

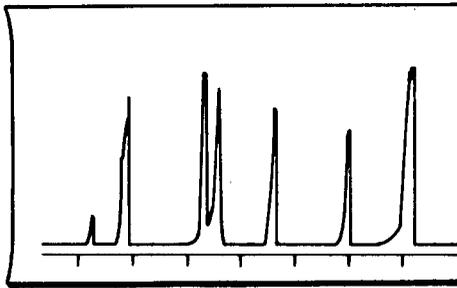
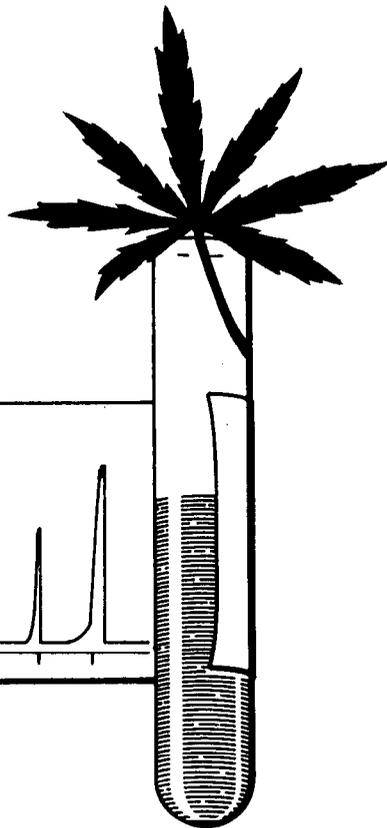
National
Institute on
Drug
Abuse

Research

MONOGRAPH SERIES

42

THE
АНАЛИЗ
CANNABINOIDS
В BIOLOGICAL
ЖИДКОСТИ



Анализ каннабиноидов в биологических жидкостях

Редактор:

Ричард Л. Ястребов, Ph.D.

Исследование технология отделение

Отдел исследований

Национальный институт по борьбе со злоупотреблением наркотическими средствами

NIDA Research Монография 42

1982

Департамент здравоохранения и социальных служб Службы общественного здравоохранения

Алкоголизма, наркомании, и администрация психического здоровья

Национальный институт по борьбе со злоупотреблением наркотическими средствами 5600 Fishers Lane Роквилл, Мэриленд 20857

NIDA Исследование Монография готовит исследовательские подразделения Национального института по борьбе со злоупотреблением наркотических средств и опубликовала его Управление науки. Основная цель этой серии заключается в обеспечении критических обзоров исследовательских проблемных областей и методов, содержания внедренного конференция и интегративные научные обзоры. Его двойная акцент издания является быстрым и целенаправленным распространением в научную и профессиональную общественность.

Editorial Advisors Мартин

В. Адлер, Ph.D.

Temple University школы медицины Филадельфии,
штат Пенсильвания

Сидней Арчер, Ph.D.

Rensselaer политехнический институт Трой,
Нью-Йорк

Ричард Э. Belleville, Ph.D.

NB Associates, медицинские науки Rockville,
Maryland

Гилберт Дж Ботвин, доктор философии

Cornell University Medical College Нью-Йорк,
Нью-Йорк

Джозеф В. Brady, Ph.D.

Школы Университета Джона Хопкинса медицины Балтимор, штат
Мэриленд

Теодор Дж Цицерон, доктор философии

Вашингтонский университет Школа медицины Сент-Луис, штат
Миссури

Сидни Козн, MD

Лос-Анджелес, Калифорния

Риз Т. Джонс, доктор медицинских наук

Лэнгли Портера Neuropsychiatric институт
Сан-Франциско, Калифорния

Denise Кандель, Ph.D.

Колледж врачей и хирургов Колумбийского университета Нью-Йорк, Нью-Йорк

Герберт Клебер, MD

Йельский университет, факультет медицины
Нью-Хейвен, штат Коннектикут

NIDA Research Серия монографий

Уильям Pollin, MD

ДИРЕКТОР, NIDA

Джек Даррелл, MD

ASSOCIATE ДИРЕКТОР ПО НАУКЕ, NIDA РЕДАКТОРА
ГЛАВНЫЙ

Элеонора В. Waldrop

ОТВЕТСТВЕННЫЙ РЕДАКТОР

Анализ каннабиноидов в биологических жидкостях

ПОДТВЕРЖДЕНИЕ

Эта монография основана на документах, представленных в техническом обзоре, состоявшемся в Роквилле, штат Мэриленд, на 17 января 1980 года под эгидой Отдела исследований, Национальный институт по борьбе со злоупотреблением наркотических средств.

COPYRIGHT STATUS

Материал в этом объеме в открытом доступе и может быть использован и без разрешения Национального института по борьбе со злоупотреблением наркотических средств или авторы Цитирование источника ценится. Воспроизведение из главы по Моффату, Williams, и королю требует подтверждений того, что материал находится под британской короной авторского права.

Правительство Соединенных Штатов не поддерживает и не благоприятствует какой-либо конкретный коммерческий продукт или товар. Торговые названия или названия SUP плоскогубцы, упоминаемые в данном документе, используются только приступающих, потому что они считаются необходимыми в контексте исследований, опубликованных в настоящем документе.

Библиотека Конгресса числа Каталог карт 82-600586

DHNS номер публикации (ADM) 85-1212 Печатный
1982 Перепечатано 1985

NIDA Исследование Монография индексируется в *Index Medicus*.
Они выборочно включены в охвате из *Американская статистика Index*,
информационная служба Biosciences, *Химическая Ab-stracts*, *Current Contents*,
психологические Рефераты, а также *Психо- фармакологии Тезисы*.

Для продажи суперинтендантных документов, государственная типография США

Вашингтон, округ Колумбия 20402

ПРЕДИСЛОВИЕ

Поскольку использование марихуаны увеличилось в течение последних нескольких лет, потребность в улучшенных количественных химических анализах, с помощью которых изучить влияние употребления марихуаны на здоровье человека увеличилось. Более чувствительные, надежные и работоспособные анализы на каннабиноиды (активные принципы марихуаны) в жидкостях организма необходимы, чтобы увеличить наши знания о том, как эта химический ДОГОВОРЕ stituents и их метаболиты накапливаются и как они огра NAT, от тела.

В дополнение к требованиям исследования, существует растущий спрос на менее дорогих и более надежных тестов для использования вооруженными силами, гражданских правоохранительных органов и частного сектора промышленности, где забота существует для воздействия использования марихуаны на критической производительности труда. Особую озабоченность вызывают эффекты марихуаны на комплексной производительности, связанных с управлением транспортными средствами, пилотирование самолета, работающего промышленного оборудования, мониторинга радарные экраны и т.д.

Забота о негативном влиянии употребления марихуаны на здоровье возведено недавними результатами исследований, а также наличия проверяемых более мощной марихуаны, тенденция к использованию среди младших возрастных групп, а также растущее число лиц с длительным воздействием на марихуана. С положительной стороны вопроса здоровья, тетрагидроканнабинол (THC), основным активным компонентом марихуаны, является объектом интенсивных исследований в качестве лечения для часто невыносимых побочных эффектов химиотерапии, когда другие antieme- тики являются неэффективными. Потенциальные применения THC для лечения симптомов глаукомы, судорог, связанных с мышечной дистрофией, а также некоторых астматических состояний также под следствием. Исследования с целью оценки как клинический потенциал THC и эффекты Хуаны на его семейное здоровье должно опираться частично на чувствительные химические анализы.

Отличающиеся методологии анализа каннабиноидов необходимы, чтобы удовлетворить эти различные потребности. Соответственно, Национальный ин ституте по борьбе со злоупотреблением наркотиками (NIDA) поддерживает различные усилия по разработке чувствительных методов каннабиноидов опробования по методикам im- типоassay, газовой хроматографии, газовой хроматографии / масс-спектрометрии trometry и высокоэффективной жидкостной хроматографии. разра-

тие этих методов является предметом технического обзора, проведенного NIDA в феврале 1976 года и описан в NIDA исследований монографию 7. С того времени, исследование методов в анализе каннабиноидов в биологических жидкостях были уточнены и новые методы были разработаны. Еще более важным, возможно, было применение многих из этих методов для широкого круга научных проблем.

В январе 1980 NIDA провел второй технический обзор для объединения ведущих ученых, работающих над развитием каннабиноидов анализов и подвести итоги последних исследований, где используются каннабиноиды скопического сестренка. Настоящая монография представляет эту информацию в качестве компендиума состояния искусства в быстро развивающейся области исследований анализа каннабиноидов сегодня.

Мы надеемся, что этот объем будет полезен для основных исследователей в области биомедицины и криминалистику, где уточнить наличие надежных, точных и доступных количественных анализов является критической величиной для лучшего понимания проблем в области злоупотребления марихуаны.

Marvin Снайдер, Ph.D.

директор

Отдел исследований Национального института по
борьбе со злоупотреблением наркотическими средствами

СОДЕРЖАНИЕ

предисловие		
<i>Marvin Снайдер</i>		v
Введение и обзор		
<i>Ричард Л. Ястребов</i>		1
Использование высокого давления жидкостной хроматографии с электрохимическим детектированием для количественного определения Nantadol и его применение к тетрагидроканнабинол Δ^9 :		
<i>Richard M. Shepard и Джордж М. Милн</i>		7
Радиоиммуноанализы для Cannabinoids		
<i>С. Е. Кук, НН Seltzman, В.Х. Шиндлер, CR Tallent, KM Ch и CG Pitt</i>		19
Radioimmunoanalysis Дельта-9-ТГК в крови с помощью ¹²⁵ Я Tracer		
<i>SM Оуэнс, AJ McBay и HM Рейснер</i>		33
Существенные изменения в методах радиоиммунных прикладной к Δ^9 -THC и его 9-Замещенные Метаболиты		
<i>JR Соарес, JD Грант и SJ Gross</i>		44
Комбинированный высокоэффективной жидкостной хроматографии и метод радиоиммунологическая для анализа тетрагидроканнабинол и Δ^8 метаболита в плазме крови и моче		
<i>Энтони С. Моффат, Питер Л. Уильямс, и Laurence J. король</i>		56
EMIT Анализ на каннабиноидов в моче метаболита		
<i>MJ Делорентис, К. Макнейл, А. Манн, С. Кларк, и Елена М. Greenwood</i>		69
Лаборатория Оценка иммуноанализа наборов для обнаружения каннабиноидов в биологических жидкостях		
<i>Майкл А. Торф, Брайан С. Finkle, и Мэри Е. Deyman</i>		85

Количественный анализ для Δ^9 -ТНС, 11-гидрокси- Δ^9 -ТНС, и 9-карбокси- Δ^9 -ТНС в плазме с помощью ГХ / СИ-МС	<i>Rodger Л. Фольц и Брюс Дж Ниду</i>	99
стабильность Δ^9 -Тетрагидроканнабинол в консервированной крови и сыворотка	<i>Энтони С. Вонг, Майкл У. Orbanosky, Виктор К. Рив, и Джеймс D, Бид</i>	119
Составляющими Cannabis и диспозиции и Метаболизм каннабиноидов	<i>Ричард Л. Ястребов</i>	125
Список Монографии	138

Введение и обзор

Ричард Л. Ястребов

Анализ каннабиноидов в биологических жидкостях является предметом серьезного интереса в нескольких областях, представляющих общественный интерес, а также предмет огромной научной задачей. Ученые, участвующие в фундаментальных исследованиях по марихуане и ее компонентам требуют более чувствительной и доступной METHODE количественного анализа, организации гражданского правоприменения заинтересованы в более эффективных способах определения химической интоксикации или прошлое использования марихуаны, и специалистов в области клинической становятся все больше и больше заинтересовано в тестах, чтобы определить степень использования Хуанов его семейной привычку индивида в сочетании с протоколами лечения.

