



Pracownia studencka  
**Katedry Analizy Środowiska**

# Instrukcja do ćwiczeń laboratoryjnych

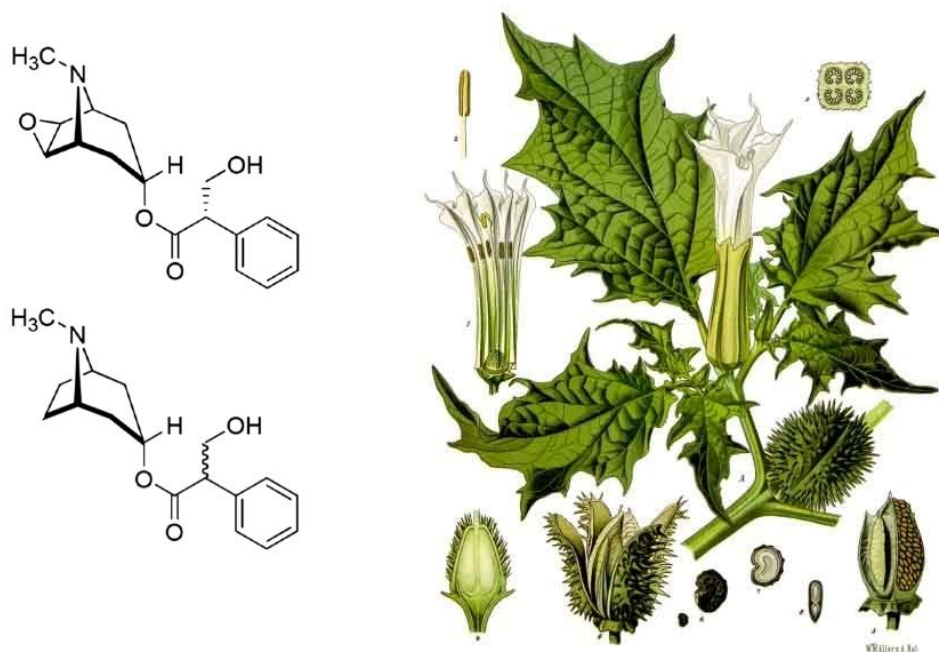
## Ćwiczenie nr 1

**Zastosowanie reakcji chemicznych  
oraz technik chromatograficznych do wykrywania  
skopolaminy w napojach**

## I. Wprowadzenie

### 1.1. Skopolamina

Skopolamina (hioscyna) jest alkaloidem tropanowym, który wraz z atropiną występuje w niektórych roślinach z rodziny psiankowatych (Solanaceae), np. w bieluniu dziędzierzawie (*Datura stramonium*) czy w tzw. trąbach anielskich (*Brugmansia suaveolens*), uprawianych jako roślina ozdobna. Związek ten bywa stosowany jako lek, ze względu na swoją aktywność jako antagonistą ośrodkowych i obwodowych receptorów muskarynowych mięśni gładkich oraz mięśnia sercowego. Skopolamina jest zatem używana w leczeniu stanów skurczowych mięśni gładkich, wykazuje także działanie przeciwwymiotne. Jednocześnie jednak, ze względu na znaczny wpływ na układ nerwowy (m.in. działanie halucynogenne, powodowanie senności oraz zaników pamięci), konieczne jest stosowanie takich form chemicznych tego związku, które nie przekraczają bariery krew – mózg (np. butylobromku). Podawana jest w formie tabletek lub plastrów. Struktury skopolaminy, atropiny oraz najważniejsze naturalne źródło tych związków przedstawia **Rys. 1**. Poza zastosowaniem skopolaminy jako leku, znane są przypadki przyjmowania lub podania tego związku lub roślin go zawierających w celu popełnienia samobójstwa, zabójstwa lub innego przestępstwa, a w przeszłości także stosowania przez służby specjalne jako tzw. serum prawdy.



**Rys. 1.** Struktury chemiczne skopolaminy (góra) oraz atropiny (dół) [1]. Po prawej schematyczne przedstawienie rośliny *Datura stramonium* (bielun dziędzierzawa; Franz Eugen Köhler, *Köhler's Medicinal-Pflanzen*, domena publiczna).

