



СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
НАУК О ЖИЗНИ

ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КОКАИНА: ОТ ИСТОКОВ ДО СОВРЕМЕННОСТИ

БЕЛОВА М. В., РОДИОНОВА Г.М., ПЕТУХОВ А.Е.,
СУХАНОВА А.М.

Кафедра фармацевтической и токсикологической химии им.
А.П. Арзамасцева Института фармации им. А.П. Нелюбина

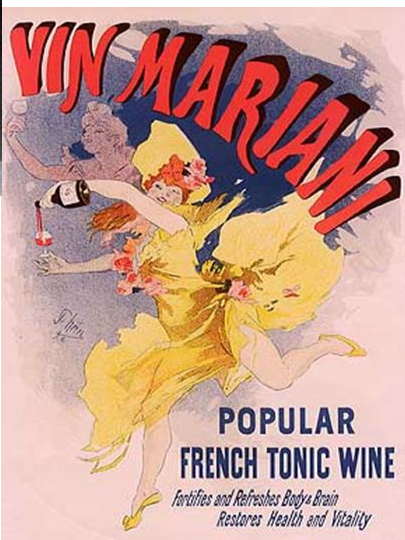
ПЕРВОГО МГМУ ИМЕНИ И.М. СЕЧЕНОВА

КРАТКАЯ ИСТОРИЯ УПОТРЕБЛЕНИЯ КОКАИНА



Южноамериканские индейцы используют кокаиновый куст по крайней мере 5000 лет в религиозных обрядах, улучшения самочувствия, снятия усталости, снижения чувства голода.

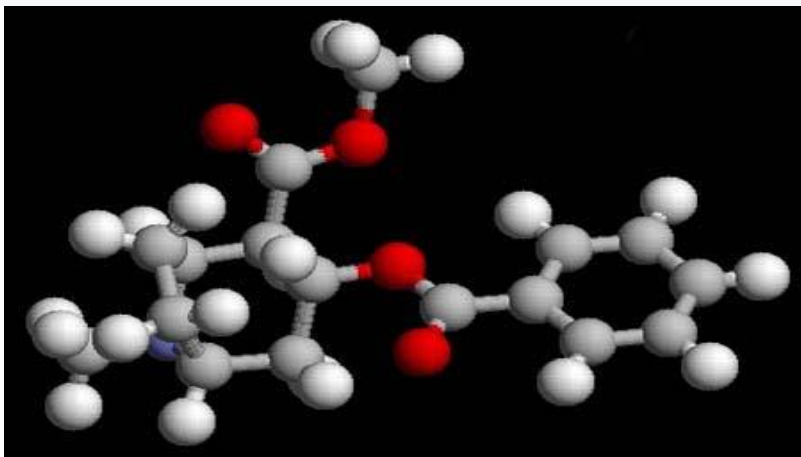
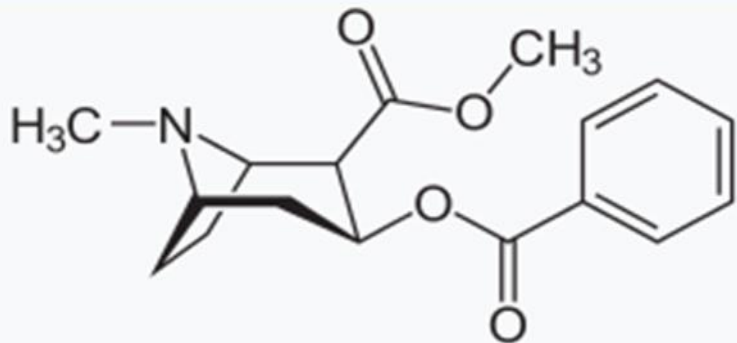
Кокаин выделен из листьев коки в 1859 г немецким химиком Фридрихом Гедке, Альберт Ниeman (Германия) усовершенствовал процедуру выделения алкалоида и назвал его кокаином, его структура расшифрована в 1898 г., а синтез осуществлен в 1902 г.



В 18 – 19 веках кокаин широко распространялся как свободно доступный и «безвредный» стимулятор. Он использовался для местного обезболивания, входил в состав большого числа лекарств, прохладительных напитков, тоников, вин и лакомств

В 1912 году правительство Соединенных Штатов сообщило о 5000 смертельных случаев, связанных с кокаином, за один год, и к 1922 году этот наркотик был официально запрещен.

