

ZASTOSOWANIE METODY IMMUNOFLUORESCENCJI W ŚWIETLE SPOLARYZOWANYM (FPIA) I METOD CHROMATOGRAFICZNYCH DO ANALIZY P-METOKSYAMFETAMINY (PMA) I P-METOKSYMETFAMINY (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

APPLICATION OF THE FLUORESCENCE POLARIZATION IMMUNOASSAY AND CHROMATOGRAPHIC METHODS FOR DETERMINATION OF P-METHOXYAMPHETAMINE (PMA) AND P-METHOXYMETHAMPHETAMINE (PMMA) IN URINE AND NON-BIOLOGICAL MATERIAL

ABSTRACT – Suitability of the TDx amphetamine test in detection of amphetamine-related drugs of abuse was tested. It was found that cross reactivity of the test antibodies is very high for PMMA and MDA (over 100% at the concentration of 500 ng/ml), which makes it possible to use the FPIA method in screening of urine samples for the presence of these drugs, providing the urine does not contain other cross reactive substances. This condition being fulfilled, it is also possible to detect the hydroxylated metabolites – p-OH-A and p-OH-MA, although the cross reactivity of the antibodies is in this case much lower (at 500 ng/ml 40 and 60% respectively). However, cross reactivity for PMA and MDE is negligible, and their detection with the TDx test is practically impossible.

Following derivatization, PMA, PMMA and their hydroxylated metabolites were separated and identified by gas chromatography – mass spectrometry (GC-MS) in the presence of other psychoactive substances, which abound on Polish illicit drug market, i.e.: amphetamine, methamphetamine, α -phenylethylamine, MDMA, MDA and MDE.

Analysis of the urine of a 23 year old man, who died suddenly, presumably due to an overdose of drugs, and of the tablet fragment found near the body,

revealed the presence of PMA, PMMA, ephedrine and amphetamine. The composition of drugs in the tablet fragment was: PMA – 16%; PMMA – 13%; ephedrine – 4%, amphetamine – 1%. Trace amounts of p-methoxyethylamphetamine, p-methoxydimethylamphetamine and p-hydroxyamphetamine were also found. **KEY WORDS:** p-methoxyamphetamine (PMA), p-methoxymethylamphetamine (PMMA), gas chromatography (GC), mass spectrometry (MS), cross-reactivity, FPIA.

WSTĘP

W latach 90. na rynku narkotykowym w USA i w Europie Zachodniej, a także w Polsce, pojawiło się wiele nowych substancji psychoaktywnych pochodnych fenylizopropylaminy (amfetaminy) i fenyletylaminy (9). W tym okresie Polska zyskała niedobłą sławę jednego z najpoważniejszych nielegalnych producentów amfetaminy wytwarzanej różnymi metodami przez liczne zakonspirowane laboratoria. Znaczna część tej produkcji była i jest przemykana 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 fenylizopropylaminy 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-metoksyamfeta-

minę (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 pozacuropejskim 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 substytuty (14).

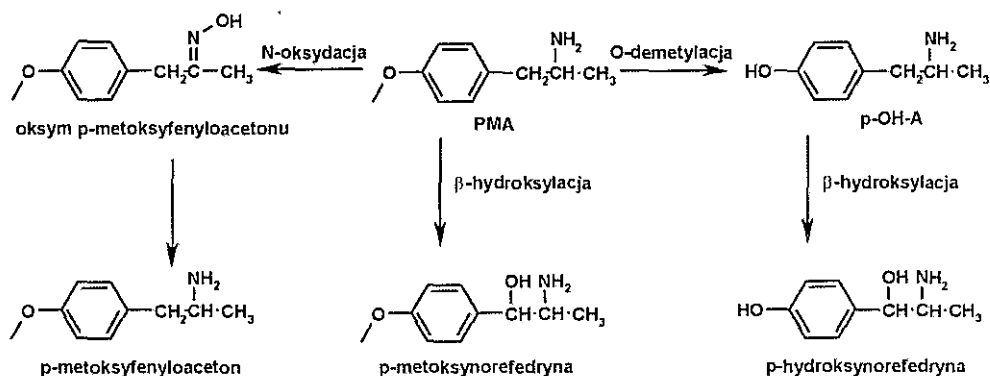
Niebezpieczną cechą obu narkotyków jest mała różnica między dawką skuteczną, tj. wywołującą efekty oczekiwane przez biorcę, a dawką śmiertelną. Np. „efektywna” dawka PMA wynosi 0,75 mg/kg, tj. 52 mg dla osoby o wadze 70 kg, a śmierć może nastąpić już po przyjęciu 140 mg.

