



Uniwersytet  
Gdański



# Katedra Analizy Środowiska

## Instrukcja do ćwiczeń laboratoryjnych

### Ćwiczenie 2

Oznaczanie środków dopingujących w płynach ustrojowych  
z wykorzystaniem techniki HPLC-UV

Gdańsk, 2023



## Fizykochemiczne metody badań w kryminalistyce

### Oznaczanie środków dopinujących w płynach ustrojowych z wykorzystaniem techniki HPLC-UV

#### 1. Wprowadzenie

Zażywanie substancji poprawiających wydajność sięga starożytnych czasów, kiedy to popularnością zwłaszcza wśród sportowców, cieszyły się ekstrakty ziołowe. Jednym z ważniejszych był wyciąg z rośliny *Ephedra sinica*. Dopiero w 1924 roku substancja stymulująca, znajdująca się w tej roślinie, została zidentyfikowana jako efedryna. Innym znanym zjawiskiem, mającym na celu poprawę wyników wytrzymałościowych i zwalczanie zmęczenia, było stosowanie amfetaminy oraz praktykowanie transfuzji krwi (1). Obecnie spożywanie środków zwiększających wydajność u ludzi i zwierząt, jak i uchylanie się od pobrania próbek, handel, manipulacja czy jakiegokolwiek rodzaju udziału w naruszeniu przepisów antydopingowych są zabronione i określone jako doping (2). Od niedawna, nowym zagrożeniem stał się także tzw. doping genowy, definiowany jako nieterapeutyczne wykorzystanie komórek, genów, elementów genetycznych lub modulacji ekspresji genów, posiadających zdolność do poprawy wyników sportowych (2),

Pierwsza afera dopingowa, która ujrzała światło dzienne na oczach międzynarodowej publiczności, miała miejsce podczas Igrzysk Olimpijskich w Rzymie w 1960 roku. W trakcie letnich zawodów, na skutek spożycia środków rozszerzających naczynia krwionośne (Ronicol) lub pobudzających (amfetamina), duński kolarz zasłabł i zmarł (1). Powyższe wydarzenie doprowadziło do utworzenia w 1961 roku Komisji Medycznej Międzynarodowego Komitetu Olimpijskiego (MKOI), której nadrzędnym celem była walka z dopingiem w sporcie. Wiele późniejszych incydentów dopingowych na arenach międzynarodowych, między innymi podczas kolarskiego Tour de France, przyczyniło się do powołania w 1999 Światowej Agencji Antydopingowej (WADA, ang. *World Anti-Doping Agency*). Organizacja ta do dnia dzisiejszego promuje i koordynuje Światowy Program Zwalczania Doping. W ramach działalności tej instytucji, corocznie aktualizowana jest lista substancji i metod zabronionych (3). I tak na przykład, wśród substancji zakazanych w sektorze dopingowym wymienić można środki anaboliczne, hormony peptydowe, czynniki wzrostu i mimetyki, substancje z grupy beta-2-agonistów, modulatory hormonów i metabolizmu, diuretyki i inne substancje maskujące, alkohol, stymulanty, narkotyki, kanabinoidy oraz glikokortykoidy (3). W przypadku niektórych substancji, np. efedryny czy metyloefedryny, ustalono wartości progowe. Związki te zaliczane są do kategorii stymulantów dopiero w momencie, gdy ich stężenie w moczu przekroczy wartość 10 µg/ml (2,3)



## Fizykochemiczne metody badań w kryminalistyce

### Oznaczenie środków dopingujących w płynach ustrojowych z wykorzystaniem techniki HPLC-UV

Badaniom na zawartość środków antydopingowych poddaje się różne płyny ustrojowe. Rutynowo wykorzystywanym do badań antydopingowych materiałem jest mocz. Wynika to przede wszystkim z faktu wykorzystania nieinwazyjnej metody poboru próbek, wystarczającej ilości materiału, jak i faktu wydalania większości produktów metabolizmu przez nerki. Niemniej jednak istnieją doniesienia wskazujące, że na wydalanie niektórych substancji (w tym efedryny i metyloefedryny) wyraźny wpływ może mieć pH moczu oraz jego objętość (4). Krew została włączona do badań dopiero w 1992 roku. Przez wiele lat temat poboru próbek krwi był bardzo kontrowersyjny ze względów religijnych i kulturowych (1). Warto także podkreślić, że badaniom na zawartość substancji zabronionych poddaje się także inne próbki natury biologicznej, np. włosy (5),

