

Mariola Wicka (autor korespondencyjny)

Zakład Badań Antydopingowych Instytutu Sportu w Warszawie

wicka.m@wp.pl

Piotr Chołbiński

Zakład Badań Antydopingowych Instytutu Sportu w Warszawie

Dorota Kwiatkowska

Zakład Badań Antydopingowych Instytutu Sportu w Warszawie

Andrzej Pokrywka

Zakład Badań Antydopingowych Instytutu Sportu w Warszawie

Wykrywanie substancji psychotropowych we krwi metodą LC/MS/MS

Streszczenie

Z roku na rok obserwuje się wzrost zjawiska zażywania środków uzależniających. Prowadzi to do pojawiania się problemu związanego z uzależnieniem, jak również zażywanie środków psychoaktywnych stwarza duże zagrożenie dla uczestników ruchu drogowego. Rozporządzenie Ministra Zdrowia w sprawie środków działających podobnie do alkoholu oraz warunków i sposobu przeprowadzenia badań na ich obecność w organizmie człowieka nakłada odpowiednie kryteria warunkujące wykonanie badań. Istotnym czynnikiem pod względem opiniodawczym jest znajomość budowy chemicznej substancji należących do poszczególnych grup środków uzależniających, ich przemian metabolicznych, które zachodzą w ustroju, jak również działania na organizm. Ma to na celu pomóc w prawidłowej interpretacji uzyskiwanych wyników badań analitycznych.

Słowa kluczowe substancje psychoaktywne, chromatografia, spektrometria mas, identyfikacja

Wstęp

Zjawisko zażywania środków uzależniających jest z roku na rok coraz bardziej powszechne. Przyjmowanie środków odurzających może skutkować zatruciami, w tym zatruciami przewlekłymi. Z czasem zażywanie substancji psychoaktywnych wywołuje uzależnienie o charakterze fizycznym i psychicznym, charakteryzujące się m.in. rozwojem zjawiska tolerancji, zwiększeniem dawek przyjmowanych substancji, nieskutecznymi próbami zmniejszenia tych dawek lub przerywania stosowania oraz występowaniem objawów odstawiennych. Problem przyjmowania środków psychoaktywnych stwarza duże zagrożenie dla uczestników ruchu drogowego. Na mocy kodeksu karnego (art. 178a) zabronione jest prowadzenie pojazdów mechanicznych pod wpływem środka odurzającego [1].

Prawo o ruchu drogowym [2] oraz Kodeks wykroczeń [3] zakazują prowadzenia pojazdów w stanie po użyciu środka działającego podobnie do alkoholu. Należy również zaznaczyć, że Sąd Najwyższy uchwałą z dnia 27 lutego 2007 roku rozstrzygnął interpretację pojęcia „środka odurzającego” w rozumieniu art. 178a Kodeksu karnego oraz ustawy z dnia 29 lipca 2005 roku o przeciwdziałaniu narkomanii (Dz.U. nr 179 poz.1485). Zgodnie z tą uchwałą pojęcie środka odurzającego obejmuje nie tylko środki odurzające

wskazane w tej ustawie, lecz również inne substancje pochodzenia naturalnego lub syntetycznego działające na ośrodkowy układ nerwowy, m.in. psychotropowe, których użycie powoduje obniżenie sprawności w zakresie kierowania pojazdem. Rozporządzenie Ministra Zdrowia w sprawie środków działających podobnie do alkoholu oraz warunków i sposobu przeprowadzania badań na ich obecność w organizmie człowieka nakłada odpowiednie kryteria warunkujące wykonanie badań [4]. Konieczne jest spełnienie odpowiednich wymagań analitycznych pozwalających na oznaczenie środków psychoaktywnych w materiale biologicznym w zakresie odpowiednich stężeń granicznych. Zgodnie z przywołanym rozporządzeniem w pobranej próbce krwi oznacza się 5 grup środków działających podobnie do alkoholu:

- morfinę – dla której ustalono granicę oznaczalności (LOQ) na poziomie 20 ng/ml
- amfetaminę i jej analogi, w tym metylenodiodoksy-metamfetaminę – LOQ 50 ng/ml
- kokainę i jej metabolit benzoilokogoninę – LOQ 50 ng/ml
- delta-9-tetrahydrokanabinol – LOQ 2 ng/ml
- benzodiazepiny [4].

Bardzo ważne jest ujednoczenie przepisów dotyczących interpretacji analizy toksykologicznej badanego materiału biologicznego, w tym próbek krwi pobranych od kierowców na obecność środków

działających podobnie do alkoholu w odniesieniu do stanów – po użyciu i pod wpływem działania tych środków. Podstawą do wysunięcia propozycji ujednoczenia tych przepisów było uczestnictwo Polski w największym programie naukowo-badawczym w Unii Europejskiej w obszarze bezpieczeństwa ruchu drogowego, jakim był program DRUID – *DRiving Under the Influence of Drugs, Alcohol and Medicines*, który zakończył się w 2011 roku. W programie uczestniczyło 19 krajów członkowskich, 37 różnych instytucji i ponad 200 ekspertów. Głównymi celami programu były:

- diagnoza problemu prowadzenia pojazdu po spożyciu alkoholu, narkotyków i wybranych leków
- ocena zagrożeń związanych z pojawieniem się w ruchu drogowym tych substancji
- ustalenie progów dla różnych nielegalnych substancji psychoaktywnych, powyżej których prowadzenie pojazdu powinno być zakazane
- ocena i wybór najlepszych metod wykrywania substancji psychoaktywnych w organizmie kierowców
- określenie najlepszych strategii działania wobec kierowców, którzy zostali zatrzymani za prowadzenie pojazdu po zażyciu zakazanej substancji psychoaktywnej.

Celem badań DRUID w Polsce było określenie skali rozpowszechnienia alkoholu, leków i narkotyków w populacji kierowców i odniesienie do innych krajów uczestniczących w programie DRUID [5]. Biorąc pod uwagę wyniki programu DRUID, praktykę opiniodawczą oraz granice analityczne stosowanie w 11 krajach europejskich, w listopadzie 2012 roku w Krakowie grono analityków, lekarzy i prawników ustaliło polskie granice analityczne wartości progów dla stanu po użyciu i pod wpływem działania środków działających podobnie do alkoholu dla potrzeb opiniowania dla celów sądowych. Wartości opublikowano w materiałach konferencyjnych XXX Konferencji Toksykologów Sądowych [6] (patrz tab. 1).

Istotnym pod względem opiniodawczym czynnikiem mającym na celu prawidłową interpretację uży-

skiwanych wyników badań analitycznych jest również znajomość budowy chemicznej substancji należących do poszczególnych grup środków uzależniających, ich przemian metabolicznych zachodzących w ustroju oraz działania na organizm. Temu poświęcono pierwszą część artykułu. W drugiej zaś opisano metodę analityczną opracowaną w Zakładzie Badań Antydopingowych (ZBA) Instytutu Sportu, wykorzystywaną do analizy próbek krwi na obecność narkotyków i stymulantów. Metoda oparta na wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas pozwala na identyfikację prawie 30 substancji.

Charakterystyka poszczególnych grup środków odurzających

Opiaty

Opium zawiera około 20 alkaloidów należących do dwóch grup, takich jak:

- alkaloidy fenentrenowe (morfina, kodeina, tebaina)
- alkaloidy izochinolinowe (papaweryna, narkotyna [noskapina], narceina) [7].

Spośród tych alkaloidów największe znaczenie mają morfina, kodeina i tebaina, która nie ma działania narkotycznego, ale służy do produkcji innych związków psychoaktywnych [7].

Osoby uzależnione przyjmują opiaty przez wdychanie, palenie, iniekcje podskórne i dożylnie. Objawy działania widoczne na zewnątrz to m.in.:

- obojętność, senna, spowolnione ruchy
- zaburzenia motoryczne
- zaburzenia świadomości (euforia) tzw. haj (3–6 godz.)
- wystąpienie napadu drgawek
- częste oblizywanie warg (suchość w ustach)
- ekstremalnie zwężone źrenice (szpilkowate)
- obwisłe powieki
- zaburzenia w oddychaniu
- niewyraźna mowa.