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, szczykościsk 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-hydroksyindoloocetowego w wielu regionach mózgu oraz zmniejszenie liczby miejsc wiążących serotoninę. Jednak jej neurotoksyczność wobec układu serotonergicznego, tj. zdolność do nieodwracalnego uszkodzenia neuronów serotonergiczných, 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 para-metoksy pochodnych nie obserwuje się takiego wpływu N-metylacji (brak wyraźnej różnicy w neurotoksyczności PMA i PMMA) (6).

Szlak metaboliczny PMA w organizmie ludzkim obejmuje proces oksydatywnej dezaminacji do p-metoksyfenyloacetonu poprzez związek pośredni o strukturze oksymu. W procesie β -hydroksylacji łańcucha bocznego w cząsteczce PMA powsta-

je 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 wydalone są w moczu przeważnie w postaci glukuronianów. Na uwagę zasługują p-OH-A i p-hydroksynorefedryna, gdyż wykazują pewną aktywność biologiczną (4) (ryc. 1).



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

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 chlorowodorokiem 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 chlorowodoroków 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) alkaliczowano 10% roztworem węgla sodowego (100 μl) i ekstrahowano chloroformem (1 μl). Warstwę organiczną po suszeniu bezwodnym Na_2SO_4 używano do analizy metodą GC-MS.

Derywatywacja narkotyków

Ekstrakt wzorca (100 μl), tabletki (100 μl) lub moczu (500 μl) odparowywano w temperaturze 40°C w strumieniu azotu. Do pozostałości dodawano 400 μl 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 μl 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 świe-

tle 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 PFFA. Po usunięciu nadmiaru reagenta pozostałość rozpuszczano w 400 μ l octanu etylu i analizowano metodą GC-MS (objętość nastrzyku $V = 1\mu$ l).

Fragmenty tabletki znalezione przy denacie rozcierano i 10-15 mg proszku rozpuszczano w 1 ml wody zawierającej standard wewnętrzny – chlorowoderek 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), chlorowoderek efedryny (od 0,5 do 3 mg), chlorowoderek p-metoksyamfetaminy (od 1 do 8 mg) oraz chlorowoderek p-metoksymetyloamfetaminy (od 1 do 8 mg) otrzymano rozpuszczając odważone substancje wzorcowe w 1 ml wody zawierającej standard wewnętrzny – chlorowoderek 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 nastrzyku 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 prób-

ka 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 chlorowodorków 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

