

# ENANTIOSELECTIVE METHOD FOR DETERMINATION OF AMPHETAMINE AND ITS EIGHT ANALOGUES USING CHIRAL STATIONARY PHASE\*

Piotr ADAMOWICZ, Maria KAŁA

*Institute of Forensic Research, Cracow*

**ABSTRACT:** Amphetamine is one of the most frequently abused drugs today. Like many other chiral compounds, amphetamine and its analogue enantiomers exhibit different activities, toxicities and behavioural effects, *d*-amphetamine being much more potent in its stimulating action than the *l*-form. There are medications on the market which contain only the *l*-enantiomer of methamphetamine (e.g. Vick Nasal Inhaler) or which metabolise to the *l*-enantiomers of methamphetamine or amphetamine (e.g. selegiline). To differentiate between the intake of these medicaments and abuse of amphetamine and methamphetamine, it is necessary to develop an enantioselective method of determination. The enantioseparation of amphetamine, methamphetamine and various other analogues of amphetamine by use of the chiral stationary phase, consisting of immobilised native  $\beta$ -cyclodextrin selectors, is presented. This method was elaborated for separation of specified compounds without any derivatisation. In this method 1-PEA and 2-PEA were used as internal standards for urine or non-biological materials analysis. Additionally, twelve different samples of amphetamine confiscated by police were analysed with respect to their enantiomeric composition.

**KEY WORDS:** Amphetamine; Amphetamine analogues; Enantiomers; HPLC; Chiral analysis.

*Z Zagadnień Nauk Sądowych, z. XLIV, 2000, 24–42*

*Received 21 July 2000; accepted 23 October 2000*

## INTRODUCTION

Quantitative analysis of the enantiomeric composition of drugs is very important from the forensic as well as the clinical point of view. Amphetamine (AM), methamphetamine (MA) and various related amphetamine derivatives, such as 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA), 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA), 3,4-methylenedioxyethylamphetamine

---

\* The presented article was worked out at the Institute of Forensic Research, Cracow as the part of the Master Thesis of the first author and defended at the Faculty of Chemistry, Jagiellonian University, Cracow, in 1999.

(MDE), *p*-methoxyamphetamine (PMA), 2,5-dimethoxy-4-bromoamphetamine (DOB), 2,5-dimethoxy-4-methylamphetamine (DOM) act as central nervous system stimulants and have become popular drugs of abuse. The clinical and toxicological implications of their enantiomeric composition result from the different activities, toxicities and behavioural effects of particular enantiomers. The *d*-(+)-enantiomers of AM and MA have five times more psychostimulant activity on CNS than the *l*-enantiomers.

Amphetamine and methamphetamine (AM and MA) positive test results of biological fluids could be the result of abused street drugs or legitimate use of medications (e.g. Vick Nasal Inhaler). Another, often overlooked, matter is the metabolic conversion of precursor drugs, based on the amphetamine skeleton, to AM or MA, which are excreted in the urine. The differentiation of enantiomers which are metabolic products of amphetamine-like medicaments from illicit AM and MA is therefore essential.

Enantiomeric separations of AM derivatives by various forms of high-pressure liquid chromatography (HPLC) have been reported. Application of HPLC to the enantioselective analysis of AM and MA requires use of chiral stationary phase or chiral derivatisation reagents. Chiral stationary phases are used more frequently than chiral reagents because of the simple procedure for the preliminary preparation of samples and the saving of time and reagents.

Various types of detectors are used to determine separated enantiomers: ultraviolet-visible variable wavelength (UVD), diode array (DAD), fluorescence (FLD) and mass spectrometer (MSD) [4].

Katgi et al. [2] separated the enantiomers of AM and MA on a  $\beta$ -cyclodextrin column and detected them using UVD. They also determined AM and MA by thermospray liquid chromatography-mass spectrometry (TS/LC/MS). Human urine was extracted on solid phase (Bond Elut SCX SPE). The  $\beta$ -cyclodextrin column was also applied to simultaneous separation of enantiomers of AM and MA and ring substituted amphetamines [9] and also stereoisomers of ephedrine and enantiomers of MA and selegiline by Lemr et al. [5]. The separation of enantiomers of selegiline is very important because only one isomer (*l*-isomer) is used in medication for Parkinson's Disease.

A chiral column (Chiracel OB-H) for the enantioselective separation of ethylamphetamine derivatives was used by Nagai et al. [8]. In this study the HPLC-UV method was used in the determination of enantiomers in human and rat urine. In a former study [7], Nagai and Kamiyama separated the derivatives of MA and its metabolites on Chiracel OB and OJ columns.

Other types of chiral columns are seldom used [4]. Makino et al. separated enantiomers of AM on a Diacel Crownpack CR (+) column and detected them using HPLC-DAD.

Enantiomeric analysis is not commonly applied in Poland because racemic mixtures of AM and its derivatives are governed by the Drug Addiction Counteraction Act of April 24, 1997. Most of the 14 medications which have been shown [1] to be precursors of AM and MA are not listed in the "Official List of Medications Permitted for Use in Poland" but are included in the psychotropic substance group of the above-mentioned Act. However, there are some new medicines, especially those acting as anorectics (e.g. clobenzorex, furfenorex) which are not legally regulated and it is well known from the practice of the Institute of Forensic Research that they are frequently over-used due to administration without a prescription. The parent compounds are detectable only for a few hours after ingestion because they are rapidly metabolised. Therefore they are not useful as target compounds when differentiating between intake of phenylethylamine/phenylpropanamine medications (prescribed by a doctor) and an abuse of AM/MA. A readily available enantioselective method should be developed to demonstrate whether metabolic profiles of AM and/or MA enantiomers allow such a differentiation.

The aim of this paper was to develop a method of enantioseparation of AM, MA and their analogues, by means of HPLC-DAD and chiral stationary phase with  $\beta$ -cyclodextrin selectors.

