

Dr. Gyarmati László gyógyszerész alezredes,

Dr. Laczik János orvos-őrnagy

Dr. Dávid Gábor orvos-alezredes, az orvostudományok kandidátusa

## Élénkítő hatású (doping) szerek gyors kimutatása vizeletben I.\*

A gyógyszerek egy jelentős része — túl az toxikológiai problémákon — bizonyos körülmények között a szervezetre nem kívánatos hatást fejthet ki és ezért jelenlétük kizárása, avagy éppen bizonyítása szükséges lehet. Ilyen vizsgálatok jelentősége kézenfekvő sport-, igazságügyi-orvosi gyakorlatban — esetleg diagnosztikában pl. akkor, amikor ismeretlen eredetű „indokolatlannak látszó” időszakos hypertonia, palpitatio, pszichés. vagy visceralis hypermotilitas észlelésekor felmerül a stimuláló szerek szédesének a gyanúja.

Jelen dolgozatunkban az *Aktedron* (Amphetamin), *Centedrin* (Ritalin) és a *Gracidin* (Phenmetrazin) kimutatásának lehetőségét ismertetjük vizeletben és nyálban peroralis terápiás adagok után.

A probléma megközelítésére a vékonyrétegekromatográfia látszott a legcélszerűbbnek — közismert előnyei miatt, mint az egyszerűség, gyorsaság, továbbá az a körülmény, hogy nem igényel különösebb felszerelést és bármely laboratóriumban kivitelezhető (1., 2.). Osztályunkon már évek óta jó tapasztalatokat szereztünk e módszer alkalmazásával a toxikológiai analízis legkülönbözőbb problémáinak a megoldásában (3., 4.).

Megvizsgáltuk az említett gyógyszerek elválasztásának és azonosításának lehetőségét több kifejlesztő oldószerben és több előhívó reagenssel.

*Módszer:*

*Vegyszerek:*

Silicagel G. Merck),

0,1 N nátronlug,

Dietiléter (peroxid mentes, vas/II) szulfátról frissen desztillálva!)

*Kifejlesztő oldószer:* lásd a 2. számú táblázatban.

*Előhívó reagensek és készítésük:*

a) *Dragendorff-reagens* (5):

I. oldat: 17,0 g bázisos bizmutnitrátot és 200,0 g borkósavat 800,0 ml desztillált vízben feloldunk.

II. oldat: 160,0 g káliumjodidot oldunk 400,0 ml desztillált vízben.

Törzsdolat: a fenti két oldatot összeöntjük.

Permetező reagens: 50,0 ml törzsdathoz 100,0 g borkósavat adunk és desztillált vízzel 500,0 ml-re egészítjük ki. (A törzsdolat hónapokig, a permetező reagens pedig néhány hétig tartható el.)

b) *Dinitrofluorbenzol* (6):

0,1<sup>0</sup>/<sub>0</sub>-os oldat 96<sup>0</sup>/<sub>0</sub>-os alkoholban.

\* Az Igazságügyi Orvosok Kongresszusán (1968) elhangzott előadás alapján.

(Permetzés után a keletkezett színt vagy színeket megfigyeljük, majd száradás után 2 N sósavval ismét permetezzünk és a változást feljegyezzük.)

c) *Diazotált p-nitranilin (1)*:

I. oldat: 0,7 g p-nitranilint 9,0 ml. cc sósavban feloldunk és desztillált vízzel 100,0 ml-re kiegészítjük.

II. oldat: 1<sup>0</sup>/<sub>0</sub>-os vizes nátriumnitrit oldat (frissen készítendő!).

Permetező reagens: 4,0 ml I. oldathoz jég-hűtés mellett 5,0 ml II. oldatot csepegtetünk keverés közben, majd jeges desztillált vízzel 100,0 ml-re egészítjük ki. (Egy-két napig jégen eltartható.)

