

Ćwiczenie U1/U2

Profilowanie narkotyków

**Zastosowanie techniki chromatografii cienkowarstwowej (TLC)
w badaniach przesiewowych**

**Wpływ pH na ekstrakcję ciecz-ciecz zanieczyszczeń z próbki
narkotyku**

Wpływ dodatków na profil zanieczyszczeń narkotyku

Prowadzący: *mgr Aneta Garbacik*
mgr Jagoda Kuczara

PROFILOWANIE NARKOTYKÓW

Profilowanie narkotyków

Słowo: *profilowanie* oznacza zespół czynności analitycznych mających na celu określenie źródła pochodzenia próbki. Jeżeli ograniczymy to pojęcie tylko do profilowania narkotyków, to będzie ono oznaczać określenie cech fizykochemicznych próbki narkotyku (a zwłaszcza składu ilościowego i jakościowego zanieczyszczeń występujących w próbce). Skład jakościowy i ilościowy zanieczyszczeń jest charakterystyczną cechą każdej próbki i zależy od następujących czynników:

- ♦ użytych reagentów i rozpuszczalników (różniących się między sobą w minimalnym stopniu w zależności od firmy produkującej odczynniki);
- ♦ przebiegu reakcji;
- ♦ produktów pośrednich;
- ♦ użytego szkła laboratoryjnego i aparatury chemicznej;
- ♦ sposobu destylacji bądź ekstrakcji;
- ♦ sposobu krystalizacji;
- ♦ czystości w laboratorium;
- ♦ indywidualnych przyzwyczajęń osoby zajmującej się syntezą;
- ♦ przenoszenia i pakowania narkotyków.

Cel profilowania

Profilowanie narkotyków pozwala na określenie źródła pochodzenia skonfiskowanych próbek narkotyków. Inaczej mówiąc - umożliwia wskazanie próbek, które albo pochodzą z tego samego rzutu syntezy lub z tego samego nielegalnego laboratorium, albo nie mają ze sobą żadnych powiązań.

Podstawą porównywania próbek jest tzw. profil zanieczyszczeń, który zawiera informacje o zanieczyszczeniach obecnych w danej próbce. Profilem może być np. chromatogram lub widmo masowe. Profile są klasyfikowane do odpowiednich grup według ich wzajemnego podobieństwa. Pochodzenie próbek narkotyków z jednej partii jest stwierdzane wówczas gdy profile zanieczyszczeń tych próbek są "identyczne". Jeśli profile są "podobne", to wiadomo, że próbki wyprodukowano w podobnych warunkach i według tego samego przepisu. Informacje te służą następnie policji, która wykorzystuje analizę porównawczą próbek do ustalenia powiązań między

narkomanami, handlarzami i producentami. Współpraca między laboratoriami kryminalistycznymi na całym świecie pozwala na stwierdzenie, z jakiego regionu świata może pochodzić dany narkotyk, a także na ustalenie dróg przemytu narkotyków.

Profilowanie narkotyków daje również możliwość prześledzenia sposobu, w jaki dany narkotyk został otrzymany. Na podstawie składu zanieczyszczeń można wnioskować o rodzaju substratów zastosowanych w czasie syntezy oraz o zastosowanej metodzie syntezy.

Charakterystyka próbek narkotyków

Konfiskowane przez policję narkotyki syntetyczne występują w różnej formie:

- proszek,
- tabletki,
- roztwór w kapsułkach.

Jak już wspomniano wyżej, próbka narkotyku, oprócz składnika głównego, zawiera dodatkowo wiele innych komponentów, które można podzielić na trzy grupy:

➤ **grupa 1** - wszystkie te substancje, które towarzyszą głównemu składnikowi w tzw. materiale naturalnym (w przypadku narkotyków naturalnych i półsyntetycznych np. kodeina, noskapina lub papaweryna zawarte w opium lub heroinie), oraz substancje wprowadzone w czasie syntezy narkotyku syntetycznego, pochodzące z zanieczyszczeń prekursorów, reagentów i rozpuszczalników (np. acetofenon w amfetaminie będący zanieczyszczeniem wyjściowego benzylometyloketonu);

➤ **grupa 2** - wszystkie te substancje, które powstają w trakcie syntezy głównego składnika, czyli produkty reakcji ubocznych (np. acetylokodeina, 6-mono-acetylmorfina, acetylowe pochodne alkaloidów opium w heroinie, lub zanieczyszczenia charakterystyczne dla syntezy amfetaminy metodą Leuckarta, takie jak N-formyloamfetamina czy fenyloamfetaminy). Tę grupę związków można dodatkowo podzielić na:

- związki specyficzne, powstające tylko w danej metodzie syntezy;
- związki mogące powstawać podczas syntezy danej substancji różnymi metodami (zależnie od warunków syntezy);
- związki, które powstały w wyniku reakcji zanieczyszczeń substratów i rozpuszczalników, inaczej mówiąc niespecyficzne produkty reakcji ubocznych;

➤ **grupa 3** - dodatki wprowadzane po syntezie, a w trakcie dystrybucji narkotyku. Można je podzielić na substancje nie mające działania biologicznego (rozcieńczalniki), np. skrobia lub cukier, oraz wykazujące działanie biologiczne (dodatki) np.: kofeina lub prokaina.

Najważniejsze z punktu widzenia profilowania, szczególnie jeśli chodzi o narkotyki syntetyczne, są związki pierwszego i drugiego rodzaju. Są to tzw. **znaczniki (marker)**, które wskazują metodę syntezy, jak również próbki wyprodukowane w podobnych warunkach, a więc mogące pochodzić z tego samego źródła. Związki należące do trzeciego rodzaju służą do porównywania próbek i stwierdzenia, czy dwie próbki pochodzą z jednego rzutu syntezy. Przy tego rodzaju porównaniach uwzględnia się zarówno skład organiczny, jak i nieorganiczny próbek.

Procedura profilowania

W ramach profilowania wykonuje się:

- badanie fizyczne, czyli ocenę cech fizycznych próbki narkotyku (postaci, koloru, zapachu);
- badanie chemiczne, składające się z trzech etapów:
 - analizy mającej na celu identyfikację i oznaczenie ilościowe głównego składnika;
 - analizy domieszek (rozcieńczalników i dodatków);
 - profilowania zanieczyszczeń.

