

mgr farm. Artur Teżyk

**Ocena przydatności analizy amfetaminy i jej metabolitu w opiniodawstwie sądowo-
lekarskim**

Rozprawa na stopień naukowy doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki medyczne

Promotor: prof. dr hab. n. med. Roman Wachowiak



Kolegium Nauk Medycznych
Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Poznań, 2021

Słowa kluczowe: amfetamina, enancjomery, 4-hydroksyamfetamina, metabolizm, farmakokinetyka, HPLC MS/MS

Keywords: amphetamine, enantiomers, 4-hydroxyamphetamine, metabolism, pharmacokinetics, HPLC MS/MS

Podziękowania

*Składam serdeczne podziękowania
Panu Promotorowi prof. dr hab.
n. med. Romanowi Wachowiakowi
za życzliwą pomoc i opiekę naukową
oraz cenne wskazówki merytoryczne
przy wykonywaniu pracy.*

oraz

*Kierownikowi Panu dr hab.
Czesławowi Żabie
i Panu prof. dr hab. Zygmuntowi
Przybylskiemu za umożliwienie
wykonania pracy w Zakładzie
Medycyny Sądowej*

Serdecznie dziękuje

*Mojej Rodzinie za nieskończoną
cierpliwość*

*Pani dr Karinie Sommerfeld - Klatta
za nieocenioną pomoc podczas
wykonywania pracy*

*Panu dr hab. Michałowi Romańskiemu
za nieocenioną pomoc w zakresie
analizy farmakokinetycznej*

*Koleżankom i Kolegom z Zakładu
Medycyny Sądowej za życzliwą
atmosferę*

Spis treści

Spis skrótów	7
Wstęp.....	10
1. Amfetamina.....	13
1.1 Właściwości fizykochemiczne amfetaminy	15
1.2 Metabolizm i farmakokinetyka amfetaminy.....	16
1.3 Metabolizm i metabolity amfetaminy jako markery konsumpcji.....	23
1.4 Analiza chiralna.....	26
1.5 Amfetamina w dowodach rzeczowych.....	31
1.6 Dotychczasowe wykorzystanie metabolizmu amfetaminy w badaniach sądowych.....	33
2. Cel pracy	34
3. Materiał i metody	36
3.1 Aparatura i sprzęt laboratoryjny	36
3.2. Odczynniki	36
3.3. Roztwory podstawowe i wzorcowe i bufory stosowane w badaniach	38
3.3.1 Rozwór wzorca wewnętrznego IS w metodzie HPLC-MS/MS	38
3.3.2 Roztwory podstawowe 4-OH-AMF, S (+) AMF i R (-) AMF	38
3.3.3. Bufor PBS.....	38
3.3.4 Bufor octanowy o pH 5,2	38
3.3.5 Krew pełna	38
3.3.6 Roztwór amfetaminy w buforze PBS do podania dożołądkowego	39
3.3.7 Faza ruchoma do metody oznaczenia 4-OH-AMF.....	39
3.3.8 Faza ruchoma do oznaczenia enancjomerów amfetaminy	39
3.3.9 Roztwór octanu amonu.....	39
3.4. Materiał badawczy	39
3.5. Metody badawcze.....	40
3.6. Analiza jakościowo-ilościowa dowodów rzeczowych	40
3.7. Metody HPLC-MS/MS oznaczania enancjomerów amfetaminy i 4- hydroksyamfetaminy	42
3.7.1. Metoda oznaczania 4-OH-AMF	42
3.7.2. Metoda oznaczania enancjomerów amfetaminy.....	43
3.7.3. Izolacja enancjomerów amfetaminy i 4-hydroksyamfetaminy z krwi i z osocza.....	44
3.8. Walidacja metod oznaczania enancjomerów amfetaminy i 4- hydroksyamfetaminy	45
3.8.1 Selektywność.....	45
3.8.2 Liniiowość	45
3.8.3 Limit wykrywalności i oznaczalności	45
3.8.4 Precyzja i dokładność	46
3.9. Procedura wykonania doświadczeń na zwierzętach.....	47

3.9.1.	Podawanie roztworu amfetaminy, pobrania krwi i oznaczenie amfetaminy i metabolitu.....	47
3.9.2.	Analiza farmakokinetyczna AMF i 4-OH-AMF	48
3.10.	Analiza poziomu enancjomerów amfetaminy oraz 4-OH- AMF we krwi ludzkiej	49
3.11.	Ocena statystyczna	49
Wyniki badań		51
4.1	Oznaczanie 4-OH-AMF oraz enancjomerów amfetaminy metodą HPLC-MS/MS	51
4.1.1.	Selektywność.....	51
4.1.2.	Liniowość	54
4.1.3	LOD i LOQ	54
4.1.4.	Precyzja i dokładność	55
4.1.5.	Odzysk i efekt matrycowy.....	56
4.2.	Wynik badania materiału dowodowego	57
4.3.	Wynik badania osocza szczurów po podaniu amfetaminy oraz ustalenie parametrów farmakokinetycznych.	59
4.3	Wyniki badania krwi na zawartość enancjomerów amfetaminy oraz 4-OH-AMF	63
4.4.	Ocena statystyczna wyników badań materiału dowodowego oraz biologicznego.	67
5.	Dyskusja.....	75
6.	Wnioski	81
7.	Streszczenie.....	83
8.	Summary	84
9.	Bibliografia	86
10.	Spis tabel	92
11.	Spis rycin.....	93
Załącznik nr 1		95
Załącznik nr 2.....		96

Spis skrótów

4-OH-AMF	4-hydroksyamfetamina
4-OH-MAF	4-hydroksymetamfetamina
λ	stała szybkości terminalnej fazy eliminacji
ADHD	zespół nadpobudliwości psychoruchowej z deficytem uwagi (Attention Deficit Hyperactivity Disorder)
AUC	pole powierzchni pod krzywą
BSTFA	N,O-bis-(trimetylosililo)-trifluoracetamid
Cl_{ren}	klirens nerkowy
Cl_{tot}	klirens ogólnoustrojowy
Cl_{NR}	klirens pozanerkowy
Cl/F	klirens pozorny
C_{max}	maksymalne stężenie leku (związku) w osoczu lub innym płynie ustrojowym
CV	współczynnik zmienności (coefficient of variation)
DRUID	Prowadzenie pod wpływem środków odurzających, leków i alkoholu (Driving under influence of drugs alcohol and medicines)
EMA	Europejska Agencja Leków (European Medicines Agency)
EMCDDA	Europejskie Centrum Monitorowania Narkotyków i Narkomanii (European Monitoring Center for Drugs and Drug Addiction)
f_b	frakcja związana z białkami
F	bezwzględna biodostępność leku
(+) FLEC	chlorek kwasu (+) – 1 - (9-fluorenylo) etylomrówkowego
GC-MS	chromatografia gazowa z detekcją w postaci spektrometrii mas
GC-NCI-MS	chromatografia gazowa z detekcją w postaci spektrometrii mas z negatywną chemiczną jonizacją
HILIC	chromatografia oddziaływań hydrofilowych (Hydrophilic interaction liquid chromatography),
HPLC	wysokosprawna chromatografia cieczowa
HPLC-UV	- z detekcją w świetle nadfioletowym
HPLC-DAD	- z detekcją spektrofotometryczną z szeregiem diod
HPLC-ESI-MS/MS	- z detekcją tandemowej spektrometrii mas ze źródłem jonizacji typu elektrosprej
HPLC-HRMS	- z detekcją w postaci wysokorozdzielczej spektrometrii mas

HMMA	4-hydroksy-3-metoksymetamfetamina
IS	wzorzec wewnętrzny
k₁₀	stała szybkości eliminacji leku z kompartmentu centralnego
k₁₂	stała szybkości dystrybucji leku z kompartmentu centralnego do tkankowego
k₂₁	stała szybkości dystrybucji leku z kompartmentu tkankowego do centralnego
k_a	stała szybkości absorpcji
k_e	stała szybkości eliminacji
k_m	stała szybkości eliminacji na drodze metabolicznej
k_{e, rest.}	stała szybkości eliminacji na drodze niemetabolicznej
MATE	czynnik wyparcia (Multidrug and Toxins Extrusion)
MDMA	(±) 3,4-metylenodioksymetamfetamina
ME	efekt matrycowy
MRM	monitorowanie poszczególnych przejść (Multi reaction monitoring)
MRT	średni czas przebywania leku w ustroju (Mean retention time)
NPD	detektor azotowo - fosforowy
OCT	transporter kationów organicznych (Organic Cation Transporters)
OUN	ośrodkowy układ nerwowy
PBS	roztwór chlorków (NaCl i KCl) buforowany fosforanami (KH ₂ PO ₄ i Na ₂ HPO ₄)
r²	współczynnik korelacji
R-MTPCI	chlorek kwasu R-(-) - α -metoksy- α -(trifluoroacetylo) fenylooctowego
SD	odchylenie standardowe (standard deviation)
SIM	monitorowanie wybranego jonu (Selected ion monitoring)
SPE	ekstrakcja do fazy stałej (solid phase extraction)
S-TPC	chlorek S-(-)-N-(trifluoroacetylo) pirolidyno-2-karbonylu
S-HFBPCI	chlorek S-(-)-N-(trifluorobutylo) pirolidyno-2-karbonylu
t_{1/2}	biologiczny okres półtrwania
T_{lag}	opóźnienie czasu wchłaniania
T_{max}	czas wystąpienia maksymalnego stężenia w osoczu lub innym płynie ustrojowym
TMCS	trimetylochlorosilan
UNDOC	Biuro Narodów Zjednoczonych ds. Narkotyków i Przestępczości (United Nations Office on Drugs and Crime)
V_d	objętość dystrybucji

V_{ss}	objętość dystrybucji w stanie stacjonarnym
V_z/F	pozorna objętość dystrybucji

Wstęp

Problem rozpowszechnienia i używania środków psychoaktywnych, w tym amfetaminy, wśród kierowców na terenie Polski w chwili obecnej jest mało poznany. Kierowanie pojazdem w stanie nietrzeźwości lub pod wpływem środka odurzającego stanowi przestępstwo z art. 178a Kodeksu Karnego. Prowadzenie pojazdu w stanie po użyciu alkoholu bądź podobnie działającego środka stanowi wykroczenie z art. 87 Kodeksu Wykroczeń. Te same akty prawne dotyczą zarówno środków psychoaktywnych jak i alkoholu etylowego. Udostępnione przez Komendę Główną Policji dane dotyczą przede wszystkim liczby wszczętych postępowań z artykułu 178a Kodeksu Karnego i nie precyzują, czy przestępstwo dotyczyło kierowania pod wpływem alkoholu czy innego środka. Przykładowo w 2020 roku liczba wszczętych w Polsce postępowań wyniosła ponad 50 tysięcy [1].

Kluczowe w tym temacie są wyniki badań z lat 2006-2011 prowadzone w ramach VI Programu Ramowego Komisji Europejskiej tzw. DRUID (z ang. Driving under influence of drugs, alcohol and medicines), którego celem była kompleksowa ocena ryzyka używania najczęściej spotykanych substancji psychoaktywnych dla bezpieczeństwa ruchu drogowego. Raport końcowy (z sierpnia 2012 r.) zawierał wyniki badań epidemiologicznych 48545 kierowców, losowo poddanych kontroli w 13 krajach (w tym 4003 osób w Polsce), w tym 2492 prowadzących pojazdy, którzy odnieśli ciężkie obrażenia w wypadkach drogowych (dane z 6 krajów). Zgodnie z przedstawionymi wynikami rozpowszechnienie amfetaminy jako znanego powszechnie środka psychostymulującego, wśród kierowców w Polsce wynosiło 0,05 % wobec średniej europejskiej wynoszącej 0,08 % [2].

Dane Europejskiego Centrum Monitorowania Narkotyków i Narkomanii (EMCDDA, z ang. European Monitoring Center for Drugs and Drug Addiction) szacują, że w latach 2015 – 2020 w 25 krajach 1,4 miliona dorosłych (15 – 34 lata) w ciągu ostatniego roku używało amfetaminy. Szacunkowe dane dla Polski wskazują, że 1,4 % populacji w tym przedziale wiekowym w ciągu ostatniego roku zażyło amfetaminę, a u 2,4 % osób w wieku od 15 do 64 r.ż. potwierdzono jej użycie w ciągu całego życia. Ustalono, że rekreacyjnie 3 % młodzieży szkolnej (13 – 16 lat) w okresie całego życia przynajmniej raz zażyło amfetaminę [3].

Kazuistyka Zakładu Medycyny Sądowej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego z lat 2010 - 2020 wskazuje na wzrastającą z roku na rok liczbę przestępstw (głównie przeciwko bezpieczeństwu komunikacji, przestępstw przeciwko mieniu oraz przeciwko wolności seksualnej) z udziałem środków odurzających i psychotropowych. W samym roku 2020 na 1717 spraw, w których analizowano materiał biologiczny na zawartość substancji psychoaktywnych pochodne amfetaminy stwierdzono 238 razy (13,8 %).

Jednym z podstawowych zadań toksykologa sądowego jest oznaczenie poziomu środka odurzającego w materiale biologicznym, interpretacja uzyskanego wyniku i odpowiedź na dodatkowe problemowe pytania zadane przez organ zlecający. Podstawowe pytanie, które stawiane jest biegłemu w sprawach prowadzenia pojazdów pod wpływem substancji psychoaktywnej dotyczy określenia stopnia w jakim oznaczona we krwi substancja upośledza funkcje ośrodkowego układu nerwowego (OUN). Stwierdzone oddziaływania wybranego środka w odniesieniu do skali porównawczej oddziaływania alkoholu na OUN aktualnie jest podstawą kwalifikacji prawnej czynu tj. wskazania na przestępstwo, wykroczenie lub wykluczenie wpływu. Pomimo wielu badań dotyczących wpływu amfetaminy na organizm człowieka do dziś nie udało się w sposób jednoznaczny ustalić poziomu referencyjnego we krwi, któremu można by przypisać kategorycznie określone oddziaływanie obniżające sprawność psychomotoryczną kierowcy [2].

Biegły często w przebiegu postępowań przygotowawczych czy sądowych proszony jest o interpretację oznaczonego stężenia w kontekście deklarowanej zażytej dawki, czasu zażycia czy drogi przyjęcia lub podania. W większości przypadków powyższe dane pozostają nieznane bądź celowo są zniekształcane przez osobę badaną (zwłaszcza w odniesieniu do czasu zażycia substancji). Obiektywne ustalenie czasu ekspozycji czy częstości zażywania może niejednokrotnie dostarczyć wartościowych informacji dotyczących wpływu oznaczonej substancji na przebieg danego zdarzenia. Równie często z uwagi na różnicę czasową pomiędzy zdarzeniem a pobraniem krwi pada pytanie o stężenie substancji psychoaktywnej w chwili zdarzenia, z możliwością przeprowadzenia korekty retrospektywnej.

W opublikowanym w 1992 roku cyklu prac Huestis i wsp. zostały zaproponowane modele matematyczne określania czasu zażycia substancji psychoaktywnych na przykładzie przetworów ziela konopi indyjskiej w tym poziomu Δ^9 -tetrahydrokanabinolu oraz stosunku jego stężenia do stężenia metabolitu – kwasu 11-nor-9-karboksy- Δ^9 -tetrahydrokanabinolowego we krwi [4] [5]. W roku 2008 Jenkins i Cone użyli modeli matematycznych opracowanych przez Huestis do szacowania czasu zażycia heroiny [6]. Niestety poza wymienionymi brakuje opracowań dotyczących możliwości określenia czasu zażycia innych często spotykanych w kazuistyce toksykologicznej substancji takich jak amfetamina i jej pochodne.

Mimo faktu, że amfetamina, która została zsyntezowana po raz pierwszy w 1887 roku a weszła do użytku w roku 1932 jest jedną z najbardziej poznanych substancji w praktycznej farmakologii to wciąż na wiele pytań brakuje odpowiedzi. Ze względu na aktualnie częste występowanie amfetaminy w bieżących sprawach bardzo istotną z punktu widzenia medyczno-prawnego wydaje się możliwość permanentnego zwiększenia zakresu informacji

jakie można uzyskać podczas badania toksykologicznego próbki krwi, dla celów opiniodawczych. Zatem w hipotezie badawczej niniejszej pracy założono, że prezentowane wyniki będą stanowić próbę odpowiedzi na wątpliwości.

1. Amfetamina

Amfetamina jest aminą sympatykomimetyczną, która po zażyciu wzmacnia wydzielanie noradrenaliny, dopaminy i serotoniny oraz hamuje ich wchłanianie zwrotne do zakończeń synaptycznych. Typowe efekty intoksykacji w ostrej fazie to euforia, poprawa koncentracji i skupienia uwagi, zmniejszenie senności i znużenia, poprawa zdolności psychomotorycznych, pobudzenie psychoruchowe oraz zmniejszenie apetytu. Ze wzrostem dawki rośnie ryzyko działania toksycznego i zgonu w wyniku zawału mięśnia sercowego, udaru krwotocznego lub niedokrwienego czy hipertermii. Faza ostra lub euforyczna trwa około 6 godzin po czym przechodzi w fazę poeuforyczną lub dysforyczną (zwana potocznie „zjazdem”), która charakteryzuje się zmęczeniem, spadkiem koncentracji, sennością i depresyjnym nastrojem.

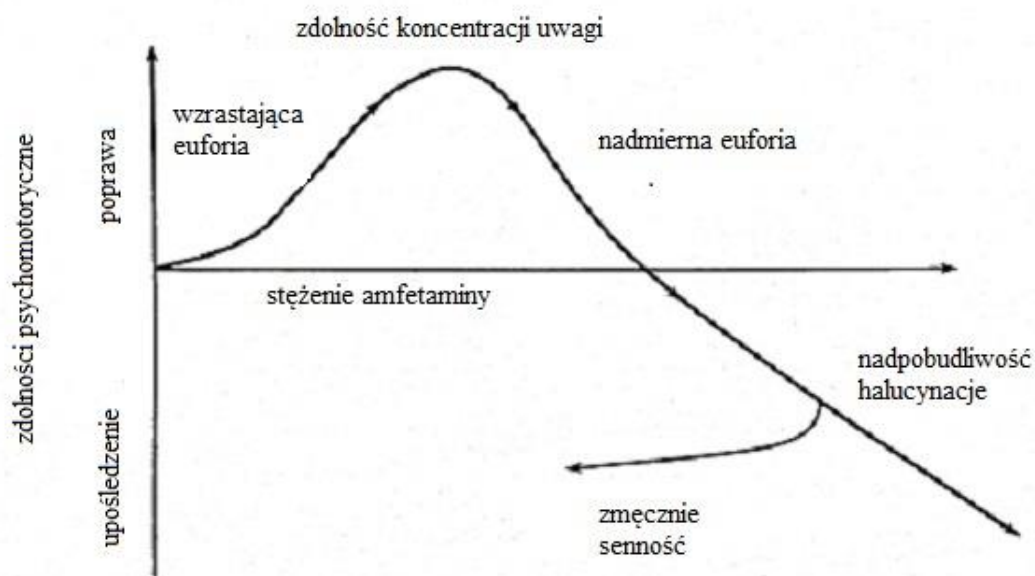
Negatywne efekty działania amfetaminy obserwowane u kierowców to przede wszystkim zaburzenia uwagi z tendencją do nerwowych zachowań, poczucie dezorientacji, zaburzenia koordynacji, upośledzona zdolność prawidłowej kontroli pojazdu, agresywna i niebezpieczna jazda, podejmowanie niepotrzebnego ryzyka, przecena własnych możliwości, zmęczenie i senność w fazie dysforycznej. W innym ujęciu efekty działania amfetaminy istotne z punktu widzenia bezpieczeństwa prowadzenia pojazdu można zgrupować w trzech kategoriach [7].

Tabela 1. Efekty zażycia amfetaminy [7].

Pożądane efekty fazy euforycznej	Niepożądane efekty fazy euforycznej	Niepożądane efekty fazy dysforycznej
Poprawa funkcji psychomotorycznych (skupienie i uwaga)	Wzrost ciśnienia krwi	Zmęczenie
Poprawa możliwości komunikacji	Tachykardia	Senność
Odhamowanie	Rozszerzenie źrenic i spowolnienie reakcji źrenic na światło	Drażliwość
Poprawa percepcji otoczenia	Wzrost temperatury ciała	Wyczerpanie psychiczne i fizyczne
Gotowość do podejmowania ryzykownych działań	Wzrost napięcia mięśni	Depresyjny nastrój
Rozszerzona świadomość	Splątanie	Utrata zdolności koncentracji i skupienia uwagi
Wzrost pewności siebie	Stany lękowe	Apatia
	Stany psychotyczne	
	Zaburzenia koncentracji i uwagi	
	Nudności i wymioty	
	Bóle głowy	

Z analizy dostępnego piśmiennictwa wynika, że pomiędzy poziomem amfetaminy a jej oddziaływaniem na OUN występuje skomplikowana zależność, gdzie początkowo, korzystny

wpływ na zdolności psychomotoryczne jest zastępowany kolejną fazą upośledzania w późniejszym okresie [8].



Ryc. 1 Zależność pomiędzy stężeniem amfetaminy a wpływem na funkcje psychomotoryczne [8].

W badaniach oceniających wpływ amfetaminy na funkcje ośrodkowego układu nerwowego z udziałem probantów stosowano dawki, które nie przekraczały 40 mg. Takie dawki skutkowały stężeniem maksymalnym (C_{max}) we krwi na poziomie 100 – 150 ng/ml. W prowadzonych badaniach nie stwierdzono natomiast zależności między stopniem oddziaływania a poziomem narkotyku we krwi [9, 10, 11]. Zastrzeżeniem do wyników powyższych badań jest fakt, że w rzeczywistości dawki amfetaminy przyjmowane przez rekreacyjnych biorców są wielokrotnie większe tj. 50 – 300 mg lub wyższe. Zatem wysokie dawki i częste zażywanie amfetaminy mogą wywoływać dużo bardziej zróżnicowaną odpowiedź spowodowaną wielokierunkowymi zmianami neurochemicznymi [12]. Jednak ze względu na przeciwwskazania natury etycznej nie jest możliwe przeprowadzenie badań na osobach nadużywających amfetaminę w wysokich dawkach.

W Norwegii badaniom poddano kierowców zatrzymanych za jazdę pod wpływem amfetaminy i/lub metamfetaminy i wskazano na istotną zależność między stężeniem we krwi a stopniem upośledzenia do tzw. efektu pułapowego dla przedziału 270 – 530 ng/ml. Zastrzeżeniem do uzyskanych wyników był fakt, że badania przeprowadzono na grupie kierowców zatrzymanych z powodu widocznego zewnętrznie upośledzenia funkcji OUN [13]. W opozycji do badań norweskich wyniki szwedzkich autorów wskazywały na brak zależności między wyznaczanym stężeniem amfetaminy a stopniem upośledzenia zdolności psychomotorycznych [14]. W kolejnym opracowaniu autorów norweskich zasugerowano już tylko najniższy poziom amfetaminy wynoszący 41 ng/ml jako stężenie, powyżej którego

obserwowano upośledzenie funkcji OUN, jednak z uwagi na sprzeczne dane nie zasugerowano obowiązujących prawnych limitów interpretacyjnych [15].

Opinie co do interpretacji stanu osoby, która kieruje pod wpływem amfetaminy i innych stymulantów stanowią trudny element pracy toksykologa, bowiem sam wynik badania krwi z określeniem poziomu amfetaminy nie pozwala na ustalenie czy w chwili zdarzenia występowały pożądane, pozytywne efekty działania amfetaminy (ograniczone czasowo), które mogły poprawiać zdolności psychomotoryczne, zwłaszcza u osób zmęczonych. Alternatywnie należy rozważyć występowanie niepożądanych efektów fazy euforycznej, które mogą manifestować się jako nieoczekiwane objawy sedatywne. Dodatkowo, efekty fazy poeuforycznej, senność i wyczerpanie, których należy spodziewać się przy niskich stężeniach narkotyku mogą również wystąpić przy wysokich jego poziomach we krwi, często obserwowanych po wielokrotnym, chronicznym zażywaniu amfetaminy. Uwzględniając tak skomplikowane, wieloprofilowe relacje oddziaływań, niektórzy autorzy wskazują, że ustalenie, prostej naukowej interpretacji zależności tj. „stężenie amfetaminy we krwi – efekt działania” jest praktycznie niemożliwe i pozostaje otwartym problemem [7].

1.1 Właściwości fizykochemiczne amfetaminy

Amfetamina - ($\pm$) 1- fenylopropano-2-amina jest związkiem syntetycznym posiadającym w położeniu 2 chiralny atom węgla przez co tworzy mieszaninę racemiczną złożoną z dwóch stereoizomerów - prawoskrętnej (2S) - (+) - 1-fenylo-2-aminopropanu (dextroamfetamina lub D-amfetamina) i lewoskrętnej (2R) - (-) - 1-fenylo-2-aminopropanu (lewoamfetamina lub L-amfetamina).



Ryc. 2 Struktura chemiczna enancjomerów amfetaminy (modyfikacja własna).

Amfetamina o wzorze sumarycznym $C_9H_{13}N$ jako wolna zasada o pK_a 9.9 jest bezbarwną, lotną cieczą o charakterystycznym, nieprzyjemnym zapachu (psujących się ryb) i temperaturze wrzenia $200-203^\circ C$ oraz gęstości $0,913\text{ g/ml}$. Rozpuszcza się w wodzie, etanolu, chloroformie i eterze oraz w kwasach. Najczęściej spotyka się ją w postaci soli: siarczanu $(C_9H_{13}N)_2 \cdot H_2SO_4$, fosforanu $C_9H_{13}N \cdot H_3PO_4$ oraz chlorowodorku $C_9H_{13}N \cdot HCl$. Sole amfetaminy dobrze rozpuszczają się w wodzie. Najpopularniejsza sól tj. siarczan występuje w

postaci proszku o barwie od białej do brązowej. Rozpuszcza się w wodzie w ilości 50 – 100 mg/ml [16].

W Polsce amfetamina należy do wykazu substancji psychotropowych grupy II-P Ustawy o przeciwdziałaniu narkomanii z 29 lipca 2005 roku z późniejszymi zmianami. W niektórych krajach tj. Stany Zjednoczone, Kanada, Szwecja, Niemcy czy Królestwo Niderlandów dopuszcza się stosowanie amfetaminy w celach medycznych, przede wszystkim w leczeniu nadpobudliwości psychoruchowej z deficytem uwagi (ADHD), narkolepsji, zaburzeniach poznawczych związanych z alkoholowym syndromem płodowym jak również jako lek zmniejszający łaknienie, mimo że jest ona substancją psychotropową o wysokim potencjale uzależnienia. Zatwierdzone przez amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków (FDA, z ang. Food and Drug Administration) niektóre preparaty zawierające amfetaminę tj. Adderall, Adderall XR, Eveko, Dexedrine i Vyvanse, dostępne są w Polsce w ramach procedury importu docelowego [17].

1.2 Metabolizm i farmakokinetyka amfetaminy

Istnieją dość ograniczone dane z zakresu absorpcji amfetaminy po jej zażyciu, a dostępne informacje dotyczą głównie różnych postaci farmaceutycznych, w jakich występuje substancja. Amfetamina podawana jest doustnie jako mieszanina racemiczna (zwykle siarczan) bądź jako czysty S (+) enancjomer. Po pojedynczej dawce doustnej amfetamina jest szybko wchłaniana, stężenie maksymalne we krwi (C_{max}) osiągane jest w ciągu czterech godzin od przyjęcia (T_{max}). Zarówno wartości AUC_{24} jak C_{max} są proporcjonalne do podanej dawki. Również wpływ czynników modyfikujących stopień dysocjacji, pK_a poprzez dodanie wodorowęglanu sodu lub chlorku amonu do mieszaniny amfetaminy nie ma znaczenia na szybkość jej absorpcji czy biodostępność. Po doustnym podaniu zarówno racemicznej amfetaminy jak również czystych enancjomerów nie odnotowano różnic w parametrach farmakokinetycznych (C_{max} , T_{max}) [18, 19, 20]. Nie stwierdzono również różnic w biodostępności amfetaminy przyjmowanej na czczo lub po posiłku. Wchłanianie amfetaminy przez błony śluzowe i jej przenikanie jest pH-zależne. Absorpcja amfetaminy podawanej przez 5 minut na błonę śluzową jamy ustnej zachodziła w 50 % w przypadku pH równego 8,16 i w 80 % dla pH wynoszącego 9,18 [21]. Nie wykazano różnic w procesie wchłaniania dla różnych gatunków biologicznych [22, 23, 24, 25].

Wiązanie amfetaminy z białkami ludzkiego osocza mieści się w zakresie 16 - 20 % i nie wykazuje zróżnicowania pomiędzy biorcami okazjonalnymi a chronicznymi w przeciwieństwie do objętości dystrybucji (V_d), która dla chronicznych wynosi 6,1 l/kg a dla biorców okazjonalnych od 3,5 do 4,6 l/kg. Zróżnicowana objętość dystrybucji niezależnie od osobniczych różnic tłumaczona jest większym powinowactwem do tkanek w przypadku

biorców z rozwiniętą tolerancją. Sugeruje się możliwość kumulacji amfetaminy w kompartmentcie tkankowym w przypadku biorców chronicznych. Dla uzależnionych biorców obserwuje się również wydłużony czas biologicznego półtrwania $t_{1/2}$, który po doustnej dawce 25 mg wynosi $21,8 \pm 1,4$ h a w przypadku okazjonalnego biorcy $13,9 \pm 3,4$ h, niezależnie od spodziewanego efektu indukcji enzymatycznej. Jeżeli chodzi o enancjomery amfetaminy to nie stwierdzono istotnych różnic w przypadku wiązania z białkami jak i objętości dystrybucji form S (+) i R (-). Obserwowany wyraźnie krótszy okres biologicznego półtrwania formy S (+) wynoszący 9,7 – 11 h w odniesieniu do wartości dla formy R (-), która mieści się w zakresie 11,5 -13,8 h, jest związany z jej intensywniejszym metabolizmem [26, 27].

W przypadku badań na zwierzętach, u szczurów, którym podawano amfetaminę wiązanie z białkami osiągało wartości do 40 %. Po podaniu dożylnym w porównaniu do człowieka nie obserwowano statystycznie istotnej różnicy w czasie biologicznego półtrwania dla poszczególnych enancjomerów, zaobserwowano natomiast istotnie większą objętość dystrybucji dla izomeru R (-). U szczura po podaniu dożylnym racemicznej amfetaminy w przeciwieństwie do człowieka obserwowano wyższe stężenie formy S (+) w osoczu i moczu [24].

Kierunki przemian metabolicznych, amfetaminy przedstawiono na rycinie 3. Amfetamina w ustroju człowieka podlega następującym przemianom metabolicznym: oksydatywnej deaminacji, N-oksydacji, hydroksylacji aromatycznej i alifatycznej. Podstawowym szlakiem metabolizmu amfetaminy u człowieka jest deaminacja do nieaktywnego fenyloacetonu. Reakcja zachodzi według dwóch mechanizmów: utlenienia węgla w pozycji α i N-oksydacji. Eksperymenty *in vitro* w wątrobie królika wykazały, że deaminacja do fenyloacetonu jest katalizowana przez izoenzymy podrodziny *CYP2C*. Wśród pochodnych N-podstawionych amfetamina wykazuje najwyższe powinowactwo do enzymu, które maleje wraz ze wzrostem wielkości podstawnika przy atomie azotu. Oksydacja węgla w pozycji α prowadzi do niestabilnej karbinoloaminy, która rozpada się do fenyloacetonu z wydzieleniem amoniaku. Szlak N-oksydacji zachodzi przy udziale izoformy 3 oksydazy flawinowej *FMO3* przez N-hydroksylację do N-hydroksyloaminy. Fenyloaceton z kolei jest utleniany do kwasu benzoesowego, który po sprzęgnięciu z glicyną tworzy kwas hipurowy. Dodatkowo fenyloaceton ulega hydroksylacji w pozycji 4 pierścienia prowadząc do 4-hydroksyfenyloacetonu [16, 23, 28].

Kolejną reakcją jest hydroksylacja pierścienia w pozycji *para*, która prowadzi do 4-hydroksyamfetaminy (4-OH-AMF), która jest następnie sprzęgana i wydalana w postaci siarczanów oraz glukuronianów. Reakcja hydroksylacji zachodzi przy udziale izoformy *CYP2D6*. Enzym ten utlenia cały szereg substratów takich jak leki przeciwbólowe, neuroleptyki, antydepresanty i opioidy. Jego gen zlokalizowany jest w długim ramieniu

chromosomu 22 i wykazuje polimorfizm. Liczba osób z wysoką aktywnością *CYP2D6* zwanych szybkimi metabolizernami oraz osób z niską aktywnością tego enzymu (wolni metabolizerny) wykazuje znaczne zróżnicowanie związane z pochodzeniem etnicznym. Wolni metabolizerny stanowią 5 – 8 % populacji białej i 2 - 10 % rasy czarnej i żółtej. W populacji Europejskiej 5 - 10 % stanowią homozygoty, które nie wykazują aktywności metabolicznej *CYP2D6*. Pośród mieszkańców Etiopii obserwuje się osoby, u których stwierdza się bardzo wysoką aktywność spowodowaną amplifikacją genu kodującego *CYP2D6*, która skutkuje ultraszybkim metabolizmem amfetaminy. Polimorfizm *CYP2D6* może być przyczyną międzyosobniczej zmienności w podatności na nadużywanie i działanie toksyczne [29, 30].

W przypadku szczura, gdzie hydroksylacja pierścienia jest głównym szlakiem metabolicznym amfetaminy zachodzi ona również przy udziale izoenzymów podrodziny *CYP2D*. Stereospecyficzny metabolizm amfetaminy u szczura bierze się prawdopodobnie z różnicy w hydroksylacji w pozycji beta lub hydroksylacji w pierścieniu, gdzie w przypadku racematu może dochodzić do konkurencyjnego hamowania reakcji formy S (+) przez formę R (-). W przypadku enancjomerów amfetaminy nie zaobserwowano chiralnej inwersji *in vitro* i *in vivo* [24, 31].

