

## Z warsztatów badawczych i doświadczeń klinicznych

Bogdan Szukalski, Ewa Mirkiewicz  
Zakład Biochemii Instytutu Psychiatrii i Neurologii  
w Warszawie

# OZNACZANIE NARKOTYKÓW W MATERIALE BIOLOGICZNYM - ŚLINIE I WŁOSACH

### Wstęp

Tradycyjnymi materiałami biologicznymi używanymi do potwierdzania lub wykluczania obecności narkotyków w ustroju są: surowica, osocze krwi i mocza. Jednakże informacje otrzymane w wyniku analizy każdego z tych płynów są różne. Oznaczenia w osoczu dostarczają aktualnej oceny stężenia, podczas gdy w moczu rejestrujemy stężenia składników „zagęszczonych” po ostatnim opróżnieniu pęcherza. Ponadto stężenie badanych substancji w moczu zależy w znacznym stopniu od ilości wypitych płynów. Mimo to mocza jest najczęściej używanym materiałem do wykrywania leków i narkotyków w ustroju, gdyż nieinwazyjny sposób pobierania oraz dostępność materiału pozwala bez kłopotu stosować go w badaniach rutynowych. Kłopotliwą i ciągle dyskutowaną pozostaje jednak sprawa pobierania próbek moczu, które z uwagi na możliwość zafalszowań musi często odbywać się pod kontrolą i dlatego jest traktowane jako „pogwałcenie prywatności”.

Wprowadzenie do laboratoriów b. czułych metod analitycznych - radioimmunologicznych, immunoenzymatycznych, immunofluorescencyjnych i innych umożliwiło wykorzystanie jako materiału do oznaczania leków i narkotyków - poza osoczem, surowicą i moczem - także śliny i włosów.

### Analiza narkotyków w ślinie

Zainteresowanie śliną jako materiałem przydatnym do wykrywania i oznaczania leków wynika z faktu, że można ją użyć do badań farmakokinetyki i biodostępności leków oraz monitorowania ich poziomu we krwi ponieważ stężenia wielu leków w ślinie są proporcjonalne do ich stężeń we krwi. Ślina może być również użyta do kontroli abstynencji narkomanów poddawanych

terapii metadonowej oraz ustalenia rodzaju narkotyków przyjętych przez narkomanów, którzy zgłaszają się w stanach zatrucia do oddziałów detoksykacyjnych.

Oznaczenie leków i narkotyków w ślinie posiada szereg zalet w porównaniu z oznaczaniem ich w materiale konwencjonalnym tj. osoczu, surowicy i moczu:

- ślinę można otrzymać w potrzebnej ilości, wielokrotnie w ciągu dnia, bez ryzyka infekcji, bez bólu i stresu związanego z ukłuciem i dyskomfortu w przypadku wynaczynień i obrzęku żyły w miejsca wprowadzenia igły,
- jej pobranie nie wymaga stosowania aseptyki, sterylnych strzykawek, udziału fachowego personelu,
- pobranie próbek może następować w ambulatorium, bez kontroli lekarskiej,
- w porównaniu z moczem pobieranie śliny nie jest związane z pogwałceniem prywatności,
- w przeciwieństwie do moczu nie zachodzi obawa zafałszowania materiału.

Ponadto wiele leków i narkotyków wiąże się w znacznym stopniu z białkami, a więc wyniki ich oznaczeń we krwi, w której zawartość białek wynosi 7,3 g/10 mL, stanowią sumę frakcji związanej i farmakologicznie aktywnej frakcji wolnej. Natomiast ślina jest ultraprzesączem płynu tkankowego o b. niskiej, bo rzędu 0,3 g/100 mL, zawartości białek, zawiera więc głównie cząsteczki narkotyku w postaci wolnej i dzięki temu dostarcza dokładniejszych danych na temat stopnia aktualnej intoksykacji. Dlatego coraz częściej wykorzystuje się ślinę jako materiał do badania obecności leków i narkotyków w ustroju [23].

Ślina jest wytwarzana przez trzy duże parzyste gruczoły ślinowe: przyusznice, podżuchwowe i podjęzykowe oraz szereg gruczołów drobnych. Skład śliny różni się w zależności od rodzaju gruczołu, pory dnia, diety, wieku, płci i ewentualnie intensywności i czasu trwania stymulacji oraz stanu chorobowego.

Chociaż opracowano specjalne urządzenia do pobierania śliny z poszczególnych gruczołów, pozwalające uzyskać płyny o bardziej stałym składzie, w praktyce zbiera się zwykle ślinę mieszaną, która w 25% pochodzi z gruczołów przyusznych, w 71% z gruczołów podżuchwowych i w 4% z gruczołów podjęzykowych.

Dobowa produkcja śliny wynosi 500-1500 mL przy szybkości wypływu ok. 0,6 mL/min. Obserwuje się duże różnice osobnicze; pH śliny waha się od 5-8.

Najważniejszymi składnikami śliny, oprócz wody i elektrolitów, są mucyna i enzym amylaza. Produkcję śliny można przyspieszyć przez żucie gumy, taśmy teflonowej, wzięcie do ust kryształka kwasu cytrynowego lub ssanie kwaśnych cukierków.

Są dowody, że wiele leków przechodzi do śliny na zasadzie biernej dyfuzji i że rozpuszczalność w lipidach może być decydującym czynnikiem dla ich obecności w ślinie. Przedostawanie się z krwi do śliny kwasowych i zasadowych związków rozpuszczalnych w lipidach zależy od ich stopnia dysocjacji w tych płynach, ponieważ tylko niejonizowana postać leku może przenikać przez błony biologiczne. Stosunek stężenia leku w ślinie do stężenia w osoczu (s/o) można wyliczyć z wartości  $pK_a^*$  związku oraz pH krwi (7,4) i śliny (5-8) opierając się na równaniu Hendersona-Hasselbalcha według następujących wzorów:

$$\frac{S}{O(kw.)} = \frac{1 + 10^{(pH \text{ śl.} - pK_a)}}{1 + 10^{(pH \text{ os.} - pK_a)}}$$

$$\frac{S}{O(zas.)} = \frac{1 + 10^{(pK_a - pH \text{ śl.})}}{1 + 10^{(pK_a - pH \text{ os.})}}$$

Np. stężenie w ślinie słabo kwaśnego fenobarbitalu jest niższe niż w osoczu wskutek różnicy pH obu płynów. Z podobnych powodów stężenia leków słabo zasadowych są wyższe w ślinie niż w osoczu.

Wzrost pH śliny powoduje jednak zmianę tego stosunku. Np. s/o słabo zasadowego prokainamidu o  $pK_a = 9,4$  zmienia się z 0,27 do 8,93 ze wzrostem pH śliny od 6,3 do 8,0 [42].

