



## Analiza kannabinoli i opiatów za pomocą TLC

JAN BŁĄDEK, PIOTR POLAK\*, EWA JARZYNA, IWONA JAKUBOWSKA

Wojskowa Akademia Techniczna, Wydział Nowych Technologii i Chemii, Instytut Chemii,  
00-908 Warszawa, ul. S. Kaliskiego 2

\*Laboratorium Kryminalistyczne Komendy Stołecznej Policji,  
00-150 Warszawa, ul. Nowolipie 2

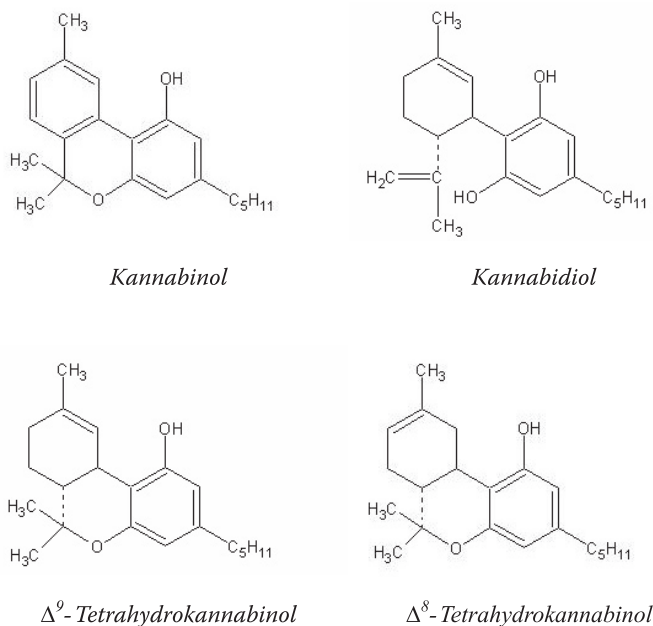
**Streszczenie.** Przedstawiono wyniki badań nad zastosowaniem instrumentalnej chromatografii cienkowarstwowej do analizy opiatów i kannabinoli. Sprecyzowano zasady rozdziału składników zawartych w ekstraktach konopi i preparatach opiatów oraz zasady identyfikacji i oznaczeń zawartych w nich substancji psychotropowych. Oszacowano oznaczalność graniczną i błędy metody. Zaproponowane rozwiązania analityczne zweryfikowano podczas analizy handlowych próbek opiatów oraz pomiarów poziomu  $\Delta^9$ -tetrahydrokannabinolu w suszu konopi.  
**Słowa kluczowe:** kannabinoile, opiaty, chromatografia cienkowarstwowa, skryning laboratoryjny  
**Symbole UKD:** 543.54

### 1. Wprowadzenie

Szeroko zakrojony program zwalczania toksykomanii stwarza potrzebę doskonalenia metod analizy ksenobiotyków, przy czym najwięcej uwagi poświęca się substancjom o właściwościach psychotropowych [1]. Prace badawcze poświęcone tej tematyce podzielić można na dwie grupy [2, 3]. Pierwsza z nich dotyczy próbek biologicznych; informacje o rodzaju i ilości narkotyku stanowią istotną pomoc w diagnostyce i badaniu zatruc ostrych, w toksykologii klinicznej i medycynie sądowej. Do grupy drugiej zalicza się prace poświęcone analizie identyfikacyjnej materiału podejrzanego o zawartość narkotyku. Przedmiotem badań są wówczas próbki ziela, płynów lub materiałów sypkich dostarczane zwykle przez organy prewencji. W tej grupie prac szczególne znaczenie mają analizy skryningowe, ze względu na potrzebę dostarczania niezawodnych informacji analitycznych w możliwie krótkim czasie.

