

Marek Wiergowski, Krystyna Reguła, Beata Szpiech

Szybka analiza amfetaminy w ludzkim materiale biologicznym z wykorzystaniem metody mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej w fazie nadpowierzchniowej

Fast analysis of amphetamine in human biological material using headspace solid phase microextraction

Z Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej AM w Gdańsku
p.o. Kierownik: dr hab. Z. Szczerkowska - profesor AM

Oznaczanie amfetaminy dla celów sądowo-lekarskich wymaga opracowania szybkiej i miarodajnej procedury analitycznej uwzględniającej właściwości fizyko-chemiczne amfetaminy oraz szczególny rodzaj materiału biologicznego (często będącego w stanie znacznego rozkładu gnilnego). W toku badań stwierdzono kilkukrotny wzrost czułości dla amfetaminy badanej z wykorzystaniem metody mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej (SPME) w fazie nadpowierzchniowej w stosunku do tradycyjnej metody analizy w fazie nadpowierzchniowej. Ponadto opracowana procedura charakteryzuje się krótkim czasem analizy, prostotą, zadowalającą dokładnością oraz ograniczeniem wpływu związków utrudniających miarodajne oznaczenie końcowe. Wykazano przydatność analizy amfetaminy w materiale biologicznym z wykorzystaniem metody SPME w fazie nadpowierzchniowej.

Determination of amphetamine for the purpose of forensic medicine needs fast and reliable analytical procedure taking into consideration the physical and chemical properties of amphetamine and complicated matrix of biological material (often in decay conditions). Analysis of headspace solid phase microextraction (SPME) was several-times as sensitive as a conventional headspace analysis. Moreover the elaborated procedure was characterized by speed of analysis, simplicity, good accuracy, and it reduces the potential for interference by co-administered compounds. Suitability of amphetamine analysis using headspace SPME for biological material investigation was presented.

Słowa kluczowe: amfetamina, mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej w fazie nadpowierzchniowej, ludzki materiał biologiczny, chromatografia gazowa

Key words: amphetamine, headspace solid phase microextraction (SPME), human biological material, gas chromatography

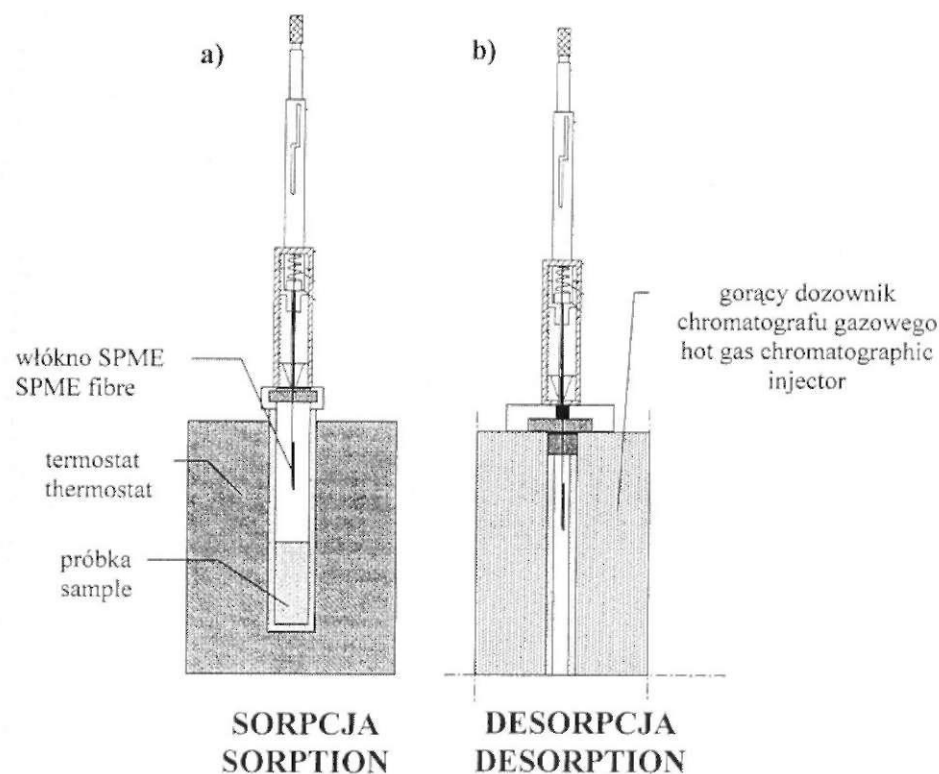
Oznaczenie amfetaminy w materiale biologicznym należy do często przeprowadzanej analizy w toksykologii sądowej. Przy czym istotne znaczenie ma nie tylko szybkość analizy, ale również czułość oraz granica wykrywalności oznaczeń. Yashiki i współpracownicy (4) w 1995 roku opublikowali dane dotyczące oznaczenia amfetaminy w moczu metodą mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej w fazie nadpowierzchniowej (ang. Head Space - Solid Phase Microextraction, HS-SPME). Podstawy metodyczne techniki mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej wprowadził i opracował profesor Janusz Pawliszyn, absolwent Politechniki Gdańskiej oraz jego współpracownicy z „The University of Waterh w Kanadzie (2, 3). Przedmiotem niniejszego opracowania jest wstępna praca teoretyczna i doświadczalna dotycząca szybkiej analizy amfetaminy z wykorzystaniem mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej w fazie nadpowierzchniowej w ludzkim materiale biologicznym: we krwi i w moczu.

