zmodyfikowanych na szczególną uwagę zasługują tzw. entaktogeny, stosowane coraz częściej jako środki odurzające na dyskotekach oraz na tzw. „raving parties” – imprezach mających na celu grupowe przeżywanie oszołomienia narkotycznego. Należą do nich związki posiadające ugrupowanie 3,4-dioksymetylenowe: 3,4-metylenodioksyamfetamina (MDA), 3,4-metylenodioksymetamfetamina (MDMA), 3,4-metylenodioksy-N-etyloamfetamina (MDE) i [N-metylo-1-(3,4-metylenodioksyfenilo)-2-aminobutan] (MBDB).

Psychoaktywnym analogiem strukturalnym amfetaminy jest również katyna, różniąca się od niej tylko obecnością grupy hydroksylowej w łańcuchu bocznym oraz N-metylowa pochodna katyny – efedryna. Niektóre psychoaktywne analogi amfetaminy i metamfetaminy są już od dość dawna obecne na polskim rynku narkotykowym, a prawdopodobieństwo pojawienia się innych jest bardzo wysokie. Dlatego chemicy w laboratoriach kryminalistycznych muszą być przygotowani do analizy bardzo licznej grupy psychoaktywnych analogów amfetaminy zatrzymywanych przez policję, a toksykolodzy – do identyfikacji oraz ilościowego oznaczania tych analogów w płynach biologicznych. To drugie zadanie jest trudniejsze, gdyż nie ogranicza się do wykrywania substancji macierzystej, ale obejmuje również analizę metabolitów. Np. MDE można wykryć siedem dni po przyjęciu na podstawie identyfikacji w moczu metodą GC/MS specyficznego metabolitu – 3-metoksy-4-hydroksyetyloamfetaminy (4).

Amfetaminę można wykrywać za pomocą różnych testów immunologicznych – testu płytkowego Ontrak (Hoffmann – La Roche), testu paskowego Frontline (Boehringer Mannheim), testu wielozadaniowego Triage (Merck), a także metody immunofluorescencji w świetle spolaryzowanym – FPIA (Abbott), która opiera się na reakcji antygen-przeciwciała. Ta ostatnia metoda jest najbardziej rozpowszechniona, gdyż pozwala nie tylko wykryć obecność, ale również określić przybliżone stężenie amfetaminy w badanej próbce. Jej słabą stroną jest niska specyficzność, gdyż z przeciwciałami skierowanymi przeciw amfetaminie reagują również związki o zbliżonej do amfetaminy budowie chemicznej (tzw. reaktywność krzyżowa), co może prowadzić do błędnych wyników zarówno jakościowych, jak i ilościowych.

Ponadto dodatni wynik badania moczu metodą FPIA oznacza jedynie obecność w nim związków z grupy amfetamin, nie wskazuje natomiast, jakie to są związki. Ich identyfikacja wymaga zastosowania jednej z metod chromatograficznych: wysokosprawnej chromatografii cienkowarstwowej (HPTLC), chromatografii gazowej (GC) lub chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią masową (GC/MS). HPTLC wyróżnia się prostotą wykonania i nie wymaga kosztownej aparatury, ale w odniesieniu do złożonych mieszanin psychoaktywnych amin okazuje się najczęściej mało skuteczna (13).

Najbardziej czułą i specyficzną metodą identyfikacji złożonych mieszanin analogów strukturalnych amfetaminy i metamfetaminy jest chromatografia gazowa połączona ze spektrometrią masową (GC/MS).

Przydatność chromatografii gazowej do analizy amfetaminy i jej pochodnych wynika z dość dużej lotności i stosunkowo niskiej masy molowej tych związków. Badanie tą metodą ogranicza się w zasadzie do związków, których masa molowa nie przekracza 1000 daltonów. Dobre rezultaty daje stosowanie niepolarnych i słabo polarnych (np. BP-5, SE-30, SPB-5) kolumn kapilarnych o długości od 12 do 30 m. W przypadku identyfikacji i oznaczania tych związków w tabletkach, kapsułkach („działki” uliczne) analiza nie następuje z reguły większych kłopotów. Problemy pojawiają się przy monitorowaniu tych związków na poziomie stężeń rzędu ng/ml, a więc takich, jakie występują w płynach biologicznych. W strukturze niektórych substancji, będących metabolitami amin psychoaktywnych, występują dwie grupy funkcyjne – pierwszo- lub drugorzędowa aminowa (zasadowa) oraz kwaśna – fenolowa. Ze względu na obecność tych ugrupowań wykazują one bardzo dużą tendencję do nieodwracalnej adsorpcji zarówno na etapie przygotowania próbki (straty wywołane obecnością centrów absorpcyjnych na szkło), jak i podczas właściwej analizy chromatograficznej, szczególnie w przypadku oznaczeń ilościowych związku. Wymaga to spełnienia pewnych wymogów dotyczących obu etapów analizy. Niezbędne jest odpowiednie przygotowanie „drogi chromatograficznej”: komora nastrzykowa oraz kolumna kapilarna muszą być pozbawione centrów aktywnych posiadających własności adsorpcyjne. Na etapie przygotowania próbki, w czasie ekstrakcji, niezbędne jest stosowanie buforu gwarantującego stałe pH (ze względu na amfoteryczne właściwości związków) oraz zastosowanie standardu wewnętrznego.