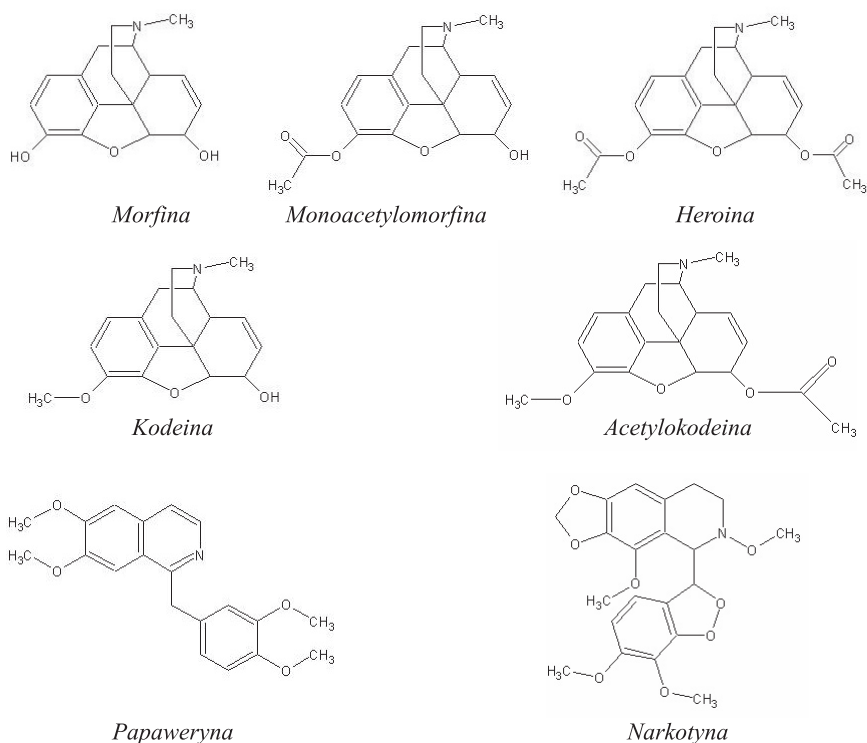
Wyniki doświadczeń prezentowane w niniejszym opracowaniu związane są bezpośrednio z drugą grupą ww. prac badawczych. Podjęto próbę zastosowania współczesnej, instrumentalnej chromatografii cienkowarstwowej (TLC) do analizy wybranych narkotyków (kannabinoli i opiatów).

Kannabinole stanowią grupę substancji psychotropowych występujących w żywicy konopi (*Cannabis ruderalis*, *Cannabis sativa* i *Cannabis indica*) [4], z których największe znaczenie mają  $\Delta^9$ -tetrahydrokannabinol, kannabinol, kannabidiol oraz  $\Delta^8$ -tetrahydrokannabinol (rys. 1). Zgodnie z ustawą o przeciwdziałaniu narkomanii [5], zawartość  $\Delta^9$ -tetrahydrokannabinolu w kwiatowych lub owocujących wierzchołkach konopi (z których nie usunięto żywicy) nie powinna przekraczać 0,2% (w przeliczeniu na suchą masę), zaś systematyczna kontrola upraw jest zadaniem laboratoriów kryminalistycznych.



Rys. 1. Podstawowe kannabinole występujące w konopiach

Nazwa „opiaty” pochodzi od opium, to znaczy soku mlecznego otrzymanego z niedojrzałych makówek maku lekarskiego (*Papaver somniferum* L.). Sok mleczny zawiera około 25 alkaloidów fenantrenowych i izochinolinowych (rys. 2), z których największe znaczenie mają morfina i kodeina (oraz ich pochodne acetylowe), papaweryna i narkotyna. W nielegalnym handlu i dystrybucji narkotyków substancje te występują zwykle w postaci proszków (*Brown sugar*) lub płynów (*kompot*) otrzymywanych ze słomy makowej.



