

CAPILLARY ELECTROPHORESIS AS A NEW TOOL IN FORENSIC TOXICOLOGICAL ANALYSIS

Katarzyna MADEJ

Faculty of Chemistry, Jagiellonian University, Cracow

ABSTRACT: The basic aspects of capillary electrophoresis (CE) such as: instrumentation, separation modes and its chief domains of use in forensic analysis are presented. Micellar electrokinetic capillary chromatography (MECC), capillary zone electrophoresis (CZE) and chiral separations – the most often used separation modes in drugs analysis – are described. The main directions of development of CE methods in the field of forensic toxicological analysis are described. They are: 1. examination of abused drugs and accompanying compounds in confiscated illegal preparations, 2. analysis of abused drugs in biological samples and 3. determination of other drugs in biological and non-biological material. On the basis of a review of chemical and toxicological literature up to 2000, a variety of examples of CE applications to forensic drugs analysis is given.

KEY WORDS: Capillary electrophoresis; Forensic toxicology; Drugs; Biological and non-biological samples.

Z Zagadnień Nauk Sądowych, z. XLVIII, 2001, 31–52

Received 8 October 2001; accepted 28 November 2001

INTRODUCTION

Narcotics and medicines are the major objects of interest in toxicological analysis. These substances are identified and determined in powders, tablets, liquids, plants and biological samples. Many analytical techniques are used for this purpose, amongst which the most common are: thin layer chromatography (TLC), gas chromatography (GC), high performance liquid chromatography (HPLC), immunoassays, and, to a lesser degree, direct spectrophotometry in the UV range.

The analytical results obtained in toxicological examinations should be highly reliable, as they have legal consequences. A generally accepted requirement in forensic analysis is that, to achieve legal defensibility, experimental results have to be confirmed by at least two independent methods, based on different physical-chemical mechanisms, with comparable sensitivity.

Capillary electrophoresis (CE) is a relatively new analytical technique, which may be an alternative or complementary method to HPLC and GC.

In this paper general aspects of capillary electrophoresis and a review of its various applications to forensic toxicological analysis are presented.

INSTRUMENTATION

A schematic diagram of the basic set-up of CE equipment is shown in Figure 1. CE apparatus consist of: an injection system, a separation capillary (20–100 μm ID, 20–100 cm length), a high voltage source (HV, of the order of 5–30 kV and up to 200–250 μA), electrodes, jars with a separation buffer (during measurement electrodes and ends of the capillary are dipped in the jars), vessel with sample, detector, control and recording system.

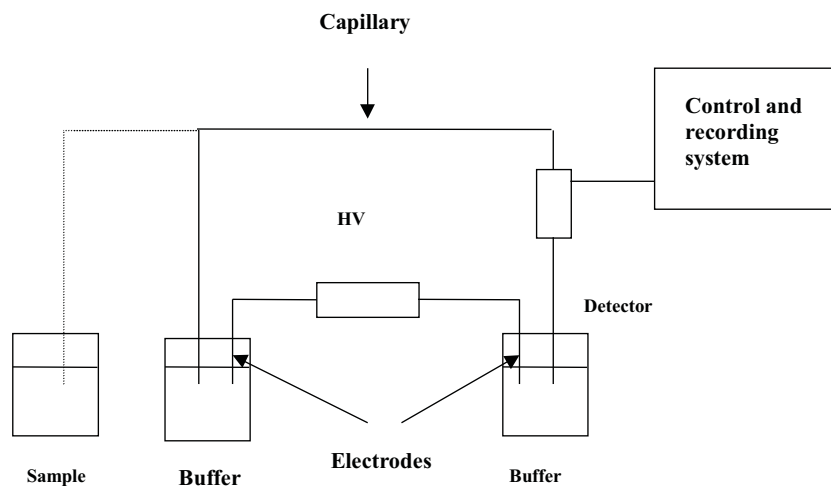


Fig. 1. Schematic diagram of a measurement set-up for capillary electrophoresis.

In normal use of CE apparatus, a sample injection is performed at the anodic end of the capillary and the detection of analytes takes place close to its cathodic end.

In CE, two injection techniques are currently used: hydrodynamic and electrokinetic. The former, using pressure or vacuum application while the injection end of the capillary is dipped into the sample solution, is non-selective – what is injected has the same composition as the sample. The latter, induced by application of potential, is selective – what is injected depends on the mobility and electrical charge of the ions in the sample. Although theoretically superior due to its selectivity, electrokinetic injection can be influ-

enced by many factors that are difficult to control, and thus suitable optimisation of analytical conditions is required to achieve acceptable reproducibility of results.

Because of the fundamental role that the capillary plays in the CE apparatus (the place where separation occurs and where detection takes place), it should fulfil special requirements. The capillary should be: chemically and physically resistant, transparent to UV radiation (usually UV spectrophotometric detection is used), able to dissipate Joule heat through good thermal conductivity, and relatively inexpensive.

SEPARATION MODES

Generally, analysis by CE consists in separation of the sample components in a capillary filled with the appropriate buffer, in a high intensity electric field. For the quantification of these analytes, a suitable detection system is used (e.g. UV, laser-induced fluorescence, mass spectrometry).

Using the same CE instrumentation, several different separation variants can be carried out, based on different physical-chemical principles, by simply changing the buffer and/or the capillary. These variants are: capillary zone electrophoresis (CZE), micellar electrokinetic capillary chromatography (MECC or MEKC), chiral separations, capillary gel electrophoresis (CGE) capillary isoelectric focusing (CIEF), and capillary isotachopheresis (CITP).

In forensic toxicological analysis, three separation modes play a significant role: CZE, MECC and chiral separation.

Capillary zone electrophoresis (CZE)

CZE is the fundamental separation mode of CE, which is conducted in a basic buffer, free of additional substances that take part in the separation process (surfactants, chiral selectors). Ionic compounds are separated in a capillary filled with buffer, in a high intensity electric field (hundred of volts per centimetre), on the basis of their differences in electrophoretic mobilities.

The electrophoretic mobility (μ_e) of the analyte is directly proportional to its ion charge and inversely proportional to the buffer viscosity and the analyte ion radius. Besides electrophoretic migration, a fundamental factor in CE is electroosmosis – the motion of the liquid filling the capillary, which is the source of electroosmotic flow (EOF). Mobility of EOF (μ_{eo}) is proportional to the dielectric constant of the buffer and the zeta (ζ) potential (the potential measured at the plane of shear close to the liquid-solid interface) and inversely proportional to the buffer viscosity.

Using CZE mode in bare fused-silica capillaries, the EOF is directed from the anodic to the cathodic end of the capillary.

Generally, migration velocity (v) of analytes may be expressed by the following equation:

$$v = (\mu_{eo} + \mu_e)E = (\mu_{eo} + \mu_e)V/L, \quad \{1\}$$

where: E – applied electric field; V – potential, L – capillary length.

Micellar electrokinetic capillary chromatography (MECC, MEKC)

As it is based on differences in electrophoretic mobility, CZE separation is not appropriate for neutral substances, which migrate towards the detector at the same velocity as the EOF.

MECC is based on a micellar “pseudostationary” phase added to the buffer, which interacts with the solutes according to partitioning mechanisms, in a chromatography-like way. In this system, the EOF acts as the chromatographic “mobile phase” and a surfactant(s) added to the basic buffer above its critical micellar concentration (CMC) constitutes the micellar “pseudostationary” phase. The most commonly used surfactant is sodium dodecyl sulphate (SDS). The anionic SDS micelles are electrostatically attracted toward the anode, but because of the prevailing velocity of EOF they slowly migrate towards the cathode, i.e. in the direction of the detector. Depending on the individual partitioning equilibria of the different analytes between the hydrophobic core of the micelles and the aqueous buffer, the micelles selectively slow down the migration of the nonionic solutes they interact with. In the absence of surfactant in the running buffer, these compounds would migrate at the same velocity as the EOF. Consequently, the more polar molecules migrate faster than the less polar and hydrophobic compounds.