Urządzenie do SPME ma kształt zbliżony do strzykawki. Najważniejszym jego elementem jest włókno kwarcowe pokryte fazą stacjonarną. Procedura analityczna SPME obejmuje zasadniczo dwa podstawowe etapy (uproszczony schemat procedury przedstawiono na ryc. 1). W pierwszym etapie (ryc. 1a) włókno jest doprowadzane do kontaktu z próbką w fazie gazowej (lub w fazie ciekłej), w wyniku czego dochodzi do sorpcji analitów. W drugim etapie (ryc. 1b) włókno jest wystawiane na działanie wysokiej temperatury w gorącym dozowniku chromatografu gazowego, a uwolnione anality przenoszone są do kolumny chromatograficznej.

Wyboru odpowiednich parametrów w SPME dokonuje się biorąc pod uwagę takie właściwości jak: lotność, polarność i masa cząsteczkowa analitów, złożoność składu chemicznego próbki czy współczynnik podziału analitu. Współczynnik podziału można w pewnym zakresie zmieniać przez modyfikację składu próbki, przy czym dobre efekty uzyskuje się przez dodatek soli (wzrost siły jonowej roztworu) bądź zmianę pH próbki. Czułość metody SPME można również zwiększyć przez zastosowanie grubszego filmu fazy stacjonarnej, co powoduje niestety wydłużenie czasu uzyskania równowagi w układzie. Stosowanie grubszego filmu wiąże się także z wydłużonym czasem kondycjonowania włókna i desorpcji termicznej analitów w dozowniku chromatografu gazowego. Włókna o grubym filmie fazy stacjonarnej (np. 100 pm) są bardziej przydatne do analizy związków lotnych (o temperaturze wrzenia do ok. 200°C), choć mogą być również użyte do związków mniej lotnych, ale wówczas czas ustalenia się równowagi jest dłuższy.

