

# RAPID LC-MS/APCI METHOD FOR QUANTITATION OF MDMA, MDA AND MDEA IN WHOLE BLOOD

Wojciech LECHOWICZ<sup>1</sup>, Andrzej PARCZEWSKI<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup> *Institute of Forensic Sciences, Cracow*

<sup>2</sup> *Faculty of Chemistry, Jagiellonian University, Cracow*

**ABSTRACT:** 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA) is a psychotropic substance with both stimulant and hallucinogenic properties. MDMA is chemically related to other designer drugs such as 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA) and 3,4-methylenedioxyethylamphetamine (MDEA). A rapid method of blood analysis by means of liquid chromatography-mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization (LC-MS/APCI) has been proposed for detection and quantitation of methylenedioxyamphetamines. The proposed methodology requires 0.2 ml of blood or serum. Established limits of detection for all analytes were below 1 ng/ml. Limits of quantitation were 5 ng/ml. A statistical evaluation of obtained positive results is presented. Almost 10% of positive MDMA cases were classified as drug-facilitated sexual assaults (DFSA). Half of the determined concentration of MDMA was within the range of 80-200 ng/ml. Some practical remarks on blood analysis for MDMA are made.

**KEY WORDS:** MDMA; MDA; MDEA; Blood; LC/MS; Toxicological analysis.

*Problems of Forensic Sciences, vol. LX, 2004, 42–57*

*Received 10 December 2004; accepted 13 January 2005*

## INTRODUCTION

3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA) is considered a so-called designer drug, i.e. a psychotropic substance produced in an illegal laboratory. MDMA, also termed “ecstasy”, is taken at doses of ca. 2 mg/kg body weight. Its maximum concentration in blood is observed at about 1–1.5 hours, and the effects of its activity are maintained for 4–6 hours.

The increasing availability of “ecstasy”, especially among young people at discotheques, leads to more frequent consumption and, by the same token, a greater number of infringements of the law. Results of pilot studies carried out in Lublin Voivodeship (province), Poland, showed that “ecstasy” is the second most commonly consumed drug at discotheques (49%) after marihuana (62%). I. Siudem noticed [13] that there was a strong correlation (0.85) between expenditure on drugs and contraception. Analysis carried out at the Institute of Forensic Research, Cracow, in 2004 showed an increase in

the number of rapes, when substances which facilitate sexual assault were consumed. Among 41 blood samples in which MDMA was detected – the main constituent of “ecstasy” – at least 5 were submitted in connection with suspicion of crime with a sexual background.

A disturbing phenomenon, which can be observed periodically in connection with consumption of “ecstasy” pills, is their changeable content. The original psychotropic component of “ecstasy” pills – MDMA – is exchanged for another component, which very often has a higher toxicity [1, 4, 5, 9, 11].

At least a dozen papers have described methods of determination and quantification of amphetamine and its derivatives, including methylenedioxyamphetamines in biological material [12]. Analysis of these compounds by GC/MS requires a derivatisation step, e.g. by application of trichloroacetate acid anhydride, because of the physico-chemical nature of this compound [6]. So new analytical methods were sought, which did not require this step. A paper written by Goff et al. [7] was one of the first papers which described determination and quantification of MDMA and its metabolite MDA in blood and slices of liver tissues of rabbits as well as in the larvae of flies, which are parasites on carrion. He applied liquid-liquid extraction and LC/MS analysis with electro-spray ionisation (ES); ions were analysed in selected ion monitoring mode (SIM). MDMA-D<sub>5</sub> was applied as an internal standard. The obtained limits of detection were on the borderline between pico- i nanograms. Findings from these studies aided in the evaluation of time elapsed since moment of death.

Kataoka et al. [8] applied the LC/ES/MS method with SIM mode to quantification of amphetamine, MDA, MDMA and MDEA in urine. They applied solid phase micro-extraction after multiple dilution of the sample and obtained limits of detection from 0.38 to 0.82 ng/ml. Limits of quantification were from 32 to 79 ng/ml.

Application of atmospheric pressure chemical ionisation (APCI) was proposed by Bogusz et al. [2, 3]. He presented validation parameters in two papers on identification and quantification of amphetamine and its derivatives – e.g. MDMA. He achieved a limit of detection of 1–5 ng/ml. He also applied a phenylthiocyanine derivatisation agent, which is an untypical approach when the LC/MS method is applied [3].

In the present paper, another method of quantification of MDA, MDMA and MDEA in a small amount of blood (0.2 ml) and with a shortened analytical procedure are proposed. A short time of analysis and simplicity are advantages of this method.

## MATERIALS AND METHODS

A liquid chromatograph coupled with a mass spectrometer HP-1100 Series, Agilent Technologies (USA) was applied in the research. Separation was performed by application of a LiChroCART  $55 \times 4$  column with Purospher STAR RP-18e stationary phase, Merck (Darmstadt, Germany). The following chemical agents were used: acetonitrile (HPLC gradient-grade) and distilled water (HPLC gradient-grade) by Merck, n-butyl chloride (pure p.a.) and ether diisopropyl (pure p.a.) by Sigma (St. Louis, USA), formic acid 90% (pure p.a.) (Ubichem, UK), sodium carbonate (pure p.a.), sodium hydrocarbonate (pure p.a.) and 0.025M hydrochloric acid (pure p.a.) (POCH, Poland).

