

Identificazione della 4-bromo-2,5-dimetossiamfetamina (DOB) in compresse clandestine sequestrate in Italia

Carmelo FURNARI, Valeria OTTAVIANO e Felice ROSATI

Cattedra di Medicina Legale, Università degli Studi "Tor Vergata", Roma

Riassunto. - Alcuni derivati di tipo amfetaminico, come la 4-bromo-2,5-dimetossi-amfetamina, (DOB) e di tipo fenetilamminico, come la 4-bromo-2,5-dimetossi-fenetilammina (2C-B o Nexus), presentano strette analogie di struttura che ne rendono difficile l'univoca identificazione, fondamentale soprattutto quando le analisi abbiano finalità forensi. Proponiamo, in questo lavoro, un approccio analitico per una corretta identificazione del principio attivo in compresse contenenti DOB, sequestrate nel mercato clandestino romano ed analizzate per conto dell'Autorità Giudiziaria. La procedura comprende l'estrazione del principio attivo dalle compresse mediante terbutilmetil etero in ambiente alcalino e successive analisi qualitative mediante gascromatografia con rivelatore di massa (GC-MS) ad impatto elettronico (EI) e ionizzazione chimica (CI). Lo studio della frammentazione del composto non derivatizzato e del suo pentafluoropropionil-derivato ha consentito di individuare la struttura della catena alchilica ed i sostituenti dell'anello aromatico. Questa procedura analitica consente di distinguere una struttura amfetaminica da una fenetilamminica impiegando una strumentazione comunemente presente nei laboratori di tossicologia forense e nei laboratori che sul territorio si occupano di accertamenti su sostanze in sequestro a scopo sanitario e giudiziario.

Parole chiave: DOB, amfetamine, ecstasy, GC-MS.

Summary (*Identification of the 4-bromo-2,5-dimethoxyamphetamine (DOB) encountered in illicit tablets seized in Italy*). - Some of the molecules belonging to the amphetamines group (4-bromo-2,5-dimethoxyamphetamine, DOB) or to the phenethylamines (4-bromo-2,5-dimethoxy-phenethylamine, 2C-B or Nexus) have closely related structures that make their identification quite difficult. The unambiguous identification is crucial in forensic responses. This paper describes the analytical approach used to achieve the identification of the main ingredient contained in tablets seized in the illicit market of Rome (Italy) and submitted to our laboratory by the Court of Law of Rome. The procedure entails the basic extraction of the main ingredient from the tablets with tert-butyl methyl ether followed by qualitative gas chromatographic mass-spectrometric (GC-MS) analysis using both electron impact detection (EI) and chemical ionization (CI). The examination of the mass spectra obtained from the native molecule and from its pentafluoropropionyl-derivative allows the structural identification of the side chain and the substitutions on the aromatic ring. This analytical approach can thus be useful to distinguish between amphetamine-like and phenethylamine-like compounds using instruments and techniques commonly available in the forensic toxicology laboratories.

Key words: DOB, amphetamines, ecstasy, GC-MS.

Introduzione

Nel mercato clandestino italiano delle sostanze stupefacenti, hanno una diffusione sempre maggiore compresse diverse, chiamate in modo generico "ecstasy".

Queste compresse si differenziano microscopicamente tra loro per i simboli impressi (logo), che sono assai numerosi e per lo più ripresi dal mondo dei fumetti, del commercio e dall'attualità. Stante la natura artigianale di queste preparazioni, non sempre a simboli uguali corrisponde il medesimo principio attivo, mentre spesso compresse con differenti simboli contengono la stessa sostanza.

Dalla struttura di base fenetilamminica si possono ottenere oltre 2000 derivati attraverso sostituzioni sull'anello aromatico, sulla catena alifatica oppure sul

gruppo amminico [1]. Il gran numero di composti e le piccole differenze strutturali tra alcuni di essi rendono talvolta difficile l'univoca identificazione, fondamentale per studi di farmacologia, tossicologia e, soprattutto, quando le analisi hanno finalità forensi.

Da alcuni anni il principio attivo prevalente nelle compresse circolanti nel mercato illecito è costituito dalle 3,4-metilenediossiamfetamine (MDA, MDMA, MDEA, MBDB).

In questo lavoro è riportata l'identificazione di un'ulteriore sostanza, la 4-bromo-2,5-dimetossiamfetamina (DOB), rinvenuta in alcune compresse recentemente analizzate nel nostro laboratorio per conto dell'Autorità Giudiziaria. Le compresse erano di colore bianco, di forma biconvessa, del diametro di 7 mm e 4 mm di spessore e del peso medio di 230 mg.

