

FARMACEUTICKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY  
V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

**Sliny jako alternativní analytický materiál  
v průkazu abusu amfetaminů**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Jaroslav Sochor, CSc.

Školitel- specialista: PharmDr. Viktor Voříšek

Vedoucí katedry: Doc. RNDr. Jiří Klimeš, CSc.

Hradec Králové 2006

Markéta Zemanová

Ráda bych poděkovala panu PharmDr. Viktoru Voříškovi (člen mezinárodní toxikologické společnosti, TIAFT – The International of Forensic Toxicologists) za odborné vedení, ochotu a cenné připomínky při zpracování této diplomové práce, dále panu Doc.MUDr. Pavlu Živnému, CSc. a všem ostatním pracovníkům Ústavu klinické biochemie a diagnostiky za možnost provedení experimentální práce na jejich oddělení a za jejich vstřícnost a přátelské přijetí.

## OBSAH:

1	ÚVOD.....	4
2	CÍL PRÁCE.....	5
3	TEORETICKÁ ČÁST .....	6
3.1	<i>Slinné žlázy a tvorba slin</i> .....	6
3.1.1	Terminologie sliny a orální tekutiny .....	6
3.1.2	Význam slin .....	6
3.1.3	Anatomické uložení slinných žláz.....	7
3.1.4	Tvorba a složení slin .....	8
3.1.4.1	Anorganické komponenty .....	8
3.1.4.2	Organické komponenty .....	10
3.2	<i>Salivace</i> .....	11
3.2.1	Rychlost slinného toku a pH.....	12
3.3	<i>Mechanismus transportu návykových látek z plazmy do slin</i> .....	13
3.3.1	Typy transportů .....	13
3.3.2	Faktory ovlivňující mechanismus transportu.....	14
3.4	<i>Amfetaminy</i> .....	18
3.4.1	Terminologie.....	18
3.4.2	Popis psychostimulancií .....	18
3.4.3	Popis amfetaminů .....	19
3.4.4	Zdroje amfetaminů .....	19
3.4.5	Farmakodynamika.....	20
3.4.6	Farmakokinetika.....	20
3.4.7	Farmakologické účinky .....	21
3.4.8	Přehled legálních a ilegálních amfetaminových derivátů .....	22
3.5	<i>Techniky odběru slin</i> .....	23
3.5.1	Odběrové systémy .....	23
3.5.2	Vlivy odběrových systémů .....	26
3.6	<i>Analýza návykových látek v tělních tekutinách</i> .....	26
3.6.1	Analýza INL v orální tekutině.....	26
3.6.1.1	Screeningové testy .....	27
3.6.1.2	Terénní testy .....	27
3.6.1.3	Konfirmační testy.....	29
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	30
4.1	<i>Cílová skupina</i> .....	30
4.2	<i>Materiál a metodiky</i> .....	30
4.2.1	Osnova postupu experimentální části .....	30
4.2.2	Testovací skupina a biologický materiál .....	31
4.2.3	Popis terénních testů a konfirmační techniky GC/MS.....	31
4.2.3.1	Soupravy terénních testů.....	31
4.2.3.2	Technika GC/MS .....	32
4.2.4	Způsob odběru a zpracování slinného vzorku pro screening.....	34
4.3	<i>Hodnocení programu</i> .....	35
4.3.1	Způsob hodnocení programu .....	35
4.3.1.1	Zmapování situace nabídky výrobků na českém trhu.....	35
4.3.1.2	Otestování a porovnání diagnostických souprav .....	35
4.3.1.3	Testování pro statistické analytické vyhodnocení .....	36
4.4	<i>Výsledky a interpretace analytických údajů</i> .....	37
4.4.1	Monitorovací účinnost na základě korelace sliny/moč.....	37
4.4.2	Testování analytické účinnosti, specifity a senzitivity na standardní přídavky k slepým vzorkům slin .....	38
4.4.2.1	Příprava vzorků se standardními přídavky (testování senzitivity a specifity) .....	38
4.4.2.2	Výsledky testování analytické účinnosti, specifity a senzitivity .....	39
5	DISKUSE .....	42
6	ZÁVĚR .....	51
7	PŘÍLOHA .....	53
7.1	<i>Seznam použitých zkratk</i> .....	53
7.2	<i>Strukturní vzorce</i> .....	54
7.3	<i>Seznam obrázků a tabulek</i> .....	56
8	LITERATURA .....	57

# 1 Úvod

V současné moderní době dochází k neustálému nárůstu poznatků ve všech oborech bioanalýzy. Také rozvoj laboratorních diagnostických metod a přístupů je velmi zrychlován. Snahou mé práce bylo, abych poukázala, shromáždila a zaznamenala informace o možné neinvazivní diagnostice, kterou je použití slin jako biologického materiálu, k průkazu abúzu amfetaminu a jeho derivátů.

Ačkoli slina případně orální tekutina „postrádá drama krve, upřímnost potu a emocionální výzvu slz“, citován Mandel (1990) [„lacks the drama of blood, the sincerity of sweat and the emotional appeal of tears“, Mandel, I. D. (1974). Relation of saliva and plaque to caries. *Journal of Dental Research*. 53, 246-266.] splňuje požadavek na levné a neinvazivní diagnostické postupy ke stanovení orálních a systémových onemocnění, monitorování léčiv a odhalování nezákonného užívání narkotik.

Před více než sto lety byl slinný sekret použit jako alternativní biologický materiál. Ke stanovení ilegálních návykových látek byla orální tekutina navržena již v roce 1970 (Gorodetzky a Kullberg, 1974). Od této doby byly sliny využívány pro terapeutické a toxikologické monitorování různých látek. Vzhledem k rychlému rozvoji laboratorních diagnostických metod byl v roce 1990 na světový trh zaveden první imunochromatografický kvalitativní rychlotest pro detekci ilegální návykové látky ve slinách. Jedním z hlavních důvodů pro zavedení kvalitativních rychlotestů byla myšlenka, že slinná koncentrace látek reflektuje plazmatickou koncentraci nevázané a neionizované parentní drogy. Tato frakce je zodpovědná za farmakologické účinky.

Ačkoli transport látky z plazmy do orální tekutiny ovlivňuje řada proměnných faktorů a ve své složitosti není zcela prozkoumán, jsou rychlotesty mezi analytickými odborníky akceptovány.

V posledních letech jsou evidentní aplikace orientačních rychlotestů v západních zemích Evropské Unie a v některých zemích Spojených států amerických, kde jsou využívány především policií, celní zpravou a detoxikačními centry.

## 2 Cíl práce

Cílem studie bylo monitorování přítomnosti návykových látek, amfetaminu a jeho derivátů, v tělních tekutinách pomocí instrumentálních metod založených na principu enzymové imunoanalýzy a plynové chromatografie ve spojení s hmotovou spektrometrií pro confirmaci pozitivních výsledků.

Porovnání analytické a interpretační efektivity orientačních stanovení drog ve slinách tzv.on-site testů\* s výsledky již využívaných standardních metod bioanalýzy. V neposlední řadě se jednalo též o zmapování situace komerční nabídky rychlotestů na českém trhu s možností porovnání s ostatními státy Evropské unie a Spojených států amerických.

---

\* název "on-site testy" je široce využívaným termínem v klinické praxi, který je převzat z anglického jazyka, pro účely diplomové práce byl tento termín nahrazen vhodnějším českým výrazem "rychltesty"

## **3 Teoretická část**

### **3.1 Slinné žlázy a tvorba slin**

#### **3.1.1 Terminologie sliny a orální tekutiny**

Termínem slina se rozumí tekutina, která je soustředěná pouze ze specifických slinných žláz, zatímco orální tekutina je termínem širším, zahrnuje jak tekutinu ze žláz a dentálních štěrbin, tak i další látky, které jsou přítomny v dutině ústní jako např. mukózní buňky a zbytky potravy (Malamud, 1993 a Schramm et al., 1993). Odlišení těchto dvou pojmů má význam zejména z analytického hlediska ve smyslu přípravy a zpracování analytického vzorku.

#### **3.1.2 Význam slin**

V dutině ústní i v horních kompartmentech gastrointestinálního traktu mají sliny velký význam. Mezi složky slin patří muciny, enzym amyláza, IgA aj. Muciny uhlazují povrch sousta, tím usnadňují jeho zpracování v ústech i jeho polykání a ulehčují pohyby při žvýkání a artikulaci. Amyláza umožňuje začátek trávení škrobů. Lysozym a molekula IgA zajišťují ochranu před infekcí apod.

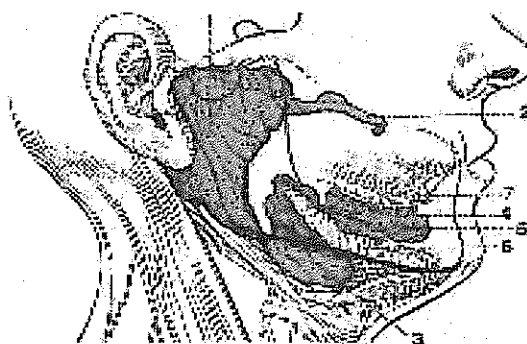
Ze slinných žláz probíhá kontinuálně bazální sekrece slin, která je zvýšena vyvolanou sekrecí. Celkový objem orální tekutiny u dospělého člověka činí přibližně 1000 ml/den s typickým průtokem 0,05 ml/min během spánku, 0,5 ml/min při plivání a 1-3 i více ml/min během žvýkání (Crouch et al., 2004). Zvýšení sekrece závisí na druhu vyvolávajícího podnětu a hydrataci organismu. Při nedostatku vody v těle klesá tvorba slin, vysychají ústa spolu s hltanem a navozuje se pocit žízně, který je důležitý pro bilanci tekutin v těle.

### 3.1.3 Anatomické uložení slinných žláz

Slinné žlázy jsou tuboalveolární žlázy tvořeny jednotlivými aciny, na které navazují vsunuté vývody ústící do žíhaného vývodu a následně do dutiny ústní.

Pod souhrnným názvem *Glandulae salivariae majores* jsou sdruženy tři části slinných žláz, a to *Glandula sublingualis*, *gl.submandibularis* a *gl. parotidea [parotis]* (viz obrázek 1).

*Gl.sublingualis* je slinná žláza podjazyková s větším počtem vývodů. Je uložena na *diaphragma oris*. Jejími vývody jsou *ductus sublingualis major* (hlavní vývod) a *ductus sublinguales minores* (až 40 malých vývodů). Slinná žláza podčelistní, nebo-li *gl.submandibularis* je uložena téměř zcela pod *musculus mylohyoideus* a jejím vývodem je *ductus submandibularis*. *Gl. parotidea [parotis]* je slinnou žlázou příušní, která je uložena na *ramus mandibulae* a za ním a *Glandula parotidea [parotis] accessoria* je přídatný lalok příušní slinné žlázy. Vývod příušní žlázy je *ductus parotideus*.



Obr.1. Anatomické uložení slinných žláz (*glandulae salivariae majores*)

(3) *Glandula submandibularis* (70 % z celkové slinné produkce), (1) *Glandula parotis* (25 %)

(5) *Glandula sublingualis* (5 %)

Zdroj: <http://www.medac.de/patient/fachbereiche/supportiv-therapie/indikationen/mundtrockenheit.htm>

Každý druh slinných žláz produkuje typický sekret. Žláza podjazyková a drobné žlázy v dutině ústní secernují sliny kontinuálně. Vyměšují vazkou tekutinu, bohatou na mucin, a jsou tak označovány jako žlázy mucinózní. Žláza příušní

produkuje serózní tekutinu s větším obsahem enzymu  $\alpha$ -amylázy, který štěpí škroby, dokud není kyselým žaludečním obsahem inaktivován. Podčelistní žlázy jsou seromucinózní. Malé slinné žlázy umístěné v bukální sliznici, ve rtech a patře, produkují viskózní sekret obsahující především mucin.

### 3.1.4 Tvorba a složení slin

Slina je uložena v sekrečních granulích jednotlivých acinů ve slinné žláze. Sekreční proteiny a elektrolyty jsou sbírány do kondenzačních vakuol, které jsou směřovány v sekrečních granulích směrem k apikálnímu částem buňky.

Slina, jako i další tělní tekutiny, je zředěný vodnatý roztok, který obsahuje elektrolyty a proteiny s nižší nebo shodnou osmolalitou jakou má plazma (Paxton, 1979). Kromě výše jmenovaných je ve slině určité množství buněčných úlomků, které vznikají z epiteliálních buněk úst a zbytky potravy (Caddy, 1984). Osmolalita slin je principiálně determinovaná typem žlázy a sekreční aktivitou, jejíž stupeň je ovlivňován mnoha faktory zahrnující pohlaví, věk, nutriční a emoční stav, cirkadiální rytmy, roční období (Mandel, 1974; Shannon, Suddick and Dowd jr, 1974), melancholii (Shannon a Suddick, 1973), různá onemocnění a spousty farmakologických agens. Fyzikální parametry slin a zastoupení anorganických i organických komponent shrnuje tabulka 1.

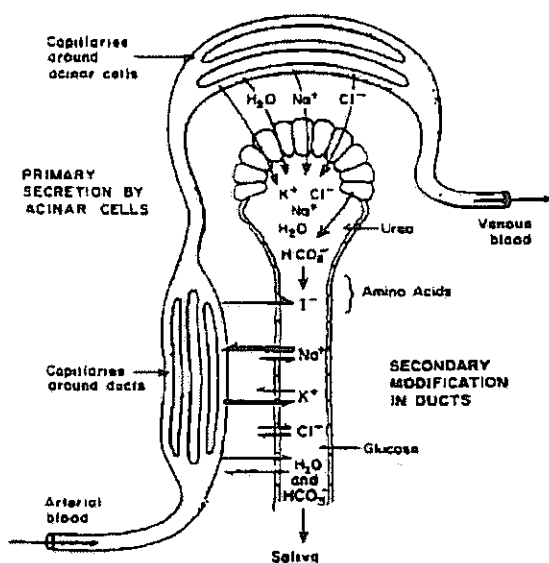
#### 3.1.4.1 Anorganické komponenty

Obecně lze říci, že slina obsahuje běžné elektrolyty tělní tekutiny, hlavními ionty jsou sodík, draslík, chloridy a uhličitany. Tvorbu slin ilustruje obrázek 2 (Davenport, 1977).

Acinární buňky slinných žláz přenášejí aktivním transportem sodík z krve do lumen žláz. Výsledná změna osmotického tlaku mezi krví a prostorem lumen má za následek přesun vody z krve přes tight junctions mezi acinárními buňkami ve směru sodíku. Mechanismus je nazýván jako primární sekrece, přičemž tekutina je izotonická v porovnání s plazmou. Během průchodu primární tekutiny systémem kanálek slinných žláz jsou procesem aktivního transportu reabsorbovány ionty sodíku a chloridů. Draslík a uhličitany jsou aktivně sekretovány do sliny. Membrány



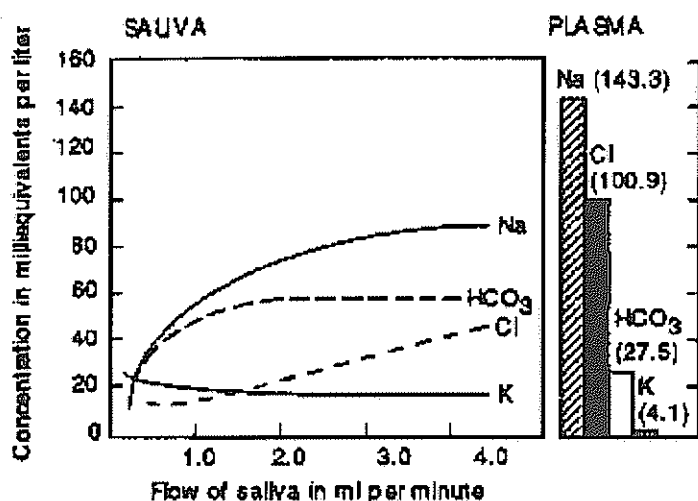
kanálků jsou pro vodu relativně nepropustné, tím se slina ve svém průchodu stává stále více hypotonickou (Vining and McGinley, 1982).



Obr.2. Tvorba slin (Davenport, 1977)

#### Mechanismus primární sekrece a tvorba finální sliny

Buněčná výstelka má omezenou kapacitu transportu sodíku ze salivy a tato kapacita nevzrůstá proporcionálně s rostoucím slinným tokem. Obr. 2. znázorňuje závislost koncentrace iontů na rychlosti slinného průtoku. Ve slině je koncentrace draslíku podstatně vyšší než-li v plazmě, avšak vzrůstá-li rychlost toku, slinná koncentrace klesá. Tento jev je vysvětlován jako důsledek konstantní sekrece draslíku buněčnou výstelkou. Koncentrace hydrogenuhličitanů je velmi závislá na typu žlázy, která slinu produkuje, dále pak na charakteru stimulace salivace a rychlosti toku slin. Doprovodnými znaky vzestupu koncentrace hydrogenuhličitanů je nárůst pH s rostoucí rychlostí sekrece. Slinné pH se pohybuje v rozmezí 6,2 až 7,4 a pokud se zvyšuje, poukazuje na zvýšenou sekreci (Drobitch and Svensson, 1992).



