



DETERMINATION OF AMPHETAMINES IN BLOOD BY ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA) IN THE PRACTICE OF THE INSTITUTE OF FORENSIC RESEARCH

Ewa JANOWSKA, Piotr ADAMOWICZ, Ewa CHUDZIKIEWICZ, Wojciech LECHOWICZ

Institute of Forensic Research, Krakow, Poland

Abstract

Methods based on immunochemical reactions are the most useful screening methods used in laboratories. The immunosorbent test kit ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) used for identification of compound groups in analysed materials with use of a drug-enzyme conjugate is classified into this group. The ELISA method was applied for routine analysis of blood and urine samples for the presence of drugs in the Institute of Forensic Research in 2006. Absorbance values less than or equal to absorbance of 50 ng/ml calibrator were taken as a positive result. All positive results were confirmed by the liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) method. More than 11% of positive results were obtained by means of the ELISA method, in which the presence of amphetamine was confirmed by the LC-MS method in the concentration range from 57 to 583 ng/ml.

Key words

Blood; Amphetamine; ELISA; LC-MS.

Received 10 November 2006; accepted 27 December 2006

1. Introduction

Amphetamine (d-N-phenylisopropylamine) is a prototype of the psychostimulating compounds, which are characterised by sympathomimetic action and strong stimulation of the central nervous system. It was marketed in 1932 as a commercially available drug [7]. Since the 1970s amphetamine and its derivatives have been used as psychotropic substances, present on the illegal drug market in Poland.

According to the Act on Counteracting Drug Addiction of 29 July 2005 [6] amphetamine and methamphetamine are classified as psychotropic substances in class II-P. According to the regulations of the Road Traffic Act [4] and the Decree of the Minister of Health of 11 June 2003 [5], amphetamine and its derivatives are included in the list of agents acting similarly to alcohol.

In 2005 in the practice of the Institute of Forensic Research, 155 cases were noted in which the presence of amphetamine was shown. This was over 14% of all expert opinions prepared in the Section for Toxicological Analyses at that time. The concentration of amphetamine in examined blood samples was in the range from 37 to 1795 ng/ml, whereas the mean concentration and the median amounted to 228 and 150 ng/ml, respectively.

Because of the above-mentioned legal regulations, blood samples collected from persons suspected of consumption of psychotropic substances and from drivers are examined routinely in the Institute for the presence of amphetamine and its derivatives.

Toxicological analysis of blood and urine samples for the presence of narcotic drugs and psychotropic substances begins with the use of screening methods,

which allows separation of the samples giving positive results.

The most helpful screening methods used in toxicological laboratories are based on immunochemical reactions. One such method is the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), which is applied for detection of specific groups of compounds in examined material by use of antibodies conjugated with a suitable enzyme [2, 3].

The ELISA assay was used routinely in 2006 in the Institute to examine blood and urine samples for the presence of narcotic drugs and psychotropic substances.

2. Aim of the study

The aim of the study was to assess the usefulness of the ELISA assay in screening examination of blood collected from persons addicted to psychotropic substances and drivers for the presence of amphetamine as well as to draw the practical conclusions from these examinations.

3. Material and methods

3.1. Reagents

1. "Amphetamine Ultra" test kit for amphetamine detection, manufactured by Neogen (USA). The test kit is composed of:
 - microplate (which has 96 so-called "wells");
 - EIA buffer, containing phosphoric buffer with addition of serum and fixing agents for dilution of samples and conjugate (the specific antibody with amphetamine);
 - wash buffer;
 - K-Blue Substrate[®], stabilised tetramethylbenzidine with addition of hydrogen peroxide;
 - analyte-enzyme conjugate, containing the analyte and the enzyme catalysing decomposition of hydrogen peroxide (peroxidase);
 - Red Stop Solution;
 - negative control;
 - positive control – containing serum spiked with 50 ng/ml amphetamine.
2. Amphetamine and amphetamine-D₅ supplied by Cerillant (LGC Promochem, Warsaw, Poland).
3. Acetonitrile, n-butyl chloride, distilled water (HPLC gradient grade) purchased from Merck (Darmstadt, Germany).