В любой области развития анализа, и особенно в области злоупотребления наркотиков, то questione чувствительности методы, специфичности и работоспособной способность имеет первостепенное значение. Другая связанными, но часто забывают, что площадь фармакокинетики лекарственных средств, решающее значение для интерпретации анализа лекарственной концентрации,

Чувствительность анализа является мерой наималейшего количества материала для анализа будет надежно обнаруживать. Потому что есть много способов, чтобы прибыть на номере, который представляет этот предел, то чувствитель- претензия сительности для опубликованных анализов не всегда совпадает с их практическими рабочими пределами. Когда eeneitivity определяется это важные работы, чтобы учитывать тип жидкости тела вовлеченного и способ определяется чувствительность. Анализа, который надежно обнаруживает свое pan- ogram данного лекарственного средства в одном миллилитре физиологического раствора, не может обеспечить надежное обнаружение в 100 раз даже такой концентрации в реальной сыворотке или моче образцов из-за помехами биологического фонового шума. При определении чувствительности анализе, важно, чтобы подготовить и проанализировать значительное количество пустых тела жидкости образцов, содержащих одинаковое количество анализируемого вещества вблизи предела чувствительности, так что точность анализа может быть статистически определено чески. Статистическая вариация этого «игольчатого» уровня

следует сравнить с изменением наблюдаемым в пустых образцах на, чтобы определить вероятность перекрытия значений. Это особенно велика роль в тестах, предназначенные для использования в качестве анализов обнаружения, где есть беспокойство как для ложных положительных результатов и ложных результатов пренебрежимо чeskих.

Не менее важно, чтобы иметь возможность отличить данный препарат интереса от других препаратов, метаболитов и эндогенных соединений, которые могут появиться в матрице образца. Степень, в которой анализ может сделать это различие является специфичность анализа. Это становится особенно важным в случае судебно-медицинской экспертизы образцов, где качественный анализ препарата часто является более важным, чем количественный анализ. В случае иммуноанализов, это ему определенные снова и снова доказывать особенно важный фактор. Исторически сложилось так, immunoas- говорит недоставало высокую специфичность из-за способа антителя был сгенерирован в широкополосных риала. Как было показано в работах, представленных докторами. Кук и Соарес, Высокая специфичность радиоиммуноанализа (RIA) методы могут быть достигнуты путем тщательного проектирования и сложные технические приемы синтеза при получении иммуногенов, используемых для генерации антисыворотки реагента. В некоторых случаях, однако, тест с высокой специфичностью для конкретного исходного лекарственного средства или метаболита не является желательным в качестве одного с ограниченной перекрестной реактивностью для одного класса молекул, как и в случае однородного фермента Syva immunoas- сказать (EMIT) представлены докторами. Гринвуд и Делорентис. Здесь перекрестная реактивность с различными Гринвуд и Делорентис. Здесь перекрестная реактивность с различными Гринвуд и Делорентис. Здесь перекрестная реактивность с различными

Δ^9 -тетрагидроканнабиол (THC)

метаболиты желательно, так как анализ используются для определения прошлого использования марихуаны, а не определенного уровня заданного cannabin- подъязычных. Путем перекрестной реакции с более, чем одного метаболита, чувствительность дополни- аль достигается.

Другой аналитический подход, который извлекает выгоду от использования перекрестно реагирующих антисыворотки является то, что сочетающий высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с RIA. Эта методика экс ploits специфичности должны быть достигнута с помощью ВЭЖХ хроматографической отстоящей товки и чувствительности можно с помощью RIA в качестве детектора для системы. Хороший пример такого подхода описан в статье доктора Moffat.

Основные успехи со времени предыдущего NIDA монографии по каннабиноидов анализов в 1976 году включали разработку чувствительной газовой хроматографии / масс-спектрометрии (ГХ / МС) мет- ODS для обнаружения 11-гидрокси-ТГК и 11-нор-THC-9-карбокси- LIC кислоты (9-карбокси-THC) при низкой чувствительности нанограмм. Новые свершения в иммуноанализе включают разработку специфических методов RIA для 9-карбокси-THCA, а также развитие йодированных индикаторов, которые позволяют уровни чувствительности около одного нанограмм на мл должны быть достигнуты. Продемонстрировал способность использовать некоторые из этих анализов

для непосредственного анализа цельной крови также является важным достижением для судебно-исследовательских применений.

Обнаружение прошлого использования марихуаны может облегчить лекарственно-treatment консультирование и обеспечить более широкую базу, для оценки влияния марихуаны на здоровье и безопасности. Это особенно важно в отношении тех групп, которые могут рассматриваться как в относительно ситуаций высокого риска, либо для себя или других, и включает в себя молодежь, член военных, автомобильные driv-ERS и оператор комплекса промышленное оборудование. Такие системы, как Syva EMIT могут обеспечить некоторые из этой оценки в его роли в качестве инструмента скрининга для конкретных групп населения.

В случае водителей, механизаторов и других, чей уровень трезвости является ключевым фактором безопасности, вопрос аналитического средства определения опьянения имеет решающее значение и вопрос, который оказался гораздо более трудной задачей, чем простое обнаружение. Есть много специфических факторов, которые следует учитывать при каннабиноидах анализов используются в судебной области, в том числе удобства получения биологического образца, чтобы быть проанализированы и обычными концернами чувствительности, специфичности и другими техническими аспектами анализа. Интерпретация результатов

в судебно-медицинских случаях становится, как imrog-
Tant как точность анализа выполняется.

Как видно из доступных данных, что только образец крови может относиться физиологически коррелирует с фактическим состоянием интоксикации. Образец мочи, который дает положительный результат теста указывает на предварительное применение, но такое скопического сестренка не может быть непосредственно связано с интоксикацией, так как каннабиноидов Me- tabolites может сохраняться в моче в течение нескольких дней после того, как курение одной сигареты.

Использование слюны или дыхания для обнаружения является очень привлекательным потому что Бе включает в себя легко получить образец. Исследования в PROG- ССГ дополнительно оценить потенциал слюны или дыхания в качестве неинвазивной альтернативы сбора крови в придорожных обследований. бумага Dr Soares' обеспечивает предварительное доказательство того, что каннабиноиды обнаружить с помощью методов иммуноанализа могут быть найдены в образцах дыхания. В то время как эксперименты с внутривенной инъекцией меченного THC в человеческие субъект с последующим мониторингом radioac- тельности в слюне показали, что незначительное количество лекарственного средства или метаболитов пересекают крови / слюны барьер, другие эксперименты показали, что дыхание и образцы крови, собранные после курения его семейного Хуаны действительно показывают обнаруженные уровни THC, которые сохраняются в течение нескольких часов. Эти уровни THC по-видимому, из-за материала seques- непосредственно убито, неспецифическим образом, во рту и в легких во время курения, а затем медленно высвобождаются в дыхании или слюной. Если простые методы для анализа этих уровней можно было бы разработать, можно предположить, что они могут быть использованы в качестве предположительного испытания недавней

использование марихуаны. Такой способ анализа не будет, однако, быть количественно связаны с их эквивалентов в крови уровня при этих обстоятельствах.

Одним из наиболее важных вопросов в области марихуаны и вождения является интерпретацией данной концентрации в крови THC объяснить предполагаемую интоксикацию человека, у которого был взят образец. В попытке определить, является ли возможным установить предположительный уровень обесценения для THC, начаты исследования по контракту NIDA в Научно-исследовательском институте Южной Калифорнии для изучения влияния различных доз марихуаны на поведенческих задачах, связанных с способностью управлять автомобилем. Одновременно с поведенческим исследованием, фармакокинетический анализ каждого субъекта был выполнен. Эти исследования были разработаны для создания двух наборов времени, конечно, данные-один из концентрации в крови и один из Behavioral производительности. Чувствительные поведенческие тесты проводились периодически, чтобы обеспечить временной курс кривую производительности, которые могут быть статистически по сравнению с фармакокинетической кривой в крови уровня. Анализ этих данных еще не завершен, но то, что очевидно, до сих пор является то, что даже если некоторая согласованность существует по индивидуальным курительного заданной дозы марихуаны, с точки зрения ожидаемых уровней в крови, связанные эффективности воздействие этих доз не показывает та же последовательность. Пока еще не ясно, будет ли практическая Предположительный концентрация THC может быть связана с измеримыми нарушениями. соответствующие показатели воздействия этих доз не показывают ту же последовательность. Пока еще не ясно, будет ли практическая Предположительный концентрация THC может быть связана с измеримыми нарушениями. соответствующие показатели воздействия этих доз не показывают ту же последовательность. Пока еще не ясно, будет ли практическая Предположительный концентрация THC может быть связана с измеримыми нарушениями.

Исследование терапевтического применения THC является быстро развивающейся областью. Начаты исследовать терапевтический потенциал THC как противорвотное средство для пациентов химиотерапии крупных государственных и национальных программ. Большинство исследований включает в себя устные дозы THC в ТКА в кунжутном масле в капсулах. Глава о метаболизма и утилизации указывает на то, что пероральный путь введения приводит к образованию большого количества 11-гидрокси-THC, который представляет собой фармакологически активный метаболит, и анализа, подходящий для данного типа клинических исследований должны быть разработаны, чтобы определить, как THC и 11-гидрокси-THC уровень. В настоящее время только GC / способ и методы, которые MS пар ВЭЖХ с RIA могут быть применены к этому типу анализа.

Там было все больший интерес к использованию неспецифических RIA-х годов в сочетании с хроматографического разделения СВОЙСТВ ВЭЖХ инструментов. Бумаги доктором Мосфат демонстрирует один конкретное использование этой системы в области каннабиноидного скопического SES. Сочетание этих двух методов является мощным

инструмент исследования в том, что он позволяет исследователю определить Количественно с одной радиоиммуноанализом концентрации большого количества метаболитов. Компромисс является несколько больше времени анализа, но в условиях исследования или с небольшим числом выборок, время не часто является основным фактор. ВЭЖХ была также использована в качестве составной части процедуры подготовки образца для ГХ / МС анализов, как отмечено доктором Foltz. Д-ра. Шепарда и Милна сообщить метод разумной чувствительности с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии и стандартных детекторов.