Charakterystyka morfiny

Morfina uznawana jest za najważniejszy psychoaktywny składnik opium. Wywołuje zjawisko tolerancji oraz uzależnienia psychicznego i fizycznego. Nasila działanie innych środków działających depresyjnie na ośrodkowy układ nerwowy, np. leków uspokajających, nasennych, psychotropowych oraz alkoholu. Działanie morfiny jako środka silnie przeciwbólowego nasila się wraz ze wzrostem dawki. Czas przeciwbólowego działania morfiny różni się od drogi podania i wynosi po podaniu doustnym 4–6 godzin, po podaniu doodbytniczym i podskórnym – około 4 godzin, a dokałowym od 24 do 48 godzin [8]. Morfina występuje w organizmie w postaci wolnej i sprzężonej. W moczu ludzkim jest identyfikowana w 10% w postaci wolnej oraz w 75% w postaci 3-glukuronidu morfiny o okresie

Tabela 1
Propozycje granic analitycznych i wartości progów dla stanu po użyciu i pod wpływem

Substancja	Granice analityczne [ng/ml]	Wartość stężenia progowego [ng/ml] dla stanu	
		po użyciu	pod wpływem
THC	1	1–2,5	≥ 2,5
Amfetamina i pochodne	25	25–50	≥ 50
Kokaina	10	10–20	≥ 20
Benzoilekgonina	100	> 100	nie ustalono
Morfina	10	10–25	> 25

połowicznego wydalania do 4 godzin. Pozostałą część stanowi 6-glukuronid, 3-etero-siarczan i 3,6-diglukuronid morfiny. Wymienione metabolity są również obecne we krwi i w osoczu [7]. Dawka śmiertelna wynosi 120–250 mg – przy podaniu doustnym, a około 70 mg przy dożylnym [8].

Charakterystyka heroiny

Heroina jest ponad dwukrotnie silniejszym środkiem przeciwbólowym niż morfina. Efekt działania jest dużo szybszy, ale bardziej krótkotrwały niż w przypadku morfiny ze względu na lepszą rozpuszczalność w lipidach i łatwiejsze przechodzenie przez barierę krew-mózg. Heroina występuje również jako mieszanina z innymi narkotykami, np. *speedball* (szybka piłka), czyli mieszanina heroiny ze stymulantami – kokainą albo amfetaminą.

Heroina w organizmie ulega bardzo szybkiemu metabolizmowi, a jej okres półtrwania wynosi zaledwie 2–3 minuty. Metabolizm heroiny obejmuje:

- dwustopniową deacetylację do 6-acetylmorfiny, a następnie do morfiny
- N-demetylację do normorfiny (aktywność podobna do morfiny, ale słabsza)
- sprzężanie z kwasem glukuronowym i siarkowym.

Głównymi metabolitami heroiny występującymi w moczu przez 20–40 godzin po podaniu dożylnym są: 3-O-glukuronid morfiny (38,2% dawki), 6-O-monoacetylmorfina (1,3%), wolna morfina (4,2%) oraz niezmienniona heroina (0,1%). Inne glukuronidy morfiny oraz normorfina powstają z heroiny w znikomych ilościach [7]. W moczu po spożyciu heroiny często występuje również kodeina. Nie jest ona metabolitem heroiny, ale powstaje w wyniku deacetylacji acetylokodeiny stanowiącej zanieczyszczenie nielegalnie produkowanej heroiny. O stosowaniu heroiny może świadczyć także obecność w moczu 6-O-monoacetylmorfiny (MAM), jednak metabolit ten udaje się wykryć jedynie w ciągu 2–8 godzin po przyjęciu heroiny, gdyż szybko przekształca się w wolną morfinę. W przypadku zażywania heroiny dawka dożylna dla początkującego biorczy wynosi 5–10 mg, zaś przy silnym uzależnieniu wzrasta o 20–60 mg, natomiast dawka śmiertelna wynosi 70 mg przy podaniu dożylnym i 200–500 mg przy zażyciu doustnym [8].

Charakterystyka kodeiny

Kodeina (metylmorfina) to naturalny alkaloid występujący w opium. Jest stosowana jako lek przeciwkaszlowy oraz w mieszkankach przeciwbólowych (wykazuje 20% przeciwbólową aktywność morfiny). Jako lek kodeina jest podawana doustnie oraz jako składnik „polskiej heroiny” – dożylnie. Dobrze wchłania się z przewodu pokarmowego. Po podaniu domięśniowym osiąga maksymalne stężenie we krwi po 15–60 minutach, a po doustnym po około 1–2 godziny. Kodeina ulega biotransformacji do morfiny (O-demetylacja) oraz norkodeiny (N-demetylacja).

Kodeina i jej metabolity ulegają sprzężaniu z kwasem glukuronowym.

Amfetamina, metamfetamina i ich analogi: MDMA, MDEA, MDA

Charakterystyka amfetaminy

Amfetamina jest mieszaniną racemiczną dwóch stereoizomerów: prawoskrętnego, zwanego D-amfetaminą i lewoskrętnego – L-amfetaminą, różniących się między sobą działaniem fizjologicznym. Występuje w postaci tabletek, kapsulek, pigułek oraz proszku o barwie białej, żółtej, różowej czy brązowej w zależności od rodzaju zanieczyszczeń i substancji fałszujących. Jest przyjmowana doustnie, donosowo, dożylnie i podskórnice.

Objawy działania przyjmowania amfetaminy to m.in.:

- niepokój ruchowy i silne pobudzenie
- gadatliwość, nerwowość, drażliwość
- euforia, ale też wahania nastroju
- nadmierne poczucie pewności siebie lub nieuzasadniony strach
- obiektywna niezdolność do koncentracji (gonitwa myśli)
- niezdolność do logicznego myślenia
- rozszerzone źrenice wykazujące brak reakcji na światło
- przyspieszony oddech
- czasami zgrzytanie zębami, szczękoscisk
- zaczerwienienie skóry twarzy
- drżenie mięśniowe, zmęczenie spowodowane bezsennością
- znaczny spadek wagi (przy dłuższym używaniu).

Amfetamina dobrze i szybko wchłania się z przewodu pokarmowego i łatwo przenika przez barierę łożyskową. Jej okres biologicznego półtrwania wynosi od 4 do 6 godzin [9]. Jest zażywana w dawkach 5–15 mg/dobę przez początkujących biorców, a 100–2000 mg/dobę przez osoby przewlekłe ją stosujące. Amfetamina zaczyna działać po około 20 minutach po przyjęciu doustnym i jej działanie utrzymuje się przez 2–3 godziny. Maksymalne stężenie w osoczu jest zazwyczaj osiągane w ciągu 4 godzin po spożyciu [10]. Nie więcej niż 20% amfetaminy wiąże się z białkami surowicy krwi [10], a w moczu jest obecna w ciągu 20 minut po zażyciu. 20–30% dawki amfetaminy wydalana jest w postaci niezmiennionej, pozostała część jako fenylacetone, kwas hipurowy, kwas benzoowy – produkty dezaminacji, hydroksylowane metabolity – 4-hydroksyamfetamina oraz w formie sprzężonej (25% dawki). 4-hydroksyamfetamina ulega dalszym przemianom w 4-hydroksynorefedrynę [11].

Szybkość wydalania amfetaminy oraz wielkość frakcji niezmetabolizowanej różni się w zależności od pH moczu. Przy prawidłowej kwasowości moczu (pH 5–7) w ciągu doby wydalana jest około 30% dawki, jeśli moczu ma odczyn kwaśny wydalanie wzrasta do około 78%, a gdy

zasadowy – maleje do około 45%. Doustna dawka amfetaminy w ilości 10 mg odpowiada stężeniu we krwi 35 ng/ml, 25 mg – 41 ng/ml, a 30 mg odpowiada 111 ng/ml [8].

Należy również zwrócić uwagę na to, że amfetamina może powstać w organizmie w procesie metabolizmu niektórych związków wchodzących w skład leków dostępnych na receptę, np. selegiliny, a także niedostępnych w Polsce, np. mefenoreksu czy fenproporeksu.

Charakterystyka metamfetaminy

Metamfetamina występuje w postaci chlorowodoru, który jest białym proszkiem o gorzkim smaku dobrze rozpuszczalnym w wodzie. Dostępna jest także w formie tabletek. Narkotyk ten przyjmuje się doustnie, dożylnie, wdycha przez nos albo pali. Czysty chlorowodorek metamfetaminy nadający się do palenia występuje w postaci przezroczystych, błyszczących kryształów, przypominających lód (odmiana *ice*). Efektywność metamfetaminy zależy od drogi przyjęcia. Natychmiast po przyjęciu dożylnym lub paleniu występuje intensywne pobudzenie, tzw. *rush* lub *flash*. Natomiast wciągnięcie przez nos lub połknięcie wywołuje słabszą euforię, tzw. *high*, która pojawia się po 3–5 minutach od przyjęcia doustnego oraz po 15–20 minutach po zażyciu donosowym. Początkowe objawy zażywania narkotyku wywołują takie reakcje jak: pobudzenie, przyspieszenie oddechu, obniżenie łaknienia, podwyższenie temperatury ciała. Z czasem ujawniają się bóle w klatce piersiowej, nadciśnienie tętnicze, napady drgawkowe, uszkodzenie drobnych naczyń mózgowych prowadzące do udaru mózgu. Osoby nadużywające metamfetaminy zachowują się agresywnie, cierpią na bezsenność, odczuwają stały niepokój. Zażywanie tej substancji wywołuje silne uzależnienie.

Okres biologicznego półtrwania metamfetaminy wynosi 10 godzin dla wszystkich dróg podania. Około 44% dawki wydalą się w postaci niezmetabolizowanej. Od 6 do 20% dawki ulega N-demetylacji do amfetaminy, a około 10% hydroksylacji do 4-hydroksyamfetaminy. Również w przypadku tej substancji pH moczu ma wpływ na szybkość i procentową ilość wydalanej substancji z organizmu [11].