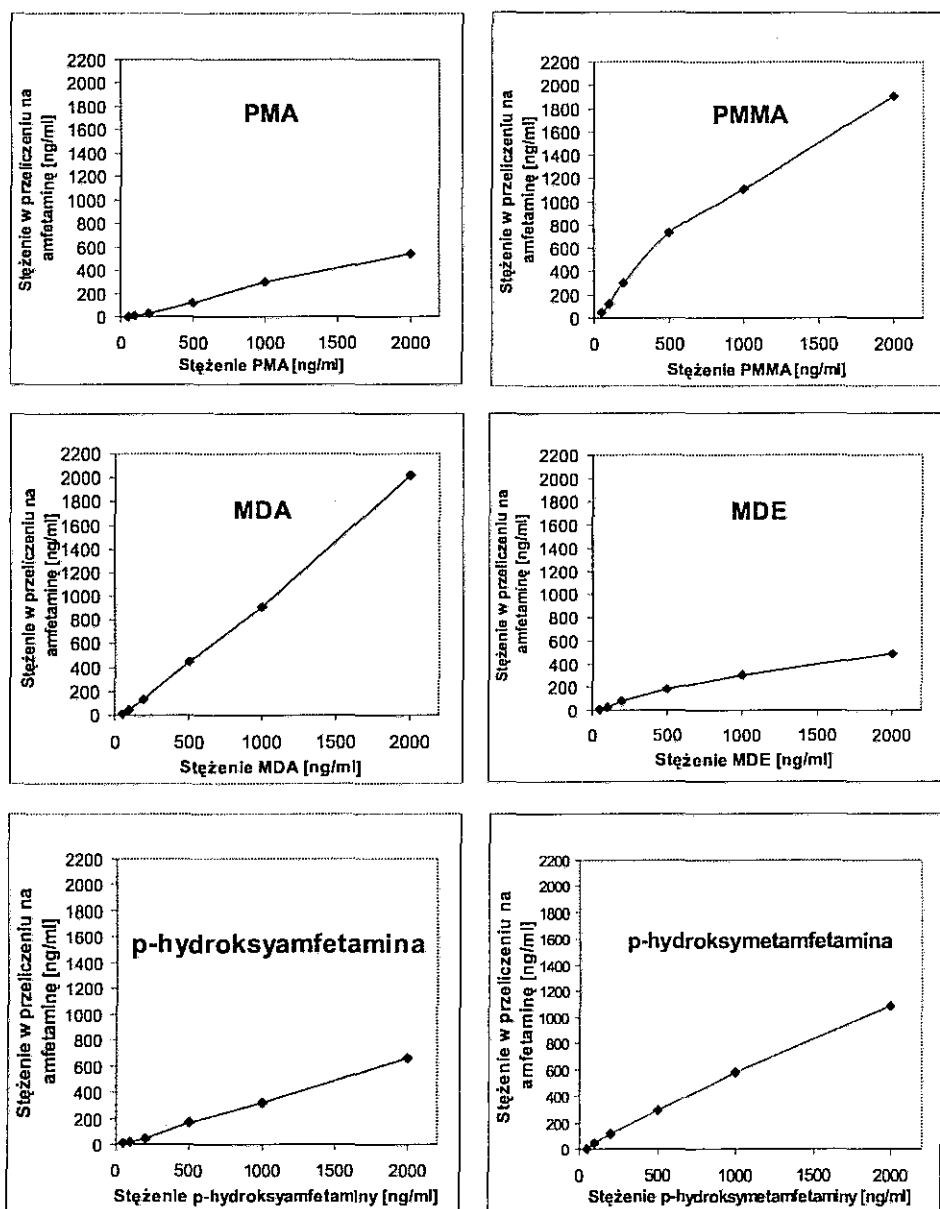
Na ryc. 2 przedstawiono wykresy obrazujące reaktywność krzyżową PMA, PMMA, MDA i MDE – psychoaktywnych analogów amfetaminy i metamfetaminy oraz p-OH-A i p-OH-MA – głównych metabolitów amfetaminy, metamfetaminy, PMA i PMMA – z przeciwciałami amfetaminowego testu TDx.

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.

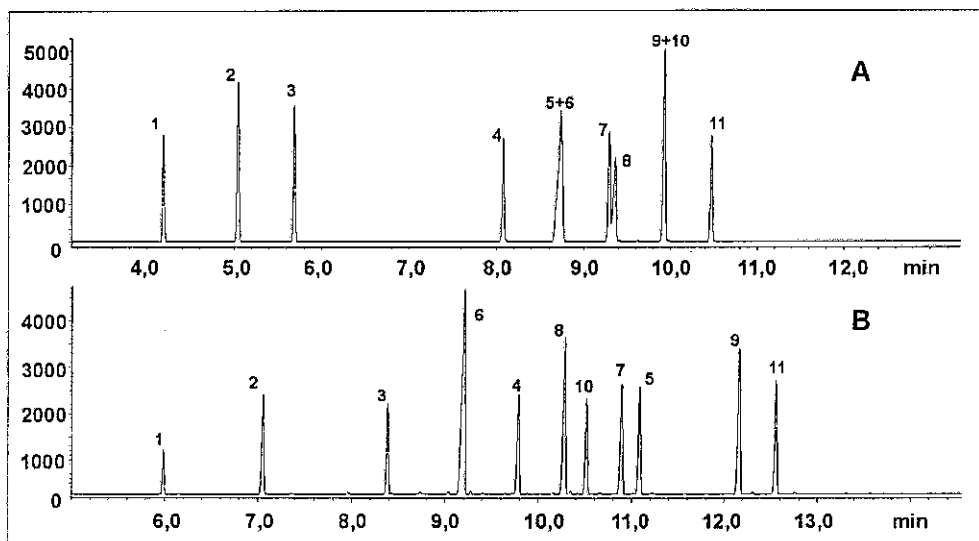
Z 11 składników mieszaniny, dobrze oddzielone piki uzyskano dla α -fenyloetyloaminy, amfetaminy, metamfetaminy, PMA i MDE, natomiast pary związków: PMMA i p-OH-A, MDA i p-OH-MA oraz MDMA i p-OH-E nie rozdzielały się w sposób zadowalający. Zastosowano więc derywatyzację mieszaniny analitów PFPA i otrzymane 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

