

## STANOVENÍ 4-HYDROXY-METHAMFETAMINU, 4-HYDROXY-AMFETAMINU, AMFETAMINU A METHAMFETAMINU POMOCÍ HPLC S FLUORESCENČNÍ DETEKČÍ

PAVLA PILAŘOVÁ, PETR KASTNER  
a JIŘÍ KLIMEŠ

*Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv, Karlova Univerzita v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové  
pavla.pilarova@faf.cuni.cz*

Došlo 13.10.11, přepracováno 6.1.12, přijato 1.3.12.

Klíčová slova: methamfetamin, fluorescenční detekce, dansyl chlorid, HPLC, SPE

### Úvod

Amfetaminové deriváty (APs) patří k velmi oblíbeným psychostimulačním drogám zneužívaných v Evropě a také v České republice. Tyto sloučeniny se vyznačují silným centrálně stimulačním, anorektickým a periferně sympatomimetickým účinkem. Používají se jako léčiva v terapii narkolepsie, jsou relativně úspěšné a díky krátkodobému podávání nevzniká na ně tolerance. APs navozují stav zvýšené úrovně bdělosti, zabraňují spánku, urychlují psychomotoriku a mozek je schopen zachytit a zpracovat větší množství podnětů. Tohoto účinku je však dosaženo na úkor kvality práce mozku. Methamfetamin (MA; pervitin, ice) se stal preferovanější drogou díky snadnější nelegální syntéze než u amfetaminu. Ve formě hydrochloridu je nejčastěji aplikován i.v. nebo je ve formě volné baze inhalován, což vede k rychlejšímu průniku a kumulaci látky v mozku. Po podání se objevuje pocit velké fyzické a psychické síly, je narušeno vnímání (halucinace). Biologický poločas je 12–34 h a je závislý na pH moči, vylučuje se jí téměř z 43 % v nezměněné formě, koncentrace jsou v rozmezí 25–300  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Hlavním metabolitem je amfetamin (AP), typický představitel psychostimulancií, dobře se absorbuje z gastrointestinálního traktu a snadno proniká přes hematoencefalickou bariéru. V moči se objevuje během 20 min, koncentrace může být 1–90  $\mu\text{g ml}^{-1}$  (cit.<sup>1–3</sup>). MA a AP způsobují psychickou, ale i fyzickou závislost. Hlavním metabolitem AP je 4-hydroxyamfetamin (p-OHAP), který se nachází v moči v koncentracích 0,03–0,5  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . 4-Hydroxymethamfetamin (p-OHMA) je hlavním metabolitem MA, koncentrace v moči jsou 0,2–8,0  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Stejně jako p-OHAP je fyziologicky aktivní<sup>4</sup>.

Pro kvalitativní a kvantitativní analýzu amfetaminu,

methamfetaminu a jeho příbuzných látek bylo vyvinuto mnoho analytických postupů, z nichž velké množství využívá HPLC. Sledované látky se vyznačují nízkou absorpcí UV záření, proto jindy běžně používaná UV detekce není dostatečně citlivá. V současné době se tento problém řeší pomocí vysoce sofistikované a relativně drahé MS detekce.