КОКАИН



Кокаин = Метилвый эфир бензоилэкгонина = дважды сложный эфир спиртокислоты экгонина с метиловым спиртом и бензойной кислотой

М.м 303,353

pKa 8,97 ± 0,20

K октанол/вода 3,01 ± 0,34

Кокаин отнесен к числу особо опасных наркотиков. В настоящее время он включен в список №2 Конвенции ООН по наркотикам, что означает возможность его применения по определенным медицинским показателям при международном и внутреннем контроле.

В России он входит в Список II Постановления Правительства РФ №681, а все его растительные источники, формы незаконного оборота, производные и экгонин в Список I.

ОСНОВНЫЕ РЕГИОНЫ НЕЛЕГАЛЬНОГО ПРОИЗВОДСТВА КОКАИНА

Кокаин среди всех наркотиков вышел на второе место по величине мирового оборота. Объем рынка кокаина в Европе, прежде всего в Западной и Южной Европе, оценивается в 5,7 млрд евро в год.

С 2019 г. наблюдался рост его доступности

Июль 2019 г изъятие 4,5 тонн кокаина в Гамбурге

За весь 2019 г в Германии изъято 10 тонн

В марте 2020 г – 4 тонны в Роттердаме (Нидерланды)

Первый квартал 2020 г в Бельгии изъято 18 тонн, а в 2019 г – 12 тонн.



*Найт Б., Елкина А. Европейская мафия: главные игроки на криминальной карте ЕС // Deutsche Welle. URL: <https://www.dw.com/ru/a-51117756>

ЧАСТОТА ВЫЯВЛЕНИЯ НАРКОТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ (в т.ч. кокаина) у освидетельствуемых лиц за период 2016-2020 в ХТЛ МНПЦ наркологии

Группа наркотических средств	2016	2017	2018	2019	2020
ОПИАТЫ	3435	2009	1649	1367	1112
КАННАБИНОИДЫ/СИНТЕТИЧЕСКИЕ КАННАБОМИМЕТИКИ	4771/478	4737/ 97	3848/ 60	3189/ 71	2202/ 25
МЕТАДОН	1260	1741	1537	1589	1740
КОКАИН, из них в сочетании с др. НС, ПВ, ПАВ	315 / 229	599 / 468	580 /450	519 /417	555 / 472
АМФЕТАМИНЫ	1630	1392	943	545	505
ДРУГИЕ НС, в т.ч. КАТИНОНЫ	746	682	823	1414	2250
«Аптечные наркотики»	1728	2505	2761	4336	4426
Сочетания НС, ПАВ, ПВ	3823	3959	2949	2807	2787

Среди лиц, поступающих в отделение острых отравлений НИИ СП им. Н.В. Склифосовского, ежегодно выявляют в среднем 30 случаев острых тяжелых отравления кокаином, от 3,1 до 4,5% от всех пациентов с отравлениями наркотическими средствами (НС) и психоактивными веществами (ПАВ). Преимущественно в сочетании с другими НС и ПАВ, в частности, метадоном.

ЦВЕТНЫЕ РЕАКЦИИ НА КОКАИН



Сеченовский Университет

Реакции с общеалкалоидными реактивами - образует аморфные осадки .
Наиболее чувствительными среди этих реакций являются взаимодействие с фосфорно-вольфрамовой кислотой (1:1000000), реактивом Драгендорфа (1:160000), йодом в йодиде калия (1:100000); фосфорно-молибденовой кислотой (1:50000).
Пикриновая кислота дает кристаллический осадок в разведении 1:1500.