Najliczniejsza grupa zdiagnozowanych zatruc alkaloidami tropanowymi (głównie skopolaminą oraz atropiną) dotyczy przypadkowego spożycia części roślin zawierających te związki, wraz z żywnością lub produktami ziołowymi. Najczęściej dotyczy to ziaren zbóż oraz uzyskanej z nich mąki (gryka, proso perłowe, sorgo), czasami warzyw puszkowanych oraz zbieranych w naturze warzyw liściastych. Z tego względu, produkty przetwarzania ziaren niektórych gatunków zbóż, a także pasze na ich bazie, są monitorowane pod kątem zawartości atropiny i skopolaminy. Możliwe jest także omyłkowe zebranie części zielonych, korzeni lub nasion roślin zawierających alkaloidy tropanowe i użycie ich jako ziół lub przypraw [1,2]. Obejmuje to niektóre zioła dostępne handlowo (np. korzeń żywokostu), a także liczne rośliny stosowane w medycynie tradycyjnej. Znane są także przypadki celowego spożycia części roślin psiankowatych lub napojów alkoholowych na ich bazie, jako środków halucynogennych. Zastosowanie części tych roślin jako narkotyków, także w celach rytualnych, ma długą historię sięgającą czasów prehistorycznych [3].

Ryzyko związane zarówno z celowym przyjmowaniem skopolaminy, nazywanej także oddechem diabła, jako halucynogenu, jak i kryminalnym stosowaniem tego związku jako substancji wywołującej dezorientację i uległość, wiąże się z niebezpieczeństwem przyjęcia/podania dawki, która wywoła poważne efekty toksyczne:

- zaburzenie intelektu;
- dezorientację;
- otępienie;
- przyspieszenie pracy serca i wzrost ciśnienia tętniczego;
- halucynacje;
- poirytowanie;
- lękliwość;
- euforię

do zgonu włącznie.

Skopolamina, wykorzystywana w celach przestępczych do przejmowania kontroli nad ludźmi, w tym pozbawiania ich świadomości, została okrzyknięta jednym z najbardziej niebezpiecznych preparatów psychoaktywnych na świecie [4]. Najczęściej stosowana jest w celach przestępczych w krajach Ameryki Południowej, gdzie rabunki osób celowo narażonych na działanie skopolaminy są notowane co najmniej od lat 50. XX wieku [5][6]. Mechanizm przestępstw jest zbliżony – narkotyk zazwyczaj zostaje podany ofierze w drinku (może być także wchłonięty drogą wziewną), po czym przestępca przekonuje ofiarę do przekazania mu gotówki i cennych przedmiotów.

### Zastosowanie reakcji chemicznych oraz technik chromatograficznych do wykrywania skopolaminy w napojach

Ofiara często zostaje zawieziona do banku w celu wypłaty środków, czasami także przestępcy dokonują kradzieży przedmiotów z domu ofiary. Znacznie rzadziej skopolamina jest także używana w celu dokonania przestępstwa o charakterze seksualnym (w Ameryce Południowej ok. 3% znanych przypadków jej podania). Zastosowanie tego związku w celach przestępczych jest możliwe, ponieważ jednym ze skutków działania skopolaminy na organizm człowieka jest przejściowa uległość i podatność na sugestie. Co więcej, podanie wystarczająco wysokiej dawki tego związku prowadzi do czasowego zaniku pamięci, co w efekcie bardzo utrudnia identyfikację przestępców, a w skrajnych przypadkach ofiara może nie być świadoma faktu dokonania przestępstwa. Związek ten nie utrzymuje się długo w organizmie – wykrycie skopolaminy w moczu jest możliwe zazwyczaj tylko w ciągu pierwszych 12 godzin po podaniu substancji. Później, jedyną możliwością jest analiza pozostałości skopolaminy we włosach ofiary, gdzie wykrycie tego związku jest możliwe nawet po kilku miesiącach [6].

Największe niebezpieczeństwo stosowania skopolaminy w celach przestępczych wiąże się z dużym zróżnicowaniem osobniczym w zakresie dawek wykazujących działanie silnie toksyczne, w tym zgon. Znanie są przypadki śmierci w wyniku zatrucia dawkami poniżej 10 mg (0,01 g) skopolaminy, choć zazwyczaj efekt taki wywołują dopiero dawki rzędu kilkunastu-kilkudziesięciu miligramów. Część znanych przypadków zgonów tego typu wiąże się bezpośrednio z działaniami o charakterze przestępczym [6]. Rozpowszechnienie procederu w krajach Ameryki Południowej jest na tyle duże, że turyści pochodzący z Kanady oraz USA bywają przestrzegani przed możliwością utraty majątku w wyniku otrucia. Na terenie Europy przestępcze zastosowanie skopolaminy jest prawdopodobnie mniej rozpowszechnione, choć brakuje wiarygodnych danych na ten temat. Znany jest przynajmniej jeden przypadek celowego podania skopolaminy na terenie Hiszpanii [7]. Ofiara (kobieta) przyjęła nieznaną dawkę w napoju, podanym jej przez męża, z którym się rozwodziła; obserwowane efekty toksyczne były umiarkowane i sugerowały dawkę znacznie poniżej 10 mg. Brak danych na temat motywów, którymi kierował się mężczyzna.