Pro analýzu APs s MS detekcí lze využít např. chromatografické separace na stacionární fázi C18 s lineárním gradientem acetonitril – voda po předchozí úpravě vzorků séra mikroextrakcí na pevné fázi. Detekční limity pro AP a MA jsou 0,3  $\text{mg l}^{-1}$  a 0,04  $\text{mg l}^{-1}$  (cit.<sup>5</sup>). Pro přímé enantioselektivní dělení MA a AP v moči je možno použít silikagelovou kolonu s vázaným fenylykarbamoylovaným  $\beta$ -cyklodextrinem, mobilní fázi je směs acetonitrilu s methanolem a fosforečnanový pufr o různém pH (cit.<sup>6,7</sup>). Další autoři publikovali metodu analýzy enantiomerů MA ve vzorcích moči na imunoafinitní koloně vlastní výroby (silikagel s imobilizovanými myšími monoklonálními protilátkami proti MA) s gradientovou elucí octanovým pufrem o různém pH a detekčním limitem 18  $\text{ng ml}^{-1}$  (cit.<sup>8</sup>) nebo přímou analýzu séra nebo krve na C18 semi-mikro koloně s navázaným hovčím sérovým albuminem. Detekční limit těchto analytů se pohyboval okolo 10  $\text{ng ml}^{-1}$  (cit.<sup>9</sup>). LC-MS je pro tento účel jednou z nejlepších metod, přesto vzhledem k ekonomické náročnosti má význam se zabývat alternativními možnostmi. Zlepšení detekce lze dosáhnout předkolonovou derivatizací s činidly, které přidávají do molekuly analytu fluorofor za vzniku fluorescenčních derivátů. K tomuto účelu byl použit jako fluorescenční činidlo *o*-ftaldialdehyd<sup>10</sup>. Použití acetonového roztoku dansyl chloridu (Dns-Cl) spojuje derivatizaci s deproteinací při stanovení MA v lidské plazmě a moči. Proces derivatizace je ale časově náročný, příprava vzorku vyžaduje asi 2 hodiny<sup>11</sup>. Dansylace byla použita nejen pro derivatizaci APs, ale i dalších analytů často s kratší inkubační dobou<sup>12–14</sup>. Po derivatizaci fluorescein isothiokyanátem lze APs stanovit kapilární elektroforézou (CE) s použitím boritanového pufru o pH 12; laserem indukovanou fluorescencí byl dosažen detekční limit 0,2  $\text{ng ml}^{-1}$  (cit.<sup>15</sup>). CE s ultrafialovou detekcí byla použita pro chirální separace těchto látek s použitím  $\beta$ -cyklodextrinu a fosforečnanového pufru pH 3,2 (cit.<sup>16</sup>). K možnostem detekce je vhodné ještě zmínit, že pro hodnocení methylenedioxyderivátů APs v různých biologických matricích bylo popsáno několik vysoce selektivních metod využívajících vlastní fluorescenci stanovovaných látek<sup>17,18</sup>.

Hlavním cílem této studie bylo vyvinout a validovat relativně jednoduchou a rychlou HPLC metodu, která by mohla být použita pro kvalitativní i kvantitativní hodnocení MA a jeho metabolitů v moči. Dobrá separace MA, AP, p-OHAP a p-OHMA je velmi důležitá, neboť metabolity se vyskytují v biologických vzorcích společně s matečnou nelegální drogou. Kvůli již zmíněné slabé absorpci analytů byla zvolena předkolonová derivatizace Dns-Cl, která se realizuje současně s SPE izolací a umožňuje použít dostatečně citlivou a relativně selektivní fluorescenční detekci. Pro kvantifikaci byla zvolena metoda vnitřního standardu, jímž byl fenylethylamin (PEA).

## Experimentální část

### Chemikálie

(+)Methamfetamin hydrochlorid; amfetamin sulfát; 4-hydroxymethamfetamin; vnitřní standard – fenylethylamin; derivatizační činidlo 5-dimethylaminonaftalen-1-sulfonfylchlorid (Dns-Cl) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), 4-hydroxyamfetamin hydrobromid (Hoechst, Německo). Lyofilizované vzorky moči (SEKK spol. s.r.o., ČR) byly těsně před použitím rekonstituovány vodou dle návodu dodavatele. Ultra čistá voda byla připravena zařízením firmy Millipore Corp. Všechna další činidla pro SPE extrakci a mobilní fázi byla kvality pro HPLC (Merck, Německo).

### Roztoky

Zásobní standardní roztoky APs o koncentraci  $1 \text{ mg ml}^{-1}$  byly připraveny rozpuštěním ve vodě a uloženy při  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Z nich byly před analýzou naředěny vodou standardní roztoky o požadované koncentraci. Modelové vzorky moči s APs byly získány přidáním standardních roztoků k rekonstituované moči. Roztok DNS-Cl ( $10 \text{ mmol l}^{-1}$ ) byl připraven rozpuštěním příslušné navážky v acetonitrilu a uchováván ve tmě. Uhlíčanový pufr byl připraven rozpuštěním  $0,8 \text{ g}$  hydrogenuhličitanu sodného ve  $100 \text{ ml}$  vody, pH bylo upraveno na hodnotu  $9,0$  pomocí  $10 \text{ M-NaOH}$ .