Amfetamina w postaci wolnej aminy jest bezbarwną cieczą o temperaturze wrzenia od 200°C do 203°C, przy czym absorbując dwutlenek węgla z atmosfery tworzy lotny związek - węglan amfetaminy (1). Zgodnie z zasadą że „podobny rozpuszcza się w podobnym” do analizowania związków o charakterze polarnym odpowiedniejsza jest faza bardziej polarna. W przypadku, gdy anality są związkami lotnymi lub mają wysoki współczynnik podziału, a badana próbka jest ciałem stałym lub cieczą o dużej zawartości związków organicznych o dużych

masach cząsteczkowych, lepszą techniką, z punktu widzenia czułości metody, jest SPME z fazy nadpowierzchniowej. Unika się wówczas „zablokowania” włókna przez związki organiczne, a czas konieczny do uzyskania stanu równowagi jest znacznie krótszy. Wynika to z faktu, że dyfuzja w gazach zachodzi czterokrotnie szybciej niż w fazie wodnej. Taki przypadek odnosi się do oznaczania amfetaminy w materiale biologicznym.

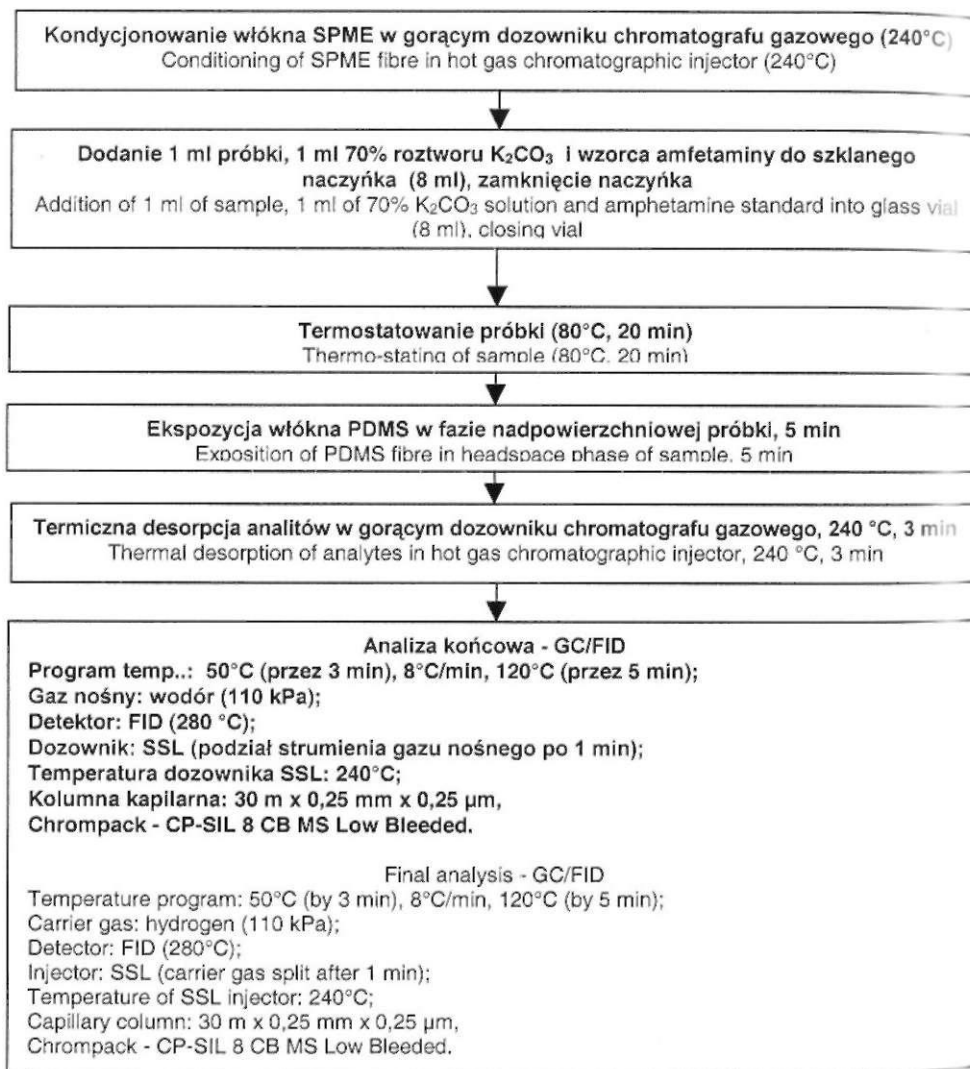


Ryc. 1. Procedura analityczna mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej (SPME)
 Fig. 1. Analytical procedure of solid phase microextraction (SPME).