Obr. 3 Závislost mezi koncentrací (mEq/l) elektrolytů sodíku, draslíku, chloridu a hydrogenuhličitanů ve slině a rychlostí slinného toku (ml/min) (Thaysen at al., 1954)

### 3.1.4.2 Organické komponenty

Slina poskytuje enzymy pro trávení a další proteiny, zahrnující specifické glykoproteiny, které jsou syntetizovány acinárními buňkami. Další organické složky jakými jsou hormony, imunoglobuliny, enzymy, DNA a virové partikule jsou detekovány ve stopovém množství (Vining and McGinley, 1985). Koncentrace celkové bílkoviny ve slině je zanedbatelná, je nižší než 1% z celkového množství jednotlivých složek. Hlavní zdroj výše uvedených komponent je pravděpodobně tekutina ze štěrbin gingivy (zubní štěrbin, okraje dásní) (Cimasoni, 1974).

Sliny jsou rovněž adekvátním zdrojem molekuly DNA pro analýzu humánního genomu, tak i analýzu forenzní, např. při určování paternity (Walsh et al., 1992).

Tab. 1 Fyzikální parametry slin a zastoupení jednotlivých komponent v porovnání s plazmou

PARAMETR	jednotky	slina	plazma
objem	ml/den	500 - 1500	4,3% hmotnosti těla
rychlost toku	ml/min	0,6 (0,1 - 1,8)	
pH		6,7 (5,6 - 7,9)	
voda	%	98 (97 - 99,5)	91,5 (90 - 93)

celková bílkovina	g/100ml	0,3 (0,15 – 0,64)	7,3 (6 – 8)
albumin	g/100ml		4,5 (4 – 5)
mucin	mg/100ml	0,27 (0,08 – 0,6)	
aminokyseliny	mmol/l	0,1 – 40	0,98
elektrolyty			
Draslík [K <sup>+</sup> ]		8 – 40	3,5 - 5,5
Sodík [Na <sup>+</sup> ]		5 – 100	135 - 155
Vápník [Ca <sup>2+</sup> ]		1,5 - 2	4,5 - 5,2
Fosfáty [HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ]		5,5 - 14	1,2 - 2,2
Chloridy [Cl <sup>-</sup> ]		5 – 70	
cholesterol	mg/100ml	7,5 (3 – 15)	150 - 300
sušina	g/l	6 (3 – 8)	80

### 3.2 Salivace

Autonomní nervový systém hraje důležitou roli ve slinění. V tabulce 2 jsou shrnuty účinky různých nervových stimulů na objem, viskozitu a obsah proteinů a mucinů.

Tab. 2 Charakteristické rozdíly ve slinách v závislosti na rozdílné nervové stimulaci

Parametr	Nervová stimulace		
	$\beta$ -adrenergní stimul	$\alpha$ -adrenergní stimul	Cholinergní stimul
Objem	nízká	nízká	vysoká
Viskóznita	vysoká	nízká	nízká
Koncentrace proteinů	vysoká	vysoká	nízká
Koncentrace mucinů	velmi vysoká	nízká	velmi nízká

Sekreční buňky serozních a seromucinózních žláz jsou inervovány sympaticky a parasympaticky. Sekrece slin roste úměrně, jestliže jsou synergicky stimulovány obě dráhy. Proto cholinergní a také  $\alpha$ - a  $\beta$ -adrenergní stimulace je možná.  $\alpha$ - adrenergní stimulace slinných žláz způsobí kalciový influx do sekrečních

buněk, jehož následkem je produkce sekretu, který je bohatý na proteiny. Vlivem nízké koncentrace mucinu je vzhled klinicky popisován jako nepěnlivý a viskózní. U tohoto typu stimulace je nízký objem slin.  $\beta$ -adrenergní stimulace nemá za následek tok elektrolytů, ale umožňuje vysokou proteinovou produkci acinů. Tento sekret je v porovnání s  $\alpha$ -adrenergní stimulací viskózní s větším obsahem mucinu, klinicky je popisován jeho vzhled jako pěnlivý a objemově spíše nižší.

Mukózní žlázy jsou stimulovány cholinergicky. Tento způsob stimulace způsobuje iontový tok jednak  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  a  $\text{Ca}^{2+}$  iontů přes buněčnou membránu a má za následek vzestup elektrolytů a velký objem tekutiny.

### 3.2.1 Rychlost slinného toku a pH

Sekrece prakticky kolísá mezi hodnotami od 0 ml/min (během spánku) do 6 ml/min (např. při žvýkání, kyselý stimul na jazyku). Míra sekrece průtoku, tak i podíl jednotlivých slinných žláz na celkové produkci slin je závislá na cirkadiálních rytmech a typu stimulace. Příspěvky jednotlivých žláz jsou shrnuty v tabulce 3, přičemž největší podíl na celkovém objemu mají žlázy příušní a podčelistní, s výjimkou během spánku, kdy stimulace příušní žlázy bývá ignorována.

Rychlost průtoku slin ve slinotvorných kanálcích je determinována elektrolytickou koncentrací. Vyšší rychlost znamená kratší čas pro konající se iontovou výměnu. Vyšší koncentrace hydrogenuhličitanů v důsledku stimulace slinění, má za následek vyšší pufrální kapacitu orální tekutiny. Na počátku výrazně klesá celková koncentrace proteinů a mucinu a salivace je zrychlována až do dosažení konstantního objemu. Celková koncentrace proteinů a mucinu sekretovaných za minutu proporcionálně roste s mírou sekrece.

Podíl hydrogenuhličitanů jako slinné pufrální složky během klidové fáze je přibližně 50%. Během této fáze příušní žlázy prakticky neprodukují žádné sliny, zatímco další dvě velké slinné žlázy jsou zodpovědné za produkci slin. Jedná se o vysoce viskózní a na proteiny bohatou sekreci, která je stabilizována orální tekutinou s pH kolem 7,0. Za podmínek stimulace roste role hydrogenuhličitanů, jako hlavní

pufrační komponenty. Je důležitá k ochraně zubů proti demineralizaci a zvlhčování měkkých tkání dutiny ústní.

Tab.3 Průměrný příspěvek jednotlivých typů slinných žláz na celkové produkci sliny v závislosti na určitém typu stimulace

žlázy	stimulace			
	během spánku	žádná	mechanická	kys.citrónovou
Gl. parotis	0	21	58	45
Gl. submandibularis	72	70	33	45
Gl. sublingualis	14	2	2	2
Gl.salivariae minores	14	7	7	8

vyjádřeno v % z celkového množství

### 3.3 Mechanismus transportu návykových látek z plazmy do slin

Slinné žlázy jsou bohatě cévně zásobeny. Cesta drogy z krve do slinného kanálku se děje přes kapilární stěnu, basální membránu a membránu epiteliálních buněk slinných žláz. V procesu transportu drog se uplatňují různé mechanismy, zahrnující pasivní transcelulární difúzi, aktivní proces proti koncentračnímu gradientu, filtraci přes póry v buněčné membráně a pinocytózu.

#### 3.3.1 Typy transportů

U **pasivní transcelulární difuze**, která se týká většiny léčiv včetně amfetaminů, procházejí vysoce lipofilní látky přes kapilární stěnu, buněčnou membránu a acinární buňky sekrečního prostoru. Lipidová vrstva epiteliální buněčné membrány tvoří limitující bariéru. Tentýž mechanismus umožňuje jejich přechod přes buněčnou linii duktů ve žlázách.

**Ultrafiltrací** (neboli paracelulárním transportem) procházejí malé polární molekuly, např.glycerol, glukóza, ethanol aj. Poměry S/P několika malých polárních,

lipofóbních sloučenin jsou vyhodnocovány jako funkce jejich molekulové hmotnosti. Tento mechanismus je omezen na sloučeniny s molekulovou hmotností (MW) menší než 300Da, dokonce i u látek s MW okolo 150Da je dokázáno, že hladina ve slinách je mnohem nižší než jaká je v plazmě (Burgen, 1956; Martin and Burgen, 1962; Vining and McGinley, 1982).

**Aktivní transportní mechanismy** řídí přechod mnoha elektrolytů a některých proteinů, jako např. IgA. Tento proces je znám i u některých drog a léků, jako např. penicilin, metoprolol, methotrexát (Paxton, 1979)

Pinocytóza jako speciální případ aktivního transportu má vzhledem ke studovaným látkám tohoto experimentu význam zanedbatelný.

### 3.3.2 Faktory ovlivňující mechanismus transportu

Velikost difúze látek je funkcí koncentračního gradientu, dále je závislá na velikosti povrchu plochy určené k transportu, tloušťce membrány a rozměru difúzní konstanty, která je závislá na fyzikálně-chemických vlastnostech každé látky. (Paxton, 1979). Proměnné, které ovlivňují tento typ transportu jsou pH a  $pK_a$ , rozpustnost v tucích, velikost náboje, molekulární hmotnost, prostorové uspořádání, hladina volné frakce látky (nevázané na sérových proteinech), dávce a clearance látky, průtoku a pH slin, podíl slinných vazebných bílkovin a slinných enzymů, které jsou schopné metabolizovat látky. Z výše uvedeného výčtu vyplývají intra a individuální rozdíly v poměru saliva/plazma (dále jen S/P) některých návykových látek.

Obecně lze formulovat větu, že koncentrace látek ve slinách reflektuje volnou frakci léčiva v krvi. Proměnné jsou přehledně shrnuty v tabulce 4 (Landon et al., 1982).

Tab.4. Proměnné veličiny, které ovlivňují proces pasivní difúze (Landon et al., 1982)

proměnné ve vztahu	typy proměnných
k návykové látce	kyselé či bazické povahy a hodnota pak lipofilita neutrální či s nábojem molekulová hmotnost a prostorové uspořádání
k cirkulující hladině látky	hladina nevázaná frakce návykové látky dávka a clearance
ke slině	rychlost slinného průtoku slinné pH slinné vazebné proteiny (obvykle minimální) enzymy zodpovědné za metabolizaci náv.látky

Relativní afinita mezi vodou a lipidy, jako např. vyjádření rozdělovacího koeficientu oktanol/voda, je důležitý faktor, který determinuje snadnost s jakou molekuly procházejí lipidovými membránami acinárních buněk. Jestliže je návyková látka ionizována fyziologickým pH, její efektivní lipofilita je značně snížena. Ionizované partikule jsou obkloповány molekulami vody, které jsou zodpovědné za nepříznivé membránové ion-dipólové interakce. Významné je, že lipofilní drogy jsou obvykle metabolizovány na více polární látky a metabolity hydrofilní povahy jsou přednostně vylučovány do moči.

Další variabilní proměnnou je pH slin. Při zvýšené rychlosti slinného toku se zvyšuje koncentrace hydrogenuhličitanů, která mění pH slin z původních 6,0 na 8,0 (Landon and Mahmood, 1982). Účinek pH slin je závislý na konstantě  $pK_a$  drogy. Slinné pH ovlivňuje koncentraci kyselých látek, jestliže je hodnota  $pK_a$  kyselých látek vyšší než hodnota 5,5 a látek bazické povahy, u kterých je hodnota konstanty  $pK_a$  menší než 8,5 (Feller and le Petit, 1977).

Jedním z nejvíce užívaných aspektů při monitorování hladin návykových látek ve slinách je velikost nevázané frakce látky v plazmě a ve slinách ( $f_p$  a  $f_s$ ). Pro kyselá drogy s  $pK_a < 5,5$  a bazická drogy s  $pK_a > 8,5$  je poměr S/P nezávislý na pH. Tento S/P poměr se musí rovnat poměru  $f_p/f_s$ , přičemž  $f_s$  je obvykle považována za rovnou jedné. Poměr S/P tedy odpovídá nevázané frakci INL v plazmě (tato frakce je zodpovědná za farmakologický účinek látky). V případě metamfetaminu, který má hodnotu  $pK_a$  10,1 je tedy tento poměr na pH slin nezávislý.

Rasmussen (1964) sestavil rovnici založenou na rozdělení pH, která popisuje poměr S/P a rovněž zvažuje rozdíly mezi protein vázající a ionizovanou frakcí drogy ve slině a v plazmě. Rovnice vychází z Henderson-Hasselbalchovy teorie.

Za předpokladu pasivního difúzního transportu platí pro lipofilní látky kyselého charakteru rovnice (1) a pro látky bazické rovnice (2).

$$\text{substance kysel\u00e9 povahy} \quad -S/P = \frac{1 + 10^{(pH_s - pK_a)} x f_p}{1 + 10^{(pH_p - pK_a)} x f_s} \quad (1)$$

$$\text{substance bazick\u00e9 povahy} \quad -S/P = \frac{1 + 10^{(pK_a - pH_s)} x f_p}{1 + 10^{(pK_a - pH_p)} x f_s} \quad (2)$$

vysv\u011btlen\u00ed symbol\u016f: S	koncentrace drogy ve slin\u00e1ch
P	koncentrace drogy v plazm\u011b
pK <sub>a</sub>	konstanta pK <sub>a</sub> drogy
pH	pH plazmy
f <sub>p</sub>	voln\u00e1 frakce drogy v plazm\u011b
f <sub>s</sub>	voln\u00e1 frakce drogy ve slin\u00e1ch

L\u00e1tky kysel\u00e9 povahy se vyskytují v ni\u017e\u00ed\u0161\u00edch koncentrac\u00edch a l\u00e1tky bazick\u00e9 v koncentrac\u00edch vy\u0161\u00ed\u00edch ve slin\u00e1ch ne\u017e-li v plazm\u011b. Opa\u010dn\u00e1 situace nast\u00e1v\u00e1, jestli\u017ee je slinn\u00e9 pH vy\u0161\u00ed ne\u017e pH krve, nap\u0159. po siln\u00e9 stimulaci slinn\u00e9ho toku. V rovnici (1) a (2) jsou dv\u011b prom\u011bnn\u00e9, pH plazmy a vazebnost drogy, kter\u00e9 jsou relativn\u011b st\u00e1le. Hodnota plazmatick\u00e9ho pH je u zdrav\u00fdch lid\u00ed obvykle 7,4 a vazebnost n\u00e1vykov\u00fdch l\u00e1tek na slinn\u00e9 proteiny je obecn\u011b zanedbateln\u00e1 (f<sub>s</sub>=1). Wan et al. (1978) zapsal hodnotu 2,76 S/P pom\u011bru bazick\u00e9 drogy amfetaminu, kter\u00e1 se shoduje s hodnotou vypo\u010d\u00edtanou dle podle Rasmussenovy rovnice (S/P=2,21).



V rovnici (1) a (2) se předpokládá pasivní a rychlá difúze látek mezi plazmou a slinami. Jestliže slinné žlázy vylučují malé frakce drog, stane se transport závislý na slinném toku. Graham (1982) sestavil rovnici pro slinnou clearance ( $CL_S$ ):

$$CL_S = Q_S * S/P$$

kde symboly:  $Q_S$ ..... rychlost slinné produkce

$S/P$ ..... je koncentrační poměr látky

Z rovnice je patrné, že slinná clearance je přímo úměrná  $S/P$  poměru a rychlosti průtoku slin. Zuidema a Van Ginneken (1983a) sestavili podobnou rovnici, ve které rozdělili clearance na aktivní a pasivní komponenty. Charakterizovali substance s vysokou mírou extrakce  $S/P$  jako látky s vysokou mírou clearance. V případě dobré lipofility a vysoké míry extrakce je slinná clearance přímo úměrná průtoku krve. V případě opačném, tedy nízké lipofility a nízké míry clearance je přechod substancí přes membránu a jejich objevení se ve slinách dán tzv. rychlostním poměrem (aktuální koncentrace/rychlost průtoku krve). Slinná clearance je v tomto případě tedy jen parciálně závislá na průtoku krve, i když slinný tok zůstává závislým na krevním toku. Slinná koncentrace návykových látek se postupně snižuje s rostoucí rychlostí toku slin a krve.

Intraindividuální variabilita poměru  $S/P$  mnoha INL se může projevit po jejich orálním či intravenózním podání. Posti (1982) předložil pravděpodobnou teorii založenou na proměnlivém arteriovenózním koncentračním poměru. Haeckel (1990) popsal tento jev více detailněji. Při orální aplikaci dochází k absorpci látky ze střeva a v jejím počátku je v arteriální krvi vyšší koncentrace drogy než-li v krvi venózní (pozitivní arteriovenózní diference). Po kompletní absorpci, kdy ještě není látka metabolizovaná, případně je metabolizována v zanedbatelném množství, je situace opačná (negativní arteriovenózní diference v eliminační fázi). Tuto fluktuaci koncentrací popsal Haeckel (1990) pro kofein. Vzhledem k množství protékající krve se orgány liší a lze je rozdělit do dvou skupin. Pro první skupinu orgánů je charakteristický velký průtok krve (př. játra, ledviny, mozek, slinné žlázy), zatímco u druhé skupiny je popisován relativně nízký tok krve (př. kůže, kosterní svalovina ve fázi klidu, tuková tkáň). Farmakokinetika považuje první skupinu za centrální a skupinu druhou jako periferní kompartment. Z výše uvedeného lze odvodit následující úvahu. Slinné žlázy mají vysoký krevní průtok, arteriovenózní diference

substancí schopných difúze je relativně malá a blíží se k hodnotě 1,0. Nízká korelace mezi kompartmenty, pak může být zanedbána (Haeckel, 1990).

