
РЕКОМЕНДУЕМЫЕ МЕТОДЫ
ОБНАРУЖЕНИЯ И АНАЛИЗА

**ГЕРОИНА,
КАННАБИНОИДОВ,
КОКАИНА,
АМФЕТАМИНА,
МЕТАМФЕТАМИНА
И ЗАМЕЩЕННЫХ ПО
ЦИКЛУ ПРОИЗВОДНЫХ
АМФЕТАМИНА**

В БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОБАХ

РУКОВОДСТВО ДЛЯ
НАЦИОНАЛЬНЫХ ЛАБОРАТОРИЙ



ОРГАНИЗАЦИЯ ОБЪЕДИНЕННЫХ НАЦИЙ

**ПРОГРАММА ОРГАНИЗАЦИИ ОБЪЕДИНЕННЫХ НАЦИЙ
ПО МЕЖДУНАРОДНОМУ КОНТРОЛЮ НАД НАРКОТИКАМИ**

**Рекомендуемые методы
обнаружения и анализа**

**героина, каннабиноидов,
кокаина, амфетамина,
метамфетамина и замещенных
по циклу производных
амфетамина**

в биологических пробах

**РУКОВОДСТВО ДЛЯ НАЦИОНАЛЬНЫХ
ЛАБОРАТОРИЙ**



ОРГАНИЗАЦИЯ ОБЪЕДИНЕННЫХ НАЦИЙ
Нью-Йорк, 1995 год

Данная публикация основана на материалах

Совещания группы экспертов по выявлению и анализу находящихся под контролем наркотических средств в биологических пробах, проходившего в Сингапуре 25–29 сентября 1989 года и в Мадриде 1–5 октября 1990 года. Высказанные мнения не обязательно отражают мнение Организации Объединенных Наций. Настоящая публикация официально не редактировалась.

ST/NAR/27

Содержание

<i>Глава</i>	<i>Стр.</i>
Введение	1
I. Общие аспекты анализа находящихся под контролем наркотических средств в биологических пробах.....	5
А. Цель и стратегия	5
В. Общие руководящие принципы представления проб для обнаружения наркотических средств.....	6
С. Забор проб: подробное описание процедуры.....	6
D. Конфиденциальность результатов	9
E. Безопасность сотрудников лабораторий.....	10
F. Краткое изложение мер предосторожности в целях обеспечения сохранности проб.....	10
G. Методология	10
H. Обеспечение качества	15
I. Интерпретация результатов	15
II. Рекомендуемые методы обнаружения и анализа героина (морфина) в биологических пробах.....	17
А. Наиболее распространенные виды незаконных продуктов опия, морфина и героина.....	17
В. Методы отбора и подготовки проб для анализа метаболитов героина	23
С. Методы скрининга.....	25
D. Подтверждающие (контрольные) хроматографические методы	28
E. ГХ–МС анализ моноацетилморфина как индикатора употребления героина.....	33
F. Интерпретация результатов	34
III. Рекомендуемые методы обнаружения и анализа каннабиноидов в биологических пробах	35
А. Наиболее распространенные виды продуктов каннабиса	35
В. Описание незаконных продуктов каннабиса.....	39
С. Методы отбора и подготовки проб для анализа 9-карбокси-ТГК	45
D. Методы скрининга.....	47
E. Подтверждающие (контрольные) хроматографические методы	49
F. Интерпретация результатов	53
IV. Рекомендуемые методы обнаружения и анализа кокаина в биологических пробах.....	54
А. Наиболее распространенные виды незаконных продуктов коки.....	54

<i>Глава</i>	<i>Стр.</i>
В. Методы отбора и подготовки проб для анализа кокаина и его метаболитов.....	57
С. Методы скрининга.....	60
Д. Подтверждающие (контрольные) хроматографические методы.....	63
Е. Интерпретация результатов.....	66
Ф. Анализ и интерпретация содержания кокаина и его метаболитов в других биологических средах.....	67
V. Рекомендуемые методы обнаружения и анализа амфетамина и метамфетамина в биологических пробах.....	68
А. Введение.....	68
В. Методы отбора и подготовки проб для анализа амфетамина и метамфетамина и их метаболитов.....	70
С. Методы скрининга.....	72
Д. Подтверждающие (контрольные) хроматографические методы.....	76
Е. Интерпретация результатов.....	81
VI. Рекомендуемые методы обнаружения и анализа замещенных по циклу производных амфетамина в биологических пробах.....	82
А. Введение.....	82
В. Методы отбора и подготовки проб для анализа замещенных по циклу производных амфетамина.....	84
С. Методы скрининга.....	85
Д. Подтверждающие (контрольные) хроматографические методы.....	88
Е. Интерпретация результатов.....	92
Ссылки.....	93

Введение

А. История вопроса

В последнее десятилетие наблюдается колоссальный рост не только производства и предложения незаконных наркотических средств, что отражается в их огромных и все возрастающих количествах, изымаемых национальными и международными органами, но и масштабов злоупотребления наркотическими средствами, то есть незаконного спроса на наркотики. Среди изъятых наркотических средств наряду с традиционными наркотиками, уже находящимися под национальным и международным контролем, встречаются совершенно новые, ранее не известные незаконные наркотические вещества или их комбинации, которые изготовлены химиками, работающими в подпольных лабораториях. Одновременно сообщается о расширении ненадлежащего применения наркотических средств, используемых в лечебных целях, таких как барбитураты и бензодиазепины, и злоупотребления ими.

То, что традиционно считалась проблемой развитых стран, теперь уже вышло за их пределы. Злоупотребление наркотическими средствами в настоящее время стало глобальной проблемой, в равной степени затрагивающей как развитые, так и развивающиеся страны. Сегодня нет такой страны, которая была бы свободна от этой угрозы.

Масштабы и разнообразие форм злоупотреблений наркотическими средствами потребовали от государств значительно активизировать усилия по контролю над наркотиками, в ряде случаев путем введения жестких законодательных мер, что может иметь серьезные последствия для лиц, обвиняемых в связанных с наркотиками преступлениях. В конечном счете исход таких предпринятых в соответствии с законом судебных разбирательств базируется на результатах лабораторных анализов. Это обстоятельство привело к увеличению объема работы национальных лабораторий, от которых теперь требуется не только идентифицировать изъятые материалы, но и установить факт злоупотребления наркотиками. Кроме того, если в прошлом такая лаборатория зачастую должна была выполнять только качественные анализы, то теперь ей приходится представлять надежные как качественные, так и количественные результаты.

В области злоупотребления наркотическими средствами лаборатории теперь должны располагать возможностями для исследования большего числа веществ и применять более быстрые, но вместе с тем более точные и более специфичные методы обнаружения и анализа. При исследовании биологических проб, таких как моча и кровь, возникают дополнительные сложности, обусловленные необходимостью отделять вещества, являющиеся объектом анализа, от примесей, содержащихся в крови и моче, которые представляют собой сложные биологические матрицы.

Кроме того, международный характер проблемы злоупотребления наркотиками требует быстроты обмена аналитическими данными между лабораториями, как и между лабораториями и правоохранительными органами на национальном и международном уровнях. Достижению этих целей в значительной мере способствовала бы разработка международно приемлемых методов обнаружения и анализа наркотических средств.

В 1986 году в ходе работы над рекомендуемыми методами анализа изъятых каннабиса и амфетамина/метамфетамина участники Совещания группы экспертов в Куала-Лумпуре признали возрастающую актуальность разработки методов анализа наркотических веществ, являющихся предметом злоупотребления, и их метаболитов в биологических жидкостях организма человека. Организации Объединенных Наций было рекомендовано изучить наиболее целесообразные средства решения этой проблемы [1].

Комиссия по наркотическим средствам на своей тридцать второй сессии в феврале 1987 года одобрила это предложение и призвала Лабораторию Организации Объединенных Наций оказать содействие государствам-членам путем разработки и доведения до их сведения рекомендаций, связанных с анализом контролируемых наркотических средств в биологических жидкостях.

В соответствии с этим призывом Отдел по наркотическим средствам в 1987 году созвал совещание группы экспертов с целью разработки руководящих принципов для национальных программ по анализу наркотиков и лабораторий, выполняющих анализы наркотических средств, являющихся предметом злоупотребления, в биологических жидкостях. При оценке глобальных потребностей в данной конкретной области группой экспертов было отмечено, что перечень наркотиков, на наличие которых необходимо проводить анализ, как минимум должен включать опиаты (героин, морфин, кодеин), каннабиноиды, кокаин, метадон, метаквалон, амфетамин, метамфетамин и фенциклидин. Было рекомендовано "опубликовать на основе материалов совещания рабочие руководства по данной теме, которые могли бы служить руководящими указаниями при разработке программ и модернизации лабораторий", а также "создать обзорную группу экспертов для периодического рассмотрения методологии и процедур проверки на наркотики" [2].

На своей десятой специальной сессии Комиссия по наркотическим средствам одобрила рекомендации группы экспертов, особо подчеркнув необходимость "разработки рекомендуемых лабораторных методов проверки на наркотики и международных нормативных критериев для национальных программ по анализу биологических жидкостей организма, включая проверку квалификации персонала и утверждение методов/процедур" [3].

Аналогичным образом, на Международной конференции по борьбе со злоупотреблением наркотическими средствами и их незаконным оборотом, состоявшейся июне 1987 года, было высказано предложение о том, что "Отделу по наркотическим средствам в сотрудничестве с ВОЗ и МОТ следует развивать и координировать национальные усилия путем разработки международно приемлемых руководящих принципов, критериев и методологий национальных программ контроля". На Конференции также было предложено, что "для обслуживания национальных лабораторий следует создать центральный источник справочных стандартов основных метаболитов, связанных со злоупотреблением наркотическими средствами" [4].

В соответствии с просьбой Комиссии, по приглашению правительства Сингапура Отдел по наркотическим средствам созвал Совещание группы экс-

пертов по обнаружению и анализу находящихся под контролем наркотических средств в биологических жидкостях и по рекомендуемым методам обнаружения и анализа героина/морфия и каннабиноидов в биологических пробах. Затем в Мадриде состоялось совещание по рекомендуемым методам обнаружения и анализа кокаина, амфетамина, метамфетамина, а также замещенных по циклу производных амфетамина в биологических пробах.

В. Назначение Руководства

Настоящее переработанное Руководство объединяет следующие руководства Организации Объединенных Наций: *Рекомендуемые методы обнаружения и анализа героина и каннабиноидов* [5] и *Рекомендуемые методы обнаружения и анализа кокаина, амфетамина, метамфетамина и замещенных по циклу производных амфетамина в биологических пробах* [6]. Особо подчеркивается значение надлежащего проведения под соответствующим контролем отбора проб, их транспортировки и хранения, а также строгого соблюдения процедуры поддержания непрерывной цепочки хранения. При проведении анализа биологических проб важно строго выполнять руководящие указания в отношении представления проб. Необходимость этого обусловлена тем, что результаты анализа могут по закону иметь серьезные последствия для обследуемого лица.

Настоящее Руководство, подготовленное Лабораторией Сектора технического обслуживания Программы Организации Объединенных Наций по международному контролю над наркотиками (ЮНДКП), отражает выводы упомянутых групп экспертов и предназначено служить практическим пособием для национальных органов и специалистов по анализу, в котором изложены рекомендуемые методы обнаружения и анализа героина/морфина, каннабиноидов, кокаина, амфетамина, метамфетамина и замещенных по циклу производных амфетамина в биологических пробах для использования в лабораториях судебной экспертизы и токсикологических лабораториях.

При отборе методов эксперты располагали данными о том, что многие действующие в настоящее время лаборатории применяют методы, результаты которых соответствуют требованиям законодательства, а иногда и более жестким требованиям. Однако ими было отмечено, что структуры национальных программ, лабораторное оборудование и методики, используемые в обнаружении злоупотреблений наркотическими средствами, отличаются большим разнообразием. В целом настоящее Руководство представляет собой попытку оказать содействие предпринимаемым на национальном уровне усилиям в этой области и гармонизировать их, поскольку в нем предлагаются международно приемлемые руководящие принципы и выбранные методы, которые могут применяться в лабораториях. И что еще более важно, оно призвано помочь лабораториям, не имеющим доступа к сложному оборудованию и возможностям использовать сложные методы анализа. Каждый из представленных в Руководстве методов применялся в течение ряда лет в лабораториях, пользующихся заслуженной репутацией, и от его применения можно ожидать надежных результатов. В процессе определения этих методов группы экспертов, естественно, отдавали себе отчет в том, что существует множество других полезных и приемлемых методов.

С. Применение Руководства

Рекомендуемые в Руководстве методы были отобраны на основе их проверенной на практике надежности, что является весьма важным требованием, если результаты анализа предполагается использовать в целях судебного разбирательства или установления наказания. Окончательный выбор методологии и подхода к проведению анализа остается за химиком-аналитиком, работающим в условиях своей страны. Этот выбор будет неизбежно зависеть от наличия соответствующего оборудования, эталонных и справочных материалов и подготовленного персонала. Тем не менее в целях установления незаконного употребления наркотических средств рекомендуется использовать два метода: метод первоначального отборочного анализа – скрининга (как правило, метод иммунологического анализа), а затем метод подтверждающего (контрольного) анализа с использованием иных химических или физических принципов (обычно хроматографический метод). В том случае, если в распоряжении имеется лишь тонкослойная хроматография (ТСХ), предлагается провести повторный анализ методом ТСХ, но с использованием иной системы растворителей.

Подчеркивается, что, независимо от выбранных методов, необходимо уделить внимание надлежащему техническому содержанию оборудования и контролю за состоянием окружающей среды, особенно при транспортировке и хранении проб и неустойчивых реактивов, и что необходимо полагаться только на надлежащим образом подготовленный и квалифицированный персонал. Обращается внимание также на важность наличия учебных пособий по наркотическим средствам, являющимся предметом злоупотребления, и аналитическим методам. Кроме того, ожидается, что химик-аналитик будет в курсе последних тенденций в области токсического анализа, постоянно следя за текущими публикациями по этой теме. Полезными дополнениями к настоящему Руководству будут руководства Организации Объединенных Наций по рекомендуемым методам анализа героина [7], опиума/необработанного морфина [8], каннабиса [9], кокаина [10], амфетамина и метамфетамина [11], а также незаконных замещенных по циклу производных амфетамина [12]. Несмотря на то что названные руководства первоначально были предназначены для анализа изъятых материалов, содержащаяся в них информация может быть применена также и к анализу биологических проб.

Программа Организации Объединенных Наций по международному контролю над наркотиками с благодарностью примет замечания как по содержанию, так и в отношении практической полезности настоящего Руководства. Отзывы можно направлять по адресу:

United Nations International Drug Control Programme
Division for Operations and Analysis
Scientific Section
Vienna International Centre
P.O. Box 500
A-1400 Vienna
Austria

I. Общие аспекты анализа находящихся под контролем наркотических средств в биологических пробах

A. Цель и стратегия

Анализ биологических жидкостей/проб обычно проводится для двух целей:

для целей судебной экспертизы, например анализ биологических проб на наличие находящихся под контролем наркотических средств. Положительный результат анализа пробы в этом случае, как правило, ведет к уголовному судопроизводству и последующему наказанию обвиняемого, у которого взята данная проба;

для диагностических, лечебных и реабилитационных целей, например проведения анализа в лечебном аспекте для оценки причины интоксикации или определения того, воздерживалось ли лицо, у которого взята проба, от употребления наркотиков в течение нескольких предшествующих дней. В этом случае положительный результат анализа не обязательно влечет за собой возбуждение уголовного дела, однако может служить надежным показателем, на основе которого в дальнейшем будет проводиться лечение лица, у которого была взята данная проба.

Поскольку положительный результат анализа может приводить к принятию карательных мер, используемые процедуры и методы должны удовлетворять строгим нормам, основанным на принципах судебной токсикологии. Обычно рекомендуется следующая стратегия: сначала проводится отборочный анализ, скрининг-тест, с целью установления потенциально положительных образцов, а затем – подтверждающий (контрольный) анализ таких предположительно положительных проб.

Для первоначального скрининга проб лабораториям следует рассмотреть возможность использования методов иммунологического анализа, таких как радиоиммунологический анализ (РИА), иммуноферментный анализ (ИФА), флуоресцентный поляризационный иммунологический анализ (ФПИА) и реакция ингибирования агглютинации латекса (ИАЛ). Применение этих методов позволяет быстро исключить отрицательные пробы. Если иммунологический анализ дал положительный результат, затем следует провести подтверждающий анализ с использованием метода, в основе которого лежит иной химический или физический принцип, например тонкослойная хроматография (ТСХ), высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) или газовая хроматография (ГХ).

В. Общие руководящие принципы представления проб для обнаружения наркотических средств

Цель настоящих руководящих принципов – описать процедуры, которые будут удовлетворять необходимым критериям, гарантируя тем самым оптимальную достоверность результатов. В соответствии с рекомендацией Брюссельской группы экспертов для целей обнаружения наркотиков выбран анализ мочи. Помимо легкости забора проб мочи с помощью неинвазивных процедур метаболиты практически всех наркотических веществ экскретируются с мочой и могут быть обнаружены в ней в течение более продолжительного времени, чем в крови. Использование крови и других биологических материалов, таких как волосы, слюна или секрет потовых желез, в упомянутых выше целях, то есть для установления факта незаконного употребления наркотических средств, пока еще не стало общепринятой практикой.

Для обеспечения юридической действительности результатов анализов в условиях судебного разбирательства особое внимание следует уделять **надзору** за забором, транспортировкой и хранением проб. Надзор должен осуществляться специально подготовленным персоналом, четко понимающим юридическое значение данной процедуры; его следует осуществлять в виде непосредственного визуального наблюдения. Надлежащее наблюдение должно вестись постоянно, однако при этом необходимо делать все возможное, чтобы обеспечивались интимность личной жизни и достоинство личности. Ответственный за надзор обязан также не допустить каких бы то ни было попыток добавить в мочу загрязняющие или реактивные вещества. При необходимости транспортировки проб в аналитическую лабораторию должны быть обеспечены постоянная охрана и непрерывность четко установленной цепочки хранения.

Данные руководящие принципы применимы к ситуациям, когда забор проб мочи производится в местах, удаленных от аналитических лабораторий. Такая ситуация, возможно, не окажется характерной для всех стран или различных географических районов в пределах одной страны. Поэтому руководящие принципы должны быть адаптированы или изменены применительно к местным условиям, например в части хранения проб; при отсутствии холодильного оборудования химик-аналитик должен включить в свою программу контроля качества проверки на стабильность материалов.

С. Забор проб: подробное описание процедуры

1. В пункте забора проб

- Персонал пункта забора проб отвечает за забор, маркировку, упаковку и транспортировку проб, обеспечивая при проведении процедур забора и хранения соответствующую документацию и необходимые меры охраны.
- В пункте забора проб всему персоналу должна быть обеспечена надлежащая подготовка, необходимая для понимания процесса отбора проб и значения результатов лабораторных анализов.
- Забор проб должен проводиться под надзором специально подготовлен-

ных и уполномоченных на это сотрудников в их присутствии.

- Прежде чем приступить к забору проб мочи, необходимо обеспечить соответствующее данной цели туалетное оборудование.
- Помещение для забора проб мочи необходимо осмотреть на предмет наличия каких-либо веществ, которые могли бы быть использованы для фальсификации проб; в нем не должно быть мыла или чистящих (моющих) средств.

Возможные способы фальсификации проб мочи

Добавление в пробу различных химических веществ. Поваренная соль, моющие средства или некоторые широко используемые в быту вещества, такие как гипохлорит (отбеливатель), способны разрушать наркотические вещества или так влиять на анализ, что будет получен ложный отрицательный результат.

В некоторых обстоятельствах добавление в мочу незаконных наркотических веществ для получения положительных результатов.

В дне контейнера может быть проделано булавочное отверстие, через которое моча вытечет.

Под мышкой может быть спрятана наполненная жидкостью резиновая груша с трубкой, протянутой в область паха. Нажатием груши вода или какое-либо вещество высвобождается и разбавляет или загрязняет мочу.

Может быть представлена моча друзей обследуемого, которые не употребляют наркотики.

Добавление в контейнер с пробой воды из унитаза, чтобы разбавить мочу.

- Следует отбирать две дублирующие друг друга пробы мочи в емкости по 50 мл. Каждую емкость следует заполнять по крайней мере на две трети. Следует по возможности избегать использования пластиковых контейнеров и резиновых пробок, поскольку неполярные наркотические вещества и их метаболиты, такие как каннабиноиды, легко адсорбируются на некоторых видах пластмассовых и большинстве резиновых поверхностей. Если по практическим соображениям отдельные лаборатории используют одноразовые пластиковые контейнеры, им следует провести испытания с целью удостовериться, что эти пластиковые контейнеры не влияют на состав или концентрацию наркотика(ов) или метаболита(ов) в моче.
- Сразу же после забора пробы следует измерить и зарегистрировать температуру (32°–38°С в пределах 4 мин.) и pH свежей пробы мочи. Если возникнет подозрение в том, что проба фальсифицирована, следует уведомить об этом лабораторию. В таких случаях рекомендуется провести тщательное визуальное исследование (цвет, преципитация, пена и т. п.), а также проконтролировать содержание кретинина (180 ± 80 мг/100 мл: "нормальные значения"; 10–30 мг/100 мл: "подозрение на разбавление"; < 10 мг/100 мл: "проба разбавлена") и определить удельный вес мочи (1,007–1,035: "нормальные значения") [13, 14].
- Емкости следует плотно закупорить, опечатать и снабдить этикетками.

Следует принять меры, обеспечивающие целостность пробы, например опломбировать емкость сургучом с оттиском ведомственной печати или использовать какое-либо иное средство, позволяющее определить, была или нет фальсифицирована проба. Важно, чтобы обследуемый присутствовал при опечатывании емкостей и поставил свою подпись или инициалы на печати или этикетке.

- Этикетки следует прикреплять к контейнерам с пробами мочи, а не к крышкам. Это позволит предотвратить случайную или намеренную подмену проб и/или идентифицирующих этикеток.

Этикетка должна содержать, как минимум, следующую информацию:

Фамилия: _____
Идентификационный номер: _____
Дата и время забора пробы: _____
Место забора пробы: _____
Фамилия контролировавшего забор пробы: _____
Наркотик(и), на содержание которого(ых) проводится анализ: _____
Номер пробы: _____

- Данные о каждом лице, у которого берется проба, заносятся в бланк заявки на анализ. Этот бланк доставляется в лабораторию вместе с пробой.
- Лицо, у которого взята проба, не следует допускать к последующим операциям с ней – маркировке, упаковке и транспортировке пробы в лабораторию.
- Следует также соблюдать строгие меры охраны при хранении и уничтожении пустых емкостей, бланков заявок на анализ пробы, этикеток и упаковочных материалов.

2. Транспортировка и хранение

- После заполнения бланк заявки на анализ пробы и проба передаются курьеру для доставки в лабораторию. При транспортировке и хранении пробы должны быть защищены от воздействия прямых солнечных лучей и тепла, и поэтому во время перевозки их следует содержать в охлажденном состоянии, предпочтительно в ящике с теплоизоляцией, наполненном льдом или иным охлаждающим агентом.

Важно содержать пробы в охлажденном состоянии и в темноте в течение всего периода между забором и анализом пробы.

- Назначенное для перевозки лицо несет ответственность за транспортировку проб в лабораторию и ведение записей относительно поддержания це-

почки хранения, с тем чтобы гарантировать, что во время перевозки пробы не были фальсифицированы.

3. В лаборатории

- В лаборатории уполномоченное лицо должно принять и тщательно проверить пробы и сопроводительные документы. Одну емкость каждой пробы мочи следует использовать для анализа, а вторую – хранить в замороженном виде для дальнейшего анализа, если в этом возникнет необходимость.
- Удостоверившись, что пробы и заявка на анализ в порядке, уполномоченное лицо дает письменную расписку в их получении, подписывает и вручает доставившему их лицу.
- Лаборатория должна вести строго документированный учет и обеспечивать строгую охрану для гарантии целостности проб и конфиденциальности результатов.
- Если проведение анализа откладывается более чем на один-два дня, пробы следует хранить в замороженном виде, при возможности в запечатом холодильнике. В замороженном виде пробы, как правило, сохраняют свои свойства в течение нескольких месяцев.

4. Бланк заявки на проведение анализа на содержание наркотика

- Бланк заявки на проведение анализа на содержание наркотика, сопровождающий пробы мочи, позволяет сотрудникам лаборатории сверить отдельные пробы мочи с заявкой, чтобы подтвердить личность сдавшего пробы и удостовериться, что все отобранные пробы действительно доставлены в лабораторию.
- В бланке заявки должны содержаться, как минимум, идентификационные данные лица, у которого взята проба, сотрудника, ответственного за надзор при заборе пробы, и того, кто доставил пробу в лабораторию, номер пробы, дата и время забора, температура и рН пробы на момент забора.
- В заявку может быть включена дополнительная информация, такая как спецификация наркотиков, на содержание которых будет проводиться анализ, а также замечания о любых подозрениях относительно подлинности пробы.
- После заполнения бланка уполномоченное лицо подписывает заявку и ставит на нее официальную печать.

D. Конфиденциальность результатов

Важно постоянно обеспечивать полную сохранность и конфиденциальность.

- Любая информация, относящаяся к лицу, у которого взята проба, и к результатам анализа, должна храниться под замком и надежно охраняться.
- Доступ к отчетам должны иметь только уполномоченные лица.

Е. Безопасность сотрудников лабораторий

При работе с биологическими материалами сотрудники лабораторий подвергаются опасности заражения, в частности гепатитом и СПИДом. Поэтому весь персонал лаборатории должен принимать необходимые меры предосторожности и соблюдать правила безопасности, например надевать перчатки и другую защитную одежду.

Ф. Краткое изложение мер предосторожности в целях обеспечения сохранности проб

- Следует соблюдать строгие меры охраны не только в отношении проб, но и при хранении и уничтожении пустых емкостей, бланков заявок, этикеток и упаковочных материалов.
- Лицо, у которого была взята проба, не следует допускать к последующим операциям с ней – маркировке, упаковке и транспортировке пробы в лабораторию.
- Важно, чтобы обследуемый присутствовал при опечатывании емкостей и поставил свою подпись или инициалы на печати или этикетке.
- Необходимо вести точные и полные регистрационные записи в отношении всех лиц, участвовавших в сборе, хранении и транспортировке проб мочи.
- Этикетки следует прикреплять к контейнеру с пробами мочи, а не к крышке. Это позволит предотвратить случайную или намеренную подмену проб и/или идентифицирующих этикеток.
- Информация о лицах, у которых была взята проба, и результатах анализа должна оставаться строго конфиденциальной, и доступ к ней должен быть разрешен только уполномоченным лицам.

Г. Методология

Как было рекомендовано ранее, требуется проводить как предварительные отборочные (скрининг), так и подтверждающие (контрольные) анализы.

Скрининг должен обеспечивать с высокой степенью надежности идентификацию потенциально положительных проб; используемый метод должен быть чувствительным, быстрым и недорогим. Этим критериям в принципе удовлетворяют иммунологические анализы. Однако применяющиеся в иммунологических методах антитела характеризуются относительно низкой специфичностью, что может привести к перекрестной реактивности. Все положительные результаты, полученные в процессе скрининга с помощью иммуноло-

гического метода, должны быть подтверждены вторым анализом, основанным на иных химических принципах. В качестве скринингового теста может также использоваться тонкослойная хроматография (ТСХ).

Методы подтверждающего анализа должны быть как минимум не менее чувствительными, но более специфичными, чем методы скрининга. Обычно используются хроматографические методы, в число которых входят тонкослойная хроматография (ТСХ), газо-жидкостная хроматография (ГХЖ), высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) и газовая хроматография – масс-спектрометрия (ГХ–МС).

1. Методы иммунологического анализа

Методам иммунологического анализа отдается предпочтение, когда необходимо провести анализ большого числа проб за ограниченное время. Для скрининга наркотиков, являющихся предметом злоупотребления, имеется несколько выпускаемых промышленностью наборов для иммунологического анализа. К наиболее часто используемым методам относятся радиоиммунологический анализ (РИА), иммуноферментный анализ (ИФА), флуоресцентный поляризационный иммунологический анализ (ФПИА) и реакция ингибирования агглютинации латекса (ИАЛ). РИА, ИФА, ФПИА и ИАЛ (инструментальная версия при большом потоке проб) требуют относительно дорогостоящей аппаратуры. Любой из вышеуказанных методов может использоваться в лабораториях, в которых к ним имеется доступ.

Выбор метода в большинстве случаев зависит от объема работы (числа проб в день), выполняемой в данной лаборатории. Методы ИФА и РИА, например, используются в режимах как единичных, так и серийных анализов. В лабораториях, обрабатывающих небольшое число проб, можно использовать режимы единичного анализа или ИАЛ (в неинструментальной, местной версии), однако они дороги с точки зрения стоимости проведения анализа одной пробы. При большом объеме работы более пригодны методы серийных ИФА или ФПИА.

Для сведения к минимуму неточностей в результатах анализов необходимо уделять надлежащее внимание техническому обслуживанию и ремонту оборудования, контролю окружающей среды (постоянству температуры), а также поставкам и хранению (на холоде) относительно нестабильных реагентов. Ложные результаты также могут быть следствием фальсификации проб, например путем добавления в пробы меняющих рН (уксуса, аскорбиновой кислоты, лимонного сока, раствора извести и т. д.), окисляющих (гипохлорита натрия), поверхностно-активных (моющих средств, мыла и т. п.) и дезактивирующих ферменты (глутаровый альдегид) агентов, медикаментов (таких как глазные капли и капли для носа, содержащие тетрагидрозолин), подсластителей (сахарин) и хлорида натрия. Наиболее широко распространенные способы фальсификации – эндогенное (питье избыточного количества жидкости, прием диуретиков) и экзогенное разбавление (добавление воды), а также подмена или замена проб мочи.

Для некоторых методов иммунологического анализа характерны менее строгие требования к подготовке и опыту персонала, что облегчает набор сотрудников лабораторий, однако следует обеспечить наличие химиков-

аналитиков с большим опытом использования этих методов для осуществления надзора.

Некоторые характеристики основных методов иммунологического анализа приведены в таблице I.1.

Таблица I.1 Общие характеристики основных методов иммунологического анализа

<i>Характеристика</i>	<i>РИА</i>	<i>ИФА</i>	<i>ФПИА</i>	<i>ИАЛ</i>
Потребность в специальном оборудовании	Да	Да	Да	Нет ^c /Да ^d
Стабильность реагентов	3–4 недели	Несколько месяцев	Несколько месяцев	Более 1 года ^{c, d}
Стоимость реагентов	+	+++ ^a /++ ^b	++ (+)	+++ ^{c, d}
Возможность автоматизации	Да	Да	Да	Нет ^c /Да ^d
Число анализов, проводимых одним лаборантом за 8-часовую смену	200–400	100–400 ^b	250–300	200–350 ^c / ^{>} 500 ^d

^a Единичный анализ (s.t.).