Rys. 2. Podstawowe alkaloidy maku lekarskiego

## 2. Część doświadczalna

Do badań wytypowano kannabinol (CBN), kannabidiol (CBD),  $\Delta^8$ -tetrahydrokannabinol ( $\Delta^8$ -THC) i  $\Delta^9$ -tetrahydrokannabinol ( $\Delta^9$ -THC) z grupy kannabinoli oraz morfinę (Mor), 6-monoacetylmorfinę (AcMor), heroinę (Ac<sub>2</sub>Mor), kodeinę (Cod), acetylkodeinę (AcCod), papawerynę (Pap) i narkotynę (Nar) z grupy opiatów. Składniki mieszaniny opiatów rozdzielano w obecności kofeiny (Kof), ponieważ substancja ta dodawana jest zwykle do handlowych preparatów *Brown sugar*. Doświadczenia wykonywano z roztworami wzorców, poszukując układów chromatograficznych (umożliwiających rozdział składników poszczególnych grup narkotyków), metod wizualizacji oraz relacji ilościowych (zależności powierzchni piku densytometrycznego od masy analitu w paśmie chromatograficznym).

### 2.1. Aparatura i materiały

Aplikator Linomat IV (Camag); pionowa komora chromatograficzna (Camag); densytometr CS-9000 (Shimadzu); płytki chromatograficzne pokryte że-

lem krzemionkowym 60 F<sub>254</sub> lub żelem krzemionkowym z chemicznie związaną grupą oktadecylową (Merck), odczynniki do wizualizacji chromatogramów (Fast Blue B salt, odczynnik jodoplatynowy, sól Würstera) i rozpuszczalniki organiczne (J. T. Backer i Merck), standardy analitów (Merck), próbki konopi i handlowych preparatów opiatów (Laboratorium Kryminalistyczne Komendy Stołecznej Policji).

## 2.2. Dobór układu chromatograficznego i metod wizualizacji

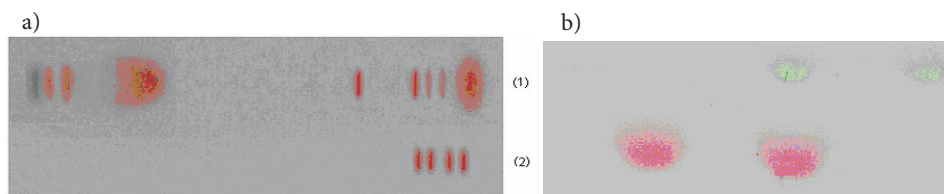
Poszukując najkorzystniejszych warunków rozdziału analitów, sporządzono metanolowe roztwory wzorców o stężeniu 10 µg/ml. Roztwory te i ich mieszaniny nanoszono techniką napyłania na linie startowe płytek chromatograficznych (objętość dozowania — 10 µl, szerokość pasma — 4 mm), a następnie rozwijano chromatogramy w pionowych komorach wstępujących.

Wstępne prace doświadczalne wykonywano zgodnie z metodyką zaproponowaną w instrukcji obsługi zestawu TOXI-LABT™, rozpowszechnionego w wielu laboratoriach medycznych i kryminalistycznych [6]. Niestety, nie uzyskano pozytywnych rezultatów. Okazało się, że układ chromatograficzny zaproponowany do analizy kannabinoli nie pozwala rozdzielić  $\Delta^8$ -THC i  $\Delta^9$ -THC (znajomość poziomu tych składników w konopiach umożliwia poprawną ocenę zarówno zieleń świeżego, jak i magazynowego przez kilka lat). Niekorzystne rezultaty uzyskano też w doświadczeniach z opiatami. Zaproponowana faza ruchoma nie dzieli morfiny i monoacetylmorfiny oraz kodeiny i monoacetylokodeiny, a odczynnik jodoplatynowy (podstawowy odczynnik stosowany współcześnie do wizualizacji opiatów) nie rozróżnia ww. związków [7]. Dążąc do wyeliminowania tych niedociągnięć, dalsze prace badawcze wykonywano przy użyciu nowych układów chromatograficznych (z wykorzystaniem normalnych i odwróconych układów faz), rozwijając chromatogramy na drodze 5-9 cm techniką elucji izokratycznej. Poprawność rozdziału oceniano poprzez obserwację gaszenia fluorescencji lub po wywołaniu reakcji barwnych. Zwilżenie chromatogramu 1% metanolem roztworem soli Fast Blue B umożliwia wizualizację wszystkich kannabinoli w postaci malinowo-czerwonych pasm chromatograficznych (rys. 3a).

