



## AMPHETAMINE IN FORENSIC-MEDICAL OPINIONS ON DRIVERS

Karol KULA, Sebastian ROJEK, Martyna MACIÓW-GŁĄB, Małgorzata KŁYS

*Department of Forensic Medicine, Jagiellonian University Medical College, Kraków, Poland*

### Abstract

The subject of this work was 25 cases of people who were driving under the influence of amphetamine and/or its derivatives. Most of the investigations were carried out following routine roadside checks of drivers (21), and, additionally, road accidents (3) and a cyclist roadside check (1). Identification and determination of xenobiotics in blood samples collected from drivers were performed by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (HPLC-ESI-MS-MS). Amphetamine was detected in all cases. The presence of amphetamine derivatives (3,4-methylenedioxyamphetamine, 3,4-methylenedioxyamphetamine, methamphetamine and pseudoephedrine) was determined in 4 cases. In terms of compounds that are not derivatives of amphetamine, cannabinoids and morphine were determined in 10 and 1 cases, respectively. Ethanol was detected only in one case for which the breath ethanol concentration was 0.52 mg/l.

### Key words

Amphetamine; HPLC-ESI-MS-MS; Case study; Medico-legal opinions.

*Received 30 July 2013; accepted 12 November 2013*

### 1. Introduction

Amphetamine and its derivatives are among the most prevalent psychoactive substances in Europe [19]. In many countries, amphetamine is the second most commonly used illegal substance, just after cannabis. The European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA), in its annual report for the year 2011, announced that about 12.5 million Europeans aged 15 to 64 have taken amphetamine at least once [19]. The problem of addiction particularly concerns young people aged from 15 to 34, 0.5–2.0% of whom have used this xenobiotic. This means that in 2011, about 1.5 million young Europeans took amphetamine. In Poland, 0.7% of the total population aged 15 to 64 took this compound, the figure being 1.9 % for the 15 to 24 years age group. The scale of psychoactive substance addiction, especially concerning young people, became the reason for adopting an antidrug strategy by the European Union for 2005–

2012, which obliged member states to counteract drug addiction.

In the years 2006–2011, a project titled DRUID (Driving under the Influence of Drugs, Alcohol and Medicines) – commissioned by the European Commission – was implemented, encompassing Norway and 18 EU countries, including Poland [18]. Its main objective was to assess the influence of the use of psychoactive substances including amphetamine by drivers on road safety. According to the study, the prevalence of amphetamine usage among drivers in Poland amounted to 0.05% and was close to the European average (0.08%). This means that for every 2000 drivers in Poland, one is driving a motor vehicle under the influence of amphetamine.

Cases that are subject to forensic-medical opinions concerning amphetamine can be divided, based on the evidence material being tested, into two groups: non-biological (solutions, powders, tablets) and biological (blood, urine, liver, hair). In addition to fatal cases in

which amphetamine was the direct or indirect cause of death, cases of non-fatal administration for non-medical use can also be included in the group in which the evidence is biological material. This group includes drivers who were subjected to roadside checks and who were suspected of driving under the influence of psychotropic substances – a group that has not decreased in size over the years. In such cases, opinions are given on the psychophysical state and reduced psychomotor skills of drivers [9, 18].

In accordance with current forensic toxicology standards, only validated analytical methods with the highest degree of reliability can be applied for judicial purposes.

The aim of this study was to develop and validate a procedure for chemical and toxicological analysis of selected psychoactive substances, including amphetamine and its derivatives in the blood, followed by verification of this procedure in forensic-medical toxicology practice, encompassing issuing opinions on drivers who have been selected for testing for the presence of amphetamines (due to aggressive behaviour or a positive result of a saliva test for the presence of amphetamines).

## 2. Materials

### 2.1. Biological material

The biological material consisted of:

- collected blood samples from 25 drivers;
- control blood obtained from the Regional Blood Centre in Kraków in order to develop and optimize an analytical procedure for determination of selected psychoactive substances.

### 2.2. Standards, reagents and auxiliary materials

Standards of: amphetamine (AMPH); methamphetamine (methAMPH); 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA); 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA); 3,4-methylenedioxyethylamphetamine (MDEA); N-methyl-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-aminobutane (MBDB); 4-methoxyamphetamine (PMA); 4-methoxymethamphetamine (PMMA); pseudoephedrine; phenylethylamine; phenylpropanolamine; cathinone; methcathinone; methylone; buphedrone; mephedrone; and deuterated derivatives of AMPH-D3; methAMPH-D5; MDMA-D5; MDA-D5; MDEA-D5 and pseudoephedrine-D3 were purchased from LGC Promochem (Warsaw).

The following reagents were used: acetonitrile and deionised water (Sigma-Aldrich, Germany), and methanol (Merck, Germany) of gradient-grade purity for liquid chromatography. Ammonium carbonate, ammonium formate and formic acid HPLC grade were purchased from Sigma-Aldrich (Germany).

Auxiliary materials were: Bond Elut-C18 columns for solid phase extraction (SPE) with a 500 mg deposit and a volume of 6 ml (Agilent, USA), a vacuum chamber for solid phase extraction (Varian, USA), and a vacuum concentrator for evaporating samples (Eppendorf, Germany).

## 3. Extraction

1 ml of blood was spiked with the addition of internal standards in the form of deuterated derivatives: AMPH-D3, methAMPH-D5, MDMA-D5, MDA-D5, MDEA-D5, and pseudoephedrine-D3 at a concentration of 0.10 mg/l, followed by addition of 5 ml of 0.01 M ammonium carbonate buffer (pH 9.3). The prepared samples were mixed and centrifuged, and the resulting supernatant was loaded onto an SPE column previously activated with 1 ml of methanol, 1 ml water and 1 ml of 0.01 M ammonium carbonate buffer (pH 9.3). The supernatant was passed through the medium by the force of gravity. SPE columns were then washed with 2 ml of 0.01 M ammonium carbonate buffer (pH 9.3) and dried under vacuum for 30 min. Analytes were eluted with 2 ml of methanol : 0.5 M CH<sub>3</sub>COOH (9:1, v/v) mixture. The extracts were dry evaporated using a vacuum concentrator and dissolved in 100 µl of phase A (solution of 2 mM ammonium formate and 0.2% formic acid in water, v/v) and phase B (solution of 2 mM ammonium formate and 0.2% formic acid in acetonitrile, v/v), 9:1, v/v.

In cases where the concentration of the analyzed compound exceeded the linear range of the method (> 0.5 mg/l), the blood sample (100 µl) was diluted tenfold with blood free from xenobiotics (900 µl) and subjected to the extraction as described above.

$\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC) and its metabolites: 11-nor-9-carboxy- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (THC-COOH) and 11-hydroxy- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (11-OH-THC) were extracted and determined according to the procedure presented in the analytical method [14], while morphine according to the procedure set forth in [6].

## 4. Analytical method

### 4.1. Chromatographic separation

Analysis of the selected psychoactive substance was performed using high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry using electrospray ionization (HPLC-ESI-MS-MS).

A liquid chromatograph (Agilent 1200, USA), consisting of a device for degassing the mobile phase (G1379 B), binary gradient pump (A G1312A), autosampler (G1329A) and column thermostat (G1316 A) were used. Chromatographic separation was carried out in an Allure column packed with PFP Propyl 50 × 2.1 mm and grain size of 5 µm, and with an Allure pre-column packed with PFP Propyl 10 × 2.1 mm (Restek, USA). The column was thermostated at 40° C. The mobile phase consisted of A and B phases, which flowed through the column in a gradient program, starting with a composition of 10% B at a flow rate of 0.5 ml/min, increasing linearly over 10 min to 90% of phase B with a flow rate equal to 1.0 ml/min. The injection volume into the chromatographic column was 10 µl. The column was conditioned for 7 min with a mixture of A and B phases (9:1, v/v) prior to any subsequent injection.