Д-р Моффат, в судебных делах, рассмотренных его группой, сообщает установлено значительное количество глюкуронида-конъюгированный метаболитов в моче и крови. Д-р Торф сообщил, что большое количество ЕМІТ-положительных образцов мочи, когда затем анализируют с помощью ГХ / МС, показали уровни, которые были низкими или незаметного для свободного 9-карбокси-ТНС. С учетом замечаний доктора Моффатом, в дальнейшем анализ некоторых из этих образцов (после технического обзора) был проведен. В ряде случаев, образцы ранее низкие или отрицательные для 9-карбокси-ТНС показали значительные уровни после ферментативного гидролиза. Это открытие указывает на то, что в некоторых образцах мочи практически все 9-карбокси-ТНС может быть найден в конъюгированной форме, что является важным фактором, когда конкретный способ, такой как ГХ / МС используется в качестве инструмента для подтверждения менее специфического анализа, такого как ЕМІТ, который, вероятно, перекрестно реагирует с глюкуронид метаболита. Этот метод гидролиза был применен к подтверждению большого количества ЕМІТ-поло- TIVE образцов полученных из Министерства обороны скринингового исследования. Институт патологии вооруженных сил используется ГХ / МС, чтобы подтвердить более 95 процентов 1100 положительных проб мочи в результате исследования. Большинство сомнительных положительных результатов, которые составляли 5 процентов неподтвержденных случаев были близки к уровню отсечки обнаружения анализа ЕМІТ.

Доктор Оуэнс сообщил, что его весьма специфичный и чувствительный RIA работал достаточно хорошо с метанолом экстрактом цельной крови. Зывалось ранее, многие исследователи предположили, что, для иммуноанализа, чтобы функционировать должным образом, среда, в которой антиген-антитело взаимодействие произошло бы быть очень похож на нормальный физио- логической среде. Оказывается, однако, что по крайней мере в случае каннабиноидов RIAs, это не обязательно так. На самом деле анализ был показан, чтобы работать лучше в присутствии спирта, чем при его отсутствии. Это также был опыт доктора. Моффат и Кук, важное открытие, поскольку оно позволяет образец крови, чтобы быть частично очищает осаждение спирта, центрифугирование, и суб-анализ секвенции полученного спиртового супернатанта без стадии выпаривания.

Представляет интерес для судебного сообщества замечания доктора Вонга относительно его исследования на устойчивость каннабиноидов в цельной крови и плазме при различных условиях. Эти исследования проводились в рамках контракта с Министерством юстиции, штат Калифорния, в рамках научно-исследовательской работы этого государства в про- смотри основы для будущего законодательства в отношении марихуаны и driv- ИНГ нарушения.

Интерпретация данных судебно-медицинской экспертизы образцов был вопрос о существующее обсуждение в данном техническом обзоре. Поскольку THC имеет относительно короткий период полураспада после курения, метод анализа чувствительности 1 нг на мл, не может быть достаточным, чтобы обнаружить соединение более 6 часов после курения. Это привело некоторых исследователей утверждать, что если какой-либо уровень THC обнаруживается в крови вообще, можно предположить, что образец был взят в то время очень близко к налетающей от курения и что, следовательно, субъект имеет высокий зада- способность в состоянии алкогольного опьянения. Этот аргумент имеет довольно широкие допущения относительно предположительную концентрации THC, которые могут быть связаны с конкретными типами хмельного поведения. Совершенно очевидно, мы все еще далеки от определения, что именно этот предполагаемый уровень. В целом было решено, однако, что для любого анализа THC в крови, чтобы быть полезным в судебно-медицинской области, она должна была бы иметь чувствительность по меньшей мере 3 нг на мл, так как уровни в крови падают на этом уровне в течение часа или два после инцидента курения. Пока мало информации в настоящее время доступен на уровнях крови THC при хронических курильщиках, возможность накопила наркотиков быть на detectable уровнях вскоре после острого периода интоксикации необходимо учитывать.

Хотя очевидно, что значительный прогресс был достигнут в последние несколько лет на каннабиноиды анализов, исследование в этой области ДОГОВОРА tipues развиваться быстрыми темпами. Из презентаций и дискуссий на этой встрече, кажется, что ближайшее будущее имеет интересные прорывы в еще более чувствительных анализах, а также совершенствование методов, которые приведут к каннабиноидам анализам используются впервые в различном новой судебно-медицинской экспертизе и социальные установки.

АВТОР

Ричард Л. Ястребов

Исследование технология отделение

Отдел исследований

Национальный институт по борьбе со

злоупотреблением наркотическими Роквилл, Мэриленд 20857

Использование высокого давления жидкостной хроматографии с Электрохимический Обнаружение для количественного определения Nantradol и его применение к Δ^9 - тетрагидроканнабинол

Richard M. Shepard и Джордж М. Милн

жидкостная хроматография высокого давления с электрохимическим детектированием позволяет чувствительный, избирательный и количественный анализ распространения биологических и фармацевтических соединений жаского электроактивные функциональных групп. В поддержку pharmacol- логических и клинических исследований с pantradol, мощным, не- опиоидного анальгетика, определенной HPLC / электрохимического анализа для pantradol и родственных соединений в плазме недавно был разработан. В предварительных исследованиях мы теперь расширили эту технику для обнаружения

Δ^9 - и 11-OH Δ^9 -

тетрагидроканнабинол. Результаты возмущали, которые показывают, что ВЭЖИ в сочетании с electroc etical детектор обеспечивает чувствительность этих соединений в плазме в диапазоне низких нг / мл.

ВВЕДЕНИЕ

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭАЯ), находит применение приведет к усилению к анализу следов наркотиков, метаболизируемых Lites лекарственных средств и биологически важных соединений в сложных матрицах, такие как жидкости организма и образцы тканей. В случае каннабиноидов, ВЭЖХ имеет

был использован в качестве средства из очищающий Δ^9 - тетрагидроканнабинол (Δ^9 -THC) из соответствующих материалов и интерференции ИНГИ эндогенных веществ в плазме крови. Однако, в концентрирует

trations из Δ^9 -ТНС обычно встречается в плазме, прямой ВЭЖХ методы оперативного мониторинга, такие как показатель преломления или обнаружение спектрофотометрии ультрафиолета не являются достаточно чувствительными для использования при мониторинге уровня в плазме. В результате последующего анализа с помощью газовой хроматографии (1), масс-спектрометрии (2), или радиоиммуноанализа (3) было необходимо. Связь с электрохимическим детектированием ВЭЖХ (4) представляет собой недавно разработанный метод, который часто обеспечивает чувствительность и селективность, необходимую для практической аналитической процедуры. Применение этой технологии для определения в плазме пантрадол, мощного анальгетика, недавно был скрайбированной операцией (5). Это является целью данного документа, чтобы описать кратко основы процесса электрохимического обнаружения, связанное с ВЭЖХ, чтобы исследовать применение этого метода к анализу пантрадол в плазме,

Δ^9 -ТНС в плазме.

Принципы ВЭЖХ с электрохимическим СВЯЗАННЫХ ОБНАРУЖЕНИЯ

В ВЭЖХ с электрохимическим детектированием (рисунок 1), материал элюируют из хроматографической колонки реагирует на поверхности электрода при контролируемом потенциале условиях, и ток, который вытекает из чистого обмена электронов контролируется как функция времени (6). Поскольку количество материала превращает по электрохимической реакции пропорционально мгновенному сгущению, ток будет напрямую связан с количеством соединения, элюированным в качестве функции времени. Если хроматографические Условия тщательно контролируют, то амперометрическое обнаружение является достаточно точным, с широким линейным диапазоном, как правило, 10⁴, и количественные данные могут быть получены на уровне помех для многих соединений. Пределы обнаружения вплоть до 1 мкг или менее достижимы в некоторых случаях.

В дополнение к чрезвычайно чувствительны, электрохимический детектор является селективным в том, что только соединений, содержащих электрохимически окисляемого или восстанавливаемого функциональную группу, могут быть обнаружены (6). Кроме того, эти соединения должны быть Электроактивными при данном потенциале, к которому установлен детектор. В то время как эти функции представляют собой как преимущество, так и недостаток, они часто объединяются, чтобы сделать пробоподготовки относительно простого дела.

С прямым преобразованием химического сигнала в электрический сигнал, электронная аппаратура электрохимического обнаружения, следовательно, недорого и надежно. Ячейки детектора хорошо подходит для ВЭЖХ-анализа, поскольку она имеет чрезвычайно низкий мертвый объем. Из-за природы электрохимического обнаружения, то

ВЭЖХ ДЛЯ NANTRADOL

чувствительность пмоль	
выборочный	
Бюджетный	
Может сочетаться с высокоэффективной жидкостной хроматографии	
Используется при анализе:	
фенолы ароматические	Аскорбиновая кислота мочево
амины катехоламины	кислоты натуральные продукты
антиоксиданты	фармацевтические препараты

Рисунок 1. Свойства и применение электрохимического обнаружения.

хроматографические системы наиболее перспективные для этого типа детектора являются ионообменные и обращенно-фазовые системами, в которых могут быть использованы водной или водно-спиртовой смеси растворителей, содержащие несколько растворенных ионов (6).

Целый ряд эндогенных соединений, лекарственных препаратов и лекарственных средств метаболизируемые Lites были изучены с помощью ВЭЖХ с электрохимическим детектированием. Примеры включают фенолы (7), ароматические амины (6,8), catechola- мин (9,10,11), аскорбиновую кислоту (12) и мочево

кислоты (13). Этот анализ методические га нашли широкое применение в области нейрохимического анализа, будучи использовано для одновременного определения, в крысах и мышей мозге, уровни нанограмм из катехоламинергических и серотонинергических нейромедиаторов, такие как норадреналин, дора- шахты, триптофан и серотонин (14 , 15).

ПРИМЕНЕНИЕ ВЭЖХ и электрохимическим детектированием К NANTRADOL

Nantradol (рисунок 2) производит обезболивающую активность 2 до 7 раз больше, чем морфин через диапазон обезболивание тестов традиционализма ют реагирующих только наркотические анальгетики агониста, но не связывается с рецептором опиатного *в пробирке (16)*. В то время как nantradol обладает определенной особенностью каннабиноидов фармакологии, он имеет ряд структурных особенностей, которые отличают его от каннабиноидов-включая отсутствия пиранового кислорода, наличие слабо основного азота и введение кислородсодержащего помощника цепи , *в естественных условиях nantradol быстро* деацетируются к свободному фенолу, desacetylnantradol, которая является единственной формой препарата обнаруживаемого

в плазме (рисунок 2). Функция фенола, который совместно с THC, делает возможным электрохимическое обнаружение desacetylnantradol.