Do badania narkotyków zastosowano ślinę po raz pierwszy w 1974 r. [16]. Szczególna przydatność tego materiału została uznana w przypadku badania kierowców podejrzanych o przyjmowanie narkotyków [39].

Najczęściej używanymi narkotykami są kanabinoły. Podwyższone poziomy tetrahydrokanabinolu (THC) -aktywnego składnika marihuany- znaleziono u ludzi palących marihuanę zarówno w osoczu (14,4%) [48] jak i w ślinie (9%) [33].

Próby oznaczania THC w ślinie podejmowano jeszcze na początku lat siedemdziesiątych [24], przy czym udawało się wykrywać ten związek nawet za pomocą TLC odznaczającej się przecież niezbyt wysoką czułością. Stosowano również inne metody: wysokosprawną chromatografię płytkową (HPTLC) [40], chromatografię gazową (GC) [28] i testy immunologiczne [18].

\*  $pK_a$  jest to ujemny logarytm ze stałej dysocjacji związku

Wyniki badania metodą radioimmunologiczną (RIA) 352 próbek śliny zebranych od ochotników: 25 mężczyzn i 10 kobiet wskazują, że oznaczenia w ślinie dość dobrze odzwierciedlają poziom THC w osoczu nawet, jeśli brak ścisłej korelacji między nimi. Stosunek stężeń THC i 11-hydroksy  $\Delta^1$ -THC w ślinie i osoczu, wyliczony w oparciu o stałe dysocjacji tych substancji i równanie Hendersona-Hasselbalcha, wynosi ok. 0,1 [23] i odbiega znacznie od wartości otrzymanych w wyniku oznaczeń tych substancji w obu płynach, które wynoszą i nawet wartość tę przekraczają [40]. Ta wysoka zawartość THC w ślinie nie jest wynikiem przechodzenia związku z osocza, gdyż podany dożylnie znakowany THC nie został w ogóle w ślinie wykryty [21]. Wydaje się więc, że THC i jego metabolity nie dostają się do śliny z krwi, lecz gromadzą się w jamie ustnej podczas palenia marihuany.

Kanabinole występują w ślinie przez ok. 14 godz. po użyciu [18], a więc znacznie krócej niż w moczu, w którym zależnie od dawki i częstości przyjmowania można je wykryć przez 5-20 dni. W innej pracy wykrywano w ślinie stężenia THC od 5-330 ng/mL [40] przez 8 godzin po paleniu, chociaż przy użyciu testów jakościowych można było stwierdzić jego obecność przez 14 godzin. Jednakże wykrycie narkotyku niemal bezpośrednio po jego użyciu nie jest możliwe za pomocą analizy moczu. W takich przypadkach ślina jest materiałem z wyboru.

Niewiele wiadomo o składzie metabolitów kanabinoli w ślinie. THC ulega w wątrobie enzymatycznej przemianie w kwas 11 - nor- $\Delta^9$ -THC-9-karboxylowy (THC-COOH), który występuje we krwi i jest głównym metabolitem w moczu [21]. Dlatego też analizę zaleca się jako badanie confirmacyjne próbek, które w testach skriningowych uznano za dodatnie [13]. Dotychczasowe badania wskazują, że ślina osób palących marihuanę zawiera śladowe ilości kilku metabolitów kanabinoli. Badano mocz i próbki śliny pobrane od takich osób. Próbka moczu zawierała jedynie THC-COOH, natomiast w ślinie wykryto 3 metabolity:  $\Delta^9$  - tetrahydrokanabinol (THC), kanabinol (CBD) i 11-hydroksy- $\Delta^9$ -THC (THC-OH).

Ponieważ wydaje się, że kanabinole nie przenikają z osocza do gruczołu ślinowego [21], metabolity THC wykrywane w ślinie mogą pochodzić bezpośrednio z dymu palonej marihuany, lub są wynikiem metabolizmu zachodzącego w jamie ustnej. Tym niemniej wyniki dotychczasowych badań dowodzą, że obecność tych metabolitów w ślinie jest dobrym wskaźnikiem aktualnego stosowania marihuany. Obawy budzą jedynie możliwości całkowitego usuwania śladów tych substancji z jamy ustnej. Jednakże normalna

dieta i płyny nie wpływają w sposób istotny na wynik analizy kanabinoli w ślinie [40]. Czy stężenie metabolitów kanabinoli może ulec istotnemu obniżeniu w wyniku płukania ust, np. alkoholem, jak to sugerowano [37], ustalać dopiero kolejne badania.

We wcześniejszych badaniach wykrywano w ślinie podawaną doustnie znakowaną kokainę nie było jednak pewności czy przechodzi ona do śliny z krwi. Dalsze prace dowiodły, że kokaina występuje w ślinie również po dożylnym podaniu narkotyku, co ostatecznie przesądza jej pochodzenie [7]. Stężenie kokainy w ślinie jest na ogół wyższe niż w osoczu, chociaż doniesiono również, iż stosunek stężeń (s/o) wynosił 0,5 [41].

Wyliczony teoretycznie stosunek stężeń ślina/osocze jest dla kokainy wysoki, jednak przewidywanie dystrybucji w oparciu o model biernej dyfuzji nie zawsze zgadza się z faktami eksperymentalnymi [23], gdyż na proces ten wpływa prawdopodobnie również rozpuszczalność kokainy w lipidach błon komórkowych gruczołu ślinowego oraz - być może - mechanizmy ewentualnego transportu aktywnego.

Testy immunologiczne pozwalają wykryć kokainę w ślinie 5-10 dni po odstawieniu [8]. Zalecany przez NIDA poziom cut-off dla kokainy i jej metabolitów w moczu (300 mg/mL) [13] występował w ślinie jeszcze przez 1-4 dni po przerwaniu podawania [8].

Jednoczesne oznaczanie morfiny w ślinie, osoczu i moczu pół godziny po domięśniowym podaniu narkotyku w dawce 10 mg dało wyniki, odpowiednio, 11 ng/mL, 66 ng/mL i 1100 ng/mL. Po podaniu heroiny jej główny metabolit - morfinę wykrywano w ślinie przez krótszy okres czasu (1-2 godz.) [9] niż w osoczu (2-4 godz.) [16].

3 godz. po doustnym podaniu 30 mg fosforanu kodeiny jej poziom w ślinie wynosił 120ng/mL [36]. Stężenie w ślinie było wyższe niż w osoczu, przy czym zanotowano duże różnice osobnicze stosunku s/o - od 2 do 6,6, przy średniej wynoszącej 3. W innej pracy stwierdzono bardzo zbliżone stężenia kodeiny w ślinie i osoczu [9]. Różnice mogą wiązać się z metodą użytą do oznaczeń: w pierwszym przypadku była to chromatografia gazowa, a w drugim metoda radioimmunologiczna, w której użyte przeciwciała mogło wykazywać reakcje krzyżowe z metabolitami. Ponadto kodeina jest słabą zasadą i dlatego pH śliny może wpływać na stosunek stężeń w ślinie i osoczu, wywołując wspomniane różnice.