Developing a new method of determination of methylenedioxyamphetamines was dictated by the necessity of analysis of small amounts of blood. Conditions of ionisation, fragmentation, separation and ionisation were optimised. The parameter of optimisation was the height of the analyte peak, taking into account selectivity of the method. This method was used in parallel with a method of determination of amphetamine by LC/MS in blood, which was worked out earlier. Results obtained by these two methods were compatible. Validation of the method was carried out with application of Validation Manager software made by Merck.

## RESULTS

## MS conditions

The similar structure of compounds from the methylenedioxyamphetamines group makes it possible to select optimal conditions of ionisation and fragmentation relatively easily. A low fragmentor voltage (60 V) was used for obtaining a high intensity of apparent molecular ions ( $M+H^+$ ), which pre-

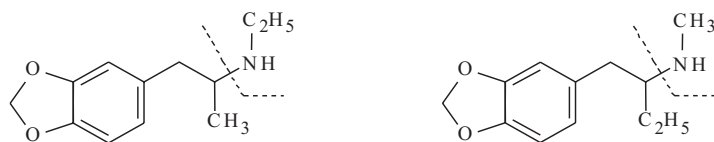


Fig. 1. Chemical structure of MDEA and MBDB. Path of fragmentation is marked with dashed line.

vented their fragmentation in the CID zone. A voltage of 100 V was applied to obtain confirmation ions at masses  $m/z = 163$  and  $177$ . Special attention

was focused on the fragmentation route of two isomers – MDEA and MBDB (potential interferent, Figure 1), whose molecular masses are identical.

Chromatographic features of both compounds are very similar. This could cause difficulties in separation of these compounds and their identification if inappropriate chromatographic columns and too low fragmentor voltage in the CID zone are applied. The presented fragmentation spectra of MDEA and MBDB were obtained during analysis at fragmentor voltage of 100 V (Figure 2).

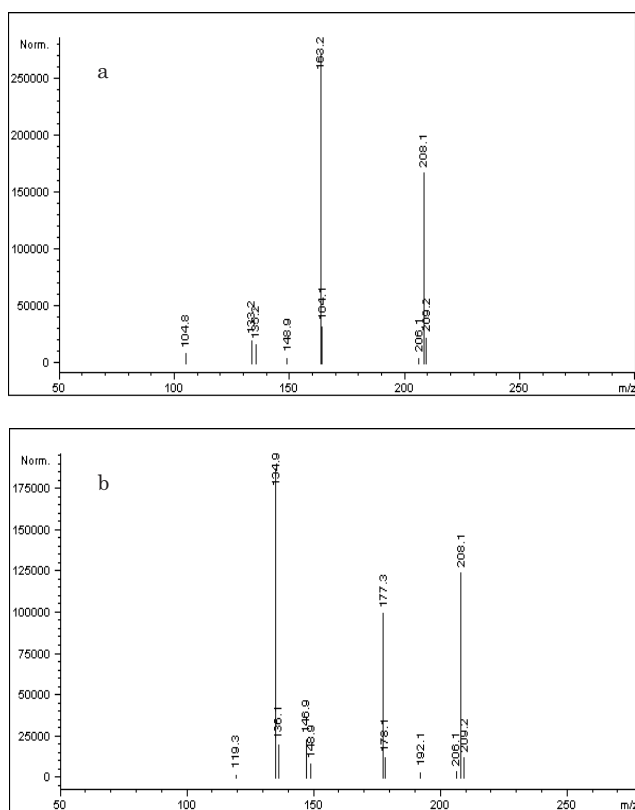


Fig. 2. Mas spectra of MDEA (a) and MBDB (b) obtained when fragmentor voltage was set to 100 V (CID).

As in the case of other compounds, the fragmentor voltage had the greatest influence on signal intensity. For successive methylenedioxyamphetamines (MDA, MDMA, MDEA), with increasing molecular mass, it was observed that small shifts of voltage were necessary for obtaining the maximum intensity of molecular ions.

A fragmentation ion  $m/z = 163$  occurred in the case of MDA ( $M+H^+$ ; 180), MDMA ( $M+H^+$ ; 194) and MDEA ( $M+H^+$ ; 208) and a fragmentation ion  $m/z = 177$  occurred in the case of MBDB isomer ( $M+H^+$ ; 208). A small shift of fragmentor voltage – necessary to obtain the maximum intensity – was also observed.

Differences in methods of fragmentation of MDEA and MBDB, i.e. formation of ions of two different values of  $m/z$  (163 and 177 respectively) at fragmentor voltages above 100 V mean that monitoring of these ions allows us to obtain peaks of MDEA and MBDB without the necessity of their chromatographic separation.

The other optimised parameters only differed insignificantly from the optimum parameters published by the manufacturer of the equipment concerning a large group of medicines, intoxicants and psychotropic compounds. Optimal MS parameters are presented in Table I.

TABLE I. OPTIMISED DETECTION PARAMETERS

Parameter	Value
Fragmentor voltage	60 V for $m/z$ 180, 194, 208 100 V for $m/z$ 163, 177
Capillary voltage	4000 V
Vaporizer voltage	320°C
Drying gas temperature	300°C
Gas flow	6 l/min
Gas pressure	30 psig
Corona current	4.5 $\mu$ A

In the studied group of compounds an important decrease in intensity of registered ions was observed when the spray gas flow was ca. 4 l/min.