Presentavano, su entrambe le facce, un “logo” costituito da due lettere C concatenate tra loro, analogo a quello presente sulle compresse del *Captagon*, farmaco a base di fenetilina, non in vendita in Italia.

Oltre a quelle da noi analizzate, abbiamo notizie certe di sequestri di compresse analoghe in molte altre parti d'Italia.

Dal punto di vista analitico una delle difficoltà nell'identificazione di questa molecola è costituita dalla piccola quantità di principio attivo presente in queste compresse (1-3 mg dispersi in 230 mg totali) che può portare ad un esito analitico negativo.

Un'altra difficoltà è dovuta alla stretta analogia strutturale con altri isomeri posizionali e con la 2,5 dimetossifenetilamina (2C-B, Nexus) di cui peraltro, a tutt'oggi, non abbiamo notizie di sequestri in Italia.

La metodologia proposta consente, con la normale strumentazione dei laboratori di tossicologia forense, una corretta identificazione della sostanza.

Materiali e metodi

Tutti i solventi ed i reagenti utilizzati erano di grado analitico (BDH - UK). L'anidride pentafluoropropionica (PFPA) è stata ottenuta dalla Alltech Italia srl.

Gli spettri UV di soluzioni metanoliche di aliquote delle compresse sono stati effettuati utilizzando uno spettrofotometro Varian DMS 200 UV-Vis alle lunghezze d'onda comprese tra 210 e 360 nm.

Per le analisi GC-MS (EI) è stato utilizzato un gas cromatografo Hewlett Packard 5890 accoppiato con un rivelatore di massa Hewlett Packard 5971A, equipaggiato con una colonna capillare HP-5 “trace analysis”, 16 m x 0,2 mm i.d., spessore della fase 0,33 µm; carrier gas: elio 0,8 ml/min; temperatura del forno programmata tra 80 °C (2 min isoterma) e 280 °C con incremento di 20 °C/min e 1 min di isoterma finale; iniettore: 250 °C; rapporto di splittaggio 1:20; detector: 280 °C.

Per le analisi GC-MS (CI) è stato utilizzato un gas cromatografo Varian GC3800 accoppiato con uno spettrometro di massa Saturn 2000 “ion trap”, equipaggiato con una colonna capillare Chrompack CP-sil 8 CB, 30 m x 0,25 mm i.d., con spessore della fase di 0,25 µm; carrier gas, elio 1 ml/min; temperatura programmata tra 100 °C (1 min isoterma) e 270 °C a 15 °C/min di incremento; iniettore: 260 °C; rapporto di splittaggio 1:50. Parametri MS: gas reagente, vapori di CH₃OH; Sec/Scan 0,6; background Mass 45; reagent ion ejection 10 Volts; CI reaction storage level 15 m/z; ARC target 5000.

Preparazione del campione

Le compresse sono state polverizzate in modo omogeneo. Il peso netto medio è risultato pari a circa 230 mg.

Per l'analisi spettrofotometrica, aliquote delle polveri sono state solubilizzate in metanolo.

Per l'analisi gascromatografica, aliquote di 50 mg di polvere sono state solubilizzate in 2 ml di H₂O alcalinizzata con 0,2 ml di NaOH 1M. La soluzione è stata estratta con due aliquote da 3 ml di terbutilmietilere; l'uso di tale solvente riduce la possibilità di formazione di artefatti nell'iniettore caldo del gascromatografo.

Gli estratti delle diverse aliquote, riuniti, sono stati concentrati, a temperatura ambiente in leggero flusso di azoto, fino ad un volume di circa 0,2 ml ed 1 µl delle soluzioni è stato iniettato nel gascromatografo.

Per ottenere pentafluoropropionil-derivati, un'aliquota degli estratti alcalini è stata evaporata a secco, ripresa con 1 ml di cicloesano e addizionata di 50 µl di una soluzione di PFPA in presenza di piridina. Dopo riscaldamento a 85 °C per 20 minuti le soluzioni sono state lavate con tetraborato sodico per rimuovere l'eccesso di reagenti e quindi analizzate.

Risultati

Lo spettro UV della soluzione metanolica, che mostra un unico massimo di assorbimento a 297 nm, ha un profilo poco caratteristico che tuttavia consente di escludere la presenza nelle compresse di amfetamina, metamfetamina e metilenediossiamfetamine.