W przypadku analizy chromatograficznej z detekcją FID (Flame Ionization Detector), NPD (Nitrogen – Phosphorus Detector) i ECD (Electron Capture Detector) identyfikacji związków dokonuje się w oparciu o czas retencji (czas, po jakim substancja wprowadzona do komory nastrzykowej chromatografu dochodzi do detektora). Taka metodyka identyfikacji wymaga zastosowania wzorców substancji analizowanych. Wynik porównania czasów retencji substancji wzorcowych i badanych stanowi jedno z podstawowych kryteriów ich identyfikacji. Nie są to jednak wyniki absolutnie jednoznaczne, gdyż różne substancje w określonych warunkach analizy mogą mieć identyczny czas retencji. W takich przypadkach w identyfikacji badanej substancji może pomóc zmiana parametrów analizy (np. zmiana programu temperaturowego), zastosowanie kolumn o innej polarności lub tzw. derywatywacja tj. przekształcanie związków analizowanych w łatwiejsze do analizy pochodne, np. trifluoroacetylowe (6); trichloroacetylowe (5), pentafluoropropionowe (3, 9) lub heptafluorobutyrylowe (7). Zasadniczym celem derywatywacji, w przypadku związków zawierających polarne grupy funkcyjne, jest związanie aktywnego wodoru, które prowadzi do wzrostu lotności oraz znacznego zmniejszenia stopnia nieodwracalnej absorpcji związku na fazie stacjonarnej kolumny i w komorze nastrzykowej. Dzięki temu na chromatogramach otrzymuje się wysokie piki o małej szerokości połówkowej. Spełnienie tych wymagań jest szczególnie istotne przy analizie materiału biologicznego.

Pełną i bardziej wiarygodną identyfikację składników mieszaniny związków uzyskać można stosując tzw. techniki łączone GC-MS, GC-FTIR, LC-MS (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry). Rejestrują one, oprócz czasu retencji, tzw. widma masowe (dla detekcji FTIR – widma w podczerwieni), które odzwierciedlają budo-

wę cząsteczki związku organicznego. Interpretacja otrzymanych widm polega w najprostszym przypadku na porównaniu go z katalogowym widmem masowym znajdującym się w komputerowej bazie danych. Komputerowe biblioteki widm masowych zawierają po kilkaset tysięcy widm i wyposażone są dodatkowo w specjalistyczne oprogramowanie służące do ich przeszukiwania. Może się jednak zdarzyć, że baza danych nie zawiera widma masowego analizowanej substancji, na przykład, gdy badane są próbki nowych związków o zmodyfikowanej strukturze, pobrane z miejsc ich nielegalnej syntezy. Istnieją reguły interpretacji widma masowego, które pozwalają na określenie przybliżonej liczby atomów węgla w cząsteczce (gdy zarejestrowany został pik jonu molekularnego). Można stwierdzić obecność w cząsteczce atomów chloru i bromu. Takie spostrzeżenia, jak również znajomość mechanizmów fragmentacji związków w detektorze masowym oraz informacje dostarczane przez inne metody instrumentalne – FTIR, ¹HNMR, ¹³CNMR i UV, pozwalają z reguły na określenie struktury związku badanego. Ostatecznym potwierdzeniem jest porównanie danych fizykochemicznych analizowanej substancji z danymi uzyskanymi dla wiarygodnego wzorca.

Należy podkreślić, że nie istnieje technika uniwersalna, automatycznie rozwiązująca wszystkie problemy i trudne sytuacje analityczne. Materiał badany zawiera bowiem często, oprócz substratów, substancji pośrednich i finalnych, także szereg zanieczyszczeń, np. specyficzne produkty uboczne, które zresztą często pozwalają określić metodę syntezy narkotyku (2, 15). Takie przypadki wymagają odwołania się do specjalistycznej literatury, a także doświadczenia i wiedzy chemicznej analityka.

MATERIAŁ

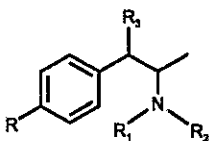
Wzorce siarczanu amfetaminy, chlorowodorku metamfetaminy, chlorowodorku 2,5-dimetoksy-4-metyloamfetaminy (DOM/STP) i chlorowodorku p-hydroksy metamfetaminy pochodziły z firmy Sigma Chemicals (ST. Louis, MO, USA). Chlorowodorek efedryny, chlorowodorek katyny (2-amino-1-fenylpropanolu-1) oraz chlorowodorek [N-metylo-1-(3,4-metylenodioksyfenilo)-2-aminobutan] (MBDB) otrzymano z Division of Narcotic Drugs, Vienna International Centre, ONZ.

