



## DETERMINATION OF 2C-B IN BIOLOGICAL MATERIAL

Dominika GIL, Piotr ADAMOWICZ

*Institute of Forensic Research, Kraków, Poland*

### Abstract

At the turn of 2009–2010, the first case of determination of 4-bromo-2,5-dimethoxyphenethylamine (2C-B) in biological material was recorded at the Institute of Forensic Research. A blood screening was performed by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), verifying at the same time its suitability for the detection of this compound. Coupled techniques (GC-MS and LC-MS/MS) were used for confirmatory analyses. Liquid-liquid extraction was applied to the isolation of 2C-B from a biological matrix and the analysis was carried out in multiple reaction monitoring (MRM) mode. As a result of blood analyses, the presence of amphetamine, 2C-B, THC and THCCOOH was revealed.

### Key words

2C-B; LC-MS/MS; Biological material.

*Received 26 July 2011; accepted 9 November 2011*

### 1. Introduction

2C-B (4-bromo-2,5-dimethoxyphenethylamine) is a psychoactive bromine derivative of phenylethylamine belonging to the so-called 2C family, which is a group of compounds differing in the type of substituent at the fourth carbon atom. 2C-B was first synthesized in 1974 and entered the drug market in the 1980s under the names: Nexus, Venus, Bromo, Eros or Bees [10, 11]. The mechanism of action of 2C-B probably consists in its agonistic influence on serotonin receptors [12]. The effect is mental and physical stimulation, intensification of external stimuli and hallucinations associated mainly with visual and auditory effects, and profound perceptual changes [5, 7]. It is believed that the action of this phenylethylamine derivative is similar to that of mescaline, LSD or psilocybin, which means that is often abused as their replacement [1, 3]. Some authors have reported that 2C-B combines both amphetamine-like stimulating effects and mescaline-like hallucinogenic effects [2]. The average oral

dose of 2C-B ranges from 12 to 24 mg. Lower doses (5–10 mg) induce only stimulating effects, but slightly higher (10–20 mg) induce hallucinations. Doses higher than 20 mg may cause tachycardia, hypertension, and hyperthermia [2, 4]. The duration of action of 2C-B is between 4–8 hours, but the strongest effects are observed only for 1–2 hours after ingestion of this substance [1, 3, 5]. Information about 2C-B metabolism in humans is rarely reported in the literature. Small differences between species were observed in studies conducted on hepatocytes of several species of animals, whereas large interindividual differences were found in research on hepatocytes originating from three persons. The results of studies conducted on animals can be related to people to a very limited extent, among whom are people with a lower tolerance to this substance [2]. Studies on rats show that the highest concentration of 2C-B ( $2250 \pm 266$  ng/ml) in serum after a subcutaneous dose of 50 mg/kg body weight was observed 30 minutes after administration [9]. Maximum concentrations of 2C-B in the tissues

occurred at 60 minutes after administration and were higher than in serum. The highest level of 2C-B was observed in the lungs ( $27028 \pm 7777$  ng/g), an average level in the brain, while the lowest in the liver ( $7485 \pm 1534$  ng/g). Relatively high concentrations of 2C-B in the brain result from its easy passage through the blood-brain barrier. The metabolic pathway of 2C-B is primarily via demethylation of the methoxy group at the fifth and the second carbon atom of the benzene ring. Sulphates and glucuronides of 2C-B (46–92% of the dose) are observed especially in urine, and the main metabolite (13.2% of the dose) of 2C-B, which appears in urine 24–48 h after the ingestion of this substance, is a 5-O-desmethyl derivative [2, 7, 8]. The main metabolite is observed in the liver and lung tissues as early as 1 hour after administration, whereas in the brain after about 2 hours. The passage of the 2C-B metabolite through the blood-brain barrier and its retention in the lungs are much less effective in comparison with the parent substance. In the case of the simultaneous ingestion of 2C-B and MDMA, less conjugated metabolites (glucuronides and sulphates, 0–31%) appear in the urine than in the case of ingestion of 2C-B alone [8]. In rats, the biological half-life of 2C-B is 1.1 h, the volume of distribution has been calculated at 16 l/kg and clearance – 9.8 l/h [9].

2C-B is available on the drug market in the form of powder, capsules or tablets, usually white, yellow or grey, often bearing a logo (names mentioned earlier); it can also be a component of ecstasy tablets [1, 3]. According to the Act on Counteracting Drug Addiction of 29 July 2005, as amended, 2C-B is classified as a psychotropic substance in the II-P group.

2C-B is very rare in Poland. The first case of the seizing of this substance was recorded in May 2007 [6]. Most screening methods do not encompass it and analyses targeted at this derivative are not performed routinely.