## MATERIALS AND METHODS

### Reagents

*l*-amphetamine (*l*-AM) base, *d*-amphetamine sulphate (*d*-AM), ( $\pm$ )-3,4-methylenedioxy-*N*-methamphetamine (MDMA), ( $\pm$ )-3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA), ( $\pm$ )-3,4-methylenedioxy-*N*-ethylamphetamine (MDE), ( $\pm$ )-*p*-methoxyamphetamine (PMA), ( $\pm$ )-2,5-dimethoxy-4-bromoamphetamine (DOB), ( $\pm$ )-2,5-dimethoxy-4-methylamphetamine (DOM), phentermine (PH), ( $\pm$ )- $\beta$ -phenethylamine (1-PEA), ( $\pm$ )- $\beta$ -phenethylamine (2-PEA), ( $\pm$ )-ephedrine, all in the form of hydrochloride salts were obtained from Sigma. S(+)-methamphetamine hydrochloride (*l*-MA) and R(-)-methamphetamine hydrochloride (*d*-MA) were obtained from RBI. Fenfluramine hydrochloride (FE) was obtained from Servier. Monosodium phosphate, sodium hydroxide, and hydrochloric acid were obtained from POCH. Diethyl ether and methanol were obtained from J. T. Baker. Water was twice distilled.

The eluents were premixed and degassed in an ultrasonic bath prior to use.

AM samples were provided by the police from evidence material confiscated.

## Equipment

An LaChrom D-7000 System liquid chromatograph (Merck-Hitachi) equipped with a pump (L-7100), a Rheodyne injection valve (fitted with a 20  $\mu$ l loop), a diode array detector (L-7450) and an interface (D-7000) were used. A PU 4100 liquid chromatograph (Philips) with a PU 4110 UV/VIS variable-wavelength detector was also used in the study.

The separation was carried out using a LiChroCART 250-4 column (Merck) with ChiraDex packing material consisting of  $\beta$ -cyclodextrin. The column temperature was controlled by use of a Peltier thermostat (L-7350) which was set at 25°C.

For the selection of the optimum wavelength, UV spectrophotometry was used. Spectra within 200–300 nm were obtained for the ethanolic solutions (50 and 500 mg/l) of *d*-AM, *l*-AM, *d*-MA and *l*-MA. It was found that the highest absorption maximums for AM and MA were at 210 nm (Figure 1).

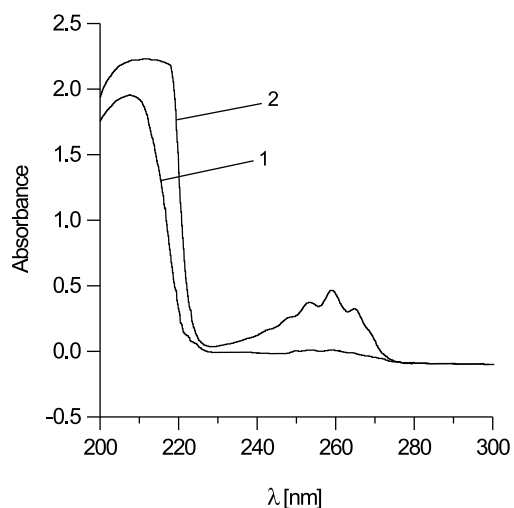


Figure 1. UV spectra (200–300 nm) of *l*-amphetamine. 1 – 50  $\mu$ g/ml, 2 – 500  $\mu$ g/ml.

## Optimisation of enantioseparations

Solutions containing 0.1–500 mg/l of *l*-AM, *d*-AM, *l*-MA, *d*-MA and its mixtures were prepared. In order to optimise separation, eight mobile phases taken from the literature were tested:

1. methanol : water : acetic acid (45:54:1);
2. methanol : water (40:60);
3. methanol : water (40:60) + 200  $\mu$ l/l 85% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>;
4. methanol : 0.01 M phosphate buffer solution (40:60) + 100  $\mu$ l/l 85% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>;
5. 0.06 M phosphate buffer (pH = 3) : methanol (5:1);
6. 25 mM triethylammonium phosphate buffer (pH = 3) : methanol (98:2);

7. tetrahydrofuran : water : acetic acid (35:71:1);
8. n-hexane : 2-propanol (95:5).

Monitoring was performed at 210 nm for phases 2–7, at 250 nm for phase 1 and at 254 nm for phase 8. The flow rate was 1 ml/min.

Separation of AM and MA enantiomers using the mobile phase comprising methanol and water could not be achieved. Good separation was attained using phases containing buffers. Enantioseparations of AM and MA was optimised in mobile phases containing large volumes of phosphate buffer and small volumes of methanol. Seven mixtures of phosphate buffer and methanol were tested:

1. 0.06 M phosphate buffer (pH = 3) : methanol (5:1);
2. 0.06 M phosphate buffer (pH = 3) : methanol (98:2);
3. 0.06 M phosphate buffer (pH = 3) : methanol (99:1);
4. 0.06 M phosphate buffer (pH = 3);
5. 0.06 M phosphate buffer (pH = 3) : water (1:1);
6. 0.1 M phosphate buffer (pH = 3) : methanol (98:2);
7. 0.1 M phosphate buffer (pH = 3).

Using mobile phases containing low concentrations of buffer or high concentrations of methanol, separation of enantiomers was not satisfactory. Better differentiation of analytes was achieved using 0.1 M phosphate buffer phase, but addition of small quantities of methanol did not improve separation.

Optimum chromatographic resolution of enantiomers of AM and MA (whose structures are shown in Figure 2) was achieved with a 0.1 M phosphate buffer solution, pH = 3.

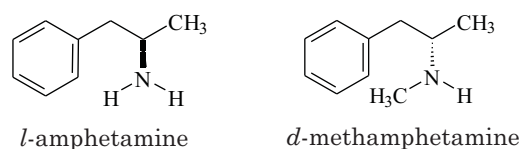


Fig. 2. Chemical structure of *l*-amphetamine and *d*-methamphetamine.

### Chromatographic conditions

The mobile phase consisted of 0.1 M phosphate buffer, pH = 3. The flow rate was 1 ml/min. Chromatogram was monitored at wavelength 210 nm.

### Validation of analytical procedures

1-PEA and 2-PEA were used as internal standards for quantitative analysis of *l*- and *d*-AM and *l*- and *d*-MA at concentrations of 0.1–1000 mg/l. These solutions were prepared by dilution of stock solution (0.1%) of these compounds with phosphate buffer containing 10 mg/l 1-PEA and 2-PEA.

Urine was obtained from healthy person and spiked with *l*-AM, *d*-AM, *l*-MA and *d*-MA at concentrations of 0.05, 0.25, 0.5, 2.5, 5, 10, 100 mg/l urine. All specimens for validation of analytical procedure were prepared with the same drug stock solution and the same sample of negative urine.

The relative retention times for AM and MA isomers were calculated and calibration curves were prepared. Limits of detection (LOD), quantitation (LOQ) and linearity (LOL) were determined for *d*- and *l*-isomers of AM and MA.