Hydroksylacja alifatyczna zachodzi w niewielkim stopniu w pozycji beta łańcucha bocznego. Reakcję katalizuje beta - hydroksylaza dopaminowa, która reaguje stereospecyficznie z formą S (+) amfetaminy prowadząc do powstania norefedryny. Norefedryna jest również hydroksylowana w pozycji p do 4-hydroksynorefedryny [32, 33].

Aktywne farmakologicznie metabolity amfetaminy tj. 4-hydroksyamfetamina i norefedryna ulegają dalszemu utlenianiu. Wymienione metabolity powstają w nieistotnych ilościach z punktu widzenia ogólnego bilansu przemian metabolicznych związku macierzystego. Amfetamina wydala się w formie norefedryny w około 2 % i 5 % przyjętej dawki, odpowiednio dla osób nieuzależnionych i uzależnionych. Natomiast 4-hydroksynorefedryna wydalana jest w przez osoby okazjonalnie przyjmujące amfetaminę w ilości około 0,3 % zażytej dawki a w przypadku chronicznych jest to około 1 %. W przypadku 4-hydroksyamfetaminy zarówno dla osób uzależnionych i nieuzależnionych ilość ta stanowi 1 - 2 % przyjętej dawki. Wymienione związki wydalone są częściowo w formie sprzężonej z kwasem glukuronowym oraz siarkowym. U szczura stosunek metabolitów amfetaminy sprzężonych do niesprzężonych wynosi 11:1 [34].

Wydalanie amfetaminy oraz biologiczny okres półtrwania we krwi uzależnione są w dużym stopniu od pH moczu, ponieważ eliminacja zachodzi głównie przez nerki. Z uwagi na fakt, że amfetamina jest słabą zasadą to wydalenie jej wzrasta wraz z zakwaszeniem moczu i maleje w przypadku jego alkalizacji. W fizjologicznym zakresie pH moczu wydalenie amfetaminy w ciągu pierwszych 24 godzin wynosi około 30 – 45 % przyjętej dawki.

W moczu alkalicznym spada do 1-4 %, a w silnie kwaśnym znacząco wzrasta do 74 % [35]. Zmiany pH moczu nie wpływają natomiast na wzajemny stosunek enancjomerów amfetaminy w moczu [36]. W eksperymencie z kontrolowanym zakwaszeniem moczu autorzy wykazali, że eliminacja amfetaminy w niekontrolowanym pH zachodzi na drodze przesączania kłębuszkowego. W przypadku kwaśnego moczu ($\text{pH } 5 \pm 0,2$ np. po podaniu chlorku amonu) obserwowano klirens amfetaminy na poziomie 400 -550 ml/min., co pozwoliło na wnioskowanie, że eliminacja do kwaśnego moczu zachodzi w innym mechanizmie niż przesączanie kłębuszkowe. Autorzy zaproponowali mechanizm dyfuzji z uwagi na wysoki gradient niejonizowanego związku [37]. Prawdopodobnie amfetamina i jej pochodne eliminowane są również na drodze aktywnego transportu w kanalikach nerkowych za pośrednictwem transporterów OCT_s (z ang. Organic Cation Transporters) i czynników wyparcia MATE (z ang. Multidrug and Toxins Extrusion) [38]. Różnice w nerkowym wydalaniu amfetaminy zależnym od pH moczu przekładają się na obserwowany okres biologicznego półtrwania. W badaniach na osobach uzależnionych wykazano, że wzrost pH moczu o jednostkę wydłuża $t_{1/2}$ amfetaminy o około 7 godzin, jednak tak znaczne zmiany pH moczu w warunkach fizjologicznych, bez przyjęcia preparatów alkalinizujących lub zakwaszających jest mało prawdopodobne [39].

Obok różnic w metabolizmie dwóch enancjomerów amfetaminy obserwuje się również różnice w ich aktywności biologicznej. Porównanie izomerów optycznych wykazało, że R (-) amfetamina jest 3,2 – 7 razy słabszym inhibitorem wychwytu zwrotnego dopaminy niż S (+) amfetamina. W przypadku wychwytu zwrotnego noradrenaliny działanie R (-) amfetaminy jest około 1,8 razy słabsze. W przypadku serotoniny uważa się, że R (-) amfetamina nie wykazuje żadnego wpływu na jej poziom. R (-) amfetamina w większym stopniu odpowiedzialna jest za obwodowe działanie między innymi na układ sercowo- naczyniowy. W badaniach *in vivo* porównujących profile farmakologiczne obu enancjomerów to ośrodkowe działanie S (+) amfetaminy jest około pięciokrotnie silniejsze od jej formy R (-) [38].

Dokonując analizy amfetaminy należy mieć świadomość, że jej obecność w płynach ustrojowych może być zarówno efektem zażycia legalnych jej preparatów, nielegalnych substancji zawierających amfetaminę oraz może być wynikiem wcześniejszego zażycia jej pochodnej, czyli metamfetaminy.

Jedną z dróg biotransformacji metamfetaminy jest N-demetylacja do amfetaminy, która zachodzi przy udziale układu CYP2D6. Demetylacja metamfetaminy zachodzi w większym stopniu dla formy S (+), przez co jako metabolit powstaje w większym stopniu S (+) amfetamina [40]. Zidentyfikowana jako analit w materiale biologicznym amfetamina może pochodzić również z przemian metabolicznych niektórych środków farmakologicznych.

Większość leków, które mogą metabolizować do amfetaminy stanowią preparaty głównie stosowane jako supresanty apetytu i psychostymulanty obecnie wycofane z rynku i najczęściej nie dopuszczone do obrotu na terenie Europy. Ze znanych i do tej pory stosowanych leków źródłem R (-) amfetaminy i R (-) metamfetaminy może być selegilina [41].

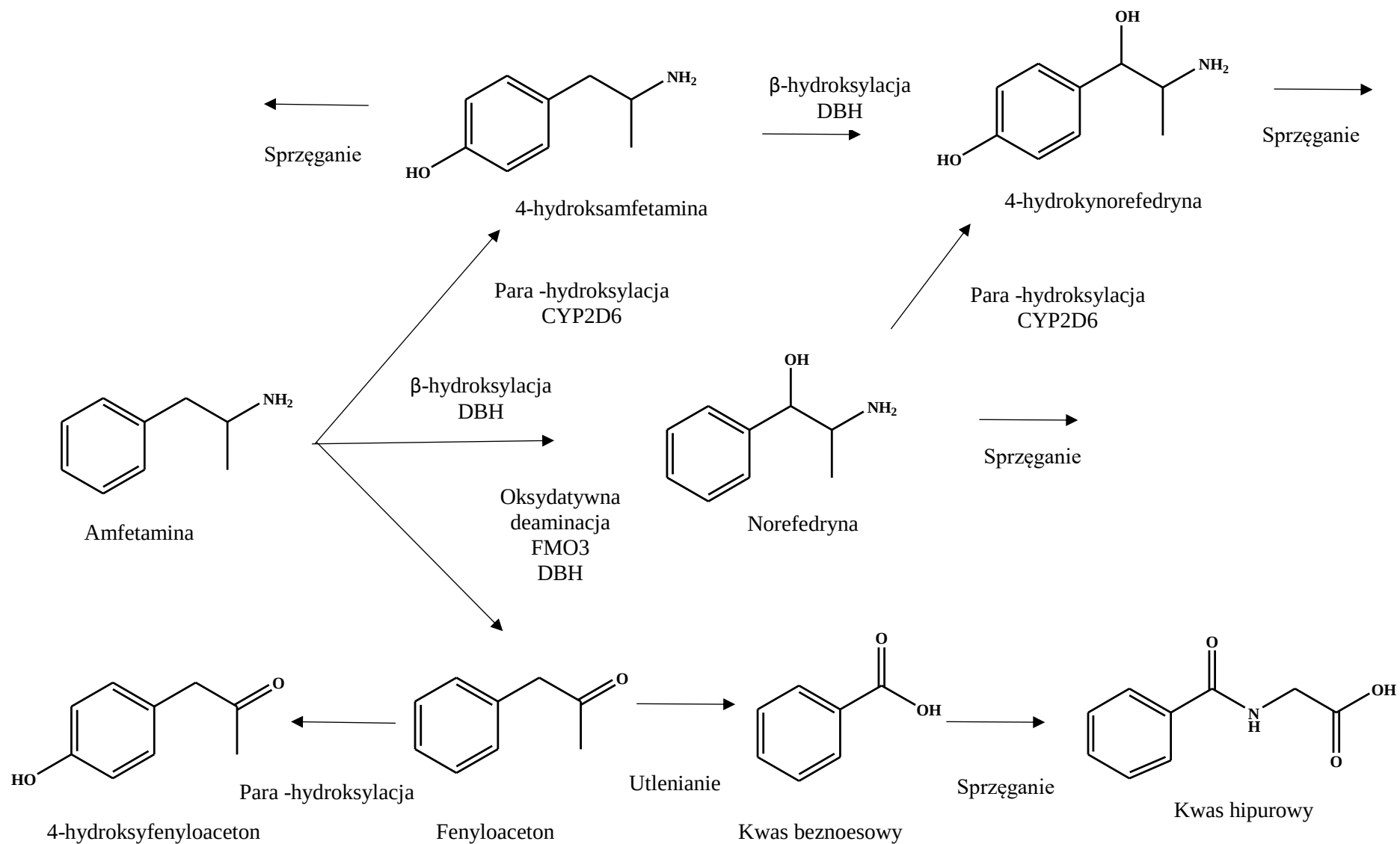
Dotychczas nieopisane potencjalne drogi przemian metabolicznych amfetaminy zostały przedstawione przez H. Schwelm po badaniach przeprowadzonych w moczu osób przyjmujący amfetaminę stereoselektywną metodą HPLC-MS/MS (z LOQ < 1 ng/ml) dla wszystkich badanych metabolitów/analitów. Wykazano, że hydroksylacja w pozycji beta w łańcuchu bocznym nie jest w pełni stereospecyficzna jak wcześniej sądzono, ponieważ obok (1R, 2S) norefedryny stwierdzono obecność (1S, 2R) norefedryny jak również produkty ich dalszego utleniania w postaci R i S katynonu. W badanych próbkach moczu zaobserwowano również metamfetaminę, której obecność przy wykluczeniu kontaminacji materiału tłumaczona jest możliwą N-metylacją amfetaminy [42]. Parametry farmakokinetyczne dla zróżnicowanych form amfetaminy przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 2. Parametry farmakokinetyczne amfetaminy u człowieka.

Dawka [mg]	Droga podania	n	Badany enancjomer	C _{max} [ng/ml]	t _{max} [h]	AUC ₂₄ [ng*h/l]	f _b [%]	V _{ss} [l]	t _{1/2β} [h]	Piśmiennictwo
20	doustna	1	racemat	36,6	3	482,5				[43]
20	doustna	1	racemat	38,8	2	431,6				
30	doustna	1	racemat	57,3	3	790,2				
30	doustna	1	racemat	57,8	2	753,1				
35	doustna	1	racemat	63,5	2	822,9				
35	doustna	1	racemat	57,5	2	758,6				
40	doustna	11	racemat	69,1±5,7	2,2±1,0	945,4±71,8				
0,25 ^a	doustna	7	S (+)	35,3±3,4	3					[20]
0,50 ^a	doustna	8	S (+)	67,3±5,4	4					
0,06 ^a	doustna	12	S (+)	18,3±1,4	1,9±0,2	49,4±3,4 ^d				[44]
0,10 ^a	doustna	12	S (+)	21,4±0,7	2,5±0,3	58,3±2,3 ^d				
10 ^b	doustna	4	S (+)	20 ^e	4 ^e			237,6±26,9	17,0±1,5	[45]
			R (-)	20 ^e	4 ^e			243,4±29,0	23,7±3,5	
10 ^c	doustna	4	S (+)	18 ^e	4 ^e			210,3±51,3	6,8±1,0	
			R (-)	17 ^e	4 ^e			248,1±78,3	7,7±1,0	
10 ^b	doustna	4	S (+)	40 ^e	2,5 ^e		16	258,1±32,7	15,6±1,3	
10 ^b	doustna	4	R (-)	40 ^e	3 ^e		16	267,4±38,1	25,0±2,3	

^a dawka w mg/kg masy ciała^b podanie łącznie z NaHCO₃^c podanie łącznie z NH₄Cl^d wartość zmierzona w czasie 0 - 4 h^e wartości przybliżone

podano wartości średnie ± odchylenie standardowe



Ryc. 3 Schemat przemian metabolicznych amfetaminy (modyfikacja własna).

Tabela 3. Parametry farmakokinetyczne amfetaminy u szczura po dożylnym podaniu amfetaminy w dawce 15 mg/kg [24].

Parametr	S (+) amfetamina	R (-) amfetamina	Stosunek S (+)/R (-)
CL _S (ml/min*kg)	65,6 ± 9,25	50,8 ± 6,88	1,29 ± 0,04
CL _R (ml/min*kg)	15,4 ± 2,55	12,5 ± 2,02	1,23 ± 0,04
CL _{NR} (ml/min*kg)	47,7 ± 6,24	35,9 ± 3,70	1,32 ± 0,05
V _{SS} (l/kg)	4,33 ± 0,71	3,84 ± 0,84	1,12 ± 0,04
t _{1/2} (h)	0,96 ± 0,13	1,12 ± 0,09	0,87 ± 0,11
MRT (h)	1,11 ± 0,13	1,21 ± 0,12	0,87 ± 0,04

1.3 Metabolizm i metabolity amfetaminy jako markery konsumpcji

Biomarkery w toksykologii stosuje się w celu oceny ekspozycji oraz efektu wrażliwości na dany ksenobiotyk lub grupę ksenobiotyków. W toksykologii sądowej szeroko omawiane są biomarkery ekspozycji na alkohol etylowy. W praktyce opiniodawczej oznaczanie biomarkerów alkoholu przydatne jest w ocenie ostrej stanów konsumpcji, przewlekłego nadużywania jak również rozróżnienia pochodzenia alkoholu (alkohol endo lub egzogeny w przypadku zgonu). Dodatkowo oznaczenie biomarkerów może być pomocne w ocenie integralności próbki materiału biologicznego i wykazaniu celowych zafałszowań lub przypadkowej kontaminacji.

W przypadku metamfetaminy wskazano, że obecność 4-OH-MAF może być rozpatrywany jako stabilny biomarker nadużywania metamfetaminy [40]. Dla pochodnej MDMA biomarker stanowi metabolit 4-hydroksy-3-metoksymetamfetamina (HMMA) [46].

Obecnie dla amfetaminy jako pewnej formy biomarkera używa się analizy chiralnej poziomu enancjomerów w próbce w celu zróźnicowania źródła pochodzenia amfetaminy. Ponieważ amfetamina pochodząca z nielegalnych źródeł powstaje zwykle w wyniku achiralnej syntezy i stanowi mieszaninę racemiczną, w przypadku próbek biologicznych w materiale stwierdza się obecność obu enancjomerów. Preparaty zawierające amfetaminę, które stosuje się w lecznictwie złożone są bądź z S (+) amfetaminy (Vyvanse i Dexedrine) lub mieszaniny S (+) i R (-) amfetaminy w określonym stosunku np. 3:1 (Adderall). Występują również mniej popularne preparaty, które zawierają racemiczną amfetaminę tj. Evekeo i Evekeo ODT [41].

Dla amfetaminy jako potencjalny i swoisty marker konsumpcji można wytypować 4-OH-AMF. Dotychczas nie opisano przypadków wykrycia 4-OH-AMF w skonfiskowanym materiale dowodowym zawierającym amfetaminę. W raportach zgłoszonych do EMCDDA dostępny jest jeden raport dotyczący konfiskaty 12,4 grama 4-hydroksyamfetaminy w Europie w 2012 roku. Wydaje się mało prawdopodobne, aby jako polarna substancja 4-OH-AMF

przenikała w istotnej ilości barierę krew-mózg i wywoływała działania psychoaktywne. Efekt farmakologiczny związku związany jest raczej z jego działaniem obwodowym sympatykomimetycznym. 4-OH-AMF posiada bardzo wąskie zastosowanie medyczne tj. wstępuje na rynku jako 1 % roztwór z tropikamidem w kroplach do oczu Paremyd dostępnych w USA. Lek stosuje się pomocniczo w diagnostyce dna oka jako preparat rozszerzający źrenice oraz do diagnostyki zespołu Hornera [47].

W dostępnym piśmiennictwie brakuje opracowań dotyczących określenia poziomu 4-OH-AMF we krwi oraz jego właściwości farmakokinetycznych. Związane jest to prawdopodobnie z jej niewielką ilością, która bezpośrednio powstaje w ustroju po zażyciu amfetaminy jak również brakiem wystarczająco czułych, selektywnych i specyficznych metod analitycznych, które pozwalają na oznaczenie tego związku. Jedyne opracowania dotyczą oznaczenia go w moczu w kontekście badań nad polimorfizmem układu *CYP2D6* i jego ewentualnych konsekwencji dla biorców amfetaminy. Metabolit 4-OH-AMF oznaczono w moczu biorców obok amfetaminy metodą chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC-MS) z użyciem kolumny HP-5 (30 m x 0,25 mm). Izolację z moczu prowadzono metodą ekstrakcji ciecz/ciecz za pomocą chloroformu ze środowiska alkalicznego wobec amfetaminy D₅ jako standardu wewnętrznego. Anality poddawano derywatyзації (silylowaniu) za pomocą mieszaniny N,O-bis-(trimetylosililo)-trifluoracetamidu z trimetylochlorosilanem (BSTFA/TMCS) po czym analizowano w trybie monitorowania poszczególnych jonów (z ang. Selected Ion Monitoring, SIM). Limit wykrywalności LOD (z ang. Limit of detection) i limit oznaczalności LOQ (z ang. Limit of quantification) dla 4-OH-AMF został ustalony odpowiednio na poziomie 15 ng/ml i 50 ng/ml [29]. Nieco więcej opracowań dotyczy badań na modelu zwierzęcym mającym na celu identyfikację układów enzymatycznych biorących udział w reakcji hydroksylacji amfetaminy. M. Law i M. Moody opracowali metodę oznaczania 4-OH-AMF w moczu szczurów po wcześniejszej hydrolizie połączeń z kwasem glukuronowym i siarkowym za pomocą beta-glukuronidazy z równoczesną aktywnością arylosulfatazy. Izolację przeprowadzano metodą ekstrakcji do fazy stałej (z ang. Solid phase extraction, SPE) na kolumnach C-18 z odzyskiem na poziomie 24 %. Oznaczenia prowadzone były metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detektorem spektrofotometrycznym (z ang. High pressure liquid chromatography, HPLC-UV) przy długości fali 215 nm. Rozdziału dokonano na kolumnie fenylowej. Jako fazy ruchomej użyto mieszaniny buforu fosforanowego o pH 3, metanolu i acetonitrylu (85:10:5, v/v). Uzyskano LOQ na poziomie 0,81 µg/ml [48, 49, 50, 51]. Soares i wsp. zaprezentowali metodę oznaczania 4-OH-AMF w moczu szczura metodą HPLC po przeprowadzeniu w pochodne w reakcji z chlorkiem dabsylu. Mocz po hydrolizie z beta-glukuronidazą/arylosulfatazą poddawany był reakcji z chlorkiem dabsylu w pH 8,6 w temp.

70°C przez 15 min., po czym po ostudzeniu ekstrahowano powstałe połączenie n-heksanem z dodatkiem n-butanolu. Ekstrakty po odparowaniu i rozpuszczeniu w metanolu analizowano na kolumnie Spherisorb ODS2 stosując jako fazę ruchomą mieszaninę metanolu i buforu amonowego o pH 5,45 z dodatkiem 0,16 % trietyloaminy i detekcją UV przy długości fali 436 nm. Uzyskano LOQ na poziomie 0,5 µg/ml [52]. Sukbuntherng i wsp. przedstawili metodę stereospecyficznego oznaczania metamfetaminy i jej metabolitów tj. 4-hydroksy metamfetaminy (4-OH-MAF) w moczu metodą HPLC po derywatywacji za pomocą chlorku kwasu (+) – 1 - (9-fluorenylo) etylomrówkowego (+FLEC). Ekstrakcję w układzie ciecz/ciecz, po hydrolizie beta-glukuronidazą, ze środowiska alkalicznego prowadzono za pomocą chloroformu, z dodatkiem wzorca wewnętrznego (2-aminofenolu) i następowała ponowna ekstrakcja za pomocą octanu etylu oraz reekstrakcja do 0,05 M HCl. Ekstrakt poddawany był derywatywacji, po czym produkt reakcji ekstrahowano za pomocą octanu etylu i po odparowaniu ponownie rozpuszczano w fazie ruchomej. Analizę HPLC prowadzono na kolumnie HS C18 (150 mm x 4,6-mm, 3 µm) z fazą ruchomą złożoną z buforu octanowego o pH 3,6 acetonitrylu i tetrahydrofuranu (59:26:15, v/v/v). Zastosowano detektor fluorescencyjny ze wzbudzeniem przy długości fali 265 nm i emisją przy 330 nm. Metoda charakteryzowała się liniowością w zakresie 5 - 100 ng/ml i LOQ wynoszącym 5 ng/ml dla 4-OH-MAF i 4-OH-AMF. Powyższą procedurę zastosowano do badań farmakokinetyki amfetaminy u szczurów po jej dożylnym podaniu [24, 53]. Henderickson i wsp. opracowali metodę wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężoną z tandemowym spektrometrem mas (z ang. High pressure liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS) do oznaczania amfetaminy, metamfetaminy, 4-OH-AMF i 4-OH-MAF w surowicy mózgu i jądrach szczura. Jako wzorca wewnętrznego dla amfetaminy i 4-hydroksyamfetaminy zastosowano amfetaminę D₁₁. Izolację z surowicy i tkanek przeprowadzono poprzez precypitację materiału biologicznego 20 % kwasem trifluorooctowym w stosunku 1:1 uzyskując odzysk na poziomie 86 – 97 %. Efekt matrycowy dla 4-OH-AMF wynosił 10 % a LOQ dla kolejnych matryc biologicznych dotyczył: surowica 5 ng/ml, mózg i jądra 25 ng/ml. Oznaczeń dokonywano na kolumnie BDS Hypersil C8 (100 mm x 2,1 mm, 3 µm) w gradientowym przepływie fazy złożonej z buforu octanowego o pH 3,7 z 5 % dodatkiem acetonitrylu (95:5, v/v) i 5 % buforu octanowego o pH 3,7 w acetonitrylu (5:95, v/v). Detekcję prowadzono w trybie jonów dodatnich w źródle jonów typu elektrosprej (z ang. electrospray, ESI). Detektor pracował w trybie monitorowania poszczególnych przejść (z ang. multiple reaction monitoring, MRM) [54].

Z przedstawionego zestawienia wynika, że dotychczas nie opracowano metody, która pozwoliłaby na oznaczenie 4-OH-AMF w materiale, który najczęściej jest poddawany rutynowym badaniom w laboratoriach toksykologicznych tj. krwi pełnej.

Dodatkowo istotnym w przyszłości aspektem analizy 4-hydroksyamfetaminy może być fakt, że jest ona jednym z najsilniejszych w grupie pochodnych amfetaminy egzogennych agonistów receptora TAAR1 (z ang. Trace amine-associated receptor). Receptor TAAR1 zlokalizowany jest wewnątrzkomórkowo w presynaptycznych zakończeniach neuronów monoaminergicznych. Przypisuje mu się między innymi rolę regulatorową układu monoaminergicznego w mózgu. Kliniczne znaczenie związane jest z jego endogennym ligandem tj. fenyloetyloaminą i udziałem w patogenezie zaburzeń depresyjnych, schizofrenii czy ADHD [55].

1.4 Analiza chiralna

Zgodnie z danymi piśmiennictwa 56 – 60 % obecnie stosowanych aktywnych środków farmakologicznych stanowią związki optycznie czynne, z czego 88 % dotyczy mieszanin racemicznych. Konsekwencją budowy chiralnej związków chemicznych jest zróżnicowane oddziaływanie z asymetrycznym środowiskiem enzymów i receptorów zbudowanych z L-aminokwasów. W takich warunkach różnice we właściwościach farmakokinetycznych i farmakodynamicznych poszczególnych izomerów optycznych mogą być znaczące. W praktyce spotyka się następujące sytuacje: farmakologicznie aktywny może być tylko jeden z enancjomerów, podczas gdy drugi może być traktowany jako zanieczyszczenie często o niepożądanych działaniach. Aczkolwiek dwa enancjomery mogą mieć takie same lub podobne właściwości farmakodynamiczne bądź różnić się siłą oddziaływania. W niektórych przypadkach dwa enancjomery mają całkowicie odmienne zastosowania terapeutyczne np. dekstropropoksyfen o działaniu przeciwbólowym i lewopropoksyfen o działaniu przeciwkaszlowym. Różnice w farmakodynamice dwóch enancjomerów wyjaśnia w uproszczeniu model Easona-Stedmana, trzypunktowego dopasowania enancjomeru do receptora. Zgodnie z wymienionym modelem silniej oddziałujący enancjomer ma co najmniej trzy punkty oddziaływania z powierzchnią receptora, podczas gdy w przypadku enancjomeru o mniejszej aktywności występują tylko dwa punkty interakcji. Różna aktywność farmakologiczna poszczególnych izomerów optycznych wiąże się ze specyficzną terminologią, stereoizomer o wyższym powinowactwie do receptora lub o wyższej aktywności określa się mianem eutomeru a izomer o niższej aktywności nosi nazwę distomeru [56].

Różnice w farmakokinetyce poszczególnych enancjomerów mogą wystąpić z uwagi na stereospecyficzność w jednym lub kilku procesach, jakim w ustroju podlega ksenobiotyk tj. absorpcji, dystrybucji, metabolizmowi i wydalaniu. Różnice w farmakokinetyce enancjomerów są relatywnie niskie. W przypadku absorpcji dla większości związków jest ona procesem biernym. Z uwagi na właściwości enancjomerów, które z reguły nie różnią się

rozpuszczalnością w lipidach i wodzie nie obserwuje się różnic w szybkości i wydajności wchłaniania poszczególnych enancjomerów. Transport aktywny związków naturalnych – aminokwasów i węglowodanów zachodzi stereoselektywnie, dlatego związki o analogicznej strukturze mogą również być wchłaniane w podobnym mechanizmie np. lewodopa (L-DOPA) która jest wchłaniana z większą wydajnością aniżeli jej izomer o konfiguracji D. W procesie dystrybucji ksenobiotyków współczynnik różnicowania wiązania z białkami dla enancjomerów osiąga wartość 1,5. Stereoselektywne wiązanie zachodzi zarówno w przypadku albumin wiążących związki o kwaśnym charakterze jak i glikoprotein wiążących zasady. Różnicowana objętość dystrybucji dla różnych izomerów optycznych wskazuje na różny stopień wiązania w tkankach. Stereoselektywność w metabolizmie przejawia się w dwojaki sposób tj. bądź przez różnicowaną biotransformację chiralnych związków bądź poprzez wtórną produkcję chiralnych metabolitów [57].

Do rozdziału związków chiralnych stosuje się aktualnie metody chromatografii cieczerwowej (z ang. Liquid chromatography, LC), gazowej (z ang. Gas chromatography, GC) czy elektroforezy kapilarnej (z ang. Capillary electrophoresis, CE). Chromatograficzne metody rozdziału enancjomerów dzielą się na pośrednie i bezpośrednie. Metody pośrednie oparte są na reakcji chiralnego odczynnika derywatyizującego z enancjomerami i analizie otrzymanych diastereoizomerów, które w przeciwieństwie do enancjomerów posiadają różnicowane właściwości fizykochemiczne ułatwiające rozdział za pomocą konwencjonalnych metod chromatograficznych. Metody bezpośrednie oparte są na rozdziale enancjomerów w środowisku chiralnym w oparciu o kolumny chiralne lub chiralne dodatki do fazy stacjonarnej [56]. W chromatografii gazowej istnieje ograniczona liczba dostępnych kolumn chiralnych, które stanowią głównie fazy cyklodekstrynowe, polisacharydowe czy oparte na antybiotykach, stąd większość prac dotyczących rozdziału związków chiralnych tą techniką dotyczy metod pośrednich. Do najczęściej stosowanych odczynników chiralnych zalicza się chlorek S-(-)-N-(trifluoroacetylo) pirolidyno-2-karbonylu (S-TPC), chlorek kwasu R-(-)- α -metoksy- α -(trifluoroacetylo) fenylooctowego (R-MTPCl) oraz chlorek S-(-)-N-(trifluorobutylo) pirolidyno-2-karbonylu (S-HFBPCl). W przypadku chromatografii cieczerwowej, przy dużym wyborze kolumn chiralnych dominują metody bezpośrednie [58].

W toksykologii sądowej metody chiralne materiału biologicznego przydatne są w analizie materiału biologicznego w celu różnicowania pochodzenia substancji (nielegalny, najczęściej racemiczny środek czy legalny lek zawierający jeden enancjomer). Ponadto analizę chiralną stosuje się w ocenie pochodzenia produktów handlowych czy metody syntezy materiału dowodowego zabezpieczonego w sprawach posiadania i produkcji nielegalnych substancji.

Analizę chiralną enancjomerów amfetaminy w materiale biologicznym prowadzona była wszystkimi dostępnymi technikami, które pozwalają na rozdział enancjomerów w rozmaitych matrycach biologicznych.

W pracy T. Nagai i wsp. autorzy badali zawartość enancjomerów metamfetaminy i jej metabolitów tj. amfetaminy, 4-OH-MAF i 4-OH-AMF w moczu szczura i człowieka. Zastosowano metodę HPLC z kolumną Chiralcel (250 mm x 4,6 mm) detekcją UV przy długości fali 220 nm. Fazę ruchomą stanowiła mieszanina n-heksanu i 2-propanolu (90:10, v/v). Próbkę moczu po hydrolizie beta-glukuronidazą ekstrahowano ze środowiska alkalicznego na kolumnach Exrelut. Ekstrakty w octanie etylu reekstrahowano do zakwaszonej fazy wodnej i poddawano derywatywacji z chlorkiem benzylu. Pochodne po dalszym oczyszczaniu poddawano analizie. Prowadzono analizę jakościową w celu identyfikacji stereospecyficznego metabolizmu i ewentualnej inwersji [59]. Opracowana metoda posłużyła tym samym autorom do analizy stosunku enancjomerów etyloaminy w moczu ludzkim po podaniu racemicznej formy związku i szacowania na tej podstawie czasu jaki upłynął od przyjęcia dawki do pobrania próbki moczu [60].

