

IDENTIFICATION STUDY OF TABLETS OF UNKNOWN COMPOSITION ORIGINATING FROM ILLICIT DRUG SALE

Joanna KULIKOWSKA, Rafał CELIŃSKI, Artur SOJA, Halina SYBIRSKA

Chair and Department of Forensic Medicine, Silesian Medical Academy, Katowice

ABSTRACT: The authors have presented identification examinations of so-called ecstasy tablets taken from 3 different drug dealers working on the illicit drugs market. Analysis of alcoholic extracts of these tablets and their hydrolysates obtained at various pH's was carried out by thin-layer chromatography in a screening system, UV spectrophotometry, HPLC-DAD and mass spectrometry. This comprehensive analysis allowed us to detect 4 active components in these tablets, namely: piracetam, caffeine, pemoline and salicylic acid. Such a quantitative composition makes this patent drug a strong stimulant. The presence of pemoline allowed us to classify this preparation under controlled psychotropic substances of group IV-P (The Act of 24th April 1997 on Counteracting Drug Addiction).

KEY WORDS: Examinations of illicit drugs; Piracetam; Caffeine; Pemoline; Salicylic acid.

Z Zagadnień Nauk Sądowych, z. XLIX, 2002, 99–113

Received 5 October 2001; accepted 8 November 2001

INTRODUCTION

In recent years, the supply of illegally sold stimulants and psychostimulants has significantly grown. The preparations offered, in the form of powders or tablets, contain mainly amphetamine and its derivatives in pure form or with admixture of medicines, mainly analgesics (paracetamol, salicylic acid) and sugar (saccharose). Preparations that do not contain these psychoactive substances are also often sold under the name of amphetamine or its derivatives [5]. Complete identification of these substances is difficult, because they may be composed of several different medicines. However, the use of various analytical methods of high sensitivity and specificity can lead to successful identification. The presented report illustrates the difficulties and problems connected with identification of drugs of abuse originating from illegal sale.

MATERIAL AND METHOD

The examined materials were:

1. 1257 celadon disc-shaped tablets, 12 mm diameter, 3 mm thick and 0.55 g unit mass. The letter "Q" and two crowns were engraved on the tablets.
2. One pink-white disc-shaped tablet, 12 mm diameter, 3 mm thick, 0.55 g unit mass, with the letter "Q" and two crowns engraved.
3. A fragment of a celadon tablet with a mass of 0.20 g.

The tablets came from three different dealers and were described by them as "ecstasy". Their outward appearances showed considerable similarities.

The evidence was analysed in two stages. In the first stage, representative samples of tablets were examined. They were fragmented and dissolved in methanol. In the second examination, their alcohol extracts and pemoline standard extracts, which were obtained after acidic hydrolysis and extraction according to the Borkowski procedure with ether from acidic medium and with chloroform from alkaline medium, were analysed [1]. Methanol extracts of the tablets and standard solutions of amphetamine, methamphetamine, ephedrine, 3,4-methyldioxyamphetamine (MDA), 3,4-methyldioxy-methamphetamine (MDMA), 2,5-dimethoxyamphetamine (DMA), 3,4-methoxyethylamphetamine (MDEA), morphine and cocaine were examined by means of thin-layer chromatography (TLC). The analyses were performed on Merck aluminium plates coated with silica gel G with the addition of fluoresceine. The chromatograms were preliminarily eluted in chloroform : acetone (90:10) and methanol : ammonia (99:1) systems. The chromatographic zones were revealed by observation of the plates in ultraviolet light at wavelength of 254 nm, and use of the following tests kit: Dragendorff, Bratton – Marshal, Marquis, Mandelin, aqueous solution of iron (III) chloride, solution of mercurous chloride and chlorobenzidine reagent [3, 6]. In a further study performed using the TLC method, a developing system was used composed of benzene : dioxane and acetic acid in the volume ratio of 90:25:4 and the chlorobenzidine test as the developing reagent.

Alcoholic extracts of the tablets were also analysed by means of high pressure liquid chromatography with a diode array detector (HPLC-DAD). The study was performed using Spectra Physics apparatus with an RP-18 column, 15 cm × 4.6 mm × 5 μm, and mobile phase composed of acetonitrile, water, phosphoric acid and triethylamine (TEA) (3:5) at pH = 3.

Identification of individual components of the tablets was performed by means of ultraviolet spectrophotometry, which was applied to eluates prepared in 0.25 M H₂SO₄, coming from zones of the thin-layer chromatogram eluted in a benzene : dioxane : acetic acid system (90:25:4). The measurements were done using a Hitachi U-2001 spectrophotometer.

The mass spectrometric (MS) method was applied to identification of substances after their elution with acetonitrile from the thin-layer chromatogram. The examinations were performed using the following equipment and under the following conditions: Finigan LCQ DUO apparatus, electrospray ionisation (ESI) method, direct sample injection into detector in the form of ion trap, spray voltage – 4,5 kV, capillary temperature – 200°C, capillary voltage – 10.00 V.

The same analytical procedure was applied to examination of ether-acidic and chloroform-alkaline extracts of the tablets and the pemoline standard.