### Extraction

1 ml of urine with addition of 0.5 mg/l 1-PEA, 2-PEA (50  $\mu$ l of methanolic solution) as internal standards was mixed with 3 ml 0.6 M NaOH and 10 ml diethyl ether in a 20 ml screw-capped test tube. The tube was closed and vortex shaken for 2 min then centrifuged for 4 min at 4000 rpm. The sample was then frozen at about  $-30^{\circ}\text{C}$  for 45–60 min. The top ethereal layer was then transferred into another tube (20 ml) and next the organic phase was transferred in portions to a small tube (2 ml) containing 50  $\mu$ l of 0.1 M HCl in methanol and placed in a multi-block heater ( $37^{\circ}\text{C}$ ). The extract was evaporated to dryness under a stream of nitrogen and reconstituted in 50  $\mu$ l of mobile phase. A 20  $\mu$ l aliquot was injected into the HPLC.

### Enantioseparation of amphetamine analogues

Investigations also encompassed AM analogues and phenethylamine derivatives (Figure 3). MDMA, MDA, MDE, PMA, DOB, DOM, FE, PH, and ephedrine were analysed using a mobile phase consisting of methanol and 0.1 M phosphate buffer, pH = 3, in proportions 20:80 and 10:90. Solutions of each compound at concentration of 10 mg/l were injected into an HPLC.

### Analysis of street amphetamine

Quantitative analysis of enantiomers of AM originating from street drugs was realised by means of the elaborated method mentioned above. Purity of AM was determined using a LiChroCART (125 x 4 mm) column with LiChroSpher 60 RP Select B (Merck) packing material. A mixture of acetonitrile (A) and water with addition of 85%  $\text{H}_3\text{PO}_4$  in an amount of 100  $\mu\text{g/l}$  of water (B) was used as the mobile phase. The flow rate was 1 ml/min in gradient mode. The gradient was programmed as follows. Start: 100% of water phase and 0% of acetonitrile. Then, the eluent proportion changed linearly so that after 10 minutes a proportion of 50%:50% was attained. Then, in 1 minute's time, the composition was brought back linearly to the initial composition, i.e. 100% water phase and 0% acetonitrile, in which it remained for 6 min.

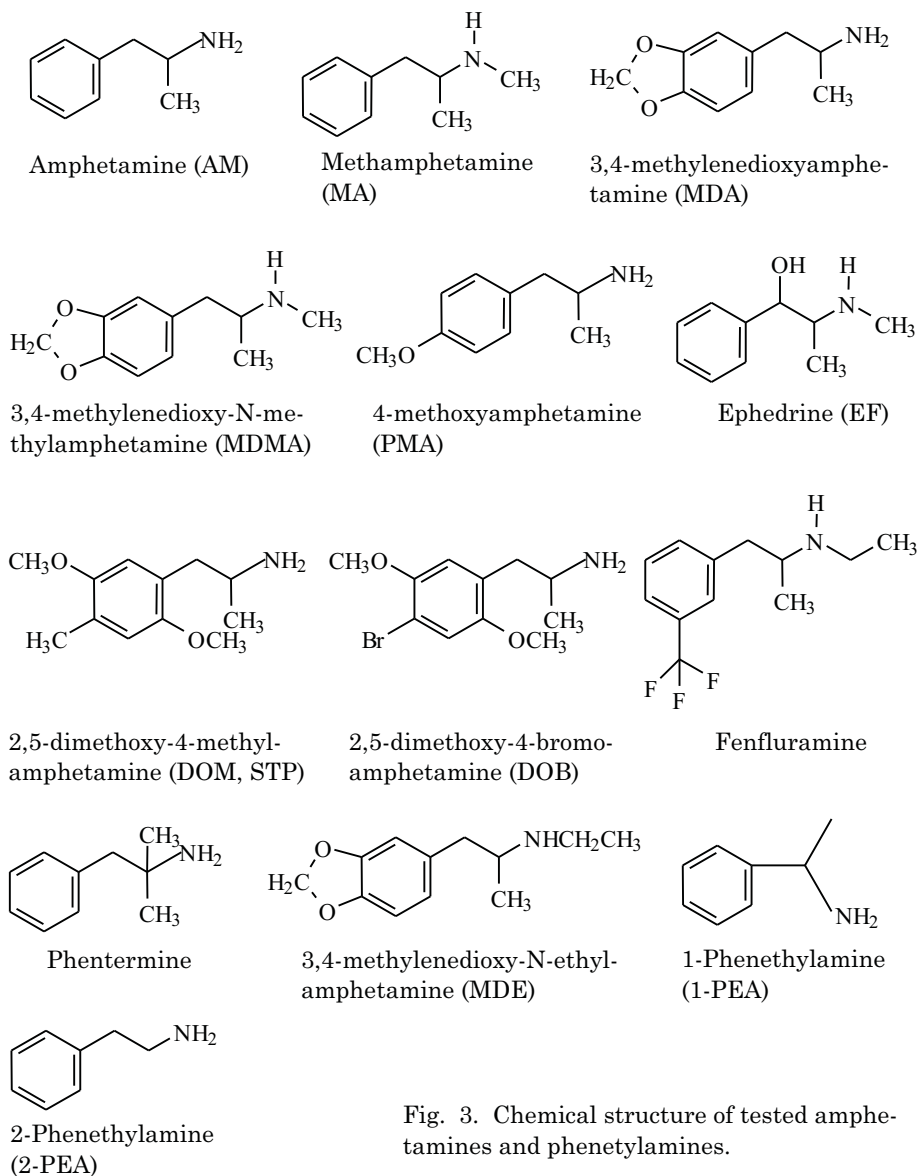


Fig. 3. Chemical structure of tested amphetamines and phenethylamines.

## RESULTS AND DISCUSSION

Optimum enantioseparation of the examined drugs was achieved using three different mobile phases (Table I).