Application of 100 V of fragmentor voltage makes it possible to monitor fragmentation ions, e.g. with the aim of confirmation of the presence of an analyte.

## Extraction

Optimal conditions of extraction were selected on the basis of analysis of blood spiked with a mixture of methylenedioxyamphetamines in different conditions of blood pH (9–12) and application of four different solvents. Results are presented in Figure 3.

1 ml of n-butyl chloride was finally used in analysis and the required volume of blood was reduced to 0.2 ml (usually applied volume – 1 ml). The vol-

ume of carbonate buffer (pH 11) was 0.2 ml. The concentration of the internal standard, MDMA-D<sub>5</sub>, was 100 ng/ml. Extraction by shaking (50 Hz) was carried out in a 1.5 ml polypropylene vial made by Eppendorf. After centrifuging (15 000 revolutions/min), 0.8 ml of organic phase with addition of 0.1 ml of aqueous solution of HCl (0.025 M) was evaporated in a nitrogen stream at a temperature of 35–40°C up to the moment of achieving the aqueous phase. The volume of injected sample was 20 µl. Injections were made by autosampler.

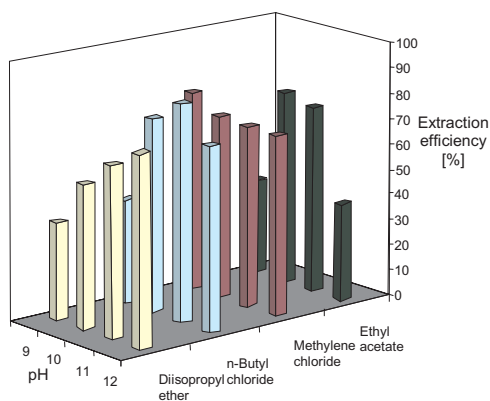


Fig. 3. Optimisation of MDMA extraction conditions. Ion intensity was chosen as optimised parameter.

### Conditions of HPLC analysis

A mixture of water (A) and acetonitrile (B) with addition of formic acid in the amount of 100 µl for 100 ml of each of the solvents was applied as a mobile phase. The intensity of flow of the mobile phase was 0.8 ml/min.

Satisfactory separation was achieved at isocratic conditions for the mobile phase A:B (75:25). A gradient of the phase composition was applied because of tailing of peaks. The profile of the gradient was as follows: 0 min: 90%(A)/10%(B); 3 min: 70%(A)/30%(B); 4 min: 90%(A)/10%(B); 6 min: 90%(A)/10%(B). As a consequence, the symmetry of peaks improved. Moreover, the width of the peaks amounted to several seconds because of the short retention time and, as a consequence, the level of detection of analytes significantly increased. Retention times and relative retention times which were used for identification of particular hallucinogens are presented in Table II.

TABLE II. RETENTION TIME OF MONITORED METHYLENEDIOXYAMPHETAMINES

Halucinogen	Retention time	Relative retention time
MDA	1.86	0.865
MDMA	2.16	1.005
MDEA	2.59	1.205
MDMA-D <sub>5</sub> (IS)	2.15	1.000

## VALIDATION

The developed method was validated [10]. Obtained values are presented in Table III. Because the value of the coefficient of variation (CV) exceeded 20%, the limit of quantification was accepted as 5 ng/ml.

TABLE III. VALIDATION PARAMETERS OF MDA, MDMA AND MDEA DETERMINATION PROCEDURE

	MDA	MDMA	MDEA
Accuracy for LOQ 5 ng/ml			
Mean recovery	92 ±12%	101 ±11%	102 ±11%
Precision for target conc. 50 ng/ml			
Repeatability, CV <sub>r</sub>	10%	10%	9%
Between-day repeatability, CV <sub>R</sub>	12%	11%	9%
Mean recovery	105 ±9%	100 ±8%	102 ±8%
Accuracy for range 5–200 ng/ml (n = 5, p = 4)			
Correlation line equation	$Y = 0.9994 \times X + 0.0002^*$	$Y = 0.9990 \times X - 0.0728^*$	$Y = 1.0059 \times X - 0.0639^*$
Linearity 0–200 ng/ml (n = 5, p = 6)			
Calibration line equation	$y = 0.0081 \times x - 0.0007$	$y = 0.0136 \times x - 0.0086$	$y = 0.0116 \times x - 0.0115$
Determination coefficient, R <sup>2</sup>	0.9978	0.9916	0.9951
Limit of detection (LOD): S/N = 3.3	0.7 ng/ml	0.6 ng/ml	0.9 ng/ml
Limit of quantitation (LOQ): S/N = 10	2.5 ng/ml**	2 ng/ml**	0.9 ng/ml**
Sensitivity	8.8 ng/ml	17.4 ng/ml	13 ng/ml

\* X, Y – spiked and measured concentration of analyte;

\*\* – too high value of CV for calculated LOQ caused that the limit was set to 5 ng/ml. Computer program of Merck (Validation Manager) was applied for calculations.