Analiza próbek w kontroli antydopingowej jest dwuetapowa. Pierwszym etapem jest wykonanie testów przesiewowych, z wykorzystaniem szybkich metod chromatograficznych: np. HPLC-UV, GC-NPD czy też immunoenzymatycznych testów, w celu wskazania obecności lub braku środka dopingującego (6). Niektóre substancje, takie jak salbutamol, morfina, katyna, efedryna, metyloefedryna, pseudoefedryna i karboksy-tetrahydrokanabinol wymagają przeprowadzenia pomiaru ilościowego, gdyż uznawane są za substancje zabronione tylko powyżej stężenia progowego. Po wykryciu środka dopingującego przeprowadza się etap potwierdzający z wykorzystaniem metod zapewniających wystarczającą do rzetelnej identyfikacji i oznaczenia precyzję, dokładność oraz liczbę kryteriów identyfikacyjnych. Powszechnie stosowaną techniką jest spektrometria mas w połączeniu z wysokosprawną chromatografią cieczową bądź gazową (7). Próbkę biologiczną przed analizą właściwą muszą zostać poddane specjalnej procedurze przygotowania, dobranej w oparciu o właściwości fizyko-chemiczne analitu i stosowaną metodę analityczną. Najważniejszym etapem jest zastosowanie odpowiedniej metody ekstrakcji, pozwalającej na pozbycie się nadmiaru zanieczyszczeń i odseparowanie analitu w maksymalnie czystej i skoncentrowanej postaci. Wśród wielu dostępnych metod ekstrakcji, techniką wyboru jest najczęściej technika ekstrakcji do fazy stałej (SPE, ang. *Solid Phase Extraction*). Poza szerokim asortymentem ziół SPE (tj. fazy normalne, odwrócone, wymiennicze jonowe, tryby mieszane), dedykowanym związkom o różnych właściwościach fizyko-chemicznych, SPE może być łatwo zautomatyzowana, co pozwala na jednoczesne przygotowanie wielu próbek



## Fizykochemiczne metody badań w kryminalistyce

### Oznaczanie środków dopingujących w płynach ustrojowych z wykorzystaniem techniki HPLC-UV

Przyjmowanie środków dopingujących miewa tragiczne konsekwencje. Warto przy tym zaznaczyć, że niektóre z nich, zwłaszcza pochodzące z nieznanymi źródeł, bywają zanieczyszczone także innymi szkodliwymi substancjami. Może to skutkować nie tylko trwałym uszczerbkiem na zdrowiu, ale nawet zgonem. Do powszechnie obserwowanych efektów ubocznych związanych ze spożyciem substancji dopingujących należą (8):

- zawał serca i udar mózgu;
- niewydolność pracy nerek; zaburzenia pracy układu oddechowego;
- napady agresji;
- trądzik;
- depresja, bezsenność, myśli samobójcze, drgawki i omamy;
- niepłodność i przerost gruczołów piersiowych;
- zaburzenia cyklu miesiączkowania, obniżenie tonu głosu i nadmierne owłosienie ciała.

Alkaloidy efedryny, będące typowymi stymulantami, występującymi w kilku gatunkach roślin, znajdują się na liście substancji zabronionych przez Światową Agencję Antydopingową. Zaliczane do nich: efedryna, metyloefedryna, pseudoefedryna, metylopseudoefedryna, norefedryna oraz katyna, są aminami sympatykomimetycznymi stosowanymi w schorzeniach astmy i oskrzeli. Substancje te wchodziły w skład leków na przeziębienie dostępnych bez recepty (4).



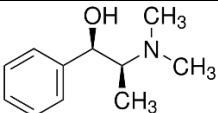
## Fizykochemiczne metody badań w kryminalistyce

### Oznaczenie środków dopinujących w płynach ustrojowych z wykorzystaniem techniki HPLC-UV

## 2. Cel ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest oznaczenie *N*-metyloefedryny w próbce krwi z wykorzystaniem techniki SPE-HPLC-UV. Zestawienie najważniejszych właściwości fizyko-chemicznych tego związku zostało przedstawione w Tabeli 1.

**Tabela 1.** Zestawienie właściwości fizyko-chemicznych *N*-metyloefedryny (9)

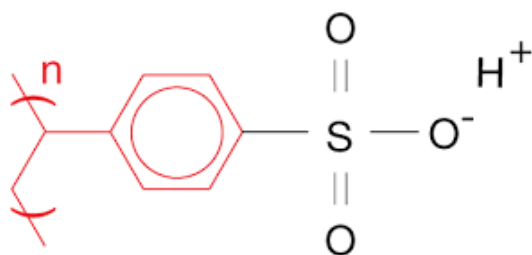
Analit Nr CAS	Struktura chemiczna	Rozpuszczalność w wodzie	Masa molowa [g mol <sup>-1</sup> ]	pKa	Log K <sub>ow</sub>
<i>N</i> -Metyloefedryna 552-79-4		15,4 mg/ml	179.26	9,3	2,47

<https://go.drugbank.com/drugs/DB11278>

## 3. Wykonanie ćwiczenia

### 3.1. Ekstrakcja analitu z próbki krwi

Do wydzielenia *N*-metyloefedryny z próbki krwi zostanie wykorzystana technika SPE. W tym celu do dwóch próbek krwi (wbogaconej i niewzbogaconej, po 5 ml każda) dodać po 15 ml roztworu 0.1M HCl<sub>aq</sub> i zawartość dokładnie wymieszać korzystając z wytrząsarki orbitalnej. Tak przygotowane próbki nanieść pipetami Pasteura na uprzednio przygotowane złoże kationowymienne (Strata XC, rysunek 1), umieszczone na szklanych kolbach bądź próżniowym zestawie do automatycznego SPE.