There are many surfactants that are used in MECC, but the most popular, besides SDS, are bile salts and hydrophobic-chain quaternary ammonia salts.

Organic solvents (e.g. methanol, acetonitril) are often used to reduce the hydrophobic interactions between analytes and micelles, and, consequently, to increase their migration velocity, similarly to reversed-phase chromatography.

Chiral separations

CE plays a major role in the separation of chiral compounds. Chiral resolutions result from stereospecific interactions of chirally active molecules, displaying different affinities for the two enantiomers of examined compounds.

Chirally active selectors used in CE include: cyclodextrins (CDs), modified CDs, bile salts, crown ethers, proteins, antibiotics. CDs (cyclic oligosaccharides) are very commonly used chiral selectors. They have an external hydrophilic surface and a hydrophobic cavity, in which they can include other compounds by hydrophobic interactions. The inclusion mechanism is spherically selective, because analytes must fit the size of the cavity.

Natural CDs are neutral and hydrophilic and consequently migrate at the velocity of the EOF. The migration velocity of the complexed form differs from that of the free molecule, because of the bigger size of the complex with the same charge as that of the free form. Therefore, the higher the affinity of the analyte for the CD, the lower the overall electrophoretic mobility of the analyte. Natural CDs have been derivatised (e.g. dimethyl- β -CD, hydroxypropyl- β -CD) to increase solubility and selectivity. Also, MECC with chirally selective micelles has proven very powerful for enantiomer separation. Chiral surfactants (e.g. bile acid salts) forming chirally active micelles have been widely used. Mixed micellar solutions containing SDS and chiral surfactants or derivatised CDs are also used.

Applications of capillary electrophoresis to forensic analysis

Capillary electrophoresis, as a technique with high analytical potential, is exploited in various fields of forensic analysis. The most important areas include:

- protein and DNA fragment analysis,
- explosive and gunshot examination,
- analysis of inks,
- examination of controlled substances and other drugs of forensic interest in biological and non-biological samples.

Applications of capillary electrophoresis to forensic toxicological analysis

Examination by CE of compounds that are important from the forensic point of view is developing in three main directions:

1. examination of legally controlled drugs and accompanying compounds in confiscated preparations,
2. analysis of abused drugs in biological samples,
3. determination of other drugs in biological and non-biological material.

In most of the examples of CE applications to forensic toxicology analysis cited below, the bare fused-silica capillary and UV detection system were used.

Examination of legally controlled drugs and accompanying compounds in confiscated preparations

Analysis of illegally produced abused drugs, confiscated by police, has two main purposes:

- the separation, identification and determination of components in the examined material,
- the identification of the source of an illicit drug (or a mixture of illicit drugs) on the basis of their qualitative and quantitative analysis.

There are two kinds of compounds which commonly accompany the main abused drug: adulterants (added to disguise or strengthen the drug) and manufacturing impurities (including degradation products).

The chiral resolution of abused drugs into their enantiomers is also of forensic significance for two reasons. Firstly, in some cases only one enantiomer is controlled under legal regulations, and proper identification is therefore critical. Secondly, determination of the enantiomeric ratio of a seized drug can indicate the technology used to produce it. The majority of known abused drugs are currently examined by capillary electrophoresis. These include: heroin, morphine, cocaine, LSD (lysergic acid diethylamide), PCP (phencyclidine), fentanyl, cannabinoids, amphetamines, psilocin, psilocybin, methaqualone, methcathinone and others.

The determination of heroin and the screening analysis of over twenty compounds present in illicit heroin samples were carried out using MECC with a separation buffer consisting of: 40 mM SDS; 8.5 mM sodium phosphate; 8.5 mM sodium borate and 15% acetonitrile (pH = 8.5) [24]. Substances accompanying seized heroin include such adulterants as: nicotinamide, phenacetin, acetaminophen, caffeine, methaqualone, phenobarbital, lidocaine, procaine, salicylic acid and acetylsalicylic acid. Impurities accompanying illicit heroin include: O⁶-acetylmorphine, acetylcodeine, morphine, codeine and other opium alkaloids. The relative migration times for the all separated compounds were determined using N-propyl-p-hydroxybenzoate (NPPB) as an internal standard, and the total duration of screening analysis was less than five minutes.

Analogous analytical conditions were applied to the examination of heroin and amphetamine seizures in Norway [6] and to the examination of illicit heroin and cocaine samples in United States [26].

An example of CZE application is a paper [25] presenting the screening analysis of thirteen common basic drugs of abuse of alkaline character: amphetamine, methamphetamine, methylenedioxyamphetamine, methylenedioxymethamphetamine, psilocyn, cocaine, PCP, methadone, codeine, morphine, acetylcodeine, heroin and LSD. 200 mM sodium phosphate at pH = 4.5 was used for the separation of commonly occurring adulterants and impurities in illicit cocaine, heroin and methamphetamine seizures. In the exam-

ined samples quantitative analyses of cocaine, heroin, methamphetamine, LSD and PCP were performed.

A number of papers concerning separation and identification of amphetamines by use of MECC and CZE modes and buffers with additions of chiral selectors have been published [3, 10, 11]. Three methylenedioxyamphetamines: 3,4 methylenedioxyamphetamine (MDA), 3,4 methylenedioxyethylamphetamine (MDE) and 3,4 methylenedioxymethamphetamine (MDMA) were separated using MECC mode with separation buffer: 40 mM ammonium acetate/0.5 mM cetyltrimethylammonium chloride (CTAC) (pH = 5.5), and CZE mode with separation buffer: 40 mM sodium formate/10 mM ammonium chloride (pH = 2.5). Detection of the separated compounds was performed using UV spectrophotometry and mass spectroscopy [3]. For chiral separation of the above mentioned compounds, a buffer consisting of 50 mM sodium phosphate, 10 mM β -cyclodextrin (β -CD) and 5 mM triethylamine (pH = 2.0) was used [3]. The effectiveness of various anionic chiral selectors on the CE separation of six chiral phenylethylamines and their impurities present in illicit methamphetamine was also studied [11]. The analyses were carried out using separation buffers consisting of 13.4 mM phosphate (pH = 8.5), 25 mM chiral surfactant or 10 mM cyclodextrin and 10% methanol. Using sulfobutyl (VII)-ether- β -cyclodextrin, simultaneous separation of fifteen examined compounds, structurally related to methamphetamine, was performed [11]. The separation and identification of enantiomers of the following compounds: amphetamine, methamphetamine, ephedrine, pseudoephedrine, cocaine, propoxyphene and natural components of khat leaves (eg. cathinone, cathine and norephedrine) were carried out using neutral and anionic cyclodextrins and their mixtures [10].

Analysis of abused drugs in biological samples

In spite of its relatively low absolute sensitivity (especially in connection with spectrophotometric detection) capillary electrophoresis is successfully used for examinations of biological samples such as: urine, serum (plasma) and hair. Due to the relatively low concentrations of xenobiotics in biological material, compounds examined by CE must first be concentrated many times using appropriate extraction procedures. In these cases the extraction techniques used most often are liquid-liquid (L-L) and solid phase extraction (SPE).

The majority of generally known drugs of abuse and their metabolites such as: 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid, cocaine and benzoylecgonine, amphetamine and its analogues, morphine and other opium alkaloids are identified and determined in the biological material mentioned above.

11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid (THC-COOH, the major metabolite of Δ^9 -tetrahydrocannabinol) was determined in urine (5 ml) at

a concentration of about 10 ng/ml of the studied material [28]. Determination of THC-COOH was performed using MECC mode with a separation buffer consisting of 75 mM SDS, 6 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ and 10 mM Na_2HPO_4 (pH = 9.1). Using analogous conditions to those above, drugs of abuse, medicines and/or their metabolites: opium alkaloids, benzoylecgonine (the major metabolite of cocaine), amphetamine and its related compounds, methaqualone and also benzodiazepines – diazepam, oxazepam and flunitrazepam, were determined in urine [27]. The detection limit of the examined compounds, after extraction of 5 ml of urine, was about 100 ng/ml.