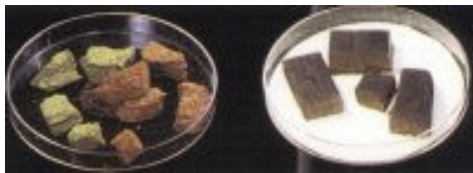


Rys. 1 Skonfiskowane tabletki ecstasy

Procedura profilowania danej próbki narkotyku jest ściśle uwarunkowana przez jej postać. Jeżeli profilowaną próbką jest amfetamina w postaci proszku, to największe znaczenie ma analiza chemiczna. Natomiast podczas profilowania amfetaminy występującej w formie tabletek bardzo ważne jest badanie fizyczne.

Badanie fizyczne jest etapem wstępnym profilowania, podczas którego grupuje się próbki według cech ewidentnie je różniących. Dużą wagę przywiązuje się do:

- ♦ sposobu pakowania narkotyków;
- ♦ znaków producenta (logo);
- ♦ rodzaju opakowania.



Rys. 2 Skonfiskowane próbki haszyszu.

Ten rodzaj badania jest bardzo ważny w profilowaniu narkotyków naturalnych, ponieważ informacje uzyskiwane w trakcie badania chemicznego są mniej użyteczne.

Producenci kokainy i haszyszu oznaczają często swój towar tzw. znakiem firmowym (logo) umieszczanym na opakowaniu. Z przechwyconego przez policję materiału tworzone są zbiory opakowań (np. chlorowodoru kokainy), dzięki którym np. Amerykanie ustalają źródło narkotyku. To ułatwienie wynika z faktu, że gangi narkotykowe znakują swój towar (np. napis Rolling Stones, znaki: ptak, kot, sierp i młot, ryba) w celu "wyrobinienia sobie marki" na rynku narkotycznym. W przypadku haszyszu znaki umieszczane są na blokach haszyszu. Porównywanie próbek tego narkotyku w Narodowym Laboratorium Kryminalistycznym w Szwecji opiera się właśnie na tych znakach.

W przypadku tabletek badanie fizyczne przeprowadzane jest głównie w oparciu o ich kształt, masę i logo, co umożliwia określenie rodzaju użytej tabletkarki i wspólnych dla przechwyconych narkotyków wytwórni.

W badaniu chemicznym najważniejszym etapem jest profilowanie zanieczyszczeń, ponieważ daje ono najwięcej informacji na temat źródła narkotyków. Dwa pierwsze etapy badania chemicznego, czyli identyfikacja głównego składnika i jego analiza ilościowa oraz identyfikacja domieszek, wykonywane są dla wszystkich narkotyków i służą do określenia związku między handlarzem a narkomanem.

Profilowanie zanieczyszczeń, składa się z następujących zespołów czynności:

- ekstrakcji zanieczyszczeń z badanej próbki
 - ♦ ciecz-ciecz (LLE)
 - ♦ do fazy stałej (SPE)
 - ♦ mikroekstrakcja do fazy stałej (SPME);
- oznaczenia zanieczyszczeń metodami analizy instrumentalnej
 - chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas – GC/MS

- chromatografia gazowa z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym -GC/FID
- chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas – LC/MS
- wysokosprawna chromatografia cieczowa – HPLC
- chromatografia cienkowarstwowa – TLC;
- interpretacji wyników, czyli porównania i klasyfikacji profili zanieczyszczeń z wykorzystaniem algorytmów statystycznych;

Oprócz zanieczyszczeń organicznych w próbkach narkotyków obecne są również śladowe ilości związków nieorganicznych. Fakt ten próbuje się wykorzystać w celu zwiększenia liczby parametrów podczas porównywania próbek. Zanieczyszczenia nieorganiczne mogą zostać wprowadzane podczas syntezy narkotyku jako reagenty, regulatory środowiska, katalizatory itp. Przykładowo w procesie syntezy i oczyszczania amfetaminy używane są kwasy (H_2SO_4 , HCl), wodorotlenki (NaOH, KOH) oraz wiele innych związków występujących później w śladowych ilościach w zatrzymanych próbkach. Profil składu pierwiastkowego próbki może być dodatkowo wzbogacony o sygnały pochodzące od soli organicznych, rozpuszczalników (np. chlorku metylenu) i od wypełniaczy, które zostały już opisane wyżej. Profile składu pierwiastkowego są kształtowane przez czynniki w większości takie same jak w przypadku zanieczyszczeń organicznych, czyli:

- stopień czystości odczynników,
- użyte reagenty i rozpuszczalniki;
- zastosowana aparatura,
- czystość w laboratorium,
- sposób osuszania próbki w trakcie syntezy,
- czystość wody używanej do syntezy.

Podsumowując, każda metoda syntezy ma swój charakterystyczny zestaw używanych odczynników nieorganicznych, co więcej, każda drobna zmiana w procedurze otrzymywania narkotyku (np. zamiana NaOH na KOH) może zmienić profil zanieczyszczeń nieorganicznych próbki, a tym samym rozstrzygnie, czy dana próbka może pochodzić z tej samej partii materiału, czy też nie.

Porównywanie profili zanieczyszczeń

Otrzymane podczas analizy chemicznej profile zanieczyszczeń porównuje się wizualnie oraz za pomocą statystycznych programów komputerowych. Ocena wizualna polega na porównaniu wybranych pasm (ich położenia i intensywności) na chromatogramach zanieczyszczeń wyekstrahowanych próbek. Uzyskane w ten sposób informacje wykorzystuje się do ustalenia stopnia podobieństwa chromatogramów zatrzymanych narkotyków (Tabela 1).

Tabela 1 Stopnie podobieństwa profili zanieczyszczeń porównywanych próbek.