Wzorce 3,4-metylenodioksyamfetaminy (MDA), 3,4-metylenodioksyetyloamfetaminy (MDEA), 3,4-metylenodioksymetamfetaminy (MDMA), etyloamfetaminy, propyloamfetaminy, butyloamfetaminy i p-metoksyamfetaminy (PMA) otrzymano w reakcji redukcyjnego alkilowania odpowiedniego ketonu chlorowodorkiem N-alkiloaminy lub – dla PMA – octanem amonu wobec cyjanoborowodorku sodowego. p-hydroksyetyloamfetaminę otrzymano przez redukcyjne alkilowanie p-metoksyfenyloacetonu chlorowodorkiem etyloaminy a następnie demetylację p-metoksyetyloamfetaminy w środowisku kwasu bromowodorowego. Surowe aminy oczyszczano metodą destylacji próżniowej i wytrącano w postaci chlorowodorków za pomocą suchego chlorowodoru w układzie izopropanol – eter dietylowy 1:1. Strukturę otrzymanych związków (Tabela 1) potwierdzono metodą chromatografii gazowej sprzężonej z detektorem mas oraz metodą spektrometrii w podczerwieni z wykorzystaniem transformacji Fouriera (FTIR) (1).

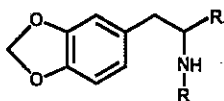
TABELA 1
Budowa chemiczna, nazwy systematyczne i używane skróty amfetaminy i jej psychoaktywnych analogów.

Związek chemiczny	Struktura	R	R ₁	R ₂	R ₃
amfetamina	I	H	H	H	H
metamfetamina	I	H	CH ₃	H	H
katyna	I	H	H	H	OH
efedryna	I	H	CH ₃	H	OH
p-metoksyamfetamina	I	OCH ₃	H	H	H
p-hydroksymetamfetamina	I	OH	CH ₃	H	H
3,4-metylenodioksyamfetamina [MDA]	II	H	H	-	-
p-hydroksyetyloamfetamina	I	OH	CH ₂ CH ₃	H	H
3,4-metylenodioksymetamfetamina [MDMA]	II	CH ₃	H	-	-
3,4-metylenodioksyetyloamfetamina [MDEA]	II	CH ₂ CH ₃	H	-	-
2,5-dimetoksy-4-metyloamfetamina [DOM, STP]	III				
N-metylo-1-(3,4-metylenodioksyfenylo)-2-aminobutan [MBDB]	II	CH ₃	CH ₂ CH ₃	-	-

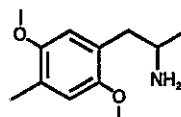
STRUKTURA I



STRUKTURA II



STRUKTURA III



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

Materiałem użytym do weryfikacji zastosowanej metodyki był mocz pacjenta Oddziału Detoksykacyjnego Instytutu Psychiatrii i Neurologii w Warszawie leczonego metadonem, u którego badanie skriningowe wykazało obecność substancji z grup amfetamin. Wskazuje to na nieprzestrzeganie abstynencji i może stanowić podstawę do relegowania z programu terapii metadonem.

METODY I WARUNKI ANALIZY

Do oceny poziomu amfetaminy w moczu zastosowano metodę immunofluorescencji w świetle spolaryzowanym (FPIA) (14) przy użyciu zestawu TDx Amphetamine/Metamphetamine Assay System.

Izolację amfetamin z moczu przed analizą chromatograficzną prowadzono metodą ekstrakcji ciecz-ciało stałe (Solid Phase Extraction – SPE) (8, 12) stosując kolumny (Bond Elut Certify Extration Columns – Varian) z sorbentem krzemionkowym, umieszczone w specjalnym urządzeniu do prowadzenia ekstrakcji pod regulowaną próżnią (Analytchem Vac Elut SPS 24™ – Varian). Kolumnę przygotowano do analizy przepuszczając kolejno 2 ml metanolu i 2 ml 0,1 ml buforu fosforanowego o pH 5, a

następnie podawano na nią próbkę badanego moczu o objętości 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 suszono przez 2 minuty. Zaadsorbowane amfetaminy eluowano 2 ml 2% roztworu amoniaku w octanie etylowym. Eluat odparowano do sucha i rozpuszczono w 50 μ l octanu etylowego. Na kolumnę chromatograficzną наносono 1,5 μ l ekstraktu, co odpowiada 0,3 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-difenylopirolidynę (EDDP).

Rozdział mieszaniny amin i identyfikację jej składników wykonano na chromatografie gazowym HP 5890 z detektorem płomieniowo – jonizacyjnym (FID). Temperatura komory nastrzykowej wynosiła 250°C, a detektor 280°C. Jako gaz nośny stosowano hel. Warunki analizy, zależne od rodzaju użytej kolumny kapilarnej, przedstawiono w opisie Tabeli 2.

Do badania mieszaniny amin metodą GC/MS stosowano chromatograf gazowy HP 6890 połączony z detektorem masowym HP 5973.

