



ANALYSIS OF ATROPINE AND SCOPOLAMINE IN BODY FLUIDS*

Agnieszka SKULSKA, Maria KAŁA

Institute of Forensic Research, Krakow, Poland

Abstract

Methods for determination of atropine (AT) and scopolamine (SK) in biological material (whole blood and urine) using the liquid chromatography atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry technique (LC-MS/APCI) were developed. Separation of analytes was performed using a LiChroCART LiChrospher 60 RP-select B column in gradient conditions. The mobile phase consisted of 0.1% (v/v) formic acid in water and in acetonitrile. Target analytes were isolated from biological matrices using the liquid-liquid extraction technique. The validation data of the methods were characterised by: limit of detection (*LOD*, *S/N* = 3) and limit of quantification (*LOQ*, *S/N* = 10) – 0.2 and 0.6 ng ml⁻¹ for SK, and 0.3 and 0.9 ng ml⁻¹ for AT, both in blood, whereas 1.8 and 2.1 ng ml⁻¹ for SK, and 0.6 and 0.9 ng ml⁻¹ for AT in urine. Calibration curves showed linearity in concentration ranges from *LOQ* to 25 ng ml⁻¹ in blood and from *LOQ* to 50 ng ml⁻¹ in urine. Determination coefficients (*R*²) of linear regression equation were higher than 0.98. Extraction recoveries were determined at analytes and internal standard (IS) concentration of 5 ng ml⁻¹ for blood, and at analytes and IS concentrations of 20 and 5 ng ml⁻¹, respectively for urine. Extraction recovery ranged from 80 (AT) to 85% (SK) for blood and 63–72% for urine.

Key words

Atropine; Scopolamine; LC-MS/APCI methods.

Received 20 November 2006; accepted 27 December 2006

1. Introduction

Almost all civilisations have used specific substances to evoke pleasure, relieve pain and alleviate tiredness and anxiety off. One of the first known natural psychoactive substances was *Cannabis*.

Cannabis is a plant from which psychoactive products: hashish and marijuana can be obtained. They have been known in Ancient China for as long as 5000 years, and used as a medium for spiritual inspiration. In the Mediterranean basin *Cannabis* appeared together with the propagation of Islam around the 7th century. In Europe hashish became known after Napoleon's expedi-

tions to Egypt. After a widespread addiction problem, in the year 1800 it became illegal among Napoleon's army. At present, *Cannabis* is used for non-medical purposes all over the world [1, 5]. "Annual report on the state of the drugs problem in Europe" published in 2005 states that *Cannabis* is the most common illicit drug on our continent. The number of young people using marijuana and hashish is still increasing. 11% to 44% Europeans aged 15–34 admits to having tried *Cannabis* at least once [4]. In Poland, the Act on Counteracting Drug Addiction of 29 July 2005 classifies *Cannabis* hemp and resin as well as decoctions, tinctures, and extracts as narcotics in group I-N. ⁹-tetrahydrocannabinol (9THC, THC) is the primary psychoactive agent of *Cannabis* and is listed in group II-P.

Legal limitations, restricted access and costs of controlled substances push people addicted to drugs to

* The research was financed from the budget's funds for science for years 2005-2007 at the Ministry of Education and Science, grant No 0 T00C 035 28.

seek new alternative sources of intoxication. Nowadays, nightshades are becoming increasingly popular. The most popular are *Datura stramonium*, *Atropa belladonna*, henbane such as *Hyoscyamus niger* and mandragora.

The above mentioned plants have been used for centuries in folk ceremonies, medicine, and in ancient and medieval times were applied as poisons. They were also considered to have magical properties which linked them to “black magic”. They are mentioned in the Old Testament (Genesis: 30,14–17, Song of Solomon 7,14) as well as in Shakespeare’s plays (Anthony and Cleopatra, act I, scene 5; Romeo and Juliet, act IV, scene 3).

In recent years there have been many cases of intoxication caused mostly by *Datura stramonium*. The popularity of these plants is based on their easy availability, and possibility of cultivation without any legal implications. *Datura* is a popular garden, veranda and terrace decoration. There have been many press and internet reports on the administration of *Datura* for recreational purposes. Comments include: “*Datura* can kill”, “Devilish herb dangerous again”, “Devil’s harvest”, “Devilish herb and alcohol – makes you stoned for sure”. There are also many reports from “trips” after administration of the these substances [3, 6], recipes for preparing smoking mixtures, decoctions and tinctures [2]. Young drug users usually drink water tinctures, or chew leaves or seeds. Rarely, the leaves are mixed with marijuana and smoked in the form of handmade cigarettes.

