

## ANALIZA ŚRODKÓW PSYCHOAKTYWNYCH W MATERIALE BIOLOGICZNYM

**Bogdan Szukalski**

Zakład Biochemii Instytutu Psychiatrii i Neurologii w Warszawie

### **DRUGS OF ABUSE DETERMINATION IN BIOLOGICAL SPECIMENS**

**ABSTRACT** – This paper presents the screening analytical methods for determination of the drugs of abuse: radioimmunological (RIA), immunoenzymatic (EIA), and immunofluorescence in polarized light (FPIA); Screen Ontrak Assay, Triage, and Frontline tests, as well as confirming methods used to verify screening results – high performance thin layer chromatography (HPTLC), gas chromatography (GC), and gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS). Solid phase extraction (SPE), most frequently used method for the isolation of narcotics from biological specimens prior to chromatographic determinations, is also outlined.

**Key words:** immunological methods, solid phase extraction, gas chromatography, mass spectrometry.

### **WSTĘP**

Nadużywanie środków odurzających, jako problem społeczny, pojawiło się w Polsce w początkach lat 70. Wieloletnia obserwacja trendów epidemiologicznych, oparta na analizie statystyk służby zdrowia, wskazuje, że zjawisko to ma charakter postępującej, z okresowymi zmianami tempa. Jego wyraźny wzrost obserwowano w początkach oraz w drugiej połowie lat 70., a największy w latach 1981-1983.

Podjęte w połowie lat 70. działania w kierunku ograniczenia dostępności leków uzależniających (wprowadzenie na narkotyki recept ściślego zarachowania, odpowiednie zabezpieczenie aptek i hurtowni, szkolenie personelu) doprowadziły do przejściowego zmniejszenia nadużywania tych środków. Jednakże bardzo szybko w środowisku narkomanów opracowano proste metody nielegalnej, „domowej” produkcji środków odurzających ze słomy makowej, znanych pod nazwami „makiwary”, „kompotu” lub „polskiej heroiny”, które obok związków z grupy opiatów zawierają liczne substancje toksyczne, powstające w toku prymitywnego procesu produkcyjnego. Produkty te stały się szybko dość powszechnie dostępne i dlatego w Polsce grupa osób uzależnionych od opiatów jest wśród ogółu uzależnionych najliczniejsza. Większość narkomanów stosuje te preparaty w połączeniu z barbituranami oraz lekami grupy benzodiazepin.

Diagnostyka laboratoryjna środków psychoaktywnych jest w systemie działań zmierzających do ograniczenia narkomanii w Polsce jednym z najsłabszych ogniw i słabość ta wynika przede wszystkim z braku nowoczesnego zaplecza aparaturowego, umożliwiającego szybkie i niezawodne wykrywanie i identyfikację środków uzależniających w materiale biologicznym. Tymczasem w wielu sytuacjach wykonanie badań na obecność środków psychoaktywnych w płynach biologicznych jest niezbędne. Jedną z takich sytuacji wiąże się z toksykologią kliniczną i przypadkami zagrażającego życiu przedawkowania leków lub narkotyków. Dane z wywiadu uzyskane od pacjenta i rodziny są w takich sytuacjach często niemiernorodne i muszą być uzupełnione obiektywnymi wynikami badań laboratoryjnych. U około 30% pacjentów nie udaje się bowiem uzyskać informacji na temat rodzaju środka, wysokości dawki oraz wpływu czasu od zażycia ostatniej dawki przed hospitalizacją. Ponadto pacjenci często agravują objawy odstawienne, aby jak najszybciej spowodować interwencję farmakologiczną i nie dopuścić do rozwoju zespołu abstynencyjnego. Systematyczne wykonanie monitoringu odpowiednio specyficznymi i czułymi metodami pozwala oprócz diagnozę na bardziej obiektywnych przesłankach oraz stanowi czynnik pozytywnego wzmocnienia, podtrzymujący motywację pacjenta do zachowania abstynencji.

Tak więc bez wyników badań laboratoryjnych nawet doświadczony lekarz często nie jest w stanie ustalić, jakie środki wywołały u pacjenta określone objawy kliniczne i w którym momencie rozpoczynają się u niego objawy abstynencyjne. Istnieje bowiem możliwość wystąpienia interakcji między środkami uzależniającymi, które nie uległy jeszcze wydaleniowi, a lekami podawanymi w celu złagodzenia objawów abstynencyjnych, lub z innych wskazań medycznych.

Dlatego wszelkie decyzje dotyczące farmakoterapii osób uzależnionych powinny zapaść w oparciu o wyniki badań laboratoryjnych, które pomagają:

1. ustalić rodzaj przyjętego narkotyku
2. ocenić wielkość przyjętej dawki
3. monitorować przebieg terapii odtruwającej
4. kontrolować abstynencję w długoterminowej terapii substytucyjnej (np. metadonem) oraz w procesie rehabilitacji narkomanów.

