



LIMITATIONS OF SIMON TEST IN NEW PSYCHOACTIVE SUBSTANCES ANALYSIS

Kaja TUSIEWICZ¹, Olga WACHEŁKO¹, Marcin ZAWADZKI², Paweł SZPOT²

¹ *Institute of Toxicology Research, Borowa, Poland*

² *Wrocław Medical University Department of Forensic Medicine, Wrocław, Poland*

Abstract

New psychoactive substances (NPS) are nowadays a prevalent group of illicit drugs, one of which are synthetic cathinones. The widespread usage of NPS requires fast, reliable, selective and sensitive analytical methods for their identification as well as differentiation. Colorimetric tests are among the most frequently used methods for screening analysis of NPS in forensic sciences because they are fast, cheap and simple they found application in roadside, borders and airport controls, as well as are used for employees control at workplaces. In this paper we present limitations of colorimetric tests based on the example of one of the Simon test's variant which was used to analyze synthetic cathinones samples. 163 seized drugs samples were analyzed. Used variant of the Simon test comprises reaction of secondary amines with sodium nitroprusside, sodium carbonate and acetaldehyde resulting in deep blue coloration. Our study indicated that the test gives a very low positive results percentage (3%), as well as many false negative results (88%). No pattern in color changes could be observed regarding samples belonging to one group of compounds in order to identify it even when lacking the expected observation. Another important aspects regarding colorimetric test is the fact that observations are very subjective. Although this method is fast and easy to perform, it does not provide unambiguous results and thus, they always should be confirmed with the use of other analytical techniques such as LC-MS/MS or GC-MS/MS.

Keywords

Colorimetric tests; New psychoactive substances; Synthetic cathinones; Screening analysis.

Received 24 October 2021; accepted 16 December 2021

Introduction

New psychoactive substances (NPS), which emerged on the drug market in 2000s, are nowadays a prevalent, widely discussed group of illicit drugs. In 2020 more than 800 substances were monitored by the European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA), whereas 46 compounds were reported for the first time via the early warning system. One of the most frequently confiscated group of NPS are synthetic cathinones, from which 156 are monitored by the EMCDDA at present (European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, 2021). They are central nervous system stimulants that are

becoming more popular throughout the years as we take a look at trends on the illicit market. In 2017 synthetic cathinones represented 24% of all reported seizures of NPS in Europe, whereas in 2018 the number increased to 36% (European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, 2019, 2020). Nowadays users usually purchase synthetic cathinones via the Internet, less often from special shops or directly from people who sell them. Those substances are sold as crystalline powders, capsules or sometimes as tablets and are usually labeled “not for human consumption”. The reason for that are intentions to get around law regulations and avoid criminal liability (Pieprzyca, Skowronek, Nižnanský, Czekaj, 2020).

The widespread usage of NPS requires fast, reliable, selective and sensitive analytical methods for their identification as well as differentiation. Colorimetric tests are among the most frequently used methods for screening analysis of NPS. Because they are fast, cheap and simple they found application in roadside, borders and airport controls, as well as are used for employees control at workplaces. A lot of analytical laboratories also use this technique for screening tests, before conducting more complex analysis. Another advantages of colorimetric test are their mobility and simple sample preparation step, as they usually consist of ready to use reagents that need to be mixed together (Graziano, Anzillotti, Mannocchi, Pichini, Busardò, 2019; Nagy, Szöllösi, Szendrei, 2005). Nonetheless, colorimetric tests also exhibit a range of disadvantages that need to be taken into consideration when conducting an analysis. First of all, those tests, in most cases, enable to identify only a group of compounds, not a single one, as they detect certain functional group which could be common among a lot of compounds. Moreover, colorimetric tests are suffering from false positive and false negative results that arise from cross reactions between reagents (Graziano et al., 2019; Nagy et al., 2005). The Zimmermann test for example is usually used to detect benzodiazepines, but also gives positive results in cathinones analysis (Graziano et al., 2019; United Nations Office, 2015). The Marquis test is commonly used in opiates such as morphine, codeine and heroin detection but suffers from false positive results when analyzing cathinones, other phenylethylamines, as well as synthetic cannabinoids and piperazines (Graziano et al., 2019; United Nations Office, 2015). The Chen Kao colorimetric method also could detect cathinones, while its main purpose is to detect ephedrine, pseudoephedrine and norephedrine (Graziano et al., 2019; United Nations Office, 2015). In each analysis a positive and negative control are also required in order to gain certainty about acquired result, as well as each analysis has to be confirmed by more selective and sensitive methods such as liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) or gas chromatography coupled with tandem mass spectrometry (GC-MS/MS). At last, colorimetric tests' results are very subjective, as not everyone might see colors in the same way. The perception depends on the light conditions, as well as eyes' adaptation (Graziano et al., 2019; Nagy et al., 2005).

In this paper we present limitations of the efficiency of colorimetric tests based on the example of one of the Simon test's variant which was used to analyze synthetic cathinones samples.

Materials and methods

Chemicals and reagents

LC-MS grade methanol was purchased from Witko, Łódź, Poland. Sodium nitroprusside dihydrate (analytical grade) was purchased from Avantor Performance Materials Poland S.A. (Gliwice, Poland). Sodium carbonate (99.95% purity) was purchased from Chempur (Piekary Śląskie, Poland). Acetaldehyde (99.5% purity) was purchased from Sigma-Aldrich (Darmstadt, Germany).

Sample preparation

163 seized drugs samples were analyzed. This included 146 synthetic cathinones, 3 tertiary amines, one amphetamine analogue and 13 mixtures of various substances. All analyzed compounds together with their abbreviations and amount of samples are listed in Table 1. All seized drugs samples were chosen based on the case (each sample applied to different case), time (cases from 2017 to 2021) and place (samples were collected in different parts of the country). 10–100 mg of the sample was weighted and dissolved in 5 mL of methanol. The weighted portion was dependent on the total mass of seized drug sample. All prepared samples were stored in 4°C. Most prepared solutions were colorless, one sample (MDMA) was pink, one sample was pale pink (4-CEC) and two samples of 4-CEC were pale blue. Before colorimetric test was performed, all samples were analyzed by LC-MS/MS in order to determine the unknown compound.

Simon test procedure

One variant of the Simon test is usually used to detect MDMA, however, due to the reaction mechanism (Fig. 1), formation of blue color after mixing all reagents is characteristic for all secondary amines (Nagy et al., 2005). In each sample the used Simon test procedure was as follow: 50 µL of the methanolic solution of the sized drug sample was transferred to an Eppendorf test tube. Then, 50 µL of reagents mixture (comprised of 1 mL of 2% sodium nitroprusside solution and 100 µL of acetaldehyde) and 100 µL of 2% sodium carbonate solution were added. Prepared solution was vortex mixed for approximately 3 seconds and the change of color of the sample was observed immediately after preparation, 2 minutes and 5 minutes later.

Table 1
List of analyzed seized drug samples by the use of Simon test

Compound(s) name(s)	Abbreviation	Number of samples
Cathinones		
4-chloromethcathinone	4-CMC	33
4-chloroethcathinone	4-CEC	21
3-chloromethcathinone	3-CMC	21
N-ethylhexedrone	NEH	18
N-ethylpentylone		14
3-methylmethcathinone	3-MMC	10
Pentedrone		8
N-ethylpentedrone	NEP	7
4-ethylethcathinone	4-EEC	6
3-methylethcathinone	3-MEC	4
Mexedrone	4-MMC-MeO	2
Pentylone		1
4-methylpentedrone	4-MPD	1
Amphetamine analogues		
Methylenedioxyamphetamine	MDMA	1
Tertiary amines		
α -pyrrolidinoisohexanophenone	α -PiHP	1
4-chloro- α -pyrrolidinopentiophenone	4-Cl- α -PVP	1
Dibutylone		1
Mixtures		
4-ethylethcathinone + pentedrone		5
4-ethylethcathinone + 4-chloromethcathinone		2
N-ethylhexedrone + lidocaine		1
3-chloromethcathinone + 4-chloromethcathinone		1
3-chloromethcathinone + etizolam		1
3-chloromethcathinone + etizolam + clonazolam		1
4-chloromethcathinone + etizolam + clonazolam		1
4-chloromethcathinone + N-ethylpentedrone		1