Jeśli idzie o syntetyczny opioid - metadon to pierwsze prace opublikowane w latach 70-tych sugerowały, że nie jest możliwe monitorowanie jego

poziomów w płynach biologicznych, gdyż u pacjentów otrzymujących jednakową dawkę metadonu występują bardzo znaczne wahania jego stężenia we krwi [22].

El-Guebały i wsp.[12] nie potwierdzili występowania takich wahań, wykazali natomiast czterokrotnie wyższe stężenie tego związku w ślinie niż we krwi, co mogłoby wskazywać, że przechodzenie metadonu z krwi do śliny jest procesem aktywnym.

Kang i Abbott [25] w pracy opublikowanej rok później podają, że stosunek stężeń metadonu w ślinie i osoczu wynosi 0,5 przy ich doskonałej korelacji. Po podaniu metadonu w dawce 90 mg autorzy znajdowali po 24 godzinach stężenie metadonu w ślinie równe 200 ng/mL.

Wolff i wsp. [46] stwierdzili niedawno występowanie liniowej zależności między stężeniem metadonu we krwi i jego dawką wyrażoną w mg/kg wagi ciała oraz niewielkie tylko wahania osobnicze. Ponadto udało się ustalić i potwierdzić, że objawy odstawienne pojawiają się, gdy stężenie metadonu we krwi spada poniżej 50 ug/L. Stwarza to szansę optymalizacji terapii metadonowej w oparciu o wyniki oznaczeń laboratoryjnych. Z uwagi na mankamenty związane z pobieraniem krwi autorzy sugerują, że ślina jako materiał pobierany nieinwazyjnie byłaby do tych badań wygodniejsza, zwłaszcza, że dla leków, które przechodzą z krwi do śliny na drodze biernej dyfuzji stwierdza się liniową zależność między stężeniami w obu tych płynach. Dla metadonu relacje te są prawdopodobnie bardziej złożone. Ci sami autorzy [47] oznaczali ostatnio metadon we krwi i ślinie u 21 pacjentów poddawanych długotrwałej terapii metadonem. Ślinę (1-3 mL) i krew (10mL) pobierano przed każdorazowym podaniem pacjentom metadonu, a do oznaczeń zastosowano metodę HPLC. Pobieranie i przechowywanie śliny było jednak utrudnione ze względu na dużą lepkość, jaką odznacza się ślina nałogowych palaczy, którzy stanowili znaczną część badanej grupy pacjentów. Mniejszą lepkość wykazuje ślina mieszana, tj. zbierana w wyniku stymulacji. Zmniejszanie lepkości oraz większą klarowność śliny można również uzyskać umieszczając ją na 24 godz. w temperaturze -40°C.

Autorzy nie potwierdzili wyników El-Guebały i wsp. (12) o czterokrotnie wyższym stężeniu metadonu w ślinie niż w osoczu. Na dużo większym materiale i przy użyciu czulszej metody analitycznej wykazali oni, że stosunek ten waha się od 1,3 - 1,0. Stwierdzono ponadto dobrą korelację między stężeniami metadonu w ślinie i jego dawką. Stężenie leku wzrastało średnio o 507<sub>1</sub>ug/L przy wzroście dawki o 1 mg/kg (współczynnik korelacji  $r=0,8$ ,  $p<0,001$ ), co

wskazuje na zależność liniową. Wzrostowi stężenia metadonu w osoczu o 1  $\mu\text{g/L}$  towarzyszył wzrost jego stężenia w ślinie o 1,3  $\mu\text{g/L}$ .

W związku z obserwowaną obecnie tendencją obejmowania terapią meta-donową coraz większej liczby osób uzależnionych od opioidów, konieczne będzie częste wykonywanie u nich oznaczeń metadonu. Zastosowanie do tych oznaczeń śliny zamiast krwi wydaje się znacznie mniej kłopotliwe zarówno dla pacjentów jak i lekarzy.

W wielu pracach wykazano również przydatność śliny jako materiału do oznaczania benzodiazepin, przy czym korelacja stężeń w ślinie i osoczu stwierdzana przez poszczególnych badaczy była b. różna: doskonała, umiarkowana i słaba. Ślinę wykorzystywano również w celu wykrywania benzodiazepin w badaniu skriningowym [33].

Przy oznaczaniu benzodiazepin w ślinie należy rozważyć sprawę ich wiązania z białkami. Np. w osoczu aż 97 % diazepamu występuje w postaci kompleksów z białkami. Dlatego ślina, jako ultraprzesącz krwi, powinna zawierać tylko 3 % zawartości leku we krwi. Niektórzy badacze potwierdzili to zjawisko inni jednak znajdowali stężenia wyższe [14] lub niższe [19]. Za przyczynę tych rozbieżności uznaje się wiązanie benzodiazepin z białkami śliny [34]. Inną przyczyną rozbieżności może być redukcja grup nitrowych przynajmniej niektórych benzodiazepin, np. nitrazepamu i klonazepamu [36]. Niskie stężenie benzodiazepin można mierzyć metodą radioreceptorową przy użyciu homogenizowanych komórek kory mózgowej szczurów. Wyniki otrzymane tą metodą są zgodne z wynikami otrzymanymi metodą chromatografii gazowej [26].

Półokres trwania amfetaminy w osoczu jest w znacznym stopniu zależny od kwasowości moczu, ponieważ szybkość eliminacji przez nerki zmienia się znacznie w zależności od pH moczu. Ponieważ w ślinie osób stosujących amfetaminę występuje wysokie stężenie tego związku (stosunek stężenia w ślinie do stężenia w osoczu wynosi 3), a wydalanie leku zależy od pH moczu, ślinę zaleca się jako materiał z wyboru do oznaczania amfetaminy. 50 godz. po podaniu 10 mg amfetaminy wykrywano ją w ślinie w stężeniu 20-50 mg/mL.

O ile jednak metody immunologiczne pozwalają na skuteczne wykrywanie amfetaminy w ślinie, chromatografia płytkowa, z uwagi na dość niską czułość, jest mało przydatna [43].

Badano również występowanie w ślinie pochodnych kwasu barbiturowego: amobarbitalu, sekobarbitalu, fenobarbitalu i pentobarbitalu [36]. Stosu-

nek stężeń amobarbitalu, sekobarbitalu i heksobarbitalu w ślinie i osoczu (s/o) waha się w granicach 0,3-0,4. Ponieważ wartości pKa barbituranów różnią się w granicach 7,4-8,3, ich przechodzenie do gruczołów ślinowych zależy od pH. Półokres trwania amobarbitalu i pentobarbitalu w ślinie wynosi, odpowiednio, 24 godz. i 18 godz. [11], natomiast dla heksobarbitalu - 3,3 godz. 50 godz. po doustnym podaniu 120 mg amobarbitalu stężenie leku w ślinie wynosiło 100 ng/mL.