## 2. Case description

Two persons were detained in connection with possession of cannabis (marijuana), and pills of unknown origin. Blood samples were taken from the detainees and sent to the Institute of Forensic Research (IFR). Results of analyses of the tablets, identifying them as 2C-B were sent to the IFR several months later. The blood samples were analyzed by screening and targeted at 2C-B methods.

## 3. Material and methods

### 3.1. Biological material

Control blood samples (analytes-free) used for development of the method were from a blood donation centre. Blood samples analysed in routine casework at the IFR also constituted material for analysis of the specificity and selectivity of the method.

### 3.2. Chemicals

Reference standards (2C-B, amphetamine, MDMA, THC and THCCOOH) and their deuterated derivatives (amphetamine-D5, MDMA-D5, THC-D3 and THCCOOH-D3) were from Cerilliant Corporation (LGC Standards, Warsaw, Poland). n-Butyl chloride, diisopropyl ether, hexane, chloroform, ethyl acetate and acetonitrile were purchased in Merck (Warsaw, Poland). Derivatization agents – trifluoroacetic anhydride (TFAA) and pentafluoropropanol (PFPOH) were obtained from Sigma-Aldrich (Poznań, Poland). Immunochemical tests from Neogen Corporation were purchased in STI Company (Warsaw, Poland).

### 3.3. Screening analyses

Blood was tested for the presence of narcotic drugs and psychotropic substances from the amphetamine group (including MDMA), benzodiazepines, cannabinoids, cocaine and opiates. These analyses were performed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), using Neogen Corporation tests. The ELISA method is used to detect compounds from specific groups with the use of antibodies conjugated with a suitable enzyme. The ELISA test works on the basis of the principle that the antibody bound to the enzyme immobilized on the substrate can specifically recognize compounds from a particular group. The sample is considered as a positive if its absorbance value is less than or equal to the absorbance of the sample with the addition of standard.

### 3.4. Determination of amphetamine and 2C-B

#### 3.4.1. Sample preparation

Deuterated derivatives – amphetamine-D5 and MDMA-D5 – used as internal standards (IS) were added to blood samples (0.2 ml) in Eppendorf vials, in order to obtain a final concentration of 100 ng/ml of each. Next, 200  $\mu$ l 0.5 M of carbonate buffer (pH 11) and 1 ml of n-butyl chloride were added to blood sam-

ple. The samples were extracted for 30 s, followed by centrifugation at 15 000 rpm for 5 min, and then organic layers (800  $\mu$ l) were transferred to other Eppendorf vials. After addition of 100  $\mu$ l of 0.025 M HCl, organic layers were evaporated at 40–45°C (for 10–15 min). The aqueous phase (acid) remaining in the vials was vortexed (approx. 10 s) and then transferred to inserts for autosampler vials.

### 3.4.2. Apparatuses and analysis conditions

Agilent Technologies liquid chromatograph 1200 Series coupled to a 6460 Triple Quad mass spectrometer was applied to analyses. Separation was carried out on a LiChroCART (125  $\times$  2 mm) column filled with Superspher RP-select B (Merck). The mobile phase, flowing through the column at a rate 0.3 ml/min, was a mixture of acetonitrile and water with addition of formic acid in an amount of 1 ml/l of mobile phase. The following gradient program was used: 0 min – 20% acetonitrile (ACN), 10 min – 40% ACN, 10.2 min – 20% ACN, 15 min – 20% ACN. Selected MRM transitions were monitored ( $m/z$ ) for: 2C-B – 260 $\rightarrow$ 243 (collision energy 4 V), 260 $\rightarrow$ 228 (14 V), 260 $\rightarrow$ 91 (48 V); amphetamine – 136 $\rightarrow$ 119 (0 V), 136 $\rightarrow$ 91 (12 V); amphetamine-D5 – 141 $\rightarrow$ 93 (12 V) and MDMA-D5 – 199 $\rightarrow$ 165 (4 V). MRM chromatograms for amphetamine and 2C-B are shown on Figure 1.

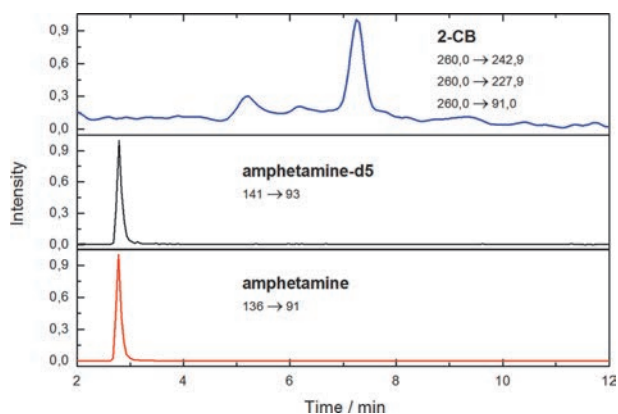


Fig. 1. Example chromatograms of ions undergoing transitions for amphetamine and 2C-B in blood.