Badania te mają również kapitalne znaczenie dla toksykologii sądowej, kiedy wyniki oznaczeń narkotyków we krwi, homogenatach wątroby, nerki, serca i mózgu, pobranych ze zwłok, są dowodami w sprawach sądowych. Badania te pozwalają również potwierdzić lub wykluczyć stosowanie niedozwolonych substancji przez kierowców pojazdów samochodowych lub operatorów skomplikowanych urządzeń i aparatów, więźniów na zwolnieniu warunkowym, a także pracowników przed podjęciem określonego zadania, wymagającego ze względu na bezpieczeństwo ludzi, pełnej sprawności psychofizycznej (np. personel linii lotniczych). Dowody dla sądu muszą być, oczywiście, potwierdzone najbardziej pewnymi i niezawodnymi metodami analitycznymi.

Od czułości i specyficzności metod identyfikacji zależy zarówno szybkie i prawidłowe rozpoznanie typu uzależnienia, jak i skuteczność kontroli abstynencji na Oddziałach Detoksykacyjnych. Ponieważ złamanie abstynencji przez pacjenta oznacza na ogół koniec kuracji i relegowanie z Oddziału, fałszywie dodatni wynik badania laboratoryjnego (tj. wykrycie narkotyku w próbce, w której go nie było) może wywołać

u pacjenta poczucie krzywdy oraz podważyć zaufanie do kompetencji służb medycznych.

Istnieje wiele metod analitycznych wykorzystywanych do wykrywania i oznaczania substancji uzależniających, ale metody stosowane z powodzeniem do badania tych środków „in substantia”, a więc w tabletkach, proszkach, „skrętach” itd. są na ogół mało przydatne w daleko trudniejszym pod względem analitycznym identyfikowaniu i oznaczaniu tych substancji w materiale biologicznym. Pomijając bowiem przypadki ostrej intoksykacji – stężenia substancji uzależniających we krwi i w moczu są na ogół bardzo niskie, a więc użyte metody muszą być wystarczająco czułe. Czynnikiem utrudniającym analizę jest również obecność w badanym materiale metabolitów substancji psychoaktywnej. Wreszcie częste są przypadki równoczesnego stosowania przez narkomanów dwóch lub nawet więcej substancji uzależniających, np. opiatów i barbituranów lub opiatów i benzodiazepin. Sytuacja ulega dalszej komplikacji, gdy pacjent, wbrew własnemu interesowi, zażywa te środki na Oddziale, w trakcie intensywnej farmakoterapii, polegającej na stosowaniu różnych leków psychotropowych (12).

Badaniu środków uzależniających powinna towarzyszyć świadomość ograniczeń zastosowanej metody analitycznej oraz znajomość jej czułości i specyficzności: przy niskiej czułości metody trzeba się liczyć z wynikami fałszywie ujemnymi (tj. niewykryciem narkotyku w próbce, w której był on obecny), a przy małej specyficzności istnieje obawa wyników fałszywie dodatnich. Wyniki fałszywie ujemne zachęcają pacjentów łamiących abstynencję do oszukiwania służb medycznych. Odpada również ważny czynnik dyscyplinujący pacjenta.

Materiałem najczęściej używanym do badania na obecność narkotyków jest moczu. A oto okresy po przyjęciu różnych grup narkotyków, w których można je wykryć skринingowym badaniem moczu:

Amfetamina	48 - 72 godz. (2-3 dni)
Kodeina	48 - 72 godz. (2-3 dni)
Morfina	48 - 72 godz. (2-3 dni)
Kokaina	72 godz. (3 dni) lub dłużej
Kannabinoidy	5 dni; przy długotrwałym stosowaniu do 30 tygodni
Benzodiazepiny	72 godz. (3 dni)
Barbiturany	szybko działające 24 godz. (2 dni) wolno działające 7 dni
Fencyklidyna	8 - 55 godz.

Okresy te zależą od:

- wysokości przyjętej dawki
- długości okresu i częstości przyjmowania
- wieku
- wagi ciała
- stanu zdrowia

### Metody skринingowe

Nie ujmując nic metodom chromatograficznym, zarówno tym prostym, a więc chromatografii bibułowej i płytkowej, jak i instrumentalnym, tj. chromatografii gazo-

wej i cieczerwowej, a zwłaszcza gazowej sprężonej ze spektrometrią masową – na szczególną uwagę zasługują tzw. metody immunochemiczne, gdyż spełniają one oczekiwania klinicystów, tj. pozwalają przeprowadzać badania skriningowe (przesiewowe) dużej liczby próbek w krótkim czasie, bez użycia specjalistycznej aparatury. W metodach tych zasada oznaczeń opiera się na reakcji między antygenem (haptentem) i przeciwciałem skierowanym przeciwko antygenowi. Wykorzystuje się w nich zjawisko współzawodnictwa między antygenem znakowanym izotopem promieniotwórczym, enzymem lub barwnikiem fluoryzującym i antygenem nieznakowanym (czyli substancją badaną) o ograniczoną liczbę miejsc wiążących w cząsteczce przeciwciała.