TABLE I. RETENTION TIMES (RT) AND RELATIVE RETENTION TIMES (RRT) OF AMPHETAMINE AND ITS ANALOGUES IN THREE MOBILE PHASES

Mobile phase	Substance	Retention time [min]	
		RT	RRT/2-PEA
0.1 M phosphate buffer pH = 3	1-PEA	3.14	0.64
	2-PEA	4.92	1.00
	Ephedrine	6.62	1.34
	<i>l</i> -AM	9.11	1.85
	<i>d</i> -AM	9.68	1.96
	<i>l</i> -MA	10.88	2.21
	<i>d</i> -MA	11.68	2.37
	<i>l</i> -PMA	13.24	2.69
0.1 M phosphate buffer: methanol (80:20)	<i>d</i> -PMA	14.06	2.85
	1-PEA	2.78	0.70
	2-PEA	3.99	1.00
	Ephedrine	4.00	1.00
	<i>l</i> -AM	5.34	1.34
	<i>d</i> -AM	5.50	1.38
	<i>l</i> -MA	5.90	1.48
	<i>d</i> -MA	6.13	1.54
	<i>l</i> -PMA	6.33	1.59
	<i>d</i> -PMA	6.82	1.71
	<i>l</i> -MDA	10.59	2.65
	<i>d</i> -MDA	11.25	2.82
	<i>l</i> -MDMA	11.28	2.83
	<i>d</i> -MDMA	12.21	3.06
<i>l</i> -MDE	12.81	3.21	
<i>d</i> -MDE	14.00	3.51	
0.1 M phosphate buffer: methanol (90:10)	<i>l</i> -MDA	14.02	–
	<i>d</i> -MDA	15.03	–
	<i>l</i> -MDMA	15.19	–
	<i>d</i> -MDMA	16.65	–
	<i>l</i> -MDE	18.07	–
	<i>d</i> -MDE	19.88	–



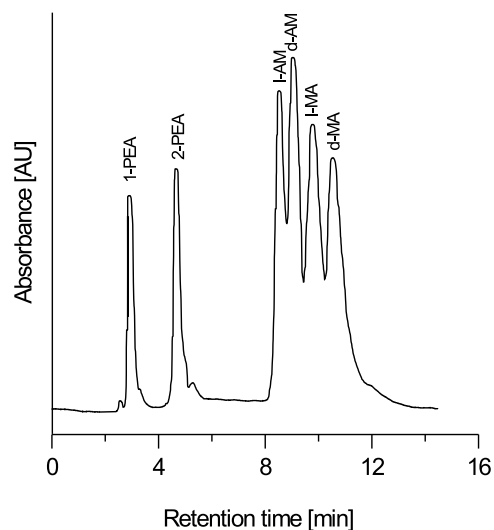


Fig. 3. Chemical structure of tested amphetamines and phenethylamines.

Using 0.1 M phosphate buffer as mobile phase at pH = 3 enabled the best separation of AM, MA (Figure 4), PMA enantiomers and ephedrine. The remaining compounds did not elute from the column by this mobile phase; so it can be stated that the mentioned chromatographic conditions appeared to be very specific for AM, MA, PMA isomers and ephedrine.

Two other mobile phases (Table I) allowed separation of MDA, MDMA and MDE enantiomers. Moreover, mobile phases consisting of 0.1 M phosphate buffer and methanol (90:10) and (80:20) eluted AM, MA and PMA.

The three mobile phases mentioned in Table I eluted the *l*-enantiomer first out of six tested compounds. Other analysed compounds – DOB, DOM, FE and PH – remained on the column in the tested chromatographic conditions.

The limit of detection (LOD) was defined as the concentration where the peak height of the analysed compound was three times the noise level. For both enantiomers of AM the concentration was 0.4 mg/l, whilst for MA it was 0.7 mg/l. The LOD for AM and MA enantiomers in urine was 0.05 mg/l and 0.1 mg/l respectively.

The calibration curves were calculated in relation to 1-PEA and 2-PEA as internal standards. The linear regression coefficients (slope, intercept and correlation coefficient) calculated for respective calibration curves are shown in Table II.

TABLE II. THE LINEAR REGRESSION COEFFICIENTS OF CALIBRATION CURVES

Substance	Slope	Intercept	Fit ( $r^2$ )
For non-biological material calculated in relation to 1-PEA			
<i>l</i> -AM	0.0443	-0.1968	0.9991
<i>d</i> -AM	0.0316	0.0922	0.9967
<i>l</i> -MA	0.0235	0.3725	0.9925
<i>d</i> -MA	0.0282	0.1448	0.9963
For non-biological material calculated in relation to 2-PEA			
<i>l</i> -AM	0.0326	0.0563	0.9980
<i>d</i> -AM	0.0232	0.2631	0.9936
<i>l</i> -MA	0.0173	0.4246	0.9918
<i>d</i> -MA	0.0208	0.2440	0.9971
For urine calculated in relation to 1-PEA			
<i>l</i> -AM	0.6802	-0.0676	0.9981
<i>d</i> -AM	0.7053	0.0192	0.9990
<i>l</i> -MA	0.4817	0.0389	0.9996
<i>d</i> -MA	0.6865	-0.1232	0.9980
For urine calculated in relation to 2-PEA			
<i>l</i> -AM	0.7076	0.0100	0.9980
<i>d</i> -AM	0.7287	0.0655	0.9993
<i>l</i> -MA	0.4998	0.0854	0.9975
<i>d</i> -MA	0.7079	-0.1373	0.9984

The ranges of concentrations in which linearity was studied were chosen arbitrarily. They were 1–1000 mg/l for methanolic solution and 0.25–100 mg/l for urine. A range was recognised as linear if the observed concentration of the analyte did not deviate from the target concentration by more than 10%. The response ratios (to 1-PEA and 2-PEA) for AM and MA enantiomers were linear in the whole examined ranges.

The LOQ was calculated as the mean LOD + 7 SD and it was 0.25 mg/l for both AM and MA enantiomers.

The extraction recovery (determined in urine with addition of analyte at concentration of 0.5 mg/l) was 68% for *l*- and *d*-AM and 65% for *l*- and *d*-MA. The obtained results show that the elaborated method allows us to determine *l*-AM, *d*-AM, *l*-MA and *d*-MA in non-biological (tablets, powders) and biological (urine) materials.

The separation of 1-PEA from 2-PEA (positional isomers) is very important from the point of view of toxicologists, medical doctors and lawyers alike. 1-PEA is not legally regulated, is available over-the-counter and often used as an adulterant of street AM distributed in European narcotic markets [6].

2-PEA is a natural substance in humans. It is a metabolite of the amino acid phenylalanine, and is found in normal urine and as a breakdown product in decomposing tissues [3]. Therefore 1-PEA and 2-PEA are very good internal standards. 2-PEA can be used for analyses of non-biological materials, and 1-PEA for biological fluids and tissues.