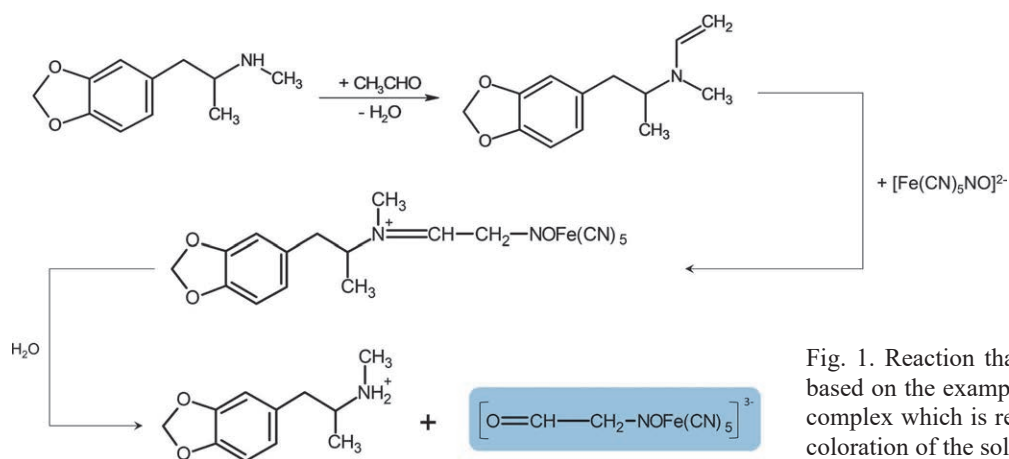


Fig. 1. Reaction that takes place in Simon test based on the example of MDMA analysis. Blue complex which is responsible for observed blue coloration of the solution is marked in color.

Results

Analysis of synthetic cathinones and an amphetamine analogue

Analysis of 146 synthetic cathinones samples and one sample of an amphetamine analogue gave 5 positive results, that is change of color of the solution to blue (Fig. 2). MDMA (Fig. 2A), which is routinely detected by the use of Simon test gave deep, blue color immediately after mixing all reagents. This coloration remained unchanged until 5th minute of the analysis. 4-MPD (Fig. 2B) firstly gave white, turbid solution, which after 2 minutes, changed into blue. It is worth mentioning that this color differs from the rest colors observed in case of positive results. Two chloromethcathinone positional isomers also exhibited deep blue coloration immediately after mixing the reagents. This include one 3-CMC sample (Fig. 2C) and two 4-CMC samples (Fig. 2D). In case of both isomers it could be seen that the blue color got darker throughout 5 minutes of analysis.

General observations that were conducted in the Simon test differed significantly from each other (Fig. 3). Some samples exhibited fuscous coloration with more or less visible decoloration after 5 minutes (Fig. 3E, 3I). Other samples turned into white or cream colored sediments that remained unchanged (Fig. 3F) or became clear (Fig. 3D) in 5 minutes. Other findings were light or deep green coloration of samples after

5 minutes (Fig. 3B, 3C) or light lime turbid solution (Fig. 3H). Lastly, some samples immediately became decolored (Fig. 3G), whereas in some samples there were no changes observed and the solution remained light fuscous (Fig. 3A).

Interesting observation was that within one group of substances (Fig. 4), results of the Simon test were different from each other. One of the most numerous groups of analyzed compounds was 4-CEC. Taking into consideration color changes within this group, mainly no changes or creation of white turbid solution which became more clear after 5 minutes were observed (Fig. 4A). Interestingly, samples that differed in initial color exhibited similar results, e.g. decoloration of fuscous solution, whereas while taking into consideration different samples with the same initial color, there were different color changes observed. For example, one sample turned fuscous immediately after mixing the reagents and decolored afterwards, while the other sample turned into white sediment and after 5 minutes became decolored (Fig. 4B). 3-MEC exhibited decoloration of fuscous solution or no changes at all during 5 minutes of analysis (Fig. 4C). N-ethylhexedrone samples, after the Simon test, resulted in different color changes. Formation of cream colored turbid solution or more or less clear one were the most common, whereas formation of light lime turbid solution was a rare observation (Fig. 4D). In case of mexedrone samples, formation of green solution was observed (Fig. 4E), but it is worth emphasizing that

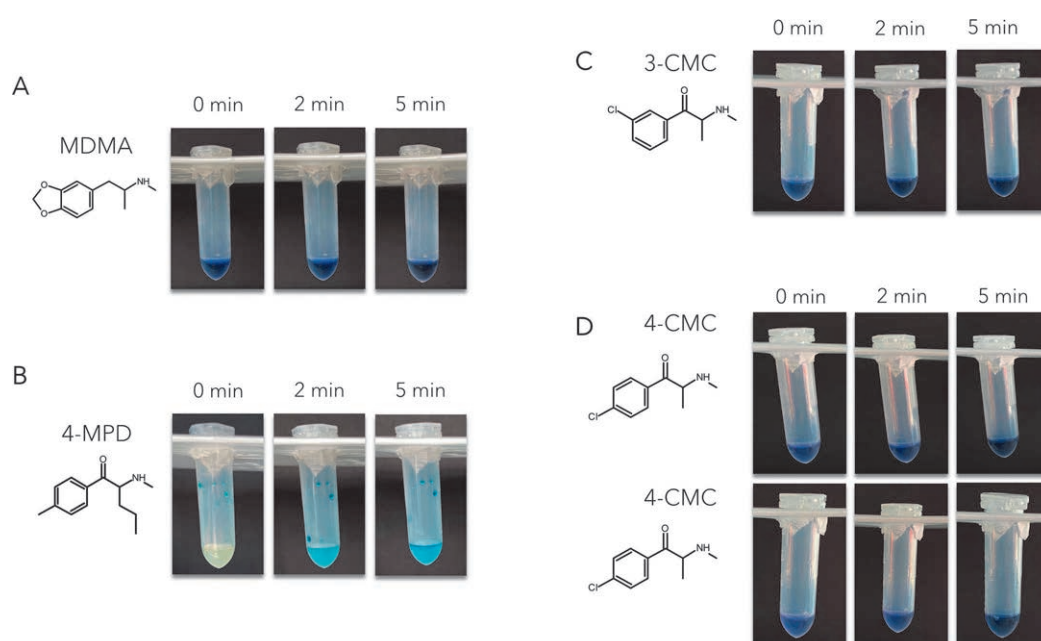


Fig. 2. Positive results of Simon test. Observations for A – MDMA, B – 4-MPD, C – 3-CMC and D – 4-CMC immediately after preparation, 2 minutes and 5 minutes later.

achieved colors differed from each other, one sample exhibited olive green coloration after 2 minutes, while the other one immediately turned green and got darker in time. Differences observed in 3-CMC group based on either decoloration of fuscous solution or turning colorless solution into greyish-green, turbid solution (Fig. 4F). N-ethylpentredone samples resulted in turbid, white solutions and colorless ones (Fig. 4G), whereas N-ethylpentylone samples were also colorless or formed cream colored, turbid solutions (Fig. 4H).

While examining results of synthetic cathinones belonging to different compounds groups (Fig. 5) it could be seen that similar color changes were observed within different compounds groups, e.g. 3-MEC, 4-CEC, 4-CMC and 3-CMC exhibit decoloration of the fuscous solution.

Analysis of tertiary amines

Analysis of three samples of tertiary amines: α -Pi-HP, 4-Cl- α -PVP and dibutylone exhibited similar results (Fig. 6A). Immediately after mixing together all reagents, solutions were light fuscous or cream colored and after 5 minutes all turned darker. As a comparison, on Fig. 6B there is 3-MEC result presented, which is similar to color changes observed within tertiary amines.

Analysis of mixtures of substances

Mixtures of three main compounds: 4-EEC, 3-CMC and 4-CMC with various additives were

analyzed (Fig. 7). 4-EEC (Fig. 7A) exhibited different color changes with each additive: in the first sample decoloration of the fuscous solution was observed, the second sample remained fuscous through 5 minutes of analysis, while the third sample turned green immediately after mixing all reagents. 3-CMC (Fig. 7B) with 4-CMC as well as with etizolam resulted in clear, colorless solution throughout the whole 5 minutes of the analysis, whereas addition of clonazolam resulted in firstly light fuscous and after 5 minutes deep fuscous solution. In 4-CMC (Fig. 7C) samples, both with etizolam and clonazolam, as well as with NEP, light fuscous coloration was observed. After 5 minutes both solutions became decolorated.