^b Анализ мочи на злоупотребление наркотиками (d.a.u.), серийный.

^c Неинструментальный анализ на месте.

^d Инструментальный анализ при большом потоке проб.

2. Тонкослойная хроматография

Методы тонкослойной хроматографии являются недорогостоящими с точки зрения капитальных затрат на оборудование и других первоначальных затрат. Они трудоемки, обычно менее чувствительны, чем другие методы, и для правильного их применения необходим большой опыт, что обусловлено субъективным характером интерпретации результатов. Их рекомендуется использовать для подтверждающего анализа результатов скринингового иммунологического анализа и для первичного анализа, когда трудовые затраты не так важны, как капитальные, но имеется надлежащим образом подготовленный персонал.

В случаях, когда ресурсы лаборатории позволяют ей применить только методологию ТСХ, результат анализа не следует использовать в качестве единственного доказательства наличия наркотика в пробе или его употребления, если это будет иметь серьезные последствия для подозреваемого лица. В отсутствие более сложного оборудования приемлемым решением может оказаться проведение подтверждающего анализа с использованием хотя бы одной альтернативной системы растворителей для ТСХ и/или обнаруживающего реагента.

3. Газовая хроматография и высокоэффективная жидкостная хроматография

Газовая хроматография и высокоэффективная жидкостная хроматография обеспечивают высокую чувствительность и специфичность при подтверждении презумптивных положительных результатов скрининга. Однако ис-

пользуемое при этом оборудование является относительно более дорогим по сравнению с оборудованием для ТСХ или иммунологического анализа, и важнейшее значение имеют надлежащая подготовка и опыт работы персонала с этой в высшей степени сложной аппаратурой.

4. Газовая хроматография – масс-спектрометрия

Газовая хроматография – масс-спектрометрия является наиболее чувствительным и специфичным методом для подтверждения наличия наркотиков в биологической пробе. Он требует наиболее крупных капитальных затрат и расходов на подготовку кадров и техническое обслуживание. В отношении результатов анализа, проведенного данным методом, существует наименьшая вероятность того, что они будут оспорены в суде, и его следует считать необходимым и важным средством в национальных программах, в которых контрольная лаборатория будет окончательной инстанцией, выполняющей подтверждающий анализ в отношении результатов, правильность которых вызвала сомнения.

5. Подготовка проб

Обычно для проведения первоначальных иммунологических анализов требуется минимальная подготовка проб. Подвергать пробы мочи гидролизу нет необходимости, поскольку при иммунологическом анализе определяются как свободные, так и конъюгированные формы наркотика и/или его метаболитов. Могут потребоваться доведение рН или центрифугирование мочи для удаления мутности. В целях получения оптимальных результатов следует соблюдать инструкции изготовителя.

В случае использования хроматографических методов тщательная подготовка пробы крайне важна. Это необходимо, поскольку моча представляет собой комплекс, содержащий смесь больших количеств многочисленных органических и неорганических соединений, в котором конкретное исследуемое вещество присутствует в ничтожных количествах. Подготовка пробы обычно включает гидролиз мочи и экстракцию и очистку исследуемых веществ. Эта процедура должна быть эффективной, поскольку для экстракции небольших количеств исследуемого соединения необходимо обеспечить хороший выход этого вещества, и избирательной, чтобы обеспечить удаление из пробы мешающих анализу примесей.

Подготовка проб для ГХ и ГХ–МС нередко включает приготовление химических производных исследуемых веществ. Хотя этот дополнительный этап может потребовать увеличения затрат времени и средств вследствие использования реагентов, тем не менее приготовление производных часто рекомендуется по следующим причинам:

Достигается более высокая чувствительность.

Модифицированные соединения термически более стабильны по сравнению с немодифицированными формами.

Улучшаются хроматографические характеристики, то есть форма пика, время удержания и разделение.

Масс-спектры содержат ионы, более подходящие для ГХ–МС в режиме мониторинга выбранного иона (МВИ), чем ионы немодифицированных форм.

6. Количественный анализ

Для целей установления незаконного употребления наркотиков использование методов количественного анализа не является абсолютно необходимым. Однако определение количества идентифицированных с помощью метода(ов) скрининга наркотических средств и их метаболитов полезно во многих отношениях, особенно в аспекте интерпретации результатов анализа.

Хроматографические методы обычно дают надежное количественное определение исследуемых веществ. Методы ТСХ можно использовать для количественного анализа, однако для них потребуется планшетный сканер для пластинок или денситометр, и они могут оказаться ненадежными или неэффективными с точки зрения затрат. Методы иммунологического анализа, применительно к рассматриваемой ситуации, также не дают надежной количественной оценки из-за скрытой возможности присутствия в пробе неидентифицированных веществ, способных вступать в перекрестные реакции.

При количественном анализе с помощью ГХ, ВЭЖХ или ГХ–МС к пробе до проведения экстракции необходимо добавить внутренний стандарт. Внутренний стандарт также позволяет измерить относительное время удержания. Внутренние стандарты должны иметь сходные с исследуемыми веществами характеристики, позволяющие экстрагировать их, получать их производные и осуществлять их анализ при тех же условиях, что и для целевых соединений, но они должны быть легко отличимы от последних в процессе хроматографии. Однако при этом необходимо принять меры предосторожности, чтобы исключить использование веществ, которые могут находиться в пробе, таких как другие наркотические препараты или эндогенные соединения.

При проведении количественного анализа методом ГХ–МС наилучшим выбором для внутреннего стандарта обычно является меченный дейтерием аналог исследуемого вещества. Однако меченные дейтерием аналоги дороги и могут оказаться труднодоступными. Обычно в качестве внутренних стандартов вполне приемлемы и другие аналоги анализируемого вещества.

Если принято решение применять количественные методы, немедленно возникает необходимость проверки выбранного метода в отношении точности и сходимости результатов, как это изложено ниже. Коэффициент вариации хроматографического метода должен быть определенно менее 10%, предпочтительно менее 5%.

Концентрацию исследуемого вещества можно рассчитать по следующей общей формуле:

$$\text{Концентрация исследуемого вещества } X = \left[\frac{A_X/A_{IS} \text{ в хроматограмме пробы}}{A_{RS}/A_{IS} \text{ в хроматограмме стандарта}} \right] \cdot C_{RS}$$

где:

A_X	=	площадь пика исследуемого вещества X , определенная по хроматограмме пробы
A_{IS} в хроматограмме пробы	=	площадь пика внутреннего стандарта, определенная по хроматограмме пробы
A_{RS}	=	площадь пика эталонного стандарта, определенная

A_{JS} в хроматограмме стандарта	=	по хроматограмме стандарта площадь пика внутреннего стандарта, определенная по хроматограмме стандарта
C_{RS}	=	концентрация исследуемого вещества X в растворе эталонного стандарта

Н. Обеспечение качества

Наличие надлежащим образом подготовленного и квалифицированного персонала – основное условие для получения надежных результатов. Строгое соблюдение установленных лабораторных процедур и надлежащей лабораторной практики, стандартных рабочих инструкций, а также регулярная переподготовка персонала будут способствовать обеспечению высокого качества и надежности работы лаборатории.

1. Внутренний контроль качества

Надлежащая и тщательно документированная программа обеспечения качества должна быть неотъемлемой частью организационной системы лаборатории по наркотикам и, как минимум, должна включать определенные средства оценки точности и сходимости результатов всех проводимых анализов. Точность методов следует оценивать или путем проведения нескольких анализов отдельных проб и/или путем анализа достаточного числа проб, предназначенных для контроля качества (с различными концентрациями наркотика или метаболита в соответствующей биологической жидкости). Это позволит химику-аналитику провести статистическую оценку точности в рамках партий проб за определенный период времени.

2. Внешняя оценка качества

При возможности лаборатория должна принимать участие в программе внешней проверки своего профессионального уровня. В идеале такую программу должна осуществлять независимая внешняя организация, например Организация Объединенных Наций, а лаборатории государств-членов должны быть приглашены к участию в ней. В отсутствие такой программы лаборатории одной страны могут принять следующую стратегию:

Межлабораторная программа проверки профессионального уровня: она проводится путем предоставления лабораториями друг другу проб для анализа и проверки качества работы друг друга.

Главную центральную лабораторию следует назначить контрольной лабораторией. Этот центр должен направлять во все лаборатории пробы, содержащие различные концентрации исследуемого(ых) вещества (веществ) для проведения анализа. Результаты анализов затем должны оцениваться контрольной лабораторией.

I. Интерпретация результатов

Качественный или количественный анализ биологической пробы представляет доказательство, употребляло ли данное лицо контролируемый наркотик или нет. Наличие метаболитов может свидетельствовать о том, что наркотическое вещество поступило в организм.

Положительный результат первоначального скрининга означает, что в пробе присутствует наркотик или метаболит, концентрация которого превышает критическую концентрацию или равна ей. Выведение из организма и концентрация наркотика в моче зависят от таких факторов, как способ введения наркотика в организм, частота и продолжительность употребления, функциональное состояние внутренних органов, скорость метаболизма наркотика, физическое состояние данного лица, возраст, пол, рацион питания, время забора пробы, эндогенного разведения и т. п. Однако важно отметить, что концентрация наркотика в моче никак не может быть связана с уровнем психических нарушений.

II. Рекомендуемые методы обнаружения и анализа героина (морфина) в биологических пробах

A. Наиболее распространенные виды незаконных продуктов опия, морфина и героина [7, 8]

1. Опий

Опий – натуральный продукт, получаемый из сока незрелого мака при надрезе его семенной коробочки. Вытекающий из надреза сок, похожий на молоко, собирается вручную и высушивается на воздухе до получения опийной смолы. Опий-сырец представляет собой сложную смесь, содержащую сахара, белки, липиды, другие смолистые вещества, а также воду. Таким образом, на долю фракции активных алкалоидов приходится лишь 10–20% общего веса. Всего описано около 40 алкалоидов, из которых четыре или пять считаются основными компонентами. Главные алкалоиды подразделяют на две основные категории – фенантроновые алкалоиды, представленные морфином, кодеином и тебаином, и изохинолиновые алкалоиды, представленные папаверином и наркотином (носкапином).

Относительное содержание различных алкалоидов может значительно варьироваться в зависимости от таких факторов, как климат, высота над уровнем моря, плодородность почвы, количество доступной влаги, возраст растения, время сбора сока и вида *Papaver somniferum*.

Морфин – главный алкалоид опия, его содержание колеблется от 4 до 21%, обычно 8–14%. Законно производимый опий-сырец, известный как индийский опий, содержит не менее 9,5% морфина в пересчете на безводный морфин.

Наркотин – второй по содержанию алкалоид, на его долю приходится 2–8%. Наркотин не является наркотиком и иногда обнаруживается в неочищенном морфине как примесь.

Концентрации кодеина в опии-сырце колеблются от 0,7 до 3%. При изготовлении героина из неочищенного морфина присутствующий там в виде примеси кодеин превращается в ацетилкодеин.

Тебаин относится к второстепенным алкалоидам *Papaver somniferum*, содержится на уровне 0,2–1%.

Содержание папаверина обычно составляет 0,5–1,3%.

Еще одним характерным для опия веществом является мекониевая кислота, содержание которой достигает 15%. В зависимости от метода экстракции это вещество влияет на чистоту неочищенного морфина, извлекаемого из опия.

a) Опий-сырец

Свежий опий-сырец представляет собой липкую дегтеобразную темно-коричневую массу, которой придается любой вид или любая форма в зависимости от способа упаковки и страны происхождения. Со временем консистенция опия меняется, он становится хрупким и твердым. Опий имеет характерный лакричный запах, усиливающийся при растворении продукта в воде. Он представляет собой неоднородный материал, в котором содержатся остатки маковых коробочек, иногда опий разбавляют, примешивая банановую пульпу или канифоль. Обычно опий завертывают сначала в листья растений, а затем в пластиковую обертку, перетянутую бечевкой.

b) Опий для курения

Опий для курения, известный также в Юго-Восточной Азии под названием "ченду", представляет собой продукт, получаемый из опия-сырца различными методами, в частности водной экстракцией, фильтрованием и выпариванием. Такая обработка опия проводится для того, чтобы получить продукт, годный для курения.

c) Опийные остатки

Вещество, оставшееся в курительной трубке после сгорания опия, называется опийными остатками. Из-за неполного сгорания и испарения такие остатки сохраняют некоторые свойства опия, так как содержат в значительном количестве морфин. В Юго-Восточной Азии зарегистрированы смеси опийных остатков с опиум-сырцом и опиумом для курения.

d) Медицинский опий

Медицинский опий, называемый также порошкообразным опиумом, представляет собой опий, высушенный при умеренной температуре и размолотый в мелкий или мелкозернистый порошок. Путем добавления порошкообразной лактозы, лузги какао или рисового крахмала содержание морфина в таком опиуме доведено до 9,5–10,5% в соответствии с фармакопейными требованиями. Внешне медицинский опий представляет собой светло-коричневый порошок, содержащий желто-коричневые или красно-коричневые частицы, с характерным запахом опия.

Различия между всеми рассмотренными выше продуктами опия с химической точки зрения весьма незначительны.

2. Неочищенный морфин

Неочищенный морфин, приобретаемый на незаконном рынке, может быть очень высокого или очень низкого качества, в зависимости от используемых методов очистки, назначения получаемого материала, а также сложившихся привычек, уровня знаний и профессионального умения незаконного химика.

3. Героин

Необходимо подчеркнуть, что не существует двух образцов героина, которые бы полностью совпадали по своему внешнему виду. И неудивительно, что героин встречается в столь многочисленных формах, если принять во внимание огромное разнообразие видов исходного природного сырья и способов изготовления героина отдельными партиями, а также последующие добавление примесей и трансформации для целей сбыта. Представленные ниже типы героина – всего лишь выборка, хотя отобраны наиболее распространенные типы. Если материал, представленный на судебную экспертизу, по внешнему виду никак не напоминает ни один из охарактеризованных в данном разделе типов, это, разумеется, не означает, что он не является героином или содержащим героин продуктом.

a) Два типа героина из Юго-Западной Азии

Тип 1: Отличается большим разнообразием цвета и консистенции, встречается практически любого оттенка от бежевого до темно-коричневого. Почти всегда имеет вид порошка, часто очень мелкого, однако в порошке иногда встречаются небольшие комки, которые мягки на ощупь и легко разрушаются при надавливании. Продукт данной категории фактически представляет собой основной тип героина, доминирующий в поставках из этого региона. Разнообразие внешнего вида героина этого типа соответствует широкий диапазон его химического состава, однако образцы героина, изъятые в последнее время, свидетельствуют, что современный продукт имеет более постоянный состав. Обычно он имеет вид мелкого порошка светло-коричневого цвета с характерным опийным запахом, типичная чистота героина достигает 60%, а все алкалоиды и производные присутствуют в виде основания. Типичный состав других алкалоидов и производных веществ:

Ацетилкодеин	5%
O ⁶ -моноацетилморфин.....	3%
Наркотин	10%
Папаверин	4%

Тип 2: Сухой тонкий порошок белого, беловатого или кремового цвета, запах значительно слабее, чем у типа 1, чистота в пределах 80–90%, героин содержится в виде соли соляной кислоты. Некоторые образцы этого типа неотличимы от героина "фармацевтической чистоты". Ниже приведен типичный состав других алкалоидов и производных веществ:

Ацетилкодеин	3%
O ⁶ -моноацетилморфин.....	2%
Наркотин	НЕ ОБНАРУЖЕН
Папаверин	НЕ ОБНАРУЖЕН

b) Два типа героина со Среднего Востока

Тип 1: Тонкие порошки бежевого или светло-коричневого цвета; комки присутствуют редко. Образцы с содержанием героина более 70% встречаются редко, средняя чистота – около 50%. Алкалоиды и производные присутствуют

в форме солей соляной кислоты. Типичный состав других алкалоидов и производных веществ:

Ацетилкодеин.....	3%
O ⁶ -моноацетилморфин.....	2%
Наркотин.....	НЕ ОБНАРУЖЕН
Папаверин.....	НЕ ОБНАРУЖЕН

Данный тип, как правило, содержит разбавитель, нередко фармацевтический, например прокаин.

Тип 2: Тонкие порошки белого или беловатого цвета. Некоторые образцы содержат 70–80% героина, тогда как другие, видимо, представляют собой продукт высокой чистоты в разведенной форме, содержащей эквивалентное количество кофеина, в связи с чем содержание героина снижается до 30–40%. Алкалоиды и производные присутствуют в форме солей соляной кислоты. Разведенные формы содержат лишь следовые количества ацетилкодеина, O⁶-моноацетилморфина, папаверина или наркотина, однако продукты высокой чистоты имеют следующий типичный состав:

Ацетилкодеин.....	2–3%
O ⁶ -моноацетилморфин.....	2%

с) Два типа героина из Юго-Восточной Азии

Героин для курения "Китайский № 3"

Твердое гранулированное вещество. Размер гранул обычно 1–5 мм в диаметре. В отличие от комков героина из Юго-Западной Азии, эти гранулы твердые и не рассыпаются при надавливании. Порошка в материале очень мало. Наиболее распространенный цвет – серый, хотя часто встречается и грязно-коричневый, и существует особая разновидность, когда гранулы имеют красный или розовый цвет – "пенанговый розовый". При количественном анализе получаются следующие результаты:

В свежеприготовленном материале серого или грязно-коричневого цвета – героина 20%, кофеина – 40% и следовые количества других алкалоидов, хотя в героине этого типа за счет гидролиза может быстро образовываться до 5% O⁶-моноацетилморфина. Алкалоиды могут присутствовать в форме солей соляной кислоты или оснований; в некоторых пробах, видимо, присутствуют как соли, так и основания, что свидетельствует о том, что соляная кислота была добавлена не в стехиометрическом количестве.

Красный или розовый цвет материала свидетельствует о том, что количественное содержание компонентов аналогично серому или грязно-коричневому продукту, но кофеин заменен барбитоном.

Героин для инъекций "Китайский № 4"

Тонкий белый порошок с незначительным запахом и без комков. Фактически весь материал будет состоять из героина. Наркотин и папаверин не обнаруживаются; содержание O⁶-моноацетилморфина обычно менее 3%. Количество ацетилкодеина, как правило, существенно выше, чем в эквивалентном

продукте высокой чистоты из Юго-Западной Азии. Все алкалоиды присутствуют в виде солей соляной кислоты.

Для всех типов героина, независимо от его происхождения, необходимо отметить, что уровни O⁶-моноацетилморфина временами превышают указанные здесь величины. Образцы плохо изготовленного героина часто гидролизуются с превращением героина в O⁶-моноацетилморфин. Наиболее распространенной причиной такого гидролиза является нестехиометрическое добавление соляной кислоты (как правило, избыточное).

Гидролиз редко приводит к высокому содержанию морфина, по крайней мере в незаконном героине твердой формы. Высокие концентрации морфина в изъятых за последнее время материалах, скорее всего, являются показателем низкого качества технологии их изготовления.

При проведении лабораторного анализа различных биологических проб на содержание героина или родственных опиатов, таких как морфин и кодеин, объектами исследования являются следующие соединения (структурные формулы этих веществ см. на рис. П.1):

Героин (диацетилморфин, ДАМ)
Морфин
O⁶-моноацетилморфин (МАМ)
Кодеин
Ацетилкодеин.

Кроме того, важнейшее значение для аналитика имеют различные морфин-О-глюкурониды (см. рис. П.1), так как большая часть героина выводится с мочой в виде связанного морфина в форме:

Морфин-3-О-глюкуронид (М-3-Г)
Морфин-6-О-глюкуронид (М-6-Г)
Морфин-3,6-О-диглюкуронид.

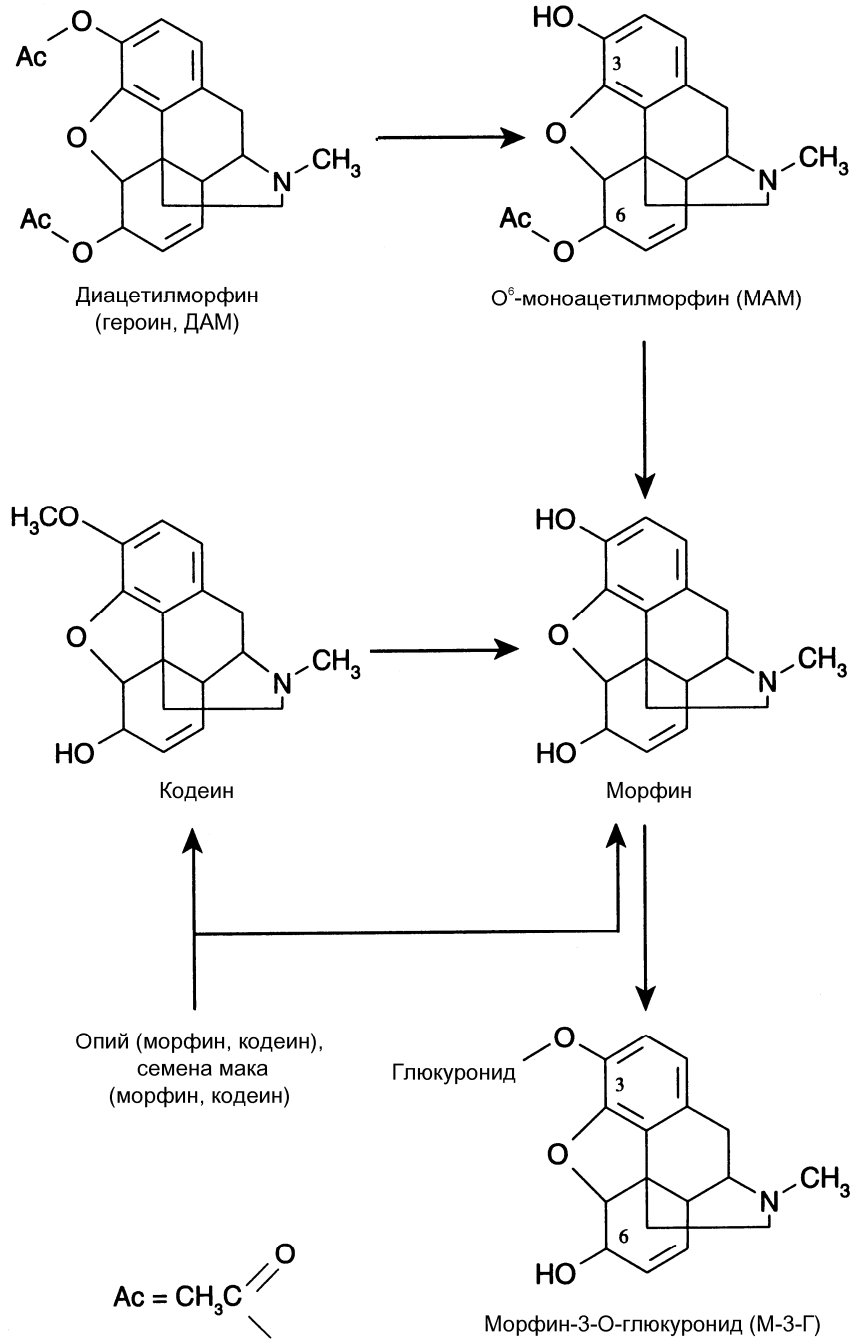
4. Способы введения в организм

Героин вводят в организм несколькими способами: нюхая или втягивая через нос, при курении, подкожными или внутривенными инъекциями. При введении путем инъекций порошок сначала растворяют в воде. Растворению помогает нагревание и подкисление раствора.

5. Метаболизм и экскреция героина

При поступлении в организм героин подвергается быстрому деацетилированию, превращаясь в МАМ [15, 16], который затем уже медленнее гидролизует в морфин. Эти метаболические пути показаны на рис. П.1. Главными метаболитами героина, обнаруживаемыми в моче спустя 20–40 ч после внутривенного введения, являются: М-3-Г (38,2% введенной дозы), свободный морфин (4,2%), МАМ (1,3%) и неизмененный героин (0,1%). Другие глюкурониды морфина, равно как и норморфин [17], могут обнаруживаться как второстепенные метаболиты героина. В моче лиц, принимающих незаконный героин, часто обнаруживают также кодеин, однако он является метаболитом не героина, а скорее продуктом деацетилирования ацетилкодеина, который часто присутствует в качестве примеси в незаконном героине.

Рис. II. 1 Метаболический путь опиатов



После терапевтического приема морфина его концентрации в моче могут составлять до 10 мкг/мл, а при смертельных передозировках героина его содержание может оказаться значительно больше: так, описан случай с концентрацией 86 мкг/мл [18]. Морфин (и кодеин) экскретируются с мочой также после приема маковых семян [19].

Вследствие быстрого метаболизма героина его определение непосредственно в биологических жидкостях человека нецелесообразно (период полураспада составляет 2–3 мин. [18]). Обычно проводится количественное определение в моче содержания главного метаболита героина – морфина. Употребление героина можно также подтвердить с помощью определения в моче МАМ, однако этот специфический метаболит может быть обнаружен только спустя непродолжительное время после приема героина (время обнаружения: 2–8 ч [19]), так как это соединение также весьма быстро превращается в организме в морфин (период полувыведения: 0,6 ч [19]). Для обнаружения МАМ требуются модифицированная методика экстракции и более сложное оборудование.

В большинстве случаев в этом не бывает необходимости.

В. Методы отбора и подготовки проб для анализа метаболитов героина

Описание общих методов отбора проб приведено в разделах I.C и G.5.

1. Подготовка проб для иммунологического анализа

Обычно для проведения иммунологических анализов требуется минимальная подготовка пробы или ее не требуется вообще (см. также раздел I.G.5). Подвергать пробы мочи гидролизу нет необходимости, поскольку при иммунологическом анализе определяются как свободные, так и конъюгированные формы наркотика и/или его метаболитов. Могут потребоваться доведение pH или центрифугирование мочи для удаления мутности. Для получения оптимальных результатов следует соблюдать инструкции изготовителя.

2. Подготовка проб для хроматографии

Объем мочи, необходимый для анализа, зависит от используемого хроматографического метода. Для ТСХ и ГХ с использованием насадочной колонки рекомендуемый объем составляет 10 мл, для остальных хроматографических методик – 5 мл.

а) Гидролиз

Кислотный гидролиз

В подходящую 50 мл пробирку с 10 мл мочи добавить 1 мл концентрированной соляной кислоты, пробирку неплотно закрыть и инкубировать в водяной бане при температуре 100°C в течение приблизительно 60 мин.

Ферментативный гидролиз

Если моча имеет щелочную реакцию, с помощью уксусной кислоты довести рН пробы (объем 5–10 мл) до 7. Добавить на каждый миллилитр мочи по 0,1 мл 0,1 М ацетатного буфера (ацетат натрия–уксусная кислота рН 5,5) и по 0,02 мл раствора β-глобурунидазы (75 единиц/мл). Инкубировать в течение 24 ч при температуре 37°C или в течение 1 ч при температуре 55°C на выбор. Во избежание денатурации фермента не допускать превышения температуры 55°C. Экстракция свободного морфина производится в соответствии с описанным ниже.

Мера предосторожности

Кислотный и ферментативный гидролизы могут приводить к деацетилированию МАМ с образованием морфина.

в) Экстракция

Жидкостно-жидкостная

Довести рН мочи до значений в пределах 8,5–9,0 и осуществить экстрагирование двойным объемом любого из указанных ниже органических растворителей:

- Хлороформ–изопропанол (9:1, по объему)
- Дихлорометан–изопропанол (9:1, по объему)
- Этилацетат.

Во избежание попадания в экстракт воды необходимо соблюдать осторожность и дать водному слою полностью разделиться со слоем растворителя, перед тем как отбирать экстракт. В случае образования эмульсии можно использовать фильтровальную бумагу, обработанную силиконом (бумага для разделения фаз), через которую надо профильтровать экстракт; эмульсия разрушается обработкой ультразвуком. При необходимости получить более чистый экстракт следует провести повторную экстракцию органического растворителя 6 мл 0,5 М раствора соляной кислоты. Отбросить слой органического растворителя и довести рН водного раствора до 8,5–9,0, после чего осуществить повторное экстрагирование одним из указанных выше растворителей. Отделить органические слои, объединить и профильтровать полученный раствор через небольшое количество сухого сульфата натрия, промыть фильтр 5 мл органической фазы. Сконцентрировать раствор до примерно 1–2 мл и досуха выпарить остаток под током азота. Для анализа методом ТСХ или ГХ снова растворить остаток в 0,1 мл метанола или смеси метанол–хлороформ (9:1).

Твердофазная

При наличии соответствующего оборудования можно использовать методику жидкостной экстракции с поддержкой броунмиллеритом (целитом)

[20]. Также рекомендуется следующий метод твердофазной экстракции (ТФЭ), использующий двуокись кремния С-18 [21].

Перед применением промыть колонку 5 мл метанола, 3 мл дистиллированной воды и 1 мл 0,05 М борного буфера (рН 9,0). Пробу мочи (1 мл) смешать с 50 мл (= 50 нг) внутреннего стандарта налорфина и 1,0 мл буфера (рН 9,0), после чего перенести смесь в колонку с двуокисью кремния С-18. Промыть колонку 100 мл 80% водного раствора метанола. Элюировать морфин 0,5 мл метанола.

с) Внутренние стандарты

Внутренние стандарты должны соответствовать критериям, приведенным в разделе I.G.6. Налорфин подходит для ГХ, а для ГХ–МС в качестве внутренних стандартов предпочтительнее применять меченные дейтерием аналоги морфина или соответствующих соединений. Если последние недоступны, следует использовать один из названных выше стандартов для ГХ. Для ВЭЖХ в качестве внутреннего стандарта подходит *l*- α -ацетилметадол · HCl.

д) Стандарты для калибровки

Для ГХ приготовить отдельные исходные растворы морфина и налорфина в метаноле с концентрацией 1 мг/мл. Используя эти исходные растворы, приготовить водные стандартные растворы для калибровки с концентрациями морфина в диапазоне от 0 до 10 мкг/мл и дополнительно 5 мкг/мл налорфина.

Для ВЭЖХ готовят и хранят в холодильнике исходные растворы в метаноле *l*- α -ацетилметадол · HCl, ДАМ, МАМ и морфина в концентрации 1 мг/мл. Растворы стандартов для калибровки готовят разведением исходных растворов смесью метанол–ацетонитрил (20:80, по объему).

С. Методы скрининга

1. Методы иммунологического анализа

Лабораториям, для которых доступны методы иммунологического анализа, при проведении первоначального скрининга рекомендуется использовать именно эти методы. Рекомендуется применять радиоиммунологический анализ, иммуноферментный анализ, флуоресцентный поляризационный иммунологический анализ, а также реакцию ингибирования агглютинации латекса (ИАЛ). Антитела имеющихся в продаже наборов для иммунологического анализа специфичны к морфину, однако они могут давать перекрестную реакцию с другими опиатами [22]. В таблице II.1 приведены некоторые основные данные о перекрестной реактивности ряда имеющихся в продаже наборов для иммунологического анализа.