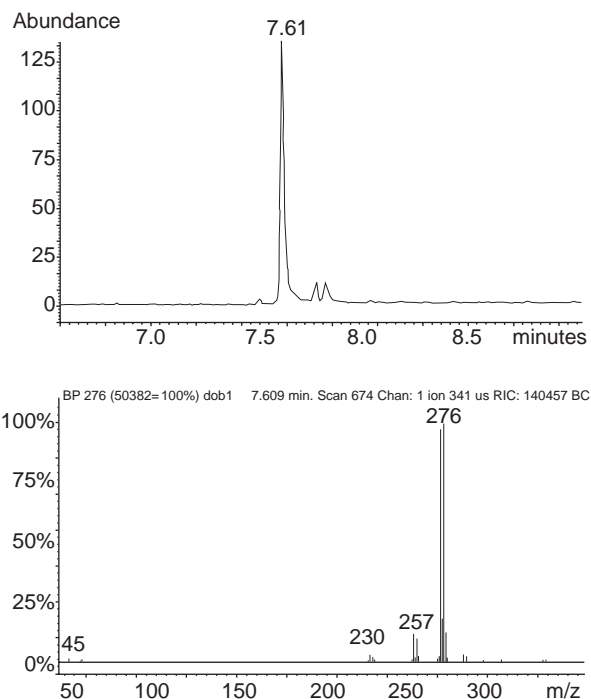


Fig. 1. - Cromatogramma dell'estratto alcalino della compressa e spettro di massa ottenuto mediante ionizzazione chimica positiva utilizzando vapori di MeOH come gas reagente.

Il peso molecolare del composto è stato determinato mediante ionizzazione chimica positiva usando come gas reagente vapori di metanolo ed ottenendo gli ioni $M+1$. La presenza del doppietto isotopico m/z 274 - 276 indica che il peso molecolare del composto è m/z 273-275 (Fig. 1).

Lo spettro ad impatto elettronico della molecola non derivatizzata sembra, ad un primo esame, assai povero di informazioni, essendo dominato dal picco base m/z 44 che deriva dalla rottura del legame in β all'atomo di azoto. Tale frammento (a struttura elementare C_2H_6N) non consente di distinguere una struttura isopropilamminica primaria da una struttura etilamminica N-metil-sostituita.

Un esame attento dello spettro, escludendo lo ione m/z 44, fornisce invece importanti indicazioni strutturali per quanto riguarda la parte aromatica della molecola. La presenza di tre doppietti, m/z 230-232, m/z 215-217 e m/z 199-201, con rapporti isotopici all'incirca uguali a 1, suggerisce una struttura Br-dimetossi (Fig. 2).

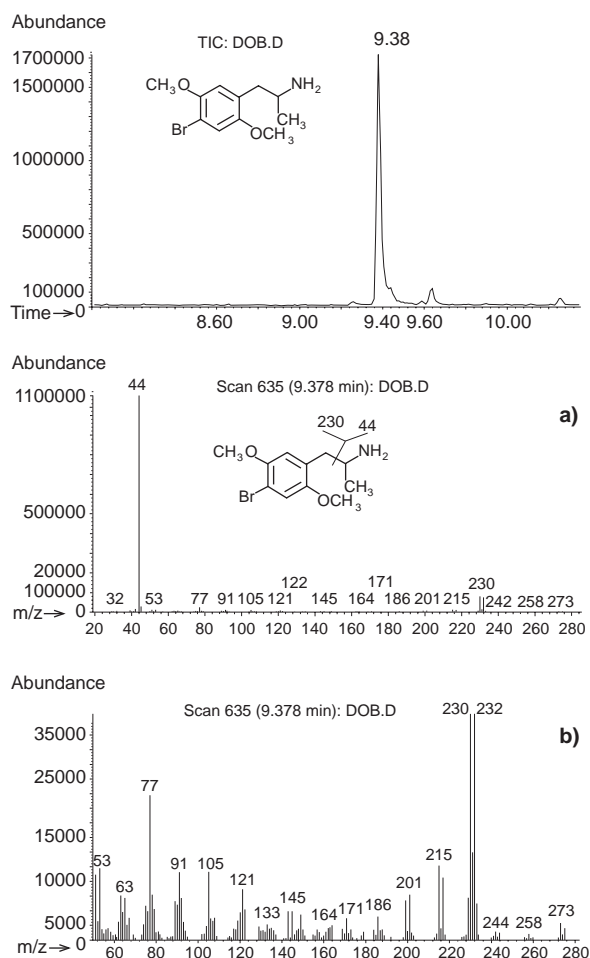


Fig. 2. - Cromatogramma dell'estratto alcalino della compressa e spettro di massa ad impatto elettronico: a) spettro totale di acquisizione tra 28 m/z e 300 m/z ; b) ingrandimento dello spettro tra 50 m/z e 280 m/z .