Lp.	Stopień podobieństwa	Interpretacja
1	bardzo duże podobieństwo	próbki pochodzą z tej samej partii narkotyku, otrzymanej w jednej serii produkcyjnej
2	duże podobieństwo	próbki prawdopodobnie pochodzą z tej samej partii narkotyku, ale istniejące niewielkie różnice w profilach wskazują na możliwość pochodzenia próbek z różnych partii materiału
3	podobna podstawowa struktura z wyraźnymi różnicami w chromatogramach	próbki otrzymano w podobnych warunkach, czyli w tym samym laboratorium, ale w różnych seriach
4	różnice w podstawowej strukturze	próbki otrzymano w różnych laboratoriach, w różnych warunkach, ale tą samą metodą syntezy
5	brak podobieństwa	próbki otrzymano różnymi metodami

Próbki zaliczone do pierwszego, drugiego lub trzeciego stopnia podobieństwa tworzą tzw. klasę. Jeżeli dana próbka nie zostanie przydzielona do żadnej z już istniejących klas, to tworzona jest nowa klasa, a to oznacza powstanie nowego nielegalnego laboratorium lub zmianę procedury otrzymywania danego narkotyku w którymś z już istniejących laboratoriów.

Profile zanieczyszczeń można porównywać wizualnie, jednakże, przy wciąż powiększających się zbiorach chromatogramów, nieuniknione stało się użycie komputerów do porównywania próbek. Istnieje kilka metod wykorzystywanych w programach klasyfikujących próbki. Jedną z często wykorzystywanych opiera się na porównaniu np. dziewięciu konkretnych pików (liczba porównywanych pików może być większa) na dwóch różnych chromatogramach. Komputer oblicza stosunek powierzchni danego pików na chromatogramie X do powierzchni tego pików na chromatogramie Y. Jeżeli np. próbka pochodzi z tej samej partii materiału to przy 5% tolerancji stosunek powierzchni co najmniej ośmiu pasm jest stały. Stosowanie tej metody jest skuteczne tylko dla próbek o dużym stężeniu zanieczyszczeń. Gdy analizuje

się bardzo czysty narkotyk, gdzie stężenie zanieczyszczeń jest niewielkie, korzysta się z metody współczynnika korelacji liniowej, który oblicza się na podstawie wzoru (1):

$$r_{xy} = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\left(\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2\right)\left(\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2\right)}} \quad (1)$$

gdzie x_i, y_i to pola powierzchni pasma "i" na chromatogramach X i Y.

Współczynnik korelacji r_{xy} może przyjmować wartości z przedziału $\langle -1; 1 \rangle$.

Podobieństwo chromatogramów jest ustalane w zależności od wartości współczynnika korelacji. Jeśli jest on większy od 0,8 to chromatogramy są klasyfikowane jako podobne.

Sytuacje problemowe w porównywaniu profili

W trakcie porównywania profili mogą się zdarzyć sytuacje gdy:

- chromatogram zawiera pik o powierzchni kilkakrotnie większej niż pozostałe;
- porównywane są profile próbek o bardzo wysokim stopniu czystości;
- w badanych próbkach znajdują się domieszki i wypełniacze.

W pierwszym przypadku współczynnik korelacji liniowej osiąga dużą wartość, mimo że chromatogramy wizualnie znacznie się różnią. Wyjściem z tej sytuacji jest obliczenie współczynnika korelacji bez uwzględnienia piku o dużej powierzchni. Powoduje to jednak zmniejszenie liczby porównywanych parametrów, a w konsekwencji - zmniejszenie zaufania do uzyskanego wyniku.

Jeżeli zaistnieje druga z wymienionych sytuacji to profil zanieczyszczeń nie

zawiera wszystkich związków, których piki wybrane zostały do ustalenia podobieństwa badanych próbek narkotyków. Jest to poważny problem, który może uniemożliwić klasyfikację próbek.



Rys. 3 Wygląd skonfiskowanych próbek amfetaminy

W ostatnim przypadku chodzi o taki rodzaj domieszek, które powodują znaczne zniekształcenia w rejestrowanych chromatogramach, np. stearynian magnezu, co uniemożliwia klasyfikację próbek.

Niestety opisane wyżej sytuacje zdarzają się dość często, o czym świadczą dane z CLK: na 1000 sporządzonych profili 216 próbek nie zostało przypisanych do żadnej grupy ze względu na nietypowe profile lub inną niż Leuckarta metodę otrzymania. Tak więc w tym przypadku istniejące trudności w profilowaniu uniemożliwiły określenie źródła prawie 22 procent badanych próbek amfetaminy.

Przygotowanie próbek narkotyków – ekstrakcja zanieczyszczeń z badanych próbek

Ekstrakcja do fazy stałej

Ekstrakcja do fazy stałej (z ang. Solid Phase Extraction – SPE) polega na zaadsorbowaniu na sorbencie stałym składników próbki i następnie elucji (wmywaniu) ich z jego powierzchni wybranym rozpuszczalnikiem. Ekstrakcja ta daje dobre rezultaty, gdy oddziaływanie między sorbentem i analitem będzie większe niż między matrycą i analitem.

Ekstrakcja do fazy stałej jest przeprowadzana w specjalnych polipropylenowych lub szklanych kolumnach lub na dyskach (krążkach).

Wyróżniamy następujące typy sorbentów:

- ♦ sorbenty niepolarne, na których adsorbowane są niepolarne i średnio polarne anality z polarnych roztworów (tabela 2)
- ♦ sorbenty polarne, na których adsorbowane są średnio polarne, do polarnych anality z niepolarnych roztworów (tabela 3)
- ♦ sorbenty o przeciwnym ładunku, na którym adsorbowane są jonowe anality z roztworów.

Tabela 2 Sorbenty niepolarne.

Symbol	Nazwa	Zastosowanie
C – 18	Oktadecyl endcapped*	Faza stosowana do rozdzielenia od niepolarnych do średniopolarnych związków, takich jak antybiotyki, barbiturany, benzodiazepiny, kofeina, narkotyki, barwniki, witaminy rozpuszczalne w tłuszczach, herbicydy, pestycydy, węglowodory, fenole, steroidy, witaminy rozpuszczalne w wodzie.
ENVI - 18	Oktadecyl endcapped	Dokładniejsze pokrycie i większa zawartość węgla niż C-18, większa odporność na skrajne wartości pH i nieco większa pojemność na związki niepolarne. Używana jak C-18.
C – 8	Oktyl endcapped	Faza stosowana do rozdzielenia od niepolarnych do średniopolarnych związków, takich jak antybiotyki, barbiturany, benzodiazepiny, kofeina, narkotyki, barwniki, witaminy rozpuszczalne w tłuszczach, pestycydy, węglowodory, fenole, steroidy, witaminy rozpuszczalne w wodzie
ENVI – 8	Oktyl endcapped	Dokładniejsze pokrycie i większa zawartość węgla niż C-8, większa odporność na skrajne wartości pH i nieco większa pojemność na związki niepolarne. Używana jak C- 8.
C - Ph	Fenyl	Nieco mniejsze zatrzymywanie niż C-8 i C-18. Używana z niepolarnymi do średniopolarnych związków, szczególnie do związków aromatycznych.
Hisep		Do eliminacji białek w próbkach biologicznych; wiąże małe cząsteczki takie jak narkotyki.

