

IDENTIFICATION OF IMPURITIES IN BIOLOGICAL MATERIAL REMAINING AFTER AMPHETAMINE SYNTHESIS

Agnieszka SIWIŃSKA-ZIÓŁKOWSKA¹, Dariusz BŁACHUT²,
Emilia WIDECKA-DEPTUCH²

¹*Chair and Department of Forensic Medicine, Medical Academy, Warsaw*

²*Department of Criminalistic and Special Chemistry, Internal Security Agency, Warsaw*

ABSTRACT: Toxicological analysis of biological material encompasses searching for different toxic substances, amongst which drugs are a very important group. Confirmation of the presence of compounds in the amphetamine class is based on detection of particular compounds in this class, for example: amphetamine (AMF), methamphetamine (MAMF), 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA), 3,4-methylenedioxyethylamphetamine (MDEA), p-methoxyamphetamine (PMA) and p-methoxymethamphetamine (PMMA), using instrumental methods. In this paper we show the possibility of identification of contaminations originating from the synthesis of amphetamine using Leuckart's method in biological materials from two autopsies performed in the Department of Forensic Medicine in Warsaw. In the first case we detected the presence of N-formylamphetamine, N,N-di-(β -phenylisopropyl)amine, N,N-di-(β -phenylisopropyl)methylamine, and derivatives of phenylmethylpyridine in stomach and blood samples. In the second case we found the same compounds only in the blood sample. Despite the lack of data about toxicity of these substances, it is possible that the toxicity may be comparable to that of amphetamine and its analogues.

KEY WORDS: Amphetamine; Impurities; Toxicological analysis; Leuckart's method; Fatal intoxication.

Problems of Forensic Sciences, vol. LX, 2004, 130–148

Received 7 July 2005; accepted 1 September 2005

INTRODUCTION

Analysis of toxicological results obtained at the Department of Forensic Medicine in Warsaw revealed that in several recent years fatal poisonings caused by drugs of abuse have occupied second position among all poisonings.

Amongst fatal poisonings by drugs, most cases have been caused by opiate (heroin) overdoses. However, amphetamine poisonings also occupy a sig-

nificant position: 7–42.9% percent of all drugs poisonings recorded in the years 1997–2004 involved amphetamines.

In fatal cases related to overdosing with amphetamine analogues, one or more such substances are identified; other xenobiotics are also found quite often, for example: cocaine, opiates, cannabis and benzodiazepines [4, 13]. In the years 1997–2004 at the Department of Forensic Medicine in Warsaw, 46 cases of death caused by overdosing with amphetamines or a combination of amphetamines and other drugs of abuse (mostly opiates) were noted. The presence of amphetamine was determined in 80.4% of cases.

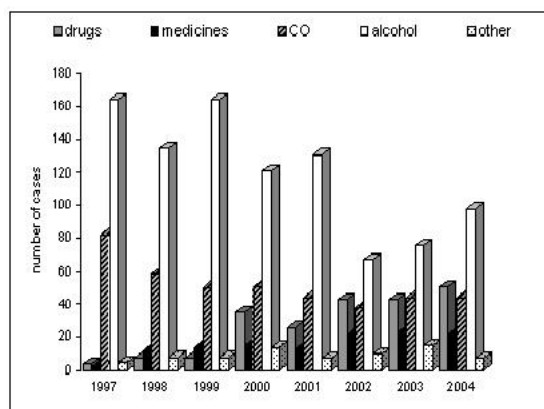


Fig. 1. Fatalities statistics in the years 1997–2004 reported at the Department of Forensic Medicine in Warsaw.

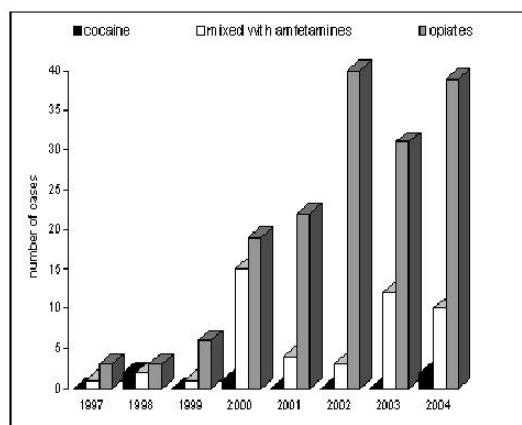


Fig. 2. Contribution of particular drugs to the total number of drugs poisonings in the years 1997–2004.

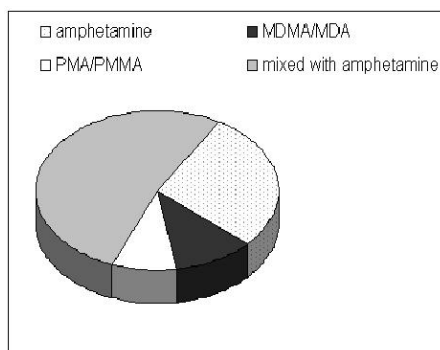


Fig. 3. Contribution of particular amphetamines in poisonings in the years 1997–2004.

Amphetamine is an increasingly popular drug in Poland. This is reflected in the growing number of persons using the drug and being hospitalised because of poisoning symptoms [2, 5, 10, 11].

Amphetamine was already present in Poland in the 1980's, but was rather rare at that time. Concurrently with the political and economic transformations (including opening of borders and market liberalization), the possibilities of obtaining substrates and reagents increased. Moreover, social changes caused an increase in demand for these types of substances, which contributed to the development of local illegal production. Amphetamine is sold as white or sometimes cream-coloured powder, in zip lock bags (known as *dilerki*) or in little packets made of folded aluminium foil. It is most often taken orally, on the mucous membranes of the mouth or intranasally, but also intravenously. Illegal "street" amphetamine sold on the black market is not, of course, pure amphetamine (because amphetamine in base form is a liquid), but a mixture of amphetamine sulphate and other compounds in various proportions.

The content of amphetamine sulphate in a street dose is very variable, ranging between 5–97% (average 40%). On occasion, one comes across cases where powder sold as amphetamine does not contain any at all. Besides amphetamine sulphate, a street portion contains admixtures added to increase the volume and to appropriately dilute the drug. These additives may be pharmacologically inactive (for example glucose, saccharose, mannitol, starch, carbonates, and magnesium sulphate) or have specific biological activity. Active compounds (additives) are most frequently components of popular medicines, especially analgesics (paracetamol, phenacetin, ethenzamide, salicylic and acetylsalicylic acid, propyphenazon) [7] or additives which are not medicines, for example α -phenylethylamine [1, 8]. Impurities make up a small part (up to several percent) of a street dose. The profile of impurities (their qualitative and quantitative composition) permits identification not

only of the method used for synthesis, but often also the “manufacturer” of the sample [12, 16].

