

## CONTRIBUȚII LA DOZAREA RAPIDĂ A AMFETAMINEI DIN MATERIALE BIOLOGICE

Maria Kincses Ajtay, Gyöngyi Dudutz, Gyöngyvér Coroian

Amfetamina face parte din grupa medicamentelor excitante ale sistemului nervos central, cu proprietăți psihostimulante marcate. Folosirea ei ridică probleme toxicologice majore atât sub aspectul intoxicației acute (supradozări, sinucideri), cât și a celei cronice (abuz de medicamente, dopaj, toxicomanie), rezolvarea cărora necesită dozarea rapidă a substanței din materiale biologice (1,2).

Pentru determinarea cantitativă a amfetaminei, literatura de specialitate indică metode volumetrică, colorimetrică bazate pe reacții de culoare ale amfetaminei cu diferiți reactivi (3, 4, 5).

În vederea dozării amfetaminei din materiale biologice am studiat aplicabilitatea metodei spectrofotometrice cu coloranți organici, denumită în literatura de specialitate „acid dye method” (6, 7, 8).

### Material și metodă

Amfetamina, datorită bazicității moleculei (structura fenilalchil-amină  $pK = 4,2$ ), formează săruri liposolubile cu diferite tipuri de coloranți organici acizi. Acești compuși, datorită liposolubilității lor, pot fi extrăși cantitativ cu solvenți organici și apoi descompuși prin acidulare sau alcalinizare, punându-se în libertate colorantul respectiv, a cărui colorație se determină fotometric.

În lucrarea de față ne-am propus experimentarea condițiilor optime de lucru ale metodei, folosind ca reactiv coloranții: tropeolina 00 (Too), albastru de bromtimol (ABT), metiloranj (MO) și eriocrom T (erio T).

#### Reactivi:

- sol. etalon sulfat de amfetamina D.L. (Merck) 1 ml/0,1 mg în apă
- sol. tropeolina 00, sarea sodică, 1% în apă (Too)
- sol. albastru de bromtimol, 0,1% în apă (ABT)
- sol. metiloranj 0,1% în apă (MO)
- eriocrom T substantă, p.a.
- sol. acetat de sodiu 2 M

- tampon acid acetic-acetat de sodiu (pH = 4,5)/9.8 ml sol. 0,2 M acetat de sodiu, 10,2 ml sol. 0,2 M acid acetic/
- sol. acid sulfuric 1% (in vol) in metanol
- sol. hidroxid de sodiu 0.4% in metanol
- cloroform p.a.
- metanol absolut

### Tehnica de lucru

Pentru prepararea scării etalon, într-o serie de pilnii de separare se introduc cantități crescînde din soluția etalon de amfetamină (între 2—200  $\mu\text{g}$  substanță activă). Probele se completează pînă la un volum de 5 ml fie cu apă distilată, fie cu un tampon indicat pentru metoda respectivă în tabelul nr. 1. În continuare se adaugă cite 3 ml din soluția reactiv-colorant, se agită energic, apoi se extrage cu 10 ml cloroform. Se separă în eprubete gradate cite 9 ml din extractul cloroformic la care se adaugă 1 ml soluție de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  sau  $\text{NaOH}$  în metanol, în funcție de metoda aplicată.

Intensitatea colorației se citește la Spccol, la lungimile de unde ( $\lambda_{\text{max}}$ ) stabilite de noi pe baza curbelor de absorbție ale coloranților.

Tabelul nr. 1. arată schema metodelor de dozare

Schema de lucru a metodelor de dozare

Nr. crt. Metoda	Cant. de amfetamina	Vol. tot. de pr. 5 ml	Colorant (reactiv)	Solvent	Descompunerea sării liposol.	Colorația
1. Too	10-100 $\mu\text{g}$ de probă sau în urină	tampon acid acet. acetat Na (pH=4,5)	tropeolină 00 1 <sup>o</sup> 3 ml	$\text{CHCl}_3$ 10 ml	$\text{H}_2\text{SO}_4$ în metanol 1 ml	roșu ( $\lambda_{\text{max}} = 530$ )
2. ABT	10-50 $\mu\text{g}$ de probă sau în urină	sol. acetat de sodiu 2M	albastru de brom-timol 0,1 <sup>o</sup> 3 ml	$\text{CHCl}_3$ 10 ml	$\text{NaOH}$ în metanol 1 ml	albastru ( $\lambda_{\text{max}} = 590$ )
3. MO	20-100 $\mu\text{g}$ de probă sau în rezid. extr. reluat în $\text{H}_2\text{SO}_4$ 0,01 N	apă distilată	metiloranj 0,1 <sup>o</sup> 3 ml	$\text{CHCl}_3$ 10 ml	$\text{H}_2\text{SO}_4$ în metanol 1 ml	roșu ( $\lambda_{\text{max}} = 530$ )
4. Erio T	20-100 $\mu\text{g}$ de probă	apă distilată	erio T subst. 0,005 g probă	$\text{CHCl}_3$ 10 ml	$\text{H}_2\text{SO}_4$ în metanol 1 ml	roșu ( $\lambda_{\text{max}} = 530$ )

Curbele de etalonare sint redade în figurile nr. 1, 2, 3, 4.