W związku z występowaniem na amerykańskim rynku w odręcznej sprzedaży (OTC) preparatów zmniejszających obrzęk błon śluzowych nosa zawierających R-metamfetaminę (lewometamfetamina) (preparaty handlowe Vick's Inhaler, Capor Inhaler czy Sinu Inhaler) i możliwością uzyskania po ich zastosowaniu pozytywnych wyników badań moczu na obecność amfetaminy i metamfetaminy ukazała się seria prac dotycząca różnicowania pochodzenia stwierdzonych w płynach ustrojowych związków. J. Cuddy i wsp. opracowali metodę oznaczenia izomerów optycznych amfetaminy i metamfetaminy w moczu za pomocą GC-MS z użyciem kolumny DB-17 (20 m x 0,18 mm). Anality izolowano z próbek moczu metodą ekstrakcji ciecz/ciecz z $\text{pH} \geq 10$, wobec amfetaminy D_5 i metamfetaminy D_5 jako wzorców wewnętrznych i derywatyzowano S-TPC w chloroformie. Zaproponowana metoda pozwoliła na potwierdzenie wcześniejszego zażycia legalnej, niewykazującej działania ośrodkowego R (-) metamfetaminy i odróżnienie od zażycia S (+) metamfetaminy i racemicznej metamfetaminy [61]. Opracowana wcześniej metoda pozwoliła zespołowi autorów na zastosowanie jej do badania profilu wydalania enancjomerów amfetaminy po zastosowaniu preparatów farmaceutycznych zawierających formy S (+) i R (-) amfetaminy w stosunku 3:1 i odróżnienia od zażycia nielegalnej wówczas w USA racemicznej formy [62] [63]. Dodatkowo badano profil metaboliczny wydalania enancjomerów amfetaminy i metamfetaminy powstających w ustroju w wyniku metabolizmu leku z grupy niesteroidowych leków przeciwzapalnych – famprofazonu [64]. W doniesieniu Nyström i wsp. przeprowadzono analizę enancjomerów amfetaminy metodą GC-MS w trybie SIM w próbkach krwi i włosów pacjentów z ADHD leczonych amfetaminą, jako kontroli zażywania

dotychczasowych dawek amfetaminy. W badaniach zastosowano kolumnę HP-5 MS (30 m x 0,25 mm, 0,25 μ m), jako odczynnika do derywatyzacji użyto S-TPC a jako wzorca wewnętrznego amfetaminy D₁₁. Próbkę włosów roztwarzano w 2 M NaOH, natomiast próbki krwi alkalizowano za pomocą 2M NaOH, po czym ekstrahowano metodą cieczech/ cieczech za pomocą izooktanu, ekstrakt z dodatkiem 1 % HCl w metanolu odparowywano do sucha i derywatyzowano. W opisanej pracy potwierdzono zupełny rozdział enancjomerów i uzyskano liniowe zakresy 2,5 – 50 mg/30 mg próbki włosów i 5- 400 ng/g krwi, nie wskazując wartości LOQ dla analizowanych materiałów. Metodę zastosowano do oceny zawartości amfetaminy w próbkach zabezpieczonych od pacjentów. Metoda w przypadku włosów pozwoliła na retrospektywne ustalenie dodatkowego przyjmowania racemicznej postaci, nielegalnej amfetaminy przez niektórych pacjentów [65]. Zespół F. Peters przedstawił w pełni zwalidowaną metodę oznaczenia izomerów optycznych amfetaminy i metamfetaminy w surowicy oraz osoczu metodą GC-MS z zastosowaniem negatywnej jonizacji chemicznej i techniki SIM. Ekstrakcję analitów przeprowadzano metodą SPE z użyciem kolumn ekstrakcyjnych z mieszanym złożem (zawierającym grupy C8 oraz wymienniczkę kationową SO₃⁻), ukierunkowanym do izolacji substancji o charakterze zasadowym. Anality derywatyzowano za pomocą S-HFBPCL i analizowano na kolumnie HP-5 MS (30 m x 0,25 mm, 0,25 μ m), jako wzorców wewnętrznych użyto pochodnych amfetaminy D₁₁ i metamfetaminy D₅. Metoda została oceniona pod względem selektywności, liniowości, dokładności, precyzji, limitu oznaczalności, stabilności procesu analitycznego, wydajności ekstrakcji, stabilności analitów w cyklu zamrażania i rozmrażania. Uzyskano LOQ na poziomie 5 ng/ml, zakres liniowości 5 – 250 ng/ml i odzysk 88,9 – 98,6 % dla wszystkich analitów. Opracowaną metodą badano poziomy enancjomerów i ich wzajemny stosunek w próbkach rutynowo poddawanych analizie toksykologicznej [66]. Używając również metody GC-MS z negatywną jonizacją Leis i wsp. w analizie poziomu enancjomerów amfetaminy w surowicy osiągnęli niespotykane wcześniej parametry metody. Próbkę surowicy z amfetaminą D₅ po ekstrakcji cieczech/ cieczech z alkalicznego środowiska za pomocą n-heksanu derywatyzowana była za pomocą S-HFBPCL. Analiza na kolumnie SGE-BPX5 (15 m x 0,25 mm, 0,25 μ m), wykazała liniowość w zakresie 0,006 – 50 ng/ml, LOQ dla S (+) amfetaminy 0,195 ng/ml a dla izomeru R (-) na 0,049 ng/ml. Metodę zastosowano do wstępnej oceny farmakokinetyki amfetaminy po doustnym przyjęciu 10 mg racematu. Uzyskano nietypowe wyniki wskazujące na wyższą biodostępność i C_{max} dla S (+) amfetaminy (~ 19 ng/ml) niż dla R (-) (~ 5 ng/ml). Poprzednia metoda została przez ten sam zespół zaadaptowana do oznaczenia enancjomerów amfetaminy metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej z wysokorozdzielczym spektrometrem masowym (z ang. Liquid chromatography coupled with high resolution mass spectrometry, HPLC-HRMS). Ten sam model izolacji i derywatyzacji

został zastosowany. Do rozdziału użyto kolumny Hypersil Gold (100 mm x 2,1 mm, 1,9 μ m) a fazę ruchomą A stanowiły 0,12 % roztwór kwasu mrówkowego w wodzie z dodatkiem 5 mM octanu amonu i B 0,12 % roztwór kwasu mrówkowego w acetonitrylu z dodatkiem 5 mM octanu amonu. Detekcję prowadzono w trybie jonów dodatnich z wykorzystaniem wysokorozdzielczego analizatora Orbitrap. Uzyskano liniową zależność w zakresie 0,024 – 25 ng/ml dla R (-) amfetaminy i 0,098 – 100 ng/ml dla S (+) amfetaminy. Metoda przeznaczona była do oceny farmakokinetyki preparatów amfetaminy u dzieci [67] [68]. Kolejna, w pełni zwalidowana i szybka metoda LC-MS/MS oznaczania enancjomerów amfetaminy w surowicy i ślinie z zastosowaniem amidu 1-fluoro-2,4 dinitrofenylo-5-L-alaniny (odczynnika Marfey) jako odczynnika derywatyzującego została zaproponowana przez zespół M. Newmeyr. Surowica i ślina po dodaniu wzorca wewnętrznego (amfetaminy D₁₁) i 1 % roztworu kwasu mrówkowego poddawane były izolacji metodą SPE na kolumnach zawierających silny wymiennicz kationowy. Po desorpcji i dodaniu 1% roztworu HCl w metanolu (w celu uniknięcia strat lotnych amin przy odparowaniu) prowadzono derywatyzację i analizę na kolumnie porowatej C 18 (100 mm x 2,1 mm, 2,6 μ m) z fazą ruchomą w postaci mieszaniny wody i metanolu (40:60, v/v) w przepływie izokratycznym. Zastosowano jonizację ESI w ujemnej polaryzacji a detekcję prowadzono w trybie MRM. Uzyskano LOQ na poziomie 1 ng/ml, liniowość w zakresie 1 – 500 ng/ml, dla surowicy, w przeciwieństwie do śliny uzyskano niewielki efekt matrycy. Odzysk dla amfetaminy mieścił się w zakresie 101 – 117 % a wydajność całego procesu została określona w przedziale 92 – 117 % [69]. W związku z pojawieniem się na rynku trwałych i relatywnie tanich kolumn chiralnych do HPLC zaczęto opracowywać selektywne metody analizy chiralnej bez przeprowadzania enancjomerów w diastereoizomery. Pozwala to uniknąć problemu trwałości i czystości chiralnej odczynników derywatyzujących. W opracowaniu A. Maas i wsp. przedstawiono metodę HPLC-MS/MS do rozdziału enancjomerów amfetaminy i metamfetaminy w próbkach krwi z użyciem chiralnej kolumny z wypełnieniem polisacharydowym Lux[®] AMP (150 mm x 3,0 mm, 3 μ m) i fazą ruchomą w postaci A - roztworu wodorowęglanu amonu o pH 11,0 i B - metanolu. Po dodaniu wzorców wewnętrznych amfetaminy D₅ i metamfetaminy D₁₁ izolacja prowadzona była przez precypitację za pomocą metanolu odzyskiem ponad 90 % dla wszystkich analitów. Uzyskano LOQ dla S (+) amfetaminy na poziomie 1,65 ng/ml i dla R (-) amfetaminy na poziomie 3,86 ng/ml. Metoda została zastosowana do oceny drogi syntezy metamfetaminy na podstawie analizy próbek surowicy osób nadużywających metamfetaminę [70].

1.5 Amfetamina w dowodach rzeczowych

Z danych publikowanych przez Biuro Narodów Zjednoczonych ds. Narkotyków i Przestępczości (UNDOC) wynika, że problem podaży nielegalnych stymulantów pochodnych amfetaminy w globalnym ujęciu zdominowany jest przez metamfetaminę. W 2019 roku na świecie skonfiskowano 325 ton metamfetaminy, 79 ton amfetaminy oraz 16 ton MDMA. W bardziej lokalnym ujęciu wynika, że europejski rynek zdominowany jest przez amfetaminę bowiem, w latach 2015 - 2019 z ogólnej liczby 571 zlikwidowanych na świecie laboratoriów produkujących amfetaminę 488 zlokalizowanych było w Europie. W czołówce państw z największą liczbą nielegalnych laboratoriów znajdują się: Belgia, Królestwo Niderlandów, Federacja Rosyjska oraz Polska [71]. Z danych EMCDDA wynika, że na rynku europejskim w roku 2019 dokonano 34 000 konfiskat, które łącznie stanowiły 17 ton narkotyku. Zawartość amfetaminy w sprzedaży detalicznej na terenie Europy mieści się w zakresie 13 – 65 %, przy czym w połowie krajów oscyluje w zakresie 20 – 35 %. W krajach, które konsekwentnie raportują wyniki badań w ostatniej dekadzie obserwuje się wzrost zawartości amfetaminy w skonfiskowanych materiałach. W roku 2019 na terenie Polski w 85 konfiskatach zabezpieczono łącznie 2214 kg amfetaminy [3].

Aktualnie obowiązująca Ustawa z dnia 29 lipca 2005 o przeciwdziałaniu narkomanii nie odnosi się do zawartości substancji czynnej w skonfiskowanych substancjach z wyjątkiem badania zawartości morfiny w słomie makowej i zawartości sumy delta-9-tetrahydrokannabinolu i kwasu tetrahydrokannabinolowego w konopiach, które są niezbędne do właściwej kwalifikacji prawnej. W związku z powyższym laboratoria kryminalistyczne, które badają narkotyki rzadko dokonują oceny ilościowej zawartości substancji czynnej w zabezpieczonym materiale dowodowym.

W opublikowanych w ostatnich latach pracach dotyczących rynku narkotykowego w Polsce trzykrotnie oceniano zawartość amfetaminy w zabezpieczonym materiale dowodowym. W pracy B. Bryska i D. Zuba w latach 2003 - 2013 zbadano 1972 próbek o zróżnicowanej gramaturze pod kątem zawartości amfetaminy (metodą HPLC) oraz zidentyfikowano substancje dodatkowe (metodą GC-MS). Z przeprowadzonej analizy wynika, że w latach 2003 – 2009 amfetamina była drugą, po przetworach ziela konopi innych niż włókniste, najczęściej występującą substancją psychoaktywną w Polsce, a od roku 2004 obserwowano systematyczny spadek liczby spraw związanych z dystrybucją amfetaminy. Poziom amfetaminy w próbkach z omawianego okresu zmieniał się aż czterokrotnie od poziomu 30 - 35 % w latach 2003 – 2006 do poziomu 8 % w roku 2010, po roku 2010 nastąpił niewielki wzrost zawartości po czym znowu zanotowano spadek do poziomu około 8 %. Ze spadkiem zawartości amfetaminy zaobserwowano obniżenie dawki amfetaminy z około 130 do około 30 mg, przy praktycznie niezmiennionej masie porcji handlowej stanowiącej

wówczas 0,3 – 0,5 g. Ze zmniejszeniem zawartości amfetaminy w zabezpieczanych dowodach wzrastała zawartość biologicznie czynnych dodatków takich jak kofeina i kreatyna. Ponadto jako zafałszowania odnotowywano leki psychotropowe, uspokajające czy przeciwpadaczkowe (np. klonazepam, karbamazepina, kwas walproinowy czy lewomepromazyna), leki przeciwbólowe i przeciwzapalne (np. paracetamol, salicylany, diklofenak) czy takie leki jak ranitydyna. Od roku 2010 wraz z rozwojem rynku nowych substancji psychoaktywnych (NPS) obserwowano domieszki substancji z grupy syntetycznych katynonów (np. mefedron, pentedron czy mefylon) [72]. W doniesieniu A. Tyranda i A. Duszyńska przedstawiono wyniki badań składu jakościowo - ilościowego klasycznych narkotyków zabezpieczonych na terenie całego kraju w latach 2018 - 2019. Na podstawie badania 94 próbek amfetaminy stwierdzono, że jej zawartość mieści się w zakresie od kilku do maksymalnie 28 %, przy czym notowano próbki o zawartości amfetaminy poniżej 1 %, średnia zawartość amfetaminy w przebadanych próbkach wynosiła 13,1 % a mediana 12 %. Duże zróżnicowanie zawartości amfetaminy zaobserwowano dla poszczególnych województw od 4 % wolnej zasady dla województwa warmińsko – mazurskiego do 21 % wolnej zasady dla województwa podkarpackiego. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że średnia zawartość amfetaminy nie odbiegała w znaczący sposób od zawartości notowanych przez EMCDDA, które w omawianym okresie wynosiły 17 – 29 % [73]. W doniesieniu autorstwa P. Adamowicz i M. Kała przedstawiono wyniki badań próbek amfetaminy na kolumnie chiralnej z ChiraDex z wypełnieniem beta-cyklodekstrynowym. W przebadanych 12 próbkach stwierdzono zawartości amfetaminy w zakresie 26,6 – 64,6 %. We wszystkich próbkach stwierdzono obecność racemicznej amfetaminy w stosunku R/S wynoszącym 0,99 i nie potwierdzono zmian w stosunku enancjomerów podczas przechowywania materiału w okresie 2 lat [74]. W pracy Losacker i wsp. przedstawiono wyniki badania czystości i enancjomerów amfetaminy, metamfetaminy i MDMA w próbkach skonfiskowanych na terenie południowych Niemiec. Próbki analizowano metodą HPLC-MS/MS na kolumnie Lux[®] AMP (150 mm x 3,0 mm, 3 µm) i fazą ruchomą w postaci A - roztworu wodorowęglanu amonu o pH 11,0 i B - metanolu. W poddanych badaniu 143 próbkach potwierdzono obecność amfetaminy w średnim stężeniu $21,6 \pm 14,6$ % z medianą równą 16,1 % i zakresem 0,4 - 73,1 % w przeliczeniu na zasadę. Uzyskany stosunek R/S w zakresie 0,97 – 1,04 % (średnia 1,00 %) wskazywał na obecność racematu. Zróżnicowany poziom enancjomerów uzyskano przy badaniu próbek metamfetaminy, z uwagi na możliwą drogę jej pozyskiwania z pseudoefedryny [75]. Analizę chiralną amfetaminy przeprowadził Dhabbah badając 12 partii tabletek zawierające amfetaminę skonfiskowanych na terenie Arabii Saudyjskiej. Przeprowadzone badanie metodą GC-MS po derywatywacji za pomocą S-TPC wykazało podobne poziomy obu enancjomerów w próbkach z niewielkim nadmiarem

enancjomerycznym formy S (+) wynoszącym 0,6 – 9,72 %. Zawartość amfetaminy w tabletkach mieścił się w zakresie 36,44 - 96,22 mg [76]. W badaniach S. George i R. Braithwaite 17 próbek amfetaminy pochodzącej z konfiskat, z złożenia racemicznej formy, derywatyzowano za pomocą S-TPC analizowano metodą GC z detektorem azotowo-fosforowym (z ang. Nitrogen phosphorus detector, NPD). Uzyskano średni stosunek R/S na poziomie 89,2 % (zakres 72,2 % - 98,3 %). Średnia zawartość amfetaminy w badanych próbkach wynosiła 21,5 % (zakres 3,4 – 71,0 %) [77].

Synteza amfetaminy w nielegalnych laboratoriach prowadzona jest zwykle metodą Leuckarta, która nie wymaga zaawansowanego sprzętu i może być prowadzona przez osoby nieposiadające dużej wiedzy chemicznej. Mniej popularne metody to metoda nitrosterynowa i metoda redukcyjnego aminowania. Przedstawione metody prowadzą do powstania racemicznej formy związku. W dostępnym piśmiennictwie opisano co najmniej kilkanaście metod syntezy chiralnej amfetaminy, których zastosowanie dotychczas nie zostało potwierdzone w ujawnionych laboratoriach. Zmieniające się przepisy i utrudniony dostęp do substratów niezbędnych do syntezy zmuszają do szukania nowych dróg otrzymywania produktu z dostępnych materiałów, dlatego, obok profilowania zanieczyszczeń, monitoring składu izomerów optycznych wydaje się w pełni uzasadniony [78] [79].

1.6 Dotychczasowe wykorzystanie metabolizmu amfetaminy w badaniach sądowych

Z analizy dotychczasowego piśmiennictwa wynika, że ocena przemian metabolicznych amfetaminy i jej pochodnych w kontekście medyczno-sądowym dotyczyła głównie badania moczu i analizy chiralnej w celu różnicowania pochodzenia amfetamin w próbkach. Nieliczne doniesienia dotyczą oznaczenia we krwi pełnej, surowicy lub osocza. Zespół F. Peters opracowaną metodą GC –MS z negatywną jonizacją chemiczną przeprowadził badanie enancjomerów amfetaminy i metamfetaminy w surowicy osób zażywających amfetaminę, z podziałem na pacjentów wykazujących objawy intoksykacji oraz pacjentów bezobjawowych. Uzyskano stosunek R/S w zakresie 0,97 – 1,66 % (średnia 1,15 %), nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic, $p > 0,05$ między stosunkami enancjomerów dla osób intoksykowanych i bezobjawowych. Ponadto autorzy porównali zakresy stężeń amfetaminy pomiędzy pacjentami bezobjawowymi – zakres poniżej LOQ do 218,4 ng/ml a pacjentami intoksykowanymi – zakres od 13 do 398,7 ng/ml (> 10 ng/ml). Z grupy pacjentów z objawami intoksykacji u 80 % przypadków stężenie amfetaminy było ≥ 100 ng/ml a ~ 20 % stężenie było ≤ 20 ng/ml [66]. Dalsze badania zespołu F. Peters dotyczyły oznaczeń amfetaminy w próbkach klinicznych, które zawierały co najmniej jedną substancję z grupy amfetamin i pochodzących od osób kierujących zatrzymanych do kontroli drogowych i

wykazujących symptomy intoksykacji. W grupie 151 przypadków amfetaminy 51 osób stanowili kierowcy, a próbki kliniczne podzielono na 3 podgrupy tj. pacjentów objawowych, u których objawy przypisano obecności amfetaminy ($n = 40$), z której wydzielono grupę pacjentów, u których za objawy odpowiadały dodatkowe substancje ($n = 24$) oraz pacjentów bezobjawowych ($n = 46$). W próbkach oznaczono poziom poszczególnych enancjomerów, ich sumę oraz stosunek R/S a rezultaty poddano ocenie testami Kruskal - Wallis i Dunna dla sprawdzenia istotności różnic między badanymi grupami. Przeprowadzone porównania wykazały istotną statystycznie różnicę ($p = 0,001$) pomiędzy stężeniem amfetaminy bądź poszczególnych jej enancjomerów pomiędzy grupą pacjentów bezobjawowych a pozostałymi grupami. W przypadku wartości stosunku R/S istotna różnica występowała między kierowcami a grupą pacjentów bezobjawowych (stosunek R/S u kierowców < stosunek R/S pacjentów bezobjawowych) [80]. W doniesieniu C. Hess i wsp. wykorzystano uprzednio opracowaną metodę chiralnej analizy amfetaminy i metamfetaminy do różnicowania jednorazowego przyjęcia metamfetaminy od jednoczesnego przyjęcia metamfetaminy z amfetaminą. Dotychczas stosowane metody oceny oparte na analizie stosunku stężenia metamfetaminy do stężenia amfetaminy w zakresie między 3 a 10 świadczące o przyjęciu metamfetaminy zostały ocenione jako niewystarczające do jednoznacznej oceny bez analizy chiralnej. Przy przyjęciu, że dostępna na nielegalnym rynku metamfetamina stanowi formę S (+) to wykrycie w próbkach osocza jako metabolitu S (+) amfetaminy świadczy o przyjęciu samej metamfetaminy, wykrycie dodatkowo formy amfetaminy R (-) dowodzi dodatkowej konsumpcji racemicznej amfetaminy [70, 81]. W 2020 roku zespół M. Losacker przeprowadził badania szybkości wydalania 4-fluoroamfetaminy po doustnym podaniu dawki 100 i 150 mg racemicznego związku odpowiednio 12 i 5 ochotnikom. Podczas eksperymentu zabezpieczano próbki krwi w czasie do 12 godzin od podania. Analizę enancjomerów 4-fluoroamfetaminy prowadzono wcześniej opisaną przez A. Mass metodą HPLC-MS/MS, którą zmodyfikowano do celów eksperymentu. Przeprowadzone badania nie wykazały różnicy w T_{max} i C_{max} dla poszczególnych izomerów, natomiast istotnie różniły się czasy biologicznego półtrwania $t_{1/2}$ wynoszące odpowiednio 12,9 dla izomeru R (-) i 6,0 dla S (+). Podczas eliminacji stosunek R/S rósł w sposób liniowy osiągając wartość 2 po 12 godz. od zażycia u wszystkich uczestników. W konkluzji wskazano zróżnicowany w czasie stosunek enancjomerów R/S jako obiecujący wskaźnik fazy intoksykacji oraz szacowania czasu konsumpcji [82].

2. Cel pracy

W związku z aktualnym zapotrzebowaniem organów zlecających badania toksykologiczne na interpretację w zakresie możliwości ustalenia czasu zażycia amfetaminy w określonym momencie przed pobraniem próbki krwi oraz możliwości przypadkowej

kontaminacji amfetaminą materiału biologicznego uznano za celowe przeprowadzenie oceny przydatności metabolizmu amfetaminy jako pomocniczego kryterium w obiektywnym opiniodawstwie toksykologicznym. Z dotychczas dostępnego piśmiennictwa wynika, że wybrany metabolit amfetaminy, którym jest 4-OH-AMF nie był przedmiotem kompleksowych badań u człowieka w kontekście wykorzystania go jako markera wcześniejszego zażycia.

W realizacji programu eksperymentalnego dysertacji przyjęto następujące cele szczegółowe:

1. Opracowanie metody analizy jakościowo - ilościowej dowodów rzeczowych z uwzględnieniem chiralnej oceny zawartej w nich amfetaminy.
2. Opracowanie kompleksowych metod oznaczenia stereoizomerów amfetaminy i 4-OH-AMF w materiale biologicznym i ocena ich parametrów walidacyjnych.
3. Wykorzystanie opracowanych metod analitycznych do wstępnej oceny kinetyki tworzenia 4-OH-AMF z amfetaminy na modelu zwierzęcym.
4. Wykorzystanie opracowanych metod w analizie przypadków nadużywania amfetaminy do interpretacji spraw realizowanych w statutowej działalności Zakładu Medycyny Sądowej.
5. Analizę porównawczą otrzymanych wyników i ustalonych zależności w zakresie ich praktycznego wykorzystania dla celów opiniodawstwa toksykologicznego.

3. Materiał i metody

3.1 Aparatura i sprzęt laboratoryjny

- chromatograf Agilent Infinity 1200 LC z detektorem UV-DAD (Agilent Technologies, Waldbronn, Niemcy)
- kolumna HPLC Poroshell 120 PVP ($100 \times 2,1$ mm, $2,7 \mu\text{m}$) z prekolumną Poroshell 120, PFP, $2,1\text{mm}$, (Agilent Technologies, Santa Clara, USA)
- chromatograf Agilent 1200 z detektorem ESI-MS/MS 6410B Triple Quad (Agilent Technologies, Santa Clara, USA)
- kolumna HPLC Kinetex® $2,6 \mu\text{m}$ HILIC ($100 \times 2,1$ mm, $2,6 \mu\text{m}$) z prekolumną Ultra UHPLC HILIC $2,1$ mm (Phenomenex, Torrance CA, USA)
- kolumna HPLC Lux® $3 \mu\text{m}$ AMP ($150 \times 3,0$ mm, $3,0 \mu\text{m}$) z prekolumną Lux® $3 \mu\text{m}$ AMP $2,0$ mm (Phenomenex, Torrance CA, USA)
- chromatograf gazowy Clarus 500 z kwadropolowym detektorem masowym Clarus 500 (Perkin Elmer, Shelton, USA)
- kolumna GC Zebron Guardian ZB 5 MS ($30 \text{ m} \times 0,25$ mm, $\text{df} = 0,25 \mu\text{m}$) ze zintegrowaną prekolumną 10 m (Phenomenex, Torrance CA, USA)
- pH-metr Elmetron CP-505 z elektrodą pH-metryczną (Elmetron, Zabrze, Polska)
- waga analityczna Radwag XA 110 (Radwag, Radom, Polska)
- zestaw do izolacji z fazy stałej VISIPREP 24 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Niemcy)
- wytrząsarka laboratoryjna CAT VM 4 (M. Zipperer, Etzenbach, Niemcy)
- mieszadło rodkowe RM5W-80V (M. Zipperer, Etzenbach, Niemcy)
- wirówka EBA Micro 220R (Hettich, Tuttlingen, Niemcy)
- koncentrator próżniowy GeneVac Mivac Duo (Genevac, Ipswich, Wielka Brytania)
- system oczyszczania wody DirectQ3 (Merck Millipore, Billerica, MA, USA)
- zestaw do sączenia (Sartorius, Goettingen, Niemcy)
- sączki nitrocelulozowe o średnicy porów $0,2 \mu\text{m}$ (Sartorius, Goettingen, Niemcy)
- próbki wirówkowe 9 ml (Sarstedt, Nümbrecht, Niemcy)
- zestaw pipet automatycznych $10 - 5000 \mu\text{l}$ (Eppendorf, Hamburg, Niemcy)
- zestaw szkła laboratoryjnego

3.2. Odczynniki

- chlorowodorek ($\pm$)-4-hydroksyamfetaminy (National Measurement Institute, Pymple, Australia),
- siarczan ($\pm$)-amfetamina (Lipomed Arlesheim, Szwajcaria),
- ($\pm$)-amfetamina D₅ rozwór 1 mg/ml w metanolu (Cerilliant, Round, Rock, TX, USA)

- S (+)-amfetamina roztwór 1 mg/ml w metanolu (Cerilliant, Round, Rock, TX, USA)
- R (-)-amfetamina roztwór 1 mg/ml w metanolu (Cerilliant, Round, Rock, TX, USA)
- beta-glukuronidaza Helix pomatia typ HP-2 (Sigma-Aldrich, USA)
- kolumny do ekstrakcji z fazy stałej SPE C18 Bakerbond 3 ml/ 500 mg (J.T. Baker, Królestwo Niderlandów)
- koncentrat krwinek czerwonych (Regionalna Stacja Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Poznaniu)
- mrówczan amonu do LC-MS (Sigma-Aldrich, USA)
- octan amonu do LC-MS (Sigma-Aldrich, USA)
- fosforan trietyloamoniowy (Sigma-Aldrich, USA)
- 1-chlorobutan do analizy (Sigma-Aldrich, USA)
- kwas mrówkowy do LC-MS (Merck, Darmstadt, Niemcy)
- wodorowęglan amonu do analizy (Merck, Darmstadt, Niemcy)
- 1 M NaOH do analizy (Merck, Darmstadt, Niemcy)
- roztwór wodorotlenku amonu 25 % do analizy (Sigma-Aldrich, Steinheim, Niemcy)
- bufor PBS (phosphate buffered saline) – tabletki do sporządzania roztworu (Sigma-Aldrich, Steinheim, Niemcy)
- kwas solny (Merck, Darmstadt, Niemcy)
- kwas octowy do analizy $\geq 99,7\%$ (Sigma-Aldrich, Steinheim, Niemcy)
- sodu octan (min. 99,0%) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Niemcy)
- metanol do HPLC o czystości gradientowej (Merck, Darmstadt, Niemcy)
- acetonitryl do HPLC o czystości gradientowej (Merck, Darmstadt, Niemcy)
- chlorek baru cz.d.a (POCH, Gliwice, Polska)
- fluorek sodu cz.d.a (POCH, Gliwice, Polska)
- osocze szczurze (Sigma-Aldrich, Steinheim, Niemcy)
- azot sprężony (Messer Polska, Chorzów, Polska)
- woda dejonizowana uzyskana z zastosowaniem systemu DirectQ3 o oporności właściwej 18,2 M Ω x cm
- wzorce pH o wartości 1,68, 7,00 i 12,4 (Labstand, Poznań, Polska)
- Bioketan (ketamina 100 mg/ml) (Vetoquinol Biowet, Gorzów Wlkp., Polska)
- Xylavet (ksylazyna 20 mg/ml) (ScanVet, Gniezno, Polska)

3.3. Roztwory podstawowe i wzorcowe i bufor stosowane w badaniach

3.3.1 Rozw6r wzorca wewn6trznego IS w metodzie HPLC-MS/MS

Do kolby miarowej o poj.10 ml przeniesiono pipet6 0,1 ml metanolowego roztworu racemicznej amfetaminy D₅ o st6żeniu 1 mg/ml i uzupełniono metanolem do kreski. Uzyskano roztw6r o st6żeniu 0,01 mg/ml.

3.3.2 Roztwory podstawowe 4-OH-AMF, S (+) AMF i R (-) AMF

Odważono 12,384 mg chlorowodoru 4-hydroksyamfetaminy (10 mg w przeliczeniu na zasadę), który rozpuszczono w metanolu w kolbie miarowej o poj. 10 ml. W przypadku enancjomer6w amfetaminy zakupiono roztwory o st6żeniu 1 mg/ml w metanolu. Roztwory podstawowe o st6żeniu 1 mg/ml służyły do przygotowania serii roztwor6w roboczych o st6żeniach: 100, 200, 500, 1000, 2500, 5000, 10000, 20000, 50000 i 100000 ng/ml w mieszaninie tj. woda dejonizowana - metanol (50:50 v/v). Roztwory dodawane były w ilořci po 10 µl do odpowiedniej obj6tořci osocza lub krwi uzyskuj6c w ten spos6b obj6tořć 1 ml. Uzyskiwano w ten spos6b roztwory o st6żeniu 100 razy niŹszym niŹ roztw6r wzorcowy, z kt6rych skonstruowano nast6puj6ce krzywe kalibracyjne. Dla 4-OH-AMF we krwi krzyw6 w zakresie 1,0; 2,0; 5,0; 10,0; 25,0 i 50,0 ng/ml a w osoczu szczura 25,0; 50,0; 100; 500 i 1000 ng/ml. Dla S (+) AMF i R (-) AMF we krwi i w osoczu szczura po 10,0; 25,0; 50,0; 100; 500 i 1000 ng/ml.

3.3.3. Bufor PBS

Jedn6 tabletk6 buforu rozpuszczano w zlewce zawieraj6cej około 150 ml wody dejonizowanej. Po zmierzniu pH roztworu, kt6re wynosiło $7,4 \pm 0,1$ roztw6r przeniesiono do kolby miarowej o poj. 200 ml i uzupełniono do kreski.

3.3.4 Bufor octanowy o pH 5,2

Bufor octanowy przygotowano poprzez odwaŹenie 26,88 g tr6jwodnego octanu sodu i rozpuszczeniu w około 150 ml wody dejonizowanej, po czym dodano 4,73 g kwasu octowego i wymieszano. Po zmierzniu pH skorygowano 0,1 M roztworem kwasu solnego lub 0,1 M wodorotlenku sodu i uzupełniono wod6 dejonizowan6 do 250 ml. Uzyskano 250 ml 1 M buforu octanowego o pH 5,2.

3.3.5 Krew pełna

Koncentrat krwinek czerwonych w ilořci 1 jednostki (około 250 ml) przeniesiono do zlewki i uzupełniono 100 ml wody dejonizowanej i wymieszano. Do roztworu dodano nast6pnie 100 ml 1 % roztworu fluorku sodu i wymieszano. Tak uzyskan6 krew poddano badaniom kontrolnym na zawartořć pochodnych amfetaminy.

3.3.6 Roztwór amfetaminy w buforze PBS do podania dożołądkowego

Na wadze analitycznej odważono 68,0 mg siarczanu amfetaminy (zawiera 50,0 mg zasady) i rozpuszczono w 5 ml buforu PBS. Po rozpuszczeniu roztwór przeniesiono do kolby miarowej o poj. 10 ml i uzupełniono do kreski buforem PBS. Uzyskano roztwór amfetaminy w PBS o stężeniu 5 mg/ml.

3.3.7 Faza ruchoma do metody oznaczenia 4-OH-AMF

Odważono 1,261 g mrówczanu amonu, który rozpuszczono w wodzie dejonizowanej w kolbie miarowej o poj. 200 ml, uzyskując w ten sposób roztwór o stężeniu 100 mM/l. W kolejnym etapie do kolby miarowej o poj. 1 l odmierzono 50 ml roztworu mrówczanu amonu o stężeniu 100 mM, 50 ml metanolu o czystości gradientowej i uzupełniono do objętości 1 l acetonitrylem o czystości gradientowej uzyskując w rezultacie roztwór mrówczanu amonu w fazie 5 mM/l. Roztwór przesączono przez sączeł nitrocelulozowy 0,2 μ m.

3.3.8 Faza ruchoma do oznaczenia enancjomerów amfetaminy

Odważono 0,790 g wodorowęglanu amonu, który rozpuszczono w około 800 ml wody dejonizowanej, po czym doprowadzono do pH 11,0 dodając odpowiednią ilość 25 % wodorotlenku amonowego. Po przeniesieniu do kolby miarowej o poj. 1 l uzupełniono wodą dejonizowaną do 1 L uzyskując 100 mM/l roztwór wodorowęglanu amonu o pH 11,0. Roztwór przesączono przez sączeł nitrocelulozowy 0,2 μ m.

3.3.9 Roztwór octanu amonu

Odważono 7,708 g octanu amonu, który następnie rozpuszczono w 1 l wody dejonizowanej. Uzyskano roztwór 0,1 M/l.

3.4. Materiał badawczy

Badania zostały przeprowadzone w Zakładzie Medycyny Sądowej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, z wyjątkiem eksperymentu ze zwierzętami, który przeprowadzono w Zwierzętarni przy Katedrze i Zakładzie Toksykologii UM w Poznaniu. Badanie na zwierzętach przeprowadzono na podstawie uchwały nr 28/2008 z dnia 20.06.2008 Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Poznaniu (załącznik nr 1).

Materiał dowodowy tj. próbki amfetaminy (n=50) poddawane badaniom w Zakładzie Medycyny Sądowej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu były wcześniej zabezpieczone przez funkcjonariuszy Policji na terenie Wielkopolski w latach 2018 – 2020 w ramach postępowań prowadzonych w związku z art 62 Ustawy o przeciwdziałaniu narkomanii. Badaniom poddawano wyłącznie sprawy, które zawierały powyżej 1 g materiału.

Materiał biologiczny w postaci krwi ludzkiej (n = 135, 45 kobiet i 90 mężczyzn) badany w ramach pracy pochodził ze spraw, które analizowane były w Zakładzie Medycyny Sądowej,

na potrzeby postępowań w sprawach karnych na terenie Wielkopolski w latach 2017 – 2020 (kierowanie pod wpływem środków odurzających i substancji psychotropowych i wypadków komunikacyjnych). Zgoda na prowadzenie badań została wydana Uchwałą nr 471/11 przez Komisję Bioetyczną przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (załącznik nr 2). Materiał pochodził od losowo wybranych kobiet i mężczyzn, u których we krwi stwierdzono wyłącznie amfetaminę. Przekazywane materiały zwykle nie zawierają informacji, które pozwalają na ustalanie wieku osób badanych oraz stanu ich zdrowia.