Routine toxicological analysis of biological material encompasses searching for various toxic compounds, among which drugs are a very important group. Confirmation of the presence of compounds from the amphetamines group is above all based on detection of amphetamine (AMF), but also methamphetamine (MAMF), 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA), 3,4-methylenedioxyethylamphetamine (MDEA), p-methoxyamphetamine (PMA) and p-methoxymethamphetamine (PMMA). In some cases, metabolites of these compounds are ascertained (above all in urine samples) [3].

Gas chromatography coupled with mass spectrometry is universally applied in toxicological analyses both in screening and directed analysis. It permits identification of individual analytes based on retention time and mass spectra. In the discussed cases, during analysis of chromatograms, peaks of compounds were ascertained that had not been found (until then) in biological material analysed for the presence of amphetamines.

MATERIALS AND METHODS

Case 1: A dead body of a young man, W. K., was found near a railway line. Plastic bags containing white powder were found by the deceased (material evidences had not been sent for investigation). The autopsy did not reveal any injuries, but signs of circulatory and respiratory insufficiency were ascertained.

Case 2: The police were informed about the death of a young woman, R. P., in her flat. The boyfriend of the deceased stated that R. P. had got into a quarrel with him, during which she had taken amphetamine, washing it down with beer.

Routine toxicological analyses were performed in both of the above cases. Urine samples were screened using the ToxSee multidrug test by Bio Rad. Blood and urine were appropriately diluted with Abbott buffer solution and then, after centrifugation, the upper layer was analysed using fluorescence polarisation immunoassay (FPIA) with Abbott TDx apparatus and amphetamine/methamphetamine reagents kit.

Stomach and its content were deproteinised with ethanol and then the separated fraction was extracted with chloroform after acidification and with a mixture of chloroform : isopropanol (4:1) after alkalisation. The organic extracts were dried using anhydrous sodium sulphate and evaporated. Dry residues were dissolved in methanol. Body fluids (blood and urine) were extracted with n-butyl chloride both from acidic and alkaline solution. The extracts were evaporated and the dry residues were dissolved in methanol.

For compounds from the amphetamines group, extraction was carried out separately from body fluids with cyclohexane from an alkaline environment. The organic extracts were evaporated and dry residues were subjected to derivatisation with heptafluorobutyric anhydride (HFBA) by Supelco. Samples obtained in this way were analysed by means of gas chromatography with mass spectrometry using various temperature programmes, by the screening method: 150°C–295°C (10°C/min), 295°C isothermal (4 min), injection volume 1 µl in splitless mode; amphetamine determination: 90°C–250°C (10°C/min), 250°C–280°C (30°C/min), 280°C isothermal (6 min), injection volume 3 µl in splitless mode, GC/MS parameters were as follows – gas chromatograph: HP 6890, mass spectrometer: HP 5973, capillary column: HP-5MS of 30 m length and 250 µm i.d., injector temperature: 250°C, transfer line: 280°C, ion source: 230°C, quadruple temperature: 150°C.

Scan mode in the range of masses 5–550 amu was employed for data recording. ChemStation software Rev. B.01.00 supervised the GC/MS system.

Analytical grade reagents were purchased from the following companies: n-butyl chloride – Fluka, HFBA – Supelco, methanol – Ultra Resi-Baker, others – POCh.

RESULTS

During interpretation of obtained chromatograms, beside amphetamine, the presence of a compound was ascertained that was proposed by NIST'98 library searching programme as “formetorex” (N-formylamphetamine). This compound is an intermediate product of amphetamine synthesis in the Leuckart reaction. The researchers became interested in the origin of the compound, and as a result of that other compounds were found (for which no satisfactory propositions were put forward by the library), constituting amphetamine contaminants, and their presence may indicate the Leuckart route of synthesis. They were identified as N-formylamphetamine (formetorex), N,N-di-(β-phenylisopropyl)amine, N,N-di-(β-phenylisopropyl)methylamine, and derivatives of phenylmethylpyridine (Figure 4).

The identity of the detected compounds was confirmed by comparing retention time and mass spectra with drug standards. Reference standards were synthesised in the laboratory and their purity and structure were confirmed by a set of analytical techniques (proton and carbon nuclear magnetic resonance, infrared spectroscopy and, in some cases, high-resolution mass spectrometry HR/MS). Mass spectra of N-formylamphetamine, N,N-di-(β-phenylisopropyl)amine, N,N-di-(α-phenylisopropyl)methylamine are shown in Figures 5, 6 and 7. Results of toxicological analyses of both cases are presented in Table I.

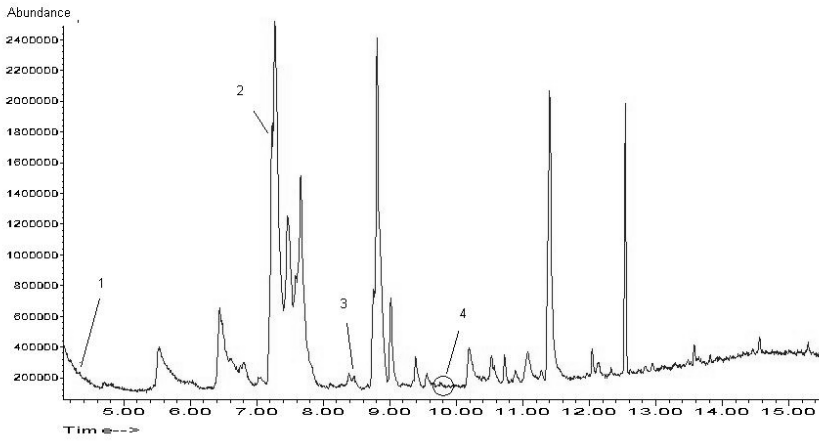


Fig. 4. Chromatogram of gastric content (case 1).