MATERIAŁ I METODA

Procedura szybkiej analizy amfetaminy (ryc. 2) wymaga wstępnie kondycjonowania włókna SPME (100 pm, PDMS, „Supelco”) w gorącym dozowniku chromatografu gazowego przez czas konieczny do oczyszczenia włókna, czyli w praktyce od pół godziny do nawet kilku godzin. Dopiero po tym etapie można przystąpić do przygotowania próbki moczu i krwi do analizy końcowej. Do

szklanego naczynka przeniesiono po 1 ml próbki, dodano wzorzec amfetamir oraz roztworu węgłanu potasu. Zamknięto szczelnie naczynko i wymieszar zawartość. W trakcie termostatowania próbki amfetamina jest uwalniana do fazy nadpowierzchniowej. Po 20 min włókno SPME wprowadza się do fazy nadp wierzchniowej wewnątrz naczynka i ekspozuje przez 5 min. Termiczna desorpc analitów w gorącym dozowniku chromatografu gazowego uwalnia substancj które są dalej rozdzielane i oznaczane w układzie chromatograficznym GC-FID



Ryc. 2. Procedura oznaczania amfetaminy metodą HS-SPME-GC/FID.

Fig. 2. Procedure of amphetamine determination using HS-SPME-GC/FI method.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Krzywe kalibracyjne zawartości amfetaminy we krwi i moczu wyznaczone omawianą metodą dostarczają informacji o liniowości odpowiedzi detektora płomieniowo-jonizacyjnego wynoszącej około 0,96 (ryc. 3). Przy czym zastosowanie dodatku wzorca wewnętrznego może poprawić wartość współczynnika korelacji liniowej R^2 . Uwzględniając wartość t_{α} w trakcie analizy chromatograficznej oraz na podstawie krzywych kalibracyjnych obliczono stężenia granicy wykrywalności i oznaczalności amfetaminy we krwi i moczu (tabela I). Porównanie tych wartości ze stężeniami toksycznymi i śmiertelnymi (1) wypada na korzyść prezentowanej metody, co pozwala na wykorzystanie jej w praktyce toksykologicznej. Precyzję badanej procedury dla sześciu pomiarów próbek moczu z dodatkiem amfetaminy (stężenie amfetaminy - 10 pg/ml) określono jako 17% względnego odchylenia standardowego.