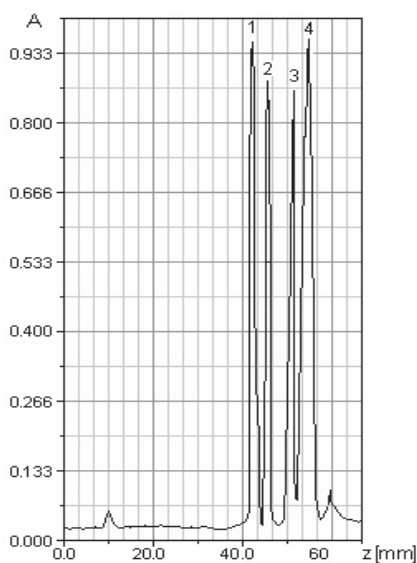
Korzystną wizualizację opiatów uzyskano przy użyciu metanolowego, nasyconego roztworu soli Würstera. Reakcję wykonywano następująco: płytki chromatograficzne nasycono parami bromu, a po usunięciu jego nadmiaru w strumieniu powietrza zwilżano je odczynnikami wizualizującymi i naświetlano promieniowaniem UV o długości fali równej 254 nm. Niemal wszystkie opiaty (z wyjątkiem papaweryny) uwidaczniają się wówczas w postaci czerwonych lub niebieskozielonych pasm, przy czym barwy morfiny i kodeiny oraz ich acetylowych pochodnych różnią się, umożliwiając identyfikację tych związków (rys. 3b).

Poprawny rozdział kannabinoli (rys. 4) uzyskano podczas izokratycznej elucji jednokrokowej w normalnym układzie faz. Warunki rozdziału były następujące: faza stacjonarna — wysokosprawny żel krzemionkowy (Merck,

nr katalogowy 1.05548), faza ruchoma — dwuskładnikowa mieszanina heksanu i eteru diizopropylowego (6:1; v/v), zasięg elucji — 60 mm.