## 3.5. Determination of THC and THCCOOH

### 3.5.1. Sample preparation

Deuterated derivatives of THC-D3 and THCCOOH-D3, which were used as IS, were added to separate blood samples (0.5 ml) in Eppendorf vials, in or-

der to obtain a final concentration of 20 and 50 ng/ml, respectively. Next, 200  $\mu$ l 0.5 M of phosphate buffer (pH 3) and 1.2 ml of diisopropyl ether (for THC) or a mixture of hexane and ethyl acetate (7:1, v/v) (for THCCOOH) were added to the blood samples. The samples were extracted for 30 s, followed by centrifugation at 15 000 rpm for 5 min, and then organic layers (600  $\mu$ l) were transferred to glass silanized vials and evaporated to dryness at 40–45°C. Next, derivatization agents in the form of a mixture of chloroform and TFAA (1:1, v/v) (THC) or TFAA and PFPOH (2:1, v/v) (THCCOOH) were added to vials. The derivatization was carried out at 70°C for 40 min, then the reagents were evaporated to dryness at 40–45°C and dissolved in 50  $\mu$ l of ethyl acetate.

### 3.5.2. Apparatuses and analysis conditions

Determination was performed using an Agilent Technologies 6890 Series gas chromatograph equipped with a 5973 mass selective detector (MSD). Helium was used as a carrier gas. Separation was performed using a Restek Rtx-5MS (30 m  $\times$  0.25 mm  $\times$  0.25  $\mu$ m) column in gradient temperature mode (0 min – 80°C, 1 min – 80°C, 10 min – 280°C, 14 min – 280°C). Monitored ions  $m/z$  were respectively for: THC – 410.3 and THC-D3 – 413.3, and THCCOOH – 572.3, 422.3 and THCCOOH-D3 – 575.3, 425.3.

## 4. Results and discussion

2C-B is very rare in Poland. According to Polish reports of the European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA), the first seizure was recorded in May 2007, and another twelve in the first half of 2009 [6]. Therefore, analyses targeted at this derivative are not performed routinely. At the turn of 2009–2010, the first case of detection of 2C-B in biological material was recorded in the IFR. This compound was present in blood samples collected from two persons who at the moment of arrest were in possession of marijuana and pills identified as 2C-B. Blood screening was performed by the ELISA method. Analyses were carried out with the use of tests for the detection of amphetamines, MDMA, opiates, cocaine, benzodiazepines and cannabinoids. Blood samples collected from the two persons were initially classified as positive for cannabinoids, which required verification by a confirmatory method. As a result of GC-MS analysis, traces of  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol at a concentration below 1 ng/ml, and its main metabolite – 11-nor-9-carboxy- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol in

concentrations of 1.9 and 4.4 ng/ml were determined in the two blood samples.

The results obtained by the ELISA method for compounds from the remaining groups mentioned above were classified as negative, because the absorbance values for these compounds were higher than the absorbance of the blood sample fortified with the corresponding compound at a concentration (given in parentheses) established as a threshold for screening methods, i.e. for amphetamine derivatives (amphetamine 50 ng/ml), methamphetamine derivatives (MDMA 50 ng/ml), cocaine (benzoylecgonine 50 ng/ml), opiates (morphine 20 ng/ml) and benzodiazepines (clonazepam 10 ng/ml).

Despite the negative results obtained by the screening method and due to the circumstances of the case, extended analyses for amphetamine derivatives, including 2C-B, were performed using a specific liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method. Optimization of mass spectrometer operating parameters (fragmentor voltage, collision energy, and the most intense MRM transitions) was performed using Mass Hunter Optimizer software. A 9-point calibration curve (0, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000 ng/ml) was prepared for 2C-B in blood. The values of the method parameters were respectively: the correlation coefficient ( $R$ ) – 0.991, the limit of detection ( $LOD$ ) for  $S/N \geq 3$  for the least intense ion transition ( $m/z$ ) 260  $\rightarrow$  91 – 1.8 ng/ml, the limit of quantification ( $LOQ$ ) for  $S/N \geq 10$  – 6.1 ng/ml, range of linearity from  $LOQ$  to 1000 ng/ml.