Рисунок 2. Структура nantradol (CP-44001), мощное неопиоидное болеутоляющее, и ее деацетилирования к desacetylnantradol (CP-44041).

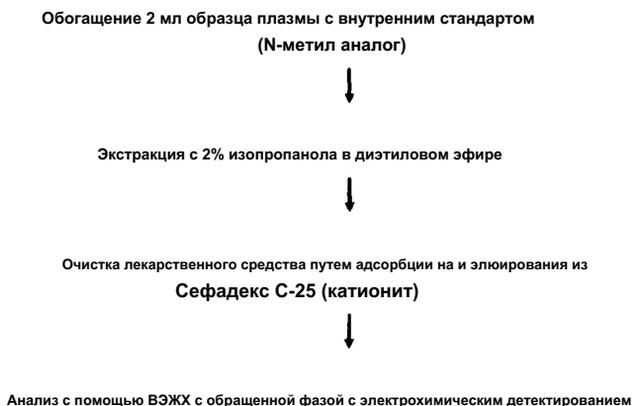


Рисунок 3. Поток Схема с изложением процедуры для анализа desacetylnantradol в плазме.

Процедура анализа (фигура 3) начинается с укреплением образца плазмы 2 мл с 20 нг / мл внутреннего стандарта, то N-метил аналог desacetylnantradol (5,17). Добыча стандарта наркотиков и внутреннего достигаются с помощью 2% изопропанола в диэтиловом эфире. Экстракт добавляют к 2 мл метанола и концентрируют в атмосфере азота до конечного объема 1 мл. Экстрагируют лекарственное средство и внутренний стандарт, затем адсорбируют на катионообменной Sepha- DEX C-25 (добавленного в 1 мл в виде 30% суспензии в воде) в, собирают центрифугированием и супернатант отбрасывали. После воды

мыть, то desacetylnantradol и внутренний стандарт элюируют из Sephadex C-25 с 1 мл ацетонитрила: 0,05 М КН₂ ПО₄ (1: 1). Анализ достигается путем инъекции 50 мкл раствора для анализа на обращенно-фазовой ВЭЖХ Waters μBondapak фенильном колонке с элюированием системой растворителей ацетонитрил: 0,05 М КН₂ ПО₄ (1: 1) при скорости потока 2,0 мл / мин. Два типичных ВЭЖХ-хроматограммы анализа desacetylnantradol, выделенного из плазмы крови человека образцы на укрепленный с 20 нг / мл внутреннего стандарта и 5 или 20 нг / мл лекарственного средства показаны на рисунке 4. Неизвестных уровней лекарственного средства сначала выражается как отношение высоты пика, соответствующего desacetylnantradol по сравнению с, что в течение 20 мг / мл внутреннего стандарта. Концентрации затем определяются из соответствующим чешки построен стандартной кривой (рисунок 5), в котором известные количества лекарственного средства были добавлены к плазме. Хорошая линейность получаются и precision в анализе составляет около 10% относительного стандартного отклонения на основе средних нормализованных отношений высоты пика в пределах серии анализа. Чувствительность анализа позволяет анализировать desacetylnantradol в плазме до уровня примерно 5 нг / мл.

ПРИМЕНЕНИЕ ВЭЖХ / электрохимическим детектированием ТНС

Δ⁹-ТНС

В свете общего присутствия C-1 фенол в desacetylnantradol и Δ⁹-ТНС, мы провели некоторые начальные эксперименты предназначено для изучения возможности анализа ТНС - с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимическим детектированием. ВЭЖХ-система для анализа nantradol была адаптирована к Δ⁹-ТНС с использованием тех же ПЕРЕСТАНОВОК сведущий-фазовая колонка и детектор потенциал и, вероятно, не оптимальный. Менее полярный растворитель 55:45 ацетонитрил: 0,05 М КН₂ ПО₄ при скорости потока 2,0 мл / мин была использована. В этой системе ТНС и 11- гидрокси Δ⁹-тетрагидроканнабинол (11-OH - ТНС), легко изоляционные номинальный друг от друга (фигура 6), элюируя в 16,6 мл и 8,2 мл, повторно соответственно. Как мало, как 0,7 нг чистого Δ⁹-ТНС впрыскивают на колонку можно обнаружить в этой системе. Когда различные количества чистого ТНС, от 0, Δ⁹- до 154 нг, впрыскивают на колонку описывать возникающую кривой пика отклика линейна во всем диапазоне с коэффициентом корреляции 0,999 и точностью 6,3% относительного стандартного отклонения на основе средняя нормированная высот пиков (фигура 7).

В предварительных попытках определить Δ⁹-Уровни ТНС в плазме, собака плазмы (2 мл) трижды экстрагируют гексаном (3 мл). Объединенные экстракты промывали гексаном 3 раза с 3% КОН в

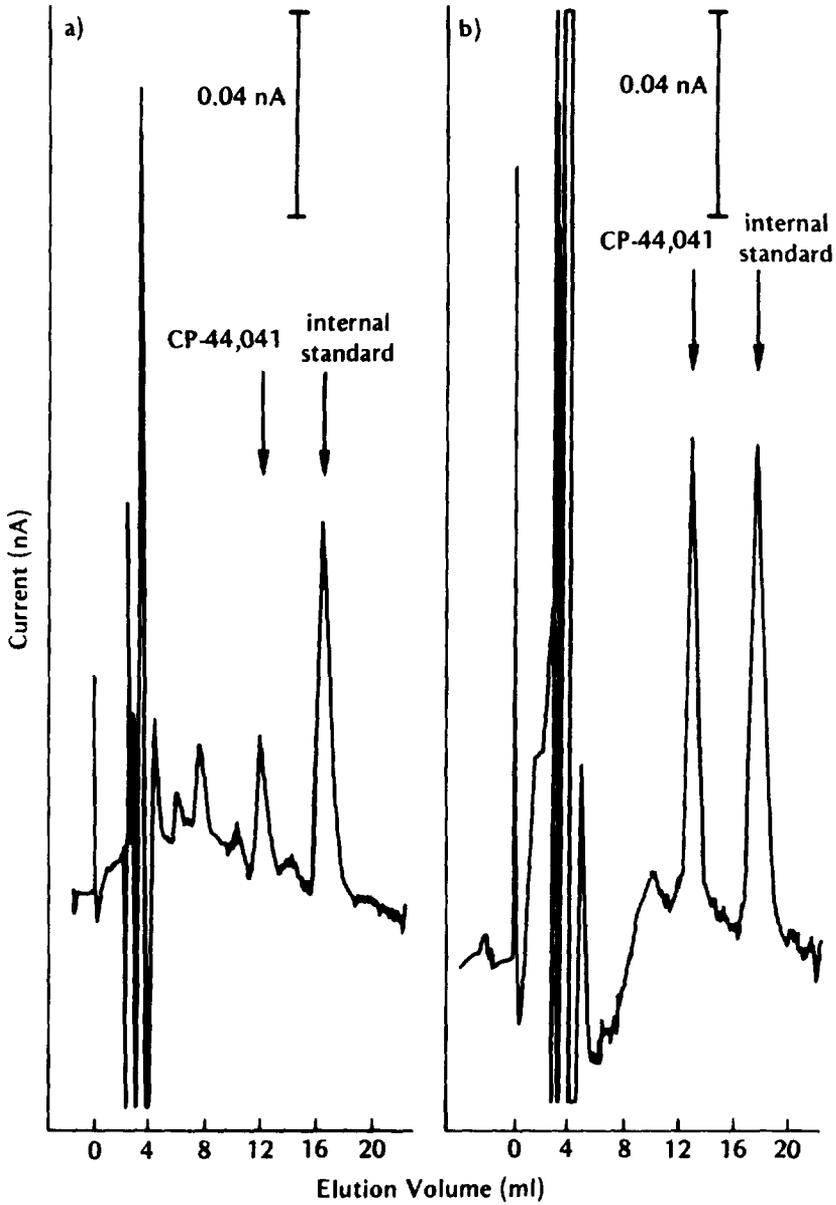


Рисунок 4. ВЭЖХ-хроматограммы desacetylnatradol и внутреннего стандарта изолированных из плазмы крови человека, укрепленные с 20 нг / мл N-метил- и desacetylnatradol либо а) 5 нг / мл или б) 20 нг / мл desacetylnatradol.

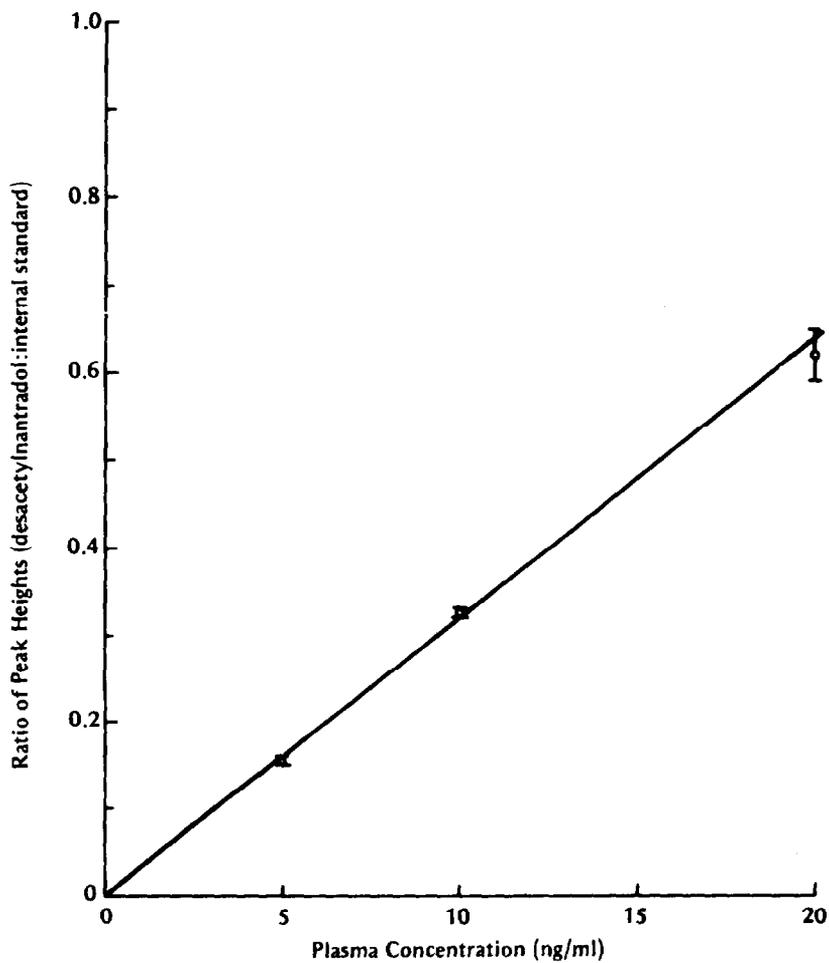


Рисунок 5. Стандартные кривой, иллюстрирующие изменения в соотношении высот пиков из desacetylnantradol против внутреннего стандарта в зависимости от того или иного Концентрации desacetylnantradol в укрепленной человеческой плазме.