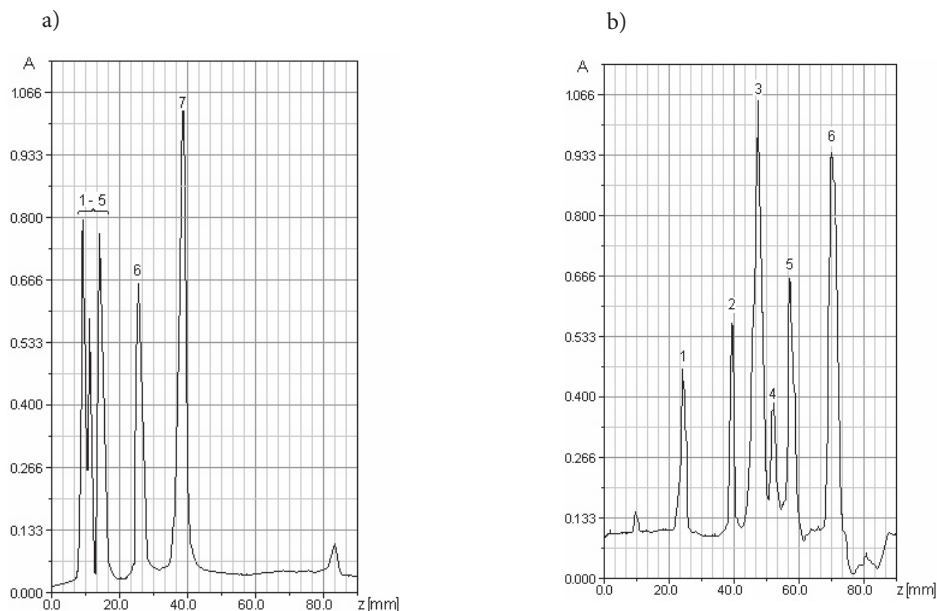


Rys. 3. Wizualizacja chromatogramów: a) chromatogram ekstraktu konopi (1) na tle wzorców (2); b) pasmo morfiny (malinowe) i jej pochodnej monoacetylowej (pasmo niebieskozielone)



Rys. 4. Rozdział kannabinoli (densytogram wzorców). Oznaczenia pików: 1 — CBN, 2 —  $\Delta^9$ -THC, 3 —  $\Delta^8$ -THC, 4 — CBD. A — absorbancja VIS ( $\lambda = 490$  nm) w jednostkach względnym densytometru; z — zasięg pasma chromatograficznego

Opiaty rozdzielono również w normalnym układzie faz, ale dopiero podczas elucji dwukrokowej (zasięg każdego kroku 80 mm). Skład fazy ruchomej był następujący: krok I — trójskładnikowa mieszanina chlorku metylenu, metanolu i eteru diizopropylowego (4:0,2:1; v/v), krok II — dwuskładnikowa mieszanina chlorku metylenu i metanolu (4:1; v/v). Pierwszy krok (rys. 5a) umożliwia wydzielenie i oznaczenie papaweryny (a po wizualizacji również narkotyny); w kroku drugim papaweryna wędruje wraz z czołem fazy ruchomej, zaś pozostałe składniki (nierozdzielone w kroku I) tworzą oddzielne, łatwe do oznaczeń pasma chromatograficzne (rys. 5b).



Rys. 5. Densytogramy wzorców opiatów: a) po I kroku, pomiar absorpcji UV ( $\lambda = 225$  nm); b) po II kroku, pomiar absorpcji VIS ( $\lambda = 550$  nm). Oznaczenia pików: 1 — Mor, 2 — Cod, 3 — AcMor, 4 — AcCod, 5 — Ac<sub>2</sub>Mor, 6 — Nar, 7 — Pap. A — absorbanca w jednostkach względnych densytometru; z — zasięg pasma chromatograficznego

### 2.3. Wydobywanie analitów z matrycy

Analizy ilościowe poprzedzono densytometrycznymi pomiarami widm absorpcji UV lub VIS poszczególnych analitów lub produktów ich reakcji z odczynnikami wizualizującymi. Pomiary wykonywano bezpośrednio na adsorbencie, otrzymując informacje o długości fali  $\lambda_{\max}$ , przy której absorpcja danego analitu osiąga wartość maksymalną.

W celu wyznaczenia relacji ilościowych na linii startowej płytek chromatograficznych nanoszono od 2 do 150  $\mu$ l roztworów wzorców. Chromatogramy rozwijano i wizualizowano zgodnie z opisaną wyżej procedurą, a następnie przenoszono je do densytometru (Shimadzu, CS 9000) i skanowano techniką *zig-zag*. W przypadku kannabinoli pomiary absorpcji VIS wykonywano przy długości fali  $\lambda_{\max} = 490$  nm (jest to długość fali, przy której absorpcja VIS barwnego kompleksu każdego kannabinolu z odczynnikami wizualizującymi osiąga wartość maksymalną). W przypadku opiatów chromatogramy skanowano dwukrotnie: po I kroku (pomiar absorpcji UV;  $\lambda = 225$  nm; czynność ta umożliwia oznaczenia papaweryny) oraz po II kroku i wywołaniu reakcji barwnej (pomiar absorpcji VIS;  $\lambda = 550$  nm (oznaczenia pozostałych opiatów)). Wyniki pomiarów zestawiono w tabelach 1 i 2.