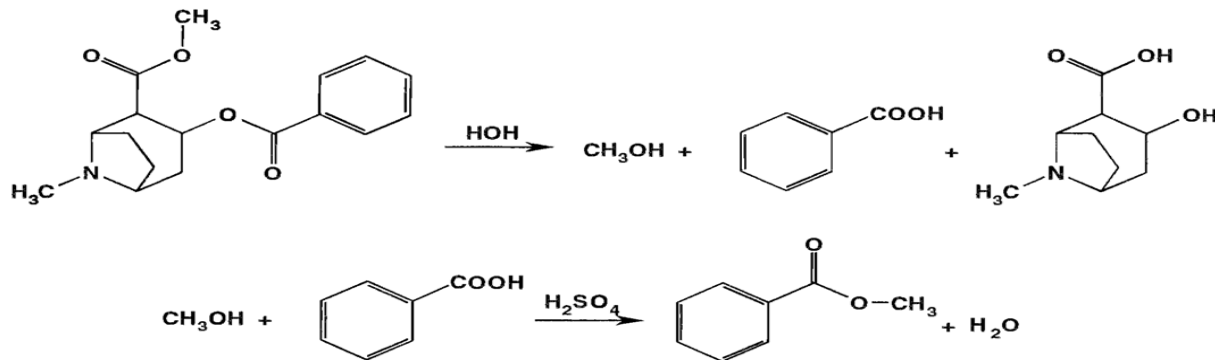
Реакция Скотта

К образцу добавляют 5 капель 2% тиоционата кобальта в смеси с глицерином (1:1) . В присутствии кокаина образуется **синее окрашивание**.
При добавлении соляной кислоты – окрашивание исчезает. А добавление нескольких капель хлороформа – **восстанавливает синее окрашивание** (хлороформного слоя)

ХИМИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ НА КОКАИН



При анализе достаточного количества – порошка, обнаружение предлагалось проводить по **продукту гидролиза - бензойной кислоте**. Проведение гидролиза спиртовым раствором серной кислоты при нагревании приводило к образованию бензойно-этилового эфира, обнаруживаемого по запаху.



При еще больших количествах проводят гидролиз при осторожном нагревании с серной кислотой, затем раствор выливают в холодную воду. Бензойная кислота выделяется в аналитически значимых количествах. Доказывают ее присутствие.



Образование кристаллического осадка с перманганатом калия :

Часть пробы растворяют в 1-2 каплях 1% соляной кислоты , высушивают ю
Добавляют каплю 1% раствора перманганата калия. Наблюдают **красно-фиолетовые кристаллы в виде прямоугольных пластин и сростки из них.**
Открываемый минимум 4 мкг при разведении 1:10000 *

Образование продукта кокаина с комплексной солью $\text{Na}_2[\text{PbCu}(\text{NO}_2)_6]$
в виде характерных **прямоугольных кристаллов** с выраженными гранями

Образование соли с платинохлористоводородной кислотой
в виде **перистых дендритов** или **штыковидных кристаллов** в случае низких концентраций. Предел обнаружения – 3 мкг кокаина

ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ ИСПЫТАНИЯ : ОПЫТ НА ЖИВОТНОМ



СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

Остаток после испарения хлороформа из щелочной хлороформной вытяжки растворяют в 1-2 каплях 1% раствора соляной кислоты и выпаривают при комнатной температуре. Сухой остаток растворяют в нескольких каплях воды и вводят в глаз кошки, лягушки или белой мыши.

В присутствии кокаина наблюдается расширение зрачка.

ОБНАРУЖЕНИЕ ЭКГОНИНА

Кокаин в трупном материале гидролизуется до экгонина, который образует внутреннюю соль при кислых значениях pH и соль карбоновой кислоты аммония при подщелачивании. В связи с этим экгонин трудно извлекается органическими растворителями. Для экстракции в хлороформ было предложено переводить экгонин в метиловый эфир, а затем определять микрохимической реакцией с фосфорно-молибденовой кислотой.

Образуются сферические сростки из **желто-зеленых призматических кристаллов** Чувствительность 50 мкг. *

* М.Д. Швайкова и др. [Микрохимическое открытие](#) экгонина переводением его в [метиловый эфир](#), Фармация, № 1, 1939)

Обнаружение кокаина во внешней среде, вещественных доказательствах (порошки и др.)

- С целью предотвращения транспортировки наркотиков используют специально обученных собак, способных выявить следовые концентрации наркотика в воздухе благодаря своему чувствительному обонянию.
- Бесконтактное обнаружение наркотиков. Перспективными считаются устройства, работающие на принципе ядерного квадрупольного резонанса (ЯКР). Сравнивая спектр поглощения с эталонным значением, можно обнаружить любое химическое соединение с упорядоченной кристаллической структурой. Однако данный метод малоэффективен при определении состава жидкостей и газов.
- Для подтверждения наличия в изъятых образцах наркотика используют следующие методы:
- Цветные реакции макрореакции (описаны выше)
- Тонкослойная хроматография, УФ-спектроскопия, Газожидкостная хроматография, хроматомасс-спектроскопия, ИК-спектроскопия.
- УФ- спектроскопия. Измеряют светопоглощение раствора кокаина гидрохлорида. УФ спектр кокаина гидрохлорида имеет максимум поглощения при 234 нм и минимум - при 210 нм. Может использоваться и в количественном анализе

ТОНКОСЛОЙНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ (ТСХ)