Do rozdziału użyto kolumnę kapilarną BP-1 o długości 25 m, średnicy wewnętrznej 0,22 mm i grubości filmu 0,25 μ m. Temperatura komory nastrzykowej wynosiła 240°C, temperatura źródła jonów 230°C, przepływ gazu nośnego (helu) 0,6 cm³/min. Temperaturę pieca zaprogramowano następująco: początkowa temperatura 100°C utrzymywała się przez 1 minutę, następnie wzrastała o 10°C/min do temperatury 280°C, którą utrzymywano przez 3 min. Czas trwania analizy wynosił 22 min.

Do badania ekstraktów moczu zmodyfikowano programy temperaturowe i podano je w opisie chromatogramów.

Przygotowanie próbek do analizy

Substancje wzorcowe (1,5 mg) rozpuszczono w 1 cm³ wody i alkalizowano 5% roztworem węglańu sodu, dodawano po 1 cm³ chloroformu i silnie wytrząsano przez 1 min. Warstwę organiczną oddzielano, suszono bezwodnym siarczanem sodu i podawano na kolumnę w ilości 1-2 μ l.

Derywatywacja bezwodnikiem kwasu trifluorooctowego (TFAA): 100 μ l chloroformowego roztworu standardu odparowywano do sucha w temperaturze pokojowej w strumieniu azotu. Do pozostałości dodano 100 μ l 0,05 M roztworu trietyloaminy w heksanie, 50 μ l bezwodnika kwasu trifluorooctowego i ogrzewano w temperaturze 60°C przez 20 minut. Po ochłodzeniu, rozpuszczalnik i TFAA odparowywano w strumieniu azotu a pozostałość rozpuszczono w 50 μ l heksanu.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Rozdział chromatograficzny jest rezultatem oddziaływania pomiędzy substancją rozdzielaną a fazą stacjonarną. Mechanizm ten jest dość złożony i w skrócie można przyjąć, że zależy on od polarności substancji rozdzielanych, ich prężności pary w

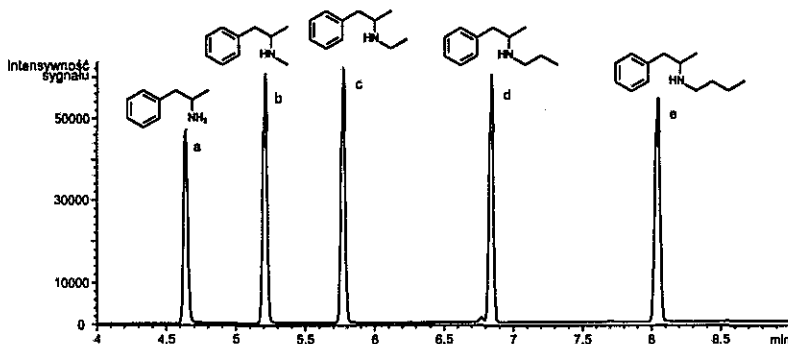
danej temperaturze oraz polarności fazy stacjonarnej. Lotność substancji zależy od wielkości cząsteczki (masy molowej) i obecności polarnych grup funkcyjnych, które decydują o polarności całej cząsteczki.

Nie ma ścisłych reguł doboru odpowiedniej fazy stacjonarnej do określonej grupy rozdzielanych substancji. Istnieje jedynie ogólna zasada, że związki polarne powinny być rozdzielane na kolumnach polarnych, a niepolarne – na niepolarnych (podobne oddziałuje z podobnym). Dlatego każda bardziej złożona analiza wymaga wstępnych prób mających na celu ustalenie optymalnych warunków postępowania.

W niniejszym opracowaniu stosowano kolumny z następującymi fazami stacjonarnymi:

- SPB-Octyl,[poli(50% n-oktyl/50% dimetylosiloksan)] – faza niepolarna;
- BP-1,[poli(dimetylosiloksan)] – faza niepolarna;
- SPB-5,[poli(5% difenyl/95% dimetylosiloksan)] – faza słabo polarna;
- MDN-35,[35% fenyl]metylpolisiloksan] – faza średnio polarna.

Dla każdej z kolumn dobierano indywidualnie optymalny program temperaturowy pieca. Na Ryc.1 przedstawiono rozdział amfetaminy i jej N-alkilowanych homologów. Czas retencji pochodnych rośnie wraz ze wzrostem masy cząsteczkowej, która wpływa na lotność związków, zmieniającą się z pewną prawidłowością w szeregu homologicznym. Podobnych zmian czasu retencji można oczekiwać przy tworzeniu łańcucha homologicznego także w innych miejscach cząsteczki amfetaminy.



Ryc. 1. Chromatogram mieszaniny amfetaminy i jej N-alkilowanych analogów. Oznaczenia: (a) amfetamina, (b) metamfetamina, (c) N-etyloamfetamina, (d) N-propyloamfetamina, (e) N-butyloamfetamina. Kolumna kapilarna SPB-5, 25 m × 0,2 mm × 0,33 μm, rodzaj nastrzyku: split 1:20, program temperaturowy kolumny: 125°C (0,5 min) – 270°C (3 min), przyrost 10°C/min.