### **3.4 Amfetaminy**

Amfetamin je chemická látka patřící do skupiny budivých aminů, tj. derivátů sympatomimetik s centrálně dráždivým účinkem. AMF byl syntetizován v r. 1887, v r. 1939 byl návyk považován za vyloučený a za necelý rok bylo popsáno jeho zneužívání v USA.

Skupina budivých aminů má desítky zástupců používaných a bohužel z větší části zneužívaných v praxi. Látky amfetaminového charakteru jsou získávány cestou chemické syntézy (chemické názvy a struktury jsou uvedeny v příloze).

#### **3.4.1 Terminologie**

Alexander Shulgin (1978), specialista na psychomimetické fenylethylaminy tvrdí, že „název amfetamin určuje jednu jedinou chemickou strukturu, a proto by neměl být důvod, pro jeho užití v množném čísle“. Nicméně je plurálu využíváno, zpravidla jako generických názvů mnoha sloučenin obsahujících amfetaminovou strukturu.

J.H. Biel a B.A. Bopp (1978) definovali strukturu amfetaminu jako: (1) nesubstituovaný fenylový kruh, (2) dvou uhlíkatý řetězec mezi fenylovým kruhem a dusíkem, (3)  $\alpha$ -methylová skupina, (4) primární aminoskupina.

#### **3.4.2 Popis psychostimulancí**

Psychostimulancia jsou látky s nefyziologickým účinkem na CNS. Jejich neurobiologický mechanismus působí cestou zvýšení koncentrace monoaminů na synapsích, ovlivnění presynaptických receptorů a sníženého zpětného vychytávání monoaminů. Dále blokují jejich biotransformaci (inhibicí monoaminoxidasy, dále jen MAO) a podílí se na vytváření p-hydroxynorefedrinu, který působí jako falešný mediátor). Typickými zástupci jsou AMF, MAMF, MDMA a další.

### 3.4.3 Popis amfetaminů

Amfetamin a tzv. "formované amfetaminy" (v cizojazyčné literatuře jsou někdy označovány deriváty AMF termínem "designer amphetamines") jako např. MDA a jemu podobné deriváty jsou centrální nervové stimulanty populárně zneužívané pro jejich psychotropní efekt, zahrnující pocit euforie, zvýšenou energii a bdělost. Podání amfetaminů je obecně orální nebo intravenózní cestou, zatímco methamfetaminy jsou zneužívány orálně, intravenózně i cestou kouření.

### 3.4.4 Zdroje amfetaminů

#### Přírodní amfetaminové zdroje

Amfetaminy, stejně jako opiáty, kokain, nikotin, marihuana a alkohol, jsou produkovány rostlinou říší. Typickými rostlinnými představiteli jsou členové rodu *Ephedra* a stromu *Catha edulis*.

*Ephedra sinica*, často označována pouze jako ephedra a v Číně jako *Ma huang* ("Hledající potíže"), má hlavní aktivní komponentu efedrin (7.2-7), který byl identifikován v r.1887 Nagajoshi Nagai (zakladatel Farmaceutické společnosti v Japonsku). Čerstvé listy z keře nebo stromu *Catha edulis* obsahují kathinon (7.2-9) a norpseudoefedrin (kathin) (7.2-10). Mezi další rostlinné odrůdy, které obsahují přírodní amfetaminy patří odrůdy Akácie, které obsahují AMF a MAMF (Clement et al., 1998) a AMF v Egyptském jasmínu (Nofal et al., 1982). Meskalin (7.2-6) je získáván ze sušených vrcholů kaktusů *Lophophora williamsii* a jeho příbuzných druhů.

#### Amfetaminu podobné endogenní sloučeniny

Dlouhou dobu je známo, že dekarboxylací metabolitů aromatických aminokyselin lze získat z fenylalaninu  $\beta$ -fenethylamin (7.2-11) jeho metabolit fenylethanolamin (7.2-14), tyramin (7.2-5) z tyrozinu a tryptamin z tryptofanu, které jsou formovány v periférním nervovém systému (Nakajima et al., 1964) a v mozku (Inwang et al., 1973).

### Syntetické amfetaminy

Rumunský chemik Lazar Edeleanu popsal v roce 1887 (ve své disertační práci pod vedením A.W. Hofmannaz Univerzity v Berlíně) syntetickou přípravu amfetaminu. Mnoho amfetaminových derivátů bylo vyvinuto pro klinické použití jako např. chuťové supresivum fenfluramin (7.2-12), inhibitor MAO používaný při léčbě Parkinsonovy choroby s názvem Deprenyl (7.2-16) aj.

### **3.4.5 Farmakodynamika**

Jako centrální sympatomimetika se do značné míry podobají svou strukturou katecholaminům a jejich účinek je tak popisován jako přímé působení na receptory adrenergních struktur. Amfetaminy zvyšují koncentraci neurotransmiterů dopaminu, noradrenalinu a serotoninu na nervových synapsích jak v centrálním nervovém systému, tak i na periférii. Všechny tyto látky do určité míry tlumí monoaminoxidázu, zvláště tranlycypromin. Efedrin inhibuje cholinesterázu, avšak hlavně zamezuje zpětnému ukládání (uptake) katecholaminů při jejich uvolnění na zakončení sympatických nervových vláken (podobně jako imipramin), a tak zesiluje jejich účinek. Účinek efedrinu je oproti ostatním látkám značně protražovaný. Obecně je děj zvýšení koncentrace popisován jako zvýšené uvolňování mediátorů z nervových zakončení a blokadou zpětného vychytávání. Amfetaminy dále blokují enzym monoaminoxidázu (MAO), který inaktivuje katecholaminy. Všechny výše uvedené mechanismy vedou tedy ke zvýšení neurotransmise.

### **3.4.6 Farmakokinetika**

Amfetaminy se dobře resorbují z gastrointestinálního traktu a snáze pronikají hematoencefalickou bariérou. Dobře se resorbují i nosní sliznicí.

Hodnota  $pK_a$  konstanty **amfetaminu** je rovna 10 a jeho vazebnost na plazmatické proteiny je z 16%. Teoretický S/P poměr je 3,33. Amfetamin se detoxikuje velmi pomalu, v moči se objevuje již během 20min (ovšem celá dávka může být vylučována řadu dní) a je exkretován většinou v nezměněné formě. Slinné vzorky jsou vhodnější než-li vzorky moči, což je vysvětlováno vyšší koncentrací amfetaminu získaného ze slin uživatelů po absorpční fázi a na druhé straně silným

vlivem pH moče na exkreci drogy (Schramm et al., 1992). Pokud je pH moče menší než 7, dochází k rychlejší eliminaci AMF.

**Metamfetamin** má hodnotu konstanty  $pK_a$  10,1 a není vázán na plazmatické proteiny. Přibližně 70% dávky je exkretováno močí během 24h. Za normálních podmínek je kolem 43% z dávky eliminováno v nezměněné podobě, 15% jako 4-hydroxymetamfetamin a okolo 5% jako amfetamin, který je hlavním aktivním metabolitem. Exkrece nezměněné látky závisí na pH moči, přičemž bývá zvětšená v kyselé moči a značně redukována (okolo 2%) v moči zásadité.

### 3.4.7 Farmakologické účinky

Nejsilněji působí *amfetamin* a *dexamfetamin*, které vyvolávají značnou euforii a podléhají předpisům o omamných látkách. Téměř stejný účinek má též *metamfetamin*. Látka, která byla původně zavedena jako lék proti obezitě je *fenmetrazin*, stimuluje centrální nervový systém podobně jako amfetamin, jeho účinek je však menší, protrahovanější se slabším sklonem k návykovosti. *Efedrin*, přirozený alkaloid, který byl dlouhou dobu užíván v lidovém lékařství, má euforickou složku podstatně slabší a jeho hlavní použití bylo v léčbě astmatických záchvatů jako bronchodilatans a ke zvýšení krevního tlaku. Vzhledem k jeho návykovosti je nahrazován modernějšími léčivy nebo je zejména v HVLP kompositech nahrazen optickým antipodem pseudoefedrinem, u něhož je riziko závislosti minimální.

Farmakologický účinek centrálních sympatomimetik se projevuje vlivy na:

- (1) bdělost – odstraňují pocit únavy a ospalosti, řadí se mezi přímé antagonisty účinku barbiturátů a neuroleptik
- (2) psychické funkce – zvyšují rychlost přenosu nervových vzruchů mezi jednotlivými synapsemi v centrálním nervovém systému a tím i rychlosti sledu myšlenek, je však prokázáno, že rychlost odpovědi se zrychluje, zatímco její přesnost se podstatně snižuje; dochází tedy k rychlému sledu myšlenek, avšak s velkou chybou

- (3) motilitu – zvyšuje motilitu experimentálních zvířat, a to zvláště v první hodině po podání, v dalším období potom dochází spíše ke snížení motility
- (4) podkorové oblasti – všechna centrální sympatomimetika mají zároveň analeptické účinky, stimulují dechové a cirkulační centrum v prodloužené míše a antagonizují tak toxické účinky barbiturátů a jiných sedativ

### 3.4.8 Přehled legálních a ilegálních amfetaminových derivátů

Mezi legální látky amfetaminového typu se řadí:

- amfetaminy a jejich isomery (amfetamin, metamfetamin)
- analogy amfetaminu (efedrin, fenmetrazin, methylfenidát, fentermin, chlorfentermin)
- ostatní deriváty (cyklické sloučeniny)

Ilegální amfetaminové deriváty tzv. “formované amfetaminy“ jsou shrnuty v tabulce 5. V posledních letech jsou nejpoblárnějšími prekurzory pro syntézu ilegálního amfetaminu a metamfetaminu fenyl-2-propanon a efedrin.

Další psychostimulační látky s odlišnou strukturou: mazindol, pipradol, amfepranon, fenethylin, trihexyfenidyl, orfenadrin, benztropin, IMAO.

Tab. 5 Přehled dalších ilegálních amfetaminových derivátů – “designer drugs“

DMA	di-methoxyamfetamin
DOB	2,5-dimethoxy-4-bromoamfetamin
DOET	2,5-dimethoxy-4-ethylamfetamin
DOM	2,5-dimethoxy-4-methylamfetamin, STP
MAMF	metamfetamin
MBDB	N-methyl-1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-2-butanamin
MDA	3,4-methylendioxyamfetamin
MDE	N-ethyl-3,4-methylendioxyamfetamin
MDMA	N-methyl-3,4-methylendioxyamfetamin
MMDA	3-methoxy-4,5-methylendioxyamfetamin
PMA	p-methoxyamfetamin
TMA	3,4,5-trimethoxyamfetamin

### 3.5 Techniky odběru slin

Existuje mnoho různých stimulů, které způsobují salivaci viz. kap. 3.2.1 (nervová, mechanická a stimulace kyselinou citrónovou). V mnoha studiích je požadována nestimulovaná slina a testované osoby odplivávají přímo do odběrové zkumavky. Samotné plivání je obvykle dostatečným stimulem k vyvolání průtoku slin rychlostí okolo 0,5 ml/min.

Přestože většina pacientů preferuje raději darování slin než-li krve, představuje "plivání" jakousi sociální bariéru. Tento fakt a možné další příčiny, jakými je nervozita, úzkost a různá onemocnění, vedou při potřebě slinného vzorku ke snížení slinné sekrece, resp. k suchosti v ústech.

Žvýkání parafinového vosku, parafilm<sup>®</sup>, gumových proužků, kousků Teflonu nebo žvýkačky (Dawes a Macpherson, 1992), vyvolá průtok slin obvykle 1 až 3 ml/min.

Obecně platí, že rychlost sekrece vzrůstá s velikostí sousta a tlakem, který je vyvinut při žvýkání. Jednostranné kousání podporuje hojnou sekreci žláz na aktivní straně úst, zatímco sekrece inaktivní strany je velmi nízká.

Při užívání uvedených stimulů doporučuje Mucklow (1982) ve své práci, aby testovaná osoba sliny nashromáždila v ústech a při pocitu nutkání sliny spolknout je volně vyloučila z úst do odběrovky. Opakované vylučování slin by mohlo způsobit napěnění vzorku, vzniklé bublinky mají významný vliv na změnu pH a tím dochází k chybné interpretaci poměru S/P.

Velmi potentním stimulem chuti je pár kapek citronové šťávy nebo použití kyseliny citrónové o koncentraci 0,5 mol/l, tyto látky obecně indukují maximální sekreci kolem 5 až 10 ml/min (Vining a McGinley, 1985).

#### 3.5.1 Odběrové systémy

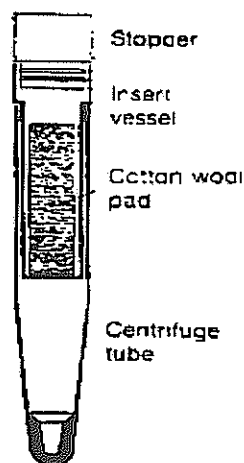
Během posledních několika let byly mnohé výzkumy soustředěny na vývoj metod, které řešily spousty existujících problémů pramenících z využívání salivy jako biologického materiálu pro kvantitativní stanovení tzv. volné návykové látky (bez proteinové vazby). Cooper et al. (1981) a May et al. (1978) byli první, kteří použili dentální bavlněnou ruličku k monitorování *desipraminu*. V následujícím období

jejich metoda posla řadou změn a vylepšení a nyní je dentální bavlněná rulička dostupná jako Salivette<sup>®</sup>. Procedura odběru je následující: během žvýkání (po dobu 30-45 sekund bez nebo za pomoci stimulace) dochází k absorpci slin do dentální bavlněné ruličky. Takto zachycený slinný sekret je vložen do odběrovky s plastovým uzávěrem a upevněn do zkumavky k centrifugaci. Během centrifugace dochází k pasáži slin z ruličky do spodní části zkumavky, se kterou se poté pracuje (viz obr. 4) (Haeckel at al., 1989). Nevýhodou u Salivette<sup>®</sup> je interference dentální bavlněné ruličky s některými analyzovanými hormony a léky, jako např. u testosteronu (Dabbs, 1991). Výhodou Salivette<sup>®</sup> oproti ostatním typům odběrovek je relativně velký objem slin (1,5ml) za krátký časový úsek (Höld, De Boer, Zuidema a Maes, 1995).

Dalším sběrným zařízením je OraSure<sup>®</sup>, který absorbuje po vložení mezi tváře a dásně 1,0 ml gingivální crevikulární tekutiny a sliny než-li sliny samotné. V tomto případě je na místě použití termínu „orální vzorek“, než-li termínu saliva (Thieme, Yoshihara, Piacentini a Beller, 1992).

Oral-Diffusion-Sink (ODS) zařízení je užíváno jako in situ sběr ultrafiltrátu slin (Wade, 1992a; Wade a Haeggele, 1991). ODS zařízení, varianta dříve používaného systému pro časově integrované měření kortikoidů v intersticiální tekutině (Wade, 1984), je vloženo do úst a kontinuálně hromadí určité sloučeniny procesem difúze po koncentračním gradientu. Koncentrační gradient pro konkrétní analyt je udržován vnitřním obsahem aparátu, který váže látku jako volnou frakci. Hodnota je zanedbatelná v porovnání s jeho koncentrací ve slinách. Antisérum má odpovídající specifitu a vazebnou kapacitu užívanou k zachování koncentračního gradientu pro kortikosteroidy (Wade a Haeggele, 1991). Zařízení ODS může být použito k reflexi dostupnosti hormonů ve slinách, je obzvláště vhodný ve studiích sloučenin, které mají epizodickou sekreci a rychlou clearans. Výsledky získané ODS mají obecně vysokou korelační hodnotu s více tradiční časově integrovanou metodologií (Geris a Kathol, 1992; Shipley, Alessi, Wade, Haeggele a Helmbold, 1992).





Obr. 4. Salivette<sup>®</sup> pro slinný vzorek (Haeckel et al., 1987)

Schramm (1990) vyvinul zařízení pro in situ sběr ultrafiltrátu slin, který je založen na principu osmotické pumpy. Semipermeabilní membrána (propustný limit 12,000 Da) obklopuje osmotický aktivní substanci (sacharóza), vložení do úst pacienta dochází během pár minut k ultrafiltraci slin (1 ml ultrafiltrátu za 5 minut). Vnitřní část osmotické pumpy je nepropustná pro velké molekuly, čímž jsou eliminovány běžné problémy, se kterými se setkáváme při odběru slin, např. vyloučení nadbytečného množství pěny obsahující málo tekutiny nebo diskomfort pacientů, který pramení z formace viskózní sliny mezi ústy a odběrovým zařízením.