Separation of amphetamine, morphine and its analogues, and caffeine in serum and urine samples were performed for about 18 minutes using MECC mode with 0.05 M glycine buffer containing 0.05 M SDS (pH = 10.5) [4]. The repeatability of the identification parameter was significantly improved by using two carboxylic acids as marker compounds.

Applications of different separation modes of CE to identification and determination of amphetamine with its analogues in urine were described in several other works [7, 14, 15, 18]. The screening analysis of amphetamine, methamphetamine, MDMA and MDA was carried out using CZE mode with mass spectroscopy detection (API-MS). A mixture of ammonium acetate and acetic acid at pH = 4.6 was used as the separation buffer [14] and the above mentioned compounds were determined in the concentration range of 50–200 ng/ml. The simultaneous determination of methamphetamine and its related compounds using MECC with UV and laser-induced fluorescence detection (LIF) has also been described [7]. Separation of compounds was carried out in urine, using buffer containing 50 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ and 15 mM SDS (pH = 9.3). The following compounds were separated for about 15 minutes: methamphetamine, amphetamine, 4-hydroxyamphetamine and 4-hydroxymethamphetamine. In order to increase sensitivity of analysis, LIF detection was applied after derivatisation of the determined compounds with 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole [7]. Amphetamine and its analogues were also determined as fluorescein isothiocyanate (FITC) derivatives using alkaline buffers without addition of surfactant (CZE), and also with addition of SDS (MECC) [15]. The FITC derivatives of amphetamine, methamphetamine, MDMA and β -phenylethylamine were simultaneously determined in urine and for each compound a detection limit of about 200 ng/ml was achieved. Phosphate buffer (100 mM, pH = 2.5) containing natural β -cyclodextrin (15 mM) as the chiral selector was used for the separation of amphetamine and its five analogues: MDMA, MDA, MDE, ephedrine and methamphetamine [18]. For each examined enantiomer, the detection limit was below 200 ng per one millilitre of urine.

In order to establish a history of the past exposure to drugs, human scalp hair is examined. The above mentioned amphetamines [18], cocaine and

morphine [9] were determined in appropriately prepared hair samples. For the determination of amphetamines in hair samples, the field-amplified sample stacking procedure was used. Morphine and cocaine were determined in the hair of persons taking heroin and cocaine, using CZE mode with 0.05 M tetraborate buffer at pH = 9.2 [19]. The detection limit of morphine and cocaine was 0.15 ng/mg and both narcotics could be determined in 100 mg hair samples.

Determination of other drugs in biological and non-biological material

A number of CE methods for the separation and simultaneous determination of several to tens of drugs from various pharmaceutical groups have been presented in works concerning analysis of medicines. Methods of determining individual drugs with their metabolites have also been described. The following drugs may be mentioned from amongst those that have been studied by capillary electrophoresis, and are at the same time of forensic interest: benzodiazepines [16, 21, 22], barbiturates [2, 23], tricyclic antidepressants [1, 8, 17], phenothiazines [1, 13], antiepileptics [5], β -blockers [8] and cardiac antiarrhythmics [1].

These medicines were analysed in: aqueous standard solutions, biological samples, pharmaceutical preparations and the previously mentioned illicit drug samples. Psychotropic drugs from barbiturates and benzodiazepines groups are especially often added to illegally manufactured drugs to gain the desired effect on the organism.

The separation of 25 barbiturates was tested by use of two separation modes: CZE and MECC [2]. The examined barbiturates were separated by CZE mode with 90 mM phosphate buffer at pH = 8.4, whereas in the case of MECC, 20 mM phosphate buffer with 50 mM SDS at pH = 7.5 was used. In order to improve the repeatability of the identification parameter and also the suitability of CE to systematic toxicological analysis, the parameter of corrected effective mobility was introduced. In a subsequent paper [23], seven barbiturates: barbital, allobarbital, phenobarbital, butalbital, tiopental, amobarbital and pentobarbital were monitored in serum (plasma) and urine using MECC with phosphate-borane buffer at pH = 7.8, containing 50 mM SDS. The results of the examinations indicated that some barbiturates can be directly analysed in serum while the determination of them in urine requires initial extraction of this material [23]. Screening analysis of six drugs from the benzodiazepine derivatives group: nitrazepam, diazepam, estazolam, bromazepam, triazolam and flurazepam was performed in serum for 25 minutes using an analogous composition of the above mentioned buffer with 15% of methanol [22]. Detection limits of 200 ng/ml for flurazepam and 25 ng/ml for the remaining benzodiazepines were obtained.

Determination of nitrazepam, 7-amino-nitrazepam and its main metabolite in urine, 7-acetamidonitrazepam, may serve as an example of the analysis of a single drug with its metabolites [21]. The above mentioned compounds were analysed in urine using phosphate-borane buffer at pH = 8.5 with addition of SDS and methanol. The total separation time for the three compounds was 25 minutes and their detection limits in urine were in the range 100–200 ng/ml.

Tricyclic antidepressants and phenothiazine derivatives are frequently used psychotropic drugs. Tricyclic antidepressants: desipramine, nortriptyline, doxepine, imipramine and amitriptyline were determined in serum using MECC with phosphate buffer at pH = 8.0, containing 25 mM DTAB (dodecyltrimethylammonium bromide) and 2 M urine [8]. The detection limit for the examined drugs was in the range 5–10 ng/ml. The optimisation of separation conditions for fourteen phenothiazines was carried out with standard drugs using CZE and MECC modes [13]. Using the buffer: 20 mM Tris/acetic acid (pH = 5.0) with the addition of cationic surfactant FC 135 at a concentration of 50 mg/l and 10 mM CTAB (cetyltrimethylammonium bromide), separation of nine phenothiazines was achieved. Determination of promethazine and thioridazine in pharmacological preparations was performed using CZE mode (without addition of surfactants).

Micellar electrokinetic chromatography was also used for the analysis of 26 tricyclic drugs using a separation buffer composed of sodium tetraborate and sodium taurodeoxycholate [1].

Among these drugs were: cardiac antiarrhythmics, tricyclic antipsychotics and antidepressants. The separation and determination of the examined drugs was carried out in urine and detection limits of from several to tens of ng/ml were achieved.

Nine tricyclic antidepressants: trimipramine, clomipramine, protriptyline, imipramine, desipramine, amitriptyline, nortriptyline, opipramol and carbamazepine were successfully separated in a fused-silica capillary covered inside by polyacrylamide, using a separation buffer consisting of 10 mM citrate, 20 mM SDS and 10 mM carboxymethyl- β -cyclodextrine (CM- β -CD), pH = 6.5 [17].

SUMMARY

Successful applications of capillary electrophoresis to many problems concerning examination of medicines and drugs of abuse in a variety of materials have proved that this is a powerful analytical tool. One of its variants, micellar electrokinetic chromatography, which combines two separation mechanisms: electrophoretic and chromatographic, possesses especially

high resolution potential. The great separation power of CE is also widely exploited in chiral compounds analyses where buffers with addition of chiral selectors are used. The possibility of easy application of two or more separation conditions based on different physical-chemical principles (eg. CZE, MECC), often by simply changing the separation buffer, is also worth mentioning [20]. Moreover, capillary electrophoresis displays such advantages as negligible consumption of samples and reagents and relatively low working costs. Another advantage of CE is the possibility of MECC use for the direct analysis of some drugs in biological material, for example in serum [23] without pre-treatment of the sample. Some limitations of CE are: the relatively low repeatability of migration times (identification parameter) and low absolute sensitivity connected with the small sample injected for analysis (of the order of a few nanoliters) and also commonly used UV spectrophotometry detection (the optical path through the examined solution equals the internal diameter of the capillary). In order to adapt CE to the requirements of forensic toxicological analysis, improvement of the above mentioned parameters is necessary. For improvement of repeatability of results, the addition of marker compounds has already been applied to samples [4], as has correlation of the identification parameter [2]. Low absolute sensitivity is compensated for by use of effective extraction procedures, which enable determination of drugs at levels as low as 10–20 nanograms per one millilitre of serum/urine, or 100 mg sample hair. The other possibility of improving sensitivity analysis is to concentrate sample components in the capillary by use of a sample stacking procedure [12, 18].