As a result of the performed analyses, amphetamine and 2C-B at concentrations below 50 ng/ml were found in blood samples (Table I).

TABLE I. DETERMINED CONCENTRATIONS OF DETECTED COMPOUNDS IN BLOOD SAMPLES

Case	Concentration [ng/ml]			
	2C-B	Amphetamine	THC	THCCOOH
1	11	37	< 1.0	1.9
2	9	35	< 1.0	4.4

Moreover, analyses by the ELISA method were performed to verify the possible existence of cross-reactivity of antibodies for amphetamines and methamphetamines with 2C-B. The results obtained for amphetamine and methamphetamine in evidence blood samples and controls fortified with 2C-B (at concentrations of 15, 50 and 100 ng/ml), amphetamine and MDMA (at a concentration of 50 ng/ml) are shown

in Table II. There were no significant changes in the value of absorbance for blood samples with the addition of 2C-B. It can thus be stated that it is not possible to detect 2C-B using standard tests (Neogen Corporation) for screening analysis for the presence of amphetamine and methamphetamine derivatives.

In turn, the implementation of specific tests for this compound, if any were available, does not seem purposeful, taking into consideration its low incidence in Poland. The analysis of blood samples collected from two people described in this paper shows that only information about the presence of 2C-B in tablets seized from the suspects resulted in the detection of this compound in biological material. Therefore, it is necessary to pay particular attention to 2C-B in screening methods or to include methods targeted at this compound in routine practice.

TABLE II. READINGS OBTAINED BY THE ELISA METHOD FOR AMPHETAMINE AND METHAMPHETAMINE DERIVATIVES IN THE EVIDENCE BLOOD SAMPLES AND CONTROL SAMPLES FORTIFIED WITH 2C-B, AMPHETAMINE AND MDMA

Concentration [ng/ml] of added compound	Absorbance value	
	Amphetamine derivatives	Methamphetamine derivatives
Case 1	1.123	1.749
Case 2	1.150	1.738
Amphetamine 50	0.596	–
MDMA 50	–	0.705
2C-B 15	2.049	1.846
2C-B 50	1.907	1.810
2C-B 100	1.999	1.801
∅	2.045	1.958

## 5. Summary

The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) screening method used in routine analyses does not detect 2C-B. For this purpose, it is necessary to use instrumental, preferably coupled, methods.

The developed method of the detection and determination of 2C-B was successfully applied to routine analysis of blood samples collected from people suspected of ingesting 2C-B.

## References

1. 2C-B (nexus). Reappears on the club drug scene, National Drug Intelligence Center, Information Bulletin, May 2001.
2. Carmo H., Hengstler J. G., de Boer D. [et al.], Metabolic pathways of 4-bromo-2,5-dimethoxyphenylethylamine (2C-B): analysis of phase I metabolism with hepatocytes of six species including human, *Toxicology* 2005, 206, 75–89.
3. Cole M. D., Lea C., Oxley N., 4-Bromo-2,5-dimethoxyphenethylamine (2C-B): a review of the public domain literature, *Science & Justice* 2002, 42, 223–224.
4. de Boer D., Gijzels M. J., Bosman I. J. [et al.], More data about the new psychoactive drug 2C-B, *Journal of Analytical Toxicology* 1999, 23, 227–228.
5. Giroud C., Augsburg M., River L. [et al.], 2C-B: a new psychoactive phenylethylamine recently discovered in ecstasy tablets sold on the Swiss black market, *Journal of Analytical Toxicology* 1998, 22, 345–354.
6. EMCDDA (reports), <http://www.emcdda.europa.eu>.
7. Kanamori T., Tsujikawa K., Ohmae Y. [et al.], Excretory profile of 4-bromo-2,5-dimethoxy-phenethylamine (2C-B) in rat, *Journal of Health Science* 2003, 49, 166–169.
8. Pichini S., Pujadas M., Marchei E. [et al.], Liquid chromatography-atmospheric pressure ionization electrospray mass spectrometry determination of “hallucinogenic designer drugs” in urine of consumers, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2008, 47, 335–342.
9. Rohanová M., Páleníček T., Balíková M., Disposition of 4-bromo-2,5-dimethoxyphenethylamine (2C-B) and its metabolite 4-bromo-2-hydroxy-5-methoxyphenethylamine in rats after subcutaneous administration, *Toxicology Letters* 2008, 178, 29–36.
10. Shulgin A. T., Carter M. F., Centrally active phenethylamines, *Psychopharmacology Communications* 1975, 1, 93–98.
11. Shulgin A. T., Shulgin A., Pihkal a chemical love story, Transform Press, Berkeley 1995.
12. Villalobos C. A., Bull P., Sáes P. [et al.], 4-bromo-2,5-dimethoxyphenethylamine (2C-B) and structurally related phenylethylamines are potent 5-HT<sub>2A</sub> receptor antagonists in *Xenopus laevis* oocytes, *British Journal of Pharmacology* 2004, 141, 1167–1174.