## Analysis of accuracy of method

The developed method was applied to analysis of reference material in the form of a freeze-dried serum spiked by MDMA and MDEA (Medidrug BTMF 2/2000 S-plus 41622, Medichem). Declared concentrations were: 134 ng/ml for MDMA – (confidence limits according to Horowitz – 105–193 ng/ml), and 119.8 ng/ml for MDEA – (confidence limits according to Horowitz – 93–172 ng/ml). The obtained results lay within these confidence limits even though the calibration curve was created on the basis of results of whole blood. Calculated concentrations were:  $107 \pm 3$  ng/ml for MDMA, and  $100 \pm 8$  ng/ml for MDEA.

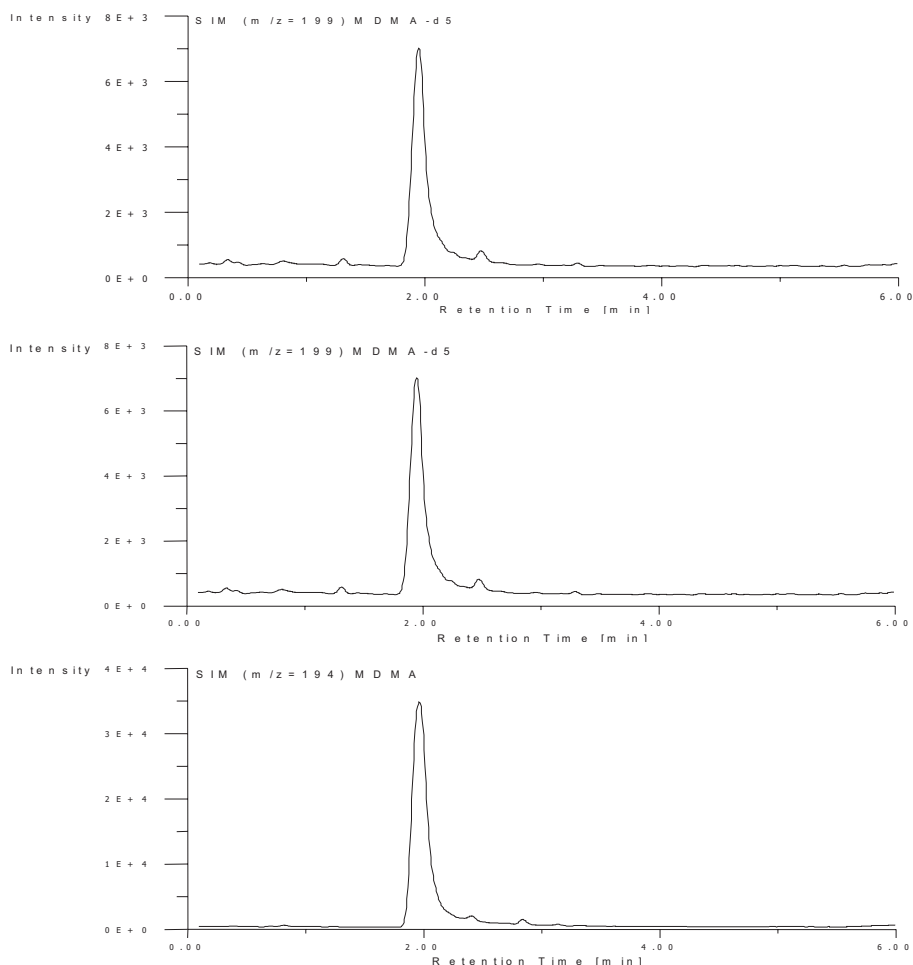


Fig. 4. Whole blood analysis. Chromatograms for extracted ions of m/z: 180 (MDA 5 ng/ml), 194 (MDMA 347 ng/ml) and 199 (MDMA-D<sub>5</sub> 100 ng/ml IS).



## DISCUSSION

The proposed mobile phase composition was characterised by weak elution power. A certain amount of compound originating from the biological matrix was retained and eluted, even though a short chromatographic column was applied. Therefore, there was a danger of co-elution with analytes. The performed trials and analysis of evidence material (blood) collected from various persons showed that this phenomenon occurred after ca. 1.5–2 hours. The duration of analysis was 6 min. This means that it is possible to carry out 20 analyses of blood samples without occurrence of the above mentioned problem. After this time it is necessary to rinse the column with phase B, i.e. 100% acetonitrile with addition of formic acid.

The proposed method was applied during routine analysis of methylenedioxy derivatives of amphetamine in blood samples.

Chromatograms obtained during analysis of a blood sample collected from the corpse of a young man who was beaten to death are presented in Figure 4.

Particular stages of analysis were simplified and their quantity was reduced to a minimum in the proposed method. A chromatographic column with stationary phase grains of 3  $\mu\text{m}$  diameter (LiChroCART 55-4, Purospher STAR RP-18e) was applied. This allowed reduction of flow without a significant effect on the symmetry of peaks. Nevertheless, column efficiency was sufficient for separation of compounds which had similar chromatographic features. Resolution was sufficiently high for it to be possible to observe on the chromatogram a shift between peaks of MDMA and its deuterium derivative – MDMA-D<sub>5</sub>. In spite of satisfactory separation of particular methylenedioxyamphetamines in isocratic conditions, a programmed gradient of the mobile phase was applied, which significantly improved symmetry of peaks.