În urma calculelor statistice se constată o liniaritate excelentă în domeniul de concentrații între 10—100  $\mu\text{g}$  substanță activă (tabel nr. 2).

Tabelul nr. 2  
Prelucrarea statistică a rezultatelor

Nr. crt.	Substanța și reactiv	$Y = bx + a$	$S_0$	$r$
1.	Amfetamină cu tropeolină 00	$y \pm 0,016407 = (0,23214 \pm \pm 0,01960) x + (-0,02169 \pm \pm 0,01527)$	$\pm 0,016407$	$\pm 0,9859$
2.	Amfetamină cu albastru de bromtimol	$y \pm 0,008752 = (0,57 \pm \pm 0,02765) x + (0,023 \pm \pm 0,009176)$	$\pm 0,008752$	$\pm 0,9984$
3.	Amfetamină cu metiloranj	$y \pm 0,0736 = (1,477 \pm \pm 0,3808) x + (0,04245 \pm \pm 0,03882)$	$\pm 0,0736$	$\pm 0,9912$
4.	Amfetamină cu eriocrom T	$y \pm 0,00751 = (1,7166 \pm \pm 0,04134) x + (0,000667 \pm \pm 0,004679)$	$\pm 0,00751$	$\pm 0,9976$

### Rezultate și discuții

Rezultatele experiențelor privind stabilirea condițiilor optime de lucru, reflectă următoarele:

1. pH-ul influențează formarea și extracția sării liposolubile colorant-amfetamină. Astfel lucrând cu Too, cele mai bune rezultate se obțin la pH ușor acid (pH=4,5), stabilit cu tamponul acid acetic-acetat de sodiu. În cazul reactivului ABT, sarea respectivă se formează la valorile de pH cuprinse într-un interval de pH 6,6—7,4 în prezența soluției de acetat de sodiu 2 M. Utilizarea tamponului fosfat Sörensen indicat de literatura de specialitate a dat rezultate mult inferioare celor obținute cu soluție de acetat de sodiu.

În cazul dozărilor efectuate cu MO și Erio T, tamponarea mediului de lucru nu este necesară. pH-ul 5,8—6 al soluției analizat corespunde chiar valorilor de pH optime formării și extracției compusului amfetamină-colorant.

2. Ca solvent extractiv al compusului cercetat, cel mai adecvat s-a dovedit a fi cloroforul. Am încercat aplicabilitatea altor solvenți organici citați de literatura de specialitate (benzen, diclorometan), care însă nu au asigurat extracția cantitativă a sării.

Metodele 1 și 2 prezintă avantajul utilizării lor pentru determinarea amfetaminei direct din urină (lucrând pe 2 ml probă de urină).

Metodele 3 și 4, prevăd extracția anterioară a amfetaminei din probe biologice. În acest caz proba de urină se alcalinizează cu  $\text{NH}_4\text{OH}$  diluat (pH = 10—11), și se extrage cu eter. Reziduul uscat, după evaporarea eterului este reluat cu acid sulfuric 0,01 N, adăugat în cantități

