

Új eljárások természetes és szintetikus kábitószeraminok meghatározására

Doktori tézisek

Molnár Borbála

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola



Témavezető: Perlné Dr. Molnár Ibolya, D.Sc., egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Ludányi Krisztina, Ph.D., egyetemi docens
Vitányiné Dr. Morvai Magdolna, Ph.D.,
minőségirányítási vezető

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Klebovich Imre, D.Sc., egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai: Csörgeiné Dr. Kurin Krisztina,
Ph.D., egyetemi docens
Dr. Órfi László, Ph.D., egyetemi docens

Budapest
2016

1. Bevezetés

Az ENSZ Kábítószer-ellenőrzési és Bünmegelőzési Hivatalának jelentése szerint 2013-ban a 15-64 éves korosztály 5,2 %-a ($\pm 1,8$ %), 246 ($\pm 83,5$) millió ember fogyasztott kábítószerrel világszerte, az év során legalább egyszer. Az új, (fél)szintetikus dizájnert drogok, amelyek a hatályos tiltólistákon szereplő vegyületektől szerkezetileg kis mértékben eltérnek, így nem esnek törvényi szabályozás alá, vagyis ellenőrzés alá vonásukig jogi következmények nélkül terjeszthetők, s ezért folyamatos kihívást jelentenek a kutatók és a bűnüldöző szervek számára. Magyarországon 2010 óta összesen 108 dizájnert drogot azonosítottak, elsősorban szintetikus AM-, CTN- és kannabinoid-típusú vegyületeket.

A kábítószer-használat terjedése közegészségügyi és társadalmi gondok sokasodásával jár. Közülük egy, ritkán említett következmény: hasonlóan a terápiás felhasználású gyógyszerekhez, az illegális készítmények maradékai is megjelenhetnek természetes vizeinkben, elsősorban a sűrűn lakott települések vízi környezetének szennyezőiként. A kutatók rendkívüli figyelmet fordítanak a kábítószer meghatározására növényi, biológiai, környezeti mintákban, valamint a lefoglalásra került tételekben.

A GC-MS az egyik leggyakrabban alkalmazott technika összetett mátrixok szerves vegyületeinek azonosítására és mérésére, így a kábítószer-analitikában is kiemelt jelentőségű. A vegyületek illékonyága elengedhetetlen feltétele gázkromatográfiás meghatározásuknak. A származékképzés csökkenti a mérendő összetevők polaritását, egyúttal a keletkező termékek hőstabilitását, s gázfázisba juttatását eredményezi. A származékká alakítás jelentősen javítja a mérés érzékenységét és szelektivitását, valamint a szerkezetfelderítés hatékonyságát, így gyakran alkalmazzák kábítószer meghatározását megelőzően, számolva azzal is, hogy a minta-előkészítés idejét és költségeit növeli.

Munkám célja az volt, hogy új minta-előkészítési (dúsítás, származékképzés) eljárásokat javasoljak növényi vagy biológiai mintákban található, PFAA-szerkezetű aminok – kitüntetett figyelemmel a kábítószer (AM, MDA, MSC, CTN, CAT) – és a CTN-típusú dizájnert drogok (4-FMC, MCTN, PENT, 4-MEC, 3,4-DMMC, 4-EMC) elemzésére.

2. Célkitűzések

A szakirodalmi előzmények részletes ismeretében kitűzött céljaim:

- a. a kutatócsoport által korábban kidolgozott, szerves vegyületek GC-MS analízisére alkalmas, sok összetevőt (> 100) egyidejűleg elemző rendszer bővítése a PFAA-szerkezetű aminokkal – kitüntetett figyelemmel a kábítószerekre (AM, MDA, MSC, CTN, CAT) – és a CTN-típusú dizájnertrokokkal (4-FMC, MCTN, PENT, 4-MEC, 3,4-DMMC, 4-EMC); ennek érdekében
- b. részletes származékképzési és fragmentum-analitikai tanulmány készítése: a PFAA- és a CTN-típusú vegyületek TMS-, 2TMS- vagy oxim-TMS-származékká alakítására optimális körülmények feltárása a legalkalmasabb reagens (HMDS/MSTFA/BSTFA), katalizátor (TFE/TMCS/TMIS), oldószer (PYR, EtAc, ACN), reakcióhőfok és -idő meghatározásával;
- c. a khataminok elemzésére javasolt GC-MS eljárások kiegészítéseként a CTN, CAT és NE hatékony kromatográfiás elválasztásának megvalósítása, s a fragmentációs utak részletes ismeretében a vegyületek azonosítására alkalmas fragmentumok bemutatása;
- d. a szakirodalomban javasolt hosszadalmas, legtöbbször rendkívül bonyolult minta-előkészítési eljárások helyett az ún. "zöld kémia" feltételeit közelítő módszerek kidolgozása növényi és biológiai mintákban található fenilalkilaminok mérésére;
- e. az új eljárások analitikai teljesítményjellemzőinek meghatározása; összehasonlításuk egymással, valamint a szakirodalomban javasolt módszerekkel;
- f. a munka gyakorlati jelentőségének bizonyítása növényi és biológiai minták (*Lophophora williamsii* kaktusz, *Catha edulis* cserje, vizelet) kábítószer tartalmának meghatározásával.

3. Módszerek

3.1 A vizsgált minták

A fehérjementesített, humán vizeletminták a Semmelweis Egyetem Igazságügyi és Biztosítás-orvostani Intézetének Toxikológiai Laboratóriumából érkeztek. A *Lophophora williamsii* kaktusz az Eötvös Loránd Tudományegyetem Növényszervezettani Tanszékéről származott. A *Catha edulis* leveleket a budakalászi Gyógynövénykutató Intézet Kft. bocsájtotta rendelkezésemre.

3.2 Az eszközök

3.2.1 A minta-előkészítés eszközei

A fagyasztva szárításához Modulyo liofilizátort (Jencons, Egyesült Királyság); a minták, modelloldatok, oldószerek, reagensek és katalizátorok megfelelő térfogatának méréséhez $\pm 1\%$ pontosságú Hamilton mikrofecskendőket (Bonaduz, Svájc); a tömegméréshez $\pm 0,01$ mg pontosságú analitikai mérleget (Sartorius, Goettingen, Németország); a centrifugálásához Hettich EBA 21 (Tuttlingen, Németország) centrifuga készüléket; az ultrahanggal segített extrakcióhoz Sonorex (RK 52 H) ultrahangos fürdőt (Bandelin electronic, Berlin, Németország); a szűréshez $1,6 \mu\text{m}$ pórusátmérőjű GF/A üvegszűrőpapírt (Whatman, Maidstone, Egyesült Királyság); az oldószer-mentesítéshez Büchi Rotavapor R-200 (Flawil, Svájc) rotációs vákuumlepárlót és Büchi V-700 vákuumpumpát; a származékká alakításhoz termosztálható, a reakciócsövekkel azonos méretű fémbetűtű kályhakat (Kutesz, Magyarország) használtam.

3.2.2 Az alkalmazott gázkromatográfiai körülmények

A méréseket Varian 450 típusú (Varian, Walnut Creek, CA, USA) gázkromatográfiai készüléken végeztem, amely Varian 240 MS/MS ioncsapda rendszerű tömegszelektív detektorral, valamint Varian CP-8400 automata mintaadagolóval és szeptummal ellátott programozható injektorral rendelkezik.

Az elválasztásokat SGE forte capillary (Victoria, Ausztrália) BPX5 jelzésű, 30 m hosszú, 0,25 mm átmérőjű, 0,25 µm filmvastagságú kromatográfiás oszlopon végeztem. A vivőgáz nedvességcsapdán átvezetett, 1 mL/perc sebességgel áramoltatott 6.0 tisztaságú (99,9999 %) He volt.

3.2.3 A tömegspektrométer működésének főbb jellemzői

A Varian 240 MS/MS ioncsapda rendszerű tömegszelektív detektor tömegtartománya 50-1000 amu, pásztázási sebessége 5.000-10.000 amu/sec., a filament áramerőssége 10-100 µA között változtatható, 65.000 µs maximális ionizációs időtartam mellett.