Atropine, one of the fundamental constituents of these plant substances is applied in premedication before anaesthesia, in ophthalmology in order to dilate the pupils of the eyes and counteract cycloplegia, in cardiology, and also as an antidote to phosphorous organic compounds intoxication. Scopolamine is used in medicine in a similar way.

Atropine and scopolamine affect the human organism at low concentration/doses. A single oral dose of these medicines is 0.4–1 mg and 0.4 mg respectively. This produces low therapeutical blood concentrations (atropine – 2–100 ng ml⁻¹, scopolamine 0.3–20 ng ml⁻¹). Administration of *Datura* with an unknown amount of psychoactive compounds can lead their overdosing. It is often a problem for the forensic toxicologist to confirm or exclude therapeutical or recreational administration of these two alkaloids.

The aim of the study was to develop methods for detection and determination of atropine and scopolamine in biological samples and their application in forensic cases.

2. Materials and methods

2.1. Biological samples

Control blood samples were obtained in a local blood bank in Krakow. Control urine samples were collected from persons with no history of atropine and scopolamine administration. Control material was used for development and validation of methods. Forensic case materials – blood and/or urine samples came from six cases where toxicological analysis for the presence of atropine and scopolamine was necessary.

2.2. Materials

Atropine and scopolamine standards (as free base and hydrochloride), internal standards (IS): papaverine (PA) was obtained from Sigma-Aldrich (Warsaw, Poland) fentanyl-d₅ (FL-d₅) was obtained from Cerilliant, LGC Promochem, (Warsaw, Poland). All solvents were of HPLC grade or better: non stabilised diethyl ether and ethyl acetate (Lach-Ner, Neratowice, Czech Republic), n-hexane, n-butyl chloride and acetonitrile (Merck, Darmstadt, Germany), water (J. T. Baker, Deventer, Holland). All laboratory glassware used in analytical procedures was silanised.

2.3. Case study

Cases I–IV: Four teenagers were hospitalised with syndromes of intoxication. During anamnesis they admitted to eating *Datura* seeds. Urine samples were collected on the third day of hospitalisation.

Case V: A man was shot in the head during a police pursuit. While being operated on, he was given atropine.

Case VI: An elderly man died in hospital. He was taking a prescribed medicine called Reasec over a long period of time. It contained atropine.

2.4. Methods

Atropine and scopolamine was identified and determined using an HP 1100 Agilent Technologies liquid chromatograph coupled with mass spectrometer. Atmospheric pressure chemical ionisation was applied (APCI). Analyses were performed in single ion monitoring (SIM) mode. Particular pseudomolecular ions were monitored (m/z): 290 for atropine, 304 for scopolamine, 342 for fentanyl-d₅ and 340 for papaverine.

Separation of analytes was performed using a LiChroCART LiChrospher 60 RP-select B column manufactured by Merck, in gradient elution mode. As

a mobile phase, 0.1 % formic acid in acetonitrile (A) and in water (B) was used. The mobile phase flow was 1 ml min⁻¹. The gradient was programmed in the following mode: 0 min – 10% B, 7 min – 70% B, 15 min – 70% B, 16 min – 10% B, 20 min – 10% B.

2.5. Extraction procedure

Calibration curves were prepared after analysis of standard spiked control urine and blood samples. For atropine and scopolamine, an eight point curve was drawn: in urine – 2.5; 5; 10; 15; 20; 30; 40 and 50 ng/ml and in blood 0.5; 1; 2.5; 5; 10; 15; 20 and 25 ng/ml respectively. Papaverine and fentanyl were used as IS at concentration of 5 ng ml⁻¹. After this, analytes were extracted from urine and blood using liquid-liquid extraction (LLE) as follows: to a glass 20 ml tube, 1 ml of sample (urine blood) was added and spiked with IS. Then 1 ml of phosphate buffer (pH 11 – blood, pH 10 – urine) was added and the mixture was extracted with 5 ml of diethyl ether. The next step was

centrifugation for 5 min at 4000 RPM. 4 ml of organic layer was transferred to another tube and evaporated at 40°C under a stream of nitrogen to obtain ca 1.5 ml. The reduced volume of organic layer was transferred to a 2 ml glass bottle and evaporated to dryness as above. The dry residue was reconstituted in 100 µl of mobile phase. 20 µl of the solution was injected onto a column using an autosampler.

3. Results and discussion

Optimisation of mass spectrometer parameters was performed in order to obtain the highest intensity of ions specific to analytes. Optimal values were as follows: fragmentor voltage – 100 V, vaporiser temperature – 350°C, capillary voltage – 4000 V, corona current – 4 A, pressure – 40 PSI, gas flow 5 l/min, shield gas flow – 5 l/min.