RESULTS

Preliminary screening quantitative examinations were performed, which did not indicate the presence of amphetamine and its dioxy derivatives, ephedrine, methamphetamine, morphine and cocaine.

The use of a selected developing system composed of a mixture of benzene, dioxane and acetic acid allowed us to obtain well-separated zones of four compounds. The results of colour reactions, as well as the values of separation coefficients (shown in Figure 1) suggested the presence of salicylic acid, caffeine, piracetam and pemoline in the analysed tablets.

Analysis by means of HPLC-DAD and UV methods confirmed the presence of salicylic acid, caffeine and pemoline in the tablets. The original chromatogram obtained by means of HPLC-DAD is shown in Figure 2.

Figure 3 illustrates the absorption curves of the examined substances, compared with the absorption curves of salicylic acid, caffeine and pemoline standards.

A substance with retention factor ($R_f = 0.05$) equal to the R_f of piracetam standard did not possess an absorption spectrum in the ultraviolet region (nor did the piracetam standard). The presence of piracetam in tablets was confirmed by means of the MS method. The mass spectrum recorded for the zone with $R_f = 0.05$ was consistent with the mass spectrum of piracetam standard solution.

The path of the absorption curve in the ultraviolet region, corresponding to the pemoline zone removed from the thin-layer chromatogram, was not convincingly characteristic (Figure 3). Efforts to obtain a mass spectrum for the pemoline zone did not give a satisfactory solution either. The results of analysis of the alcoholic extracts of the tablets and pemoline by the TLC method, obtained after acidic hydrolysis, are shown in Figure 5.

Figures 6 and 7 illustrate the results of examination, obtained by means of UV spectrophotometry and HPLC-DAD for unhydrolysed pemoline and

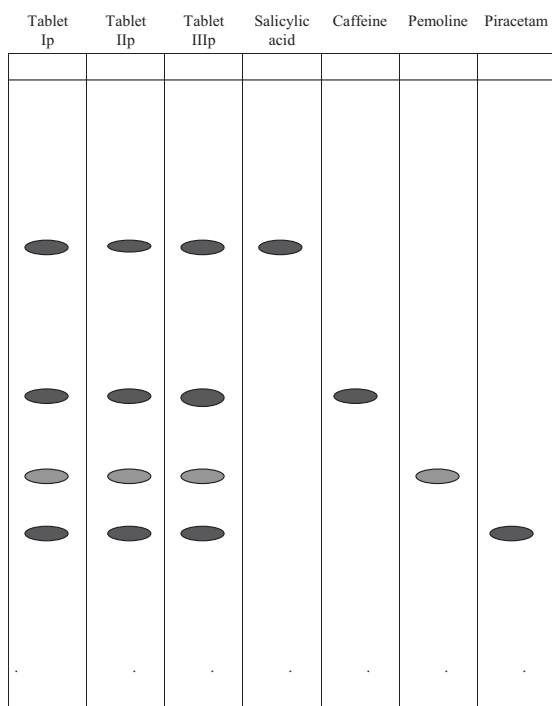


Fig. 1. Results of chromatographic separation of the components of the seized material and reference compounds.

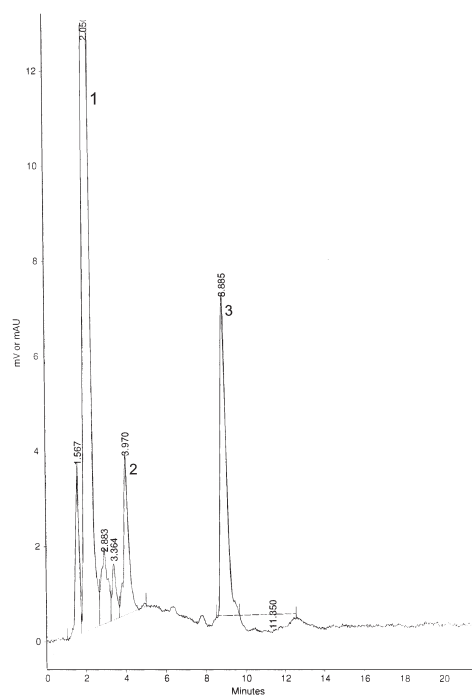


Fig. 2. Chromatographic separation of alcoholic extract of a tablet (HPLC-DAD): 1. caffeine, 2. pemoline, 3. acetylic acid.