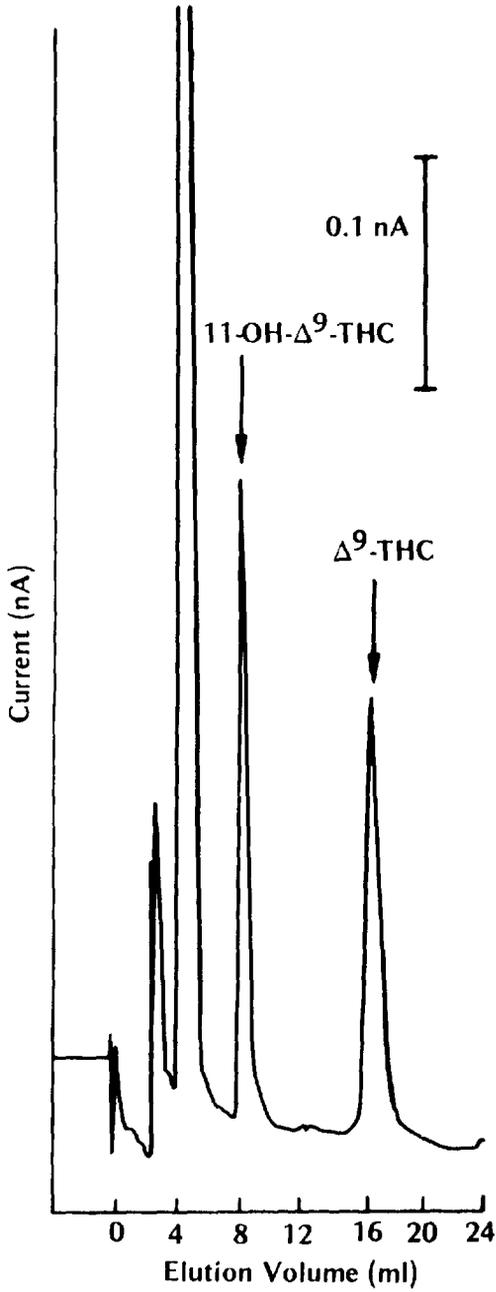


Рисунок 6. хроматограмма высокоэффективной жидкостной хроматографии, иллюстрирующая обнаружение и разделение Δ^9 -THC и 11-OH- Δ^9 -THC.

Δ^9 -

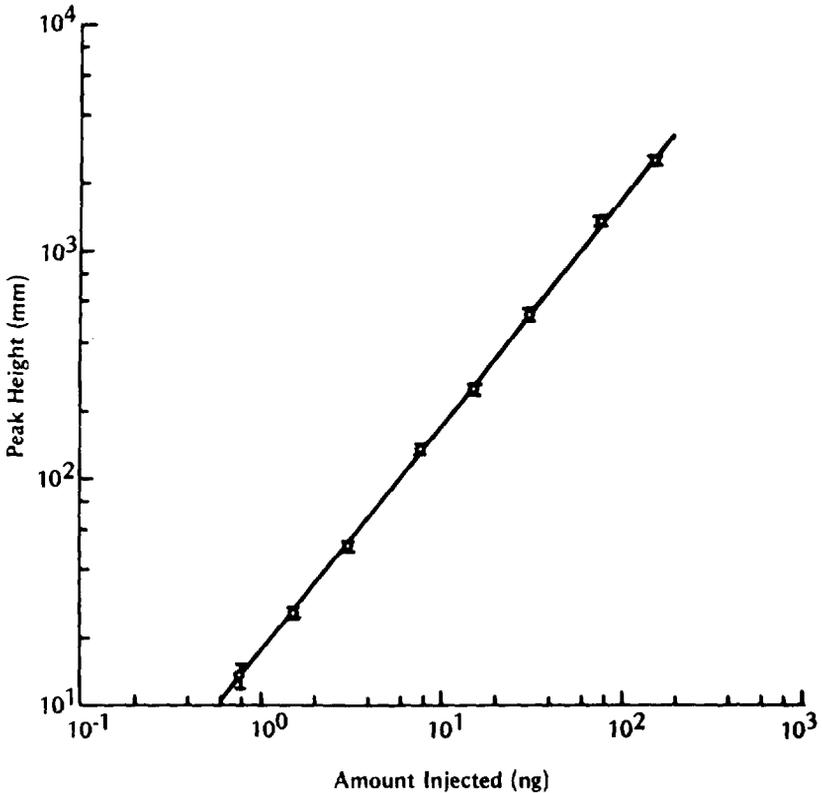


Рисунок 7. Демонстрация линейности пика отклика по высоте

Δ^9 -THC против количество вводили в ВЭЖХ, используя электрохимическое обнаружение.

20% водный метанол. Объединенные щелочные экстракты подкисл ют концентрированной HCl, разбавляют водой и снова экстрагируют гексаном. Этот гексан экстракт затем выпаривали в атмосфере азота и остаток повторно растворяли в 200 μ l из ВЭЖХ растворителя. 100 μ l раствора затем вводили в колонку. ВЭЖХ про- файлы, полученные из пустой собачьей плазмы и плазмы собак укрепленные с 20 нг / мл

Δ^9 -THC показаны на рисунке 8. Среднее восстановление

Δ^9 -THC в трех образцах, составило $38\% \pm 2\%$. На основании этих результатов, предел обнаружения для определения плазменного

эта процедура составляет примерно 5 нг / мл. Δ^9 -THC по

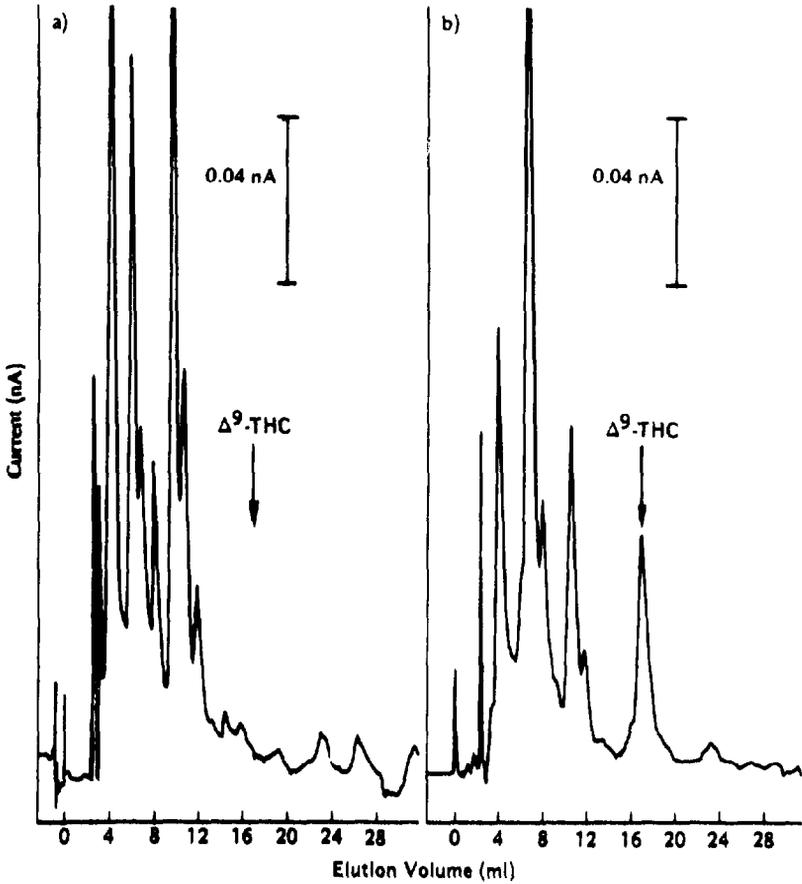


Рисунок 8. ВЭЖХ-хроматограммы Δ^9 -THC выделены из) пустой плазмы собаки и б) собака плазмы укреплённые с 20 нг / мл Δ^9 -THC.

ВЫВОД

ВЭЖХ с электрохимическим детектированием часто может обеспечить чувствительность и селективность, необходимую для практических аналитических процедур, как и в случае pantadol. Было показано, что здесь Thie методология способна обнаруживать низкие уровни нанограммовые из Δ^9 -THC

в плазме, обеспечивая при этом разделение Δ^9 -THC из его основных метаболит 11-OH- Δ^9 -THC. Таким образом, оказывается, что, в то время как дальнейшее де-

velopment этого метода необходим для рутинного анализа плазмы для

Δ^9 -THC и его метаболиты, ВЭЖА с электрохимическим обнаружением Тионом является целесообразным подходом к анализу нанограммовых концентраций

Δ^9 -THC.

БЛАГОДАРНОСТЬ

Доктор Хью М. McIlhenny и г-н Франк Р. Мошер внесли полезные предложения в разработке анализа для Δ^9 -THC и помог разработать

Анализ на nantradol. Д-р М. Росс Джонсон синтезирован и проанализирован pantradol, desacetylnantradol и N-метил-desacetylnantradol, и д-р Карл Hausmeyer доступен электрохимический детектор на ранних стадиях развития pantradol анализа. Онный институт На- по борьбе со злоупотреблением наркотиками (NIDA) при условии

Δ^9 -THC и 11-

ой- Δ^9 -THC.

РЕКОМЕНДАЦИИ

1. ЭР Гаррет и СА Хант. Разделение и анализ Δ^9 -тетрагидроканнабинол в биологических жидкостях методом жидкостной хроматографии под высоким давлением и ГЖХ. *J. Pharm. Sci.*, **66**, 20-26 (1977).
2. JL Валентина, PJ Bryant, PL Gutshall, OHM Gan, PD Lovegreen, ED Томпсон и HC Нью. жидкости под высоким давлением хромато-масс-спектрометрического определение метрики Δ^9 -тетрагидроканнабинола в человеческой плазме после курение марихуаны. *J. Pharmaceut. Sci.*, **66**, 1263-1266 (1977).
3. PL Williams, AC Моффат и LJ King. В сочетании с высоким давлением жидкость хроматография и радиоиммуноанализ метод для количественного определения тетрагидроканнабинола и некоторые из его Δ^9 -метаболитов в плазме крови человека. *J. Chromatog.*, **155**, 273-283 (1978).
4. РТ Киссинджер, С. Refshauge, P. Dreiling и Р. Адамс. Электрохимический детектор для жидкостной хроматографии с чувствительностью пикограммовой. *Анальный. Lett.*, **6**, 465- 477 (1973).
5. RW мачты, HM McIlhenny, Г.М. Милна, и г-н Джонсон. Поведенческие эффекты и фармакокинетика pantradol гидрохлорид, мощный, каннабиноиды, связанные с анальгетиком. *Фармаколог.*, **21**, 270 (1979).
6. РТ Киссинджер. Амперометрические и кулонометрические детекторы для высокоэффективной жидкостной хроматографии. *Анальный. Chem.*, **49**, 447A-466A (1977).
7. Р. М. Riggan, Л. Д. Рай, Р. Л. Алкорн, и РТ Киссинджер. Определение фено- L-IC симпатических стимуляторов в фармацевтических препаратах с помощью жидкостной хроматографии с электрохимическим детектированием. *Анальный. Lett.*, **7**, 791-798 (1974).
8. Л. Стернсон и WJ Dewitte. Высокого давления жидкостной хроматографии анализе изомерных аминифенолов с электрохимическим детектированием. *J. Chromatog.*, **138**, 229-231 (1977).
9. RM Riggan, RL Alcorn и РТ Киссинджер. Метод жидкостной хроматографии для мониторинга терапевтических концентраций L-допа и дофамина в сыворотке крови. *Clin. Chem.*, **22**, 782-784 (1976).