Výhodou v laboratorním procesu je nízká viskozita čistého ultrafiltrátu a v porovnání s běžnou slinou je laboratorní proces zjednodušen (žádná centrifugace, extrakce a větší přesnost). Další výhodou ultrafiltračního kolektoru je odstranění problému kontaminace buněčnými součástmi krve, molekuly navázané na proteiny jsou eliminovány samotnou technikou odběru slin (Borzelleca a Cherrick, 1965).

Dominující nevýhodou tohoto systému je hustota tekutiny ultrafiltrátu, která je způsobena vysokou koncentrací sacharózy (jež se používá jako osmotická hnací síla).

Ke správnému stanovení aktuální koncentrace hledaných analytů v ultrafiltrátu je zapotřebí korekční faktor, který je odvozen z hustoty roztoku (Schramm, Annesley, Siegel, Sackellares a Smith, 1991). Čas stanovení z ultrafiltrátu je velmi dlouhý v porovnání se systémem Salivette<sup>®</sup> (8 min vs 45 s).

Kolektor je dostatečným stimulem slinného toku, není tedy nezbytné užívat mechanické případně chemické stimuly, které mohou interferovat s kvantitativním

stanovením analytů, vytvářet nescifické vazby nebo jinými způsoby ovlivňovat imunoanalýzu. Kromě toho je slinné pH stabilizované ve stimulované salivaci.

### 3.5.2 Vlivy odběrových systémů

U komerčně dostupných odběrových systémů orální tekutiny byly v in vitro studiích zjištěny rozdílné drogové a slinné recovery (výtěžnost). V laboratorním využití by se měla recovery pohybovat v rozmezí 50-90% (O'Neal et al., 2000).

## 3.6 Analýza návykových látek v tělních tekutinách

Analýzu INL v tělních tekutinách lze schematicky rozdělit

- Orientační analýza (kvalitativní analýza)
  - Instrumentální
  - Manuální
  - Terénní testy
    - Barevné reakce
    - Imunoprecipitační rychlé testy
- Instrumentální analýza (kvalitativní a kvantitativní analýza, např. HPLC, GC, EMIT atd.)
- Konfirmační analýza (instrumentální analýza ve spojení s různou detekcí, např. GC/MS, GC/MS-MS, LC/MS, LC/MS-MS)

### 3.6.1 Analýza INL v orální tekutině

Analýza návykových látek v orální tekutině v současné době nejvíce využívá imunoanalytických metod, které jsou základem systému rychlostestů.

Principem imunoanalytické metody je reakce antigenu a protilátky za tvorby komplexu, kterou vyjadřuje následující rovnice:  $Ag + Ab \rightarrow [AgAb]$

Haptenem v antigenním komplexu je hledaný analyt-marker užití drogy. Do určité míry specifická protilátka je značena v případě rychlotestů koloidním zlatem, fosforem případně jinými indikátory.

### 3.6.1.1 Screeningové testy

Imunoanalýza jako metoda, která umožňuje stanovit drogu ve slinách, musí zaměřit nebo mít signifikantní tzv. zkříženou reaktivitu s parentní drogou a lipofilním metabolitem, např. kokain jako parentní droga a ekgonin methyl ester jako jeho lipofilní metabolit. Drogy, které se kouří (marihuana, kokain či heroin) jsou v depotních místech bukální sliznice a predominují ve slině. Imunoanalýza, která slouží k detekci hydrofilních metabolitů drog v moči není vhodná pro slinný screening. Před zavedením specifické imunoanalýzy pro slinný screening musí být provedeny klinické experimenty a testy senzitivity, specifity a prediktivní hodnoty rozdílných cut-off křivek drog ve slině.

### 3.6.1.2 Terénní testy

Mezi prvními terénními testy pro detekci INL byla metoda využívající barevné reakce, z nichž pramení i její název *Barevná reakce (CR, color reaction)*. Základem reakcí byla barevná změna Marquisova činidla. Tyto reakce se však v praxi příliš neosvědčily a byly nahrazeny sofistikovanějšími imunochromatografickými terénními rychlotesty.

U rychlotestů se obecně jedná o laterální difúzi vzorku orální tekutiny společně s mono- či polyklonální protilátkou v pufrovacím roztoku, která prochází lineárním uspořádáním imobilizovaných drog. Pokud je droga ve vzorku přítomna, naváže se na ni protilátka a vytvoří se komplex. Nenavázaná protilátka prochází testovací linií a reaguje s konjugátem imobilizovaných drog. V místě reakce se vytvoří barevná precipitační linie, která je indikací negativního výsledku (tedy pozitivní test je negativním výsledkem).

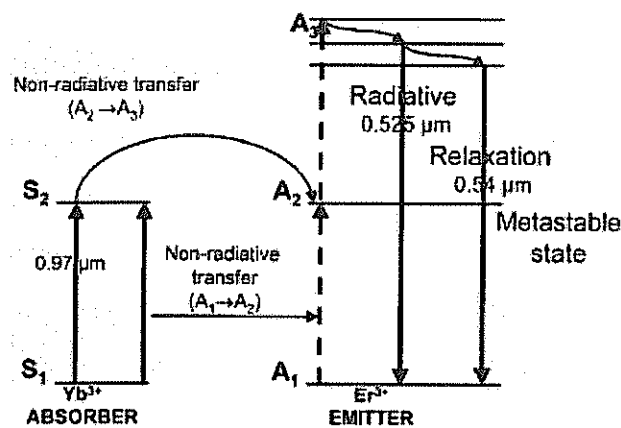
Cozart Rapiscan systém byl prvním rychlotestem s elektronickým čtecím zařízením. Byl vyvinut v roce 1998 a využíval laterální imunoanalýzu s protilátkou značenou koloidním zlatem (Spiehler, 2001). Sběrný buničinný váleček odběrové soupravy po vložení do úst absorbuje 1 ml slin, poté je umístěn zpět do odběrovky a promýván 2 ml pufru. Na kazetu je nakapáno 6 kapek směsi sliny a pufru. Doba trvání průchodu vzorku je 3-5 minut pro jednoduchý či dvoupanelový test a 12 minut pro pětipanelový test. Výsledky testu (zlatem značená protilátka navázaná na imobilizovaných drogách při absenci drogy ve slině) jsou monitorovány ve čtecím zařízení. Kontrola kvality je prováděna pomocí myší protilátky IgG, která je přítomná na konci setu a zjišťuje kompletní laterální difúzi vzorku. V případě positivity je doporučeno zbytek vzorku (2,8 ml směsi) uchovat pro konfirmaci výsledku, případně odebrat moč nebo krev (De Giovanni et al., 2002).

Dalšími imunochromatografickými testy, které využívají k detekci protilátku značenou zlatem je ORALScreen Systém (Avitar, Canton, MA) (Barrett et al., 2001), DrugWipe a DrugRead (Securitec GmbH, Ottobrun bei Munchen, Germany).

V nedávné době byla použita technologie tzv. Up-converting Phospor Technology (UPT). Principem UPT je fyzikální jev zvaný luminiscence. Jde o jev, kdy pevná látka absorbuje v nějaké formě energii, přičemž část této energie může dále emitovat ve formě elektromagnetického záření ve viditelné nebo jí blízké oblasti. Luminiscenční látky jsou tzv. luminofory. UPT využívá fluorescenci, což je speciální případ luminiscence, kdy emise během záření má zpoždění menší než  $10^{-8}$ s. Luminiscenci umožňují příměsné aktivační atomy vyskytující se v malém množství v základní krystalografické mřížce luminoforu.

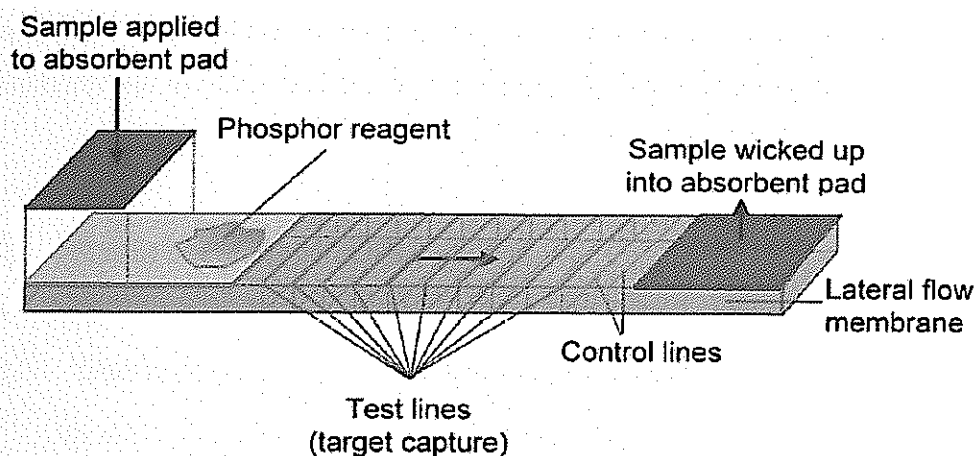
UPT technologie je založená na lanthanových částicích umístěných v krystalu, které absorbují infračervené světlo a emitují viditelné záření (viz obr. 5. a 6.). Z emitovaného světla se kvantitativně stanovuje koncentrace drogy ve vzorku. Tato metoda nahradila down-converting detekci, jejímž principem bylo absorbovat energii fotonů a emitovat foton o nižší frekvenci a která měla řadu nedostatků. Hlavním problémem bylo excitační ultrafialové záření, které způsobilo fluorescenci řady organických sloučenin a tím autofluorescenci pozadí s chybnými výsledky.

Mikrotitrační analýzou amfetaminů a metamfetaminů se zabývá firma OraSure Technologies, Inc. (Bethlehem, Pa) (Niedbala, 2001).



Obr. 5. Princip UPT technologie (Niedbala et al., 2001)

Lanthanové částice jsou umístěné v krystalu. Tyto elementy neradiativně přenášejí energii ve formě fotonů z absorberu na emiter.



Obr. 6. Testovací destička UPT technologie (Niedbala et al., 2001)

### 3.6.1.3 Konfirmační testy

Pozitivní výsledek on-site testů musí být potvrzen sofistikovanější metodou. Materiálem je vzorek slin, případně je dodána krev či moč (pozitivně označeného jedince). Bazálním a nejvíce užívaným analytickým systémem pro konfirmační analýzu amfetaminů je konfigurace plynové chromatografie ve spojení s hmotovou spektrometrií (GC/MS).

## **4 Experimentální část**

V rámci experimentální části mé diplomové práce jsem se zúčastnila programu protidrogové politiky s názvem "Analytická supervize rychlých orientačních průkazů ilegálních návykových látek ve slinách", jehož zadavatelem bylo Ministerstvo zdravotnictví České republiky. Program byl zahájen 7.4. 2004 rozhodnutím Ministerstva zdravotnictví ČR č. 42/04-OZP/4, kdy byl otevřen finanční zdroj pro dotaci.

### **4.1 Cílová skupina**

Extralaboratorní testování na přítomnost amfetaminů a metamfetaminů se týká prakticky celé populace České republiky. Použití souprav k detekci drog je cíleno na problematiku nehodovosti na pracovištích a v dopravním úseku, v monitorování sociálně problémových skupin obyvatelstva nebo školní mládeže.

### **4.2 Materiál a metodiky**

#### **4.2.1 Osnova postupu experimentální části**

Při sběru analytických vzorků od testovací skupiny probíhaly zároveň analýzy odebraného biologického materiálu s využitím laboratorních instrumentálních metod screeningu EMIT a konfirmace GC/MS za účelem řízeného výběru pozitivních vzorků. Detekovatelný koncentrační rozsah pozitivních vzorků byl stanoven dle interních laboratorních operačních postupů detekčních limitů GC/MS metodik. Konfirmované pozitivní vzorky byly zamrazeny na  $-70^{\circ}\text{C}$ , aby bylo možné je podrobit terénním testovacím soupravám. Poté následovala další fáze sběru zejména pozitivních výsledků a paralelní analýzy instrumentální metodikou a rychlotesty. Konečnou etapou bylo zpracování analytických výsledků, tedy jejich vyhodnocení a závěry z nich pramenící.

## **4.2.2 Testovací skupina a biologický materiál**

Pro účely testování byla využita statistický reprezentativní skupina klientů Detoxikačního centra, poraden pro toxikomanie a dalších pacientů zejména z onkologické kliniky. Od této skupiny byly získány dublety analytických vzorků slin a moči.

## **4.2.3 Popis terénních testů a konfirmační techniky GC/MS**

### **4.2.3.1 Soupravy terénních testů**

SalivaScreen 5 Test SYNTRON BIORESEARCH (dále jen Syntron) a Saliva Screen VI ULTIMED (dále jen Ultimed)

Nabídka testů návykových látek na soupravách (v originálním znění):

#### **SYNTRON:**

Amphetamin (AMP)  
Cocaine (COC)  
Marijuana (THC)  
Methamphetamin (MET)  
Opiates (OPI)  
Phencyclidine (PCP)

#### **ULTIMED:**

Opiáty/morfin (OPI)  
Marihuana (THC)  
Kokain/Benzoylecgonine (COC)  
Methadon (MAD)  
Methamphetamin (MET)

#### 4.2.3.2 Technika GC/MS

Vzorek je podroben úpravě na SPE extrakci, přičemž jeho eluát je odpařen v dusíkové atmosféře a reziduum je derivatizováno s trifluoracetanhydridem.

Pro extrakci amfetaminů z moče na pevné fázi se používá typ MP1, který je vhodný pro hydrofobní molekuly s funkčními skupinami katexu. Po eluci a následné derivatizaci je vzorek vhodný k další analýze na GC-MS.

#### Extrakce

Vakuový extraktor firmy Supelco, membránová pumpa

SPE-extrakce na pevné fázi, kolonky MP1 – katexy s C18 (Varian, Inc.)

#### Chemikálie a činidla:

- standardy d-amfetaminu Abbott v nativní moči
- derivatizační činidlo: anhydrid kys.trifluoroctové, anhydrid kys. heptafluorbutanové
- zkumavky Toxi-Tubes A
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  p.a., KOH p.a.,  $\text{NH}_4\text{OH}$  konc., HCl konc., EtOAc GC purity, kys.octová ledová, methanol, voda

#### Pracovní postup

- Patříčný počet mikrokolonek se umístí do vakuového manifoldu Supelco
- Provede se kondicionace kolonky pomocí 100  $\mu\text{l}$  methanolu
- Kolonka je propláchnuta 200  $\mu\text{l}$  fosfátového pufru 0,1M o pH 6
- Na kolonku jsou nanášeny 2 ml zpufovaného vzorku
- Kolonka je promyta 500  $\mu\text{l}$  destilované vody, 500  $\mu\text{l}$  0,1 M kyseliny octové a 500  $\mu\text{l}$  methanolu
- Disk se ponechá sušit při zvětšeném vakuu (17 – 34 kPa) po dobu 5 minut
- Přidá se 500  $\mu\text{l}$  methanolu, zvětší se vakuum (34 – 68 kPa) a suší po dobu 5 min
- Výměna zkumavky za normálního tlaku
- Aplikace 1,5 ml elučního činidla (ethylacetát : methanol : amoniak, v poměru 8:2:0,2)



- Aspirace za tlaku 6,8 kPa
- Odpaření eluátu při 45°C v atmosféře dusíku
- Derivatizace pomocí 100 µl PFPA při teplotě 70°C po dobu 60 min (platí pro společné vzorky, ve kterých detekujeme zároveň amfetaminy i opiáty)
- Derivatizace pomocí 200 µl TFAA při teplotě 80°C po dobu 15 minut (platí pro samotné amfetaminy)

### Parametry GC-MS

Systém GC-MS: Magnum Finnigan MAT (dnes firma ThermoElectron, Inc.)

Injector: Lauber injector

Autosampler: A200S, Finnigan MAT

Pumpa: turbopumpa PFEIFFER TP 4/4, 020-065, výkon 60 l/ min

GC kolona: ZB1ms; délka 30m; síla vrstvy stacionární fáze 0,25 mm

Stacionární fáze: 100 % dimethylpolysiloxan

Teplotní program pro GC:

70°C; 1 min

70°C – 200°C při 30°C/min (teplotní gradient)

200°C – 260°C při 8°C /min (teplotní gradient)

260°C 28 min

Derivatizační činidlo: PFPA, derivatizací vznikají pentafluorpropionylové deriváty

Metoda ionizace: Elektron Impact – elektronová ionizace

Rychlost skenu: 5 µScans

Celková doba trvání analýzy: 35 min

Charakteristické hmoty m/z:

AMF – 190, 118, 91

MAMF – 204, 160, 118, 91

EFEDRIN – 204, 110, 91

MDMA – 204, 162, 135, 110, 77

#### 4.2.4 Způsob odběru a zpracování slinného vzorku pro screening

Před odebráním vzorku slin bylo nutné testovanou osobu poučit o vhodnosti nemít potravu v ústech minimálně 5 minut před odběrem. Rovněž i pocit sucha v ústech lze řešit podáním sklenice vody opět minimálně 5 minut před odběrem.