---

### Corresponding author

Dominika Gil  
Instytut Ekspertyz Sądowych  
ul. Westerplatte 9  
PL 31-033 Kraków  
e-mail: [dgil@ies.krakow.pl](mailto:dgil@ies.krakow.pl)

---



## OZNACZANIE 2C-B W MATERIALE BIOLOGICZNYM

### 1. Wstęp

2C-B (4-bromo-2,5-dimetoksyfenyloetyloamina) jest psychoaktywną bromową pochodną fenyletyloaminy zaliczaną do tzw. rodziny 2C, czyli grupy związków różniących się rodzajem podstawnika przy czwartym atomie węgla. 2C-B po raz pierwszy została zsyntetyzowana w 1974 roku, a w latach 80. ubiegłego wieku trafiła na rynek narkotykowy pod nazwami: Nexus, Venus, Bromo, Eros lub Bees [10, 11]. Mechanizm działania 2C-B prawdopodobnie polega na agonistycznym działaniu na receptory serotoninowe [12]. Efektem tego jest pobudzenie psychiczne i fizyczne, intensyfikacja bodźców zewnętrznych oraz halucynacje związane głównie z efektami wizualnymi, słuchowymi i głębokimi zmianami percepcyjnymi [5, 7]. Uważa się, że działanie tej pochodnej fenyletyloaminy jest podobne do meskaliny, LSD albo psylocybiny, przez co często bywa stosowana jako ich zamiennik [1, 3]. Niektórzy autorzy podają, że 2C-B łączy stymulujące działanie amfetaminy z halucynogennymi efektami meskaliny [2]. Przeciętą doustną dawką 2C-B waha się w przedziale 12–24 mg. Niższe dawki (5–10 mg) działają jedynie stymulująco, natomiast nieco wyższe (10–20 mg) wywołują halucynacje. Dawki wyższe od 20 mg mogą powodować tachykardię, hipertensję, a także hipertermię [2, 4]. Czas działania 2C-B wynosi 4–8 godzin, jednak najsilniejsze efekty obserwuje się zaledwie przez 1–2 godziny od zażycia tej substancji [1, 3, 5]. Informacje dotyczące metabolizmu 2C-B u ludzi rzadko są opisywane w piśmiennictwie. W badaniach prowadzonych na hepatocytach kilku gatunków zwierząt obserwowano niewielkie różnice międzygatunkowe, a pochodzących od trzech osób duże różnice osobnicze. Wyniki badań prowadzonych na zwierzętach mogą być w bardzo ograniczonym zakresie odnoszone do ludzi, wśród których są osoby o niższej tolerancji na tę substancję [2]. Z badań na szczurach wynika, że maksymalne stężenie 2C-B ( $2250 \pm 266$  ng/ml) w surowicy po podaniu podskórnym w dawce 50 mg/kg masy ciała obserwowano po 30 minutach od zaaplikowania [9]. Maksymalne stężenia 2C-B w tkankach pojawiały się po 60 minutach od podania i były wyższe niż w surowicy. Najwyższy poziom 2C-B obserwowano w płucach ( $27028 \pm 7777$  ng/g), średni w mózgu, natomiast najniższy w wątrobie ( $7485 \pm 1534$  ng/g). Stosunkowo wysokie stężenia 2C-B w mózgu są wynikiem jej łatwego przechodzenia przez barierę krew-mózg. Szlak metaboliczny 2C-B przebiega głównie poprzez demetylację grupy metoksylowej przy piątym i drugim atomie węgla pierścienia benzenowego. W moczu obserwuje się zwłaszcza siarczany i glukuroniany 2C-B (46–92% dawki), a głównym metabolitem (13,2% dawki) 2C-B pojawia-

jącym się w moczu w czasie 24–48 h od chwili przyjęcia tej substancji jest pochodna 5-O-demetylowa [2, 7, 8]. W tkankach wątroby i płuc główny metabolit obserwuje się już po 1 godzinie od podania, natomiast w mózgu po około 2 godzinach. Przechodzenie metabolitu 2C-B przez barierę krew-mózg jak i jego zaleganie w płucach jest znacznie mniej efektywne w porównaniu z substancją macierzystą. W przypadku jednoczesnego przyjęcia 2C-B i MDMA w moczu pojawia się mniej metabolitów sprzężonych (glukuronianów i siarczanów, 0–31%) niż w przypadku przyjmowania samej 2C-B [8]. U szczurów biologiczny okres półtrwania 2C-B wynosi 1,1 h; objętość dystrybucji obliczono na 16 l/kg, natomiast klirens – 9,8 l/h [9].