*Endcapped – pokrycie końcowe; reakcja wiązania z trimetylochlorosilanem wolnych, dostępnych silanoli, pozostałych na powierzchni żelu krzemionkowego po związaniu z nim fazy stacjonarnej (wytworzenia fazy wiążącej). Jest stosowane w celu dezaktywowania sorbentu w stosunku do związków zasadowych.

Tabela3 Sorbenty polarne

Symbol	Nazwa	Zastosowanie
C – CN	Cyjano Endcapped	Faza stosowana do średnio polarnych związków w układzie fazy odwróconej, w układzie fazy normalnej do związków polarnych takich jak: mykotoksyny, antybiotyki, barwniki, herbicydy, pestycydy, fenole, steroidy. Słaby wymiennicz kationów.
C - Diol	Diol	Faza stosowana do ekstrakcji związków polarnych.
C – NH₂	Amino	Faza stosowana do ekstrakcji związków polarnych, słaby wymiennicz anionów oraz kwasów organicznych.
C – Alumina-A	Kwasowa pH~5	Wymiennicz anionów i adsorbent związków polarnych, takich jak witaminy.
C – Alumina-B	Zasadowa pH~8,5	Adsorpcja związków polarnych i wymiana kationów.
C – Alumina-C	Obojętna pH~6,5	Adsorpcja związków polarnych. Możliwość wymiany anionów i kationów – zależne od pH. Używany do ekstrakcji witamin, antybiotyków, enzymów, hormonów, glikozydów.
C – Florisil		Faza stosowana do adsorpcji związków polarnych, takich jak: alkohole, aldehydy, aminy, narkotyki/leki, barwniki, pestycydy, PCB, ketony, związki azotowe, kwasy organiczne, fenole i steroidy.

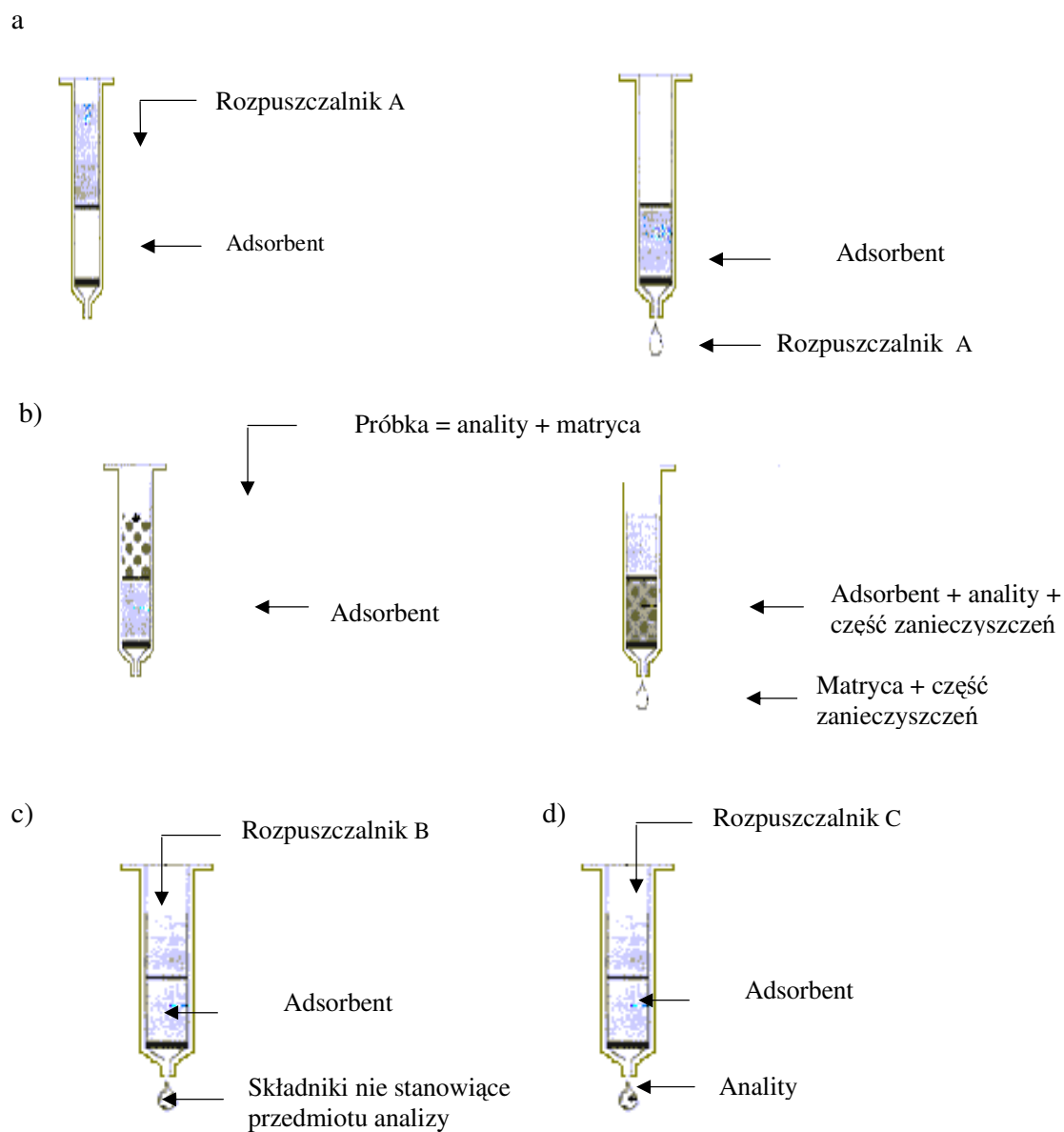
Proces ekstrakcji do fazy stałej z zastosowaniem kolumny SPE składa się z kilku etapów: kondycjonowania kolumny, wprowadzenia próbki na kolumnę (sorpcja analitów), wymywania analitu ze złoża. Poszczególne etapy procesu ekstrakcji przedstawia rys.4.