10. PT Киссинджер, RM Rigglin, RL Alcorn и LD Pay. Оценка catechola- мин в моче с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимической обнаруженной кала. *Biochem. Med.*, 13, 299-306 (1975).
11. С. Refshaug, PT Киссинджер, P. Dreiling, CL Blank, P. Фримен и Р. Адамс. Новая высокоэффективная жидкостная хроматографический анализ катехоламинов мозга. *Life Sciences*, 14, 311-322 (1974).
12. LA Pachla и PT Киссинджер. Определение аскорбиновой кислоты в пищевых продуктах, фармацевтических препаратах и жидкостях организма с помощью жидкостной хроматографии с электрохимической обнаруженной кала. *Анальный. Стет.*, 48, 364-367 (1976).
13. LA Pachla и PT Киссинджер. Оценка сыворотки мочевого кислоты высокой реформ- ANCE жидкостной хроматографии с электрохимическим детектированием. *Clin. Хим. Acta*, 59, 309-312 (1975).
14. С. Сага и СЛ Бланк. Одновременное определение норадреналина, допамина и серотонина в ткани мозга с помощью жидкостной хроматографии высокого давления с электрохимическим детектированием. *Анальный. Хим. Acta*, 104, 29-45 (1979).
15. И.В. Меффорд и JD Varchas. Определение триптофана и метаболитов в головном мозге и шишковидной ткани крыс путем обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимическим детектированием. *J. Chromat.*, 181, 187-193 (1980).
16. Г. М. Милн, А. Вайсман, БК кЭ и МР Джонсон. CP-44001, Роман бензо (с) хинолином аналгетик. *Фармаколога*, 20, 243 (1978).
17. HM McIlhenny, RW мачты, М. Р. Джонсон и Г. М. Милна. Nantadol гидрохлорид: Фармакокинетика и поведенческие эффекты после острого и хронического лечения. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 219 (2), 363-369 (1981).

АВТОРЫ

Richard M. Shepherd и Джордж М. Милн ПФИИР Research Laboratories Гротон, штат Коннектикут. 06340

Радиоиммуноанализы для Cannabinoids

CE Кук, HH Seltzman, B.X. Schindler, CR Tallent, KM Chin и CG Pitt

Простота, чувствительность и специфичность radioimmun- oassay сделали его привлекательную процедуру из скопического анализа дельта-9-тетрагидроканнабинола (THC) в биологических жидкостях или тканях. Наличие близкородственных соединений, таких как метаболиты могут мешать результатам радиоиммуноанализа. Appropriate дизайн иммуногенов может уменьшить такое вмешательство. Эта работа была направлена на использование амиловой боковой цепи для связывания каннабиноидов соединений с белками с образованием иммуногены. Хотя сторона амиловой цепь метаболизируются до некоторой степени, метаболиты не являются количественно значимыми в большинстве случаев. 5'-карбокси-дельта-8-ТГК и 5'-карбокси-дельта-9-ТГК были связаны с бычьим сывороточным альбумином. Иммунизация кроликов полученных конъюгатов приводило к образованию антисыворотки с высокой селективностью по отношению к дельта-9-ТГК VS. его метаболита карбоновой кислоты, 11-нор-9-карбокси-дельта-9-ТГК. Дельта-8-THC RA- dioligands (4', 5'-третий и 5'-иод-125) могут быть использованы с этими антисыворотки для анализа дельта-9-ТГК в плазме. Чувствительность с меченого тритием материала составляет примерно 2,5 нг /

мл. 5'-оксо-11-нор-9-карбокси-дельта-8-ТГК использовали для получения иммуноген, который привел к депетion антисыворотки высоко специфичным для 11-нор-9-карбокси-дельта-9-ТГК. Эта анти-сыворотки и йод-125-5-иод-11-нор-9-карбокси-дельта-8-ТГК были использованы для разработки весьма специфического анализа для 11-нор-9- карбокси-дельта-9-ТГК в плазмы.

ВВЕДЕНИЕ

Основная предпосылка методов иммуноанализа является то, что меченый антиген будет взаимодействовать с специфическими антителами с образованием меченого комплекса антиген / антитело. В присутствии немеченого антигена

будет конкуренция за сайты связывания с антителом, там- за счет уменьшения количества комплекса, который маркирован. Для того, чтобы достичь полезный анализа, а затем, один должна быть в состоянии получить меченый антиген, чтобы генерировать специфические антитела, которые будут связываться с интерес соединением, а также разработать некоторые средства различения меченого комплекса от свободного меченого антигена ,

Для того, чтобы стимулировать образование антител, которые будут связываться SE- lectively небольшой молекулы, такие как тетрагидроканнабинол, молекула или гаптен сначала должна быть связана с большой молекулой, генер- союзницей белки (фигура 1). Эта концепция была продемонстрирована Штайнер много в землепользовании лет назад (1). Ландштайнер также показал, что поло- ние о связи имеет большое значение при определении селективности полученного антитела. Подгонка между антителом и антигеном, часто довольно хорошо, особенно в тех областях, которые повторно перемещаются от места прикрепления к белку. Тем не менее, поэтому введение ссылки ковалентной неизбежно приводит к изменению структурных характеристик молекулы. В результате чего антитела часто отражает это, будучи нечувствительны к изменениям вокруг поло- ции связи,

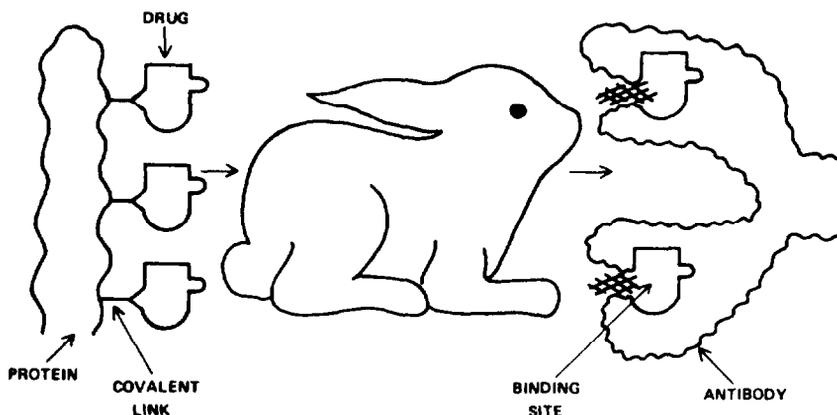


Рисунок 1. Получение антител к препарату. Лекарственное средство (гаптен компонент) ковалентно связано с большой молекулой, такие как белки, чтобы сформировать иммуноген. Инъекция этого в животных стимулирует образование антител. Связывающий участок

антитело вмещает гаптен, с некоторой неопределенностью вокруг области что соответствует точке связывания в иммуногене.

Так как в целом препарат и его метаболиты имеют много LAR Подобных структурных особенностей, метаболиты обычно будут Прин- дружком мешая участник в анализе RIA. Таким образом, при получении конъюгата для создания специфической антисыворотки, один старается избегать сайтов на лекарствах, которые являются метаболический реактивными, чтобы оставить их free'to связанное с влиянием на формирование селективных антител. Кроме того, один пытается избежать сокрытии структурные особенности, которые могут допускать развитие сильного сродства сайтов связывания. Кроме того, необходимо также рассмотреть вопрос о химии участвует и его трудности в связи с ожидаемой выгодой.

В настоящее время широко признано, что основные метаболические альтер- ations в молекуле THC происходят в 8- и 11-положениях. Гигиеническое droxylation может происходить в этих положениях, а окисление до 11- нор-9-карбоксите метаболитом является также основным путем. Метаболиты с участием боковой цепи амиловых также сообщались, но прибли- груша, что в количественном выражении они являются относительно незначительной, по крайней мере, у людей (2).

Неселективные антисыворотки также полезны, но наш интерес был в разработке анализов со спецификой для одного соединения. Специфичность анализа может быть увеличена с помощью таких методов, как диффе- ренциальных экстракции желаемого соединения или добавлений второго антитела связать мешающее вещество (3). Однако, эти методы работают лучше, если антисыворотки имеют хорошую избирательность, чтобы начать с. Поэтому мы решили исследовать иммуногены, образованного путем присоединения каннабиноидов фрагментов с белками через боковую цепь амиловых, так как это будет выполнить наше требование на расстоянии от основных сайтов обмена веществ.

Иммуноген СИНТЕЗ И антисыворотки дельта-9-ТГК

Для получения синтетического удобства наши первоначальные попытки имели дело с дельта-8-изомера THC. 5'-карбокси-дельта-8-ТГК обрабатывали N-гидроксисукцинимидом и дициклогексилкарбодиимидом с получением сложного эфира, который легко вступает в реакцию с бычьим сывороточным альбумином в смеси диоксана и бикарбоната натрия с получением желаемого впе- tynogen, содержащий около 33 остатков дельта-8-ТГК на молекулу альбумина бычьей сыворотки (4).

Это иммуноген вводили в кроликов с помощью модификации метода внутрикожной из Vaitukaitis и соавт. (4). Разумные анти- титров сывороточных были достигнуты в 7,5 недель после первой иммунизации против и, как мы уже сообщали ранее, в результате чего антисыворотка показала хорошую селективность по отношению к дельте-9-тетрагидроканнабинол против его Me- tabolites (4,5).

Поскольку антисыворотки получают из дельта-8-иммуногена показал, примерно в 2,5 раза больше сродство к дельта-8-ТНС, как для дельта-9- ТНС, оказалось, что, возможно, даже лучше, антисыворотка может быть достигнуто, начиная с дельта-9- 5'-карбоновая кислота гаптен. Де- хряков иммуногеном синтезировали, как и в случае дельта-8-соединения. Кроликов иммунизируют полученного конъюгата и антисыворотки, которые были способны связывать дельта-9-ТГК были получены (5). Как показано на рисунке 2, антисыворотка выставлены очень низкие кросс-ные реакции с 11-нор-9-карбоксии метаболита дельта-9-ТГК. Наблюдались несущественная перекрестная реакция с 11-гидроксии метаболит, но это соединение присутствует в очень низких концентрациях в крови после курения или внутривенного введения (6), так что кросс-реакция будет озабоченность только после перорального введения дельта-9-ТГК.