Jak wspomniano, analiza toksykologiczna w przypadku podania skopolaminy jest dość kłopotliwa ze względu na nietrwałość związku w organizmie. Ze względu na fakt, że skopolamina najczęściej podawana jest w napojach/drinkach, zasadne jest wdrożenie prostych i jednoznacznych metod stwierdzania jej obecności w takich matrycach, w tym w napojach zawierających inne substancje klasyfikowane jako alkaloidy.

## 1.2. Identyfikacja alkaloidów tropanowych

Do wykrywania skopolaminy oraz innych substancji z grupy alkaloidów tropanowych w próbkach różnego pochodzenia (np. wodach, roślinach, żywności) zastosowanie znajdują zarówno szybkie metody skринingowe (np. charakterystyczne reakcje strąceniowe (**Tabela 1**), podczas których powstają trudno rozpuszczalne w wodzie osady – głównie sole proste amin lub ich związki kompleksowe) oraz czułe i selektywne metody confirmacyjne.

**Tabela 1.** Zestawienie najpopularniejszych odczynników wykorzystywanych w reakcjach strąceniowych alkaloidów wraz z wynikiem reakcji [8].

Odczynnik	Wynik reakcji
odczynnik Mayera (jodortęcian potasowy)	biały lub żółtawy osad
odczynnik Dragendorffa (jodobizmutan (III) potasowy)	żółtopomarańczowe lub czerwone osady
odczynnik Wagnera (roztwór jodu w wodnym roztworze jodku potasowego)	jasnokawowe lub ciemnobrunatne kłaczkowate osady
kwasy pikrynowy (nasycony na zimno roztwór wodny)	żółty, krystaliczny lub bezpostaciowy osad
odczynnik Sonnenscheina (kwas molibdenianofosforowy)	jasno żółte lub brunatno-żółte bezpostaciowe osady zmieniające barwę na błękitną lub zieloną
odczynnik Scheiblera (kwas wolframianofosforowy)	kłaczkowate osady
kwasy chloroplatynowy	jasnożółte lub pomarańczowe osady

Wymogi tej drugiej grupy spełniają przede wszystkim techniki chromatograficzne (gazowa (GC, ang. *Gas chromatography*) lub ciekłowa (LC, ang. *Liquid chromatography*)), najlepiej sprzężone ze spektrometrią mas (MS, ang. *Mass spectrometry*). Analiza alkaloidów z wykorzystaniem tych technik jest zwykle poprzedzona wieloetapową procedurą ekstrakcji analitów z wybranej matrycy, uwzględniającą alkalizację stosowanego materiału, następnie wyizolowanie substancji za pomocą względnie niepolarnego rozpuszczalnika organicznego (octanu etylu, dichlorometanu, chloroformu). W przypadku techniki GC, niezbędnym krokiem jest także derywatywizacja alkaloidów do odpowiednich lotnych trimetylosililowych (TMSi) pochodnych, zsyntezowanych przy użyciu wielu popularnych odczynników, m. in. *N,O*-bis(trimetylosililo)trifluoroacetamidu (BSTFA) [9].

Do technik stosowanych zarówno w metodzie skринingowej jak i confirmacyjnej należy chromatografia cienkowarstwowa (TLC, ang. *Thin Layer Chromatography*). Wśród podstawowych zalet tej techniki wymienić można niski koszt, krótki czas analizy oraz niewielkie zużycie rozpuszczalników.

## II. Cel ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest zastosowanie reakcji chemicznych i metod chromatograficznych do identyfikacji skopolaminy w napojach.