Stwierdzenie to obowiązuje również dla szeregów homologicznych N-alkilowanych, podstawionych w pierścieniu, innych pochodnych fenyloizopropylamin. Dla każdej z zastosowanych kolumn (Tabela 2) czasy retencji pochodnych metylenodiosyamin zmieniają się wg następującego szeregu: MDE>MDMA>MDA.

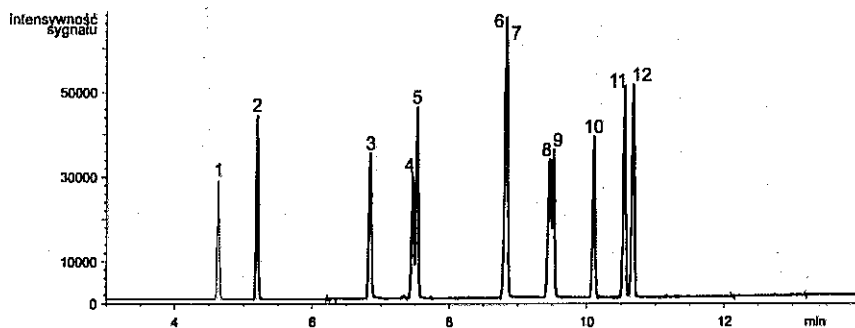
Przy wprowadzeniu innych podstawników, a w szczególności podstawników polarnych (np. grupy metoksyłowe, hydroksyłowe), nie można jednoznacznie przewidzieć kolejności elucji odpowiednich pochodnych. Można jedynie przypuszczać, że podstawnik wydatnie podnoszący masę cząsteczkową spowoduje wzrost czasu retencji. Istnieją

TABELA 2

Czasy retencji na kolumnach kapilarnych o różnej polarności oraz główne jony widm MS amfetaminy i jej psychoaktywnych analogów strukturalnych.

Związek chemiczny	czasy retencji amin [min]					Główne jony widm MS
	kolumna kapilarna					
	SPB-5 ^{a)}		SPB-Octyl ^{b)}	MDN-35 ^{c)}	BP-1 ^{d)}	
	Bez derywatyzacji	Pochodne TFA				
amfetamina	4,63	6,42	3,36	7,15	4,12	44,65,91,120
metamfetamina	5,20	7,87	4,06	7,73	4,79	58,65,91,134
katyna	6,83	6,60	5,33	10,75	6,46	44,77,51,105
efedryna	7,47	7,57	6,26	11,17	6,83	58,91,134,65
p-metoksyamfetamina	7,53	9,34	6,45	11,26	7,11	44,122,121,58
p-hydroksymetamfetamina	8,82	9,70	7,33	12,86	8,51	58,107,77,150
MDA	8,83	10,59	7,86	12,97	8,27	44,136,77,51
p-hydroksyetyloamfetamina	9,46	10,08	8,12	13,36	9,11	72,44,107,77
MDMA	9,52	12,12	8,85	13,48	8,97	58,135,77,136
MDEA	10,10	12,65	9,61	13,91	9,56	72,44,135,77
DOM	10,55	11,78	9,85	14,45	10,03	166,44,151,91
MBDB	10,67	12,89	10,29	14,61	10,07	72,135,88,178

a) – detekcja FID, kolumna kapilarna SPB-5, 25 m × 0,2 mm × 0,33 μm, program temp: 125°C (0,5 min) – 270°C (3 min), przyrost 10°C/min, split 1:20, b) – detekcja FID, kolumna kapilarna SPB-Octyl, 30 m × 0,32 mm × 0,25 μm, program temp: 110°C (1 min) – 260°C (2 min), przyrost 8°C/min, split 1:20, c) – detekcja FID, kolumna kapilarna MDN-35, 30 m × 0,25 mm × 0,25 μm, program temp: 100°C (0,5 min) – 270°C (3 min), przyrost 10°C/min, split 1:20, d) – detekcja MS, kolumna kapilarna BP-1, 25 m × 0,22 mm × 0,25 μm, program temp: 100°C (1 min) – 280°C (3 min), przyrost 10°C/min, split 6:1.



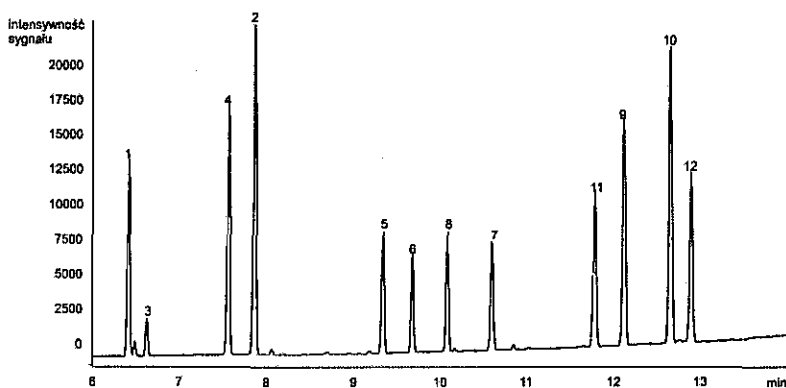
Ryc. 2. Chromatogram mieszaniny amfetaminy i jej analogów. Oznaczenia: (1) amfetamina, (2) metamfetamina, (3) katyna, (4) efedryna, (5) p-metoksyamfetamina, (6) p-hydroksymetyloamfetamina, (7) 3,4-metylenodioksyamfetamina [MDA], (8) p-hydroksyetyloamfetamina, (9) 3,4-metylenodioksyamfetamina [MDMA], (10) 3,4-metylenodioksyetyloamfetamina [MDEA], (11) 2,5-dimoksy-4-metyloamfetamina [DOM], (12) N-metylo-1-(3,4-metylenodioksyfenilo)-2-aminobutan [MBDB].