## Wnioski

Materiałem biologicznym najczęściej wykorzystywanym do wykrywania i oznaczania narkotyków w organizmie pozostaje mocz, gdyż jest łatwy do uzyskania. Jednakże ślina ma również szereg zalet. Podobnie jak mocz, może ona być pobrana od pacjenta z wyeliminowaniem potencjalnego niebezpieczeństwa infekcji, jednakże użycie śliny eliminuje ponadto problem pogwałcenia prywatności pacjenta i w znacznym stopniu ogranicza możliwość zafałszowania materiału. Zbiórka śliny, wykonana właściwie, nie wymaga specjalnych pomieszczeń i ścisłego nadzoru. Zwłaszcza z użyciem urządzenia do zbierania ultrafiltratu możliwa jest estetyczna zbiórka bez plucia, u wielu pacjentów równocześnie, w jednym pomieszczeniu, pod nadzorem jednej osoby kontrolującej. Choć możliwości zafałszowania próbki nie da się całkowicie wykluczyć, jest b. mało prawdopodobne, aby którykolwiek ze sposobów stosowanych do zafałszowania moczu mógł być zastosowany do śliny. Wyeliminowanie możliwości zafałszowania próbek śliny znacznie obniża koszty pobierania.

W przeciwieństwie do moczu, ślina może być użyta do określania aktualnego (tj. w momencie pobrania) stężenia narkotyku lub jego metabolitów nie związanych z białkami. Ponieważ półokresy trwania metabolitów różnią się, określenie stosunku stężeń różnych metabolitów w ślinie może pomóc w ustaleniu czasu przyjęcia narkotyku. Pewnym mankamentem śliny jako materiału do oznaczania narkotyków jest to, że utrzymują się one w ślinie znacznie krócej niż w moczu. Ponieważ stężenia narkotyków w ślinie są na ogół niższe niż w moczu - metody analityczne używane powszechnie do oznaczeń w moczu nie mogą być bezkrytycznie stosowane do badania śliny. Z drugiej strony nie wydaje się, aby istniały jakieś techniczne ograniczenia przy oznaczaniu narkotyków i ich metabolitów w ślinie ogólnie dostępnymi metodami. Np. metody immunologiczne są wystarczająco czułe, aby wykryć te substancje w niee-



kstrahowanych próbkach materiału, a GC/MS można dostosować do ilościowych oznaczeń narkotyków w stężeniach rzędu pikogramów na mililitr. Dalsze badania powinny zmierzać do tego, by oznaczenia w ślinie dawały możliwość rozróżniania przewlekłych i okazjonalnych biorców narkotyków, ponieważ stężenie narkotyku we krwi u osób długotrwale uzależnionych jest zwykle wyższe niż u okazjonalnych biorców.

### **Analiza narkotyków we włosach**

Włos składa się z części ukrytej w skórze, tzw. korzenia, zakończonego cebulką włosową oraz części znajdującej się nad powierzchnią skóry, tj. łodygi albo trzonu. Skład chemiczny włosów waha się w bardzo szerokich granicach, można jednak przyjąć następujące wartości średnie: woda 4-13 %, białka (z b.wysoką zawartością aminokwasów siarkowych) 85-93 %, lipidy 2-3 % i popiół 0,23-0,80 %. Średnia szybkości wzrostu włosów wynosi 0,45mm/dobę i zależy od rasy, odżywiania, czynników fizjologicznych i patologicznych.

Próby wykrywania we włosach różnych obcych dla organizmu substancji, zwłaszcza trucizn i leków, podejmowano od bardzo dawna. Już w r. 1875 Casper [6] opisał w swoim słynnym *Praktisches Handbuch der gerichtlichen Medizin* analizę włosów w celu wykrycia arsenu. Dopiero jednak prawie 100 lat później opisano po raz pierwszy wykrywanie we włosach świnki morskiej substancji organicznych - barbituranów (cyt. za 29).

Ostatnio przedmiotem dużego zainteresowania badaczy stało się wykorzystanie próbek włosów do wykrywania obecności narkotyków w ustroju, ponieważ włosy jako materiał biologiczny mają szereg zalet w porównaniu z krwią i moczem. Narkotyki pozostają w trzonie włosa b. długo, a więc „okienko detekcji” tj. czas, w którym można je wykryć, jest znacznie szersze (miesiące, lata) niż w przypadku moczu i krwi (godziny i dni). Tak więc pacjenci, którzy brali narkotyki w poprzednich tygodniach, a powstrzymali się od ich brania przed samym badaniem będą mieli wynik dodatni we włosach, a ujemny w moczu. Ponadto rzadkie stosowanie narkotyków, b. trudne do wykrycia za pomocą badania moczu, daje się wykryć dzięki badaniu włosów. W takich przypadkach nawet przy użyciu niskich dawek analiza włosów wykrywa znacznie więcej osób przyjmujących narkotyki niż analiza moczu. Dowodem na długotrwałą stabilność narkotyków we włosach jest wykrycie kokainy we włosach mumii liczącej ponad 4000 lat [5].

A oto inne zalety stosowania włosów jako materiału do wykrywania i oznaczania narkotyków w ustroju:

- pobieranie próbek włosów ma charakter nieinwazyjny i jest czynnością bardzo prostą,
- nie narusza prawa prywatności, w przeciwieństwie do pobierania moczu, które z uwagi na możliwość zafalszowania materiału wymaga kontroli drugiej osoby,
- w przypadku włosów nie ma w zasadzie praktycznych możliwości zafalszowania próbki,
- zagubione lub zanieczyszczone próbki można łatwo zastąpić innymi,
- włos jest mechanicznie odporny i chemicznie obojętny, nie wymaga więc zachowania specjalnych warunków przy przechowywaniu i transporcie,
- praktycznie nie istnieje ryzyko przeniesienia choroby od pacjenta.

Oznaczanie narkotyków we włosach, oprócz zalet, ma również pewne ograniczenia. Badanie jest na ogół droższe niż w przypadku moczu, a proces analityczny - bardziej czasochłonny. Analiza włosów nie daje też możliwości wykrywania narkotyków przyjmowanych bezpośrednio przed badaniem, ponieważ między ich inkorporacją do korzenia włosa i pojawieniem się w części włosa ponad powierzchnią skóry upływa długi okres czasu. Wreszcie jednorazowe przyjęcie narkotyku rzadko udaje się wykryć za pomocą analizy włosów. Jest ona natomiast b. przydatna do wykrywania przewlekłego stosowania narkotyku w przypadkach, gdy zawiodą analizy krwi i moczu. Ponadto można ogólnie powiedzieć, że stężenia lipofilnych leków macierzystych jest we włosach zawsze wyższe niż ich metabolitów [30], przeciwnie niż w moczu.

