

## GC/MS YÖNTEMİ İLE İDRARDA KOKAİN TAYİNİ

### DETERMINATION OF COCAINE IN URINE BY GC/MS METHOD

Gülhan CENGİZ<sup>1</sup>, Şebnem Ş. ÇEÇEN<sup>2</sup>, Tülin SÖYLEMEZOĞLU<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Eczaanesi, Manisa/TÜRKİYE

<sup>2</sup> Ankara Üniversitesi, Adli Tıp Enstitüsü, Dikimevi, Ankara /TÜRKİYE

#### ÖZET

Ülkemizde madde bağımlılığının yaygınlığı ile ilgili yeterli toksikolojik analize dayalı araştırma olmamasına karşın güncel yayınlardan kokain kullanımının yaygınlaştığı izlenimi edinilmektedir. Bu nedenle bağımlıların belirlenmesi için uygun analitik toksikoloji yöntemleri kurulmalıdır. Kokain, santral sinir sistemine, kalbe, karaciğere, nöromusküler sisteme ve böbreklere toksik etki eden doğal bir alkaloiddir. Yaygın suistimali, toplum sağlığı açısından önemli bir sorundur. Kokain genellikle etanol, opioidler, esrar ve sedatif hipnotikler gibi diğer suistimal edilen veya yasaklanmış ilaçlarla birlikte kullanılır. Çalışmamızda, kokain düzeyinin idrarda kalitatif ve kantitatif tayini amacıyla gaz kromatografisi kütle spektrometresi (GC-MS) ile yöntem kuruldu. Kurulan yöntemin kesinliği, doğruluğu ve spesifikliğı değerlendirildi. İdrardan kokainin izole edilmesi için sıvı-sıvı ekstraksiyon ve katı faz ekstraksiyon (SPE) yöntemleri uygulanarak karşılaştırıldı. Sıvı-sıvı ekstraksiyonda verim kokain için %77.6; SPE'de ise %81.2 olarak bulundu. Psikiyatri kliniğinden madde bağımlılığı kuşkusuyula gönderilen idrar örneklerinde yapılan analizler sonucu, örneklerden birinde metilekgonin ve benzoilekgoninin yanında morfin de belirlendi.

**Anahtar kelimeler:** Kokain suistimali, GC/MS, sıvı-sıvı ekstraksiyon, katı faz ekstraksiyon (SPE).

#### ABSTRACT

Although there are not enough researches in our country about drug abuse depending upon toxicological analysis, there is an impression that cocaine abuse is becoming widespread from current data. As a result, appropriate analytical toxicological method should be established in order to determine the drug abuse. Cocaine is a natural alkaloid that is toxic to central nervous system, heart, liver, neuromuscular system and kidneys. Widespread abuse of cocaine is an important health problem in society. Cocaine is usually misused with ethanol, opioids, marijuana and sedative hypnotics.

In our study, qualitative and quantitative methods are established to determine cocaine levels from urine by GC/MS (gas chromatography mass spectrometry). Precision, accuracy, specificity of the established