Zaletami metod immunochemicznych jest wysoka czułość, możliwość oznaczania substancji uzależniającej bezpośrednio w materiale biologicznym (tj. bez często kłopotliwego etapu izolacji) oraz stosunkowo krótki czas potrzebny do wykonania oznaczenia.

Do tej grupy należą:

1. Metoda radioimmunologiczna (RIA - Radioimmunoassay), w której stosuje się antygen znakowany pierwiastkiem promieniotwórczym. Badana substancja (antygen nieznakowany) wypiera antygen znakowany z jego kompleksu z przeciwciałem. Ilość znakowanego antygeny, wyparta z kompleksu, jest miarą ilości badanej substancji w próbce materiału biologicznego. Po oddzieleniu frakcji związanej (tj. kompleksu antygen-przeciwciała) od frakcji wolnej (samego antygeny) mierzy się aktywność promieniotwórczą frakcji wolnej.

2. Metoda immunoenzymatyczna (EIA - Enzym Immunoassay)

W metodzie tej stosuje się antygen znakowany enzymem. Może to być lizozym, dehydrogenaza jabłczanowa i in. Utworzenie kompleksu antygeny znakowanego enzymem z przeciwciałem powoduje zmniejszanie aktywności enzymu. Antygen nieznakowany (czyli oznaczana substancja psychoaktywna), jeśli jest obecny w badanej próbce, rozbija kompleks znakowanego antygeny z przeciwciałem, powodując wzrost aktywności enzymatycznej proporcjonalny do stężenia substancji oznaczanej.

3. Najczęściej stosowaną obecnie skriningową metodą badania moczu na obecność narkotykw jest metoda immunofluorescencji w świetle spolaryzowanym (FPIA – Fluorescence Polarization Immunoassay), której teoretyczne podstawy wywodzą się z roku 1926, a rozpowszechnianie wiąże się z wprowadzeniem w 1981r. aparatu TDx firmy Abbott.

W metodzie tej antygen jest znakowany barwnikiem fluoryzującym (np. fluoresceiną). Występująca we krwi lub moczu substancja psychoaktywna wypiera znakowany fluoresceiną antygen z kompleksu antygen-przeciwciała. Pociąga to za sobą zmianę polaryzacji fluorescencji mierzoną przez odpowiedni system detektorowy.

Stosując gotowe zestawy odczynników dla poszczególnych substancji uzależniających (lub grup substancji o zbliżonej strukturze chemicznej) można tą metodą bardzo szybko, tj. w ciągu kilkunastu minut, stwierdzić obecność albo brak w moczu opiatów, amfetamin, benzodiazepin, barbituranów i metadonu.

Poza wykryciem obecności narkotyku metoda pozwala ocenić jego przybliżone stężenie w badanym materiale biologicznym. Jednakże jej specyficzność nie jest wysoka, tzn. stosowane w niej odczynniki nie są swoiste dla jednej substancji, lecz mogą reagować z mniejszą lub większą wydajnością z całą grupą substancji o zbliżonej

strukturze. Np. w przypadku opiatów, najczęściej używanych przez polskich narkomanów, odczynnik FPIA reagują nie tylko z morfiną, ale również z heroiną, kodeiną, MAM (monoacetylmorfina), 3-glukuronianem morfiny itp.

Ta niska specyficzność metody może być przyczyną wyników fałszywie dodatnich tj. wskazujących na obecność narkotyku u osób, które go nie przyjmowały. Aby zmniejszyć liczbę takich wyników, wprowadzono pojęcie „prugu czułości” (ang. cutoff level lub Minimal Allowable Threshold – MAT) to jest minimalnego stężenia narkotyku w moczu, które musi być przekroczone, aby można było uznać wynik za dodatni.

Wartości cutoff dla ważniejszych narkotyków:

Amfetaminy	1000 ng/ml
Barbiturany	200 ng/ml
Benzodiazepiny	50 ng/ml
Metabolity kokainy	300 ng/ml
Kannabinoidy	50 ng/ml
Metakwalon	300 ng/ml
Opiaty	300 ng/ml
Fencyklidyna	50 ng/ml
Propoksyfen	300 ng/ml

Polscy narkomani nie używają czystych opiatów, lecz produkowane domowymi sposobami preparaty ze słomy makowej (makiwara, kompot, mleczko makowe), odznaczające się bardzo różnym składem, ich mocz może więc zawierać, oprócz wymienionych wyżej opiatów i ich metabolitów, szereg substancji o podobnej budowie, lecz o innym niż heroina i morfina działaniu. Związki te reagują w różnym stopniu z odczynnikami wpływając na wynik badania. Tak więc dodatnie wyniki otrzymane metodą FPIA świadczą jedynie o obecności w badanym materiale związków o strukturze opiatów, nie dostarczają natomiast informacji o tym, jakie to są opiaty, co dla lekarza prowadzącego proces odtruwania może być sprawą istotną.