Statistical analysis

All synthetic cathinones, amphetamine analogue and mixtures analysis results are presented in Fig. 8 with each color change percentage share. 5 samples that gave positive results represent approximately 3% of all analyzed samples that should give deep blue color as a positive result observation. The most common color change was decoloration of light fuscous solution (33% of all analyzed samples). Less than one-third of analyzed samples (23%) were light fuscous and remained unchanged throughout 5 minutes of analysis. 16 samples which stands for 11% of all were associated with cream colored sediment formation, whereas 9 samples (6%) exhibited white sediment formation which became darker in time. Individual samples exhibited color changes from light fuscous

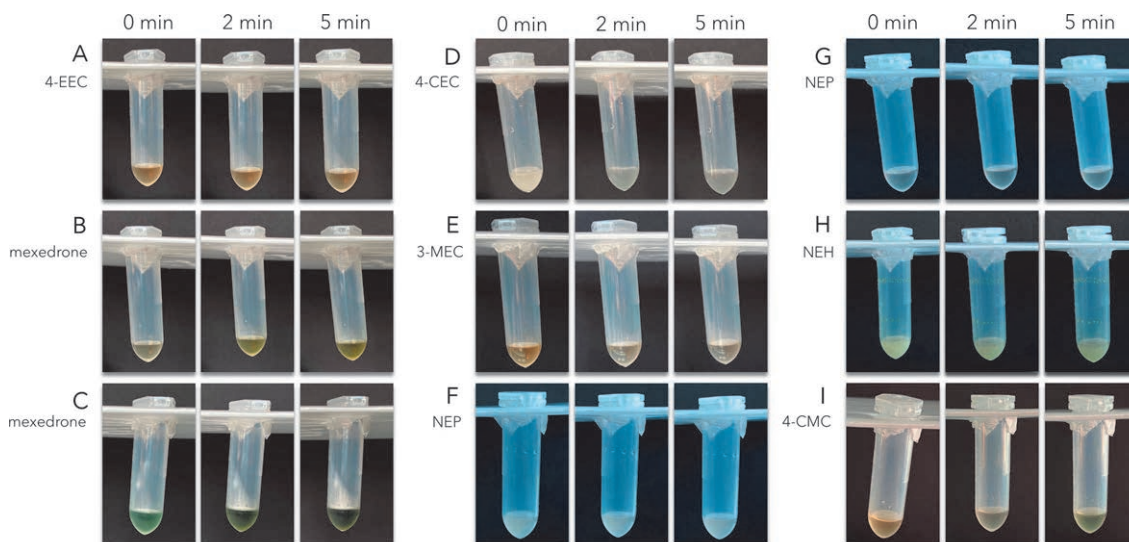


Fig. 3. Results of Simon test and their diversity based on representative samples. Observations for A – 4-EEC, B – mexedrone, C – mexedrone, D – 4-CEC, E – 3-MEC, F – NEP, G – NEP, H – NEP, I – 4-CMC immediately after preparation, 2 minutes and 5 minutes later.

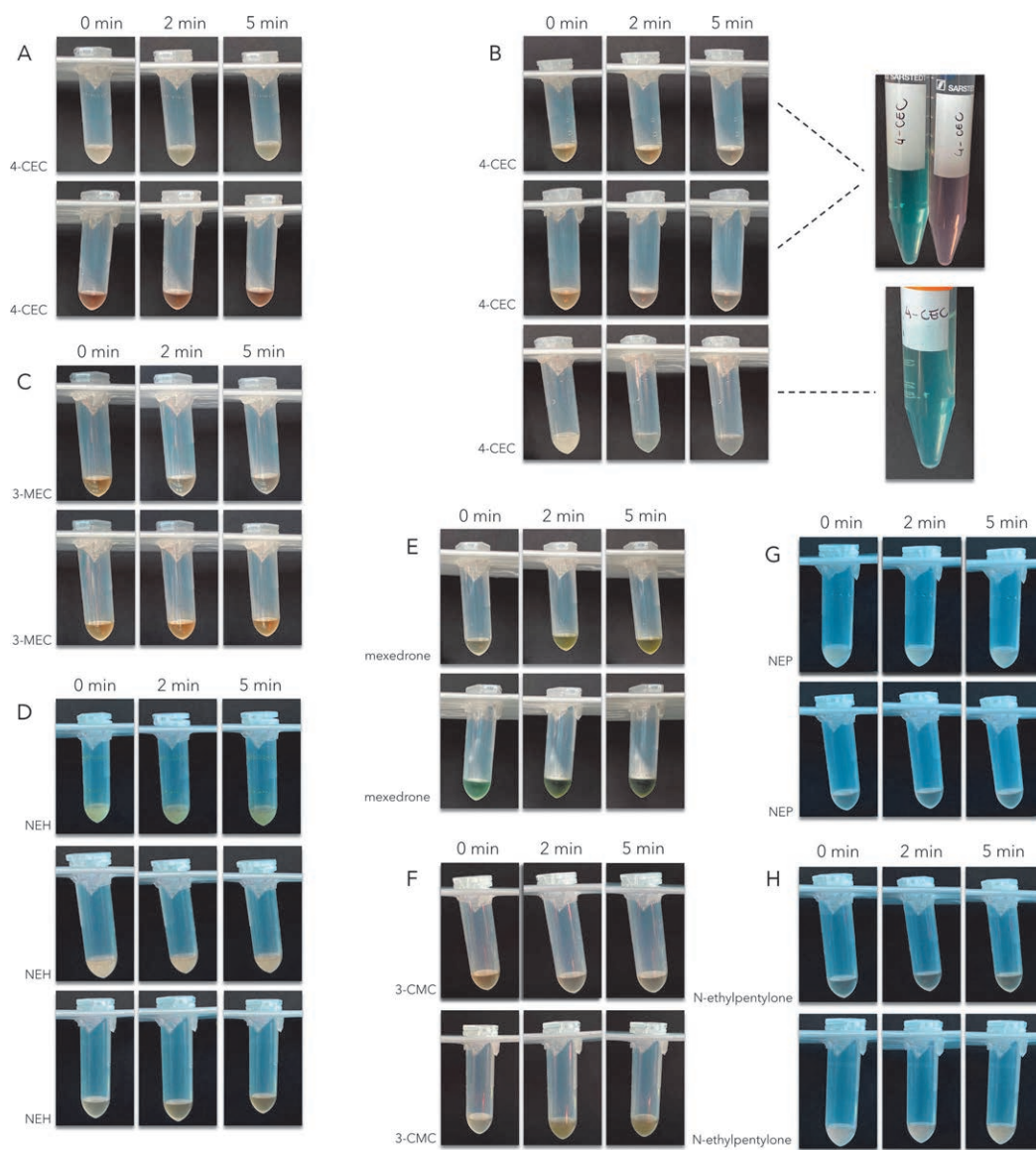


Fig. 4. Results of Simon test and their comparison within one group of substances. Observations for A – 4-CEC, B – 4CEC with differentiation in solutions color, C – 3-MEC, D – NEH, E – mexedrone, F – 3-CMC, G – NEP, H – N-ethylpentylone immediately after preparation, 2 minutes and 5 minutes later.

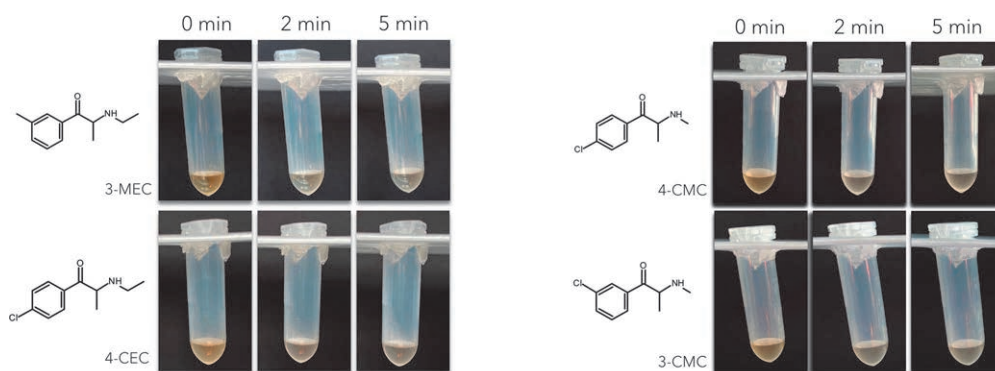


Fig. 5. Results of Simon test and their comparison within groups of substances. Observations for 3-MEC, 4-CEC, 4-CMC and 3-CMC immediately after preparation, 2 minutes and 5 minutes later.