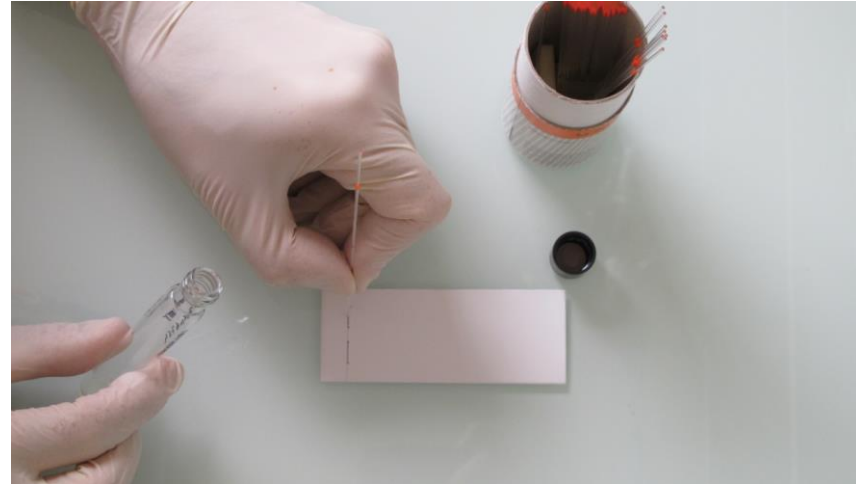
СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

Подвижная фаза

- хлороформ: диоксан: этилацетат:
25%водный раствор аммиака (25: 60: 10: 5)
- метанол - 25% водный раствор аммиака
(100:1,5)
- гексан-хлороформ-триэтиламин (14:9:4),
- диоксан: толуол: диэтиламин (75: 15: 10)
- этилацетат: метанол аммиак (85: 10: 5)

Неподвижная фаза -

Пластины Силуфол, Сорбтон, Сорбфил,



Обнаружение проводят

- по гашению флюоресценции при длине волны 254 нм
- помощью реактива Драгендорфа - окрашенная зона коричневого цвета.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОКАИНА МЕТОДОМ ГАЗОЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ (ГЖХ)

Капиллярная кварцевая колонка длиной 10 - 20 м и диаметром 0,2 мм с малополярной стационарной фазой типа **HP-5**; Т испарителя 275 °С, детектора - 290 °С; нагрев колонки изменяется от 100 до 280 °С со скоростью 10 °С/мин.; газ-носитель - гелий (азот);

детектор - пламенно-ионизационный или термоионный.

Кокаин в этих условиях выходит между насыщенными нормальными углеводородами с числом атомов углерода 21 и 22 (индекс удерживания - 2187).

При количественном определении в качестве стандарта используют раствор метилстеарата в этаноле (1 мг/мл).

Дериватизация : метилирование для экгоина.

ацилирование или силилирование для метаболитов



ПОДТВЕРЖДАЮЩИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ НА КОКАИН

Хромато-масс-спектрометрия.

Хромато-масс-спектрометрическую идентификацию кокаина проводят с предварительным разделением компонентов на кварцевой капиллярной колонке.

Масс-спектр :: 82, 182, 94, 105, 42, 303 m/z

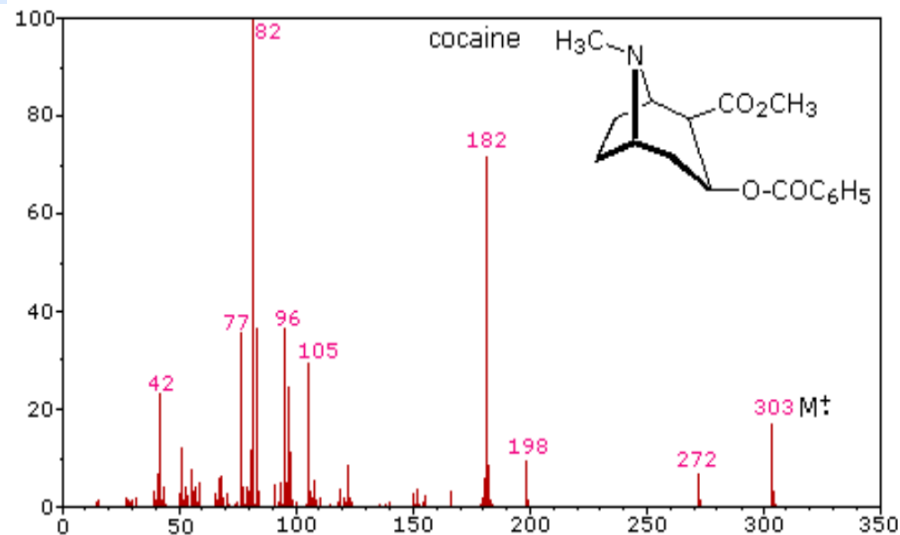
Инфракрасная спектроскопия.