### 4.2. Detection

A quadrupole tandem mass spectrometer (G6410 A, Agilent, USA) with an electrospray ionization source (ESI) was used. The parameters of the ESI ion source were as follows: temperature – 350°C, pressure of the pulverized gas (nitrogen) – 40 psi, flow rate of drying gas (nitrogen) – 9 l/min, capillary voltage – 3000 V. The mass spectrometer worked in a tandem configuration (MS-MS) in the positive ion mode, with dynamic multiple reaction monitoring (DMRM, Table I) only in selected windows of retention time (1.4 min). System parameters control, data collection and processing were performed using Agilent Mass Hunter software version B.03.01 (B2065).

### 4.3. Validation

To assess the specificity of the method, a control blood sample was prepared, free of xenobiotics, without the addition of analytes or internal standards of analyzed amphetamines. The possible influence of the biological matrix in the elution areas of the analytes and their internal standards was investigated. In order to estimate the effect of potential interference by compounds with a similar structure to the analyzed

TABLE I. FRAGMENTATION PARAMETERS OF THE ANALYZED COMPOUNDS

Compound name	Precursor ion	Product ion	Frag-mentor voltage [V]	Collision energy [V]	Retention time [min]
AMPH-D3	139.2	122.1	80	5	4.5
		92.1	80	15	
AMPH	136.1	119.1	80	5	4.5
		91.1	80	15	
Pseudoephedrine-D3	169.2	151.1	90	10	5.0
		136.1	90	20	
Pseudoephedrine	166.2	148.1	90	10	5.0
		133.1	90	20	
MDA-D5	185.1	168.1	70	5	5.5
		138.1	70	15	
MDA	180.1	163.2	70	5	5.5
		135.1	70	15	
PMA	166.2	149.1	70	5	5.6
		121.1	70	20	
methAMPH-D5	155.2	121.1	50	9	5.6
		92.1	50	21	
methAMPH	150.1	119.1	90	5	5.6
		91.1	90	15	
MDMA-D5	199.2	165.2	95	5	5.7
		135.0	95	20	
MDMA	194.2	163.1	95	10	5.7
		135.0	95	20	
PMMA	180.1	149.1	70	5	5.8
		121.1	70	20	
MBDB	208.2	135.0	90	20	6.1
		177.1	90	10	
MDEA-D5	213.2	163.1	70	9	6.1
		135.0	70	21	
MDEA	208.2	163.1	90	15	6.1
		135.1	90	20	

analytes, control blood was spiked with phenylethylamine, phenylpropanolamine, cathinone, methcathinone, methylone, mephedrone and buphedrone at a concentration of 10 mg/l.

Calibration curves were prepared by analysis of three series of blood samples spiked respectively with 0.01, 0.02, 0.05, 0.10 and 0.50 mg/l AMPH, MDA, methAMPH, PMA, MDMA, PMMA, MBDB, MDEA and pseudoephedrine. Each calibration sample was also spiked with internal standards (AMPH-D3,

MDA-D5, methAMPH-D5, MDMA-D5, MDEA-D5, and pseudoephedrine-D3) in the amount of 0.10 mg/l.

The detection limit (*LOD*) of the method was determined, assuming that it is the lowest concentration at which the ratio of the peak area of the analyte to the area under the peak of the noise is  $\geq 3$ . On the other hand, the limit of quantification (*LOQ*) is the lowest concentration for which the accuracy of determination of an analyte is in the range of 80–120% of the actual concentration.

The intra- and inter-assays precision and accuracy were studied for three analyte concentrations, corresponding to the lower (0.01 mg/l), middle (0.05 mg/l) and upper (0.50 mg/l) concentrations on the calibration curve. The intra-assay precision and accuracy was determined for a series of seven replicates for each of the defined concentrations of the analyte. Inter-assay precision was studied in three different series with seven iterations for defined concentrations of the analytes.

The accuracy of the method was expressed as relative error [%] – as the ratio of the difference between the average and the actual concentration of the analyte to the actual concentration of the analyte multiplied by 100. The precision was expressed as a percentage standard deviation [% *RSD*] and calculated as the ratio of the absolute value of the standard deviation to the mean determined analyte concentration multiplied by 100.

The extraction efficiency of the analytes was studied in triplicate for low (0.01 mg/l), middle (0.05 mg/l) and upper (0.50 mg/l) concentrations of the calibration curve. Additionally, extraction from methanol solutions of the analysed compounds of identical concentrations was performed. The absolute extraction efficiency expressed as a percentage was determined as the ratio of the area under the peak of the analyte after extraction from blood to the area of the peak of the same analyte after the extraction of the methanol standard solution multiplied by 100.

## 5. Results

A procedure for validating the determination method of amphetamine and its derivatives in blood was performed. There was no interference in the areas of elution of the analysed compounds coming from the biological matrix or from the matrix enriched with standards. Detailed results of the validation are presented in Table II and III.

The developed methodology was applied to the studied group consisting of 25 cases of drivers who were selected for testing for the presence of ampheta-

TABLE II. PARAMETERS OF CALIBRATION CURVES FOR THE ANALYZED COMPOUNDS

Compound name	Calibration curve	Coefficient of determination ( $R^2$ )	Limit of detection ( <i>LOD</i> ) [mg/l]
AMPH	$y = 0.014x - 0.018$	0.9999	0.003
Pseudoephedrine	$y = 0.013x - 0.012$	0.9993	0.003
MDA	$y = 0.012x - 0.025$	0.9999	0.003
PMA	$y = 0.048x + 0.032$	0.9981	0.001
methAMPH	$y = 0.030x - 0.113$	0.9996	0.001
MDMA	$y = 0.015x - 0.043$	0.9999	0.003
PMMA	$y = 0.022x + 0.013$	0.9992	0.002
MBDB	$y = 0.096x - 0.222$	0.9984	0.001
MDEA	$y = 0.046x - 0.179$	0.9996	0.001

$y$  – relative response (peak area of compound/peak area of internal standard);  $x$  – concentration of compound [mg/l]; limit of quantification (*LOQ*) and limit of linearity (*LOL*) for analyzed compounds were 0.01 and 0.01–0.50 mg/l, respectively.

mines (due to aggressive behaviour or positive result of saliva test for the presence of amphetamines). This group was completely homogeneous in terms of gender – it consisted of 25 men aged 20 to 38 years (mean age was 26 years). 21 cases related to routine control of passenger car drivers, 3 cases to road traffic accidents and 1 case related to a cyclist. In 14 cases, the presence of amphetamine in the form of powder, tablet or aqueous solution in syringes in the car and/or on the driver's clothing was disclosed. In order to determine the alcohol content, each of the detained drivers was tested with a breath analyzer. Only in one case was there a positive result for ethyl alcohol presence, amounting to 0.52 mg/l (pos. 25, Table IV). Out of the nine analyzed compounds, the presence of five was ascertained in the blood of drivers: amphetamine, MDMA, MDA, methAMPH and pseudoephedrine. In all cases, the presence of amphetamine was shown and its concentration in the blood varied within a wide range: 0.02–1.99 mg/l. In one case, MDMA (0.01 mg/l) and MDA (0.14 mg/l); in one, methAMPH (0.04 mg/l); and in one, pseudoephedrine (1.59 mg/l) were found. Amongst non-amphetamine derivatives of compounds, cannabinoids were found in 10 cases, and morphine in one case. Detailed information about the analyzed cases and the results of toxicological studies are presented in Table IV.