➤ **Kondycjonowanie kolumny:** Kondycjonowanie uaktywnia fazę stałą. Objętość rodzaj użytych rozpuszczalników są określone dla danego typu kolumny. Może być stosowany jeden rozpuszczalnik lub sekwencja rozpuszczalników (Rys.4a.).

➤ **Wprowadzanie próbki:** Próbkę przenosi się do kolumny ekstrakcyjnej. Oznaczone związki są silnie zatrzymywane przez złożę, gdy ich powinowactwo do fazy stałej jest duże (Rys4.b) Po zakończeniu etapu sorpcji złożę można przemyć odpowiednim rozpuszczalnikiem, który wymywa składniki nie będące przedmiotem analizy a osadzone na złożu (Rys.4c). Może to być główny składnik próbki lub/i też rozcieńczalniki.

➤ **Wymywanie analitów:** Przed przystąpieniem do elucji analitów kolumnę osusza się. Czas suszenia zależy od rodzaju próbki. W celu wymycia analitów do kolumny wprowadza się najlepiej kilkoma porcjami określoną objętość rozpuszczalnika wymywającego (Rys.4c.). Rozpuszczalnik przepuszcza się przez kolumnę bardzo powoli. Zebrane ekstrakty analizuje się bezpośrednio, albo odparowuje się do sucha, a następnie rozpuszcza się w odpowiednim rozpuszczalniku i analizuje.

Ekstrakcja SPE posiada szereg zalet, do których należy między innymi możliwość izolowania i wzbogacania analitów zarówno lotnych jak i nielotnych, możliwość przechowywania analitów zatrzymanych na sorbencie przez długi czas, eliminowanie tworzenia się emulsji w procesie ekstrakcji (ekstrakcja ciecz-ciecz) lub pienienia próbki (ekstrakcja ciecz-gaz). Możliwy jest szeroki wybór sorbentów, co umożliwia uzyskanie znacznej selektywności procesu wzbogacania. Ważną zaletą jest zmniejszenie zużycia stosowanych rozpuszczalników.



Rys.4. Schemat ekstrakcji w układzie ciecz-ciało stałe: a) kondycjonowanie rozpuszczalnikiem A – przygotowanie kolumny do ekstrakcji, b) wprowadzenie próbki na kolumnę – ekstrakcja analitów, usuwanie matrycy i części zanieczyszczeń, c) przemywanie rozpuszczalnikiem B – pozbywanie się składników nie będących przedmiotem analizy, d) wymywanie rozpuszczalnikiem C – selektywne wymywanie analitów

Mikroekstrakcja do fazy stałej (SPME)

Mikroekstrakcja do fazy stałej jest metodą przygotowania próbek do analizy chromatograficznej, głównie do chromatografii gazowej.

Przyrząd do mikroekstrakcji zawiera cienki drut stalowy który jest przedłużony włóknem o właściwościach sorpcyjnych (długość włókna wynosi ok. 1cm). Drut ten jest przesuwany wewnątrz igły mikrostrzykawki. Włókno może być pokryte żelem krzemionkowym albo cienką warstwą cieczy o małej lotności, trudno rozpuszczalnej w matrycy.

Mikroekstrakcja składa się z kilku etapów. W pierwszym etapie włókno jest doprowadzane do kontaktu z próbką w fazie gazowej lub w fazie ciekłej, w wyniku czego dochodzi do sorpcji analitów. W drugim etapie włókno jest wystawiane na działanie wysokiej temperatury w gorącym dozowniku chromatografu gazowego, a uwolnione anality przenoszone są do kolumny chromatograficznej.

Wyboru odpowiednich parametrów w SPME dokonuje się biorąc pod uwagę takie właściwości jak: lotność, polarność i masa cząsteczkowa analitów, złożoność składu chemicznego próbki czy współczynnik podziału analitu. Współczynnik podziału można w pewnym zakresie zmieniać przez modyfikację składu próbki, przy czym dobre efekty uzyskuje się przez dodatek soli (wzrost siły jonowej roztworu) bądź zmianę pH próbki. Czułość metody SPME można również zwiększyć przez zastosowanie grubszego filmu fazy stacjonarnej, co powoduje niestety wydłużenie czasu uzyskania równowagi w układzie. Stosowanie grubszego filmu wiąże się także z wydłużonym czasem kondycjonowania włókna i desorpcji termicznej analitów w dozowniku chromatografu gazowego. Włókna o grubym filmie fazy stacjonarnej (np. 100 μm) są bardziej przydatne do analizy związków lotnych (o temperaturze wrzenia do ok. 200°C), choć mogą być również użyte do związków mniej lotnych, ale wówczas czas ustalenia się równowagi jest dłuższy.

W przypadku, gdy anality są związkami lotnymi lub mają wysoki współczynnik podziału, a badana próbka jest ciałem stałym lub cieczą o dużej zawartości związków organicznych o dużych masach cząsteczkowych, lepszą techniką, z punktu widzenia czułości metody, jest SPME z fazy nadpowierzchniowej (technika headspace). Unika się wówczas "zablokowania" włókna przez związki organiczne, a czas konieczny do uzyskania stanu równowagi jest znacznie krótszy. Wynika to z faktu, że dyfuzja w gazach zachodzi czterokrotnie szybciej niż w fazie wodnej.

Do zalet SPME należy:

- ♦ szybkość – równowaga osiągnięta w czasie od 2 do 30 minut, w związku z tym metoda nadaje do szybkiego monitorowania próbek;
- ♦ czułość – limit detekcji może osiągnąć poziom ppt;
- ♦ ekonomia – zminimalizowane koszty rozpuszczalników, włókno można wykorzystywać ok. 100 razy;
- ♦ uniwersalność – możliwość stosowania z dowolnym chromatografem gazowym lub dowolnym zestawem HPLC posiadającym przystawkę SPME/HPLC do dozowania próbek;
- ♦ możliwość ekstrakcji z wielu różnych matryc;
- ♦ możliwość automatyzacji;

Chromatografia cienkowarstwowa

Chromatografia cienkowarstwowa jest techniką rozdzielania substancji polegającą na zróżnicowanym podziale składników mieszaniny pomiędzy fazę ruchomą a stacjonarną. Fazę stacjonarną stanowi cienka warstwa sorbentu osadzona na podłożu w postaci płytek lub folii.