Metoda Abbotta pozwala wykrywać również kannabinoidy, kokainę i fencyklidynę, ale z uwagi na mniejsze prawdopodobieństwo ich stosowania przez polskich narkomanów oraz wysoki koszt oznaczeń, w Polsce nie bada się ich rutynowo.

Spośród metod immunochemicznych metody immunoenzymatyczne i immunofluorescencyjne, oprócz wymienionych zalet, posiadają ważny atut dodatkowy – nie wymagają pracowni izotopowej i liczników radioaktywności.

Ciekawym rozwiązaniem firmy Hoffmann-La Roche jest Abuscreen Ontrak Assay, służący do wykrywania w moczu obecności najważniejszych grup środków uzależniających o stężeniu przewyższającym ich próg wykrywalności. Jest to test szybki, bo pozwala uzyskać pewny wynik w ciągu 3 minut, ekonomiczny – bo jego wykonanie nie wymaga żadnego wyposażenia, prosty – bo może go wykonywać personel bez specjalnego doświadczenia laboratoryjnego i wreszcie wygodny, bo można się nim posłużyć w każdych warunkach. Jest on szczególnie przydatny w sytuacjach, w których konieczne jest wykonanie badania na obecność substancji psychoaktywnych bez użycia jakiegokolwiek aparatury, np. przez policję na miejscu wypadku, w Oddziale

Detoksykacyjnym u pacjenta przywiezionego z objawami ciężkiego zatrucia narkotykami itp. Zasada testu polega na hamowaniu aglutynacji cząstek lateksowych. Kroplę badanego moczu umieszcza się pipetą w zagłębieniu na firmowej płytce, dodaje kolejno po 1 kropli trzech odczynników oznaczonych literami A, B, C i starannie miesza. Odczynnik A zawiera przeciwciała skierowane przeciwko wykrywanej substancji uzależniającej, odczynnik B – roztwór buforowy, a odczynnik C – zawiesinę cząstek lateksowych „opłaszczonych” cząsteczkami narkotyku. Mieszanie tę wprowadza się do znajdującego się na firmowej płytce „labiryntu”, zakończonego rozszerzeniem w kształcie kwadratu. Jeśli mocz nie zawiera narkotyku, lub stężenie badanej substancji jest niższe od wartości cutoff, cząstki lateksu łączą się z przeciwciałem i zbijają w większe agregaty, widoczne w rozszerzonej części labiryntu w postaci kłaczkowatej struktury.

Jeśli w moczu jest obecna substancja uzależniająca, konkuruje ona z kompleksem lateksowym o wiązanie z przeciwciałem i przy wystarczająco wysokim stężeniu blokuje większość miejsc wiążących, hamując aglutynację kompleksu lateksowego. Stężenia odczynników są tak dobrane, że hamowanie aglutynacji następuje wówczas, gdy stężenie narkotyku w moczu przekracza wartość cutoff dla danej substancji. Tak więc wynikiem ujemnym jest aglutynacja cząstek żywicy lateksowej, czyli pocętkowane białe pola (kratownica utworzona z cząstek lateksowych), natomiast wynikiem dodatnim – brak objawów aglutynacji, czyli mleczny, jednolity wygląd mieszaniny reakcyjnej.

Dostrzegalna mikroaglutynacja lateksu („kłaczkowate” częściowo zaglutynowanej zawiesiny lateksowej na mlecznym białym tle) może zachodzić, gdy stężenie narkotyku jest równe, lub bardzo bliskie wartości cutoff. Każdy rodzaj aglutynacji, w tym wspomniane wyżej mikroaklaczkowanie, odczytuje się jako wynik ujemny.

Na rynku są również paskowe testy immunologiczne Frontline (Boehringer Mannheim) na opiaty, kannabinoidy, kokainę, metadon i amfetaminy oraz immunochemiczny zestaw Triage (Merck) pozwalający na jednoczesne (tj. za pomocą jednego zestawu) wykrywanie opiatów, amfetamin, benzodiazepin, barbituranów, kannabinoidów, kokainy, metadonu (lub zamiennie – fencyklidyny) a także trójcyklicznych leków antydepresyjnych.

Należy też wspomnieć o hemoaglutynacyjnym teście Boehringera (HIA – Hemoagglutination Inhibition Assay), który pozwala uzyskać wynik stosunkowo szybko, ale odznacza się mniejszą czułością niż FPIA i ma charakter wyłącznie jakościowy.

W ciągu kilku ostatnich lat wzrosła znacznie liczba substancji objętych kontrolą międzynarodową oraz uległy zaostrzeniu przepisy i zabezpieczenia prawne dotyczące leków uzależniających. Powołano specjalne służby do walki z przemytem narkotyków. Wzrosły ilości przechwytywanych narkotyków, takich jak opiaty, kanabinoide, kokaina, metamfetamina.