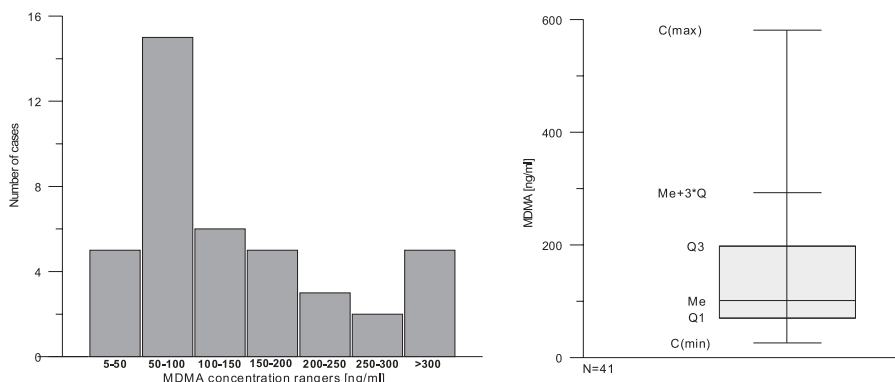


Fig. 5 Statistical evaluation of cases positive for MDMA. Me – median, Q1 and Q3 – first and third quartile.

Due to low values of limits of detection, the developed method of identification and quantification of MDMA, MDA and MDEA could be applied to verification of testimonies of raped persons (in this case an examination is made a long time after the moment of using a psychotropic drug).

Among the 41 blood samples in which MDMA was detected, which is ca. 5% of all analysed samples, the determined concentration was in the range of 50–100 ng/ml in 15 cases, and half of the positive results were in the range of 80–200 ng/ml (Figure 5).

Acknowledgements: The authors would like to thank Ewa Janowska, PhD, Ewa Chudzikiewicz, MSc, and Piotr Adamowicz, PhD, for providing information about determined concentrations of methylenedioxyamphetamines in blood samples from case-works.

#### References:

1. Adamowicz P., Chudzikiewicz E., Lechowicz W., Illicit “ecstasy” tablets in southern Poland: A two-year review, *Problems of Forensic Sciences* 2003, vol. 56, pp. 100–108.
2. Bogusz M. J., Kała M., Maier R., Determination of phenylisothiocyanate derivatives of amphetamine and its analogues in biological fluids by HPLC-APCI-MS or DAD, *Journal of Analytical Toxicology* 1997, vol. 21, pp. 59–69.
3. Bogusz M. J., Krüger K. D., Maier R. D., Analysis of underivatized amphetamines and related phenethylamines with high-performance liquid chromatography – atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometer, *Journal of Analytical Toxicology* 2000, vol. 24, pp. 77–84.
4. Boyer E., Quang L., Woolf A. [et al.], Dextromethorphan and ecstasy pills, *JAMA* 2001, vol. 285, p. 409.
5. Byard R. W., Gilbert J., James R. [et al.], Amphetamine derivative fatalities in South Australia: Is “ecstasy” the culprit?, *American Journal of Forensic Medicine and Pathology* 1998, vol. 19, pp. 261–265.
6. Gan B. K., Baugh D., Liu R. H. [et al.], Simultaneous analysis of amphetamine, methamphetamine, and 3,4-metylenodioxymethamphetamine (MDMA) in urine samples by solid-phase extraction, derivatization, and gas chromatography/mass spectrometry, *Journal of Forensic Science* 1991, vol. 36, pp. 1331–1341.
7. Goff M. L., Miller M. L., Paulson J. D. [et al.], Effects of 3,4-metylenodioxymethamphetamine in decomposing tissues on the development of *Parasarcophaga ruficornis* (Diptera: Sarcophagidae) and detection of the drug in postmortem blood, liver tissue, larvae, and puparia, *Journal of Forensic Science* 1997, vol. 42, pp. 276–280.
8. Kataoka H., Lord H. L., Pawliszyn J., Simple and rapid determination of amphetamine, methamphetamine, and their methylenedioxy derivatives in urine by automated in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid

- chromatography – electrospray ionization mass spectrometry, *Journal of Analytical Toxicology* 2000, vol. 24, pp. 257–265.
9. Kraner J. C., McCoy D. J., Evans M. A. [et al.], Fatalities caused by the MDMA-related drug paramethoxyamphetamine (PMA), *Journal of Analytical Toxicology* 2001, vol. 25, pp. 645–648.
  10. Lechowicz W., *Metodyka oznaczania substancji halucynogennych w płynach ustrojowych dla celów toksykologii sądowej oraz opiniowania sądowego* [niepublikowana praca doktorska, Uniwersytet Jagielloński 2003].
  11. Lora-Tamayo C., Tena T., Rodriguez A., Amphetamine derivative related deaths, *Forensic Science International* 1997, vol. 85, pp. 149–157.
  12. Recommended methods for the detection and assay of heroin, cannabinoids, cocaine, amphetamine, methamphetamine and ring-substituted amphetamine derivatives in biological specimens, United Nations 1995, pp. 31–46, 71–80.
  13. Siudem I., Narkotyki w dyskotekach, *Serwis Informacyjny Narkomania* 2003, vol. 1, s. 12–18.