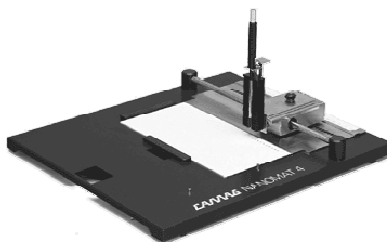
Przebieg analizy za pomocą chromatografii planarnej składa się z kilku etapów:

1. naniesienie próbki na fazę stacjonarną;
2. rozwinięcie chromatogramu;
3. wizualizacja chromatogramu;
4. oznaczenie jakościowe i ilościowe składników próbki.

Wcześniej należy wybrać odpowiednią fazę stacjonarną i ruchomą stosowaną w czasie analizy oraz sposób wizualizacji i rejestracji chromatogramu.

Naniesienie próbki

Próbki nanosi się na linię startu w postaci plamek okrągłych lub wydłużonych (rozdzielanie analityczne) lub w postaci pasma na całej szerokości płytki (rozdzielanie preparatywne). Do nanoszenia próbek używa się mikropipety, mikrostrzykawki lub specjalnych aplikatorów (jeden z nich przedstawia Rys.5).



Rys..5. Przyrząd do nanoszenia próbek NANOMAT 4

Rozwijanie chromatogramu

Rozwijanie chromatogramów może odbywać się różną techniką. Do najbardziej popularnych należy technika wstępująca (pionowa) oraz pozioma.

Wizualizacja chromatogramu

Chromatogram otrzymany w optymalnym układzie ma plamki rozdzielone, rozłożone równomiernie między linią startu a linią czoła fazy ruchome, bez ogonów. Gdy rozdzielone składniki nie są widoczne na płytce należy je uwidocznic. W tym celu można zastosować:

- ♦ wizualizację fizyczną – np. przez oglądanie płytki pod lampą emitującą promieniowanie o długości fali 254nm i 366nm.
- ♦ wybarwienie chemiczne – przez spryskanie płytek odpowiednio dobranymi odczynnikami chemicznymi.

Często stosuje się przeprowadzenie związków chemicznych w określone pochodne dobierając właściwy odczynnik derywatyzujący aby uzyskać lepsze właściwości chromatograficzne jak i obniżenie progu wykrywalności danego związku.

Oznaczenia jakościowe i ilościowe składników próbki

Podstawą identyfikacji badanego związku jest zgodność jego współczynnika R_f z substancją wzorcową w co najmniej dwóch różnych warunkach chromatograficznych. Współczynnik R_f jest definiowany jako stosunek odległości przebytej przez daną plamkę (l_s) i odległości przebytej przez czoło rozpuszczalnika (l_f) stąd:

$$R_f = \frac{l_s}{l_f}$$

Współczynnik R_f można wyrazić też następującą zależnością:

$$R_f = \frac{t_m}{t_m + t_s} = \frac{1}{1 + k}$$

gdzie: t_m – czas jaki substancja przebywa w fazie ruchomej;

t_s – czas jaki substancja przebywa w fazie stacjonarnej;

k – współczynnik retencji.

Technika chromatografii cienkowarstwowej może być zastosowana do szacunkowej analizy ilościowej. Przeprowadza się ją poprzez porównanie wielkości i intensywności plamek badanego związku z serią plam substancji wzorcowej naniesioną na tą samą płytkę w określonych stężeniach lub przy zastosowaniu densytometru. Densytometr przekształca chromatogram plamkowy w chromatogram pikowy taki jaki otrzymujemy w chromatografii cieczowej.

Literatura obowiązkowa

- ↳ Z. Witkiewicz, *Podstawy chromatografii*, WNT, Warszawa 2000;
- ↳ W. Krawczyk, *Profilowanie narkotyków*, Wydawnictwo CLK KGP, Warszawa 1998, str. 33-44 (książka dostępna u osoby prowadzącej ćwiczenie)

Literatura uzupełniająca (dostępna u osoby prowadzącej ćwiczenie)

- ↳ W. Krawczyk *Chromatografia gazowa w kryminalistyce*, Wydawnictwo CLK KGP Warszawa 1999;
- ↳ M. A. Verweij, *Impurities in Illicit Drug Preparations: Amphetamine and Methamphetamine*, Forensic Sci Rev, 1(1), 1989, 1-11;
- ↳ M. A. Verweij, *Impurities in Illicit Drug Preparations: 3,4-(Methylenedioxy)amphetamine and 3,4-(Methylenedioxymethyl)amphetamine*, Forensic Sci Rev, 4:137, 1992, 137-146;

- ↳ M. Bohn, G. Bohn, G. Blaschke, *Synthesis markers in illegally manufactured 3,4-methylenedioxyamphetamine and 3,4-methylenedioxymethamphetamine*, Int J Leg Med, 106, 1993, 19-23;
- ↳ R.J. Renton, J.S. Cowie, M.C. H. Oon, *A Study of the Precursors, Intermediates and Reaction By-Products in the Synthesis of 3,4-Methylenedioxymethamphetamine and Its Application to Forensic drug Analysis*, Forensic Science International, 60, 1993, 189-202;
- ↳ J. Ballany, B. Caddy, M. Cole, Y. Finnon, L. Aalberg, K. Janhimen, E. Sippola, K. Andersson, C. Brtler, J. Dahlen, I. Kopp, L Dujourdy, E Lock, P. Margot, H. Huizer, A. Poortman, E. Kaa, A. Lopes, *Development of a harmonized pan-European method for the profiling of amphetamines*, Science & Justice, 41, 2001, 193-196;
- ↳ T. Vu Doan-Trang, *Logo and Headspace Comparison for Source Determination of Ecstasy Seizures*, Microgram, XXXIV, 9, 2001, 244-256;
- ↳ F. Palhol, S. Boyer, N. Naulet, M. Chabrilat, *Impurity profiling of seized MDMA tablets by capillary gas chromatography*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, Springer-Verlag 2002;
- ↳ K. Tanaka, T. Ohmori, T. Inoue, S. Seta, *Impurity Profiling Analysis of Illicit Methamphetamine by Capillary Gas Chromatography*, J Forensic Sci, 39(2), 1994, 500-511;
- ↳ J. C. Koester, D. B. Andresen, P. M. Grant, *Optimum Methamphetamine Profiling with Sample Preparation by Solid-Phase Microextraction*, J Forensic Sci, 47(5), 2002, 1003-1007;

ĆWICZENIE U1

Zastosowanie techniki chromatografii cienkowarstwowej (TLC) w badaniach przesiewowych.