L'individuazione della struttura 4-bromo-2,5-dimetossi-, tra i 5 isomeri possibili, è suggerita dall'assenza dello ione m/z 180, che esclude il legame del Br nelle posizioni 2 o 6 (orto), e dalle abbondanze reciproche dei tre doppietti m/z 230-232, m/z 215-217 e m/z 199-201 [2, 3].

Lo spettro EI del derivato PFPA (Fig. 3), ottenuto per sostituzione di un H amminico con un gruppo acilico, conferma il peso molecolare del composto (m/z 419-421), e fornisce informazioni decisive sulla struttura della catena alifatica laterale. Gli ioni diagnostici e più abbondanti dello spettro sono originati da due vie di frammentazione:

a) la scissione del legame dell'atomo di carbonio in β all'azoto produce i frammenti m/z 229-231, corrispondenti alla porzione aromatica alogenata (bromodimetossibenil-catione), ed m/z 190 corrispondente alla catena amminoalifatica pentafluoro-acilata (ione imminico derivatizzato);

b) la scissione del legame in α all'azoto, caratteristica delle ammine fluoroacilate, produce lo ione m/z 162, corrispondente al gruppo amminico primario acilato, e il doppietto m/z 256-258 derivante dallo ione molecolare per perdita dell'ammina acilata e di un protone [4-6].

I frammenti m/z 190 e m/z 162, ottenuti rispettivamente dalla rottura dei legami in β ed in α , indicano che il metile è legato all'atomo di carbonio e non all'azoto e quindi consentono di identificare la catena laterale come una isopropilammina.

Discussione

La DOB, ammina ad attività psicotomimetica con elevato potenziale d'abuso e con proprietà allucinogene, può essere sintetizzata per alogenazione dalla 2,5-dimetossi-amfetamina (DMA), utilizzata nell'industria farmaceutica e fotografica [7]. Strutturalmente è correlata alla 4-metil-2,5-dimetossiamfetamina (DOM), introdotta sul mercato illecito di San Francisco alla fine degli anni '60 con il termine "STP", un acronimo per "serenità, tranquillità, pace".

La DOB è molto potente ed è attiva già a bassissime dosi; quantità dell'ordine di 1-3 milligrammi generalmente producono alterazioni dell'umore e minime alterazioni delle percezioni, mentre dosi di poco maggiori producono allucinazioni marcate che possono durare fino a 24 ore.

Sebbene la DOB sia stata inclusa fin dal 1992 nella tabella 1 della Legge 309/90 sulle sostanze stupefacenti e psicotrope, solo di recente vi è notizia di sequestri in Italia. Inoltre, anche nella letteratura internazionale, le informazioni sulle sue proprietà farmacologiche, tossicologiche e sul suo metabolismo sono scarse.

All'inizio degli anni '80 alcuni autori hanno riportato casi di decessi legati all'uso di questa sostanza [8, 9]. Una corretta identificazione è di conseguenza necessaria anche per future esigenze di ricerca analitica in tessuti e fluidi biologici.

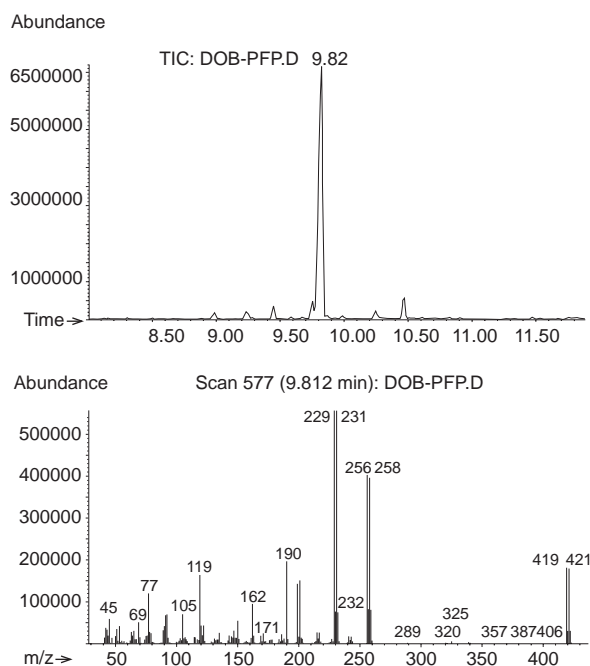


Fig. 3. - Cromatogramma del derivato PFPD della molecola e spettro di massa ottenuto mediante impatto elettronico.