Psychoaktywne analogi strukturalne amfetaminy i metamfetaminy powstały przez wprowadzenie cyklicznego układu dioksymetylenowego złożonego z dwóch atomów tlenu i grupy metylenowej. W wyniku tego otrzymuje się pochodne takie jak 3,4-metylenodioksymetamfetamina (MDMA), 3,4-metylenodioksy-N-etyloamfetamina (MDEA) oraz 3,4-metylenodioksyamfetamina (MDA). W 1986 roku Nichols wprowadził specjalny termin „entaktogeny” mający na celu określenie tych związków. Termin ten wywodzi się od greckiego słowa *endon* (wewnątrz) oraz łacińskich *genero* (rodzić) i *tactus* (działanie), co oznacza „działanie od środka” [12, 13].

Charakterystyka MDMA

MDMA to syntetyczny analog metamfetaminy i meskaliny mający właściwości pobudzające i halucynogenne jak meskalina. Najczęściej występuje w postaci chlorowodoru. Jest przyjmowana głównie doustnie w postaci białego proszku, a także różnokolorowych tabletek, kapsułek z wytłoczonymi znakami, symbolami oraz napisami. Tabletki i kapsułki mogą dodatkowo zawierać amfetaminę, metamfetaminę, kokainę oraz acetaminofen. Głównymi objawami zażycia MDMA są: euforia, silne pobudzenie, brak apetytu, szczękościsk, rozszerzenie źrenic, nagłe wzrosty ciśnienia, halucynacje wzrokowe, napady paniki i wybuchy agresji. MDMA dobrze wchłania się z przewodu pokarmowego i łatwo pokonuje barierę krewmózg. Znaczna część narkotyku wydalą się w moczu w postaci niezmienionej. Główne drogi metabolizmu tego środka to:

N-demetylacja, O-demetylacja, dezaminacja, O-aliacja [14].

Głównym metabolitem MDMA jest 4-hydroksy-3-metoksymetamfetamina (HMMA). W wyniku N-demetylacji powstaje MDA, a znaczącym metabolitem jest 4-hydroksy-3-metoksyamfetamina (HMA). Inne metabolity występują w mniejszych ilościach.

Dihydroksymetamfetaminy (HHMA) i dihydroksyamfetaminy (HHA) nie można wykryć w osoczu, ponieważ są substancjami nietrwałymi oraz ulegają szybkiej przemianie do HMA i HMMA. Wartość pH moczu wpływa na szybkość wydalania MDMA z organizmu. 70% dawki wydalą się w postaci niezmienionej, gdy pH moczu jest mniejsze niż 5 [8]. Skuteczna dawka narkotyku wynosi od 75 do 200 mg (1–2 tabletki), a efekty działania pojawiają się zwykle po 30 minutach od przyjęcia i nasilają się w ciągu jednej godziny. Działanie narkotyku ustępuje po około 4–6 godzinach. Doustna dawka MDMA w ilości 50 mg odpowiada stężeniu we krwi 106 ng/ml, 70 mg – 41 ng/ml, natomiast 100 mg odpowiada 180 ng/ml [8].

Charakterystyka MDA

MDA to narkotyk syntetyczny, który w latach sześćdziesiątych XX wieku cieszył się dużą popularnością wśród hipisów jako tzw. *mellow drug of America* lub *love drug*.

Występuje jako chlorowodorek w postaci proszku, tabletek lub kapsułek. Efektywna dawka narkotyku wynosi między 80 a 160 mg, a jego działanie utrzymuje się przez 6 do 10 godzin. MDA wywołuje silniejsze niż MDMA efekty psychodeliczne i halucynogenne. Po zażyciu MDA następuje zaburzenie orientacji, pojawiają się natrętne myśli i odczuwalny jest silny niepokój wewnętrzny [9, 11, 15, 16].

Charakterystyka MDEA

MDEA występuje w postaci chlorowodoru w tabletkach i pigułkach i podobnie jak MDA jest

dodawana do tabletek ecstasy. Średnia dawka MDEA dla przeciętnego biorcy wynosi około 150 mg i działa od 3 do 5 godzin. Wywołuje podobne objawy do MDMA, ale w przeciwieństwie do MDMA nie powoduje wzmożonej aktywności, lecz raczej wykazuje działanie uspokajające. Po jej zażyciu pojawiają się m.in. takie objawy, jak: halucynacje, paranoja, obłąd. MDEA wydalana jest z organizmu głównie w postaci niezmienionej. Omawiając analogi strukturalne amfetaminy i metamfetaminy, należy zwrócić również szczególną uwagę na dwa związki psychoaktywne: PMA – parametoksyamfetaminę i PMMA – parametoksymetamfetaminę. PMMA charakteryzuje się toksycznością i efektami działania podobnymi do MDMA, ale ma słabsze działanie stymulujące. PMA występuje najczęściej w postaci tabletek, które wyglądem przypominają ecstasy, które w swym składzie zawierają MDMA. PMA wykazuje działanie dużo bardziej toksyczne niż amfetamina oraz charakteryzuje się niewielką różnicą pomiędzy dawką wywołującą oczekiwane przez biorcę efekty, a dawką letalną. To wszystko sprawia, że obecność w tabletkach PMA zamiast MDMA może prowadzić do przypadkowych zatruc. PMA powoduje silne pobudzenie psychomotoryczne, bardzo duże przyspieszenie tętna, zwiększając ciśnienie, drgawki, skurcze mięśni, poty, zatrzymanie akcji serca. Narkotyk ten wykazuje również działanie halucynogenne, ponad pięciokrotnie silniejsze od meskaliny [9].

Kokaina i jej metabolity

Kokaina jest estrem ekgoniny oraz alkoholu metylowego i kwasu benzoowego i należy do alkaloidów tropanowych wywodzących się z tropanu jako produktu kondensacji pierścieni piperidyny i pirolidyny. Na rynku narkotykowym dostępna jest w postaci chlorowodoru kokainy („koka”, „charlie”) oraz w formie krystalicznej, wolnej zasady kokainy jako tzw. krak (*crack*) [17]. Chlorowodorek kokainy jest białą krystaliczną substancją o charakterystycznym gorzkim smaku, która w temperaturze topnienia (około 197°C) ulega rozkładowi. Kokaina zasadowa, podobnie jak chlorowodorek, ma również postać białego krystalicznego proszku o temperaturze topnienia nieco niższej (96–98°C). Ponieważ w wyższych temperaturach ulatnia się bez rozkładu, pozwala to na palenie jej w fajce lub w postaci papierosa. Preparaty kokainy sprzedawane na wolnym rynku są zafalszowywane różnymi substancjami, takimi jak np.: fenacetyna (*phenacetin*), lignokaina (*lignocaine*), benzokaina (*benzocaine*), prokaina (*procaine*), kofeina (*caffeine*), paracetamol (*paracetamol*), cukry (*sugars*), atropina [18].

Kokaina może być przyjmowana różnymi drogami: przez nos (*sniffing*, *snorting*) lub w postaci iniekcji dożylnych oraz domięśniowych. Używana bywa doustnie, podjęzykowo, dopochwowo, doodbytniczo. Widoczne objawy zażywania kokainy to m.in.:

- czerwony nos, często z krostami lub objawami egzemy
- rozszerzone źrenice
- błądliwość twarzy
- mała masa ciała, ogólne osłabienie
- gadatliwość, gonitwa myśli
- częste zawroty głowy i wymioty.

Kokaina powoduje bardzo silne uzależnienie psychiczne [19]. W dużych dawkach działa depresyjnie na ośrodkowy układ nerwowy, co może prowadzić do porażenia oddechu i krążenia [20]. Kokaina w organizmie podlega wielu przemianom, które prowadzą do powstania produktów pochodnych. Przeciętny czas półtrwania w organizmie zależy od dawki i wynosi 20–90 minut, a przy ciągłym zażywaniu może wzrosnąć nawet do 110 godzin [21].

Kokaina ulega intensywnemu metabolizmowi, tylko 1–5% dawki narkotyku wydalana się w moczu w postaci niezmienionej. Wielkość tej frakcji wzrasta wraz ze wzrostem kwasowości moczu. 25–45% podanej dawki kokainy ulega hydrolizie do benzoilokogoniny, a 18–22% do estru metylowego ekgoniny. W ciągu 3 dni około 70% przyjętej dawki wydalana się w moczu, a tylko 4–6% w kale [9]. Pierwszym etapem przemiany metabolicznej kokainy jest hydroliza jednej lub obu grup estrowych do nieaktywnych farmakologicznie metabolitów: benzoilokogoniny i estru metylowego ekgoniny, a następnie ekgoniny [22]. W wyniku N-demetylacji kokainy tworzy się norkokaina wykazująca aktywność farmakologiczną zbliżoną do kokainy. U narkomanów kokainowych, którzy piją alkohol, dochodzi do enzymatycznej transestryfikacji kokainy w obecności alkoholu etylowego, która zachodzi w wątrobie pod wpływem niespecyficycznych karboksylolizaz, czego wynikiem jest wytworzenie estru etylowego benzoilokogoniny, czyli kokaetyleny zwanego inaczej etylokokainą. W porównaniu z kokainą ma on dłuższy okres biologicznego półtrwania wynoszący około 2–2,5 godz. [9].