TABLE III. THE PRECISION, ACCURACY AND EXTRACTION EFFICIENCY OF THE DEVELOPED METHOD FOR THE DETERMINATION OF AMPHETAMINE AND ITS DERIVATIVES IN BLOOD

Compound name	Concentration in blood [mg/l]	Intra assay precision [% RSD] (n = 7)	Inter assay precision [% RSD] (n = 21)	Accuracy [%] (n = 7)	Extraction efficiency [%] (n = 7)
AMPH	0.01	2.4	2.6	2.8	95
	0.05	2.3	2.3	0.8	92
	0.50	2.1	2.2	2.1	85
Pseudoephedrine	0.01	3.7	5.1	6.4	106
	0.05	4.2	4.8	3.6	92
	0.50	5.4	3.8	2.1	88
MDA	0.01	3.4	4.8	4.0	104
	0.05	4.8	4.9	-2.7	99
	0.50	4.2	5.5	3.5	94
PMA	0.01	4.6	4.9	7.9	104
	0.05	4.3	4.4	6.8	93
	0.50	3.8	3.8	-8.7	82
methAMPH	0.01	3.0	4.1	4.7	95
	0.05	2.9	3.3	4.8	102
	0.50	3.2	4.0	3.1	92
MDMA	0.01	2.8	3.7	2.4	94
	0.05	2.5	3.1	2.2	90
	0.50	2.4	2.6	1.5	84
PMMA	0.01	5.2	5.1	4.3	109
	0.05	5.1	5.9	-8.4	105
	0.50	4.3	4.5	5.8	88
MBDB	0.01	5.2	6.1	7.2	106
	0.05	4.7	4.7	5.6	93
	0.50	4.2	5.2	-4.3	80
MDEA	0.01	4.1	4.7	4.7	105
	0.05	3.4	3.3	3.3	96
	0.50	3.4	4.8	-0.4	98

TABLE IV. THE RESULTS OF TOXICOLOGICAL ANALYSES OF BLOOD COLLECTED FROM DRIVERS

Case no.	Age	Information about cases	Xenobiotic	Concentration in blood [mg/l]
1	30	The driver was stopped for a roadside check. He had three syringes with aqueous solution of amphetamine and two plastic bags containing amphetamine powder. He was addicted to heroin and ethanol	AMPH	0.90
2	20	Traffic accident. The driver drove into a roadside ditch	AMPH THC-COOH	0.32 0.015
3	27	The driver was stopped for a roadside check. He had a plastic bag containing amphetamine powder	AMPH	0.25
4	27	The driver was stopped for a roadside check. He had marijuana in the car. He had been convicted of assault, threatening and insulting police officers and drug trafficking. He was in rehab due to addiction to amphetamine	AMPH MDMA MDA	0.03 0.01 0.14
5	24	The driver was stopped for a roadside check. He hid amphetamine wrapped in aluminium foil in a sock	AMPH	0.31
6	27	The driver was stopped for a roadside check. He tried to escape from police officers	AMPH	0.97
7	20	The driver was stopped for a roadside check. He had three plastic bags containing amphetamine powder	AMPH	0.47



Case no.	Age	Information about cases	Xenobiotic	Concentration in blood [mg/l]
8	30	The driver was stopped for a roadside check. He pleaded guilty to smoking marijuana	AMPH $\Delta^9$ -THC THC-COOH 11-OH-THC	0.18 0.002 0.029 0.001
9	23	The driver was stopped for a roadside check. He said that he may have taken unspecified drugs a few days earlier	AMPH	1.63
10	23	The driver was stopped for a roadside check. He had marijuana and amphetamine in the car. An ex-serviceman discharged from the army due to drug abuse	AMPH methAMPH $\Delta^9$ -THC THC-COOH	0.02 0.04 0.001 0.041
11	21	The driver was stopped for a roadside check. He was suspected of drug trafficking. 121 g of powder and 100 tablets containing amphetamine powder, and 1 g of marijuana were found in the vehicle	AMPH THC-COOH	0.59 0.013
12	23	The driver was stopped for a roadside check. He was suspected of smuggling drugs from the Czech Republic. The passenger had a plastic bag containing amphetamine powder	AMPH $\Delta^9$ -THC THC-COOH 11-OH-THC	0.58 0.002 0.042 0.001
13	32	The driver was stopped for a roadside check. He had hidden three portions of amphetamine powder wrapped in aluminium foil in a sock	AMPH THC-COOH	0.57 0.025
14	28	The driver was stopped for a roadside check. A member of a criminal group involved in drug trafficking. He had amphetamine powder wrapped in aluminium foil	AMPH $\Delta^9$ -THC THC-COOH	0.56 0.002 0.022
15	26	The driver was stopped for a roadside check. Two plastic bags containing amphetamine powder were found in the car	AMPH	0.31
16	31	The driver was stopped for a roadside check	AMPH	1.99
17	20	The driver was stopped for a roadside check. Suspected of drug trafficking. Two plastic bags containing marijuana and eight plastic bags containing amphetamine powder were found in the car	AMPH $\Delta^9$ -THC THC-COOH	0.34 0.001 0.014
18	32	The driver was stopped for a roadside check. He had hidden two plastic bags containing amphetamine in a sock. He was addicted to amphetamine. Treated psychiatrically	AMPH	1.24
19	22	The driver was stopped for a roadside check	AMPH	1.76
20	27	The driver was stopped for a roadside check	AMPH $\Delta^9$ -THC THC-COOH	0.13 0.001 0.018
21	38	The driver was stopped for a roadside check. He was nervous, hyperactive, and his pupils did not react to light. A saliva test showed the presence of amphetamines and cannabinoids	AMPH Pseudoephedrine $\Delta^9$ -THC THC-COOH	0.03 1.59 0.002 0.028
22	27	The driver was stopped for a roadside check. Dried plants (cannabis, poppy straw) and aluminium foil containing amphetamine powder were found in the car	AMPH Morphine	0.35 0.16
23	27	The driver was stopped for a roadside check. He tried to escape from police officers. He had hidden marijuana and cocaine powder in the spare tire. In addition, an electronic scale was found in the car	AMPH	0.31
24	30	Traffic accident. Two people were killed. The driver was suspected of driving under the influence of amphetamine	AMPH	0.74
25	26	Traffic accident. The driver caused a head-on collision. The driver of the car involved in the accident suffered serious injury. The offender had a plastic bag containing amphetamine powder in the car. The breath ethanol concentration of the driver was 0.52 mg/l	AMPH	0.20

## 6. Discussion

Amphetamine is a sympathomimetic amine with a strong central nervous system (CNS) action. Its stimulatory function is based on the release of catecholamines: dopamine and norepinephrine and their transduction intensification [1, 5, 13].

Amphetamine is taken mostly by the oral or intranasal route in the form of a phosphate or sulphate salt. A single dose effective for an occasional recipient is accepted to be 5–15 mg; however, addicted patients may experience increased tolerance enabling them to take up to 2.000 mg per day. One-time administration of an effective dose of amphetamine results in plasma concentration of approximately 0.1 mg/l [11]. In the case of addicts, the determined amphetamine plasma concentration can be as high as 3.0 mg/l. The estimated toxic dose for the occasional user is 200 mg. It is believed that toxic effects may occur at plasma concentrations of 0.2–0.3 mg/l and a fatal toxic effect at concentrations greater than 0.5 mg/l [11]. Amphetamine is detectable in the blood up to maximally 20 h, while in the urine up to 72 h after administration.

Amphetamine, as a powerful stimulant of the CNS, causes agitation, palpitations and arrhythmia of the heart, insomnia, dizziness, tremor, and loss of appetite [4, 15, 17]. Symptoms of ingestion also include mood improvement, fatigue decrease, excessive irritability and explosiveness. After taking amphetamine, people may experience racing thoughts and even delusions. The period after the stimulating action of amphetamine ceases is also very dangerous – it is characterized by a difficult to control sleepiness. In addition, use of amphetamines may lead to a false assessment of one's skills, engaging in risky behaviours, which can even occasionally result in fatal accidents [10, 12].

In accordance with the Act of 29 July 2005 (*Journal of Laws* no. 179, item 1485, as amended) on the prevention of drug addiction, amphetamine is on the list of psychotropic substances in Group II P. It causes a decrease in psychomotor performance of drivers by an impairment of the assessment of speed and distance needed to effectively stop a vehicle [3]. After taking the drug, a driver becomes excessively excited, becomes overly confident in their own abilities and loses the capacity for objective assessment of the situation on the road. This often results in aggressive and risky driving and increases the risk of accidents [7]. According to the report of the DRUID project, amphetamine increased the risk of causing an accident with injuries 8-fold and that of causing a fatal accident 24-fold [18]. In addition, the effect of amphetamine on impairment of some psychomotor skills, such as adjusting speed to

other vehicles (car following test) and on the tendency to bizarre behaviour has been demonstrated. Among the 25 cases analyzed in this study, three concerned road accidents, which led to two passengers being killed (item 24, Table IV), and one participant in a collision suffering serious injuries (item 25, Table IV).