Wpływ pH na ekstrakcję ciecz-ciecz zanieczyszczeń z próbki narkotyku.

Prowadzący: mgr Aneta Garbacik

Cel ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest zapoznanie z metodą profilowania narkotyków, która nie jest jeszcze stosowana rutynowo we wszystkich laboratoriach kryminalistycznych, ale ze względu na cenne informacje, jakie dzięki niej się uzyskuje, prowadzi się obecnie szeroko zakrojone badania nad wprowadzeniem tej metody jako rutynowej. Prowadzi się również badania nad wykorzystaniem TLC w profilowaniu narkotyków. Ćwiczenie to ma na celu wykazać możliwość wykorzystania TLC w badaniach przesiewowych w profilowaniu narkotyków.

Zakres materiału naukowego

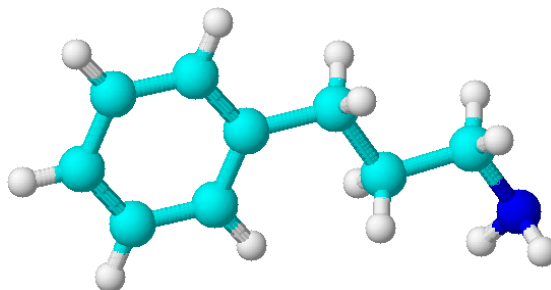
- ☞ aminy – otrzymywanie i właściwości fizykochemiczne;
- ☞ metody wydzielania związków organicznych z roztworów wodnych (ekstrakcja ciecz-ciecz);
- ☞ podstawy teoretyczne, postępowanie analityczne i zastosowanie chromatografii cienkowarstwowej, szereg eluotropowy rozpuszczalników;

Odczynniki, materiały, przyrządy

Odczynniki: metanol, chloroform, bufor fosforanowy pH = 7, bufor węglanowy pH = 10, n-heksan;

Materiały: siarczan 3-fenylopropyloaminy (związek imitujący siarczan amfetaminy);

Przyrządy: komora chromatograficzna typu *sandwicz*, płytki chromatograficzne (żel krzemiankowy), mikrowytrząsarka *Vortex*, lampa UV do wizualizacji plamek;



Rys. 6. 3-fenylopropyloamina

Przygotowanie próbek:

1. Odważyć 4 porcje badanych próbek (2 dla zanieczyszczenia I i 2 dla zanieczyszczenia II) po 200 mg do analizy TLC (ekstrakcja);
2. 4 próbki przenieść do fiolek o obj. 5 ml;
3. 2 próbki (zanieczyszczenie I i II) rozpuścić w 2 ml roztworu buforowego o $\text{pH} = 7$, a pozostałe 2 (zanieczyszczenie I i II) w 2 ml roztworu buforowego o $\text{pH} = 10$;
4. Wytrząsać przez 30 min;
5. Do każdej próbki dodać 200 μl n-heksanu;
6. Wytrząsać przez 30 min.

Sposób wykonania analizy TLC

1. Sporządzić 20 ml mieszaniny - chloroform : metanol o następujących stosunkach objętościowych: 1:1, 2:1 i 9:1;
2. Nałożyć po 10 μl warstwy organicznej na plamki startowe (w odległości 1 cm od brzegu płytki);
3. Umieścić płytkę w komorze chromatograficznej;
4. Do rowków w komorze wprowadzić 3 ml mieszaniny rozpuszczalników;
5. Płytkę rozwijać przez 20 min., po tym czasie wyciągnąć płytkę z komory i pozostawić na powietrzu do wyschnięcia;
6. Zaznaczyć plamki pod lampą UV;
7. Wygrzać płytkę przez 20 min. w 100°C i ponownie zaznaczyć plamki pod lampą UV.

Opracowanie wyników

- Wyznaczyć współczynniki R_f dla poszczególnych plamek;
- Uzasadnić wybór mieszaniny rozpuszczalników do rozdziału zanieczyszczeń;
- Uzasadnić różnice w profilach otrzymanych po ekstrakcji z roztworów buforowych o $\text{pH} = 7$ i $\text{pH} = 10$;
- Na podstawie chromatogramów otrzymanych dla dwóch różnych próbek 3-fenylopropyloaminy (według tej samej procedury) uzasadnić różnice w profilach.

ĆWICZENIE U2

Zastosowanie techniki chromatografii cienkowarstwowej (TLC) w badaniach przesiewowych.

Wpływ dodatków na profil zanieczyszczeń narkotyku

Prowadzący: mgr Jagoda Kuczara

Cel ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest zapoznanie z metodyką profilowania narkotyków oraz sposobu i możliwości wydobycia informacji o narkotykach na podstawie przeprowadzonych badań a następnie określenie wpływu rozcieńczalników na profil zanieczyszczeń narkotyku. Zapoznanie się z metodą ekstrakcji do fazy stałej (SPE) oraz techniką chromatografii cienkowarstwowej.

Zakres materiału naukowego:

- ☛ podstawowe zagadnienia profilowania narkotyków
- ☛ podstawowe informacje dotyczące procesu ekstrakcji SPE (ekstrakcja do fazy stałej)
- ☛ podstawy teoretyczne techniki chromatografii cienkowarstwowej (rodzaje faz nieruchomych i faz ruchomych, techniki rozwijania i wybarwiania chromatogramów)
- ☛ postępowanie analityczne i zastosowanie chromatografii cienkowarstwowej
- ☛ zasady analizy jakościowej i ilościowej (rozdzielczość, odtwarzalność, granice wykrywalności i oznaczalności).