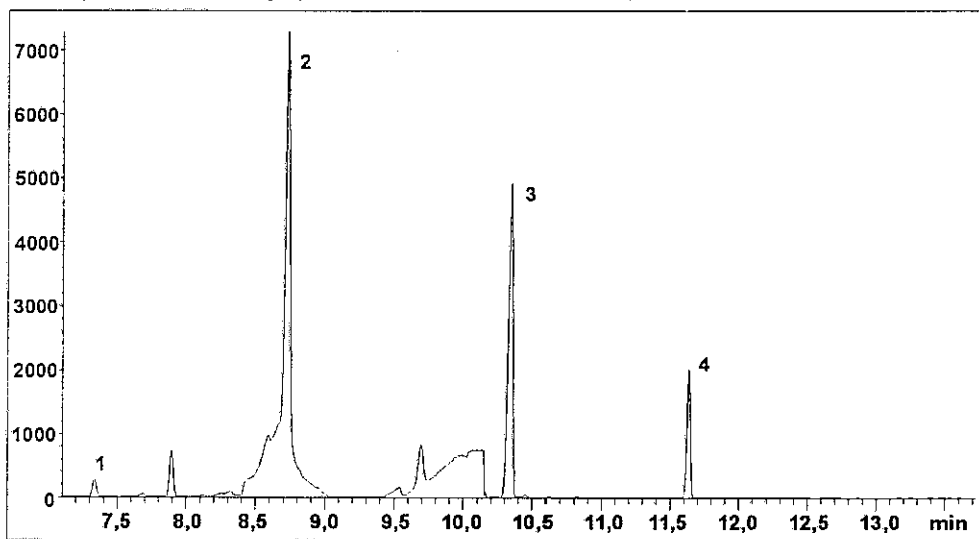


Ryc. 2. Reaktywności krzyżowe psychoaktywnych analogów amfetaminy oraz ich metabolitów z przeciwciałami testu amfetaminowego TDx. Oś x – stężenie dodane; oś y – stężenie znalezione.

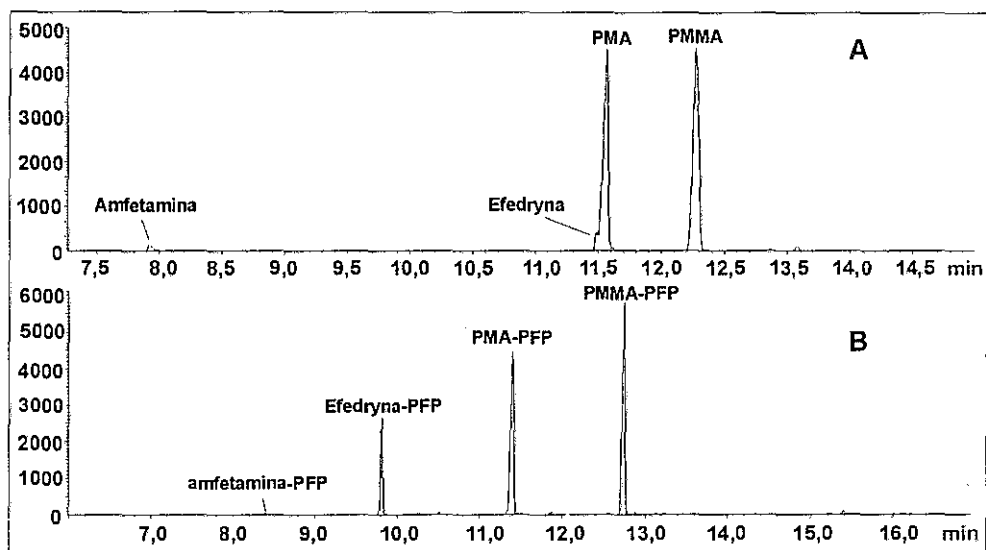
rejestracją wybranych jonów (SIM) po derywatywacji ekstraktu bezwodnikiem kwasu pentafluoropionowego, przedstawia ryc. 4. Zidentyfikowano PMA, PMMA, amfetaminę i efedrynę, które na chromatogramie tworzą rozdzielone piki. Metoda derywatywacji umożliwiła dobrą separację efedryny i PMA, które bez przekształcenia w