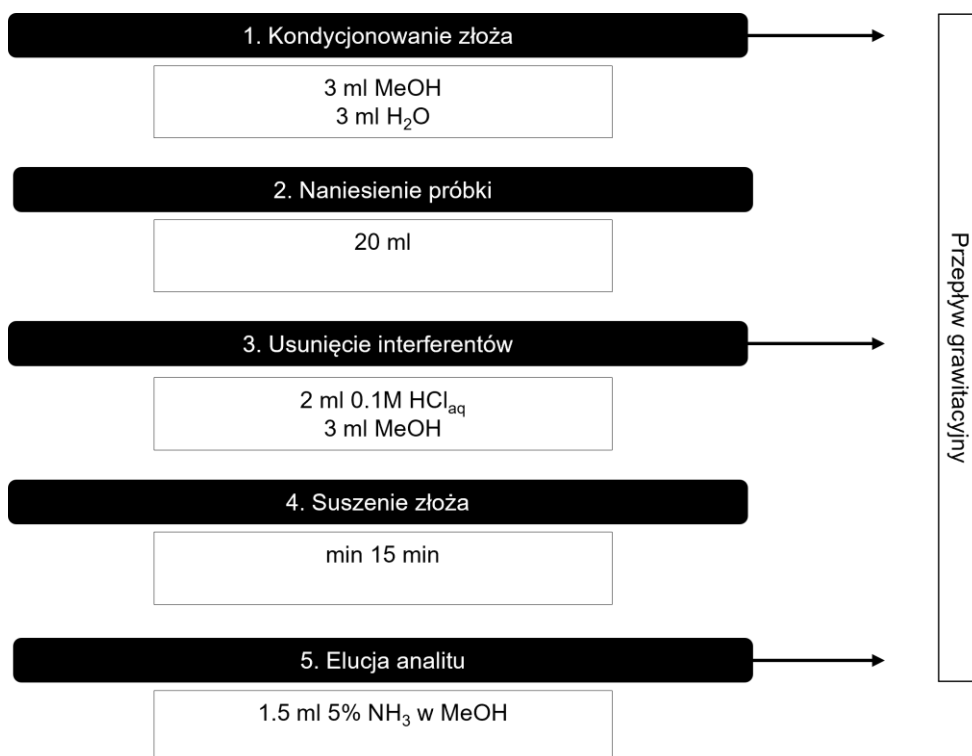


**Rys. 1.** Struktura złoże Strata XC, wykorzystywanego do ekstrakcji *N*-metyloefedryny (Phenomenex).

## Fizykochemiczne metody badań w kryminalistyce

### Oznaczanie środków dopinujących w płynach ustrojowych z wykorzystaniem techniki HPLC-UV

Procedurę ekstrakcji przedstawiono na rysunku 2. Uzyskane eluaty należy odparować w strumieniu azotu do sucha. Następnie suchą pozostałość rozpuścić w 1ml mieszaniny MeOH:0.1% $\text{HCOOH}_{\text{aq}}$  (1:1, v/v) i przefiltrować do osobnych naczynek chromatograficznych z wykorzystaniem filtrów strzykawkowych. Na koniec ćwiczeń laboratoryjnych wykonać analizę HPLC przygotowanych próbek w warunkach przedstawionych w Tabeli 2. Identyfikacji analitu dokonać na podstawie czasu retencji. Zawartość *N*-metyloefedryny w próbce krwi wyznaczyć korzystając z równania krzywej kalibracyjnej.



**Rys. 2.** Procedura ekstrakcji *N*-metyloefedryny z próbki krwi z wykorzystaniem techniki SPE (zmodyfikowana)(10) .



## Fizykochemiczne metody badań w kryminalistyce

### Oznaczanie środków dopinujących w płynach ustrojowych z wykorzystaniem techniki HPLC-UV

#### 3.2. Sporządzenie krzywej kalibracyjnej

Z metanolowego roztworu podstawowego *N*-metyloefedryny o stężeniu 1 mg/ml przygotować 6 roztworów roboczych o stężeniach wskazanych przez prowadzącego zajęcia, oraz ślepą próbę. W tym celu metanolową porcję roztworu podstawowego odparować w strumieniu azotu do sucha. Suchą pozostałość rozpuścić w 1 ml mieszaniny MeOH:0.1% $\text{HCOOH}_{\text{aq}}$  (1:1, v/v). Następnie wykonać analizy HPLC roztworów wzorcowych *N*-metyloefedryny zgodnie z warunkami podanymi **Tabeli 2.**