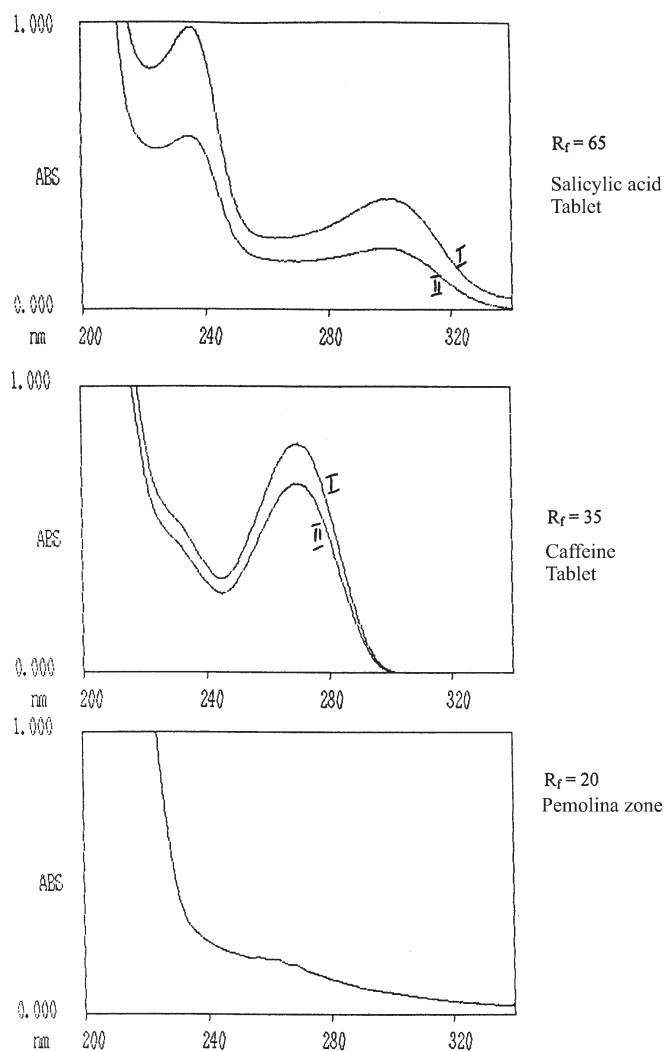


Fig. 3. The results of UV spectrophotometric measurements of thin layer chromatography eluats of a tablet.

pemoline after hydrolysis. In the next figure are series of mass ions obtained for acidic extract of pemoline zones, separated in the thin-layer.

DISCUSSION

The application of simple thin-layer chromatography, used for preliminary identification examinations in a selected developing system, allowed

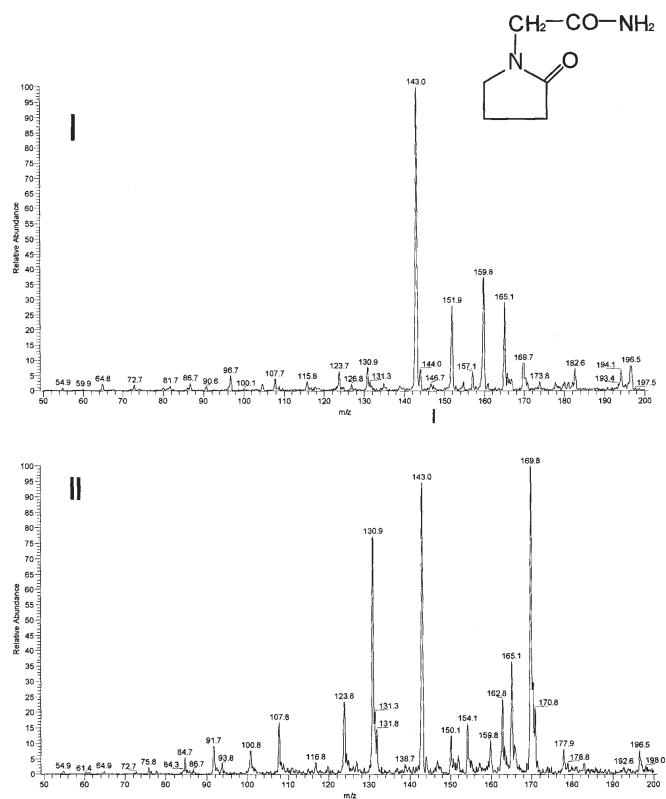


Fig. 4. Mass spectrum of a tablet's component of $R_f = 0.05$ (II) corresponding to a R_f of reference piracetam (I). Elution of thin layer chromatogram was made with acetonitrile.

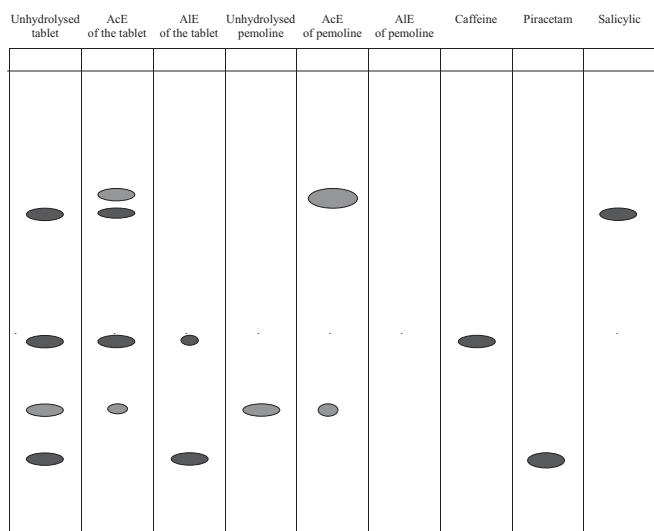


Fig. 5. The results of chromatographic separation of unchanged and hydrolysed samples of seized material and pemoline.. Ek – acid extract, Ez – alkaline extract.