Таблица II.1 Перекрестная реактивность имеющихся в продаже наборов для иммунологического анализа морфина

Анализ	Перекрестная реактивность (%)			
	Морфин	МАМ	М-3-Г	Кодеин
Coat-A-Count	84 (300) ^{a, b}	0 (100)	1 (618)	0,1 (600)
Abuscreen-RIA	85 (300) ^{a, b}	15 (100)	52 (618)	198 (300)
EMIT-d.a.u.	86 (300) ^{a, b}	16 (100)	45 (618)	330 (300)
FPIA-TDx	90 (300) ^{a, b}	93 (50)	64 (185)	111 (300)
Abuscreen-Ontrak	100 (300) ^{c, d}	–	86 (350)	171 (175)
Abuscreen-Online	100 (300) ^{c, d}	97 (311)	62 (480)	134 (255)

^a Выявляемая перекрестная реактивность рассчитана путем деления выявляемой концентрации на концентрацию определяемого соединения и умножения на 100 (в скобках приведена концентрация, при которой определялась перекрестная реактивность, нг/мл).

^b См. Edwards [14].

^c Перекрестная реактивность рассчитана путем деления концентрации определяемого соединения (300 нг/мл) на концентрацию, эквивалентную 300 нг/мл морфина, и умножения на 100 (в скобках эквиваленты, нг/мл).

^d Данные изготовителя.

2. Тонкослойная хроматография

Стандартная методика ТСХ

Подробное описание стандартных материалов и методик ТСХ приведено в руководстве Организации Объединенных Наций *Рекомендуемые методы анализа опия/необработанного морфина* [8], которые применимы для анализа биологических экстрактов на морфин.

Пластинки для ТСХ

Покрытие:	Активированный силикагель G. Также может применяться силикагель, содержащий добавку, флуоресцирующую под действием УФ-излучения с длиной волны 254 нм
Толщина слоя:	0,25 мм
Размер пластинок:	Стеклопластиковые пластинки 20 × 20 см, 20 × 10 см или 10 × 5 см. Оптимальная длина пробега приблизительно 10 см

Стандартные растворы

Морфин.

Кодеин.

Все стандартные растворы готовятся в метаноле при концентрации 1 мг/мл. На пластинку наносится 5–10 мкл каждого раствора. Могут использоваться как соли, так и основания, поскольку на пластинках для ТСХ соединения всегда продвигаются как свободные основания.

Методика

Нанести на пластинку 25 и 50 мкл экстракта в виде пятна (см. раздел II.B.d) с последующим разделением в одной из представленных ниже систем растворителей.

Растворители для разделения [8, 23]

Система А:	Толуол	45
	Ацетон	45
	Этанол	7
	Концентрированный раствор аммиака	3
Система В:	Этилацетат	85
	Метанол	10
	Концентрированный раствор аммиака	5

Визуализация

До визуализации пластинки должны быть высушены. Высушивание может производиться при комнатной температуре или более быстро в термостате при 120°C в течение 10 мин., или при использовании нагнетального вентилятора горячего воздуха. Для того чтобы получить надлежащее развитие окраски, важно удалить с пластинки все следы аммиака и других оснований. Для визуализации рекомендуются следующие методы [7, 8, 24]:

УФ-излучение с длиной волны 254 нм.

Реактив Драгендорфа.

Для приготовления раствора А смешать 2 г субнитрата висмута (оксинитрат висмута), 25 мл концентрированной (ледяной) уксусной кислоты и 100 мл воды. Для приготовления раствора В растворить 40 г йодида калия в 100 мл воды. Для получения реактива Драгендорфа смешать 10 мл раствора А, 10 мл раствора В, 20 мл концентрированной (ледяной) уксусной кислоты и 100 мл воды.

Реактив – подкисленный йодоплатинат калия.

0,25 г хлорида платины и 5 г йодида калия растворить в воде до 100 мл. Это – реактив йодоплатинат калия. Чтобы получить подкисленный вариант, добавьте 2 мл концентрированной соляной кислоты.

Флуоресцентный реактив [24].

- i) Буфер АМП: добавить 105 мг 2-амино-2-метил-1,3-пропандиола к 18,8 мл концентрированной соляной кислоты и развести водой до 1000 мл (рН 9,3 ± 0,2).
- ii) Раствор феррицианида калия: растворить 58 мг феррицианида калия в 100 мл дистиллированной воды и хранить в холодильнике (готовить новый раствор еженедельно).

Сначала пластинку следует рассмотреть под действием ультрафиолетового (УФ) излучения. С реактивом Драгендорфа морфин дает оранжевые пятна на желтом фоне, при распылении йодоплатинового реактива – пятна синие до фиолетового цвета. С флуоресцентным реактивом морфин дает флуоресценцию под действием УФ-излучения.

Результаты

Таблица II.2 R_f × 100 значений [8]

Соединение	Система для разделения	
	A	B
Морфин	19	20
Кодеин	40	35

В. Подтверждающие (контрольные) хроматографические методы

1. Газовая хроматография

а) Получение производных веществ пробы

Силилирование

Экстракт мочи упаривают досуха под током азота, и из полученного остатка получают производные в закрытом сосуде с 20 мкл *N,O*-бис-триметилсилилтрифторацетамида (БСТФА) или *N,O*-бис-триметилсилилацетамида (БСА) путем нагревания при температуре 85°C в течение 15 мин. Как вариант, вместо чистых силилирующих реактивов возможно применение смеси силилирующего реактива и пиридина (1:1, по объему). Данная смесь инжектируется непосредственно в хроматографическую систему.

Если должен использоваться азотно-фосфорный детектор (АФД), силилирование можно произвести с помощью летучего силилирующего реактива, такого как *N*-метил-*N*-триметилсилилтрифторацетамид (МСТФА), или с помощью смеси гексаметилдисиласана (ГМДС), триметилхлорсилана (ТМХС) и пиридина. Модифицированные экстракты можно упарить досуха и восстановить пробу в сухом растворителе, таком как толуол, до инжектирования (1 – 2 мкл) в колонку газового хроматографа.

Производные вещества следует готовить непосредственно перед проведением анализа, так как силиловые производные не обладают достаточной устойчивостью.

Ацилирование

Добавить 50 мкл пентафторпропионового ангидрида (ПФПА) к экстракту мочи и нагревать полученную смесь в закрытой пробирке при температуре 65°C в течение 30 мин. Выпарить избыток реактива ПФПА под током азота и восстановить осадок с помощью 50 мкл этилацетата. Полученные производные стабильны в реактиве в течение нескольких месяцев, а после испарения реактива сохраняют стабильность минимум в течение 24 ч.

b) Метод насадочной колонки [8]

Рабочие условия

Детектор: пламенный ионизационный детектор (ПИД)

Примечание: Для достижения более высокой чувствительности и специфичности рекомендуется азотно-фосфорный детектор (АФД): рабочие параметры при его использовании должны соответствовать рекомендациям изготовителя. Методы подготовки пробы и приготовления производных веществ пробы должны быть выбраны такими, чтобы избежать присутствия в конечном растворе, инжектируемом в хроматографическую систему, азотсодержащих растворителей и реактивов.

Колонка:	2 м × 2–4 мм (внутренний диаметр)
Насадка колонки:	a) Диметилсиликон (SE-30, OV-1) b) Фенилметилсиликон, 50% фенила (OV-17)
Газ-носитель:	Азот, 70 мл/мин.
Рабочие температуры:	Инжектор: 275°C Термостат: 230°C Детектор: 275°C

Примечание: Перед использованием все насадочные колонки должны быть кондиционированы. Обычно температура кондиционирования должна быть не менее чем на 30°C выше той, при которой должен проводиться анализ, если только при этом не требуется превышать верхний предел температуры колонки, указанный изготовителем. В таком случае должен применяться меньший температурный интервал, а период кондиционирования должен быть существенно увеличен. Обычно колонки кондиционируются в течение ночи или не менее 15 ч.

Кондиционирование производят при нормальной скорости тока газаносителя и с отсоединением колонки от детектора.

Примечание:

- Для предотвращения адсорбции морфина в процессе ГХ стеклянные колонки следует часто обрабатывать силаном.
- Регулярно прочищайте отверстие для инъекции пробы и детектор в целях избежания разложения пробы и потери чувствительности детектора.
- Обращайтесь с силилирующими реактивами с осторожностью, так как эти вещества обладают очень высокой реактивностью и высокой чувствительностью к действию влаги.

с) Метод капиллярной колонки

Рабочие условия

Детектор:	Пламенный ионизационный детектор (ПИД)
Колонка:	Кварцевое стекло, 10 м × 0,53 мм (внутренний диаметр), с 2,6 мкм химически связанной диметилсилоновой стационарной фазой, например, OV-1
Газ-носитель:	Гелий, 25 мл/мин.
Рабочие температуры:	Инжектор: 280°C Термостат: 260°C Детектор: 300°C

Примечание: Соответствующая методика с капиллярной колонкой также описана в руководстве Организации Объединенных Наций Рекомендуемые методы анализа опия/необработанного морфина [8]. В зависимости от наличия оборудования размеры капиллярных колонок, стационарная фаза, толщина фазы, газ-носитель и скорость его тока могут отличаться от описанных выше. Однако для анализа биологических проб рекомендуется использовать неполярную колонку общего назначения. Оптимальные рабочие условия для системы следует выбирать в соответствии с рекомендациями поставщика.

2. Газовая хроматография – масс-спектрометрия

а) Качественный анализ

Рабочие условия

Колонка:	Кварцевое стекло, 25 м × 0,31 мм (внутренний диаметр), с 0,17 мкм поперечно связанной 5% фенилметилсилоновой стационарной фазой
Газ-носитель:	Гелий, 1,8 мл/мин.
Рабочие температуры:	Инжектор: 280°C Термостат: 230°C
Ионизация:	Режим ЭУ при 75 эВ

Основные ионы в масс-спектрах триметилсилиловых производных морфина и налорфина, используемые для масс-спектрометрии в режиме мониторинга выбранного иона (МВИ), представлены в таблице П.3, ниже.

Таблица П.3 Основные ионы в масс-спектрах морфина, МАМ, кодеина и внутренних стандартов (производные ТМС и ТФА, режим МВИ)

<i>Соединение</i>	<i>Основные осколочные ионы, m/z</i>
Морфин-диТМС	414, 429
Налорфин-диТМС	441, 455
Морфин-диТФА	364, 477
<i>d</i> ₃ -морфин-диТФА	367, 480
МАМ-ТФА	311, 364, 423
<i>d</i> ₃ -МАМ-ТФА	367, 426
Кодеин-ТФА	282, 395
<i>d</i> ₃ -кодеин-ТФА	285, 398

b) Количественный анализ [25]

Рабочие условия

Колонка:	Кварцевое стекло, 12 м × 0,2 мм (внутренний диаметр), с 0,33 мкм поперечно связанной 100% диметилполисилоксановой стационарной фазой
Газ-носитель:	Гелий, 1,9 мл/мин.
Рабочие температуры:	Инжектор: 250°C Термостат: 150–300°C, при скорости 12°C/мин.
Методика инъекции:	Нерасщепленная
Ионизация:	Режим ЭУ при 75 эВ
Ионы:	Режим мониторинга выбранного иона (МВИ), производные ТФА (см. таблицу П.3, выше)

Количественное определение

Калибровка с одним измеряемым, использующая ионные отношения исследуемых веществ и их соответствующих меченных дейтерием внутренних стандартов. Кодеин 395/398; морфин 364/367; МАМ 432/426.

Экстракция

pH 1 мл мочи довести до 7,0 путем добавления 3 мл буфера с pH 7,0. Добавить 100 мкл раствора, содержащего *d*₃-кодеин, *d*₃-морфин и *d*₃-МАМ, каждое соединение в концентрации 1 мг/мл. Полученную смесь пропустить через прибор для встряхивания и перемешивания "Vortex". Моча проходит через колонку твердофазной экстракции (Bond-Elut Certify), предварительно кондиционированную 3 мл метанола и 3 мл дистиллированной воды. Колонка последовательно промывается 3 мл воды, 3 мл 0,1 М буфера – ацетатного натрия (pH 4,5) и 3 мл метанола. После высушивания колонки (вакуум, 1–2 мин.) исследуемые вещества элюируют 3 мл свежеприготовленного раствора дихлорометан–изопропанол–концентрированный раствор аммиака (80:20:2).

Приготовление производных

Производные ТФА: остаток выпаренного элюента (N_2 , 50–60°C) восстанавливается 200 мкл хлороформа и 100 мкл трифторуксусного ангидрида (ТФУА), перемешивается при встряхивании в приборе "Vortex" и нагревается при температуре 70°C в течение 15 мин. После охлаждения и выпаривания досуха (N_2 , 50–60°C) остаток повторно растворяют в 100 мл хлороформа, и 2 мкл аликвотной пробы инжестируют в ГХ–МС.

3. Высокоэффективная жидкостная хроматография

В литературе описано несколько методов анализа морфина с применением ВЭЖХ. Используются различные методики обнаружения, такие как УФ-поглощение и флуоресценция. Недостатком некоторых таких методов является низкая чувствительность или длительная подготовка пробы. Практичным и чувствительным вариантом является электрохимическое обнаружение. Ниже описаны два метода.

Рабочие условия

Метод А [16]

Колонка:	Кварц (LiChrosorb Si-60 или эквивалентный), 5 мкм, 30 см × 4 мм (внутренний диаметр)
Подвижная фаза:	Ацетонитрил–метанол–раствор А–раствор В (75:25:0,04:0,216, по объему) Раствор А: Смешать концентрированный раствор аммиака и метанол (1:2, по объему) Раствор В: Смешать ледяную уксусную кислоту и метанол (1:1, по объему)
Скорость:	1,3 мл/мин.
Обнаружение:	УФ-излучение с длиной волны 218 нм

Метод В [26, 27]

Колонка:	Октадецилкварцевая обращенная фаза, 5 мкм, 25 см × 4,6 мм (внутренний диаметр)
Подвижная фаза:	100 мл ацетонитрила и 900 мл буфера: 0,2 М натрия перхлората/0,005 М натрия цитрата (перед использованием профильтровать через 0,5 мкм мембранный фильтр)
Скорость:	1,9 мл/мин.
Обнаружение:	Электрохимическое обнаружение (ЭХО), стеклянный углеродный электрод

Примечание: Данные об определении морфина-3-О-глюкуронида (М-3-Г) и морфина-6-глюкуронида (М-6-Г) в моче методом ВЭЖХ и электрохимического или УФ-обнаружения имеются в литературе [28, 29].

Е. ГХ–МС анализ моноацетилморфина как индикатора употребления героина

Существует ряд ГХ–МС методов для обнаружения и/или количественного определения наногаммовых количеств О⁶-моноацетилморфина (МAM) в пробах мочи, полученных от лиц, злоупотребляющих героином. В одном из этих методов [30] обнаружение МAM основано на твердофазной экстракции из мочи при щелочном рН в октадециловой колонке с последующей трансформацией в производное пентафторпропионила (ПФП). Моноацетилморфин пентафторпропионат отделяют и идентифицируют методом ГХ–МС в режиме мониторинга выбранного иона (МВИ) с использованием налорфина или *d*₃-морфина в качестве внутренних стандартов. Другой метод ГХ–МС [25], использующий производные ТФА и режим МВИ, описан в разделе П.Д.2. Положительная идентификация МAM может применяться для дифференциации между приемом героина и злоупотреблением морфином, кодеином, опиум или маковыми семенами.

1. Подготовка пробы и приготовление производных веществ пробы

Примечание: *Не гидролизуйте пробы мочи перед проведением этого анализа, так как и кислотный, и ферментативный гидролизы могут привести к превращению МAM в морфин.*

В 25 мл пробирку для центрифугирования с 10 мл мочи добавить 1 мл буферного раствора (рН 9). Проверить, чтобы рН находился между 8 и 9. Используется колонка твердофазной экстракции с С-18, которая кондиционируется последовательным промыванием 5 мл метанола и 5 мл дистиллированной воды. Пропустить пробу мочи через колонку.

Дважды промыть колонку дистиллированной водой. Добавить каплю концентрированного раствора аммиака, после чего снова промыть колонку дистиллированной водой. Высушить колонку, пропуская через нее воздух (в течение 5 мин.). Восстановить МAM и морфин элюированием колонки дважды по 0,75 мл смеси дихлорметан–ацетон (1:1, по объему). Выпарить элюат в 2 мл пробирке при 60°C. Растворить остаток в 100 мкл смеси дихлорметан–ацетон (1:1, по объему) и перенести раствор в 1,5 мл пробирку. Выпарить под мягким током азота при температуре 65°C.

Добавить 50 мкл пентафторпропионового ангидрида (ПФПА). Выдержать смесь в закрытой пробирке при температуре 65°C в течение 30 мин. Выпарить избыток реактива ПФПА под током азота. Восстановить остаток в 50 мкл этилацетата. 1 мкл полученного раствора инжестрировать в систему ГХ–МС.

В литературе описан альтернативный вариант анализа, использующий простую экстракцию растворителями [31].

2. Рабочие условия

Применимы рабочие условия, описанные выше (раздел II.D.2). Для обнаружения ПФП-производных морфина, кодеина и МАМ отслеживают следующие ионы: m/z 361, 414, 445, 473 и 577. Ион m/z 603 используется в качестве внутреннего стандарта.

F. Интерпретация результатов

Полученный при первоначальном иммунологическом анализе положительный результат означает, что в моче присутствует некий опиат, концентрация которого превышает критический уровень или равна ему, что должно быть подтверждено чувствительным, но обладающим более высокой специфичностью методом по сравнению с первоначальным анализом. Удержание опиатов в организме и фактические концентрации наркотика в моче зависят от таких факторов, как скорость обмена наркотического вещества, физическое состояние индивида, количество принимаемой жидкости и способ приема. Как правило, с помощью представленного выше подхода опиаты в моче могут быть обнаружены в течение не более трех дней.

Вследствие общих путей метаболизма героин, опий, кодеин и сам морфин могут являться источниками морфина и морфина-3-глюкуронида в моче. Кроме того, другие опиаты, такие как этилморфин, фолкодин и никоморфин, также могут служить источниками морфина [18]. Следовательно, наличие морфина в моче само по себе не указывает, какой именно опиат был употреблен.

В тех случаях, когда результаты анализа вызывают сомнения относительно источника морфина, более точные сведения о принятом наркотике можно получить при обнаружении и/или количественном определении исходного вещества и из характера экскреции других основных метаболитов. Например, обнаружение МАМ можно рассматривать как доказательство употребления героина [19, 30, 32].

В отношении кодеина, хотя данный вопрос до определенной степени и остается спорным, все же считается общепринятым, что, если отношение общего кодеина к общему морфину менее 0,5, а общая концентрация морфина в моче превосходит 200 нг/мл, кодеин может быть исключен как источник присутствующего морфина [33, 34].

III. Рекомендуемые методы обнаружения и анализа каннабиноидов в биологических пробах

A. Наиболее распространенные виды продуктов каннабиса [9]

1. Растительные продукты (марихуана)

Каннабис (*Cannabis sativa L.*) – растение, широко распространенное в умеренной и тропической зонах земного шара; большинство стран сообщало о незаконном выращивании и обороте этих растительных продуктов. Крупномасштабное незаконное культивирование растения каннабис с целью получения растительных продуктов каннабиса осуществляется в Северной и Южной Америке, Карибском бассейне, Африке и Юго-Восточной Азии. Формы этого растительного материала в незаконном обороте различаются не только по регионам, но и в разных странах каждого региона.

Традиционно считается, что только верхушки растения каннабис с цветами и плодами и его листья содержат значительное количество психоактивных компонентов (например, тетрагидроканнабинол); они известны как "наркотикосодержащие части", и обычно только эти части растения являются предметом продажи в незаконном обороте. Эти части можно собирать с растущего растения. Центральный стебель и основные боковые стебли растения не трогают, и они не используются при производстве незаконных продуктов каннабиса. Альтернативным способом является сбор растения целиком, при этом срезается основной стебель под нижними боковыми стеблями с листьями. Отделенный растительный материал или растения целиком высушиваются на воздухе, их обычно раскладывают прямо на земле, а если количество относительно небольшое, то на неглубоких поддонах. Цельные растения можно сушить, подвесив их за стебли верхушками вниз, и после сушки с центрального и основных боковых стеблей срезают наркотикосодержащие части растения. В зависимости от последующей обработки высушенного материала получают самые различные формы растительной продукции. Отделенные части растений можно сильно спрессовать в брикеты растительного материала (в такой форме в незаконном обороте часто встречается каннабис из Западной Африки и Карибского бассейна). Либо каннабис можно оставить в виде рыхлого растительного материала (в такой форме часто встречается каннабис, поступающий из некоторых стран Центральной и Южной Африки и стран Юго-Западной и Юго-Восточной Азии). Реже встречается форма, представляющая собой растительный материал, скрученный в "початок" и завернутый в грубый растительный материал (центральная часть Южной Африки).

Когда для незаконной торговли производится продукт высокого качества, используются только плодоносящие и цветущие верхушки растения. Чаще

всего этому продукту придают форму палочки; нередко плодоносящие и цветущие верхушки привязывают бечевкой к центральной бамбуковой палочке. Такие палочки весом около 2 г (брутто) и длиной около 8 см в незаконном обороте известны под названием "палочки Будды" (Юго-Восточная Азия). Часто при изъятиях из незаконного оборота обнаруживается, что эти палочки связаны в пучки, содержащие до 20 палочек. Плодоносящие и цветущие верхушки также часто завертывают в грубую оберточную бумагу в виде небольшой трубочки (Южная Африка). Эти трубочки значительно меньше, чем палочки из Юго-Восточной Азии. Обычно одна трубочка содержит менее 0,5 г каннабиса, и семян в ней мало или вообще нет.

Высококачественный продукт можно получить путем просеивания растительного материала каннабиса для удаления тех частей растения, которые содержат относительно мало или совсем не содержат каннабиноидов. По существу, при этом удаляются семена и почти все части стебля, за исключением самых мелких. То, что просеялось, является продуктами плодоносящих и цветущих верхушек и листьев каннабиса. Этот материал похож на мелко нарезанный растительный материал. В незаконном обороте он известен под названием "киф (кайф)". Этот продукт характерен для Северной Африки. Такой материал отличается высоким содержанием смолы каннабиса, и его можно спрессовать в брикеты, которые внешне немного напоминают брикеты смолы каннабиса, изготовленные в этом же регионе. Однако при микроскопическом исследовании обнаруживается, что такие брикеты сохранили основные характеристики растительного материала. Этот материал, является ли он рыхлым или спрессованным в небольшие брикеты, имеет тот же профиль каннабиноидов, что и брикеты смолы каннабиса, изготовленные в этом же регионе.

Другим высококачественным продуктом является синсемилла. Слово "синсемилла" образовано из двух испанских слов, означающих "без семян". Синсемиллу изготавливают путем удаления мужских растений каннабиса с плантации, где произрастают женские растения, прежде чем мужские растения выделят пыльцу. Женские растения не будут оплодотворены и, следовательно, не будут давать семян. Те, кто занимается незаконным культивированием каннабиса, считают, что смолистые части таких растений имеют более высокое содержание психоактивных веществ (например, тетрагидроканнабинола – ТГК), чем обычные женские растения, которые были оплодотворены обычным образом. Судебная экспертиза подтвердила эту точку зрения; обнаружено, что синсемилла обладает более высоким содержанием каннабиноидов, особенно ТГК.

Следует отметить, что удаление мужских растений с плантации, где растут женские растения, до оплодотворения практиковалось уже долгое время, в частности на Индийском субконтиненте. Было известно, что, если этого не сделать, женские растения дадут семена и будет очень низкий выход "ганджи". Однако в таком материале неизменно будет немного цветущих верхушек, содержащих семена. Это может быть вызвано тем, что каннабис не является исключительно двудомным растением. На любом большом поле, где растет каннабис, будет несколько однодомных растений, обладающих и мужскими, и женскими цветками.

Синсемилла остается продуктом, культивируемым только на Американском континенте, хотя изъятия синсемиллы производились и за его пределами. Однако в этих случаях изъятый материал был выращен на Американском континенте.

2. Продукты смолы каннабиса (гашиш)

Изготовление смолы каннабиса сосредоточено в двух основных регионах мира. Страны Южного и Восточного Средиземноморья образуют один регион, а в другой входят страны Индийского субконтинента. Для изготовления смолы каннабиса в этих регионах используют множество различных процессов. Однако в целом в странах одного региона используются сходные способы. В результате имеются два "семейства" смолы каннабиса. В странах Южного и Восточного Средиземноморья производят одну группу продуктов смолы каннабиса, а в странах Индийского субконтинента – другую. Однако в методах изготовления смолы каннабиса в обоих регионах имеется определенное сходство, в частности применяются методы, в которых важной частью процесса изготовления является просеивание.

Смола из какой-либо страны одного из этих регионов по внешнему виду намного более похожа на смолу из другой страны этого же региона, чем на смолу из другого региона. (В смолах из одного региона могут быть значительные различия в профиле каннабиноидов.)

а) Смола каннабиса из стран Средиземноморья

Растительный материал обмолачивается, часто об стенку. Этот процесс осуществляется для отделения вырабатывающих смолу частей растения от тех частей, которые не дают смолу и потому содержат мало психоактивных компонентов. Частицы смолы каннабиса и листьев каннабиса, а также его семена отделяются от более волокнистых частей растения, которые выбрасывают. Затем материал просеивается (отделяются семена и небольшие волокнистые части). Оставшийся продукт содержит намного больше смолы. На этой стадии макроскопическая растительная структура практически разрушается, но на микроскопическом уровне материал обладает многими признаками растения. Внешне он напоминает тонкоизмельченный порошок, и на этой стадии его прессуют в брикеты. В некоторых странах (Восточное Средиземноморье) материал перед прессованием помещают в полотняные мешки, в других странах (Северная Африка) – заворачивают в пленку. В одном районе (Северо-Восточное Средиземноморье) материал иногда поступает в незаконную торговлю в виде тонкоизмельченного порошка, не спрессованного в брикеты.

б) Смола каннабиса из Индийского субконтинента

В странах Индийского субконтинента для изготовления смолы каннабиса используют иные способы. Плодоносящие и цветущие верхушки растений каннабиса, выращенного в странах Индийского субконтинента, содержат настолько много смолы, что являются липкими на ощупь. Если плодоносящие и цветущие верхушки растений растереть между ладонями, смола выделяется из растения и остается на руках.

Поэтому изготовление смолы каннабиса в странах Индийского субконтинента основывается на процессе растирания или размешивания (сбивания), а не на обмолачивании. Для этого можно использовать разнообразные способы. Описанные в настоящем документе методы можно рассматривать в качестве репрезентативных для данного процесса.

Медленный и трудоемкий способ состоит в растирании содержащих смолу частей растения каннабис между ладонями. На руках появляется тонкий

слой смолы каннабиса, выделившейся из растираемого материала. Когда из обрабатываемой таким образом партии выделена вся смола, растения выбрасывают (их можно использовать в качестве продукта второго класса, приготавливая, например, настойку типа чая). Прилипшую к ладоням смолу удаляют с помощью металлического скребка. Ее помещают в емкость для сбора смолы и растирают следующую партию каннабиса. Выделенная смола каннабиса постепенно заполняет емкость для сбора. Затем соответствующее количество смолы достают из емкости и прессуют или скатывают в брикеты, круглые стержни, шарики или придают другую форму, используемую в данной местности.

Другим способом является растирание плодоносящих и цветущих верхушек каннабиса между листами резины. Смола каннабиса остается на резиновых листах, ее соскребают, набирая пригодное для изготовления брикетов количество. Этот способ может быть видоизменен: сборщик, передвигаясь по полю каннабиса, собирает смолу с помощью листов резины, кожи или аналогичного материала. Смола накапливается на этих листах, когда между ними пропускают плодоносящие и цветущие верхушки растений; собрав достаточное количество смолы, листы очищают. Изготовление брикетов и других форм происходит так же, как описано выше.

Плодоносящие и цветущие верхушки можно собирать таким же способом, как и в случае сбора растительных продуктов каннабиса. Их высушивают, мнут и растирают руками в крупнозернистый порошок. Затем порошок просеивают через несколько сит, так что он становится таким же тонкоизмельченным, что и изготовленный в Средиземноморье. Тонкоизмельченный порошок, который все еще остается зеленым, хранят в кожаных мешках от четырех до пяти месяцев, пока опять не наступит жаркая погода. Тогда порошок выкладывают на солнце на непродолжительное время, достаточное для растапливания смолы. Порошок снова помещают на несколько дней в кожаные мешки, затем его извлекают и интенсивно размешивают (сбивают) деревянными палками, и на его поверхности появляется некоторое количество маслянистого материала. Размешивание продолжают, пока не будет получен материал, пригодный для прессования в брикеты.

Наконец, абсолютно другой способ применяется в некоторых местностях Индийского субконтинента. Таким способом получают небольшое количество смолы каннабиса. Растительный материал, не содержащий основных стеблей, погружают в кипящую воду. При этом из плодоносящих и цветущих верхушек извлекается смола. (Сравните с приготовлением мяса, когда при кипячении из него выделяются животные жиры.) Подвергнутый экстракции каннабис выбрасывают (его можно использовать в кулинарных целях), после охлаждения экстрагирующей жидкости на ее поверхности образуется слой затвердевшей смолы. Смолу снимают и формуют в брикеты или придают ей другую желательную форму. Проблема этого метода состоит в том, что в смолу попадает вода. В результате брикеты смолы с течением времени зачастую плесневеют.

3. Жидкий каннабис (гашишное масло)

Жидкий каннабис представляет собой жидкий экстракт растительного материала каннабиса или смолы каннабиса; перед поступлением в незаконный оборот экстракт часто концентрируют. Жидкий каннабис изготавливается с целью концентрации психоактивных ингредиентов (например, ТКК). Это может помочь торговцу наркотиками избежать мер пресечения незаконного оборота, поскольку меньший по размерам тайник может содержать больше психоактивного материала. Не менее важна для торговца возможность спрятать

жидкий каннабис в таких местах, где это сложно сделать с растительным продуктом или смолой каннабиса. Кроме того, жидкий каннабис легче герметично запаковать, что исключает возможность его обнаружения по издаваемому им запаху.

При изготовлении как из растительного материала, так и из смолы жидкий каннабис получают с помощью процесса, сходного с приготовлением кофе посредством фильтрации. С другой стороны, этот процесс можно рассматривать как аналогичный экстракции в аппарате Сокслета, осуществляемой в химических лабораториях для экстракции химических веществ из твердых материалов при непрерывном обороте экстрагирующего растворителя.

В. Описание незаконных продуктов каннабиса

1. Названия и синонимы для незаконных продуктов каннабиса

Имеется так много синонимов, использующихся для различных незаконных продуктов каннабиса, что их перечисление выходит за рамки настоящего руководства. Читатель отсылается к публикации Организации Объединенных Наций по этому вопросу – The Multilingual Dictionary of Narcotic Drugs and Psychotropic Substances under International Control (ST/NAR/1) (*Многоязычный словарь по наркотическим средствам и психотропным веществам, находящимся под международным контролем*).