### Chromatografické podmínky

Analýzy byly provedeny na přístroji Shimadzu (Shimadzu, Japan) v sestavě řídicí jednotka SCL-10 AVP,

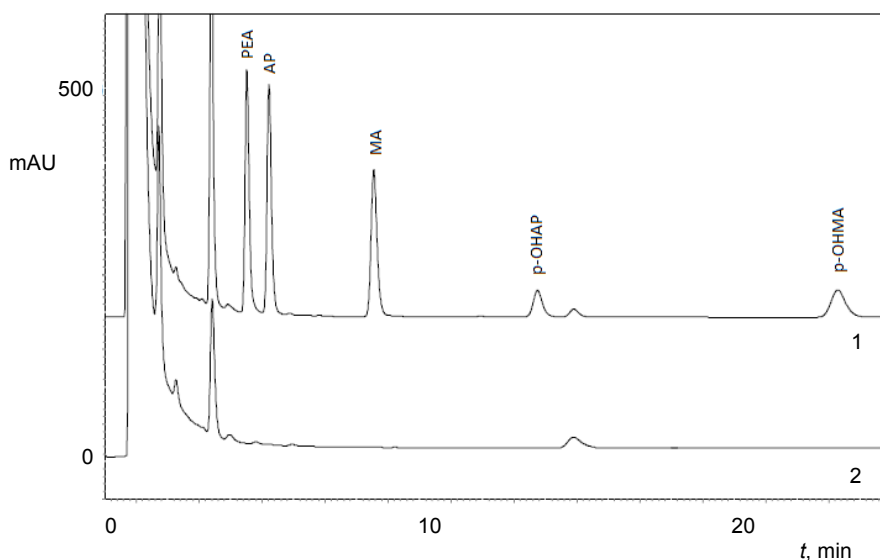
pumpa LC-10 ADVP, autosampler SIL-10ADVP, kolonový termostat CTO-10ASVP, degasser DGU-14A, fluorescenční detektor FL RF-10AXL, chromatografický software Class-VP. Excitační vlnová délka byla  $343 \text{ nm}$  a emisní  $530 \text{ nm}$ . Optimální chromatografická separace byla dosažena s použitím kolony LiChrospher 100 RP-18 ( $5 \text{ } \mu\text{m}$ )  $125 \text{ mm} \times 4 \text{ mm I.D}$  (Merck, Německo) a s mobilní fází acetonitril – voda ( $65:35, \text{ v/v}$ ), průtok  $1 \text{ ml min}^{-1}$ , teplota kolony  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , teplota autosampleru  $15 \text{ }^\circ\text{C}$ , nástřik  $20 \text{ } \mu\text{l}$ .

### SPE izolace, derivatizace

Zkumavka se  $100 \text{ } \mu\text{l}$  roztoku vnitřního standardu ( $20 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ ) a  $1,0 \text{ ml}$  vzorku moči byla protřepána  $10 \text{ s}$  pomocí přístroje Vortex. SPE kolonka LiChroCART® RP-18 E (Merck, Německo) byla aktivována promytím  $2,0 \text{ ml}$  methanolu a  $1,5 \text{ ml}$  uhlíčanového pufru pH  $9,0$  pomocí vakuového systému Visiprep SPE. Průtok byl udržován na rychlosti přibližně  $0,5 \text{ ml min}^{-1}$ . Celý objem vzorku byl aplikován na kolonku, následovalo promytí  $1,0 \text{ ml}$  vody a vysušení vakuem. Do kolonky byla přidána směs roztoku DNS-Cl a uhlíčanového pufru o pH  $9,0$ , kolonka byla uzavřena, obalena alufólií a vložena do sušárny (objem a poměr směsi, reakční teplota a čas byly optimalizovány). Po ochlazení byly produkty derivatizace eluovány  $1,5 \text{ ml}$  acetonitrilu, doplněny do  $2,0 \text{ ml}$  mobilní fáze a  $20 \text{ } \mu\text{l}$  bylo nastříknuto na HPLC kolonu.