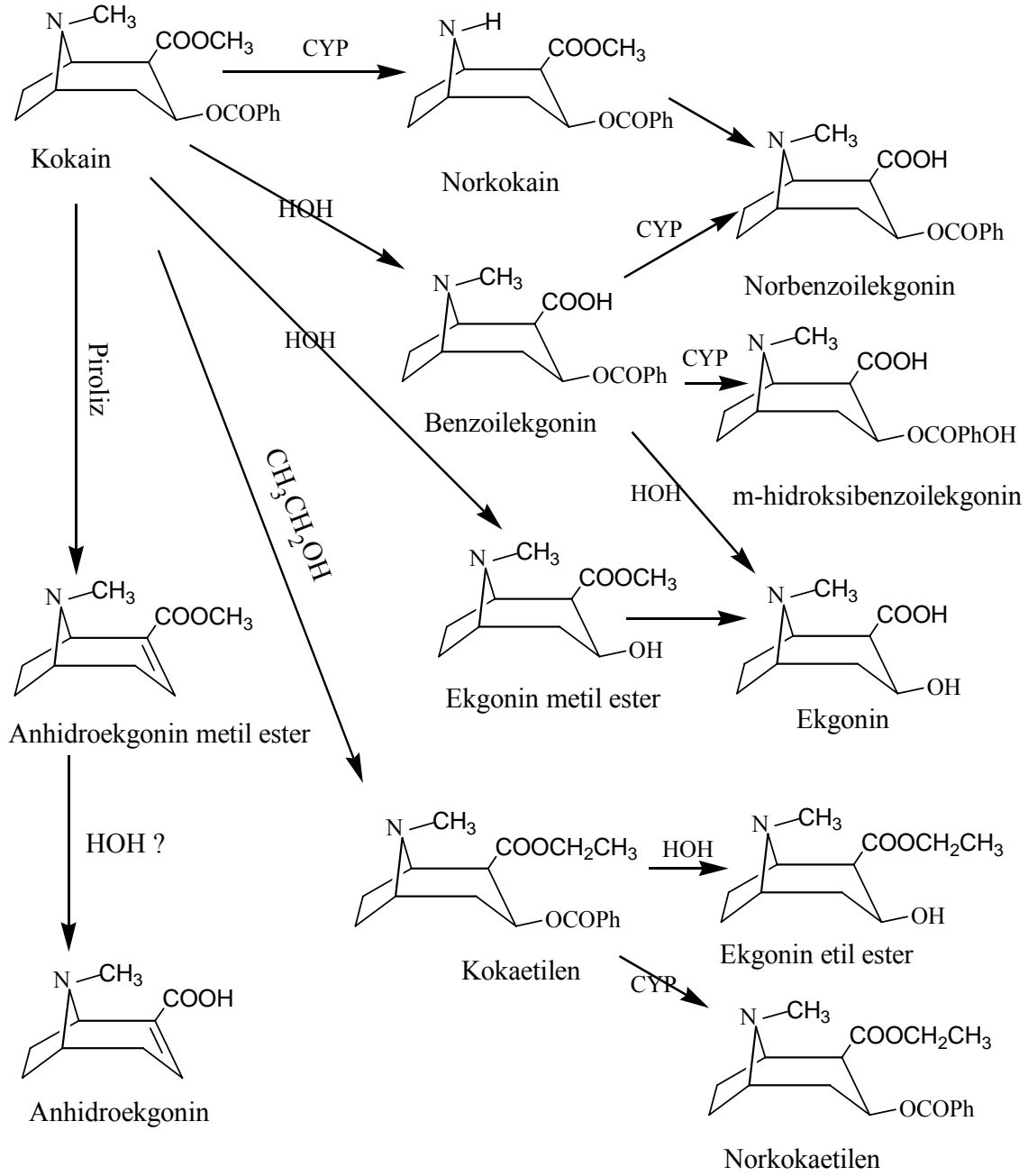
*method is evaluated. In order to isolate cocaine from urine, liquid-liquid and solid phase extraction methods are applied and compared. Recovery rates of 77.6% by liquid-liquid extraction method and 81.2% by SPE method were obtained. In one of the suspicious urine samples, morphine is determined besides methylecgonine and benzoylecgonine.*

**Key Words:** Cocaine abuse, GC/MS, liquid-liquid extraction, solid phase extraction (SPE).

## GİRİŞ

Kokain, tropan familyası alkaloidlerinden ester yapısında bir lokal anesteziiktir. Koka bitkisinin yapraklarından ekstrakte edilen doğal kaynaklı en güçlü stimülandır (1).