Jednakże w wyniku nielegalnych syntez wykonywanych przez chemików w „podziemnych” laboratoriach na narkotykowym rynku USA i wielu krajów Europy pojawiają się stale nowe substancje psychoaktywne, będące najczęściej wynikiem chemicznej modyfikacji struktury znanych narkotyków. Stanowi to wyzwanie dla międzynarodowych instytucji czuwających nad przestrzeganiem prawa oraz technicznym i naukowym dostosowaniem laboratoriów toksykologicznych do zmieniających się warunków i zmusza do szybkich działań w tym zakresie.

Analitycy muszą teraz dysponować metodami wykrywania i oznaczania większej liczby substancji, przy czym metody te muszą być szybkie i bardzo dokładne. W dodatku, międzynarodowy charakter handlu narkotykami wymaga szybkiej wymiany doświadczeń analitycznych między laboratoriami i to zarówno w skali krajowej jak i międzynarodowej.

Na ósmej, specjalnej sesji Komisji Narkotyków ONZ (Commission on Narcotic Drugs) w lutym 1984 r. wysunięto pod adresem Sekretarza Generalnego ONZ postulat, by podjąć kroki zmierzające do osiągnięcia porozumienia międzynarodowego w zakresie ujednoczenia metod analizy narkotyków. Komisja stała na stanowisku, że ujednoczenie metod analitycznych, stosowanych w poszczególnych krajach, ułatwi zadanie instytucjom powołanym do zapobiegania i zwalczania narkomanii i przyspieszy wymianę informacji w tym zakresie w skali międzynarodowej.

W odpowiedzi na postulat Komisji, Sekcja Narkotyków (Division of Narcotic Drugs) zorganizowała w październiku 1985r. w Wiesbaden spotkanie 15 ekspertów z różnych krajów świata (wśród nich autora niniejszego artykułu), którzy uznali za niezbędne opracowanie zwięzłych podręczników laboratoryjnych z opisem zalecanych metod analizy najważniejszych grup substancji psychoaktywnych.

Wykonując zalecenie ekspertów Sekcja Narkotyków przystąpiła do wydawania takich opracowań, rozpoczynając od wydanego w roku 1986 podręcznika omawiającego heroinę i opiaty. Kolejne broszury, opublikowane dotychczas, poświęcono analityce kokainy, kanabinoidów oraz amfetaminy i metamfetaminy.

Każda z zalecanych metod była publikowana w piśmiennictwie naukowym i przez szereg lat stosowana w renomowanych laboratoriach. Dokonując wyboru autorzy mieli jednak pełną świadomość, że w literaturze fachowej opisano wiele innych wartościowych metod analitycznych. Odsyłamy Czytelników do opracowań wydanych przez Sekcję Narkotyków ONZ (16, 17) oraz ich polskiego tłumaczenia, wydanego przez Instytut Psychiatrii i Neurologii (13). Podano w nich obszerną bibliografię tematu oraz zestawienie najważniejszych periodyków poświęconych tej problematyce.

Wybór metody zależy od analityka znającego potrzeby, możliwości i warunki swojego laboratorium. Oglądając materiał otrzymany do badania może on wybrać najwłaściwsze postępowanie analityczne. Identyfikacja każdego narkotyku powinna być oparta przynajmniej na dwóch niezależnych parametrach analitycznych, których wybór powinien w każdym przypadku uwzględniać charakter substancji i wyposażenie laboratorium.

Np. dwa odrębne układy TLC można uznać za 2 parametry, przy czym „odrębne” oznacza, że użyte układy rozwijające lub adsorbenty pokrywające płytki są zupełnie różne. Jeśli to możliwe, należy zastosować trzy całkowicie odmienne techniki analityczne, np. test barwny, chromatografię (TLC, GLC lub HPLC) i spektroskopię (w podczerwieni lub nadfiolecie). Wybór tych technik zależy od wykonującego badanie.

### **Metody confirmacyjne**

Dodatni wynik badania skringowego oznacza jedynie obecność w nim związków z danej grupy narkotyków, nie wskazuje natomiast, jakie to są związki. Ich identyfikacja wymaga zastosowania jednej z metod chromatograficznych: wysokosprawnej

chromatografii cienkowarstwowej (High Performance Thin Layer Chromatography, HPTLC), chromatografii gazowej (Gas Chromatography, GC) lub chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią masową (Gas Chromatography/Mass Spectrometry, GC/MS).

Izolację analitu (narkotyk, jego metabolit) z matrycy (mocz, krew) przed ich rozdzieleniem chromatograficznym (metodą HPTLC, GC, HPLC i GC/MS) prowadzi się najczęściej metodą ekstrakcji ciecz – ciało stałe (Solid-Phase Extraction, SPE), stosując kolumny z sorbentem krzemionkowym oraz urządzenie do ekstrakcji z regulowaną próżnią (8, 11).