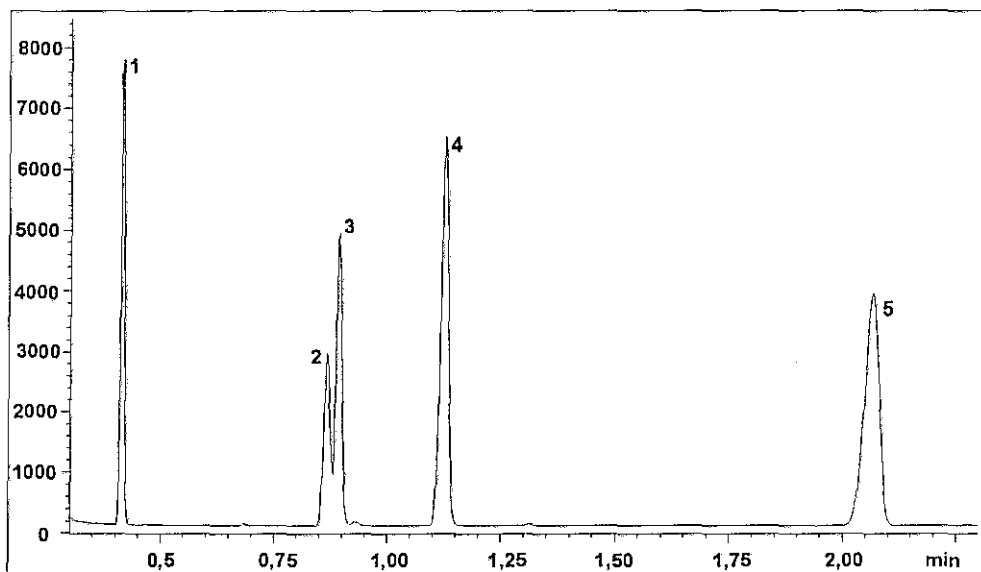
Ryc. 3. Rozdział chromatograficzny jedenastu analogów amfetaminy, A – mieszanina wolnych zasad; B – mieszanina pochodnych pentafluoropropionowych; 1 = *a*-fenyloetyloamina; 2 = amfetamina; 3 = metyloamfetamina; 4 = PMA; 5 = PMMA; 6 = *p*-OH-A; 7 = MDA; 8 = *p*-OH-MA; 9 = MDMA; 10 = *p*-OH-EA; 11 = MDE. 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 $F=1,5$ ml/min, kolumna kapilarna HP-5 30 m x 0,25 mm x 0,25 mm, program temperaturowy 100°C (1,0 min), przyrost $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ do 280°C (3,0 min).



Ryc. 4. Chromatogram ekstraktu moczu po derywacji bezwodnikiem kwasu pentafluoropropionowego uzyskany metodą GC-MS-SIM. 1 = PFP-amfetamina; 2 = PFP-efedryna; 3 = PFP-*p*-metoksyamfetamina (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 $F=0,6$ ml, kolumna kapilarna BP-5 20 m x 0,22 mm x 0,25 mm, program temperaturowy 90°C (2,0 min), przyrost $8^{\circ}\text{C}/\text{min}$ do 285°C (2,0 min).



Ryc. 5. Chromatogram GC-MS ekstraktu tabletki. A – analiza wykonana bez derywacji; B – analiza pochodnych PFP. Warunki analizy: system GC-MS (Ryc.4), zmodyfikowano program temperatury: 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).

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 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.