Kokainin, metabolitlerinin, piroliz ürünlerinin ve/veya etanol ile birlikte kullanıldığında ortaya çıkan metabolitlerinin biyolojik sıvılarda ve dokularda tespit edilmesi, kokain kullanımını ve vücuda giriş yolunu gösterir. Kokain katabolizması sonucu ester hidroliz ürünleri olan benzoilekgonin (BE) ve daha az miktarda ekgonin metil ester (EME) oluşur. Benzoilekgonin büyük oranda kokainin in vivo kimyasal hidrolizi sonucu oluşurken, EME enzimatik hidrolizi sonucu oluşur. Diğer kokain metabolitleri olan norkokain (NCOC), norbenzoilekgonin (NBE), m-hidroksibenzoil ekgonin (HBE) ve ekgonin (E), BE ve EME ile karşılaştırıldıklarında daha az rastlanılan metabolitlerdir. Kokain sigara halinde içildiğinde piroliz ürünü olarak yalnızca anhidroekgonin metil ester (AEME) oluşur. Anhidroekgonin metil ester ve metaboliti anhidroekgonin (AE), krak kokain kullanımının göstergesidir. Kokain ve etanolün birlikte kullanımı sonucu biyolojik olarak aktif olan kokaetilen (CE) molekülü ve aktif olmayan norkokaetilen ve ekgonin etil ester (EEE) metabolitleri oluşur. Kokain ve etanol, CE'nin uzun süreli psikoaktif etkileri dolayısıyla beraber kullanılırlar. Kokaetilen kokaine göre daha toksiktir ve yüksek dozda ortaya çıkabilecek ölüm riskini artırır (2) (Şekil 1).



**Şekil 1:** Kokainin biyotransformasyonu, pirolizi ve etanol ürünleri (CYP= sitokrom P-450; HOH= hidroliz) (2,3).

Kokain metabolizmasının major yolu (%90'ı) hidrolizle gerçekleşir; ekgonin metil ester (%30-50), benzoilekgonin (%29-45), küçük miktarda ekgonin (%1-3) metabolitleri ve metabolize olmamış kokain (%1-5) şeklinde idrarla atılır (4). Küçük bir miktarı (yaklaşık %10'u) ise karaciğerde birçok basamaktan oluşan oksidatif bir yolakla norkokaine, N-hidroksinorkokaine ve sonuçta norkokain nitroksid radikaline biyoaktif edilir (5).

Kokain suistimalinin sağlık ve yasal sonuçlar üzerine etkisi nedeniyle madde kullanımı ve suistimalini saptamak klinik ve adli toksikologlar için giderek daha fazla önem kazanmaktadır.

Bu çalışmada öncelikle idrarda kokainin tespit edilmesinde kullanılacak bir yöntem kurulmuştur. İç standart olarak kodein ve en uygun türevlendirme reaktifi olan N-metil-N-trimetilsililtriflorasetamid (MSTFA) kullanılmıştır. Sıvı-sıvı ve katı faz ekstraksiyon yöntemleri kurularak % verim farkı karşılaştırılmıştır.

## **MATERYAL VE YÖNTEM**

### ***Ekstraksiyon***

Örneklerin hazırlanmasında iki farklı ekstraksiyon tekniği kullanılarak yöntemler birbiri ile karşılaştırıldı.

#### ***Sıvı-Sıvı Ekstraksiyon***

5 ml standart solusyon veya idrar alınarak 0,5 ml sodyum hidroksit ile pH: 9'a ayarlandı. İki kez 5 ml diklorometan ile ekstrakte edildikten sonra diklorometan fazları birleştirilerek susuz sodyum sülfatla suyu alındı. Diklorometan nitrojen gazı altında kuruluğa kadar uçuruldu. Türevlendirme işleminden sonra GC/MS'e 1 µl enjeksiyon yapıldı.

#### ***Katı Faz Ekstraksiyon (Solid Phase Extraction)***

1 ml idrar alınıp, 3ml'ye su ile seyreltildi. Kolondan (SPE Columns C18 Altech) 3 ml metanol ve 3 ml 0,1 M fosfat tamponu geçirildi. 3 ml 0,1 M fosfat tampon geçirildikten sonra 2 dakika hava geçirilerek kartuş kurutuldu. Kartuşa 100 µl aseton uygulandı ve kolon çıkışına temiz tüp konuldu ve 2ml kloroform-isopropanol uygulandı. Çözücü 2 ml'lik tüp içerisine alındı ve vakum altında kuruluğa kadar uçuruldu. Türevlendirme işleminden sonra GC/MS'e 1 µl enjeksiyon yapıldı.