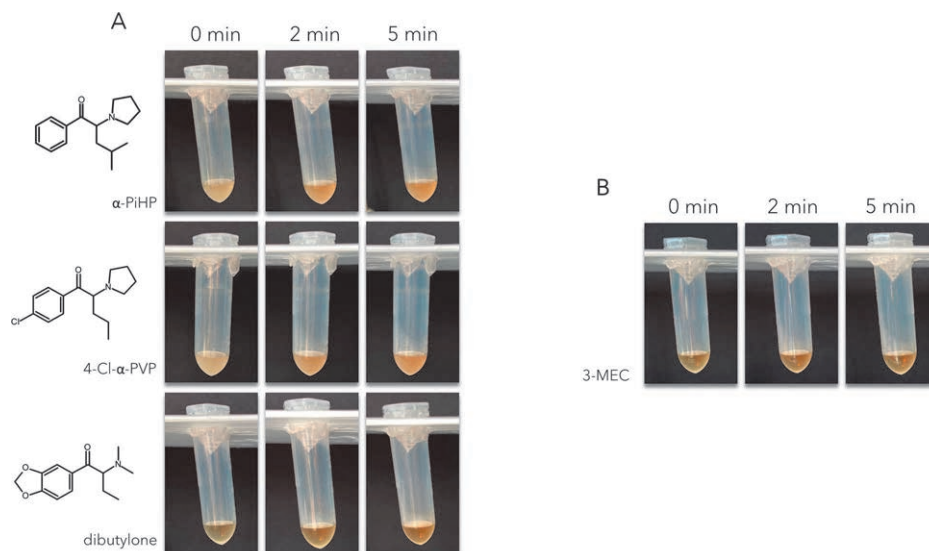


Fig. 6. Results of Simon test for tertiary amines and their comparison with secondary amine result. Observations for A – α -PiHP, 4-Cl- α -PVP and dibutylone, B – 3-MEC immediately after preparation, 2 minutes and 5 minutes later.

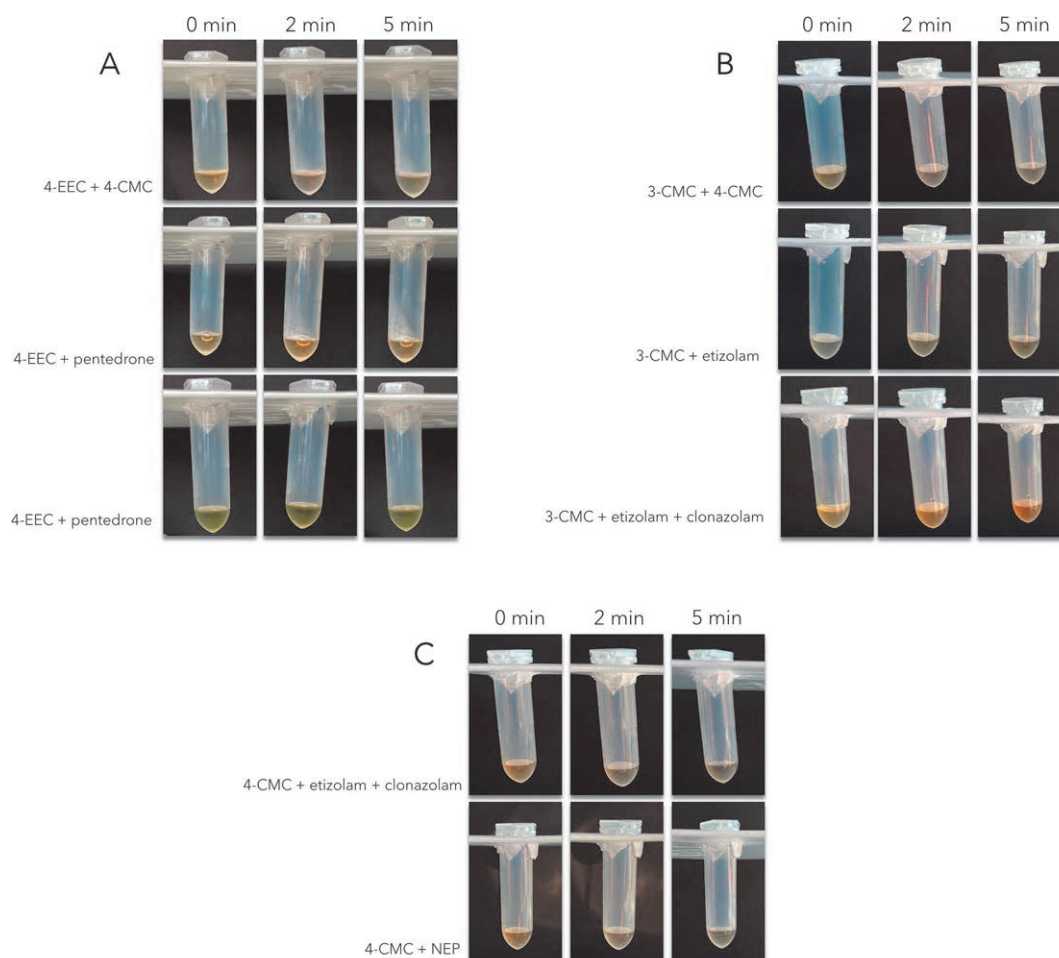


Fig. 7. Results of Simon test for mixtures of substances. Observations for A – 4-EEC mixtures with various substances, B – 3-CMC mixtures with various substances, C – 4-CMC mixtures with various substances immediately after preparation, 2 minutes and 5 minutes later.

to green (4%), dark fuscous (3%) or turbid solutions (3%). 14% of all analyzed samples exhibited numerous and various results that are in detail listed in Fig. 8.

Discussion

New psychoactive substances appear to be a current problem all over the world. This topic, which involves challenge in NPS common occurrence was raised by, among others, Rojek, Korczyńska-Albert, Kulikowska and Kłys (2017). Fatal and non-fatal intoxications cases (Adamowicz, Jurczyk, Gil, Szustowski, 2019; Rojek, Kłys, Maciów-Głąb, Kula, 2017; Nowak, Szpot, Zawadzki, 2021) require development of selective and sensitive determination methods of NPS (Sekula, Zuba, Lorek, 2018; Siczek, Zawadzki, Siczek, Chłopaś-Konowalek, Szpot, 2020); Zawadzki, Wachelko, Chłopaś-Konowalek, Szpot, 2021), but also fast and simple screening methods. Previously mentioned situations (e.g. roadside and border controls, at airports and at workplaces) require fast results and thus, colorimetric tests seem to be an optimal choice because they provide rapid observations, as the change of colors happen within minutes. Sample preparation is also easy to perform, no special and complex training is needed in order to conduct such analysis. This way, after a short training course, not only highly qualified staff is able to perform colorimetric test, but it is also possible outside the laboratory by employers, border guards and police. Mobility of colorimetric test

is responsible for its use in many fields, as they allow detection of an unknown substance in almost any circumstances. All before mentioned advantages found their use in NPS determination, e.g. opiates, amphetamines, synthetic cathinones, cocaine, cannabinoids and piperazines (Cuypers, Bonneure, Tytgat, 2016; Philp, Fu, 2018).

However, based on our conducted analysis, the aforementioned statements do not refer to the analysis of NPS. It was shown that very little samples gave expected, positive results. Only 3%, which stands for 5 samples of four different compounds, resulted in blue coloration after conducting the Simon test. What should be emphasized is that these observations were very subjective. As it can be seen in Fig. 2B, 4-MPD gave different color than the rest of positive-marked samples. It is more bright, azure shade of blue and could be interpreted in both ways. One analyst could recognize this result as a positive one, whereas another analyst could interpret it the other way, as a negative result. That points to the need of positive and negative controls preparation before any analysis. What should be alarming, while taking into consideration all acquired results, is that results of the Simon test are very diversified. Results of one group of compounds differ from each other, so there is no visible pattern of observations related to one particular group of compounds that could be useful in identifying this group, even without expected blue coloration. Those observations include change of color, decoloration, formation of sediment or turbid solution in different colors.