3.2. Material

The studied material was 207 blood samples collected from persons addicted to amphetamine and from drivers who were tested for psychoactive substances. The determinations were performed in series on different days. Blood samples, in which the value of absorbance measured during blood examination for the presence of amphetamines was lower or equal to an absorbance of the standards (positive results), were selected for further studies.

3.3. Methods

3.3.1. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

The assay procedure includes the addition of 10 μ l of blood or urine sample (diluted 1:4 in EIA buffer) to the "well" of the microplate coated with anti-drug antiserum, followed by the addition of the analyte-enzyme conjugate. After incubation at room temperature for 45 min, the liquid is removed from the wells and the microplate is washed three times with the buffer. Then, K-Blue[®] Substrate (TMB) is added to the dried wells. After a 30 min incubation, Red Stop Solution is added and the reaction is halted. The measurement of absorbance of the obtained solution should be performed within a 2-hour period after stopping the reaction.

The immunological reaction takes place between the antibody present in each well and amphetamine (the antigen from the blood or the standard) as well as the antigen conjugated with the enzyme (peroxidase). The extent of enzymatic reaction is inversely proportional to the concentration of antigen in serum. The higher is its concentration, the lower the number of antigens bound to the antibody. After addition of K-Blue Substrate containing tetramethylbenzidine and hydrogen peroxide to the wells, a colour reaction takes place. The absence of amphetamine in the examined blood results in maximal intensity of the colour. If amphetamine is present in the samples, the released peroxidase (from the conjugation with the antigen) will result in decreased colour development.

Positive readings are obtained for samples with an absorbance lower than or equal to the absorbance of controls, whereas the results are recognised as negative when the absorbance is higher than the absorbance of controls.

3.3.2. Liquid chromatographic method coupled to mass spectrometry (LC-MS)

The liquid chromatographic method coupled to mass spectrometry (LC-MS) was applied as a confirmatory method [1]. Liquid chromatograph 2695 Alliance manufactured by Waters coupled to Quattro Micro API mass spectrometer manufactured by Micromass was used for the study. The separation was conducted on a LiChroCART 125 3 mm column filled with Purospher 60 RP-18e. The mobile phase was a mixture of acetonitrile and water with addition of formic acid (1 ml/l). The phase flow rate was 0.8 ml/min and programmed gradient elution was applied.

3.4. Extraction

The liquid-liquid technique was used for extraction of amphetamine from blood samples. Amphetamine-D₅ (internal standard) at a concentration of 1000 ng/ml was added into the blood sample (0.2 ml), followed by alkalisation by 0.5 M sodium hydroxide (pH 13). Then, extraction was performed using n-butyl chloride. The organic phase was vaporised in the presence of 0.025 M hydrochloric acid.

3.5. Determination

The obtained extracts were analysed by LC-MS. The following m/z values corresponding to apparent molecular ions $[M + H]^+$ were recorded: amphetamine – 136, amphetamine-D₅ – 141 and 2-phenylethylamine – 122. Optimisation and validation of the method for amphetamine determination was performed. The obtained limits of detection (LOD) and determination (LOQ) were 20 and 36 ng/ml, respectively. The linearity range was from 36 to 1000 ng/ml.

4. Results and discussion

All blood samples that were classified as positive after examination by the ELISA assay were subjected to confirmatory analysis by means of LC-MS. In 24 cases, which was over 11% of all examined blood samples, the presence of amphetamine was detected. The determined concentrations of amphetamine in blood samples ranged from 57 to 583 ng/ml.