#### ***Türevlendirme***

Her iki ekstraksiyon yöntemi sonucunda elde edilen çözücüler uçuruldu ve 50 µl asetonitril ilave edildi. Üzerine 50 µl MSTFA ilave edilerek tüpün ağzı sıkıca kapatıldı. 70 °C'de 15 dakika bekletilerek trimetilsilil türevlerinin oluşması sağlandı. Bu çözeltilerden 1 µl GC-MS'e enjekte edildi.

#### ***Standartların Hazırlanması***

Kokainin metanol içerisinde çözülerek stok çözeltileri hazırlandı. Bu stok çözeltiler sıvı-sıvı ekstraksiyon için 5 ml idrar içerisine değişen konsantrasyonlarda ilave edildi. Kalibrasyon için kullanılan konsantrasyon aralığı 1-200ng/ml (1-10-50-100-200 ng/ml)'dir. Bu çözeltilere iç

standart olarak 100 ng/ml kodein ilave edildi. Daha sonra sıvı-sıvı ekstraksiyon, SPE ve türevlendirme bölümünde belirtilen işlemler uygulandı. Bu çözeltilerden 1 µl GC-MS cihazına enjekte edildi. Standart maddelerin alanlarının internal standart maddenin alanı oranına karşı gelen konsantrasyonları grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrileri hazırlandı, doğru denklemleri hesaplandı.

### ***Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (GC-MS) ile Teşhis***

Standart maddeler ekstrakte edilip türevlendirme işlemleri yapıldıktan sonra 40-550 amu (atomic mass unit) arasında, 1800 amu/s tarama hızıyla seçimli iyon tarama (SIM=Selected Ion Monitoring) tekniğiyle incelendi.

### ***Analiz Şartları***

Analizlerde Hewlett Packard 6890N marka gaz kromatografisi ve ona bağlı olarak çalışan Hewlett Packard 5973 kütle detektörü kullanıldı. Analizler 30x250µm x 0.25µm HP-5MS %5 fenilmetilsiloksan kapiller kolonu kullanılarak yapıldı. Taşıyıcı gaz olarak kullanılan helyum 1 ml/dakika akış hızına, kolon giriş basıncı 1.7 psi'ye ve enjeksiyon bloğu 1:30 (split) bölünmeli olarak ayarlandı. Programlı kolon sıcaklığı kullanıldı. Başlangıç sıcaklığı 70°C'ye ayarlandı ve bu sıcaklığın 1 dakika sabit kalması sağlandıktan sonra 20°C/dak sıcaklık artışı ile 160°C'ye çıkartıldı. İkinci sıcaklık artış hızı 4°C/dak olarak belirlendi ve son sıcaklık olan 295°C'de sıcaklığın 4 dakika sabit kalması sağlandı. Enjeksiyon sıcaklığı 285°C'ye ayarlandı. Analizler esnasında kullandığımız iyon numaraları aşağıda verilmiştir:

Kokain : 303, **182**, 82; Kodein-TMS: **371**, 178, 73.

*Doğrusallık:* 1-200 ng/ml konsantrasyonları arasında (1-10-50-100-200 ng/ml) hazırladığımız standartlar ekstrakte edilip türevlendirildikten sonra GC/MS'e verilerek çalışılan aralıkta doğrusallık olup olmadığı araştırıldı.

*Tekrarlanabilirlik:* Kokainin 1 ve 200 ng/ml konsantrasyonlarındaki standartları numune hazırlama metoduna göre ekstrakte edilip türevlendirildikten sonra GC/MS'e verildi ve tekrarlanabilirlikleri % değişim katsayısı (% CV) hesaplanarak değerlendirildi. Bu çalışmada her bir konsantrasyon için 5 uygulama yapıldı.