jednak wyjątki, np. czas retencji katyny po dołączeniu do cząsteczki dwóch grup trifluoroacetylowych uległ skróceniu o ok. 3%, a więc zmniejszenie polarności związku ma większy wpływ na zmianę czasu retencji niż przyrost masy cząsteczkowej. Podobne zjawisko kompensacji dwóch przeciwstawnych czynników obserwuje się po derywaty-

zacji efedryny, p-hydroksymetamfetaminy i p-hydroksyetyloamfetaminy. Względny przyrost czasu retencji wynosi od 1% do 9%, podczas gdy dla pozostałych związków zmienia się on od 11% dla DOM do ok. 50% dla metamfetaminy.

Dobry rozdział mieszaniny amfetamin osiągnięto na trzech kolumnach kapilarnych z fazami: SPB-Octyl, BP-1 i MDN-35. Kolumna SPB-5 nie gwarantowała dobrego rozdziału par efedryny i p-metoksyamfetaminy, MDMA i p-hydroksyetyloamfetaminy a MDA i p-hydroksymetamfetamina w ogóle nie uległy rozdzielaniu. Rozdział ostatniej z wymienionych par związków jest ważny z toksykologicznego punktu widzenia, gdyż p-hydroksymetamfetamina jest metabolitem metamfetaminy, a MDA narkotykiem „ulicznym” i jednocześnie metabolitem powstającym w wyniku demetylacji MDMA i deetylacji MDEA. Jednoczesna obecność tych substancji w płynach biologicznych narkomanów jest więc prawdopodobna, zwłaszcza że coraz częściej pojawiają się na nielegalnym rynku „kompozycje” zawierające np. mieszaninę amfetaminy i MDMA oraz metamfetaminy i MDE.

Powyższy problem rozwiązano przeprowadzając rozdzielane amfetaminy w pochodne trifluoroacetylowe (Ryc.3). Trifluoroacetamidy amin otrzymane przy nadmiarze odczynnika acetylującego posiadają bardzo dobre właściwości chromatogra-

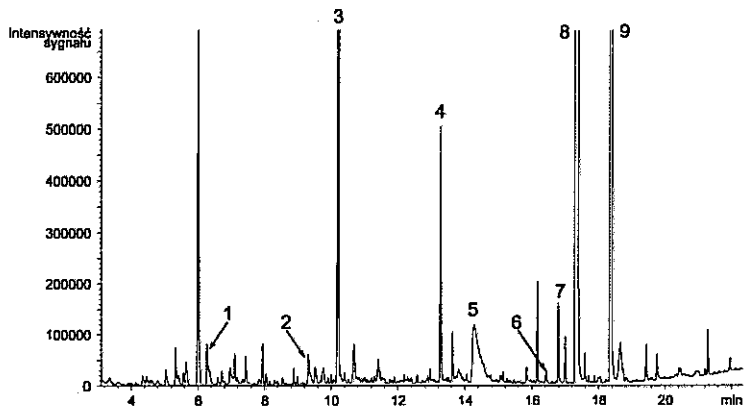


Ryc. 3. Chromatogram mieszaniny amfetaminy i jej analogów po derywatywacji odczynnikiem TFAA. Oznaczenia: (1) amfetamina, (2) metamfetamina, (3) katyna, (4) efedryna, (5) p-metoksyamfetamina, (6) p-hydroksymetyloamfetamina, (7) 3,4-metylenodioksyamfetamina [MDA], (8) p-hydroksyetyloamfetamina, (9) 3,4-metylenodioksyamfetamina [MDMA], (10) 3,4-metylenodioksyetyloamfetamina [MDEA], (11) 2,5-dimetoksy-4-metyloamfetamina [DOM], (12) N-metylo-1-(3,4-metylenodioksyfenylo)-2-aminobutan [MBDB].

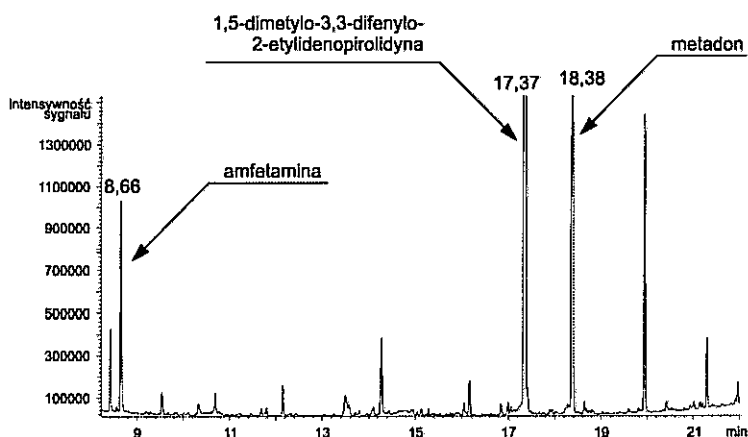
ficzne, powstają ze 100% wydajnością, a proces derywatywacji jest „czysty”, tj. nie dostarcza produktów ubocznych, utrudniających prowadzenie analizy chromatograficznej. Jedynym mankamentem jest dość mała trwałość produktów.