2C-B jest dostępna na rynku narkotykowym w postaci proszku, kapsułek albo tabletek najczęściej barwy białej, żółtej lub szarej, nierzadko opatrzonej logo (o wspomnianych wcześniej nazwach); może wchodzić również w skład tabletek ekstazy [1, 3]. Zgodnie z ustawą o przeciwdziałaniu narkomanii z 29 lipca 2005 r. z późniejszymi zmianami, 2C-B zaliczana jest do substancji psychotropowych grupy II-P.

2C-B jest bardzo rzadko spotykana w Polsce. Pierwszy przypadek zabezpieczenia tej substancji zarejestrowano w maju 2007 r. [6]. Większość metod przesiewowych jej nie obejmuje, a analizy celowane prowadzone w kierunku wykrycia tej pochodnej nie są wykonywane rutynowo.

### 2. Opis przypadku

Zatrzymano dwie osoby w związku z posiadaniem przetworów konopi w postaci marihuany oraz tabletek niewiadomego pochodzenia. Od zatrzymanych osób do badań pobrano próby krwi, które nadesłano do Instytutu Ekspertyz Sądowych (IES). Po kilku miesiącach nadesłano do IES wyniki badań tabletek, które zostały zidentyfikowane jako 2C-B. Próby krwi poddano badaniom metodami przesiewowymi i ukierunkowanymi na 2C-B.

### 3. Materiał i metody

#### 3.1. Materiał biologiczny

Próby krwi kontrolnej (wolnej od analitów) stosowane do opracowania metody pochodziły ze stacji krwiodawstwa. Materiał do badań stanowiły również próby krwi pochodzące z ekspertyz rutynowo opracowywanych

w IES w celu sprawdzenia specyficzności i selektywności metody.

### 3.2. Odczynniki

Substancje wzorcowe (2C-B, amfetamina, MDMA, THC i THCCOOH) oraz ich deuterowane pochodne (amfetamina-D5, MDMA-D5, THC-D3 i THCCOOH-D3) pochodziły z firmy Cerilliant Corporation (LGC Standards, Warszawa, Polska). Chlorek n-butylu, eter diizopropylowy, heksan, chloroform, octan etylu i acetonitryl zostały zakupione w firmie Merck (Warszawa, Polska). Odczynniki derywatyizujące – bezwodnik kwasu trifluorooctowego (TFAA) i pentafluoropropanol (PFPOH) uzyskano z firmy Sigma-Aldrich (Poznań, Polska). Testy immunoenzymatyczne firmy Neogen zakupiono w firmie STI (Warszawa, Polska).

### 3.3. Analizy przesiewowe

Krew badano na obecność środków odurzających i substancji psychotropowych z grup amfetamin (w tym MDMA), benzodiazepin, kannabinoli, kokainy i opiatów. Powyższe badania wykonano metodą immunoenzymosorbcyjną (ELISA) z zastosowaniem testów firmy Neogen. Metoda ELISA służy do wykrywania związków z określonych grup z użyciem przeciwciał skoniugowanych z odpowiednim enzymem. Zasada działania testu ELISA polega na tym, że unieruchomione na podłożu przeciwciała związane z enzymem może specyficznie rozpoznawać związki z określonej grupy. Próbkę uznaje się za dodatnią, jeżeli jej wartość absorbancji jest mniejsza lub równa wartości absorbancji próbki z dodatkiem wzorca.

### 3.4. Oznaczanie amfetaminy i 2C-B

#### 3.4.1. Przygotowanie próbek do badań

Do prób krwi (0,2 ml) umieszczonych we fiolkach Eppendorfa dodawano jako wzorce wewnętrzne (IS) deuterowane pochodne – amfetaminę-D5 i MDMA-D5, aby osiągnąć stężenie każdego z nich wynoszące 100 ng/ml. Następnie do krwi dodawano 200  $\mu$ l 0,5 M buforu węglanowego (pH 11) oraz 1 ml chlorku n-butylu. Próby wstrząsano przez 30 s, a następnie wirowano przez 5 min przy 15 000 obr./min, po czym fazę organiczną (800  $\mu$ l) przenoszono do kolejnych fiolek Eppendorfa. Po dodaniu do tych fiolek po 100  $\mu$ l 0,025 M HCl, fazę organiczną odparowywano w temperaturze 40–45°C (przez 10–15 min). Pozostałą we fiolkach fazę wodną (kwas) mieszało na wstrząsarce (około 10 s), a następnie przenoszono do wkładek fiolek do automatycznego podajnika próbek.