**Tabela 2.** Zestawienie warunków analizy *N*-metyloefedryny z wykorzystaniem techniki HPLC-UV

Kolumna chromatograficzna	Faza ruchoma	Program elucji	Natężenie przepływu fazy ruchomej [ml min <sup>-1</sup> ]	$\lambda$ [nm]
Hypersil Gold C18 aq	(B) – MeOH (A) – 0.1% $\text{HCOOH}_{\text{aq}}$	Izokratycznie: 35 % B 65% A	1,0	210

Sporządzić wykres zależności powierzchni sygnału chromatograficznego analitu od stężenia. Wyznaczyć równanie krzywej kalibracyjnej oraz wartość współczynnika  $R^2$ .



## Fizykochemiczne metody badań w kryminalistyce

### Oznaczanie środków dopinujących w płynach ustrojowych z wykorzystaniem techniki HPLC-UV

#### 4. Szkło i odczynniki:

- 0.1M HCl<sub>aq</sub> (200 ml)
- MeOH (2000 ml)
- MeOH (100 ml)
- 0.1% HCOOH<sub>aq</sub> (2000 ml)
- 0.1% HCOOH (100 ml)
- Woda odgazowana (1000 ml)
- MeOH do płukania strzykawki
- Metanolewy roztwór *N*-metyloefedryny o stężeniu 1000 mg l<sup>-1</sup>
- 5% NH<sub>3</sub> w MeOH (50 ml)
- Kolumnienki Strata XC (200 mg/3ml; 2 szt)
- Vortex
- Zestaw do odparowywania pod azotem
- Zestaw próżniowy do SPE lub kolby szklane (2 szt)
- Falkony (2 szt)
- Cylinder miarowy 50 ml (2 szt)
- Pipety Pasteura (4 szt)
- Filtry strzykawkowe (2 szt)
- Strzykawki do filtrów strzykawkowych (2 szt)
- Bagietka szklana (2 szt)
- Naczynka chromatograficzne (1,5 ml, 12 szt)
- Strzykawki do HPLC (2 szt, 50 ml i 100 ml)
- Pipety miarowe 2 ml (2 szt)
- Pipety miarowe 1 ml (2 szt)
- Pipety miarowe 5 ml (2 szt)
- Cenki
- Bibuła laboratoryjna ochronna





## Fizykochemiczne metody badań w kryminalistyce

### Oznaczanie środków dopingujących w płynach ustrojowych z wykorzystaniem techniki HPLC-UV

#### 5. Literatura

1. Ljungqvist A. Brief History of Anti-Doping. *Med Sport Sci.* 2017;62:1–10.
2. Segura J, Ventura R, Marcos J, Gutiérrez Gallego R. Chapter 21 Doping substances in human and animal sport. *Handb Anal Sep.* 2008;6:699–744.
3. Antydopingowa ŚA. LISTA SUBSTANCJI I METOD ZABRONIONYCH. ŚWIATOWY KODEKS ANTYDOPINGOWY Stand MIĘDZYNARODOWY. 2020;1–10.
4. Kojima A, Nishitani Y, Sato M, Kageyama S, Dohi M, Okano M. Comparison of urine analysis and dried blood spot analysis for the detection of ephedrine and methylephedrine in doping control. *Drug Test Anal.* 2016;8(2):189–98.
5. Wong JKY, Choi TLS, Kwok KY, Lei ENY, Wan TSM. Doping control analysis of 121 prohibited substances in equine hair by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal.* 2018;158:189–203.
6. Klaus Mueller R, Grosse J, Lang R, Thieme D. Chromatographic techniques-the basis of doping control. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1995;674(1):1–11.
7. Badoud F, Guillarme D, Boccard J, Grata E, Saugy M, Rudaz S, et al. Analytical aspects in doping control: Challenges and perspectives. *Forensic Sci Int.* 2011;213(1–3):49–61.
8. Tsakalof A, Tzatzarakis M, Tsitsimpikou C. Detection of doping substances residues in biological material: A comparative approach. *Toxicol Lett.* 2015;238(2):S43–4.
9. Gray N, Musenga A, Cowan DA, Plumb R, Smith NW. A simple high pH liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for basic compounds: Application to ephedrines in doping control analysis. *J Chromatogr A.* 2011;1218(15):2098–105.
10. Zhang L, Wang ZH, Li H, Liu Y, Zhao M, Jiang Y, et al. Simultaneous determination of 12 illicit drugs in whole blood and urine by solid phase extraction and UPLC-MS/MS. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci.* 2014;955–956(1):10–9.