The next step was to optimise the extraction procedure of atropine and scopolamine from blood. The in-

TABLE I. THE INFLUENCE OF CARBONATE BUFFER pH IN CONJUNCTION WITH EXTRACTION SOLVENTS ON EFFICIENCY AND REPRODUCIBILITY OF ATROPINE (AT) AND SCOPOLAMINE (SK) EXTRACTION FROM BLOOD SAMPLES

	AT	SK	AT	SK	AT	SK	AT	SK
	Diethyl ether		Ethyl acetate		n-hexane		1-chlorobutane	
Carbonate buffer, pH 9								
PA	1.76 ± 0.06 (3.6%)	1.53 ± 0.08 (5.4%)	1.06 ± 0.18 (16.6%)	0.98 ± 0.14 (14.3%)			0.43 ± 0.09 (21.5%)	0.39 ± 0.10 (25.9%)
FL-d ₅	0.47 ± 0.04 (7.9%)	0.41 ± 0.02 (5.9%)	0.47 ± 0.04 (8.9%)	0.43 ± 0.03 (6.6%)			0.16 ± 0.02 (12.8%)	0.14 ± 0.03 (18.6%)
Carbonate buffer, pH 10								
PA	1.48 ± 0.38 (25.9%)	1.54 ± 0.31 (20.3%)	0.85 ± 0.16 (18.9%)	0.13 ± 0.01 (5.3%)			0.48 ± 0.01 (2.01%)	0.07 ± 0.01 (12.9%)
FL-d ₅	0.36 ± 0.06 (17.7%)	0.38 ± 0.10 (25.7%)	0.37 ± 0.13 (34.0%)	0.05 ± 0.01 (16.2%)			0.14 ± 0.01 (4.65%)	0.020 ± 0.002 (10.2%)
Carbonate buffer, pH 11								
PA	2.44 ± 0.15 (6.2%)	2.31 ± 0.10 (4.4%)	0.91 ± 0.08 (8.4%)	0.89 ± 0.13 (15.0%)	0.17 ± 0.06 (38.5%)	0.11 ± 0.05 (47.1%)	0.61 ± 0.24 (39.6%)	0.59 ± 0.22 (36.8%)
FL-d ₅	0.59 ± 0.02 (3.1%)	0.56 ± 0.02 (3.8%)	0.54 ± 0.02 (4.1%)	0.53 ± 0.04 (7.8%)	0.07 ± 0.02 (28.5%)	0.05 ± 0.02 (38.8%)	0.45 ± 0.15 (32.5%)	0.43 ± 0.13 (29.5%)

– mean ± SD (RSD).

fluence of pH and solvent type on extraction efficiency, final purity of extracts and repeatability of obtained results was studied. Fentanyl-d₅ was used as the IS, and papaverine as the external standard (ES). Extraction was performed in carbonate buffer medium at pH: 9, 10 and 11. Diethyl ether, ethyl acetate, 1-chlorobutane, and n-hexane were used as extraction solvents. The choice of optimal extraction conditions was made on the basis of the highest obtained value of analyte/IS or analyte/ES signal ratio. The next criterion was the reproducibility of results expressed as standard deviation (SD), and relative standard deviation (RSD).

The obtained results (Table I, Figures 1, 2) show that in blood, the atropine and scopolamine extraction process is most effective for a carbonate buffer pH 11, with diethyl ether as the extraction agent. As for urine, the most effective extraction conditions were for carbonate buffer pH 11, and diethyl ether, as in blood.

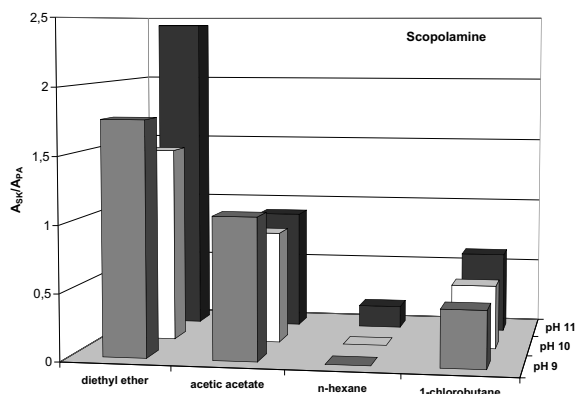


Fig. 1. The influence of carbonate buffer pH in conjunction with extraction solvents on extraction recovery of scopolamine from blood samples.