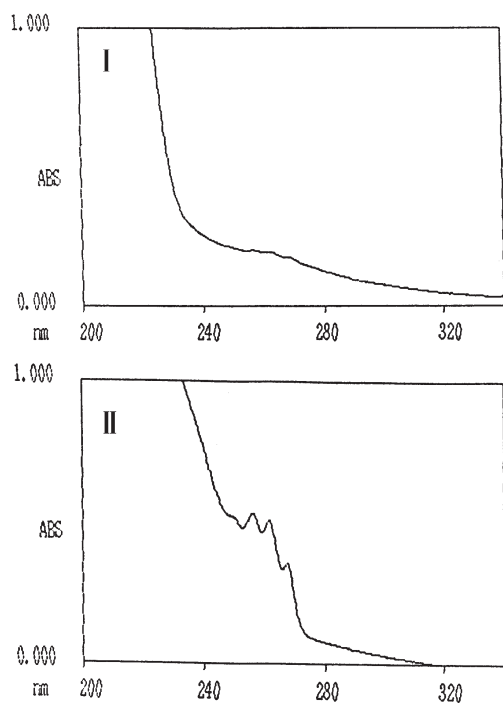


Fig. 6. Absorption spectra made of the TLC elatus of hydrolysed pemoline: I region of refraction factor $R_f = 0.20$; II region of refractionfactor $R_f = 0.82$.

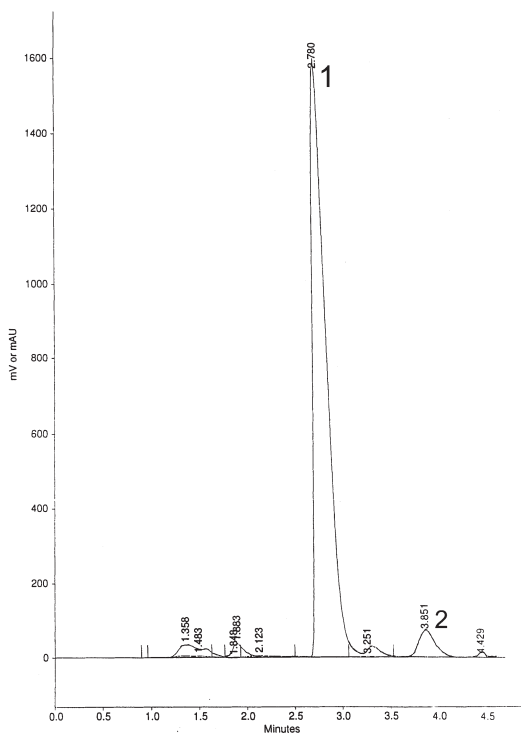


Fig. 7. Chromatographic separation of alcoholic extract of hydrolysed pemoline (HPLC-DAD).

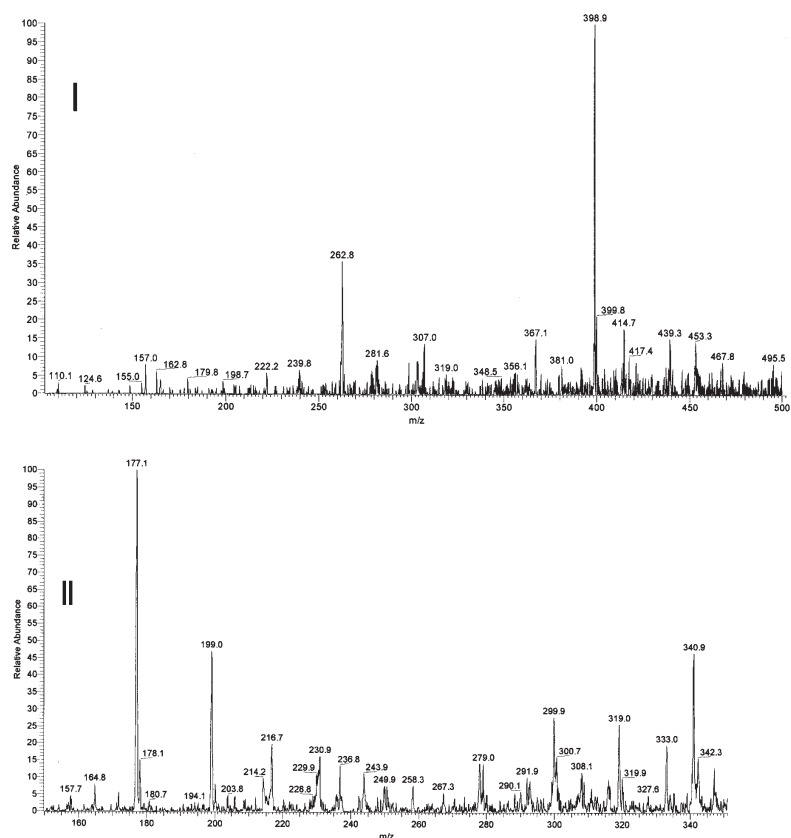


Fig. 8. Mass spectra of pemoline acid extract components after their acetonitrile elution from thin layer chromatogram: I region of refraction factor $R_f = 0.82$; II region of refraction factor $R_f = 0.20$.