Efekty oddziaływania kokainy na organizm zależą przede wszystkim od sposobu jej przyjmowania oraz od zażytej dawki. Maksymalne stężenie kokainy w osoczu krwi występuje 50–60 minut po podaniu doustnym, 30–40 minut – po donosowym, 5 minut po paleniu oraz 2–3 minuty po iniekcji dożylniej. Efekty tych oddziaływań można podzielić na trzy fazy działania [20]:

I faza: stymulacyjna, euforii lub „haju”: biorca ma dobre samopoczucie, jest gadatliwy, wesoty, euforyczny, ma obniżone uczucie głodu, ograniczoną potrzebę snu z towarzyszącym wzrostem ciśnienia i przyspieszeniem tętna. Po zażyciu większej dawki pojawia się niepokój, występują zachowania agresywne i gwałtowne, którym towarzyszą bóle głowy, brzucha, wymioty, poty, dreszcze. Ze względu na szybki metabolizm kokainy stan I fazy jest zwykle krótki.

II faza: przedłużona stymulacja, tzw. rausz kokainowy: mogą pojawiać się stany lękowe oraz negatywny odbiór otoczenia.

III faza: depresja: pojawia się silne uczucie zmęczenia, obniżony nastrój i dążenie do zażycia kolejnej dawki.

Delta 9-tetrahydrokanabinol i jego metabolity

Kanabinoły są to związki o 21 atomach węgla o budowie dibenzopirany występujące wyłącznie w konopiach. Obecnie znanych jest ponad 60 kanabinoli, w tym największą aktywność biologiczną wykazuje $\Delta 9$ -tetrahydrokanabinol ($\Delta 9$ -THC). W dużej ilości kanabinoły znajdują się w kwitnących i owocujących wierzchołkach oraz liściach rośliny *Cannabis* (typ narkotykowy). Preparaty *Cannabis* przyjmuje się najczęściej poprzez palenie, rzadziej doustnie. Podczas palenia następuje rozkład części $\Delta 9$ -THC i do płuc dostaje się tylko 20–70% aktywnego związku zawartego w marihuanie, przy czym jego zawartość w dymie papierosowym jest uzależniona od techniki palenia.

Objawy działania $\Delta 9$ -THC to m.in.:

- słodkawa woń oddechu
- gadatliwość i wesołkowatość, stany euforyczne
- przekrwienie spojówek, niekiedy obrzęk powiek, oczopląs, światłowstręt
- wysuszenie śluzówek jamy ustnej, ataki kaszlu
- ogólne podniecenie, aktywność psychoruchowa
- ataksja, zawroty głowy, drżenie ciała
- zaburzenia pamięci (krótkotrwałej), zaburzenia zdolności koncentracji i uwagi
- zaburzenia poczucia czasu, dezorientacja, zaburzenia zdolności krytycznego myślenia
- pocenie się, bladeść skóry [9].

W celu wywołania uczucia euforii okazyjni palacze marihuany potrzebują zaledwie od 2 do 3 mg $\Delta 9$ -THC, a jednym ręcznie przygotowanym „skrętem” może się wprowadzić w stan odurzenia od 2 do 4 początkujących palaczy [23]. THC ulega w organizmie intensywnemu metabolizmowi [9] i do moczu przechodzi mniej niż 1% niezmienionego związku. Podczas palenia marihuany procesy metaboliczne rozpoczynają się w płucach, a po jej doustnym stosowaniu głównie w wątrobie. W ciągu 72 godzin po paleniu blisko 50% wdychanego THC wydalą się w postaci metabolitów, a pozostałe 50% ulega dystrybucji w różnych tkankach. Jest szczególnie silnie zatrzymywany przez tkankę tłuszczową, z której uwalnia się bardzo powoli, przez szereg dni. Wydalanie odbywa się głównie w kale (65%) i przez nerki (25%). Biologiczny okres półtrwania THC wynosi 20 godzin i świadczy o powolnym przebiegu eliminacji tego związku z ustroju.

Głównym szlakiem metabolicznym w biotransformacji $\Delta 9$ -THC jest utlenianie węgla 11 z utworzeniem 11-hydroksy- $\Delta 9$ -tetrahydrokanabinolu (11-OH- $\Delta 9$ -THC), który wykazuje aktywność zbliżoną do $\Delta 9$ -THC. 11-OH- $\Delta 9$ -THC następnie ulega przemianie w nieaktywny metabolit, kwas 11-nor- $\Delta 9$ -tetrahydrokanabinolowy (THC-COOH), który z kwasem glukuronowym tworzy glukuronian. Zarówno THC-COOH,

jak i jego glukuronian występują w moczu w największych ilościach. Produkt utlenienia $\Delta 9$ -THC przy węglu 8, tj. 8 β -hydroksy- $\Delta 9$ -THC, wykazuje ok. 4% aktywności związku macierzystego, natomiast 8 α -hydroksy- $\Delta 9$ -THC, różniący się jedynie konfiguracją grupy hydroksylowej, jest praktycznie pozbawiony aktywności [9].

Palenie marihuany wywołuje w osoczu szybki wzrost stężenia $\Delta 9$ -THC, który następnie ulega obniżeniu i po 2–3 godzinach staje się niewykrywalny, a jednocześnie wzrasta stężenie THC-COOH, który można wykrywać przez około 6 godzin. Różny jest też profil metaboliczny $\Delta 9$ -THC we krwi. Zależy on w głównej mierze od drogi przyjęcia związku. Na przykład po paleniu papierosów z marihuany i po dożylnym przyjęciu $\Delta 9$ -THC stężenie nieaktywnego metabolitu 11-OH- $\Delta 9$ -THC stanowi 10–15% stężenia $\Delta 9$ -THC, natomiast po doustnym przyjęciu – około 50%. Spowodowane jest to wynikiem tzw. efektu pierwszego przejścia, jakiemu ulega $\Delta 9$ -tetrahydrokanabinol w wątrobie przed dotarciem do krążenia ogólnego. Dlatego też aktywne metabolity $\Delta 9$ -THC: 11-hydroksy- $\Delta 9$ -tetrahydrokanabinol oraz 8 β -hydroksy- $\Delta 9$ -THC są w małym stopniu odpowiedzialne za efekty obserwowane po dożylnym i dołucnym przyjmowaniu $\Delta 9$ -THC, a mogą znacząco wpływać na te efekty po przyjęciu doustnym.

Opisując substancje z grupy *cannabis*, należy również wziąć pod uwagę kanabinomimetyki – aktywne substancje, które wchodzi w skład tzw. dopalaczy, których zażywanie jest związane z zagrożeniem dla zdrowia i życia. Analiza dotychczas zidentyfikowanych związków pozwala podzielić je na grupy w zależności od budowy chemicznej, tj. pochodne:

- naftyloindolu (np. JWH-015, JWH-018, JWH-073)
- naftylometyloindolu
- naftoilopirołu
- naftlometylidenoindenu
- fenyloacetyloindolu (np. JWH-250)
- cykloheksylofenolu (np. CP47,497)
- dibenzopirany (strukturalne analogi $\Delta 9$ -THC – HU-210) [6].

Struktury chemiczne niektórych syntetycznych kanabinoidów przedstawiono w literaturze [24].

W wyniku zażycia syntetycznych kanabinoidów występują efekty bardzo podobne do tych, które wywołują wprowadzone do organizmu produkty konopi innych niż włókniste, takich jak ziele lub żywica, popularnie znanych jako marihuana i haszysz. Są to m.in. zmiana nastroju i samopoczucia, błogostan, euforia, halucynacje, czasami depresja, apatia i urojenia. Zażycie tych substancji powoduje wzrost ciśnienia krwi, tachykardię, przekrwienie gałek ocznych, zaburzenia koordynacji ruchowej, uwagi, zawroty głowy, wysuszenia śluzówek. Zbliżone efekty działania są skutkiem oddziaływań syntetycznych kanabinomimetyków na te same receptory, na które oddziałuje aktywny składnik roślin konopi delta-9-tetrahydrokanabinol.

Benzodiazepiny

Benzodiazepiny są klasą związków liczącą blisko 3000 substancji, z czego około 50 znalazło zastosowanie w leczeniu. Duże spektrum zastosowań klinicznych benzodiazepin jest ściśle powiązane z ich szerokim profilem terapeutycznym, związanym z działaniem:

- nasennym (ułatwiającym zasypianie i pogłębienie snu) (flunitrazepam, estazolam, midazolam, triazolam, temazepam)
- przeciwłękowym, czyli anksjolitycznym (diazepam, medazepam, oksazepam, chlordiazepoksyd, halazepam, lorazepam)
- uspokajającym (nordiazepam)
- miorelaksacyjnym, czyli obniżającym napięcie mięśni szkieletowych (tetrazepam)
- przeciwdrgawkowym (klonazepam).