#### 3.4.2. Aparatura i warunki analizy

Do oznaczeń zastosowano chromatograf cieczerwowy serii 1200 połączony ze spektrometrem mas 6460 Triple Quad firmy Agilent Technologies. Rozdział prowadzono na kolumnie LiChroCART (125  $\times$  2 mm) z wypełnieniem Superspher RP-select B firmy Merck. Fazę ruchomą, przepływającą przez kolumnę z szybkością 0,3 ml/min, stanowiła mieszanina acetonitrylu i wody z dodatkiem kwasu mrówkowego w ilości 1 ml/l fazy. Zastosowano następujący program gradientowy: 0 min – 20% acetonitrylu (ACN), 10 min – 40% ACN, 10,2 min – 20% ACN, 15 min – 20% ACN. Monitorowano wybrane przejścia (MRM) jonów ( $m/z$ ) dla: 2C-B – 260  $\rightarrow$  243 (przy energii kolizji 4 V), 260  $\rightarrow$  228 (14 V), 260  $\rightarrow$  91 (48 V); amfetaminy – 136  $\rightarrow$  119 (0 V), 136  $\rightarrow$  91 (12 V); amfetaminy-D5 – 141  $\rightarrow$  93 (12 V) i MDMA-D5 – 199  $\rightarrow$  165 (4 V). Chromatogramy MRM jonów dla amfetaminy i 2C-B przedstawiono na rycinie 1.

### 3.5. Oznaczanie THC i THCCOOH

#### 3.5.1. Przygotowanie próbek do badań

Do prób krwi (0,5 ml) umieszczonych oddzielnie we fiolkach Eppendorfa dodawano jako IS deuterowane pochodne – THC-D3 i THCCOOH-D3, osiągając stężenia każdego z nich odpowiednio 20 i 50 ng/ml. Następnie do krwi dodawano 200  $\mu$ l 0,5 M buforu fosforanowego (pH 3) oraz 1,2 ml eteru diizopropylowego (dla THC) lub mieszaniny heksanu i octanu etylu (7:1, v/v) (dla THCCOOH). Próby wstrząsano przez 30 s, a następnie wirowano przez 5 min przy 15 000 obr./min, po czym fazę organiczną (600  $\mu$ l) przeniesioną do szklanych, silanizowanych fiolek odparowywano w temperaturze 40–45°C do sucha. Następnie do fiolek dodawano odczynniki derywatyizujące w postaci mieszaniny chloroformu i TFAA (1:1, v/v) (THC) oraz TFAA i PFPOH (2:1, v/v) (THCCOOH). Derywatyizację prowadzono w temperaturze 70°C przez 40 min., po czym odczynniki odparowywano do sucha w temperaturze 40–45°C i rozpuszczano w 50  $\mu$ l octanu etylu.

#### 3.5.2. Aparatura i warunki analizy

Oznaczenia wykonano przy użyciu chromatografu gazowego serii 6890 połączonego ze spektrometrem mas serii 5973 Network MSD firmy Agilent Technologies. Jako gaz nośny stosowano hel. Rozdział analitów prowadzono na kolumnie Rtx-5MS (30 m  $\times$  0,25 mm  $\times$  0,25  $\mu$ m) firmy Restek w warunkach gradientu temperatury (0 min – 80°C, 1 min – 80°C, 10 min – 280°C, 14 min – 280°C). Monitorowano jony  $m/z$  odpowiednio dla: THC – 410,3 i THC-D3 – 413,3 oraz THCCOOH – 572,3, 422,3 i THCCOOH-D3 – 575,3, 425,3.

#### 4. Wyniki i dyskusja

2C-B jest bardzo rzadko spotykana w Polsce. Zgodnie z polskimi raportami Europejskiego Centrum Monitorowania Narkotyków i Narkomanii (EMCDDA), pierwsze takie zdarzenie zarejestrowano w maju 2007 r., a kolejnych dwanaście w pierwszej połowie 2009 r. [6]. Dlatego też nie wykonuje się rutynowo analiz celowanych w kierunku tej pochodnej. Na przełomie lat 2009–2010 odnotowano w IES pierwszy przypadek wykrycia 2C-B w materiale biologicznym. Związek ten był obecny w próbach krwi pobranych od dwóch osób, które w momencie zatrzymania posiadały przy sobie marihuanę oraz tabletki zidentyfikowane jako 2C-B. Badania przesiewowe krwi przeprowadzono metodą immunoenzymosorbcyjną ELISA. Do analiz stosowano testy do wykrywania amfetamin, MDMA, opiatów, kokainy, pochodnych benzodiazepiny i kannabinoli. Próby krwi pobrane od obu osób zakwalifikowano jako wstępnie dodatnie dla kannabinoli, co wymagało weryfikacji metodą potwierdzającą. W wyniku analiz metodą GC-MS w obu próbach krwi wykazano śladowe ilości  $\Delta^9$ -tetrahydrokannabinolu w stężeniu poniżej 1 ng/ml oraz jego główny metabolit – 11-nor-9-karboksy- $\Delta^9$ -tetrahydrokannabinol w stężeniach 1,9 i 4,4 ng/ml.