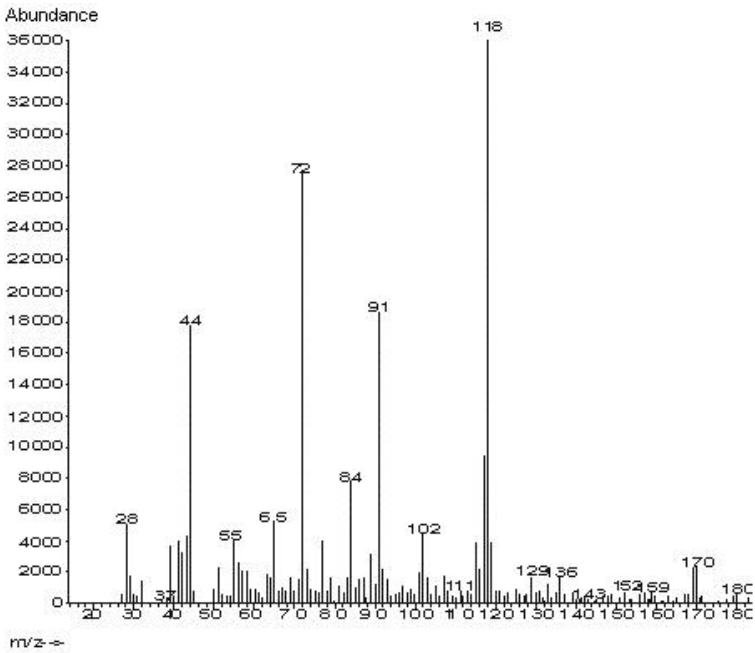


Fig. 5. Mass spectrum of N-formylamphetamine.

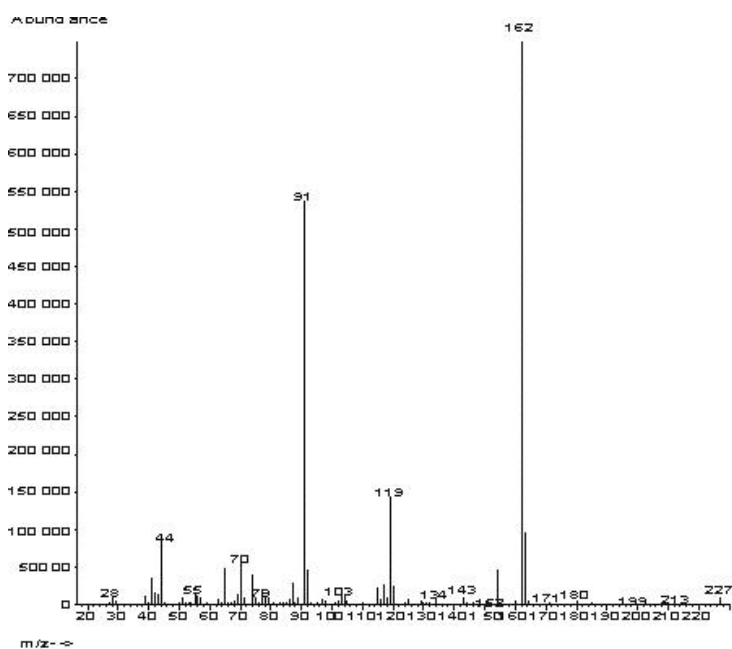


Fig. 6. Mass spectrum of N,N-di(β-phenylisopropyl)amine.

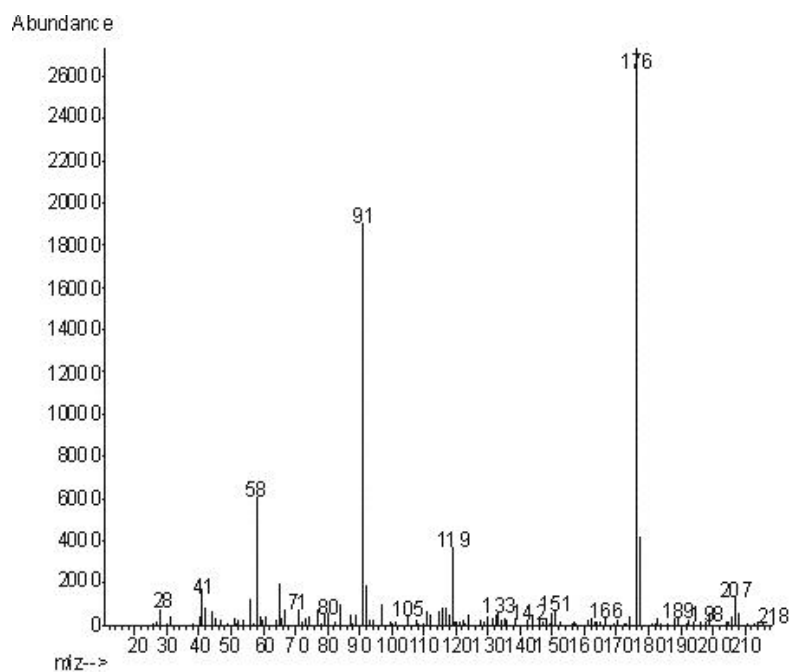


Fig. 7. Mass spectrum of N,N-di(β-phenylisopropyl)methylamine.

TABLE I. RESULTS OF ANALYSES OF BIOLOGICAL MATERIAL

Case	Concentration of amphetamine in body fluids [$\mu\text{g/ml}$]	Amphetamine in stomach	Impurities in examined biological material	Ethanol [%]
Case 1 W. K.	Blood 50.66 Urine 371.17	(+)	Blood (+) Stomach (+)	Blood zero Urine zero
Case 2 R. P.	Blood 31.35 Urine 161.79	(-)	Blood (+) Stomach (-)	Blood zero Urine zero

In both discussed cases, amphetamine and its impurities were the only detected xenobiotics, and the concentrations of amphetamine in the blood of the deceased were very high. The stomach content in case 1 contained a large amount of unabsorbed amphetamine, whereas in case 2 the stomach content contained only trace amounts of this compound. As impurities only constitute a very small part of "street" amphetamine, it is only possible to detect them in cases where the concentration of amphetamine in biological material is high.

DISCUSSION

Amphetamine has a simple chemical structure, so it is easy to synthesise using standard laboratory equipment. Many methods have been proposed for amphetamine synthesis, the most frequently applied being ones with benzylmethylketone (BMK).

Route A – Leuckart reaction. This is the most popular method of amphetamine synthesis in Poland (more than 95% of studied street samples seized by the police were produced using this method). The route consists in heating a mixture of benzylmethylketone with formamide or ammonium formate. This leads to the formation of formylamphetamine. Formylamphetamine is then hydrolysed to amphetamine as a result of heating in concentrated hydrochloric acid. This is a relatively easy reaction, but a rather dirty product is obtained, i.e. many impurities are created, and so careful purification is required (Figure 8 a).

Route B – reductive amination of benzylmethylketone in heterogeneous catalysis conditions. A mixture of BMK and ammonia is treated with hydrogen in the presence of a catalyst, for example Raney nickel, palladium or platinum adsorbed on carbon (Pt/C or Pd/C). The reaction is usually carried out at elevated pressure in autoclaves. It is very efficient and leads to the formation of only small amounts of unwanted by-products. Unfortunately, it requires expensive laboratory equipment (Figure 8 b).