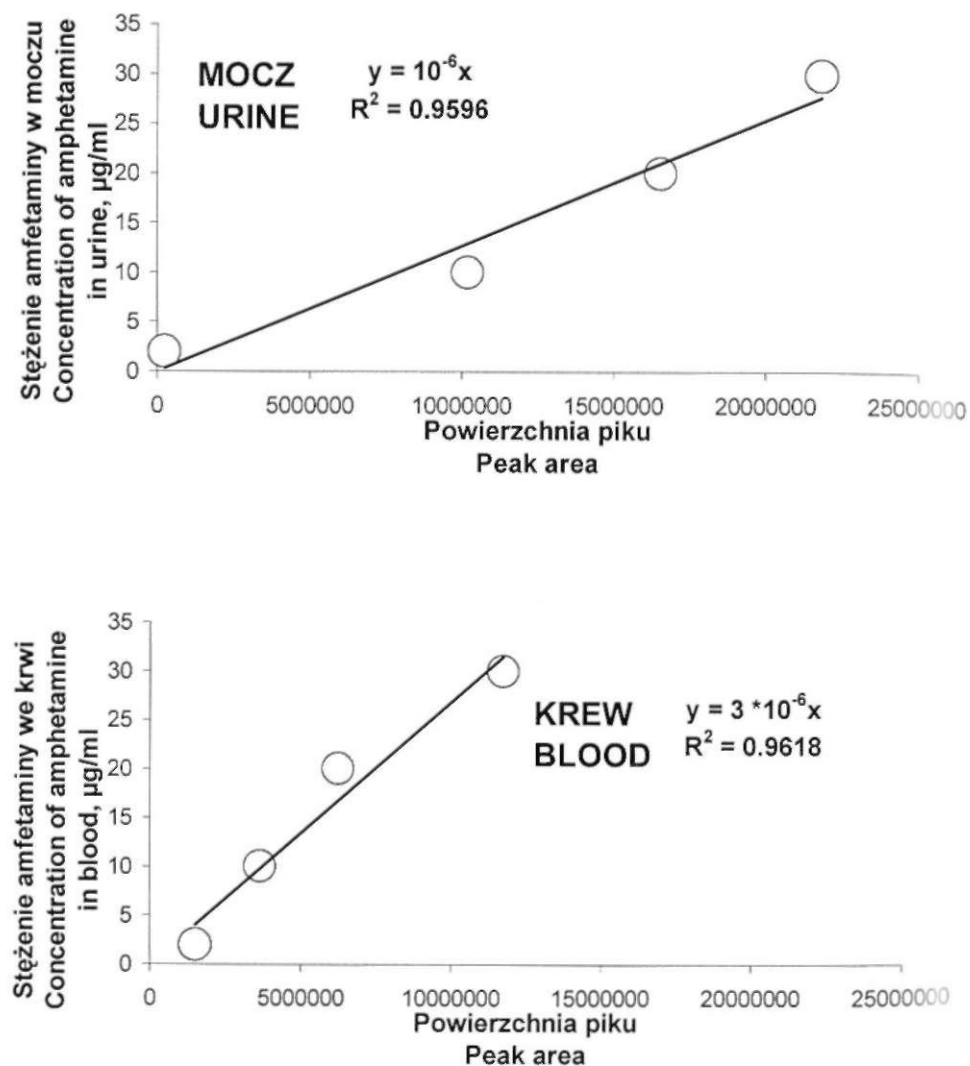
Tabela I. Granica wykrywalności i oznaczalności amfetaminy.

Table I. Detection and determination limit of amphetamine.

Materiał biologiczny Biological material	Granica wykrywalności Detection limit pg/ml	Granica oznaczalności Determination limit pg/ml
krw* blood	0,15	0,30
mocz urine	0,05	0,10