Znajomość mechanizmów decydujących o inkorporacji cząsteczek narkotyku do zrębu włosa jest jeszcze bardzo niekompletna, wiadomo jednak, że cebulka włosowa wychwytuje narkotyki i ich metabolity z krwi docierającej do korzenia włosa i zatrzymuje je na stałe w jego łodydze. Rosnący włos „zapisuje” więc jakby historię przyjmowania narkotyku przez danego osobnika. W ten sposób odcinek włosa długości ok. 5 cm może dostarczyć informacji o przyjmowaniu narkotyków w okresie 4 miesięcy. A zatem narkotyk może być wykryty we włosach długo po jego użyciu.

Natomiast w moczu narkotyki można wykryć tylko w krótkim okresie czasu po przyjęciu, ponieważ ich eliminacja przez nerki jest na ogół dość szybka. Np. opiaty i kokaina, które są rozpuszczalne w wodzie, ulegają wydaleniowi przez nerki w ciągu 2-3 dni. Inne narkotyki, jak marihuana i fencyklidyna

(PCP), które rozpuszczają się w tłuszczach, pozostają w ustroju dłużej i można je wykryć w moczu przez 2-3 tygodnie po wprowadzeniu do ustroju.

Ważną sprawą jest odróżnianie narkotyku, który znalazł się na powierzchni włosów ze środowiska od tego, który wniknął do włosa z krwi, zwłaszcza, że narkotyki docierają do włosów głównie w formie niezmetabolizowanej [10]. Dlatego przed przystąpieniem do właściwej analizy narkotyków próbki włosów muszą być poddane procedurze usuwania zanieczyszczeń z ich powierzchni. Baumgartner i Hill [4] oznaczali narkotyki w próbkach włosów po ich dokładnym płukaniu oraz w cieczy użytej do płukania. Odpowiednio wyższe stężenie narkotyku we włosach niż w cieczy użytej do ich płukania stanowi - zdaniem autorów - dowód stosowania narkotyku. Oczywiście wykrycie we włosach metabolitu narkotyku przesądza sprawę w sposób definitywny [10].

Do opracowania metody usuwania zanieczyszczeń używano włosów ze sztucznie naniesionymi na ich powierzchnię narkotykami. Próbki takich włosów poddawano myciu (płukaniu) za pomocą różnych rozpuszczalników jak etanol, 0,01 N HCl lub siarczan dodecyłu. Usuwiają one z powierzchni włosów ponad 90 % zanieczyszczeń, ale żaden nie usuwa ich całkowicie. Kombinacje różnych sposobów płukania próbki, np. płukanie detergentem, a następnie wytrząsanie próbki z chlorkiem metylenu, dawały całkowite lub prawie całkowite usunięcie zanieczyszczeń, ale powodowały ekstrakcję części narkotyku ze zrębu włosa [4, 10].

Opracowano również 2 rodzaje wzorcowych próbek włosów zawierających dokładnie określone ilości substancji uzależniających do oceny różnych metod usuwania zanieczyszczeń z powierzchni włosów, a także oceny efektywności poszczególnych etapów właściwej analizy narkotyków we włosach. Próbki włosów od osób nie przyjmujących narkotyków zanurzano do roztworu badanego narkotyku (kokainy, benzoiloeogoniny, morfiny, kodeiny) w dimetylosulfotlenku (DMSO) na okres 3-4 tygodni. Zatrzymane przez włos ilości narkotyku zależą od jego stężenia w roztworze DMSO oraz czasu przebywania włosa w roztworze. Ilości te są jednak różne dla poszczególnych narkotyków nawet przy jednakowym stężeniu narkotyku i czasie przebywania włosów w roztworze [4, 10].

Jeden z wzorcowych preparatów, oznaczony symbolem RM 4849, przygotowano przez wysycenie włosów roztworem narkotyków w dimetylosulfotlenku (DMSO) i ich kriogeniczną homogenizacją tj. rozdrobnienie w stanie zamrożenia do postaci b. drobnego proszku. Preparat ten nadaje się do oceny efektywności metod ekstrakcji narkotyków z włosa oraz różnych metod oznacza-

nia narkotyków. Natomiast do oceny skuteczności metod usuwania zanieczyszczeń z powierzchni włosów lepiej nadaje się preparat RM 4848 zawierający, zamiast sproszkowanych włosów, przygotowane w podobny sposób krótkie ich fragmenty.

Przy oznaczeniach narkotyków zatrzymanych przez zrzęb włosa ważną sprawą jest możliwie pełna i powtarzalna ekstrakcja analizowanych połączeń z próbki włosów. Sprzyja temu całkowita hydroliza włosów, jednak drastyczne warunki jakie stosuje się przy pełnej hydrolizie mogą spowodować rozkład badanych substancji. Np. kiedy hydrolizę prowadzi się w stężonych roztworach zasad kokaina ulega całkowitej przemianie w benzoiloeckgoninę i ekgoninę, co sprawia, że oznaczenie związku macierzystego jest w ogóle niemożliwe. Zdaniem Welcha i wsp. [45] godna zalecenia jest stosowana przez nich ekstrakcja 0,1 N HCl w temp. 45°C przez 12 godzin, która daje dobrą wydajność kokainy i benzoiloeckgoniny mimo, że zrzęb włosa nie ulega w tych warunkach całkowitemu rozkładowi. Wysoką wydajność takiej ekstrakcji potwierdzono oznaczając narkotyki w roztworze po powtórnej ekstrakcji włosów. Ilości narkotyków w roztworze po drugiej ekstrakcji były znikome, co dowodzi, że odzysk związków przy pierwszej ekstrakcji był b. wysoki. Inni autorzy [15] stosowali do ekstrakcji etanol i metanol.

Zamiast kwaśnej hydrolizy można przeprowadzić enzymatyczną hydrolizę włosów za pomocą proteiny K (3 mg na 8-12 mg próbkę włosów) w temp. 37°C przez 72 godz. Takie warunki nie powodują rozkładu kokainy. Narkotyki i ich metabolity izoluje się z roztworu metodą ekstrakcji w fazie stałej (Solid Phase Extraction - SPE). Zawierający narkotyki eluat z kolumny SPE odparowuje się do sucha w strumieniu azotu a pozostałość ogrzewa z 50 µL N, O-bis-(trimetylosyliło) - acetamidu (BSA) celem przeprowadzenia oznaczanych związków w lotne pochodne trójmetrylosyliłowe, które poddaje się rozdzielaniu i ilościowemu oznaczaniu metodą GC/MS [45]. Według innych badaczy [4, 20] hydroliza enzymatyczna włosów nie daje powtarzalnych wyników z powodu różnego stopnia rozkładu włosa przez enzym proteolityczny.