### Validace

Byly stanoveny následující parametry: linearita, selektivita, správnost, opakovatelnost, LOD, LOQ a stabilita vzorků.



Obr. 1. Charakteristický chromatogram směsi APs v moči (1) a blanku moči (2); mobilní fáze acetonitril – voda ( $65:35, \text{ v/v}$ ), fluorescenční detekce  $\lambda_{\text{ex}} 343 \text{ nm}$  and  $\lambda_{\text{em}} 530 \text{ nm}$

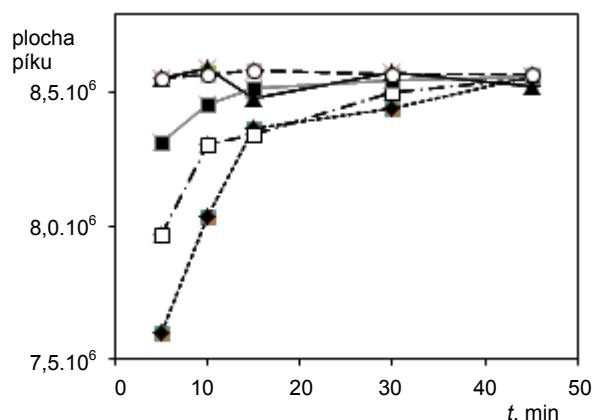
## Výsledky a diskuse

### Optimalizace chromatografických podmínek

Byly testovány různé průtoky (0,7 až 1,2 ml min<sup>-1</sup>) a poměry obou složek mobilní fáze, aby byly získány ostré a symetrické píky s rozlišením na základní linii. Optimální průtok byl 1,0 ml min<sup>-1</sup>, optimální poměr acetonitril – voda (65:35 v/v). Eluční pořadí bylo PEA, AP, MA, p-OHAP, p-OHMA, píky byly ostré, symetrické a s přijatelným rozlišením (obr. 1).

### Optimalizace podmínek izolace a derivatizace

Cílem práce bylo zkrátit čas potřebný pro přípravu vzorků. Přínos změn podmínek byl indikován velikostí ploch píků, větší plocha znamenala větší výtěžek izolace a derivatizace. První zlepšení výtěžku bylo dosaženo zvýšením objemu derivatizačního činidla z 0,5 ml na 1,0 ml a změnou jeho poměru ve směsi s uhlíčanovým pufrům pH 9,0 z původních 2:3 na 1:1. Vlivy teploty a doby derivatizace (40 až 90 °C; 5, 10, 15, 30 a 45 min) byly sledovány na dvou vybraných APs: MA a AP. Jak lze předpokládat, nižší teplota vyžaduje delší čas derivatizace. Optimální teplota byla 75 °C, při reakčních časech 10 a 15 min se plochy píků prakticky nelišily. Z toho vyplývá, že derivatizační reakce dosáhla maxima již po 10 min. Derivatizace při vyšších teplotách, zvláště při 90 °C, byla provázena řadou problémů způsobených těkavostí rozpouštědla, které vedly k nízké reprodukovatelnosti výsledků. Závislost plochy píku MA na čase derivatizace při různých teplotách zachycuje obr. 2; chování AP bylo obdobné, z toho lze usuzovat na stejné chování ostatních APs. V této práci použitý acetonitril jako médium při dansylaci umožňuje vyšší teploty inkubace, což zkracuje reakční dobu<sup>13,14</sup>. Naše metoda, která kombinuje SPE extrakci s dansylací, redukuje inkubaci na 10 min ve srovnání s 2 h potřebnými pro současnou deproteinaci s dansylací v médiu na bázi acetonu<sup>11</sup>.