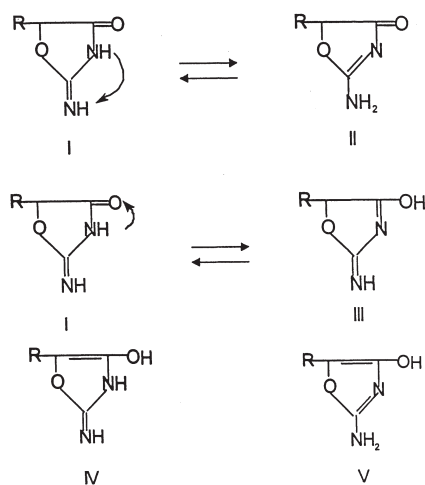


Fig. 9. Tautomeric forms of pemoline – 2-imid-5-phenyl-oxazolinyn-4-on (5-phenyl-izihydantonine) (I).

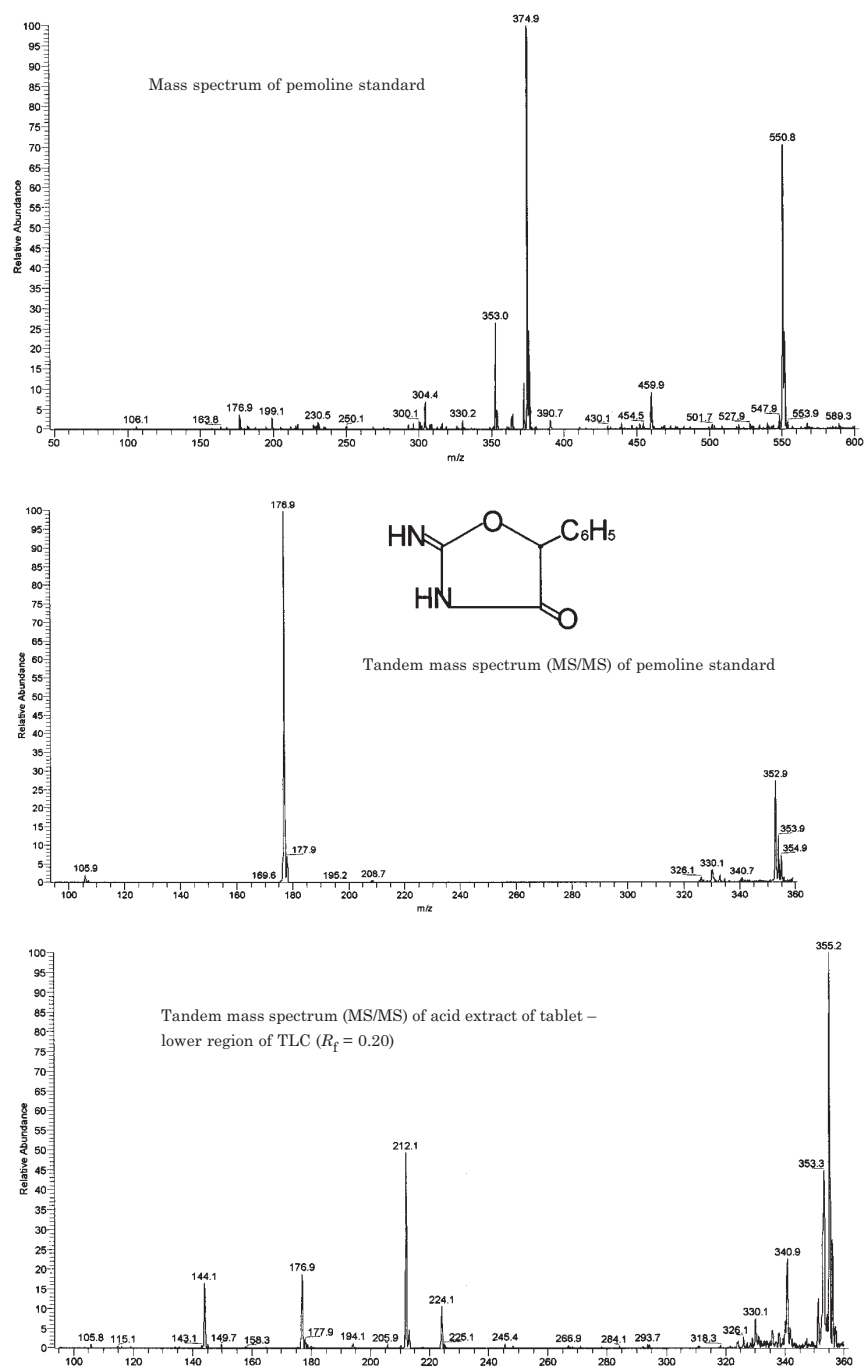


Fig. 10. Mass spectra of standard pemoline and thin layer chromatogram region of unchanged pemoline recorded during analysis of acid extract of hydrolysed tablet.

us to exclude the presence of psychoactive substances from the group of amphetamine derivatives – “ecstasy” – suggested by dealers and police, and to show the same components in all tablets of varying origin, i.e. salicylic acid, caffeine, piracetam and pemoline. The chlorobezydine test turned out to be very useful for detection of the substances on chromatograms. It detected the presence of all four components.