Najwcześniej podjęto próby oznaczania we włosach opiatów. Baumgartner i wsp. [3] opisali w r. 1979 wykrywanie opiatów we włosach osób uzależnionych metodą radioimmunologiczną (RIA), a Marigo i wsp. [27] donieśli o możliwości wykrywania morfiny metodą HPLC. Dużo uwagi poświęcono również oznaczaniu metadonu we włosach osób poddanych długotrwałej terapii tym lekiem [2, 16].

11 laboratoriów wyspecjalizowanych w analityce narkotyków uczestniczyło w kompleksowym programie mającym na celu ustalenie przydatności oznaczeń narkotyków we włosach w praktyce toksykologicznej. Zainteresowane laboratoria otrzymywały do badania włosy pobrane od narkomanów, od ludzi nie mających kontaktu z narkotykami oraz włosy sztucznie wysycone narkotykami (bierna kontaminacja powierzchni włosów). Włosy miały postać proszku lub krótkich segmentów. Badania ograniczono do kokainy, benzoiloeogoniny i morfiny. Stosowano ekstrakcję w środowisku kwaśnym, enzymatyczną hydrolizę włosów oraz rozdział i oznaczanie metodą GC/MS. Wyniki jakościowe uzyskane przez wszystkie laboratoria były na ogół zgodne, ale rozrzut wyników ilościowych był znaczny [44].

Narkotyki występują we włosach przewlekłych narkomanów w ilościach rzędu ng/mg, brak jednak danych na temat minimalnych dawek, jakie można jeszcze wykryć. Wg Moellera [29] jedna lub dwie iniekcje heroiny w ciągu tygodnia powodują występowanie we włosach morfiny w ilości 0,5-1 ng/mg, co stanowi granicę wykrywalności dla metody GC/MS.

Moeller i wsp. [31] opisali metodę jednoczesnego wykrywania i oznaczania morfiny, 6-acetylmorfiny (MAM), kodeiny, dihydrokodeiny, benzoiloeogoniny (BZE), kokainy, metadonu i EDDP (metabolit metadonu) we włosach narkomanów poddanych terapii metadonowej. Próbkę włosów płukano, cięto na odcinki długości 2 cm, proszkowano, inkubowano z buforem fosforanowym oraz B- glukuronidazą i arylo-sulfatazą. Po izolacji narkotyków metodą ekstrakcji w fazie stałej i przeprowadzeniu ich w lotne pochodne poddawano mieszaninę analizie metodą GC/MS z użyciem ich deuterowanych analogów jako standardów wewnętrznych. Metoda jest powtarzalna przy granicy wykrywalności 0,1 ng/mg włosa dla prawie wszystkich oznaczanych substancji. Pobrano 15 próbek włosów od 5 pacjentów leczonych metadonem przez okres 6 miesięcy. W 95 % badanych próbek wykryto metadon (średnia zawartość 10,9 ng/mg) w 70 % - EDDP (średnio 1,2 ng/mg), w 69 % opiaty (MAM śr. 1,1 ng/mg) w 43 % - kokainę (2,6 ng/mg) i benzoiloeogoninę. Stwierdzono korelację między dawką metadonu i jego stężeniem we włosach.

Dobrym markerem jednoczesnego przyjmowania kokainy i etanolu jest etylenokokaina (ang. cocaethylene), czyli etylowy ester benzoiloeogoniny, powstający w wątrobie z kokainy, która jest metylowym estrem benzoiloeogoniny i alkoholu etylowego. Zachodzi tu reakcja transestryfikacji czyli zamiany estru (rodnika) metylowego na etylowy. Etylenokokainę wykryto

metodą GC/MS we włosach i moczu narkomanów kokainowych pijących alkohol.

Kintz i Mangin [26] badali włosy 57 noworodków, których matki przyjmowały heroinę (9 przypadków), nikotynę (30 przypadków), benzodiazepiny (11 przypadków), kokainę (2 przypadki) i amfetaminę (1 przypadek) - we wszystkich przypadkach przyjmowanych przez matkę narkotyk był obecny we włosach dzieci.

Na grupie 256 osób przebywających w więzieniu w miastach stanu Floryda (Tampa i St. Petersburg) przeprowadzono porównawcze badania zawartości narkotyków w moczu i włosach. Badanych pytano czy brali narkotyki i jakie. Zarówno wyniki analizy włosów jak i moczu różniły się od relacji badanych, którzy na ogół zatajali fakty przyjmowania narkotyków.

Z 256 osób u 49 wykryto narkotyki (opiaty i kokainę) metodami FPIA i EMIT zarówno w moczu jak i we włosach. U 207 osób wyniki badania moczu były ujemne, ale we włosach aż 88 osób z tej grupy wykryto narkotyki. Włosy 9 z nich poddano, dla kontroli, analizie najbardziej pewną metodą GC/MS, która potwierdziła obecność narkotyków [17]. Tak więc badanie włosów dało więcej (ok. 50 %) wyników dodatnich niż badanie moczu (~ 20 %).

Wyniki badania włosów znalazły również zastosowanie jako potwierdzenie dowodu użycia narkotyków w sprawach sądowych [17]. Okręgowy Sąd w Brooklynie (N.York) rozpatrywał sprawę osobnika, który naruszył przepisy dotyczące narkotyków i został skazany z zawieszeniem na 5 lat pod warunkiem, że powstrzyma się od użycia narkotyków. Badanie moczu wykonane w ciągu pierwszego roku wykazało obecność kokainy, co zdecydowało o skierowaniu go na leczenie. Na rozprawie sądowej związanej z kolejnym złamaniem warunków zawieszenia, osobnik twierdził, że nie brał narkotyków przez szereg miesięcy. Sąd zarządził badanie włosów, aby ostatecznie ustalić, czy warunki zawieszenia były rzeczywiście złamane. Badanie wykazało obecność kokainy [17].

Również inni badacze zajmowali się warunkami wykrywania i oznaczania we włosach ludzkich różnych narkotyków i ich metabolitów: kokainy [1, 20], opiatów [3, 15, 27, 35], amfetamin [32] i fencyklidyny [38] stosując metody immunochemiczne, chromatograficzne i spektrometrii masowej.