## III. Wykonanie ćwiczenia

### 3.1. Wykrywanie skopolaminy podczas szybkich prób jakościowych (reakcji strąceniowych).

Wykonać szybkie próby jakościowe dla sześciu próbek napojów (coca coli, toniku i herbaty) według procedury opisanej poniżej. Jako próbę odniesienia wykorzystać wodny roztwór skopolaminy o stężeniu  $1000 \text{ mg l}^{-1}$ .

#### Reakcja strąceniowa z odczynnikiem Dragendorffa:

- do buteleczek o poj. 2 ml wprowadzić za pomocą pipety po 1 ml coca coli, coca coli wzbogaconej skopolaminą, toniku, toniku wzbogaconego skopolaminą, herbaty, herbaty wzbogaconej skopolaminą oraz wodnego roztworu skopolaminy;
- dodać po 200  $\mu\text{l}$  odczynnika Dragendorffa do każdej z próbek;
- wytrząsać przez 1 min;
- odstawić na 2 min.

**Pojawienie się żółtopomarańczowego lub czerwonego osadu świadczy o obecności alkaloidów w próbce (Rys. 2.).**



Rys. 2. Wynik reakcji strąceniowej skopolaminy z odczynnikiem Dragendorffa.

### 3.2. Ekstrakcja skopolaminy z napojów

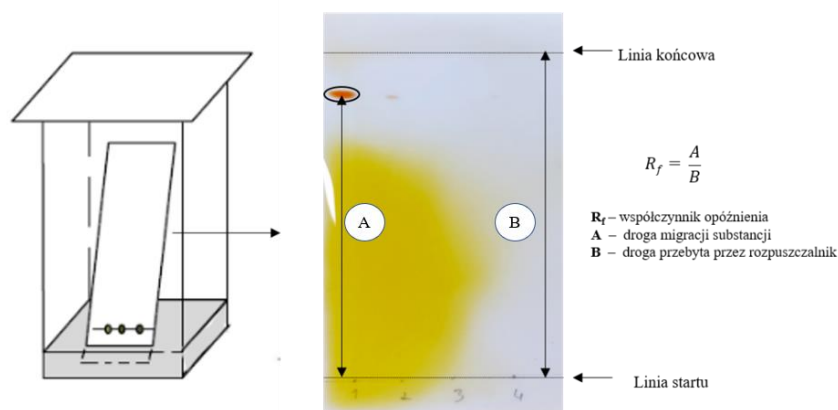
Do czterech cylindrów miarowych wprowadzić po 25 ml coca coli, coca coli z dodatkiem skopolaminy, toniku i toniku z dodatkiem skopolaminy. W następnej kolejności zalkalizować wszystkie próbki przy użyciu kilku kropel wody amoniakalnej i sprawdzić pH za pomocą papierków

### Zastosowanie reakcji chemicznych oraz technik chromatograficznych do wykrywania skopolaminy w napojach

lakmusowych. Wykonać ekstrakcję ciecz-ciecz w rozdzielaczu za pomocą 15 ml chloroformu. Zebrać **warstwę organiczną (dolną)** do kolby stożkowej. Wprowadzić ponownie 15 ml chloroformu do rozdzielacza i wytrząsać przez kilka sekund regulując ciśnienie. Zebrać warstwę chloroformową do tej samej kolby stożkowej. Usunąć pozostałą w rozdzielaczu warstwę wodną, zastępując ją zebraną frakcją chloroformową. W następnej kolejności należy zobojętnić roztwór. W tym celu przeprowadzić trzykrotne wytrząsanie warstwy organicznej 25 ml wody dejonizowanej (3 x po 25 ml). Frakcje organiczne zbierać do kolby sercowki po uprzednim przesączeniu przez środek suszący. Zebrane frakcje chloroformowe zateżyć do objętości 1 ml na odparowywaczu obrotowym. Wykonać analizę TLC oraz GC uzyskanych ekstraktów.