2. Внешний вид и химические характеристики незаконных продуктов каннабиса

Необходимо подчеркнуть, что никакие два продукта каннабиса не обладают абсолютно одинаковым внешним видом. Продукты каннабиса изготавливаются из весьма различающихся природных продуктов отдельными партиями с помощью самых разных процессов, а затем подвергаются обработке и видоизменению в целях сбыта, и потому неудивительно, что они обладают столь большим разнообразием форм. В настоящем руководстве описаны лишь некоторые, наиболее часто встречающиеся формы. Если материал, представленный на судебную экспертизу, не обладает внешним сходством ни с одним из описанных в настоящем руководстве типов, это, разумеется, не означает, что он не является каннабисом или продуктом, содержащим каннабис.

а) Растительные продукты (марихуана)

Каннабис, выращенный в регионах с умеренным климатом

Каннабис, культивируемый в Европе, Северной Америке и южных областях Южного полушария, во время произрастания является светло-зеленым; после уборки некоторые образцы теряют зеленую окраску и приобретают желтую, изредка коричневую окраску. Обычно плодоносящие и цветущие верхушки не содержат смолы – при сжатии в ладонях они не становятся липкими, в отличие от каннабиса из Индийского субконтинента. По той же причине этот материал трудно спрессовать в брикеты, что легко сделать, например, с каннабисом из Западной Африки. В европейском каннабисе всегда содержатся

семена и больше листьев, чем в каннабисе из Северной Америки, в котором преобладают плодоносящие и цветущие верхушки.

Химические характеристики: весьма различные, поскольку семена ввозятся, часто нелегально, из самых разных регионов, где каннабис произрастает в диком виде. Встречаются различные профили каннабиноидов, включающие и не включающие КБД и ТГВ.

Каннабис, выращенный в регионах с тропическим климатом

Каннабис из Северной Африки

Встречается в незаконном обороте вне региона редко; мелко нарезанная светло-зеленая или желто-зеленая трава не содержит семян или волокнистого материала.

Химические характеристики: совпадают с характеристиками смолы, изготавливаемой в этом регионе, то есть содержит ТГВ и КБД меньше, чем ТГК.

Каннабис из Западной Африки и Карибского бассейна

Во время произрастания этот материал зеленого цвета; после уборки и сушки он становится коричневым, некоторые образцы сохраняют зеленую окраску. Обычно карибский каннабис в большей степени сохраняет зеленую окраску, чем западноафриканский. Лишь изредка встречаются высушенные образцы западноафриканского каннабиса не коричневого цвета. Если не считать цвета, эти два типа каннабиса очень сходны по внешнему виду и химическим характеристикам. У некоторых образцов западноафриканского каннабиса плодоносящие и цветущие верхушки разрушены при обработке; в спрессованной массе растительного материала заметно много темно-коричневых семян.

До последнего времени карибский каннабис был низкого качества, имел много стеблей и цветоножек, которые не содержат или почти не содержат психоактивных компонентов каннабиса. В последнее время наблюдается тенденция к изготовлению синсемиллы; не обнаружено образцов, совершенно не содержащих семян, но количество материала, не содержащего психоактивных компонентов, в изъятых продуктах резко уменьшилось, а плодоносящие и цветущие верхушки в некоторых партиях по характеристикам сравнимы с североамериканской синсемиллой.

Химические характеристики: в обоих типах отсутствует КБД и наблюдается низкое отношение ТГВ:ТГК.

Каннабис из Центральной Африки

Большинство образцов сходно с западноафриканским каннабисом, но некоторые аналогичны каннабису, изготовленному в южной части Африки.

Химические характеристики: коричневые образцы по профилю каннабиноидов сходны с западноафриканским каннабисом; зеленые образцы по профилю каннабиноидов сходны с южноафриканским каннабисом.

Каннабис из южной части Африки

В высушенном и подготовленном к перевозке виде этот материал обычно напоминает каннабис, выращенный в областях с умеренным климатом. Он гораздо более зеленый по цвету и содержит больше листьев, чем западноафриканский каннабис.

Химические характеристики: не содержит КБД; содержание ТВГ и ТГК примерно одинаковое.

Каннабис из Южной Америки

Сходен с карибским каннабисом; качество образцов самое разное – от образцов, включающих значительную долю волокнистого, не содержащего психоактивных веществ материала, до продуктов типа синсемиллы, состоящих только из плодоносящих и цветущих верхушек.

Химические характеристики: аналогичны карибскому каннабису. Некоторые образцы содержат небольшое количество КБД.

Каннабис из Индийского субконтинента

В незаконном обороте встречаются три типа: 1) коричневые плодоносящие и цветущие верхушки, которые содержат много смолы и прилипают к ладоням; 2) темно-зелено-коричневый материал, сходный с некоторыми образцами из Западной Африки; 3) зеленый материал, содержащий главным образом листья, без плодоносящих и цветущих верхушек.

Химические характеристики: 1) присутствует КБД, содержание ТГК и ТВГ приблизительно одинаково; 2) напоминает западноафриканский каннабис; 3) сходен с типом 1, но содержит мало каннабиноидов.

Каннабис из Юго-Восточной Азии

"Палочки Будды" – см. раздел III.A.1.

Химические характеристики: обычно содержит только ТГК, не содержит КБД и содержит очень мало ТВГ.

b) Продукты смолы каннабиса

Смола каннабиса из Северной Африки

Желто-коричневые, тонкие, прямоугольные брикеты, завернутые в целлофан, обычно без маркировки. Иногда помечены отпечатками монет.

Недавно появившийся в обороте продукт по внешнему виду сходен со смолой каннабиса из Индийского субконтинента – он почти черный на поверхности и внутри намного темнее, чем желто-коричневые брикеты. Этому виду придается форма куска туалетного мыла, завернутого в целлофан. Маркировки нет, но некоторые образцы помечены отпечатками монет.

Химические характеристики: обычно мало КБД по сравнению с ТГК и очень мало ТВГ. В разных изъятых продуктах содержится различное количество каннабиноидных кислот.

Смола каннабиса из Восточного Средиземноморья

Красно-коричневая и порошкообразная. Всегда перевозится в полотняных мешках, которые, исключая несколько последних лет, постоянно были белыми, иногда с чернильной печатью. В настоящее время полотняные мешки иногда ярко окрашены и могут иметь или не иметь чернильную печать. Массы брикета до 0,5 кг, иногда 1 кг. При разворачивании на смоле обнаруживается отпечаток ткани.

Химические характеристики: содержание КБД больше, чем в любых других продуктах смолы каннабиса. ТГВ очень мало. Кислот, в основном КБДК, больше, чем в любых других продуктах смолы каннабиса.

Смола каннабиса из Северо-Восточного Средиземноморья

Зеленовато-коричневый порошок или (редко) небольшие тонкие пластинки хрупкого материала, завернутые в целлофан.

Химические характеристики: КБД намного меньше, чем ТГК. ТГВ мало. Кислоты присутствуют в больших количествах.

Смола каннабиса из Индийского субконтинента

Изготавливают большое количество различных продуктов. Прямоугольные брикеты, черные на поверхности и темно-зеленые внутри, поступающие из северо-западной части субконтинента, по количеству преобладают по сравнению со всеми другими типами. Эти брикеты, на поверхности которых нередко встречается проштампованное клеймо, часто перед перевозкой обертывают в темный целлофан. Некоторые брикеты являются квадратными. Толщина брикетов колеблется от 5 до 20 мм, свежеприготовленные брикеты обладают запахом и пластичны. При старении они утрачивают запах и становятся хрупкими. Обычно масса брикетов составляет 0,25, 0,5 или 1 кг, но изредка встречаются и более тяжелые. Брикеты из северной части Индийского субконтинента часто покрыты плесенью и легко крошатся.

Другие продукты смолы каннабиса из Индийского субконтинента представляют собой палочки, часто в пучках, небольшие шарики (1 см в диаметре), крупные шарики (8 см в диаметре) и куски смолы неопределенной формы. Все эти продукты являются темно-коричневыми или черными на поверхности и темно-зелеными или темно-коричневыми внутри.

Химические характеристики: различаются не менее сильно, чем внешний вид. Обычно содержание каннабиноидной кислоты меньше, чем в средиземноморской смоле каннабиса. Содержание каннабидиола в брикетах меньше, чем в смоле из Восточного Средиземноморья, но больше, чем в смоле из Северной Африки; в некоторых других типах он может присутствовать в весьма небольших количествах или вообще отсутствовать. Обычно содержание ТГВ небольшое, однако некоторые типы содержат больше ТГК, чем любая другая смола каннабиса, и, соответственно, при продаже в незаконном обороте его стоимость выше.

с) Жидкий каннабис (гашишное масло)

Жидкий каннабис представляет собой темное вязкое масло с характерным запахом. При разбавлении органическими растворителями образует зеленый или коричневый раствор. Цвет не обязательно служит указанием на происхождение, поскольку на цвет может влиять степень зрелости растительного материала и растворитель, использованный при изготовлении жидкого каннабиса.

Обычно жидкий каннабис, образующий при разбавлении раствор зеленого цвета, изготовлен из растения каннабис, а образующий раствор коричневого цвета – из смолы каннабиса. Жидкий каннабис не может быть разбавлен водой; если к жидкому каннабису, который был разбавлен, например этанолом, добавить воду, то образуется эмульсия.

Иногда перед перевозкой жидкий каннабис не концентрируют; этот продукт обладает консистенцией (и часто запахом), свойственной органическому растворителю, и может быть окрашен в зеленый или коричневый цвет.

Химические характеристики: за одним важным отличием, профиль каннабиноидов сходен с профилем каннабиса или смолы каннабиса, из которых изготовлен жидкий каннабис. Отличие заключается в том, что в жидком каннабисе нет каннабиноидных кислот. Основными регионами – изготовителями жидкого каннабиса являются производящие смолу каннабиса страны Средиземноморья и Индийского субконтинента и производящие растительный каннабис страны Карибского бассейна. Профиль нейтральных каннабиноидов жидкого каннабиса из этих регионов сходен с профилем смолы или растительных продуктов, изготовленных в этих же регионах. Однако содержание каннабиноидов в этих материалах гораздо выше.

Типичное содержание ТГК в трех незаконных продуктах каннабиса:

Растение каннабис:	0,5– 5%
Смола каннабиса:	2– 10%
Жидкий каннабис:	10– 30%

Следует отметить, что эти значения являются только ориентировочными для уровней, с которыми, скорее всего, столкнется судебный химик-аналитик. Многие образцы растения, смолы или жидкого каннабиса обладают содержанием ТГК, выходящим за границы этих диапазонов.

Помимо нейтральных каннабиноидов изъятый материал каннабиса может содержать самые различные уровни соответствующих каннабиноидных кислот. Хотя, по-видимому, не имеется четкой взаимосвязи между происхождением материала и составом и содержанием каннабиноидных кислот, судебного химика-аналитика, в зависимости от национального законодательства, могут попросить продемонстрировать наличие и/или определить по отдельности содержание этих кислот в исследуемом образце.

В дополнение к изложенному, отсылаем читателя к различным справочникам, руководствам и обзорным публикациям [35–37], в которых приведены подробные сведения по химии каннабиноидов.

Каннабис содержит сложный комплекс многочисленных специфичных отдельных химических веществ, называемых каннабиноидами, из которых основными являются следующие четыре:

- Δ-9-тетрагидроканнабинол (ТГК)
- Каннабинол (КБН)
- Каннабидиол (КБД)
- Каннабихромин (КБХ).

Основным каннабиноидом, вызывающим большинство характерных психологических эффектов продуктов каннабиса, является ТГК, который, следовательно, представляет собой единственный каннабиноид, имеющий значение в данном контексте.

3. Способы введения, метаболизм и экскреция ТГК [38, 39]

Наиболее распространенным способом злоупотребления каннабисом является курение. Иногда он может вводиться перорально. ТГК энергично метаболизируется в организме человека, с мочой выделяется менее 1% неизменного ТГК. При курении первые обменные реакции начинаются в легких, тогда как при пероральном потреблении марихуаны первые метаболические события

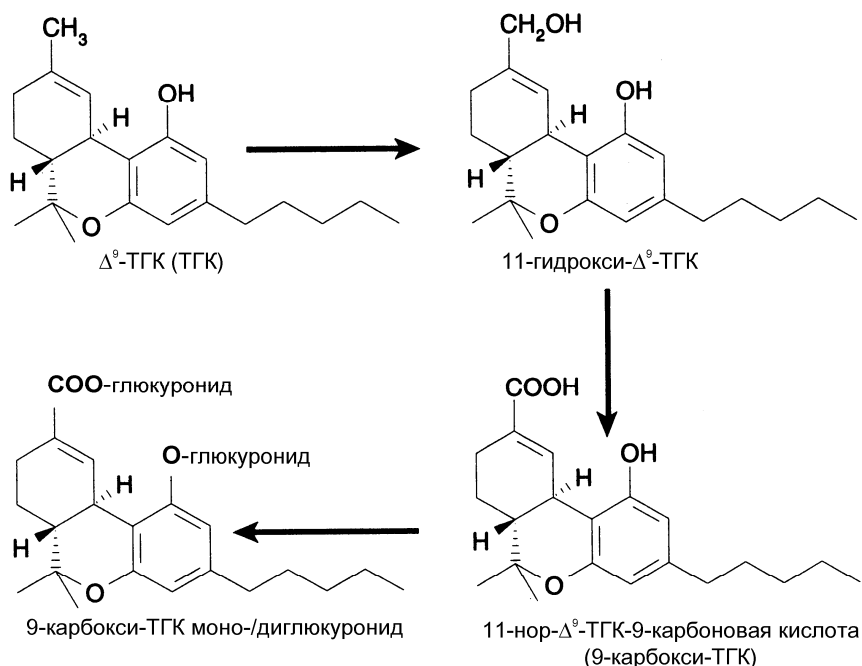
происходят в печени. Метаболический путь ТГК схематично представлен на рис. III.1.

Спустя 72 ч после курения примерно 50% поступившего ингаляционно ТГК выделяется в виде метаболитов, а оставшиеся 50% оказываются распределенными по всему организму с максимальным накоплением в жировой ткани. Дальнейшее выделение происходит медленно, в течение нескольких дней. 25% экскреции приходится на мочу, 65% выделяется через кишечник.

Несмотря на то что к настоящему времени описано более 20 метаболитов ТГК, причиной появления в моче основных соединений является окисление в С-11 позиции и конъюгация с глюкуроновой кислотой. Главным кислотным метаболитом является 11-нор- Δ^9 -тетрагидроканнабинол-9-карбоновая кислота (9-карбоксит-ТГК), которая превращается в моно- и ди-глюкуроновые конъюгаты, являющиеся основными метаболитическими формами, экскретируемыми с мочой. Таким образом, идентификация 9-карбоксит-ТГК в моче считается наилучшим показателем потребления каннабиса.

Концентрация ТГК в плазме крови быстро уменьшается в результате энергичных обменных реакций и поступления вещества в ткани. Тем не менее период полувыведения ТГК продолжителен и, как правило, превышает 20 ч. Это приводит к тому, что ТГК находится в организме в течение многих часов, а вероятно, и дней после последнего употребления наркотика. Соответственно, пролонгированной оказывается и экскреция 9-карбоксит-ТГК. Характер экс-

Рис. III.1 Метаболический путь ТГК



кретции с мочой у эпизодического потребителя наркотиков отличается от тако-

вого у хронического наркомана. В первом случае после последнего употребления наркотика метаболиты в моче обнаруживаются в течение 1–3 дней, в зависимости от применяемого метода, тогда как в моче хронических курильщиков эти вещества обнаруживаются в течение недели и более.

С. Методы отбора и подготовки проб для анализа 9-карбокси-ТГК

Используются методы отбора и подготовки проб, изложенные в разделах I.C и G.5.

Меры предосторожности

При обработке проб мочи для анализа на 9-карбокси-ТГК должны быть также соблюдены определенные меры предосторожности. В тепле довольно быстро происходит деградация метаболитов каннабиноидов, и количество основного метаболита 9-карбокси-ТГК может значительно снизиться через 1 неделю даже при комнатной температуре и на 45% – через 6 месяцев [40, 41]. Снижение зависит от таких факторов, как окисление, количество мочи в контейнере и тип используемого контейнера. Сообщалось также, что 9-карбокси-ТГК необратимо сорбируется различными типами контейнеров, что приводит к его значительным потерям.

1. Подготовка проб для иммунологического анализа

Обычно для иммунологического анализа требуется минимальная подготовка проб или ее не требуется вообще (см. также раздел I. G.5).

2. Подготовка проб для хроматографии

а) Гидролиз

Свыше 80% экскретируемого метаболита каннабиноида 9-карбокси-ТГК присутствует в моче в виде конъюгатов с глюкуроновой кислотой. Для получения свободного метаболита необходимо произвести гидролиз мочи, который может быть выполнен с помощью либо щелочи, либо ферментативного гидролиза. Щелочной гидролиз считается более эффективным и воспроизводимым, чем кислотный или ферментативный гидролизы [42, 43].

Отберите пипеткой 10 мл мочи из контейнера в стеклянную пробирку, закрывающуюся пробкой. Для методов, требующих применения внутреннего стандарта (ГХ, ГХ–МС, ВЭЖХ), его также следует добавить в пробирку. Добавьте 2 мл 10 н. раствора гидроксида калия, закройте пробирку и инкубируйте 20 мин. при 50°C, время от времени перемешивая.

На этой стадии может быть выполнена очистка однократной экстракцией с использованием 20 мл циклогексан–этилацетата (7:1, по объему), особенно перед анализом с помощью ГХ, ГХ–МС и ВЭЖХ, для удаления нейтральных или основных примесей.

б) Экстракция

Процедура экстракции должна быть эффективной и избирательной. Обеспечение хорошего выхода метаболита важно, так как общее количество метаболитов каннабиноидов очень мало. Избирательность важна для гарантии удаления мешающих анализу веществ, присутствующих в моче.

Экстракция 9-карбокси-ТГК из гидролизованной мочи проводится при кислых значениях рН для гарантии растворения этого метаболита в используемых органических растворителях. Обычно для жидкостно-жидкостной экстракции используются описанные в литературе растворители или смеси растворителей, такие как петролейный эфир, гексан, диэтиловый эфир, хлороформ и комбинация гексана и этилацетата. В литературе предложено также несколько методов твердофазной экстракции метаболитов каннабиноидов.

Жидкостно-жидкостная

После охлаждения гидролизованной пробы доведите ее значение рН до 2 при помощи 2 н. раствора соляной кислоты или 2 н. раствора серной кислоты. Добавьте 15 мл циклогексан–этилацетата (7:1, по объему) и экстрагируйте раствор при механическом встряхивании в течение 10 мин. Отберите органический слой, профильтруйте его через небольшое количество сухого сульфата натрия в коническую пробирку, фильтр промойте 5 мл растворителя и выпарите до сухого состояния при комнатной температуре под током воздуха или азота. Вновь растворите остаток в 0,2 мл метанола или смеси ацетонитрил–этанол (3:1, по объему) при перемешивании или с использованием ультразвука.

Твердофазная

Как альтернатива жидкостно-жидкостной экстракции может применяться твердофазная экстракция. Для этой цели рекомендуется использовать химически связанный обращенно-фазовый адсорбент (модифицированное кварцевое стекло), применение которого должно соответствовать инструкции изготовителя. Как сообщалось в соответствующей литературе [44, 45], ряд методов демонстрируют высокое извлечение метаболита; один из этих методов приведен ниже.

Кондиционируйте колонку, медленно промывая ее поочередно метанолом, водой, метанолом и водой порциями по 3 мл каждый раз. Корпус от 10 мл пластикового шприца прикрепите к колонке в качестве резервуара. Примените слабый вакуум для усиления тока жидкости. Пропустите гидролизованную мочу (2 мл) через колонку и промойте ее 10 мл 0,1 н. раствором соляной кислоты и 25 мл 50 мМ раствором фосфорной кислоты в 10% ацетонитриле. Элюируйте 9-карбокси-ТГК с помощью 1 мл ацетона. Выпарите растворитель под током азота и вновь растворите остаток в 0,1 мл метанола.

В литературе описан новый простой и быстрый способ подготовки пробы и процедуры очистки для ГХ и ГХ–МС с использованием диска (микроколоники) для твердофазной экстракции и получения производных соединений [46].

с) Внутренние стандарты

Внутренние стандарты должны удовлетворять критериям, изложенным в разделе II.G.6. Каннабинол (КБН), оксифенбутазон или кетопрофен пригодны для большинства методов ГХ. Меченные дейтерием аналоги 9-карбокси-ТГК (d_3 или d_6), если они доступны, рекомендованы для ГХ–МС. Каннабинол или *n*-октил-*p*-гидроксibenзоат пригодны для ВЭЖХ.

Приготовление растворов внутренних стандартов:

Приготовьте исходный раствор в абсолютном этаноле, содержащий 1 мг/мл каннабинола. Перенесите 1 мл раствора в стандартную колбу на 200 мл и доведите до метки абсолютным этанолом (1 мл раствора внутреннего стандарта содержит 5 мкг каннабинола).

d) Стандартный раствор

Поскольку обычно нет необходимости в количественном определении, имеющийся в распоряжении раствор 9-карбокси-ТГК используется для идентификации метаболита в моче.

D. Методы скрининга

1. Методы иммунологического анализа

Лабораториям, для которых доступны методы иммунологического анализа, при проведении первоначального скрининга рекомендуется использовать именно эти методы. В продаже имеется несколько наборов для иммунологического анализа, пригодных для скрининга каннабиноидов в моче [47, 48]. Все иммунологические методы обнаруживают 9-карбокси-ТГК и проявляют среднюю (до высокой) перекрестную реактивность к другим содержащимся в моче ТГК-метаболитам с замещенными по циклу производными дибензопирана (таким как 11-гидрокси-ТГК) [49, 50]. Все положительные результаты, полученные с помощью первоначальных скрининг-тестов, должны быть подтверждены вторым анализом исходной пробы с использованием методов, основанных на методиках и химических принципах, отличных от первоначального скрининг-теста. Эти анализы должны быть более специфичными и по крайней мере столь же чувствительными. Некоторые основные данные перекрестной реактивности ряда имеющихся в продаже наборов иммуноанализа приведены в таблице III.1.

Таблица III.1 Перекрестная реактивность имеющихся в продаже наборов для иммунологического анализа каннабиноидов

Анализ	Перекрестная реактивность (%)			
	9-карбокси-ТГК	11-гидрокси-ТГК	ТГК	КБН
EMIT-d.a.u.	100 (50) ^{a, d}	56 (90)	–	–
FPIA-TDx	100 (100) ^{b, c}	36 (277)	15 (655)	11 (899)
Abuscreen-Ontrak	100 (100) ^{b, d}	40 (250)	14 (714)	1 (10 640)
Abuscreen-Online	100 (100) ^{b, d}	>100 (5)	3 (3 000)	5 (2 000)

^{a, b} Перекрестная реактивность рассчитана путем деления концентрации определяемого соединения ($50\%/100^b$ нг/мл) на концентрацию, эквивалентную $50\%/100^b$ нг/мл 9-карбокси-ТГК, и умножения на 100 (в круглых скобках эквиваленты, нг/мл).

^c М.А. ElSohly [50].

^d Данные изготовителя.

2. Тонкослойная хроматография

Стандартная методика ТСХ

Подробное описание стандартных материалов и методик для ТСХ приведено в руководстве Организации Объединенных Наций *Рекомендуемые методы анализа каннабиса* [9], и изложенные ниже применимы при анализе биологических экстрактов на 9-карбокси-ТГК.

Пластинки для ТСХ

Покрытие:	Активированный силикагель G. Также может применяться силикагель, содержащий добавку, флуоресцирующую под действием УФ-излучения с длиной волны 254 нм
Толщина слоя:	0,25 мм
Размер пластинок:	Стеклопластиковые пластинки 20 × 20 см, 20 × 10 см или 10 × 5 см. Оптимальная длина пробега приблизительно 10 см

Методика

25–50 мкл восстановленного раствора наносят на пластинку для ТСХ. Стандартный раствор 9-карбокси-ТГК также наносят на пластинку, затем осуществляют разделение, используя одну из представленных ниже систем растворителей.

Растворители для разделения:

Система А [51]:	Этилацетат	12
	Метанол	5
	Концентрированный раствор аммиака	1
	Вода	0,5
Система В [52]:	Хлороформ	70
	Метанол	30
	Концентрированный раствор аммиака	2

Визуализация

До визуализации пластинки должны быть высушены. Высушивание может производиться при комнатной температуре, или более быстро в термостате при 120°C в течение 10 мин., или при использовании нагнетательного вентилятора горячего воздуха. Для того чтобы получить надлежащее развитие окраски, важно удалить с пластинки все следы аммиака или других оснований. Для визуализации рекомендуется следующий метод:

Распыляемый реагент:

0,1% водный раствор соли Fast Blue В ("прочная синяя В"). Раствор должен быть свежеприготовленным. Приемлемая частота использования – один раз в день.

Для развития окраски важно, чтобы пластинка для ТСХ была подщелочена. Этого можно достичь обработкой пластинки парами аммиака или диэтиламина после распыления реактива. Затем пластинка высушивается с использованием нагнетательного вентилятора теплого воздуха. 9-карбокситГК проявляется в виде розового или красно-розового пятна с тем же значением R_f , что и для пятна стандарта 9-карбокситГК.

Примечание: В некоторых авторитетных источниках утверждается, что соль "прочная синяя В" является потенциальным канцерогеном. Те же авторитетные источники устанавливают, что краситель Fast Blue ВВ менее подозрителен в качестве потенциального канцерогена [53]. Поэтому в качестве альтернативы на пластинку можно нанести распылителем свежеприготовленный раствор красителя Fast Blue ВВ в 0,1 М растворе гидроксида натрия (0,75 мг/10 мл) и затем высушить для обеспечения надлежащего развития окраски и стабильности.

Результаты

Таблица III.2 $R_f \times 100$ значений

Соединение	Система для разделения	
	A	B
9-карбокситГК	35–40	25–38

Эти значения могут меняться в зависимости от лабораторных условий (влажность, температура, вытяжные шкафы) и других параметров (например, качества используемого материала).

Е. Подтверждающие (контрольные) хроматографические методы

1. Газовая хроматография

а) Получение производных веществ пробы

Экстракт мочи выпаривается до сухого состояния под током азота, и в пробирку добавляют 50 мкл N,O-бис-триметилсилил-трифторацетамида (БСТФА) и триметилхлорсилана (ТМХС), перемешивают в приборе для встряхивания "Vortex" и нагревают при 60°C в течение 10 мин. Для приготовления производных можно также использовать реагенты N-триметилсилил-N-метилтрифторацетамид (МСТФА)/ТМХС [39, 54] или *t*-бутилдиметилсилилтрифторацетамид (МТБСТФА)/ТБДМС [55, 56]. МТБСТФА обладает более высокой реактивностью, и в результате ТБДМС-производные более стабильны и показывают более высокую чувствительность в ГХ–МС.

Для получения производных веществ пробы может быть применен альтернативный метод с использованием гидроксида тетраметиламмония (ТМАГ), в результате чего образуется диметилловое производное 9-карбокситГК [57, 58]. В этом случае к сухому остатку добавляется 70 мкл 10% ТМАГ-диметил-

сульфоксида (1:20, по объему), а затем через 2 мин. – 5 мкл йодистого метила. Еще через 10 мин. добавьте 200 мкл 0,1 н. HCl и экстрагируйте раствор 2 мл изооктана. Изооктановый слой отделяется и выпаривается под током азота. Сухой остаток восстанавливается в 50 мкл растворителя. 1–2 мкл раствора производного вещества инжeksiруется в колонку.

b) Метод насадочной колонки [57]

Рабочие условия:

Детектор:	ПВД
Колонка:	2 м × 2 мм (внутренний диаметр)
Насадка колонки:	a) 3% диметилсиликон (OV-1) b) 3% фенилметилсиликон, 50% фенил (OV-17)
Газ-носитель:	Азот или гелий при скорости 30 мл/мин.
Рабочие температуры:	Инжектор: 260°C Термостат: 255°C Детектор: 275°C

Примечание: *Перед использованием все насадочные колонки должны быть кондиционированы. Обычно температура кондиционирования должна быть не менее чем на 30°C выше той, при которой должен проводиться анализ, если только при этом не требуется превышать верхний предел температуры колонки, указанный изготовителем. В таком случае должен применяться меньший температурный интервал, а период кондиционирования должен быть существенно увеличен. Обычно колонки кондиционируются в течение ночи или не менее 15 ч.*

Кондиционирование производят при нормальной скорости тока газ-носителя и с отсоединением колонки от детектора.

Примечание:

- *Для предотвращения адсорбции морфина в процессе ГХ стеклянные колонки следует часто обрабатывать силаном.*
- *Регулярно прочищайте отверстие для инъекции пробы и детектор в целях избежания разложения пробы и потери чувствительности детектора.*
- *Обращайтесь с силилирующими реактивами с осторожностью, так как эти вещества обладают очень высокой реактивностью и высокой чувствительностью к действию влаги.*

c) Метод капиллярной колонки [58]

Рабочие условия

Детектор:	ПВД
Колонка:	Кварцевое стекло, 10 м × 0,52 мм (внутренний диаметр), с 2,6 мкм химически связанной диметилсиликоновой стационарной фазой, например OV-1

Газ-носитель:	Гелий при скорости 2 мл/мин.
Методика инъекции:	Расщепленная/нерасщепленная
Рабочие температуры:	Инжектор: 290°C Термостат: 240°C Детектор: 290°C

2. Газовая хроматография – масс-спектрометрия

Рабочие условия [46, 56, 59, 60]

Колонка:	Кварцевое стекло, 10–30 м × 0,18–0,25 мм (внутренний диаметр), с 0,25 мкм химически связанной фенилметил- или диметилполисилоксановой стационарной фазой
Газ-носитель:	Гелий при скорости 2 мл/мин.
Температура колонки:	От 150–220°C до 270–290°C при 5–25°C/мин.
Температура инжектора:	250–260°C в режиме без расщепления
Ионизация:	Режим электронного удара (ЭУ) или химической ионизации

Внутренние стандарты

Меченные дейтерием аналоги 9-карбокси-ТГК (d_3 или d_6) или неизотопные стандарты (например, (2-[(2,6-дихлоро-3-метилфенил)амино] бензойная кислота).

Экстракция

Твердофазная экстракция (ТФЭ) [46, 59, 60] или жидкостно-жидкостная экстракция [56]

Приготовление производных

С БСТФА или МСТФА (ТМС-производные) [46, 59], МТБСФА (ТБДМС-производные) [56] или с гидроксидом триметиламония (метилловые производные) [60].

Таблица III.3 Основные ионы в масс-спектрах производных 9-карбокси-ТГК (МВИ)

Соединение	Основные осколочные ионы, m/z
9-карбокси-ТГК диметилловое производное	372 (M^+), 357, 313
9-карбокси-ТГК-диТМС	488 (M^+), 473, 371
9-карбокси-ТГК-диТМС ^a	489 (M^+), 399, 371
9-карбокси-ТГК-диТБДМС	572 (M^+), 557, 515, 413

^a Режим химической ионизации, в качестве реагирующего газа использовался изобутан.