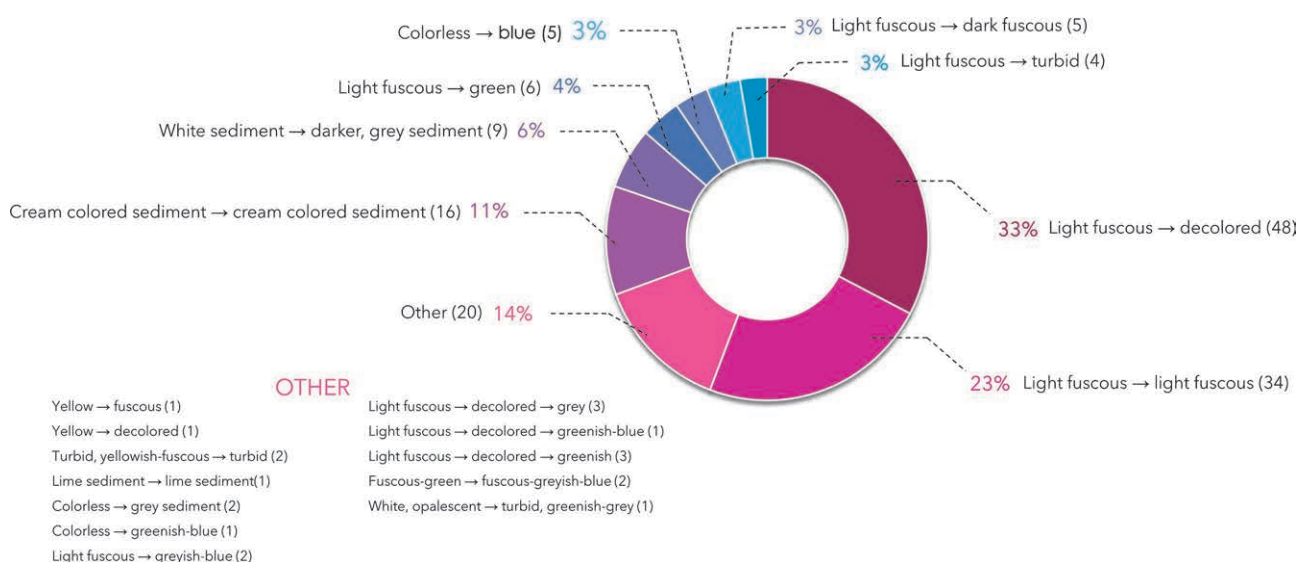


Fig. 8. Percentage share of all observations during analysis of secondary amines with the use of Simon test. Numbers in brackets represent the number of samples that exhibited certain color change.

What is also worth noticing is that initial solutions that had different colors exhibited similar results (Fig. 4B), whereas 4-CEC initial solutions that were in the same color gave different results: one sample was fuscous and then decolorated, while the other one resulted in formation of white sediment and changed to a clear solution after 5 minutes. Hence, it is difficult to unambiguously hypothesize if the color of the initial solution has an impact on the final result. More study in this field is needed, as in this study most of the samples were clear solutions, so beforementioned hypothesis is based only on three samples analysis. When taking into consideration different compounds, e.g. 3-MEC, 4-CEC, 4-CMC and 3-CMC (Fig. 5), results of the Simon test were very similar, so it was impossible to distinguish those compounds from each other. What is interesting and worth mentioning is positional isomers differentiation, as in some countries it is common, that one isomer is legal, while another one could be illegal. Based on conducted analysis, it is not possible to distinguish 4-CMC from 3-CMC. However, positional isomers differentiation is possible with the use of ultraviolet (UV) spectrophotometry which is also simple and fast method which lack the complicated step of sample preparation. Zuba and Adamowicz (2016) performed chromatographic methods in order to distinguish positional isomers of methylmethcathinone. Acquired UV spectra indicate that differentiation of 2-, 3- and 4-methylmethcathinone is possible based only on their UV spectra. Tertiary amines were analyzed in order to examine negative results. As expected, the solution remained fuscous or turned deeper after 5 minutes. However, a great number (23%) of secondary amines also gave similar results, hence the lack of color change cannot be interpreted as a negative result. Consequently, even while having negative control, an analyst is not able to make a statement if analyzed sample does not contain secondary amine, or if it has been a false negative result. Lastly, when taking into consideration mixtures of various substances, each different mixture of 4-EEC (Fig. 7A) gave different results, whereas 3-CMC mixtures (Fig. 7B) with 4-CMC and with etizolam exhibited similar color changes, but addition of etizolam with clonazolam resulted in different color change. 4-CMC (Fig. 7C) mixed with any compound exhibited similar results. Therefore, acquired results are ambiguous and it is not possible to establish if an addition of another compound has an impact on the Simon test result.

It was shown that colorimetric tests, besides their incontrovertible advantages, are suffering from a number of limitations. The most important one is the lack of selectivity and presence of false positive and false

negative results. Although this method is fast and easy to perform, it does not provide unambiguous results and thus, they should be confirmed with the use of other analytical techniques such as LC-MS/MS or GC-MS/MS. Colorimetric tests may serve as a primary, screening method of analysis on an unknown substance, but acquired results – both positive and negative – should be interpreted with caution.

Conclusions

Colorimetric tests, although fast, simple, mobile and used in many different fields, are not free from limitations, such as low selectivity and false positive and false negative results. Our study, based on authentic seized samples of synthetic cathinones analysis with the use of the Simon test, indicates that colorimetric tests suffer from very low positive results percentage (3%), as well as from false negative results (88%). What is more, no pattern in color changes could be observed regarding samples belonging to one group of compounds. Lastly, the fact that observations performed in colorimetric tests are very subjective should always be taken under consideration while conducting such analysis, as well as should always be confirmed by other, more specific methods such as LC-MS or GC-MS.

References

1. Adamowicz, P., Jurczyk, A., Gil, D., Szustowski, S. (2020). A case of intoxication with a new cathinone derivative α -PiHP – A presentation of concentrations in biological specimens. *Legal Medicine*, 42, 101626.
2. Cuypers, E., Bonneure, A. J., Tytgat, J. (2016). The use of presumptive color tests for new psychoactive substances. *Drug Testing and Analysis*, 8(1), 136–140.
3. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (2019). *European Drug Report 2019: Trends and Developments*. Luxembourg: Publications Office of the European Union.
4. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (2020). *European Drug Report 2020: Trends and Developments*. Luxembourg: Publications Office of the European Union.
5. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (2021). *European Drug Report 2021: Trends and Developments*. Luxembourg: Publications Office of the European Union.

6. Graziano, S., Anzillotti, L., Mannocchi, G., Pichini, S., Busardò, F. P. (2019). Screening methods for rapid determination of new psychoactive substances (NPS) in conventional and non-conventional biological matrices. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 163, 170–179.
7. Nagy, G., Szöllösi, I., Szendrei, K. (2005). Color tests for precursor chemicals of amphetamine-type substances. the use of color tests for distinguishing between ephedrine-derivatives. *Scientific and Technical Notes SCITEC/20*.
8. Nowak, K., Szpot, P., Zawadzki, M. (2021). Fatal intoxication with U-47700 in combination with other NPS (N-ethylhexedrone, adinazolam, 4-CIC, 4-CMC) confirmed by identification and quantification in autopsy specimens and evidences. *Forensic Toxicology*, 39(2), 493–505.
9. Philp, M., Fu, S. (2018). A review of chemical ‘spot’ tests: A presumptive illicit drug identification technique. *Drug Testing and Analysis*, 10(1), 95–108.
10. Pieprzycza, E., Skowronek, R., Niżnanský, L., Czekaj, P. (2020). Synthetic cathinones – from natural plant stimulant to new drug of abuse. *European Journal of Pharmacology*, 875, 173012.
11. Rojek, S., Kłys, M., Maciów-Głąb, M., Kula, K. (2017). A new challenge in forensic toxicology exemplified by a case of murder under the influence of a synthetic cannabinoid – AM-2201. *Legal Medicine*, 27, 25–31.
12. Rojek, S., Korczyńska-Albert, M., Kulikowska, J., Kłys, M. (2017). Współczesne wyzwania w toksykologii związane z nowymi substancjami psychoaktywnymi ilustrowane przypadkami zgonów po zażyciu UR-144 oraz UR-144 z pentedronem oznaczonych w próbkach krwi metodą LC-ESI-MS-MS. *Archiwum Medycyny Sądowej i Kryminologii*, 67(2), 104–120.
13. Sekuła, K., Zuba, D., Lorek, K. (2018). Analysis of fragmentation pathways of new-type synthetic cannabinoids using electrospray ionization. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 29(10), 1941–1950.
14. Siczek, M., Zawadzki, M., Siczek, M., Chłopaś-Konowalek, A., Szpot, P. (2021). Etazene (N,N-diethyl-2-[[4-(ethoxyphenyl)methyl]-1H-benzimidazol-1-yl]-ethan-1-amine (dihydrochloride)): a novel benzimidazole opioid NPS identified in seized material: crystal structure and spectroscopic characterization. *Forensic Toxicology*, 39(1), 146–155.
15. United Nations Office (2015). Recommended methods for the identification and analysis of synthetic cathinones in seized materials. Manual for use by national drug analysis laboratories.
16. Zawadzki, M., Wachelko, O., Chłopaś-Konowalek, A., Szpot, P. (2021). Quantification and distribution of 4-fluoroisobutyryl fentanyl (4-FiBF) in postmortem biological samples using UHPLC–QqQ-MS/MS. *Forensic Toxicology*, 39(2), 451–463.
17. Zuba, D., Adamowicz, P. (2016). Distinction of constitutional isomers of mephedrone by chromatographic and spectrometric methods. *Australian Journal of Forensic Sciences*, 49(6), 637–649.