TABELA 1

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

Substancja ^a	Zawartość nominalna % [wag]	Zawartość zmierzona ^b % [wag]	Odchylenie standardowe SD	Współczynnik zmienności CV %	Przedział ufności wartości średniej ^c
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.

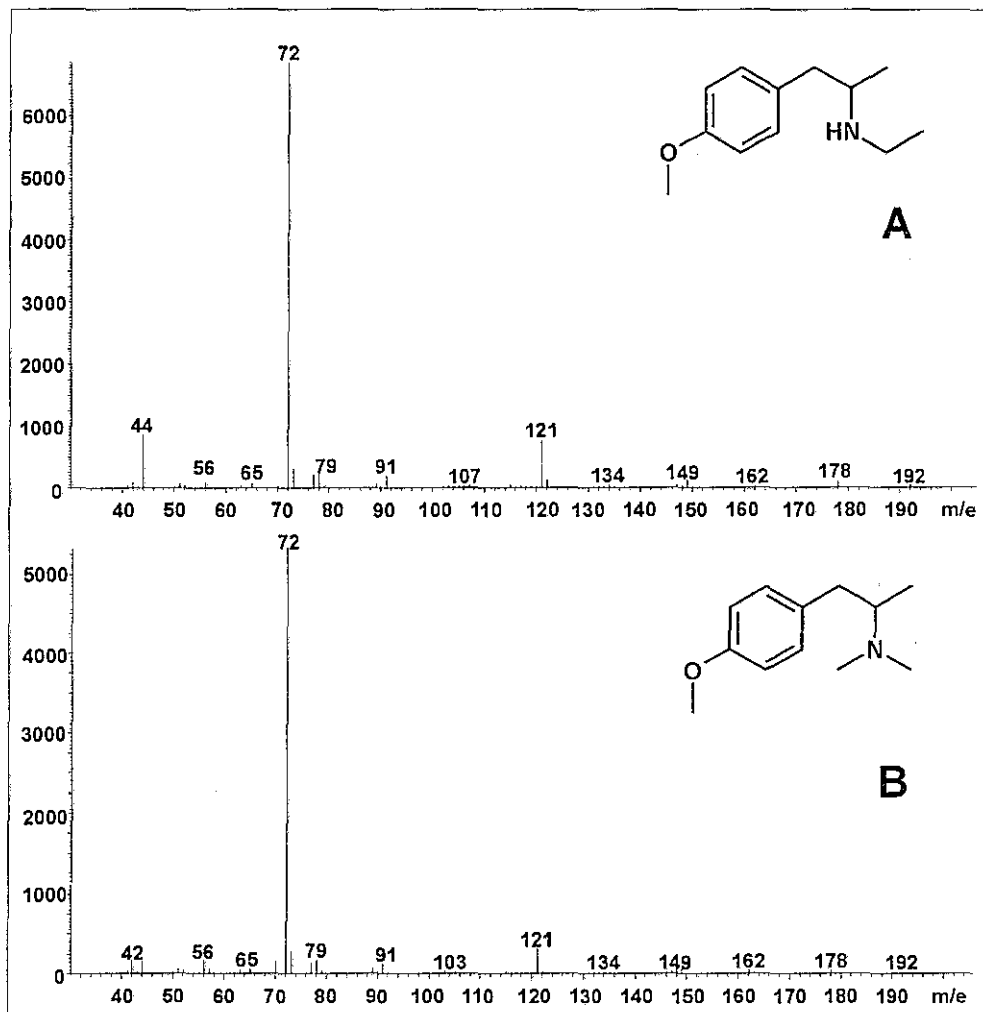
b – wartość średnia, ilość oznaczeń n=6.

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

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



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

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. dery-

watyzacja) może być utrudniona. 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 skriningowego 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 derywatacji 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.

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 derywatacji 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 w fragmencie tabletki wynosiła: PMA – 16%, PMMA – 13 %, efedryna – 4%, amfetamina – 1 %. Stwierdzono również, że badany materiał zawiera śladowe ilości p-metoksytyloamfetaminy, 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. Blachut 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 fenylotalkilaminami*. Z Zagadnień Nauk Sądowych, 2002, 48, 118-126.
12. Midha K.K., Coats 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.