## SZYBKIE OZNACZANIE MDMA, MDA I MDEA WE KRWI METODĄ LC/MS/APCI

Wojciech LECHOWICZ, Andrzej PARCZEWSKI

### WSTĘP

3,4-metylenodioksymetamfetamina (MDMA) jest zaliczana do tzw. *designer drugs*, czyli substancji psychoaktywnych produkowanych w nielegalnych laboratoriach. MDMA, znana pod nazwą „ecstasy”, przyjmowana jest w dawce około 2 mg/kg masy ciała. Maksymalne jej stężenie we krwi pojawia się po 1–1,5 godzinie, a efekty działania utrzymują się przez 4–6 godzin.

Wzrastająca dostępność tabletek „ecstasy”, szczególnie wśród młodzieży bawiącej się na dyskotekach, prowadzi do częstszego ich przyjmowania, a tym samym większej liczby przypadków kolizji z prawem. Jak wynika z badań pilotażowych prowadzonych w województwie lubelskim, drugim po marihuanie (62%) wymienianym przez pytanych środkiem przyjmowanym na dyskotekach jest „ecstasy” (49%). Jak zauważa I. Siudem [13], występuje wysoka korelacja (0,85) w wydatkach na narkotyki i środki antykoncepcyjne. Jak wynika z zestawień dokonanych w 2004 roku w Instytucie Ekspertyz Sądowych w Krakowie, zanotowano wzrost liczby przypadków gwałtów z użyciem substancji ułatwiających wykorzystanie seksualne. Spośród 41 próbek krwi w których stwierdzono obecność MDMA – głównego składnika „ecstasy” – co najmniej 5 nadesłano w z wiązku z podejrzeniem o dokonanie przestępstwa na tle seksualnym.

Niepokojącym zjawiskiem, jakie pojawia się okresowo w związku z przyjmowaniem tabletek „ecstasy”, jest ich zmienny skład. Pierwotny składnik psychoaktywny tabletek „ecstasy”, MDMA, jest zamieniany na inny, często o większej toksyczności [1, 4, 5, 9, 11].

Co najmniej w kilkunastu publikacjach opisano metody wykrywania lub oznaczania amfetamin i jej pochodnych, w tym metylenodioksyamfetamin w materiale biologicznym [12]. Z powodu właściwości fizykochemicznych tej grupy związków, analiza metodą GC/MS wymaga ich wcześniejszej derywatyzacji, np. z zastosowaniem bezwodnika kwasu trichlorooctowego [6]. Prawdopodobnie ta konieczność skłoniła do poszukiwań nowych metod analizy. Jedną z pierwszych publikacji dotyczących oznaczania MDMA i jego metabolitu MDA we krwi królików oraz wycinkach tkanki wątroby, jak i w larwach much pasożytniczych na padlinie, była praca Goffa [7]. Zastosował on ekstrakcję typu ciecz-ciecz oraz analizę LC/MS z zastosowaniem jonizacji przez elektrorozpylanie (ES); jony monitorowano w trybie *selected ion monitoring* (SIM). Jako standardu wewnętrznego użyto MDMA-D5. Uzyskane limity detekcji znajdowały się na granicy piko- i nanogramów. Badania wykorzystywane były do oceny czasu, jaki upłynął od chwili śmierci.

Kataoka i in. [8] zastosowali metodę LC/ES/MS w trybie SIM do oznaczania amfetaminy, MDA, MDMA oraz MDEA w moczu. Po wielokrotnym rozcieńczeniu posłużyli się oni mikroekstrakcją do fazy stałej (SPME), uzyskując w ten sposób limity de-

tekcji wynoszące od 0,38 do 0,82 ng/ml. Granice oznaczalności zawierały się w przedziale od 32 do 79 ng/ml.

Użycie chemicznej jonizacji pod ciśnieniem atmosferycznym (APCI) zaproponował Bogusz [2, 3]. W dwóch pracach poświęconych identyfikacji i oznaczania amfetaminy oraz jej pochodnych – w tym MDMA – podał on parametry walidacyjne, z których wynika, iż osiągnięty limit detekcji wynosił 1–5 ng/ml. W swych badaniach poddawał amfetaminę derywatacji z fenylotiocyanianem, co w przypadku oznaczeń z wykorzystaniem metody LC/MS jest dość nietypowym podejściem [3].

W niniejszej pracy przedstawiono inną propozycję metodyki oznaczania MDA, MDMA oraz MDEA w niewielkiej (0,2 ml) objętości krwi w skróconej procedurze analitycznej. Zaletą opracowanej metody prostota oraz niedługi czas analizy.

## MATERIAŁY I METODY

W badaniach wykorzystano chromatograf cieczowy sprzężony ze spektrometrem mas HP-1100 Series firmy Agilent Technologies (Stany Zjednoczone). Rozdział prowadzono przy użyciu kolumny chromatograficznej LiChroCART 55 × 4 z wypełnieniem Purospher STAR RP-18e firmy Merck (Darmstadt, Niemcy). Stosowano następujące odczynniki chemiczne: acetonitryl (HPLC gradient-grade) oraz wodę destylowaną (HPLC gradient-grade) firmy Merck, chlorek n-butylu (cz.d.a.) oraz eter diizopropylowy (cz.d.a.) firmy Sigma (St. Louis, Stany Zjednoczone), kwas mrówkowy 90% (cz.d.a.) (Ubichem, Wielka Brytania), węglan sodu (cz.d.a.), wodorowęglan sodu (cz.d.a.) oraz kwas solny 0,025 M (cz.d.a.) firmy (POCH, Polska).