3. *Высокоэффективная жидкостная хроматография*

Высокоэффективная жидкостная хроматография на колонках с обращенной фазой при ультрафиолетовом [61] или электрохимическом обнаружении [55, 62] обеспечивает высокую чувствительность и достаточную специфичность для подтверждения положительных результатов, полученных при скрининге с помощью иммунологических методов. Она позволяет быстро обнаруживать 9-карбокситГК при низком (нг/мл) уровне без предварительного получения его производных соединений. Для воспроизводимого количественного определения рекомендуется внутренний стандарт (например, каннабинол [55, 61]).

Рабочие условия

Метод А [61]

Колонка:	Октилварц (Spherisorb C-8 или эквивалентный), 5 мкм, 25 см × 4,6 мм (внутренний диаметр)
Подвижная фаза:	Ацетонитрил–50 мМ фосфорная кислота (65:35, по объему)
Скорость:	1,5 мл/мин.
Обнаружение:	УФ-излучение с длиной волны 211 нм (200–350 нм диапазон сканирования при использовании диодного детектора)
Инжектируемый объем:	10–15 мкл
Внутренний стандарт:	Каннабинол

Метод В [62]

Колонка:	Октилварц (Zorbax C-8 или эквивалентный), 5 мкм, 25 см × 4,6 мм (внутренний диаметр)
Подвижная фаза:	Ацетонитрил–метанол–0,02 н. серная кислота (35:15:50, по объему)
Скорость:	1,1 мл/мин.
Обнаружение:	ЭХО, 110 мВ (Ag/AgCl) (рабочий стеклянный углеродный электрод)
Инжектируемый объем:	5–10 мкл
Внутренний стандарт:	п-октил-р-гидроксibenзоат

Альтернативные методики ВЭЖХ см. Dixit и Dixit [63].

Ф. Интерпретация результатов

1. Время обнаружения

Период времени, за который метаболит может быть обнаружен, варьируется в зависимости от методов иммунологического анализа и принятого при первоначальном скрининге критического уровня концентрации препарата. Обычно единичное употребление марихуаны (менее 2 раз в неделю) может быть обнаружено с помощью анализа мочи в течение 1–3 дней, если установить критический уровень 100 нг/мл (или менее). При хроническом употреблении марихуаны в течение длительного периода время обнаружения метаболита может существенно увеличиться благодаря способности ТГК поглощаться и накапливаться в жировой ткани. В этих условиях обнаружение 9-карбоксит-ТГК возможно в течение 1 недели и позже [39, 64].

2. Пассивная ингаляция

Иногда в качестве объяснения положительного результата анализа мочи приводится пассивное или случайное воздействие дыма марихуаны. Хотя было продемонстрировано, что это явление может иметь место, достижение достаточных для определения доз ТГК при таком способе поступления затруднено и в большинстве случаев маловероятно. При использовании скрининговых методов с критическим уровнем 20 нг/мл могут появиться положительные результаты, но очень редко. При критических уровнях в 100 нг/мл возможность положительных результатов вследствие пассивной ингаляции фактически исключена [43, 65–68].

3. Колебания концентраций

На концентрацию наркотиков в моче могут влиять ряд различных факторов, прежде всего потребление жидкости. Концентрация наркотика в моче может меняться 10-кратно в течение нескольких часов. Это означает, что при интерпретации положительного результата, появляющегося, например, после отрицательного результата при ежедневном режиме отбора проб, должна соблюдаться осторожность. Это особенно проблематично в случае таких наркотиков, как ТГК, с продолжительным периодом полураспада, когда обнаружение вероятно в течение нескольких дней, но концентрация их существенно меняется относительно критического уровня. Положительные пробы, следующие за отрицательными, не обязательно указывают на продолжение употребления марихуаны.

IV. Рекомендуемые методы обнаружения и анализа кокаина в биологических пробах

A. Наиболее распространенные виды незаконных продуктов коки [10]

1. Листья кока

Различные виды *Erythoxylon* имеют листья, различающиеся по размеру и внешнему виду. У всех видов верхняя сторона листа темнее, чем нижняя, которая может быть серо-зеленой по окраске. На нижней стороне листьев находятся две жилки, параллельные средней жилке, что считается характерным признаком листа кока.

2. Кокаин

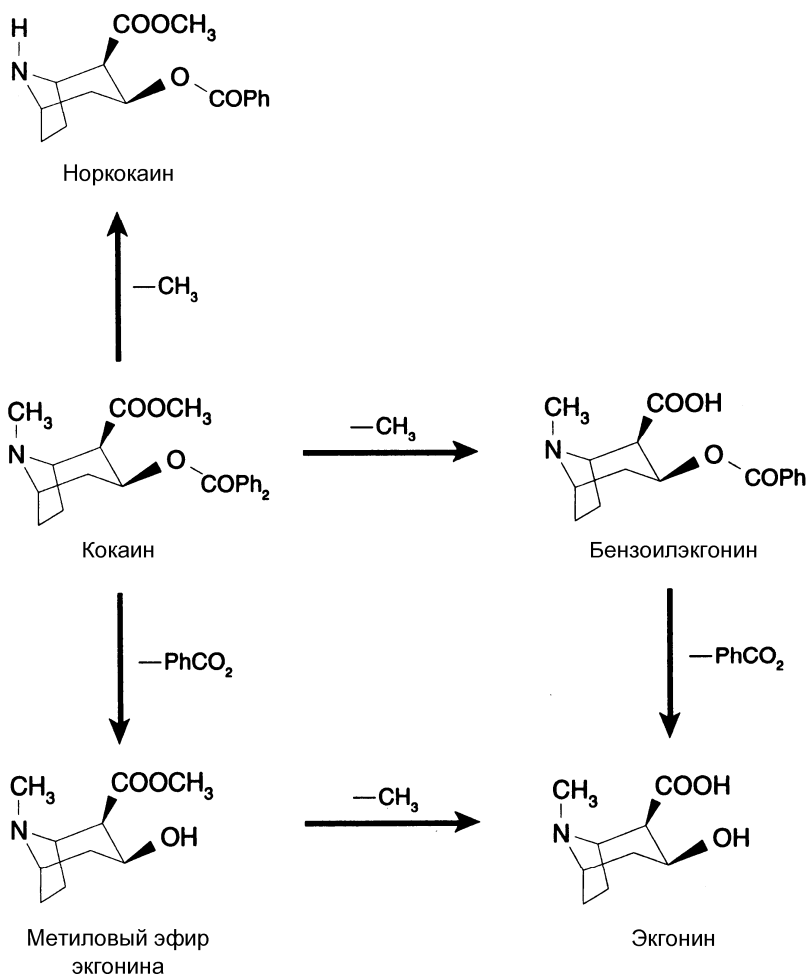
Хотя кокаин изготавливается из натурального продукта, состав и свойства которого не отличаются постоянством, а процессы его производства отдельными партиями допускают широкое разнообразие, он обладает сравнительно малой изменчивостью по сравнению, например, с продуктами героина. Тем не менее нет двух абсолютно идентичных незаконных образцов кокаина. большей частью это белый или почти белый порошок, зачастую тонкоизмельченный, редко влажный. Он обладает характерным запахом.

Кокаиновая паста представляет собой почти белый, кремовый или бежевый порошок. Редко бывает тонкоизмельченным, часто содержит комки и, как правило, влажный. Если комки некристаллические (кристаллические встречаются редко), они обычно разрушаются при незначительном надавливании. Обладает характерным запахом.

Время от времени кокаин встречается в виде материала, содержащего крупные, иногда бесцветные кристаллы ("каменный кокаин"). Эти кристаллы могут быть довольно твердыми. Обычно некоторая, если не основная, часть таких образцов состоит из материала, сходного с обычным кокаином-"порошком".

Разбавление кокаина в производящих странах осуществляется сравнительно редко, продаваемый на международном черном рынке материал часто обладает чистотой 80–90% (в виде гидрохлорида кокаина). Последующее разбавление и трансформация для целей сбыта в экономически развитых странах обычно состоит в добавлении либо неконтролируемых синтетических местных анестетиков (например, лидокаина, прокаина или бензокаина), либо углеводов (например, маннита, лактозы или глюкозы). В любом случае внешний вид кокаина изменяется лишь незначительно, так как практически все добавляемые вещества представляют собой тонкоизмельченные сухие белые порошки.

Рис. IV.1 Метаболический путь кокаина



Обычно чистота кокаина, предназначенного для незаконной продажи в экономически развитых странах, составляет около 30%. Материал, поступающий на международный черный рынок, подвергается разбавлению в пропорции один к трем по весу.

Помимо упомянутых выше разбавителей и примесей гидрохлорид кокаина может также содержать целый ряд веществ, таких как крахмал, борная кислота, гидрокарбонат натрия и диперон.

Появились более новые формы кокаина, особенно формы в виде свободного основания, такие как экстрагированное основание кокаина и "крэк". В этих формах могут присутствовать остатки растворителя, а также местные анестетики, используемые в качестве разбавителей. Частой комбинацией является так называемый "скоростной шар" ("speed-ball"), который состоит из смеси кокаин плюс героин.

Кроме того, отсылаем читателя к обзорным публикациям, в которых приведены подробные сведения по химии алкалоидов коки [69–72]. При лабораторном анализе различных биологических проб на кокаин имеют значение следующие соединения (структура представлена на рис. IV.1.):

Кокаин
Бензоилэксгонин
Метилловый эфир эксгоина
Эксгоин

3. Способы введения

Кокаин может употребляться интраназально (наиболее обычный способ употребления, то есть его втягивают носом или нюхают) или путем внутривенных и внутримышечных инъекций. Его также можно принимать перорально, класть под язык, вводить вагинально или ректально, и его можно курить. При втягивании носом через соломинку или трубочку из свернутой бумаги формируется узкая полоска из кокаинового порошка на гладкой поверхности. "Полоска" кокаина, как правило, 3–5 см длиной и содержит 10–100 мг порошка. Свободное основание кокаина и "крэк" вводятся ингаляционно, то есть при курении в специальных приспособлениях. В некоторых географических районах листья кока традиционно жуют вместе со щелочной землей.

Биодоступность кокаина варьируется в зависимости от способа введения (см. таблицу IV.1) [73].

Таблица IV.1 Биодоступность кокаина при различных способах введения

Способ введения	Биодоступность (%)
Пероральный	20–30
Интраназальный	20–30
При курении	6–32
Внутривенный	100

4. Метаболизм и экскреция

Кокаин преобразуется в два основных метаболита, а именно бензоилэксгонин и метилловый эфир эксгоина [74]. Недавно в моче человека были идентифицированы некоторые другие второстепенные метаболиты, включая норкокаин [75]. Метаболические пути схематично показаны на рис. IV.1. Кокаин элиминируется с мочой в неизменном виде (1–9% дозы), в виде бензоилэксгоина (35–54%) и метилового эфира эксгоина (32–49%). Рекомендуемыми целевыми исследуемыми веществами являются кокаин и его метаболиты бензоилэксгоин и метилловый эфир эксгоина.

Пик концентрации кокаина в плазме достигается вскоре после интраназального, интрапульмонарного или внутривенного введения. Время наступления максимальных психотропных и физиологических эффектов также коротко; затем эйфорические эффекты ослабляются в пределах 30–60 мин. (20

мин. в случае курения). Полупериод выведения кокаина из плазмы после внутривенного или интрапупьмонарного введения составляет 38–39 мин. [77].

В. Методы отбора и подготовки проб для анализа кокаина и его метаболитов

Описание общих методов отбора проб приведено в разделах I.C и G.5.

Меры предосторожности

При работе с пробами мочи для анализа кокаина и его метаболитов необходимо соблюдать определенные меры предосторожности. Исследуемые вещества проявляют слабую устойчивость к гидролизу, особенно в щелочной среде [78, 79]. После отбора пробы следует держать как можно больше на холоде и в темноте. Установлено, что при pH 8 концентрации кокаина в пробах мочи снижаются на 40–70% во время хранения при 4° С в течение 21 дня. Поэтому рекомендуется доводить кислотность проб до pH 5 разведенной уксусной кислотой. Метилловый эфир экгонина, например, стабилен в моче до трех лет при кислотности между pH 3 и 5 и хранении при 4–5° С [80]. Следует также отметить, что пробы крови, которые будут использовать для анализа кокаина и его метаболитов, лучше стабилизировать фторидом и при pH 5.

1. Подготовка проб для иммунологического анализа

Если необходимо, для устранения мутности мочу следует центрифугировать. Необходимо довести pH проб мочи до значений между 6,5 и 8,0. В отношении дальнейших процедур следует придерживаться инструкций изготовителя.

2. Подготовка проб для хроматографии

а) Гидролиз

Гидролиз не нужен.

б) Экстракция

Жидкостно-жидкостная

Аликвота мочи от 1 до 20 мл экстрагируется в соответствии с методологией, которая будет использоваться впоследствии. Проба доводится до pH 9 (диапазон 8–9,5) соответствующим буфером. Подходит любой из следующих буферов [89]:

Бура (pH 9–9,6): раствор, содержащий 19,07 г тетрабората натрия ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$) в 1 л воды.

Аммиачный буфер (pH 9,5): хлорид аммония (10,7 г), растворенный в водном растворе аммиака (5 М; 40 мл), и раствор доведен до 1 л водой.

Далее проба экстрагируется как минимум два раза эквивалентными объемами экстрагирующего раствора. Подходящими являются смеси дихлорметан–изопропанол (85:15, по объему) или хлороформ–изопропанол (50:50, по объему). Необходимо позаботиться о том, чтобы водный (верхний) слой полностью отделился от слоя растворителя (нижнего) до отбора экстракта, для того чтобы избежать какого-либо переноса воды. Если возникают проблемы с образованием эмульсий, можно использовать для фильтрации экстракта обработанную силиконом фильтровальную бумагу (фазоразделяющая бумага). Органические слои фильтруются через небольшое количество сухого сульфата натрия (на фильтре), фильтр промывается 5 мл растворителя. Экстракт выпаривается досуха в вакууме или под током азота.

Твердофазная

Диатомовая земля

При проведении процедур экстракции с использованием диатомовой земли следует соблюдать рекомендации изготовителя (например, Extrelut®). Следующая процедура типична [90–92].

Пробу мочи (20 мл) доводят до pH 9 насыщенным $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3$ буфером. Затем пробу переносят на колонку жидкостного хроматографа, содержащую 20 г диатомовой земли, и дают впитаться в течение 10–15 мин. Колонку элюируют 40 мл дихлорметан–изопропанола (85:15, по объему). Получают около 25 мл элюата. Органический элюат собирается и выпаривается досуха.

Модифицированный кремнезем

Рекомендуются также методы твердофазной экстракции, использующие картриджи с модифицированным кремнеземом [82, 93, 94]. Преимущества методики данного типа состоят в экономии времени, сокращении объемов требуемых растворителей и избегании связанных с образованием эмульсий проблем, которые иногда возникают во время жидкостно-жидкостной экстракции. Эти преимущества сводятся на нет стоимостью используемых картриджей. Ниже описаны две репрезентативные методики твердофазной экстракции (ТФЭ), каждая из которых типична для методов данного типа. Имеются и другие материалы для ТФЭ, и необходимо тщательно следовать процедурам, рекомендованным изготовителем.

Методика А В методе используется картридж с модифицированным кремнеземом (например, Bond Elut Certify®), который допускает как ионные, так и неполярные взаимодействия между анализируемой пробой и адсорбентом [85].

Экстракционные картриджи вставляются в вакуумную рабочую станцию и кондиционируются промыванием метанолом (2 мл) и затем фосфатным буфером (0,1 М; pH 7; 2 мл). Необходимо тщательно следить, чтобы картриджи не высохли после кондиционирования.

Пробы мочи центрифугируют, и, если необходимо, аликвоты (2,5 мл) смешивают с внутренним стандартным раствором и затем с фосфатным буфером (0,1 М; pH 7; 1 мл). Значение pH проверяется и в случае необходимости доводится до pH 7.

Затем пробы мочи переносят на картриджи и медленно пропускают под вакуумом.

Картриджи промывают деионизированной водой (3 мл), водной соляной кислотой (0,1 М; 3 мл) и метанолом (9 мл).

Анализируемые пробы элюируются смесью хлороформ–изопропанол–концентрированный раствор аммиака (80:20:2, по объему; 2 мл).

Элюаты выпариваются досуха.

Методика В В методе используется колонка на основе циклодекстрана (например, Cuslobond I), которая, как установлено, дает чистый экстракт бензоилэргонина с эффективностью извлечения от 50% [85].

Циклодекстрановые колонки (500 мг/3 мл) используют без кондиционирования.

Моча (5 мл) добавляется в колонку и медленно пропускается под вакуумом.

Колонку промывают водой (10 мл) и высушивают путем центрифугирования или пропуская воздух через колонку в течение 10 мин.

Затем колонку промывают ацетоном (2,5 мл) и высушивают в вакууме.

Бензоилэргонин элюируют смесью хлороформ–этанол (8:2, по объему; 2 мл) с использованием легкого положительного давления на верхушку колонки с помощью резиновой груши.

Элюат выпаривают досуха.

Усовершенствованный, быстрый и эффективный метод ТФЭ для бензоилэргонина с извлечением 90–100% описан Андерсоном [95]. В литературе описана также новая простая и быстрая процедура подготовки проб и очистки для ГХ и ГХ–МС с использованием диска (микроколонки) для ТФЭ и получения производных соединений [96].

с) Внутренние стандарты

При выборе подходящего внутреннего стандарта следует по возможности соблюдать общие критерии, представленные в разделе П.С.6. Внутренние стандарты для анализа кокаина и его метаболитов с помощью газовой хроматографии делятся на три группы:

Аналог бензоилэргонина, например пропилбензоилэргонин [81].

Опиатный алкалоид, например леваллофан [82], налорфин [83], этилморфин [84] или кодеин [85].

Разнообразные вещества, например *n*-тетракозан, тетрафенилэтилен (только ПИД) или бутилантрахион [86].

Для ГХ–МС предпочтительными внутренними стандартами являются меченные дейтерием аналоги кокаина и его метаболитов, но если они недоступны, следует использовать один из перечисленных выше стандартов для ГХ. Внутренние стандарты, подходящие для ВЭЖХ, – это лидокаин [87] и тропакакоин (бензоилтропин) [88].

d) Стандарты для калибровки

Приготовьте исходные растворы в метаноле, содержащие 1 мг/мл кокаина, бензоилэксгоина, метилового эфира экгоина и внутреннего стандарта. Из этих исходных растворов приготовьте стандарты мочи, содержащие кокаин в диапазоне концентраций 0–5 мкг/мл, бензоилэксгоин и метиловый эфир экгоина в диапазоне 0–25 мкг/мл и внутренний стандарт в концентрации 25 мкг/мл. Комплект калибровочных стандартов мочи следует обрабатывать одновременно с исследуемыми пробами.

С. Методы скрининга

1. Методы иммунологического анализа

Радиоиммунологический анализ, флуоресцентный поляризационный иммунологический анализ, иммуноферментный анализ (серийный вариант) (ИФА) и ингибирование агглютинации латекса рекомендуются там, где лаборатории имеют необходимое оборудование для проведения этих методов (см. раздел I.G.1). Пределы обнаружения радиоиммунологического анализа и флуоресцентного поляризационного иммунологического анализа составляют обычно 50 нг/мл или менее, в то время как для ИФА ограничением является 300 нг/мл. Антитела имеющихся в продаже наборов для иммунологического анализа выявляют бензоилэксгоин, но могут различными способами вступать в перекрестные реакции с кокаином и другими его метаболитами в различных случаях [97]. В таблице IV.2 приведены некоторые основные данные о перекрестной реактивности ряда имеющихся в продаже наборов для иммунологического анализа.

Таблица IV.2 Перекрестная реактивность имеющихся в продаже наборов для иммунологического анализа кокаина и метаболитов кокаина

<i>Анализ</i>	<i>Перекрестная реактивность (%)</i>			
	<i>Бензоилэксгоин</i>	<i>Кокаин</i>	<i>Метиловый эфир экгоина</i>	<i>Эксгоин</i>
Coat-A-Count	104 (300) ^{a, b}	7 259 (50)	1,3 (5 000)	–
Abuscreen-RIA	108 (300) ^{a, b}	215 (300)	0,6 (5 000)	–
EMIT-d.a.u.	100 (300) ^{c, d}	0,15 (200 000)	–	1,5 (20 0000)
EMIT-s.t.	пол. (300) ^b	отр. (5 000)	отр. (5 000)	–
FPIA-TDx	95,7 (300) ^{a, b}	1,2 (5 000)	0,1 (5 000)	–
Abuscreen-Ontrak	100 (300) ^{c, d}	10 (3 000)	< 0,01 (> 100 000)	0,75 (40 000)
Abuscreen-Online	100 (300) ^{c, d}	0,97 (30 928)	0,31 (96 774)	1,2 (25 000)

^a Выявляемая перекрестная реактивность рассчитана путем деления выявляемой концентрации на концентрацию определяемого соединения и умножения на 100 (в скобках приведена концентрация, при которой определялась перекрестная реактивность, нг/мл).

^b J.E. Wallace [86].

^c Перекрестная реактивность рассчитана путем деления концентрации определяемого соединения (300 нг/мл) на концентрацию, эквивалентную 300 нг/мл бензоилэкгонины, и умножения на 100 (в скобках эквиваленты, нг/мл).

^d Данные изготовителя.

2. Тонкослойная хроматография

Для экстракции должно быть взято 5–20 мл мочи. Обычная ТСХ имеет предел обнаружения кокаина и бензоилэкгонины 1 мг/мл мочи. Высокоэффективная тонкослойная хроматография (ВЭТСХ) имеет предел обнаружения бензоилэкгонины приблизительно 0,3 мг/мл мочи, и если имеется соответствующее оборудование, этому методу должно быть отдано предпочтение.

Стандартная методика ТСХ

Подробное описание стандартных материалов и методик ТСХ приведено в [10], и изложенные ниже применимы при анализе биологических экстрактов.

Пластинки для ТСХ

Покрытие:	Активированный силикагель G, содержащий добавку, флуоресцирующую под действием УФ-излучения с длиной волны 254 нм
Толщина слоя:	0,25 мм
Размер пластинок:	Стеклопластиковые пластинки 20 × 20 см, 20 × 10 см или 10 × 5 см. Оптимальная длина пробега приблизительно 10 см

Пластинки для ВЭТСХ

Имеются в продаже готовые пластинки для ВЭТСХ, 10 × 10 см, как правило, обеспечивающие разделение после пробега 5 см.

Стандартные растворы

Кокаин
Бензоилэкгонин
Метилэфир экгонины.

Приготовить стандартные растворы в концентрации 1 мг/мл в метаноле и наносить 5 мкл каждого раствора на пластинку.

Методика

Экстракты мочи (см. раздел IV.В.с) выпаривают досуха в пробирках для анализа и перерастворяют в метаноле (50 мкл). Весь экстракт наносится на пластинку в виде пятна.

Растворители для разделения

Система А (ТСХ) [10]:	Метанол	100
	Концентр. раствор аммиака	1,5
Система В (ТСХ) [98]:	Хлороформ	50
	Метанол	50
Система С (ВЭТСХ) [99]:	Этилацетат	15
	Метанол	15
	Дихлорметан	5
	Концентр. раствор аммиака	3

Визуализация

До визуализации пластинки должны быть высушены. Высушивание может производиться при комнатной температуре, или более быстро при использовании нагнетательного вентилятора горячего воздуха, или в термостате при 120° С в течение 10 мин. Для того чтобы получить надлежащее развитие окраски, важно удалить с пластинки все следы аммиака или других оснований. Для визуализации рекомендуются следующие методы:

УФ-излучение с длиной волны 254 нм.

Реактив – подкисленный йодоплатинат калия. (Приготовление см. раздел II.C.2)

Реактив Драгендорфа. (Приготовление см. раздел II.C.2)

Последующее опрыскивание подкисленным хлоридом железа может вызвать более интенсивное окрашивание [100].

Реактив для опрыскивания: Концентрированная серная кислота (1мл) осторожно добавляется к водному раствору хлорида железа (5%, м/о; 10 мл) и смешивается.

Результаты

Таблица IV.3 R_f × 100 значений

Соединение	Система для разделения	
	А	В
Кокаин	59	61
Бензоилэргонин	25	28
Метилвый эфир эргонина	65	–

Таблица IV.4 Появление пятен при каждом методе визуализации

Соединение	Метод обнаружения		
	УФ	Йодоплатинат	Реактив Драгендорфа
Кокаин	Темный	Фиолетовый	Оранжевый ^а
Бензоилэргонин	Темный	Не проявляется ^б	Оранжевый ^а

^а Цвет одинаковый до и после опрыскивания раствором подкисленного хлорида железа.

^б Пятна > 1 мкг дают лиловую окраску на слегка более светлом лиловом фоне [85].

Д. Подтверждающие (контрольные) хроматографические методы

1. Газовая хроматография

а) Получение производных веществ пробы

Для обнаружения метаболитов кокаина нужно получить производные экстракта мочи (см. также примечания в разделе I.G.5).

Алкилирование/ацилирование (ПФП-производные, пригодные для ПИД и АФД) [83]

Экстракт мочи выпаривают досуха и добавляют пентафторпропионовый ангидрид (50 мкл) и пентафторпропанол (25 мкл). Смесь нагревают при 90°C в течение 15 мин. Участвовавшие в получении производных реагенты испаряются, а остаток перерастворяют в этилацетате (25 мкл). Полученные ПФП-производные стабильны в реактиве в течение нескольких месяцев, а после выпаривания реактива – не менее 24 ч.

Силилирование (ТМС- или ТБДМС-производные, пригодные для ПИД)

Экстракт мочи выпаривают досуха и перерастворяют в ацетонитриле (25 мкл). Добавляется силилирующий реагент, например 25 мкл *N*-метил-*N*-бутилсилилтрифторацетамид (МСТФА) для ТМС-производных или *N*-метил-*N*-(*tert*-бутилдиметилсилил)трифторацетамид (МТБСТФА) [88] для ТБДМС-производных, и реакция продолжается 30 мин. при 50–60°C. Смесь инжигируется непосредственно в хроматограф. Производные следует подготавливать непосредственно перед анализом с помощью ГХ или ГХ–МС. Они стабильны в реактиве не более нескольких дней.

б) Метод насадочной колонки [10]

Рабочие условия

Детектор: ПИД, водород при 30 мл/мин., воздух при 450 мл/мин.

Примечание: Для достижения более высокой чувствительности и специфичности рекомендуется азотно-фосфорный детектор (АФД): рабочие параметры при его использовании должны соответствовать рекомендациям изготовителя. Методы подготовки проб и получения производных должны быть выбраны такими, чтобы избежать присутствия в конечном растворе, инжигируемом в хроматограф, азотсодержащих растворителей и реагентов.

Колонка:	2 м × 2–4 мм (внутренний диаметр)
Насадка колонки:	a) Диметилсиликон (SE 30, OV-1) b) Фенилметилсиликон, 50% фенила (OV-17)
Газ-носитель:	Азот, 30 мл/мин.
Рабочие температуры:	Инжектор: 220° С Термостат: 220° С Детектор: 300° С
Кондиционирование насадочных колонок:	

Примечание: *Перед использованием все насадочные колонки должны быть кондиционированы. Обычно температура кондиционирования должна быть не менее чем на 30° С выше той, при которой должен проводиться анализ, если только при этом не требуется превышать верхний предел температуры колонки, указанный изготовителем. В таком случае должен применяться меньший температурный интервал, а период кондиционирования должен быть существенно увеличен. Обычно колонки кондиционируют в течение ночи или не менее 15 ч.*

Кондиционирование производят при нормальной скорости тока газаносителя и с отсоединением колонки от детектора.

Примечание:

- *Для предотвращения адсорбции морфина в процессе ГХ стеклянные колонки следует часто обрабатывать силиконом.*
- *Регулярно прочищайте отверстие для инъекции пробы и детектор в целях избежания разложения пробы и потери чувствительности детектора.*
- *Обращайтесь с силилирующими реактивами с осторожностью, так как эти вещества обладают очень высокой реактивностью и высокой чувствительностью к действию влаги.*

c) *Метод капиллярной колонки*

Рабочие условия

Детектор:	ПИД или АФД (см. примечание к пункту "Детектор", выше)
Колонка:	Кварцевое стекло, 25 м × 0,32 мм (внутренний диаметр), с 0,15 мкм неполярной (метилсиликон) химически связанной стационарной фазой
Газ-носитель:	Гелий или водород, 2 мл/мин.
Рабочие температуры:	Инжектор: 250° С Термостат: от 150° С до 280° С, при 9° С/мин. Детектор: 280° С

Примечание: *В зависимости от наличия оборудования размеры капиллярных колонок, стационарная фаза, толщина фазы, газ-носитель и скорость его тока могут отличаться от описанных выше. Однако для анализа биологиче-*

ских проб рекомендуется использовать неполярную колонку общего назначения. Оптимальные рабочие условия для системы следует выбирать в соответствии с рекомендациями поставщика.

2. Газовая хроматография – масс-спектрометрия

Если в качестве детектора используется масс-спектрометр, то основные ионы (m/z) в спектрах ЭУ⁺ соответствуют представленным в таблице IV.5. Подробное описание методик ГХ–МС с использованием мониторинга выбранного иона (МВИ) дано в [95, 101].

Таблица IV.5 Основные ионы в масс-спектрах кокаина и его метаболитов

Соединение	Основные осколочные ионы (m/z)			
	Немодифицированные	ПФП-производные	ТМС-производные	ТБДМС-производные
Кокаин	82, 105, 182, 303	(не образуются)	(не образуются)	(не образуются)
Бензоилэксгонин	82, 93, 124, 168	272, 300, 316, 421	82, 240, 361	282, 346, 403
Метилловый эфир эксгонина	82, 96, 168, 199	119, 182, 345	82, 83, 96, 98, 182	182, 256, 313

3. Высокоэффективная жидкостная хроматография

Методика

Экстракты мочи выпаривают досуха и перерастворяют в ацетонитриле или подвижной фазе (50–100 мкл), 10–20 мкл инжeksiруется.