Należy zaznaczyć, że istnieją również inne sposoby rozwiązywania trudności związanych z rozdziałem chromatograficznym. Można np. zastosować wodór jako gaz nośny, co pozwala uzyskać większą ilość tzw. półek teoretycznych, decydujących o sprawności kolumny chromatograficznej. Jednakże praca z wodorem jest dość niebezpieczna. Dobry efekt przynosi niekiedy zmiana grubości fazy stacjonarnej oraz zwiększenie długości kolumny.

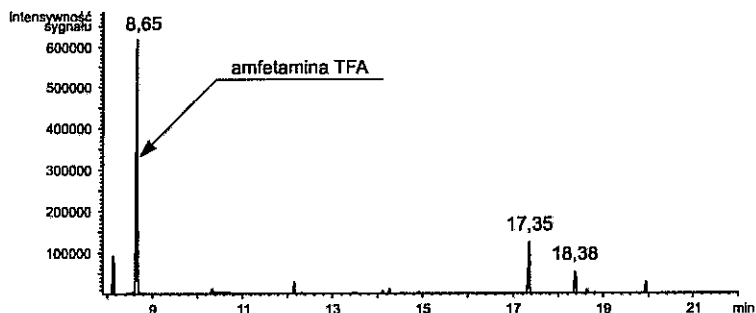
Zarejestrowano widma masowe wszystkich analizowanych amin psychoaktywnych (Tabela 1) i porównano je z widmami znajdującymi się w komputerowej bazie danych oraz w literaturze (1, 10, 11) stwierdzając bardzo dobrą zgodność. Widma ma-



Ryc. 4. Chromatogram całkowitego prądu jonowego (TIC) ekstraktu moczu (próbka 2859). Zidentyfikowane związki oraz warunki analizy zestawiono w Tabeli 3.



Ryc. 5. Chromatogram TIC ekstraktu moczu (próbka 2859) zawierającego amfetaminę po derywatacji TFAA.



Ryc. 6. Chromatogram SIM (monitorowano jony: 91, 118, 140) ekstraktu moczu (próbka 2859) zawierającego amfetaminę po derywatacji TFAA.

sowe, jak również dane retencji zarejestrowane dla wszystkich wzorców, stanowią wystarczający zespół cech fizykochemicznych umożliwiający jednoznaczną identyfikację każdej z pochodnych w analizowanych próbkach.

W moczu pacjenta uczestniczącego w programie leczenia metadonem badanie skринingowe metodą immunofluorescencji w świetle spolaryzowanym (FPIA) wykazało obecność amfetaminy w ilości 6000 ng/ml. Istniało więc domniemanie, że pacjent złamał abstynencję, za co może grozić relegowanie z programu.

Wykonano więc weryfikację wyniku badania skринingowego metodą GC/MS (Ryc. 4). Ryc. 5 przedstawia chromatogram tej samej próbki moczu po derywatyzacji ekstraktu za pomocą bezwodnika kwasu trifluorooctowego, a Ryc. 6 – chromatogramu SIM po derywatywacji TFAA.

Na Ryc. 4 widać wyraźny pik amfetaminy oraz 8 pików odpowiadających związkom zestawionym w Tabeli 3.

Są to: metadon i jego trzy metabolity – 2-etylo-5-metylo-3,3-difenylopirolidyna, 1,5-dimetylo-3,3-difenylo-2-etylideno-pirolidyna (EDDP) i pochodna normetadonu, nikotyna i jej dwa metabolity – kotynina i 3-hydroksykotynina oraz selegilina (fenyloizopropylometylopropynyloamina).

TABELA 3

Czasy retencji związków wykrytych w badanym moczu. Warunki analizy: detekcja MS, program temp. 80°C (1,5 min) – 285°C (20 min), przyrost 10°C/min, split 6:1.

Związek chemiczny	Czas retencji [min]
amfetamina	6,28
nikotyna	9,32
selegilina	10,22
kotynina (metabolit nikotyny)	13,28
3-hydroksykotynina	14,29
2-etylo-5-metylo-3,3-difenylopirolidyna	16,43
metabolit normetadonu (c19h21n)	16,79
1,5-dimetylo-3,3-difenylo-2-etylideno-pirolidyna	17,37
metadon	18,38

Pik amfetaminy występuje również na chromatogramach otrzymanych po derywatywacji ekstraktu moczu za pomocą TFAA (Ryc. 5 i Ryc. 6), co dodatkowo potwierdza fakt złamania abstynencji i przyjęcia narkotyku przez pacjenta. Obecność nikotyny oraz jej metabolitów dowodzi, że pacjent jest palaczem tytoniu, a metadonu i metabolitów, że przyjmuje ten środek w ramach terapii uzależnienia od opiatów. Ponadto wykryto selegilinę – lek hamujący swoicie mitochondrialną monoaminooxidazę stosowany w chorobie Parkinsona.