Mimo dużej liczby publikacji na temat analizy narkotyków we włosach wyniki tych analiz nie wszędzie uznaje się jako dowód przyjmowania narkotyków. Nawet w USA, skąd pochodzi najwięcej publikacji, oznacze-

nia narkotyków we włosach nie mają jeszcze charakteru badań rutynowych i traktowane są raczej jako badania uzupełniające w szczególnych przypadkach, np; gdy są podstawy do przypuszczeń, że ujemny wynik moczu jest nieprawidłowy (podejrzenie wyniku fałszywie ujemnego), gdy badany kwestionuje wynik badania moczu oraz gdy istnieje podejrzenie, że badanemu udało się zafałszować próbkę moczu podczas pobierania. Wynika to z braku ogólnie akceptowanych zasad postępowania przy analizie włosów. Konieczna jest standaryzacja w zakresie ilości włosów użytych do badania, regionu powierzchni głowy, odległości od powierzchni skóry w jakiej włosy powinny być ucięte, a także sposobów unikania biernej kontaminacji przy pracy z pobraną próbką włosów.

Dlatego NIJ (National Institute of Justice, USA) opracował 5-letni plan przystosowania tej metody dla potrzeb rutynowych i sądowych. Badania są prowadzone w 3 kierunkach:

- 1) rozwoju technik ekstrakcji i analizy,
- 2) opracowania prawidłowej interpretacji wyników analizy włosów i uwiarygodnienia ich jako dowodu przyjmowania narkotyków,
- 3) wykorzystania wyników badania włosów na obecność narkotyków jako dowodu w praktyce sądowej.

NIJ współpracuje w tej dziedzinie z American Academy of Forensic Sciences (Amerykańska Akademia Medycyny Sądowej) i Society of Forensic Toxicology (Towarzystwo Toksykologii Sądowej).

Badania te powinny odpowiedzieć na następujące pytania:

- czy środowiskowe zanieczyszczenie włosów (np. dym palonej marihuany) ma istotny wpływ na wynik oznaczenia,
- czy wykryciu narkotyku we włosach przeszkadza ich mycie, utlenianie itp.,
- czy istnieją różnice w zatrzymywaniu narkotyku przez włos zależnie od jego rodzaju (włosy cienkie, grube),
- w jakim stopniu narkotyki mogą wnikać do włosów za pośrednictwem potu i innych dróg z pominięciem krwi i jeśli tak, to jak to wpływa na rozmieszczenie narkotyku wzdłuż włosa,
- ile czasu upływa zanim narkotyk pojawi się we włosach i czy różne narkotyki wykazują niejednakowy stopień szybkości wchłaniania,
- w jakim stopniu stężenie narkotyku we włosach stanowi miarę przyjętej ilości narkotyku.

Z uwagi na istnienie wielu klas nielegalnie nadużywanych leków, licznych metabolitów każdego leku danej klasy, osobniczych różnic metaboli-

zmu oraz różnic wynikających z przewlekłego i sporadycznego przyjmowania leków potrzebne są dalsze badania zanim ślina a zwłaszcza włosy staną się powszechnie stosowanym materiałem biologicznym do wykrywania i oznaczania narkotyków w rutynowej procedurze analitycznej i sądowej. Postęp, jaki dokonał się w tej dziedzinie w ciągu kilku ostatnich lat, pozwala sądzić, że stanie się to w niezbyt odległej przyszłości.

B. Szukalski, E. Mirkiewicz

## **Narcotics determination in saliva and hair as the biological material**

### **Summary**

The paper presents the review of current bibliography concerning detection and determination of addictive substances in saliva and hair and discusses the possibility to employ the media in routine examinations. Saliva and hair, as substances employed for detection and determination of narcotics present many advantages, as compared to widely used urine and blood. These advantages are:

- accessibility, non-intrusive, « non-violent» regarding privacy of examined individual and hazardless regarding possible infection, method of collecting the material.

The determination of narcotics in saliva and hair may be considered a valuable method of supplementary character, regarding blood and urine tests and in some cases may become consciously selected procedure.

**Key words:** Hair, Saliva, Determination of Narcotics.

### **Piśmiennictwo**

1. Balabanova S., Brunner H., Nowak R.: Radioimmunological determination of cocaine in human hair. *Z. Rechtsmed.*, 1987, 98, 229-234.

2. Balabanova S., Wolf H. U.: Determination of methadone in human hair by radioimmunoassay. *Z. Rechtsmed.*, 1989, 102, 1- 4.



3. Baumgartner A. M., Jones P. F., Baumgartner W. A., Black C. T.: Radioimmunoassay of hair for determining opiate-abuse histories. *J. Nucl. Med.*, 1979, 20, 748 -752.
4. Baumgartner W. A., Hill V. A.: Hair analysis for drugs of abuse: Decontamination issues. Proceedings for the 2 - nd International Congress of Therapeutic Drug Monitoring and Toxicology, Barcelona, 1990, 9-12.
5. Cartmell L. W., Aufderhide A., Weems C.: Cocaine metabolites in pre-Columbian mummy hair. *J. Okla. State Med. Assoc.*, 1991, 84, 11-12.
6. Casper J. L.: *Praktisches Handbuch der gerichtlichen Medizin*. Berlin, 1857.
7. Cone E. J., Kumor K., Thompson L. K., Sherer M.: Correlation of saliva cocaine levels with plasma levels and with pharmacologic effects after intravenous cocaine administration in human subjects. *J. Anal. Toxicol.*, 1988, 12, 200 -206.
8. Come E. J., Weddington W. W.: Prolonged occurrence of cocaine in human saliva and urine after chronic use. *J. Anal. Toxicol.*, 1989, 13, 65-68.
9. Cone E. J.: Testing human hair for drugs of abuse. I. Individual dose and time profiles of morphine and codeine in plasma, saliva, urine, and beard compared to drug-induced effects on pupils and behavior. *J. Anal. Toxicol.*, 1990, 14, 1-7.
10. Come E. J., Yousefnejad D., Darwin W. D., Maguire T.: Testing human hair for drugs of abuse .II. Identification of unique cocaine metabolites in hair of drug users and evaluation of decontamination procedures. *J. Anal. Toxicol.*, 1991, 15, 250 -255.
11. Dilli S., Pillai D.: Analysis of trace amounts of barbiturates in saliva. *J. Chromatography*, 1980, 190, 113-118.
12. El-Guebaly N., Davidson W. J., Sures H. A., Griffin W.: The monitoring of saliva drug levels: psychiatric applications. *Can J. Psych.*, 1981, 26, 43-47.
13. *Federal Register*: 1988, 53, 11983.
14. Gier de J. J., Hart B. J., Wilderink P.F., Nelemans F. A.: Comparison of plasma and saliva levels of diazepam. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 1980, 10, 151-155.
15. Goldberger B. A., Caplan Y. H., Maguire T., Cone E. J.: Testing human hair for drugs of abuse. III. Identification of heroin and 6-acetylmorphine as indicators for heroin use. *J. Anal. Toxicol.*, 1991, 15, 226-231.

16. Gorodetzky C.W., Kullberg M. P: Validity of screening methods for drugs of abuse in biological fluids. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 1974, 15, 579-587.