(A lemez bepermetezése után a keletkezett színeket megfigyeljük és száradás után 2 N nátronlúggal ismét permetezzük, majd az így keletkezett színeket is megfigyeljük.)

d) *Ninhidrin: (1) (Módosított!)*

0,3 g ninhidrint 100,0 ml acetonban oldunk és hozzáadunk 3 ml jég-ecetet. (2—3 napig használható!) Befűvés után a lemezeket 10—20 percig 110 C°-on hevítjük.

1. sz. táblázat

Név Reag	Aktedron μg	Centedrin μg	Gracidin μg	Megjegyzés
Dragendorff reagens	25 (barna)	2 (barna)	2 (barnáspiros)	
Dinitrofluorbenzol később o, 1 n HCl	0,5 (sárga) 0,2 (sárga)	—	—	
Diaz. paranitranilin — később o, 1 n NaOH	0,5 (sárga) 0,1 (lilásrózsa)	— 2,0 (fehér)	10 (halv. sárga) 10 (fehér)	
Ninhidrin	2,0 (kékes-lila)	—	—	

## Eljárás

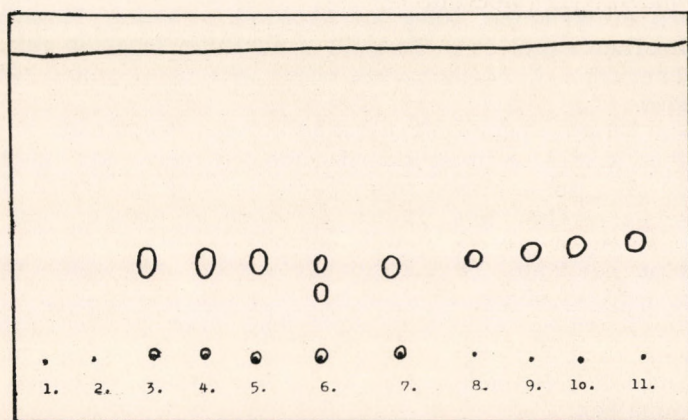
### 1. Kivonás:

#### a) Vizelet:

25—50 ml vizeletet cc. ammóniával meglúgosítjuk úgy, hogy a pH 10—11 legyen, majd azonos mennyiségű éterrel kétszer kirázzuk. Az egyesített éteres kivonatokat vízmentes nátriumszulfáttal megszáritjuk és 30 35 C°-on szárazra pároljuk. A szárazmaradékot 0,05—0,1 ml alkoholban feloldjuk és ebből az alkoholos oldatból cseppentünk fel alkalmas mennyiséget mikropipettával a szilikagel-lemezre, majd kromatografáljuk az ismert módon. A felcseppentendő mennyiségre irányadó, hogy egy-egy folt kb. 10—20 ml vizeletnek feleljen meg.

#### b) Nyál:

Az egyszeri szájöblítéssel (deszt. víz!) nyert aktuális nyálmennyiséget használjuk fel a vizsgálatra és vizeletnél leírtak szerint járunk el.



1. ábra

## AKTEDRON

Dosis: 10 mg per os

- 1.: Kontroll vizelet (25 ml) kivonata.
- 2.: Kontroll nyál kivonata.
- 3.: Kontroll vizelet (25 ml) + 40  $\mu$ g Aktedron.
- 4.: Kontroll vizelet (25 ml) + 80  $\mu$ g Aktedron.
- 5.: 4 órás vizelet (25 ml) kivonata.
- 6.: 30 perces nyál kivonata.
- 7.: 60 perces nyál kivonata.
- 8.: 60 perces nyál kivonata.
- 9.: 24 órás vizelet (25 ml) kivonata.
- 10—11.: 6 órás vizelet (25 ml) kivonata.

Kivonás: ammóniás közegből éterrel.

Kromatográfia: Silicagel G (0,1 n NaOH), metanolban

Előhívás: Dinitrofluorbenzol.