O skuteczności procesu wyodrębnienia analitu, tj. jego selektywnej sorpcji, ilościowej desorpcji (rugowania) i odzysku decyduje porowatość nośnika, gęstość pokrycia fazą stacjonarną i prawidłowy dobór rozpuszczalnika. Trzeba również pamiętać o oddziaływaniu innych substancji obecnych w matrycy oraz samej matrycy na procesy sorpcyjne, bo mogą one wpływać ujemnie na powtarzalność odzysku.

$$\text{Odzysk R} = \frac{\text{wyekstrahowana ilość analitu}}{\text{ilość analitu przepuszczona przez kolumnę}} \times 100 (\%)$$

Jest to bardzo ważny etap analizy, gdyż jeśli jego wydajność nie jest wystarczająco wysoka, końcowy wynik badania może być obciążony dużym błędem i tym samym niemiarodajny.

HPTLC wyróżnia się prostotą wykonania, nie wymaga kosztownej aparatury, może być więc stosowana w warunkach skromnego laboratorium. Wykorzystuje ona różną szybkość przechodzenia składników mieszaniny z bardzo cienkiej warstwy adsorbenta nałożonego na płytkę do przesuwanego się wzdłuż płytki rozpuszczalnika. Rozdzielone składniki mieszaniny przeprowadza się w barwne połączenia przy pomocy swoistych odczynników (6).

Jednak w odniesieniu do złożonych mieszanin związków psychoaktywnych, np. amfetamin i produkowanych nielegalnie ich strukturalnych analogów, tzw. „narkotyków zmodyfikowanych” (designer drugs), okazuje się najczęściej mało skuteczna (10).

Najbardziej czułą i specyficzną metodą identyfikacji złożonych mieszanin narkotyków i ich metabolitów jest chromatografia gazowa połączona ze spektrometrią masową (GC/MS).

W przypadku analizy chromatograficznej z detekcją FID (Flame Ionization Detector), NPD (Nitrogen – Phosphorus Detector) i ECD (Electron Capture Detector), identyfikacji związków dokonuje się w oparciu o czas retencji (czas, po jakim substancja wprowadzona do komory nastrojkowej chromatografu dochodzi do detektora). Taka metodyka identyfikacji wymaga zastosowania wzorców substancji analizowanych.

Wyniki porównania czasów retencji substancji wzorcowych i badanych stanowią jedno z podstawowych kryteriów ich identyfikacji. Nie są to jednak wyniki absolutnie jednoznaczne, gdyż różne substancje w określonych warunkach analizy mogą mieć identyczny czas retencji. W takich przypadkach w identyfikacji badanej substancji



może pomóc zmiana parametrów analizy (np. zmiana programu temperaturowego), zastosowanie kolumn o innej polarności lub, najczęściej, tzw. derywatyzacja, tj. przekształcanie związków analizowanych w łatwiejsze do analizy pochodne, np. trifluoroacetylowe (9), trichloroacetylowe (7), pentafluoropropionowe (4) lub heptafluorobutyrylowe (10). Zasadniczym celem derywatyzacji, w przypadku związków zawierających polarne grupy funkcyjne, jest związanie aktywnego wodoru, które prowadzi do wzrostu lotności oraz znacznego zmniejszenia stopnia nieodwracalnej adsorpcji związku na fazie stacjonarnej kolumny i w komorze nastrzykowej. Dzięki temu na chromatogramach otrzymuje się wysokie piki o małej szerokości połówkowej. Spełnienie tych wymagań jest szczególnie istotne przy analizie materiału biologicznego.

Pełną i bardziej wiarygodną identyfikację składników mieszaniny związków użyć można stosując tzw. techniki łączone GC-MS, GC-FTIR, LC-MS (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry). Rejestrują one, oprócz czasu retencji, tzw. widma masowe (dla detekcji FTIR - widma w podczerwieni), które odzwierciedlają budowę cząsteczki związku organicznego. Interpretacja otrzymanych widm polega, w najprostszym przypadku, na porównaniu go z katalogowym widmem masowym znajdującym się w komputerowej bazie danych. Komputerowe biblioteki widm masowych zawierają po kilkaset tysięcy widm i wyposażone są dodatkowo w specjalistyczne oprogramowanie służące do ich przeszukiwania. Może się jednak zdarzyć, że baza danych nie zawiera widma masowego analizowanej substancji, na przykład w przypadku badania próbek nowych, nielegalnie produkowanych, pochodnych narkotyków o zmodyfikowanej strukturze, tzw. narkotyków zmodyfikowanych. Istnieją reguły interpretacji widma masowego, które pozwalają na określenie przybliżonej liczby atomów węgla w cząsteczce (gdy zarejestrowany został pik jonu molekularnego). Można także stwierdzić obecność atomów chloru i bromu. Takie spostrzeżenia, jak również znajomość mechanizmów fragmentacji związków w detektorze masowym oraz informacje dostarczane przez inne metody instrumentalne – FTIR, <sup>1</sup>HNMR, <sup>13</sup>CNMR i UV, pozwalają z reguły określić strukturę badanego związku. Ostatecznym potwierdzeniem jest porównanie danych fizykochemicznych analizowanej substancji z danymi uzyskanymi dla wiarygodnego wzorca.