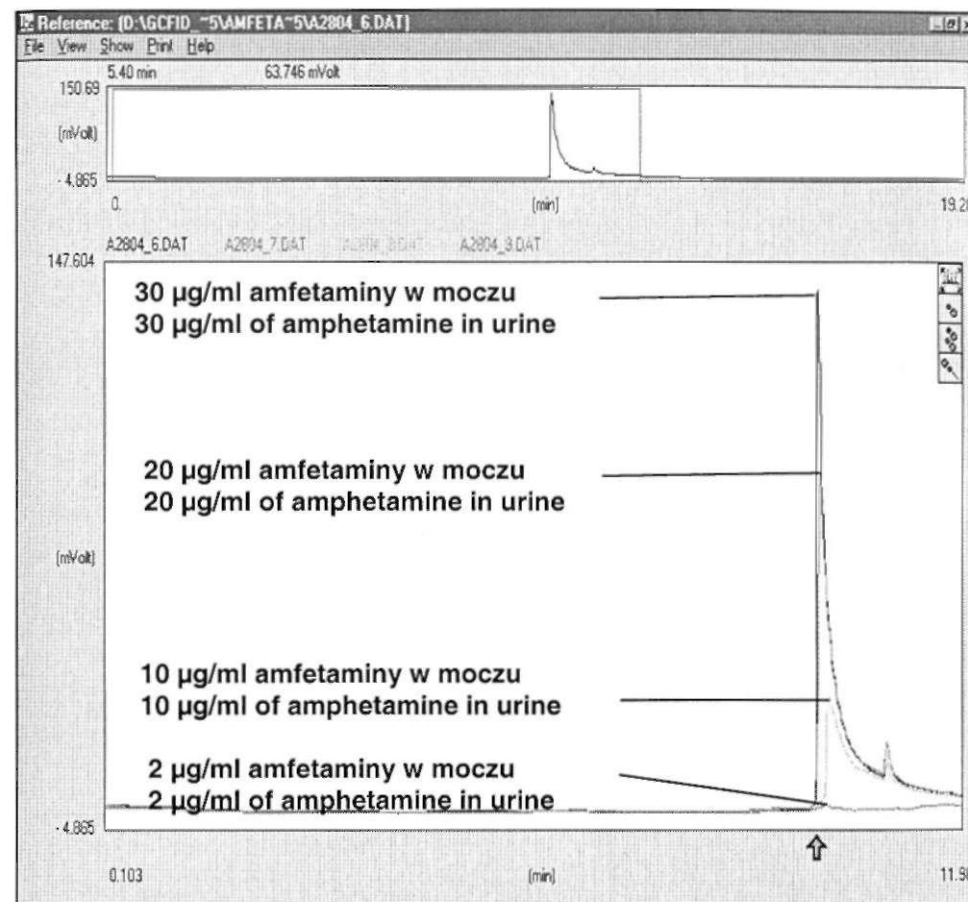
* Stężenie amfetaminy we krwi (1): **lecniczne** - od 0,05 do 2 pg/ml, **toksyczne** - od 1 do 3 pg/ml i **śmiertelne** - ponad 0,5 pg/ml (średnio 8,6 pg/ml)
Concentration of amphetamine in blood (1): **therapeutic** - from 0,05 to 2 pg/ml, **toxic** - from 1 to 3 pg/ml and **lethal** - above 0,5 pg/ml (average 8,6 pg/ml)

Na ryc. 4 porównano chromatogramy wykorzystane do wyznaczenia krzywej kalibracyjnej zawartości amfetaminy w moczu z detekcją płomieniowo-jonizacyjną. Warto zwrócić uwagę na ograniczenie wpływu związków utrudniających miarodajną analizę chromatograficzną, o czym świadczy niewielka ilość związków chemicznych w sąsiedztwie piku amfetaminy. Opracowaną procedurę wykorzystano do oznaczania amfetaminy we krwi i moczu mężczyzny-denata (stężenie amfetaminy w moczu wyniosło 9,9 pg/ml a we krwi 10,3 pg/ml), przy czym obecność amfetaminy w moczu była potwierdzona metodą immunofluorescencji w świetle spolaryzowanym.



Ryc. 3. Krzywe kalibracyjne zawartości amfetaminy we krwi (a) i moczu (b) wyznaczone metodą HS-SPME-GC/FID

Fig. 3. Calibration curves of amphetamine concentration in blood (a) and urin (b) determined by HS-SPME-GC/FID



Ryc. 4. Porównanie chromatogramów wykorzystanych do wyznaczenia krzywej kalibracyjnej zawartości amfetaminy w moczu (HS-SPME-GC/FID)

Fig. 4. Comparison of chromatograms applied to determination of calibration curves of amphetamine concentration in urine (HS-SPME-GC/FID)

WNIOSKI

1. W pracy wykazano przydatność metody SPME do badania zawartości amfetaminy w krwi i moczu. Zastosowana metoda pozwala na kilkukrotny wzrost czułości oznaczenia amfetaminy w stosunku do tradycyjnej metody analizy w fazie nadpowierzchniowej.
2. Do zalet metody SPME należy zaliczyć ograniczenie ilości koniecznych operacji analitycznych. Tym samym istnieje mniejsze ryzyko popełnienia

błędu grubego i systematycznego, a dodatkowo znacznie skraca się czas analizy.