According to the Law on Road Traffic (chapter V, sec. 1, art. 129 § 1–2), a police officer is entitled to test the vehicle driver, or another person with respect to whom there is a reasonable suspicion that they could have driven the vehicle, in order to determine the content of alcohol or agent acting similarly to alcohol. In such situations, a police officer is entitled to prevent the suspected offender from driving and to order the use of testing and measuring instruments to determine their state of intoxication/sobriety. Routine tests can be carried out on a driver's saliva using a multi-drug tester (e.g. Rapid STAT), which allows simultaneous and rapid detection of, among other things, amphetamine, methAMPH and MDMA. After using the saliva tester, an official police note and a report on the driver's behaviour, indicating likely administration of agents acting similarly to alcohol, are drawn up. A positive result obtained using the saliva tester obliges a police officer to carry out procedures to obtain, collect and send blood samples for confirmatory testing using reference methods. These include high performance liquid or gas chromatography and mass spectrometry (LC/MS, GC/MS).

The Regulation of the Minister of Health of 11 June 2003 (*Journal of Laws* no. 116, item 1104) on the list of agents acting similarly to alcohol and the conditions and manner of testing for their presence in the body defines the required limit of quantification for individual agents acting similarly to alcohol, including amphetamine, MDMA and analogues thereof, equal to 0.05 mg/l in blood. The limit of quantification of the method presented in this study was 0.01 mg/l, meeting the analytical requirements contained in this regulation. Moreover, the method is characterized by specific and accurate assay results (Table II and III), meeting the requirements of the European standard PN-EN ISO/IEC 17025:2005.

An agent acting similarly to alcohol detected and determined in the blood is unequivocal evidence of violation of the applicable road regulations by a driver. The wide range of concentrations of amphetamines (0.02–1.99 mg/l) in the 25 analysed cases is an indication of the high complexity of the problem. The impact of different concentrations of amphetamine on psychomotor ability of drivers cannot be unambiguously assessed. In contrast to states related to alcohol, none of the regulations defines concentration ranges

corresponding to specific states related to the taking of agents acting similarly to alcohol. A difficulty in interpretation relates to the distinction between a “state after using an agent acting similarly to alcohol” (Article 87 § 1 of the Petty Offences Code), and a “state under the influence of an intoxicant” (Article 178a § 1 of the Criminal Code), which raises doubts about determining the boundary between a petty offence and a crime [16]. The fact that “state after using an agent acting similarly to alcohol” appears alongside “state after use of alcohol” and “state under the influence of an intoxicant” is an alternative to “state of (alcohol) intoxication” indicates that these are the conditions that give rise to a range of effects on the CNS which are the same effects as caused by “state after use of alcohol” and “state of (alcohol) intoxication” respectively, after consumption of alcohol. Furthermore, definitions of the states associated with the use of drugs are not uniform. The Petty Offences Code uses “state after using alcohol or a similarly acting agent”, the Law on Road Traffic “state after using an agent acting similarly to alcohol”, while the Criminal Code “state under the influence of an intoxicant”. This creates significant problems of interpretation from the legal point of view.

The task of the forensic expert in the field of toxicology is to answer the question asked by courts: “Were the driver’s psychomotor skills impaired?” The ultimate outcome of such an assessment should be based on a comprehensive analysis of the problem. It should encompass: pre-laboratory tests (usually on saliva), the findings of the police, the testimony of witnesses and of the doctor filling in the blood collection report (degree of addiction, dose taken, the time of the last dose, psychophysical state, mood, etc.) and results of analytical studies (qualitative and quantitative) [8]. Of the above mentioned factors, the most reliable and objective source of information (for an expert opinion) is the analytical results – hence the need to carry out tests involving the analysis of a wide range of psychoactive substances.

Only in one case (item 25, Table IV) was a positive result obtained for ethanol, equal to 0.52 mg/l. The mechanism of interaction of amphetamines and ethyl alcohol is not fully understood. Although alcohol has a depressive effect on the CNS, while amphetamine causes stimulation, studies showed no simple antagonistic interaction [2]. Amphetamine may, to some extent, reduce the dangerous effects of alcohol, but some psychophysical disorders still occur that lower the ability to drive vehicles. Alcohol can increase the transient disturbance of the immune system caused by taking MDMA. Moreover, alcohol may slightly in-

crease the blood concentration of MDMA, while the concentration of alcohol can be slightly reduced by MDMA [2]. Therefore, when evaluating psychomotor skills of drivers, reference must be made to Article 87 § 1 of the Petty Offences Code and Article 178a § 1 of the Criminal Code.

## 7. Conclusions

The analytical procedure for the determination of amphetamine and its derivatives in blood by HPLC-ESI-MS-MS after solid phase extraction (SPE) presented in this paper was optimized and validated, meeting the analytical requirements listed in the Regulation of the Minister of Health of 11 June 2003 (*Journal of Laws* no. 116, item 1104) and the guidelines contained in the European standard PN-EN ISO/IEC 17025:2005.

In the group of 25 examined cases, besides amphetamine – which was determined in a wide range of concentrations (0.02–1.99 mg/l) – the presence of  $\Delta^9$ -THC and/or of its metabolites THC-COOH and 11-OH-THC (10 cases) was most often demonstrated. This corresponds well to other statistical data, according to which amphetamine and cannabis preparations are the most commonly taken illegal substances in Europe [19]. Only in one case was methAMPH revealed, in one – pseudoephedrine, in one – MDMA and MDA, and in one – morphine (in addition to amphetamine). This confirms the fact that methAMPH, MDA and MDMA are less common on the Polish drug market in comparison with amphetamine and cannabinoids. Moreover, the results of the study may suggest a change in the trend of drug usage profile from an amphetamine-opiate profile to an amphetamine-cannabinol one.

In the DRUID project, the users of amphetamines were mainly young people under 35 years of age [18]. This is confirmed by the results of this work, as in the analyzed group of 25 cases, only one (38 years, item 21, Table IV) slightly exceeded this age range. In 11 reported cases, amphetamine in blood was found at a concentration greater than 0.5 mg/l, which for occasional users can be highly toxic and even lead to fatal poisoning [13]. The results obtained are based on living people, suggesting that they may correspond to addicted users who have developed individual tolerance to this compound.

According to the Act of 29 July 2005 (*Journal of Laws* no. 179, item 1485, as amended) drug prevention in Poland is carried out by properly developing social, economic, educational and health care policies.



However, the use of and addiction to drugs, particularly amphetamine, is still a serious social problem, not only in Poland but also in Europe. This means radical measures need to be applied. The following appear to be necessary: monitoring of the abstinence of people affected by addiction, legal restrictions on drivers and educational programs to raise awareness of the scale of the problem, especially among young people. In addition, increased inspections to ensure the safety of road users can contribute to a significant and sustained reduction in the number of serious road accidents.