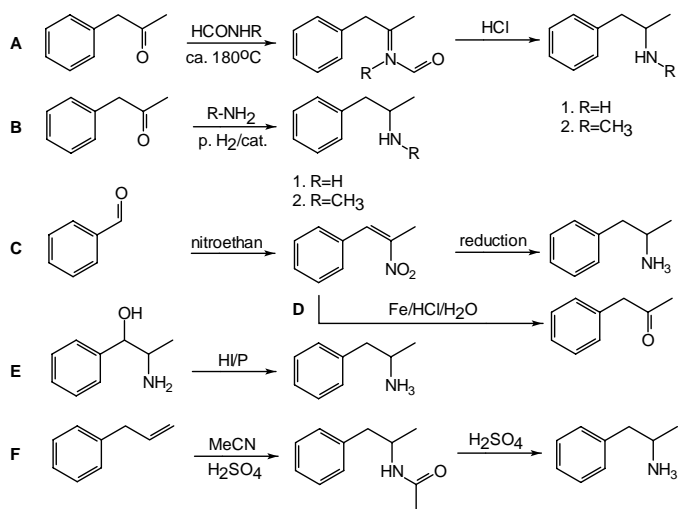


Fig. 8. Main reactions used in various routes of amphetamine synthesis (details in text).

Route C – nitropropene reaction. In the first stage, benzaldehyde undergoes condensation with nitroethane, giving an intermediate product, phenyl-nitropropene. In the second stage, nitropropene is reduced to amphetamine using lithium aluminium hydride (LiAlH_4) or by catalytic reduction in heterogeneous conditions. In the commercial offer of chemical companies there are (uncontrolled by law) benzaldehyde derivatives substituted at the ring. Using them instead of benzaldehyde is the simplest way of obtaining substituted analogues of amphetamine, for example 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA), 4-methylthioamphetamine (4-MTA), 4-methoxyamphetamine (PMA) and 2,5-dimethoxyamphetamine (2,5-DMA) (Figure 8 c).

The range of this method may be broadened by partial reduction and hydrolysis of the intermediate product, nitropropene (route D). BMK obtained in this way may be used in reactions described earlier (Figure 8 d).

Route E – norephedrine reduction. Norephedrine can be reduced to amphetamine by heating until boiling in a hydroiodide acid/red phosphorous system. This method is not applied very often. Nevertheless, it has two important advantages: it is easy to perform, even by non-professionals, and leads to optically pure amphetamine, and not, as in the methods described earlier, to a racemic mixture. Therefore, an analogous street sample produced in this way is stronger. Reduction of the norephedrine diastereoisomer, i.e. pseudoephedrine, leads to formation of a less psychoactive enantiomer of amphetamine. This method has great importance, above all, in obtaining methamphetamine from ephedrine (United States, Far East) (figure 8 e).

Route F – Ritter reaction. Some literature sources talk about the possibilities of amphetamine synthesis using the Ritter reaction. The substrate is allylbenzene, which reacts with acetonitril in an acidic environment giving the acetyl derivative of amphetamine. Acetylamphetamine is then hydrolysed in an acidic environment to amphetamine. Application of this method to illegal production was reported in Great Britain (figure 8 f).

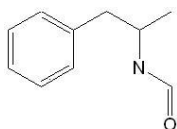


Fig. 9. Structure of N-formylamphetamin

In all of the above methods (routes A–F), crude amphetamine is obtained, which is purified by steam water distillation, extraction, and sometimes distillation at reduced pressure. The obtained product – the base form of the amine – is a colourless, sticky liquid with an unpleasant odour. Amphetamine sulphate, which is a colourless solid substance, is obtained by its precipitation using a solution of sulphuric acid in ethanol, acetone or other solvents [16].

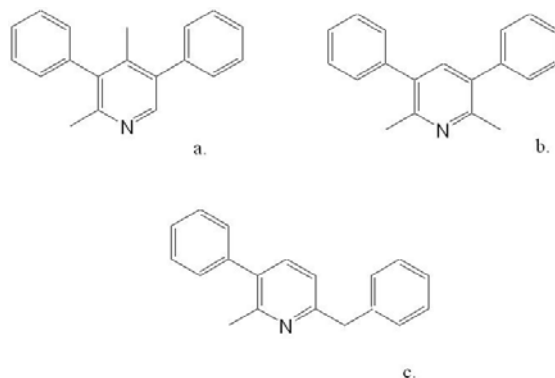


Fig. 10. Structures of pyridines: a – 2,4-dimethyl-3,5-diphenylpyridine, b – 2,6-dimethyl-3,5-diphenylpyridine, c – 2-methyl-3-phenyl-6-(phenylmethyl)-pyridine.

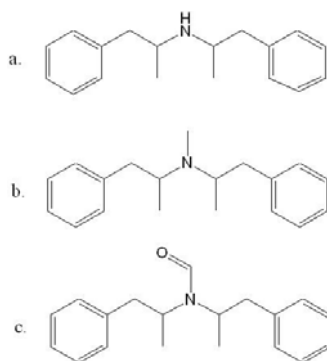


Fig. 11. Structures of dimers: a – N,N-di(β-phenylisopropyl)amine, b – N,N-di(β-phenylisopropyl)methylamine, c – N,N-di(β-phenylisopropyl)formamide.

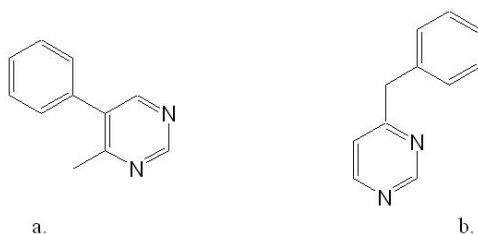


Fig. 12. Structures of pyrimidines: a – 4-methyl-5-phenylpyrimidine, b – 4-benzylpyrimidine.

Amphetamine obtained in the Leuckart reaction may contain the following impurities [6, 14, 15, 16]:

- a) Residues of substrates and their impurities and also reagents used in the reaction (formamide, formic acid, phenylacetone, dibenzylketone – BMK impurities);
- b) Intermediate products arising during synthesis of the main product (N-formylamphetamine) (Figure 9);
- c) Products of side reactions, such as: α -benzylphenethylamine; derivatives of pyridine (2,4-dimethyl-3,5-diphenylpyridine – Figure 10 a, 2,6-dimethyl-3,5-diphenylpyridine – Figure 10 b), 4-methyl-5-phenyl-2-(phenylmethyl)-pyridine, 2-methyl-3-phenyl-6-(phenylmethyl)-pyridine – Figure 10 c, 2,4-dimethyl-3-phenyl-6-(phenylmethyl)-pyridine, 2-methyl-2-phenylmethyl-5-phenyl-2,3-dihydropyrid-4-one); dimers (N,N-di(β -phenylisopropyl)amine – Figure 11 a, N,N-di(β -phenylisopropyl)methylamine – Figure 11 b, N,N-di(β -phenylisopropyl)formamide – Figure 11 c); pyrimidine derivatives (4-methyl-5-phenylpyrimidine – Figure 12 a, 4-benzylpyrimidine Figure 12 b).