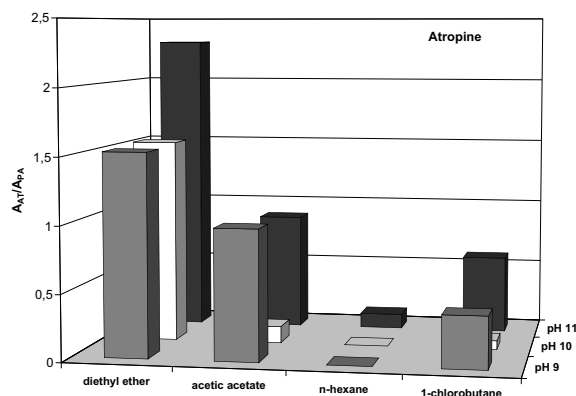


Fig. 2. The influence of carbonate buffer pH in conjunction with extraction solvents on extraction recovery of atropine from blood samples.

Efficiency of extraction process was measured as ratio of analytical signal (peak area) of analyte and IS (fentanyl-d₅, FL-d₅) and/or external standard (papaverine, PA). Reproducibility was expressed as SD and RSD.

The elaborated methods of atropine and scopolamine determination in blood and urine were validated. Validation parameters were calculated such as limit of detection (LOD), limit of quantitation (LOQ), determination coefficient (R²) and extraction efficiency (at concentration of 5 ng ml⁻¹, 20 ng ml⁻¹ and IS at 5 ng ml⁻¹), intra (n = 5) and inter-day (n = 5, p = 3) precision (CV_{w.g.} i CV_{m.g.}) (Table II). Precision was calculated for 5 ng ml⁻¹ in blood and 20 ng ml⁻¹ in urine at concentration of IS of 5 ng ml⁻¹. Methods showed linearity over the whole concentration range: 0.5–25 ng ml⁻¹ for blood and 2.5–50 ng ml⁻¹ for urine.

TABLE II. VALIDATION PARAMETERS OF THE METHODS OF DETERMINATION OF ATROPINE AND SCOPOLAMINE IN BLOOD AND URINE

Validation parameter		Compound	
		Atropine	Scopolamine
LOD [ng ml ⁻¹]	1	0.3	0.2
	2	0.6	1.8
LOQ [ng ml ⁻¹]	1	0.9	0.6
	2	0.9	2.1
Extraction recovery [%]*	1	80	85
	2	63	72
R ²	1	0.986	0.998
	2	0.987	0.987
CV _{w.g.} [%]	1	6.8	7.5
	2	5.0	5.4
CV _{m.g.} [%]	1	16.2	11.0
	2	5.8	6.9

LOD – limit of detection; LOQ – limit of quantification; R² – determination coefficient of linear regression equation; 1 – extraction from blood with diethyl ether and carbonate buffer (pH 11); 2 – extraction from urine with diethyl ether and carbonate buffer (pH 10).

* – recovery; 1 – C_{standards} = 5 ng/ml, 2 – C_{standards} = 20 ng/ml, C_{IS(papaverine)} = 5 ng/ml.

CV_{w.g.} – intra-day precision, n = 5, C_{IS (papaverine)} = 5 ng/ml, 1 – C_{standards} = 5 ng/ml, 2 – C_{standards} = 20 ng/ml.

CV_{m.g.} – inter-day precision, n = 15, C_{IS (papaverine)} = 5 ng/ml, 1 – C_{standards} = 5 ng/ml, 2 – C_{standards} = 20 ng/ml.

Biological samples collected from patients in cases I–VI were sent to the Institute of Forensic Research in order to perform analyses for toxicological and clinical

purposes with application of elaborated methods. Concentrations determined in urine samples (case I–IV) were 28.5, 9, 2.3, and 54 ng ml⁻¹. In one urine sample scopolamine was detected and determined at concentration of 1.5 ng ml⁻¹ (case I, Figure 3). Atropine concentrations were 19 ng ml⁻¹ (case V) and 13 ng ml⁻¹

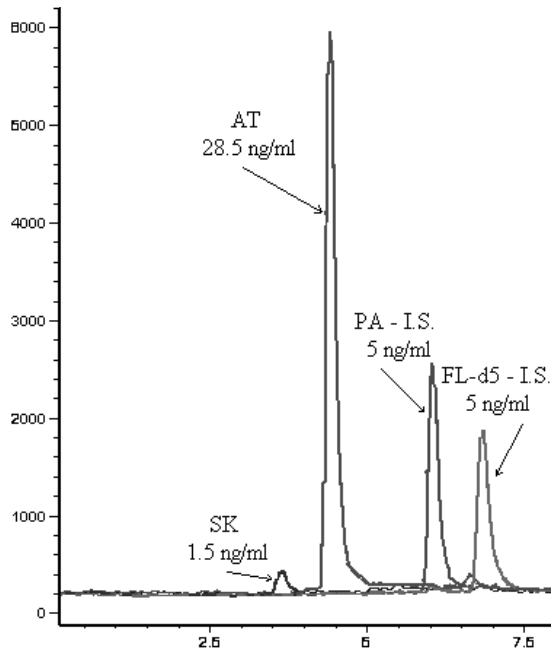


Fig. 3. LC-MS/APCI chromatogram of the extract of a urine sample taken from a patient (case I) three days after recreational use of *Datura stramonium* seeds.