*Verim (Geri kazanılabilirlik):* Kokain için yaptığımız ekstraksiyonun verimini hesaplamak için kokainin boş idrar içinde 100 ng/ml konsantrasyonunda standart çözeltisi hazırlandı. Ancak bu aşamada iç standart (kodein) koyulmadı. Bu şekilde hazırlanan kokain standardı numune hazırlama metoduna göre ekstrakte edildikten sonra iç standart ilave edildi ve türevlendirilerek GC/MS'e verildi. Bu çalışmaya paralel olarak 100 ng/ml konsantrasyonunda bir standart (iç standart da

koyularak) hazırlandı ve yine numune hazırlama metoduna göre ekstrakte edilip türevlendirildikten sonra GC/MS'e verildi. Bu her iki uygulama arasındaki farktan faydalanarak ekstraksiyonun % verimi hesaplandı. Hesaplamalar 5 uygulamanın ortalaması alınarak yapıldı.

## **BULGULAR**

### ***GC-MS İle Yapılan Kokain Çalışması Sonuçları***

#### ***Sıvı-sıvı Ekstraksiyon Yöntemi İle Elde Edilen Sonuçlar***

İlk olarak kokainin GC/MS ile miktar tayininin yapılabileceği en düşük konsantrasyon (LOQ-Limit of Quantitation) ve tayin edilebilecek sınır değeri (LOD-Limit of Detection) saptandı.

Bulunan değerler: LOD=0,2 ng/ml, LOQ= 0,5 ng/ml. Daha sonra kesinlik (precision) çalışmaları yapıldı. Kesinlik çalışmaları; aynı numunelerin tekrar tekrar uygulandığında tek tek elde edilen test sonuçlarının birbiri ile olan uyumluluğunun derecesi için yapılmaktadır. Diğer bir deyişle kesinlik elde edilen sonuçların tekrarlanabilirliği olarak da tanımlanabilir. Bunun için en düşük (1ng/ml), orta (100ng/ml) ve en yüksek konsantrasyonlarda (200ng/ml) beş enjeksiyon yapıldı. Standart/internal standart (S/IS) alanlarına bakılarak ortalama değerler, standart sapma (SD), varyasyon katsayısı (CV) ve rölatif standart sapma (RSD) değerleri hesaplandı. Bulunan değerler:

1ng/ml için; X ortalama= 0,0706 SD= 0,006294 CV= 0,089 RSD= 8,9

100ng/ml kokain için; X ortalama= 2,2905 SD= 0,07855 CV= 0,03429 RSD= 3,42

200 ng/ml için; X ortalama= 4,6925 SD= 0,24817 CV= 0,0528 RSD= 5,28

RSD değerlerinin <10 olması yöntemin tekrarlanabilirliğinin iyi olduğunu göstermektedir. Verim hesaplaması yapıldı. Kokain için sıvı-sıvı ekstraksiyon ile yaptığımız çalışmalar sonucunda ortalama % 77,6'lık verim elde edildi.

#### ***Katı Faz Ekstraksiyon Yöntemi İle Elde Edilen Sonuçlar***

Kokain için yapılan çalışmalarda: LOD= 0,15 ng/ml , LOQ= 0,5 ng/ml bulundu.