A mérések során belső, elektronütköztetési ionizációt használtam. Az átvezető kapilláris (transfer line), az ioncsapda és a manifold hőfoka rendre 300, 210 és 80 °C volt. Az ionizációs feszültséget 70 eV értékre állítottam, a Fil/Mul késleltetés 3 perc volt. A detektort valamennyi mérés során FS üzemmódban alkalmaztam.

A készülék optimális mérési paramétereit Varian MS Workstation 6.9. szoftver segítségével ellenőriztem és vezéltem.

3.3 Eljárások

3.3.1 A származékká alakítás

A modelloldatok tömegállandóságig szárított maradékainak feldolgozását perfluoroacyl-, trimetilszilil- vagy oxim-származékká alakítási eljárásokkal, 70-100 °C hőfokon, 10-90 percig folytattam.

A származékképzés után az oldatokat szobahőfokra hűtöttem, majd a hígítatlan, vagy a megfelelő származékképző szerrel ötször-tízszor hígított elegyek 1-1 µL térfogatait három párhuzamos mérésben injektáltam a GC-MS rendszerbe.

Minden származékkészítési művelet során három párhuzamos és egy ún. "műveleti üres" (azonos módon, de modelloldat nélkül összeállított) mintát készítettem.

3.3.2 A vizeletminták kábítószer tartalmának meghatározása előzetes extrakció nélkül

A centrifugált (1200 rpm, 5 perc) vizeletminták 20-40 µL részleteit 10 µL 10 % (m/m) HCl oldattal savanyítottam, majd rotációs vákuumlejáró készüléken tömegállandóságig szárítottam. Ezután a mintákat közvetlenül, előzetes extrakció nélkül alakítottam származékká.

A visszanyerési, linearitási és LOQ adatok meghatározása során kábítószeret nem tartalmazó vizelet 20 µL térfogataihoz a CTN-típusú dizájnerdrogok ismert mennyiségeit adalékoltam (kivétel: "műveleti üres"). A minta-előkészítés további lépései egyeznek az előző bekezdésben leírt eljárással.

3.3.3 A növényminták előkészítése

A *Catha edulis* (25,09 g) és *Lophophora williamsii* (2,95 g) mintákat fagyasztva szárítottuk. A *Catha edulis* levelek liofilizálás utáni tömege 8,37 g, a *Lophophora williamsii* szöveté 0,260 g.

3.3.3.1 A *Lophophora williamsii* minta extrakciója

2,00 mg liofilizált kaktuszhoz 2,0 mL 10 % (m/m) HCl tartalmú MeOH oldatot adtam, s a mintát 60 °C hőfokú UH fürdőben, 30 percig extraháltam. Az oldószer párolgásának visszaszorítására visszafolyó hűtőt alkalmaztam. A minta folyadék fázisát szobahőfokra hűtés és centrifugálás után analitikai pontossággal 5,0 mL térfogatú mérőlombikba öntöttem. Az UH támogatott kivonást 3 alkalommal ismételtam, a frakciókat közös edényben gyűjtöttem. A kivonat 5-50 µL részleteit 2 mL térfogatú reakciócsövekbe mértem, 30 - 40 °C hőfokon tömegállandóságig szárítottam, majd származékká alakítottamk.

3.3.3.2 A *Lophophora williamsii* és a *Catha edulis* minták kábítószer tartalmának meghatározása, a vegyületek előzetese kivonása nélkül

A peyote kaktusz és a khat cserje liofilizátumainak 0,1-5 mg részleteit 2 mL-es, vákuumlejáró készülékhez csatlakoztatható, csavarmenettel ellátott reakciócsövekbe mértem, majd közvetlenül, előzetes extrakció nélkül származékká alakítottam.

Centrifugálás (1200 rpm, 5 perc) után hígítás nélkül, vagy ötszörös/tízszeres hígításban injektáltam az oldatokat. A *Catha edulis* minta elemzését standard addíciós módszerrel egészítettem ki: az ismert koncentrációjú khatamin oldatok megfelelő térfogatait rotációs vákuumlejáró készüléken leszártottam, s a száraz maradékokat a liofilizátum jelenlétében alakítottam származékká.