In the case of amphetamine determination, false positive results occur frequently. Such samples examined by the ELISA assay give positive readings, whereas verification performed by the confirmatory method gives negative results. 2-phenylethylamine,

the endogenous substance formed during decomposition of biological material, is detected in such samples of biological material.

The obtained results for the ELISA assay and LC-MS method are presented in Table I. On the basis of these results, such parameters as sensitivity, specificity and efficiency of the method were calculated. Assuming a cut-off value for amphetamine equal to 50 ng/ml, the determined values were as follows: sensitivity – 100%, specificity – 30% and efficiency – 49%.

TABLE I. RESULTS OBTAINED BY METHODS ELISA AND LC-MS

		LC-MS		n
		+	-	
ELISA	+	24	46	70
	-	0	20	20

The relationship between the obtained values of absorbance in the ELISA assay and determined concentrations of amphetamine in the examined blood samples was analysed. The relationship based on data obtained by analysis of an exemplary microplate is shown in Figure 1. The coefficient of non-linear correlation was determined and it amounted to $R = 0.847$.

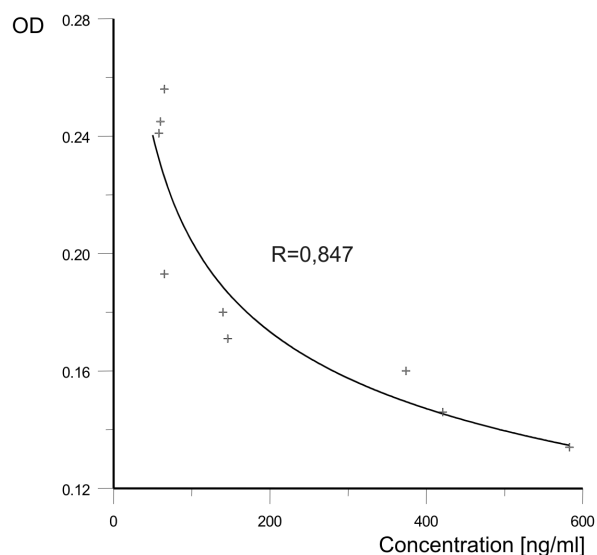


Fig. 1. Dependence of absorbance value in the ELISA method on concentration of amphetamine in blood (results from one of the microplates).

Analysis of obtained results shows that the values of absorbance for negative samples ranged from 0.316 to 1.032 and the mean was 0.616.

The mean value for positive samples for different series was 0.137, and the range of the readings was from 0.117 to 0.634.

Calculations of the first derivative for the ranked readings (shown in Figure 2) indicate that the plates are varied and for most of the readings the border value between positive and negative results is 0.77, whereas the mean value of the readings for the examinations of blood samples with addition of 50 ng/ml amphetamine was 0.137. The difference between the values for negative and positive samples was great and amounted to 0.479. This means that the sensitivity of the assay is sufficient.

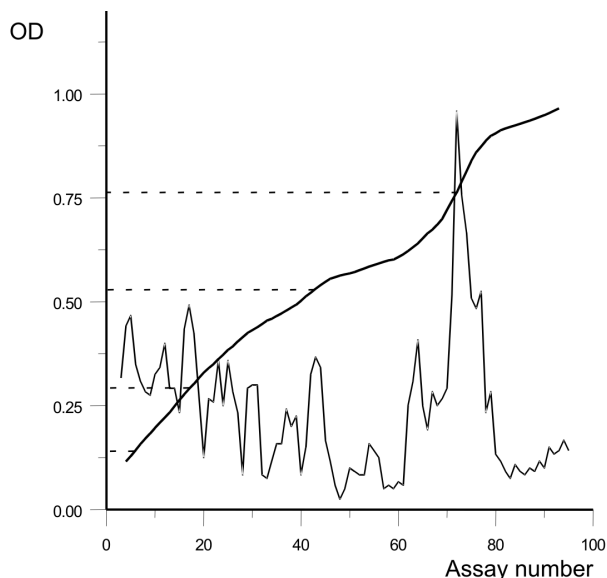


Fig. 2. Deflection points in curve representing the function of sorted results from the ELISA method and ordinal number.