## 2. A vékonyréteg készítése:

20x12 cm-es vagy 6x12 cm-es sík üvegből vágott lemezeket használunk. A Silicagel G.-ből 7,0 g-t 25 ml 0,1 N nátronlúgban szuszpendálunk és a homogén szuszpenzióból 3—4 ml-t (porkanálnyi) öntünk a 6x12 cm-es üveglapra. Az üveglap vízszintes síkban való mozgatásával szétterítjük, és a kanál hátlapjával egyenletesen elkenjük. A lemezeket pormentes helyen vízszintes asztallapra helyezve szobahőmérsékleten legalább 16 órán át szárítjuk. A lemezek így használatra készek.

## EREDMÉNYEK, MEGBESZÉLÉS:

Az 1., 2. és 3. számú ábra mutatja, hogy a felsorolt farmakonok a leírt eljárással biztonságosan kimutathatók a szer bevétele után 2—3 óra múlva nyert vizeletmintában, valamint a 10—30 perc múlva vett nyál-mintában.

Az irodalomban ajánlott Dragendorff-reagens és ninhidrin nem mutatkozott elég érzékenynek, főleg az Aktedron esetében. Megállapítottuk, hogy a dinitrofluórbenzol és a diazotált p-nitranilin legalább egy nagyságrenddel érzékenyebb. A érzékenységi viszonyokat a 1. számú táblázatban foglaltuk össze.

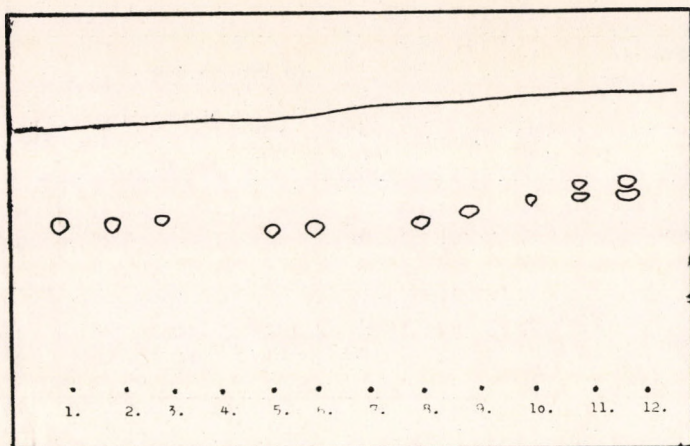
A szóban forgó gyógyszerek alkaloid jellegű vegyületek és kromatográfiás elválasztásukra az irodalomban oldószerveverékeket ajánlanak (1., 2., 7., 8., 9.). Mi ezzel szemben megvizsgáltuk, hogy az egyedi oldószerek alkalmasak-e az elválasztásra. Ennek az lenne az előnye, hogy a kifejlesztőszér, valamint a gőztere mindig állandó és felöntéssel bármikor reprodukálhatóan pótolható. Ez a körülmény széria vizsgálatok során lényegesen egyszerűsíti az eljárást.

Az adszorbensréteg nátronlúggal történő impregnálása biztosítja — egyéb előnyeik kívül —, hogy mind a kivonással nyert termék, mind pedig az együtt futtatott referencia anyag bázis formájában vesz részt az elválasztási folyamatban.

Az elválasztási lehetőségeket, illetőleg az ismertetett rendszerekben nyert Rf értékeket a 2. számú táblázat mutatja. A táblázatban feltüntetett Rf értékek legalább 10 különböző időpontban készült lemezeken nyert adatok számtani középértékei. Az egyes vizsgálatok során kapott Rf értékek ettől az átlagtól max. 0,05 egységgel tértek el. A táblázatban szereplő oldószerekben 10 cm-es futtatás esetén jó elválasztási effektus érhető el, a foltok körülhatároltak és így jól értékelhetők.

Kromatografálásra a gyártó cégek által rendelkezésünkre bocsátott szubsztanciákat, továbbá a gyógyszerári forgalomban levő készítményeket használtuk fel; tablettákból alkoholos kivonatokat készítettünk és ezt a kivonatot, valamint az injekciós készítményeket alkalmaztuk megfelelő hígításban.