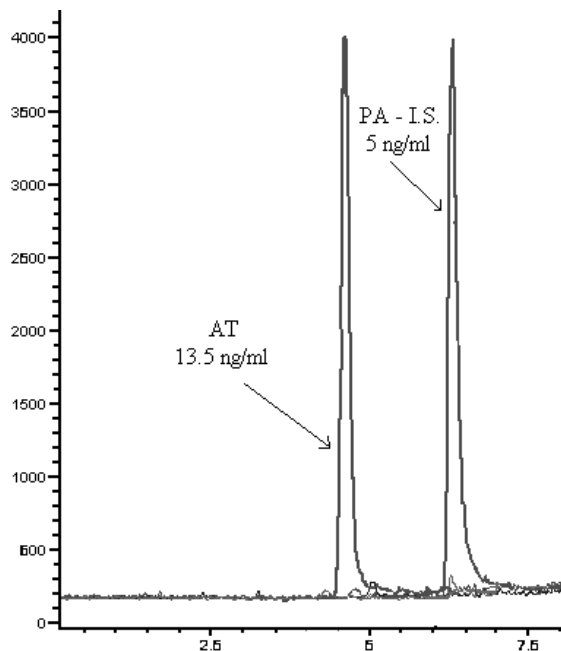


Fig. 4. LC-MS/APCI chromatogram of the extract of a blood sample taken from a patient (case VI) who was under treatment by Reasec.

(case VI, Figure 4). Obtained values were within the therapeutic range.

4. Summary

In Poland use of solanaceae, in particular *Datura stramonium* in order to intoxicate is becoming really popular. The developed LC-MS-APCI methods for determination of atropine and scopolamine in blood and urine are used to confirm or exclude the possibility of overdosing of these alkaloids after medical applications. They are also a practical tool for forensic and clinical toxicology, where confirmation of those compounds in biological samples after intoxication or death is necessary. This is particularly important because of numerous reports that atropine is used as an addition to cocaine and ecstasy sold on the European drug market.

References:

1. Cekiera C., Toksykomania – narkomania, lekomania, alkoholizm, nikotynizm, Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa 1985.
2. <http://ar2005.emcdda.europa.eu/pl/page026-pl.html>.
3. http://www.erowid.org/experiences/subs/exp_Datura.shtml.
4. Thille Z., Zgirski L., Toksykomanie – zagadnienia społeczne i kliniczne, Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, Warszawa 1976.
5. www.erowid.org/experiences/exp.php?ID=562.
6. www.monar.org.pl/News-article-sid-62.html.

ANALIZA ATROPINY I SKOPOLAMINY W PŁYNACH USTROJOWYCH

1. Wstęp

Prawie wszystkie znane cywilizacje używały różnych środków, które wywoływały uczucie przyjemności, łagodziły ból, usuwały zmęczenie, przeciwdziałały niepokoju. Do najwcześniejszych poznanych roślin zawierających substancje uzależniające należą m.in. konopie.

Konopie (*Cannabis*) są surowcem służącym do otrzymywania produktów o działaniu euforyzującym (haszyszu i marihuany). Były one znane w Chinach ok. 5 tysięcy lat temu. W starożytnej medycynie Wschodu były stosowane jako środek inspiracji duchowej. W rejonie śródziemnomorskim przetwory konopi pojawiły się około VII wieku wraz z szerzeniem się islamu. Do Europy haszysz został sprowadzony podczas wypraw Napoleona do Egiptu i wówczas stał się przyczyną nałogu. Wśród wojsk napoleońskich wybuchła prawdziwa „haszyszomania”. W jej wyniku w 1800 r. Napoleon zakazał używania wywaru z haszyszu. Obecnie przetwory konopi używane są w celach pozamedycznych w wielu regionach świata [1, 5]. Sprawozdanie roczne 2005: „Stan problemu narkotykowego w Europie” informuje, że konopie są najbardziej rozpowszechnionym nielegalnym środkiem na naszym kontynencie. Liczba młodych osób używających konopi stale wzrasta. Obecnie od 11% do 44% Europejczyków w wieku od 15 do 34 lat przyznaje, że przynajmniej raz próbowało przetworów konopi [4].