ИК спектрографическое исследование позволяет идентифицировать индивидуальные вещества,

Исследуемые образцы, нуждаются в предварительной пробоподготовке.

Пробоподготовку проводят методом экстракции (ЖЖЭ или ТФЭ).

Спектр сравнивается с эталонным.



МЕТОДЫ АНАЛИЗА КОКАИНА В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТАХ

Метод	Биообъект	Наркотическое вещество	ПрО, нг/мл	Применение
Иммунный анализ	моча	Бензоилэкгонин	300	Качественный и полуколичественный анализ, предварительная идентификация, Скрининг
ТСХ	Моча	Кокаин, Бензоилэкгонин. Метилэкгонин	500	Качественный и полуколичественный анализ, предварительная идентификация, Скрининг
ГЖХ – ДИП, или - ТИД	Моча	Кокаин, Бензоилэкгонин. Метилэкгонин	Около 50	Скрининг; Подтверждающее исследование Количественное определение
ГЖХ- ДИП или - ТИД	Кровь	Кокаин, Бензоилэкгонин. Метилэкгонин	Варьирует 5-50	Количественное определение , Изучение токсикокинетики
ВЭЖХ -УФ	Кровь, моча	Кокаин, Бензоилэкгонин.	Около 50	Скрининг; Подтверждающее исследование Количественное определение
ГЖХ-МС	Кровь , моча	Кокаин, Бензоилэкгонин. Метилэкгонин	Менее 5	Экспертное подтверждение Изучение токсикокинетики, клинические корреляции
ВЭЖХ-МС/МС	Кровь, моча	Кокаин, Бензоилэкгонин. Метилэкгонин		Экспертное подтверждение Изучение токсикокинетики, клинические корреляции

Иммунные методы: иммуно-ферментный, поляризационный флуороиммуноанализ; иммуно-хроматографический анализ



- Обнаружение кокаина и его метаболитов суммарно
- . Пороговая чувствительность (cut off) 300 нг /мл.
- Методика проста и не требует выделение анализируемых веществ из биологической матрицы.
- Наличие других контролируемых и возможных сопутствующих веществ, таких как ацетаминофен, ацетилсалициловая кислота, амитриптилин, атропин, кофеин, прокаин, лидокаин , эфедрин, налоксон, имипрамин и некоторых других, в концентрации до 100 мкг/мл не дает перекрестных (ложноположительных) результатов.

СОХРАННОСТЬ КОКАИНА В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦАХ



Сеченовский Университет

Низкая стабильность кокаина, если не приняты меры к консервации.

Кокаин разлагается как *in vivo*, так и *in vitro* с помощью двух основных механизмов: химического и ферментативного гидролиза. Химический происходит при щелочном pH, ферментативный - результат активности эстераз. Продуктами химического и ферментативного гидролиза являются бензоилэксгонин (БЭ) и метиловый эфир экгоина (МЭ), соответственно.

В предсмертной крови при pH 7,4 основной путь – химический, лишь незначительная часть метаболизируется холинэстеразой плазмы в МЭ, который быстро разлагается до экгоина химическим гидролизом и, таким образом, не накапливается в крови живых субъектов

В посмертной крови значение pH крови **быстро снижается из-за анаэробного гликолиза**, что приводит к отсутствию химического гидролиза кокаина до БЭ, и накоплению **МЭ** под действием существующей холинэстеразы. **Более точно концентрация кокаина в крови в момент смерти может быть оценена путем суммирования концентраций кокаина и метилэксгоина.**

Для предотвращения гидролиза в крови рекомендуется добавление **NaF, ингибитора холинэстеразы**, в концентрации около 1%. Кокаин стабилен в крови от 2-3 недель до нескольких месяцев при температуре 4°C и при pH менее 7 (Baselt и др., 1993; Isenschmid и др., 1989; Муди и др., 1999).