In the near future capillary electrophoresis may thus become an interchangeable or complementary method to commonly used analytical methods in forensic toxicology such as gas chromatography and high performance liquid chromatography.

References:

1. Aumatell A., Wells R. J., Determination of cardiac antiarrhythmic, tricyclic antipsychotics and antidepressants in human and animal urine by micellar electrokinetic capillary chromatography using a bile salt, *Journal of Chromatography B* 1995, vol. 669, pp. 331–334.
2. Boone C. M., Franke J. P., de Zeeuw R. A. [et al.], Evaluation of capillary electrophoretic techniques towards systematic toxicological analysis, *Journal of Chromatography A* 1999, vol. 838, pp. 259–272.
3. Gaus H. J., Gögüs Z. Z., Schmeer K. [et al.], Separation and identification of designer drugs with capillary electrophoresis and on-line connection with ionspray mass spectrometry, *Journal of Chromatography A* 1996, vol. 735, pp. 221–226.

4. Hyötyläinen T., Sirén H., Riekkola M. L., Determination of morphine analogues, caffeine and amphetamine in biological fluids by capillary electrophoresis with the marker technique, *Journal of chromatography A* 1996, vol. 735, pp. 439–447.
5. Kataoka Y., Makino K., Oishi R., Capillary electrophoresis for therapeutic drug monitoring of antiepileptics, *Electrophoresis* 1998, vol. 19, pp. 2856–2861.
6. Krogh M., Brekke S., Trønnesen F. [et al.], Analysis of drug seizures of heroin and amphetamine by capillary electrophoresis, *Journal of Chromatography* 1994, vol. 674, pp. 235–240.
7. Kuroda N., Nomura R., Al-Dirbashi O. [et al.], Determination of methamphetamine and related compounds by capillary electrophoresis with UV and laser-induced fluorescence detection, *Journal of Chromatography A* 1998, vol. 798, pp. 325–334.
8. Lee K. J., Lee J. L., Moon D. C., Determination of tricyclic antidepressants in human plasma by micellar electrokinetic capillary chromatography, *Journal of Chromatography* 1993, vol. 616, pp. 135–143.
9. Lukkari P., Nyman T., Riekkola M. L., Determination of nine β blockers in serum by micellar electrokinetic capillary chromatography, *Journal of Chromatography A* 1994, vol. 674, pp. 241–246.
10. Lurie I. S., Klein R. F. X., Cason T. A. D. [et al.], Chiral resolution of cationic drugs of forensic interest by capillary electrophoresis with mixtures of neutral and anionic cyclodextrins, *Analytical Chemistry* 1994, vol. 66, pp. 4019–4026.
11. Lurie I. S., Odeneal II N. G., McKibben T. D. [et al.], Effects of various anionic chiral selectors on the capillary electrophoresis separation of chiral phenethylamines and achiral neutral impurities present in illicit methamphetamine, *Electrophoresis* 1998, vol. 19, pp. 2918–2925.
12. McGrath G., Smyth W. F., Large-volume sample stacking of selected drugs of forensic significance by capillary electrophoresis, *Journal of Chromatography B* 1996, vol. 681, pp. 125–131.
13. Muijselaar P. G. H. M., Claessens H. A., Cramers C. A., Determination of structurally related phenothiazines by capillary zone electrophoresis and micellar electrokinetic chromatography, *Journal of Chromatography A* 1996, vol. 735, pp. 395–402.
14. Ramseier A., Siethoff C., Caslavská J. [et al.], Confirmation testing of amphetamines and designer drugs in human urine by capillary electrophoresis-ion trap mass spectrometry, *Electrophoresis* 2000, vol. 21, pp. 380–387.
15. Ramseier A., von Heeren F., Thormann W., Analysis of fluorescein isothiocyanate derivatized amphetamine and analogs in human urine by capillary electrophoresis in chip-based and fused-silica capillary instrumentation, *Electrophoresis* 1998, vol. 19, pp. 2967–2975.
16. Smyth W., McClean S., A critical evaluation of the application of capillary electrophoresis to the detection and determination of 1,4-benzodiazepine tran-

- quilizers in formulations and body materials, *Electrophoresis* 1998, vol. 19, pp. 2870–2882.
17. Spencer B. J., Zhang W., Purdy W. C., Capillary electrophoretic separation of tricyclic antidepressants using charged carboxymethyl- β -cyclodextrin as a buffer additive, *Electrophoresis* 1997, vol. 18, pp. 736–744.
 18. Tagliaro F., Manetto G., Bellini S. [et al.], Simultaneous chiral separation of 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA), 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA), 3,4-methylenedioxyethylamphetamine (MDE), ephedrine, amphetamine and methamphetamine by capillary electrophoresis in uncoated and coated capillaries with native β -cyclodextrin as the chiral selector: Preliminary application to the analysis of urine and hair, *Electrophoresis* 1998, vol. 19, pp. 42–50.
 19. Tagliaro F., Poiesi C., Aiello R. [et al.], Capillary electrophoresis for the investigation of illicit drugs in hair: determination of cocaine and morphine, *Journal of Chromatography* 1993, vol. 638, pp. 303–309.
 20. Tagliaro F., Smith F. P., Turrina S. [et al.], Complementary use of capillary zone electrophoresis and micellar electrokinetic capillary chromatography for mutual confirmation of results in forensic drug analysis, *Journal of Chromatography A* 1996, vol. 735, pp. 227–235.
 21. Tomita M., Okuyama T., Simultaneous determination of nitrazepam and its metabolites in urine by micellar electrokinetic capillary chromatography, *Journal of Chromatography* 1993, vol. 621, pp. 249–255.
 22. Tomita M., Okuyama T., Application of capillary electrophoresis to the simultaneous screening and quantitation of benzodiazepines, *Journal of Chromatography B* 1996, vol. 678, pp. 331–337.
 23. Thormann W., Meier P., Marcolli C. [et al.], Analysis of barbiturates in human serum and urine by high-performance capillary electrophoresis-micellar electrokinetic capillary chromatography with on-column multi-wavelength detection, *Journal of Chromatography* 1991, vol. 545, pp. 445–460.
 24. Walker J. A., Krueger S. T., Lurie I. S. [et al.], Analysis of heroin drug seizures by micellar electrokinetic capillary chromatography (MECC), *Journal of Forensic Sciences* 1994, vol. 40, pp. 6–9.
 25. Walker J. A., Marché H. L., Newby N. [et al.], A free zone capillary electrophoresis method for the quantitation of common illicit drug samples, *Journal of Forensic Sciences* 1996, vol. 41, pp. 824–829.
 26. Weinberger R., Lurie I. S., Micellar electrokinetic capillary chromatography of illicit drug substances, *Analytical Chemistry* 1991, vol. 63, pp. 823–827.
 27. Wernly P., Thormann W., Analysis of illicit drugs in human urine by micellar electrokinetic capillary chromatography with on-column fast scanning polychrome absorption detection, *Analytical Chemistry* 1991, vol. 63, pp. 2878–2882.
 28. Wernly P., Thormann W., Confirmation testing of 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in urine with micellar electrokinetic capillary chromatography, *Journal of Chromatography* 1992, vol. 608, pp. 251–256.

ELEKTROFOREZA KAPILARNA JAKO NOWE NARZĘDZIE W TOKSYKOLOGII SĄDOWEJ

Katarzyna MADEJ

WSTĘP

Głównym przedmiotem zainteresowania toksykologicznej analizy sądowej są środki odurzające i leki. Substancje te są identyfikowane i oznaczane w proszkach, tabletkach, płynach, roślinach oraz w próbkach biologicznych. Do tego celu służy wiele technik analitycznych, spośród których najczęściej stosowane są: chromatografia cienkowarstwowa (TLC), chromatografia gazowa (GC), wysokosprawną chromatografią cieczową (HPLC), metody immunologiczne i – w mniejszym stopniu – bezpośrednia spektrofotometria w zakresie UV.