Opracowanie kolejnej metody oznaczania metylenodioksyamfetamin zostało podyktowane koniecznością badań niewielkich ilości krwi. Optymalizacji poddano warunki jonizacji, fragmentacji, rozdziału oraz ekstrakcji. Parametrem optymalizowanym była wysokość piku analitu przy uwzględnieniu selektywności metody. Stosowana ona była równolegle z opracowaną wcześniej procedurą oznaczania amfetamin we krwi metodą LC/MS. Wyniki badań obiema metodami były zgodne. Walidacji metody dokonano, stosując program Validation Manager firmy Merck.

## WYNIKI

### Parametry metody MS

Podobna struktura substancji z grupy metylenodioksyamfetamin umożliwia stosunkowo łatwe dobranie optymalnych warunków zarówno jonizacji, jak i fragmentacji. Dla uzyskania pozornych jonów molekularnych ( $M+H^+$ ) o dużej intensywności zastosowano niskie (60 V) napięcie fragmentatora, co zapobiegło fragmentacji w strefie CID. Dla uzyskania jonów confirmacyjnych o masach  $m/z = 163$  oraz  $177$  zastosowano napięcie 100 V. Szczególną uwagę zwrócono na drogę fragmentacji dwóch izomerów – MDEA oraz MBDB (potencjalny interferent, rycina 1), których masy molekularne są identyczne.

Bardzo podobne są również właściwości chromatograficzne obu związków. Może to spowodować trudności w rozdzieleniu tych substancji i ich identyfikacji przy zastosowaniu nieodpowiednich kolumn chromatograficznych oraz przy zbyt niskim na-

pięciu fragmentora w strefie CID. Przedstawione widma fragmentacyjne MDEA oraz MBDB uzyskano podczas badania przy napięciu fragmentora 100 V (rycina 2).

Podobnie jak w przypadku innych substancji, największy wpływ na intensywność sygnału ma napięcie fragmentora. Dla kolejnych metyleniodioksyamfetamin (MDA, MDMA, MDEA) o wzrastającej masie molowej zauważono niewielkie przesunięcia napięcia, przy którym występowały maksymalne intensywności pozornych jonów molekularnych.

W przypadku MDA ( $M+H^+$ ; 180), MDMA ( $M+H^+$ ; 194), MDEA ( $M+H^+$ ; 208) pojawia się jon fragmentacyjny  $m/z = 163$ , natomiast w przypadku izomeru MBDB ( $M+H^+$ ; 208) jon fragmentacyjny  $m/z = 177$ . Również dla tych jonów zaobserwowano niewielkie przesunięcie wartości napięcia fragmentora, przy którym występowało maksimum.

Różnice w sposobie fragmentacji MDEA oraz MBDB, tj. powstawanie jonów o  $m/z$  równym odpowiednio 163 i 177 dla napięć fragmentora powyżej 100 V sprawia, iż monitorując te właśnie jony, można uzyskać piki pochodzące od MDEA oraz MBDB bez konieczności ich chromatograficznego rozdzielania.

Pozostałe zoptymalizowane wartości parametrów nieznacznie tylko różniły się od podawanych przez producenta aparatu optymalnych parametrów dla dużej grupy leków oraz środków odurzających i substancji psychotropowych. Optymalne parametry MS podano w tabeli I.

W przypadku badanej grupy substancji zaobserwowano znaczny spadek intensywności rejestrowanych jonów przy przepływie gazu rozpylającego (*gas flow*) wynoszącego około 4 l/min.

Zastosowanie napięcia fragmentora o wysokości 100 V daje możliwość monitorowania jonów fragmentacyjnych, np. w celu potwierdzenia obecności analitu.

## Ekstrakcja

Optymalne parametry ekstrakcji dobrano na podstawie analiz krwi wzbogacanej o mieszaninę metyleniodioksyamfetamin w warunkach o zmiennym pH (9–12) krwi oraz przy zastosowaniu czterech różnych rozpuszczalników. Wyniki przedstawiono na rycinie 3.

W analizach zastosowano ostatecznie chlorek n-butylu o objętości 1 ml, a wymaganą objętość krwi zredukowano do 0,2 ml (zwykle stosowana objętość – 1 ml). Objętość buforu węglanowego (pH 11) wynosiła 0,2 ml. Stężenie standardu wewnętrznego MDMA-D5 wynosiło 100 ng/ml. Ekstrakcja przez wstrząsanie (50 Hz) prowadzona była w polipropylenowych fiolkach Eppendorfa o pojemności 1,5 ml. Po odwirowaniu (15 000 obr./min) fazę organiczną o objętości 0,8 ml z dodatkiem 0,1 ml wodnego roztworu HCl (0,025 M) odparowano w strumieniu azotu w temperaturze 35–40°C do momentu osiągnięcia fazy wodnej. Objętość wstrzykiwanej próbki wynosiła 20  $\mu$ l. Wstrzyknięcie wykonywał automatyczny podajnik próbek.