Аналитический протокол

Vortex смесь 100 μ Л плазмы с 400 μ л метанола

Дайте постоять, 5-10 мин; центрифуга; аликвоты

50 μ Л аликвоты + 400 μ Л буфера с радиолиганда (15000 имп)

+ 100 μ Л антисыворотки / буфер

Vortex смеси; инкубировать 4-24 ч при температуре 4 ° C

Добавить уголь / буфер (500 μ Л 1,58% суспензии)

Vortex смеси; инкубировать 20 мин при 4 ° C

Центрифуга 15 мин при 4 ° C; переливать; сосчитать.

Рисунок 2. Протокол для анализа дельта-9-ТГК или его метаболита карбоновой кислоты в плазмы.

радиолиганда

Обратимся теперь к рассмотрению радиолиганда. Тритий-1a- Beled радиоактивных лиганды имеют преимущество в целом лучше срок годности. Кроме того, они имеют сродство к антитела, по существу, равной немеченого соединения. С другой стороны, йод-125 имеет определенные преимущества по сравнению с тритием для использования в качестве радиоизотопа. Они включают в себя выше теоретическая удельная активность, устойчивость к закалке и легкость измерения. Размер атома йода,

однако, делает его введение в небольшую молекулу, такие как ТНС проблемы с точки зрения аффинности связывания. Прямая подстановка йода в такую молекулу часто ингибирует связывание с антителом и уменьшает сродство ниже того, что может дать полезный анализ. Тем не менее, прямое введение йода в 5'-положения ТНС - то есть в положение, которое было связано с про- Теип в иммуногене - может позволить нам воспользоваться вдвое чувствительности сродства антител к изменениям в положении связывания в иммуногене. Таким образом, 5'-йод-дельта-8-ТГК был подготовлен и представлен в реакции обмена с йодидом натрия йода-125. Эта процедура привела к йодсодержащих ТНС средней удельной активности, в пределах примерно от 8-40 Ки / ммоль (4-7).

АНАЛИЗ дельта-9-ТГК в плазме

Выше антисыворотки были использованы для разработки анализа для дельта-9- ТНС в плазме. Изначально меченный тритием дельта-8-ТГК специфического специфика в 60 Ки / ммоль (8) используют в качестве радиолиганда. Антисыворотки к дельте-9-ТГК был использован при начальном титре 1: 6000. Стандартные кривые показали практическую чувствительность 25 пг. (Мы определяем практическую чувствительности, как количество, которое уменьшает связывание радиолиганды на 10%. Это прагматическое определение, основанное на опыте. Пределы чувствительности на основе 2-й или 3-х стандартных отклонений от пустых трубок будут намного ниже.)

Для анализа плазмы мы использовали процедуру, показанную на рисунке 2. Плазменный смешивают с метанолом (9), и аликвоты полученной надосадочной жидкости инкубируют с меченым лигандом и антисыворотками, должны прибыть в течение ночи при 4 ° С. Разделение осуществляется путем добавления суспензии угля в буфере и после центрифугирования сверх-плавающих отсчитываются.

В этих условиях нашего практический предел чувствительности составлял 2,5 нг / мл либо с радиолиганды. Когда тритий радиолиганда использовали, контрольные образцы на 8 нг / мл показали внутри-анализа CV 5,9% и между-анализ CV 6,4%. Для 30 нг / мл контролирует эти значения были 6,0 и 5,5%, соответственно. Дисперсии (10) основаны на 28 анализов и 4 пробирки были проанализированы на образец. Аналогичные результаты были получены с йодированной лиганда, но с меньшим количеством многих анализов.

Теперь мы использовали оба этих лиганды в анализе для тетрагидроканнабинола из плазмы. Благодаря любезности д-ра Джона Мерритт, Университет Северной Каролины школы медицины, мы получили некоторые образцы из испытуемых вводили дельта-9-ТГК и

анализировали их с использованием обоих лигандов. Чувствительность в каждом случае прибли- reared на уровне 2,5 нг / мл. Рисунок 3 показывает данные из одного суб-JECT анализировали с использованием обоих лигандов. Результаты появляются сопоставимы и этот вывод подтверждается на фиг.4, которая показывает результаты анализа всех 62 образцов, в которых либо образцы дали результаты выше 2,5 нг / мл. Используя тритий в качестве ординаты, мы нашли уравнение регрессий SION с наклоном 1,06 и 0,72 перехвата нг / мл. Коэффициент корреляции 0,9907.

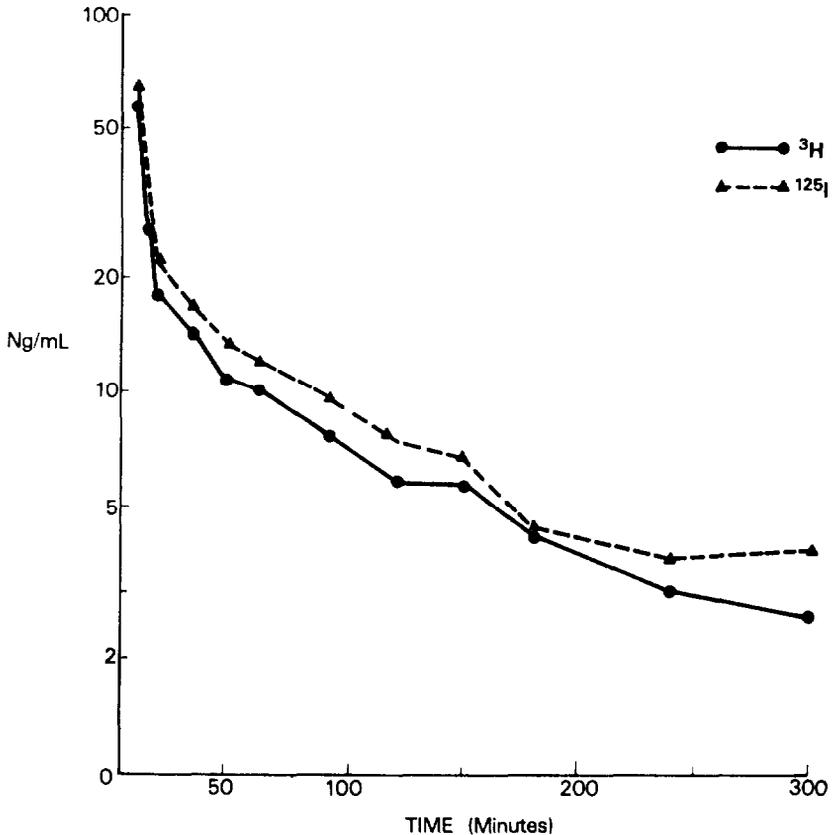


Рисунок 3. Плазменная кривой от субъекта вводят дельта-9-ТГК. Методология фигуры 2 и либо трития или иод-125-замещенных радиолиганды были использованы.

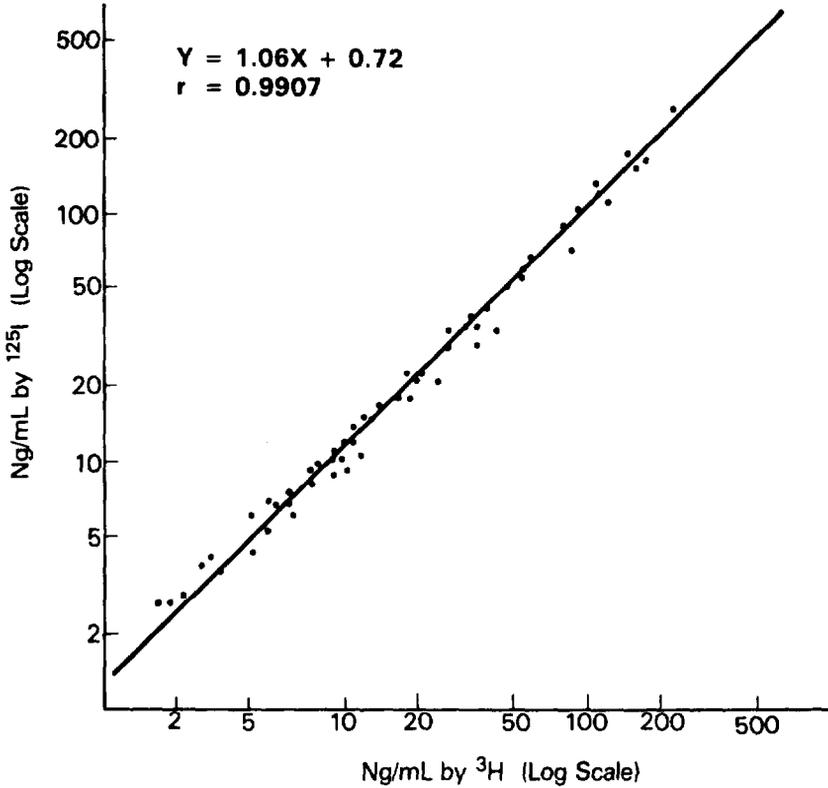


Рисунок 4. Сопоставление результатов анализа на 62 образцах плазмы для дельта-9-ТГК либо с тритием или йод-125-меченой радиолигандой.

РАЗРАБОТКА КОНКРЕТНЫХ RIA в течение 11-нор-9-карбокси дельта-9-ТГК

Продемонстрировав полезность нашего подхода к анализу дельта-9-ТНС, мы затем намеревался применить те же принципы к анализу различных метаболитов дельта-9-ТГК. Л L-нор-9-carbox- илова кислота (или 11-овая кислота) была показана, что основной метаболит в плазме и была выбрана в качестве следующей мишени для развития иммуноанализа. Мы не хотели использовать 5'-карбокси-аналог этого соединения в качестве гаптена подготовить иммуноген, так как это представило возможность получения смеси 5- и 11-связанные конъюгат. Поэтому необходимо было найти способ связывания через 5'-положении, которое не связано с

карбоновая кислота. Альдегидный фрагмент, казался бы полезными в этом отношении, так как он будет реагировать со свободными аминогруппами белка, такими как альбумин бычьей сыворотки, с образованием имина, а второе вещества может быть уменьшен с цианоборгидридом натрия с образованием стабильной алкиламиногруппой связи (фигура 5). Синтез этого соединения, однако, оказались не тривиальный вопрос (11).