TABLE III. CONCENTRATIONS [%] OF AMPHETAMINE (AM) AND ITS *l*- AND *d*-ENANTIOMER IN SAMPLES CONFISCATED BY THE POLICE

Number of sample	AM [%]	<i>l</i> -isomer [%]	<i>d</i> -isomer [%]	<i>l/d</i>
1	56.1	49.8	50.2	0.99
2	56.9	49.9	50.1	0.99
3	58.1	49.8	50.2	0.99
4	58.1	50.0	50.0	1.00
5	60.2	50.1	49.9	1.00
6*	55.6	49.7	50.3	0.99
7	26.6	49.1	50.9	0.96
8**	56.0	50.2	49.8	1.01
9	48.4	49.2	50.8	0.97
10	61.0	49.7	50.3	0.99
11	64.6	49.9	50.1	1.00
12	48.8	50.2	49.8	1.01
X		49.8	50.2	0.99
SD		0.35	0.35	0.01
CV [%]		0.70	0.70	1.48

Examined after (\*) one year and (\*\*) two years of storage; X – mean; SD – standard deviation; CV [%] – coefficient of variation.

The method described was applied to determination of enantiomers of AM in twelve street samples confiscated by police on the Polish drug market (Table III). The powders contained AM in concentrations of 27–65%. This range of AM concentrations is typical for Polish street samples. Illicit AM is

a racemate composed of two isomers, the *d*-isomer and the *l*-isomer in a ratio of 1:1.

The enantiomers composition of AM in street samples was stable. It did not depend on the purity of AM and the duration of storage.

## CONCLUSIONS

The three elaborated HPLC methods utilising  $\beta$ -cyclodextrin-chiral stationary phase allow separation and identification of enantiomers of AM, and its 5 analogues (MA, PMA, MDA, MDMA, MDE). These methods also differentiate AM, MA, PMA, MDA, MDE, ephedrine, 1-PEA and 2-PEA from each other.

The described chromatographic conditions with 0.1 M phosphate buffer turned out to be very specific for separation, identification and determination of AM, MA, PMA, ephedrine, 1-PEA and 2-PEA. These methods may be used for:

- routine screening of powders and urine for simultaneous presence of AM, MA, PMA, MDA, MDE and ephedrine;
- determination of these five amphetamines and ephedrine in urine in cases of an intoxication (with the designer drugs mentioned);
- differentiating (for forensic purposes) between prescribed phenylethylamine medications/self-administered medications and street AM and MA.

The method of enantioselective analysis using the chiral stationary phase is very simple and inexpensive and does not take a long time to perform.

## References:

1. Cody T. J., Enantiomeric composition of amphetamine and methamphetamine derived from the precursor compound famprofazone, *Forensic Science International* 1996, vol. 80, pp. 189–199.
2. Katagi M., Nishioka H., Nakajima K. [et al.], Direct high-performance liquid chromatographic and high-performance liquid chromatographic-thermospray-mass spectrometric determination of enantiomers of methamphetamine and its main metabolites amphetamine and p-hydroxymethamphetamine in human urine, *Journal of Chromatography B* 1996, vol. 676, pp. 35–43.
3. King L. A., Poortman van der M., Huizer H., 1-Phenylethylamines: a new series of illicit drugs?, *Forensic Science International* 1996, vol. 77, pp. 141–149.
4. Kraemer T., Maurer H. H., Determination of amphetamine, methamphetamine and amphetamine-derived designer drugs or medicaments in blood and urine, *Journal of Chromatography B* 1998, vol. 710, pp. 163–187.

5. Lemr K., Jivorský D., Ševčík J., Effect of some parameters on enantiomer separation of ephedrine, methamphetamine and selegiline using HPLC with beta-cyclodextrin stationary phase, *Journal of Liquid Chromatography* 1996, vol. 19, pp. 3173–3191.
6. Meyer E., Van Bocxlaer J., Lambert W. [et al.],  $\alpha$ -Phenylethylamine identified in judicial samples, *Forensic Science International* 1995, vol. 76, pp. 159–160.
7. Nagai T., Kamiyama S., Simultaneous HPLC analysis of optical isomers of methamphetamine and its metabolites, and stereoselective metabolism of racemic methamphetamine in rat urine, *Journal of Analytical Toxicology* 1991, vol. 15, pp. 299–304.
8. Nagai T., Kamiyama S., Matsushima K., Analysis of time-lapse changes of *d*- and *l*-enantiomers of racemic ethylamphetamine and stereoselective metabolism in rat urine by HPLC determination, *Journal of Analytical Toxicology* 1995, vol. 19, pp. 225–228.
9. Rizzi A. M., Hirz R., Cladrowa-Runge S. [et al.], Enantiomeric separation of amphetamine, methamphetamine and ring substituted amphetamines of a  $\beta$ -cyclodextrin chiral stationary phase, *Chromatographia* 1994, vol. 39, pp. 131–137.

# ENANCJOSELEKTYWNA METODA OZNACZANIA AMFETAMINY I JEJ OŚMIU ANALOGÓW Z ZASTOSOWANIEM CHIRALNEJ FAZY STACJONARNEJ\*

Piotr ADAMOWICZ, Maria KAŁA

## WSTĘP

Analiza ilościowa enancjomerów środków uzależniających jest bardzo ważna zarówno z toksykologicznego, jak i klinicznego punktu widzenia. Amfetamina (AM), metamfetamina (MA) i różne ich pochodne jak: 3,4-metylenodioksyamfetamina (MDA), 3,4-metylenodioksymetamfetamina (MDMA), 3,4-metylenodioksyetyloamfetamina (MDE), p-metoksyamfetamina (PMA), 2,5-dimetoksy-4-bromoamfetamina (DOB), 2,5-dimetoksy-4-metyloamfetamina (DOM), działające pobudzająco na ośrodkowy układ nerwowy, stały się często nadużywanymi środkami. Kliniczne i toksykologiczne implikacje ich enancjomerycznego składu wynikają z odmiennych aktywności, toksyczności oraz odmiennych efektów behawioralnych, jakie wywołują poszczególne enancjomery. Izomery AM i MA o konfiguracji *d* są kilkakrotnie silniejsze w działaniu na ośrodkowy układ nerwowy w porównaniu do izomerów o konfiguracji *l*.

Pozytywne wyniki badania płynów ustrojowych na obecność amfetaminy oraz metamfetaminy (AM i MA) mogą pochodzić z użycia ich w celu pobudzenia oraz w celach terapeutycznych (np. Vick Nasal Inhaler). Innym, często nie zauważanym problemem, jest metabolizm leków o strukturze amfetaminy do AM i MA, które są wydalane z moczem. Konieczne zatem może być rozróżnienie enancjomerów powstałych w wyniku metabolizmu leków o strukturze amfetaminy od pochodzących z nadużycia AM i MA.