TABELA 1

## Parametry analiz ilościowych

Analit	Równanie krzywej wzorcowej $A = f(c)^*$	Współczynnik korelacji	Oznaczalność graniczna [ng]	Maksymalny zakres liniowości [ $\mu\text{g}$ ]
CBN	$A = 257,75 \cdot c - 14194$	0,9781	100	9,5
CBD	$A = 229,46 \cdot c + 9852$	0,9839	80	9,0
$\Delta^9$ -THC	$A = 151,08 \cdot c - 4845$	0,9851	70	6,6
$\Delta^8$ -THC	$A = 181,02 \cdot c - 2853$	0,9933	50	5,0

TABELA 2

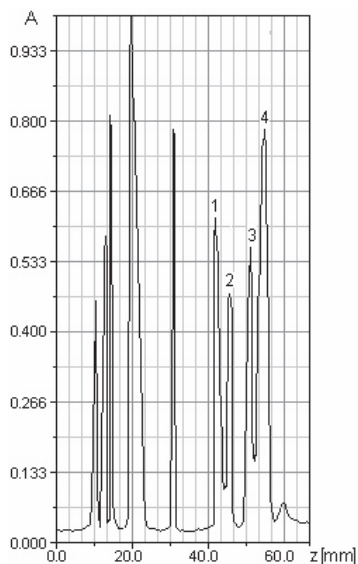
Analit	Równanie krzywej wzorcowej $A = f(c)^*$	Współczynnik korelacji	Oznaczalność graniczna [ng]	Maksymalny zakres liniowości [ $\mu\text{g}$ ]
Ac <sub>2</sub> Mor	$A = 8,68 \cdot c + 319$	0,9891	60	10,5
AcMor	$A = 7,91 \cdot c + 388$	0,9890	60	9,5
Cod	$A = 5,41 \cdot c + 213$	0,9922	100	12,5
Mor	$A = 3,73 \cdot c + 39$	0,9920	80	9,5
Pap	$A = 109,9 \cdot c - 2929$	0,9989	110	12,0

\*A — powierzchnia pików densytometrycznych, c — masa analitu w paśmie [ng]

## 2.4. Pomiary weryfikacyjne

Próbki konopi suszono w temperaturze 37°C do stałej masy. Porcje wysuszonego ziela o masie 10 mg ekstrahowano 2 ml metanolu (ekstrakcja cieczowa wspomagana wibracjami). Przesączony eluat nanoszono (2-30  $\mu\text{l}$ ) na linie startowe płytek chromatograficznych techniką napyłania. Analizy jakościowe wykonywano identycznie jak podczas wyznaczania parametrów analitycznych. Przykłady otrzymywanych rozdziałów pokazane są na rysunku 6.

W tabeli 3 zestawiono wyniki badań porównawczych piętnastu próbek suszu konopi. Oznaczenia techniką TLC wykonywano zgodnie z opisaną procedurą. Oznaczenia techniką GC wykonywano zgodnie z metodyką obowiązującą w Laboratorium Kryminalistycznym Komendy Stołecznej Policji. Polega ona na ekstrakcji próbki suszu o masie około 100 mg, zatężeniu ekstraktu, derywatyzacji analitu przy użyciu TMSA i chromatograficznych oznaczeniach  $\Delta^9$ -tetrahydrokannabinolu techniką GC/FID.