Sběrače použité pro odběr orální tekutiny byly dvojího typu

1. typ: *Saliva collector*

- Testované osobě se vloží do úst savá houbička
- Ponechá se sytit slinami pomocí jazyka a rtů přibližně 2 minuty
- Sběrač je vyjmut a vložen do trychtýřku (součástí odběrového systému) tak, aby se houbička stlačila o stěny, tím se nabraná kapalina vloží do nálevky
- Z nálevky je OT vykapána do aplikační jamky destičky
- Vykapávání se sestává ze 4 kapek, které jsou aplikovány v 10 sekundových intervalech

2. typ: *Salivette*

Odběrovka Salivette (viz kap.3.5.1, obr.4.) je zkumavka, která je opatřena krytem. Uvnitř zkumavky je váleček obsahující tampon.

- Do úst pacienta je vložen vatový tampon a ponechá se sytit 1 minutu slinami
- Po uplynutí této doby se tampon hygienicky vyjme (např. pinzetou) a vloží se zpět do válečku
- Odběrovka se nechá centrifugovat a ultrafiltrát je aplikován na destičku testovací soupravy

Na testovací destičce jsou vedle výsledkového okénka naznačeny dráhy pro precipitační linie. Test musí být odečítán do 15 minut po aplikaci vzorku. Vznikne-li barevná linie (modrofialová), výsledek je považován za negativní a naopak. Při vyhodnocování je nutné odečíst linii kontroly, která v případě chybění indikuje neplatnost testu, resp.výsledek testu je označen za invalidní.

## **4.3 Hodnocení programu**

### **4.3.1 Způsob hodnocení programu**

Způsob hodnocení projektu byl založen na obecně přijatých pravidlech, která jsou používána v oboru analytické toxikologie a bioanalýzy. Pro screeningové a konfirmační metody platila metodika standardních operačních postupů. Projekt se sestával ze tří hlavních částí:

- (1) zmapování situace nabídky výrobků na českém trhu
- (2) otestování a porovnání diagnostických souprav
- (3) testování pro statistické analytické vyhodnocení.

#### **4.3.1.1 Zmapování situace nabídky výrobků na českém trhu**

Byli zjištěni pouze dva výrobci, kteří tyto výrobky oficiálně dodávají na český trh, jde o soupravy Saliva Screen 5 Test SYNTRON BIORESEARCH (dále jen Syntron) a Saliva Screen VI, ULTIMED (dále jen Ultimed). Dodavatelem výrobků testerů Syntron byla společnost Dynex, s.r.o. Praha a soupravy Ultimed firma JK-Trading, s.r.o. Karlovy Vary na český trh. Soupravy jiných výrobců nebyly v době řešení práce k dispozici.

#### **4.3.1.2 Otestování a porovnání diagnostických souprav**

Pro analytickou účinnost souprav v praktickém využití, která je analytickým parametrem kvality, existuje ekvivalent "monitorovací účinnost".

Pro zjištění monitorovací účinnosti souprav, tj. schopnosti diagnózy abusu drogy, byly diagnostické soupravy testovány na reálných cíleně pozitivních vzorcích slin a moče pacientů. Bylo shromážděno 63 pozitivních vzorků slin a k nim komplementární počet vzorků moči pro korelační (praktické) vyhodnocení. K tomu bylo analyzováno 13 anamnestických prokazatelně negativních dvojic vzorků (sliny + moč), které sloužily k ověření specifity terénních testů.

Paralelní analýzy vzorků tělních tekutin vypovídaly o monitorovací schopnosti abúzu návykových látek, neboť referenční analýza, s ohledem na farmakokinetické zákonitosti, je zde analýza moči k níž se výsledky analýzy ve slinách vztahují. Výstupy tohoto bodu je třeba považovat za zásadní a pro využití souprav v praxi jako nezbytný parametr.

Kalkulace účinnosti monitorovacího parametru ( $Eff_{\text{monitor}}$ ) je dle vztahu:

$$Eff_{\text{monitor}} = (N_{\text{ref}}N_{\text{sal}} + P_{\text{ref}}P_{\text{sal}})/(N_{\text{ref}}N_{\text{sal}} + P_{\text{ref}}P_{\text{sal}} + P_{\text{ref}}N_{\text{sal}} + N_{\text{ref}}P_{\text{sal}})$$

přičemž platí:

$P_{\text{ref}}P_{\text{sal}}$  je shodný pozitivní výsledek konfirmace v moči a slinách: PP

$N_{\text{ref}}N_{\text{sal}}$  je shodný negativní výsledek v moči a slinách : NN

$P_{\text{ref}}N_{\text{sal}}$  je pozitivní výsledek v moči a negativní výsledek ve slinách: PN

$N_{\text{ref}}P_{\text{sal}}$  je negativní výsledek v moči a pozitivní výsledek ve slinách: NP

#### 4.3.1.3 Testování pro statistické analytické vyhodnocení

Principem je testování analyticky přesně definovaných vzorků slin s přesnými přidávanými koncentracemi analytů pro analytické vyhodnocení specifity, sensitivity a účinnosti, dle příslušných rovnic:

$$\text{Specifita} = (TN)/(TN+FP)$$

$$\text{Senzitivita} = (TP)/(TP+FN)$$

$$\text{Účinnost} = (TN+TP)/(TN+TP+FN+FP)$$

TP správně pozitivní výsledek

TN správně negativní výsledek

FP falešně pozitivní výsledek

FN falešně negativní výsledek

SR celkový počet správných výsledků

FR celkový počet nesprávných výsledků

## 4.4 Výsledky a interpretace analytických údajů

### 4.4.1 Monitorovací účinnost na základě korelace sliny/moč

Konečné výsledky zaznamenané v % shrnují tabulky 6-8.

Tabulka 6 je přehledem výchozích výsledků psaná v absolutních číslech a porovnává výsledky terénních testů s referenční GC/MS metodikou.

Tabulka 7 podává přehled o výsledné míře monitorovacích účinností souprav, tj. o schopnosti potvrdit či vyloučit užití návykové látky ze skupiny amfetaminů.

Míra shody mezi referenčními GC/MS a imunochromatografickými metodami, tj. správnost analýzy pomocí terénních testů ukazuje tabulka 8. Pojednává o míře shody (%) referenční GC/MS ve slinách s výsledky terénních testů ve stejné tělní tekutině.

Tab. 6 Výsledky terénních testů v porovnání s technikou GC/MS

	ULTIMED		SYNTRON	
	MET	AMP	MET	AMP
PP	7	6	6	
PN	0	1	1	
NP	0	15	2	
NN	55	40	51	
INV	0	0	2	

Tab. 7 Monitorovací účinnost souprav

	MET	AMP
SYNTRON		
Eff <sub>monitor</sub>	95	74
ULTIMED		
Eff <sub>monitor</sub>	100	-

Tab. 8 Shoda mezi referenční GC/MS a terénními testy ve slinách

	MET	AMP
SYNTRON	94	83
ULTIMED	96	-

#### 4.4.2 Testování analytické účinnosti, specifity a senzitivity na standardní přídavky k slepým vzorkům slin

##### 4.4.2.1 Příprava vzorků se standardními přídavky (testování senzitivity a specifity)

Ke slinným blankům bylo pro tento účel připraveno 6 vzorků standardních přídavků analytů ze tří skupin (dle tabulky 9). Zdroje pro přípravu vzorků byly definované kontrolními a standardními materiály firem Alltech, Inc. A Varian (kontrola 19, TOXI-LAB).

Počet použitých souprav k testování standardních přídavků byl 25 u SYNTRONU i souprav ULTIMED.

Tab. 9 Vzorky a jejich diference od prahové hodnoty pro testování senzitivity a specifity

číslo vzorku	analyt	c (ng/ml)	n	dif cut-off (%)		
				im	u	s
1	kodein	390	5	+30		
2	kodein	210	5	-30		
3	morfín	52	5		+30	+73
	amfetamin	52			+4	
4	morfín	28	5		-30	-7
	amfetamin	28			-44	
5	benzoylekgonin	26	5		+30	-13
	amfetamin	26			-48	

6	benzoylekgonin	14	5	-30	-53
	amfetamin	14		-72	
7	morfin	40	5	+33	+33
	benzoylekgonin	40		+100	+33
	amfetamin	40		-20	

Vysvětlivky:

n ... počet provedených testů

dif cut-off ...kladná případně záporná difference koncentrace analytu v % od prahové hodnoty

s - cut-off SYNTRON

u - cut-off ULTIMED

im - cut-off imunochemické metodiky

#### 4.4.2.2 Výsledky testování analytické účinnosti, specifity a senzitivity

Dle následujících vztahů byly vypočteny hodnoty analytických ukazatelů:

$$\text{Specifita} = (\text{TN})/(\text{TN}+\text{FP})$$

$$\text{Senzitivita} = (\text{TP})/(\text{TP}+\text{FN})$$

$$\text{Účinnost} = (\text{TN}+\text{TP})/(\text{TN}+\text{TP}+\text{FN}+\text{FP})$$

Tab. 10 Výsledky pro testovací soupravu Syntron

SYNTRON	
celkový počet testů	100
TP	28
TN	48
FP	12
FN	12
INV	0
SR	76
FR	24
specifita	80%
senzitivita	70%
účinnost	76%

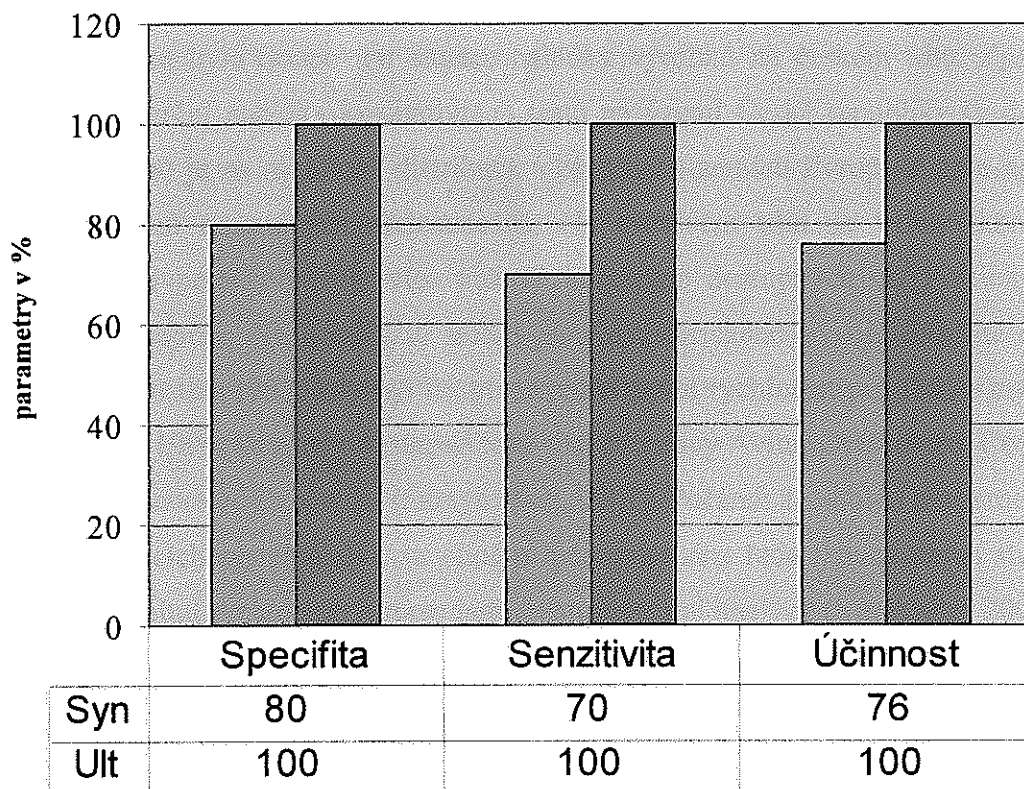
Tab. 11 Výsledky pro testovací soupravu Ultimed

<b>ULTIMED</b>	
celkový počet testů	125
TP	55
TN	70
FP	0
FN	0
INV	125
SR	0
FR	0
specifita	100%
senzitivita	100%
účinnost	100%

Porovnání výsledků analytické účinnosti, senzitivity a specifity obou souprav pro detekci INL je zaneseno v grafické podobě do obrázku 7.



### Porovnání testovacích souprav- Syntron a Ultimed



Obr. 7. Grafické shrnutí analytických parametrů testovacích souprav

Tab. 12 Deklarované hodnoty (výrobce) cut-off (ng/ml)

SYNTRON	cut-off
MAMF	50
ULTIMED	cut-off
d-AMF	50
d-MAMF	50

## 5 Diskuse

Experimentální část mé diplomové práce se sestávala ze tří hlavních částí. Prvním krokem bylo zmapování situace nabídky výrobků na českém trhu. Zjistili jsme, že komerční nabídka kvalitativních testů na území České republiky (v době zahájení studie) je na rozdíl od distribuce v západních zemích Evropské unie nebo Spojených států amerických nedostatečná. Na světovém trhu se v době konání experimentální práce objevuje více než 12 komerčně dostupných diagnostických testovacích souprav. Na konci 20. století jsou z historického vývoje důležité dva mezníky je jím rok 1990, kdy byl na trh zaveden první rychlotest pro INL v orální tekutině a rok 1999, kdy byly dostupné testovací soupravy Avitar OralScreen, Cozart RapiScan a Securetec Drugwipe (Samyn et al., 2001). Počátek 21. století zaznamenal rozvoj testovacích systémů INL ve slině a byla vykonána řada srovnávacích studií mezi orientačními rychlotesty a metodami instrumentální analýzy (Verstraete, 2005). Díky všeobecnému zájmu o jejich využití v praxi, se domnívám, že lze na českém trhu předpokládat jejich rozvoj a dostupnost.

Z pohledu hodnocení analytických parametrů se podařilo shromáždit statisticky cenný soubor. Kvalita studie byla garantována vysokým počtem testovaných entit, přičemž byl brán zřetel na selektivní výběr pozitivních vzorků. Počet jedno sto otestovaných kusů od každého typu soupravy jsme pokládali v tomto ohledu za dostačující.

Analytický parametr kvality, jakým je monitorovací účinnost, tj. schopnost souprav prokázat abúzus amfetaminů případně jeho derivátů, nám poskytl možnost srovnání obou testovacích systémů (viz 4.3.1.2., tab. 2). Souprava Syntron poskytuje horší výsledky než testery značky Ultimed. Tento fakt je možné podtrhnout zjištěním velmi problematické absorpce OT na chromatografickou desku systému. Důsledkem pozorovaného jevu je zvýšená citlivost k velikosti objemu aplikovaného vzorku, čímž dochází k výraznému zpomalení až alteraci precipitační reakce (neadekvátní reakce Ag a Ab). V tomto případě se nám osvědčila technika, při níž byla testovací destička v mírně svislé poloze, tedy startovací linie je umístěna výše.

Odečet vzniku precipitační linie vnáší do interpretace výsledků určitou nejistotu tím, že barevná rozlišovací schopnost jedince je subjektivní záležitostí. Současní světoví výrobci testovacích souprav minimalizují riziko chybného odečtu a tím i interpretace výsledku tím, že zavádějí odečítací zařízení. Cozart Rapiscan

systém byl prvním rychlotestem s elektronickým čtecím zařízením. Byl vyvinut v roce 1998 a využíval laterální imunoanalýzu s protilátkou značenou koloidním zlatem (Spiehler, 2001). Tyto instrumentální modifikace rychlých testů jsou užitečné zejména pro "laické" využití (policie, celní správa apod.)

Souprava Syntron umožňuje paralelní stanovení INL ze skupiny AMF a MAMF, přičemž testovací systém Ultimed poskytuje stanovení pouze MAMF. Tento rozdíl by nemusel mít velký vliv na možnost použití, neboť samotný AMF není zpravidla zneužíván v tak velkém měřítku. Daleko větší měrou je v ČR prokázán abúzus MAMF (látky známé pod názvem Pervitin) a MDMA (známá jako Extáze, také pod názvem Adam, E, X, droga lásky).

Při testování standardních přídavek na analytickou účinnost, specifitu a senzitivitu s ohledem na deklarované a zvyklostní hodnoty cut-off, která je pro AMF a MAMF 50 ng/ml, byly výsledky pro testované analyty stoprocentní v případě diagnostiky pomocí setu Ultimed. Výsledky u soupravy Syntron byly výrazně horší (viz kapitola 4.4.2.2, tab.4-5, tab. 4-6, obr. 4-1).

Nesporná výhoda, která je neustále zmiňovaná při užití rychlotestů k průkazu abúzu INL je její neinvazivní charakter. Odběr slin či orální tekutiny je velmi jednoduchý a může být odebírán přímo na místě, např. dopravní nehody, incidentu nebo vyšetřování trestného činu. Pro řadu testovaných jedinců je přijatelnější poskytování slin jako biologického materiálu než-li moče, krve či vlasů (Fendrich et al., 2001). Sliny jsou odebírány pod dozorem, čímž je minimalizováno riziko falšování či záměny vzorků. Je tedy velmi obtížné zfalšovat slinné vzorky (např. u drogově závislých nebo při kontrole dopingu sportovců) a tím se vyhnout detekci drog (Jehanli et al., 2001).