Benzodiazepiny charakteryzują się różną wielkością dawki terapeutycznej, która wynosi np. dla flunitrazepamu 1–2 mg, alprazolamu 1–3 mg, estazolamu 2–6 mg, diazepam 5–30 mg, temazepamu 7–30 mg, medazepamu 5–25 mg, oksazepamu 10–60 mg.

Stopień wiązania benzodiazepin z białkami krwi jest bardzo wysoki i wynosi średnio 70–99%. W związku z tym tylko nieznaczna część wprowadzonego do organizmu leku decyduje o efekcie farmakodynamicznym. Benzodiazepiny charakteryzują się również bardzo różnymi wartościami okresów biologicznego półtrwania. Poniższa tabela charakteryzuje wartości okresów półtrwania wybranych benzodiazepin oraz ich metabolitów – tabela 2.

Benzodiazepiny są związkami lipofilnymi, łatwo przechodzą przez barierę krew–mózg. Ich nadużywanie może doprowadzić do występowania różnych objawów niepożądanych, na które składają się m.in.:

- senność, spowolnienie ruchu, zaburzenie widzenia
- zatrzymanie moczu, zaparcia
- podniecenie i agresywne zachowanie, tachykardia.

Pod względem budowy chemicznej w klasycznych benzodiazepinach podstawową strukturą jest układ 1,4-benzodiazepiny, w którym do 1,4-diazepiny (pierścień A) jest dołączony pierścień benzenowy (pierścień B). Wyjątek stanowi klobazam jako pochodna 1,5-benzodiazepiny i tofizepam – pochodna 2,3-benzodiazepiny [26].

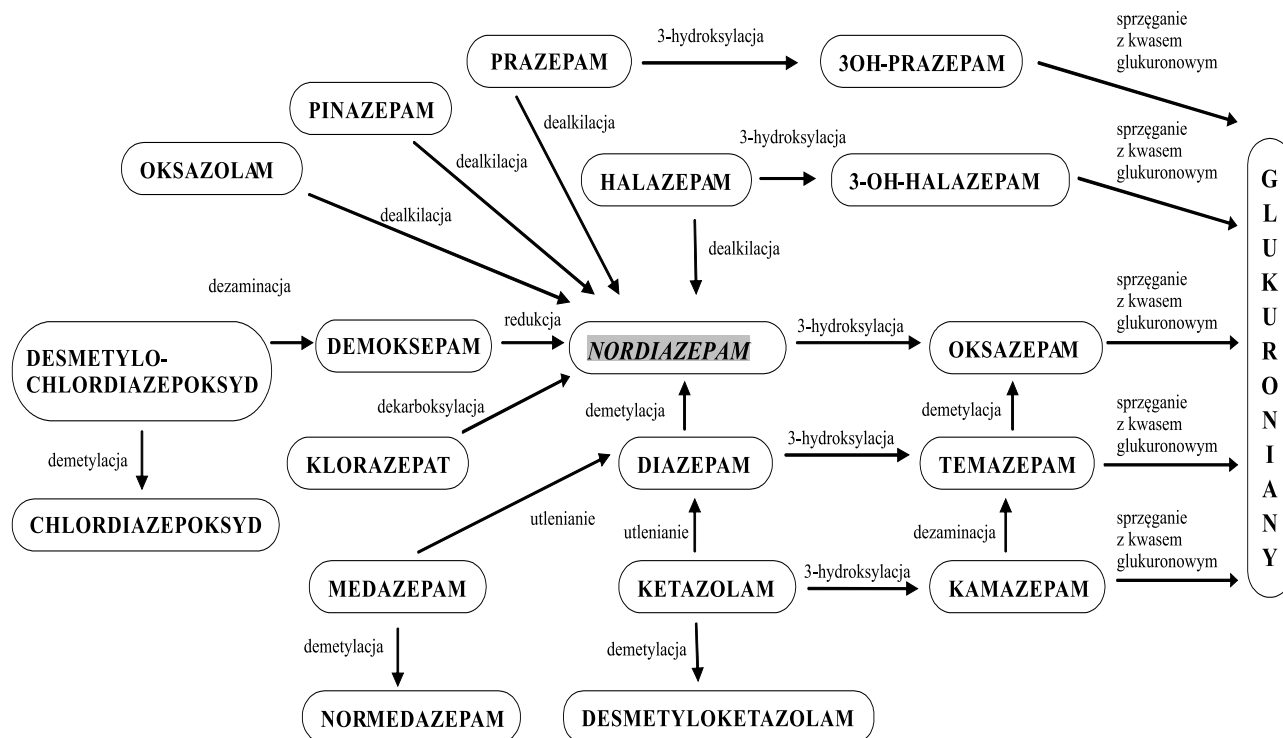
Benzodiazepiny metabolizowane są głównie w wątrobie i tylko w niewielkim stopniu są wydalane w postaci niezmienionej. W organizmie ulegają następującym procesom metabolicznym:

- hydroksylacji łańcuchów alifatycznych i pierścieni aromatycznych
- dezalkilacji (najczęściej odłączenie grupy metylowej)
- redukcji grupy nitrowej
- acetylacji
- sprzęganiu z kwasem glukuronowym.

Schemat przemiany metabolicznej benzodiazepin w diazepam i nordiazepam przedstawiono na rycinie 1 [9].

Tabela 2
Wartości okresów półtrwania wybranych benzodiazepin oraz ich metabolitów wg [25]

Benzodiazepina	Związek macierzysty i metabolity	T _{1/2} [h]
Alprazolam	-alprazolam	9–30
	-α-hydroksyalprazolam	1–2
Bromazepam	-bromazepam	9–19
	-3-hydroksybromazepam	
Chlordiazepoksyd	-chlordiazepoksyd	5–30
	-nordazepam	50–99
	-oksazepam	5–15
Diazepam	-diazepam	20–50
	-nordazepam	50–99
	-oksazepam	5–15
Estazolam	-estazolam	12–18
	-4-hydroksyestazolam	
Flunitrazepam	-flunitrazepam	11–25
	-7aminoflunitrazepam	
Flurazepam	-flurazepam	2–3
	-desalkylflurazepam	50–100
Ketazolam	-ketazolam	1,5
	-diazepam	20–90
	-nordazepam	50–99
	-oksazepam	5–15
Klobazam	-klobazam	10–50
	-norklobazam	40
Klonazepam	-klonazepam	10–50
Lorazepam	-lorazepam	8–25
Lormetazepam	-lormetazepam	10
	-lorazepam	8–25
Midazolam	-midazolam	1–5
	-α-hydroksymidazolam	1
	-4-hydroksymidazolam	1
Medazepam	-medazepam	1–2
	-diazepam	22–50
	-nordazepam	50–99
	-oksazepam	5–15
	-temazepam	3–38
-normedazepam		
Nitrazepam	-nitrazepam	18–38
Nordazepam	-nordazepam	50–99
	-oksazepam	5–15
Oksazepam	-oksazepam	5–15
Oksazolam	-oksazolam	50–99
	-nordazepam	
Przepam	-prazepam	3
	-nordazepam	50–99
	-3-hydroksyprazepam	5–15
	-oksazepam	
Temazepam	-temazepam	3–38
	-oksazepam	5–15
Tetrazepam	-tetrazepam	13–44
	-3-hydroksytetrazepam	
Triazolam	-triazolam	1–4
	-α-hydroksytriazolam	4
	-4-hydroksytriazolam	4



Ryc. 1. Przemiany metaboliczne benzodiazepin-opracowano na podstawie [9]

W centrum przemiany metabolicznej znajduje się nordiazepam, w który przekształcają się inne leki benzodiazepinowe, takie jak diazepam, klorazepat, chlordiazepoksyd, oksazolam, pinazepam, halazepam, prazepam. Nordiazepam natomiast ulega hydroksylacji do oksazepamu. Ponieważ okres połowicznego wydalania nordiazepamu jest długi, benzodiazepiny, które się w niego przekształcają, uważane są za leki o długim okresie działania.

Opis metody analitycznej wykorzystywanej do analiz próbek krwi na obecność substancji psychotropowych

Materiały i metody

Materiał biologiczny

Materiał biologiczny do badań stanowiły próbki krwi kontrolnej potrzebnej do opracowania metody oraz krwi przyżyciowej pobranej przez odpowiednie organy wymiaru sprawiedliwości w celu stwierdzenia obecności środków odurzających.