4. Eredmények

Új eljárásokat javasoltam a PFAA-szerkezetű vegyületek – kitüntetett figyelemmel a kábítószer (AM, MDA, MSC, CTN, CAT) – és a CTN-típusú dizájnernedrogok (4-FMC, MCTN, PENT, 4-MEC, 3,4-DMMC, 4-EMC) GC-MS meghatározására.

Felismertem a HMDS+perfluorokarbonsav reagenspárokkal képzett, alapvetően új, a PFAA-típusú vegyületekre szelektív acilező reakció feltételeit, optimális körülményeit és mechanizmusát. Megállapítottam, hogy az új eljárással kapott válaszjelek értéke (i) független az alkalmazott perfluorokarbonsavtól; (ii) egységesen nagy, amely a molekulaion ($[M]^+$) és/vagy az – önkémiai ionizáció révén keletkező – $[M+147]^+$ ion jelenlétének köszönhető; (iii) jelentősen nagyobb, mint TFAA-t alkalmazva, melynek oka egyrészt az $[M+147]^+$ ionból eredő hozzájárulás hiánya, másrészt a reagensfelesleg eltávolításából származó anyagveszteség, amely TFAA használata során legkevesebb 46 % (2-PEA) volt.

Javaslatot tettem a PFAA-szerkezetű vegyületek meghatározására azok 2TMS-származékaként. Az új eljárás előnyeit a 2TMS-termékek és a HMDS+perfluorokarbonsav reagenspárokkal képzett acilezett származékok válaszjeleinek összehasonlítása útján elemeztem: a PFAA-2TMS válaszjelei átlagosan ~1,7-szer (kiemelve a három kábítószeramint AM: 1,9-szer, MDA: 2,7-szer, MSC: 1,6-szor) nagyobbak, mint a HMDS+perfluorokarbonsav reagenspárokkal képzett termékeké. Az AM és MDA vegyületek 2TMS-származékainak válaszjeleit a megfelelő TMS-termékekével – melyeket az irodalomban javasolt eljárással, MSTFA-val oldószermentes közegben képeztem – is ütköztettem: az AM-2TMS válaszjele ~2,5-szer, az MDA-2TMS-é ~3,5-szer nagyobb, mint a megfelelő TMS-termékeké. A 2TMS-származékképzés acilezéshez viszonyított előnyeit vizeletminta AM- és *Lophophora williamsii* kaktuszminta MSC- tartalmának meghatározása útján mutattam be.

Az irodalmi előzmények hiánypótlásaként új eljárást javasoltam a khataminok meghatározására. Elsőként írtam le a CTN TMS(TMS-oxim)_{1,2}-származékká alakításának lehetőségét, s optimális feltételeit. Az új módszer legfőbb előnye (i) a kromatográfiai elválasztás hatékonyságának és (ii) a meghatározás érzékenységének javítása: a CTN-TMS(TMS-oxim)_{1,2} csúcsok válaszjeleinek összegét

összehasonlítva a CTN-TMS válaszjelével kitűnik, hogy az oximmá alakítás eredményeként jelentősen nagyobb válaszjelű termék keletkezett.

A CTN mintájára bemutattam a CTN-típusú dizájnerdrogok TMS(TMS-oxim)_{1,2}-származékká alakításának lehetőségét. Az új eljárás trimetilszililezéshez képest tapasztalt legfőbb előnye a TMS(TMS-oxim)_{1,2} termékek stabilitása, a trimetilszililezés (előzetes oximálás nélkül) ugyanis kárászéletű termékek keletkezéséhez vezet.

A szakirodalomban javasolt hosszadalmas, legtöbbször rendkívül bonyolult minta-előkészítési eljárások helyett az ún. "zöld kémia" feltételeit közelítő módszereket mutattam be növényi és biológiai mintákban található fenilalkilaminok mérésére. Meghatároztam az új eljárások analitikai teljesítményjellemzőit, s összehasonlítottam azokat egymással, valamint a szakirodalomban javasolt módszerekkel.