## References

1. Baselt R. C., Disposition of toxic drugs and chemicals in man, Chemical Toxicology Institute, Foster City 2000.
2. Baxter K., Stockley's drug interactions, Pharmaceutical Press, London 2010.
3. Hjalmdahl M., Vadeby A., Forsman A. [et al.], Effects of d-amphetamine on simulated driving performance before and after sleep deprivation, *Psychopharmacology* 2012, 222, 401–411.
4. Jacobs W., Fatal amphetamine-associated cardiotoxicity and its medicolegal implications, *American Journal of Forensic Medicine & Pathology* 2006, 27, 156–160.
5. Kłys M., Bystrowska B., Bujak-Giżycka B. [et al.], Amfetamina i pochodne w opiniowaniu sądowo-lekarskim przypadków śmiertelnych, *Przegląd Lekarski* 2003, 60, 239–244.
6. Kłys M., Rojek S., Four nonfatal and six fatal cases of opiate use: utility of morphine, its metabolites, and their ratios in blood specimens, *Forensic Toxicology* 2008, 26, 87–90.
7. Kłys M., Szydłowski L., Rojek S., Role of toxicological determination of amphetamines and cannabinoids in hair of adolescent patient in cardiologic diagnostic management, *Cardiology in The Young* 2012, 22, 8–12.
8. Korczyńska M., Kulikowska J., Celiński R. [et al.], Stan „pod wpływem substancji odurzających lub psychotropowych” – porównanie wyników badań toksykologicznych z oceną lekarską w materiałach Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej i Toksykologii Sądowo-Lekarskiej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach, *Archivum Medycyny Sądowej i Kryminologii* 2011, 61, 35–42.
9. Ledingham D., Drugs and driving: a retrospective study of the analyses of blood and urine specimens submitted to the Lothian and Borders Police Forensic Laboratory, *Journal of Clinical Forensic Medicine* 1999, 6, 133–140.
10. Lora-Tamayo C., Tena T., Roriquéz A., Amphetamine derivative related deaths, *Forensic Science International* 1997, 85, 149–157.
11. Moffat A. C., Osselton M. D., Widdop B., Clarke's analysis of drugs and poisons, Pharmaceutical Press, London 2011.
12. Musshoff F., Madea B., Driving under the influence of amphetamine-like drugs, *Journal of Forensic Sciences* 2012, 57, 413–419.
13. Neiman J., Haapaniemi H. M., Hillbom M., Neurological complication of drug abuse: pathophysiological mechanisms, *European Journal of Neurology* 2000, 7, 595–606.
14. Rojek S., Kłys M., Analysis of 9-THC and its metabolites: 11-OH-9-THC and THC-COOH in blood by gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry (GC-MS-MS) and its application to medico-legal investigations, *Problems of Forensic Sciences* 2007, 70, 173–186.
15. Senczuk W., Toksykologia, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 1999.
16. Stefański R. A., Prawo o ruchu drogowym. Komentarz, Wolters Kluwer Polska, Warszawa 2008.
17. Verschraagen M., Maes A., Ruiters B. [et al.], Post-mortem cases involving amphetamine-based drugs in the Netherlands. Comparison with driving under the influence cases, *Forensic Science International* 2007, 170, 163–170.
18. www.druid-project.eu [access 2012.09.04].
19. www.emcdda.europa.eu/events/2011/annual-report, Sprawozdanie roczne 2011 dotyczące stanu problemu narkotykowego w Europie sporządzone przez Europejskie Centrum Monitorowania Narkotyków i Narkomanii (EMCDDA) [access 2012.01.30].

---

### Corresponding author

Karol Kula  
Katedra i Zakład Medycyny Sądowej  
Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego  
ul. Grzegorzewska 16  
PL 31-531 Kraków  
e-mail: karol.kula@uj.edu.pl

---

# AMFETAMINA W OPINIOWANIU SĄDOWO-LEKARSKIM KIEROWCÓW

## 1. Wstęp

Amfetamina oraz jej pochodne należą do najbardziej rozpowszechnionych substancji psychoaktywnych w Europie [19]. W wielu państwach, po konopiach indyjskich, to drugie najczęściej używane nielegalne substancje. Agencja Unii Europejskiej ds. narkotyków (Europejskie Centrum Monitorowania Narkotyków i Narkomanii, EMCDDA) w sprawozdaniu rocznym za 2011 rok ogłosiła, że około 12,5 miliona Europejczyków w wieku od 15 do 64 lat przynajmniej raz próbowało amfetaminy [19]. Problem uzależnienia dotyczy szczególnie ludzi młodych w wieku od 15 do 34 lat, wśród których używało tego ksenobiotyku 0,5–2,0% osób. Oznacza to, że w 2011 roku około 1,5 miliona młodych Europejczyków próbowało amfetaminy. W Polsce rozpowszechnienie tego związku wyniosło 0,7% dla całej populacji w wieku od 15 do 64 lat, w tym 1,9% dla przedziału wiekowego od 15 do 24 lat. Skala uzależnienia od substancji psychoaktywnych, szczególnie dotycząca młodzieży, stała się powodem do przyjęcia przez Unię Europejską strategii antynarkotykowej na lata 2005–2012 zobowiązującej kraje członkowskie do przeciwdziałania zjawisku narkomanii.

W latach 2006–2011 na zlecenie Komisji Europejskiej realizowany był projekt DRUID (Driving under the Influence of Drugs, Alcohol and Medicines) obejmujący Norwegię oraz 18 krajów Unii Europejskiej, w tym Polskę [18]. Jego głównym celem była ocena wpływu stosowanych przez kierowców substancji psychoaktywnych, w tym amfetaminy, na bezpieczeństwo na drogach. Zgodnie z wynikami badań, rozpowszechnienie amfetaminy wśród kierowców w Polsce wyniosło 0,05% i było zbliżone do średniej europejskiej (0,08%). Oznacza to, że na 2000 kierowców w Polsce jeden prowadzi pojazd mechaniczny pod wpływem amfetaminy.

Opiniowane przypadki w aspekcie sądowo-lekarskim, dotyczące amfetaminy, podzielić można ze względu na materiał dowodowy poddany badaniu na materiał niebiologiczny (roztwory, proszki, tabletki) oraz biologiczny (krew, mocz, wątroba, włosy). Do grupy, w której materiałem dowodowym jest materiał biologiczny, oprócz przypadków zakończonych zgonem, w których amfetamina stanowiła bezpośrednią lub pośrednią przyczynę śmierci, zaliczyć można przypadki zażywania jej do celów niemedycejskich bez skutku śmiertelnego. Do tej grupy należy, niemałająca od lat, grupa kierowców zatrzymanych podczas kontroli drogowej i podejrzanych o prowadzenie pojazdu pod wpływem substancji psychotropowych. Wiąże się to z opiniowaniem dotyczącym

stanu psychofizycznego oraz obniżeniem zdolności psychomotorycznych kierowców [9, 18].

Zgodnie z obowiązującymi standardami stosowanymi w toksykologii sądowej, do celów orzecznictwa prawnego wymagane jest stosowanie zwalidowanych metod analitycznych o najwyższym stopniu wiarygodności.

Celem niniejszej pracy było opracowanie i walidacja procedury chemiczno-toksykologicznej analizy wybranych substancji psychoaktywnych, w tym amfetaminy i jej pochodnych we krwi, a następnie jej weryfikacja w toksykologicznej praktyce sądowo-lekarskiej obejmującej opiniowanie kierowców, u których istniało wskazanie do przeprowadzenia badań na obecność amfetaminy (np. agresywne zachowanie lub dodatni wynik testu śliny na obecność amfetaminy).

## 2. Materiał

### 2.1. Materiał biologiczny

Materiał biologiczny stanowiły:

- próbki krwi zabezpieczone od 25 kierowców;
- krew kontrolna otrzymana z Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Krakowie w celu opracowania i optymalizacji procedury analitycznej oznaczania wybranych substancji psychoaktywnych.

### 2.2. Wzorce, odczynniki chemiczne i materiały pomocnicze

Wzorce amfetaminy (AMF), metamfetaminy (methAMF), 3,4-metylenodioksymetamfetaminy (MDMA), 3,4-metylenodioksyamfetaminy (MDA), 3,4-metylenodioksyetylamfetaminy (MDEA), N-metyl-1-(3,4-metylenodioksyfenyl)-2-aminobutanu (MBDB), 4-metoksyamfetaminy (PMA), 4-metoksymetamfetaminy (PMMA), pseudoefedryny, fenyloetyloaminy, fenylopropanolaminy, katynonu, metkatynonu, metylonu, mefedronu i bufedronu oraz deuterowane pochodne AMF-D3, methAMF-D5, MDMA-D5, MDA-D5, MDEA-D5 i pseudoefedryny-D3 zakupiono w firmie LGC Promochem (Warszawa).

Zastosowano następujące odczynniki chemiczne: acetonitryl i woda dejonizowana (Sigma-Aldrich, Niemcy), metanol czystości gradientowej do chromatografii cieczowej (Merck, Niemcy). Węglan amonu, mrówczan amonu i kwas mrówkowy czystości do chromatografii cieczowej zakupiono w firmie Sigma-Aldrich (Niemcy).