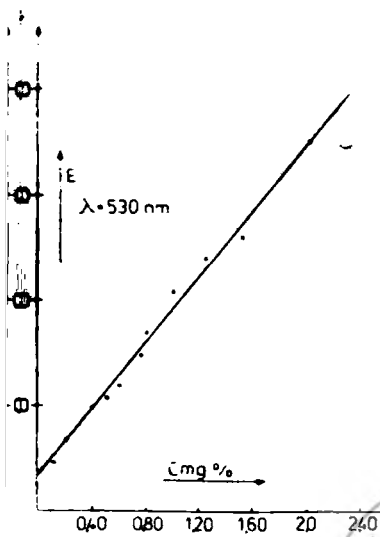


Fig. nr. 1: Curba etalon a amfetaminei.  
Reactiv: metiloranj

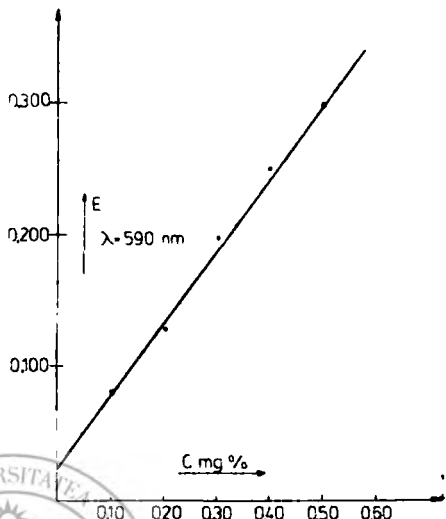


Fig. nr. 2: Curba etalon a amfetaminei.  
Reactiv: albastru de bromtil

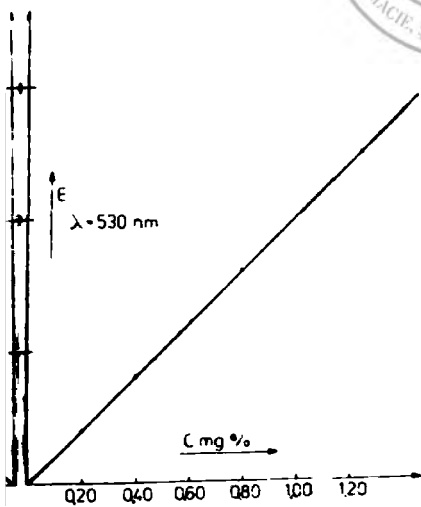


Fig. nr. 3: Curba etalon a amfetaminei.  
Reactiv: tropeolina OO

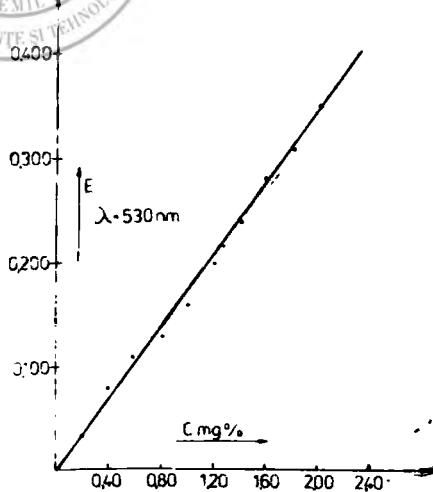


Fig. nr. 4: Curba etalon a amfetaminei.  
Reactiv: erio T

equimoleculare (pentru evitarea excesului de  $H_2SO_4$ ). Soluția obținută servește pentru determinări cantitative, aplicind metodele arătate.

### Concluzii

Metodele „acid dye” experimentate servesc pentru determinarea rapidă și simplă a amfetaminei din urină. Sensibilitatea metodelor este avansată (2  $\mu g$  substanță activă, 10 ml sol. extractivă).

Din rezultatele experimentale reiese că aplicabilitatea cea mai bună o prezintă metoda 1 (cu Too), care permite dozări directe din urină.

### Bibliografie

1. *Knoil J.*: Gyógyszertan. Medicina, Budapest, 1983;
2. *Cotrău M.*: Toxicologia substanțelor organice. Ministerul Industriei Chimice, București, 1985;
3. *Szász Gy.* Gyógyszerészeti kémia. Medicina, Budapest, 1983;
4. *Vejdelek/Kakác*: Farbreaktionen in der spektrophotometrischen Analyse Organischer Verbindungen. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1980;
5. *Racz I., Marton Szilvia*: Gyógyszerészet (1983), 27, 204;
6. *Blazek J.*: Die Pharmazie (1967), 120, 3, 129;
7. *Matsui F., Watson J. R., French W. N.*: J. Chromatog. (1969), 44, 109;
8. *Mc Martin C., Simpson P., Thrope N.*: J. Chromatog. (1969), 43, 72

*Maria Kincses-Ajtay, Gyöngyi Dudutz, Gyöngyver Coroian*

### CONTRIBUTIONS TO THE RAPID ASSAYING OF AMPETAMINE IN BIOLOGICAL MATERIAL

With a view to assay amfetamine in biological material, the authors have studied the applicability of acid dye method. They used acid dyes as a reagent e.g. tropeoline (T), Too, bromothymol blue (BTB), methyl orange (MO) and eriochrome (erio T). The extraction of the fat-soluble salt amfetamine stain was made with chloroform working in a medium plugged with acetic acid — sodium acetate solution (pH = 4.5) in Too, and sodium acetate solution (pH = 6.6 — 7.4) in BTB. In the dyes erio T and MO the extraction was made in an unplugged medium. The methods with Too and BTB can be applied directly on the urine for assaying amfetamine.

These methods are reproducible and sensitive between 20—100  $\mu g$  amfetamine/sample.