Wyniki analiz toksykologicznych powinny być wysoce wiarygodne z powodu ich prawnych konsekwencji. Ogólnie akceptowana zasada obowiązująca w sądowej analizie toksykologicznej jest taka, że aby wyniki badań mogły uzyskać moc prawną, muszą być potwierdzone przy użyciu przynajmniej dwóch niezależnych metod o porównywalnej czułości, opartych na różnych mechanizmach fizykochemicznych. Elektroforeza kapilarna (CE) należy do stosunkowo nowych technik analitycznych i może być zamienną lub uzupełniającą metodą dla wysokosprawnej chromatografii cieczowej i chromatografii gazowej.

W niniejszej pracy przedstawiono główne aspekty elektroforezy kapilarnej oraz podano przykłady jej różnorodnych zastosowań w sądowej analizie toksykologicznej.

APARATURA DO ELEKTROFOREZY KAPILARNEJ (CE)

Schemat układu pomiarowego do elektroforezy kapilarnej został przedstawiony na rycinie 1. Aparatura do elektroforezy kapilarnej (CE) składa się z następujących zasadniczych części: systemu wstrzykowego, kapilary (średnica wewnętrzna: 20–100 μm , długość: 20–100 cm), źródła wysokiego napięcia (HV, rzędu 5–30 kV), elektrod, naczynek z buforem (w których podczas pomiaru zanurzone są elektrody i końce kapilary), naczynka z próbką, detektora oraz układu sterującego i rejestrującego. W zwykłym ustawieniu aparatu do CE wstrzykiwanie próbki odbywa się przy anodowym końcu kapilary, a detekcja analitów blisko jej katodowego zakończenia.

W CE aktualnie wykorzystywane są dwa sposoby wprowadzania próbki do kapilary: hydrodynamiczny i elektrokinetyczny. W pierwszym wykorzystuje się ciśnienie lub próżnię, a w drugim napięcie pola elektrycznego. Technika hydrodynamiczna jest nieselektywna, tzn. skład wprowadzonego roztworu do kapilary jest identyczny ze składem próbki, natomiast technika elektrokinetyczna jest selektywna, a skład wprowadzonego roztworu zależy od ruchliwości i ładunku elektrycznego składników próbki. Chociaż teoretycznie drugi sposób ma przewagę nad pierwszym ze względu na selektywność analizy, na wprowadzanie roztworów do kapilary techniką elektrokinetyczną wpływa wiele czynników trudnych do kontro-

lowania i aby uzyskać powtarzalne wyniki, niezbędna jest odpowiednia optymalizacja warunków analitycznych.

Kapilara, ze względu na swoją podstawową rolę w analizie (miejsce, w którym zachodzi separacja i detekcja badanych związków), powinna spełniać odpowiednie warunki. Kapilara powinna być: odporna na czynniki chemiczne i fizyczne, przepuszczalna dla promieniowania UV (zwykle stosowana jest detekcja spektrofotometryczna w UV); powinna też umożliwiać odprowadzenie ciepła Joule'a poprzez dobre termalne przewodnictwo oraz być stosunkowo niedroga.

SPOSOBY SEPARACJI

Analizy techniką CE polegają ogólnie na rozdziale (w polu elektrycznym o wysokim natężeniu) składników próbki w kapilarze wypełnionej odpowiednim buforem. W celu oznaczenia badanych związków stosuje się odpowiedni system detekcji (np. UV, fluorescencyjny ze wzbudzeniem laserowym, spektrometrii mas).

Stosując to samo oprzyrządowanie, można uzyskać kilka wariantów separacji analitów opartych na różnych zasadach fizykochemicznych poprzez zmianę buforu i/lub kapilary. Są to: kapilarna elektroforeza strefowa (CZE), micelarna elektrokinezytyczna chromatografia kapilarna (MECC lub MEKC), separacje chiralne, kapilarna elektroforeza żelowa (GCE), izoelektryczne ogniskowanie kapilarne (CIEF) oraz izotachoforeza kapilarna (CITP).

W toksykologicznej analizie sądowej istotną rolę odgrywają trzy sposoby separacji: CZE, MECC i rozdział chiralny.

Kapilarna elektroforeza strefowa (CZE)

CZE jest podstawowym sposobem separacyjnym elektroforezy kapilarnej, który przebiega w zasadniczym buforze wolnym od dodatkowych substancji (surfaktantów, związków chiralnych) biorących udział w procesie rozdziału. W kapilarze wypełnionej buforem separacyjnym związki w postaci jonowej są rozdzielane w polu elektrycznym o wysokim natężeniu (setki V na cm) na zasadzie różnic ich elektroforetycznych ruchliwości. Ruchliwość elektroforetyczna (μ_e) jest wprost proporcjonalna do ładunku jonowego, a odwrotnie proporcjonalna do lepkości buforu i promienia jonowego.

Oprócz migracji elektroforetycznej, głównym czynnikiem w CE jest elektroosmoza – ruch cieczy wypełniającej kapilarę, która jest źródłem tzw. przepływu elektroosmotycznego (EOF). Ruchliwość EOF (μ_{eo}) jest wprost proporcjonalna do stałej dielektrycznej buforu i potencjału zeta (ζ) (potencjał mierzony w płaszczyźnie poślizgu przy powierzchni międzyfazowej ciało stałe – ciecz) oraz odwrotnie proporcjonalna do lepkości buforu.

W kapilarach krzemionkowych (*bare fused-silica capillary*) przy zastosowaniu wariantu elektroforezy strefowej, EOF jest skierowany od końca anodowego do końca katodowego kapilary. Ogólnie, prędkość migracyjną (v) analitów wyraża następujące równanie:

$$v = (\mu_{eo} + \mu_e) E = (\mu_{eo} + \mu_e) V/L, \quad \{1\}$$

gdzie: E – natężenie pola elektrycznego, V – napięcie, L – długość kapilary.

Micelarna elektrokinetyczna chromatografia kapilarna (MECC, MEKC)

Ze względu na to, że rozdział związków w strefowej elektroforezie kapilarnej opiera się na różnicach w ich elektroforetycznych ruchliwościach, ten wariant separacji nie jest odpowiedni dla substancji obojętnych, które migrują w kierunku detektora z tą samą szybkością jak *EOF*. Micelarna elektrokinetyczna chromatografia kapilarna działa na zasadzie micelarnej „pseudostacjonarnej” fazy dodanej do buforu, która wchodzi w interakcje z badanymi związkami zgodnie z mechanizmem podziału, podobnie jak ma to miejsce w technice chromatografii podziałowej. W tym układzie, *EOF* pełni rolę chromatograficznej „fazy ruchomej”, a micelarną fazę „pseudostacjonarną” stanowi surfaktant (surfaktanty) dodany do zasadniczego buforu w stężeniu wyższym od krytycznego stężenia micelnego (*CMC*). Najczęściej używanym surfaktantem jest siarczan sodowy dodecyłu (*SDS*). Anionowe micelle *SDS* są elektrostatycznie przyciągane w kierunku anody, ale ze względu na przeważającą prędkość *EOF*, micelle te powoli migrują ku katodzie, tj. w kierunku detektora. W zależności od indywidualnych równowag podziałowych badanych związków pomiędzy hydrofobowy rdzeń miceli i wodny bufor, micelle selektywnie spowalniają migrację niejonowych związków, które wchodzi z nimi w interakcje. W przypadku nieobecności surfaktantu w roztworze, związki te migrowałyby z tą samą prędkością jak *EOF*. W rezultacie opisanych procesów, bardziej polarne cząsteczki migrują szybciej niż mniej polarne i hydrofobowe związki. W MECC stosuje się wiele surfaktantów, ale najbardziej popularne – poza *SDS* – są sole kwasów żółciowych oraz czwartorzędowe sole amonowe z łańcuchami hydrofobowymi.