### 3.3. Analiza TLC ekstraktów

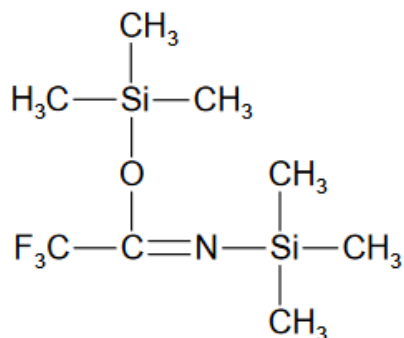
Jako wzorzec należy zastosować chloroformowy roztwór skopolaminy o stężeniu  $1000 \text{ mg l}^{-1}$ . Na linię startową (narysowaną delikatnie miękkim ołówkiem w odległości 1 cm od dolnego brzegu) płytki chromatograficznej (o wymiarach 4 x 6,5 cm), pokrytej żelem krzemionkowym, za pomocą kapilarek, nanieść punktowo roztwór wzorcowy oraz uzyskane ekstrakty. Jako fazę ruchomą wykorzystać mieszaninę chloroformu:metanolu:H<sub>2</sub>O:wody amoniakalnej (70:30:4:2, v/v/v/v). Komorę chromatograficzną napełnić niewielką ilością przygotowanej fazy ruchomej (3 ml), przykryć wieczkiem i pozostawić na ok 5 min w celu wysycenia parami rozpuszczalnika. Delikatnie za pomocą pęsety wstawić płytkę do komory chromatograficznej. Zamknąć komorę i rozwijać chromatogram do momentu, gdy czoło rozpuszczalnika znajdzie się w odległości 1 cm od górnego brzegu płytki. Następnie wyjąć i wysuszyć płytkę. Chromatogram (płytkę) po rozwinięciu spryskać obficie odczynnikiem Dragendorffa. Czynność powtórzyć dwukrotnie. Po spryskaniu, plamy alkaloidów barwią się na pomarańczowo. Wyznaczyć współczynniki opóźnienia  $R_f$ .



Rys. 3. Komora chromatograficzna z zanurzoną płytką i chromatogram TLC wzorca skopolaminy.

### 3.4. Derywatywacja

Uzyskane ekstrakty oraz wzorzec skopolaminy należy przeprowadzić w lotne, trimetylosililowe pochodne za pomocą mieszaniny sililującej BSTFA/TMCS (99:1) (**Rys. 4**).



**Rys.4.** Wzór strukturalny *N,O*-bis(trimetylosilylo)trifluoroacetamidu (BSTFA)

W tym celu po 500 µl każdego z ekstraktów oraz 50 µl roztworu wzorcowego skopolaminy (o stężeniu 1000 mg l) przenieść do oddzielnych, zakręczanych buteleczek i odparować w strumieniu azotu do sucha. Następnie dodać po 50 µl odczynnika sililującego i ogrzewać w temperaturze 80 °C przez 15 min (buteleczki przed umieszczeniem w bloczku grzejmym należy dodatkowo zabezpieczyć taśmą teflonową). Po ostudzeniu wykonać analizę GC w warunkach opisanych w rozdziale 3.5.

### 3.5. Wykrywanie skopolaminy przy użyciu techniki chromatografii gazowej (GC-FID)

Wykonać analizę chromatograficzną roztworu wzorcowego skopolaminy oraz ekstraktów zgodnie z poniższymi warunkami:

Chromatograf Shimadzu GC-2010 z detektorem FID

- Kolumna chromatograficzna RTX-5 30 m, 0,25 mm średnica wewnętrzna, 0,25 µm grubość fazy stacjonarnej,
- Program temperaturowy: 200 - 300 °C (5 min.), narost 8°C min<sup>-1</sup>,
- Temperatura dozownika: 300 °C,
- Temperatura detektora: 300 °C,
- Dzielnik przepływu: 1:20,
- Gaz nośny: argon, stały przepływ 1 ml min<sup>-1</sup>,
- Ciśnienie gazów: powietrze: 350 kPa, wodór: 35 kPa
- Czas analizy: 17,5 min



## Sprawozdanie:

- Przetawić w formie schematu blokowego procedurę wykrywania skopolaminy w napojach z uwzględnieniem warunków przeprowadzonych analiz.
- Dokonać identyfikacji skopolaminy w ekstraktach na podstawie współczynników opóźnienia oraz czasu retencji.