Пригодны следующие системы ВЭЖХ:

Рабочие условия

Метод А [87]

Колонка:	Октадецилсиликоновая обращенная фаза, 3 мкм, 10 см × 3,2 мм (внутренний диаметр)
Подвижная фаза:	Фосфатный буфер (0,01 М; рН 2,1), содержащий тетрабутиламмония гидроксид (0,2 мМ) и ацетонитрил (6%, по объему)
Скорость:	1,5 мл/мин.
Обнаружение:	УФ-излучение с длиной волны 233 нм

Метод В [88]

Колонка:	Октадецилсиликоновая обращенная фаза, 3 мкм, 15 см × 4,6 мм (внутренний диаметр) + предколонка
----------	--

Подвижная фаза:	Ацетонитрил–вода (17,5:82,5, по объему), содержащая фосфорную кислоту (8,5 г/л) и гексилламин (0,28 мл/л), рН 3
Скорость:	1,2 мл/мин.
Обнаружение:	УФ-излучение с длиной волны 230 нм
<i>Метод С [94]</i>	
Колонка:	Октадецилсиликоновая обращенная фаза, 25 см × 4,6 мм (внутренний диаметр) + предколонка
Подвижная фаза:	Первоначальная: 10% ацетонитрил в фосфатно-калиевом буфере (0,05 М; рН 3,2). В течение 15 мин. содержание ацетонитрила повышают до 50% и окончательный состав фазы сохраняется в течение 5 мин. Между инъекциями требуется 5 мин. для восстановления равновесия.
Скорость:	1,5 мл/мин.
Обнаружение:	УФ-излучение с длиной волны 200 нм

Е. Интерпретация результатов

1. Время обнаружения

После однократной дозы кокаина неизмененный препарат может быть обнаружен в пределах 24 ч, а метаболиты бензоилэкгонин и метиловый эфир экгонина – в пределах 48 ч [102–104]. При хроническом употреблении время обнаружения может длиться дольше, до 5 и более дней [105, 106].

В относительных количествах метаболитов, экскретируемых после введения кокаина интраназально, внутривенно или при курении, обнаруживаются минимальные различия [107].

Как правило, по концентрации кокаина и его метаболитов в моче невозможно сделать заключение о количестве принятого наркотика, времени приема последней дозы или уровне нарушений.

2. Предостережения

Метиловый эфир экгонина образуется под действием фермента псевдохолинэстеразы. Нарушения активности псевдохолинэстеразы, вызванные генетическими причинами [108] или преднамеренным одновременным приемом ингибиторов холинэстераз, таких как фосфорорганические пестициды, могут изменить характер экскреции метаболитов.

Этиловый эфир бензоилэкгонина (кокаэтилен), гомолог кокаина, и другие второстепенные продукты трансформации могут быть обнаружены после одновременного приема кокаина и этанола [99, 109].

Употребление напитков, приготовленных из чая, содержащего листья кока ("здоровый чай инков"), может привести к приему кокаина и последующей экскреции с мочой бензоилэкгонина в концентрации до нескольких миллиграммов на литр мочи [110].

Метиловый эфир дегидроэкгонина может быть обнаружен после курения свободного основания кокаина ("крэк") [111].

Е. Анализ и интерпретация содержания кокаина и его метаболитов в других биологических средах

Концентрации кокаина и бензоилэксгоина в плазме крови после терапевтического приема кокаина в норме меньше 0,5 и 0,1 мкг/мл, соответственно. В случаях передозировки уровни в крови, собранной при аутопсии, находятся в диапазоне 1–20 и 1–10 мкг/мл, соответственно [76, 112].

Как отмечалось ранее (раздел IV.В), кокаин и его метаболиты малоустойчивы в отношении гидролиза (как ферментативного, так и неферментативного). Пробы крови и плазмы следует собирать в пробирки, содержащие фторид натрия и при рН, доведенном уксусной кислотой (10%, по объему) до 5. После этого их можно хранить в холодильнике при 4°С или, если возможно, замороженными в течение нескольких месяцев [78, 79, 113].

Установлено, что как волосы, так и пробы слюны лиц, употребляющих кокаин, содержат кокаин [114–118]. Хотя количественная интерпретация концентраций кокаина в волосах еще полностью не разработана, уровни кокаина в слюне, по-видимому, хорошо коррелируют с его концентрацией в плазме.

V. Рекомендуемые методы обнаружения и анализа амфетамина и метамфетамина в биологических пробах

A. Введение

Незаконные амфетамин и метамфетамин в основном производятся методом синтеза в подпольных лабораториях и в значительных, хотя и относительно меньших, количествах поступают в результате переключения или ненадлежащего использования легально производимых материалов. Имеются значительные различия в распространении амфетамина и метамфетамина в разных частях мира: амфетамин более распространен в Европе, в то время как метамфетамин является более часто встречающимся наркотиком в Соединенных Штатах Америки, Японии и Юго-Восточной Азии.

Методы изготовления, химические характеристики и внешний вид незаконных амфетамина и метамфетамина довольно подробно описаны в руководстве Организации Объединенных Наций *Рекомендуемые методы анализа амфетамина и метамфетамина* [119] и не будут здесь воспроизводиться. Однако после публикации руководства появилась чистая форма солянокислого (+)-метамфетамина, которая благодаря своим прозрачным листовидным кристаллам называется "айс" (лед) [120].

1. Способы введения

Амфетамин чаще всего принимают перорально или интраназально (втягивая носом) в виде сульфатной или фосфатной соли в дозах, колеблющихся от 5–15 мг у лиц, употребляющих его эпизодически, до 100–2000 мг в день у лиц, регулярно потребляющих наркотик [121]. Метамфетамин в виде соли соляной кислоты чаще всего готовят для инъекций или для курения ("айс") [120], но он также доступен в форме таблеток.

2. Метаболизм и экскреция

После перорального приема амфетамина в дозах 2,5–15 мг максимальные концентрации в плазме порядка 30–170 мкг/мл достигаются через 2 ч, а период полувыведения из плазмы колеблется от 8 до 12 ч. В случаях с летальным исходом концентрации в крови обычно составляют свыше 500 мкг/мл [106].

Амфетамин и метамфетамин начинают появляться в моче в пределах 20 мин. после приема. Амфетамин экскретируется как в виде неизмененного препарата, обычно 20–30% дозы, так и в виде дезаминированных (гиппуровая кислота и бензойная кислота) и гидроксильированных метаболитов, частично в

виде конъюгатов, что обычно составляет до 25% дозы. Скорость экскреции и доля дозы, выводимой в виде неизмененного препарата, варьируются в зависимости от pH мочи. При щелочной реакции мочи около 45% дозы выводится за 24 ч, 2% дозы – в виде неизмененного препарата, в то время как при кислой реакции мочи до 78% дозы может выводиться за 24 ч, 68% – в виде неизмененного препарата [122]. Поэтому рекомендуемые целевые анализируемые вещества – это неизмененные препараты. Основной и второстепенный пути метаболизма амфетамина схематически представлены на рис. V.1.

Метамфетамин экскретируется как в неизмененном виде (44%), так и в виде его основных метаболитов амфетамина (6–20%) и 4-гидроксиметамфетамина (10%) [123]. Метаболический путь метамфетамина схематически представлен на рис. V.2. Как и в случае с амфетамином, при кислой реакции мочи увеличивается как скорость экскреции, так и доля препарата, экскретирующегося в неизмененном виде.

Вследствие хронического употребления у наркоманов обнаружены в моче концентрации амфетамина порядка 1–90 мкг/мл и метамфетамина порядка 25–300 мкг/мл [124].

Рис. V.1 Метаболический путь амфетамина

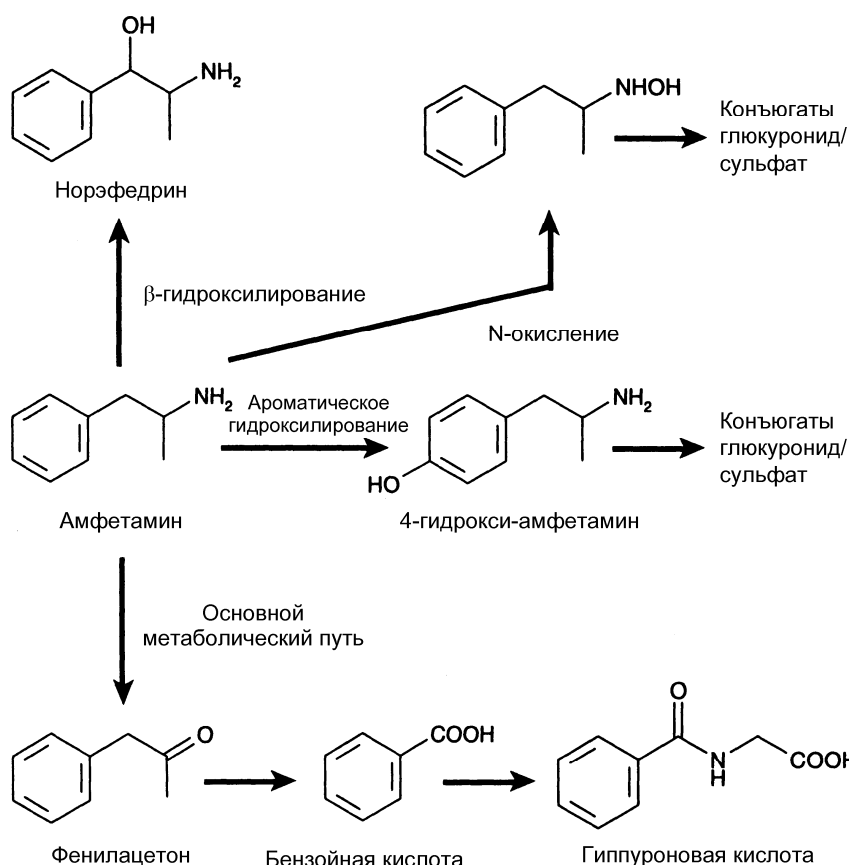
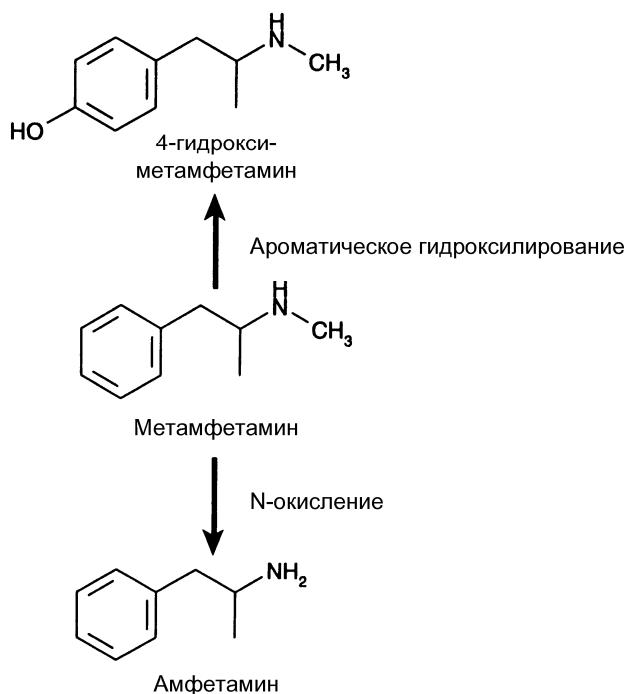


Рис. V.2 Метаболический путь метамфетамина



В. Методы отбора и подготовки проб для анализа амфетамина и метамфетамина и их метаболитов

Общие методы отбора проб и меры предосторожности, изложенные в разделах I.C и G.5, применимы к пробам, используемым для анализа амфетамина и метамфетамина.

Меры предосторожности

При концентрировании с помощью упаривания экстрактов, содержащих амфетамин и метамфетамин, должны быть приняты меры предосторожности, так как свободные основания могут быть утеряны в процессе выпаривания растворителя. Такие потери можно исключить путем добавления к экстракту растворенной в метаноле соляной кислоты [метанол : концентрированная соляная кислота (9:1, по объему; 50 мкл)] для получения соответствующих солянокислых солей наркотиков до того, как растворитель будет выпарен.

1. Подготовка проб для иммунологического анализа

Обычно для проведения первоначальных иммунологических анализов требуется минимальная подготовка проб. Подвергать пробы мочи гидролизу нет необходимости, поскольку при иммунологическом анализе определяются

как свободные, так и конъюгированные формы наркотика и/или метаболита. Могут потребоваться доведение рН или центрифугирование мочи для удаления мутности. Для получения оптимальных результатов следует соблюдать инструкции изготовителя.

2. Подготовка проб для хроматографии

а) Гидролиз

Гидролиз не требуется.

б) Экстракция

Жидкостно-жидкостная

Амфетамин и метамфетамин экстрагируются из мочи при щелочном рН, когда аминогруппа находится в незаряженном состоянии. Величины pK_a этих двух наркотиков составляют 9,9 и 10,1, соответственно, и для оптимального их выхода рН мочи следует довести до 11. Можно использовать следующую процедуру [125]:

Мочу (2 мл) внести пипеткой в 50 мл колбу с коническим дном, и к ней добавить раствор внутреннего стандарта (раствор 2-метил-фенилэтиламина; 8 мкг/мл; 0,25 мл), раствор гидроксида натрия (1 М; 2 мл), воду (5 мл) и дихлорметан (20 мл). Колбу закрыть, встряхнуть, отцентрифугировать на малой скорости в течение 5 мин. и отбросить верхний слой.

Если требуется дальнейшая очистка экстракта, можно использовать дополнительную стадию очистки, которая основана на обратной экстракции в кислоту.

К экстракту добавить серную кислоту (0,15 М; 2 мл), колбу закрыть, встряхнуть и отцентрифугировать, как описано выше. Верхнюю водную фазу перенести в 15 мл круглодонную колбу, в которую добавлены раствор гидроксида натрия (1 М; 1 мл) и 1-хлорбутан или дихлорметан (2,5 мл). Колбу закрыть, энергично встряхнуть, используя прибор для встряхивания "Vortex", и отцентрифугировать. Органический растворитель перенести в чистую колбу. Добавить раствор соляной кислоты в метаноле (9:1, по объему; 50 мкл) и выпарить экстракт досуха.

Твердофазная

Преимущества метода данного типа состоят в экономии времени, сокращении объемов требуемых реактивов и избегании связанных с образованием эмульсии проблем, которые иногда возникают во время жидкостно-жидкостной экстракции. Эти преимущества сводятся на нет стоимостью используемых картриджей.

Применяемые картриджи содержат диатомовую землю или кремнезем, замещенные неполярными группами (октадецилкремнезем) [126], катионообменными группами или смесью неполярных и ионообменных заместителей [127]. Необходимо следовать инструкциям изготовителя используемых картриджей.

Типична нижеследующая процедура:

Картриджи с сильным катионообменником (бензолсульфонилпропил кремнезем, емкость 1 мл) кондиционируют метанолом (2 мл), водой (1 мл) и фосфорной кислотой (10 мМ; 0,5 мл) под вакуумом на вакуумной установке. Мочу (1 мл) и фосфорную кислоту (10 мМ; 0,5 мл) тщательно смешивают в подходящем сосуде и наносят на картридж. Картридж высушивают на воздухе в течение примерно 30 с и затем промывают фосфорной кислотой (10 мМ; 1 мл), уксусной кислотой (0,1 М; 0,5 мл) и метанолом (1 мл). Колонку снова высушивают на воздухе в течение примерно 30 с, и анализируемые вещества элюируются раствором аммиака в метаноле (3%, по объему; 2 мл). Экстракт выпаривают досуха под вакуумом или под током азота с учетом мер предосторожности, указанных в разделе V.B.2.b.

c) Внутренние стандарты

При выборе подходящего внутреннего стандарта по возможности необходимо соблюдать общие критерии, представленные в разделе I.G.6. В качестве внутренних стандартов для анализа амфетаминов в моче методами ГХ или ВЭЖХ предлагается использовать фентермин, пропиламфетамин и другие аналоги амфетамина. Для ГХ–МС предпочтительными внутренними стандартами являются меченные дейтерием аналоги амфетамина и метамфетамина, но если они недоступны, следует использовать один из перечисленных выше стандартов для ГХ.

d) Стандарты для калибровки

Приготовьте отдельные исходные растворы в метаноле, содержащие 1 мг/мл амфетамина, метамфетамина и внутреннего стандарта. Из этих исходных растворов приготовьте стандарты мочи, содержащие амфетамин и метамфетамин в диапазоне концентраций 0–5 мкг/мл, и внутренний стандарт в концентрации 5 мкг/мл. Комплект калибровочных стандартов мочи следует обрабатывать одновременно с исследуемыми пробами.

C. Методы скрининга

1. Методы иммунологического анализа

Как отмечено в разделе I.G.1, методики иммунологического анализа могут использоваться для целей скрининга, а положительные результаты должны подтверждаться другим, более специфичным методом. Это особенно важно при анализе амфетамина и метамфетамина, поскольку существует большое число амфетаминоподобных лекарств, ряд которых может давать перекрестную реакцию с антителами к амфетамину и метамфетамину (см. также раздел VI.C.1). Имеющиеся в продаже наборы для иммунологического анализа амфетамина и метамфетамина обеспечивают проведение иммуоферментного анализа, флуоресцентного поляризационного иммунологического анализа, ингибирования агглютинации латекса и радиоиммунного анализа. Специфичность данных иммунологических анализов широко варьируется в зависимости

от конкретного используемого антитела. Некоторые характеристики имеющихся наборов для иммунологического анализа приведены в таблице V.1.

Таблица V.1 Перекрестная реактивность имеющихся в продаже наборов для иммунологического анализа амфетамина (А) и метамфетамина (МА)

Анализ	Перекрестная реактивность (%)				
	<i>d</i> -А	<i>l</i> -А	<i>d, l</i> -А	<i>d</i> -МА	<i>l</i> -МА
ЕМИТ-d.a.u. моноклональный	100 (300) ^{a, b}	10 (2 900)	60 (500)	100 (1 000)	14 (7 000)
FRIA-TDx амфетамин	91 (1 000) ^{c, d}	61 (1 000)	100 (1 000)	123 (1 000)	115 (1 000)
FRIA-TDx амфетамин/ метамфетамин II	100 (1 000) ^{c, d}	57 (1 000)	165 (1 000)	98 (1 000)	7 (1 000)
Abuscreen-Online	100 (1 000) ^{a, b}	–	66 (1 517)	0,5 (219 298)	–

^a Перекрестная реактивность рассчитана путем деления концентрации определяемого соединения (300 или 1000 нг/мл) на концентрацию, эквивалентную 300 или 1000 нг/мл *d*-амфетамина или 1000 нг/мл *d*-метамфетамина, и умножения на 100 (в скобках – эквиваленты, нг/мл).

^b Данные изготовителя.

^c Перекрестная реактивность рассчитана путем деления выявляемой (измеренной) концентрации на фактическую концентрацию и умножения на 100 (в скобках приведена концентрация, при которой определялась перекрестная реактивность, нг/мл).

^d J.T. Cody [128].

2. Тонкослойная хроматография

Стандартная методика ТСХ

Общие замечания относительно применения тонкослойной хроматографии в качестве метода скрининга приведены в разделе I.G.2. Подробное описание стандартных материалов и методик ТСХ приведено в [10], и изложенные ниже применимы при анализе биологических экстрактов.

Пластинки для ТСХ

Покрывтие: Активированный силикагель G, содержащий добавку, флуоресцирующую под действием УФ-излучения с длиной волны 254 нм
Толщина слоя: 0,25 мм
Размер пластинок: 20 x 20 см, 20 x 10 см или 10 x 5 см; оптимальная длина пробега приблизительно 10 см

Стандартные растворы

Амфетамин
Метамфетамин

Приготовить все стандартные растворы в концентрации 5 мг/мл в метаноле и наносить 1 мкл каждого раствора на пластинку.

Методика

Экстракты мочи выпаривают досуха в пробирке, соблюдая меры предосторожности, приведенные в разделе V.B.2.b, и перерастворяют в метаноле (50 мкл). Весь экстракт наносится на пластинку в виде пятна с помощью стеклянного капилляра.

Растворители для разделения [129]

Система А:	Метанол	100
	Концентрированный раствор аммиака	1,5
Система В:	Этилацетат	85
	Метанол	10
	Концентрированный раствор аммиака	5

Визуализация

До визуализации пластинки должны быть высушены. Высушивание может производиться при комнатной температуре, в термостате при 120°C в течение 10 мин. или более быстро при использовании нагнетательного вентилятора горячего воздуха. Для правильного развития окраски важно удалить с пластинки все следы аммиака. Для визуализации рекомендуются следующие методы:

Реактив Fast Black К ("прочный черный К") [130–132].

Раствор А: 1% соли Fast Black К ("прочный черный К") в воде.

Раствор В: 1 М гидроксида натрия.

Опрыскать пластинки раствором А и наблюдать появление каких-либо окрашенных пятен. Вторичные амины, такие как метамфетамин, дают окрашивание сразу. Дополнительное опрыскивание раствором В дает окрашивание пятен амфетамина (и любого другого замещенного амфетамина). Высушить пластинки на воздухе и еще раз опрыскать раствором А. Это дает более интенсивно окрашенные пятна. Цвета варьируются от фиолетового у первичных аминов до почти розового у вторичных аминов, таких как метамфетамин. Пределы обнаружения амфетамина и метамфетамина составляют 0,1 и 0,05 мкг, соответственно [130].

Нингидриновый реактив.

Приготовить 10% раствор в этаноле.

Опрыскать нингидриновым реактивом и нагревать в термостате при 120°C в течение по крайней мере 15 мин. Первичные амины, такие как амфетамин, дают фиолетовые или розовые пятна, пятна вторичных аминов, таких как метамфетамин, имеют большую интенсивность.

Флуорескаминовый реактив (Floram).

Приготовить раствор 10 мг флуорескамина в 50 мл ацетона.

Опрыскать флуорескаминовым реактивом. Высушить пластинку с помощью нагнетательного вентилятора горячего воздуха. Подвергнуть пластинку действию ультрафиолетового излучения с длиной волны 365 нм. Амфетамин дает ярко-желтое флуоресцентное пятно. Предел обнаруже-

ния амфетамина и других первичных аминов составляет около 10 нг. Метамфетамин не обнаруживается.

Реактив Симона.

Раствор А: 20% водный раствор карбоната натрия.

Раствор В: 1% водный раствор нитропруссид натрия.

Опрыскать пластинку раствором А, затем раствором В. Поместить пластинку в пустой бачок для проявления вместе с химическим стаканом, содержащим ацетальдегид. Закрыть бачок. Пары ацетальдегида будут вызывать интенсивное окрашивание пятен метамфетамина в синий цвет. Предел обнаружения метамфетамина в моче составляет около 0,1 мкг/мл. Амфетамин и другие первичные амины дают пятна от бледно-розового до красного цвета, и их реакция менее интенсивна.

Результаты

Таблица V.2 R_f x 100 значений

Соединение	Система для разделения	
	А	В
Амфетамин	44	66
Метамфетамин	33	63

3. Цветной тест

Сообщалось о чувствительном и специфичном скрининг-тесте на содержание метамфетамина в моче [133].

Приготовление адсорбционных картриджей

Октадецилсилилкремнезем (ODS-silica; 0,13 г) упаковывается в полиэтиленовую трубку [35 мм x 4 мм (внутренний диаметр)] с оттянутым тонким концом (внутренний диаметр приблизительно 2 мм) всасыванием с помощью аспиратора.

Приготовление модифицированного реактива Симона

Ацетальдегид (25 мл), содержащий 1,5% уксусную кислоту, смешать с метанолом (25 мл) и хранить в холодильнике. Перед использованием один объем ацетальдегидного раствора смешать с 1 объемом 1% водного раствора нитропруссид натрия.

Методика

Каждый адсорбционный картридж предварительно активируется пропусканием через него смеси метанола с 0,1 М соляной кислотой (9:1, по объему; 2 мл) и затем дистиллированной воды (3 мл). Аликвота пробы мочи (5 мл) смешивается с буфером (0,5 М, рН 8,0; 2,5 мл), и раствор медленно пропускается через адсорбционный картридж с помощью одноразового шприца. Картридж промывают водным раствором ацетона

(20%, по объему; 4 мл), и затем через адсорбент пропускают модифицированный реактив Симона (0,4 мл). Элюат собирают в виде четырех фракций по три капли, и к каждой фракции добавляют по одной капле раствора карбоната натрия (1%, м/о). На присутствие метамфетамина указывает развитие синей окраски, преимущественно в третьей фракции, а также и во второй и четвертой фракциях, если концентрация метамфетамина в моче высока. Если метамфетамин отсутствует, получается бледно-оранжевая окраска. Предел обнаружения в моче составляет 1 мкг/мл метамфетамина, и весь тест может быть проведен за 3 мин.

Д. Подтверждающие (контрольные) хроматографические методы

1. Газовая хроматография

а) Получение производных веществ пробы

Гептафтормасляный ангидрид (ГФМА) [134]:

ГФМА (50 мкл) добавить к сухому остатку. Пробирку закрыть, встряхнуть на приборе для встряхивания "Vortex" и инкубировать при 75°C в течение 20 мин. Пробирку открыть и высушить на воздухе или под током азота при 30°C. Содержимое растворить в 50 мкл этилацетата и 1–2 мкл инжектировать в колонку для ГХ.

Альтернативная методика [135]:

К сухому остатку добавить гидроксид калия (0,5 М; 50 мкл) и затем 500 мкл толуола. После перемешивания и центрифугирования органический слой перенести в чистую пробирку и добавить 5 мкл ГФМА. Раствор тщательно перемешать и немедленно добавить бикарбонат натрия (10%, м/о; 500 мкл) при непрерывном перемешивании. Пробирку отцентрифугировать и 1 мкл слоя толуола (верхнего) инжектировать в колонку для ГХ.

Трифторуксусный ангидрид (ТФУА) [125, 136]:

К сухому остатку добавить этилацетат (100 мкл) и ТФУА (50 мкл). Пробирку встряхнуть и инкубировать при 60°C в течение 20 мин. Смесь аккуратно упарить до конечного объема 50 мкл под мягким током воздуха или азота при комнатной температуре и 1–2 мкл инжектировать в колонку для ГХ.

N-метил-N-tert-бутилдиметилсилилтрифторацетамид (МТБСТФА) [137]:

100 мкл ацетонитрила и 150 мкл МТБСТФА добавить к сухому остатку. Сосуд закрыть и прогреть в течение 15 мин. при 90°C, а затем выдержать 2 ч или более при комнатной температуре. Добавить 500 мкл ацетонитрила, содержимое перемешать и использовать для ГХ или ГХ–МС.

b) Метод без приготовления производных

Рабочие условия

Детектор:	ПИД, АФД
Колонки:	Стекланные насадочные колонки [2 м x 3–4 мм (внутренний диаметр)] с диметилсиликоновой (например, OV-1, SE-30) или метилфенилсиликоновой (например, OV-17) жидкими стационарными фазами
Газ-носитель:	Азот, 30 мл/мин.
Капиллярные колонки из кварцевого стекла с химически связанными неполярными стационарными фазами (например, SE-54) можно использовать в качестве альтернативы описанным выше насадочным колонкам. В качестве газа-носителя используется гелий со скоростью потока 1 мл/мин.	
Рабочие температуры:	Инжектор: 250–280°C
	Термостат: 90–280°C (программируется в зависимости от используемой колонки)
	Детектор: 280–300°C

c) Метод с приготовлением производных

Рабочие условия

Детектор:	ПИД, АФД, ЭХО или масс-спектрометр с ионизацией электронным ударом, функционирующий в режиме мониторинга выбранного иона (МВИ)
Колонки и температуры:	См. метод без приготовления производных, выше.

Результаты

Таблица V.3 Данные об удержании амфетамина, метамфетамина и их производных

Соединение	Колонка		
	SE-30 Немодифицированное ^a	3% OV-17 Модифицированное ТФА ^a	SE-54 Модифицированное ГФМА ^b
Амфетамин	1 129	1 536	2,74
Метамфетамин	1 176	1 722	3,61

^a Индексы удержания.

^b Время удержания (мин.) на капиллярной колонке SE-54, 25 м x 0,3 мм (внутренний диаметр), толщина пленки 0,17 мкм, температура программируется от 120°C (1 мин.) до 280°C со скоростью 10°C/мин.

2. Газовая хроматография – масс-спектрометрия [125, 134, 136, 137]

Если в качестве детектора используется масс-спектрометр, то при ионизации ЭУ⁺, проводимой в режиме мониторинга выбранного иона (МВИ), основные ионы (m/z) в спектрах соответствуют приведенным в таблице V.4.

Таблица V.4 Основные ионы в масс-спектрах амфетамина, метамфетамина и их производных

Соединение	Основные осколочные ионы (m/z)			
	Немодифицированное	Немодифицированное ТФМА ^a	Модифицированное ТФА ^a	Модифицированное ТБДМС ^b
Амфетамин	44, 65, 91	91, 118, 240	91, 118, 140	73, 100, 158, 192
Метамфетамин	58, 91, 134	91, 118, 254	110, 118, 154	73, 172, 173, 206

3. Высокоэффективная жидкостная хроматография

Ниже представлены два метода для анализа амфетамина и метамфетамина в моче с помощью ВЭЖХ [138–141].

а) Метод без приготовления производных [138]

Подготовка проб

Экстракция проб производится так, как описано ранее (раздел V.B), с использованием фентермина в качестве внутреннего стандарта. Экстракты выпаривают досуха под током азота с учетом мер предосторожности, указанных в разделе V.B.2, и затем вновь растворяют в 50–100 мкл ацетонитрила или подвижной фазы.

Стандартные растворы

Стандартные растворы готовят растворением контрольного материала в ацетонитриле до концентрации 0,01 мг/мл.

Рабочие условия

Колонка:	Октадецилсиликоновая (Spherisorb ODS-1 или эквивалентный), 3 или 5 мкм, 12,5 см x 4,0 мм (внутренний диаметр) + предколонка
Подвижная фаза:	Ацетонитрил–вода (57:943, по объему) + фосфорная кислота (8,5 г/л) + гексиламин (0,28 мл/л). В зависимости от типа используемой колонки величины k' можно оптимизировать изменением соотношения ацетонитрил–вода

Скорость:	0,8 мл/мин.
Детектор:	УФ-излучение с длиной волны 190 нм
Инжектируемый объем:	10 мкл
Количественное определение:	По площади пиков, используя метод внутреннего стандарта

Результаты

Время удержания по отношению к фентермину (внутренний стандарт):

Амфетамин	0,64
Метамфетамин	0,93
Фентермин	1,00 (8,1 мин.)

b) Метод с приготовлением производных [141]

Подготовка проб

Экстракцию проб проводят так, как описано ранее (раздел V.B), используя фентермин в качестве внутреннего стандарта. Стандартные растворы готовят, растворяя контрольный материал в чистой моче до концентрации 5 мкг/мл, и обрабатывают так же, как и исследуемые пробы мочи. Экстракты выпаривают досуха под током азота с учетом мер предосторожности, указанных в разделе V.B.2, затем вновь растворяют в растворе бикарбоната натрия (2%, м/о; 200 мкл) и добавляют равный объем β -нафтохинон-4-сульфоната натрия. После нагревания в термостате при 60°C в течение 30 мин. водный раствор экстрагируют смесью гексан-диэтиловый эфир (2:1, по объему), используя прибор для встряхивания "Vortex", в течение 1 мин. Органический слой переносят в чистую колбу и выпаривают досуха под током азота. Остаток растворяют в ацетонитриле (100 мкл).