Opisano wiele metod rozdzielania enancjomerów, pochodnych AM, z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). Zastosowanie HPLC do enancjoselektywnej analizy AM i MA wymaga użycia chiralnej fazy stacjonarnej lub chiralnego odczynnika derywatyzującego. Chiralne fazy stacjonarne są używane częściej niż chiralne reagenty, ponieważ charakteryzują się prostą procedurą wstępnego przygotowania próbki oraz oszczędnością czasu i odczynników.

Do oznaczania rozdzielonych enancjomerów lub diastereoizomerów stosowane są różne detektory – spektrofotometryczny w zakresie nadfioletu i widzialnej części widma ze zmienną długością fali (UVD), szeregu diod (DAD), fluorescencyjny (FLD) oraz spektrometr masowy (MSD) [4].

Katagi i in. [2] zastosowali do oznaczania enancjomerów AM i MA detektor spektrofotometryczny (UV) oraz kolumnę z  $\beta$ -cyklodekstryną. Oznacжали oni również AM i MA przy użyciu metody spektrometrii masowej z jonizacją w systemie termorozpy-

---

\* Niniejszy artykuł został opracowany na podstawie pracy magisterskiej pierwszego z autorów, wykonanej w Instytucie Ekspertyz Sądowych w Krakowie i obronionej na Wydziale Chemii UJ w 1999 roku.

lania (TS/LC/MS). Mocz ludzki ekstrahowali na fazie stałej (Bond Elut SCX SPE). Kolumna z  $\beta$ -cyklodekstryną została również zastosowana do jednoczesnego rozdzielania enancjomerów AM i MA i ich pierścieniowych pochodnych [9] oraz stereoisomerów efedryny i enancjomerów MA i selegiliny przez Lemra i in. [5]. Rozdział enancjomerów selegiliny jest bardzo ważny, gdyż tylko jeden z nich (*l*-izomer) jest używany przy produkcji leku stosowanego w leczeniu choroby Parkinsona.

Nagai i in. [8] zastosowali chiralną kolumnę (Chiracel OB-H) w enancjoselektywnym rozdzielaniu pochodnych etyloamfetaminy. W ich badaniach oznaczano enancjomery w moczu szczura i człowieka metodą HPLC-UV. We wcześniejszych badaniach Nagai i Kamiyama [7] rozdzielali pochodne MA i jej metabolitów przy użyciu kolumny Chiracel OB i OJ.

Inne typy kolumn są rzadziej stosowane [4]. Makino i in. rozdzielali enancjomery AM za pomocą kolumny Diacel Crownpack CR (+) i oznaczali je metodą HPLC-DAD.

Analiza enancjomerów nie jest rutynowo stosowana w Polsce, ponieważ ustawa z dnia 24 kwietnia 1997 r. o przeciwdziałaniu narkomanii obejmuje kontrolą racematu AM i jej pochodnych. Większość z 14 leków, które przedstawiono [1] jako prekursorzy AM i MA, nie jest wymieniona w „Urzędowym wykazie środków farmaceutycznych dopuszczonych do obrotu w Polsce”, ale włączona do grupy substancji psychotropowych wyżej wymienionej ustawy. Istnieje jednak kilka nowych leków szczególnie działających jako anorektyki (np.: klobenzoreks, furfenoreks), które nie są prawnie kontrolowane i wiadome jest z praktyki ekspertów pracujących w Instytucie Ekspertyz Sądowych, że środki te mogą być często nadużywane na skutek przyjmowania ich bez konsultacji z lekarzem. Macierzyste związki są możliwe do wykrycia tylko przez kilka godzin po przyjęciu leku, ponieważ szybko ulegają metabolizmowi. Dlatego też nie są one użyteczne do odróżnienia przyjmowania fenyloetyloaminowych i fenylopropyloaminowych leków przepisanych przez lekarza lub obecnych w organizmie na skutek samowolnego przyjęcia od nadużycia AM i MA. Celowe jest opracowanie łatwo dostępnej enancjoselektywnej metody do udowodnienia, że profile metaboliczne enancjomerów AM i MA pozwalają na takie rozróżnienie.

Celem niniejszej pracy było opracowanie metody oznaczania enancjomerów AM, MA i ich analogów z zastosowaniem techniki HPLC-DAD i chiralnej fazy stacjonarnej modyfikowanej  $\beta$ -cyklodekstryną.

## MATERIAŁ I METODY

### Odczynniki

*l*-amfetamina (*l*-AM) w postaci wolnej zasady, siarczan *d*-amfetaminy (*d*-AM), ( $\pm$ )-3,4-metylenodioksymetamfetamina (MDMA), ( $\pm$ )-3,4-metylenodioksyamfetamina (MDA), ( $\pm$ )-3,4-metylenodioksy-N-etylo-amfetamina (MDE), ( $\pm$ )-*p*-metoksyamfetamina (PMA), ( $\pm$ )-2,5-dimetoksy-4-bromoamfetamina (DOB), ( $\pm$ )-2,5-dimetoksy-4-metyloamfetamina (DOM), fentermina (PH), ( $\pm$ )- $\alpha$ -fenyloetyloamina (1-PEA), ( $\pm$ )- $\beta$ -fenyloetyloamina (2-PEA), ( $\pm$ )-efedryna – wszystkie w formie chlorowodorków pochodziły z firmy Sigma. Chlorowodorek S(+)-metamfetaminy oraz R(-)-metamfetaminy zakupiono w firmie RBI. Chlorowodorek fenfluraminy otrzymano z firmy Servier. Fosforan jednosodowy, kwas solny i wodorotlenek sodu pochodziły z firmy POCH. Eter dietylowy i metanol kupiono w firmie J. T. Baker. Woda była dwukrotnie

destylowana. Przed użyciem fazy ruchome były mieszane i odgazowywane w łaźni ultradźwiękowej.

Proszki AM pochodziły z dowodów rzeczowych przesłanych przez policję do Instytutu Ekspertyz Sądowych w celu przeprowadzenia analizy.

### Aparatura

Zastosowano chromatograf cieczowy LaChrom D-7000 firm Merck-Hitachi wyposażony w pompę L-7100, zawór nastrzykowy typu Rheodyne z pętlą o pojemności 20  $\mu$ l, detektor szeregu diod (DAD) L-7450 i interfejs D-7000. W badaniach stosowano także chromatograf cieczowy PU4100 firmy Philips wyposażony w detektor UV/VIS ze zmienną długością fali – model PU4110.