ИЗВЛЕЧЕНИЕ КОКАИНА И ЕГО МЕТАБОЛИТОВ ИЗ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ



СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

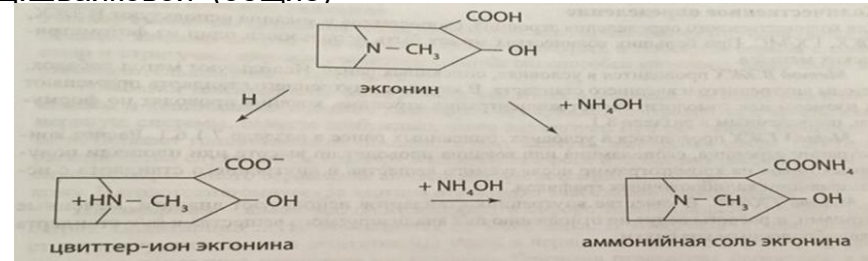
Изолирование:

Из тканей - метод В.Ф.Крамаренко (частный);
методы Стаса - Отто, А.А. Васильевой, М.Д.Швайковой (общие)

При изолировании объекты подкисляют до pH = 2-3.

Экгонин существует в форме цвиттер-иона.

При подщелачивании во второй фазе до pH = 8-10 он образует аммонийную соль по карбоксильной группе.



Из биожидкостей жидкостно-жидкостная экстракция кокаина при pH 8-10 органическим растворителем хлороформом.

Затруднена одновременная экстракция кокаина, метилэконина (МЭ) и бензоилэконина (БЭ) методом жидкостно-жидкостной экстракции из-за высокой полярности БЭ.

1. Использование смеси полярных растворителей хлороформа и изопропанола или этанола: например, хлороформ-изопропанол (3:1) или (9:1)

2. Фракционирование: Кокаин и МЭ при pH 9-10; БЭ – при pH 4-5 [Катаев СС. Идентификация кокаина и его основных метаболитов в моче. Мат. Конференции . Казань, 2006. с .187-190]

3. Твердофазная экстракция на колонках со смешанными фазами, позволяющими извлекать и полярные и малополярные соединения из водной биологической матрицы. Обзор по методике и эффективности извлечения с использованием ТФЭ на колонках со смешанными фазами разных производителей – см. [Катаев С.С. , Дворская О.Н. *Pharmacy & Pharmacology* V. 5 N 6, 2017 : 543-555]

Сочетание С8 и катионообменной Bond Elut Certify® и диатомитовой Extremelut®. Извлечение не ниже 86% для трех соединений [Kenichi Takekawa Cocaine and its metabolites: In: *Drugs and Poisons in Human*: 2005 : 213-218]

ПОДТВЕРЖДАЮЩИЕ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА



СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

- * Газо-жидкостная хроматография ГЖХ
- * Высокоэффективная жидкостная хроматография ВЭЖХ
- * Хромато-масс-спектрометрия ХМС



АНАЛИЗ КОКАИНА И ЕГО МЕТАБОЛИТОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТАХ МЕТОДОМ ГХ-МС

ГХ : капиллярная колонка типа HP-5MS (25-30 м * 0,25 мм; толщина 0,25 мкм)
Т колонки 50 °С \Rightarrow 25 °С/мин \Rightarrow 150 °С (3 мин) \Rightarrow 10 °С/мин \Rightarrow 300 °С;
температура инжектора: 250 °С; температура интерфейса: 300 °С; газ-носитель: гелий 0,9 мл/мин;
режим ввода splitless ; Регистрация масс в режиме полного сканирования . *
Внутренний стандарт : дейтерированный кокаин или гисциамин

Валидирована для определения в крови, моче, экстрактах печени, почек, сердца

Применена для экспертизы смертельного отравления кокаином

При анализе проб на кокаин и его метаболиты оптимально проводить **derivatization**.

Гидроксильную группу метилэгонина переводят в ацильное производное , а карбоксильную группу бензоилэгонина - в сложный эфир.

В качестве ацилирующего реагента может быть использован уксусный , пентафторпропионовый ангидрид, трифторуксусный ангидрид (TFAA) или гептафтормасляный ангидрид. Для этрификации можно использовать гексафлуоризопропанол (HFIP) или трифлуориэтанол (TFET). Комбинация TFAA с TFET также может дать хорошие результаты поскольку Derivatization обоих соединений происходит одновременно. .