Rozpuszczalniki organiczne (np. metanol, acetonitryl) są często stosowane w celu redukcji hydrofobowych interakcji pomiędzy badanymi związkami i micelami oraz – w konsekwencji – w celu zwiększenia szybkości ich migracji, analogicznie jak ma to miejsce w chromatografii z odwróconymi fazami.

Rozdział związków optycznie czynnych (chiralnych)

Elektroforeza kapilarna odgrywa ważną rolę w rozdziale związków chiralnych. Rozdziały te wynikają ze specyficznych interakcji aktywnych chiralnie molekuł wykazujących różne powinowactwo dla dwóch enancjomerów badanych związków. Do chiralnie aktywnych selektorów stosowanych w CE należą: cyklodekstryny (*CDs*), zmodyfikowane *CDs*, sole kwasów żółciowych, etery koronowe, proteiny oraz antybiotyki. *CDs* i cykliczne oligosacharydy są bardzo powszechnie stosowanymi chiralnymi selektorami. Związki te posiadają zewnętrzną powierzchnię hydrofilową i hydrofobowe wgłębienie, w którym mogą inkludować inne związki poprzez interakcje hydrofobowe. Mechanizm inkluzji jest selektywny sferycznie, ponieważ anality muszą odpowiadać rozmiarowi wnęki. Naturalne *CDs* są obojętne i hydrofilowe, i w konsekwencji migrują z prędkością *EOF*. Prędkość migracyjna skompleksowanej formy będzie różniła się od prędkości wolnej molekuly ze względu na większy rozmiar kompleksu z tym samym ładunkiem, jaki posiada wolna cząsteczka. Tak więc, im większe powinowactwo analitu do *CD*, tym mniejsza jest jego całkowita ruchliwość elektroforetyczna. Aby zwiększyć rozpuszczalność oraz selektywność działania naturalnych *CDs*, są one poddawane derywatywacji odpowiednimi odczynnikami, uzyskując pochodne, np. dimetyl- β -*CD*, hydroxypropyl- β -*CD*, karboxymetyl- β -*CD*. Również wariant MECC z dodatkiem selektywnych chiralnie miceli wykazał duży

potencjał separacyjny. Powszechnie stosowane są surfaktanty chiralne (np. sole kwasów żółciowych) tworzące chiralnie aktywne micelle, jak również mieszaniny roztworów micelarnych, zawierających SDS i chiralne surfaktanty lub pochodne CDs.

WYKORZYSTANIE ELEKTROFOREZY KAPILARNEJ W ANALIZIE SĄDOWEJ

Elektroforeza kapilarna ze względu na swój duży potencjał analityczny stosowana jest w różnych dziedzinach analizy sądowej. Do najważniejszych z nich należą:

- analiza białek i fragmentów DNA,
- badanie śladów powybuchowych i powystrzałowych,
- analiza materiałów kryjących,
- badanie środków odurzających i leków w materiałach biologicznych i niebiologicznych.

ZASTOSOWANIA ELEKTROFOREZY KAPILARNEJ W SĄDOWEJ ANALIZIE TOKSYKOLOGICZNEJ

Badanie techniką CE związków ważnych z punktu widzenia toksykologii sądowej rozwija się w trzech głównych kierunkach:

1. badania prawnie kontrolowanych substancji odurzających i towarzyszących im związków w skonfiskowanych preparatach,
2. analizy środków odurzających w próbkach biologicznych,
3. oznaczania leków w materiale biologicznym i niebiologicznym.

W większości poniżej podanych przykładów zastosowania CE w sądowej analizie toksykologicznej używano kapilary krzemionkowej (*bare fused-silica capillary*) oraz detekcję spektrofotometryczną w zakresie UV.

Badania prawnie kontrolowanych substancji odurzających i towarzyszących im związków w skonfiskowanych preparatach

Analiza nielegalnie wytwarzanych substancji odurzających, zatrzymanych przez policję, ma dwa zasadnicze cele:

- rozdział, identyfikację i oznaczenie składników w próbce badanego materiału,
- określenie nielegalnego źródła pochodzenia substancji odurzającej (lub mieszaniny substancji odurzających) na podstawie rodzaju i ilości oznaczonych związków współwystępujących z tą substancją.

Do związków towarzyszących zasadniczej substancji (substancjom) odurzającej (odurzającym) mogą należeć substancje rozcieńczające (dodawane w celu fałszerstwa lub wzmocnienia działania narkotyku) oraz zanieczyszczenia powstałe w trakcie jego wytwarzania.

Z sądowego punktu widzenia istotny z dwóch względów jest również rozdział chiralnych związków odurzających na ich odmiany enancjomeryczne. Po pierwsze, w pewnych przypadkach tylko jeden enancjomer badanej substancji podlega prawnej kontroli, a więc jego identyfikacja ma podstawowe znaczenie. Po drugie, określenie stosunku odmian enancjomerycznych występujących w próbce nielegalnie produkowanej substancji może wskazywać na technologię jego wytwarzania.

Obecnie techniką elektroforezy kapilarnej bada się większość znanych substancji odurzających, do których zaliczają się: heroina, morfina, kokaina, LSD (dietyloamid kwasu lizergowego), PCP (fencyklidyna), fentanyl, kanabinoidy, amfetaminy, psylocyna, psylocybina, metakwalon, metkatinon i inne.

Oznaczanie heroiny oraz analizę skryningową ponad dwudziestu związków obecnych w nielegalnych próbkach heroiny przeprowadzono stosując MECC z buforem separacyjnym o składzie: 40 mM SDS; 8,5 mM fosforanu sodowego; 8,5 mM boranu sodowego i 15% acetonitrylu (pH = 8,5) [24]. Jako przykłady substancji towarzyszących heroinie można podać takie rozcieńczalniki jak: nikotynamid, fenacytynę, acetaminofen, kofeinę, metakwalon, fenobarbital, lidokainę, prokainę, kwas salicylowy, kwas acetylosalicylowy oraz zanieczyszczenia: O⁶-acetylmorfinę, acetylkodeinę i alkaloidy opium. W celu wyznaczenia czasów migracji wszystkich analizowanych związków zastosowano n-propyl-p-hydroksybenzoesan (NPPB) jako standard wewnętrzny, a całkowity czas analizy skryningowej nie przekroczył pięciu minut.

Analogiczne warunki analizy zastosowano do badania skonfiskowanych próbek heroiny i amfetaminy w Norwegii [6] oraz próbek nielegalnej heroiny i kokainy w Stanach Zjednoczonych [26].

Przykładem wykorzystania CZE może być praca [25], w której przedstawiono analizę skryningową trzynastu popularnych związków odurzających o charakterze zasadowym, takich jak: amfetamina, metamfetamina, metylenedioksyamfetamina, metylenedioksymetamfetamina, psylocyna, kokaina, PCP, metadon, kodeina, morfina, acetylkodeina, heroina i LSD. 200 mM fosforan sodowy o pH = 4,5 zastosowano do rozdziału substancji rozcieńczających i zanieczyszczeń powszechnie występujących w konfiskowanych próbkach kokainy, heroiny i metamfetaminy. W badanych próbkach przeprowadzono analizę ilościową kokainy, heroiny, metamfetaminy, LSD i PCP.