3.5. Metody badawcze

W badaniach zawartości amfetaminy w materiale dowodowym skorzystano z rutynowo stosowanych w Zakładzie Medycyny Sądowej metod badań jakościowych i zawartości amfetaminy technikami chromatografii gazowej sprzężonej z detektorem masowym (GC-MS) i wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detektorem spektrofotometrycznym z szeregiem diod (z ang. diode array detector, DAD). Oceny składu izomerów optycznych w materiałach dokonano opracowaną metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją w postaci tandemowego spektrometru mas (HPLC-MS/MS).

Materiał biologiczny pod kątem zawartości 4-OH-AMF analizowany był opracowaną metodą HPLC-MS/MS z zastosowaniem kolumny HILIC. Analizę zawartości amfetaminy z oceną stosunku enancjomerów przeprowadzono również metodą HPLC-MS/MS z użyciem kolumny chiralnej.

3.6. Analiza jakościowo-ilościowa dowodów rzeczowych

Materiał przekazany do analizy po wstępnej ocenie organoleptycznej był ważony, w przypadku stwierdzenia zawilgocenia materiału suszono go do stałej masy pod dygestorium. Z wysuszonego do stałej masy materiału pobierano naważkę ok. 10 mg, którą rozpuszczano w 1 ml mieszaniny metanol/toluen (50:50 v/v) i po odwirowaniu przenoszono do wialki chromatograficznej i poddawano badaniu w układzie GC-MS. Próbkę o objętości 1 µl nastrzykiwano za pomocą automatycznego podajnika próbek przy temperaturze dozownika 250 °C działającego w trybie bez podziału strumienia gazu (splitless). Rozdział chromatograficzny prowadzono na kolumnie kapilarnej Zebron Guardian ZB-5MS (30 m × 0,25 mm × df 0,25 µm) w gradientowym programie temperaturowym. Temperatura początkowa kolumny (75°C) była utrzymywana przez 1 min., następnie wzrastała liniowo z szybkością 20°C/min. do 275°C i pozostawała niezmienną przez 9 minut. Całkowity czas analizy wynosił 18 minut. Jako gaz nośny stosowano hel o stałym natężeniu przepływu

wynoszącym 1 ml/min. Zastosowano jonizację strumieniem elektronów, których energia wynosiła 70 eV. Prowadzono skanowanie w zakresie mas m/z od 30 do 600 amu.

Kolejną naważkę ok. 100 mg rozpuszczano w wodzie dejonizowanej i poddawano próbie na zawartość jonów siarczanowych z wodnym $BaCl_2$.

Oznaczenie amfetaminy w zabezpieczonym materiale dowodowym wykonano przy użyciu metody HPLC-DAD. Z próbek, gdzie stwierdzono obecność siarczanu amfetaminy pobierano naważki w ilości 1,36 mg (odpowiada zawartości 1 mg w przeliczeniu na wolną zasadę), które rozpuszczano w 1 ml metanolu. Próbkę wytrząsano na wytrząsarce o amplitudzie 1 cm i częstotliwości 280/min. Po odwirowaniu i przeniesieniu do wialek chromatograficznych próbki poddawano analizie, z wykorzystaniem chromatografu cieczowego 1220 Infinity firmy Agilent Technologies na kolumnie Poroshell 120 PVP ($100 \times 2,1$ mm, $2,7 \mu m$). Rozdział dokonywany jest z wykorzystaniem dwukanałowej pompy gradientowej z wbudowanym degazerem próżniowym. Temperatura kolumny podczas procesu wynosi $40^\circ C$. Zastosowana metoda izokratyczna obejmuje wykorzystanie fazy nośnej będącej mieszaniną 1 molowego roztworu fosforanu trietyloamoniowego (TEAP), acetonitrylu i metanolu (85:10:5; v/v/v). Szybkość przepływu wynosi 0,4 ml/min. Pomiaru dokonuje się przy długości fali 206 nm. Całkowity czas analizy to 9 minut. Zawartość amfetaminy w badanej próbce odczytywano z krzywej kalibracyjnej w zakresie 1,56 – 100 % przy limicie oznaczalności 1,56 %.

W celu oznaczenia stosunku enancjomerów w materiale dowodowym z metanolowych roztworów analizowanych metodą HPLC-DAD pobierano próbkę o objętości 1 μl i przenoszono do nowej wialki chromatograficznej. Do próbek dodano 10 μl roztworu wzorca wewnętrznego (0,01 mg/ml roztworu amfetaminy D_5 w metanolu) i uzupełniono fazą ruchomą (100mM roztwór wodorowęglanu amonu o pH 11) do 200 μl . Równolegle przygotowano roztwory wzorcowe ($n=5$) poprzez dodanie po 1 μl wzorca S (+) i R (-) amfetaminy oraz 10 μl wzorca wewnętrznego do wialek chromatograficznych i uzupełnieniu fazą do 200 μl . Tak otrzymane próbki analizowano metodą HPLC-MS/MS opisaną w rozdziale 3.7.2. Stosunek enancjomerów w badanych próbkach wyznaczano zgodnie z równaniem:

$$R/S = \frac{P_{R-enancjomer}}{P_{R-enancjomer IS}} / \frac{P_{S-enancjomer}}{P_{S-enancjomer IS}}$$

gdzie: $P_{R-enancjomer}$ i $P_{R-enancjomer IS}$ to pola powierzchni pików R (-) AMF i R (-) AMF D_5 a $P_{S-enancjomer}$ i $P_{S-enancjomer IS}$ to pola powierzchni pików S (+) AMF i S (+) AMF D_5

3.7. Metody HPLC-MS/MS oznaczania enancjomerów amfetaminy i 4-hydroksyamfetaminy

3.7.1. Metoda oznaczania 4-OH-AMF

Do rutynowego oznaczania amfetaminy i jej pochodnych w Katedrze i Zakładzie Medycyny Sądowej wykorzystuje się metodę HPLC-MS/MS z zastosowaniem typowej kolumny w odwróconym układzie faz (Poroshell 120 EC-18 3,0 mm x 75 mm, 2,7 μ m i fazy ruchomej w postaci 0,05 M buforu kwas mrówkowy/mrówczan amonu o pH 3,2 i acetonitrylu z kwasem mrówkowym 1 ml/l). W rutynowych warunkach chromatograficznych obserwuje się słabą retencję 4-OH AMF, który eluuje w drugiej minucie analizy. Niskie stężenia związku, które występują w materiale biologicznym oraz obecność interferujących składników matrycy nie pozwoliło na opracowanie selektywnej i wystarczająco czułej metody w tych warunkach. W związku z powyższym w celu oznaczenia 4-OH-AMF opracowano metodę HPLC-MS/MS z wykorzystaniem przeznaczonej do analizy substancji polarnych kolumny chromatograficznej, gdzie mechanizm rozdziału oparty jest na oddziaływaniach hydrofilowych (z ang. Hydrophilic interaction liquid chromatography, HILIC).

Analizę prowadzono przy zastosowaniu chromatografu cieczowego Agilent 1200 Series złożonego z degazera próżniowego, pompy binarnej, automatycznego podajnika próbek i termostatowanego kompartamentu kolumny połączonego z tandemowym spektrometrem mas QQQ 6410B firmy Agilent Technologies. Pracą zestawu kierowano z poziomu oprogramowania MassHunter ver. B 08.00.

Rozdział prowadzono na kolumnie z porowatym wypełnieniem Kinetex® 2,6 μ m HILIC (100 $\times$ 2,1 mm, 2,6 μ m) termostatowanej w temperaturze 40°C. Jako optymalnej fazy ruchomej użyto mieszaniny acetonitrylu, metanolu oraz 100 mM roztworu mrówczanu amonu w wodzie dejonizowanej (90:5:5; v/v/v). Przepływ fazy był izokratyczny o natężeniu 0,4 ml/min. Objętość nastrzyku próbki wynosiła 1 μ l a całkowity czas analizy to 6 minut. Detektor masowy typu potrójny kwadrupol wyposażony był w źródło jonizacji typu elektrosprej działającego w polaryzacji dodatniej. Parametry pracy źródła jonów zostały zoptymalizowane za pomocą dedykowanej aplikacji Mass Hunter Source Optimiser w serii nastrzyków wzorców rozpuszczonych w fazie ruchomej. Zoptymalizowane parametry zestawiono w tabeli nr 4.

Tabela 4 Parametry źródła jonizacji detektora masowego dla AMF D₅ oraz 4-OH-AMF.

Napięcie kapilary	4000 V
Przepływ gazu rozpylającego (azotu)	10 l/min.
Temperatura gazu osuszającego (azotu)	350°C
Ciśnienie gazu rozpylającego (azotu)	40 psi

Detektor masowy pracował w trybie monitorowania wielu reakcji (z ang. multiple reaction monitoring, MRM). Doboru parametrów poszczególnych reakcji dla substancji badanych oraz wzorca wewnętrznego dokonano na podstawie nastrzyków wzorców rozpuszczonych w fazie ruchomej. Do wyznaczenia poszczególnych przejść użyto dedykowanego oprogramowania MassHunter Optimiser. Z wyznaczonych przez aplikację przejść MRM dla każdego związku wybrano po dwa przejścia o największej intensywności, które nie miały wspólnych jonów potomnych. Parametry poszczególnych przejść MRM przedstawiono w tabeli nr 5.

Tabela 5. Parametry poszczególnych przejść MRM dla substancji badanych oraz wzorca wewnętrznego.

Nazwa	Jon macierzysty [m/z]	Jon potomny [m/z]	Napięcie fragmentora [V]	Energia kolizji [eV]
4-OH AMF	152,1	135	60	5
	152,1	107	60	17
AMF D ₅	141	124	60	5
	141	93	60	14

3.7.2. Metoda oznaczania enancjomerów amfetaminy

Oznaczenia enancjomerów przeprowadzono metodą HPLC-MS/MS, z wykorzystaniem zestawu chromatograficznego opisanego w rozdziale 3.7.1. Rozdział prowadzono na kolumnie chiralnej Lux® 3 µm AMP (150 × 3,0 mm, 3,0 µm) z prekolumną Lux® 3 µm AMP 2,0 mm termostатовanej w temperaturze 30°C. Fazę ruchomą stanowiły 100 mM/l roztwór wodorowęglanu amonu o pH 11,0 (kanał A) oraz metanol (kanał B). Zastosowano izokratyczny przepływ faz ruchomych w stosunku A 40 % i B 60 % na poziomie 0,42 ml/min. Objętość nastrzyku próbki wynosiła 2 µl a całkowity czas analizy to 12 minut. W celu przepłukania kolumny między nastrzykami na 2 minuty następowała zmiana składu fazy do A 5 % i B 95 %, po czym następował powrót do wcześniejszego składu i wyrównanie przez 2 minuty. Detektor masowy typu potrójny kwadrupol wyposażony był w źródło jonizacji typu elektrosprej działającego w polaryzacji dodatniej. Parametry pracy źródła jonów zostały zoptymalizowane za pomocą dedykowanej aplikacji Mass Hunter

Source Optimiser w serii nastrzyków wzorców rozpuszczonych w fazie ruchomej. Zoptymalizowane parametry zestawiono w tabeli nr 6.

Tabela 6. Parametry źródła jonizacji detektora masowego dla S (+) i R (-) AMF oraz AMF D₅.

Napięcie kapilary	4000 V
Przepływ gazu rozpylającego (azotu)	10 l/min.
Temperatura gazu osuszającego (azotu)	310°C
Ciśnienie gazu rozpylającego (azotu)	40 psi

Detektor masowy pracował w trybie MRM. Parametry poszczególnych przejść MRM przedstawiono w tabeli nr 7.

Tabela 7. Parametry poszczególnych przejść MRM dla substancji badanych oraz wzorca wewnętrznego.

Nazwa	Jon macierzysty [m/z]	Jon potomny [m/z]	Napięcie fragmentora [V]	Energia kolizji [eV]
S (+) i R (-) AMF	136	119	60	5
	136	91	60	14
S (+) i R (-) AMF D ₅	141	124	60	5
	141	93	60	14

3.7.3. Izolacja enancjomerów amfetaminy i 4-hydroksyamfetaminy z krwi i z osocza

Do próbowki polipropylenowej przeniesiono po 1 ml osocza lub krwi i dodano 2 ml 0,1 M roztworu octanu amonu oraz 10 µl wzorca wewnętrznego, po czym wymieszano na mieszadle rolkowym przez 10 minut i odwirowano przy 1400 x g przez 8 minut.

Kolumny SPE kondycjonowano za pomocą 2 ml metanolu i 2 ml 0,1 M octanu amonu i po naniesieniu próbki przemyto 2 ml 0,1 M octanu amonu i osuszono przy podciśnieniu 10 mmHg przez ok 10 minut. Anality desorbowano, za pomocą 2 ml mieszaniny 1-chlorobutanu, izopropanolu oraz roztworu wodorotlenku amonu (80:20:4; v:v:v). Po desorpcji do próbek dodano po 100 µl mieszaniny metanolu z kwasem solnym w stosunku 9:1. Próbkę odparowywano do sucha w wirówce próżniowej w temp 40°C, po czym suchą pozostałość rozpuszczano w 100 µl fazy ruchomej i poddawano analizie.

Uwzględniono, że metabolit 4-OH-AMF jest sprzęgany z kwasem glukuronowym, dlatego krew przed izolacją poddawano hydrolizie enzymatycznej z użyciem beta-glukuronidazy. Metoda hydrolizy próbek krwi została rozwinięta w pracy realizowanej w Katedrze i Zakładzie Medycyny Sądowej w Poznaniu [83] w 2020 roku w oparciu o propozycje L.

Sanches i wsp. [84]. W teście Wilcozona stwierdzono istotny wpływ hydrolizy ($p = 0,0298$) na poziom 4-OH-AMF.

Dla próbek badanych osocza szczura bądź krwi ludzkiej etap izolacji poprzedzono etapem hydrolizy enzymatycznej. Do próbki polipropylenowej przeniesiono po 1 ml osocza lub krwi i dodano 1 ml buforu octanowego o pH 5,2 oraz 20 μ l beta-gukuronidazy *Helix pomatia* i inkubowano w cieplarni w temp. 37°C przez 24 godziny po czym studzono do temperatury pokojowej.

3.8. Walidacja metod oznaczania enancjomerów amfetaminy i 4-hydroksyamfetaminy

W celu przeprowadzenia walidacji metod oznaczania enancjomerów amfetaminy oraz 4-OH-AMF we krwi i osoczu wyznaczono następujące parametry: selektywność, liniowość, granicę wykrywalności (LOD) i granicę oznaczalności (LOQ), efekt matrycowy, precyzję i dokładność oznaczania w ciągu dnia i między dniami oraz odzysk analitów.

3.8.1 Selektywność

Selektywność metod została określona na podstawie analizy chromatogramów uzyskanych dla matryc ($n=6$) niezawierających analitów. Analizowano możliwość interferencji pików pochodzących od składników matrycy z pikami analitów. Kryteria akceptacji to brak sygnału w obszarze retencji badanego związku o intensywności większej niż 20% sygnału dla analitów o stężeniu LOQ i 5% dla wzorca wewnętrznego. Oceny rozdziału enancjomerów amfetaminy dokonano w oparciu o współczynnik rozdziału R , który obliczono zgodnie ze wzorem:

$$R = 2(t_2 - t_1)/(w_1 + w_2)$$

gdzie: t_1 , t_2 – czasy retencji 1 i 2 związku; w_1 , w_2 – szerokość pików 1 i 2 mierzona u podstawy

3.8.2 Liniowość

Krzywe wzorcowe S (+) AMF, R (-) AMF i 4-OH AMF zostały przedstawione jako zależność stosunku pola powierzchni pików analitu do pola powierzchni pików odpowiedniego wzorca wewnętrznego (AMF D₅) od stężenia danego analitu w matrycy. Krzywa wzorcowa dla 4-OH AMF w osoczu obejmowała zakres stężeń 10 do 1000 ng/ml a we krwi 1 – 50 ng/ml. Krzywe wzorcowe dla S (+) AMF, R (-) AMF w obu matrycach zostały przygotowane w zakresie stężeń 10 -1000 ng/ml. Ustalono następujące parametry prostych ($n=4$): współczynnik kierunkowy (a), przesunięcie (b) oraz ich błędy standardowe (odpowiednio S_a i S_b) i współczynnik korelacji (r).

3.8.3 Limit wykrywalności i oznaczalności

Wartość LOD oszacowano jako stężenie analitu, przy którym stosunek powierzchni pików do powierzchni szumów linii podstawowej (S/N) był równy co najmniej 3:1. LOQ wyznaczono

jako najmniejsze stężenie analitu, zapewniające odpowiednią precyzję (współczynnik zmienności $CV \leq 20 \%$) i dokładność (błąd $\leq 20 \%$) oznaczeń.

3.8.4 Precyzja i dokładność

Precyzję oznaczeń wyrażano jako współczynnik zmienności (CV), obliczony zgodnie ze wzorem:

$$CV = SD/C_{\text{sr}} * 100 \%$$

gdzie: CV – współczynnik zmienności [%]; SD – odchylenie standardowe oznaczonych stężeń analitu [ng/ml]; C_{sr} – średnie oznaczone stężenie analitu [ng/ml]. Dokładność oznaczeń w ciągu dnia i między dniami przedstawiono jako różnica między wartością zmierzoną a nominalną zgodnie ze wzorem:

$$\text{błąd } \% = \frac{C_{\text{sr}} - C_{\text{nom}}}{C_{\text{nom}}} * 100 \%$$

gdzie: błąd % – względny błąd oznaczeń [%]; C_{nom} – nominalne stężenie [ng/ml].

Precyzję i dokładność w ciągu dnia wyznaczono poprzez oznaczenie pięciu niezależnych próbek matrycy nastrzykniętych odpowiednim roztworem wzorcowym o znanym stężeniu niskim, średnim i wysokim przygotowanym analogicznie jak krzywa wzorcowa. Precyzję i dokładność między dniami wyznaczono dla takich samych poziomów jak powyżej w ciągu trzech kolejnych dni.

3.8.5 Odzysk i efekt matrycowy enancjomerów amfetaminy oraz 4-OH-AMF z krwi oraz osocza

Odzysk oraz efekt matrycowy znormalizowany względem wzorca wewnętrznego enancjomerów amfetaminy oraz 4-OH-AMF z osocza szczura oraz krwi wyznaczono dla dwóch poziomów analitów (niskie, wysokie) przez porównanie wyników oznaczeń serii składających się z pięciu próbek obciążonego osocza lub krwi, obciążonych ekstraktów oraz odpowiednich roztworów wzorcowych.

W celu oceny odzysku do próbek krwi dodano roboczych roztworów S (+) i R (-) oraz 4-OH-AMF uzyskując stężenie 2,0 i 30 ng/ml dla 4-OH-AMF oraz 25 i 800 ng/ml dla enancjomerów amfetaminy (odpowiednio poziom niski i wysoki) oraz wzorca wewnętrznego. Dla osocza poziomy 4-OH-AMF i enancjomerów wynosiły 25 i 800 ng/ml. Uzyskane serie próbek poddawano izolacji zgodnie z procedurą opisaną w rozdz. 3.7.3. Próbkę drugiej serii po dodaniu wzorca wewnętrznego poddawano izolacji zgodnie z procedurą opisaną w rozdz. 3.7.3. Suche pozostałości w przypadku próbek pierwszej serii rozpuszczono w 100 μ l fazy ruchomej. W przypadku próbek drugiej serii do suchej pozostałości dodano roztwory robocze analitów po czym uzupełniono do 100 μ l fazą ruchomą i analizowano odpowiednią metodą HPLC-MS/MS. Odzysk obliczono według wzoru:

$$\text{odzysk } \% = \frac{P_{\text{ekstr}}/P_{\text{IS}}}{P_{\text{nieekstr}}/P_{\text{IS}}} * 100 \%$$

gdzie: P_{ekstr} – pole powierzchni pików analitu po ekstrakcji, $P_{nieekstr}$ – pole powierzchni pików analitu bez ekstrakcji, P_{IS} – pole powierzchni wzorca wewnętrznego

Dla określenia efektu matrycowego dodatkowo przygotowano serię roztworów wzorcowych badanych związków i wzorca wewnętrznego w fazie ruchomej o zawartości takiej samej jak w próbkach do wyznaczenia odzysku, po czym analizowano odpowiednią metodą HPLC-MS/MS. Efekt matrycowy obliczono zgodnie z równaniem:

$$ME \% = \frac{P_{nieekstr}}{P_{neat}} * 100 \%$$

gdzie: ME % - efekt matrycowy, $P_{nieekstr}$ - pole powierzchni pików analitu bez ekstrakcji, P_{neat} - pole powierzchni wzorca w fazie ruchomej

Efekt matrycowy znormalizowany względem wzorca wewnętrznego obliczono zgodnie z równaniem:

$$ME_{IS-norm} = \frac{ME_{analit}}{ME_{IS}} * 100 \%$$

gdzie: $ME_{IS-norm}$ - efekt matrycowy znormalizowany względem wzorca wewnętrznego, ME_{analit} - efekt matrycowy analitu, ME_{IS} - efekt matrycowy wzorca wewnętrznego

3.9. Procedura wykonania doświadczeń na zwierzętach

3.9.1. Podawanie roztworu amfetaminy, pobrania krwi i oznaczenie amfetaminy i metabolitu

Doświadczenia na szczurach wykonano po uzyskaniu zgody Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Poznaniu (Załącznik 1). Do badań użyto 13 dorosłych osobników szczepu *Wistar* obojga płci. Średnia masa zwierząt w grupie wynosiła $281 \pm 11,99$ g. W okresie 12 godzin poprzedzających badanie zwierzęta nie otrzymywały pokarmu. Losowo wybranemu szczurowi unieruchomionemu przez operatora w pozycji pionowej podawano za pomocą strzykawki wyposażonej w tępo zakończoną metalowym ogranicznikiem sondę dożołądkową 0,5 ml roztworu siarczanu amfetaminy w buforze PBS, po czym zwierzę oznaczano i umieszczano w klatce. Po upływie wyznaczonego czasu zwierzęta kolejno było usypiane mieszaniną ketaminy + ksylazyny (dawka 30-35 + 40-90 mg/kg/m.c.) i zabezpieczano od nich krew do badań. Próbkę krwi pobierano w następujących punktach czasowych 0;0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 8,0; 10;0 12,0 i 24,0 h. Zabezpieczone próbki krwi wirowano przez 10 min. przy 4500 x g po czym oddzielone osocze zamrożono w temperaturze – 20 °C do czasu analizy. Po rozmrożeniu próbki osocza poddawano hydrolizie za pomocą beta-glukuronidazy oraz izolacji amfetaminy i 4-OH-AMF

metodą SPE opisaną w rozdziale 3.7.3. W dalszym etapie oznaczano enancjomery AMF oraz 4-OH-AMF metodami HPLC-MS/MS opisanymi w rozdziale 3.7.1 i 3.7.2.

3.9.2. Analiza farmakokinetyczna AMF i 4-OH-AMF

Analizę farmakokinetyczną AMF i 4-OH-AMF przeprowadzono za pomocą programu Phoenix WinNonlin 8.3.2.116 (Certara, Princeton, NJ, USA) w oparciu o sumę stężeń enancjomerów związku macierzystego i jego metabolitu, znormalizowanych w stosunku do średniej masy ciała szczurów:

$$C_{\text{norm}} = C_{\text{ozn}} \times mc_i / mc_{\text{śr}}$$

gdzie: C_{norm} – stężenie znormalizowane, C_{ozn} – stężenie oznaczone w osoczu i-tego szczura, mc_i – masa ciała i-tego szczura, $mc_{\text{śr}}$ – średnia masa ciała szczurów (281 g). Ponadto stężenia 4-OH-AMF wyrażono jako stężenia AMF, mnożąc je przez współczynnik równy stosunkowi masy cząsteczkowej związku macierzystego i metabolitu (135,21 Da/151,21 Da = 0,8942).

W pierwszym etapie przeprowadzono analizę bezmodelową AMF i 4-OH-AMF. Wartości maksymalnego stężenia (C_{max}) i odpowiadającego mu czasu (T_{max}) odczytano bezpośrednio z wykresu znormalizowanych stężeń związków. Stałą szybkości terminalnej fazy eliminacji (λ) wyznaczono stosując ważenie $1/Y^2$; biologiczny okres półtrwania ($t_{1/2}$) obliczono ze wzoru $\ln 2/\lambda$. Pole pod krzywą stężenia jako funkcji czasu w zakresie od zera do ostatniego zmierzonego stężenia (AUC_{last}) wyznaczono metodą trapezów z interpolacją typu *lin up log down*. Wartość resztkowego pola powierzchni pod krzywą stężenia (AUC_{res}) obliczono jako iloraz ostatniego zmierzonego stężenia i stałej λ . Suma AUC_{last} i AUC_{res} stanowiła pole powierzchni pod krzywą stężenia od zera do nieskończoności (AUC_{inf}). Dodatkowo dla związku macierzystego obliczono pozorny klirens (Cl/F , gdzie F oznacza biodostępność) jako iloraz Dawka/ AUC_{inf} oraz pozorną objętość dystrybucji (V_z/F) ze wzoru: Dawka/($AUC_{\text{inf}} \times \lambda$).

W drugim etapie ustalono model farmakokinetyczny i parametry farmakokinetyczne związku macierzystego. Testowano klasyczny model jedno- i dwukompartментowy, z uwzględnieniem czasu opóźnienia wchłaniania (T_{lag}), ważeniem typu $1/Y_{\text{hat}}^2$ (Y_{hat} – stężenie przewidywane przez model) i parametryzacją typu *micro*. Wartości początkowe (*initial estimates*) stałej szybkości eliminacji (k_e) i pozornej objętości dystrybucji (V/F) ustalono na podstawie parametrów λ i V_z/F uzyskanych w analizie bezmodelowej, przyjmując: $k_e = \lambda$; $V_1/F = V_z/F$ dla modelu jednokompartментowego; $V_1/F = V_2/F = 1/2 V_z/F$ dla modelu dwukompartментowego. Początkowe wartości T_{lag} , stałej szybkości wchłaniania (k_a) oraz stałych szybkości opisujących dystrybucję i eliminację związku z kompartментu centralnego (k_{12} , k_{21} , k_{10}) wynosiły odpowiednio 0,4 h, 1 h^{-1} oraz $0,5 \text{ h}^{-1}$. Optymalny model wybrano na podstawie wartości testów Akaike i Schwartz.

W trzecim etapie zbudowano łączony model farmakokinetyczny związek macierzysty – metabolit, stosując model maksymalnego prawdopodobieństwa (*Maximum Likelihood Model*), dostępny w programie WinNonlin. Wykorzystano przy tym optymalny model farmakokinetyczny AMF ustalony w drugim etapie prac (okazał się nim model jednokompartamentowy): wartości T_{lag} , k_a i V_1/F dla AMF przyjęto jako stałe (*frozen*). Założono, że eliminacja AMF może przebiegać poprzez nieodwracalny metabolizm do 4-OH-AMF (opisany stałą szybkości k_m) lub innymi drogami (opisanymi łącznie stałą szybkości $k_{e,rest}$), w tym przez wydalenie w formie niezmienionej. Dla dyspozycji 4-OH-AMF sprawdzono model jedno- i dwukompartamentowy. Celem zapewnienia identyfikowalności stałych szybkości k_m i $k_{e,rest}$, wartość pozornej objętości dystrybucji V_{1m}/F dla 4-OH-AMF (indeks dolny „m” oznacza metabolit) przyjęto jako równą V_1/F AMF (model jednokompartamentowy dyspozycji) lub wartości V_{1m}/F i V_{2m}/F dla 4-OH-AMF jako równe $\frac{1}{2} V_1/F$ AMF (modelu dwukompartamentowy dyspozycji). Założono, że początkowe wartości (*initial estimates*) stałych k_m i $k_{e,rest}$ wynoszą $\frac{1}{2} k_e$ AMF, początkowa wartość stałej szybkości eliminacji 4-OH-AMF dla modelu jednokompartamentowego wynosi $0,16 \text{ h}^{-1}$ (λ uzyskana w analizie bezmodelowej), a początkowe wartości stałych szybkości dystrybucji i eliminacji 4-OH-AMF z kompartmentu centralnego dla modelu dwukompartamentowego (k_{12m} , k_{21m} , k_{10m}) są równe $0,5 \text{ h}^{-1}$. Zastosowano multiplikatywny model błędu resztkowego, który jest odpowiednikiem ważenia $1/Y_{\text{hat}}^2$ w klasycznym modelu farmakokinetycznym.

3.10. Analiza poziomu enancjomerów amfetaminy oraz 4-OH- AMF we krwi ludzkiej

Badanie zanonimizowanych próbek krwi ludzkiej przekazanych do rutynowych badań na zawartość środków odurzających przeprowadzono pod kątem zawartości enancjomerów amfetaminy oraz poziomu 4-OH-AMF. Izolację ksenobiotyków przeprowadzono po wykonaniu hydrolizy zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale 3.7.3. Oznaczenia S (+) i R (-) amfetaminy oraz 4-OH-AMF dokonano metodą HPLC-MS/MS opisaną w rozdziałach 3.7.1. i 3.7.2.

3.11. Ocena statystyczna

Analizę zmiennych ilościowych przeprowadzono w programie R, wersja 4.1.1. wyliczając średnią, odchylenie standardowe, medianę oraz kwartyle. Porównanie wartości zmiennych ilościowych w dwóch grupach wykonano za pomocą testu Manna-Whitney’a. Porównanie wartości zmiennych ilościowych w trzech i więcej grupach wykonano za pomocą testu Kruskala-Wallisa. Po wykryciu istotnych statystycznie różnic, wykonywano analizę post-hoc testem Dunna w celu zidentyfikowania różniących się istotnie statystycznie grup. Korelacje

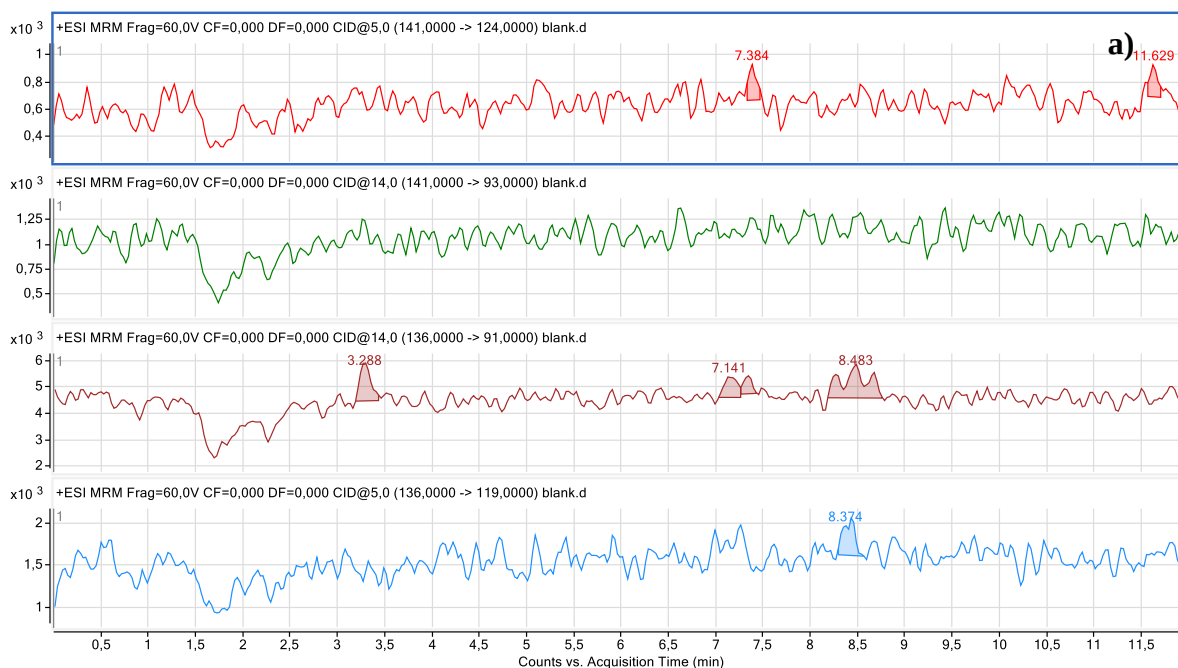
między zmiennymi ilościowymi analizowano za pomocą współczynnika korelacji Spearmana. W analizie przyjęto poziom istotności $\alpha = 0,05$. Wartości $p < 0,05$ interpretowano jako świadczącą o istotnych zależnościach.