Phenylmethylpyrimidine and pyrimidine derivatives are created only in the Leuckart reaction and they are a result of the competitive condensation reaction of the ketone (BMK) and amino-reductive reagents (alternate systems: ammonia/formic acid, ammonium formate, formamide) [16].

The application of gas chromatography coupled with mass spectrometry allowed us to identify impurities of amphetamine that was synthesised using the Leuckart reaction. The toxicity of amphetamine impurities is a separate problem. There is little information in the literature on this issue. Only the method of synthesis, identification and acute toxicity of α -benzylphenethylamine and α -benzyl-N-methylphenethylamine have been described. These compounds are created in the course of synthesis of amphetamine and methamphetamine from BMK contaminated by dibenzylketone [9]. A comparison of toxicity of amphetamine, methamphetamine and their impurities is presented in Table II.

TABLE II. COMPARISON OF TOXICITY OF AMPHETAMINE, METHAMPHETAMINE AND THEIR CONTAMINANTS

Compound	LD ₅₀ [mg/kg] ^a	CD ₅₀ [mg/kg] ^b
Amphetamine sulphate	91.14	88.35
Methamphetamine HCl	57.19	56.96
α-benzylphenethylamine HCl	63.25	45.59
α-benzyl-N-methylphenethylamine HCl	78.20	54.09

^a LD₅₀ – lethal dose 50%;

^b CD₅₀ – convulsive dose 50%.

The analogy of amphetamine structure and impurities in dimer form may suggest that these compounds, which possess hydrophobic properties (they can easily pass through biological membranes and penetrate into the central nervous system), may exhibit biological activity and therefore toxicity cannot be excluded.

CONCLUSIONS

1. In the case of high concentrations of amphetamine in the blood and large amounts of unabsorbed substance in the stomach, it is possible to identify compounds (impurities), indicating the Leuckart method of amphetamine synthesis.
2. The toxicity of synthesis markers is not known. Nevertheless, bearing in mind the structural analogy between impurities with a dimer form and amphetamine itself, the biological activity of these compounds – and, following on from this, their toxicity – cannot be excluded, especially since secondary dimers have hydrophobic properties, which is conducive to crossing cell membranes and reaching the CNS.

References:

1. Błachut D., α-feniloetyloamina – nowy rodzaj domieszki siarczuanu amfetaminy. Cz. 1, *Problemy Kryminalistyki* 2000, nr 230, s. 24–30.
2. Chodorowski Z., Sein Anand J., Sein Anand I. [i in.], Ocena używania środków uzależniających przez młodzież wybranych szkół średnich i studentów Akademii Medycznej w Gdańsku, *Przegląd Lekarski* 2000, t. 57, s. 549–555.
3. Dring L., Smith R., Williams R., The fate of amphetamine in man and other mammals, *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 1966, vol. 18, pp. 402–405.

4. Kłys M., Jankowski Z., Bystrowska B. [i in.], Znaczenie interakcji toksycznej w orzecznictwie sądowo-lekarskim. Złożone śmiertelne zatrucie pochodnymi amfetaminy i kokainą („UFO”?), *Archiwum medycyny sądowej i kryminalistyki* 2001, t. 51, s. 133–134.
5. Kołaciński Z., Andrzejewska M., Zatrucia wybranymi narkotykami w latach 1995–1993 w materiale Kliniki Ostrego Zatrucia Instytutu Medycyny Pracy w Łodzi, *Przegląd Lekarski* 2000, t. 57, s. 553–557.
6. Kram T., Reidentification of a major impurity in illicit amphetamine, *Journal of Forensic Chemistry* 1979, vol. 24, pp. 596–599.
7. Kulikowska J., Soja A., Sybirska H., Badania nad jakością narkotyków grupy amfetaminy z nielegalnego obrotu, *Archiwum medycyny sądowej i kryminalistyki* 2000, t. 50, s. 75–79.
8. Meyer E., van Boclaer J., Lambert W. [et al.], α -phenetylamine identified in judicial samples, *Forensic Science International* 1995, vol. 76, pp. 159–160.
9. Noggle Jr T., Clark R., Davenport T. [et al.], Synthesis, identification, and acute toxicity of alpha-benzylphenethylamine and alpha-benzyl-N-methylphenethylamine, Contaminants in clandestine preparation of amphetamine and methamphetamine; *Journal Association of Official Analytical Chemists* 1985, vol. 68, p. 1213.
10. Pach J., Szkolnicka B., Targosz D. [i in.], Substancje uzależniające w materiale Kliniki Toksykologii Collegium Medium Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie w latach 1997–1999, *Przegląd Lekarski* 2000, t. 57, 10, s. 519–524.
11. Panas M., Sołtycka M., Piekoszewski W., Profil analiz substancji psychoaktywnych wykonanych w latach 1990–1999 w Laboratorium Toksykologicznym Kliniki Toksykologii, *Przegląd Lekarski* 2000, t. 57, s. 565–567.
12. Sanger D., Humphreys I., Patel A. [et al.], The significance of gas chromatographic impurity patterns obtained from illicitly produced amphetamine, *Forensic Science International* 1985, vol. 28, p. 7.
13. Siwińska-Ziółkowska A., Widecka-Deptuch E., Przypadki śmiertelnych zatrucia z udziałem p-metoksyamfetaminy (PMA) i p-metoksymetamfetaminy (PMMA) w materiale Zakładu Medycyny Sądowej w Warszawie, *Alkoholizm i Narkomania* 2002, t. 15, s. 44–57.
14. van der Ark A., Sinnema A., Theeuwes A. [et al.], Impurities in illicit amphetamine 3. isolation and identification of 2,4-dimethyl-3,5-diphenyl pyridine, 2,6-dimethyl-3,5-diphenyl pyridine and 4-methyl-5phenyl-2-(phenylmethyl)pyridine, *Pharmaceutisch Weekblad* 1978, vol. 113, p. 41.
15. van der Ark A., Theeuwes A., Verweij A., Impurities in illicit amphetamine 1. isolation and identification of some pyrimidines, *Pharmaceutisch Weekblad* 1977, vol. 112, p. 977.
16. Verweij A., Impurities in illicit drug preparations: Amphetamine and methamphetamine, *Forensic Sciences Review* 1989, vol. 1, pp. 1–11.