On the basis of performed analysis of real samples on different plates, the authors suggest that the cut-off value for positive values should be 50% of the absorbance for negative controls.

5. Conclusions

The number of cases concerning examination of blood samples for the presence of narcotic drugs and psychotropic substances is growing year after year. Material for examination is collected from persons addicted to these substances and from drivers. Therefore, the most important issue was to select the method that allows rapid detection if the sample of blood or other biological material (urine, oral fluid) contains the above-mentioned compounds. The aim of the paper

was to assess the usefulness of the ELISA assay for screening examination of blood collected from persons addicted to psychotropic substances and from drivers for the presence of amphetamine.

The following practical conclusions can be drawn on the basis of the studies:

1. 11% of positive results, in which the presence of amphetamine was confirmed in a range from 57 to 583 ng/ml, were obtained by ELISA assay.
2. On the basis of performed analysis of real samples on different plates, the authors suggest that the cut-off for positive values should be 50% of the absorbance for negative controls, but not higher than for the designated positive control (if the reading is higher than half of the absorbance for the negative control).
3. It was shown in the performed studies that the ELISA assay with the use of tests manufactured by Neogen is suitable for screening analysis of blood for the presence of amphetamines.

References

1. Bogusz M., Krüger K. D., Maier R. D., Analysis of underivatized amphetamines and related phenethylamines with high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry, *Journal of Analytical Toxicology* 2000, 24, 77–83.
2. Clarke's analysis of drugs and poisons. on of drugs, The Pharmaceutical Press, London 2004.
3. Laloup M., Tilman G., Maes V [et. al.]. Validation of an ELISA-based screening assay for the detection of amphetamine, MDMA, and DMA in blood and oral fluid, *Forensic Science International* 205, 153, 29–37.
4. Prawo o ruchu drogowym, ustawa z dnia 20.06.1997 r., Dz. U. nr 98 poz. 114, ze zm.
5. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 11.03.2004 r. W sprawie wykazu środków działających podobnie do alkoholu oraz warunków i sposobu przeprowadzenia badań na ich obecność w organizmie, Dz. U. 2004, nr 52, poz. 524.
6. Ustawa o przeciwdziałaniu narkomanii z dnia 29.06.2005 r., Dz. U. 2005, nr 179, poz.1485.
7. Seńczuk W. [red.], Toksykologia współczesna, PZWL, Warszawa 2005.

Corresponding author

Ewa Janowska
Instytut Ekspertyz Sądowych
ul. Westerplatte 9
PL 31-033 Kraków
e-mail: ejanowska@ies.krakow.pl

OZNACZANIE AMFETAMIN WE KRWI METODĄ IMMUNOENZYMOSORBCYJNĄ (ELISA) W PRAKTYCE INSTYTUTU EKSPERTYZ SĄDOWYCH

1. Wstęp

Amfetamina (d-N- -fenyloizopropylamina) jest prototypem związków psychostymulujących, charakteryzujących się działaniem sympatykomimetycznym i silnym pobudzeniem ośrodkowego układu nerwowego. Jako lek powszechnie dostępny została wprowadzona do obrotu w 1932 roku [7]. Od lat siedemdziesiątych XX wieku amfetamina i jej pochodne stosowane są na polskim rynku narkotykowym jako substancje psychotropowe. Zgodnie z Ustawą z dnia 29 lipca 2005 r. o przeciwdziałaniu narkomanii [6], amfetamina i metamfetamina zaliczone są do substancji psychotropowych grupy II-P. W myśl przepisów Ustawy prawo o ruchu drogowym [4] i z rozporządzeniem Ministra Zdrowia z dnia 11 czerwca 2003 r. [5] amfetamina i jej analogi zaliczone są do środków działających podobnie do alkoholu. W 2005 roku w praktyce Instytutu Ekspertyz Sądowych zanotowano 155 przypadków, w których wykazano obecność amfetaminy, co stanowiło ponad 14% wszystkich ekspertyz opracowywanych w Pracowni Analiz Toksykologicznych w tym okresie. W badanych próbach krwi wykazano stężenia amfetaminy w zakresie od 37 do 1795 ng/ml, a średnie stężenie oraz wartość środkowa (mediana) wynosiły odpowiednio 228 i 150 ng/ml. W związku z wyżej wymienionymi uregulowaniami prawnymi, próby krwi nadesłane do Instytutu pobrane od osób podejrzanych o przyjmowanie środków psychotropowych, a także kierowców, rutynowo badane są na obecność amfetaminy i jej pochodnych.