A 2. számú táblázatban látható, hogy egyes oldószerekben egy-egy anyag több foltot ad. Ezeket a mellék-foltokat részben az illető gyógyszer bomlástermékének, másrészt — a kromatográfiában jól ismert — mellék-foltok jelenségének tetteztük fel. A táblázatban aláhúzott Rf. értékkel jellemzett foltot tekintettük fő foltnak nagysága, körülhatároltsága és az ismétlések során következetes megjelenése alapján. Több esetben a bioló-



2. ábra

### C E N T E D R I N

Dosis: 10 mg per os

- 1.: 4 órás vizelet (12,5 ml) kivonata.
- 2.: 6 órás vizelet (12,5 ml) kivonata.
- 3.: 24 órás vizelet (12,5 ml) kivonata
- 4.: Kontroll vizelet (12,5 ml) kivonata.
- 5.: Kontroll vizelet + 40  $\mu\text{g}$  Centedrin.
- 6.: Kontroll vizelet + 80  $\mu\text{g}$  Centedrin.
- 7.: Kontroll nyál kivonata.
- 8.: 30 perces nyál kivonata.
- 9.: 60 perces nyál kivonata.
- 10.: 5  $\mu\text{g}$  Centedrin.
- 11.: 10  $\mu\text{g}$  Centedrin.
- 12.: 20  $\mu\text{g}$  Centedrin.

*Kivonás:* ammoniás közegből éterrel.

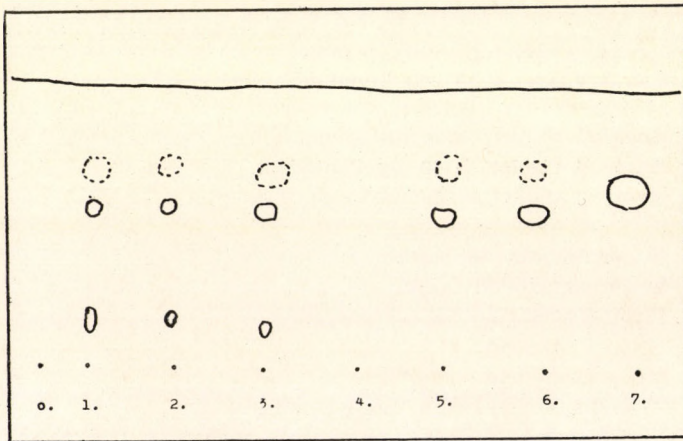
*Kromatográfia:* Silicagel G (0,1 n NaOH), metanolban

*Előhívás:* Dragendorff reagens.

giai kivonatban is megtaláltuk ezeket a mellék-foltokat, illetve egy részüket.

Az izolálás során nyert kivonat aliquot része alkalmas akár egyidejűleg, vagy a kromatografálást követően kvantitatív meghatározásra is. Erre a célra az ún. indikátor-festékmódszert (6., 10.) alkalmaztuk, amiről a későbbiekben kívánunk beszámolni. A kromatográfiai eljárás egyébként alkalmas félkvantitatív becslésre is. Ugyanis, ha a vizsgálandó anyaggal együtt ismert mennyiségű referencia anyagot is futtatunk a kifejlesztett és előhívott foltok nagysága és színintenzitása alapján mennyiségi viszonyokra is következtethetünk.

Futtató- szer  Vizsg. anyag neve	Rf. érték x 100							
	Meta- nol	Etanol	i.-Pro- panol	Ace- ton	Metil- etil- keton	Éter	Dioxán	Etil- acetát
Aktedron	$\frac{28}{38}$ $\frac{75}{75}$	$\frac{12}{24}$ $\frac{60}{60}$	10	32	27	0	$\frac{53}{56}$	$\frac{37}{23}$
Centedrin	$\frac{64}{54}$ $\frac{76}{76}$	$\frac{44}{54}$	$\frac{24}{27}$	$\frac{47}{61}$	$\frac{28}{45}$	$\frac{16}{30}$	46 57	$\frac{12}{24}$ $\frac{36}{48}$
Gracidin	49	30	15	18	15	4	23	13