W Polsce ustawa o przeciwdziałaniu narkomanii z dnia 29 lipca 2005 roku zalicza ziele i żywicę konopi oraz wywary, nalewki i wyciągi z konopi innych niż włókniste do środków odurzających grupy I-N, a ⁹-THC, składnik psychoaktywny w nich występujący, do substancji psychotropowych grupy II-P.

Ograniczenia prawne, utrudniony dostęp oraz koszty związane ze zdobyciem kontrolowanych środków odurzających sprawiają, że osoby wprowadzające się w stan odurzenia coraz częściej poszukują nowych produktów. Obecnie coraz większą popularnością cieszą się niektóre rośliny z rodziny psiankowatych zawierające alkaloidy tropanowe. Do najbardziej popularnych roślin należą bielunie (np. bielun dziedzierzawa – *Datura stramonium*), pokrzyk wilcza jagoda (*Atropa belladonna*), lulki (np. lulek czarny – *Hyoscyamus niger*) oraz mandragora. Wspomniane rośliny były od wieków wykorzystywane w obrzędach ludowych, w medycynie, a w starożytności i średniowieczu stosowano je także jako trucizny. Roślinom tym przypisywano również magiczne właściwości, co powodowało, że wiązane były z „czarną magią”.

Wzmianki o tych roślinach można znaleźć w tekstach Starego Testamentu (Księga Rodzaju: 30,14–17, Pieśń nad Pieśniami: 7,14), w sztukach Williama Szekspira (Anto- niusz i Kleopatra: akt I, scena 5, Romeo i Julia: akt IV, scena 3).

W ostatnich latach notuje się w wielu regionach Polski przypadki wprowadzania się w stan odurzenia przede wszystkim za pomocą bieluni. Popularność tych roślin polega na tym, że można je zrywać i hodować bez żadnych konsekwencji prawnych, a ich ogólna dostępność sprawia, że koszt zdobycia jest niski lub nawet zerowy. Bielunie są popularną ozdobą ogródków, werand i tarasów. O skali problemu nadużywania bielunia w celach rekreacyjnych mogą świadczyć dość liczne doniesienia w prasie czy też w serwisach internetowych. Dla potwierdzenia powyższego stwierdzenia przytoczono kilka przykładów tytułów artykułów prasowych: „Bielun może zabić”, „Diabelskie ziele znów groźne”, „Diabelskie zniwo”, „Diabelskie ziele” z alkoholem – odlot murowany”. Na stronach internetowych można znaleźć liczne relacje z „podróży” po spożyciu produktów roślinnych [3, 6], sposoby przygotowania mieszanek do palenia, wywarów czy nalewek do picia wraz z ich jednorazowymi działającymi porcjami [2]. Młodzi konsumenci narkotyków w celu wywołania halucynacji zazwyczaj piją wodne wywary z materiału roślinnego lub też żują liście lub nasiona. Sporadycznie liście po zmieszaniu z marihuaną są palone w postaci ręcznie robionych papierosów.

Atropina, jeden z podstawowych składników tych roślin, jest stosowana w premedykacji przed anestezją, w okulistyce w celu rozszerzenia źrenic i porażenia akomodacji, w kardiologii, a także jako odtrutka w zatruciach związkami fosforoorganicznymi. Drugi składnik – skopolamina znajduje podobne do atropiny zastosowanie w medycynie.

Atropina i skopolamina działają na organizm w niskich dawkach. Jednorazowa doustna dawka tych leków wynosi odpowiednio 0,4–1 mg i 0,4 mg, co skutkuje ich niskimi stężeniami terapeutycznymi we krwi (atropina – 2–100 ng/ml, skopolamina – 0,3–20 ng/ml). Przyjmowanie bielunia o nieznannej zawartości składników czynnych najczęściej prowadzi do ich przedawkowania. Często zadaniem toksykologa sądowego – analityka jest wykluczenie albo potwierdzenie terapeutycznego lub rekreacyjnego przedawkowania tych dwóch alkaloidów.

Celem niniejszej pracy było opracowanie metod wykrywania i oznaczania atropiny i skopolaminy w płynach ustrojowych oraz ich zastosowanie w praktyce eksperckiej.

* Praca naukowa finansowana ze środków budżetowych na naukę w latach 2005/2007 jako projekt badawczy nr 0 T00C 035 28.

2. Materiały i metody

2.1. Materiał biologiczny

Próby kontrolne krwi uzyskano ze stacji krwiodawstwa w Krakowie. Próby kontrolne moczu pobrano od osób, które nie zażywały atropiny i skopolaminy. Próby te wykorzystywano podczas opracowywania i walidacji metod.