IDENTYFIKACJA PRODUKTÓW UBOCZNYCH SYNTEZY AMFETAMINY W MATERIALE BIOLOGICZNYM

Agnieszka SIWIŃSKA-ZIÓŁKOWSKA, Dariusz BŁACHUT,
Emilia WIDECKA-DEPTUCH

WSTĘP

Jak wynika z analizy wyników badań toksykologicznych uzyskanych w Zakładzie Medycyny Sądowej w Warszawie, zatrucia narkotykami od kilku lat stanowią drugą co do wielkości grupę przypadków zgonów spowodowanych zatruciem.

Wśród zatruc śmiertelnych narkotykami najwięcej przypadków spowodowanych było przedawkowaniem opiatów (heroiny), jednak zatrucia amfetaminami stanowią również znaczącą pozycję, zaś odsetek zatruc z ich udziałem wynosił w latach 1997–2004 od 7 do 42,9% w stosunku do wszystkich zatruc narkotykami.

W przypadkach zgonów związanych z przedawkowaniem związków zaliczanych do amfetamin, wykrywana jest jedna lub więcej substancji z tej grupy, nierzadko stwierdza się także obecność innych ksenobiotyków, np. kokainy, opiatów, kannabionoli czy benzodiazepin [4, 13].

W latach 1997–2004 w Zakładzie Medycyny Sądowej w Warszawie zanotowano 46 przypadków zgonów na skutek przedawkowania związków z grupy amfetamin lub amfetamin i innych środków odurzających (najczęściej opiatów). Obecność amfetaminy stwierdzono w 80,4% przypadków.

Amfetamina jest środkiem coraz bardziej popularnym w Polsce. Odzwierciedla się to we wzrastającej liczbie osób stosujących ten środek i hospitalizowanych w związku z objawami zatrucia [2, 5, 10, 11]. Amfetaminę można było znaleźć w Polsce już w latach 80. dwudziestego wieku, ale stanowiła wówczas dużą rzadkość. Wraz z przemianami polityczno-gospodarczymi (m.in. otwarcie granic i uwolnienie rynku) wzrosły możliwości pozyskiwania substratów i odczynników, a zmiany społeczno-obyczajowe spowodowały wzrost popytu na tego typu środki, co przyczyniło się do rozwoju „rodzimej” nielegalnej produkcji.

Amfetamina sprzedawana jest w postaci białego, niekiedy kremowobiałego proszku w torebkach z zamknięciem strunowym (tzw. „dilerkach”) lub pakietkach z folii aluminiowej. Przyjmowana jest najczęściej doustnie, na błony śluzowe jamy ustnej lub donosowo, ale także dożylnie. Sprzedawany na „czarnym rynku” proszek nie jest oczywiście czystą amfetaminą (gdyż ta w postaci wolnej zasady jest cieczą), lecz mieszaniną siarczanu amfetaminy i innych związków w bardzo różnych proporcjach.

Zawartość siarczanu amfetaminy w „działce” jest bardzo zmienna i wynosi 5–97% (średnio 40%). Niejednokrotnie spotyka się też przypadki, że proszek sprzedawany jako amfetamina w ogóle jej nie zawiera. Obok siarczanu amfetaminy „działka” zawiera domieszki dodawane w celu zwiększenia objętości porcji i właściwego rozcieńczenia narkotyku. Dodatki te mogą być związkami obojętnymi farmakologicznie (np. glukoza, sacharoza, mannitol, skrobia, węglany, siarczan magnezu) lub też mieć określone działanie biologiczne. Związkami aktywnymi są najczęściej składniki po-

ularnych leków, zwłaszcza przeciwbólowych (paracetamol, fenacetyna, etenzamid, kwas salicylowy i acetylosalicylowy, propyfenazon) [7] lub związki nie będące lekami np. α -fenyloetyloamina [1, 8]. Niewielką (do kilku procent) składową „działkę” stanowią zanieczyszczenia. Profil zanieczyszczeń (ich skład jakościowy i ilościowy) pozwala nie tylko na identyfikację metody użytej do syntezy, ale niejednokrotnie także na przypisanie próbki do konkretnego „producenta” [12, 16].

Rutynowa analiza toksykologiczna materiału biologicznego obejmuje poszukiwanie różnych związków toksycznych, wśród których narkotyki stanowią bardzo ważną grupę. Potwierdzenie obecności związków z grupy amfetamin polega na wykryciu przede wszystkim amfetaminy (AMF), a także metamfetaminy (MAMF), 3,4-metylenodioksymetametaminy (MDMA), 3,4-metylenodioksyetylamfetaminy (MDEA), p-metoksyamfetaminy (PMA), p-metoksymetametaminy (PMMA). W niektórych przypadkach stwierdza się (przede wszystkim w moczu) obecność metabolitów tych związków [3].

Technika chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas jest stosowana powszechnie w analizie toksykologicznej zarówno w badaniach przesiewowych (skryningowych), jak i w ukierunkowanych. Pozwala ona na identyfikację poszczególnych analitów nie tylko w oparciu o czas retencji, ale także o widmo masowe. W omawianych przypadkach podczas analizy uzyskanych chromatogramów potwierdzono obecność pików związków dotychczas niespotykanych w materiale biologicznym badanym na obecność amfetamin.

MATERIAŁ I METODY

Przypadek 1: obok torów kolejowych znaleziono zwłoki młodego mężczyzny W. K. Przy zwłokach ujawniono woreczki z zawartością proszku koloru białego (dowody rzeczowe nie zostały nadesłane do badania). Sekcja zwłok nie wykazała zmian urazowych, stwierdzono natomiast cechy ostrej niewydolności krążeniowo-oddechowej.

Przypadek 2: policja została powiadomiona o zgonie młodej kobiety R. P. w zajmowanym przez nią mieszkaniu. Jak oświadczył konkubent zmarłej, doszło między nimi do kłótni, w trakcie której R. P. zażyła amfetaminę, popijając ją piwem.

W obydwu opisanych powyżej przypadkach wykonywano rutynową analizę toksykologiczną. Mocz poddano badaniu przy pomocy testu wielooznaczniowego ToxSee firmy Bio Rad. Krew i mocz odpowiednio rozcieńczano buforem firmy Abbott wykorzystywanym do oznaczeń metodą immunofluorescencji w świetle spolaryzowanym (FPIA), a następnie wirowano i w uzyskanym supernatancie wykonywano oznaczenie, używając aparatu TDx firmy Abbott oraz zestawu odczynników Amphetamine/Methamphetamine.