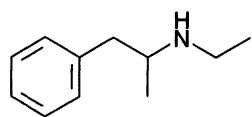
Рабочие условия

Колонка:	Октадецилсиликоновая (μ -Bondapak C-18 или эквивалентный), 3 или 5 мкм, 15 см x 3,9 мм (внутренний диаметр)
Подвижная фаза:	Ацетонитрил-метанол-0,01 М серная кислота (20:20:60, по объему)
Скорость:	0,8 мл/мин.
Температура:	40°C
Детектор:	УФ-излучение с длиной волны 248 нм или электрохимический детектор при 0,0 В относительно Ag/AgCl
Инжектируемый объем:	5–10 мкл
Количественное определение:	По площади пиков, используя метод внутреннего стандарта

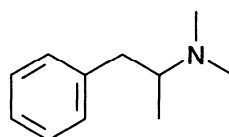
Рис. V.4 Лекарства, метаболизируемые в амфетамин или метамфетамин

Амфетамин как метаболит

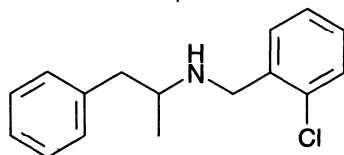
Метамфетамин как метаболит



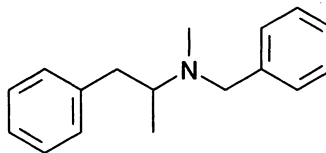
Этиламфетамин



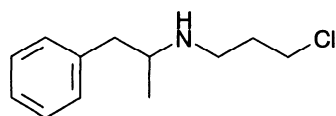
Диметиламфетамин



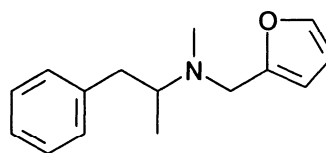
Клобензорекс



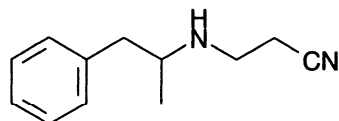
Бензфетамин



Мефенорекс



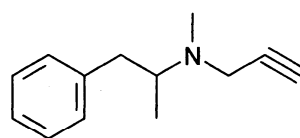
Фурфенорекс



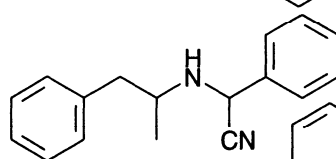
Фенпропорекс



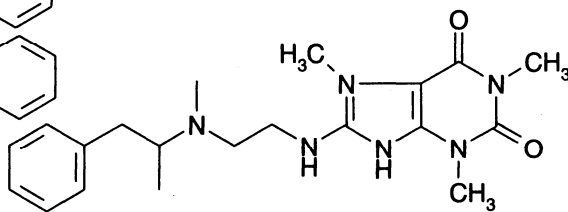
Прениламин



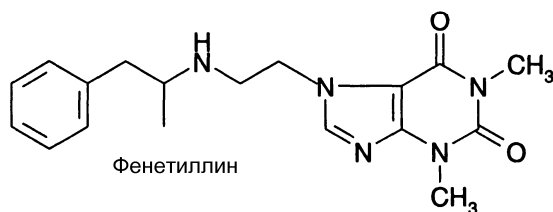
Селегилин



Амфетаминил



Фенкамин



Фенетиплин

Результаты

Время удержания по отношению к фентермину (внутренний стандарт):

Амфетамин	0,57
Метамфетамин	0,70
Фентермин	1,00 (25,12 мин.)

Е. Интерпретация результатов

В моче амфетамин обнаруживался в неизменном виде спустя 29 ч после однократного приема дозы 5 мг амфетамина перорально. Неизмененный метамфетамин также обнаруживался до 23 ч после однократного приема перорально. Положительный результат анализа на амфетамин обычно означает употребление амфетамина или метамфетамина в течение предшествующих 24–48 ч.

Следует учитывать три дополнительных обстоятельства. Во-первых, некоторые непатентованные лекарственные препараты, применяемые в качестве противозастойных (противоотечных) и снижающих аппетит средств, содержат эфедрин и фенилпропаноламин, которые могут давать положительные результаты как при ИФА, так и при радиоиммунном анализе, если присутствуют в моче в значительной концентрации. Во-вторых, некоторые из выдаваемых по рецепту лекарств, такие как бензфетамин, фенфлурамин, мефентермин, фенметразин и фентермин, также могут давать положительные результаты при иммунологическом анализе. Наконец, амфетамин и метамфетамин в моче могут быть метаболитами некоторых лекарств (рис. V.4). Таким образом, наиболее важно в случае наличия сомнений относительно происхождения амфетамина или метамфетамина, обнаруженного в пробе мочи, повторно исследовать мочу на присутствие лекарств-предшественников.

VI. Рекомендуемые методы обнаружения и анализа замещенных по циклу производных амфетамина в биологических пробах

А. Введение

Незаконные замещенные по циклу производные амфетамина вообще встречаются менее часто, чем амфетамин и метамфетамин, и отличаются от них также по своей химии, фармакологии и методам анализа. В данном руководстве будут рассмотрены следующие вещества:

3,4-метилendioксиамфетамин	МДА
3,4-метилendioксиметамфетамин	МДМА, "экстази"
3,4-метилendioксиэтиламфетамин	МДЭ, МДЭА
5-метокси-3,4-метилendioксиамфетамин	ММДА
4-метоксиамфетамин	ПМА
4-метоксиметамфетамин	ПММА
2,5-диметоксиамфетамин	ДМА
2,5-диметокси-4-метиламфетамин	ДОМ, СТП
2,5-диметокси-4-этиламфетамин	ДОЭТ
3,4,5-триметоксиамфетамин	ТМА
4-бром-2,5-диметоксиамфетамин	ДОБ, бромо-СТП

Были синтезированы многие другие аналоги амфетамина и метамфетамина, и некоторые из них незаконно распространялись в ограниченном масштабе в различных местностях, например 3,4-метилendioксиэтиламфетамин и *N,N*-диметиламфетамин. За исключением ПММА, все они также содержатся в Перечне веществ, включенных в Списки Конвенции о психотропных веществах 1971 года. Основная информация, касающаяся истории, физических свойств и химии этих производных, приведена в руководстве Организации Объединенных Наций *Рекомендуемые методы анализа незаконных замещенных по циклу производных амфетамина* [129] и здесь не воспроизводится. Дополнительная информация об их фармакологии и токсикологии содержится в недавних обзорах литературы [142–144].

1. Способы введения

Практически все эти незаконные вещества содержат наркотик в форме гидрохлорида и поставляются в виде белого или почти белого порошка, табле-

ток или капсул и в случае с ДОБ – в виде пропитанной бумаги (промокашки) для перорального потребления. Однако они также могут вводиться внутривенно или ингаляцией путем курения, как, например, "айс" (см. раздел V.A.2). Обычная доза МДА и МДМА находится в диапазоне от 80 до 125 мг. ДОМ и ДОБ чаще всего принимают перорально дозами от 15 до 25 мг.

2. Метаболизм и экстракция

Большинство производных амфетамина быстро адсорбируются из желудочно-кишечного тракта и легко преодолевают гематоэнцефалический барьер. Столь же быстрым является проявление психотропного действия этих наркотиков.

Метаболизм замещенных по циклу амфетаминов организмом человека широко не изучался. Однако можно сделать некоторые обобщения, используя доступную информацию по человеческому метаболизму и результаты метаболических исследований на лабораторных животных [144–153]. Значительная часть дозы всех препаратов выводится в неизменном виде с мочой. Таким образом, исходные соединения являются целевыми анализируемыми веществами при обнаружении употребления этих наркотиков путем анализа мочи.

Известная информация о метаболизме этих веществ сведена в таблицу VI.1.

Столь же мало известно о периодах полураспада этих производных в плазме и их выделении с мочой. Однако опубликованные исследования ДОМ и ДОЭТ показывают, что до 20% первого вещества и 10–40% последнего выделяются с мочой в неизменном виде в течение первых 24 ч. Для обоих наркотиков пик экскреции с мочой приходится на 3–6-й часы [150, 151].

В контролируемом медицинском исследовании при дозе 1,5 мг МДМА/кг веса тела максимальные уровни его в плазме, составлявшие около 0,33 мкг/мл, наблюдались спустя 2 ч при времени полураспада в плазме 8 ч. В плазме можно было обнаружить также малые количества МДА, *N*-диметилового метаболита МДМА. Средние уровни МДМА в моче составляли около 1,4, 14 и 23 мкг/мл спустя 1,5, 10 и 22 ч, соответственно. Основными метаболитами, присутствовавшими в моче, были 4-гидрокси-3-метоксиметамфетамин и 3,4-дигидроксиметамфетамин, причем оба выделялись в виде глюкуронидов [153].

Таблица VI.1 Метаболизм замещенных по циклу производных амфетамина

Вещество	Вид	Целевое вещество	Другие метаболиты	Ссылки
МДА	Крыса	МДА	4-гидрокси-3-метоксиамфетамин	145
МДМА	Человек	МДМА	4-гидрокси-3-метоксиметамфетамин 3,4-дигидроксиметамфетамин (конъюг.) 3,4-метилендиоксиамфетамин	146, 153 153 153
ПМА	Человек	ПМА	4-гидроксиамфетамин	147
ДОМ	Человек	ДОМ	4-карбокиси-2,5-диметоксиамфетамин	148–150
ДОЭТ	Человек	ДОЭТ		151
ДОБ	Человек	ДОБ		152

В. Методы отбора и подготовки проб для анализа замещенных по циклу производных амфетамина

Общие процедуры и меры предосторожности, изложенные в разделах I.C и G.5, применимы к пробам, используемым для анализа замещенных по циклу производных амфетамина.

Меры предосторожности

При концентрировании с помощью упаривания экстрактов, содержащих замещенные по циклу производные амфетамина, должны быть приняты меры предосторожности, так как свободные основания могут быть утеряны в процессе выпаривания растворителя. Такие потери можно исключить путем добавления к экстракту растворенной в метаноле соляной кислоты [метанол-концентрированная соляная кислота (9:1, по объему; 50 мкл)] для получения соответствующих солянокислых солей наркотиков до того, как растворитель будет выпарен.

1. Подготовка проб для иммунологического анализа

Обычно для проведения первоначальных иммунологических анализов требуется минимальная подготовка проб. Подвергать пробы мочи гидролизу нет необходимости, поскольку при иммунологическом анализе определяются как свободные, так и конъюгированные формы наркотиков и/или метаболитов. Могут потребоваться доведение pH или центрифугирование мочи для удаления мутности. Для получения оптимальных результатов следует соблюдать инструкции изготовителя.

2. Подготовка проб для хроматографии

а) Гидролиз

Для замещенных по циклу амфетаминов обычно нет необходимости производить гидролиз, за исключением случая, когда необходимо провести анализ моно- или дигидроксилированных метаболитов (например, МДМА) в низкой концентрации [153].

б) Экстракция

Целевыми анализируемыми веществами являются неизменные замещенные по циклу производные амфетамина, которые экстрагируют из мочи, используя процедуры, подобные тем, что описаны для амфетамина и метамфетамина (раздел V.B). Заметим, что некоторые метаболиты веществ данной группы могут содержать как кислые (карбоксильные и фенольные), так и основные (амино) группы. Если необходимо анализировать эти метаболиты, следует тщательно выбирать условия экстракции, особенно pH.

Было предложено несколько методик твердофазной экстракции МДМА, использующих смешанные [154] или ионообменные сорбенты [138, 153]. Рекомендуются следующий метод ТФЭ.

Мочу (2 мл) и внутренний стандарт (0,25 мл раствора выбранного внутреннего стандарта с концентрацией 8 мкг/мл) смешать с фосфатным буфером (0,1 М, рН 6; 2 мл) [154]. В случае необходимости довести рН до 5–7 гидроксидом натрия (0,1 М) или соляной кислотой (0,1 М). Картриджи для твердофазной экстракции (емкостью 5 мл, наполненные модифицированным кремнеземом, содержащим смесь неполярных и катионообменных групп, например Bond Elut Certify®) кондиционировать метанолом (2 мл) и фосфатным буфером (0,1 М, рН 6; 2 мл). Пробы мочи медленно пропускать через картриджи в течение по крайней мере 2 мин. Картриджи промыть уксусной кислотой (1 М; 1 мл) и затем высушить пропуская через них воздух под вакуумом в течение 5 мин. Картриджи снова промыть метанолом (6 мл) и затем снова высушить в течение 2 мин. Анализируемые вещества элюировать этилацетатом, содержащим 2% концентрированного водного аммиака (свежеприготовленный, 2 мл). Элюат тщательно упарить под током азота при температуре ниже 40°C. Отметим, что добавление раствора соляной кислоты в метаноле к этим экстрактам для исключения потери анализируемого вещества с парами (см. раздел VI.B, выше) нецелесообразно, так как оно вызовет выпадение осадка хлорида аммония. Данный экстракт при необходимости может быть очищен, в зависимости от метода последующего анализа, распределением остатка между водным раствором гидроксида натрия (1 М; 1 мл) и хлорбутаном (2,5 мл). Верхний органический слой перенести в чистую стеклянную колбу и тщательно выпарить досуха. В данном случае можно добавить раствор соляной кислоты в метаноле перед выпариванием растворителя.

с) Внутренние стандарты

При выборе подходящего внутреннего стандарта по возможности необходимо соблюдать общие критерии, представленные в разделе I.G. В качестве внутренних стандартов для анализа замещенных по циклу амфетаминов в моче методами ГХ и ВЭЖХ предлагается использовать фентермин, пропиламфетамин, метилendiоксипропиламфетамин и другие аналоги амфетамина. Для ГХ–МС предпочтительными внутренними стандартами являются меченные дейтерием аналоги целевых анализируемых веществ, но если они недоступны, следует использовать один из перечисленных выше стандартов для ГХ.

d) Стандарты для калибровки

Приготовьте исходный раствор каждого целевого анализируемого вещества и внутреннего стандарта в метаноле с концентрацией 1 мг/мл. Из этих исходных растворов приготовьте стандарты мочи, содержащие целевые вещества в диапазоне концентраций 0–5 мкг/мл и внутренний стандарт в концентрации 5 мкг/мл. Комплект калибровочных стандартов мочи следует обрабатывать одновременно с исследуемыми пробами.

С. Методы скрининга

1. Методы иммунологического анализа

Общие замечания относительно выбора и применения иммунологических анализов приведены в разделе I.G.1. Большинство иммунологических анализов амфетаминоподобных наркотиков предназначено для обнаружения амфетамина и/или метамфетамина. Однако некоторые из иммунологических анализов

проявляют значительную перекрестную реактивность с веществами, входящими в группу замещенных по циклу производных амфетамина. Поскольку иммунологические анализы не специфичны, положительные результаты всегда необходимо подтверждать другим, более специфичным методом.

Критические уровни концентрации и пределы обнаружения для замещенных по циклу амфетаминов не установлены. Однако были сообщены некоторые данные о перекрестной реактивности, которые можно сравнить с перекрестной реактивностью и критическими уровнями концентрации для амфетамина и метамфетамина в целях оценки критических уровней замещенных по циклу производных (см. таблицу VI.2).

Таблица VI.2 Перекрестная реактивность имеющихся в продаже иммунологических анализов замещенных по циклу производных амфетамина

Анализ	Перекрестная реактивность (%)						
	МДА	МДМА	МДЭ	ДМА	ТМА	ДОБ	ДОМ
ЕМГТ-d.a.u. моноклональная	147 (1 000) ^{a,b}	74 (1 000)	–	–	–	–	–
FRIA-TDx амфетамин	15 (1 000) ^{c,d}	25 (1 000)	32 (1 000)	0,6 (5 000)	0,4 (5 000)	0,5 (5 000)	0,6 (5 000)
FRIA-TDx амфетамин/ метамфетамин II	148 (1 000) ^{c,d}	97 (1 000)	43 (1 000)	7 (5 000)	3 (5 000)	5 (5 000)	4 (5 000)
Abuscreen-Online	41 (1 000) ^{a,b}	0,2 (1 000)	66 (1 517)	0,5 (219 298)	–	–	–

^a Перекрестная реактивность рассчитана путем деления концентрации определяемого соединения (1000 нг/мл) на концентрацию, эквивалентную 1000 нг/мл *d*-амфетамина, и умножения на 100 (в скобках – эквиваленты, нг/мл).

^b Данные изготовителя.

^c Перекрестная реактивность рассчитана путем деления выявляемой (измеренной) концентрации на фактическую концентрацию и умножения на 100 (в скобках – концентрация, при которой определялась перекрестная реактивность, нг/мл).

^d См. J.T. Cody [128].

2. Тонкослойная хроматография

Стандартная методика ТСХ

Общие замечания относительно применения тонкослойной хроматографии в качестве метода скрининга приведены в разделе I.G.2. Подробное описание стандартных материалов и методик ТСХ приведено в [10], и изложенные ниже применимы при анализе биологических экстрактов.

Пластинки для ТСХ

Покрытие:	Активированный силикагель G, содержащий добавку, флуоресцирующую под действием УФ-излучения с длиной волны 254 нм
Толщина слоя:	0,25 мм
Размер пластинок:	Стеклопластиковые пластинки 20 x 20 см, 20 x 10 см или 10 x 5 см; оптимальная длина пробега приблизительно 10 см

Стандартные растворы

Приготовить все стандартные растворы в концентрации 1 мг/мл в метаноле и наносить 5 мкл каждого раствора на пластинку.

Методика

Экстракты мочи выпаривают досуха в пробирке, соблюдая меры предосторожности, приведенные в разделе VI.B, и перерастворяют в метаноле (50 мкл). Весь экстракт наносится на пластинку в виде пятна с помощью стеклянного капилляра.

Растворители для разделения [129]

Система А:	Метанол	100
	Концентрированный раствор аммиака	1,5
Система В:	Этилацетат	85
	Метанол	10
	Концентрированный раствор аммиака	5

Визуализация

До визуализации пластинки должны быть высушены. Высушивание может производиться при комнатной температуре, в термостате при 120°C в течение 10 мин. или более быстро, при использовании нагнетательного вентилятора горячего воздуха. Для правильного развития окраски важно удалить с пластинки все следы аммиака.

Реактив Fast Black К ("прочный черный К") [129-132]. (Приготовление см. раздел V.C.2)

Нингидриновый реактив. (Приготовление см. раздел V.C.2)

Флуорескаминовый реактив (Floram). (Приготовление см. раздел V.C.2)

Для обнаружения низких концентраций первичных аминов рекомендуется применение флуорескаминового реактива (Floram) (см. раздел V.C.2).

Результаты

Таблица VI.3 R_f x 100 значений

Соединение	Система для разделения	
	А	В
МДА	41	62
МДМА	31	62
ПМА	41	62
ДМА	37	65
ДОМ	35	63
ДОЭТ	36	61
ДОБ	37	62

Д. Подтверждающие (контрольные) хроматографические методы

1. Газовая хроматография

а) Получение производных веществ пробы

Гептафтормасляный ангидрид (ГФМА) [134]

ГФМА (50 мкл) добавить к сухому остатку. Пробирку закрыть, встряхнуть на приборе для встряхивания "Vortex" и инкубировать при 75°C в течение 20 мин. Пробирку открыть и высушить на воздухе или под током азота при 30°C. Содержимое растворить в 50 мкл этилацетата и 1–2 мкл инжестировать в колонку для ГХ.

Альтернативная методика [135]

К сухому остатку добавить гидроксид калия (0,5 М; 50 мкл) и затем 500 мкл толуола. После перемешивания и центрифугирования органический слой перенести в чистую пробирку и добавить 5 мкл ГФМА. Раствор тщательно перемешать и немедленно добавить раствор бикарбоната натрия (10%, м/о; 500 мкл) при непрерывном перемешивании. Пробирку отцентрифугировать и 1 мкл слоя толуола (верхнего) инжестировать в колонку для ГХ.

Трифторуксусный ангидрид (ТФУА) [125, 136]

К сухому остатку добавить этилацетат (100 мкл) и ТФУА (50 мкл). Пробирку встряхнуть и инкубировать при 60°C в течение 20 мин. Смесь тщательно упарить до конечного объема 50 мкл под мягким током воздуха или азота при комнатной температуре и 1–2 мкл инжестировать в колонку для ГХ.

б) Метод приготовления производных: метод насадочной колонки

Рабочие условия

Детектор: ПИД, АФД
Колонки: Стекланные насадочные колонки [2 м x 3–4 мм (внутренний диаметр)] с диметилсиликоновой (например, OV-1, SE-30) или метилфенилсиликоновой (например, DB-1, OV-17) жидкими стационарными фазами
Газ-носитель: Азот, 30 мл/мин.
Капиллярные колонки из кварцевого стекла с химически связанными неполярными стационарными фазами (например, SE-54) можно использовать в качестве альтернативы описанным выше насадочным колонкам. В качестве газа-носителя используется гелий со скоростью потока 1 мл/мин.

Рабочие температуры: Инжектор: 250–280°C
 Термостат: 90–280°C (программируется в зависимости от применяемой колонки)
 Детектор: 280–300°C

b) Метод с приготовлением производных

Рабочие условия

Детектор: ПИД, АФД, ЭХО или масс-спектрометр с ионизацией электронным ударом, функционирующий в режиме мониторинга выбранного иона (МВИ)
 Колонки и температуры: См. метод без приготовления производных, выше.

Результаты

Таблица VI.4 Данные об удержании замещенных по циклу амфетаминов и их производных

Соединение	Колонка		
	<i>OV-1 или SE-30</i> Без модификации ^a	<i>DB-1</i> Без модификации ^a	<i>SE-54</i> Модифицировано ГФМА ^b
МДА	1 477	1 444	5,77
МДМА	1 585	1 501	6,87
ПМА	1 412	1 346	4,77
ДМА	1 558	1 527	6,24
ДОМ	1 618	1 593	6,65
ДОЭТ	1 654	1 654	7,23
ДОБ	1 809	1 786	8,70

^a Индексы удержания.

^b Время удержания (мин.) на капиллярной колонке SE-54, 25 м x 0,3 мм (внутренний диаметр), толщина пленки 0,17 мкм, температура программируется от 120°C (1 мин.) до 280°C со скоростью 10°/мин. Время удержания амфетамина в этой системе 2,74 мин.

2. Газовая хроматография – масс-спектрометрия

Если в качестве детектора используется масс-спектрометр, основные ионы (m/z) в спектрах ЭУ⁺ таковы, как в таблице VI.5.

Таблица VI.5 Основные ионы в масс-спектрах замещенных по циклу производных амфетамина

Соединение	Основные осколочные ионы (m/z)	
	Немодифицированное	Производное ГФМА
МДА	44, 135, 136	135, 162, 240
МДМА	58, 77, 135, 136	135, 162, 254

Таблица VI.5 (окончание)

Соединение	Основные осколочные ионы (m/z)	
	Немодифицированное	Производное ГФМА
ПМА	44, 78, 122	121, 148, 240
ПММА	58, 77, 78, 121	–
ДМА	44, 72, 91	151, 178, 240
ДОМ	44, 151, 166	91, 135, 165, 193, 405
ДОЭТ	44, 165, 180	179, 206, 240
ДОБ	44, 215, 217, 230, 232	229, 231, 256, 258, 240

3. Высокоэффективная жидкостная хроматография

Ниже представлены два метода для анализа замещенных по циклу производных амфетамина в моче с помощью ВЭЖХ [138–141].

а) Метод без приготовления производных [138]

Подготовка проб

Экстракция проб проводится так, как описано ранее (раздел VI.B), с использованием фентермина в качестве внутреннего стандарта. Экстракты упаривают досуха под током азота с учетом мер предосторожности, указанных в разделе VI.B.2, и затем вновь растворяют в 100 мкл ацетонитрила или подвижной фазы.

Стандартные растворы

Стандартные растворы готовят растворением контрольного материала в ацетонитриле до концентрации 0,01 мг/мл.

Рабочие условия

Колонка:	Октадецилсиликоновая (Spherisorb ODS-1 или эквивалентный), 3 или 5 мкм, 12,5 см x 4,0 мм (внутренний диаметр) + предколонка
Подвижная фаза:	Ацетонитрил–вода (57:943, по объему) + фосфорная кислота (8,5 г/л) + гексиламин (0,28 мл/л). В зависимости от типа используемой колонки величины k' можно оптимизировать изменением соотношения ацетонитрил–вода
Скорость:	0,8 мл/мин.
Детектор:	УФ-излучение с длиной волны 190 нм
Инъектируемый объем:	10 мкл
Количественное определение:	По площади пиков, используя метод внутреннего стандарта

б) Метод с приготовлением производных [141]

Подготовка проб

Экстракцию проб проводят так, как описано ранее (раздел VI.B), используя фентермин в качестве внутреннего стандарта. Экстракты выпаривают досуха в стеклянном сосуде под током азота. Затем их вновь растворяют в водном растворе бикарбоната натрия (2%, м/о; 200 мкл) и добавляют водный раствор β-нафтохинон-4-сульфоната натрия (0,5%, м/о; 200 мкл). Сосуды закрывают и нагревают при 60°C в течение 30 мин. После охлаждения водный раствор экстрагируют смесью гексан–диэтиловый эфир (2:1, по объему), используя прибор для встряхивания "Vortex", в течение 1 мин. Органический слой отбирают и выпаривают досуха под током азота. Остаток растворяют в ацетонитриле (100 мкл).

Стандартные растворы

Стандартные растворы готовят растворением контрольного материала в чистой моче до концентрации 5 мкг/мл.

Рабочие условия

Колонка:	Октадецилсиликоновая (μ-Bondapak C-18 или эквивалентный), 3 или 5 мкм, 15 см x 3,9 мм (внутренний диаметр)
Подвижная фаза:	Ацетонитрил–метанол–0,01 М серная кислота (20:20:60, по объему)
Скорость:	0,8 мл/мин.
Температура:	40°C
Детектор:	УФ-излучение с длиной волны 248 нм или электрохимический детектор при 0,0 В
Инжектируемый объем:	5–10 мкл
Количественное определение:	По площади пиков, используя метод внутреннего стандарта

Результаты

Таблица VI.6 **Время удержания замещенных по циклу производных амфетамина по отношению к фентермину (внутренний стандарт)**

<i>Соединение</i>	<i>Метод без модификации</i>	<i>Метод, использующий модификацию</i>
МДА	0,83	0,49
МДМА	1,19	–
ПМА	0,90 ^a	0,57
ПММА	–	0,76
Фентермин	1,00 (8,1 мин.; 3,4 мин. ^a)	1,00 (25,12 мин.)
ДМА	1,88	–
ДОМ	2,15 ^a	1,44
ДОЭТ	4,06 ^a	–
ДОБ	2,59 ^a	1,72

^a Определено с использованием подвижной фазы, состав: ацетонитрил–вода (182:816, по объему) + фосфорная кислота (8,5 г/л) + гексиламин (0,28 мл/л).

Е. Интерпретация результатов

В научной литературе было мало публикаций, касающихся диапазона концентраций, которого можно ожидать у эпизодических или хронических потребителей замещенных по циклу амфетаминов.

Сообщалось, что после однократного приема МДА концентрации неизменного препарата в плазме и моче составляют менее 0,4 и 10 мкг/мл, соответственно. В случае ПМА соответствующие концентрации препарата в плазме и моче составляют менее 0,2 и 5 мкг/мл [84].

Установлено, что в случае злоупотребления уровни содержания МДА в плазме и моче находятся в диапазоне 5–25 и 50–150 мкг/мл, соответственно. Для ПМА соответствующие диапазоны составляют 0,3–2 мкг/мл в плазме и 5–200 мкг/мл в моче [84].

После введения 1,5 мг МДМА/кг веса тела наблюдались максимальные уровни его в плазме около 0,33 мкг/мл, тогда как в моче можно было обнаружить концентрации около 1,4, 14 и 23 мкг/мл спустя 1,5, 10 и 22 ч, соответственно [153].

Сообщалось о случаях смерти, связанных с данными наркотиками. Концентрации в крови и моче при летальном исходе в результате приема МДА находились в диапазонах 2,3–26 мкг/мл в крови и 46–175 мкг/мл в моче, соответственно [154–156]. Установлено, что в пяти летальных исходах, связанных с употреблением МДМА и МДЭА, уровни содержания их в крови были в диапазоне от 0,9 до 2 мкг/мл [157]. У девяти умерших от употребления ПМА концентрации ПМА в крови и моче находились в диапазоне 0,3–1,9 и 6,0–175 мкг/мл, соответственно [158].

Ссылки

- 1 Report of the Expert Group on Recommended Methods for Testing Cannabis and Amphetamine/Methamphetamine Analysis, E/CN.7/1987/8.
- 2 Report of the Expert Group on Guidelines for the Establishment of National Testing Programmes and Laboratories for Drugs of Abuse in Body Fluids, E/CN.7/1988/CRP.5, para 42.
- 3 Commission on Narcotic Drugs, Report of the Tenth Special Session, E/1988/13-E/CN.7/1988/14, para. 236 (b).
- 4 Report of the International Conference on Drug Abuse and Illicit Trafficking (United Nations Publication, Sales No. E.87.1.18), para 84.
- 5 Recommended Methods for the Detection and Assay of Heroin and Cannabinoids in Biological Specimens, Manual for Use by National Laboratories, ST/NAR/23, United Nations, 1993.
- 6 Recommended Methods for the Detection and Assay of Cocaine, Amphetamine, Methamphetamine and Ring-Substituted Amphetamine Derivatives in Biological Specimens, Manual for Use by National Laboratories, ST/NAR/24, United Nations, 1993.
- 7 Recommended Methods for Testing Heroin, Manual for Use by National Narcotics Laboratories, ST/NAR/6, United Nations, 1986.
- 8 Recommended Methods for Testing Opium/Crude Morphine, Manual for Use by National Narcotics Laboratories, ST/NAR/11, United Nations, 1987.
- 9 Recommended Methods for Testing Cannabis, Manual for Use by National Narcotics Laboratories, ST/NAR/8, United Nations, 1987.
- 10 Recommended Methods for Testing Cocaine, Manual for Use by National Narcotics Laboratories, ST/NAR/7, United Nations, 1986.
- 11 Recommended Methods for Testing Amphetamine and Methamphetamine, Manual for Use by National Narcotics Laboratories, ST/NAR/9, United Nations, 1987.
- 12 Recommended Methods for Testing Illicit Ring-Substituted Amphetamine Derivatives, Manual for Use by National Narcotics Laboratories, ST/NAR/12, United Nations, 1987.
- 13 B. Needleman, M. Porvaznik and D. Ander, Creatinine analysis in single collection urine specimens, *J. Forens. Sci.* 37, 1125-1133 (1992).
- 14 C. Edwards, M. J. Fyfe, R. H. Liu and A. S. Walia, Evaluation of common urine specimen adulteration indicators, *J. Anal. Toxicol.* 17, 251-252 (1993).
- 15 R. C. Baselt, *Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man*, Vol.1, Biomedical Publications, Canton, Connecticut 06019, 1978, p. 10.
- 16 J. G. Umans, T. S. K Chiu, R. A Lipman, M. F. Schultz, S-U. Shin and C. E Inturrisi, Determination of heroin and its metabolites by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.* 233, 213-225 (1982).
- 17 S. Y. Yeh, C. W. Gorodetzky and R. L. McQuinn, Urinary excretion of heroin and its metabolites in man, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 196, 249-256 (1976).
- 18 *Opiatnachweis im Ham*, DFG/TIAFT Mitt. XXI. Verlag Chemie, Weinheim, 1993.
- 19 E. J. Cone and W. D. Darwin, Rapid assay of cocaine, opiates and metabolites by gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr.* 580, 43-61 (1992).