- * Crouch DJ, Alburges ME, Spanbauer AC et al. (1995) Analysis of cocaine and its metabolites from biological specimens using solid-phase extraction and positive ion chemical ionization mass spectrometry. J Anal Toxicol 19:352–358)

АНАЛИЗ КОКАИНА И ЕГО МЕТАБОЛИТОВ В БИОЛОГИЧЕСКОМ ОБЪЕКТЕ (моча) МЕТОДОМ ГХ-МС



ГХ: Т колонки 70°C (2 мин) → 20°C /мин → 280°C (8 мин);

Температура инжектора 250°C и интерфейса 280°C.

Газ-носитель (гелий) через колонку 0.85 мл/мин, **режим работы split/splitless** (деление потока 1:10, с задержкой включения 1 мин после ввода пробы).

Регистрация масс-спектров в режиме полного сканирования в интервале масс 45-450 а.е.

Пробоподготовка: ВС – этилморфин

Кокаин и метилэгонин экстрагировали рН 9-10 в хлороформ. Дериватизация – уксусный ангидрид 80°C 25 мин. Введение в этилацетате.

Бензоилэгонин из водного остатка экстракция при рН 4-5 в хлороформ.

Дериватизация - BSTFA, содержащий 1% триметилхлорсилана, 80°C 30 минут.

Соединение	Характеристические ионы m/z, а.е. (интенсивность, %)	t _{уд.} , МИН.	RI
Метилэгонин ацетил-	182 (100); 82 (80); 94 (56); 96 (31); 83 (25); 241 (15); 75 (11); 117 (11); 168 (11); 183 (11)	8,79	1643
Кокаин	82 (100); 182 (82); 83 (41); 77 (28); 94 (28); 96 (25); 105 (25); 303 (18); 81 (12)	11,90	2266
Бензоилэгонина триметилсилилов ый эфир	82 (100); 240 (49); 105 (31); 83 (38); 94 (23); 77 (20); 96 (18); 361 (17); 250 (13)	12,22	2341

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОКАИНА МЕТОДОМ ВЫСОКО-ЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ (ВЭЖХ)



Обращенно-фазная хроматография на колонках типа C18

Подвижные фазы: 1) смесь ацетонитрил-муравьиная кислота-формиат аммония в разных соотношениях;

2) Смесь метанол - ацетонитрил-муравьиная кислота-формиат аммония в разных соотношениях

3) Метанол – фосфатный буфер - гексиламин в разных соотношениях

Градиентный режим

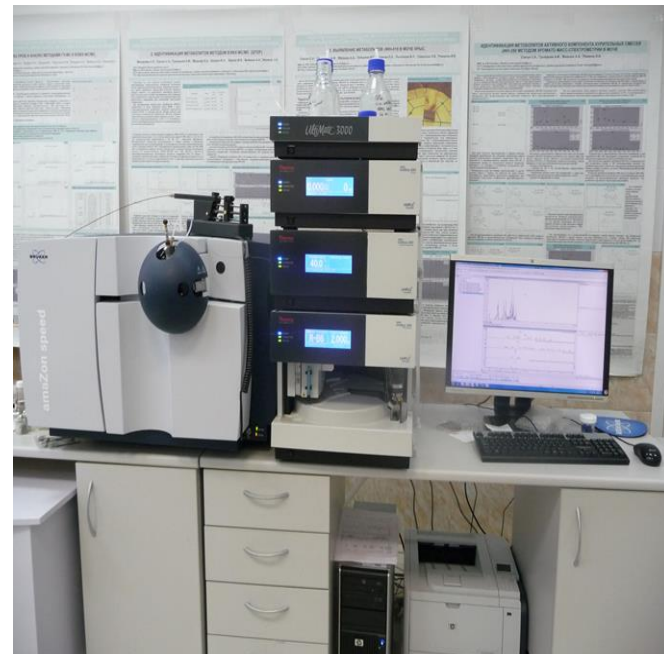
Детектирование :

Тандемная масс-спектрометрия - тройной квадруполь;

Квадруполь-время-пролетный масс-детектор высокого разрешения

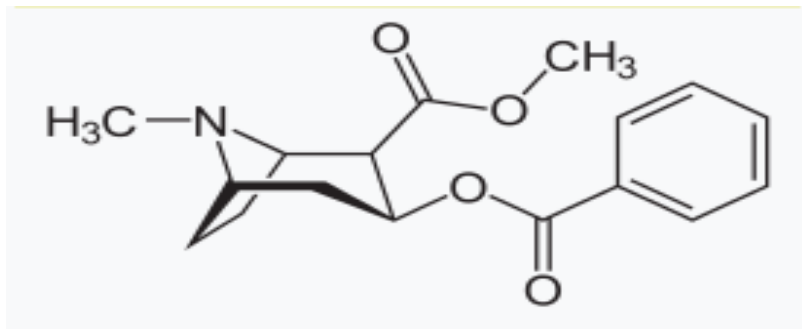
Ионизация – электроспрей , регистрация положительных ионов