The identification performed on the thin-layer was verified by means of ultraviolet spectrophotometry applied to eluates of chromatographic zones of the separated substances, as well as by the HPLC-DAD method. It confirmed the presence of salicylic acid and caffeine, and was indicative of the presence of pemoline (HPLC-DAD) in the examined material. The procedure did not turn out to be useful in the case of piracetam, owing to a lack of absorption spectrum of this compound in the ultraviolet region. The characteristics of this substance obtained by means of molecular ion size (MS) measurement confirmed the presence of piracetam in the examined tablets.

Identification of pemoline was the most problematic. This is surely connected with its internal structure, which results in the possibility of inter- and intramolecular interactions [4].

The application of acidic hydrolysis to the examined material, parallel to pemoline standard at 100°C, enabled a form of the compound to be revealed on the thin-layer, which, in a zone with a coefficient R_f value of 0.82, gave a colour reaction with mercurous nitrate solution and Bratton-Marshall reagent. The absorption spectra in the UV region for the examined substance and standard were consistent with that given in the literature for pemoline [2].

The dimer of the pseudomolecular ion of pemoline, detected by means of the mass spectrometric (MS) method in eluate from the chromatographic zone of $R_f = 0.20$ (unhydrolysed pemoline), fragmented under the impact of increased MS/MS energy into a pemoline mass ion ($m/z = 176.8$).

The presence of salicylic acid, caffeine, piracetam and pemoline was shown in tablets originating from 3 different sources on the illicit drugs market. A preparation of such composition was not found on medicine lists, and, furthermore, its qualitative composition suggests non-therapeutic use.

Three components of this preparation stimulate the central nervous system, and the effect of pemoline, by analogy to amphetamine, can be intensified both by caffeine and piracetam [7].

Pemoline and its derivatives with psychoactive properties similar to amphetamine were withdrawn several years ago from health care in Poland [7]. Pemoline is classified as belonging to psychotropic substances of group IV-P (The Act of 24th April 1997 on Counteracting Drug Addiction, Addendum 2). The detection of its presence has allowed us to classify the examined tablets into a group of controlled psychotropic substances.

References:

1. Borkowski T., Metody wyosabniania trucizn organicznych z materiału biologicznego, *Archiwum medycyny sądowej i kryminologii* 1968, t. XVIII, s. 95–100.
2. Clarke's isolation and identification of drugs in pharmaceuticals, body fluids, and post-mortem material, The Pharmaceutical Press, London 1986.
3. Dłużniewska A., Kała M., Schemat identyfikacji trucizn organicznych, w szczególności leków, za pomocą chromatografii cienkowsarstwowej, *Archiwum medycyny sądowej i kryminologii* 1975, t. X, s. 49–61.
4. Howell C. F., Quinones N. Q., Hardy R. A., 2-Amino-2-oxazolin-4-ones. II. Tautomerism, *J.Org.Chem.: Organic Chemical Research Section, Lederle Laboratories Division, American Cyanamid Co., Pearl River* 1961, vol. 27, pp. 1686–1691.
5. Kulikowska J., Soja A., Sybirska H., Badania nad jakością narkotyków z grupy amfetaminy z nielegalnego obrotu, *Archiwum medycyny sądowej i kryminologii* 2000, t. L, s. 75–80.
6. Müller R. K., *Die toxikologisch-chemische Analyse*, Verlag Theodor Steinkopff, Dresden 1976.
7. Podlewski J. K., Chwalibogowska-Podlowska A., *Leki współczesnej terapii*, Wydawnictwa Fundacji Büchnera, Warszawa 2001.

BADANIA IDENTYFIKACYJNE TABLETEK O NIEZNANYM SKŁADZIE POCHODZĄCYCH Z NIELEGALNEJ SPRZEDAŻY NARKOTYKÓW

Joanna KULIKOWSKA, Rafał CELIŃSKI, Artur SOJA, Halina SYBIRSKA

WSTĘP

W ostatnich latach znacznie wzrosła podaż środków pobudzających i psychostymulujących sprzedawanych nielegalnie. Oferowane preparaty w formie proszków lub tabletek zawierają głównie amfetaminę i jej pochodne w postaci czystej lub z domieszką leków najczęściej o działaniu przeciwbólowym (paracetamol, kwas acetylosalicylowy) i cukru (sacharozy). Pod nazwą amfetaminy lub jej pochodnych sprzedawane są też często preparaty, które w swoim składzie nie zawierają tych substancji psychoaktywnych [5]. Złożone nawet z kilku różnych środków leczniczych mogą stworzyć wiele problemów analitycznych w badaniach służących ich pełnej identyfikacji. Jednak użycie różnych metod analitycznych o wysokiej czułości i specyficzności potrafi zapewnić pomyślnie dokonanie analizy. Przedstawione doniesienie stanowi ilustrację trudności i problemów związanych z identyfikacją środków odurzających pochodzących z ich nielegalnej sprzedaży.

MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań stanowiło:

1. 1257 tabletek barwy seledynowej w kształcie dysku o średnicy 12 mm, grubości 3 mm i masie jednostkowej 0,55 g. Na tabletkach wytłoczona była litera Q i dwie korony.
2. Jedna tabletkę barwy różowo białej w kształcie dysku o średnicy 12 mm, grubości 3 mm i masie 0,55 g z wytłoczoną literą Q i dwiema koronami.
3. Fragment tabletki barwy seledynowej o masie 0,20 g.

Tabletki pochodziły od trzech różnych dealerów i określane były przez nich jako „ecstasy”, zewnętrzny wygląd tych tabletek wykazywał znaczne podobieństwa.

Materiał dowodowy analizowano dwuetapowo. W pierwszym etapie poddano badaniu reprezentatywne próbki tabletek, które po rozdrobnieniu rozpuszczono w metanolu. W badaniu drugim analizowano ich ekstrakty alkoholowe (i wzorcowej pemoliny) uzyskane po kwaśnej hydrolizie i ekstrakcji wg Borkowskiego eterem ze środowiska kwaśnego i chloroformem ze środowiska zasadowego [1]. Metanolowe wyciągi tabletek oraz roztwory substancji wzorcowych amfetaminy, metafetaminy, efedryny, 3,4-metylenodioksyamfetaminy (MDA), 3,4-metylenodioksyamfetaminy (MDMA), 2,5-dimetoksyamfetaminy (DMA), 3,4-metylenodioksyetyloamfetaminy (MDEA), morfiny i kokainy badano metodą chromatografii cienkowarstwowej (TLC) na płytkach z folii aluminiowej firmy Merck z żelem krzemionkowym G z dodatkiem fluoresceiny. Wstępnie rozwijano chromatogramy w układach złożonych z chloroformu : acetonu (90:10) i metanolu : amoniaku (99:1). Do ujawnienia stref

chromatograficznych zastosowano obserwację płytek w świetle ultrafioletowym przy długości fali 254 nm oraz zestaw testów: Dragendorffa, Brattona – Marshala, Marquisa, Mandelina, roztwór wodny chlorku żelaza III, roztwór chlorku rtęciowego, odczynnik chloro-benzydynowy [3, 6]. W dalszych badaniach metodą TLC wykorzystano układ rozwijający złożony z mieszaniny benzenu : dioksanu i kwasu octowego w stosunku objętościowym 90:25:4 i test chloro-benzydynowy jako odczynnik wywołujący.

Wyciągi alkoholowe tabletek analizowano również metodą wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej z detektorem diodowym (HPLC-DAD). Badania przeprowadzono w aparacie firmy Spectra Physics przy użyciu kolumny RP-18 o wymiarach 15 cm × 4,6 mm × 5 μm i fazy ruchomej złożonej z acetonitrylu, wody, kwasu fosforowego i trójetyloaminy (TEA) (3:5) o pH = 3.

Identyfikację poszczególnych składników tabletek przeprowadzono metodą spektrofotometrii w nadfiolecie zastosowaną do sporządzonych w 0,25 M H₂SO₄ eluatów ze stref chromatogramu cienkowarstwowego rozwiniętego w układzie benzen : dioksan : kwas octowy (90:25:4). Pomiarów dokonano za pomocą spektrofotometru firmy Hitachi U-2001.

Metodę spektrometrii masowej MS zastosowano do identyfikacji substancji po ich wyeluowaniu z chromatogramu cienkowarstwowego za pomocą acetonitrylu. Badania przeprowadzono w następujących warunkach: aparat marki Finigan LCQ DUO, metoda jonizacji ESI (*electrospray*), bezpośredni nastrzyk próbki na detektor w postaci pułapki jonowej, napięcie rozpylacza – 4,5 kV, temperatura kapilary – 200°C, napięcie kapilary – 10,00 V.

Taki sam tok postępowania analitycznego zastosowano do badania ekstraktów eterowo-kwaśnych i chloroformowo-zasadowych tabletek i wzorcowej pemoliny.

WYNIKI

Przeprowadzone wstępne przesiewowe badania jakościowe nie wykazały w tabletkach obecności amfetaminy i jej dioksypochoodnych, efedryny, metamfetaminy oraz morfiny i kokainy.

Użycie wybranego układu rozwijającego złożonego z mieszaniny benzenu, dioksanu i kwasu octowego, pozwoliło na uzyskanie dobrze rozdzielonych stref czterech związków. Wyniki reakcji barwnych, a także wartości współczynników rozdziału (przedstawione na rycinie 1), sugerowały obecność w analizowanych tabletkach kwasu salicylowego, kofeiny, piracetamu i pemoliny.

Analiza metodami HPLC-DAD i UV potwierdziła w tabletkach obecność kwasu salicylowego, kofeiny i pemoliny. Na rycinie 2 przedstawiono oryginalny chromatogram uzyskany metodą HPLC-DAD.