Należy podkreślić, że nie istnieje technika uniwersalna, automatycznie rozwiązująca wszystkie problemy i trudne sytuacje analityczne. Materiał badany zawiera bowiem często, oprócz substratów, substancji pośrednich i finalnych, także szereg zanieczyszczeń, np. specyficzne produkty uboczne, które zresztą często pozwalają ustalić metodę syntezy narkotyku. Takie przypadki wymagają odwołania się do specjalistycznej literatury, a także doświadczenia i wiedzy chemicznej analityka.

### **Analiza narkotyków w ślinie i włosach**

Tradycyjnymi materiałami biologicznymi używanymi do potwierdzenia lub wykluczenia obecności narkotyków w ustroju są: surowica, osocze krwi i moczu. Jednakże w wyniku analizy każdego z tych płynów otrzymuje się informacje o odmiennym charakterze. Oznaczenia w osoczu dostarczają aktualnej oceny stężenia, podczas gdy w moczu rejestrują stężenia składników „zagręszczonych” po ostatnim opróżnieniu pęcherza. Ponadto stężenie badanych substancji w moczu zależy w znacznym stopniu

od ilości wypitych płynów. Mimo to mocz jest najczęściej używanym materiałem do wykrywania leków i narkotyków w ustroju, gdyż nieinwazyjny sposób pobierania oraz dostępność pozwalają bez kłopotu stosować go w badaniach rutynowych. Kłopotliwe i ciągle dyskutowane pozostaje jednak pobieranie próbek moczu, które z uwagi na możliwość zafalszowań musi często odbywać się pod kontrolą i dlatego jest traktowane jako „pogwałcenie prywatności”.

Wprowadzenie do laboratoriów metod analitycznych o wysokiej czułości umożliwiło wykrywanie i identyfikację leków i narkotyków także w ślinie i włosach.

Zainteresowanie śliną jako materiałem przydatnym do wykrywania i oznaczania narkotyków wiąże się z wcześniejszym wykorzystywaniem do badania farmakokinetyki i biodostępności leków oraz monitorowania ich poziomu we krwi możliwego dzięki temu, że 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 środków psychoaktywnych 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 wielokrotnie w ciągu dnia, bez ryzyka infekcji, bez bólu i stresu związanego z ukłuciem i dyskomfortu w przypadku wynacznień i obrzęku żyły w miejscu 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 zafalszowania materiału.

Do badań 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 około 0,6 ml/min.

Do badania narkotyków zastosowano ślinę po raz pierwszy w 1974 r. (5). Szczególna przydatność tego materiału została uznana w przypadku badania kierowców podejrzanych o przyjmowanie narkotyków (18).

Innym materiałem, którego analiza może potwierdzić lub wykluczyć stosowanie narkotyków, są włosy.

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 bardzo wysoką zawartością aminokwasów siarkowych) 85-93%, lipidy 2-3% i popiół 0,23-0,80%. Średnia szybkość wzrostu włosów wynosi 0,45 mm/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 roku 1875 Casper (2) 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 15).

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 bardzo długo, a więc „okienko detekcji” tj. czas, w którym można je wykryć, jest znacznie szersze (miesiące, lata) niż w przypadku krwi i moczu (godziny i dni). Tak więc pacjenci, którzy brali narkotyki w poprzednich tygodniach, a powstrzymali się od ich przyjmowania przed samym badaniem, będą mieli wynik dodatni we włosach, a ujemny w moczu. Ponadto rzadkie stosowanie narkotyków, trudne do wykrycia za pomocą badania moczu, daje się wykryć dzięki badaniu włosów. W takich przypadkach, nawet przy stosowaniu 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 (1).

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 zafałszowania materiału wymaga kontroli drugiej osoby,
- w przypadku włosów nie ma w zasadzie praktycznych możliwości zafałszowania 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 ograniczenia. Badanie jest na ogół droższe niż w przypadku moczu, a proces analityczny znacznie 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 czas. Wreszcie jednorazowe przyjęcie narkotyku rzadko udaje się wykryć za pomocą analizy włosów. Jest ona natomiast bardzo przydatna do wykrywania przewlekłego stosowania narkotyku, gdy zawiodą analizy krwi i moczu. Ponadto można ogólnie powiedzieć, że stężenia lipofilnych leków macierzystych jest we włosach zawsze wyższe niż ich metabolitów (14), 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 o długości około 5 cm może dostarczyć informacji o przyjmowaniu narkotyków w okresie 4 miesięcy. A zatem narkotyk może być wykryty we włosach długo po jego użyciu.

Ważną sprawą jest odróżnianie narkotyku, który znalazł się na powierzchni włosów ze środowiska od tego, który wniknął do włosa z krwi, ponieważ narkotyki docierają do włosów głównie w formie niezmetabolizowanej (13). Dlatego przed przystąpieniem do właściwej analizy – próbki włosów muszą być poddane procedurze usuwania zanieczyszczeń z ich powierzchni.