## Literatura

1. Arcella, D.; Altieri, A. Human Acute Exposure Assessment to Tropane Alkaloids. *EFSA J.* **2018**, *16*,
2. Adamse, P.; van Egmond, H.P.; Noordam, M.Y.; Mulder, P.P.J.; De Nijs, M. Tropane Alkaloids in Food: Poisoning Incidents. *Qual. Assur. Saf. Crop. Foods* **2014**, *6*, 15–24,
3. Robinson, D.W.; Brown, K.; McMenemy, M.; Dennany, L.; Baker, M.J.; Allan, P.; Cartwright, C.; Bernard, J.; Sturt, F.; Kotoula, E.; et al. Datura Quids at Pinwheel Cave, California, Provide Unambiguous Confirmation of the Ingestion of Hallucinogens at a Rock Art Site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2020**, *117*, 31026–31037,
4. Motyka, M.; Marcinkowski, J.T. Nowe Metody Odurzania Się. Cz. IX. Skopolamina – Nienowyy Lek Wkomponowyywany w Nowe Preparaty Stosowane w Celach Przestępczych: „oddech Diabła”. *Probl Hig Epidemiol* **2015**, *96*, 839–844.
5. Reichert, S.; Lin, C.; Ong, W.; Him, C.C.; Hameed, S. Million Dollar Ride: Crime Committed during Involuntary Scopopolamine Intoxication. *Can. Fam. Physician* **2017**, *63*, 369–370.
6. Lusthof, K.J.; Bosman, I.J.; Kubat, B.; Vincenten-van Maanen, M.J. Toxicological Results in a Fatal and Two Non-Fatal Cases of Scopopolamine-Facilitated Robberies. *Forensic Sci. Int.* **2017**, *274*, 79–82,
7. Gomila Muñiz, I.; Puiguriquer Ferrando, J.; Quesada Redondo, L. Drug Facilitated Crime Using Burundanga: First Analytical Confirmation in Spain. *Med. Clínica (English Ed.* **2016**, *147*, 421,
8. Kasprzykowska, R.; Kołodziejczyk, A.S. *Skrypt z Chemii Leków, Uniwersytet Gdański*; 2010; ISBN 978-83-7326-713-8.
9. Śramska, P.; Maciejka, A.; Topolewska, A.; Stepnowski, P.; Haliński, Ł.P. Isolation of Atropine and Scopopolamine from Plant Material Using Liquid-Liquid Extraction and EXTrelut® Columns. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2017**, *1043*, 202–208,

## Szkło i odczynniki

### Odczynniki:

- bezwodny siarczan magnezu
- bezwodny siarczan sodu
- chloroform (500 ml)
- metanol (100 ml)
- metanol do osuszania szkła
- 25% roztwór wody amoniakalnej (100 ml)
- roztwór herbaty (100 ml)
- coca cola (500 ml)
- tonik (500 ml)

### Zastosowanie reakcji chemicznych oraz technik chromatograficznych do wykrywania skopolaminy w napojach

- odczynnik silylujący: 99% BSTFA + 1% TMCS
- odczynnik Dragendorffa
- wodny roztwór skopolaminy o stężeniu 1000 mg l<sup>-1</sup>
- chloroformowy roztwór skopolaminy o stężeniu 1000 mg l<sup>-1</sup>

#### **Szkło:**

- rozdzielacz poj. 100 ml – 4 szt
- statyw – 4 szt
- łapy – 4 szt
- bloczek grzejny
- kolby stożkowe z korkiem poj. 100 ml – 4 szt
- kolby sercowe z korkiem poj. 100 ml – 4 szt
- pipety Pasteura
- kapilarki
- cylinder miarowy poj. 50 ml – 4 szt
- cylinder miarowy poj. 25 ml – 4 szt
- cylinder miarowy V = 10 ml – 3 szt
- zlewka V = 100 ml – 3 szt
- reduktor do odparowywacza
- pipety Pasteura + smoczki
- bagietka szklana
- lejek średni – 4 szt. + pasujące sączki
- pipeta V = 5 ml (4 szt.)
- pipeta V = 1 ml (4 szt)
- pipeta V = 2 ml (2 szt)
- buteleczki poj. 2 ml – 20 szt
- buteleczki poj. 4 ml – 2 szt
- 2 komory chromatograficzne do TLC
- buteleczka do spryskiwania
- buteleczka zakręcana poj. 25 ml – 3 szt

#### **Pozostałe:**

- płytki do TLC *silica gel 60* firmy Merck
- papierki lakmusowe
- łyżka metalowa

Zastosowanie reakcji chemicznych oraz technik chromatograficznych do wykrywania skopolaminy w napojach

- ołówek
- linijka
- nożyczki
- pisak do szkła
- metalowa pęseta
- bibuła laboratoryjna ochronna
- podstawki pod kolby sercówki
- taśma teflonowa
- cenki
- zbiornik na zlewki
- pH-metr
- bloczek grzejny
- strzykawka do GC poj. 10  $\mu$ l – 1 szt
- strzykawka do GC poj. 100  $\mu$ l – 1 szt