#### **CV ve RSD hesaplamaları yapıldı. Bulunan değerler:**

1ng/ml için; X ortalama= 0,0944 SD= 0,00695 CV= 0,0736 RSD= 7,3

100ng/ml kokain için; X ortalama= 2,589 SD= 0,08254 CV= 0,03188 RSD= 3,18

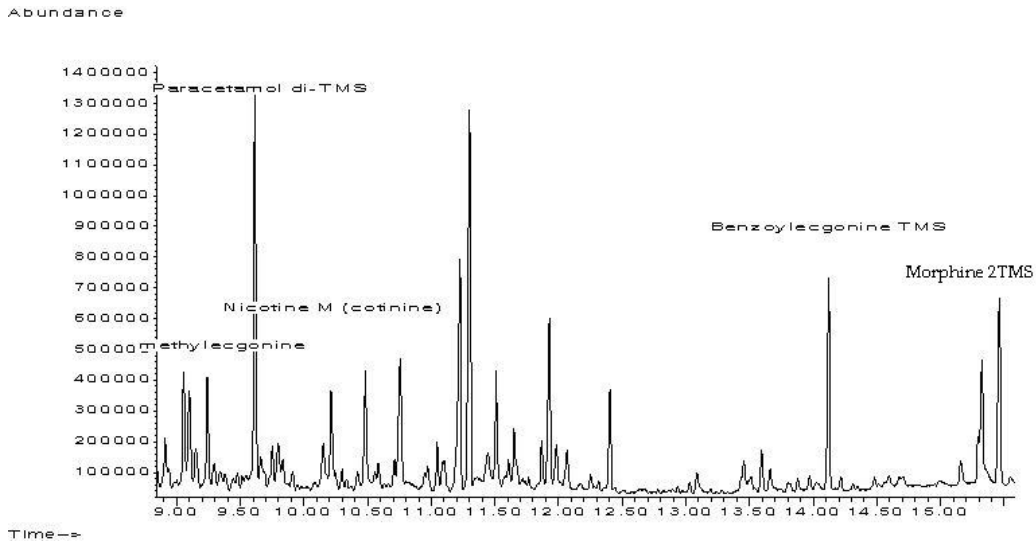
200 ng/ml için; X ortalama= 4,6316 SD= 0,19343 CV= 0,04176 RSD= 4,17

Kokain için SPE ile yaptığımız çalışmalar sonucunda % 81,2' lik verim elde edildi.

Kalibrasyon eğrisi hazırlamak için 1, 10, 50, 100 ve 200 ng/ml'lik kokain çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilere internal standart olarak 100 ng kodein ilave edildi. Standart maddelerin alanlarının internal standart maddenin alanına karşı gelen konsantrasyonları grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi çizildi .

### ***H. A. İsimli Hastaya Ait İdrar Bulguları***

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Psikiyatri ABD'de tedavi gören H.A. isimli 26 yaşındaki erkek hastanın idrarında GC-MS ile madde ve ilaç taraması yapılmıştır. SCAN modunda yapılan analiz sonuçları aşağıda görülmektedir.



**Şekil 2:** H. A. isimli hastanın SCAN modundaki idrar kromatogramı

### **SONUÇ VE TARTIŞMA**

Kokain suistimalinin sağlık ve yasal sonuçlar üzerine etkisi nedeniyle biyolojik analizlerle madde kullanımı ve suistimalini saptamak, klinik ve forensik toksikologlar için giderek daha fazla önem kazanmaktadır (6). Biyolojik örneklerin GC-MS'de analizlenmeden önce uygun bir ekstraksiyon yöntemi ile izole edilmesi gerekmektedir.

İdrar içerisinde suistimal edilen maddelerin izolasyonunda kullanılan SPE yöntemi, son yıllarda sıvı-sıvı ekstraksiyona karşı bir alternatif olarak ortaya çıkmıştır (7). SPE'nin amacı interfere eden matriks bileşenlerini ayırmak ve analiti izole etmektir.

SPE klasik sıvı-sıvı yöntemleri ile karşılaştırıldığında birçok avantaja sahiptir:

- Solvent (çözücü) tüketimi ve kimyasal atık daha azdır.

- Daha az zamanda (sıvı/ sıvıya kıyasla; 2/3 oranında) numune kromatografik analize hazırlanır.
- Otomasyona uygundur.
- Numune daha az transfer edildiği için verim daha yüksektir.
- Çapraz kontaminasyon olmadığı için yöntemin kesinliği (accuracy) daha yüksektir.
- Çözücü/numune ile birebir temas halinde ve cam malzeme kullanımı az olduğu için analizi yapan personel için daha kolay ve güvenli bir yöntemdir.
- Katı faz ekstraksiyonda birçok seçenek arasından uygun adsorban seçimi önemlidir. Adsorban, örneğin biyolojik materyalden yeterli verimle ayrımını sağlamalıdır.
- SPE’de polar, hidrofobik ve/veya iyonik etkileşimli adsorbanlar kullanılabilirken klasik sıvı/sıvı ekstraksiyon yöntemleri sıvı fazdaki partiyon denklemi ile sınırlıdır.
- Tüm duyarlı kromatografik ve spektroskopik (HPLC, GC, TLC, UV veya IR gibi) yöntemler için numune ön-hazırlama işlemi olarak SPE kullanılabilir. Son yıllarda hassas ve duyarlı modern aletlerin gelişmesiyle, numunenin iyi ve saf hazırlanarak analize uygun hale getirilmesi kolonların korunması açısından gerekli olmuştur.
- SPE ile numunedeki analitin tayin edilebilirlik hassasiyeti 100-5000 katna çıkarılabilir. Analitin kalitatif ve kantitatif analizinin yapılabilmesi için gerekli konsantrasyon aralığının sağlanabilmesi için bu adım gereklidir (6,8).