Peel et al. (1984) jako první zkoušeli proveditelnost detekce návykových látek ve slinných vzorcích získaných od řidičů (řízení pod vlivem omamných látek). Jejich výsledky korelovali s policejními posudky. Dalšími, kteří prováděli studie rychlotestů u zadržených řidičů byli Yacoubian et al (2001) a u řidičů pod vlivem drogy Steinmeyer et.al (2001).

Zajímavé a rozsáhlé studie, které vznikly na základě podnětu Evropské Unie byly programy ROSITA a ROSITA 2 (Roadside Testing Assessment). Program ROSITA měla za cíl zhodnotit kvalitu komerčně dostupných kvalitativních

orientačních rychlostestů (i prototypů) v průkazu abúzu INL při silničních kontrolách v některých zemích EU (Vestraete, 2005). ROSATA 2 probíhala v letech 2003 – 2005 a opět bylo jejím cílem ohodnotit kvalitu komerčně dostupných testovacích souprav i jejich možných prototypů v průkazu abúzu INL u řidičů. Studie probíhala v šesti evropských zemích a pěti zemích USA. Bohužel v době sepisování mé diplomové práce nebyla k dispozici zpráva, která by shrnovala výsledky této studie.

V kapitole 3.1.4 jsou zaznamenány vlivy, které se podílejí na změně formace a složení slin. Stupeň sekreční aktivity žlázy je ovlivňován faktory zahrnujícími pohlaví, věk, nutriční a emoční stav, cirkadiální rytmy, roční období, stavy jako např. melancholie, různá onemocnění a spousty farmakologických agens. Nelze pominout, že v době experimentu jsem se potýkala s různým složením a množstvím odebírané orální tekutiny, což je jednou z hlavních problematických záležitostí na tomto poli bioanalýzy. Byla patrná interindividuální variabilita v nasbíraných objemech. Cirkadiální rytmy se projevují ve stimulaci či potlačení slinného toku, pH a na některé součásti slin (Dawes, 1972; Ferguson a Fort, 1974). Sucho v ústech má za následek zeslabený slinný tok, což je pozorováno např. při podávání tricyklických antidepresiv v důsledku jejich anticholinergních vlastností (Gelenberg et al., 1990). Aps a Martens (2005) ve své studii popisují změnu skladby orální tekutiny při systémových onemocněních (cystická fibróza, roztroušená skleróza mozkomíšní, GVHD, diabetes mellitus, epilepsie, AIDS, alkoholická cirhóza jater a ledvinná disfunkce). Věnují se charakterizaci orální tekutiny u pacientů trpících systémovým onemocněním v porovnání se zdravými jedinci, např. u cystické fibrózy (onemocnění exokrinních žláz, které je charakterizováno poruchou transportu iontů) je produkován viskóznější sekret. Změna skladby sekretu může znamenat obtížnější manipulaci a zkreslení výsledků.

Vzájemnými vztahy mezi věkem, orálními sensorickými potížemi (OSC) a salivací se ve své práci zabývali Nagler a Hershovich (2004). Cílem jejich studie bylo vyšetřit slinný průtok a složení profilu v relativně objemné skupině lidí zahrnující věk 18-90 let, přičemž výsledky byly korelovány s ohledem na nemoci, užívání léků a OSC. V této práci bylo zjištěno, že starší lidé mají signifikantně redukovanou a alterovanou slinnou sekreci v porovnání s mladšími jedinci a zhruba polovina starší populace trpí OSC zahrnující poruchy chuti nebo xerostomií.

Výše uvedené skutečnosti naznačují rozsáhlé možnosti ve složení orální tekutiny a zahrnují intra a individuální rozdíly. Podmínky pro zpracování slinných vzorků by měly být standardizovány.

Faktory ovlivňující mechanismus transportu INL z plazmy do slin jsou uvedeny v kap. 3.3.2. Současné působení několika různých faktorů má za následek ovlivnění koncentračního poměru S/P pro danou látku. Ve většině dřívějších studií nebylo měřeno slinné pH, a proto získaná hodnota poměru S/P nemohla být porovnána s poměrem vypočteným. Působení mnoha různých faktorů může způsobit diferenci mezi teoretickým a stanoveným poměrem S/P. Samyn a Van Haeren (2000) stanovili S/P poměr MDMA, který překročil teoretickou hodnotu. Navarro et al. (2001) zaznamenali exkreční profil MDMA a jeho metabolitů ve slinách a v plazmě po ingesci 100mg dávky. U 8 zdravých dobrovolníků dosáhla slinná koncentrace maxima po 1,5h, hodnoty se pohybovaly v rozmezí 1,73 až 6,51 mg/l. Tyto maximální hodnoty korespondovaly s průměrnou hodnotou poměru S/P 18,1 ( $\pm 7,9$  SD). Časový profil poměru S/P měl vrchol po 1,5h, byl následován poklesem a plató fází mezi hodnotami 7,3 a 6,4 v 10 a 24h po podání.

V teoretické části v kapitole 3.5.2 jsem naznačila možný vliv odběrových systémů na výtěžnost, která by se při analýze měla pohybovat v rozmezí 50-90% (O'Neal et al., 2000). Crouch (2005) ve své práci hodnotil zanedbané proměnné při testování orální tekutiny a jednou ze zmiňovaných studií byla jeho práce (Crouch et al., 2004). V této studii hodnotil z komerčně dostupných odběrových systémů následující: *Salivette*<sup>TM</sup> (dále jen *Salivette*), *Intercept*<sup>®</sup> (*Intercept*), *Finger Collector*<sup>®</sup> (*FC*), *ORALscreen*<sup>®</sup> (*Oscreen*), *Hooded Collector*<sup>®</sup> (*HC*). Jako sběrný objem použili 2g orální tekutiny. Do zkumavek umístili testované sběrné zařízení a ponechali inkubaci určitý čas (tzv. odběrový čas, který je určen výrobcem). Pokud nebyl čas specifikován, zařízení bylo ponecháno ve zkumavce po dobu 5min. Jednotlivé systémy byly zváženy a rozdíly mezi počáteční a konečnou váhou kultivačních zkumavek byly použity k výpočtu absorbovaného množství orální tekutiny každého zařízení. Systémem *Salivette* bylo odebráno 1,84g orální tekutiny a návraceno 1,48g tedy 83% byla jeho recovery. Výtěžnost orální tekutiny u *Interceptu* byla 78%, u systému *FC* 77%, u *Oscreenu* byla zjištěna hodnota 33% a *HC* dosahoval pouze 18% výtěžnosti. Pro účely práce jsem použila odběrový systém *Salivette* bez přídavku

kyseliny citrónové, kterou jsem se rozhodla nepoužít vzhledem k níže citovaným úskalím při kysele stimulované salivaci.

Dále třetina *in vitro* testů byla použita k určení recovery při abúzu drogy a jejich metabolitů. V tomto experimentu byly zesíleny koncentrace INL/metabolitu. Kvantifikace INL/metabolitu byla provedena pomocí LC/MS za použití vícebodové kalibrace pro každý analyt. Analytická výtěžnost byla vypočítána dělením průměrné koncentrace z jednotlivého zařízení a průměrné koncentrace kontroly (nebyla sesbírána odběrovým systémem). Téměř shodné recovery mají látky amfetamin a methamfetamin díky podobné struktuře. Salivette a FC systémy přesáhly 50% recovery, u Interceptu a Oscreenu byla naměřena 16-36% výtěžnost.

Vzhledem k citovaným dobrým výsledkům výtěžnosti jsem se rozhodla použít systém Salivette (výtěžnost salivy je z 83% a více než 50% výtěžnost AMF a MAMF). Dalším vhodným odběrovým systémem by mohl být FC, u kterého je výtěžnost orální tekutiny 77% a výtěžnost AMF a MAMF nad 50%. Existuje nemálo výrobců u nichž nejsou přesně specifikovány parametry sběrného objemu, výtěžnost orální tekutiny a výtěžnost INL u odběrového zařízení, případně neznámá metoda mohou vytvářet řadu problémů pro laboratorní specifikaci a interpretaci výsledků. Více sofistikovaný screening a konfirmační technologie mohou být potřebné k dosažení požadované senzitivity. Limitovaný objem orální tekutiny může znemožnit screening a konfirmaci většího počtu drog nehledě na to, že opětovné změření již není možné. Získaný objem (výtěžnost) a variabilní odběr mezi jednotlivými zařízeními mohou být příčinou rozdílné laboratorní interpretace.

Techniky odběru orální tekutiny využívají rozdílné stimuly salivace. V kapitole 3.5 jsou shrnuty praktiky, se kterými je možné se setkat.

Autoři některých studií se zaměřovali na vysoký salivační průtok v prodlouženém časovém intervalu, přičemž sekreci stimulovali léky, např. parasymptomimetický *pilocarpin*, který se užívá orálně, subkutánně nebo intravenózně. V dávkách potřebných k produkci slin o velmi vysoké rychlosti průtoku mohou mít parasymptomimetické léky nežádoucí vedlejší účinky, jako např. pocení, palpitace, koliky abdominální oblasti a urgentní nutkání močit. Kromě uvedeného léky způsobují rozšíření spojů *tight junction*. Těmito spoji prochází sloučeniny o vyšší molekulové hmotnosti, které ve slině za normálních okolností přítomné nejsou. Např. stimulace potkaních parotid *isoprenalinem* způsobuje zvýšení

junctionální permeability, tím dochází k pasáži stopového množství sloučenin o molekulové hmotnosti  $\leq 34,500$  (Mazariegos, Tice a Hand, 1984). Důsledkem většího množství proteinů, které procházely spoji, byl více viskóznější vzorek slin.

Kyselina citrónová je velmi potentním chemickým stimulem tvorby slin. Stimulace vede ke zvýšené rychlosti slinné sekrece a tím k získání adekvátního množství vzorku, zároveň však způsobuje změny ve složení iontů v sekundární salivě. Tyto změny se týkají především hydrogenuhličitanů (v teoretické části je popsán vztah mezi slinným pH, koncentrací hydrogenuhličitanů a rychlostí slinného průtoku). Slabě bazické látky zůstávají ve slinných žlázách a nepřecházejí v dostatečném množství do slin. Vyšší koncentrace hydrogenuhličitanů v důsledku stimulace slinění, má za následek vyšší pufrční kapacitu orální tekutiny a korekci pH slin po přidání kyselých látek. Kyselina citrónová je slabou kyselinou a její přítomnost ve slinách nevede k výraznějšímu snížení pH slin. V experimentu jsem nepoužila kyselinu citrónovou, jak jsem již výše uvedla, navíc změna pH nemá tak výrazný vliv na přechod amfetaminů mezi plazmou a slinou (poměr S/P).

Fyzikální nebo chemické stimuly, které jsou užívány při odběru slin by neměly absorbovat lipofilní látky a modifikovat analyzované sloučeniny, dále by neměly představovat interferující faktor během analytického procesu. Např. Parafilm<sup>®</sup> vykazuje absorpci k velmi lipofilním molekulám, což má za následek zjevnou redukci hladiny INL (Taylor et al., 1978), čemuž jsem se při odběrech záměrně vyhýbala. Používaly se standardní odběrové zkumavky firmy Greiner. Chuťové stimuly (př. kyselina citrónová) způsobují změny slinného pH, jeho důsledkem je chybný výsledek, který vychází z výpočtu S/P poměru. Navíc Paton (1986) ve své studii uvádí, že kyselina citrónová způsobuje interference v některých imunologických analýzách.

U zdravých testovaných představuje gingivální crevikulární tekutina (ze zubů a okraje dásní) více než 0,5% objemu smíšené sliny a tento rozměr zřetelně vzrůstá u pacientů s gingivitidou (Cimasoni, 1974). Exudativní plazma, která pochází z minoritních oděrek úst, může také přispívat k celkovému objemu slin. Gingivální tekutina obsahuje protein v takřka podobném množství jako plazma, což představuje možnou cestu vstupu mnoha INL do slin. Proto jsou testovaní požádáni, aby se několik hodin před sběrem slinného vzorku se vyvarovali čištění zubů a jiných praktik orální hygieny.

Kouření, šňupání a orální cesta podání ilegální návykové látky způsobují depozita a jsou projevem přídavného zdroje drogy.

Ze sublinguální nebo bukální sliznice dochází k velmi rychlé absorpci INL do krevní cirkulace. Látky podané touto cestou způsobují vyšší koncentraci parentní drogy v orální tekutině s menším detekčním oknem jako následek rychlé absorpce.

V jiné farmakokinetické studii byl methamfetamin vyšetřován v plazmě, moči a slině u dobrovolníků po kouření a intravenózní aplikaci hydrochloridu methamfetaminu (Cook et al., 1993). V tomto případě byl methamfetamin detekován ve slině, koncentrace jeho metabolitů byla v příliš malém měřítku. Ihned po kouření, v porovnání s jeho intravenózní aplikací, byla koncentrace methamfetaminu velmi vysoká. Hladina během 3 hodin rychle klesala a vyrovnala hladinu v krvi, poté hladiny klesaly pomaleji a detekce byla možná po dobu 21h. Na základě uvedeného lze očekávat, že koncentrace methamfetaminu získaná ze slin po kouření bude vysoká než-li korespondující koncentrace v plazmě. Poměr S/P methamfetaminu se zdá být velmi sensitivní k malým změnám slinného pH (závisí na rychlosti slinného toku). Tento poměr klesá s časem. Hodnota poměru S/P po 4h od kouření je ekvivalentní hodnotě S/P po intravenózním podání (Cook et al., 1993).

Na specifitě rychlých testů se především podílí kvalita a specifita dané nebo daných protilátek. Tato skutečnost je bezprostředním faktorem použitelnosti tohoto typu analýz. Samyn et al. (1999) se zabývali stanovením INL v orální tekutině s použitím testů se slinnými a močovými protilátkami. Protilátky, které jsou vytvořené pro detekci analytů v moči, reagují převážně s hydrofilnějšími metabolity INL. Do slin se však transportují především parentní drogy, případně jejich lipofilnější metabolity (viz kapitola 3.5). Takové testy jsou pro užití detekce INL ve slinách nevhodné, neboť mají nižší specifitu pro INL. U testů pro analýzu látek v moči je výrazně vyšší cut-off hladina koncentrací testovaných látek a metabolitů v porovnání s cut-off ve slinách. Za těchto situací se zvyšuje pravděpodobnost velkého počtu falešně negativních výsledků při analýzách slinných vzorků.

Pozitivita v orální tekutině je dána hodnotou cut-off, která je pro amfetaminy 56  $\mu\text{g/l}$  i více a indikuje signifikantně farmakologickou hladinu návykové látky v krvi (Uges, 1996). Pro screening imunologickými metodami a konfirmaci byla navržena hodnota cut-off 50  $\mu\text{g/l}$  amfetaminu, methamfetaminu, MDMA a MDA



(Samhsa, 2000). Cozart RapiScan systém má stanovenou hodnotu cut-off 10  $\mu\text{g/l}$ , ve zředěné orální tekutině je cut-off 30  $\mu\text{g/l}$  amfetaminu nebo MDA ve slině. Tato hodnota koresponduje s plazmatickou koncentrací, která je přibližně 10  $\mu\text{g/l}$  amfetaminu nebo MDA v plazmě. Methamfetamin-MDMA cartridge mají cut-off 50  $\mu\text{g/l}$  případně 150  $\mu\text{g/l}$  methamfetaminu či MDMA v upravovaných slinách. Hodnotu cut-off 80  $\mu\text{g/l}$  pro D,L-amfetamin sulfát má testovací systém Securitec DrugWipe.

Slinné vzorky jsou vhodnější než-li vzorky moči, což je vysvětlováno vysokou koncentrací metamfetaminu získaného ze slin uživatelů po absorpční fázi a na druhé straně silným vlivem pH moče na exkreci drogy (Schramm et al., 1992).

Hladina metamfetaminu ve slině dosahuje maxima 40 – 60 ng/ml a zůstává vyšší než 10 ng/ml po dobu nejméně 50h po orální aplikaci, jestliže je pH moče větší než 7 a po dobu 20h pokud pH moče je menší než 7. Hladina metamfetaminu byla téměř třikrát vyšší než hladina v plazmě (Wan et al., 1978).

Smith (1981) popisoval pomocí metody RIA koncentraci metamfetaminu ve slinách (73,0 ng/ml) porovnáním s krevními vzorky (64,1 ng/ml) a spermatem (54,0 ng/ml). Při použití imunologických metod musí být brána v úvahu možná zkřížená reaktivita s dalšími sloučeninami.

Vapaatalo et al.(1984) experimentálně prokázal, že metoda TLC je nevhodná pro detekci amfetaminů ve slinách v důsledku nízké sensitivity metody (limit detekce je 1 ng/ml).

Smith a Kidwell (1991) se zaměřili na riziko nedetekovatelnosti abúzu ilegálních amfetaminových analogů v moči za použití komerčně dostupných imunologických testovacích souprav pro screening amfetaminů. Konfirmační metodou byla GC/MS technika. Formované amfetaminy (designer drugs) se projevují malou nebo žádnou zkříženou aktivitou, a tak je nelze detekovat ve screeningové fázi.