Substancje wzorcowe

Użyto następujących substancji wzorcowych [27]:

- alprazolam (8-chloro-1-methyl-6-phenyl-4H-[1,2,4] triazolo[4,3-a][1,4]benzodiazepine)
- bromazepam (7-bromo-5-pyridin-2-yl-1,3-dihydro-1,4-benzodiazepin-2-one)

- chlordiazepoksyd (chlordiazepoxide, 7-chloro-4-hydroxy-N-methyl-5-phenyl-3H-1,4-benzodiazepin-2-imine)
- klonazepam (clonazepam, 5-(2-chlorophenyl)-7-nitro-1,3-dihydro-1,4-benzodiazepin-2-one)
- klobazam (clobazam, 7-chloro-1-methyl-5-phenyl-1,5-benzodiazepine-2,4-dione)
- diazepam (7-chloro-1-methyl-5-phenyl-3H-1,4-benzodiazepin-2-one)
- estazolam (8-chloro-6-phenyl-4H-[1,2,4]triazolo[4,3-a][1,4]benzodiazepine)
- lorazepam (7-chloro-5-(2-chlorophenyl)-3-hydroxy-1,3-dihydro-1,4-benzodiazepin-2-one)
- lormetazepam (7-chloro-5-(2-chlorophenyl)-3-hydroxy-1-methyl-3H-1,4-benzodiazepin-2-one)
- midazolam (8-chloro-6-(2-fluorophenyl)-1-methyl-4H-imidazo[1,5-a][1,4]benzodiazepine)
- nitrazepam (7-nitro-5-phenyl-1,3-dihydro-1,4-benzodiazepin-2-one)
- nordiazepam (7-chloro-5-phenyl-1,3-dihydro-1,4-benzodiazepin-2-one)
- oksazepam (oxazepam, 7-chloro-3-hydroxy-5-phenyl-1,3-dihydro-1,4-benzodiazepin-2-one)
- temazepam (7-chloro-3-hydroxy-1-methyl-5-phenyl-3H-1,4-benzodiazepin-2-one)
- zaleplon (N-[3-(3-cyanopyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7-yl)phenyl]-N-ethylacetamide)
- zopiklon (zopiclone, [6-(5-chloropyridin-2-yl)-5-oxo-7H-pyrrolo[3,4-b]pyrazin-7-yl]4-methylpiperazine-1-carboxylate)
- amfetamina (amphetamine, 1-phenylpropan-2-amine)

- metamfetamina (metamphetamine, (2S)-N-methyl-1-phenylpropan-2-amine)
- hydroksyamfetamina (hydroxyamphetamine, 4-(2-aminopropyl)phenol)
- MDMA (1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-N-methylpropan-2-amine)
- MDA (4-[(4-aminophenyl)methyl]aniline)
- kokaina (cocaine, methyl (3S,4R)-3-benzoyloxy-8-methyl-8-azabicyclo[3.2.1]octane-4-carboxylate)
- morfina (morphine, (4R,4aR,7S,7aR,12bS)-3-methyl-2,4,4a,7,7a,13-hexahydro-1H-4,12-methanobenzo[3,2-e]isoquinoline-7,9-diol)
- LSD ((6aR,9R)-N,N-diethyl-7-methyl-6,6a,8,9-tetrahydro-4H-indolo[4,3-fg]quinoline-9-carboxamide).
Wyżej wymienione wzorce pochodziły z firm Ceriliant, EDQOM, SIGMA oraz NARL.
Benzoiloeckgonina (benzoylecgonine, (1R,2R,3S,5S)-3-benzoyloxy-8-methyl-8-azabicyclo [3.2.1]octane-2-carboxylic acid) pochodziła z „Polfy” SA.
- Kodeina – lek Thiocodin
- Klorazepam – lek Clorannxen
- Medazepam – lek Rudotel
- Zolpidem – lek Zolpic.

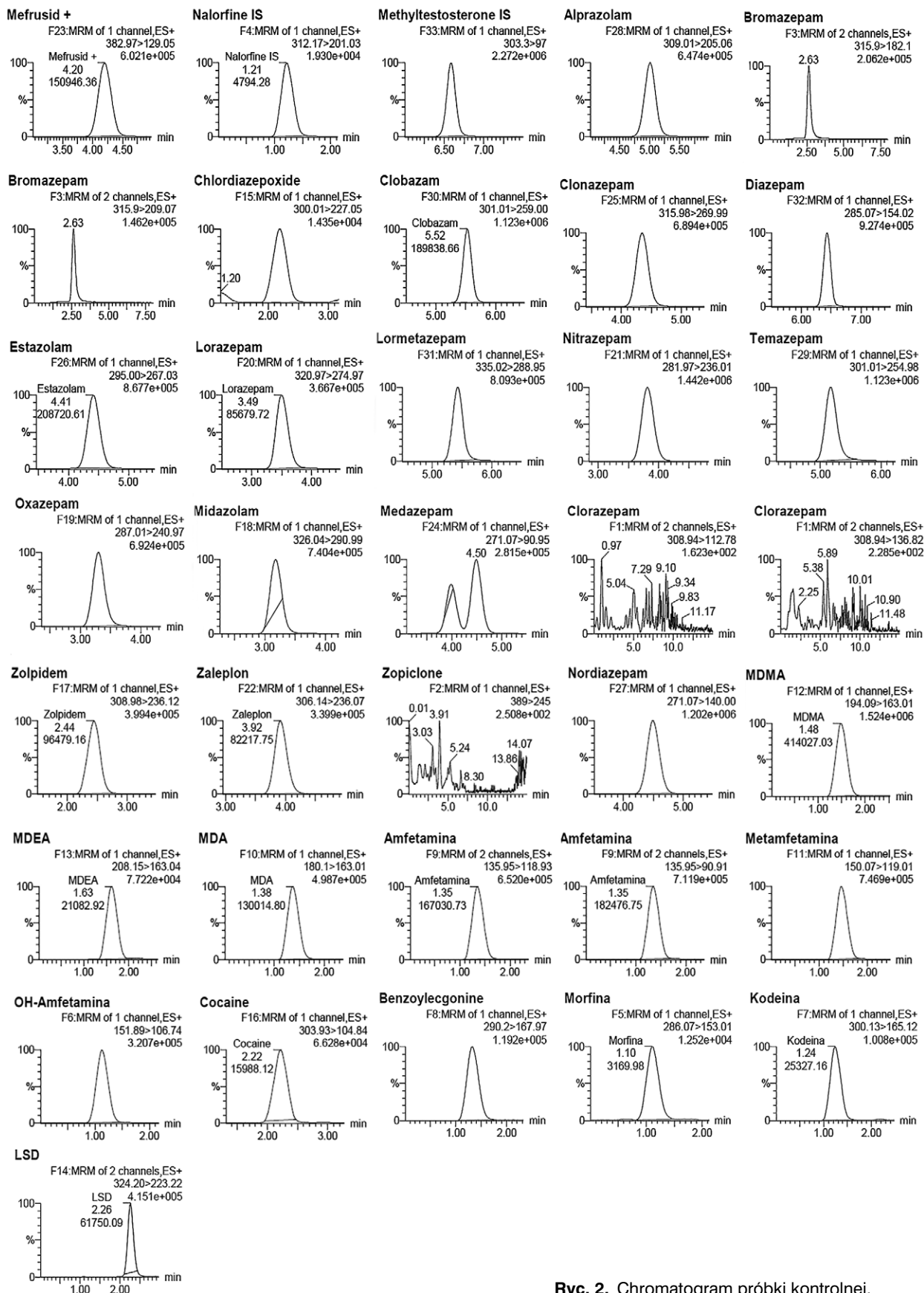
Tabela 3

Wybrane parametry analityczne związków w układzie LC-MS/MS

Badany związek	RT (min)	[M+H] ⁺	MRM m/z	Napięcie stożka (V)	Energia zderzeń (V)
Alprazolam	5	309,01	205,06	45	40
Bromazepam	2,63	315,9 315,9	182,1 209,07	45	30 25
Chlordiazepoksyd	2,20	300,01	227,05	25	25
Klobazam	5,52	301,01	259	35	20
Klonazepam	4,36	315,98	269,99	45	25
Diazepam	6,44	285,07	154,02	45	25
Estazolam	4,41	295	267,03	45	25
Lorazepam	3,49	320,97	274,07	35	20
Lormetazepam	5,42	335,02	288,95	35	20
Nitrazepam	3,81	281,97	236,01	45	25
Temazepam	5,16	301,01	254,98	30	20
Oksazepam	3,30	287,01	240,97	30	20
Midazolam	3,18	326,04	290,99	45	25
Medzepam	3,90	271,07	90,95	35	30
Klorazepam	–	308,94	112,78 136,82	40	15
Zolpidem	2,44	308,98	236,12	40	35
Zaleplon	3,92	306,14	236,07	45	25
Zopiklon	–	389	245	30	25
Nordiazepam	4,48	271,07	140	45	30
MDMA	1,48	194,09	163,01	25	15
MDEA	1,63	208,15	163,04	25	15
MDA	1,38	180,1	163,01	25	15
Amfetamina	1,35	135,95	90,91 118,93	20	20 10
Metamfetamina	1,45	150,07	119,01	20	10
OH-Amfetamina	1,12	151,89	106,74	15	20
Kokaina	2,22	303,93	104,84	30	35
Benzoiloeckgonina	1,33	290,2	167,97	30	20
Morfina	1,10	286,07	153,01	40	45
Kodeina	1,24	300,13	165,12	40	40
LSD	2,26	324,20	208,2 223,22	40	35 25
Metylotestosteron IS	6,77	303,3	97	45	27
Mefrusid IS	2,26	382,97	129,05	25	20

Method: C:\MassLynx\MassLynxProjects\Benzodiazepiny.PRO\MethDB\Benzodiazepins_20120209 Scr.mdb 19 Mar 2012 10:52:49
 Calibration: 10 May 2012 16:16:42

Name: QC1 20120509, Date: 09-May-2012, Time: 11:06:25, ID: , Description:



Ryc. 2. Chromatogram próbki kontrolnej.