Pocci ve arkadaşları ilaç testi için kullanılan biyolojik sıvılarda bulunan çoğu safsızlığın kolona irreversibl olarak bağlandığını göstermiştir. Bu açıdan bakıldığında; SPE temiz bir ekstrakt elde etmeyi sağlar ve endojen pikleri azaltır. Bu nedenle analitin sensitivitesi ve spesifikliğı artar (9).

Yaptığımız çalışmada idrar örneklerinin sıvı-sıvı ve SPE ekstraktları GC-MS yöntemi ile karşılaştırmalı olarak incelendi. Katı faz ekstraksiyon yöntemi; az miktarda numune (0,5-1 ml) gerektiren, ekstraksiyon basamakları kolay ve kısa süreli olan, kantitatif çalışmalarda tekrarlanabilirliğin yüksek olduğu ve birden fazla ekstraksiyonun aynı anda yapılabildiği bir yöntemdir. Sıvı-sıvı ekstraksiyon işleminde ise pH ayarlaması sırasında zorluklar oluşmakta ve fazlar ayrılırken kayıplar meydana gelmektedir. Bu nedenle rutin analiz yapan ve örnek sayısı fazla olan laboratuvarlar için SPE yönteminin daha uygun olacağı düşünülmektedir. Ancak SPE için



kullanılan kartuşların maliyetinin çok yüksek olması sıvı-sıvı ekstraksiyon yönteminin de tercih edilmesine neden olabilmektedir.

Çalışmamızda kokain için sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi ile verim % 77.6; SPE yöntemi ile %81.2 olarak bulundu.

Gunnar ve arkadaşlarının kanda yaptıkları çalışmada kokain için LOD değerini 2ng/ml, LOQ değerini ise 10 ng/ml (10), Gentili ve arkadaşlarının saçta yaptıkları çalışmada ise kokain için LOD değerini 0.35 ng/mg, LOQ değerini ise 1.05 ng/mg (11), Lewis ve arkadaşlarının kanda kokain için LOD ve LOQ değerini 0.78 ng/ml (2), Cone ve arkadaşları ise kokain için LOD değerini ~1.0 µg/L olarak (3) bildirmişlerdir. Yaptığımız çalışmada ise idrardan yapılan sıvı-sıvı ekstraksiyon sonucu elde edilen LOD değeri 0.2 ng/ml, LOQ değeri 0.5 ng/ml iken, katı faz ekstraksiyon yöntemi ile yapılan çalışmada, LOD değeri 0.15 ng/ml, katı faz ekstraksiyon LOQ değeri 0.5 ng/ml bulunmuştur. Son yıllarda yapılan çalışmalarda aletlerdeki gelişmelere bağlı olarak duyarlılığın arttığı ve LOQ değerlerinin düştüğü görülmektedir. Bu açıdan çalışmamızda bulunan değerlerin, yapılan diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında kabul edilebilir sınırlar içerisinde olduğunu söyleyebiliriz.