- 20 K. Bjerver, J. Jonsson, A. Nilsson, J. Schuberth and J. Schuberth, Morphine intake from poppy seed food, *J. Pharm. Pharmacol.* 34, 798-801 (1982).
- 21 R. H. Drost, R. D. Van Ooijen, T. Ioescu and R. A. A. Maes, Determination of morphine in serum and cerebrospinal fluid by gas chromatography and selected ion monitoring after reversed phase column extraction, *J. Chromatogr.* 310, 193-198 (1984).
- 22 E. J. Cone, S. Dickerson, B. D. Paul and J. M. Mitchell, Forensic drug testing for opiates. IV. Analytical sensitivity, specificity, and accuracy of commercial urine opiate immunoassays, *J. Anal. Toxicol.* 16, 72-78 (1992).
- 23 Thin-Layer Chromatography R_f Values of Toxicologically-Relevant Substances in Standardised Systems, DFG/TIAFT Mitt. XVII. Verlag Chemie, Weinheim, 1992.
- 24 L. R. Goldbaum, P. Santinga and A. M. Dominguez, A procedure for the rapid analysis of large numbers of urine samples for drugs, *Clin. Toxicol.* 5, 369-379 (1972).
- 25 D. C. Fuller and W. H. Anderson, A simplified procedure for the determination of free codeine, free morphine, and 6-acetylmorphine in urine, *J. Anal. Toxicol.* 16, 315-318 (1992).
- 26 P. M. Kabra and L. J. Marton, *Clinical Liquid Chromatography*, Vol. 1, Analysis of Exogenous Compounds, CRC Press, 1984, pp. 153-157.
- 27 C. Kim and T. Kats, Rapid and sensitive analysis of morphine in serum by reversed-phase high performance liquid chromatography with electrochemical detection, *J. Anal. Toxicol.* 8, 135-137 (1984).
- 28 J.-O. Svensson, Determination of morphine, morphine-6-glucuronide and normorphine in plasma and urine with high-performance liquid chromatography and electrochemical detection, *J. Chromatogr.* 375, 174-178 (1986).
- 29 J. Gerostamoulos, K. Crump, I. M. McIntyre and O. H. Drummer, Simultaneous determination of 6-monoacetylmorphine, morphine and codeine in urine using high-performance liquid chromatography with combined ultraviolet and electrochemical detection, *J. Chromatogr.* 617, 152-156 (1993).
- 30 J. Fehn and G. Megges, Detection of O^6 -monoacetylmorphine in urine samples by GC/MS as evidence for heroin use, *J. Anal. Toxicol.*, 9, 134-138 (1985).
- 31 R. W. Romberg and V. E. Brown, Extraction of 6-monoacetylmorphine from urine, *J. Anal. Toxicol.* 14, 58-59 (1990).
- 32 E. J. Cone, P. Welch, J.M. Mitchell and B. D. Paul, Forensic drug testing for opiates: I. Detection of 6-acetylmorphine in urine as an indicator of recent heroin exposure; drug and assay considerations and detection times, *J. Anal. Toxicol.* 15, 1-7 (1991).
- 33 M. C. Dutt, D. S.-T. Lo, D. L. K. Ng and S. Woo, Gas chromatographic study of the urinary codeine-to-morphine ratios in controlled codeine consumption and in mass screening for opiate drugs, *J. Chromatogr.* 267, 117-124 (1983).
- 34 M. A. ElSohly and A. B. Jones, Morphine and codeine in biological fluids: Approaches to source differentiation, *Forens. Sci. Rev.* 1, 13-21 (1989).
- 35 R. Mechoulam, *Marijuana Chemistry*, Science, 168, 1159-1166 (1970).
- 36 R. Mechoulam, *Marijuana*, Academic Press, New York and London, 1973.
- 37 C. E. Turner, Constituents of *Cannabis sativa* L., XVII: A Review of the natural constituents, *J. Nat. Prod.* 43, 169-234 (1980).
- 38 M. M. Halldin, S. Carisson, S. L. Kanter, M. Widman and S. Agurell, Urinary metabolites of δ -9-tetrahydrocannabinol in man, *Arzneim.-Forsch.* 32, 764-768 (1982).
- 39 T. S. Baker, J. V. Harry, J. W. Russell and R. L. Myers, Rapid method for the GC/MS confirmation of 11-nor-9-carboxy- δ -9-tetrahydrocannabinol in urine, *J. Anal. Toxicol.* 8, 255-259 (1984).
- 40 A. S. Christophersen, Tetrahydrocannabinol stability in whole blood: Plastic versus glass containers, *J. Anal. Toxicol.* 10, 129-131 (1986).

- 41 J. R. Johnson, T. A. Jennison, M. A. Peat and R. L. Foltz, Stability of Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC), 11-hydroxy-THC, and 11-nor-9-carboxy-THC in blood and plasma, *J. Anal. Toxicol.* 8, 202-204 (1984).
- 42 P. L. Williams, A. C. Moffat and L. J. King, Combined high-performance liquid chromatography and radioimmunoassay method for the analysis of Δ^9 -tetrahydrocannabinol metabolites in human urine, *J. Chromatogr.* 186, 595 (1979).
- 43 E. J. Cone, R. E. Johnson, W. D. Darwin, D. Yousefnejad, L. D. Mell, B. D. Paul and J. Mitchell, Passive inhalation of marijuana smoke: Urinalysis and room levels of *delta*-9-tetrahydrocannabinol, *J. Anal. Toxicol.* 11, 89-96 (1987).
- 44 K. Verebey, D. Jukofsky and S. J. Mule, Evaluation of a new TLC confirmation technique for positive EMIT cannabinoid urine samples. *Res. Comm. Subst. Abuse* 6, 1-9 (1985).
- 45 R. C. Parry, L. Nolan, R. E. Shirey, G. D. Wachob and D. J. Gisch, Pretreatment of urine samples for the analysis of 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid using solid-phase extraction, *J. Anal. Toxicol.* 14, 39-44 (1990).
- 46 A. H. B. Wu, N. Liu, Y.-J. Cho, K. G. Johnson and S. S. Wong, Extraction and simultaneous elution and derivatization of 11-nor-9-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol using Toxi-Lab SPEC[®] prior to GC/MS analysis of urine, *J. Anal. Toxicol.* 17, 215-217 (1993).
- 47 J. Irving, B. Leeb, R. L. Foltz, C. E. Cook, J. T. Burse and R. E. Willette, Evaluation of immunoassays for cannabinoids in urine, *J. Anal. Toxicol.* 8, 192-196 (1984).
- 48 D. L. Black, B. A. Goldberger, D. S. Isenschmid, S. M. White and Y. H. Caplan, Urine cannabinoid analysis: An integrated multi-method approach, *J. Anal. Toxicol.*, 8, 224-227 (1984).
- 49 A. B. Jones, H. N. ElSohly and M. A. ElSohly, Analysis of the major metabolite of *delta*-9-tetrahydrocannabinol in urine. V. Cross-reactivity of selected compounds in a radioimmunoassay, *J. Anal. Toxicol.*, 8, 252-254 (1984).
- 50 M. A. ElSohly, A. B. Jones and H. N. ElSohly, Cross-reactivity of selected compounds in the Abbott TDx[®] cannabinoid assay, *J. Anal. Toxicol.* 14, 277-279 (1990).
- 51 M. J. Kogan, E. Newman and N. J. Wilson, Detection of the marijuana metabolite 11-nor-*delta*-9-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in human urine by bonded-phase adsorption and thin-layer chromatography, *J. Chromatogr.* 306, 441-443 (1984).
- 52 K. K. Kaistha and R. Tadrus, Semi-quantitative thin-layer mass screening detection of 11-nor-*delta*-9-tetrahydrocannabinol-9-carboxy acid in human urine, *J. Chromatogr.* 237, 528-533 (1982).
- 53 R. B. Hughes and R. R. Kessler, Increased safety and specificity in the thin-layer chromatographic identification of marihuana, *J. Forens. Sci.* 24, 842-846 (1979).
- 54 M. Congest, R. de la Torre and J. Segura, Optimization of the quantitative analysis of the major Cannabis metabolite (11-nor-9-COOH- Δ^9 -tetrahydrocannabinol) in urine by gas chromatography/mass spectrometry, *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* 16, 367-372 (1988).
- 55 D. Bourquin and R. Brenneisen, Confirmation of Cannabis abuse by the determination of 11-nor-*delta*-9-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid with high-performance liquid chromatography and electrochemical detection, *J. Chromatogr.* 414, 187-191 (1987).
- 56 R. Clouette, M. Jacob, P. Koteel and M. Spain, Confirmation of 11-nor- Δ^9 -tetrahydro-cannabinol in urine as its *t*-butyldimethylsilyl derivative using GC/MS, *J. Anal. Toxicol.* 17, 1-4 (1993).
- 57 J. D. Whiting and W. W. Manders, Confirmation of a tetrahydrocannabinol metabolite in urine by GC, *J. Anal. Toxicol.* 6, 49-52 (1982).
- 58 M. Hanke and G. Megges, Routine-Nachweis des THC-Metaboliten 11-Nor-*delta*-9-THC-9-Carbonsäure in der forensischen Praxis, *Z. Rechtsmed.* 90, 105-108 (1983).
- 59 R. C. Parry and D. J. Gisch, Confirmation of 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in urine using solid-phase extraction pretreatment, *LC-GC Int.* 3, 29-35 (1990).
- 60 G. R. Nakamura, R. D. Meeks and W. J. Stall, Solid-phase extraction, identification, and quantitation of 11-nor-*delta*-9-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid, *J. Forens. Sci.* 35, 792- 796 (1990).

- 61 D. Bourquin and R. Brenneisen, Determination of the major *delta*-9-tetrahydrocannabinol metabolite in urine by high-performance liquid chromatography and photodiode array detection, *Anal. Chim. Acta* 198, 183-189 (1987).
- 62 Y. Nakahara, H. Sekine and SE. Cook, Confirmation of Cannabis use II. Determination of tetrahydrocannabinol metabolites in urine and plasma by HPLC with ECD, *J. Anal. Toxicol.* 13, 22-24 (1989).
- 63 V. Dixit and V. M. Dixit, A unique solid phase extraction column for isolation of 11-nor- Δ -9-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in human urine, *J. Liq. Chromatogr.* 13, 3313-3325 (1990).
- 64 P. Kelly and R. T. Jones, Metabolism of tetrahydrocannabinol in frequent and infrequent marijuana users, *J. Anal. Toxicol.* 16, 228-235 (1992).
- 65 A.C. Moffat, Monitoring urine for inhaled cannabinoids, *Arch. Toxicol., Suppl.* 9, 103-110(1986).
- 66 B. Law, P. A. Mason, A. C. Moffat, R. I. Gleadle and L. J. King, Forensic aspects of the metabolism and excretion of cannabinoids following oral ingestion of Cannabis resin, *J. Pharm. Pharmacol.* 36, 289-294 (1984).
- 67 B. Law, P. A. Mason, A. C. Moffat, L. J. King and V. Marks, Passive inhalation of cannabis smoke, *J. Pharm. Pharmacol.* 36, 578-581 (1984).
- 68 R. H. Liu, Important considerations in the interpretation of forensic urine drug test results, *Forens. Sci. Rev.* 4, 51-65 (1992).
- 69 L. D. Baugh and R. H. Liu, Sample differentiation: Cocaine example, *Forens. Sci. Rev.* 3, 101-115 (1991).
- 70 J. F. Casale and R. P. X. Klein, Illicit production of cocaine, *Forens. Sci. Rev.* 5, 95-107 (1993).
- 71 J. M. Moore, R. P. Meyers, M. D. Jimenez, The anatomy of a cocaine comparison case: A prosecutorial and chemistry perspective, *J. Forens. Sci.* 38, 1305-1325 (1993).
- 72 J. F. Casale and J. M. Moore, 3',4',5'-Trimethoxy-substituted analogues of cocaine, *cis*-/transcinnamoylcocaine and tropacocaine: Characterization and quantitation of new alkaloids in coca leaf, coca paste and refined illicit cocaine, *J. Forens. Sci.* 39, 462-472 (1994).
- 73 K. Verebey and M. S. Gold, From coca leaves to crack: The effects of dose and routes of administration in abuse liability, *Psychiatr. Ann.* 18, 513-520 (1988).
- 74 T. Inaba, Cocaine: Pharmacokinetics and biotransformation in man, *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 67, 1154-1157 (1989).
- 75 J. Jue Zhang and R. L. Foltz, Cocaine metabolism in man: Identification of four previously unreported cocaine metabolites in human urine, *J. Anal. Toxicol.* 14, 201-205 (1990).
- 76 R. C. Baselt (Ed.) *Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man: Cocaine*, Biomed. Public., Davis, California (1982), pp. 193-198.
- 77 D. S. Isenschmid, M.W. Fischman, R. W. Foltin and Y. H. Caplan, Concentration of cocaine and metabolites in plasma of humans following intravenous administration and smoking of cocaine, *J. Anal. Toxicol.* 16, 311-314 (1992).
- 78 R. C. Baselt, Stability of cocaine in biological fluids, *J. Chromatogr.* 268, 502-505 (1983).
- 79 D. S. Isenschmid, B. S. Levine and Y. H. Caplan, A comprehensive study of the stability of cocaine and its metabolites, *J. Anal. Toxicol.* 13, 250-256 (1989).
- 80 J. Vasiliades, Long-term stability of ecgonine methyl ester in urine, *J. Anal. Toxicol.* 17, 253 (1993).
- 81 J. Ambre, T. I. Ruo, J. Nelson and S. Belknap, Urinary excretion of cocaine, ben-zoylecgonine and ecgonine methyl ester in humans, *J. Anal. Toxicol.* 12 301-306 (1988).
- 82 J. Ortuno, R. de la Torre, J. Segura and J. Cami, Simultaneous detection in urine of cocaine and its main metabolites. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 8, 911-914 (1990).
- 83 K. Verebey and A. DePace, Rapid confirmation of enzyme multiplied immunoassay technique (EMIT®) cocaine positive samples by capillary gas-liquid chromatography/ nitrogen phosphorus detection (GLC/NPD), *J. Forensic Sci.* 34, 46-52 (1989).

- 84 R. C. Baselt, *Analytical Procedures for Therapeutic Drug Monitoring and Emergency Toxicology*, 2nd Ed., PSG Publishing, Mass. (1987).
- 85 L. K. Thompson, D. Yousefnejad, K. Kumor, M. Sherer and E. J. Cone, Confirmation of cocaine in human saliva after intravenous use, *J. Anal. Toxicol.* 11, 36-38 (1987).
- 86 J. E. Wallace, H. E. Hamilton, J. G. Christenson, E. L. Shimek, P. Land and S. C. Hams, An evaluation of selected methods for determining cocaine and benzoylecgonine in urine, *J. Anal. Toxicol.* 1, 20-26 (1977).
- 87 J. A. Sandberg and G. D. Olsen, Microassay for the simultaneous determination of cocaine, norcocaine, benzoylecgonine and benzoynorecgonine by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.* 525, 113-121 (1990).
- 88 D. Bourquin and R. Brenneisen, Determination of cocaine and cocaine metabolites in urine using HPLC and photodiode array detection, *Proceed. Ann. Meeting Am. Acad. Forens. Sci. (AAFS)*, Las Vegas (1989).
- 89 A. C. Moffat, J.V. Jackson, M.S. Moss and B. Widdop (Eds.), *Clarke's Isolation and Identification of Drugs*, 2nd Ed., Pharmaceutical Press, London (1986).
- 90 J. Breiter, R. Helger and H. Lang, Evaluation of column extraction: A new procedure for the analysis of drugs, *Forens. Sci.* 7, 131-140 (1976).
- 91 D. Gübitz and R. Wintersteiger, Identification of drugs of abuse by high performance thin-layer chromatography, *J. Anal. Toxicol.* 4, 141-144 (1980).
- 92 K. Matsubara, C. Maeda and Y. Fukui, Quantitation of cocaine, benzoylecgonine and ecgonine methyl ester by GC-CI-SIM after Extrelut extraction, *Forens. Sci. Int.* 26, 181-192 (1994).
- 93 J. Sherma, J.E. Bernard and M.H. Higgs, Screening of benzoylecgonine in urine with Cyclobond solid phase extraction and high performance TLC, *J. Liq. Chromatogr.* 11, 3135- 3143 (1988).
- 94 B.K. Logan, D. T. Stafford, I. R. Tebbett and C. M. Moore, Rapid screening for 100 basic drugs and metabolites in urine using cation exchange solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode array detection, *J. Anal. Toxicol.* 14, 154-159 (1990).
- 95 R. E. Anderson and G. L. Nixon, Isolation of benzoylecgonine from urine using solid-phase extraction, *J. Anal. Toxicol.* 17, 432-433 (1993).
- 96 Toxi-Lab Inc., *Manufacturer's documentation: Toxi-Lab SPEC-VC-MP1 Extraction of Benzoylecgonine from Urine Using On-Disc Derivatization* (1992)
- 97 E. J. Cone and J Mitchell, Validity testing of commercial urine cocaine metabolite assays: II. Sensitivity, specificity, accuracy and confirmation by gas chromatography/ mass spectrometry, *J. Forens. Sci.* 34, 32-45 (1989).
- 98 M. J. Kogan, D. J. Pierson, M. M. Durkin, and N. J. Wilson, Thin layer chromatography of benzoylecgonine: A rapid qualitative method for confirming the EMIT urine cocaine metabolite assays, *J. Chromatogr.* 490, 236-242 (1989).
- 99 F.K. Rafla and R. L. Epstein, Identification of cocaine and its metabolites in human urine in the presence of ethyl alcohol, *J. Anal. Toxicol.* 3, 59-63 (1979).
- 100 S. Goenechea and M. Franke, Kokain, *Mitteilung der Senatskommission für Klinische Toxikologische Analytik*, DFG (1993).
- 101 J. Gerlits, GC/MS quantitation of benzoylecgonine following liquid-liquid extraction of urine, *J. Forens. Sci.* 38, 1210-1214 (1993).
- 102 R. L. Hawks and C. N. Chiang (Eds.) *Urine Testing for Drugs of Abuse*, NIDA Res. Monogr. 73, 93 (1986).
- 103 J. Ambre, M. Fischman and Tsuen-Ih Ruo, Urinary excretion of ecgonine methyl ester, a major metabolite of cocaine in humans, *J. Anal. Toxicol.* 8, 23-25 (1984).
- 104 J. Ambre, The urinary excretion of cocaine and metabolites in humans: A kinetic analysis of published data, *J. Anal. Toxicol.* 8, 241-245 (1985).

- 105 E. J. Cone and W. W. Washington, Prolonged occurrence of cocaine in human saliva and urine after chronic use., *J. Anal. Toxicol.* 13, 56-68 (1989).
- 106 Am. Assoc. for Clin. Chem. Special Report, Critical issues in urinalysis of abused substances: Report of the substance-abuse testing committee, *Clin. Chem.* 34, 605-632 (1988).
- 107 C. Cook, R. Jeffcoat and M. Perez Reyes, Pharmacokinetic Studies of Cocaine and Phencyclidine in Man, in G. Barnett and C. N. Chiang (Eds.) *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Psychoactive Drugs*, Biomed. Publ., (1985) pp. 48-74.
- 108 P. Jatlow, P. Barash, C. Van Dike, J. Roddnig and R. Byck, Cocaine and succinylcholine: A new caution, *Anesth. Anal.* 58, 235-238 (1979).
- 109 R. M. Smith, Ethyl esters of arylhydroxymethoxy cocaines in the urines of simultaneous cocaine and ethanol users, *J. Anal. Toxicol.* 8, 38-42 (1984).
- 110 G.F. Jackson, J. J. Saady and A. Poklis, Urinary excretion of benzoylecgonine following ingestion of Health Inca Tea, *Forens. Sci. Int.* 49, 57-64 (1991).
- 111 J. Osterloh, Testing for drugs of abuse—Pharmakokinetic considerations for cocaine in urine, *Clin. Pharmacokin.* 24, 355-361 (1993).
- 112 K. K. Redda, in A. Walker and G. Barnett (Eds.) *Cocaine, Marijuana and Designer Drugs: Chemistry, Pharmacology and Behaviour*, CRC Press (1989) p. 72.
- 113 Y. Liu, R. D. Budd and E. C. Griesemer, Study of the stability of cocaine and benzoylecgonine, its major metabolite, in blood samples, *J. Chromatogr.* 248, 318-320 (1982).
- 114 M. R. Harkey and G. L. Henderson, Hair analysis for drugs of abuse, in R.C. Baselt (Ed.) *Adv. Anal. Toxicol.*, Vol. II, Year Book Medical Publishers (1989) pp. 298-329.
- 115 E. J. Cone, K. Kumor, L. K. Thompson and M. Sherer, Correlation of saliva cocaine levels with plasma levels and with pharmacologic effects after intravenous cocaine administration in human subjects, *J. Anal. Toxicol.* 12, 200-206 (1988).
- 116 L. K. Thompson, D. Yousefnejad, K. Kumor, M. Sherer and E. J. Cone, Confirmation of cocaine in human saliva after intravenous use, *J. Anal. Toxicol.* 11, 36-38 (1987).
- 117 M. R. Harkey, G. L. Henderson and C. Zhou, Simultaneous quantitation of cocaine and its major metabolites in human hair by gas chromatography/chemical ionization mass spectrometry, *J. Anal. Toxicol.* 15, 260-265 (1991).
- 118 W. Schramm, P. A. Craig, R.H. Smith and G.E. Berger, Cocaine and benzoylecgonine in saliva, serum, and urine, *Clin. Chem.* 39, 481-487 (1993).
- 119 Recommended Methods for Testing Amphetamine and Methamphetamine, Manual for Use by National Narcotics Laboratories, ST/NAR/9, United Nations, 1987.
- 120 K. Cho, Ice: A new dosage form of an old drug, *Science* 249, 631-634 (1990).
- 121 R. De Cresce, A. Mazura, M. Lifshitz and J. Tilson, *Drug Testing in the Workplace*, American Society of Clinical Pathology Press, Chicago (1989), p. 108.
- 122 L. G. Dring, R. L. Smith and R. T. Williams, The fate of amphetamine in man and other mammals, *J. Pharm. Pharmacol.* 18, 402-405 (1966).
- 123 J. Caldwell, L. G. Dring and R. T. Williams, Metabolism of [¹⁴C] methamphetamine in man, the guinea pig and the rat, *Biochem. J.* 129, 11-22 (1972).
- 124 A. H. Beckett and M. Rowland, Urinary excretion kinetics of methamphetamine in man, *J. Pharm. Pharmacol.* 17/Suppl, 109s-114s (1965).
- 125 C. L. Hombeck and R. J. Czarny, Quantitation of methamphetamine and amphetamine in urine by capillary GC/MS. Part I. Advantages of trichloroacetyl derivatisation, *J. Anal. Toxicol.* 13, 251-262 (1989).
- 126 K. Shimosato, M. Tomita and I. Ijiri, Urinary excretion of p-hydroxylated methamphetamine metabolites in man. I. A method for determination by high-performance liquid chromatography-electrochemistry, *Arch. Toxicol.* 59, 135-140 (1986).

- 127 X. Chen, J. Wijsbeck, J. Van Veen, J. P. Franke and R. A. de Zeeuw, Solid-phase extraction for the screening of acidic, neutral and basic drugs in plasma using a single-column procedure on Bond Elut Certify, *J. Chromatogr.* 529, 161-166 (1990).
- 128 J. T. Cody and R. Schwarzhoff, Fluorescence polarization immunoassay detection of amphetamine, methamphetamine, and illicit amphetamine analogues, *J. Anal. Toxicol.* 17, 26-30 (1993).
- 129 Recommended Methods for Testing Illicit Ring-Substituted Amphetamine Derivatives: Manual for Use by National Narcotic Laboratories, ST/NAR/12, United Nations, 1987.
- 130 I. Ojanperä, K. Wähälä and T.A. Hase, Fast Black K salt: A versatile thin-layer chromatographic visualisation reagent for the differentiation of aliphatic amines, *Analyst* 115, 263-267 (1990).
- 131 P. Lillsunde and T. Korte, Comprehensive drug screening in urine using solid-phase extraction and combined TLC and GC/MS identification, *J. Anal. Toxicol.* 15, 71-81 (1991).
- 132 I. Ojanperä, P. Lillsunde and T. Korte, Detection of amphetamine analogues by thin layer chromatography and gas chromatography-mass spectrometry, *Proceed. Int. Congress on Clin. Toxicol., Poison Control and Analytical Toxicology, LUX TOX'90, 1990, Luxembourg, Bull. Soc. Sci. Med. Luxembourg* 127, 88-92 (1990).
- 133 Y. Nakahara and H. Sekine, A high selective screening test for methamphetamine in human urine, *Forensic Sci. Int.* 26, 277-282 (1984).
- 134 R. W. Taylor, S. D. Le, S. Philip and N. C. Jain, Simultaneous identification of amphetamine and methamphetamine using solid phase extraction and gas chromatography/nitrogen phosphorus detection or gas chromatography/mass spectrometry, *J. Anal. Toxicol.* 13, 293-295 (1989).
- 135 P. Lillsunde and T. Korte, Determination of ring- and N-substituted amphetamines as heptafluorobutyl derivatives, *Forens. Sci. Int.* 49, 205-213 (1991).
- 136 K. Hara, T. Nagata and K. Kimura, Forensic toxicological analysis of methamphetamine and amphetamine in body materials by gas chromatography/mass spectrometry, *Z. Rechtsmed.* 96, 93-104 (1986).
- 137 R. Melgar and R.C. Kelly, A novel GC/MS derivatization method for amphetamines, *J. Anal. Toxicol.* 17, 399-402 (1993).
- 138 H.-J. Helmlin and R. Brenneisen, Determination of psychotropic phenylalkylamine derivatives in biological matrices by high-performance liquid chromatography with photodiodearray detection, *J. Chromatogr.* 593, 87-94 (1992).
- 139 B. M. Farrell and T. M. Jefferies, An investigation of HPLC methods for the analysis of amphetamines, *J. Chromatogr.* 272, 111-128 (1983).
- 140 Y. Nakahara and Y. Takeda, β -Naphthaquinone sulfonate as electrochemical labelling reagent for high-sensitivity LC analysis of drugs in biological fluids, *Chromatographia* 26, 363-368 (1988).
- 141 Y. Nakahara, A. Ishigami and Y. Takeda, Electrochemical label for high-performance liquid chromatography. I. β -Naphthoquinone-4-sulphonate as an electrochemical detection labelling reagent of amines, *J. Chromatogr.* 489, 371-376 (1989).
- 142 K. Asghar and E. De Souza (Eds.), *Pharmacology and Toxicology of Amphetamine and Related Designer Drugs*, NIDA Res. Monogr. 94, 1989.
- 143 K. K. Redda, C. A. Walker and G. Barnett (Eds.), *Cocaine, Marijuana, Designer Drugs: Chemistry, Pharmacology, and Behaviour*, CRC Press, Florida (1989).
- 144 *Manual on Designer Drugs, An Information Booklet on New Types of Drugs of Abuse-Analogues of Controlled Substances*, WHO/PSA/90.5 (1991).
- 145 G. M. Marquardt, V. DiStefano and L. L. Ling, Metabolism of β -3,4-methylene-dioxyamphetamine in the rat, *Biochem. Pharmacol.* 27, 1503-1505 (1978).
- 146 H. K. Lim and R. L. Foltz, Identification of metabolites of 3,4-(methylenedioxy)-methamphetamine in human urine, *Chem. Res. Toxicol.* 2, 142-143 (1989).
- 147 I. Kitchen, J. Trembley, J. Andre, L. G. Dring, J. R. Idle, R. L. Smith and R. T. Williams, Interindividual and interspecies variation in the metabolism of the hallucinogen 4-methoxyamphetamine, *Xenobiotica* 9, 397-404 (1979).

- 148 S. H. Snyder, L. A. Faillace and H. Weingartner, DOM (STP), a new hallucinogenic drug, and DOET: Effects in normal subjects, *Am. J. Psychiat.* 125, 357-364 (1968).
- 149 B.-T. Ho, V. Estevez, L. W. Tansey, L. F. Englert, P. J. Creaven and W. M. McIsaac, Analogs of amphetamine. 5. Excretory metabolites of 1-(2,5-dimethoxy-4-methyl-phenyl)-2-aminopropane (DOM) in rats, *J. Med. Chem.* 14, 158-160 (1971).
- 150 S. H. Snyder, L. A. Faillace and L. E. Hollister, 2,5-Dimethoxy-4-methylamphetamine (STP): A new hallucinogenic drug science, *Science* 158, 669-670 (1967).
- 151 S. H. Snyder, L. A. Faillace and H. Weingartner, A new psychotropic agent. Psychological and physiological effects of 2,5-dimethoxy-4-ethylamphetamine (DOET) in man, *Arch. J. Gen. Psychiat.* 21, 95-101 (1969).
- 152 T. Sargent, D. A. Kalbhen, A. T. Shulgin, G. Braun, H. Stauffer and N. Kusubor, In vivo human pharmacodynamics of the psychodysleptic 4-bromo-2,5-dimethoxyphenyl-isopropylamine labeled with bromine-82 or bromine-77, *Neuropharmacol.* 14, 165-174 (1975).
- 153 H. J. Helmlin, K. Bracher, S. J. Salamone and R. Brenneisen, Analysis of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and its metabolites in human plasma and urine by HPLC-DAD, GC/MS and AbuseScreen-Online, *Proceed. SOFT/CAT Meeting, Phoenix* (1993).
- 154 B. K. Gan, D. Baugh, R. H. Liu and A. S. Walia, Simultaneous analysis of amphetamine, methamphetamine, and 3,4-methylenedioxymethamphetamine in urine samples by solid-phase extraction, derivatisation, and gas chromatography/mass spectrometry, *J. Forens. Sci.* 36, 1331-1341 (1991).
- 155 G. Cimbura, 3,4-Methylenedioxyamphetamine (MDA): Analytical and forensic aspects of fatal poisoning, *J. Forens. Sci.* 23, 329-323 (1972).
- 156 A. Poklis, M. A. MacKell and W. K. Drake, Fatal intoxication from 3,4-methylenedioxyamphetamine, *J. Forens. Sci.* 79, 70-75 (1978).
- 157 G. P. Dowling, E. T. McDonough II and R. O. Bost, "Eve" and "Ecstasy": A report of five deaths associated with the use of MDEA and MDMA, *J. Am. Med. Assoc.* 257, 1615-1617 (1987).
- 158 G. Cimbura, PMA deaths in Ontario, *Can. Med. Assoc. J.* 110, 1263-1267 (1974).