Per quanto riguarda l'aspetto analitico, la solubilizzazione diretta delle compresse in metanolo, utile per l'ottenimento di spettri UV in condizioni neutre, comporta problemi per la successiva analisi gascromatografica per la possibile formazione di artefatti dovuti alla presenza, nella molecola d'origine, di terminali amminici non completamente sostituiti che potrebbero alcalinarsi nell'iniettore caldo in presenza di MeOH.

L'estrazione da ambiente alcalino, che trasforma queste molecole nelle rispettive basi libere, con acetato di etile o terbutilmetil etero ovvia questi inconvenienti, dando origine ad un estratto ottimale per l'analisi qualitativa (GC-FID e GC-MS) ed eventualmente quantitativa. Per quanto riguarda l'analisi GC-MS, tecnica impiegata comunemente nei laboratori che si occupano di tossicologia, si deve ricordare che le strette analogie strutturali tra molecole quali le bromodimetossi-amfetamine e bromodimetossi-fenetilamine, determina no spettri di massa molto simili e spesso con lo ione molecolare assente o poco abbondante. Informazioni strutturali importanti possono comunque essere ottenute dallo studio di frammenti di bassa intensità e tramite la formazione di opportuni derivati.

Inoltre, in molti lavori pubblicati e in alcuni database, gli spettri di massa sono acquisiti a partire da 40 AMU. In questo modo però si perdono alcune fondamentali informazioni relative alla struttura della catena laterale e pertanto è consigliabile l'acquisizione a partire da 28 AMU. In questo modo si può registrare la presenza dello ione m/z 30, indicativo di una catena fenetilaminica primaria (presente ad esempio nella 2C-B), oppure quella dello ione m/z 44 corrispondente ad

una fenetilamina monometilata o ad una catena isopropilaminica primaria (come nella DOB).

Per questi motivi è bene ricordare che non ci si può affidare acriticamente al responso fornito dal confronto con i database di spettri di massa comunemente disponibili.

Conclusioni

La 4-bromo-2,5-dimetossiamfetamina presente nelle compresse esaminate è stata identificata per mezzo dello studio degli spettri di massa (EI e CI positiva) del composto tal quale e del suo pentafluoroacil-derivato.

L'approccio analitico proposto consente l'identificazione della DOB utilizzando una strumentazione comunemente presente nei laboratori che si occupano di tossicologia forense.

Lo stesso approccio metodologico può essere utilizzato per la corretta identificazione delle numerose sostanze correlabili strutturalmente alla fenetilamina e alla fenilisopropilamina che già sono o che potrebbero in futuro essere introdotte nel mercato clandestino, evitando errori di interpretazione dei corrispondenti spettri di massa.

Ricevuto il 26 marzo 2001.

Accettato il 18 giugno 2001.

BIBLIOGRAFIA

- Shulgin AT, Shulgin A. *PIKHAL, a chemical love story*. Berkeley, CA: Transform Press;1992.
- Giroud C, Augsburger M, Rivier L, Mangin P, Sadeghipour F, Varesio E, Veuthey JL, Kamalaprjia P. 2C-B: A new psychoactive phenylethylamine recently discovered in ecstasy tablets sold on the Swiss black market. *J Anal Toxicol* 1998;25(5):345-54.
- De Ruiter J, Clark CR, Noggle FT. Analysis of the bromination products of the isomeric dimethoxyphenethylamines: differentiation of "Nexus" from five positional isomers. *Microgram* 1997;30(5):96-111.
- Clark CR, Noggle FT, Holston PL, De Ruiter J. Methods of differentiation for regioisomeric 2,3- and 3,4- methylenedioxyphenalkylamines by liquid chromatography and mass spectrometry. *Microgram* 1998;31(9):244-57.
- Clark CR, Valaer AK, Noggle FT, De Ruiter J. GC-MS analysis of acylated derivatives of methamphetamine and regioisomeric phenethylamines. *J Chromatogr Sci* 1995;33:485-92.
- Furnari C, Ottaviano V, Rosati F, Tondi V. Identification of 3,4-methylenedioxyamphetamine analogs encountered in clandestine tablets. *Forensic Sci Int* 1998;92:49-58.
- Valter K, Arrizabalaga P. *Designer drugs directory*. Lauzanne: Elsevier Science SA;1998. p.53.
- Winek C, Collom W, Bricker J. A death due to 4-bromo-2,5-dimethoxyamphetamine. *Clin Toxicol* 1981;18:267-71.
- Bohn G. Illegally manufactured 2,5-dimethoxy-4-bromo-amphetamine in connection with a fatal intoxication. *Toxicochemistry* 1981;14:140-1.