Opublikowano również prace dotyczące rozdziału i identyfikacji amfetamin przy zastosowaniu technik separacyjnych MECC i CZE oraz buforów z dodatkiem chiralnych selektorów [3, 10, 11]. Rozdział trzech metylenedioksyamfetamin: 3,4 metylenedioksyfenylamfetaminy (MDA), 3,4 metylenedioxyfenyletylaminy (MDE) i 3,4 metylenedioxyfenylmetamfetaminy (MDMA) przeprowadzono stosując wariant MECC z buforem separacyjnym o składzie: 40 mM octanu amonowego i 0,5 mM chlorku cetyltrimetylamonowego (CTAC, pH = 5,5) oraz wariant CZE z buforem separacyjnym o składzie: 40 mM mrówczanu sodu i 10 mM chlorku sodu (pH = 2,5). Detekcję rozdzielonych związków prowadzono, stosując metodę spektrofotometrii w zakresie UV oraz metodę spektrometrii mas [3]. W celu dokonania rozdziału enancjomerów wyżej wymienionych związków chiralnych zastosowano bufor złożony z 50 mM fosforanu sodowego, 10 mM β -cyklodextryny (β -CD) i 5 mM trietylaminy (pH = 2,0) [3]. Efektywność różnych anionowych chiralnych selektorów testowano na przykładzie rozdziału sześciu chiralnych fenyletyloamin i ich zanieczyszczeń powszechnie występujących w próbkach nielegalnie wytwarzanej metamfetaminy [11]. Analizy przeprowadzono, stosując bufor separacyjny o składzie: 13,4 mM fosforanu (pH = 8,5), 25 mM chiralnego surfaktanta lub 10 mM cyklodextryny i 10% metanolu. Stosując sulfobutyl – (VII)-eter- β -cyklodextrynę – przeprowadzono jednoczesny rozdział piętnastu badanych związków strukturalnie spokrewnionych z metamfetaminą [11]. Natomiast rozdziały enancjomerów: amfetaminy, metamfetaminy, efedryny, pseudoefedryny, kokainy i propoksyfenu oraz składników naturalnie występujących w liściach khatu

(m.in. katinonu, katiny i norefedryny) przeprowadzano z wykorzystaniem obojętnych i anionowych cyklodextryn oraz ich mieszanin [10].

Analiza środków odurzających w próbkach biologicznych

Elektroforeza kapilarna, pomimo swojej stosunkowo niskiej czułości bezwzględnej (zwłaszcza w połączeniu z detekcją spektrofotometryczną), z powodzeniem wykorzystywana jest do badania próbek materiału biologicznego: moczu, surowicy (osocza) krwi oraz włosów. Ze względu na stosunkowo niskie stężenia ksenobiotyków w materiale biologicznym, związki badane metodą CE muszą być wstępnie wielokrotnie koncentrowane poprzez zastosowanie odpowiednich procedur ekstrakcji. Najczęściej stosowanymi technikami ekstrakcji w analizie materiału biologicznego są: ekstrakcja typu ciecz – ciecz oraz ekstrakcja na fazie stałej (SPE).

W wyżej wspomnianym materiale identyfikuje i oznacza się większość powszechnie znanych środków odurzających i ich metabolitów, do których można zaliczyć: kwas 11-nor- Δ^9 -tetrahydrokanabinol-9-karboksylowy, kokainę i benzoilokgoninę, amfetaminę i jej analogi, morfinę oraz inne alkaloidy opium.

Kwas 11-nor- Δ^9 -tetrahydrokanabinol-9-karboksylowy (THC-COOH, główny metabolit Δ^9 -tetrahydrokanabinolu) oznaczano w moczu (5 ml) w stężeniu około 10 ng w 1 ml badanego materiału [28]. Oznaczenie THC-COOH przeprowadzono, wykorzystując wariant MECC z buforem separacyjnym o składzie: 75 mM SDS, 6 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ i 10 mM Na_2HPO_4 (pH = 9,1). Stosując analogiczne jak wyżej warunki, w moczu oznaczono również takie środki odurzające, leki i/lub ich metabolity jak: opioidy, benzoilokgoninę (główny metabolit kokainy), amfetaminę i jej analogi oraz metakwalon, a także benzodiazepiny: diazepam, oxazepam i flunitrazepam [27]. Granica detekcji badanych związków, po ekstrakcji 5 ml moczu, wynosiła ok. 100 ng/ml.

Rozdział amfetaminy, morfiny i jej analogów oraz kofeiny w próbkach surowicy i moczu przeprowadzono w czasie około 18 minut, stosując wariant MECC z buforem separacyjnym zawierającym 0,05 M glicyny i 0,05 M SDS (pH = 10,5) [4]. W celu zapewnienia odpowiedniej powtarzalności parametru identyfikacyjnego badanych związków, do próbki dodawano dwa kwasy karboksylowe jako związki odniesienia.

W kilku innych pracach [7, 14, 15, 18] przedstawiono zastosowanie różnych wariantów separacyjnych CE do identyfikacji i oznaczenia amfetaminy i jej pochodnych w moczu. Analizę skryningową amfetaminy, metamfetaminy, MDMA i MDA przeprowadzono stosując CZE w połączeniu z detekcją spektrometrii mas (API-MS). Jako bufor separacyjny zastosowano mieszaninę octanu amonowego i kwasu octowego o pH = 4,6 [14] i wyżej wspomniane związki oznaczano w moczu w zakresie stężeń 50–200 ng/ml. Opisano także jednoczesne oznaczenie metamfetaminy i jej pokrewnych związków przy użyciu MECC z detekcją UV oraz detekcją fluorescencyjną ze wzbudzeniem laserowym (LIF) [7]. Rozdział związków przeprowadzono w moczu, stosując bufor zawierający 50 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ oraz 15 mM SDS (pH = 9,3). W ciągu około 15 minut rozdzielono następujące związki: metamfetaminę, amfetaminę, 4-hydroxyamfetaminę i 4-hydroxymetamfetaminę. W celu zwiększenia czułości analizy zastosowano również detekcję fluorescencyjną po uprzednim przeprowadzeniu oznaczanych związków w pochodne przy użyciu odczynnika 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazolowego [7]. Amfetaminę i jej analogi oznaczano także w postaci pochodnych izotiocyanianu fluoresceiny (FITC), stosując alkaliczne bufor separacyjny bez dodatku surfaktanta (CZE) oraz z dodatkiem SDS (MECC) [15]. Pochodne FITC

amfetaminy, metamfetaminy, MDMA i β -fenyloetyloaminy jednocześnie oznaczano w moczu i dla każdego związku uzyskano granicę detekcji – około 200 ng/ml badanego materiału. Rozdział enancjomerów amfetaminy i jej pięciu analogów: MDMA, MDA, MDE, efedryny i metamfetaminy przeprowadzono w moczu, stosując 100 mM bufor fosforanowy o pH = 2,5 z dodatkiem naturalnej β -cyklodextryny o stężeniu 15 mM jako chiralnego selektora [18]. Dla każdego enancjomeru badanego związku granica detekcji wynosiła poniżej 200 ng w 1 ml moczu.

W celu prześledzenia historii przyjmowania środków odurzających, badaniu poddaje się włosy. Odpowiednio przygotowane próbki włosów analizowano ze względu na obecność wyżej wspomnianych amfetamin [18], a także kokainy i morfiny [19]. W przypadku oznaczania amfetamin w próbkach włosów wykorzystano efekt koncentracji tych związków w kapilarze (*field-amplified sample stacking procedure*). Natomiast morfinę i kokainę oznaczano we włosach osób przyjmujących heroinę i kokainę, stosując wariant CZE z 0,05 M buforem boranowym o pH = 9,2 [19]. Granica detekcji morfiny i kokainy wynosiła 0,15 ng/mg, co pozwoliło oznaczać te związki w próbkach włosów o masie 100 mg.

Oznaczanie leków w materiale biologicznym i niebiologicznym

W pracach dotyczących analizy leków techniką elektroforezy kapilarnej przedstawiono metody rozdziału i jednoczesnego oznaczania od kilku do kilkudziesięciu związków leczniczych z różnych grup farmakologicznych. Opisano również metody oznaczania pojedynczych leków wraz z ich metabolitami. Spośród badanych dotychczas leków elektroforezą kapilarną, a równocześnie ważnych z punktu widzenia sądowego, można wymienić: benzodiazepiny [16, 21, 22], barbiturany [2, 23], trójpierścieniowe leki przeciwdepresyjne [1, 8, 17], fenotiazyny [1, 13], leki przeciwpadaczkowe [5], β -blokery [8] i leki antyarytmiczne [1].