Declaration of interest

The authors declare no conflicts of interest (including financial and personal) that might appear to influence the work reported in this paper.

Corresponding author

Kaja Tusiewicz
Institute of Toxicology Research
ul. Kasztanowa 45
PL 55-093 Borowa
e-mail: kajatusiewicz@gmail.com

OGRANICZENIA TESTU SIMONA W ANALIZIE NOWYCH SUBSTANCJI PSYCHOAKTYWNYCH

Wstęp

Nowe substancje psychoaktywne (NSP), które pojawiły się na rynku narkotykowym w pierwszej dekadzie XXI wieku, stanowią obecnie grupę nielegalnych substancji psychoaktywnych budzącą szerokie dyskusje. W 2020 r. Europejskie Centrum Monitorowania Narkotyków i Narkomanii (EMCDDA) monitorowało ponad 800 substancji, a za pośrednictwem systemu wczesnego ostrzegania zgłoszono po raz pierwszy 46 związków. Jedną z najczęściej konfiskowanych grup NSP są syntetyczne katynony, z których 156 jest obecnie monitorowanych przez EMCDDA (European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, 2021). Są to stymulanty ośrodkowego układu nerwowego; gdy przyjrzymy się trendom na rynku nielegalnych substancji dostrzeżemy, że z biegiem lat stają się one coraz bardziej popularne. W 2017 r. syntetyczne katynony stanowiły 24% wszystkich zgłoszonych przypadków konfiskat NSP w Europie, podczas gdy w 2018 r. liczba ta wzrosła do 36% (European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, 2019, 2020). Obecnie użytkownicy najczęściej kupują syntetyczne katynony przez Internet, rzadziej w specjalnych sklepach lub bezpośrednio od sprzedających je osób. Substancje te są sprzedawane w postaci krystalicznych proszków, kapsułek lub czasami tabletek i są zwykle oznaczone jako „nieprzeznaczone do spożycia przez ludzi”. To oznaczenie ma na celu obejście przepisów prawa oraz uniknięcie odpowiedzialności karnej (Pieprzycza, Skowronek, Niżnanski, Czekaj, 2020).

Powszechne stosowanie NSP sprawia, że metody ich identyfikacji i różnicowania muszą być szybkie, niezawodne, selektywne i czułe. Testy kolorymetryczne należą do najczęściej stosowanych metod analizy przesiewowej NSP. Ze względu na swą szybkość, niską cenę i prostotę, znalazły one zastosowanie w kontrolach drogowych, granicznych i lotniskowych, służą także do kontroli pracowników na stanowiskach pracy. Wiele laboratoriów analitycznych wykorzystuje tę technikę również do badań przesiewowych przed przeprowadzeniem bardziej złożonej analizy. Kolejną zaletą testów kolorymetrycznych jest ich mobilność i prostota etapu przygotowania próbek, ponieważ zazwyczaj składają się one z gotowych do użycia odczynników, które należy ze sobą zmieszać (Graziano, Anzillotti, Mannocchi, Pichini, Busardò, 2019; Nagy, Szöllösi, Szendrei, 2005). Niemniej jednak testy kolorymetryczne wykazują również szereg wad, które należy wziąć pod uwagę podczas przeprowadzania analizy. Przede wszystkim testy te w większości przypadków pozwalają zidentyfikować nie jeden związek, a całą ich

grupę, ponieważ wykrywają określoną grupę funkcyjną, która może być wspólna dla wielu związków. Ponadto testy kolorymetryczne wykazują wyniki fałszywie dodatnie i fałszywie ujemne, które wynikają z reakcji krzyżowych między reagentami (Graziano i in., 2019; Nagy i in., 2005). Na przykład test Zimmermanna jest zwykle używany do wykrywania benzodiazepin, ale daje również dodatnie wyniki w analizie katynonów (Graziano i in., 2019; United Nations Office, 2015). Test Marquisa jest powszechnie stosowany w wykrywaniu opiatów, takich jak morfina, kodeina i heroina, ale daje fałszywie dodatnie wyniki podczas analizy katynonów, innych fenyloetyloamin, a także syntetycznych kannabinoidów i piperazyny (Graziano i in., 2019; United Nations Office, 2015). Metoda kolorymetryczna Chen Kao może również wykrywać katynony, ale jej głównym celem jest wykrywanie efedryny, pseudoefedryny i norefedryny (Graziano i in., 2019; United Nations Office, 2015). W każdej analizie wymagana jest również kontrola dodatnia i ujemna w celu uzyskania pewności co do wyniku, a ponadto każde badanie należy potwierdzić bardziej selektywnymi i czułymi metodami, takimi jak chromatografia cieczowa sprzężona z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS) lub chromatografia gazowa sprzężona z tandemową spektrometrią mas (GC-MS/MS). Ponadto wyniki testów kolorymetrycznych są bardzo subiektywne, ponieważ nie każdy postrzeża dany kolor w ten sam sposób. Percepcja zależy od warunków oświetleniowych, a także od adaptacji oczu (Graziano i in., 2019; Nagy i in., 2005).

W artykule przedstawiono ograniczenia skuteczności badań kolorymetrycznych na przykładzie jednego z wariantów testu Simona, który wykorzystano do analizy próbek syntetycznych katynonów.

Materiały i metody

Materiały i odczynniki

Metanol klasy LC-MS zakupiono w firmie Witko, Łódź, Polska. Dwuwodny nitroprusydek sodu (czysty, do analizy) zakupiono w firmie Avantor Performance Materials Poland S.A. (Gliwice, Polska). Węglan sodu (o czystości 99,95%) zakupiono w firmie Chempur (Piekary Śląskie, Polska). Aldehyd octowy (o czystości 99,5%) zakupiono w firmie Sigma-Aldrich (Darmstadt, Niemcy).

Przygotowanie próbek

Przeanalizowano 163 próbki skonfiskowanych narkotyków. Obejmowały one 146 syntetycznych katynonów, 3 aminy trzeciorzędowe, jeden analog amfetaminy i 13 mieszanin różnych substancji. Wszystkie analizowane związki wraz ze skrótami ich nazw oraz liczbą próbek zestawiono w tabeli 1. Próbki skonfiskowanych narkotyków zostały wybrane na podstawie sprawy (każda próbka dotyczyła innej sprawy), czasu (sprawy od 2017 do 2021 r.) i miejsca (próbki zostały pobrane w różnych częściach kraju). Odważono 10–100 mg każdej próbki i rozpuszczono w 5 ml metanolu. Masa naważki była zależna od całkowitej masy skonfiskowanej próbki narkotyku. Wszystkie przygotowane próbki przechowywano w temperaturze 4°C. Większość przygotowanych roztworów była bezbarwna, jedna próbka (MDMA) była różowa, jedna (4-CEC) – blad różowa, a dwie próbki 4-CEC – bladoniebieskie. Przed wykonaniem testu kolorymetrycznego wszystkie próbki przeanalizowano metodą LC-MS/MS w celu identyfikacji nieznanego związku.