Abúzus formovaných amfetaminů a jejich detekce ve slinách reprezentuje stále rostoucí problém, který je popisován v klinických studiích vědeckých pracovníků Kintz, 1997; Goldberger et al., 1993; Penxren et al., 1993. Kintz (1997) upravil vzorky moči a slin alkalickou extrakcí ethylacetátem a následnou derivatizací anhydridem. Ve slinném vzorku byl detekován MBDB získaný 30 minut po podání

dávky 100mg MBDB, zatímco BDB nebyl získán. Nejvyšší koncentrace MBDB (1083 ng/ml) a BDB (146 ng/ml) byly získány po 2h a obě sloučeniny byly detekovatelné po dobu 17h. V málo ovlivňované studii excrece MDMA a MDEA, zůstávaly detekovatelné hladiny pár hodin po ingesci návykových látek (Penxren et al., 1993).

Na základě znalosti distribuce, metabolismu a exkrece INL je použití rychlých orientačních testů, kombinujících TLC a imunoanalýzu INL v orální tekutině vhodné zejména v případech posouzení aktuálního stavu testované osoby. Vyjimky je možné zaznamenat u jedinců, kteří užívají INL chronicky.

Zkřížená reaktivita parentních drog a jejich metabolitů, faktory ovlivňující transport INL do slin, řada interferujících vlivů, problémy odběrových systémů a rozdíly v kvalitě mezi jednotlivými testovacími soupravami omezují použití těchto rychlotestů pouze pro kvalitativní průkaz abúzu INL. Pozitivní výsledky je nutné konfirmovat specifickými analytickými metodami. Při konfirmaci výsledků se běžně používá GC/MS technika. V posledních letech byla vyvinuta celá řada konfirmačních metod pomocí spojení kapalinové chromatografie s tandemovou hmotovou spektrometrií (LC/MS-MS).

Samyn et al. (2002a) kvantifikovali koncentraci MDMA, MDA a MDE v 50  $\mu$ l orální tekutiny právě za pomoci LC/MS-MS techniky. Popsali detekci MDMA v orální tekutině dobrovolníků, kterým podali dávku 75 mg MDMA.

V nedávné době byla publikována pravidla pro zahrnutí orální tekutiny do federálního Workplace Drug Testing programu (2004), jejímž autorem byla organizace SAMHSA (Substance Abuse and Mental Health Services Administration), se sídlem v USA.

Domnívám se, že pro zavedení rychlých kvalitativních testů v praxi a podmínky jejich používání k průkazu abúzu amfetaminů i jiných INL by se měla ještě dále prohloubit legislativa a na ni navazující metodické normy, předpisy a standardní operační postupy. Zákon by měl definovat podmínky použití, postupy a osoby, které by byly oprávněné k provádění testů (Verstraete et al., 2005). Osoba provádějící test by se měla vyvarovat zbytečného použití orientačních testů (na základě znalosti farmakologických faktů).

## 6 Závěr

Experimentální část diplomové práce se sestávala ze tří hlavních částí, přičemž všech stanovených cílů bylo dosaženo. Jednalo se tedy (1) o zmapování situace nabídky výrobků na českém trhu, (2) otestování a porovnání diagnostických souprav a (3) testování pro statistické analytické vyhodnocení.

Zjistili jsme, že nabídka komerčně dostupných kvalitativních rychlotestů na území České republiky je na rozdíl od distribuce v západních zemích Evropské unie či Spojených států amerických nedostatečná. Na českém trhu jsou k dispozici dvě testovací soupravy: výrobky Saliva Screen 5 Test SYNTRON BIORESEARCH společnosti Dynex, s.r.o. Praha a soupravy Saliva Screen VI, ULTIMED od firmy JK-Trading, s.r.o. Karlovy Vary. Analytický parametr kvality, jakým je monitorovací účinnost, mi poskytl možnost porovnání obou testovacích souprav, přičemž souprava Ultimed měla 100% monitorovací účinnost. Výsledky analytické účinnosti, specifity a senzitivity jednoznačně ukazují, že souprava Syntron poskytuje horší výsledky než testery značky Ultimed.

Na základě znalostí tvorby a sekrece slin, mechanismu salivace, mechanismu transportu amfetaminů do slin a v neposlední řadě znalostí farmakologických vlastností amfetaminů lze sliny použít jako alternativní biologický materiál k průkazu jejich abúzu.

Nespornou výhodou odběru salivy v porovnání s odběrem krevního vzorku je neinvazivní způsob odběru. Z tohoto důvodu je možné užít sliny v klinicky obtížných situacích při nesnadném odebírání vzorků krve, jako např. u dětí, hendikepovaných a anxiózních pacientů, u jedinců drogově závislých, kteří mají pohmožděné žíly, kde získání krevních vzorků je prakticky nemožné. Na druhé straně může být orální tekutina odebírána přímo na místě, např. dopravní nehody, incidentu, vyšetřování trestného činu, ale i monitorování školní mládeže, při kontrole dopingu sportovců nebo u klientů detoxikačních center.

Je vhodné se zmínit, že souprava Syntron umožňuje paralelní stanovení ilegálních návykových látek ze skupiny AMF a MAMF, přičemž testovací systém

Ultimed poskytuje stanovení pouze MAMF. Tento rozdíl je zanedbatelný vzhledem k využití soupravy Ultimed, neboť amfetamin je primárním metabolitem daleko více zneužívaného metamfetaminu (látky známé pod názvem Pervitin), pokud jde o situaci na české drogové scéně. Na druhém místě mezi zneužívanými amfetaminy v České republice je designer drug (formovaný amfetamin) MDMA (který je znám pod názvy Extáze, Adam, E, X nebo droga lásky). Intoxikace AMF v našich podmínkách zpravidla nebývá. Je ovšem vhodné vést tento rozdíl v obou soupravách v patrnost.

V mé experimentální části bylo možné testovat pouze dvě soupravy, které byly momentálně k dispozici na trhu. Domnívám se, že všeobecný zájem o jejich využití v praxi se projeví na českém trhu jejich rozšířením a dostupností. Bylo by vhodné nadále monitorovat nabídku kvalitativních rychlostestů a případně před zavedením do běžné praxe provést otestování dalších nabízejících se souprav.

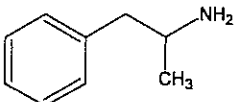
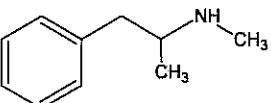
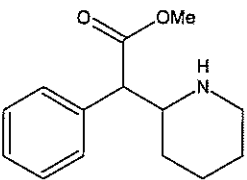
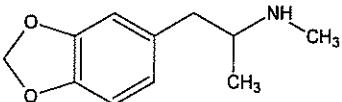
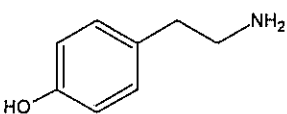
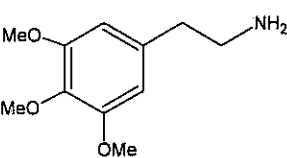
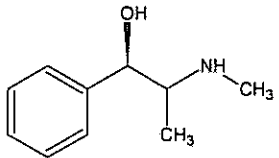
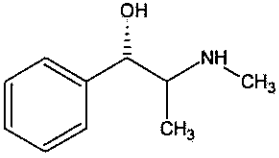
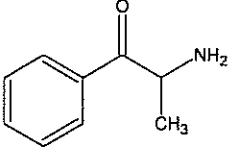
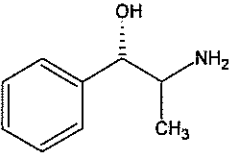
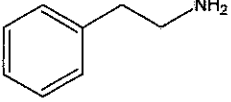
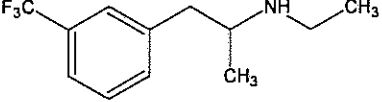
## 7 Příloha

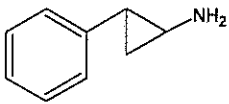
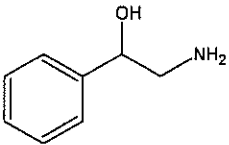
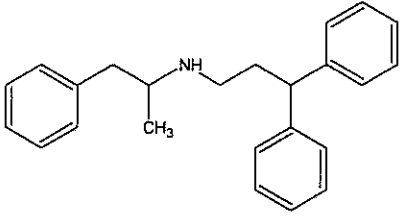
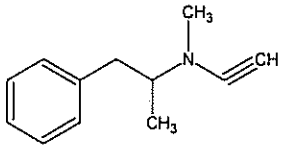
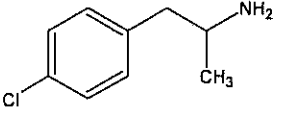
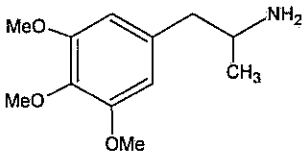
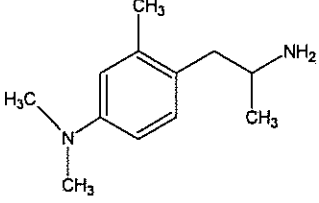
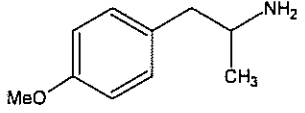
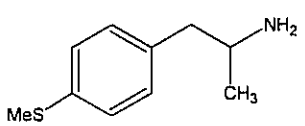
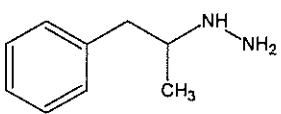
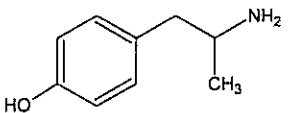
### 7.1 Seznam použitých zkratek

Ab	protilátka
Ag	antigen
AMF	amfetamin/y
BDB	demethylovaný metabolit MBDB
CNS	centrální nervový systém
EMIT	Enzymová imunoanalýza (enzyme multipled immunoassay technique)
FN	Falešně negativní výsledek
FP	Falešně pozitivní výsledek
FR	Celkový počet nesprávných výsledků
GC/MS	Plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií
HVLP	Hromadně vyráběné léčivé přípravky
INL	Ilegální návykové látky
MAMF	metamfetamin/y
MBDB	N-methyl-1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-2-butanamin
MDE	N-ethyl-3,4-methylendioxyamfetamin
MDMA	N-methyl-3,4-mathylendioxyamfetamin
ODS	Oral-Diffusion-Sink
PFPA	pentafluorpropionylanhydrid
S/P	sliny/plazma
SR	Celkový počet správných výsledků
TFA	trifluoroctová
TLC	Tenkovrstvá chromatografie
TN	Správně negativná výsledek
TP	Správně pozitivní výsledek
UPT	Up-Converting Phospor Technology
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; HCl	dihydrogenfosforečnan draselný; kyselina chlorovodíková
KOH; NH <sub>4</sub> OH	hydroxid draselný; hydroxid amonný
EtOAc	ethylacetát

## 7.2 Strukturální vzorce

Strukturální vzorce a názvy amfetaminů (kap.3.4)

- 1)  AMF
- 2)  MAMF
- 3)  methylfenidát
- 4)  MDMA
- 5)  tyramin
- 6)  meskalin
- 7)  efedrin
- 8)  pseudoefedrin
- 9)  kathinon
- 10)  norpseudoefedrin
- 11)   $\beta$ -fenethylamin
- 12)  fenfluramin

- 13)  tranylcypromin
- 14)  fenylethanolamin
- 15)  prenylamin
- 16)  deprenyl
- 17)  PCA
- 18)  TMA
- 19)  amiflamin
- 20)  PMA
- 21)  4-methylthioamfetamin
- 22)  feniprazin
- 23)  4-hydroxyamfetamin

## 7.3 Seznam obrázků a tabulek

### Seznam obrázků

- Obr. 1. Anatomické uložení slinných žláz (glandulae salivariae majores)
- Obr. 2. Tvorba slin (Davenport, 1977). Mechanismus primární sekrece a tvorba finální sliny
- Obr. 3. Tvorba slin (Davenport, 1977). Mechanismus primární sekrece a tvorba finální sliny
- Obr. 4. Salivette<sup>®</sup> pro slinný vzorek (Haeckel et al., 1987)
- Obr. 5. Princip UPT technologie (Niedbala et al., 2001)
- Obr. 6. Testovací destička UPT technologie (Niedbala et al., 2001)
- Obr. 7. Grafické shrnutí analytických parametrů testovacích souprav

### Seznam tabulek

- Tab. 1 Fyzikální parametry slin a zastoupení jednotlivých komponent v porovnání s plazmou
- Tab. 2 Charakteristické rozdíly ve slinách v závislosti na rozdílné nervové stimulaci
- Tab. 3 Průměrný příspěvek jednotlivých typů slinných žláz na celkové produkci sliny v závislosti na určitém typu stimulace
- Tab. 4 Proměnné veličiny, které ovlivňují proces pasivní difúze (Landon et al., 1982)
- Tab. 5 Přehled dalších ilegálních amfetaminových derivátů –“designer drugs“
- Tab. 6 Výsledky terénních testů v porovnání s technikou GC/MS
- Tab. 7 Monitorovací účinnost souprav
- Tab. 8 Shoda mezi referenční GC/MS a terénními testy ve slinách
- Tab. 9 Vzorky a jejich difference od prahové hodnoty pro testování senzitivity a specifity
- Tab. 10 Výsledky pro testovací soupravu Syntron
- Tab. 11 Výsledky pro testovací soupravu Ultimed
- Tab. 12 Deklarované hodnoty (výrobce) cut-off (ng/ml)



## 8 Literatura

- [1] Aps, J.K.M., Martens, L.C.(2005), Review: The physiology of saliva and transfer of drugs into saliva, *Forensic Science International*, 150 (2005), 199-131.
- [2] Barrett, C. *et al.* (2001), Comparison of point-of-collection screening of drugs of abuse in oral fluid with a laboratory-based urine screen, *Forensic Sci. Int.* 2001, 122, 163-166.
- [3] Biel, J.H., Bopp, B.A., 1978. Amphetamines: structure-activity relationships. In: Iversen, L.L., Iversen, S.D., Snyder, S.H. (Eds.), *Handbook of Psychopharmacology: Stimulants*. Plenum, New York, pp. 1-40.
- [4] Borzelleca, J. F., Cherrick, H. M. (1965). The excretion of drugs in saliva. *Antibiotics. Journal of Oral Therapeutics and Pharmacology.* 2, 180-187.
- [5] Van Bree, J. B. M. M. (1990). Drug transport across the blood-brain barrier. Unpublished Ph.D. Dissertation, State University Leiden.
- [6] Burgen, A. S. V. (1956). The secretion of non-electrolytes in the parotid saliva. *Journal of Cellular and Comparative Physiology.* 40, 113-138.
- [7] Caddy, B. (1984). Saliva as a specimen for drug analysis. In R. C. Baselt (Ed.), Advances in analytical toxicology (Vol. 1, pp. 198-254). Foster City: Biomedical Publications.
- [8] Chang, K. (1976). Interactions between drugs and saliva-stimulating parafilm and their implications in measurements of saliva drug levels. *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology.* 13, 357-360.
- [9] Cimasoni, G. (Ed.). (1974). Monographs in oral science. The crevicular fluid (Vol. 3). Basel: Karger,S.
- [10] Clement, B.A., Goff, C.M., Forbes, D.A., 1998. Toxic amines and alkaloids from *Acacia rigidula*. *Phytochemistry* 49, 1377-1380.
- [11] Cook, C.E., Jeffcoat, A.R., Hill, J.M., Pugh, D.E., Patetta, P.K., Sadler, B.M., White, W.R. Perez-Reyes, M., (1993), Pharmacokinetic of methamphetamine self-administered to subject by smoking S-methamphetamine hydrochloride: *Drug Metab Dispos*, 21, 717.
- [12] Cooper, T. B., Bark, N., Simpson, G. M. (1981). Prediction of steady state plasma and saliva levels of desmethylimipramine using a single dose, single time point procedure. *Psychopharmacology.* 74, 115-121.
- [13] Crouch, D.J., Day, J., Baudys, J., Evaluation of Saliva/Oral Fluid as an Alternate Drug Testing Specimen—Final Report. National Institute of Standards and Technology (NISTR 7139. Gaithersburg MD) (July) 2004, pp. 1-70.