Wyniki uzyskane metodą ELISA dla związków z pozostałych wyżej wymienionych grup zakwalifikowano jako ujemne, ponieważ wartości absorbancji dla tych związków były wyższe od absorbancji próbki krwi z dodatkiem odpowiedniego związku w stężeniu (podanym w nawiasie) ustalonym jako wartość progowa dla metod przesiewowych, czyli dla pochodnych amfetaminy (amfetamina 50 ng/ml), pochodnych metamfetaminy (MDMA 50 ng/ml), kokainy (benzoilokogonina 50 ng/ml), opiatów (morfina 20 ng/ml) i benzodiazepin (klonazepam 10 ng/ml).

Pomimo ujemnych wyników uzyskanych metodą przesiewową, ze względu na okoliczności sprawy wykonano poszerzone analizy w kierunku pochodnych amfetaminy, w tym 2C-B, przy zastosowaniu specyficznej metody chromatografii cieczowej połączonej z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS). Optymalizację parametrów pracy spektrometru mas (napiecie fragmentatora, energia kolizji, najintensywniejsze przejścia MRM) wykonano przy użyciu oprogramowania Mass Hunter Optimizer. Dla 2C-B sporządzono 9-punktową krzywą kalibracyjną (0, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000 ng/ml) we krwi. Wartości wyznaczonych parametrów metody wynosiły: współczynnik korelacji ( $R$ ) – 0,991, granica detekcji ( $LOD$ ) wyznaczona przy  $S/N \geq 3$  dla najmniej intensywnego przejścia jonów ( $m/z$ ) 260→91 – 1,8 ng/ml, granica oznaczalności ( $LOQ$ ) przy  $S/N \geq 10$  – 6,1 ng/ml, zakres liniowości od  $LOQ$  do 1000 ng/ml.

W wyniku przeprowadzonych analiz w próbach krwi wykazano obecność amfetaminy i 2C-B w stężeniach poniżej 50 ng/ml (tabela I).

Ponadto wykonano badania metodą ELISA mające na celu sprawdzenie ewentualnego występowania reakcji krzyżowych przeciwciał dla amfetamin i metamfetamin z 2C-B. Wyniki uzyskane dla amfetaminy i metamfetaminy w dowodowych próbach krwi oraz kontrolnych z dodatkiem 2C-B (w stężeniu 15, 50 i 100 ng/ml), amfetaminy i MDMA (w stężeniu 50 ng/ml) przedstawiono w tabeli II. Nie zaobserwowano istotnych zmian w wartości absorbancji dla próbek krwi z dodatkiem 2C-B. Należy więc stwierdzić, że przy zastosowaniu standardowych testów (firmy Neogen) używanych podczas analizy przesiewowej na obecność pochodnych amfetaminy i metamfetaminy nie jest możliwe wykrycie 2C-B. Z kolei wdrażanie specyficznych testów dla tego związku, o ile takowe byłyby dostępne, wydaje się mało celowe, biorąc pod uwagę jego małą częstość występowania w Polsce. Opisana w niniejszej pracy analiza prób krwi pobranych od dwóch osób pokazuje, że tylko informacja o obecności 2C-B w zabezpieczonych u podejrzanych tabletkach przyczyniła się do wykrycia tego związku w materiale biologicznym. Konieczne zatem staje się zwrócenie szczególnej uwagi na 2C-B w metodach przesiewowych lub włączenie do rutynowej praktyki metod ukierunkowanych na ten związek.

#### 5. Podsumowanie

Przesiewowa metoda immunoenzymosorbcyjna ELISA stosowana w rutynowych badaniach nie wykrywa 2C-B. W tym celu konieczne jest zastosowanie instrumentalnych metod, najlepiej sprzężonych.

Opracowana metoda wykrywania i oznaczania 2C-B została z powodzeniem zastosowana do rutynowych analiz prób krwi pobranych od osób, u których zachodziło podejrzenie przyjęcia 2C-B.