W analizie toksykologicznej prób krwi i moczu na obecność środków odurzających i substancji psychotropowych w pierwszej kolejności stosowane są metody przesiewowe (skryningowe), które pozwalają na wyodrębnienie prób dających dodatnie wyniki. Najbardziej przydatnymi metodami skryningowymi stosowanymi w laboratoriach toksykologicznych są metody oparte na reakcjach immunochemicznych. Do tej grupy zaliczana jest metoda immunoenzymosorbcyjna ELISA (ang. enzyme-linked immunosorbent assay), która służy do wykrycia określonych grup związków w badanym materiale z użyciem przeciwciał skoniugowanych z odpowiednim enzymem [2, 3]. W Instytucie Ekspertyz Sądowych w 2006 roku tę metodę zastosowano rutynowo do badania prób krwi i moczu na obecność środków odurzających i substancji psychotropowych.

2. Cel pracy

Celem niniejszej pracy była ocena przydatności metody ELISA do badania skryningowego krwi pobranej od osób uzależnionych od substancji psychotropowych oraz kierowców na obecność amfetaminy i wycignięcie praktycznych wniosków z tych oznaczeń.

3. Materiał i metody

3.1. Odczynniki

Użyto następujących odczynników:

1. Zestawu testowego do oznaczania amfetamin Amphetamine Ultra firmy Neogen (Stany Zjednoczone). Zestaw testowy składa się z:
 - mikroplastyki, (która posiada 96 tzw. dołków),
 - buforu EIA zawierającego bufor fosforanowy z dodatkiem surowicy i utrwalaczy do rozpuszczenia próbek i konjugatu (specyficzne przeciwciała z amfetaminą),
 - buforu przemywającego,
 - Substratu K-Blue tetrametylobenzydyny z dodatkiem wody utlenionej;
 - konjugatu analit/enzym zawierającego analit i enzym katalizujący rozkład wody utlenionej (peroksydazę),
 - roztworu zatrzymującego reakcję – Red Stop Solution,
 - kontroli ujemnej,
 - kontroli dodatniej zawierającej surowicę z dodatkiem 50 ng/ml amfetaminy.
2. Amfetaminy, amfetaminy-D₅, które pochodziły z firmy Cerillant (LGC Promochem, Warszawa Polska).
3. Acetonitrylu, chlorek n-butylu, wody destylowanej (czystości do HPLC), które pochodziły z firmy Merck (Darmstadt, Niemcy).

3.2. Materiał

Materiał do badań stanowiło 207 prób krwi pobranych od osób uzależnionych od amfetaminy i kierowców, którzy zostali poddani badaniu na obecność substancji psychoaktywnych w organizmie. Oznaczenia wykonano w seriach w różnych dniach. Do badań wybrano te próby krwi, w których wartość absorbancji uzyskanej w trakcie

badania krwi na obecność amfetamin była mniejsza lub równa absorbancji wzorców (wyniki pozytywne).