- [14] Dabbs, J. M. (1991). Salivary testosterone measurements: collecting, storing, and mailing saliva samples. *Physiology and Behavior*. 49, 815-817.
- [15] Davenport, H. W. (1977). Salivary secretion. In H. W. Davenport (Ed.), Physiology textbook series. Physiology of the digestive tract: an introductory text (Fourth ed., pp. 85-94). Chicago: Year Book Medical Publishers.
- [16] Dawes, C. (1972). Circadian rhythms in human salivary flow rate and composition. *Journal of Physiology*. 220, 529-545.
- [17] Dawes, C., Macpherson, L. M. D. (1992). Effects of 9 different chewing-gums and lozenges on salivary flow-rate and pH. *Caries Research*. 26, 176-182.
- [18] Drobitch, R. K., Svensson, C. K. (1992). Therapeutic drug monitoring in saliva. An update. *Clinical Pharmacokinetics*. 23, 365-379.
- [19] Drummer Olaf H. (2001): The Forensic Pharmacology of Drugs of Abuse, First published in Great Britain in 2001 by Arnold, ISBN 0 340 76257 8 (hb).
- [20] Edeleano, L., 1887. U ber einige derivate der Phenylmethacrylsäure und der Phenylisobuttersäure. *Berl. Dtsch. Chem. Ges.* 20, 616-622.
- [21] Feller, K., le Petit, G. (1977). On the distribution of drugs in saliva and blood plasma. *Int. J. Clin. Pharmacol.* 15, 468-469.
- [22] Fendrich, M. *et al.*, Validity of drug use reporting in a high-risk community sample: a comparison of cocaine and heroin survey reports with hair tests, *Am. J. Epidemiol.* 2001, 149, 955-962.
- [23] Feneis, H. ve spl. Daubera, W. (1996): Anatomický obrazový slovník, Grada Publishing, spol. s.r.o., 1996, 2. vydání, počet stran 464, ISBN 80-7169-197-6.
- [24] Ferguson, D. B., Fort, A. (1974). Circadian variations in human resting submandibular saliva flow rate and composition. *Archives of Oral Biology*. 19, 47-55.
- [25] Garrett, J. R. (1980). Permeability of salivary glands to macromolecules. In T. Zelles (Ed.), Advances in physiological sciences; vol 3. Saliva and salivation: satellite symposium of the 28th international congress of physiological sciences, Hungary (pp. 109-117). Oxford: Pergamon Press.
- [26] Gehris, T. L., Kathol, R. G. (1992). Comparison of time-integrated measurement of salivary corticosteroids by oral diffusion sink technology to plasma-cortisol. *Endocrine Research*. 18, 77-89.
- [27] Gelenberg, A. J., Wojcik, J. D., Falk, W. E., Spring, B., Brotman, A. W., Galvin-Nadeau, M. (1990). Clovoxamine in the treatment of depressed outpatients: a double-blind, parallel-group comparison against amitriptyline and placebo. *Comprehensive Psychiatry*. 31, 307-314.

- [28] De Giovanni, N. *et al.*, Cozart Rapiscan system: our experience with saliva tests, *J. Chromatogr. B. Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 2002, 773, 1-6.
- [29] Gorodetzky, C. W., Kullberg, M. P. (1974). Validity of screening methods for drugs of abuse in biological fluids. II. Heroin in plasma and saliva. *Clinical Pharmacology and Therapeutics.* 15, 579-587.
- [30] Goldberger, B.A., Darwin, W.D., Grant, T.M., Allen, A.C., Caplan, Y.H., Cone, E.J. (1993), Measurement of heroin and its metabolites by isotope-dilution electron-impact mass spectrometry, *Clin. Chem.*, 39, 670.
- [31] Graham, G. G. (1982). Noninvasive chemical methods of estimating pharmacokinetic parameters. *Pharmacology.* 18, 333-349.
- [32] Gross, S. J., Worthy, T. E., Nerder, L., Zimmermann, E. G., Soares, J. R., Lomax, P. (1985). Detection of recent cannabis use by saliva  $\Delta^9$ -THC radioimmunoassay. *Journal of Analytical Toxicology.* 9, 1-5.
- [33] Haeckel, R. (1989). The application of saliva in laboratory medicine; report on the workshop conference of the German Society for Clinical Chemistry, held under the auspices of the International Federation of Clinical Chemistry, in Bremen, March 3-4, 1988. *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry.* 27, 221-252.
- [34] Haeckel, R. (1990). Relationship between intraindividual variation of the saliva/plasma- and of the arteriovenous concentration ratio as demonstrated by the administration of caffeine. *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry.* 28, 279-284.
- [35] Hart 't, B. J., Wilting, J. (1988). Sensitive gas chromatographic method for determining nitrazepam in serum and saliva. *Journal of Chromatography Biomedical Applications.* 424, 403-409.
- [36] Höld, K. M., De Boer, D., Zuidema, J., Maes, R. A. A. (1995). Evaluation of the Salivette as sampling device for monitoring  $\alpha$ -adrenoceptor blocking drugs in saliva. *Journal of Chromatography Biomedical Applications.* 663, 103-110.
- [37] Höld, K. M., De Boer, D., Zuidema, J., Maes, R. A. A. Saliva as an analytical tool in toxicology. <http://www.criminology.fsu.edu/journal/hold.html> (květen) 2005.
- [38] Idowu, O. R., Caddy, B. (1981). A review of the use of saliva in the forensic detection of drugs and other chemicals. *Journal of the Forensic Science Society.* 22, 123-135.
- [39] Inwang, E.E., Mosnaim, A.D., Sabelli, H.C., 1973. Isolation and characterization of phenylethylamine and phenylethanolamine from human brain. *J. Neurochem.* 20, 1469-1473.
- [40] Jehanli, A. *et al.* , Blind trials of an onsite saliva drug test, *J. Forensic Sci.* 2001, 46, 206-212.

- [41] Kalina, K. a kolektiv (2003): Drogy a drogové závislosti, Mezioborový přístup, Úřad vlády České republiky, 2003, 1. vydání, ISBN 80-86734-05-6.
- [42] Kintz, P. (1997), Exkretion of MBDB and BDB in urine, saliva and sweat following single oral administration, *J. Anal. Toxicol.*, 21, 250.
- [43] Landon, J., Mahmood, S. (1982). Distribution of drugs between blood and saliva. In G. F. Read, D. Riad-Fahmy, R. F. Walker, K. Griffiths (Eds.), Immunoassays of steroids in saliva: proceedings of the ninth Tenovus workshop, Cardiff november 1982 (pp. 47-55). Cardiff: Alpha Omega Publishing Limited.
- [44] Levy, G., Lampman, R. (1975). Relationship between pH of saliva and pH of urine. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 64, 890-891.
- [45] Malamud, D. (1993), Guidelines for saliva nomenclature and collection, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 694 (1993) xi-xii.
- [46] Mandel, I. D. (1974). Relation of saliva and plaque to caries. *Journal of Dental Research*. 53, 246-266.
- [47] Mandel, I. D. (1990). The diagnostic uses of saliva. *Journal of Oral Pathology & Medicine*. 19, 119-125.
- [48] Martin, K., Burgen, A. S. V. (1962). Changes in the permeability of the salivary gland caused by sympathetic stimulation and by catecholamines. *Journal of General Physiology*. 46, 225-243.
- [49] Matin, S. B., Wan, S. H., Knight, J. B. (1977). Quantitative determination of enantiomeric compounds. I-Simultaneous measurement of the optical isomers of amphetamine in human plasma and saliva using chemical ionization mass spectrometry. *Biomedical Mass Spectrometry*. 4, 118-121.
- [50] Martinez-Madrigal, F., Micheau, C. (1989). Histology of the major salivary glands. *American Journal of Surgical Pathology*. 13, 879-899.
- [51] May, P. R. A., Van Putten, T., Jenden, D. J., Cho, A. K. (1978). Test dose response in schizophrenia: chlorpromazine blood and saliva levels. *Archives of General Psychiatry*. 35, 1091-1097.
- [52] Mazariegos, M. R., Tice, L. W., Hand, A. R. (1984). Alteration of tight junctional permeability in the rat parotid gland after isoproterenol stimulation. *Journal of Cell Biology*. 98, 1865-1877.
- [53] Mucklow, J. C. (1982). Review. The use of saliva in therapeutic drug monitoring. *Therapeutic Drug Monitoring*. 4, 229-247.
- [54] Mucklow, J. C., Bending, M. R., Kahn, G. C., Dollery, C. T. (1978). Drug concentration in saliva. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 24, 563-570.

- [55] Nagler, R.M., Hershovich, O. (2004), Relationships between age, drug, oral sensorial complaints and salivary profile, *Archives of Oral Biology* (2005) 50, 7-16.
- [56] Nakajima, T., Kakimoto, Y., Sano, I., 1964. Formation of beta-phenethylamine in mammalian tissue and its effect on motor activity in the mouse. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 143, 319-325.
- [57] Navarro, M. *et al.*, Usefulness of saliva for measurement of 3,4-methylenedioxymethamphetamine and its metabolites: correlation with plasma drug concentrations and effect of salivary pH, *Clin. Chem.* 2001, 47, 1788-1795.
- [58] O'Neal, Crouch, D.J., Rollins, D.E., Fatah, A.A., The effects of collection methods on oral fluid codeine concentrations, *J. Anal. Toxicol.* 23 (6) (2000 October) 536-542.
- [59] Niedbala, R. S., Feimdt, H., Kardos, K., Vail, T., Burton, J., Bielska, B., Shang Li, Milunic, D., Bourdelle, P. and Vallejo, R., Detection of analytes by immunoassay Using Up-converting phosphor technology, *Analytical Biochemistry*, (May), 2001, 293, 22 - 30.
- [60] Nofal, M.A., Ho, C.T., Chang, S.S., 1982. New constituents in Egyptian jasmine absolute. *Perfumer Flavorist* 6, 24-30.
- [61] Paton, R. D., Logan, R. W. (1986). Salivary drug measurement: a cautionary tale. *Lancet*. December 6, 1340.
- [62] Paxton, J. W. (1979). Measurement of drugs in saliva: A review. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*. 1, 11-21.
- [63] Peel, H. W. *et al.* , Detection of drugs in saliva of impaired drivers, *J. Forensic Sci.* 1984, 29, 185-189.
- [64] Pexten, H., Lessens, L., Czech, J., Raus, J. (1993), Excretion study of methylenedioxyethylamphetamine (MDEA, XTC, ADAM), methylenedioxyethylamphetamine (MDEA, EVE) and their major metabolites in human saliva and urine, Abstract Book - Joint Meeting of the Toxicological Society of Belgium and Luxemburg and the Royal Belgian Society for Forensic Medicine-Poisoning, Medico-Legal Aspects, Lanaken, Belgium, october 1993.
- [65] Posti, J. (1982). Saliva-plasma drug concentration ratios during absorption: theoretical considerations and pharmacokinetic implications. *Pharmaceutica Acta Helveticae*. 57, 83-92.
- [66] Rasmussen, F. (1964). Salivary excretion of sulphonamides and barbiturates by cows and goats. *Acta Pharmacologica et Toxicologica*. 21, 11-19.
- [67] Ritschel, W. A., Thompson, G. A. (1983). Monitoring of drug concentrations in saliva: a non-invasive pharmacokinetic procedure. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*. 5, 511-525.

- [68] Salako, L. A., Sowunmi, A. (1992). Disposition of quinine in plasma, red-blood-cells and saliva after oral and intravenous administration to healthy adult africans. *European Journal of Clinical Pharmacology*. 42, 171-174.
- [69] SAMHSA (Substance Abuse and Mental Health Services Administration), Mandatory Guidelines for Federal Workplace Drug Testing Programs 2000, <http://www.health.org/workplace/manguidelines/draft3.htm>.
- [70] Samyn, N. *et al.*, Plasma, oral fluid and sweat wipe ecstasy concentrations in controlled and real life conditions, *Forensic Sci. Int.* 2002a, 128, 90-97.
- [71] Samyn, N. and VanHaeren, On-site testing of saliva and sweat with DrugWipe and determination of concentrations of drugs of abuse in saliva, plasma and urine of suspected users, *Int. J. Legal Med.* 2000, 113, 150-154.
- [72] Samyn N., Verstraete A.G., Van Haeren C., Kintz P., Analysis of drugs of abuse in saliva, *Forensic Science*, 1999, 11:1-18.
- [73] Samyn, N., Viaene, B., Vandevenne, L., Verstraete, A.G., Inventory of state-of-the-art roadside drug testing equipment, in: A.G. Verstraete (Ed.), Rosita. Roadside Testing Assessmant, Rosita Consortium, Gent, 2001.
- [74] Schramm, W., Smith, R. H., Craig, P. A. (1992). Drugs of abuse in saliva: a review. *Journal of Analytical Toxicology*. 16, 1-9.
- [75] Schrammm, W., Smith, R.H., Craig, P.A., Methods of simplified saliva collection for the measurement of drugs of abuse, therapeutic drugs, and other molecules, *Ann. N.Y. Acad. Sci. (5NM)* 694 (September) (1993) 311-313.
- [76] Shannon, I. L., Suddick, R. P. (1973). Effects of light and darkness on human parotid salivary flow rate and chemical composition. *Archives of Oral Biology*. 18, 601-608.
- [77] Shannon, I. L., Suddick, R. P., Dowd jr, F. J. (1974). Monographs in oral science. Saliva: composition and secretion (Vol. 2). Basel: Karger,S.
- [78] Shipley, J. E., Alessi, N. E., Wade, S. E., Haegele, A. D., Helmbold, B. (1992). Utility of an oral diffusion sink (ODS) device for quantification of saliva corticosteroids in human subjects. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 74, 698-700.
- [79] Shulgin, A.T., 1978. Psychotomimetic drugs: structure-activity relationships. In: Iversen, L.L., Iversen, S.D., Snyder, S.H. (Eds.), *Handbook of Psychopharmacology: Stimulants*. Plenum, New York, pp. 243-336.
- [80] Spiehler, V. R. *et al.* , Certainty and confirmation in toxicology screening, *Clin. Chem.* 1988, 34, 1535-1539.
- [81] Smith, F.P., (1981), Detection of amphetamine in blood stains, semen stains, saliva and saliva stains: *Firensic Sci* 17, 255.

- [82] Smith, F.P., Kidwell, D.A. (1991), Isomeric amphetamines – A problem for urine analysis?, *Forensic Sci., Int.*, 50, 153.
- [83] Steinmeyer, S. *et al.*, Practical aspects of roadside tests for administrative traffic offences in Germany, *Forensic Sci. Int.* 2001, 121, 33–36.
- [84] Taylor, E. A., Kaspi, T. L., Turner, P. (1978). The pH dependent absorption of propranolol and indomethacin by Parafilm, a stimulant of salivary secretion. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 30, 813-814.
- [85] Thaysen, J. H., Thorn, N. A., Schwartz, I. L. (1954). Excretion of sodium, potassium, chloride and carbon dioxide in human parotid saliva. *American Journal of Physiology*. 178, 155-159.
- [86] Thieme, T., Yoshihara, P., Piacentini, S., Beller, M. (1992). Clinical evaluation of oral fluid samples for diagnosis of viral hepatitis. *Journal of Clinical Microbiology*. 30, 1076-1079.
- [87] Uges, D., Tables of therapeutic, toxic and fatal drug concentrations, *TIAFT Bull.* 1996, 26(Suppl.), 1–75.
- [88] Vapaatalo, H., Kurkkainen, S., Seius, K.E., (1984), Comparison of saliva and urine samples in thin layer chromatographic detection of central nervous stimulants, *Int. J. Clin. Pharm. Res.*, 4, 5.
- [89] Verstraete A.G. (2005), Oral fluid testing for driving under the influence of drugs, history, recent progress and remaining challenges, *Forensic Science International*, 2005,150,143–150.
- [90] Vining, R. F., McGinley, R. A. (1982). Transport of steroids from blood to saliva. In G. F. Read, D. Riad-Fahmy, R. F. Walker, K. Griffiths (Eds.), Immunoassays of steroids in saliva: proceedings of the ninth Tenovus workshop, Cardiff november 1982 (pp. 56-63). Cardiff: Alpha Omega Publishing Limited.
- [91] Vining, R. F., McGinley, R. A. (1985). Hormones in saliva. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. 23, 95-146.
- [92] Wade, S. E. (1984). A direct method for determination of the time integral of corticosterone - availability in interstitial fluid of rats. *Analytical Biochemistry*. 138, 365-371.
- [93] Wade, S. E. (1992a). Less-invasive measurement of tissue availability of hormones and drugs: diffusion-sink sampling. *Clinical Chemistry*. 38, 1639-1644.
- [94] Wade, S. E. (1992b). An Oral-Diffusion-Sink device for extended sampling of multiple steroid hormones from saliva. *Clinical Chemistry*. 38, 1878-1882.
- [95] Wade, S. E., Haegele, A. D. (1991). Time-integrated measurement of corticosteroids in saliva by Oral Diffusion Sink technology. *Clinical Chemistry*. 37, 1166-1172.

- [96] Walsh, D. J., Corey, A. C., Cotton, R. W., Forman, L., Herrin, G. L., Word, C. J., Garner, D. D. (1992). Isolation of deoxyribonucleic acid (DNA) from saliva and forensic science samples containing saliva. *Journal of Forensic Sciences*. 37, 387-395.
- [97] Wan, S. H., Matin, S. B., Azarnoff, D. L. (1978). Kinetics, salivary excretion of amphetamine isomers, and effect of urinary pH. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 23, 585-590.
- [98] Yacoubian, G. S. *et al.* , A comparison of saliva testing to urinalysis in an arrestee population, *J. Psychoactive Drugs*, 2001, 33, 289-294.
- [99] Zuidema, J., Van Ginneken, C. A. M. (1983a). Clearance concept in salivary drug excretion, part I: theory. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*. 58, 88-93.
- [100] Zuidema, J., Van Ginneken, C. A. M. (1983b). Clearance concept in salivary drug excretion, part II: experiments. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*. 58, 136-143.