

OZNACZANIE AMFETAMINY I JEJ METABOLITÓW METODĄ GC-MS

Wstęp

Amfetamina i jej pochodne (metamfetamina, MDMA) są jednymi z popularniejszych narkotyków w Polsce. Chociaż ich działanie jest raczej krótkotrwałe to zarówno niezmienną postać narkotyku jak i jego metabolity można wykryć w płynach ustrojowych (krew, ślina, moczu), włosach i paznokciach.

Tabela 1. Czas detekcji substancji psychoaktywnych w próbkach biologicznych [3, 24]

Substancja	Czas wykrycia badanej substancji w próbce biologicznej [h]			Literatura
	krew	mocz	włosy	
Amfetamina i Metamfetamina	5 b.d.	72 72	Kilka miesięcy b.d.	[3] [24]
Kokaina	10 b.d.	72 72	Kilka miesięcy b.d.	[3] [24]
Opiaty	10 b.d.	72 72	Kilka miesięcy b.d.	[3] [24]
Kannabinole	5 b.d.	120 120	Kilka miesięcy b.d.	[3] [24]
Benzodiazepiny	24 b.d.	72 72	Kilka miesięcy b.d.	[3] [24]

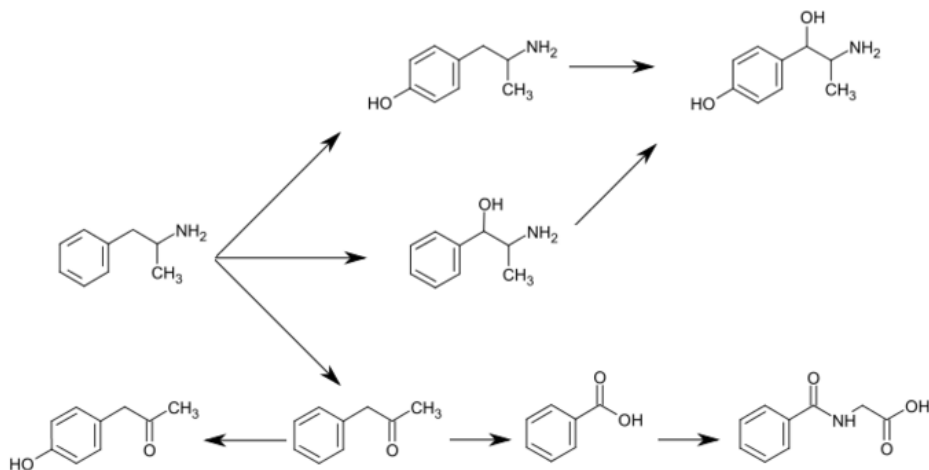
Wstępne oznaczenie zwykle wykonuje się za pomocą narkotestów, należy jednak pamiętać, że ich skuteczność wynosi 90-95% i czasem potrafią dawać fałszywy wynik pozytywny.

1. **Odczynnik Marquisa** – wykrywanie amfetaminy, metamfetaminy, MDMA, MDEA, MBDB, heroiny, morfiny i kodeiny
2. **Odczynnik kwas azotowy stężony** – potwierdzenie obecności heroiny, morfiny i kodeiny
3. **Odczynnik Simona** – wykrywanie metamfetaminy, MDMA, MDEA i MBDB
4. **Odczynnik Meckego** – odróżnianie morfiny od heroiny i kodeiny
5. **Odczynnik Scotta** – wykrywanie kokainy
6. **Odczynnik Dille-Koppányiego** – wykrywanie barbituranów
7. **Odczynnik Ehrlicha** – wykrywanie LSD
8. **Odczynnik Fast Blue B Salt** – wykrywanie produktów Cannabis: marihuany i haszyszu

Analiza jakościowa

Ostateczne potwierdzenie obecności narkotyków wykonuje się, metodą chromatografii gazowej sprzężonej z detektorem mas i porównaniem wyników z biblioteką lub wzorcem. Podczas analizy jakościowej oprócz samych narkotyków oznacza się także obecność produktów metabolizmu takich jak norefedryna, kwas benzoesowy, 4-hydroksyamfetamina, fenyloaceton (BMK). Należy przy tym pamiętać, że także niektóre leki podczas ich rozpadu metabolicznego wydzielają amfetaminę.