A munka gyakorlati jelentőségét *Catha edulis* khatamin-, *Lophophora williamsii* MSC- és vizelet PENT-tartalmának meghatározásával bizonyítottam.

5. Következtetések

Új minta-előkészítési eljárásokat javasoltam növényi és biológiai mintákban található, PFAA-szerkezetű aminok – kitüntetett figyelemmel a kábítószer (AM, MDA, MSC, CTN, CAT) – és a CTN-típusú dizájn drogok (4-FMC, MCTN, PENT, 4-MEC, 3,4-DMMC, 4-EMC) elemzésére. Ennek részeként

1. új származékképzési eljárásokat mutattam be:
 - (i) felismertem, hogy a közismert szililezőszer HMDS+TFA acilezőszerként is hatékony: a kölcsönhatás a PFAA-típusú vegyületek homológ sorának szelektív acilezésére alkalmas; a klasszikus acilezőszerekhez viszonyítva jelentősen nagyobb válaszjeleket eredményez;
 - (ii) elsőként írtam le a PFAA-szerkezetű vegyületek szelektív 2TMS-származékká alakításának mennyiségi elemzésre alkalmas feltételeit; a módszer a TMS-képzéshez és az új acilezéshez viszonyítva is számottevően nagyobb érzékenységű meghatározást tesz lehetővé;
 - (iii) javaslatot tettem a CTN és a CTN-típusú dizájn drogok szililezést megelőző oximmá alakítására; a kétlépcsős származékképzés hatékony gázkromatográfiás elválasztást és stabil termékek keletkezését eredményezi;
2. valamennyi új származékképzési eljáráshoz részletes fragmentum-analitikai tanulmányt készítettem;
3. a szakirodalomból ismert hosszadalmas, sokszor rendkívül bonyolult dúsítási eljárások helyett, a növényi és biológiai mátrixok kábítószer tartalmának direkt meghatározását javasoltam, amely az összetevők előzetes kivonás nélküli származékképzését jelenti;
4. az új eljárások (dúsítás és származékképzés) gyakorlati jelentőségét növényi és biológiai minták (*Lophophora williamsii* kaktusz, *Catha edulis* cserje, vizelet) kábítószer tartalmának meghatározásával bizonyítottam.

6. Saját publikációk

Az értekezés témájában megjelent közlemények:

Molnár B, Fodor B, Boldizsár I, Molnár-Perl I. (2016) Trimethylsilyl speciations of cathine, cathinone and norephedrine followed by gas chromatography mass spectrometry: Direct sample preparation and analysis of khatamines. *J Chromatogr A*, 1440: 172-178.

Molnár B, Fodor B, Boldizsár I, Molnár-Perl I. (2015) Quantitative silylation speciations of primary phenylalkyl amines, including amphetamine and 3,4-methylenedioxyamphetamine prior to their analysis by GC/MS. *Anal Chem*, 87: 10188-10192.

Molnár B, Csámpai A, Molnár-Perl I. (2015) Hexamethyldisilazane as an acylation generator for perfluorocarboxylic acids in quantitative derivatization of primary phenylalkyl amines confirmed by GC/MS and computations. *Anal Chem*, 87: 848-852.

Molnár B, Molnár-Perl I. (2015) The role of alkylsilyl derivatization techniques in the analysis of illicit drugs by gas chromatography. *Microchem J*, 118: 101-109.
Összefoglaló közlemény

Az értekezéstől független közlemények:

Andrási N, **Molnár B**, Dobos B, Vasánits-Zsigrai A, Záray Gy, Molnár-Perl I. (2013) Determination of steroids in the dissolved and in the suspended phases of wastewater and Danube River samples by gas chromatography, tandem mass spectrometry. *Talanta*, 115: 367-373.

Perlné Molnár I, Zsigrainé Vasánits A, Sebők Á, Helenkár A, Andrási N, Faludi T, **Molnár B**, Záray Gy. (2012) Környezeti vizek szerves szennyezőinek azonosítása és meghatározása, trimetilszilil (oxim) éter/észter származékokként, a gázkromatográfia tömegspektrometria felhasználásával. *Magy Kém Foly*, 118: 55-64. *Összefoglaló közlemény*