Materiały pomocnicze stanowiły: kolumny do ekstrakcji do fazy stałej (SPE) Bond Elut-C18 o masie złoża

500 mg i objętości 6 ml (Agilent, Stany Zjednoczone), komora próżniowa do ekstrakcji do fazy stałej (Varian, Stany Zjednoczone) oraz koncentrator próżniowy do odparowywania próbek (Eppendorf, Niemcy).

### 3. Ekstrakcja

1 ml krwi wzbogacano dodatkiem wzorców wewnętrznych w postaci deuterowanych pochodnych AMF-D3, methAMF-D5, MDMA-D5, MDA-D5, MDEA-D5, pseudoefedryny-D3 w stężeniu 0,10 mg/l, a następnie dodawano 5 ml 0,01 M buforu węglanowo-amonowego (pH 9,3). Tak przygotowane próbki mieszano, odwirowywano, a powstały supernatant наносono na kolumnienki SPE zaktywowane wcześniej za pomocą 1 ml metanolu, 1 ml wody oraz 1 ml 0,01 M buforu węglanowo-amonowego (pH 9,3). Supernatant przepuszczano przez złożo pod działaniem siły grawitacji. Kolumnienki SPE poddawano następnie myciu 2 ml 0,01 M buforu węglanowo-amonowego (pH 9,3) i suszono w próżni przez 30 min. Anality eluowano za pomocą 2 ml mieszaniny metanol : 0,5 M CH<sub>3</sub>COOH (9:1, v/v). Ekstrakty odparowywano do sucha przy użyciu koncentratora próżniowego i rozpuszczano w 100 µl mieszaniny fazy A (roztwór 2 mM mrówczanu amonu i 0,2% kwasu mrówkowego w wodzie, v/v) oraz fazy B (roztwór 2 mM mrówczanu amonu i 0,2% kwasu mrówkowego w acetonitrylu, v/v), 9:1, v/v.

W przypadku, gdy stężenie analizowanego związku przekraczało zakres liniowości metody (> 0,5 mg/l), badaną krew (100 µl) rozcieńczano dziesięciokrotnie krwią wolną od ksenobiotyków (900 µl) i poddawano ekstrakcji zgodnie z powyższym opisem.

Δ<sup>9</sup>-tetrahydrokannabinol (Δ<sup>9</sup>-THC) i jego metabolity: kwas 11-nor-9-karboksy-tetrahydrokannabinolowy (THC-COOH) oraz 11-hydroksy-tertahydrokannabinol (11-OH-THC) ekstrahowano i oznaczano zgodnie z procedurą metody analitycznej zaprezentowanej w [14], natomiast morfinę według procedury przedstawionej w [6].

### 4. Metoda analityczna

#### 4.1. Rozdział chromatograficzny

Analizę wybranych substancji psychoaktywnych przeprowadzano, stosując metodę wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas z wykorzystaniem jonizacji przez rozpylanie w polu elektrycznym (HPLC-ESI-MS-MS).

Użyto chromatografu cieczowego (Agilent 1200, Stany Zjednoczone) składającego się z urządzenia do odgazowywania fazy ruchomej (G1379 B), podwójnej pompy gradientowej (G1312 A), automatycznego

podajnika próbek (G1329 A) oraz termostatu kolumny (G1316 A). Rozdział chromatograficzny prowadzono w kolumnie Allure z wypełnieniem PFP Propyl 50 × 2,1 mm i wielkością ziaren 5 µm z przedkolumną Allure z wypełnieniem PFP Propyl 10 × 2,1 mm (Restek, Stany Zjednoczone). Kolumnę termostatowano w 40°C. Fazę ruchomą stanowiła faza A oraz faza B, które przepływały przez kolumnę w programie gradientowym, począwszy od udziału 10% fazy B przy natężeniu przepływu równym 0,5 ml/min, wzrastając liniowo w ciągu 10 min do udziału 90% fazy B i natężenia przepływu równego 1,0 ml/min. Objętość nastrzyku na kolumnę chromatograficzną wynosiła 10 µl. Kolumna była kondycjonowana przez 7 min mieszaniną fazy A oraz fazy B (9:1, v/v) przed każdym kolejnym nastrzykiem.

#### 4.2. Detekcja

Zastosowano kwadrupolowy, tandemowy spektrometr mas (G6410 A, Agilent, Stany Zjednoczone) z komorą do jonizacji przez rozpylanie w polu elektrycznym (ESI). Parametry źródła jonów ESI były następujące: temperatura – 350°C, ciśnienie rozpylanego gazu (azot) – 40 psi, natężenie przepływu gazu osuszającego (azot) – 9 l/min, napięcie kapilary – 3000 V. Spektrometr mas pracował w opcji tandemowej (MS-MS) w trybie jonów dodatnich, monitorując wybrane reakcje rozpadu (DMRM – dynamic multiple reaction monitoring, Tabela I) jedynie w zadanych oknach czasów retencji (1,4 min). Kontrola parametrów układu, gromadzenie danych oraz ich przetwarzanie zostało przeprowadzane przy użyciu oprogramowania Agilent Mass Hunter w wersji B.03.01 (B2065).

#### 4.3. Walidacja

Do oceny specyficzności metody przygotowano próbkę krwi kontrolnej, wolnej od ksenobiotyków, bez dodatku analitów i wzorców wewnętrznych analizowanych amfetamin. Badano możliwy wpływ matrycy biologicznej w obszarach elucji badanych analitów oraz ich wzorców wewnętrznych. W celu oszacowania wpływu możliwych interferencji związków o zbliżonej strukturze do analizowanych analitów wzbogacono krew kontrolną w fenyloetyloaminę, fenylopropanolaminę, katynon, metkatynon, metylon, mefedron i bufedron w stężeniu 10 mg/l.

Krzywe kalibracyjne zostały przygotowane poprzez analizę trzech serii próbek krwi wzbogaconych odpowiednio w 0,01, 0,02, 0,05, 0,10 i 0,50 mg/l AMF, MDA, methAMF, PMA, MDMA, PMMA, MBDB, MDEA i pseudoefedryny. Każda próbka kalibracyjna wzbogacona była również we wzorce wewnętrzne (AMF-D3, MDA-D5, methAMF-D5, MDMA-D5, MDEA-D5, pseudoefedryna-D3) w ilości 0,10 mg/l.

Granice detekcji metody (*LOD*) wyznaczono, zakładając, że jest ona najniższym stężeniem, przy którym stosunek pola powierzchni pod pikiem dla analitu do pola powierzchni pod pikiem dla szumu wynosi  $\geq 3$ . Jako granicę oznaczalności (*LOQ*) przyjęto najniższe stężenie, dla którego dokładność oznaczenia analitu mieści się w przedziale 80–120% rzeczywistego stężenia.

Precyzję i dokładność wewnątrz- i zewnątrzgrupową badano dla trzech stężeń analitu odpowiadających dolnemu (0,01 mg/l), środkowemu (0,05 mg/l) i górnemu (0,50 mg/l) stężeniu na krzywej kalibracyjnej. Precyzję i dokładność wewnątrzgrupową wyznaczono dla jednej serii w siedmiu powtórzeniach dla każdego zdefiniowanego stężenia analitu. Precyzję zewnątrzgrupową badano w trzech odrębnych seriach przy siedmiu powtórzeniach dla zdefiniowanych stężeń analitów.

Dokładność metody wyrażono w postaci błędu względnego [%] jako stosunek różnicy pomiędzy średnim a rzeczywistym stężeniem analitu do rzeczywistego stężenia analitu pomnożony przez 100. Precyzję wyrażono jako procent odchylenia standardowego [% *RSD*] i obliczano jako stosunek wartości bezwzględnego odchylenia standardowego do średniego wyznaczonego stężenia analitu pomnożony przez 100.

Wydajność ekstrakcji analitów była badana w trzech powtórzeniach dla dolnego (0,01 mg/l), środkowego (0,05 mg/l) i górnego (0,50 mg/l) stężenia na krzywej kalibracyjnej. Dodatkowo przeprowadzono ekstrakcję metanolowych roztworów analizowanych związków o identycznych stężeniach. Bezwzględna wydajność ekstrakcji wyrażoną w procentach wyznaczano jako stosunek pola powierzchni pod pikiem dla analitu po ekstrakcji krwi do pola powierzchni pod pikiem dla tego analitu po ekstrakcji metanolowego roztworu wzorca pomnożony przez 100.