Obr. 2. Vztah plochy píku MA a inkubační doby při různých teplotách; ◆ 40 °C, □ 50 °C, ■ 60 °C, ○ 75 °C, ▲ 90 °C

### Validace

Limit detekce (LOD) a limit kvantifikace (LOQ) byly stanoveny analýzou vzorků modelové moči se snižující se koncentrací APs. Koncentrace na úrovni LOD resp. LOQ poskytovala signál třikrát resp. desetkrát vyšší než šum základní linie. Námi zjištěné hodnoty korespondují s hodnotami metody stanovení dansylových APs ve slinách<sup>18</sup>. V porovnání s některými LC-MS detekcemi<sup>8</sup> je naše metoda dokonce citlivější. Linearita byla demonstrována korelačním koeficientem z lineární regrese závislosti plochy píků na koncentraci na 6 úrovních mezi LOQ a 500 ng ml<sup>-1</sup> pro MA a AP; resp. mezi LOQ a 100 ng ml<sup>-1</sup> pro p-OHMA, p-OHAP. Správnost vyjádřená jako výtěžnost byla vypočítána z výsledků tří nezávislých SPE extrakcí modelové moči ve srovnání s výsledky standardních roztoků derivatizovaných přímo v hnědých vialkách, aby byl vyloučen vliv světla. Koncentrační úrovně pro stano-

Tabulka I

Validační parametry stanovení MA, AP, p-OHAP a p-OHMA v moči pomocí HPLC s fluorescenční detekcí

Parametr	MA	AP	p-OHAP	p-OHMA
LOD/LOQ, ng ml <sup>-1</sup>	1/3	2/5	4/12	5/15
Linearita	5–500 ng ml <sup>-1</sup> ; $r^2 = 0,998$	5–500 ng ml <sup>-1</sup> ; $r^2 = 0,997$	15–100 ng ml <sup>-1</sup> ; $r^2 = 0,996$	15–100 ng ml <sup>-1</sup> ; $r^2 = 0,993$
Výtěžnost, %	5/500 ng ml <sup>-1</sup> 81/96	5/500 ng ml <sup>-1</sup> 71/83	15/100 ng ml <sup>-1</sup> 64/75	15/100 ng ml <sup>-1</sup> 60/71
Opakovatelnost (RSD %)	5/500 ng ml <sup>-1</sup> 7,1/0,3	5/500 ng ml <sup>-1</sup> 7,9/0,8	15/100 ng ml <sup>-1</sup> 11,2/2,8	15/100 ng ml <sup>-1</sup> 9,7/3,5
Reprodukovatelnost (RSD %)	5/500 ng ml <sup>-1</sup> 9,3/1,2	5/500 ng ml <sup>-1</sup> 11,4/3,7	15/100 ng ml <sup>-1</sup> 14,2/7,8	15/100 ng ml <sup>-1</sup> 16,0/8,6

vení výtěžnosti byly 5 a 500 ng ml<sup>-1</sup> pro MA a AP; resp. 15 a 100 ng ml<sup>-1</sup> pro p-OHAP a p-OHMA. Opakovatelnost v rámci jednoho dne byla určena jako relativní směrodatná odchylka z šesti měření ve stejný den a na stejných koncentračních úrovních jako správnost. Měřením vzorků ve dvou různých dnech byla určena reprodukovatelnost. Získané hodnoty validačních parametrů jsou shrnuty v tab. I. Selektivita je schopnost metody odlišit analyt v přítomnosti jiných složek vzorku. Pro tento účel byl nastříknut též blank modelové moči bez přídavku APs, který byl připraven pro analýzu stejným způsobem, jako modelové vzorky moči s APs. Ze srovnání chromatogramů vyplývá, že píky z blanku neinterferují s píky sledovaných APs (obr. 1). Stabilita standardů a derivatizovaných vzorků byla zjišťována opakovanými analýzami. Při uchovávání v temnu a při 4 °C byly zásobní standardní roztoky stále minimálně 1 měsíc. Po tuto dobu byly dosaženy prakticky stejné výsledky (RSD menší než 1,0 %), což odpovídá údajům v literatuře<sup>18</sup>. Dansylované vzorky moči po SPE izolaci byly uchovávány v autosampleru při 15 °C a dávkovány na kolonu každé 4 h po dobu 24 h. Opět byly dosaženy prakticky stejné výsledky (RSD menší než 2,0 %). Stabilita vzorků uchovávaných v temnu při 15 °C byla tedy uspokojující po dobu minimálně 24 h.