STRESZCZENIE

Opracowano warunki rozdziału i identyfikacji amfetaminy i jej jedenastu analogów strukturalnych metodą połączonej chromatografii gazowej i spektrome-

trii masowej. Rozdział tej złożonej mieszaniny amin osiągnięto na trzech kolumnach kapilarnych z fazami: SPB-Octyl, BP-1 i MDN-35. Natomiast na kolumnie SPB-5 rozdział efedryny i p-metoksyamfetaminy oraz MDMA i p-hydroksyetyloamfetaminy był niezadowalający, a MDA i p-hydroksymetamfetamina w ogóle nie ulegały rozdziałowi. Dobre warunki rozdziału i identyfikacji wszystkich dwunastu amin uzyskano w wyniku ich derywatywacji bezwodnikiem kwasu trifluorooctowego, która przebiega ze 100% wydajnością i nie daje produktów ubocznych.

Praktyczną przydatność opracowanych warunków zweryfikowano wykonując analizę moczu pacjenta leczonego metadonem, u którego badaniem skriningowym wykryto amfetaminę. Badanie moczu, oprócz potwierdzenia obecności narkotyku, wykazało obecność nikotyny i dwóch jej metabolitów oraz metadonu i trzech metabolitów. Wykryto również selegilinę – lek stosowany w chorobie Parkinsona.

Słowa kluczowe: amfetamina, narkotyki zmodyfikowane, chromatografia gazowa, spektrometria masowa.

PIŚMIENNICTWO

1. Dal Cason T. A., *The characterization of some 3,4-methylenedioxyphenylisopropylamine (MDA) analogs*, J. Forensic Sci., 34,, 928-961 (1989).
2. DeRuiter J., Clark C. R., Noggle F. T., *Gas Chromatographic and Mass Spectral Analysis of Amphetamine Products Synthesized from 1-Phenyl-2-Nitropropene*, J. Chrom. Sci., 32, 511-519 (1994).
3. DeRuiter J., Holston P. L., Clark C. R., Noggle F. T., *Liquid chromatographic and mass spectral methods of identification for regioisomeric 2,3- and 3,4-methylenedioxyphenalkylamines*, J. Chrom. Sci., 36, 131-138 (1998).
4. Ensslin H. K., Kovar K. A., Maurer H. H., *Toxicological detection of the designer drug 3,4-methylenedioxyethylamphetamine (MDE, „Eve”) and its metabolites in urine by gas chromatography-mass spectrometry and fluorescence polarization immunoassay*, J. Chromatogr., B: Biomed. Appl., 683, 189-197 (1996).
5. Hornbeck C. L., Czerny R. J., *Quantitation of amphetamine and methamphetamine in urine by capillary GC-MS. Part I. Advantages of trichloroacetyl derivatisation*, J. Anal. Toxicol., 13, 251-262 (1989).
6. Kronstrand R., *Identification of N-methyl-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-butanamine in urine from drug users*, J. Anal. Toxicol., 20, 512-516 (1996).
7. Kunsman G. W., Levine B., Kuhlman J. J., Jones R. L., Hughes R. O., Fujiyama C. I., Smith M., *MDA-MDMA concentration in urine specimens*, J. Anal. Toxicol., 20, 517-521 (1996).
8. 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).
9. Lora-Tamayo C., Tena T. T., Rodriguez A., *Amphetamine derivative related deaths*, Forensic Sci. Int., 85, 149-157 (1997).

10. Noggle Jr. F. T., Clark C. R., Andurkar S., DeRuiter J., *Methods for the analysis of 1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-butanamine and N-methyl-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-propanamine (MDMA)*, J. Chrom. Sci., 29, 103-106 (1991).
11. Pflieger K., Maurer H. H., Weber A., *Mass spectral and GC data of drugs, poisons, pesticides and their metabolites*, (1992), Weinheim, Germany.
12. Scheuer J., Moore C.M., *Solid Phase Extraction of Drugs from Biological Tissues – A Review*, J. Anal. Toxicol., 16, 264-269 (1992).
13. Szukalski B., Mirkiewicz E., Taracha E., *Badania amfetaminy i jej psychoaktywnych analogów w moczu narkomanów metodą FPLA i HPTLC*, Alkoholizm i Narkomania 1/26, 33-45 (1997).
14. TDX System Assays: *Amphetamine/Methamphetamine*, Abbott Laboratories Diagnostic Division, 12, 1 (1987).
15. Verweij A. M. A., *Impurities in Illicit Drug Preparation: Amphetamine and Methamphetamine*, Forensic Sci. Rev., 1, 1-11 (1989).