## 5. Wyniki

Przeprowadzono procedurę walidacji metody oznaczania amfetaminy i jej pochodnych we krwi. Nie wykazano interferencji pochodzących od matrycy biologicznej oraz wzbogaconych w nią wzorców na obszary elucji analizowanych związków. Szczegółowe wyniki walidacji zestawiono w tabeli II i III.

Opracowaną metodykę zastosowano do grupy badawczej obejmującej 25 przypadków kierowców, u których istniało wskazanie do przeprowadzenia badań na obecność amfetaminy (np. agresywne zachowanie lub dodatni wynik testu ze śliny na obecność amfetaminy). Grupa ta była całkowicie jednorodna pod względem płci – w jej skład wchodziło 25 mężczyzn w wieku od 20 do 38 lat (średnia wieku 26 lat). 21 przypadków dotyczyło rutynowej kontroli kierowców samochodów osobowych, 3 przypadki wypadku drogowego i 1 przy-

padek rowerzysty. W 14 przypadkach w samochodzie i/lub na ubraniu kierowcy ujawniono obecność amfetaminy w postaci proszku, tabletek lub wodnego roztworu w strzykawkach. W celu ustalenia zawartości alkoholu każdy z zatrzymanych kierowców został poddany badaniu analizatorem wydychanego powietrza. Tylko w jednym przypadku otrzymano wynik pozytywny wynoszący dla alkoholu etylowego 0,52 mg/l (poz. 25, tabela IV). Spośród dziewięciu analizowanych związków stwierdzono we krwi kierowców obecność pięciu: amfetaminy, MDMA, MDA, methAMF i pseudoefedryny. We wszystkich przypadkach wykazano obecność amfetaminy, a jej stężenie we krwi wahało się w bardzo szerokich granicach: 0,02–1,99 mg/l. W jednym przypadku ujawniono obecność MDMA (0,01 mg/l) oraz MDA (0,14 mg/l), w jednym methAMF (0,04 mg/l) oraz w jednym pseudoefedrynę (1,59 mg/l). W grupie związków niebędących pochodnymi amfetaminy w 10 przypadkach wykazano obecność kannabinoidów oraz w 1 przypadku morfiny. Szczegółowe informacje dotyczące analizowanych przypadków oraz wyników badań toksykologicznych zamieszczono w tabeli IV.

## 6. Dyskusja

Amfetamina należy do amin sympatykomimetycznych o silnym działaniu na ośrodkowy układ nerwowy (OUN). Jej stymulujące działanie polega na uwalnianiu amin katecholowych: dopaminy i noradrenaliny oraz nasileniu ich przekazywania [1, 5, 13].

Amfetamina najczęściej przyjmowana jest drogą doustną lub donosową w postaci soli siarczanowej lub fosforanowej. Jako jednorazową dawkę efektywną dla okazjonalnego biocy przybiera się 5–15 mg, przy czym u osób uzależnionych może wystąpić zjawisko tolerancji umożliwiające przyjęcie nawet 2000 mg na dobę. Jednorazowe przyjęcie dawki efektywnej amfetaminy skutkuje jej stężeniem w osoczu w wysokości około 0,1 mg/l [11]. W przypadku uzależnionych biocy wyznaczane stężenie amfetaminy w osoczu dochodzi do 3,0 mg/l. Oszacowana dawka toksyczna dla okazjonalnych biocy wynosi 200 mg. Uważa się, że toksyczne działanie może wystąpić już przy stężeniach w osoczu 0,2–0,3 mg/l, a efekt toksyczny ze skutkiem śmiertelnym dla stężeń powyżej 0,5 mg/l [11]. Amfetamina może być wykrywana we krwi maksymalnie do 20 h, natomiast w moczu do 72 h od chwili zażycia.

Amfetamina jako silny stymulant OUN powoduje pobudzenie psychoruchowe, kołatanie i niemiarywość pracy serca, bezsenność, zawroty głowy, drżenie mięśni i zniesienie łaknienia [4, 15, 17]. Do objawów jej zażycia zaliczyć można również poprawę samopoczucia, zniesienie uczucia zmęczenia, nadmierną drażliwość i wybuchowość. U osób zażywających amfetaminę



może wystąpić gonitwa myśli, a nawet urojenia. Okres po ustaniu stymulującego działania amfetaminy jest także bardzo niebezpieczny – charakteryzuje się trudną do opanowania sennością. Ponadto zażywanie amfetaminy może prowadzić do fałszywej oceny własnych umiejętności, podejmowania ryzykownych zachowań, w wyniku których dochodzi czasami do wypadków zakończonych zgonem [10, 12].

Zgodnie z ustawą z dnia 29 lipca 2005 r. (Dz. U. nr 179, poz. 1485, z późn. zm.) o przeciwdziałaniu narkomanii amfetamina widnieje na liście substancji psychotropowych grupy II P. Powoduje ona obniżenie sprawności psychoruchowej kierowców poprzez nieprawidłową ocenę szybkości oraz odległości potrzebnej do skutecznego zatrzymania pojazdu [3]. Po jej przyjęciu kierowca staje się nadmiernie pobudzony, nabiera przesadnego przekonania o własnych umiejętnościach i traci zdolność obiektywnej oceny sytuacji na drodze. Skutkuje to często agresywną i ryzykowną jazdą oraz zwiększa ryzyko wypadku [7]. Zgodnie z raportem projektu DRUID, amfetamina 8-krotnie zwiększa ryzyko spowodowania wypadku z obrażeniami oraz 24-krotnie wypadku ze skutkiem śmiertelnym [18]. Ponadto wykazano wpływ amfetaminy na upośledzenie niektórych zdolności psychomotorycznych, np. dostosowanie prędkości do innych pojazdów (ang. car following test) oraz skłonność do brawurowych zachowań. Wśród 25 analizowanych przypadków w niniejszej pracy, 3 dotyczyły wypadków drogowych, w wyniku których dwóch pasażerów poniosło śmierć (poz. 24, tabela IV), a jeden uczestnik kolizji doznał ciężkiego uszczerbku na zdrowiu (poz. 25, tabela IV).

Zgodnie z ustawą „Prawo o ruchu drogowym” (dział V, rozdz. 1, art. 129 § 1–2) policjant uprawniony jest do poddania badaniu kierującego pojazdem lub inną osobę, w stosunku do której zachodzi uzasadnione podejrzenie, że mogła kierować pojazdem, w celu ustalenia zawartości alkoholu lub środka działającego podobnie do alkoholu. W takich sytuacjach policjant uprawniony jest do wydawania poleceń uniemożliwiających kierowanie pojazdem oraz użycia przyrządów kontrolno-pomiarowych w celu stwierdzenia stanu trzeźwości kierującego. Rutynowo przeprowadza się również badanie śliny kierowcy przy użyciu wielopanelowego testera (np. Rapid STAT) umożliwiającego równoczesne i szybkie wykrycie w ślinie m.in. amfetaminy, methAMF oraz MDMA. Po badaniu z użyciem testera śliny sporządzana jest policyjna notatka urzędowa oraz protokół zachowań kierowcy świadczących o prawdopodobnym przyjęciu środków działających podobnie do alkoholu. Pozytywny wynik uzyskany przy użyciu testera śliny obliguje policjanta do przeprowadzenia procedur zmierzających do pobrania, zabezpieczenia i przesłania próbki krwi do badań potwierdzających z użyciem metod referencyjnych. Należą do nich wysokosprawna chromatografia cieczowa

lub gazowa sprzężona ze spektrometrią mas (LC/MS, GC/MS).

Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 11 czerwca 2003 roku (Dz. U. nr 116, poz. 1104) w sprawie wykazu środków działających podobnie do alkoholu oraz warunków i sposobu przeprowadzania badań na ich obecność w organizmie definiuje ponadto wymaganą granicę oznaczalności dla poszczególnych środków działających podobnie do alkoholu, w tym dla amfetaminy, jej analogów oraz MDMA wynoszącą 0,05 mg/l krwi. Wyznaczona granica oznaczalności metody prezentowanej w niniejszej pracy wyniosła 0,01 mg/l, spełniając tym samym wymogi analityczne zawarte w powyższym rozporządzeniu. Opracowaną metodę charakteryzowały ponadto specyficzne i dokładne wyniki oznaczeń (tabela II i III) spełniające wymogi normy europejskiej PN-EN ISO/IEC 17025:2005.

Jednoznacznym dowodem naruszenia obowiązujących przepisów ruchu drogowego przez kierowcę jest wykazany i oznaczony we krwi środek działający podobnie do alkoholu. Szeroki przedział stężeń dla amfetaminy (0,02–1,99 mg/l) w 25 analizowanych przypadkach sugeruje złożoność problemu. Ocena wpływu określonych stężeń amfetaminy na zdolność psychomotoryczną kierowców nie jest jednoznaczna. W przeciwieństwie do stanów związanych z alkoholem, żadna z ustaw nie definiuje zakresów stężeń odpowiadających poszczególnym stanom związanym z przyjęciem środków działających podobnie do alkoholu. Trudność interpretacyjna dotyczy rozróżnienia pomiędzy „stanem po użyciu środka działającego podobnie do alkoholu” (art. 87 § 1 k.w.), a „stanem pod wpływem środka odurzającego” (art. 178a § 1 k.k.), co rodzi wątpliwości przy wyznaczaniu granicy pomiędzy wykroczeniem a występkiem [16]. „Stan po użyciu środka działającego podobnie do alkoholu” występuje obok „stanu po użyciu alkoholu”, a „stan pod wpływem środka odurzającego” jako alternatywny w stosunku do „stanu nietrzeźwości”, co wskazuje, że są nimi takie stany, które wywołują w zakresie oddziaływania na OUN takie same skutki, jak spożycie alkoholu powodujące odpowiednio „stan po użyciu alkoholu” i „stan nietrzeźwości”. Ponadto definicje stanów związanych z używaniem środków odurzających nie są jednolite. W kodeksie wykroczeń przyjmuje się „stan po użyciu alkoholu lub podobnie działającego środka”, w ustawie „Prawo o ruchu drogowym” „stan po użyciu środka działającego podobnie do alkoholu”, zaś w kodeksie karnym „stan pod wpływem środka odurzającego”. Stwarza to znaczne trudności interpretacyjne w aspekcie prawnym.

Zadaniem biegłego sądowego z zakresu toksykologii jest odpowiedź na pytanie zadane przez przedstawicieli organów wymiaru sprawiedliwości: „czy zdolności psychomotoryczne kierowcy zostały naruszone?” Ostateczny efekt takiej oceny powinien wynikać z kompleksowej analizy problemu. Składają się na nią przedlaboratoryj-



ne badania (najczęściej śliny), ustalenia dokonane przez policję, zeznania świadków zdarzenia, lekarza wypełniającego protokół pobrania krwi (stopień uzależnienia, przyjęta dawka, czas od przyjęcia ostatniej dawki, stan psychofizyczny, nastrój itp.) oraz wyników (jakościowych i ilościowych) przeprowadzonych badań analitycznych [8]. Spośród wymienionych najbardziej rzetelnym i obiektywnym źródłem informacji opiniodawczej są wyniki badań analitycznych – stąd potrzeba przeprowadzania tychże badań obejmujących analizę szerokiego spektrum substancji psychoaktywnych.

Tylko w jednym przypadku (poz. 25, tabela IV) otrzymano wynik pozytywny dla alkoholu etylowego wynoszący 0,52 mg/l. Mechanizm interakcji amfetamin oraz alkoholu etylowego nie jest do końca poznany. Pomimo tego, że alkohol wykazuje działanie depresyjne na OUN, a amfetamina powoduje jego stymulację, nie wykazano prostej relacji oddziaływania antagonistycznego [2]. Amfetamina może w pewnym stopniu zredukować szkodliwy wpływ alkoholu, jednakże nadal występują pewne zaburzenia psychofizyczne wpływające na obniżenie zdolności prowadzenia pojazdów mechanicznych. Alkohol może wzmocnić przejściowe zaburzenia układu immunologicznego spowodowane przyjęciem MDMA. Ponadto alkohol może w niewielkim stopniu wpłynąć na zwiększenie stężenia MDMA we krwi, podczas gdy stężenie alkoholu może być w niewielkim stopniu zredukowane poprzez MDMA [2]. Dlatego też kryterium, na którym opiera się ocena zdolności psychomotorycznych kierowców, kieruje uwagę na art. 87 § 1 k.w. oraz art. 178a § 1 k.k.

## 7. Wnioski

Przedstawiona w niniejszej pracy analityczna procedura oznaczania amfetaminy i jej pochodnych we krwi metodą HPLC-ESI-MS-MS po ekstrakcji do fazy stałej (SPE) została zoptymalizowana oraz zwalidowana, spełniając tym samym wymogi analityczne wymienione w rozporządzeniu Ministra Zdrowia z dnia 11 czerwca 2003 roku (Dz. U. nr 116, poz. 1104) oraz wytyczne zawarte w normie europejskiej PN-EN ISO/IEC 17025:2005.

W grupie 25 analizowanych przypadków obok amfetaminy oznaczonej w szerokim przedziale stężeń (0,02–1,99 mg/l), najczęściej wykazywano obecność  $\Delta^9$ -THC i/lub jego metabolitów: THC-COOH i 11-OH-THC (10 przypadków). Odpowiada to danym statystycznym, wedle których amfetamina i przetwory konopi indyjskiej to najczęściej przyjmowane nielegalne substancje w Europie [19]. Tylko w jednym przypadku, oprócz amfetaminy, ujawniono methAMF, w jednym pseudoefedrynę, w jednym MDMA i MDA oraz w jednym morfinę. Potwierdza to fakt, że methAMF, MDA oraz MDMA

są mniej rozpowszechnione na polskim rynku narkotykowym w porównaniu z amfetaminą i kannabinolami. Ponadto wyniki przeprowadzonych badań mogą sugerować zmianę trendu w zażywaniu narkotyków z profilu amfetamino-opiowego na profil amfetamino-kannabinolowy.

W projekcie DRUID użytkownikami pochodnych amfetaminy byli głównie ludzie młodzi, poniżej 35 roku życia [18]. Potwierdzają to wyniki niniejszej pracy, gdyż w analizowanej grupie 25 przypadków tylko jeden (38 lat, poz. 21, tabela IV) nieznacznie wykraczał poza ten przedział wiekowy. W 11 przypadkach odnotowano we krwi amfetaminę w stężeniu przekraczającym 0,5 mg/l, która dla okazjonalnych biorców może okazać się silnie toksyczna, a nawet prowadząca do zatrucień śmiertelnych [13]. Otrzymane wyniki dotyczyły osób żywych, co sugeruje, że mogły one odpowiadać uzależnionym biorcóm, u których wystąpiło zjawisko tolerancji osobniczej na ten związek.

Zgodnie z ustawą z dnia 29 lipca 2005 roku (Dz. U. nr 179, poz. 1485, z późn. zm.) przeciwdziałanie narkomanii w Polsce realizuje się przez odpowiednie kształtowanie polityki społecznej, gospodarczej, oświatowo-wychowawczej i zdrowotnej. Niemniej jednak używanie oraz uzależnienie od narkotyków, a w szczególności od amfetaminy, stanowi wciąż poważny problem społeczny nie tylko w Polsce, ale w całej Europie. Wymusza to podjęcie radykalnych środków. Niezbędna wydaje się kontrola abstynencji osób dotkniętych nałogiem, restrykcje prawne wobec kierowców oraz programy edukacyjne uświadamiające skalę problemu, głównie wśród młodzieży. Ponadto wzmocnione kontrole mające na celu zapewnienie bezpieczeństwa uczestników ruchu drogowego mogą przyczynić się do wyraźnego i trwałego zmniejszenia liczby poważnych wypadków drogowych.