## Závěr

Popsaná metoda umožňuje stanovení methamfetaminu a jeho metabolitů v moči pomocí HPLC s fluorescenční detekcí. Byly navrženy a validovány optimální chromatografické podmínky a postup pro přípravu vzorků, zahrnující extrakci na pevné fázi se současnou derivatizací dansylchloridem. Spojením těchto dvou kroků a zvýšením inkubační teploty na 75 °C byla výrazně zkrácena příprava vzorku, a tím i doba analýzy. V rámci testovaných validačních parametrů byla ověřena linearita, výtěžnost, opakovatelnost, reprodukovatelnost a selektivita pro všechny testované látky. Nalezené limity detekce a kvantifikace jsou srovnatelné s údaji v literatuře a v některých případech je vyvinutá metoda citlivější než metody využívající LC-MS.

## LITERATURA

1. Bečková I., Višňovský P., Fisherová M.: *Farmakologie drogových závislostí*. Karolinum, Praha 1999.
2. Riedl O., Vondráček V., Baštecký J., Filip V., Herink J., Kornalík F., Nečas O., Skála J., Šula J., Tesal J., Vinař O.: *Klinická toxikologie*. Avicenum, Praha 1980.
3. Sato M.: *Psychopharmacol. Bull* 22, 751 (1986).
4. Endo M., Imanichi H., Moriyasu M., Hashimoto Y.: *J. Chromatogr.* 196, 334 (1980).
5. Chou Ch-Ch., Lee M-R.: *Anal. Chim. Acta* 538, 45 (2005).
6. Katagi M., Nishioka H., Nakajima K., Tsuchihashi H., Fujima H., Wada H., Nakamura K., Makino K.: *J. Chromatogr., B* 676, 35 (1996).
7. Kudo K., Tsuchihashi H., Ikeda N.: *Anal. Chim. Acta* 492, 83 (2003).
8. Lua A.C., Sutono Y., Chou T-Y.: *Anal. Chim. Acta* 576, 50 (2006).
9. Miki A., Katagi M., Tsuchihashi H.: *Proceedings of the 121<sup>st</sup> Annual Meeting of the Pharmaceutical Society of Japan*, 4, str. 171. Sapporo 2001.
10. Herráez-Hernández R., Falcó P.C., Díaz-Oltra S.: *Chromatographia* 49, 266 (1999).
11. Wang T.K., Fuh M. S.: *J. Chromatogr., B* 686, 285 (1996).
12. Faist V., Drusch S., Kiesner Ch., Elmadfa I., Erbersdobler H. F.: *Int. Dairy J.* 10, 339 (2000).
13. Kang X., Xiao J., Huang X., Gu Z.: *Clin. Chim. Acta* 366, 352 (2006).
14. Maraschiello C., Miranda E., Millán E., Floriano P., Vilageliu J.: *J. Chromatogr., B* 791, 1 (2003).
15. Zhang L., Wang R., Yu Y., Zhang Y.: *J. Chromatogr., B* 857, 130 (2007).
16. Meng L., Wang B., Luo F., Shen G., Wang Z., Guo M.: *Forensic Sci. Int.* 209, 42 (2011).
17. Mancinelli R., Gentili S., Giuducci M. S., Macchia T.: *J. Chromatogr., B* 735, 243 (1999).
18. Concheiro M., Castro A., Quintela O., Lopéz-Rivadulla M., Cruz A.: *Forensic Sci. Int.* 150, 221 (2005).

**P. Pilařová, P. Kastner, and J. Klimeš** (*Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control, Charles University, Faculty of Pharmacy, Hradec Králové*): **Determination of Amphetamine and Methamphetamine And Their 4-Hydroxy Derivatives by HPLC with Fluorescence Detection**

A rapid, sensitive and low-cost method for the determination of methamphetamine and its metabolites in urine was developed. The tested substances were isolated by SPE, dansylated and analyzed by HPLC with fluorescence detection. The method was validated, the limit of detection for methamphetamine was lower than 1 ng ml<sup>-1</sup>; the limit of quantitation was 3 ng ml<sup>-1</sup>.