Подготовка пробы : добавление смеси ацетонитрил-вода (7:3), центрифугирование , разбавление аликваты супернатанта



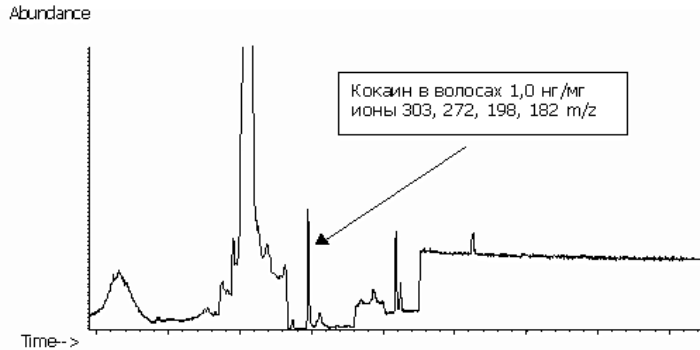
ИДЕНТИФИКАЦИЯ КОКАИНА В ВОЛОСАХ

- Обязательное подтверждение гидроксикокаина (ОН-СОС) и норкокаина (NCОС)
- Результат является положительным, если отношение $(NCОС+CE) / СОС > 0,02$ и присутствует ОН-СОС
- Наличие бензоилэкгонина не является доказательным



Musshoff, F., Thieme, D., Schwarz, G., Sachs, H., Skopp, G., & Franz, T. (2017). Determination of hydroxy metabolites of cocaine in hair samples for proof of consumption. *Drug Testing and Analysis*, 10(4), 681–688.

Пример обнаружения кокаина в волосах и ногтях



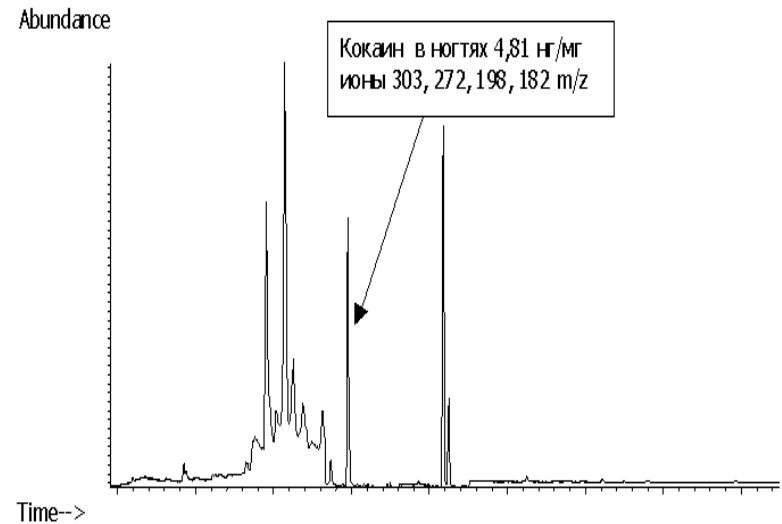
Минимальная доза кокаина, определяемая в волосах **20 – 35 мг**

Длительность определения в волосах разовой дозы **2 – 6 мес**

Содержание кокаина в волосах не зависит от способа введения

Содержание кокаина в волосах **от 0,1 до 16 нг/мг** (если полученная концентрация выше 20 нг/мг, то результаты следует рассматривать как ошибочные)

Содержание бензоилэктоина в волосах менее 1 нг/мг





Методы ГЖХ и ВЭЖХ с различными детектирующими системами используются как для идентификации кокаина, его метаболитов, так и для их количественного определения.

Время детектирования :

После разовой дозы кокаина он может обнаруживаться в моче в неизменном виде от 8 до 24 часов, а бензоилэксгонин и метилэксгонин – до 48 часов

При хроническом потреблении сроки детектирования увеличиваются до 5 дней

Обнаружение в моче этилового эфира бензоилэксгоина указывает на одновременное потребление кокаина и этанола

Обнаружение метилового эфира ангидроэксгоина указывает на курение крэка и основания кокаина



БЛАГОДАРЮ ЗА ВНИМАНИЕ