Procedura testu Simona

Do wykrywania MDMA zwykle stosuje się jeden wariant testu Simona, jednak ze względu na mechanizm reakcji (Ryc. 1) powstawanie niebieskiego zabarwienia po zmieszaniu wszystkich odczynników jest charakterystyczne dla wszystkich amin drugorzędowych (Nagy i in., 2005). W każdej próbce zastosowano następującą procedurę testu Simona: 50 µl metanoleowego roztworu próbki skonfiskowanego narkotyku przeniesiono do probówki Eppendorfa. Następnie dodano 50 µl mieszaniny odczynników (składającej się z 1 ml 2% roztworu nitroprusydku sodu i 100 µl aldehydu octowego) oraz 100 µl 2% roztworu węgla sodu. Przygotowany roztwór mieszało się za pomocą wortexu przez około 3 sekundy, a zmianę barwy próbki obserwowano natychmiast po jej przygotowaniu, następnie po 2 i po 5 minutach.

Wyniki

Analiza syntetycznych katynonów i analogu amfetaminy

Analiza 146 próbek syntetycznych katynonów i jednej próbki analogu amfetaminy dała 5 dodatnich wyników, tj. zmianę zabarwienia roztworu na niebieski (Ryc. 2). MDMA (Ryc. 2A), którą rutynowo wykrywa się za pomocą testu Simona, dała głęboki, niebieski kolor natychmiast po zmieszaniu wszystkich odczynników. Zabarwienie to pozostało niezmienione po 5 minutach analizy. W przypadku 4-MPD (Ryc. 2B) najpierw uzyskano biały, mętny roztwór, który po 2 minutach zmienił

barwę na niebieską. Warto wspomnieć, że kolor ten różnił się od pozostałych barw obserwowanych w przypadku dodatnich wyników. Dwa izomery pozycyjne chlorometkatynonu również wykazały ciemnoniebieskie zabarwienie natychmiast po zmieszaniu odczynników. Obejmowały one jedną próbkę 3-CMC (Ryc. 2C) i dwie próbki 4-CMC (Ryc. 2D). W przypadku obu izomerów można było zauważyć, że niebieski kolor ciemnieje w ciągu 5 pierwszych minut analizy.

Ogólne obserwacje przeprowadzone w teście Simona różniły się istotnie od siebie (Ryc. 3). Niektóre próbki przybierały brunatne zabarwienie z mniej lub bardziej widocznym odbarwieniem po 5 minutach (Ryc. 3E, 3I). W innych wytrąciły się w białe lub kremowe osady, które pozostały niezmienione (Rys. 3F) lub rozłożyły się (Ryc. 3D) w ciągu 5 minut. Kolejne wyniki obejmowały jasno- lub ciemnozielone zabarwienie próbek po 5 minutach (Ryc. 3B, 3C), a także jasnolimonkowe mętne roztwory (Ryc. 3H). Niektóre próbki natychmiast uległy odbarwieniu (Ryc. 3G), podczas gdy w innych nie zaobserwowano żadnych zmian, a roztwór pozostał lekko brunatny (Ryc. 3A).

Ciekawą obserwacją był fakt, że w obrębie jednej grupy substancji (Ryc. 4) wyniki testu Simona różniły się od siebie. Jedną z najliczniejszych grup analizowanych związków był 4-CEC. Biorąc pod uwagę zmiany barwy w tej grupie, w większości przypadków nie zaobserwowano zmian lub zaobserwowano tworzenie się białego mętnego roztworu, który stawał się bardziej klarowny po 5 minutach (Ryc. 4A). Co ciekawe, próbki różniące się barwą wyjściową dawały podobne wyniki, np. odbarwienie brunatnego roztworu, natomiast w przypadku różnych próbek o tej samej barwie wyjściowej obserwowano różne zmiany koloru. Na przykład jedna próbka stała się brunatna natychmiast po zmieszaniu odczynników i później odbarwiła się, a w drugiej wytrącił się biały osad i po 5 minutach uległa ona odbarwieniu (Ryc. 4B). 3-MEC wykazywał odbarwienie brunatnego roztworu lub nie wykazywał żadnych zmian w ciągu 5 minut analizy (Ryc. 4C). Próbki N-etyloheksedronu w teście Simona wykazywały różne zmiany barwy. Najczęściej obserwowano tworzenie się mętnego roztworu o barwie kremowej, mniej lub bardziej klarownego, natomiast tworzenie się jasnolimonkowego mętnego roztworu zdarzało się rzadziej (Ryc. 4D). W przypadku próbek meksedronu dochodziło do tworzenia się zielonego roztworu (Ryc. 4E), ale warto podkreślić, że uzyskane barwy różniły się od siebie – jedna próbka po 2 minutach miała oliwkowozielone zabarwienie, natomiast druga od razu zmieniła kolor na zielony, a z czasem stała się ciemniejsza. Różnice obserwowane w grupie 3-CMC polegały na odbarwieniu brunatnego roztworu lub przekształceniu bezbarwnego roztworu w mętny szarozielony roztwór (Ryc. 4F). Próbki N-etylopentadronu tworzyły mętne, białe i bezbarwne roztwory (Ryc. 4G), podczas

gdy próbki N-etylopentylonu również były bezbarwne lub tworzyły kremowe, mętne roztwory (Ryc. 4H).

Analizując wyniki badań syntetycznych katynonów należących do różnych grup związków (Ryc. 5), można zauważyć, że podobne zmiany barwy zaobserwowano w obrębie różnych grup związków, np. także 3-MEC, 4-CEC, 4-CMC i 3-CMC wykazywały odbarwienie brunatnego roztworu.

Analiza amin trzeciorzędowych

Analiza trzech próbek amin trzeciorzędowych: α -PiHP, 4-Cl- α -PVP i dibutylonu dała podobne wyniki (Ryc. 6A). Natychmiast po zmieszaniu wszystkich odczynników roztwory były lekko brunatne lub kremowe, a po 5 minutach wszystkie stały się ciemniejsze. Dla porównania na rycinie 6B przedstawiono wynik dla 3-MEC, który jest podobny do zmian barwy obserwowanych w przypadku amin trzeciorzędowych.

Analiza mieszanin substancji

Przeanalizowano mieszaniny trzech głównych związków: 4-EEC, 3-CMC i 4-CMC z różnymi dodatkami (Ryc. 7). 4-EEC (Ryc. 7A) wykazywał zróżnicowane zmiany barwy w zależności od obecności innych substancji: w pierwszej próbce zaobserwowano odbarwienie roztworu brunatnego, druga pozostawała brunatna przez 5 minut analizy, podczas gdy trzecia zmieniła barwę na zieloną natychmiast po zmieszaniu wszystkich odczynników. W przypadku mieszaniny 3-CMC (Ryc. 7B) z 4-CMC, jak również z etizolamem roztwór był klarowny i bezbarwny przez całe 5 minut analizy, podczas gdy dodanie klonazolamu skutkowało uzyskaniem początkowo jasnobrunatnego, a po 5 minutach ciemnobrunatnego roztworu. W próbkach 4-CMC (Ryc. 7C) zarówno z etizolamem i klonazolamem, jak i z NEP zaobserwowano jasnobrunatne zabarwienie. Po 5 minutach oba roztwory odbarwiały się.

Analiza statystyczna

Wyniki analizy wszystkich syntetycznych katynonów, analogów amfetaminy i mieszanin przedstawiono na rycinie 8 wraz z procentowym udziałem każdej zmiany barwy. 5 próbek, w przypadku których uzyskano dodatni wynik (ciemnoniebieskie zabarwienie), stanowiło około 3% wszystkich analizowanych próbek, które w przypadku uzyskania wyniku dodatniego powinny zabarwić się na ciemnoniebiesko. Najczęstszą zmianą barwy było odbarwienie jasnobrunatnego roztworu (33% wszystkich analizowanych próbek). Mniej niż jedna trzecia analizowanych próbek (23%) przybrała jasnobrunatną barwę i pozostała niezmienną przez 5 minut analizy. W przypadku 16 próbek, co stanowi 11% całości,

zaobserwowano tworzenie osadów o kremowej barwie, natomiast 9 próbek (6%) wykazało wytrącenie się białych osadów, które z czasem ciemniały. Pojedyncze próbki wykazywały zmianę barwy roztworu z jasnobrunatnej na zieloną (4%), ciemnobrunatną (3%) lub mętnią (3%). W przypadku 14% wszystkich analizowanych próbek uzyskano liczne i różnorodne wyniki, które szczegółowo przedstawiono na rycinie 8.