Podstawowe odczynniki chemiczne

Acetonitryl, 1-chlorobutan, dichlorometan i octan etylu cz.d.a (firma J.T. Baker).

Inne materiały pomocnicze

Do przygotowania próbek do analizy instrumentalnej użyto wytrząsarki firmy IKA, wymrażarki HAAKE, wirówki MLW JANETZKI oraz urządzenia do odparowania próbek pod azotem.

Przygotowanie próbek krwi

Do 1 ml próbki krwi, dodawano jako standard wewnętrzny mefrusid oraz metylotestosteron o stężeniu 100 µg/ml każdy. Do przygotowania próbek wykorzystano metodę podwójnej ekstrakcji ciecz–ciecz za pomocą 1-chlorobutanu i mieszaniny dichlorometanu i octanu etylu (70 : 30, v/v). Tak przygotowane próbki mieszano, wytrząsano, odwirowywano i wymrażano. Następnie po wyizolowaniu warstw organicznych obie warstwy odparowano w strumieniu azotu. Po odparowaniu eluatów ekstrakty rozpuszczono w mieszaninie acetonitryl: woda (4 : 6, v/v) i tak przygotowaną próbkę wprowadzono na kolumnę systemu LC-MS/MS.

Stosowane metody instrumentalne

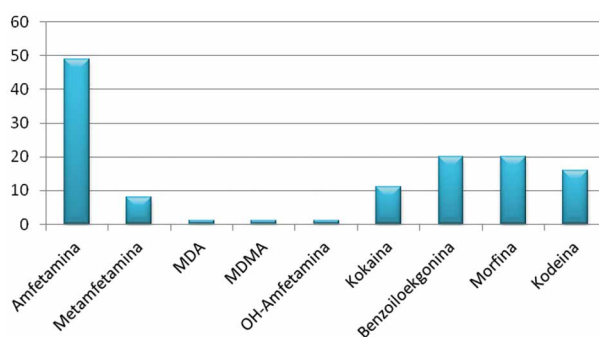
Zastosowano układ chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas (LC-MS/MS) z użyciem aparatu LC Waters Alliance 2695XC/ MS Micromass Quattro Micro API z tandemowym układem kwadropolowych analizatorów mas.

Rozdział chromatograficzny

Rozdział chromatograficzny przeprowadzono na chromatografie cieczowym Alliance 2695 firmy Waters na kolumnie Restek Allure Biphenyl (100 x 2,1 mm, wielkość cząstki 3 µm). Warunki analizy LC: przepływ przez kolumnę 0,300 ml/min, temperatura kolumny 45°C, dozowana objętość 10 µl, czas analizy 15 minut. Analizę chromatograficzną przeprowadzono w systemie gradientowym mieszaniny dwóch faz ruchomych: faza A – woda z dodatkiem 0,5% kwasu octowego oraz faza B – acetonitryl z dodatkiem 0,5% kwasu octowego. Związki rozdzielano za pomocą następującego gradientu (w stosunku do fazy ruchomej A): 0 min 60%, 1 min 60%, 9 min 10%, 10 min 60%, 15 min 60%.

Oznaczanie

Zastosowano spektrometr mas Micromass Quattro Micro API wyposażony w tandemowy układ kwadropolowych analizatorów mas. Detektor mas pracował w trybie jonizacji elektronowej ESI+, w warunkach trybu monitorowania reakcji MRM oraz trybie skanowania. Temperatura źródła jonów wynosiła 120°C, a temperatura desolwatacji 300°C. Czas izolacji jonów macierzystych wynosił 50 msec. Detektor pracował



Ryc. 3. Pozytywne przypadki badań próbek krwi kierowców analizowanych w ZBA w latach 2011–2012 (n = 264).

wał w opcji MS-MS. Wybrane parametry analityczne metody przedstawiono w tabeli 3.

Omówienie wyników badań

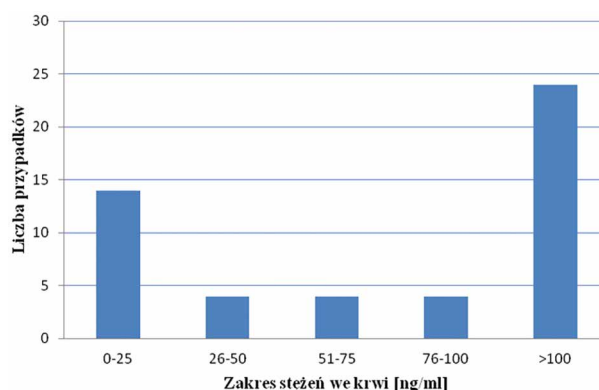
Przedstawiona metoda z wykorzystaniem układu LC-MS/MS została opracowana i jest wykorzystywana do analizy przesiewowej związków przedstawionych w tabeli 3. Granica wykrywalności wynosi 100 pg/ml dla związków z grupy benzodiazepin, 500 pg/ml dla amfetamin, kokainy i kodeiny, 2 ng/ml dla morfiny oraz 5 ng/ml dla benzoiloeogoniny. Na rycinie 2 przedstawiono przykładowy chromatogram próbki kontrolnej dla badanych związków w tej metodzie.

W latach 2011–2012 w Zakładzie Badań Antydopingowych Instytutu Sportu przebadano 264 próbki krwi pobrane od kierowców. W badanych próbkach dzięki zastosowaniu metody omówionej powyżej wykazano obecność związków z grupy amfetamin (amfetaminę, metamfetaminę, MDA, MDMA, hydroksyamfetaminę), opiatów (morfine, kodeinę) oraz kokainę i benzoiloeogoninę – rycina 3.

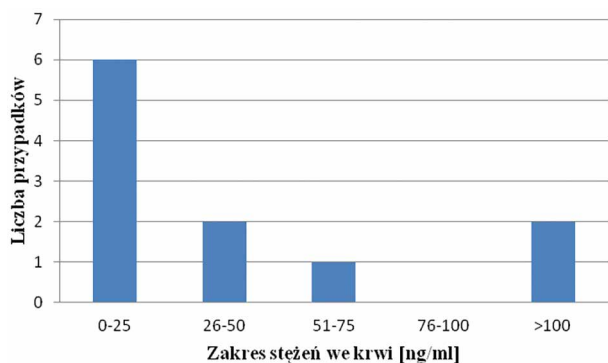
Stężenie amfetamin w badanych próbkach mieściło się w zakresie 2,7–4300 ng/ml (ryc. 4).

Największa liczba przypadków wykrycia amfetaminy dotyczyła próbek, w których stężenie tego związku przekraczało wartość 100 ng/ml.

Odwrotna sytuacja miała miejsce w przypadku próbek z kokainą – w dwóch przypadkach wykryto ten



Ryc. 4. Przypadki próbek krwi z amfetaminą analizowanych w ZBA w latach 2011–2012.



Ryc. 5. Przypadki próbek krwi analizowanych w ZBA w latach 2011–2012, w których wykryto kokainę.

narkotyków w stężeniu powyżej 100 ng/ml (158 ng/ml oraz 2,8 µg/ml) (ryc. 5).

W badanych próbkach stwierdzono także obecność leków z grupy pochodnych benzodiazepiny co przedstawiono na rycinie 6.

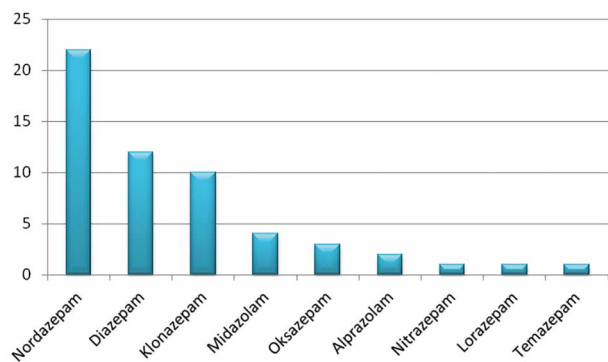
Najczęściej wykrywaną substancją z grupy benzodiazepin był nordazepam. W omawianym okresie odnotowano 23 przypadki, w których wykazano obecność tej substancji. W większości przypadków stężenie nordazepamu mieściło się w zakresie stężeń od 2–60 ng/ml. W dwóch przypadkach oznaczone stężenie było wyższe od 100 ng/ml i wyniosło 137 ng/ml oraz 438 ng/ml.