Żołądek z treścią poddano odbiałczaniu etanolem, a uzyskany przesącz ekstrahowano chloroformem ze środowiska kwaśnego i mieszaniną chloroform:izopropanol (4:1) ze środowiska alkalicznego. Uzyskane ekstrakty osuszono bezwodnym siarczanem sodu i odparowano. Suche pozostałości zawieszono w metanolu.

Płyny ustrojowe (krew i mocz) ekstrahowano chlorkiem n-butylu ze środowiska kwaśnego i alkalicznego. Ekstrakty odparowano, a suche pozostałości zawieszono w metanolu.

Dla związków z grupy amfetamin wykonano oddzielnie ekstrakcję płynów ustrojowych cykloheksanem ze środowiska alkalicznego. Ekstrakty odparowano, a suche pozostałości derywatyzowano bezwodnikiem kwasu heptafluoromasłowego (HFBA) firmy Supelco. Tak otrzymane próby analizowano: metodą chromatografii gazowej ze spektrometrią mas w różnych programach temperaturowych (chromatograf gazowy HP 6890, detektor mas HP 5973, kolumna kapilarna HP-5MS o długości 30 m i średnicy 250 μm , temperatura dozownika 250°C, linii transferowej 280°C, źródła jonów 230°C, filtra masowego (kwadrupola) 150°C); metoda skryningowa: 150°C do 295°C (10°C/min), zatrzymanie 4 min; metodą dla amfetamin: 90°C do 250°C (10°C/min), 250°C do 280°C (30°C/min), zatrzymanie 6 min; nastrzyk w trybie niepodziałowym w objętości 1 μl – metoda skryningowa lub 3 μl metoda dla amfetamin). Zbierania danych dokonywano w trybie skanowania widma w zakresie mas od 5 do 550 AMU z użyciem oprogramowania ChemStation Software Rev. B.01.00. GC HP 6890, MS 5973.

Odczynniki o czystości analitycznej pochodziły z następujących firm: chlorek n-butyłu – Fluka, HFBA – Supelco, metanol Ultra Resi-Baker, pozostałe – POCh.

WYNIKI

Podczas analizy uzyskanych chromatogramów stwierdzono, obok amfetaminy, także obecność związku, dla którego biblioteka NIST⁹⁸ podała propozycję nazwy „formetorex” (N-formyloamfetamina). Związek ten jest produktem pośrednim otrzymywanym przy produkcji amfetaminy metodą Leuckarta. Badacze zainteresowali się pochodzeniem tej substancji, w następstwie czego wykryto dalsze związki (dla których nie było zadowalających propozycji bibliotecznych), stanowiące zanieczyszczenia amfetaminy, a wskazujące na zastosowanie metody Leuckarta. Związki te zidentyfikowano jako N-formyloamfetaminę („formetorex”), N,N-di-(β -fenyloizopropilo)aminę, N,N-di-(β -fenyloizopropilo)metyloaminę oraz pochodne fenylometylopi-rydyny (rycina 4).

Tożsamość wykrytych związków została potwierdzona na podstawie zgodności czasów retencji i widm masowych odpowiednich substancji wzorcowych. Materiał referencyjny został zsyntetyzowany, a jego czystość i strukturę chemiczną uwierzytelniono kompletem badań (protonowy i węglowy rezonans magnetyczny, spektroskopia w podczerwieni i – w niektórych przypadkach – wysokorozdzielcza spektrometria mas HR/MS). Widma masowe N-formyloamfetaminy, N,N-di-(α -fenyloizopropilo)aminy i N,N-di-(α -fenyloizopropilo)metyloaminy przedstawiono na rycinach 5, 6 i 7. Wyniki analizy toksykologicznej obydwu opisanych przypadków przedstawia tabela I.

W obydwu przypadkach amfetamina i jej zanieczyszczenia były jedynymi wykrytymi ksenobiotykami, a stężenie amfetaminy we krwi ofiar było bardzo wysokie. W przypadku pierwszym stwierdzono w żołądku dużą ilość niewchłoniętej amfetaminy, podczas gdy w przypadku drugim w żołądku denatki wykryto jedynie śladowe ilości tego związku. Ponieważ zanieczyszczenia amfetaminy stanowią bardzo niewielką część „działki”, więc są możliwe do wykrycia w przypadkach, gdzie stężenie amfetaminy w materiale biologicznym jest wysokie.

DYSKUSJA WYNIKÓW

Amfetamina ma nieskomplikowaną budowę chemiczną, toteż jej synteza nie naszcza trudności i może być wykonywana przy użyciu prostego sprzętu laboratoryjnego. Opisano wiele metod syntezy amfetaminy, z czego najczęściej stosowane są metody z wykorzystaniem benzylometyloketonu (BMK).

Droga A – synteza Leuckarta. Jest najpopularniejszą metodą syntezy amfetaminy w Polsce (ponad 95% zbadanych, a przejętych przez policję próbek, zawierało amfetaminę wyprodukowaną przy użyciu tej metody). Polega ona na ogrzewaniu benzylometyloketonu z formamidem lub mrówczanem amonu, co prowadzi do powstania produktu pośredniego – formyloamfetaminy. Formyloamfetamina jest hydrolizowana do amfetaminy w wyniku ogrzewania w środowisku stężonego kwasu solnego. Jest to stosunkowo łatwa reakcja, ale raczej „brudna”, tzn. powstaje sporo zanieczyszczeń, a co za tym idzie, surowa amfetamina wymaga dość starannego oczyszczenia (rycina 8 a).

Droga B – redukcyjne aminowanie benzylometyloketonu w warunkach katalizy heterogenicznej. Mieszaninę BMK oraz amoniaku poddaje się działaniu gazowego wodoru w obecności katalizatora np. niklu Raneya, palladu lub platyny osadzonej na węglu (Pt/C lub Pd/C). Reakcję prowadzi się zazwyczaj w warunkach podwyższonego ciśnienia w autoklawach. Reakcja jest bardzo wydajna i powoduje powstawanie niewielkiej ilości produktów ubocznych. Wymaga jednak dość kosztownego wyposażenia (rycina 8 b).