Dyskusja

Wydaje się, że istnienie nowych substancji psychoaktywnych jest problemem obecnym na całym świecie. Problem ten poruszyli między innymi Rojek, Korczyńska-Albert, Kulikowska i Kłys (2017). Przypadki zatruc śmiertelnych i niezakończonych zgonem (Adamowicz, Jurczyk, Gil, Szustowski, 2019; Rojek, Kłys, Maciów-Głęb, Kula, 2017; Nowak, Szpot, Zawadzki, 2021) wymagają opracowania selektywnych i czułych metod oznaczania NSP (Sekula, Zuba, Lorek, 2018; Siczek, Zawadzki, Siczek, Chłopaś-Konowalek, Szpot, 2020; Zawadzki, Wachełko, Chłopaś-Konowalek, Szpot, 2021), ale też szybkich i prostych metod przesiewowych. Wspomniane wcześniej sytuacje (np. kontrole drogowe i graniczne, na lotniskach i w zakładach pracy) wymagają uzyskania szybkich wyników, dlatego badania kolorymetryczne, które zapewniają błyskawiczną obserwację wyników, a zmiana kolorów następuje w ciągu kilku minut, wydają się optymalnym wyborem. Łatwe jest również przygotowanie próbki – do przeprowadzenia takiej analizy nie jest potrzebne żadne specjalistyczne ani złożone szkolenie. W ten sposób po krótkim instruktażu badanie kolorymetryczne jest w stanie wykonać nie tylko wysoko wykwalifikowana kadra, jest ono również możliwe do przeprowadzenia poza laboratorium przez pracodawców, straż graniczną i policję. Zastosowanie w wielu dziedzinach umożliwi mobilność testów kolorymetrycznych, która pozwala na wykrycie nieznannej substancji w niemal każdych okolicznościach. Wszystkie wyżej wymienione zalety znalazły zastosowanie w oznaczaniu NSP, np. opiatów, amfetamin, syntetycznych katynonów, kokainy, kannabinoidów i piperazyny (Cuypers, Bonneure, Tytgat, 2016; Philp, Fu, 2018).

Jednak na podstawie przeprowadzonej przez autorów niniejszej pracy analizy powyższe stwierdzenia nie odnoszą się do analizy NSP. Wykazano, że bardzo mało próbek dało przewidywane pozytywne wyniki. Jedynie w przypadku 3%, tj. 5 próbek czterech różnych związków, po przeprowadzeniu testu Simona uzyskano niebieskie zabarwienie. Należy podkreślić, że obserwacje te były bardzo subiektywne. Jak pokazano na rycinie 2B, 4-MPD dawał inną barwę niż reszta próbek oznaczonych jako dodatnie – był to jaśniejszy, błękitny odcień niebieskiego i można go interpretować na dwa sposoby. Jeden

analitik mógłby uznać ten wynik za dodatni, podczas gdy inny mógłby go zinterpretować jako ujemny. Wskazuje to na potrzebę przygotowania kontroli dodatnich i ujemnych przed jakąkolwiek analizą. Zważywszy na wszystkie uzyskane wyniki, niepokojący wydaje się fakt, że wyniki testu Simona są bardzo zróżnicowane. Wyniki dla jednej grupy związków różnią się od siebie, nie ma zatem widocznego wzorca obserwacji związanych z jedną konkretną grupą związków, który mógłby być przydatny w identyfikacji tej grupy nawet bez oczekiwanego niebieskiego zabarwienia. Obserwacje te obejmują zmianę barwy, odbarwienie, tworzenie się osadu lub wytrącenie osadów w różnych kolorach. Warto również zauważyć, że roztwory wyjściowe o różnych barwach dawały podobne wyniki (Ryc. 4B), podczas gdy roztwory wyjściowe 4-CEC o tej samej barwie dawały różne wyniki: jedna próbka była brunatna, a następnie odbarwiła się, natomiast w drugiej wytrącił się biały osad, a po 5 minutach zmieniła się ona w klarowny roztwór. Dlatego trudno jest jednoznacznie postawić hipotezę, że barwa roztworu wyjściowego ma wpływ na wynik końcowy. Potrzebne są dalsze badania w tym zakresie, ponieważ w omawianym badaniu większość próbek występowała w postaci klarownych roztworów, zatem powyższa hipoteza opiera się tylko na analizie trzech próbek. Biorąc pod uwagę różne związki, np. 3-MEC, 4-CEC, 4-CMC i 3-CMC (Ryc. 5), można uznać, że wyniki testu Simona były bardzo zbliżone, zatem odróżnienie tych związków od siebie było niemożliwe.

Ciekawe i warte wspomnienia jest różnicowanie izomerów pozycyjnych, gdyż w niektórych krajach powszechne jest, że jeden izomer jest legalny, a inny może być nielegalny. Na podstawie przeprowadzonej analizy nie można odróżnić 4-CMC od 3-CMC. Jednak różnicowanie izomerów pozycyjnych jest możliwe przy użyciu spektrofotometrii w ultrafiolecie (UV), która jest również metodą prostą i szybką, pozbawioną skomplikowanego etapu przygotowania próbki. Zuba i Adamowicz (2016) wykonali analizę chromatograficzną w celu rozróżnienia pozycyjnych izomerów metylometkatynonu. Uzyskane widma UV wskazują, że rozróżnienie 2-, 3- i 4-metylo-metkatynonu tylko na podstawie ich widm UV jest możliwe. Aminy trzeciorzędowe analizowano w celu zbadania wyników negatywnych. Zgodnie z oczekiwaniami roztwór pozostawał brunatny lub stawał się ciemniejszy po 5 minutach. Jednak duża liczba (23%) amin drugorzędowych również dała podobne wyniki, stąd brak zmiany barwy nie może być interpretowany jako wynik ujemny. W konsekwencji nawet uzyskawszy ujemny wynik kontrolny, analitik nie jest w stanie stwierdzić, czy analizowana próbka zawiera aminę drugorzędową czy wynik jest fałszywie ujemny. Wreszcie, gdy weźmie się pod uwagę mieszaniny różnych substancji, można dostrzec, że każda z różnych mieszanin 4-EEC (Ryc. 7A) dawała inne wyniki, podczas gdy mieszaniny 3-CMC (Rys. 7B)

z 4-CMC i etizolamem wykazywały podobne zmiany barwy, ale dodanie etizolamu z klonazolamem spowodowało inną zmianę barwy. 4-CMC (Ryc. 7C) zmieszany z dowolnym związkiem dawał podobne wyniki. Uzyskane wyniki są zatem niejednoznaczne i nie można stwierdzić, czy dodatek innego związku ma wpływ na wynik testu Simona.

Wykazano, że testy kolorymetryczne, poza niepodważalnymi zaletami, mają szereg ograniczeń. Najważniejszym z nich jest brak selektywności oraz występowanie wyników fałszywie dodatnich i fałszywie ujemnych. Chociaż metoda ta jest szybka i łatwa w wykonaniu, nie daje jednoznacznych wyników, dlatego należy je potwierdzić innymi technikami analitycznymi, takimi jak LC-MS/MS czy GC-MS/MS. Testy kolorymetryczne mogą służyć jako podstawowa, przesiewowa metoda analizy nieznannej substancji, ale uzyskane wyniki – zarówno dodatnie, jak i ujemne – należy interpretować z ostrożnością.

Wnioski

Testy kolorymetryczne, choć szybkie, proste, mobilne i stosowane w wielu różnych dziedzinach, nie są wolne od ograniczeń, takich jak niska selektywność oraz uzyskiwane w nich wyniki fałszywie dodatnie i fałszywie ujemne. Opisywane w niniejszym artykule badanie, oparte na autentycznych skonfiskowanych próbkach syntetycznych katynonów analizowanych za pomocą testu Simona, wykazało, że w testach kolorymetrycznych występuje bardzo niski odsetek wyników dodatnich (3%), a także że powszechne są wyniki fałszywie ujemne (88%). Co więcej, w przypadku próbek należących do jednej grupy związków nie zaobserwowano prawidłowości zmian barwy. Wreszcie, przy przeprowadzaniu takiej analizy należy zawsze brać pod uwagę fakt, że obserwacje wykonane w testach kolorymetrycznych są bardzo subiektywne, a zatem zawsze należy potwierdzać je innymi, bardziej specyficznymi metodami, takimi jak LC-MS czy GC-MS.