Wyniki badań

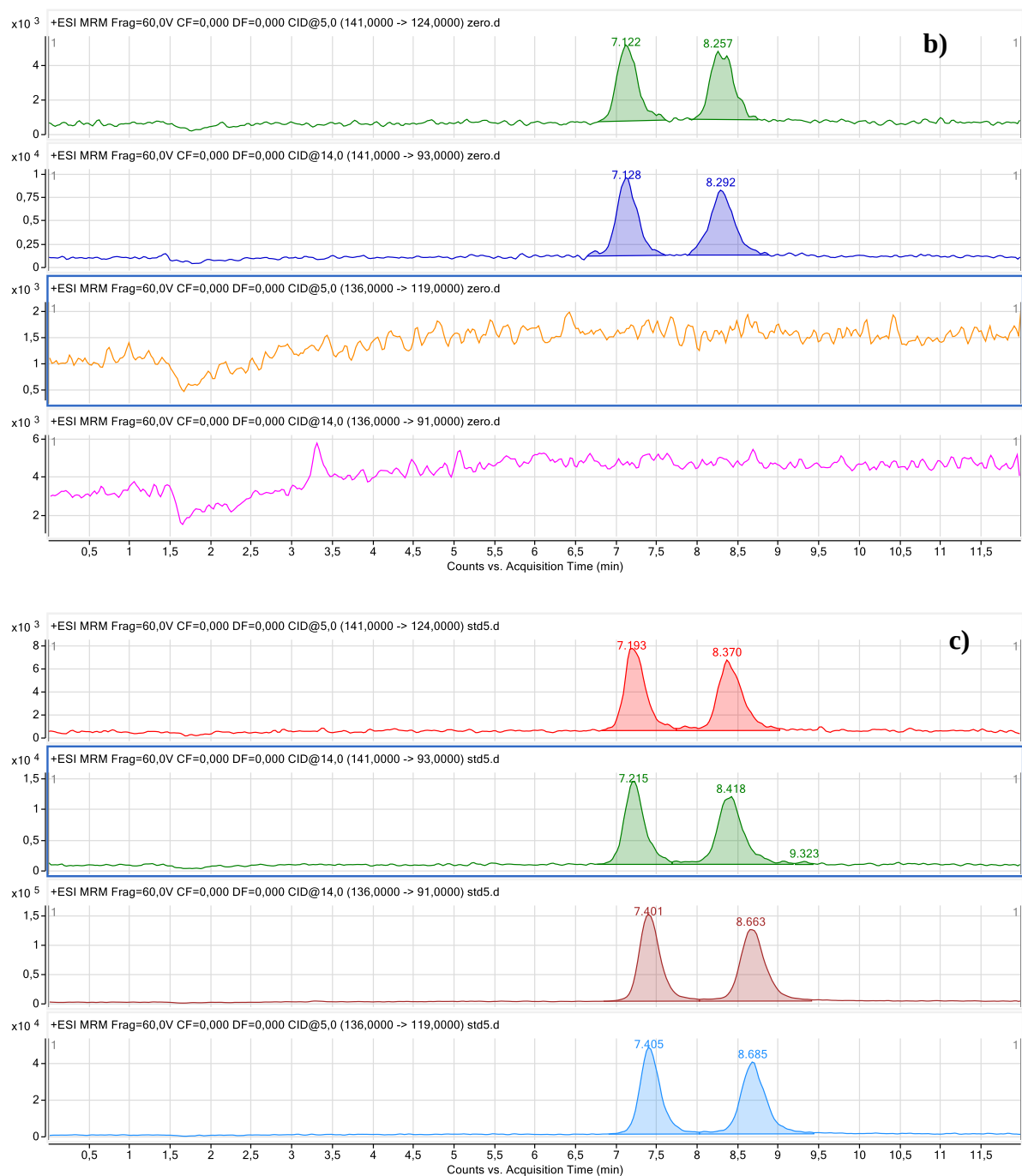
4.1 Oznaczanie 4-OH-AMF oraz enancjomerów amfetaminy metodą HPLC-MS/MS

4.1.1. Selektywność

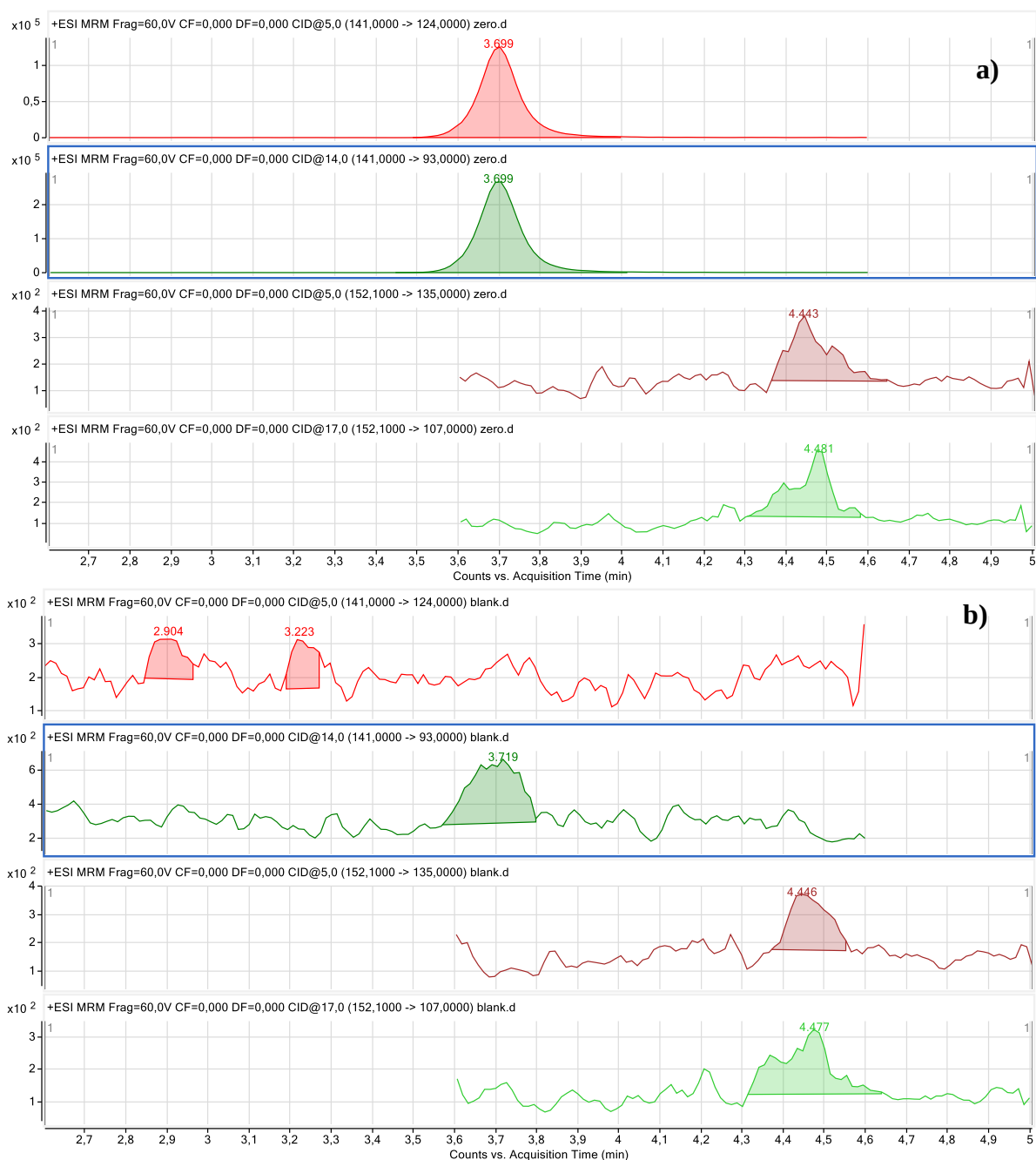
Zoptymalizowane metody HPLC-MS/MS analizy enancjomerów amfetaminy oraz 4-OH-AMF pozwoliły na całkowity rozdział S (+) i R (-) amfetaminy. Uzyskano wysoki współczynnik rozdziału enancjomerów R wynoszący 4,6. W metodzie oznaczenia enancjomerów nie stwierdzono obecności interferencji substancji endogennych. Przykładowe chromatogramy próbki ślepej, próbki zerowej oraz próbki pozytywnej przedstawiono na ryc. 4. W przypadku analizy 4-OH-AMF zastosowanie kolumny oddziaływań hydrofilowych pozwoliło na silniejszą retencję analizowanego związku i uzyskanie znacznej poprawy wartości sygnału do szumu S/N w porównaniu z rutynowo stosowaną kolumną w odwróconym układzie faz. Podobnie jak dla metody oznaczania enancjomerów uzyskano chromatogramy wolne od sygnałów interferujących związków endogennych. Chromatogramy próbki ślepej, zerowej oraz pozytywnej przedstawiono na ryc. 5.



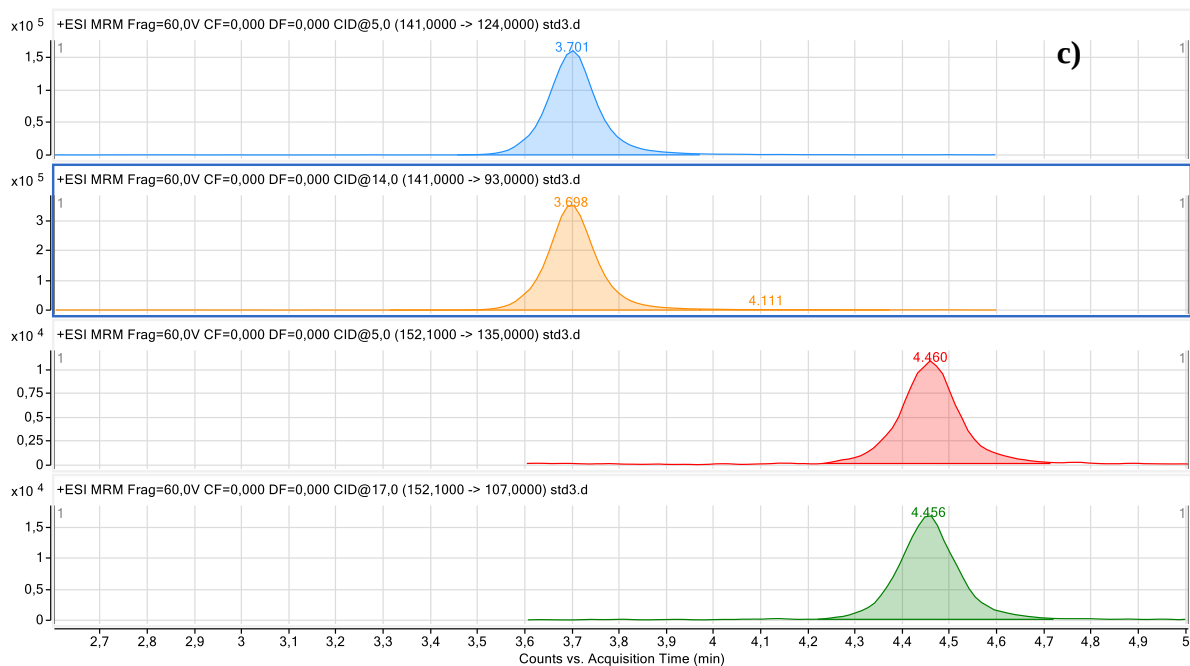
Ryc. 4 Przykładowe chromatogramy (poszczególnych przejść MRM) materiału badanego metodą HPLC-MS/MS na zawartość S (+) i R (-) AMF: a) – próbka ślepa, b) - próbka zerowa i c) – próbka badana. RT 7,19 - S (+) AMF D₅, RT 8,37 - R (-) AMF D₅, RT 7,401 - S (+) AMF i RT 8,66 - R (-) AMF



Ryc. 4 Ciąg dalszy



Ryc. 5 Przykładowe chromatogramy (poszczególnych przejść MRM) materiału badanego metodą HPLC-MS/MS na zawartość 4-OH-AMF: a) – próbka ślepa, b) - próbka zerowa i c) – próbka badana. RT – 3,70 - AMF D₅, RT 4,46 – 4-OH-AMF



Ryc. 5 Ciąg dalszy.

4.1.2. Liniowość

Tabela 8. Parametry krzywych wzorcowych enancjomerów amfetaminy i 4-OH-AMF dla krwi i osocza.

		$a \pm S_a$	$b \pm S_b$	wsp. korelacji r
4-OH-AMF	1 - 50 ng/ml	$0,014849 \pm 0,000681$	$0,0260755 \pm 0,000399$	0,998
4-OH-AMF	10-1000 ng/ml	$0,031035 \pm 0,000452$	$0,20447 \pm 0,0449$	0,999
S (+) krew	10-1000 ng/ml	$0,070247 \pm 0,000579$	$- 0,34110 \pm 0,0559$	0,999
S (+) osocze	10-1000 ng/ml	$0,080139 \pm 0,000587$	$- 0,62591 \pm 0,0854$	0,999
R (+) krew	10-1000 ng/ml	$0,071311 \pm 0,000458$	$- 0,31011 \pm 0,0455$	0,999
R (-) osocze	10-1000 ng/ml	$0,077454 \pm 0,000556$	$- 0,65405 \pm 0,0485$	0,999

4.1.3 LOD i LOQ

Wyznaczony limit oznaczalności dla 4-OH-AMF we w osoczu i we krwi dla $S/N = 3$ wynosiły odpowiednio 0,6 i 0,7 ng/ml. Dla S (+) AMF i R (-) AMF we krwi i osoczu wnosły odpowiednio 0,6 i 0,7 oraz 0,9 i 1,1 ng/ml. LOQ dla 4-OH-AMF we krwi wyznaczono na

poziomie 1,0 ng/ml. LOQ w osoczu oraz we krwi dla 4-OH-AMF, S (+) AMF i R (-) AMF przyjęto najniższy poziom kalibracyjny wynoszący 10 ng/ml.

4.1.4. Precyzja i dokładność

Tabela 9. Precyzja i dokładność 4-OH-AMF we krwi i osoczu.

Stężenie nominalne [ng/ml]	Średnie stężenie oznaczone [ng/ml]	Precyzja CV [%]	Dokładność [%]
Powtarzalność w ciągu dnia dla krwi n= 5			
2,00	2,21	10,90	10,5
10,0	10,7	9,67	7,00
30,0	31,4	6,40	4,6
Powtarzalność między dniami dla krwi n= 3			
2,00	2,17	12,9	8,5
10,0	10,7	8,88	7,00
30,0	31,1	1,77	3,6
Powtarzalność w ciągu dnia dla osocza n=5			
25,0	26,1	3,4	4,4
200	212	1,81	6,0
800	839	1,75	4,7
Powtarzalność między dniami dla osocza n=3			
25,0	26,3	2,60	5,2
200	215	1,99	7,50
800	844	1,78	5,5

Tabela 10. Precyzja i dokładność S (+) AMF we krwi i osoczu.

Stężenie nominalne [ng/ml]	Średnie stężenie oznaczone [ng/ml]	Precyzja CV [%]	Dokładność [%]
Powtarzalność w ciągu dnia dla krwi n = 5			
25,0	24,6	3,13	- 1,60
200	189	4,90	- 5,50
800	788	1,40	- 2,75
Powtarzalność między dniami dla krwi n = 3			
25,0	24,5	2,90	- 2,00
200	190	2,88	- 5,00
800	809	1,99	1,12
Powtarzalność w ciągu dnia dla osocza n =5			
25,0	25,2	1,48	0,80
200	205	1,81	2,50
800	810	1,67	1,25
Powtarzalność między dniami dla osocza n =3			
25,0	25,9	1,60	3,6
200	201	1,99	0,50
800	813	1,78	1,62

Tabela 11. Precyzja i dokładność R (-) AMF we krwi i osoczu.

Stężenie nominalne [ng/ml]	Średnie stężenie oznaczone [ng/ml]	Precyzja CV [%]	Dokładność [%]
Powtarzalność w ciągu dnia dla krwi n= 5			
25,0	24,5	2,9	- 2,00
200	195	3,99	- 2,50
800	790	1,60	-1,25
Powtarzalność między dniami dla krwi n= 3			
25,0	24,4	2,35	- 2,4
200	190	1,90	- 2,0
800	788	2,20	- 1,50
Powtarzalność w ciągu dnia dla osocza n=5			
25,0	25,6	1,10	1,50
200	210	1,90	5,00
800	813	1,65	1,62
Powtarzalność między dniami dla osocza n=3			
25,0	25,9	1,65	3,60
200	207	1,90	3,50
800	812	1,78	1,50

4.1.5. Odzysk i efekt matrycowy

Tabela 12. Odzysk 4-OH-AMF i stereoizomerów amfetaminy z krwi i osocza.

Stężenie nominalne [ng/ml]	Odzysk $\pm$ SD [%]	CV [%]
4-OH-AMF krew n=5		
2,00	72,5 $\pm$ 3,95	5,44
30,0	76,4 $\pm$ 6,75	8,83
4-OH-AMF osocze n=5		
25,0	75,6 $\pm$ 8,12	10,7
800	76,6 $\pm$ 6,98	9,11
S (+) AMF krew n = 5		
25,0	79,9 $\pm$ 6,33	7,92
800	81,3 $\pm$ 5,40	6,64
S (+) AMF osocze n = 5		
25,0	83,3 $\pm$ 4,45	5,34
800	78,9 $\pm$ 3,78	4,79
R (-) AMF krew n = 5		
25,0	78,9 $\pm$ 5,25	6,65
800	79,9 $\pm$ 4,45	5,56
R (-) AMF osocze n = 5		
25,0	81,9 $\pm$ 6,98	8,52
800	80,2 $\pm$ 5,12	6,38

Tabela 13. Efekt matrycowy 4-OH-AMF i stereoizomerów amfetaminy z krwi i osocza.

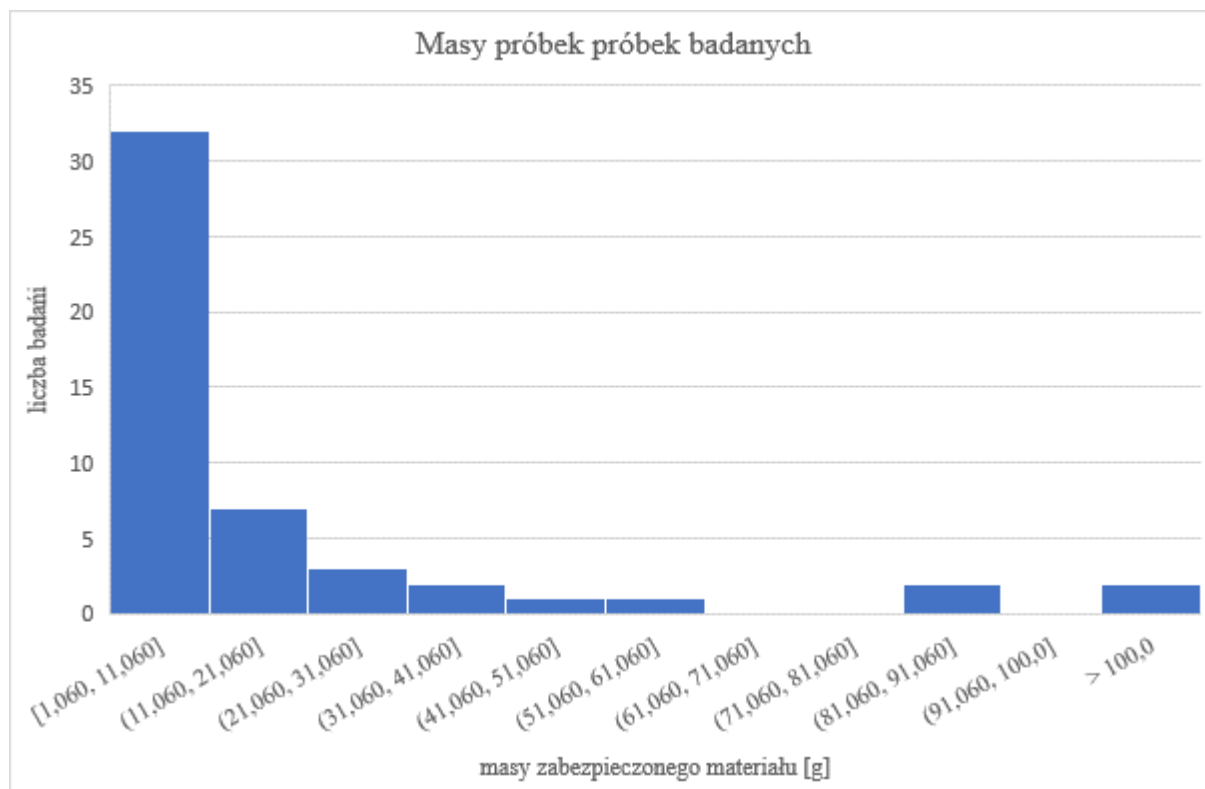
Stężenie nominalne [ng/ml]	ME $\pm$ SD [%]	ME _{IS} $\pm$ SD [%]	ME _{IS-norm} [%]
4-OH-AMF krew n=5 stężenie IS 100 ng/ml			
2,00	82,5 $\pm$ 3,75	90,0 $\pm$ 8,05	91,1
30,0	88,1 $\pm$ 4,55		97,8
4-OH-AMF osocze n=5 stężenie IS 100 ng/ml			
25,0	88,6 $\pm$ 3,98	92,2 $\pm$ 6,23	96,0
800	106 $\pm$ 7,89		114
S (+) AMF krew n = 5 stężenie IS 100 ng/ml			
25,0	90,0 $\pm$ 4,25	90,0 $\pm$ 8,05	100
800	101 $\pm$ 3,78		112
S (+) AMF osocze n = 5 stężenie IS 100 ng/ml			
25,0	89,4 $\pm$ 4,89	92,2 $\pm$ 6,23	96,9
800	109 $\pm$ 3,78		118
R (-) AMF krew n = 5 IS 100 ng/ml			
25,0	88,9 $\pm$ 6,37	90,0 $\pm$ 8,05	98,7
800	99,5 $\pm$ 4,45		110
R (-) AMF osocze n = 5 IS 100 ng/ml			
25,0	88,6 $\pm$ 8,25	92,2 $\pm$ 6,23	96,0
800	104 $\pm$ 7,23		112

4.2. Wynik badania materiału dowodowego

Tabela 14. Wyniki badania zawartości i składu dowodów rzeczowych zawierający amfetaminę.

Nr sprawy	Masa dowodu [g]	Zawartość siarczanu AMF [%]	Zawartość zasady AMF [%]	Wynik badania GC-MS	Postać	stosunek R/S
1	17,86	12	8,4	kofeina	siarczan	1,03
2	14,12	15,1	10,5	kofeina	siarczan	1,05
3	17,08	6,5	4,5	kofeina	siarczan	1,02
4	83,63	12	8,4	kofeina i lidokaina	siarczan	0,93
5	1,89	5	3,5	kofeina	siarczan	0,98
6	22,15	65,5	45,8	kofeina	siarczan	0,98
7	1,73	80	56	kofeina	siarczan	1,06
8	1,22	46	32,	kofeina	siarczan	1,00
9	329,41	6,5	4,5	kofeina	siarczan	1,04
10	7,93	9,8	6,8	kofeina	siarczan	1,00
11	13,77	8,9	6,2	kofeina	siarczan	1,02
12	49,27	10	7	kofeina	siarczan	1,02
13	2,39	7,8	5,4	kofeina	siarczan	1,01
14	2,71	7	4,9	kofeina	siarczan	0,95
15	10,22	10	7	kofeina	siarczan	1,12
16	1,89	19	13,3	kofeina	siarczan	1,01
17	1,4	27	18,9	kofeina	siarczan	0,94
18	3,28	15	10,5	kofeina	siarczan	0,93
19	3,79	24	16,8	kofeina	siarczan	1,01
20	7,13	9	6,3	kofeina	siarczan	1,03

21	12,35	33	23,1	kofeina	siarczan	1,01
22	40,56	21	14,7	kofeina	siarczan	1,04
23	1,06	6	4,2	kofeina	siarczan	1,04
24	11,25	11,6	8,12	kofeina	siarczan	0,98
25	1,16	22,5	15,75	kofeina	siarczan	1,04
26	24,62	17	11,9	kofeina	siarczan	1,01
27	5,12	17	11,9	kofeina	siarczan	1,03
28	2,69	26	18,2	kofeina	siarczan	0,91
29	4,46	22	15,4	kofeina	siarczan	0,90
30	40,12	11	7,7	kofeina	siarczan	0,99
31	1,12	24,5	17,1	kofeina	siarczan	1,02
32	880,5	50	35	kofeina	siarczan	1,06
33	53,18	16,5	11,5	kofeina	siarczan	1,01
34	2,18	20	14	kofeina	siarczan	1,04
35	2,83	11	7,7	kofeina	siarczan	0,97
36	12,1	26	18,2	kofeina	siarczan	1,07
37	1,33	41	28,7	kofeina	siarczan	0,97
38	1,4	20	14	kofeina	siarczan	0,99
39	6,49	21	14,7	kofeina	siarczan	1,00
40	4,79	21	14,7	kofeina	siarczan	1,02
41	3,41	34,5	24,1	kofeina	siarczan	0,99
42	3,31	27	18,9	kofeina	siarczan	1,02
43	6,82	48,5	33,9	kofeina	siarczan	1,07
44	2,56	40	28	kofeina	siarczan	1,02
45	2,29	16,5	11,55	kofeina	siarczan	1,04
46	26,16	8,1	5,67	kofeina	siarczan	1,03
47	88,64	22,5	15,7	kofeina	siarczan	1,01
48	6,28	38,5	26,9	kofeina	siarczan	1,07
49	2,31	19,5	13,6	kofeina	siarczan	1,07
50	2,57	24	16,8	kofeina	siarczan	0,98
średnia	36,93	22,2	15,5	-	-	1,01
SD	131,14	15,5	10,8	-	-	0,04
CV %	355,3	68,5	69,8	-	-	3,84
Mediana	4,95	19,7	13,8	-	-	1,01



Ryc. 6 Rozkład mas zabezpieczanych dowodów rzeczowych.

4.3. Wynik badania osocza szczurów po podaniu amfetaminy oraz ustalenie parametrów farmakokinetycznych.

Wyniki analizy osocza szczurów na zawartość amfetaminy i 4-OH-AMF przedstawiono w tabeli 15.

Tabela 15. Wyniki oznaczenia enancjomerów amfetaminy oraz 4-OH-AMF po dożołądkowym podaniu racemicznej amfetaminy w dawce 10 mg/kg/m.c.

t [h]	S (+) AMF [ng/ml]	R (-) AMF [ng/ml]	4-OH AMF [ng/ml]	suma AMF [ng/ml]	masa szczura [g]
0					278
0,5	515,0	315,5	98,4	830,6	276,2
1	939,0	696,4	164,7	1635,4	282,8
1,5	842,8	720,6	232,0	1563,5	266,1
2	765,3	490,2	457,1	1255,4	296,2
3	614,8	349,9	882,4	964,7	295,3
4	421,7	189,4	764,6	611,1	274,3
5	417,6	189,2	446,9	606,8	289
6	374,0	181,6	447,8	555,6	302
8	136,3	81,6	307,8	217,9	279,6
10	70,5	31,0	221,8	101,5	264
12	38,3	21,1	201,7	59,4	283
24	<LOQ	<LOQ	23,8	<LOQ	267,3

Wyniki analizy bezmodelowej enancjomerów amfetaminy przedstawiono w tabeli 16

Tabela 16. Parametry farmakokinetyczne enancjomerów amfetaminy po dożołądkowym podaniu racemicznej amfetaminy w dawce 10 mg/kg/m.c. (farmakokinetyka bezmodelowa).

Parametr	S (+) AMF	R (-) AMF
λ [1/h]	0,316	0,288
$t_{1/2}$ [h]	2,40	2,19
AUC_{inf} [h* μ g/l]	4250,7	2513,6
AUC_{last} [h* μ g/l]	4129,6	2443
C_{max} [μ g/l]	939	720
T_{max} [h]	1,5	1
V_z/F [l]	0,929	1,726
Cl/F [l/h]	0,294-	0,497

Tabela 17 Parametry farmakokinetyczne amfetaminy oraz 4-OH-AMF po dożołądkowym podaniu racemicznej amfetaminy w dawce 10 mg/kg/m.c. (farmakokinetyka bezmodelowa).

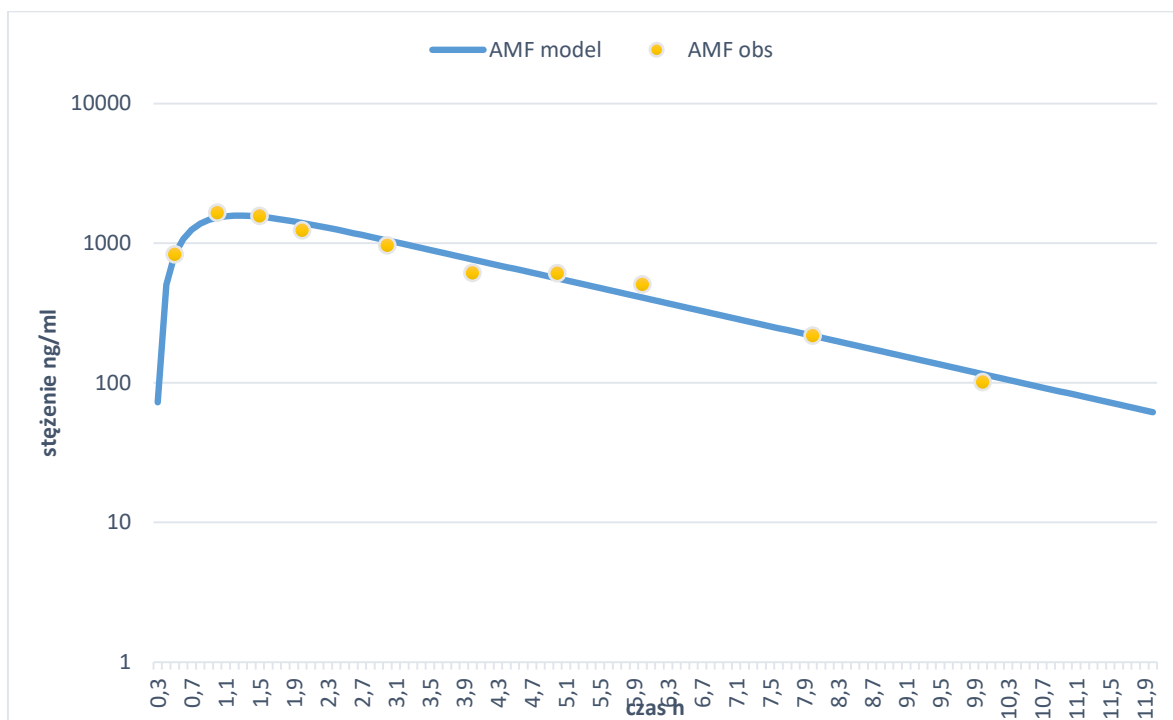
Parametr	4-OH-AMF	AMF
λ [1/h]	0,164	0,310
$t_{1/2}$ [h]	4,205	2,235
AUC_{inf} [h* μ g/l]	5730,9	6768,5
AUC_{last} [h* μ g/l]	5586,5	6577,0
C_{max} [μ g/l]	882,4	1635,4
T_{max} [h]	3	1
V_z/F [l]	-	1,191
Cl/F [l/h]	-	0,369

Farmakokinetykę amfetaminy lepiej opisywał model jednokompartmentowy niż dwukompartmentowy, o czym świadczyły mniejsze wartości uzyskane w testach Akaike i Schwartz: odpowiednio -8,79 vs -8,19 i -7,20 vs -5,80. Ważony współczynnik korelacji dla

klasycznego modelu jednokompartamentowego amfetaminy wynosił 0,985. Dopasowanie tego modelu do obserwowanych stężeń AMF przedstawiono na Ryc. 7.

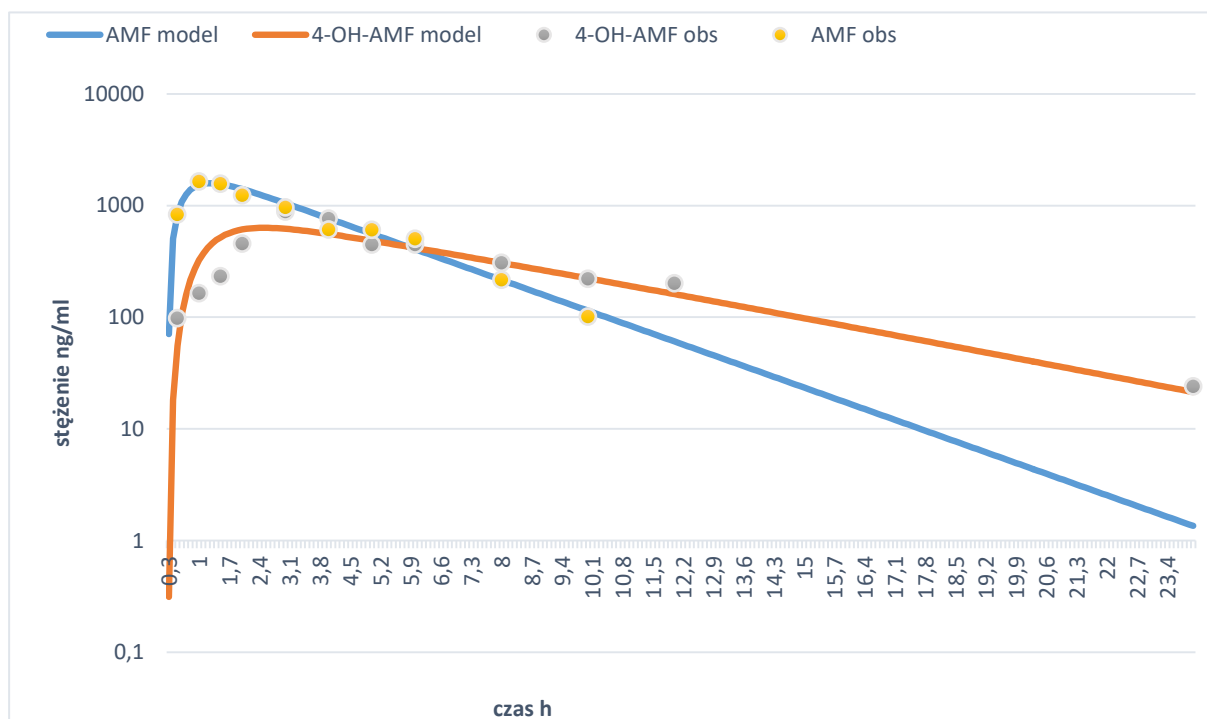
Tabela 18. Wynik analizy amfetaminy dla modelu jednokompartamentowego.

Parametr	Wartość	Błąd standardowy	CV %
T_{lag} [h]	0,285	0,140	49,13
k_a [1/h]	2,394	1,439	60,14
k_e [1/h]	0,315	0,020	6,524
$t_{1/2}$ [h]	2,199	0,143	6,517
$V1/F$ [l]	1,165	0,116	9,953
Cl/F [l/h]	0,367	0,020	5,675
AUC_{inf} [h* μ g/l]	6804,3	385,8	5,669
T_{max} [h]	1,260	0,249	19,775
C_{max} [μ g/l]	1577,0	182,3	11,56



Ryc. 7 Wykres półlogarytmiczny zmian stężenia amfetaminy w modelu jednokompartamentowym po dożylkowym podaniu racemicznej amfetaminy w stężeniu 10 mg/kg/mc.