Do wykrywania obecności Δ9-THC jest stosowana osobna metoda analityczna z wykorzystaniem układu GC-MS/MS. W omawianym okresie odnotowano 42 przypadki obecności Δ9-THC i 110 przypadków obecności THC-COOH.

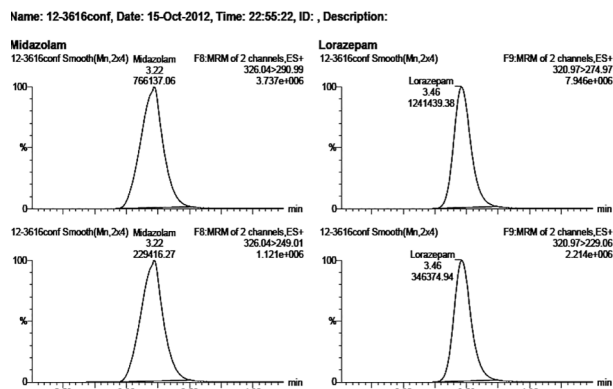
Na rycinie 7 przedstawiono przypadek z praktyki, w którym w badanej próbce krwi stwierdzono obecność związków:

- kokainy w stężeniu 2 ng/ml
- benzoiloeogoniny w stężeniu 27 ng/ml
- zolpidemu w stężeniu 63 ng/ml
- midazolamu w stężeniu 111 ng/ml
- lorazepamu w stężeniu 402 ng/ml.

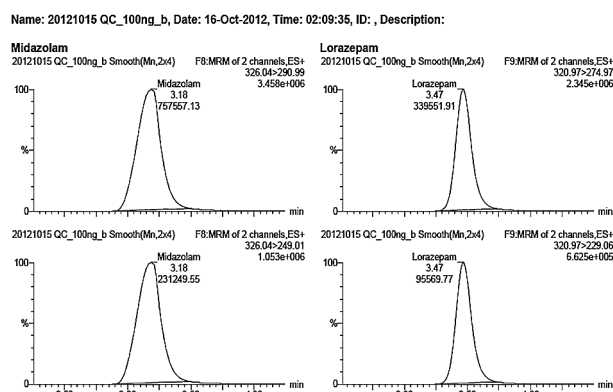
Dla porównania przedstawiono także chromatogram próbki kontrolnej, w której stężenia substancji wzorcowych były na poziomie 100 ng/ml (ryc. 8).



Ryc. 6. Próbkę pozytywnie zawierające substancje z grupy benzodiazepiny analizowane w ZBA w latach 2011–2012.



Ryc. 7. Chromatogram próbki krwi zawierającej substancje psychoaktywne.



Ryc. 8. Chromatogramy próbki kontrolnej.

Podsumowanie

Na podstawie przeprowadzonych badań zwalidowano opracowaną metodę identyfikacji substancji psychoaktywnych w próbkach krwi i stwierdzono jej przydatność w rutynowych analizach próbek pobranych od kierowców. W latach 2011–2012 najczęściej wykrywaną grupą związków w badaniach kierowców były substancje należące do grupy amfetamin i jej pochodnych oraz do grupy pochodnych benzodiazepin. Warto zaznaczyć, iż w przypadku interpretacji otrzymywanych wyników badań analitycznych przy opiniowaniu dla celów sądowych najczęstszym problemem jest ustalenie, czy wykryta we krwi substancja mogła oddziaływać na kierowcę, w jakim stopniu i czy możliwe jest ustalenie czasu jej zażycia oraz odniesienie tego wyniku do stanu po użyciu i pod wpływem substancji psychotropowej. Dlatego przy opiniowaniu niezbędna jest znajomość metabolizmu badanych substancji w organizmie, dawki, stężenia w zależności od drogi podania oraz znajomości leków dostępnych na rynku, które mogą ulegać metabolizmowi do substancji objętych kontrolą. Ważną również rzeczą jest posiadanie wiedzy co do czasu, jaki upłynął od zdarzenia do pobrania próbki oraz jak długo i w jakich warunkach był przechowywany materiał do badań.

Źródła rycin i tabel

Ryciny 1–8: autorzy

Tabele 1–3: opracowanie własne

Bibliografia

1. Kodeks karny – Ustawa z dnia 6.06.1997 r.
2. Prawo o ruchu drogowym – Ustawa z dnia 30.06.1997 r.
3. Kodeks wykroczeń – Ustawa z dnia 20 maja 1997 r.
4. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 11 czerwca 2003 r. w sprawie wykazu środków działających podobnie do alkoholu oraz warunków i sposobu przeprowadzania badań na ich obecność w organizmie z dnia 11 czerwca 2003 r. – Dz.U. 2003 nr 116 poz. 1104, wraz z nowelizacją z dnia 11 marca 2004 r. – Dz.U. 2004 nr 52 poz. 524.
5. Konferencja prasowa: „Narkotyki a prowadzenie pojazdu” Instytut Transportu Samochodowego, opr. Ilona Buttler „DRUID Driving Under the Influence of Drugs, Alcohol and Medicines, Prowadzenie pojazdu pod wpływem narkotyków, alkoholu i leków”, 2006.
6. Materiały konferencyjne z XXX Konferencji Toksykologów Sądowych, Augustów, 15–17.05.2013.
7. Burstein M.: Badanie zawartości morfiny w płynach ustrojowych osób po spożyciu produktów spożywczych zawierających mak oraz jej oznaczanie w tych wyrobach, „Problemy Kryminalistyki” 2008, nr 260.
8. Materiały z konferencji „Środki podobnie działające do alkoholu. Interpretacja wyników badań krwi kierowców dla potrzeb sądowych.”, Kraków 28–29.11.2012 r.
9. Szukalski B.: Narkotyki – kompendium wiedzy o środkach uzależniających, Instytut Psychiatrii i Neurologii, Warszawa 2005.
10. Carvalho M., Carmo H., Costa V.M., Capela J.P., Pontes H., Remiao F., Carvalho F., de Lourdes Bastos M. Toxicity of amphetamines: an update, „Arch. Toxicol.” 2012 86:1167–1231.
11. Metody analizy środków uzależniających, red. Gawrońska B., Instytut Psychiatrii i Neurologii, Warszawa 1997.
12. Kraemer T., Maurere H.: Determination of amphetamine, methamphetamine and amphetamine-derived designer drugs or medicaments in blood and urine, „Journal of Chromatography” B 713/1998, s. 163–187.
13. Marquet P., Lacassie E., Battu C., Faubert H., Lachatre G.: Simultaneous determination of amphetamine and its analogs in human whole blood by gas chromatography-mass spectrometry, „Journal of Chromatography” B 700/1997, s. 77–82.
14. Szukalski B.: Amfetamina, metamfetamina i ich psychoaktywne analogi strukturalne, „Alkoholizm i Narkomania” 3/20/95, s. 33–55.
15. de Letter E.A., Bouche M.P.L.A., Van Bocxlaer J.F., Lambert W.E., Piette M.H.A.: Interpretation of a 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA) blood level: discussion by means of a distribution study in two fatalities, „Forensic Science International” 141 (2004), s. 85–90.
16. Sadeghipour F., Veuthey J.L.: Sensitive and selective determination of methylenedioxyated amphetamines by high performance liquid chromatography with fluorimetric detection, „Journal of Chromatography” A 787/1997, s. 137–143.
17. Jatlow P.: Cocaine: Analysis, Pharmacokinetics and Metabolic Disposition, „The Yale Journal of Biology and Medicine”, 61 (1988), 105–113.
18. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction.
19. Piotrowski J.K.: Podstawy toksykologii, Wydawnictwo WNT, 2006.
20. Kiszka M.: Toksyczność kokainy, „Archiwum Medycyny Sądowej i Kryminalistyki”, 2004, 53(2):151–166.
21. Cone E.J., Weddington W.W.: Prolonged occurrence of cocaine in human saliva and urine after chronic use, „J. Anal. Toxicol.”, 1989, 13(2).
22. Inaba T., Stewart D.J., Kalow W.: Metabolism of cocaine in man., „Clin. Pharmacol. Ther.”, 1978, 23, 547–552.
23. Rojek S., Kłys M.: Analysis of Δ^9 -THC and its metabolites: 11-OH- Δ^9 -THC and THC-COOH in blood by Gas Chromatography Coupled to tandem Mass Spectrometry(GC-MS-MS) and its application to medico-legal investigations; Department of Forensic Medicine, Collegium Medicum, Jagiellonian University, Kraków, Poland Problems of Forensic Sciences 2007, LXX, 173–186.
24. Moller I., Wintermeyer A., Bender K., Jubner M.: Thomas A., Krug O., Schanzer W., Thevis M., Screening for the synthetic cannabinoid JWH-018 and its major metabolites in human doping controls, „Drug Testing and Analysis” 2011, 3(9).
25. United Nations International Drug Control Programme, Vienna, „Recommended Methods for the Detection and Assay of Barbiturates and Benzodiazepines in Biological Specimens”.
26. Toksykologia współczesna, red. W. Seńczuk, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2006.
27. <http://www.chemindustry.com/apps/chemicals>