## Warunki chromatograficzne w metodzie HPLC

Jako fazę ruchomą stosowano mieszaninę wody (A) oraz acetonitrylu (B) z dodatkiem kwasu mrówkowego w ilości 100  $\mu$ l na 100 ml każdego z rozpuszczalników. Natężenie przepływu fazy ruchomej wynosiło 0,8 ml/min.

Zadawalający rozdział uzyskano już w warunkach izokratycznych dla składu fazy ruchomej A:B (75:25). Ponieważ piki chromatograficzne „ogonowały”, zastosowano gradient składu fazy. Profil gradientu przedstawiał się następująco: 0 min: 90%(A)/10%(B); 3 min: 70%(A)/30%(B); 4 min: 90%(A)/10%(B); 6 min: 90%(A)/10%(B). W konsekwencji symetria pików uległa polepszeniu, a dzięki krótkiemu czasowi retencji również szerokość pików wynosiła kilka sekund, znacznie wzrosła więc wykrywalność analitów. W tabeli II podano czasy retencji oraz względne czasy retencji, na podstawie których można dokonywać identyfikacji halucynogenu.

### Walidacja

Opracowaną metodę poddano walidacji [10]. Uzyskane wartości przedstawiono w tabeli III. W związku z wartością współczynnika zmienności (CV) przekraczającą 20% za granicę oznaczalności przyjęto 5 ng/ml.

### Badanie dokładności metody

Opracowaną metodę zastosowano do analizy materiału referencyjnego w postaci liofilizowanej surowicy wzbogaconej o MDMA oraz MDEA (Medidrug BTMF 2/2000 S-plus 41622 firmy Medichem). Deklarowane stężenia wynosiły: dla MDMA – 134 ng/ml (przedział ufności wg Horowitza 105–193 ng/ml), zaś dla MDEA – 119,8 ng/ml (przedział ufności wg. Horowitza 93–172 ng/ml). Pomimo, że wykres kalibracyjny sporządzono na bazie krwi pełnej, uzyskano wyniki zawierające się w wyżej podanych przedziałach ufności. Obliczone stężenia wynosiły: dla MDMA –  $107 \pm 3$  ng/ml, a dla MDEA –  $100 \pm 8$  ng/ml.

### DYSKUSJA WYNIKÓW

Zaproponowany skład fazy ruchomej charakteryzuje się niewielką siłą elucji. Mimo zastosowania krótkiej kolumny chromatograficznej pewna ilość substancji pochodzącej z matrycy biologicznej ulega jednak retencji i następnie elucji. Występuje więc niebezpieczeństwo koelucji z analitami. Przeprowadzone próby oraz analiza próbek materiału dowodowego (krwi) pobieranych od różnych osób wykazały, iż istotnie takie zjawisko ma miejsce po około 1,5 do 2 godzin. Czas analizy wynosi 6 min; oznacza to możliwość wykonania 20 analiz prób krwi bez wystąpienia wspomnianego efektu matrycy próbki. Po tym czasie konieczne jest przepłukanie kolumny fazą B, a więc 100% acetonitrylu z dodatkiem kwasu mrówkowego.

Zaproponowaną metodę zastosowano podczas rutynowych badań krwi na obecność metylenodioksypochodnych amfetamin.

Na rycinie 4 przedstawiono chromatogramy uzyskane podczas analizy krwi pobranej ze zwłok młodego mężczyzny pobitego ze skutkiem śmiertelnym.

W proponowanej metodzie poszczególne etapy analizy uproszczono, a ich liczbę zredukowano do niezbędnego minimum. W analizie zastosowano kolumnę chromatograficzną o średnicy ziaren wypełnienia wynoszącej 3  $\mu\text{m}$  (LiChroCART 55-4, Purospher STAR RP-18e). Umożliwiło to zmniejszenie przepływu bez istotnej zmiany symetrii pików. Mimo niewielkiej długości, sprawność kolumny była wystarczająca dla rozdzielenia substancji o podobnych właściwościach chromatograficznych. Rozdzielczość była jednak na tyle wysoka, by zaobserwować na chromato-

gramie przesunięcie względem siebie pików pochodzących od MDMA oraz jej deuterowej pochodnej MDMA-D<sub>5</sub>. Mimo zadawalającego rozdziału poszczególnych metylenodioksyamfetamin w warunkach izokratycznych zastosowano programowany gradient składu fazy ruchomej, co istotnie poprawiło symetrię pików.

Ze względu na niskie wartości granic detekcji, opracowana metodyka identyfikacji oraz oznaczania MDMA, MDA i MDEA może być wykorzystana do weryfikacji zeznań osób, które zgwałcono (w tym przypadku badanie jest przeprowadzone zwykle po długim czasie od momentu użycia środka psychotropowego).

Spośród 41 próbek krwi, w których stwierdzono obecność MDMA, co stanowiło około 5% ogółu przebadanych próbek, w 15 przypadkach wyznaczone stężenie zawarte było w przedziale 50–100 ng/ml, a połowa wyników pozytywnych zawierała się w przedziale 80–200 ng/ml (rycina 5).

Podziękowania: Autorzy składają podziękowania dr Ewie Janowskiej, mgr Ewie Chudzikiewicz oraz dr Piotrowi Adamowiczowi za udzielenie informacji o wyznaczonych stężeniach metylenodioksyamfetamin we krwi osób badanych w ramach ekspertyzy sądowej.