Materiał ekspercki – próby krwi i (lub) moczu – pochodził z sześciu przypadków, w których konieczne było przeprowadzenie badań toksykologicznych na obecność atropiny i skopolaminy.

2.2. Odczynniki

Jako substancje wzorcowe zastosowano atropinę i skopolaminę (w postaci odpowiednio wolnej zasady i chlorowodoru) firmy Sigma-Aldrich (Warszawa, Polska). Jako standardy wewnętrzne (IS) stosowano papawerynę (PA) pochodzącą z tej samej firmy oraz fentanyl- d_5 (FL- d_5) (Cerilliant, LGC Promochem, Warszawa, Polska). Wszystkie rozpuszczalniki były czystości do analizy HPLC: niestabilizowany eter dietylowy i octan etylu (Lach-Ner, Neratowice, Czechy), n-heksan, chlorek n-butyli i acetonitryl (Merck, Darmstadt, Niemcy) oraz woda (J. T. Baker, Deventer, Holandia). Używane szklane próbki i buteleczki były silanizowane przed użyciem.

2.3. Opis przypadków

Przypadek I–IV: Czterej kilkunastoletni chłopcy zostali przyjęci do szpitala z objawami zatrucia. Podczas wywiadu przyznali się, że jedli nasiona bielunia. Mocz pobrano do badań w trzecim dniu hospitalizacji.

Przypadek V: Mężczyzna podczas pościgu policyjnego został postrzelony w głowę. W czasie zabiegu operacyjnego podawano mu m.in. atropinę.

Przypadek VI: Starszy mężczyzna zmarł w szpitalu. Przez dłuższy czas przyjmował przepisany przez lekarza preparat o nazwie Reasec zawierający atropinę.

2.4. Metody

Atropinę i skopolaminę identyfikowano i oznaczano za pomocą chromatografu cieczowego HP 1100 firmy Agilent Technologies sprzężonego ze spektrometrem mas. Stosowano chemiczną jonizację pod ciśnieniem atmosferycznym (APCI). Oznaczenia prowadzono w trybie monitorowania wybranych jonów (SIM). Monitorowano jony pseudomolekularne (m/z) dla: atropiny – 290, skopolaminy – 304, fentanilu- d_5 – 342 oraz papaweryny – 340.

Rozdział analitów przeprowadzono na kolumnie LiChroCART LiChrospher 60 RP-select B firmy Merck w systemie elucji gradientowej. Jako fazę ruchomą sto-

sowano 0,1% (v/v) kwas mrówkowy w acetonitrylu (B) i wodzie (A). Przepływ fazy ruchomej wynosił 1 ml/min. Gradient składu fazy zaprogramowano w następujący sposób: 0 min – 10% B, 7 min – 70% B, 15 min – 70% B, 16 min – 10% B, 20 min – 10% B.

2.5. Procedura ekstrakcji

Krzywe kalibracyjne wykonano, stosując próby kontrolne moczu i krwi z dodatkiem roztworów wzorcowych. Zastosowano następujące stężenia atropiny i skopolaminy: 2,5; 5; 10; 15; 20; 30; 40 i 50 ng/ml w moczu oraz 0,5; 1; 2,5; 5; 10; 15; 20 i 25 ng/ml we krwi. Dodatkowo do każdej próbki dodawano papawerynę i fentanyl- d_5 jako IS (10 μ l roztworu o stężeniu 500 ng/ml). Następnie próbki krwi i moczu poddawano ekstrakcji ciecz-ciecz według procedury podanej poniżej.

W 20 ml szklanej fiołce umieszczano po 1 ml badanego materiału (krwi, moczu) i dodawano roztwór IS. Po dodaniu 1 ml buforu węglanowego (pH 11 – krew, pH 10 – mocz) mieszaninę ekstrahowano 5 ml eteru dietylowego. Następnie mieszaninę wirowano przez 5 minut przy 4000 obr/min. 4 ml warstwy organicznej przenoszono do kolejnej fiołki i odparowywano w temperaturze 40°C pod strumieniem azotu do objętości ok. 1,5 ml. Zredukowaną objętość warstwy organicznej przenoszono do 2 ml szklanej fiołki i odparowywano do sucha w temperaturze 40°C pod strumieniem azotu. Suchą pozostałość rozpuszczano w 100 μ l fazy ruchomej i 20 μ l roztworu wprowadzano do kolumny chromatograficznej za pomocą automatycznego podajnika próbek.