Celem wyznaczenia stałej szybkości przemiany AMF do 4-OH-AMF (k_m) zbudowano łączony model farmakokinetyczny obejmujący związek macierzysty i metabolit. Dyspozycję 4-OH-AMF lepiej opisywał model dwukompartментowy niż jednokompartментowy, na co wskazywały niższe wartości testów Akaika i Schwartza – odpowiednio 283,1 vs 298,8 i 291,0 vs 304,5. Dopasowanie pełnego modelu związek macierzysty – metabolit do obserwowanych stężeń AMF i 4-OH-AMF przedstawiono na Ryc. 8



Ryc. 8 Wykres półlogarytmiczny zmian stężenia amfetaminy i 4-OH-AMF w modelu dwukompartментowym po dożładowym podaniu racemicznej amfetaminy w stężeniu 10 mg/kg/mc.

Analiza farmakokinetyczna przeprowadzona na podstawie zbudowanego modelu wykazała, że praktycznie cała podana ilość AMF ulega metabolizmowi do 4-OH-AMF, co wskazuje, że szlak ten jest główną drogą eliminacji AMF u szczurów. Parametry farmakokinetyczne uzyskane dla łączonego modelu przedstawia Tabela 19.

Tabela 19. Wynik analizy 4-OH-AMF w modelu dwukompartментowym.

Parametr	Wartość	Błąd standardowy	CV %
$T_{lag (frozen)}$ [h]	0,285	ND	ND
$k_a (frozen)$ [1/h]	2,394	ND	ND
k_m [1/h]	0,316	0,111	35,12
$k_{e \text{ rest.}}$ [1/h]	9,60E-13	0,111	1,16E+13

$V1/F_{(frozen)}$ [l]	1,165	ND	ND
k_{12m} [l/h]	0,687	0,751	109,2
k_{21m} [l/h]	0,359	0,236	65,72
k_{em} [l/h]	0,798	0,298	37,36
$V_{1m}/F_{(frozen)}$ [l]	0,583	ND	ND
$V_{2m}/F_{(frozen)}$ [l]	0,583	ND	ND

4.3 Wyniki badania krwi na zawartość enancjomerów amfetaminy oraz 4-OH-AMF

Tabela 20. Wyniki oznaczeń enancjomerów amfetaminy 4-OH-AMF we krwi kobiet.

Próbka	R (-) [ng/ml]	S (+) [ng/ml]	Stosunek R/S	suma R i S [ng/ml]	4-OH-AMF [ng/ml]
1	119,6	80,5	1,49	200,0	2,40
2	82,9	71,6	1,16	154,5	2,23
3	648,9	502,7	1,29	1151,5	3,32
4	58,8	49,1	1,20	108,0	2,90
5	156,8	116,1	1,35	272,9	3,32
6	363,3	259,8	1,40	623,2	3,51
7	197,6	108,7	1,82	306,3	2,08
8	195,7	154,9	1,26	350,6	3,13
9	235,6	132,5	1,78	368,1	2,22
10	27,3	25,3	1,08	52,6	2,06
11	420,8	364,9	1,15	785,7	5,50
12	63,9	52,0	1,23	115,9	0,00
13	170,8	143,6	1,19	314,5	2,18
14	235,1	173,9	1,35	409,1	2,21
15	110,2	73,8	1,49	184,0	2,37
16	51,6	39,0	1,32	90,6	< LOQ
17	118,6	95,0	1,25	213,5	2,18
18	188,8	134,9	1,40	323,7	2,30
19	34,3	26,4	1,30	60,7	< LOQ
20	128,4	79,9	1,61	208,3	2,12
21	120,0	105,9	1,13	225,9	3,81
22	116,2	85,6	1,36	201,7	3,15
23	200,3	134,6	1,49	334,9	2,07
24	81,4	65,3	1,25	146,7	< LOQ
25	214,1	155,0	1,38	369,1	< LOQ
26	218,6	131,4	1,66	350,1	2,71
27	177,2	126,8	1,40	304,0	2,61
28	97,6	72,2	1,35	169,8	2,20
29	30,1	21,1	1,43	51,3	2,10
30	139,8	117,4	1,19	257,1	2,41

31	154,4	127,3	1,21	281,6	1,92
32	311,7	242,5	1,29	554,2	1,89
33	69,6	49,6	1,40	119,2	2,53
34	12,4	11,5	1,08	23,9	1,96
35	132,4	91,1	1,45	223,5	2,10
36	209,9	153,4	1,37	363,3	2,83
37	213,5	148,9	1,43	362,4	< LOQ
38	125,4	91,1	1,38	216,5	3,89
39	357,8	251,8	1,42	609,6	3,14
40	236,9	170,8	1,39	407,7	2,74
41	227,0	150,7	1,51	377,7	2,60
42	97,0	74,9	1,29	171,9	1,97
43	272,1	189,9	1,43	462,0	2,15
44	69,8	50,8	1,37	120,6	< LOQ
45	88,0	72,6	1,21	160,7	2,49

Tabela 21. Wyniki oznaczeń enancjomerów amfetaminy 4-OH-AMF we krwi mężczyzn.

Próbka	R (-) [ng/ml]	S (+) [ng/ml]	Stosunek R/S	suma R i S [ng/ml]	4-OH-AMF [ng/ml]
1	243,6	163,4	1,49	407,1	2,38
2*	12,9	61,7	0,21	74,5	2,99
3	503,5	344,5	1,46	848,0	2,18
4	385,5	252,8	1,52	638,3	2,43
5	351,1	267,5	1,31	618,6	2,13
6	332,6	220,8	1,51	553,4	1,78
7	13,6	11,2	1,22	24,8	< LOQ
8	115,3	77,3	1,49	192,7	2,25
9	331,7	197,5	1,68	529,1	2,04
10	169,8	98,6	1,72	268,4	2,33
11	124,9	78,3	1,60	203,1	2,98
12	661,9	477,8	1,39	1139,7	6,38
13	175,2	132,3	1,32	307,5	3,06
14	386,5	263,8	1,47	650,3	3,47
15	121,7	102,7	1,19	224,3	5,29
16	328,7	249,6	1,32	578,3	1,97
17	371,6	241,7	1,54	613,2	2,38
18	36,1	22,1	1,63	58,2	1,98
19	242,8	180,8	1,34	423,6	2,34
20	616,2	339,6	1,81	955,7	2,46
21	381,1	247,4	1,54	628,6	2,33
22	75,5	61,4	1,23	136,9	3,27
23	123,5	93,1	1,33	216,7	2,65
24	44,1	48,2	0,92	92,4	2,73
25	107,4	75,8	1,42	183,2	2,52
26	58,7	50,8	1,16	109,5	2,72
27	29,4	27,3	1,08	56,7	2,04

28	59,1	46,1	1,28	105,1	2,29
29	435,6	293,5	1,48	729,2	3,08
30	237,4	181,2	1,31	418,6	2,33
31	201,2	149,4	1,35	350,6	3,45
32	219,4	150,6	1,46	370,0	3,18
33	83,5	58,8	1,42	142,3	2,14
34	109,7	84,6	1,30	194,3	2,08
35	47,9	38,9	1,23	86,8	2,79
36	45,5	43,6	1,04	89,1	2,85
37	901,2	737,5	1,22	1638,6	2,74
38	42,9	34,9	1,23	77,9	1,99
36	139,5	110,5	1,26	250,0	2,84
40	422,9	381,5	1,11	804,4	2,34
41	421,4	374,4	1,13	795,8	2,38
42	190,6	109,7	1,74	300,3	2,73
43	278,2	175,8	1,58	454,0	2,44
44	322,2	217,4	1,48	539,6	2,60
45	112,8	69,2	1,63	182,0	2,57
46	238,4	148,3	1,61	386,7	2,14
47	95,8	71,9	1,33	167,7	2,64
48	151,9	118,5	1,28	270,4	2,39
49	183,8	139,6	1,32	323,4	3,70
50	74,6	56,3	1,32	131,0	1,91
51	417,2	327,8	1,27	745,0	5,52
52	210,3	143,7	1,46	354,0	2,89
53	120,3	77,4	1,55	197,7	2,60
54	162,6	90,0	1,81	252,6	1,97
55	171,3	94,5	1,81	265,7	2,03
56	27,6	25,4	1,08	53,0	1,93
57	105,0	88,7	1,18	193,8	5,58
58	62,3	57,4	1,09	119,7	1,80
59	144,6	105,7	1,37	250,3	3,79
60	391,4	279,7	1,40	671,1	8,45
61	187,3	95,7	1,96	283,1	1,99
62	32,6	22,4	1,45	55,1	2,06
63	220,5	125,7	1,75	346,2	2,74
64	103,0	71,0	1,45	174,0	4,22
65	68,3	59,0	1,16	127,4	2,31
66	578,9	393,5	1,47	972,5	3,25
67	267,8	184,5	1,45	452,3	3,12
68	265,5	186,8	1,42	452,4	4,08
69	148,5	109,7	1,35	258,2	2,94
70	14,3	12,8	1,11	27,1	1,89
71	325,6	263,8	1,23	589,4	2,34
72	46,8	36,5	1,28	83,2	2,33
73	193,2	123,1	1,57	316,3	2,53
74*	9,8	54,8	0,18	64,5	1,97
75	67,6	50,5	1,34	118,1	2,17

76	366,3	265,3	1,38	631,6	2,77
77	484,2	336,3	1,44	820,5	4,83
78	125,8	80,5	1,56	206,3	2,57
79	380,1	263,1	1,44	643,2	4,22
80	98,5	76,6	1,29	175,1	2,67
81	206,1	151,0	1,36	357,1	2,53
82	125,4	88,5	1,42	213,9	3,52
83	357,7	265,0	1,35	622,7	3,58
84	227,9	170,9	1,33	398,8	3,52
85	49,2	35,3	1,39	84,4	1,95
86	271,8	193,5	1,40	465,3	3,09
87	68,7	46,5	1,48	115,2	2,45
88	104,4	87,7	1,19	192,1	2,39
89	27,9	20,5	1,36	48,4	1,93
90	135,4	100,2	1,35	235,6	3,03

* w próbkach nr 2 i nr 74, gdzie stosunek R/S < 1 potwierdzono fakt przyjmowania amfetaminy ze wskazań medycznych, wyniki nie były uwzględniane w obliczeniach statystycznych.

Tabela 22. Poziomy amfetaminy notowane w próbkach poddawanych badaniom.

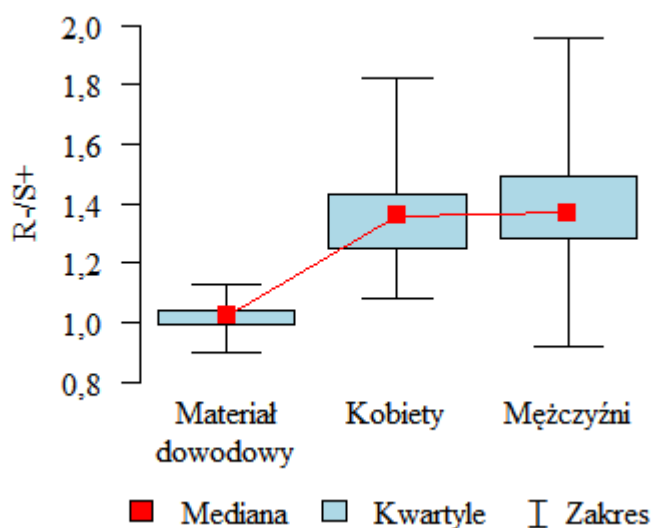
Suma R (-) i S (+)	Grupa		
	Kobiety (n=45)	Mężczyźni (n=88)	Łącznie (n=133)
Do 100 ng/ml	5 (11,11%)	13 (14,77%)	18 (13,53%)
100-200 ng/ml	10 (22,22%)	19 (21,59%)	29 (21,80%)
200-300 ng/ml	10 (22,22%)	14 (15,91%)	24 (18,05%)
300-400 ng/ml	12 (26,67%)	11 (12,50%)	23 (17,29%)
400-500 ng/ml	3 (6,67%)	7 (7,95%)	10 (7,52%)
500-600 ng/ml	1 (2,22%)	5 (5,68%)	6 (4,51%)
600-700 ng/ml	2 (4,44%)	9 (10,23%)	11 (8,27%)
700-800 ng/ml	1 (2,22%)	3 (3,41%)	4 (3,01%)
800-900 ng/ml	0 (0,00%)	3 (3,41%)	3 (2,26%)
900-1000 ng/ml	0 (0,00%)	2 (2,27%)	2 (1,50%)
Ponad 1000 ng/ml	1 (2,22%)	2 (2,27%)	3 (2,26%)

4.4. Ocena statystyczna wyników badań materiału dowodowego oraz biologicznego.

Tabela 23. Porównanie stosunku R/S amfetaminy w dowodach rzeczonych i materiale biologicznym dla kobiet i mężczyzn.

Parametr		Material dowodowy - A (n=50)	Kobiety - B (n=45)	Mężczyźni - C (n=88)	P
R-/S+	śr±SD	1,02±0,04	1,36±0,16	1,39±0,19	p<0,001
	mediana	1,02	1,36	1,37	
	kwartyle	0,99 - 1,04	1,25 - 1,43	1,28 - 1,49	C,B>A

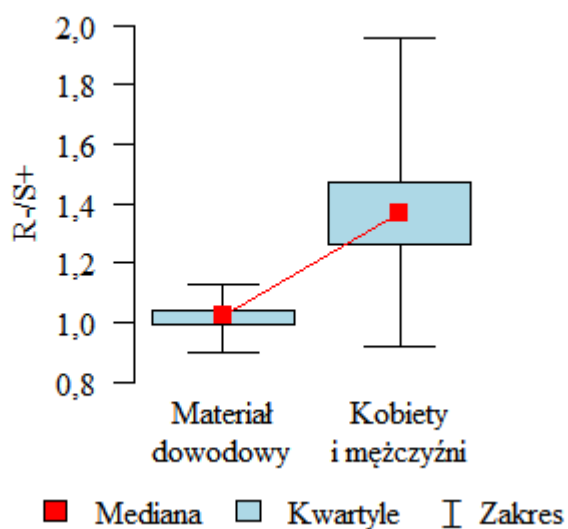
p - test Kruskala-Wallisa + analiza post-hoc (test Dunna)



Ryc. 9 Porównanie stosunku R (-) i S (+) AMF w badanych dowodach rzeczowych oraz materiale biologicznym zabezpieczonym od kobiet i od mężczyzn.

Tabela 24. Porównanie stosunku R/S amfetaminy w dowodach rzeczonych i materiale biologicznym dla kobiet i mężczyzn łącznie.

Parametr		Grupa		P
		Material dowodowy (n=50)	Kobiety i mężczyźni (n=133)	
R-/S+	śr±SD	1,02±0,04	1,38±0,18	p<0,001
	mediana	1,02	1,37	
	kwartyle	0,99 - 1,04	1,26 - 1,47	

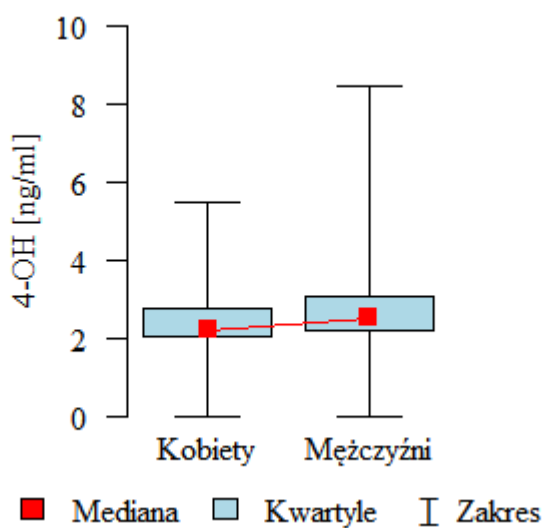


Ryc. 10 Porównanie stosunku R (-) i S (+) AMF w badanych dowodach rzeczowych oraz materiale biologicznym zabezpieczonym od kobiet i od mężczyzn łącznie.

Tabela 25. Porównanie poziomu 4-OH-AMF we krwi dla kobiet i dla mężczyzn.

4-OH-AMF [ng/ml]	Grupa			p
	Kobiety (n=45)	Mężczyźni (n=88)	Łącznie (n=133)	
śr±SD	2,21±1,16	2,81±1,11	2,60±1,16	p=0,024
mediana	2,22	2,53	2,43	
kwartyle	2,06 - 2,74	2,18 - 3,06	2,10 - 2,98	

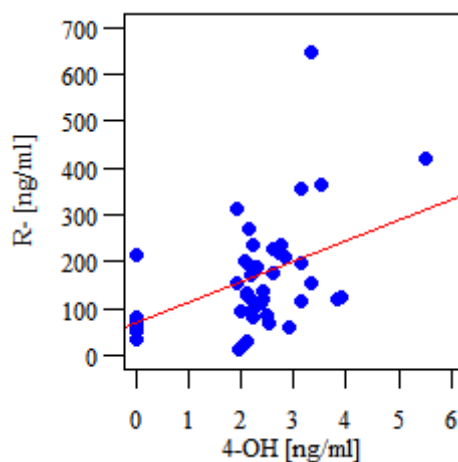
p - test Manna-Whitney'a



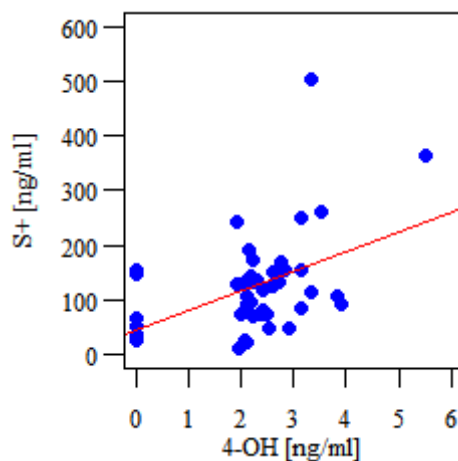
Ryc. 11 Porównanie poziomów 4-OH-AMF w badanych próbkach zabezpieczonych od kobiet i od mężczyzn.

Tabela 26. Porównanie poziomu 4-OH-AMF we krwi oraz poszczególnych enancjomerów amfetaminy oraz ich sumy amfetaminy we krwi w grupie kobiet.

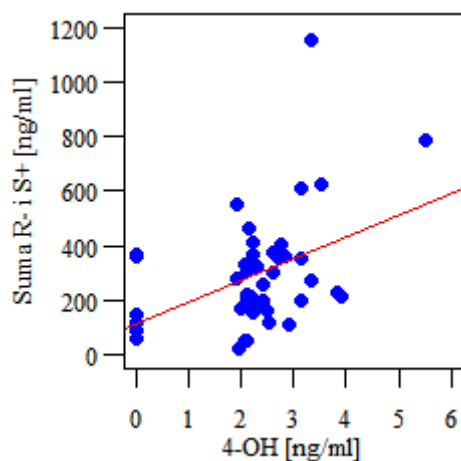
Parametr	4-OH-AMF
	Współczynnik korelacji Spearmana
R (-) [ng/ml]	$r=0,381, p=0,01$
S (+) [ng/ml]	$r=0,385, p=0,009$
Suma R (-) i S (+) [ng/ml]	$r=0,387, p=0,009$



Ryc. 12 Wykres rozrzutu: zależność stężenia 4-OH-AMF od stężenia R (-) AMF w badanych próbkach zabezpieczonych od kobiet.



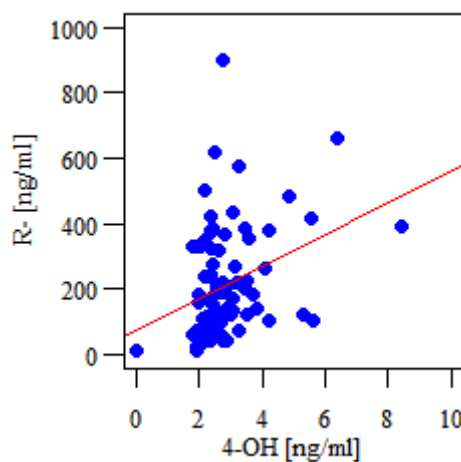
Ryc. 13 Wykres rozrzutu: zależność stężenia 4-OH-AMF od stężenia S (+) AMF w badanych próbkach zabezpieczonych od kobiet.



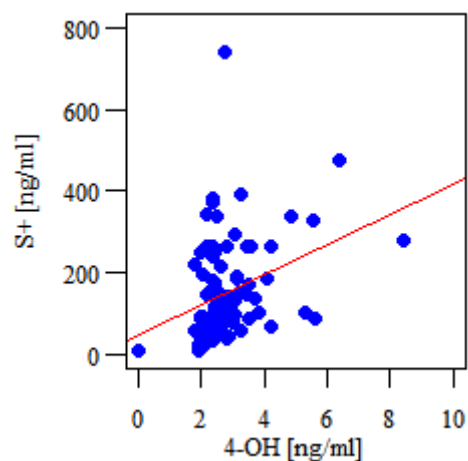
Ryc. 14 Wykres rozrzutu: zależność stężenia 4-OH-AMF od łącznego stężenia enancjomerów w badanych próbkach zabezpieczonych od kobiet.

Tabela 27. Porównanie poziomu 4-OH-AMF we krwi oraz poszczególnych enancjomerów amfetaminy oraz ich sumy we krwi w grupie mężczyzn.

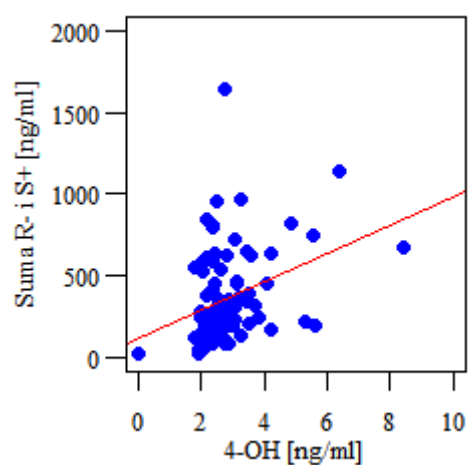
Parametr	4-OH-AMF
	Współczynnik korelacji Spearmana
R (-) [ng/ml]	$r=0,359, p=0,001$
S (+) [ng/ml]	$r=0,396, p<0,001$
Suma R (-) i S (+) [ng/ml]	$r=0,376, p<0,001$



Ryc. 15 Wykres rozrzutu: zależność stężenia 4-OH-AMF od stężenia R (-) AMF w badanych próbkach zabezpieczonych od mężczyzn.



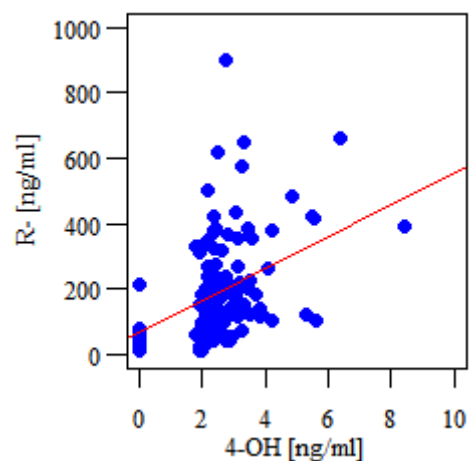
Ryc. 16 Wykres rozrzutu: zależność stężenia 4-OH-AMF od stężenia S (+) AMF w badanych próbkach zabezpieczonych od mężczyzn.



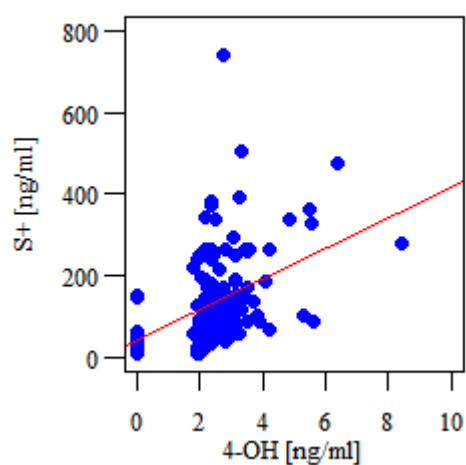
Ryc. 17 Wykres rozrzutu: zależność stężenia 4-OH-AMF od łącznego stężenia enancjomerów w badanych próbkach zabezpieczonych od mężczyzn.

Tabela 28. Porównanie poziomu 4-OH-AMF oraz poszczególnych enancjomerów amfetaminy oraz ich sumy we krwi dla całej badanej grupy.

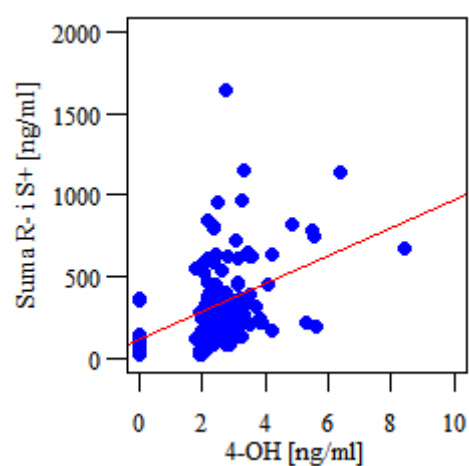
Parametr	4-OH-AMF
	Współczynnik korelacji Spearmana
R (-) [ng/ml]	$r=0,383, p<0,001$
S (+) [ng/ml]	$r=0,408, p<0,001$
Suma R (-) i S (+) [ng/ml]	$r=0,395, p<0,001$



Ryc. 18 Wykres rozrzutu: zależność stężenia 4-OH-AMF od stężenia R (-) AMF w badanych próbkach dla całej grupy badanej.



Ryc. 19 Wykres rozrzutu: zależność stężenia 4-OH-AMF od stężenia S (+) AMF w badanych próbkach dla całej grupy badanej.



Ryc. 20 Wykres rozrzutu: zależność stężenia 4-OH-AMF od łącznego stężenia enancjomerów w badanych próbkach dla całej badanej grupy.

Tabela 29. Porównanie zależności między poziomem 4-OH-AMF a stosunkiem enancjomerów w poszczególnych przedziałach stężeń w grupie kobiet.

Suma R (-) i S (+)	Współczynnik korelacji Spearmana pomiędzy poziomem 4-OH-AMF a stosunkiem R-/S+
Do 200 ng/ml	$r=0,015$, $p=0,959$
200-300 ng/ml	$r=-0,236$, $p=0,514$
Ponad 300 ng/ml	$r=-0,297$, $p=0,203$

Tabela 30. Porównanie zależności między poziomem 4-OH-AMF a stosunkiem enancjomerów w poszczególnych przedziałach stężeń w grupie mężczyzn.

Suma R (-) i S (+)	Współczynnik korelacji Spearmana pomiędzy poziomem 4-OH-AMF a stosunkiem R-/S+
Do 100 ng/ml	$r=-0,176$, $p=0,566$
100-200 ng/ml	$r=0,005$, $p=0,986$
200-300 ng/ml	$r=-0,622$, $p=0,02$
300-400 ng/ml	$r=-0,727$, $p=0,015$
400-600 ng/ml	$r=0,028$, $p=0,939$
Ponad 600 ng/ml	$r=-0,107$, $p=0,662$

Tabela 31. Porównanie zależności między poziomem 4-OH-AMF a stosunkiem enancjomerów w poszczególnych przedziałach stężeń dla całej grupy badanej.

Suma R (-) i S (+)	Współczynnik korelacji Spearmana pomiędzy poziomem 4-OH-AMF a stosunkiem R-/S+
Do 100 ng/ml	$r=-0,247$, $p=0,323$
100-200 ng/ml	$r=0,037$, $p=0,847$
200-300 ng/ml	$r=-0,412$, $p=0,046$
300-400 ng/ml	$r=-0,399$, $p=0,059$
400-600 ng/ml	$r=0,144$, $p=0,594$
Ponad 600 ng/ml	$r=-0,187$, $p=0,392$

Tabela 32. Porównanie zależności między poziomem całkowitym amfetaminy a stosunkiem enancjomerów w poszczególnych przedziałach stężeń w grupie kobiet.

Suma R (-) i S (+)	Współczynnik korelacji Spearmana pomiędzy poziomem amfetaminy a stosunkiem R-/S+
Do 200 ng/ml	$r=0,286$, $p=0,301$
200-300 ng/ml	$r=-0,661$, $p=0,044$
Ponad 300 ng/ml	$r=-0,322$, $p=0,166$

Tabela 33. Porównanie zależności między poziomem całkowitym amfetaminy a stosunkiem enancjomerów w poszczególnych przedziałach stężeń w grupie mężczyzn.

Suma R (-) i S (+)	Współczynnik korelacji Spearmana pomiędzy poziomem amfetaminy a stosunkiem R-/S+
Do 100 ng/ml	$r=-0,187$, $p=0,541$
100-200 ng/ml	$r=0,339$, $p=0,156$
200-300 ng/ml	$r=0,279$, $p=0,333$
300-400 ng/ml	$r=-0,082$, $p=0,818$
400-600 ng/ml	$r=-0,07$, $p=0,834$
Ponad 600 ng/ml	$r=-0,168$, $p=0,489$

Tabela 34. Porównanie zależności między poziomem całkowitym amfetaminy a stosunkiem enancjomerów w poszczególnych przedziałach stężeń w całej grupie badanej.

Suma R- i S+	Współczynnik korelacji Spearmana pomiędzy sumą i stosunkiem R-/S+
Do 100 ng/ml	$r=0,192$, $p=0,308$
100-200 ng/ml	$r=0,26$, $p=0,081$
200-300 ng/ml	$r=-0,205$, $p=0,251$
300-400 ng/ml	$r=-0,102$, $p=0,597$
400-600 ng/ml	$r=0,001$, $p=0,998$
Ponad 600 ng/ml	$r=-0,307$, $p=0,144$

5. Dyskusja

Amfetamina jako jeden z najczęściej nadużywanych związków psychoaktywnych z grupy psychostymulantów z racji antagonistycznych oddziaływań pożądaney, podwyższonej aktywności i czujności pierwszej ostrej fazy i późniejszego niebezpiecznego upośledzania sprawności psychomotorycznej tzw. „zjazdu” z nasilonymi objawami somatycznymi stanowi problem w interpretacji toksykologicznej. Niekwestionowana toksykologiczna maksyma „*dosis facit venenum*” w relacji różnicowania korzystnego czy negatywnego efektu psychoaktywnego nie wynika z ustalonego całkowitego stężenia zażytej dawki amfetaminy określonej pośrednio w płynach ustrojowych. Stereoselektywna analiza poziomu izomerów S (+) i R (-) amfetaminy z równoczesną kontrolą stężenia wybranych metabolitów może stanowić postęp w interpretacji w tym zakresie. Kontrolę wzajemnych zależności enancjomerów w dowodach rzeczowych zawierających amfetaminę i materiale biologicznym można przeprowadzić wyłącznie przy użyciu odpowiedniej szybkiej i sprawdzonej metody analitycznej. Opracowana i przedstawiona w dysertacji szybka i selektywna analiza została oparta o rozdział metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją w postaci tandemowej spektrometrii mas. Zaproponowana metoda analizy chiralnej amfetaminy odbiega od dotychczas stosowanych złożonych metod postępowania i stanowić może uzupełnienie w analizie toksykologiczno- sądowej. Wybór i opracowanie odpowiedniej metody jakościowo – ilościowej analizy enancjomerów amfetaminy i jej metabolitu 4-OH-AMF w materiale biologicznym stanowiły podstawowe narzędzie w realizacji założonych celów przedstawionej pracy eksperymentalnej. Przegląd piśmiennictwa dotyczący analizy chiralnej amfetaminy w płynach ustrojowych dotyczył głównie pośrednich, czasochłonnych metod jej oznaczania techniką GC-MS i LC-MS po derywatyzacji z odczynnikiem chiralnym w odpowiednie diastereoizomery. W przypadku zastosowania metody GC-MS w celu rozdzielenia enancjomerów amfetaminy zadowalające wyniki uzyskiwano z zastosowaniem mało popularnej i wymagającej metody negatywnej jonizacji chemicznej [66, 67, 81]. Podobnie w przypadku procedur HPLC-MS opisano przede wszystkim metody pośrednie z użyciem klasycznych kolumn w odwróconym układzie faz i tworzeniem diastereoizomerów w reakcji z chiralnym odczynnikiem [68, 69]. Główną niedogodnością opisywanych metod były skomplikowane procedury przygotowania próbki (często kilkietapowa derywatyzacja) oraz konieczność stosowania odczynników o wysokiej czystości chiralnej. Stosunkowo nieliczne propozycje dotyczyły metod analizy bezpośredniej na kolumnach z wypełnieniem chiralnym, których wysoki koszt był nieadekwatny do krótkiego okresu eksploatacji. Dopiero

po wprowadzeniu na rynek przystępnych cenowo i trwałych kolumn z chiralnym wypełnieniem pozwoliło na rozwój metod bezpośrednich [70].