Odczynniki:

Heksan, aceton, octan etylu, metanol, chloroform, acetonitryl, woda dwukrotnie destylowana, kwas acetylosalicylowy, glukoza, kofeina, stearynian magnezu, skrobia, kwasek cytrynowy, cukier puder, bufor fosforanowy pH=7;

Aparatura:

Zestaw do ekstrakcji SPE; płytki chromatograficzne (żel krzemionkowy), komora chromatograficzna typu *sandwich*, mikrokapilary, urządzenie do zagęszczania ekstraktów, lampa UV do wizualizacji plamek.

Sposób wykonania:

I. Otrzymanie profilu zanieczyszczeń narkotyku techniką SPE/TLC

W ćwiczeniu używamy kolumnienek z wypełnieniem:

- oktasilanowym C
- oktadecylosilanowym C-18;

a) Przygotowanie próbki do analizy

Rozpuścić w 20 ml buforu fosforanowego (pH=7) 0,5 g substancji wskazanej przez prowadzącego.

b) Wykonanie ekstrakcji

1. Kondycjonowanie kolumny - przemyć dwukrotną objętością pustej kolumny metanolem a następnie wodą destylowaną (*nie dopuścić do wysuszenia kolumny*).
2. Nanoszenie próbki - nanieść 2 x 3 ml przygotowanej próbki.
3. Wymywanie składników przeszkadzających (tu głównego składnika) - przemyć kolumnę 3 ml wody destylowanej.
4. W celu usunięcia śladów wody pozostawić przez 15 minut włączoną próżnię
5. Wymywanie analitów - nanosić na kolumnę 5 razy po 200µl metanolu przy zastosowaniu odbieralników.

c) Rozwinięcie chromatogramu

1. Nanieść na płytkę o wymiarach 10 x 10 cm pokrytą żelom krzemionkowym otrzymane ekstrakty w objętości 5 µl; nanieść po trzy plamki każdego z ekstraktów;
2. Tak przygotowane płytki rozwinąć stosując następujące eluenty:
 - a) chloroform : metanol (9:1 v/v)
 - b) chloroform : metanol : acetonitryl (5:2:3 v/v/v)
3. Wygrzewać płytkę w temperaturze 100⁰C przez 20 min;
4. Obejrzyć płytkę pod lampą UV (254 i 366 nm);

d) Opracowanie wyników

- a. Ocenic, który chromatogram zawiera najwięcej informacji (liczba i jakość uzyskanych plamek) a następnie wybrać optymalne wypełnienie kolumny do dalszych badań nad profilowaniem zanieczyszczeń w badanych próbkach.
- b. Policzyc współczynnik R_f dla poszczególnych plamek.

II. Wpływ dodatków na profil zanieczyszczeń narkotyku

1) Przygotowanie próbki

- a) Wybrać zestaw domieszek, które będą obecne w symulowanej tabletkie narkotyku
- b) Rozpuścić w 20 ml buforu fosforanowego (pH=7) 100 mg wybranych domieszek
- c) Rozpuścić w 20 ml buforu fosforanowego (pH=7) 100 mg wybranych domieszek oraz 0,5 g substancji wskazanej przez prowadzącego.

2) Wykonanie ekstrakcji

- a) Wg procedury opisanej w pierwszej części wykonania ćwiczenia

3) Rozwinięcie chromatogramu

- a. Nanieść na płytkę o wymiarach 10 x 10 cm pokrytą żelem krzemionkowym otrzymane ekstrakty w objętości 5 μ l; nanieść po trzy plamki każdego z ekstraktów;
- b. Tak przygotowane płytki rozwinąć stosując następujące eluenty:
- c. chloroform : metanol (9:1 v/v)
- d. chloroform : metanol : acetonitryl (5:2:3 v/v/v)
- e. Wyrzewać płytki w temperaturze 100⁰C przez 20 min;
- f. Obejrzeć płytkę pod lampą UV (254 i 366 nm);

4) Opracowanie wyników

- a) Policzyc współczynnik R_f dla poszczególnych plamek

- b) Opisz, jakie zmiany w otrzymanych profilach zanieczyszczeń spowodowała obecność domieszek

III SPRAWOZDANIE

Kilka słów o substancjach psychotropowych i składzie tabletek.

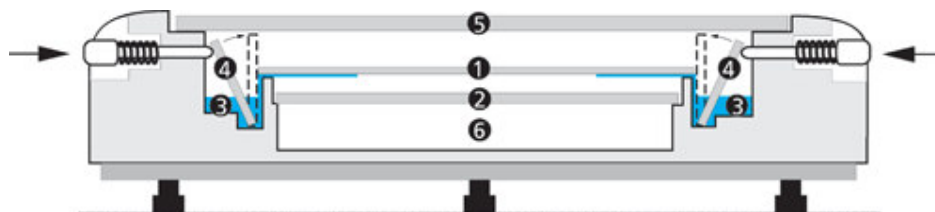
Opis wykonania ćwiczenia

Opracowanie wyników:

- ♦ Wyznaczenie współczynników R_f dla poszczególnych plamek na otrzymanych chromatogramach
- ♦ Uzasadnienie wyboru wypełnienia kolumny ekstrakcyjnej
- ♦ Porównanie chromatogramów otrzymanych dla różnych układów rozwijających
- ♦ Porównanie profili zanieczyszczeń badanych związków
- ♦ Porównanie profili zanieczyszczeń próbek nie zawierających domieszek oraz próbek z domieszkami

Aneks 1

Budowa komory chromatograficznej firmy Camag



- 1 – płytką TLC
- 2 – płytką szklaną przy konfiguracji „sandwich”
- 3 – zbiorniczek eluenta
- 4 – płytką szklaną przy pomocy której eluent dostarczany jest do płytki TLC
- 5 – szklane zamknięcie komory chromatograficznej
- 6 – przestrzeń na roztwór kondycjonujący

Aneks 2

Sekwencja rozpuszczalników do kondycjonowania kolumniek SPE:

n-heksan,
chloroform,
octan etylu,
aceton,
metanol
woda destylowana