## STRESZCZENIE

W artykule przedstawiono skринingowe metody analizy narkotyków – radioimmunologiczną (RIA), immunoenzymatyczną (EIA) i immunofluorescencyjną w świetle spolaryzowanym (FPIA), testy Screen Ontrak Assay, Triage i Frontline oraz metody konfirmacyjne stosowane do weryfikacji wyników skринingowych – wysokosprawną chromatografię płytkową (HPTLC), chromatografię gazową (GC) oraz chromatografię gazową sprzężoną ze spektrometrią masową (GC/MS). Scharakteryzowano metodę ekstrakcji w fazie stałej (Solid Phase Extraction, SPE), najczęściej obecnie stosowany sposób izolacji narkotyków z materiału biologicznego przed przystąpieniem do analiz chromatograficznych.

Omówiono również zalety i wady analizy narkotyków w mniej typowych rodzajach materiału biologicznego – ślinie i włosach.

**Słowa kluczowe:** metody immunologiczne, ekstrakcja sorpcyjna, chromatografia gazowa, spektrometria masowa.

## PIŚMIENNICTWO

1. Cartmell L.W., Aufderhide A., Weems C., *Cocaine metabolites in pre-Columbian mummy hair*, J. Okla State Med. Assoc., 84, 11-12 (1991).
2. Casper J.L., *Practisches Handbuch der gerichtlichen Medizin*, Berlin, 1857.
3. Cone E.J., Yousefnejad D., Darwin W., 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., 15, 250-255 (1991).
4. DeRuiter J., Holston P.L., Clark C., Noggle F., *Liquid chromatographic and mass spectral methods of identification for regioisomeric 2, 3- and 3, 4- methylendioxyphenalkylamines*, J. Chrom. Sci., 36, 131-138 (1998).
5. Gorodetzky C.W., Kullberg M.P., *Validity of screening methods for drugs of abuse in biological fluids*. Clin. Pharmacol. Ther., 15, 579-587 (1974).
6. Gübitz G., Wintersteiger R., *Identification of Drugs of Abuse by High Performance Thin-Layer Chromatography*, J. Anal. Toxicol., 4, 141-144 (1990).
7. Hornbeck C.L., Czerny R.J., *Quantitation of amphetamine and methamphetamine in urine by capillary GC/MS. Part I. Advantages of trichloroacetyl derivatisation*. J. Anal. Toxicol., 13, 251-262, (1989).

8. Huang W., Andollo W., Hearn W., *A solid-phase extraction technique for the isolation and identification of opiates in urine*, J. Anal. Toxicol., 16, 307-310 (1992).
9. Kronstrand R., *Identification of N-methyl-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-butanamine in urine from drug users*, J. Anal. Toxicol., 20, 512-516 (1996).
10. Kunsman G., Levine B., Kuhlman J., Jones R., Hughes R., Fujiyama C.J., Smith M., *MDA-MDMA concentration in urine specimens*, J. Anal. Toxicol., 20, 517-521 (1996).
11. Lillsunde P., Korte T., *Drug screening in urine using solid-phase extraction and combined thin-layer chromatography and gas chromatography spectrometry identification*, J. Anal. Toxicol., 15, 71-81 (1996).
12. Matsumoto H., *Wykrywanie środków uzależniających w: Farmakoterapia w stanach uzależnień (Materiały z Sympozjum)*, Warszawa 1987, s. 83-92.
13. *Metody analizy środków uzależniających*, Instytut Psychiatrii i Neurologii, Warszawa, 1997.
14. Moeller M.R., Fey P., Sachs H., *Hair analysis as evidence in forensic cases*, Forensic Sci. Int., 63, 43-53 (1993).
15. Moeller M.R., *Drug detection in hair by chromatographic procedures*, J. Chromatogr., 580, 125-134 (1992).
16. *Rapid Testing Methods of Drugs of Abuse, Manual for use by National Law Enforcement and Narcotics Laboratory Personnel*. United Nations International Drug Control Programme, Vienna, United Nations, New York, 1994.
17. *Recommended Methods for the Detection and Assay of Heroin, Cannabinoids, Cocaine, Amphetamine, Methamphetamine and Ring-Substituted Amphetamine Derivatives in Biological Specimens*. Manual for use by National Laboratories. United Nations International Drug Control Programme, United Nations, New York, 1995.
18. Starmer G.A., Vine J.H., Watson T.R., *A co-ordinated approach to the drugs and traffic safety problem*, Int. J. Psychopharm., 3 (suppl. 1), 35-53 (1988).
19. Szukalski B., Mirkiewicz E., Taracha E., *Badania amfetaminy i jej psychoaktywnych analogów w moczu narkomanów metodą FPIA i HPTLC*, Alkoholizm i Narkomania. 1/26, 33-45 (1997).