Rozdział składników prowadzono na kolumnie LiChroCART 250-4 (Merck) z wypełnieniem ChiraDex składającym się z  $\beta$ -cyklodekstryny. Temperatura kolumny była kontrolowana za pomocą termostatu typu Peltier (L-7350), który zaprogramowano na utrzymywanie temperatury 25°C.

W celu wybrania optymalnej długości fali do oznaczeń zastosowano metodę spektrofotometrii w zakresie nadfioletu. Wykreślono widma *d*-AM, *l*-MA, *d*-MA oraz *l*-MA w roztworach etanolowych o stężeniu 50 mg/l i 500 mg/l w zakresie 200–300 nm. Stwierdzono, że AM i MA wykazują największą absorbcję przy długości fali 210 nm (rycina 1).

### Optymalizacja rozdziału

Przygotowano roztwory zawierające 0,1–500 mg/l *l*-AM, *d*-AM, *l*-MA i *d*-MA oraz ich mieszaniny. W celu optymalizacji rozdziału przetestowano osiem faz ruchomych opisanych w cytowanym piśmiennictwie:

1. metanol : woda : kwas octowy (45:54:1);
2. metanol : woda (40:60);
3. metanol : woda (40:60) + 200  $\mu$ l/l 85%  $H_3PO_4$ ;
4. metanol : 0,01M bufor fosforanowy (40:60) + 100  $\mu$ l/l 85%  $H_3PO_4$ ;
5. 0,06 M bufor fosforanowy (pH = 3,0) : metanol (5:1);
6. 25 mM fosforan trietyloamonowy (pH = 3) : metanol (98:2);
7. tetrahydrofuran : woda : kwas octowy (35:71:1);
8. n-heksan : 2-propanol (95:5).

Chromatogramy rejestrowano przy długości fali 210 nm dla faz 2–7, 250 nm dla fazy 1 oraz przy 254 nm dla fazy 8. Przepływ faz wynosił 1 ml/min.

Fazy ruchome składające się z metanolu i wody nie rozdzielały izomerów optycznych AM i MA. Dobry rozdział uzyskano stosując fazy ruchome zawierające bufor. Optymalizowano rozdział badanych enancjomerów w fazach ruchomych zawierających dużą ilość buforu fosforanowego i niewielkie ilości metanolu. Przetestowano siedem faz, w których składniki mieszano w różnych proporcjach:

1. 0,06 M bufor fosforanowy (pH = 3,0) : metanol (5:1);
2. 0,06 M bufor fosforanowy (pH = 3,0) : metanol (98:2);
3. 0,06 M bufor fosforanowy (pH = 3,0) : metanol (99:1);
4. 0,06 M bufor fosforanowy (pH = 3,0);
5. 0,06 M bufor fosforanowy (pH = 3,0) : woda (1:1);
6. 0,1 M bufor fosforanowy (pH = 3,0) : metanol (98:2);



#### 7. 0,1 M bufor fosforanowy (pH = 3,0).

Przy zastosowaniu faz zawierających niskie stężenia buforu lub wysokie stężenia metanolu rozdział enancjomerów nie był zadawalający. Zaobserwowano, że lepszy efekt można uzyskać przy użyciu jako fazy buforu fosforanowego o stężeniu 0,1 M, a dodatek małych ilości metanolu nie poprawia rozdziału.

Optymalny chromatograficzny rozdział izomerów optycznych AM i MA, których wzory strukturalne ilustruje rycina 2, uzyskano w 0,01 M buforze fosforanowym o pH = 3.

#### Warunki analizy

Analizę przeprowadzono z zastosowaniem 0,1 M buforu fosforanowego jako fazy ruchomej. Przepływ fazy wynosił 1 ml/min, a długość fali, przy której rejestrowano chromatogram, wynosiła 210 nm.

#### Wyznaczenie parametrów walidacyjnych metody

Do analizy ilościowej *d*- i *l*-AM i *d*- i *l*-MA w zakresie stężeń 0,1–1000 mg/l zastosowano 1-PEA i 2-PEA jako standardy wewnętrzne. Wymienione stężenia uzyskano przez rozcieńczenie roztworów podstawowych badanych enancjomerów (0,1%) buforem fosforanowym zawierającym 1-PEA i 2-PEA o stężeniu 10 mg/l.

Do moczu pochodzącego od zdrowej osoby dodawano *l*-AM, *d*-AM, *l*-MA i *d*-MA w celu uzyskania stężeń 0,05; 0,25; 0,5; 2,5; 5; 10; 100 mg/l moczu. Wszystkie próbki stosowane przy walidacji procedury analitycznej były przygotowywane przy użyciu tego samego roztworu podstawowego oraz tej samej próby moczu.

Obliczone względne czasy retencji dla izomerów AM i MA oraz sporządzono krzywe kalibracyjne. Wyznaczono granice wykrywalności (LOD), oznaczalności (LOQ) i zakres liniowości (LOL) dla *d*- i *l*-izomerów AM i MA.

#### Ekstrakcja

Do buteleczki o pojemności 20 ml odmierzone 1 ml moczu i dodano 0,5 mg/l 1-PEA i 2-PEA (50 µl metanolowego roztworu) jako standardy wewnętrzne, a następnie zmieszano z 3 ml 0,6 M NaOH i 10 ml eteru dietylowego. Buteleczkę zakłusowano, wytrząsano przez 2 min i wirowano przez 4 min przy 4000 obr/min. Następnie próbkę wymrażano przez 45–60 min w temperaturze ok. –30°C. Górną fazę eterową dekantowano do czystej buteleczki o pojemności 20 ml, po czym przenoszono porcjami do buteleczki o pojemności 2 ml zawierającej 50 µl 0,1 M kwasu solnego w metanolu i sukcesywnie odparowywano w strumieniu azotu w temperaturze 37°C. Suchą pozostałość rozpuszczono w 50 µl fazy ruchomej. 20 µl próbki wprowadzano na kolumnę HPLC za pomocą urządzenia nastrzykowego.

#### Rozdział enancjomerów innych pochodnych amfetaminy

Badaniami objęto również analogi AM i pochodne fenyletyloaminy (rycina 3). Przy zastosowaniu faz ruchomych składających się z metanolu i buforu fosforanowego o pH = 3 w proporcjach 20:80 oraz 10:90 analizowano MDMA, MDA, MDE, PMA, DOB, DOM, FE, PH oraz efedrynę. W tym celu do kolumny wstrzykiwano roztwory tych związków o stężeniu 10 mg/l.