Wymienione związki lecznicze analizowane były w: wodnych roztworach wzorcowych, próbkach biologicznych, preparatach farmaceutycznych oraz wspomnianych wcześniej nielegalnych próbkach środków odurzających. Szczególnie leki psychotropowe z grup barbituranów i benzodiazepin często dodawane są do nielegalnie wytwarzanych środków odurzających w celu uzyskania określonego efektu na organizm.

Rozdział 25 leków z grupy barbituranów testowano przez zastosowanie dwóch separacyjnych technik elektroforezy kapilarnej: CZE i MECC [2]. Badane barbiturany były rozdzielane techniką CZE przy użyciu 90 mM buforu boranowego o pH = 8,4, natomiast w przypadku techniki MECC zastosowano 20 mM bufor fosforanowy z dodatkiem SDS w stężeniu 50 mM o pH = 7,5. W celu zwiększenia powtarzalności parametru identyfikacyjnego, a następnie zastosowania powyższych metod, do systematycznej analizy toksykologicznej wprowadzono parametr skorygowanej efektywnej ruchliwości. W kolejnej pracy [23] monitorowano w surowicy (lub osoczu) i moczu siedem leków z grupy barbituranów: barbital, allobarbital, fenobarbital, butalbital, tiopental, amobarbital i pentobarbital, stosując wariant MECC z buforem fosforanowo-boranowym o pH = 7,8 zawierającym 50 mM SDS. W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono możliwość analizy niektórych barbituranów wprost w surowicy krwi, natomiast analiza tych leków w moczu wymagała uprzedniej ekstrakcji tego materiału [23]. Stosując analogiczny do powyższego skład buforu separacyjnego z 15% dodatkiem metanolu, przeprowadzono analizę skryningową sześciu leków z grupy pochodnej benzodiazepiny: nitrazepam, diazepam, estazo-

lamu, bromazepamu, triazolamu i flurazepamu w surowicy w ciągu 25 minut [22]. Dla flurazepamu uzyskano granicę detekcji wynoszącą 200 ng/ml, a dla pozostałych benzodiazepin 25 ng/ml.

Przykładem analizy pojedynczego leku wraz z jego metabolitami może być oznaczenie pochodnej benzodiazepiny – nitrazepamu i jego głównych metabolitów w moczu: 7-amino-nitrazepamu i 7-acetamidonitrazepamu [21]. Wymienione powyżej związki analizowano w moczu przy zastosowaniu buforu fosforanowo-boranowego o pH = 8,5 z dodatkiem SDS i metanolu. Czas rozdziału trzech badanych związków wynosił 25 minut, a granice ich wykrywalności w moczu mieściły się w zakresie 100–200 ng/ml.

Do często stosowanych leków psychotropowych należą również trójpierścieniowe leki przeciwdepresyjne oraz pochodne fenotiazyny. Trójpierścieniowe leki przeciwdepresyjne: dezypraminę, nortryptylinę, doksepin, imipraminę i amitryptylinę oznaczano w osoczu, stosując wariant MECC z buforem fosforanowym o pH = 8,0, zawierającym 25 mM DTAB (bromku dodecylotrimetylamoniowego) i 2 M moczniaka [8]. Granica detekcji dla badanych leków wynosiła 5–10 ng/ml. Optymalizację warunków rozdziału czternastu fenotiazyn prowadzono na substancjach wzorcowych tych leków, stosując techniki CZE i MECC [13]. Przy zastosowaniu 20 mM buforu Tris/kwas octowy o pH = 5,0 z dodatkiem surfaktantu kationowego FC 135 w stężeniu 50 mg/l i 10 mM CTAB (bromku cetyltrimetylamoniowego) uzyskano rozdzielanie 9 fenotiazyn. Stosując wariant CZE (bez dodatku surfaktantów), przeprowadzono oznaczenie prometazyny i tiorydazyny w preparatach farmaceutycznych. Micelną elektrokineetyczną chromatografię zastosowano również do analizy 26 leków o strukturze trójcyklicznej, używając buforu separacyjnego złożonego z tetraboranu sodowego i taurodeoksycholanianu sodowego [1]. Wśród leków tych znajdowały się leki antyarytmiczne trójpierścieniowe leki przeciwpsychotyczne i przeciwdepresyjne. Rozdział i oznaczenie badanych związków przeprowadzono w moczu i uzyskano dla nich granice wykrywalności w zakresie od kilku do kilkudziesięciu ng/ml.

Dziewięć trójpierścieniowych leków przeciwdepresyjnych, takich jak: trimipramina, klomipramina, protryptylina, imipramina, dezypramina, amitryptylina, nortryptylina, opipramol i karbamazepinę rozdzielono w kapilarze krzemionkowej pokrytej od wewnątrz poliakrylamidem, stosując bufor separacyjny o składzie: 10 mM cytrynianu, 20 mM SDS i 10 mM karboksymetylu- β -cyklodextryny (CM- β -CD), pH = 6,5 [17].

PODSUMOWANIE

Zastosowanie z powodzeniem elektroforezy kapilarnej do rozwiązywania wielu problemów związanych z badaniem środków odurzających i leków w różnych materiałach udowodniło, iż jest to technika o dużym potencjale analitycznym. Szczególnie szerokie możliwości separacyjne posiada wariant elektroforezy kapilarnej zwany micelną elektrokineetyczną chromatografią kapilarną, która łączy w sobie dwa mechanizmy rozdzielania: elektroforetyczny i chromatograficzny. Duży potencjał rozdzielczy elektroforezy kapilarnej wykorzystywany jest także w przypadkach analiz związków chiralnych, w których stosuje się bufor z dodatkiem chiralnych selektorów. Warta podkreślenia jest także możliwość łatwego zastosowania kilku warun-

ków rozdziału opartych na różnych mechanizmach fizykochemicznych (np. CZE, MECC), często wymagająca jedynie wymiany buforu separacyjnego [20]. Ponadto elektroforeza kapilarna wykazuje takie zalety, jak niewielkie zużycie próbek i reagentów oraz stosunkowo niskie koszty eksploatacyjne. Inną zaletą elektroforezy kapilarnej jest możliwość zastosowania techniki MECC do badania niektórych leków wprost w materiale biologicznym, np. surowicy krwi [23] bez przeprowadzania ekstrakcji. Pewnymi ograniczeniami tej techniki są: stosunkowo mała powtarzalność czasów migracji (parametru identyfikacyjnego) oraz niezbyt duża czułość bezwzględna, związana z niewielką ilością próbki pobieranej do analizy (rzędu kilku nanolitów) oraz powszechnie stosowaną detekcją spektrofotometryczną w UV (droga optyczna przez próbkę równa jest średnicy wewnętrznej kapilary). Aby przystosować CE do wymogów sądowej analizy toksykologicznej, niezbędne jest poprawienie wyżej wymienionych parametrów. W celu zwiększenia powtarzalności wyników zastosowano już dodatek odpowiednich związków odniesienia do próbki [4] oraz korelację parametru identyfikacyjnego [2]. Natomiast stosunkowo mała czułość bezwzględna kompensowana jest przez zastosowanie efektywnych procedur ekstrakcji do wstępnego koncentrowania badanych związków, które umożliwiają analizę leków i środków odurzających na poziomie nawet kilkunastu nanogramów w 1 ml badanego płynu ustrojowego lub w próbce włosów o masie 100 mg. Inną możliwością zwiększenia czułości analizy jest koncentrowanie składników próbki w kapilarze (*a sample stacking procedure*) [12, 18]. W bliskiej przyszłości elektroforeza kapilarna może się zatem stać zamienną lub uzupełniającą metodą dla powszechnie stosowanych metod analitycznych w toksykologii sądowej, takich jak chromatografia gazowa i wysoko-sprawna chromatografia cieczowa.