Jednym z głównych celów pracy było opracowanie optymalnej pod względem nakładów pracy oraz kosztów metody analizy chiralnej amfetaminy, która pozwoliłaby na jej zastosowanie w rutynowych analizach. W tym celu zastosowano nową kolumnę Lux® AMP, z polisacharydowym wypełnieniem, która pozwoliła na całkowite ($R=4,6$) rozdzielnie S (+) i R (-) amfetaminy podczas 12 minutowej analizy. Zoptymalizowana metoda pozwoliła na uzyskanie lepszego rozdziału enancjomerów w krótszym czasie niż opracowana przez zespół A. Maas i wsp. ($R=2,4$) z użyciem identycznej kolumny [70]. Uzyskany rozdział chromatograficzny był podstawą do rutynowej analizy próbek materiału biologicznego jak i próbek dowodów rzeczowych w celu oznaczenia enancjomerów amfetaminy. Spodziewane niskie poziomy 4-OH-AMF w próbkach krwi ludzkiej wymagały zastosowania wysoce czułej i selektywnej metody oznaczeń jaką stanowi LC-MS/MS. Dotychczas opracowano metodę GC-MS oznaczania 4-OH-AMF w moczu, co przy wysokich wartościach LOD i LOQ czyniło ją nieprzydatną przy próbach badania krwi [29]. Opracowane metody HPLC dotyczyły badań poziomów metabolitu w moczu szczura i charakteryzowały się również wysokimi wartościami LOD i LOQ [50] [51]. Wieloetapowa metoda HPLC z detekcją fluorescencyjną, która pozwalała na jednoczesne oznaczenie enancjomerów amfetaminy oraz 4-OH-AMF dla których uzyskano znacznie niższe LOQ na poziomie 5 ng/ml, jednak wciąż było zbyt wysokie dla ich oznaczeń we krwi ludzkiej [53]. Podobne zależności występowały w zaproponowanej metodzie LC-MS wykorzystanej do analizy surowicy i homogenatów tkankowych pobranych od szczura [54]. Próby optymalizacji metod z użyciem najczęściej stosowanych kolumn w odwróconym układzie faz prowadziły do niepowtarzalnych wyników z uwagi na słabą retencję polarnego związku jakim jest 4-OH-AMF. Związek eluował w drugiej minucie analizy i podlegał wysokim efektom matrycowym, których nie udało się ograniczyć poprzez modyfikacje w trakcie izolacji. W celu zoptymalizowania rozdziału chromatograficznego zastosowano kolumnę oddziaływań hydrofilowych (HILIC) tj. system oparty na podziale analitu między fazę ruchomą, zawierającą powyżej > 60 % rozpuszczalnika organicznego a warstwę wodną związaną z polarną fazą stacjonarną. Zastosowany system pozwolił na uniknięcie wymywania związku z czołem fazy ruchomej i zredukowanie efektów matrycowych do akceptowalnych wartości. Dokonano także próby równoczesnego oznaczenia 4-OH-AMF i enancjomerów amfetaminy w jednym cyklu analitycznym z użyciem kolumny chiralnej, mimo braku materiałów odniesienia w postaci enancjomerów 4-OH-AMF. Uzyskane niezadowalające rezultaty w postaci wysokiego LOD dla metabolitu przy niekompletnie rozdzielonych enancjomerach, wymagały procedowania innych rozwiązań analitycznych. W opublikowanej w 2021 roku pracy M. Losacker i wsp.

zmodyfikowanie warunków chromatograficznych i przede wszystkim zastosowanie nowej generacji detektora masowego pozwoliło zarówno na rozdział enancjomerów 4-OH-AMF jak i uzyskanie LOD na poziomie 0,1 ng/ml i LOQ 0,5 ng/ml dla wszystkich badanych analitów [85]. W przypadku badania materiału biologicznego (krwi i osocza) opracowana metoda analizy enancjomerów amfetaminy pozwoliła na uzyskanie zadowalających parametrów walidacyjnych w zakresie LOD (0,6 – 1,1 ng/ml), LOQ (10 ng/ml), liniowości (10 – 1000 ng/ml), precyzji (CV < 3,99 %), dokładności (błąd oznaczeń < 5,5 %), odzysku (78 - 82 %) i wpływu matrycy (ME_{IS}-norm 91 – 112 %). Oznaczenie 4-OH-AMF we krwi i osoczu dotyczyło dwóch zakresów stężeń 1 – 50 ng/ml (krew) i 10 – 1000 ng/ml (osocze). W obu przypadkach wyznaczono parametry walidacyjne takie jak: LOD (0,6 ng/ml i osocze i 0,7 ng/ml krew), LOQ (1 ng/ml krew i 10 ng/ml osocze), liniowość (1 – 50 ng/ml krew i 10 – 1000 ng/ml osocze), precyzję (CV < 12,9 % krew, < 3,4 % osocze), dokładność (błąd oznaczeń < 7,0 % i 7,5 %), odzysk (72 - 76 %) i wpływ matrycy (MEIS-norm 91 – 97 % dla krwi i 96 -114 % dla osocza). Opracowane metody LC-MS analizy enancjomerów amfetaminy i jej metabolitu 4-OH-AMF we krwi i osoczu są odpowiednio dokładne, precyzyjne i selektywne a tym samym spełniają wymagania stawiane metodom bioanalitycznym.

W pierwszym etapie realizacji pracy badanie dowodów rzeczowych (n=50) w postaci amfetamin zabezpieczanych na terenie województwa wielkopolskiego w latach 2018 – 2020 i analizowanych w ZMS rozszerzono o analizę stosunku enancjomerów. Uzyskane wyniki wykazały, że zabezpieczana na nielegalnym rynku narkotykowym amfetamina stanowi mieszaninę racemiczną pochodzącą z syntezy achiralnej. Zawartość amfetaminy w materiale mieściła się w zakresie 5 – 80 % (średnio $22,2 \pm 15,5$ %), z medianą równą 19,7 % dla siarczanu i odpowiednio 3,5 – 56 %, (średnio $15,5 \pm 10,8$ %), z medianą wynoszącą 13,8 % w przeliczeniu na wolną zasadę. Jako zafałszowanie we wszystkich dowodach stwierdzono kofeinę poza jednym zabezpieczeniem, gdzie stwierdzono dodatkowo obecność lidokainy. Odnosząc uzyskane rezultaty do ograniczonych danych dotyczących rodzimego rynku narkotykowego uzyskano zbieżne wyniki z danymi dla województwa wielkopolskiego (średnia 12 %, n = 6 dla wolnej zasady) oraz dla całego kraju (średnia 13,1 %, mediana 12 %, n = 94 dla wolnej zasady). Podobne zawartości występowały w materiałach zabezpieczonych w analogicznym okresie na rynku niemieckim (średnio 21,6 % mediana 16,1 %, n = 143). Zawartość amfetaminy w zbadanych dowodach rzeczowych nie odbiegała również od danych europejskich, gdzie jej zawartość mieściła się w zakresie 13 – 65 % [3, 73, 75].

Mimo braku wymogów ustawowych analizy zawartości amfetaminy w zabezpieczonych dowodach rzeczowych regularne monitorowanie składu jakościowego i zawartości substancji czynnych czy poszczególnych enancjomerów w kontekście dużej zmienności rynku

narkotykowego wydaje się uzasadnione. Możliwość ustalenia metody syntezy w połączeniu z profilowaniem zanieczyszczeń pozwala na identyfikację pochodzenia narkotyku a analiza składu jakościowo - ilościowego może dostarczyć cennych informacji istotnych dla oceny ryzyka zażywania produktów obecnych na nielegalnym rynku narkotykowym.

Opracowane metody analizy 4-OH-AMF obok zmian profilu stężeń enancjomerów amfetaminy w płynach ustrojowych posłużyły w pierwszej kolejności do oceny farmakokinetyki tworzenia 4-OH-AMF na modelu zwierzęcym. Wybór modelu zwierzęcego tj. szczurów podyktowany był znanym z piśmiennictwa faktem, że hydroksylacja w pierścieniu aromatycznym stanowi w tym przypadku główny szlak metabolizmu amfetaminy [24] [31]. Podana dawka 10 mg/kg/m.c. jest allometrycznym odpowiednikiem dawki 60 mg dla człowieka o masie ciała 60 kg [86]. Mankamentem przyjętego modelu jest fakt, że szybkość metabolizmu poszczególnych enancjomerów u szczura w odniesieniu do człowieka zachodzi odwrotnie tzn. stosunek R/S < 1. Na przykładzie analizy farmakokinetyki bezmodelowej zaobserwowano, że już na etapie absorpcji występowało zróżnicowanie biodostępności enancjomerów, dla izomeru S (+) $C_{max} = 939$ ng/ml przy $t_{max} = 1,5$ h a dla izomeru R (-) $C_{max} = 720$ ng/ml przy $t_{max} = 1$ h. Dalsze parametry farmakokinetyczne takie jak AUC_{inf} i AUC_{last} , $t_{1/2}$, V_z/F i Cl/F również wykazywały zróżnicowane wartości (Tabela 15). W podobnych badaniach Hutchaleelah nie zaobserwowano natomiast różnicy w $t_{1/2}$, jednak uzyskane dane dotyczyły podania dożylnego [24]. Dotychczas obserwowane różne wartości parametrów farmakokinetycznych enancjomerów amfetaminy u szczura tłumaczone były ich zróżnicowanym wiązaniem z białkami, zróżnicowaną objętością dystrybucji oraz klirensiem. W przypadku izomeru R (-) w badaniach in vitro w osoczu szczura zaobserwowano wyższe powinowactwo do białek aniżeli izomeru S (+), podczas gdy dla człowieka nie obserwuje się istotnego wiązania z białkami. Zróżnicowanie innych parametrów takich jak klirens i objętość dystrybucji u szczura tłumaczy się niekiedy jako konsekwencje zróżnicowanego powinowactwa enancjomerów do białek [26, 27]. Dotychczas nie zaobserwowano zróżnicowania na etapie absorpcji enancjomerów amfetaminy z przewodu pokarmowego, dlatego konieczne będzie szersze zbadanie tego zjawiska. W związku z tak znacznymi różnicami w stereospecyficznym metabolizmie model zwierzęcy z użyciem szczurów w ocenie czasu konsumpcji amfetaminy należy uznać za nieprzydatny.

W dalszej części badań dokonano analizy całkowitego stężenia 4-OH-AMF w osoczu szczurów oraz opracowano model farmakokinetyczny tworzenia tego związku u szczura. W tym celu na podstawie uzyskanych wyników oznaczenia sumy enancjomerów amfetaminy oraz 4-OH-AMF w osoczu badanych zwierząt dokonano bezmodelowej oceny farmakokinetyki związku macierzystego i metabolitu (Tabela 16). Wyznaczenie parametrów farmakokinetyki bezmodelowej posłużyło do opracowania modelu farmakokinetycznego

związku macierzystego. Testowane w programie WinNonlin modele wykazały, że farmakokinetkę amfetaminy lepiej opisywał model jednokompartментowy niż dwukompartментowy, o czym świadczyły mniejsze wartości uzyskane w testach Akaike i Schwartza. Ustalone wartości farmakokinetyczne dla amfetaminy (Tabela 17) służyły do budowy łącznego modelu farmakokinetycznego oceny kinetyki tworzenia 4-OH-AMF. Testy Akaike i Schwartza wskazany, że farmakokinetkę 4-OH-AMF lepiej opisywał model dwukompartментowy niż model jednokompartментowy (Tabela 18). Stała szybkości tworzenia 4-OH-AMF ($k_m = 0,316 \pm 0,111$) wskazuje, iż metaboliczna droga wydalania amfetaminy u szczura jest podstawową drogą eliminacji amfetaminy z ustroju. Ustalone wartości potwierdziły znacznie dłuższy okres biologicznego półtrwania $t_{1/2}$ (w kinetyce bezmodelowej) dla metabolitu wnoszący 4,20 h w porównaniu do amfetaminy określony jako 2,23 h. Zaobserwowany znacznie dłuższy okres biologicznego półtrwania metabolitu w porównaniu ze związkiem macierzystym pozwolił na założenie przydatności oznaczenia 4-OH-AMF jako późnego biomarkera ekspozycji na amfetaminę. Dane literaturowe potwierdzają, że w przypadku szczura za hydroksylację amfetaminy w pierścieniu odpowiada podrodzina cytochromu *CYP2D* [49], która tę samą reakcję katalizuje u człowieka *CYP2D6* [29] [30]. Dlatego, wydaje się zasadnym kontynuowanie badań i potwierdzenie tej zależności na ludziach.

Metoda analizy 4-OH-AMF we krwi oraz enancjomerów amfetaminy została w praktyczny sposób wykorzystana w analizie próbek krwi pełnej zabezpieczonej od osób, co do których zachodziło podejrzenie zażywania amfetaminy. Badaniom poddano krew pochodzącą od 45 kobiet oraz 90 mężczyzn, u których nie wykryto innych związków poza amfetaminą. W przebiegu badań u dwóch mężczyzn (nr 2 i nr 74 w Tabeli 21) stwierdzono nietypowy stosunek R/S wynoszący 0,21 i 0,18. W późniejszym terminie dla tych przypadków potwierdzono przyjmowanie preparatów amfetaminy o określonym składzie enancjomerów ze wskazań medycznych i z tej przyczyny nie uwzględniano ich w późniejszej analizie statystycznej. Dokonana analiza próbek krwi pod kątem zawartości 4-OH-AMF wykazała jej obecność w 126 ze 133 prób (95 % badanych prób) ze średnim stężeniem $2,60 \pm 1,16$ ng/ml i statystycznie istotną ($p = 0,024$) różnicą między grupą kobiet a mężczyzn (Tabela 27). Uzyskane wyniki różnią się od rezultatów opisanych przez M. Losacker i wsp. [85], gdzie pozytywny rezultaty uzyskano w 179 ze 475 badanych próbek z uwzględnieniem poszczególnych enancjomerów tj. (S) 4-OH-AMF (mediana stężenia 1,2 ng/ml) i (R) 4-OH-AMF (mediana stężenia 0,8 ng/ml). Uzyskane stężenie medialne 2,41 ng/ml ($n=133$) jest nieznacznie wyższe od stężenia medialnego 2,0 ng/ml (suma median dwóch form optycznych). Niższy odsetek pozytywnych wyników dla 4-OH-AMF i niższa mediana stężeń uzyskana w badaniach niemieckiego zespołu może wynikać z różnic w zastosowanej

metodyce izolacji z próbek krwi. W opublikowanej pracy uzyskano odzysk na poziomie 10 – 14,6 % i nie prowadzono hydrolizy badanych próbek krwi, przy czym do ekstraktów po izolacji nie dodawano metanolowego roztworu HCl w celu ograniczenia lotności amfetamin.

Z dotychczas opublikowanych danych wynika, że kobiety stanowią niewielki odsetek osób kierujący pojazdami pod wpływem pochodnych amfetaminy. Z informacji zebranych w latach 2000 – 2004 wynika, że stanowiły one zaledwie 15 % zatrzymanych [87]. Na podstawie ustaleń P. Sever i wsp. [34] stwierdzono brak istotnych różnic w poziomach metabolitów u uzależnionych kobiet (n=2) a okazjonalnie przyjmujących ten narkotyk mężczyzn (n=2). Wnioski płynące z opublikowanych ostatnio prac wskazują na istotny wpływ hormonów płciowych na farmakokinetykę i farmakodynamikę ksenobiotyków. Stwierdzono związek aktywności cytochromu *CYP3A4* z poziomem hormonów płciowych i wyższą aktywność izoform *CYP2E1* i *CYP2D6* u mężczyzn [88, 89]. W odniesieniu do aktywności farmakologicznej samej amfetaminy odnotowano zróżnicowane subiektywne działanie amfetaminy uzależnione od poziomu żeńskich hormonów [90]. Przypuszczalnie różnice w poziomie 4-OH-AMF w badanych grupach mogą być efektem wyższej aktywności *CYP2D6* u mężczyzn.

Ostatnim z badanych aspektów była ocena zróżnicowanego poziomu enancjomerów amfetaminy w zabezpieczonych próbkach krwi. W analizowanych próbkach krwi kobiet i mężczyzn uzyskano wartości mediany stosunku R/S na poziomie odpowiednio 1,36 i 1,37, które nie wykazywały istotnych statystycznie różnic. Mediana stosunku R/S dla całej grupy badanej wynosiła 1,37 a zmierzony zakres zawierał się w przedziale 0,92 do 1,81 ze średnią wynoszącą $1,38 \pm 0,18$. W przypadku osób zażywających leki, wyłączonych z grupy badawczej (dwie osoby) stosunek R/S był niższy niż 1,0 (1,5 % badanej populacji). Notowane w piśmiennictwie zakresy dla stosunku R/S są bardzo zróżnicowane. W badaniach Hess i wsp. średni stosunek R/S w badanej grupie (n=28) wynosił $1,82 \pm 0,18$ z medianą równą 1,69 i zakresem od 1,38 do 4,5 [81]. Petres i wsp. uzyskali zakres od 0,97 do 1,66, ze średnią 1,15 i medianą 1,10 [66]. W opublikowanych wynikach badań zespołu Losacker w badanej grupie (n=425) zakres stosunku R/S wynosił 0,88 – 4,05 ze średnią i medianą na poziomie odpowiednio 1,23 i 1,11. W 75 przypadkach (18 %) stosunek R/S był poniżej wartości 1,0 [85]. Poziomy R/S > 1,0 mogą sugerować etap absorpcji amfetaminy do ustroju po doustnym podaniu co zgodne jest z wynikami uzyskanymi przez zespół Wan po doustnym podaniu racemicznej amfetaminy 4 probantom (zakres R/S 0,84 – 1,18) [45].

Oznaczony stosunek R/S dla próbek krwi różnił się w istotny sposób od stosunków notowanych w dowodach rzeczowych potwierdzając stereoselektywny metabolizm amfetaminy (Tabele 23 i 24). Stosunek formy R/S poddano analizie w zależności od poziomu amfetaminy w przedziałach stężeń ustalonych do 100 ng/ml. W badanych zakresach nie

potwierdzono istotnych zależności pomiędzy stężeniem amfetaminy a stosunkiem formy R/S z wyjątkiem istotnej zależności ($p = 0,044$) w zakresie stężeń 200-300 ng/ml w grupie kobiet ($n=10$), nie potwierdzonej dla całej badanej grupy. W analizie zależności stosunku R/S od stężenia przeprowadzonym przez M. Loasacker zaobserwowano istotnie wyższe stosunki R/S przy stężeniach < 100 ng/ml ($n=178$), co może zdaniem autorów sugerować późną fazę eliminacji amfetaminy z ustroju [85]. Zdaniem autora różnice mogą być związane z liczniejszą grupą badawczą dla stężeń < 100 ng/ml ($n = 178$ vs $n = 18$) oraz zastosowaniem metody o bardzo niskim LOQ na poziomie 0,5 ng/ml i związanej z tym mniejszej precyzji oznaczeń.

Zależność stosunku R/S od stężenia 4-OH-AMF w grupie mężczyzn wykazuje ujemną korelację w zakresie stężeń 200 – 400 ng/ml, której nie zaobserwowano w przypadku analizy grupy kobiet. Również w całej grupie zaobserwowano ujemną korelację w zakresie 200 -300 ng/ml (Tabele 29, 30 i 31). Zakładając, że stosunek R/S wzrasta z czasem to obserwowany spadek stężenia 4-OH-AMF może sugerować intensywniejszy metabolizm w początkowej fazie intoksykacji.

Koncepcja wzrostu stosunku R/S w czasie i możliwość oceny fazy intoksykacji oraz czasu ostatniego przyjęcia została zweryfikowana przez Losacker i wsp. w trakcie badanie próbek osocza pobranych od pacjentów kliniki leczenia uzależnień w kontekście deklarowanego ostatniego zażycia. Pacjenci, którzy zgodzili się wziąć udział w badaniu deklarowali czas ostatniego zażycia, drogę przyjęcia i częstotliwość przyjmowania. Wyznaczono zależność między deklarowanym czasem ostatniego przyjęcia amfetaminy a stosunkiem R/S $y=0,861+0,021x$ ze współczynnikiem korelacji $r^2 = 0,728$ i przedziałem ufności 95 %. Zaproponowano również stosunek R/S wyższy niż 1,09 jako wartość odcięcia dla okresu 6 godzin od ostatniego przyjęcia odpowiadającemu okresowi ostrej fazy intoksykacji [85].

Do jednoznacznej oceny przydatności metabolizmu enancjomerów amfetaminy oraz tworzenia metabolitu 4-OH-AMF w interpretacji fazy przemian amfetaminy w ustroju oraz szacowania czasu jej zażycia uzasadnionym byłoby przeprowadzenie kontrolowanych badań na ochotnikach, co aktualnie z przyczyn etyczno-prawo jest ograniczone.

6. Wnioski

- 1 Opracowane procedury analizy enancjomerów amfetaminy oraz jej metabolitu tj. 4-OH-AMF spełniają kryteria walidacyjne dla metod przeznaczonych do oznaczania leków i ich metabolitów w płynach biologicznych w celach sądowych lub klinicznych. Zastosowanie chiralnej fazy stacjonarnej pozwala na całkowity rozdział enancjomerów bez konieczności derywatyzacji a zastosowanie kolumny oddziaływań hydrofilowych (HILIC) pozwoliło na opracowanie zoptymalizowanie metody oznaczania 4-OH-AMF

- 2 Wstępna ocena farmakokinetyczna modelu zwierzęcego do jego użycia w ocenie biotransformacji enancjomerów amfetaminy w kontekście szacowania czasu między zażyciem a pobraniem próby krwi z uwagi na wysoki stosunek formy S/R już w pierwszym pobraniu krwi. W przypadku 4-OH-AMF jego okres biologicznego półtrwania $t_{1/2}$ 4,20 h vs 2,23 h dla amfetaminy może wskazywać potencjalne zastosowanie jako późnego biomarkera ekspozycji
- 3 Ocena analizowanych dowodów rzeczowych zawierających amfetaminę wskazuje na formę racemiczną związku o średnim stężeniu 22,2 % i medianie 19,5 w przeliczeniu na siarczany i 15,5 i 13,7 w przeliczeniu na zasadę.
- 4 W badanej grupie (łącznie dla kobiet i mężczyzn) stwierdzono stosunek enancjomerów R/S na poziomie $1,38 \pm 0,18$ istotnie różny od stosunku występującego w racemicznej amfetaminie, który potwierdza stereospecyficzny charakter przemian metabolicznych, potencjalnie przydatny w ocenie fazy intoksykacji.
- 5 Stężenie 4-OH-AMF jest dodatnio skorelowane z poziomem poszczególnych izomerów optycznych amfetaminy oraz całkowitym stężeniem amfetaminy we krwi zarówno kobiet jak i mężczyzn, przy czym występują istotne różnice w poziomie 4-OH-AMF między kobietami a mężczyznami.
- 6 Stosunek poziomu 4-OH-AMF vs stosunek R/S wykazywał ujemną korelację w grupie mężczyzn w zakresie stężeń 200 – 400 ng/ml, której nie zaobserwowano w przypadku kobiet. W łącznej analizie kobiet i mężczyzn zaobserwowano istotną ujemną korelację, która wystąpiła w zakresie 200 - 300 ng/ml
- 7 W badaniu zależności stosunku R/S względem poziomu amfetaminy zaobserwowano korelację w przedziale 200 – 300 ng/ml w grupie kobiet przy braku istotnej korelacji dla mężczyzn i całej badanej populacji.
- 8 Zaproponowany model praktycznego monitoringu procesu metabolizmu enancjomerów amfetaminy z metabolitem w postaci 4-OH-AMF po zweryfikowaniu w kontrolowanych warunkach klinicznych może stanowić wartościowe uzupełnienie w interpretacji wyniku badania sądowo-toksykologicznego.

7. Streszczenie

Autor: mgr Artur Teżyk

Tytuł: **Ocena przydatności analizy amfetaminy i jej metabolitu w opiniodawstwie sądowo-lekarskim**

Celem pracy była ocena wykorzystania przemian metabolicznych amfetaminy takich jak tworzenie 4-OH-AMF oraz stereospecyficznego metabolizmu enancjomerów w celu interpretacji wyników oznaczenia amfetaminy w próbkach krwi pobranych od osób podejrzanych o jej nadużywanie.

Do realizacji celów badawczych opracowano metody HPLC-MS/MS do rozdziału i oznaczania enancjomerów amfetaminy i jej metabolitu tj. 4-OH-AMF w materiale biologicznym (krew i osocze). W przypadku analizy enancjomerów zastosowanie kolumny z chiralnym wypełnieniem pozwoliło na całkowity rozdział enancjomerów w izokratycznej metodzie trwającej 10 minut. W drugiej izokratycznej, trwającej 6 minut metodzie zastosowano wypełnienie kolumny fazą oddziaływań hydrofilowych – HILIC, na której zachodziła lepsza retencja 4-OH-AMF. Zastosowano optymalne warunki izolacji metodą ekstrakcji do fazy stałej (SPE). Dla obu metod wyznaczono parametry walidacyjne, jak limit wykrywalności i oznaczalności, precyzję i dokładność, efekt matrycowy, odzysk i selektywność. Opracowane metody spełniały kryteria walidacyjne wymagane dla metod bioanalitycznych.

Opracowane metody zostały wykorzystane do oznaczeń enancjomerów amfetaminy oraz metabolitu 4-OH-AMF we krwi osób przyjmujących amfetaminę w celach niemedycznych (n=133, kobiety – 45, mężczyźni - 88) oraz w osoczu szczurów (n=13), którym podawano dożołądkowo roztwór racemicznej amfetaminy. Chromatograficzny rozdział enancjomerów ustanowiony w metodzie HPLC-MS/MS posłużył również do oceny składu enancjomerów amfetaminy w dowodach rzeczowych poddawanych wcześniej badaniom jakościowo – ilościowym metodami GC-MS i HPLC-DAD.

We wszystkich badanych dowodach rzeczowych (n=50) stwierdzono obecność racemicznej amfetaminy, która występowała średnio w stężeniach 22,26 % i medianie 19,57 % w przeliczeniu na siarczan i 15,58 % i 13,72 % w przeliczeniu na zasadę, które świadczyły o achiralnej metodzie syntezy związku. Jako główne zafałszowanie amfetaminy na rynku narkotykowym w regionie wielkopolskim występowała kofeina.

W badaniu krwi ludzkiej uzyskano zróżnicowany stosunek R/S amfetaminy w grupie badanej wynoszący średnio $1,38 \pm 0,18$ ng/ml, który świadczył o stereospecyficznym metabolizmie związku. W 95 % badanych stwierdzono obecność 4-OH-AMF w istotnie

różnym średnim stężeniu ($p = 0,024$) między kobietami ($2,21 \pm 1,11$ ng/ml) a mężczyznami ($2,81 \pm 1,11$ ng/ml). Średnie stężenie 4-OH AMF w całej badanej grupy wynosiło $2,60 \pm 1,16$ ng/ml. Analiza statystyczna wykazała dodatnią korelację stężenia 4-OH-AMF z poziomem amfetaminy jak i poszczególnymi enancjomerami ($p < 0,001$), co oznaczało, że im wyższe było stężenie 4-OH AMF tym wyższe były poziomy amfetaminy jak i poszczególnych jej enancjomerów. W badaniach zależności poziomu 4-OH-AMF od stosunku R/S zaobserwowano ujemną korelację w zakresie stężeń 200 – 400 ng/ml u mężczyzn ($p = 0,02$) przy braku istotnych zależności w grupie kobiet. Dla całej badanej grupy stwierdzono ujemną korelację w przedziale 200 – 300 ng/ml ($p = 0,046$). W badaniu zależności między stężeniem amfetaminy we krwi a stosunkiem enancjomerów stwierdzono dodatnią korelację w zakresie stężeń 200 – 300 ng/ml w grupie kobiet ($p = 0,044$) przy braku podobnej zależności w grupie mężczyzn oraz w całej badanej grupie.

W przypadku zwierząt również zaobserwowano zróżnicowany metabolizm dla poszczególnych enancjomerów. Stwierdzono, że w odróżnieniu od człowieka izomer R (-) ulegał szybszym przemianom metabolicznym niż izomer S (+). Analiza farmakokinetyczna wykazała znacznie dłuższy czas biologicznego półtrwania 4-OH-AMF niż amfetaminy tj. $t_{1/2}$ 4,20 h vs 2.23 h, co mogło wskazywać na potencjalne zastosowanie tego metabolitu jako późnego biomarkera zażycia amfetaminy.

8. Summary

Author: Artur Teżyk M.Sc.

Title: **Assessment of the usefulness of the analysis of amphetamine and its metabolite for medico-legal purposes**

The aim of the study was to assess the potential use of amphetamine metabolic transformations, such as the formation of 4-OH-AMF and the stereospecific metabolism of enantiomers, to interpret the results of amphetamine determination in blood samples taken from suspects.

HPLC-MS/MS methods for the separation and determination of amphetamine enantiomers and the determination of its metabolite, i.e. 4-OH-AMF, in biological material (blood and plasma) were developed for the purposes of research. In the case of enantiomeric analysis, the use of a chiral packed column allowed the complete separation of the enantiomers in the isocratic method of 10 minute-duration. In the second isocratic method, which lasted 6 minutes, the column was filled with the hydrophilic interaction phase - HILIC, where better retention of 4-OH-AMF took place. The optimal isolation conditions were applied by the method of solid phase extraction (SPE). For both methods, validation parameters were

determined, such as the limit of detection and quantification, precision and accuracy, matrix effect, recovery and selectivity. The developed methods met the validation criteria required for bioanalytical methods.

The developed methods were used for the determination of amphetamine and enantiomers 4-OH-AMF in the blood of non-medical amphetamine users ($n = 133$, females - 45, males - 88) and in the plasma of rats ($n = 13$) administered intragastrically with a racemic amphetamine solution (dose 10 mg/kg of body weight). The chromatographic separation of enantiomers established in the HPLC-MS/MS method was also used to evaluate the enantiomeric composition of amphetamine in the physical evidence previously subjected to qualitative and quantitative studies using GC-MS and HPLC-DAD methods.

In all the examined material evidence ($n = 50$), the presence of racemic amphetamine was found, which was present on average in concentrations of 22.26% and median 19.57% in terms of sulphate and 15.58% and 13.72% in terms of base, which testified to an achiral method of synthesizing the compound. Caffeine was the main adulteration of amphetamine in the drug market in the Greater Poland region.

In the study of human blood, a differentiated R/S ratio of amphetamine in the test group was obtained, averaging 1.38 ± 0.18 ng / ml, which was indicative of the stereospecific metabolism of the compound. In 95% of the subjects, 4-OH-AMF was found in significantly different mean concentrations ($p = 0.024$) between women (2.21 ± 1.11 ng / ml) and men (2.81 ± 1.11 ng / ml). The average concentration of 4-OH AMF in the entire study group was 2.60 ± 1.16 ng / ml. Statistical analysis showed a positive correlation between the concentration of 4-OH-AMF and the level of amphetamine and individual enantiomers ($p < 0.001$), which meant that the higher the concentration of 4-OH AMF, the higher the levels of amphetamine and its individual enantiomers. In studies on the dependence of the level of 4-OH-AMF on the R / S ratio, a negative correlation was observed in the concentration range of 200 - 400 ng / ml in men ($p = 0.02$), with no significant relationships in the group of women. For the entire study group, a negative correlation was found in the range of 200-300 ng / ml ($p = 0.046$). In the study of the relationship between the concentration of amphetamine in the blood and the ratio of enantiomers, a positive correlation was found in the concentration range of 200-300 ng / ml in the group of women ($p = 0.044$), with no similar relationship in the group of men and in the whole study group.

In animals, different metabolism was also observed for individual enantiomers. It was found that, unlike in humans, the R (-) isomer underwent faster metabolic changes than the S (+) isomer. Pharmacokinetic analysis showed a significantly longer biological half-life of 4-OH-AMF than that of amphetamines, i.e. $t_{1/2}$ 4.20 h vs. 2.23 h, which could indicate a potential use of the metabolite as a late biomarker of use.

9. Bibliografia

- [1] Komenda Główna Policji, „<https://statystyka.policja.pl/>,” [Online]. Available: <https://statystyka.policja.pl/st/przestepstwa-ogolem/przestepstwa-drogowe/prowadzenie-pojazdu-w-s/122332,Prowadzenie-pojazdu-w-stanie-nietrzezwosci.html>. [Data uzyskania dostępu: 03 09 2021].
- [2] EMCDDA, [Online]. Available: https://www.emcdda.europa.eu/publications/thematic-papers/druid_en. [Data uzyskania dostępu: 03 08 2021].
- [3] EMCDDA, „European Drug Report 2021: Trends and Developments,” 2021. [Online]. Available: https://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/13838/2021.2256_PL_03.pdf. [Data uzyskania dostępu: 03 08 2021].
- [4] M. Huestis, J. Henningfield i E. Cone, „Blood cannabinoids. I. Absorption of THC and formation of 11-OH-THC and THCCOOH during and after smoking marijuana. 1992,16, 276-282,” *J. Anal Toxicol*, nr 16, pp. 276-282, 1992.
- [5] M. Huestis, A. Barnes i M. Smith, „Estimating the Time of Last Cannabis Use from Plasma Δ^9 -Tetrahydrocannabinol and 11-nor-9-Carboxy- Δ^9 -Tetrahydrocannabinol Concentrations,” *Clinical Chemistry*, nr 51, pp. 2289-2295, 2005.
- [6] A. Jenkins i E. Cone, „Time of Heroin Use,” *J. Anal. Toxicol.*, nr 32, pp. 454-456, 2008.
- [7] F. Musshoff i B. Madea, „Driving under the influence of amphetamine-like drugs,” *J Forensic Sci*, nr 57, pp. 413-419, 2012.
- [8] E. Ellinwood i A. Nikado, „Stimulant induced impairment: A perspective across dose and duration of use,” *Alcohol, Drugs & Driving*, nr 3, pp. 19-24, 1987.
- [9] B. Siber, K. Papafotiou, R. Croft, E. Ogden, P. Swann i C. Stough, „The effects of dexamphetamine on simulated driving performance,” *Psychopharmacology*, nr 179, pp. 536-543, 2005.
- [10] B. Angrist, J. Corwin, B. Bartlik i T. Copper, „Early pharmacokinetics and clinical effects of oral d-amphetamine in normal subjects,” *Biol. Psychiatry*, nr 22, pp. 1357-1368, 1987.
- [11] S. Asghar, V. Tanay, G. Baker, A. Greenshaw i P. Silverstone, „Relationship of plasma amphetamine levels to physiological, subjective, cognitive and biochemical measures in healthy volunteers,” *Hum. Psychopharmacol.*, nr 18, pp. 291-299, 2003.
- [12] D. Segal i R. Kuczenski, „Repeated binge exposures to amphetamine and methamphetamine: behavioral and neurochemical characterization,” *J. Pharmacol. Exp. Ther*, nr 282, pp. 561-563, 1997.
- [13] J. Gustavsen, J. Mørland i J. Bramness, „Impairment related to blood amphetamine and/or methamphetamine,” *Accid. Anal. Prev.*, nr 38, pp. 490-495, 2006.
- [14] A. Jones, „Age- and gender-related differences in blood amphetamine concentrations in apprehended drivers: lack of association with clinical evidence of impairment,” *Addiction*,

nr 102, pp. 1085-1091, 2007.