Rys. 6. Rozdział kannabinoli w próbce konopi. Symbole i oznaczenia jak na rysunku 4

TABELA 3

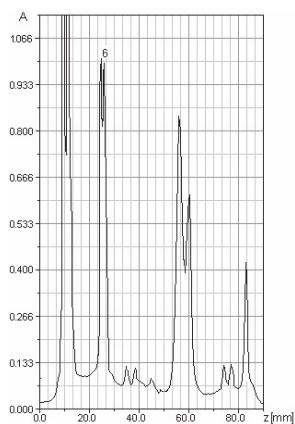
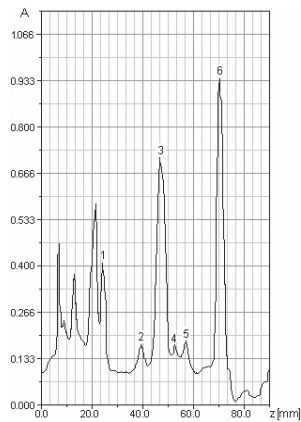
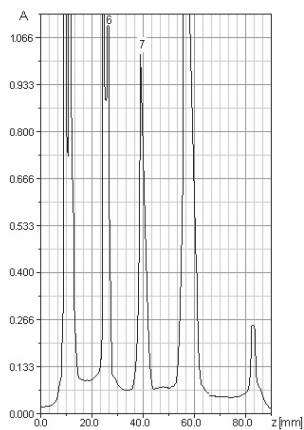
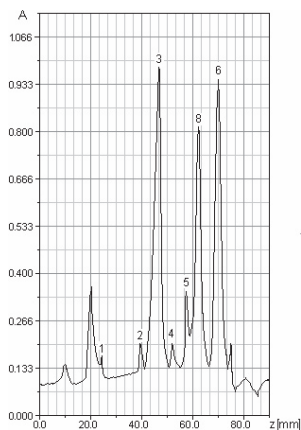
## Wyniki analiz porównawczych

Nr próbki	Zawartość $\Delta^9$ -THC [% mas.]	
	Analiza techniką TLC	Analiza techniką GC/FID
1	0,44	0,47
2	1,00	0,96
3	0,92	0,90
4	0,49	0,51
5	0,74	0,75
6	0,33	0,25
7	0,28	0,25
8	1,62	1,70
9	1,71	1,72
10	1,77	1,75
11	1,84	1,82
12	1,17	1,09
13	1,14	1,09
14	0,53	0,50
15	0,57	0,50

Pomiary weryfikacyjne próbek na zawartość opiatów miały charakter identyfikacyjny (analizy jakościowe) i polegały na badaniu obecności opiatów w materiałach zidentyfikowanych wcześniej jako *Brown sugar* i *kompot* oraz ocenie stopnia zacytowania morfiny i kodeiny. Próbki *kompotu* nanoszono bezpośrednio na płytki



chromatograficzne, natomiast z próbek *Brown sugar* sporządzono metanolewe roztwory o stężeniu 0,1%, które poddawano analizie, nanosząc na linie startowe płytek chromatograficznych od 2-30  $\mu$ l roztworów. W każdej próbce potwierdzono obecność opiatów, otrzymując wyniki zbliżone do tych, jakie pokazano na rysunkach 7 i 8.

I krok: pomiar absorpcji UV ( $\lambda = 225$  nm)II krok: pomiar absorpcji VIS ( $\lambda = 550$  nm)Rys. 7. Rozdział opiatów w próbce *kompotu*. Symbole i oznaczenia jak na rysunku 5I krok: pomiar absorpcji UV ( $\lambda = 225$  nm)II krok: pomiar absorpcji VIS ( $\lambda = 550$  nm)Rys. 8. Rozdział opiatów w próbce *Brown sugar*. Pik nr 8 pochodzi od kofeiny; pozostałe oznaczenia jak na rysunku 5

### 3. Wnioski

Wyniki badań wskazują na możliwość zastosowania instrumentalnej TLC do analizy opiatów i kannabinoli.