### Analiza amfetaminy pochodzącej z rynku narkotykowego

Analizy ilościowej enancjomerów AM w próbkach pochodzących z rynku narkotykowego dokonano stosując opracowaną metodę. Analizę czystości AM przeprowadzono przy użyciu kolumny LiChroCART 125 x 4 z wypełnieniem LiChroSpher 60 RP Select B (Merck). Jako fazę ruchomą użyto mieszaninę acetonitrylu (A) i wody z dodatkiem 85%  $H_3PO_4$  w ilości 100  $\mu$ l/l wody (B). Przepływ fazy wynosił 1 ml/min w gradientie zaprogramowanym w niżej podany sposób. Początek: 100% fazy wodnej i 0% acetonitrylu. Następnie proporcja eluentów zmieniała się liniowo, aby po 10 min osiągnąć skład 50:50, po czym w ciągu 1 min powracała do składu początkowego, w którym pozostawała przez 6 min.

#### WYNIKI BADAŃ I ICH OMÓWIENIE

Optymalny rozdział enancjomerów badanych związków uzyskano w trzech różnych fazach ruchomych (tabela I). Zdecydowanie najlepszy rozdział AM i MA (rycina 4), PMA i efedryny uzyskano w 0,1 M buforze fosforanowym o pH = 3. Inne badane związki nie były eluowane z kolumny powyższą fazą. Opracowane warunki chromatograficzne okazały się specyficzne dla izomerów AM, MA, PMA i efedryny.

Dwie kolejne fazy (tabela I) pozwoliły na rozdzielenie enancjomerów MDA, MDMA i MDE. Ponadto fazy ruchome składające się z 0,1 M buforu fosforanowego i metanolu (90:10) oraz (80:20) eluowały również AM, MA i PMA.

Trzy wymienione w tabeli I fazy eluowały jako pierwsze izomery o konfiguracji *l* sześciu badanych związków. Inne z analizowanych związków, a więc DOB, DOM, FE i PH pozostawały na kolumnie w zastosowanych warunkach chromatograficznych.

Za LOD przyjęto stężenie, przy którym stosunek wysokości pików analizowanego związku do wysokości pików szumów wynosił 3. Dla obu enancjomerów AM stężenie to wynosiło 0,4 mg/l, natomiast dla MA 0,7 mg/l. LOD dla obu enancjomerów AM i MA w moczu wynosiła odpowiednio 0,05 mg/l i 0,1 mg/l.

Krzywe kalibracji obliczono względem 1-PEA i 2-PEA. Współczynniki równania regresji liniowej dla krzywych kalibracji zestawiono w tabeli II.

Zakresy stężeń, dla których badano liniowość, wybrano arbitralnie. Wynosiły one 1–1000 mg/l dla metanолоwych roztworów oraz 0,25–100 mg/l dla moczu. Za liniowy uznano zakres, w którym obserwowane stężenie analitu nie różniło się więcej niż o 10% od stężenia docelowego. Stosunki stężeń analitów do obu standardów wewnętrznych zachowywały liniowość w całych badanych zakresach.

LOQ obliczono jako średnie LOD + 7 SD i wynosiły one 0,25 mg/l dla obu izomerów AM i MA.

Wydajność ekstrakcji (oznaczona w moczu z dodatkiem analitu o stężeniu 0,5 mg/l) wynosiła 68% dla *l*- i *d*-AM oraz 65% dla *l*- i *d*-MA. Uzyskane wyniki wskazują, że opracowana metoda pozwala na oznaczanie *l*-AM, *d*-AM, *l*-MA i *d*-MA zarówno w materiałach niebiologicznych (tabletki, proszki), jak i biologicznych (mocz).

Rozdział 1-PEA od 2-PEA (izomerów położeniowych) jest również bardzo istotny z punktu widzenia toksykologa analityka, lekarza i prawnika. 1-PEA nie jest objęta kontrolą prawną, jest łatwo dostępna i często używana do fałszowania proszków AM rozprowadzanych na europejskich rynkach narkotykowych [6].

2-PEA stanowi naturalną substancję wytwarzaną przez organizm ludzki. Jest metabolitem aminokwasu fenyloalaniny i występuje w normalnym moczu oraz jako produkt rozkładu w rozłożonych wycinkach [3]. Dlatego też 1-PEA i 2-PEA są bardzo dobrymi standardami wewnętrznymi. 2-PEA może być używana do analiz materiału niebiologicznego, a 1-PEA do płynów ustrojowych i wycinków.

Opisaną metodę zastosowano do oznaczenia zawartości enancjomerów w próbkach AM pochodzących z rynku narkotykowego (tabela III). Proszki zawierały od 27% do 65% AM. Taka czystość AM jest typowa dla polskiego rynku narkotykowego. Nielegalna AM była mieszaniną racemiczną składającą się z izomerów *d* i *l* w stosunku 1:1.

Skład enancjomerów AM w próbkach pochodzących z rynku narkotykowego był stabilny i nie zależał od czystości AM, jak również od czasu przechowywania.

#### WNIOSKI

Trzy opracowane metody pozwalają na rozdzielenie i identyfikację enancjomerów AM jej 5 analogów (MA, PMA, MDA, MDMA, MDE) techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej z zastosowaniem kolumny wypełnionej  $\beta$ -cyklodekstryną. Umożliwiają również rozdzielenie A, MA, PMA, MDA, MDE, efedryny, 1-PEA i 2-PEA.

Opisane warunki chromatograficzne z zastosowaniem 0,1 M buforu fosforanowego okazały się bardzo specyficzne do rozdzielenia, identyfikacji i oznaczania AM, MA, PMA, efedryny, 1-PEA i 2-PEA. Metody mogą być użyte do:

- rutynowych badań skryningowych próbek proszków i moczu na obecność AM, MA, PMA, MDA, MDE i efedryny;
- oznaczania tych pięciu amfetamin i efedryny w moczu w przypadkach zatrucia;
- rozróżnienia (dla celów sądowych) przyjmowania fenyloetyloaminowych leków przepisanych przez lekarza lub obecnych w organizmie na skutek przyjmowania leku bez konsultacji z nim od nadużywania AM i MA pochodzącej z rynku narkotykowego.

Metoda oznaczania enancjomerów wykorzystująca chiralną fazę stacjonarną jest bardzo prosta, niedroga i mało czasochłonna.