3. ábra

**GRACIDIN**

Dosis: 25 mg per os

- 0.: Kontroll vizelet (25 ml) kivonata.
- 1.: 3 órás vizelet (25 ml) kivonata.
- 2.: 6 órás vizelet (25 ml) kivonata.
- 3.: 24 órás vizelet (25 ml) kivonata).
- 4.: Kontroll nyál kivonata.
- 5.: 1 órás nyál kivonata.
- 6.: 3 órás nyál kivonata.
- 7.: 20 µg Gracidin.

Kivonás: ammoniás közegből éterrel.

Kromatográfia: Silicagel G (0,1 n NaOH), metanolban

Előhívás: Dragendorff reagens.

## ÖSSZEFOGLALÁS

Szerzők egyszerű, gyors és érzékeny vékonyrétegekromatográfiás eljárást dolgoztak ki az Aktedron, Centedrin és Gracidin kimutatására. Az ajánlott eljárás alkalmas az említett farmakonok kis mennyiségeinek az azonosítására vizeletben és nyálban.

## IRODALOM

1. *Stahl, E.*: Dünnschicht-Chromatografie Berlin, 1962. és New York 1967. —
2. *Szász, Gy.*: Papírkromatográfia és vékonyrétegekromatográfia. Budapest, 1964. Medicina. —
3. *Gyarmati, L., Dávid, G.*: Acta. Pharm. Hung. 1964. 19. 273. —
4. *Gyarmati, L. és mtsai*: Hazai psychopharmakonok rétegekromatográfiás elválasztása és azonosítása. Előadás: Magy. Gyógy. Társ. Anal. konferenciáján. 1965. Szeged. —
5. *Macek, K.*: A papírkromatográfia kézikönyve. Budapest, 1961. Akadémiai Kiadó. —
6. *Stewart, C. P., Stolman, A.*: Toxicology I—II. New York, 1960—61. —
7. *Comer, I. P., Comer, I.*: J. Pharm. Sci. 1967. 56. 413. —
8. *Waldi, D.*: Dünnschichtchromatografie. in Gadamer-Graf Preuss: Lehrbuch der chemischen Toxikologie. 2. Vol. Göttingen, 1966. —
9. *Beckett, H. A., Triggs, E. J.*: J. of Pharm. and Pharm. 1967. 19. 273. —
10. *Gyarmati, L., Tóth, L.*: Kísérletes Orvostudomány. 1961. 13. 352.

*Дьярмати Л.*, подполковник м/сл, *Лацик Я.*, майор м/сл,  
*Давид Г.*, подполковник м/сл:

### БЫСТРОЕ ВЫЯВЛЕНИЕ СТИМУЛИРУЮЩИХ СРЕДСТВ В МОЧЕ

Авторы выработали простой быстрый и чувствительный метод хроматографии на тонком слое для выявления Актедрона, Центедрина и Грацидина. Предложенный метод пригоден для выявления даже незначительных количеств вышеупомянутых средств в моче и в слюне.

*Dr. L. Gyarmati*, Apoth.-Oberstltn., *Dr. J. Laczik*, Major d. Med. D., *Dr. G. Dávid*, Oberstltn. d. Med. D., Kandidat d. Med. Wissenschaften:

### SCHNELLVERFAHREN ZUM NACHWEIS IM URIN VON STOFFEN MIT EINER AUFMUNTERNDEN (DOPING-) WIRKUNG

#### I. Mitteilung

Verfasser haben ein einfaches, schnelles und empfindliches dünnschicht-chromatographisches Verfahren ausgearbeitet, das sich zum Nachweis vom Aktedron, Centedrin sowie Gracidin eignet. Diese empfohlene Methode ermöglicht auch die Identifizierung im Urin und Speichel bereits kleinster Mengen der erwähnten Pharmaka.