Układ chromatograficzny zaproponowany do rozdzielania kannabinoli umożliwia analizę czterech najważniejszych składników konopi, których oznaczenia stanowią podstawę kwalifikacji upraw. Szczególnie korzystnym efektem doświadczeń jest rozdział  $\Delta^9$ -tetrahydrokannabinolu i  $\Delta^8$ -tetrahydrokannabinolu, a także znaczne skrócenie czasu i kosztów analizy. Do oznaczeń techniką TLC wystarczy próbka ziela o masie dziesięciokrotnie mniejszej w porównaniu z tą, jaka wymagana jest w przypadku analiz techniką GC/FID. Istotną zaletą zaproponowanego rozwiązania analitycznego jest również pominięcie etapu derywatywacji, znaczne skrócenie czasu oznaczeń, a także możliwość równoległej analizy kilkunastu próbek.

Zaproponowana metoda wizualizacji opiatów umożliwia rozróżnienie morfiny i 6-monoacetylmorfiny oraz kodeiny i acetylokodeiny. Jest to więc metoda przewyższająca pod względem specyficzności stosowaną dotychczas powszechnie wizualizację przy użyciu odczynnika jodopłatynowego; czułość obu tych metod jest porównywalna.

Dwukrokowa elucja próbek *kompotu* i *Brown sugar* umożliwia pełną identyfikację podstawowych składników opium i wyciągów ze słomy makowej. Zaletą zaproponowanej metody analiz jest również możliwość oceny stopnia zacetylowania morfiny i kodeiny, co stanowić może dodatkową informację o źródle i metodzie otrzymania kompotu.

Pomiary weryfikacyjne w pełni potwierdziły poprawność zaproponowanych rozwiązań analitycznych. Szczególną uwagę zwraca zgodność wyników analiz ilościowych podczas oznaczeń  $\Delta^9$ -tetrahydrokannabinolu techniką TLC i GC/FID. Fakt ten wskazuje na możliwość wykonywania (przy użyciu TLC) skринingowych analiz konopi bezpośrednio w miejscu upraw, co może znacznie ułatwić pracę organów prewencji.

Artykuł wpłynął do redakcji 6.08.2007 r. Zweryfikowaną wersję po recenzji otrzymano w październiku 2007 r.

#### LITERATURA

- [1] Comité OMS d'Experts de la Pharmacodépendance, *Vingtième Rapport*, Serie de rapports techniques 551, Geneve, 1974.
- [2] J. BŁĄDEK, S. NEFFE, *Application of Thin Layer Chromatography in Clinical Chemistry*, Sep. Purif. Rev., 23, 2003, 63.
- [3] J. BŁĄDEK, A. SZYMAŃCZYK, *Medical application of PLC. Section II; Chapter 9*, in: *Preparative Layer Chromatography*, T. Kowalska, J. Sherma (eds). CRC Press, Taylor & Francis Group. Boca Raton (USA), 2006.

- 
- [4] F. GROTENHERMEN, *Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cannabinoids*, Clin Pharmacokinet., 42, 4, 2003, 327-60.
- [5] Ustawa z dnia 29 lipca 2005 r. o przeciwdziałaniu narkomanii (Dz. U. z 2005 r., Nr 179, poz. 1485).
- [6] TOXI-LAB screening and confirmation of drug abuse. Analytical System Division of Marion Laboratories, Irvine, CA, 1987.
- [7] H. JORK, W. FUNK, W. FISCHER, H. WIMMER, Thin-Layer Chromatography, vol. 1a, b, VCH, Weinheim, 1994.

J. BŁĄDEK, P. POLAK, E. JARZYNA, I. JAKUBOWSKA

#### Determination of opiates and cannabinoids by TLC

**Abstract.** The paper contains the results of investigation on application of thin layer chromatography (TLC) for determination of opiates and cannabinoids. The rules of separation of components contained in extracts of Cannabis and the preparations of opiates were specified. The rules of identification and marks of contains in them psychotropic substances were also specified. Detection limit and errors of the method were estimated. Proposed analytical solutions were verified during an analysis of commercial samples of opiates and measurements of contents  $\Delta^9$ -THC in Cannabis.

**Keywords:** cannabinoids, opiates, thin layer chromatography, laboratory screening

**Universal Decimal Classification:** 543.54