- [15] V. Vindenes, D. Jordbru, A. Bigrer-Knapskog, E. Kvan, G. Mathisrud, L. Slørdal i J. Mørland, „Impairment based legislative limits for driving under the influence of non-alcohol drugs in Norway,” *Forensic Sci Int*, nr 219, pp. 1-11, 2012.
- [16] A. Moffat, D. Osselton, B. Widdop i J. Watts, Clarke’s analysis of drugs and poisons., 4 red., Pharm. Press, 2004.
- [17] D. Heal, S. Smith, J. Gosden i D. Nutt, „Amphetamine, past and present – a pharmacological and clinical perspective,” *J Psychopharmacol.*, nr 27, pp. 479-496, 2013.
- [18] R. de la Torre i M. Farre, „Clinical Pharmacokinetics of Amphetamine and Related Substances,” *Clinical Pharmacokinetics*, pp. 157-185, 01 Jan 2004.
- [19] A. H. Becket i M. Rowland, „Urinary excretion kinetics of amphetamine in man.,” *J. Pharm. Pharmacol.*, nr 17, pp. 628-639, 1965.
- [20] B. Angrist, J. Corwin , N. Bartlik i T. Cooper, „Early pharmacokinetics and clinical effects of oral D-amphetamine in normal subjects.,” *Biol. Psychiatry*, nr 22, pp. 1357-1368, 1987.
- [21] A. Beckett, R. Boyes i E. Triggs, „Kinetics of buccal absorption of amphetamines.,” *J. Pharm. Pharmacol.*, nr 20, pp. 92-97, 1968.
- [22] L. G. Dring, R. L. Smith i R. T. Williams, „The fate of amphetamine in man and other mammals.,” *J. Pharm. Pharmacol.*, nr 18, pp. 402-404, 1966.
- [23] L. G. Dring, R. L. Smith i R. T. Williams, „The metabolic fate of amphetamine in man and other species. Biochem.,” nr 116, pp. 425-435, 1970.
- [24] A. Hutchaleelaha, J. Sukbuntherng , H. H. Chow i M. Mayersohn, „Disposition kinetics of d- and l-amphetamine following intravenous administration of racemic amphetamine to rats.,” *Drug Metab. Dispos.* , nr 22, pp. 406-411, 1994.
- [25] S. Pashko i W. Vogel, „Factors influencing the plasma levels of amphetamine and its metabolites in catheterized rats,” *Biochemical Pharmacology*, tom 29, pp. 221-225, 1980.
- [26] G. Franksson i E. Anggard, „The Plasma Protein Binding of Amphetamine, Catecholamines and Related Compound.,” *Acta Pharmacol. Toxicol.*, nr 28, pp. 209-214, 1970.
- [27] J. Baggot, L. Davis i C. Neff, „Extent of plasma protein binding of amphetamine in different species. Biochem. Pharmacol. 1972, 21, 1813-1816,” *Biochem. Pharmacol.* , pp. 1813-1816, 1972.
- [28] S. Shiiyama, T. Soejima-Ohkuma, S. Honda , Y. Kumagai , H. Yamada, K. Oguri i H. Yoshimura, „Major role of the CYP2C isozymes in deamination of amphetamine and benzphetamine: evidence for the quinidine-specific inhibition of the reactions catalys,” *Xenobiotica*, nr 27, pp. 389-397, 1997.
- [29] E. Miranda, M. Sordo, A. Salazar, C. Contrera, L. Bautista, A. Rojas Garcia i P. Ostrosky-Wegman , „Determination of amphetamine, methamphetamine, and hydroxyamphetamine derivatives in urine by gas chromatography-mass spectrometry and its relation to CY,” *J. Anal Toxicol.*, nr 31, pp. 31-36, 2007.
- [30] D. Wu, V. Otton, T. Inaba, W. Kalow i E. Sellers, „Interactions of amphetamine analogs with

- human liver CYP2D6,” *Biochemical Pharmacol.*, tom 53, pp. 1605-1612, 1997.
- [31] Y. Law, M. Slawson i D. Moody, „Selective involvement of cytochrome P450 2D subfamily in in vivo 4-hydroxylation of amphetamine in rat,” *Drug Metab. Dispos.*, nr 28, pp. 348-353, 2000.
- [32] M. Goldstein i B. Anagnoste, „The conversion in vivo of d- amphetamine to (+)-p-hydroxynorephedrine,” *Biochim. Biophys. Acta*, nr 107, pp. 166-168, 1965.
- [33] J. Caldwell , L. Dring i R. Williams, „Norephedrine as metabolites of [14C]amphetamine in urine in man,” *Biochem J.*, tom 129, pp. 23-24, 1972.
- [34] P. S. Sever, J. Caldwell, L. G. Dring i R. T. Williams, „The metabolism of amphetamine in dependent subjects,” *Eur J Clin Pharmacol*, nr 6, pp. 177-180, 1973.
- [35] A. H. Beckett, M. Rowland i P. Turner , „Influence of Urinary pH on excretion of amphetamine,” *Lancet*, p. 303, 6 Feb. 1965.
- [36] L. Gunne, „The urinary output of d- and l-amphetamine in man,” *Biochem Pharmacol*, nr 16, pp. 863-869, 1967.
- [37] A. Beckett, J. Salmon i M. Mitchard, „The relation between blood levels and urinary excretion of amphetamine under controlled acidic and under fluctuating urinary pH values using [14C] amphetamine,” *J Pharm Pharmacol*, nr 4, pp. 251-258, 1969.
- [38] D. Wagner, J. Sagner, H. Duan, N. Isoherranen i J. Wang, „Interaction and Transport of Methamphetamine and its Primary Metabolites by Organic Cation and Multidrug and Toxin Extrusion Transporters,” *Drug Metab Dispos.*, nr 45, pp. 770-778, 2017.
- [39] E. Änggård, L. Gunne, E. Jönsson i F. Niklasson, „Pharmacokinetic and clinical studies on amphetamine dependent subjects,” *Eur J Clin Pharmacol*, nr 3, pp. 3-11, 1970.
- [40] L. Linghui, T. Everhart, J. Peyton, J. Reese i J. Mendelson, „Stereoselectivity in the human metabolism of methamphetamine,” *Br J Clin Pharmacol*, nr 69, pp. 187-192, 2010.
- [41] F. Musshoff, „Illegal or legitimate use? Precursor compounds to amphetamine and methamphetamine,” *Drug Metab Rev*, nr 32, pp. 15-34, 2000.
- [42] H. Schwelm, C. Gruman , V. Auwärter i M. Neukamm, „Application of a chiral high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of 13 related amphetamine-type stimulants to forensic samples: Interpretative hypotheses,” *Drug Test Anal*, nr 12, pp. 1354-1365, 2020.
- [43] N. Pizarro, J. Ortuno, J. Segura , M. Farre , M. Mas, J. Cami i R. de la Torre, „Quantification of amphetamine plasma concentrations by gas chromatography coupled to mass spectrometry,” *J. Pharm. Biomed. Anal.*, nr 21, pp. 739-747, 1999.
- [44] M. Perez-Reyes, W. White, S. McDonalds i R. Hicks, „Interaction between ethanol and dextroamphetamine: Effects on psychomotor performance. 1992, 16, 75-81,” *Alcohol Clin. Exp. Res.*, nr 16, pp. 75-81, 1992.
- [45] S. H. Wan, S. B. Martin i D. L. Azarnoff, „Kinetics, salivary excretion of amphetamine isomers, and effect of urinary pH,” *Clin. Pharmacol. Ther.*, nr 23, pp. 585-590, 1978.
- [46] A. Tsadik, A. Barnes, R. Lowe, E. Kolbrich Spargo, G. Milman , S. Pinary , D. Gorelick, R. Goodman i M. Huestis, „Urinary MDMA, MDA, HMMA, and HMA Excretion Following

- Controlled MDMA Administration to Humans,” *J Anal Toxicol.*, nr 33, pp. 439-446, 2009.
- [47] National Library of Medicine, 2021. [Online]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Hydroxyamphetamine>. [Data uzyskania dostępu: 01 09 2021].
- [48] M. Law i D. Moody, „Simultaneous Quantitation of Amphetamine and 4'-Hydroxyamphetamine by High Performance Liquid Chromatography,” *J. Liquid Chromatogr.*, tom 18, pp. 2029-2043, 1995.
- [49] M. Law, M. Slawson i D. Moody, „Selective involvement of cytochrome P450 2D subfamily in in vivo 4-hydroxylation of amphetamine in rat,” *Drug Metab Dispos*, nr 28, pp. 348-353, 2000.
- [50] M. Law i D. Moody, „Urinary excretion of amphetamine and 4'-hydroxyamphetamine by Sprague Dawley and dark Agouti rats,” *Life Sci.*, nr 54, pp. 1073-1079, 1994.
- [51] M. Law i D. Moody, „Urinary excretion of 4-hydroxyamphetamine and amphetamine in male and female Sprague-Dawley and Dark Agouti rats following multiple doses of amphetamine,” *Toxicol Lett*, nr 117, pp. 139-144, 2000.
- [52] M. Soares, F. Carvalho i M. de Lourdes Bastos, „Determination of amphetamine and its metabolite p-hydroxyamphetamine in rat urine by reversed-phase high-performance liquid chromatography after dabsyl derivatization,” *Biomed Chromatogr.*, nr 15, pp. 452-456, 2001.
- [53] J. Sukbuntherng, A. Hutchaleelaha, H. Chow i M. Mayersohn, „Separation and quantitation of the enantiomers of methamphetamine and its metabolites in urine by HPLC: precolumn derivatization and fluorescence detection,” *J Anal Toxicol*, nr 19, pp. 139-147, 1995.
- [54] H. Henderickson , E. Lourenzana i S. Owens, „Quantitative determination of total methamphetamine and active metabolites in rat tissue by liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection,” *AAPS J.*, nr 8, pp. 709-717, 2006.
- [55] R. Zucchi, G. Chiellini, T. Scanlan i G. Grandy, „Trace amine-associated receptors and their ligands,” *Br J Pharmacol*, nr 149, pp. 967-978, 2006.
- [56] K. Rentsch, „The importance of stereoselective determination of drugs in the clinical laboratory.,” *J. Biochem. Biophys. Methods*, nr 54, pp. 1-9, 2002.
- [57] G. Tucker i M. Lennard, „Enantiomer specific pharmacokinetics.,” *Pharmacol Ther*, nr 54, pp. 309-329, 1990.
- [58] C. Ribeiro, C. Santos, V. Concalves, A. Ramos, C. Alfonso i M. Tiritan, „Chiral Drug Analysis in Forensic Chemistry: An Overview,” *Molecules*, nr 23, 262, 2018.
- [59] T. Nagai i S. Kamiyama, „Simultaneous HPLC analysis of optical isomers of methamphetamine and its metabolites, and stereoselective metabolism of racemic methamphetamine in rat urine,” *J Anal Toxicol*, nr 15, pp. 299-304, 1991.
- [60] T. Nagai, H. Kanaya, K. Matsushima i S. Kamiyama, „Time-Lapse Changes of d- and l- Enantiomers of Racemic (dl)-Ethylamphetamine in Human Urine,” *J Anal Toxicol*, nr 21, pp. 112-115, 1997.
- [61] J. Cody i R. Schwarzhoff, „Interpretation of methamphetamine and amphetamine enantiomer

- data,” *J. Anal Toxicol.*, nr 17, pp. 321-326, 1993.
- [62] J. Cody, S. Valtier i S. Nelson, „Amphetamine enantiomer excretion profile following administration of Adderall,” *J Anal Toxicol.*, nr 27, pp. 485-491, 2003.
- [63] J. Cody, S. Valtier i S. Nelson, „Amphetamine excretion profile following multidose administration of mixed salt amphetamine preparation,” *J Anal Toxicol.*, nr 28, pp. 563-574, 2004.
- [64] B. Greenhill, S. Valtier i J. Cody, „Metabolic profile of amphetamine and methamphetamine following administration of the drug famprofazone,” *J Anal Toxicol.*, nr 27, pp. 479-484, 2003.
- [65] I. Nyström, T. Trygg, P. Woxler, J. Ahlner i R. Kronstrand, „Quantitation of R-(-)- and S-(+)-amphetamine in hair and blood by gas chromatography-mass spectrometry: an application to compliance monitoring in adult-attention deficit hyperactivity disorder treatment,” *J Anal Toxicol.*, nr 29, pp. 682-688, 2005.
- [66] F. Peters, T. Kraemer i H. Maurer, „Drug testing in blood: validated negative-ion chemical ionization gas chromatographic-mass spectrometric assay for determination of amphetamine and methamphetamine enantiomers and its application to toxicology cases,” *Clin Chem.*, nr 48, pp. 1472-1485, 2002.
- [67] H. Leis, G. Rechberger, G. Fauler i W. Windishhofer, „Enantioselective trace analysis of amphetamine in human plasma by gas chromatography/negative ion chemical ionization mass spectrometry,” *Rapid Commun Mass Spectrom.*, nr 17, pp. 569-575, 2003.
- [68] H. Leis, G. Fauler i W. Windischhofer, „Enantioselective quantitative analysis of amphetamine in human plasma by liquid chromatography/high-resolution mass spectrometry,” *Anal Bioanal Chem.*, nr 406, pp. 4473-4480, 2014.
- [69] M. Newmeyer, M. Concheiro i M. Huestis, „Rapid quantitative chiral amphetamines liquid chromatography–tandem mass spectrometry: Method in plasma and oral fluid with a cost-effective chiral derivatizing reagent,” *J Chromatogr A.*, nr 5, pp. 1358-1368, 2014.
- [70] A. Maas, M. Losacker i C. Hess, „Chromatographic separation of R/S-enantiomers of amphetamine and methamphetamine: Pathways of methamphetamine synthesis and detection in blood samples by qualitative enantioselective LC-MS/MS analysis,” *Forensic Sci Int.*, nr 291, pp. 138-143, 2018.
- [71] UNDOC, „Drug market trends, cocaine amphetamine type stimulants,” 2021. [Online]. Available: https://www.unodc.org/res/wdr2021/field/WDR21_Booklet_4.pdf. [Data uzyskania dostępu: 03 08 2021].
- [72] B. Bryska i D. Zuba, „Analysis of changes in amphetamine content in powders originating from the drug market,” *Problems of Forensic Sciences*, pp. 138-150, 2014.
- [73] A. Tyranda i A. Duszyńska, „Aktualne tendencje dotyczące czystości, działań i cen najbardziej popularnych w Polsce narkotyków,” *Problemy kryminalistyki*, nr 306, pp. 9-19, 2019.
- [74] P. Adamowicz i M. Kała, „Enantioselective method for determination of amphetamine and its eight analogues using chiral stationary phase,” *Z zagadnień nauk sądowych*, nr 44, pp. 24-42, 2000.
- [75] M. Losacker, S. Zörntlein, B. Schwarze, S. Staudt, J. Röhrich i C. Hess, „Determination of the enantiomeric composition of amphetamine, methamphetamine and 3,4-methylenedioxy-N-

methamphetamine (MDMA) in seized street drug samples from southern Germany,” *Drug Test Anal*, nr 25, 2021.

- [76] A. Dhabbah, „Determination of chiral amphetamine in seized tablets by indirect enantioseparation using GC–MS,” *Journal of King Saud University - Science*, nr 32, pp. 2622-2628, 2020.
- [77] S. George i R. Braithwaite, „Using amphetamine isomer ratios to determine the compliance of amphetamine abusers prescribed dexedrine,” *J Anal Toxicol*, nr 24, pp. 223-227, 2000.
- [78] J. Wagner, C. McElhinny, A. Lewin i F. Carrol, „Stereospecific synthesis of amphetamines,” *Tetrahedron Assymetry*, nr 14, pp. 2119-2125, 2003.
- [79] United Nations Office on Drug and Crimes, „Recommended Methods for the Identification and Analysis of Amphetamine, Methamphetamine and their Ring-substituted Analogues in Seized Materials,” 2006. [Online]. Available: <https://www.unodc.org/pdf/scientific/stnar34.pdf>. [Data uzyskania dostępu: 01 08 2021].
- [80] F. Peters, N. Samyn, M. Wahl, T. Kraemer, G. De Boeck i H. Maurer, „Concentrations and ratios of amphetamine, methamphetamine, MDA, MDMA, and MDEA enantiomers determined in plasma samples from clinical toxicology and driving under the influence of drugs cases by GC-NICI-MS,” *J Anal Toxicol*, nr 27, pp. 552-559, 2003.
- [81] C. Hess, M. Losacker i A. Maas, „Chromatographic separation of R-(-)/S-(+)-enantiomers of amphetamine and methamphetamine: differentiation between single methamphetamine consumption and co-consumption with amphetamine using enantioselective quantitative LC-MS/MS analysis,” *Int J Legal Med*, nr 133, pp. 467-473, 2019.
- [82] M. Losacker, S. Tonnes, E. de Sousa Fernandes Perna, J. Remaekers, J. Roehrich i C. Hess, „Chiral Serum Pharmacokinetics of 4-Fluoroamphetamine after Controlled Oral Administration: Can (R)/(S) Concentration Ratios Help in Interpreting Forensic Cases?,” *J Anal Toxicol*, 2020.
- [83] A. Truszkowska, *Analiza 4-OH amfetaminy w materiale biologicznym jako markera ekspozycji na amfetaminę*, Poznań: Uniwersytet Medyczny w Poznaniu, 2020.
- [84] L. Sanches, S. Seulin, V. Leyton, B. Passos i C. Pasqualucci, „Determination of Opiates in Whole Blood and Vitreous Humor: A Study of the Matrix Effect and an Experimental Design to Optimize Conditions for the Enzymatic Hydrolysis of Glucuronides,” *J Anal Toxicol*, nr 36, pp. 162-170, 2012.
- [85] M. Losacker, M. Kreamer, A. Philipsen, K. Duecker, N. Dereimuller, J. Engelmann, J. Roehrich i C. Hess, „Enantioselective Quantification of Amphetamine and Metabolites in Serum Samples: Forensic Evaluation and Estimation of Consumption Time,” *Metabolites*, tom 11, nr 521, 2021.
- [86] A. Nair i B. Jacobs, „A simple practice guide for dose conversion between animals and human.,” nr 7, pp. 27-31, 2016.
- [87] T. White, A. Justice i H. de Vit, „Differential subjective effects of D-amphetamine by gender, hormone levels and menstrual cycle phase,” *Pharmacol Biochem Behav*, nr 73, pp. 729-741, 2002.
- [88] E. Tanaka, „Gender-related differences in pharmacokinetics and their clinical significance,” *J Clin Pharm Ther*, nr 24, pp. 339-346, 1999.

- [89] R. Harris, L. Benet i R. Schwartz, „Gender effects in pharmacokinetics and pharmacodynamics,” *Drugs*, nr 50, pp. 222-239, 1995.
- [90] A. Jones, A. Holmgren i F. Kugelberg, „Driving under the influence of central stimulant amines: age and gender differences in concentrations of amphetamine, methamphetamine, and ecstasy in blood,” *J Stud Alcohol Drugs*, nr 69, pp. 202-208, 2008.

10. Spis tabel

Tabela 1. Efekty zażycia amfetaminy	13
Tabela 2. Parametry farmakokinetyczne amfetaminy u człowieka.....	21
Tabela 3. Parametry farmakokinetyczne amfetaminy u szczura po dożylnym podaniu amfetaminy w dawce 15 mg/kg.....	23
Tabela 4. Parametry źródła jonizacji detektora masowego dla AMF D ₅ oraz 4-OH-AMF.....	43
Tabela 5. Parametry poszczególnych przejść MRM dla substancji badanych oraz wzorca wewnętrznego.....	43
Tabela 6. Parametry źródła jonizacji detektora masowego dla S (+) i R (-) AMF oraz AMF D ₅	44
Tabela 7. Parametry poszczególnych przejść MRM dla substancji badanych oraz wzorca wewnętrznego.....	44
Tabela 8. Parametry krzywych wzorcowych enancjomerów amfetaminy i 4-OH-AMF dla krwi i osocza.....	54
Tabela 9. Precyzja i dokładność 4-OH-AMF we krwi i osoczu.....	55
Tabela 10. Precyzja i dokładność S (+) AMF we krwi i osoczu.....	55
Tabela 11. Precyzja i dokładność R (-) AMF we krwi i osoczu.....	56
Tabela 12. Odzysk 4-OH-AMF i stereoizomerów amfetaminy z krwi i osocza.....	56
Tabela 13. Efekt matrycowy 4-OH-AMF i stereoizomerów amfetaminy z krwi i osocza.....	57
Tabela 14. Wyniki badania zawartości i składu dowodów rzeczowych zawierający amfetaminę.....	57-58
Tabela 15. Wyniki oznaczenia enancjomerów amfetaminy oraz 4-OH-AMF po dożołądkowym podaniu racemicznej amfetaminy w dawce 10 mg/kg/m.c.....	59
Tabela 16. Parametry farmakokinetyczne enancjomerów amfetaminy po dożołądkowym podaniu racemicznej amfetaminy w dawce 10 mg/kg/m.c. (farmakokinetyka bezmodelowa).....	60
Tabela 17. Parametry farmakokinetyczne amfetaminy oraz 4-OH-AMF po dożołądkowym podaniu racemicznej amfetaminy w dawce 10 mg/kg/m.c. (farmakokinetyka bezmodelowa).....	60
Tabela 18. Wynik analizy amfetaminy dla modelu jednokompartamentowego.....	61
Tabela 19. Wynik analizy 4-OH-AMF w modelu dwukompartamentowym.....	62-63
Tabela 20. Wyniki oznaczeń enancjomerów amfetaminy 4-OH-AMF we krwi kobiet.....	63-64
Tabela 21. Wyniki oznaczeń enancjomerów amfetaminy 4-OH-AMF we krwi mężczyzn.....	64-66
Tabela 22. Poziomy amfetaminy notowane w próbkach poddawanych badaniom.....	65
Tabela 23. Porównanie stosunku R/S amfetaminy w dowodach rzeczowych i materiale biologicznym dla kobiet i mężczyzn.....	67
Tabela 24. Porównanie stosunku R/S amfetaminy w dowodach rzeczowych i materiale biologicznym dla kobiet i mężczyzn łącznie.....	67
Tabela 25. Porównanie poziomu 4-OH-AMF we krwi dla kobiet i dla mężczyzn.....	68
Tabela 26. Porównanie poziomu 4-OH-AMF we krwi oraz poszczególnych enancjomerów amfetaminy oraz ich sumy amfetaminy we krwi w grupie kobiet.....	69

Tabela 27. Porównanie poziomu 4-OH-AMF we krwi oraz poszczególnych enancjomerów amfetaminy oraz ich sumy we krwi w grupie mężczyzn.....	70
Tabela 28. Porównanie poziomu 4-OH-AMF oraz poszczególnych enancjomerów amfetaminy oraz ich sumy we krwi dla całej badanej grupy.....	71
Tabela 29. Porównanie zależności między poziomem 4-OH-AMF a stosunkiem enancjomerów w poszczególnych przedziałach stężeń w grupie kobiet.....	73
Tabela 30. Porównanie zależności między poziomem 4-OH-AMF a stosunkiem enancjomerów w poszczególnych przedziałach stężeń w grupie mężczyzn.....	73
Tabela 31. Porównanie zależności między poziomem 4-OH-AMF a stosunkiem enancjomerów w poszczególnych przedziałach stężeń dla całej grupy badanej.....	73
Tabela 32. Porównanie zależności między poziomem całkowitym amfetaminy a stosunkiem enancjomerów w poszczególnych przedziałach stężeń w grupie kobiet.....	73
Tabela 33. Porównanie zależności między poziomem całkowitym amfetaminy a stosunkiem enancjomerów w poszczególnych przedziałach stężeń w grupie mężczyzn.....	74
Tabela 34. Porównanie zależności między poziomem całkowitym amfetaminy a stosunkiem enancjomerów w poszczególnych przedziałach stężeń w całej grupie badanej.....	74

11. Spis rycin

Ryc. 1 Zależność pomiędzy stężeniem amfetaminy a wpływem na funkcje psychomotoryczne.....	14
Ryc. 2 Struktura chemiczna enancjomerów amfetaminy (modyfikacja własna).....	15
Ryc. 3 Schemat przemian metabolicznych amfetaminy (modyfikacja własna).....	21
Ryc. 4 Przykładowe chromatogramy (poszczególnych przejść MRM) materiału badanego metodą HPLC-MS/MS na zawartość S (+) i R (-) AMF: a) – próbka ślepa, b) - próbka zerowa i c) – próbka badana. RT 7,19 - S (+) AMF D ₅ , RT 8,37 - R (-) AMF D ₅ , RT 7,401 - S (+) AMF i RT 8,66 - R (-) AMF.....	51-52
Ryc. 5 Przykładowe chromatogramy (poszczególnych przejść MRM) materiału badanego metodą HPLC-MS/MS na zawartość 4-OH-AMF: a) – próbka ślepa, b) - próbka zerowa i c) – próbka badana. RT – 3,70 - AMF D ₅ , RT 4,46 – 4-OH-AMF.....	53-54
Ryc. 6 Rozkład mas zabezpieczanych dowodów rzeczowych.....	59
Ryc. 7 Wykres półlogarytmiczny zmian stężenia amfetaminy w modelu jednokompartmentowym po dożołądkowym podaniu racemicznej amfetaminy w stężeniu 10 mg/kg/mc.....	61
Ryc. 8 Wykres półlogarytmiczny zmian stężenia amfetaminy i 4-OH-AMF w modelu dwukompartmentowym po dożołądkowym podaniu racemicznej amfetaminy w stężeniu 10 mg/kg/mc.....	62
Ryc. 9 Porównanie stosunku R (-) i S (+) AMF w badanych dowodach rzeczowych oraz materiale biologicznym zabezpieczonym od kobiet i od mężczyzn.....	67
Ryc. 10 Porównanie stosunku R (-) i S (+) AMF w badanych dowodach rzeczowych oraz materiale biologicznym zabezpieczonym od kobiet i od mężczyzn łącznie.....	68
Ryc. 11 Porównanie poziomów 4-OH-AMF w badanych próbkach zabezpieczonych od kobiet i od mężczyzn.....	68
Ryc. 12 Wykres rozrzutu: zależność stężenia 4-OH-AMF od stężenia R (-) AMF w badanych próbkach zabezpieczonych od kobiet.....	69
Ryc. 13 Wykres rozrzutu: zależność stężenia 4-OH-AMF od stężenia S (+) AMF w badanych próbkach zabezpieczonych od kobiet.....	69

Ryc. 14 Wykres rozrzutu: zależność stężenia 4-OH-AMF od łącznego stężenia enancjomerów w badanych próbkach zabezpieczonych od kobiet.....	70
Ryc. 15 Wykres rozrzutu: zależność stężenia 4-OH-AMF od stężenia R (-) AMF w badanych próbkach zabezpieczonych od mężczyzn.....	70
Ryc. 16 Wykres rozrzutu: zależność stężenia 4-OH-AMF od stężenia S (+) AMF w badanych próbkach zabezpieczonych od mężczyzn.....	71
Ryc. 17 Wykres rozrzutu: zależność stężenia 4-OH-AMF od łącznego stężenia enancjomerów w badanych próbkach zabezpieczonych od mężczyzn.....	71
Ryc. 18 Wykres rozrzutu: zależność stężenia 4-OH-AMF od stężenia R (-) AMF w badanych próbkach dla całej grupy badanej.....	72
Ryc. 19 Wykres rozrzutu: zależność stężenia 4-OH-AMF od stężenia S (+) AMF w badanych próbkach dla całej grupy badanej.....	72
Ryc. 20 Wykres rozrzutu: zależność stężenia 4-OH-AMF od łącznego stężenia enancjomerów w badanych próbkach dla całej badanej grupy.....	72

Załącznik nr 1

UCHWAŁA NR 29/2008

z dnia 20.06.2008 r.

Lokalne Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Poznaniu

§ 1

Na podstawie art. 30 ust. 1 pkt 1 ustawy z dnia 21 stycznia 2005r. o doświadczeniach na zwierzętach (Dz. U. Nr 33, poz. 289) i § 14 ust. 3 rozporządzenia Ministra Nauki i Informatyzacji z dnia 29 lipca 2005r. w sprawie Krajowej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach oraz lokalnych komisji etycznych do spraw doświadczeń na zwierzętach (Dz. U. Nr 153, poz. 1275), po rozpatrzeniu wniosku, pt.: Farmakokinetyka eliminacji enancjomerów amfetaminy i jej potencjalne zastosowanie w opiniotawstwie sądowo-lekarskim z dnia 30.05.2008 r., złożonego przez prof. Romana Wachowiaka z Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej UM w Poznaniu, lokalna komisja etyczna:

WYRAŻA ZGODĘ

na przeprowadzenie doświadczeń na zwierzętach w zakresie wniosku.

§ 2

W wyniku rozpatrzenia wniosku, o którym mowa w § 1, lokalna komisja etyczna ustaliła, że:

1. Wniosek należy zaliczyć do kategorii:

Badania naukowe na zwierzętach

2. Najwyższy stopień inwazyjności proponowanych procedur nie przekracza wartości 2.

3. Doświadczenia będą przeprowadzone na zwierzętach (gatunek, liczba zwierząt):
szczury szczepu Wistar-40 sztuk

4. Doświadczenia będą przeprowadzone przez (nazwisko i imię, nazwa jednostki doświadczalnej):
Prof. Wachowiaka Romana z Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej UM w Poznaniu z zespołem

5. Doświadczenia będą przeprowadzane na tkankach i narządach uzyskiwanych od zwierząt w ramach:

§ 3

Integralną część niniejszej uchwały stanowi uzasadnienie i kopia wniosku, o którym mowa w § 1.

[Pieczęć lokalnej komisji etycznej]

Podpisy członków lokalnej komisji etycznej biorących udział w głosowaniu:

1. Prof. dr hab. Krzysztof W. Nowak, Przewodniczący LKE

2. Dr Czesław Sadowski, Wiceprzewodniczący LKE

3. Dr Paweł Antosik

4. Prof. dr hab. Teresa Bobkiewicz-Kozłowska

5. Dr Elżbieta Czarniewska

6. Prof. dr hab. Szymon Godynicki

7. Dr Paweł Olszewski

8. Mgr inż. Przemysław Wylegała

9. Dr Aleksandra Ziętek-Berdychowska

LOKALNA KOMISJA ETYCZNA
do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach
60-637 Poznań, ul. Wolynska 35
tel. 061 8487198; fax 061 8487197

Otrzymują:

1. Wnioskodawca,
2. a/a

Pouczenie

Strona niezadowolona z niniejszej uchwały może wnieść odwołanie do Krajowej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w terminie 30 dni od dnia otrzymania uchwały.

Odwołanie składa się za pośrednictwem lokalnej komisji etycznej, która wydała uchwałę, zgodnie z § 20 rozporządzenia Ministra Nauki i Informatyzacji z dnia 29 lipca 2005r. w sprawie Krajowej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach oraz lokalnych komisji etycznych do spraw doświadczeń na zwierzętach (Dz. U. Nr 153 poz. 1275).

Załącznik nr 2



UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Collegium Maius
ul. Fredry 10
61-701 Poznań

tel. (+48 61) 854 62 51, 854 60 60
fax. (+48 61) 854 61 07
www.bioetyka.ump.edu.pl

Uchwała nr 471/11

Na podstawie przepisów Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarza i lekarza dentysty (Dz. U. 1997, Nr 28, poz. 152); Rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz. U. Nr 47, poz. 480); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 11 marca 2005 r. w sprawie szczegółowych wymagań Dobrej Praktyki Klinicznej (Dz. U. 2005, Nr 57, poz. 500); Ustawy z dnia 6 września 2001r. Prawo farmaceutyczne (Dz. U. z 2004r. Nr 53, poz. 533 ze zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. 2004 nr 101, poz. 1034 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 18 maja 2005r. zmieniające rozporządzenie w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. Nr 101, poz. 845); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie sposobu prowadzenia badań klinicznych z udziałem małoletnich (Dz. U. 2004 Nr 104, poz. 1108); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie zgłaszania niespożywanego ciałka niepotędnego działania produktu leczniczego (Dz. U. Nr 104, poz. 1107); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 4 listopada 2008r. w sprawie wzorów dokumentów przedkładanych w związku z badaniem klinicznym produktu leczniczego oraz w sprawie wysokości i sposobu niszczania opłat za rozpoczęcie badania klinicznego (Dz. U. Nr 201, poz. 1247), kierując się Zasadami Prawidłowego Prowadzenia Badań Klinicznych – GCP – opracowanymi w oparciu o Deklarację Helsińską.

Komisja, na posiedzeniu w dniu: 12 maja 2011 r.

rozpatrzyła wniosek, który przedstawił Pan:

prof. dr hab. n. med. Roman Wachowiak

w sprawie prowadzenia badań w

Katedrze i Zakładzie Medycyny Sądowej UM w Poznaniu

Główny badacz: mgr farm. Artur Teżyk

Temat

**badan: "Ocena przydatności analizy amfetaminy i jej metabolitów w
opiniodawstwie sądowo-lekarskim".**

BRAK CECH EKSPERYMENTU MEDYCZNEGO

Komisja wyraża zgodę na prowadzenie badań

Przewodniczący Komisji

Prof. zw. dr hab. med. Zygmunt Przybylski