17. Gropper A., Reardon J. A: Developing Drug Testing by Hair Analysis. *Natl. Inst. Justice Journal*, 1993, 8-30.

18. Gross S. J., Worthy T. E., Nerder L., Zimmermann E. G., Soares J. R., Lomax R.: Detection of recent cannabis use by saliva  $\Delta^9$ -THC radioimmunoassay. *J. Anal. Toxicol.*, 1985, 9, 1-5.

19. Hallestrom C., Lader M. H.: Diazepam and N-desmethyldiazepam concentrations in saliva, plasma and CSF. *Brit. J. Clin. Pharmacol.*, 1980, 9, 333-339.

20. Harkey M. R., Henderson G. L., Zhou C.: Simultaneous quantitation of cocaine and its metabolites in human hair by GC/MS. *J. Anal. Toxicol.*, 1991, 15, 260-265.

21. Hawks R. L.: The constituents of cannabis and the disposition and metabolism of cannabinoids. *Natl. Inst. Drug Abuse Res. Monogr. Ser.* 1982. 42. 125-137.

22. Horns W. H., Rado M., Goldstein A.: Plasma levels and symptom complaints in patients maintained on daily dosage of methadone hydrochloride. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 1975, 17, 636-649.

23. Idowu O. R., Caddy B.: A review of the use of saliva in the forensic detection of drugs and other chemicals. *J. Forens. Sci. Soc.* 1982, 22, 123-135.

24. Just W. W., Filipovic N., Werner G.: Detection of  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol in saliva of men by means of thin-layer chromatography and mass spectrometry. *J. Chromatogr.*, 1974, 96, 189-194.

25. Kang G. I., Abbott F. S.: Analysis of methadone and metabolites in biological fluids with gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr.*, 1982, 231, 311-319.

26. Kintz P., Mangin P.: Determination of gestational opiate, nicotine, benzodiazepine, cocaine and amphetamine exposure by hair analysis. *J. Forensic. Sci. Soc.*, 1993, 33, 139-142.

27. Marigo M., Tagliaro F., Poiesi C., Lafisca S., Neri C.: Determination of morphine in the hair of heroin addicts by HPLC with fluorimetric detection. *J. Anal. Toxicol.*, 1986, 10, 158-161.

28. Maseda C., Hama K., Fukui Y., Matsubara K., Takahashi S., Akane A.: Detection of  $\Delta^9$ -THC in saliva by capillary CG/ECD after marijuana smoking. *Forens. Sci. Int.*, 1986, 32, 259-266.

29. Moeller M. R.: Drug detection in hair by chromatographic procedures. *J. Chromatogr.*, 1992, 580, 125-134.

30. Moeller M. R., Fey P., Sachs H.: Hair analysis as evidence in forensic cases. *Forensic Sci. Int.*, 1993, 63, 43-53.

31. Moeller M. R., Fey P., Wennig R.: Simultaneous determination of drugs of abuse (opiates, cocaine and amphetamine) in human hair by GC/MS and its application to a methadone treatment program. *Forensic Sci. Int.*, 1993, 63, 185-206.

32. Nakahara Y., Takahashi K., Shimamine M., Takeda Y.: Hair analysis for drugs of abuse. I. Determination of methamphetamine and amphetamine by stable isotope dilution GC/MS. *J. Forens. Sci.*, 1991, 36, 70-78.

33. Peel H. W., Perrigo B. J., Mikhael N. Z.: Detection of drugs in saliva of impaired drivers. *J. Forens. Sci.*, 1984, 29, 185-189.

34. Rosenblatt J. E., Bridge T. P., Wyatt R. J.: A novel method for measuring benzodiazepines in saliva. *Communic. Psychopharmacol.*, 1979, 3, 49-53.

35. Scheller M., Sachs H.: The detection of codeine abuse by hair analysis. *Dtsch. Med. Wochenschr.*, 1990, 115, 1313-1315.

36. Sharp M. E., Wallace S. M., Hindmarsh K. W., Peel H. W.: Monitoring saliva concentrations of methaqualone, codeine, secobarbital, diphenhydramine and diazepam after single oral doses. *J. Anal. Toxicol.*, 1983, 7, 11-14.

37. Soares J. R., Grant J. D., Gross S. J.: Significant developments in radioimmune methods applied to  $\Delta^9$ -THC and its 9-substituted metabolites. *Natl. Inst. Drug Abuse Res. Monogr. Ser.*, 1982, 42, 44-45.

38. Sramek J. J., Baumgartner W. A., Tallos J. A., Ahrens T. N., Heiser J. F., Blahd W. H.: Hair analysis for detection of phencyclidine in newly admitted psychiatric patients. *Am. J. Psychiatry*, 1985, 142, 950-953.

39. Starmer G. A., Vine J. H., Watson T. R.: A co-ordinated approach to the drugs and traffic safety problem. *Int. J. Psychopharm.*, 1988, 3, (Suppl. 1) 35-53.

40. Thompson L. K., Cone E. J.: Determination of  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol in human blood and saliva by high-performance liquid chromatography with amperometric detection. *J. Chromatogr.*, 1987, 421, 91-97.

41. Thompson L. K., Yousefnejad D., Kumor K., Sherer M., Cone E. J.: Confirmation of cocaine in human saliva after intravenous use. *J. Anal. Toxicol.*, 1987, 11, 36-38.

42. Trnavska Z., Rejholec V., Elis J., Spicak V.: Comparative pharmacokinetic analysis of theophylline in serum and saliva. *Int. J. Clin. Pharm. Res.*, 1987, 7, 329-335.

43. Vapaatalo H., Karkainen S., Senius K. E.: Comparison of saliva and urine samples in thin-layer chromatographic detection of central nervous stimulants. *Int. J. Clin. Pharmacol. Res.*, 1984, 4, 5-8.

44. Welch M. J., Śniegoski L. T., Allgood C. C.: Interlaboratory comparison studies on the analysis of hair for drugs of abuse. *Forensic Sci. Int.*, 1993, 63, 259-303.

45. Welch M. J., Śniegoski L. T., Allgood C. C., Habran M.: Hair Analysis for Drugs of Abuse: Evaluation of Analytical Methods, Environmental Issues and Development of Reference Materials, *J. Anal. Toxicol.*, 1993, 17, 389-400.

46. Wolff K., Sanderson M., Hay A.W., Raistrick D.: Plasma methadone concentrations and their relationship to drug dosage. *Clin. Chem.*, 1991, 37, 205-209.

47. Wolff K., Hay A., Raistrick D.: Methadone in saliva. *Clin. Chem.*, 1991, 37, 1297-1298.

48. Zimmermann E. G., Yeager E. P., Soares J. R., Hollister L. E., Reeve V. C.: Measurement of  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (THC) in whole blood samples from impaired motorists. *J. Forens. Sci.*, 1983, 28, 957-962.