Droga C – synteza nitropropenowa. W pierwszym etapie benzaldehyd kondensuje z nitroetanem do związku pośredniego – fenylonitropropenu. W drugim etapie nitropropen jest redukowany do amfetaminy z zastosowaniem np. glinowodoru litowego (LiAlH_4) lub za pomocą redukcji katalitycznej w warunkach heterogenicznych. W ofercie handlowej wielu firm chemicznych znajdują się niekontrolowane ustawowo, podstawione w pierścieniu, pochodne benzaldehydu. Użycie ich w miejsce benzaldehydu umożliwi najprostsze otrzymanie podstawionych w pierścieniu analogów amfetaminy, np. 3,4-metylenodioksyamfetaminy (MDA), 4-metylotioamfetaminy (4-MTA), 4-metoksyamfetaminy (PMA) oraz 2,5-dimetoksyamfetaminy (2,5-DMA) (rycina 8 c).

Zakres tej metody można rozszerzyć, gdy produkt pośredni – nitropropen – podda się częściowej redukcji, a następnie hydrolizie (droga D). Otrzyma się wtedy BMK, który można skierować do reakcji przedstawionych wcześniej (rycina 8 d).

Droga E – redukcja norefedryny. Norefedrynę można zredukować do amfetaminy, ogrzewając ją do wrzenia w układzie kwas jodowodorowy/fosfor czerwony. Metoda ta nie jest zbyt często stosowana. Ma ona jednak dwie podstawowe zalety. Jest łatwa do zastosowania nawet w warunkach dalekich od profesjonalnych i prowadzi do powstania optycznie czynnej amfetaminy, a nie, jak w przypadku poprzednich metod, do utworzenia mieszaniny racemicznej. Z tego względu analogiczna „działka” towaru działa silniej. Redukcja diastereoizomeru norefedryny, czyli pseudoefedryna, prowadzi do powstania enancjomeru amfetaminy o słabszym działaniu psychoaktywnym. Ta metoda syntezy ma przede wszystkim ogromne znaczenie w otrzymywaniu metyloamfetaminy z efedryny (Stany Zjednoczone i Daleki Wschód) (rycina 8 e).

Droga F – reakcja Rittera. Niektóre źródła w literaturze przedmiotu mówią o możliwości wykorzystania w syntezie amfetaminy tzw. reakcji Rittera. Substratem

jest allilobenzen, który reaguje z acetonitrylem w środowisku kwaśnym, dając acetylową pochodną amfetaminy. Acetylowa pochodna jest następnie hydrolizowana w środowisku kwaśnym do amfetaminy. Stosowanie tej metody do nielegalnej produkcji amfetaminy sygnalizowano w Wielkiej Brytanii (rycina 8 f).

W każdym przypadku (drogi A–F) otrzymuje się surową amfetaminę, która oczyszczana jest poprzez destylację z parą wodną, ekstrakcję, a niekiedy destylację pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymany produkt – amina w postaci zasady – stanowi bezbarwną, oleistą ciecz o przykrym zapachu. Siarczan amfetaminy, który jest bezbarwnym ciałem stałym, otrzymuje się poprzez strącenie zasady do soli działaniem roztworu kwasu siarkowego w etanolu, acetonie lub innych rozpuszczalnikach [16].

Amfetamina zsyntetyzowana metodą Leuckarta może zawierać następujące zanieczyszczenia [6, 14, 15, 16]:

- a) pozostałości substratów i ich zanieczyszczeń oraz odczynników użytych do reakcji (formamid, kwas mrówkowy, fenyloaceton, dibenzylketon – zanieczyszczenie BMK);
- b) produkty pośrednie powstające podczas syntezy właściwego produktu (N-formyloamfetamina) (rycina 9);
- c) produkty reakcji ubocznych, takie jak: α -benzylfenyloetyloamina; pochodne pirydyny (2,4-dimetylo-3,5-difenylopirydyna – rycina 10 a, 2,6-dimetylo-3,5-difenylopirydyna – rycina 10 b), 4-metylo-5-fenyl-2-(fenylometylo)-pirydyna, 2-metylo-3-fenyl-6-(fenylometylo)-pirydyna – rycina 10 c, 2,4-dimetylo-3-fenyl-6-(fenylometylo)-pirydyna, 2-metylo-2-fenylometylo-5-fenyl-2,3-dihidropiryrid-4-on); dimery (N,N-di(β -fenyloizopropyl)amina – rycina 11 a, N,N-di(β -fenyloizopropyl)metyloamina – rycina 11 b, N,N-di(β -fenyloizopropyl)formamid – rycina 11 c); pochodne pirymidyny (4-metylo-5-fenylopirymidyna – rycina 12 a, 4-benzylpirymidyna – rycina 12 b).

Pochodne fenylometylopirydyny i pirymidyny powstają wyłącznie podczas syntezy wykonywanej metodą Leuckarta i są rezultatem konkurencyjnej reakcji kondensacji ketonu (BMK) i odczynników aminująco-redukujących (układy alternatywne: amoniak/kwas mrówkowy, mrówczan amonu, formamid) [16].

Zastosowanie techniki chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas pozwoliło na wykrycie w badanym materiale biologicznym i zidentyfikowanie związków będących zanieczyszczeniami powstającymi w procesie syntezy amfetaminy metodą Leuckarta.

Odrębny problem stanowi toksyczność zanieczyszczeń amfetaminy. W dostępnym piśmiennictwie brak jest właściwie danych na ten temat. Opisano jedynie metodę syntezy, identyfikację i toksyczność ostrą α -benzylfenyloetyloaminy i α -benzyl-N-metylofenyloetyloaminy. Związki te powstają w trakcie syntezy amfetaminy i metamfetaminy z BMK zanieczyszczonego dibenzylketonem [9]. Porównanie toksyczności amfetaminy, metamfetaminy i ich zanieczyszczeń przedstawia tabela II.

Analogia budowy amfetaminy i zanieczyszczeń o charakterze dimerów nasuwa podejrzenie, że związki te, mające rozbudowaną funkcję hydrofobową (co sprzyja przechodzeniu przez błony biologiczne i penetracji do ośrodkowego układu nerwowego), mogą wykazywać aktywność biologiczną, a co za tym idzie, nie da się wykluczyć ich toksycznego działania.

WNIOSKI

1. W przypadku wysokich stężeń amfetaminy we krwi oraz obecności dużej ilości niewchłoniętego związku w żołądku jest możliwe wykrycie związków wskazujących na zażycie amfetaminy syntetyzowanej metodą Leuckarta.
2. Toksyczność markerów syntezy nie została poznana. Mimo tego na podstawie analogii strukturalnej zanieczyszczeń o charakterze dimerów oraz samej amfetaminy nie można wykluczyć aktywności biologicznej tych związków, a co za tym idzie, ich toksyczności, zwłaszcza że dimer drugorzędowy jest związkiem hydrofobowym, co sprzyja przechodzeniu przez błony komórkowe i docieraniu do OUN.