3.3. Metody

3.3.1. Metoda immunoenzymosorbcyjna (ELISA)

W metodzie tej do tzw. dołka (opłaszczonego przeciwciałem) mikro płytki dodaje się 10 µl próby krwi lub moczu (rozcieńczonych w stosunku 1:4 buforem EIA), a następnie konjugat analitu z enzymem. Po inkubacji w temperaturze pokojowej przez 45 minut płyn usuwa się z dołków i przemywa trzy razy buforem. W dalszej kolejności do dołka osuszonego dodaje się Substrat K-Blue i inkubuje przez 30 minut. Po inkubacji dodaje się roztwór zatrzymujący reakcję. Pomiar absorbancji uzyskanego roztworu powinien być dokonany w przeciągu 2 godzin od zatrzymania reakcji.

Reakcja immunologiczna zachodzi między przeciwciałem znajdującym się w każdym z dołków a amfetaminą (antygenem z próby krwi lub wzorca), a także antygenem znaczonego enzymem (peroksydazą). Natężenie reakcji enzymatycznej będzie odwrotnie proporcjonalne do stężenia antygeny w surowicy. Im większe jego stężenie, tym mniej znakowanego antygeny przyłączy się do przeciwciała. Po dodaniu do dołków Substratu K-Blue zawierającej tetrametylobenzydynę i wodę utlenioną uzyskuje się barwny roztwór. W przypadku, gdy we krwi nie ma amfetaminy, intensywność barwy jest maksymalna. Jeżeli w badanej krwi obecna jest amfetamina, to uwolniona peroksydaza (z połączenia z antygenem) spowoduje rozjaśnienie barwnego roztworu.

Wynik pozytywny dają próbki z absorbancją mniejszą lub równą absorbancji wzorców, natomiast za wynik ujemny przyjmuje się wartość absorbancji wyższą niż absorbancja wzorców.

3.3.2. Metoda chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas (LCMS)

Metodę chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas (LC-MS) zastosowano jako metodę potwierdzającą [1]. Do badań użyto chromatografu cieczowego firmy Waters 2695 Alliance połączonego ze spektrometrem mas Quattro Micro API firmy Micromass. Rozdział prowadzono na kolumnie LiChroCART 125 3 mm z wypełnieniem Purospher 60 RP-18e. Fazę ruchomą stanowiła mieszanina acetonitrylu i wody z dodatkiem kwasu mrówkowego (1 ml/l). Przepływ fazy wynosił 0,8 ml/min i odbywał się przy programowanym gradiencie składu.

3.4. Ekstrakcja

Do ekstrakcji amfetaminy z próby krwi zastosowano technikę ciecz-ciecz. W tym celu do próby krwi (0,2 ml) dodano amfetaminę-D₅ (standard wewnętrzny) w stężeniu 1000 ng/ml i zalkalizowano 0,5 M wodorotlenkiem sodu (pH 13). Następnie ekstrahowano chlorkiem n-butylu. Fazę organiczną odparowywano w obecności 0,025 M kwasu solnego.

3.5. Oznaczenie

Uzyskane ekstrakty badano metodą LC-MS. Zarejestrowano pozorne jony molekularne $[M + H]^+$ o wartości m/z odpowiednio dla: amfetaminy – 136, amfetaminy-D₅ – 141, 2-feniloetyloaminy – 122. Metoda oznaczania amfetaminy została zoptymalizowana i zwalidowana. Uzyskane granice wykrywalności (LOD) i oznaczalności (LOQ) wynosiły odpowiednio 20 i 36 ng/ml. Zakres liniowości wynosił od 36 do 1000 ng/ml.

4. Wyniki i dyskusja

Wszystkie próby krwi, które po badaniu metodą ELISA zakwalifikowano jako wyniki dodatnie, poddano analizie potwierdzającej metodą LC-MS. W 24 przypadkach, co stanowi ponad 11% wszystkich przebadanych prób krwi, stwierdzono obecność amfetamin. Wyznaczone stężenia amfetaminy w próbach krwi mieściły się w zakresie od 57 do 583 ng/ml.