Kokain idrarda 40 saate kadar tespit edilebilir. Piroliz ürünü olan anhidroekgonin metil ester içimden hemen sonra 5-27 µg/L olarak tespit edilmiş ve 28 saate kadar idrarda gözlemlenebilmiştir. İki minör metabolit olan norkokain ve ve benzoilnorkokain daha düşük düzeylerde (sırasıyla; 5-27 ve 3-16 µg/L) ve 28 saat süresi boyunca gözlenmiştir. Benzoilekgonin idrarda pik konsantrasyonuna kullanımdan 12 saat sonra ulaşır. Benzoilekgonin ve ekgonin metil ester konsantrasyonları idrarda benzer tarzda azalır ve 72 saat sonrasında gözlenemez hale gelir (3). Madde bağımlısı olduğundan kuşku edilen H.A. isimli hastanın idrarında yaptığımız analiz sonucu kokain belirlenmezken, kokainin metabolitleri olan metil ekgonin ve benzoilekgonin kalitatif olarak tespit edilebilmiştir. Bu sonuçtan yola çıkılarak ve literatür bilgisine dayanarak denilebilir ki; hastadan idrar, kokain kullanımından sonra ilk 40 saat içerisinde değil 40-72 saat dilimi içerisinde bir süreçte alınmıştır.

### **TEŞEKKÜR**

Bu çalışma DPT Teknolojik Araştırma Projesi- 98K120820 “Madde Bağımlılığının Toksikolojik Analizle Tanımlanması” ve Ankara Üniversitesi Araştırma Fonu 20.010.000.004 “Bağımlılık Yapan Bazı Maddelerin Toksikolojik Analizleri” projeleri ile desteklenmiştir

**KAYNAKLAR**

1. **Ellenhorn, M. J., Schonwald, S., Ordog, G., Wasserberger, J.** “Cocaine” In: *Ellenhorn’s Medical Toxicology*. USA, 2nd ed. Chapter 21, p.: 356-386 (1997).
2. **Lewis, R. J., Johnson, R. D., Angier, M. K., Ritter, R. M.** “Determination of cocaine, its metabolites, pyrolysis products, and ethanol adducts in postmortem fluids and tissues using Zymark® automated solid-phase extraction and gas chromatography mass spectrometry” *J. Chromatogr. B.*, **806 (2)**: 141-150 (2004).
3. **Cone, E. J., Hills Grove, M., Darwin, W. D.** “Simultaneous measurement of cocaine, cocaethylene, their metabolites, and “crack” pyrolysis product by gas chromatography-mass spectrometry” *Clin. Chem.*, **40(7)**: 1299-1305 (1994).
4. **Goldfrank, L. R., Flomenbaum, N. E., Lewin, N. A., Weisman, R. S., Howland, M. E., Hoffman, R. S.** “Cocaine” In: *Goldfrank’s Toxicologic Emergencies*. Ed.: J.E. Hollander, R.S. Hoffman. USA, 6th ed. Chapter 65, p.: 1071-1089 (1998).
5. **Aoki, K., Takimoto, M., Ota, H., Yoshida, T.** “Participation of CYP2A in cocaine-induced hepatotoxicity in female mice” *Pharmacol. Toxicol.*, **87**: 26-32 (2000).
6. **Abusada, G. M., Abukhalaf, I. K., Alford, D. D., Vinzon-Bautista, I., Logan, B. K., Stafford, D.T., Tebbett, I. R., Moore, C.M.** “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).
7. **Logan, B.K., Stafford D. T., Tebbett I. R., Moore, C.M.** “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(3)**: 154-159 (1990).
8. **Blevins, D. D., Burke, M. F., Good, T. J., Harris, P. A., Van Horne, K. C., Simpson, N., Yago, L. S.** “*Varian Sorbent Extraction Technology Handbook*” Edited by Simpson, N., Van Horne, K.C. USA (1993).
9. **Pocci, R., Dixit, V., Dixit, V. M.** “Solid-phase extraction and GC/MS confirmation of barbiturates from human urine” *J. Anal. Toxicol.*, **16**: 45-47 (1992).
10. **Gunnar, T., Mykkanen, S., Ariniemi, K., Lillsunde, P.** “Validated semiquantitative/quantitative screening of 51 drugs in whole blood as silylated derivatives by

gas chromatography-selected ion monitoring mass spectrometry and gas chromatography electron capture detection” *J. Chromatogr. B.*, **806(2)**:205-19 (2004).

11. **Gentili, S., Cornetta, M., Macchia, T.** “Rapid screening procedure based on headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry for the detection of many recreational drugs in hair” *J. Chromatogr. B.*, 801(2):289-96 (2004).

Received: 26.04.2004

Accepted: 10.12.2004