3. Metoda jest prosta a jej koszty są relatywnie niskie. W odróżnieniu od innych metod wzbogacania analitów, w metodzie SPME całkowicie wyeliminować zużycie drogich i toksycznych rozpuszczalników. Ponadto charakteryzuje się ona ograniczeniem wpływu związków utrudniających miarodajne oznaczeń końcowe.
4. Metoda SPME wymaga jednak stosunkowo częstej kalibracji oraz szczególnej dbałości o czystość włókna sorpcyjnego. W celu uzyskania powtarzalnych wyników metodą SPME konieczne jest dokładne kontrolowanie i odtwarzanie parametrów procesu sorpcji i desorpcji analitów z włókna.

PIŚMIENNICTWO

1. Moffat A.C., Jackson J.V., Moss M.S., Widdop B., Clarke's isolation and identification of drugs in pharmaceuticals, body fluids, and post-mortem material, The Pharmaceutical Press, London, 1986. -2. Pawliszyn J., Application of Solid Phase Microextraction, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1999.
3. Pawliszyn J., Solid Phase Microextraction. Theory and Practice, Wiley-VCHC.L, Toronto 1997. -4. Yashiki M.T., Koyima T., Miyazaki N., Nagasawa Y., Iwasaki, Hara K., Fast, accurate detection of amphetamines in urine, using solid phase microextraction/capillary GC, Forensic Science International, 1995,76, 169-177.

Adres pierwszego autora:
Katedra Medycyny Sądowej AM
ul. Skłodowskiej-Curie 3A
80-210 Gdańsk.

J. Šidlo, A. Šoral, J. Bauerova, S. Valko, B. Murarikova, J. Mlýnar, *J. Valuch

Pulmonary macrophages in heroin addiction

Institute of Forensic Medicine, Slovak Postgradual Academy of Medicine and St. Cyril and Method's Hospital,

Head: Jifina Bauerova, MD, PhD, Prof. assoc.

*Institute of Forensic Medicine, School of Medicine and Faculty Hospital, Comenius University, Bratislava, Slovakia

Head: Mirko Mego, MD, PhD, Prof. assoc.

Background: The pulmonary complications of illicit drug abuse may be the most common form of drug-induced lung disease. Main purpose: The aim of the study was to determine pulmonary complications associated with intravenous heroin abuse. Patients and methods: Lung tissue samples from 43 drug addicts and 28 „normal” persons submitted for medico-legal autopsy at the Institute of Forensic Medicine of Slovak Postgradual Academy of Medicine and Institute of Forensic Medicine of School of Medicine of the Comenius University in Bratislava were evaluated by method of light microscopy. Results: In the heroin addict cases pulmonary oedema in 49% and emphysema in 7% of cases were found. Statistically significant ($p > 0,05$) increased number of hemosiderin-negative pulmonary macrophages in 88% of cases of drug addicts was found. Conclusions: The Increased number of pulmonary macrophages in the group of heroin addicts can indicate may lung defense mechanism defects and/or direct heroin influence on macrophages as well. The possible conclusion of this study for practical application: occurrence of increased number of hemosiderin-negative pulmonary macrophages by negative autopsy findings in young people points to the probability of heroin abuse as well as for the necessity to investigate option this in a person's history.

Key words: heroin addiction, morphology, pulmonary macrophages

INTRODUCTION

The prevalence of drug abuse is thought to be increasing in Slovak Republic in last ten years (Novomesky, 1996). The patterns of drug abuse prevalent in a given population are determined by a variety of factors such as the cost or availability of particular substances, peer pressure, local customs, and legal pressures. The pulmonary complications of illicit drug abuse may be the most