Rycina 3 ilustruje krzywe absorpcji substancji badanych zestawione z krzywymi absorpcji substancji wzorcowych kwasu salicylowego, kofeiny i pemoliny.

Substancja o współczynniku rozdziału ($R_f = 0,05$) odpowiadającemu R_f wzorcowego piracetamu, jak i wzorcowy piracetam, nie posiadały widma absorpcji w nadfiolecie.

Obecność piracetamu w tabletkach potwierdzono metodą MS, uzyskując zapis widma masowego strefy o $R_f = 0,05$ zgodny z widmem masowym roztworu wzorcowego piracetamu.

Przebieg krzywej absorpcji w zakresie nadfioletu odpowiadający zdjętej z chromatogramu cienkowarstwowego strefie pemoliny nie był przekonywająco charakterystyczny (rycina 3). Podjęte próby uzyskania widma masowego dla strefy pemoliny nie dały również zadawalającego rezultatu.

Na rycinie 5 przedstawiono rezultaty analizy ekstraktów alkoholowych tabletek i pemoliny metodą TLC uzyskanych po kwaśnej hydrolizie.

Ryciny 6 i 7 ilustrują wyniki badań uzyskane metodą spektrofotometrii w UV i HPLC-DAD dla niezmienionej pemoliny i pemoliny poddanej hydrolizie. Na kolejnej rycinie przedstawiono pasma jonów masowych uzyskane dla rozdzielonych na cienkiej warstwie stref ekstraktu kwaśnego pemoliny.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Zastosowanie prostej metody chromatografii cienkowarstwowej użytej do wstępnych badań identyfikacyjnych pozwoliło w wybranym układzie rozwijającym na wykluczenie obecności sugerowanych przez handlarzy i policję substancji o działaniu psychoaktywnym z grupy pochodnych amfetaminy – „ecstasy” i wykazanie we wszystkich tabletkach różnego pochodzenia tych samych składników, tj. kwasu salicylowego, kofeiny, piracetamu i pemoliny. Bardzo cennym dla uwidocznienia na chromatogramach substancji okazał się test chlorobenzodynowy, który ujawnił obecność wszystkich 4 składników.

Weryfikacja dokonanej na cienkiej warstwie identyfikacji przy pomocy metody spektrofotometrii w świetle ultrafioletowym zastosowana do eluatów stref chromatograficznych rozdzielonych substancji, jak i metoda HPLC-DAD, potwierdziła obecność w materiale badanym kwasu salicylowego, kofeiny i wskazywała na obecność pemoliny (HPLC-DAD). Takie postępowanie w przypadku piracetamu okazało się nieprzydatne z uwagi na brak widma absorpcyjnego wspomnianego związku w zakresie nadfioletu. Uzyskana charakterystyka tej substancji za pomocą pomiaru wielkości jonu molekularnego (MS) potwierdziła obecność piracetamu w badanych tabletkach.

Najwięcej problemów przyniosła identyfikacja pemoliny. Związane jest to zapewne z jej strukturą wewnętrzną, z której wynika możliwość oddziaływań zewnętrznych i wewnątrzcząsteczkowych [4].

Zastosowanie kwaśnej hydrolizy badanego materiału równoległe z wzorcem pemoliny w temperaturze 100°C umożliwiło wykazanie na cienkiej warstwie takiej formy związku, który w strefie o wartości współczynnika $R_f = 0,82$ dawał reakcję barwną z roztworem azotanu rtęciowego oraz z odczynnikiem Bratton-Marshala. Widma absorpcyjne w zakresie UV dla substancji badanej i wzorcowej były zgodne z podanym w piśmiennictwie dla pemoliny [2].

Ujawniony za pomocą metody spektrometrii masowej (MS) w eluacie ze strefy chromatograficznej o $R_f = 0,20$ (pemolina niezmieniona) dimer jonu pseudomolekularnego pemoliny fragmentował pod wpływem zwiększonej energii MS/MS na jon masowy pemoliny ($m/z = 176,8$).

W tabletkach pochodzących z nielegalnego rynku narkotyków z 3 różnych źródeł wykazano obecność kwasu salicylowego, kofeiny, piracetamu i pemoliny. Preparatu o takim składzie nie znaleziono w spisach leków, a jego skład jakościowy wskazywać może na nieterapeutyczne przeznaczenie. Trzy składniki tego preparatu pobudzają

ośrodkowy układ nerwowy, przy czym oddziaływanie pemoliny ze względu na analogię do amfetaminy może być nasilone zarówno przez kofeinę, jak i piracetam [7].

Pemolina oraz jej pochodne o własnościach psychoaktywnych podobnych do amfetaminy przed kilku laty zostały wycofane w Polsce z lecznictwa [7]. Pemolina zaliczana jest do substancji psychotropowych z grupy IV-P (ustawa o przeciwdziałaniu narkomanii z 1997 r., załącznik 2). Wykrycie jej obecności pozwoliło zakwalifikować badane tabletki do grupy kontrolowanych substancji psychotropowych.