3. Wyniki i ich dyskusja

Przeprowadzono optymalizację parametrów detektora masowego w celu określenia warunków, dla jakich uzyskiwane będą jony o największej intensywności. Optymalne wartości parametrów detektora masowego wynosiły: napięcie fragmentora – 100 V, napięcie kapilary – 4000 V, temperatura odparownika – 350°C, prąd igły koronowej – 4 A, ciśnienie – 40 psi, przepływ gazów rozpylającego i osuszającego – 5 l/min.

W kolejnym etapie zoptymalizowano technikę ekstrakcji ciecz-ciecz atropiny i skopolaminy z prób krwi. Zbadano wpływ pH środowiska ekstrakcji oraz rodzaj zastosowanego rozpuszczalnika ekstrahującego na efektywność wyizolowywania analitów, czystość ekstraktów oraz powtarzalność uzyskiwanych wyników. Jako IS użyto fentanilu- d_5 , a papawerynę zastosowano jako standard zewnętrzny. Ekstrakcję wykonywano w obecności buforu węglanowego o następujących wartościach pH: 9, 10 i 11. Natomiast jako rozpuszczalniki ekstrahujące stosowano: eter dietylowy, octan etylu, 1-chlorobutan oraz n-heksan. Przy wyborze najbardziej optymalnych

warunków ekstrakcji brano pod uwagę wartość stosunku sygnału pochodzącego od badanego analitu do IS, którym był fentanyl- d_5 i (lub) standardu zewnętrznego, czyli papaweryny. Kolejnym kryterium wyboru była powtarzalność uzyskanych wyników wyrażona jako odchylenie standardowe i względne odchylenie standardowe.

Uzyskane wyniki (tabela I, rycina 1 i 2) wskazują, że proces ekstrakcji skopolaminy i atropiny z prób krwi zachodził najbardziej efektywnie w obecności buforu węglanowego o pH 11 i eteru dietylowego jako rozpuszczalnika ekstrahującego. Należy dodać, że dla moczu najkorzystniejszymi warunkami ekstrakcji okazał się bufor węglanowy o pH 10 i również eter dietylowy.

Opracowane metody oznaczania atropiny i skopolaminy we krwi i w moczu poddano walidacji. Wyznaczono parametry walidacyjne, takie jak granica oznaczalności (*LOQ*), granica wykrywalności (*LOD*), współczynnik determinacji (r^2) oraz wydajność ekstrakcji (przy stężeniu wzorców 5 ng/ml dla krwi i 20 ng/ml dla moczu oraz stężeniu IS 5 ng/ml), precyzję wewnątrz- ($n = 5$) i zewnątrzgrupową ($n = 5$ i $p = 3$) ($CV_{w.g.}$ i $CV_{m.g.}$) (tabela II). Precyzję dla prób krwi wyznaczano przy stężeniu wzorców wynoszącym 5 ng/ml, a dla moczu 20 ng/ml, natomiast stężenie IS w obu materiałach wynosiło 5 ng/ml. Metody wykazywały liniowość w zakresie badanych stężeń: 0,5–25 ng/ml dla krwi i 2,5–50 ng/ml dla moczu.

Płyny ustrojowe z opisanych powyżej sześciu przypadków przesłane do badań dla celów sądowych i klinicznych poddano analizie opracowanymi metodami. Wyznaczone stężenia atropiny (AT) w próbach moczu (przypadek I–IV) wynosiły 28,5; 9; 2,3 i 54 ng/ml. W moczu jednego z chłopców wykryto ponadto skopolaminę (SK) w stężeniu 1,5 ng/ml (przypadek I, rycina 3). Wyznaczone stężenia atropiny w próbach krwi wynosiły 19 ng/ml (przypadek V) i 13 ng/ml (przypadek VI, rycina 4). Wartości te mieściły się w zakresie stężeń terapeutycznych.

4. Podsumowanie

W Polsce stosowanie roślin z rodziny psiankowatych, a szczególnie bieluni, w celu wprowadzania się w stan odurzenia, staje się coraz bardziej popularne.

Opracowane metody LC-MS/APCI oznaczania atropiny i skopolaminy we krwi i w moczu mogą być wykorzystywane w celu potwierdzenia lub wykluczenia możliwości przedawkowania tych alkaloidów po zastosowaniu ich w celach medycznych. Stanowią one także praktyczne narzędzie dla toksykologii klinicznej i sądowej służące do potwierdzenia obecności tych związków, które mogą stać się przyczyną zatrucia lub zgonu. Jest to szczególnie istotne ze względu na liczne doniesienia o stosowaniu atropiny jako domieszki do „ecstasy” i kokainy sprzedawanych na europejskim rynku narkotykowym.