W przypadku oznaczania amfetamin spotykamy się z często z wynikami fałszywie dodatnimi. Próbki takie badane testem ELISA dają odczyt dodatni, a później zweryfikowane metodą potwierdzającą wynik ujemny. W takich próbach materiału biologicznego wykrywana jest 2-feniloetyloamina, związek endogeny powstający w trakcie rozkładu między innymi materiału biologicznego.

Uzyskane wyniki dla metody ELISA i LC-MS zamieszczono w tabeli I. Na ich podstawie obliczono takie parametry, jak: czułość, specyficzność i efektywność metody. Wyznaczone wartości przy przyjęciu progu 50 ng/ml amfetaminy, wynosiły: czułość – 100%, specyficzność – 30%, efektywność – 49%.

Oceniono zależność pomiędzy uzyskanymi wartościami absorbancji w metodzie ELISA i wyznaczonymi stężeniami amfetaminy w badanych próbach krwi. Na rycinie 1 przedstawiono tę zależność w oparciu o dane uzyskane z analiz wykonanych przy zastosowaniu jednej z użytych do badań mikro płytek i wyznaczono współczynnik nieliniowej korelacji, który wynosił $R = 0,847$. Na podstawie analizy uzyskanych wyników dla różnych płytek wykazano, że wartości absorbancji dla próbek ujemnych mieściły się w zakresie od 0,316 do 1,032, a średnia wartość wynosiła 0,616. Wartość średnia dla próbek dodat-

nich wynosiła dla różnych serii 0,137, a zakres odczytów mieścił się w granicy od 0,117 do 0,634.

Z obliczeń I pochodnej dla uszeregowanych odczytów (rycina 2) wynika, że płytki różnią się między sobą i przy większości odczytów granica pomiędzy wynikami dodatnimi i ujemnymi wynosi 0,77, natomiast z badań próbek krwi z dodatkiem 50 ng/ml amfetaminy średni odczyt wynosi 0,137. Różnica między wartościami dla próbek ujemnych i dodatnich jest duża i wynosi 0,479. Oznacza to, że test jest wystarczająco czuły.

Na podstawie przeprowadzonej analizy próbek rzeczywistych na różnych płytkach, proponuje się przyjąć granice dla wartości dodatnich wynoszącą 50% wartości absorbancji dla kontroli ujemnych.

5. Wnioski

Z roku na rok wzrasta liczba spraw dotyczących badania prób krwi na obecność środków odurzających i substancji psychotropowych. Materiał do badań pobierany jest od osób uzależnionych od tych związków, a także od kierowców. W związku z tym bardzo ważnym problemem jest wybranie takiej metody, która pozwoliłaby na szybkie rozstrzygnięcie, czy próba krwi lub inny materiał biologiczny (mocz, ślina) zawierają wspomniane związki. Niniejsza praca miała na celu ocenę przydatności metody ELISA do badania skryningowego krwi pobranej od osób uzależnionych od środków psychotropowych oraz kierowców na obecność amfetaminy.

Na podstawie przeprowadzonych badań można wyciągnąć następujące wnioski:

1. W metodzie ELISA uzyskano ponad 11% wyników pozytywnych, w których potwierdzono obecność amfetaminy w stężeniu od 57 do 583 ng/ml.
2. Na podstawie przeprowadzonej analizy próbek rzeczywistych proponuje się przyjąć granicę dla wartości dodatnich wynoszącą 50% wartości absorbancji próbek ujemnych, jednak nie więcej niż wartość dla ustalonej kontroli dodatniej (jeżeli przekracza połowę wartości absorbancji uzyskanej dla kontroli ujemnej).
3. W wyniku przeprowadzonych badań można wykażać, że metoda ELISA przy użyciu testów firmy Neogen nadaje się do analizy skryningowej krwi na obecność amfetamin.