W celu poprawienia lotności analizowanych substancji i polepszenia jakości chromatogramu tj. stosunku sygnał/szum, kształtu pików i rozdziału, stosuje się derywatyzację grup funkcyjnych np. grupami silylowymi (MTSFA) lub chloromrówczanami etylu bądź metylu.



Analiza ilościowa

Metoda z wzorcem wewnętrznym polega na dodaniu do próbki znanej ilości składnika, tzw. wzorca wewnętrznego (IST), który jest możliwie najbardziej zbliżony budową do substancji oznaczanych jednak dający wyraźny, osobny pik na chromatogramie. Wzorec ten nie może być obecny w analizowanych próbkach przed jego dodaniem. W celu uzyskania krzywej kalibracyjnej, do kilku roztworów wzorcowych o różnych stężeniach substancji oznaczanej, dodaje się najczęściej stałą i znaną ilość wzorca wewnętrznego. Na podstawie uzyskanych chromatogramów roztworów wzorcowych, wykreśla się zależność stężenia analitu w funkcji stosunku powierzchni pików analitu i wzorca wewnętrznego.

Cel zadania

Wykryć narkotyki i ich metabolity w próbce mającej imitować moczu i oznaczyć zawartość metodą z wzorcem wewnętrznym.

Sprzęt i odczynniki

1. Chromatograf gazowy z detektorem MS - TQ8040 i autosamplerem AOC-20i firmy Shimadzu
2. Naczynka szklane do ekstrakcji ciecz-ciecz o pojemności 25 ml
3. Wodne roztwory wzorcowe amfetaminy, noreferdyny i pseudoefedryny o stężeniu 1 mg/mL
4. NaOH, AcOEt, czynnik derywatyzujący MTSFA

Wykonanie analizy

1. Przygotować roztwory wzorcowe:
 - a. Wzorec amfetaminy w metanolu o stężeniu 1 mg/mL
 - b. Wzorec benzyloaminy w metanolu o stężeniu 1 mg/mL

2. Chromatografia

- a. Pobrać do 3 penicylinówek po 200 μL roztworów o znanym stężeniu z punktu 1. i ich mieszaninę 1:1 (po 200 μL),
- b. Do każdej fiołki dodać nas. K_2CO_3 (ok. 1 mL).
- c. Do każdej z fiolek dodać 150 μL chloromrówczanu etylu i wytrząsać przez 20 sekund.
- d. Dodać Et_2O (2,5 mL), usunąć warstwę wodną pipetą, przenieść warstwę eterową do fiołki do GC-MS i wykonać nastrzyki testowe wzorcowych mieszanin ~~przed i~~ po derywatyzacji.
- e. Dobrać parametry analizy tak aby uzyskać dobry rozdział pików po derywatyzacji. Wyznaczyć współczynnik odpowiedzi detektora ze wzoru.

$$\frac{h_a}{h_{wz}} = f \frac{c_a}{c_{wz}}$$

Gdzie:

f - współczynnik odpowiedzi detektora,

h_a , h_{wz} - wysokość pików analitu i wzorca wewnętrznego dla roztworów o znanych stężeniach,

C_a , C_{wz} - stężenie analitu i wzorca w roztworach kalibracyjnych.

3. Wykonanie oznaczenia zawartości narkotyku w próbce moczu
 - a. Pobrać 0,5 mL analizowanej próbki moczu, dodać 100 μL roztworu wzorcowego benzyloaminy, nasycony wodny K_2CO_3 (ok. 1 mL) i 150 μL chloromrówczanu etylu. Wytrząsać przez 20 sekund i dodać Et_2O (2,5 mL), usunąć warstwę wodną, warstwę eterową przenieść do fiolek do GC-MS i wykonać nastrzyk.
 - b. Procedurę powtórzyć stosując 1 mL, 2 mL, 3 mL i 5 mL moczu.
4. Wyznaczyć stężenie wzorca w próbkach z punktu 3 zakładając objętość roztworu eterowego równą 2,5 mL.
5. Zawartość amfetaminy we wszystkich analizowanych próbkach moczu wyznaczyć wg wzoru z punktu e (pamiętając o różnych objętościach próbek moczu branych do analizy).