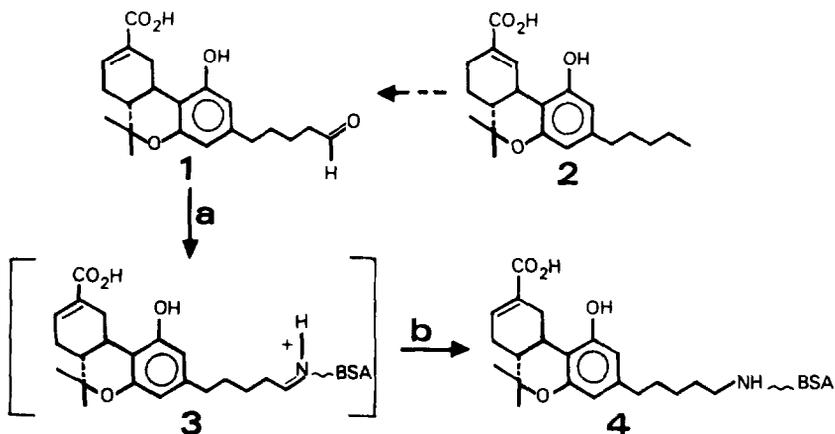


Рисунок 5. Общий путь к иммуногену, содержащему 11-нор-9-карбоксо-дельта-8-ТНС. Реагенты: а) бычьего сывороточного альбумина (BSA); б) цианоборгидрида натрия.

Опять же, по тем же причинам, в серии ТНС, соединение дельта-8- был выбран для синтетической работы. В процедуре окончательно принят (рисунок 6), 5'-бром-дельта-8-ТГК обрабатывают тетра- ацетата аммония метил, чтобы ввести 5'-ацетокси группу. Группа фенольных была защищена в качестве своего трет-бутилдиметилсилил эфира, и группа ацетокси селективно удалена обработкой с lith- гидрида алюминия иум с получением 5'-спирт, который может быть окислен с пиридинийхлорхроматом к 5'-оксо-соединения. Альдегидная группа была затем защищают в виде ацетала этилена. С-11 был следующим превращен в альдегид с помощью диоксида селена. Окисление альдегида с использованием цианида натрия и диоксид марганца в метаноле приводило к метилового эфира 9-карбоновой кислоты. Когда этот сложный эфир подвергали омылению с помощью гидроксида калия и этанола, как сложный эфир, и силильные защитные группы отщепли. Затем она оставалась только для удаления этилена ацетали, чтобы генерировать желаемое соединение де.

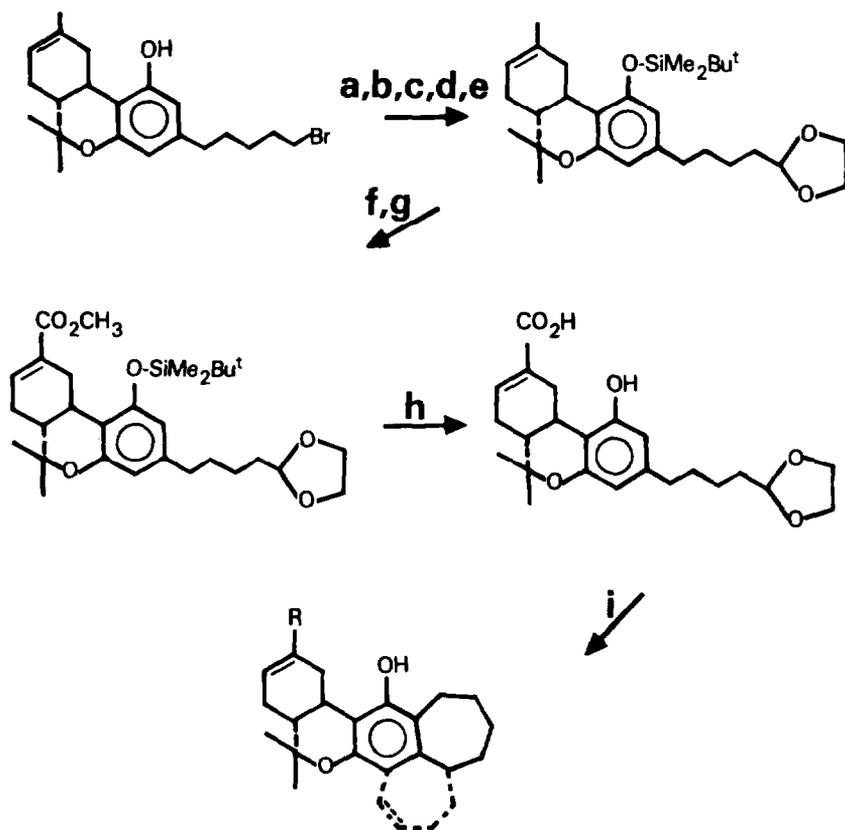


Рисунок 6. Синтез этилена ацетала 5'-оксо-11-нор-9-карбоксии-дельта-8-ТГК. Реагенты: а) тетраметиламмония ацетат; б) трет-бутилдиметилхлорсилан; в) литийалюминийгидрид; г) пиридинхлорхромата; е) этиленгликоль, толуолсульфокислота; е) диоксид селена; г) цианид натрия, уксусная кислота, метанол, двуокись марганца; ч) гидроксида калия; я) толуолсульфоновая кислота, ацетон.

Тесты с использованием модельной системы с метильной группой в С-9 показано, что в стандартных кислотных условия, используемых для гидролиза ацеталей, промежуточный альдегид, который быстро образовавшееся циклизуют взаимодействием с реактивной фенольного кольца. Поэтому было необходимо, чтобы отключить фенольного кольца с образованием ацетата фенольной (фигура 7). Это соединение может быть затем гидролизован в кислотных условиях с получением 5'-оксо-соединение с ацетатной группы все еще присутствует. были найдены Mild основные гидролитические условия для отщепления

ацетат. Однако в условиях, используемых для соединения с белком, было показано, что внутренняя циклизация была конкурентоспособна с муфтой с белком. Кроме того, гидролизует альдегид был неустойчивым и циклизует либо при стоянии или попытке очистки с помощью препаративной тонкослойной хроматографии.

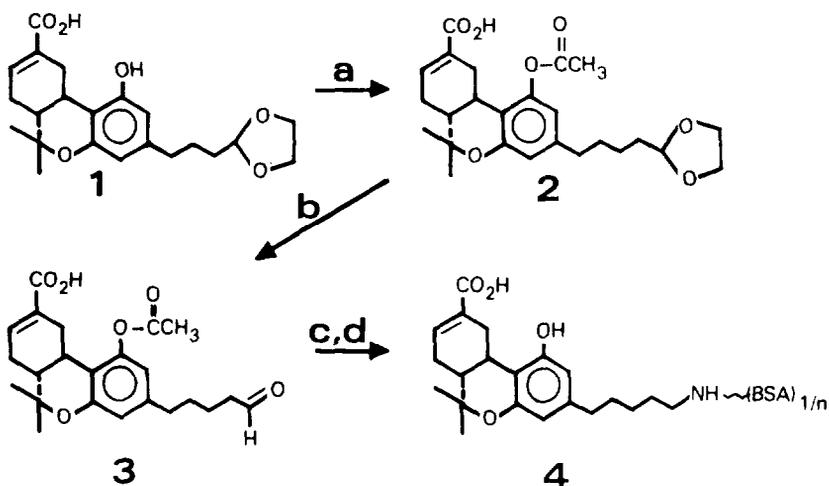


Рисунок 7. Синтез иммугена, содержащего 11-нор-9-карбокси-дельта-8-ТГК. Реагенты: а) уксусный ангидрид, пиридин; б) толуолсульфоновая кислота, ацетон; в) крупного рогатого скота сывороточный альбумин, метанол; г) цианоборгидрида натрия.

Ацетат фенольной поэтому давали реагировать с бычьим сывороточным альбумином в чистом безводном метаноле в присутствии натрия суапного-гидрид (12) и полученный конъюгат был dea- cetylated путем перемешивания с водным раствором метанола и натрия bicarbon- ели. Дифференциальный измерения поглощения ультрафиолетового были затем использованы для оценки минимального включения 11 гаптен остатков в молекуле белка. Кроликов иммунизируют с этим сопряженной ворот. Отличный титр антисыворотки был получен 4 месяцев после начальной иммунизации.

Для радиолиганда, метиловый эфир 5'-иод-11-нор-9-карбокси-дельта-8-ТНС был превращен в свободную кислоту путем обработки с три- метилсилил иодида с последующим гидролизом с водой. Обмен полученной 5'-iodocarboxylic кислоты с йодидом натрия йода-125 привело к меченого материала (рисунок 8) с удельной активностью приблизительно 7,5 Ки / ммоль. С помощью этого йодированной радиолиганда затем мы исследовались перекрестные реакции анти-сыворотки, которая была использована в титре AP-

проксимальном 1: 20000 начального разбавления. Как показано на рисунке 9, 11-нор-9-карбокси-дельта-9-ТГК смещена этот радиолганда в диапазоне 20-5000 пг. Практическая чувствительность была между 20 и 50 пг. Карбоновой кислоты в дельта-9-ТГК серии выставлены лишь немного большее сродство к антителу, чем сделал Производная TIVE 5'-иод-дельта-8. 11-гидрокси-дельта-9-ТГК и дельта-9-ТГК сам показал очень простым низкие перекрестные реакции с менее чем 0,1% сродство 9-карбокси-соединения. Он по-прежнему остается продемонстрировать, что антисыворотка будет не сильно перекрестно реагирует с очень полярными кислотами, которые также сформированы в виде метаболитов ТКА, но на основе результатов на сегодняшний день представляется, что это чрезвычайно селективные антисыворотки.

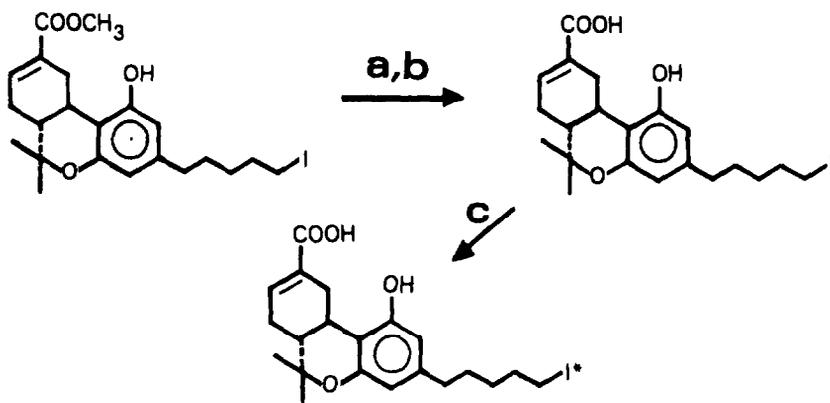


Рисунок 8. Синтез радиолганда для анализа 11-нор-9-карбокси-дельта-9-ТГК.

Реагенты: а) trimethyliodosilane, вода; б) йода-125-Nal, ацетон.

АНАЛИЗ 11-нор-9-карбокси-дельта-9-ТГК в плазме

Мы использовали эти антисыворотки и радиолганда в анализе ряда образцов плазмы, предоставленных нам благодаря любезности г Оуэнса и д-р McVay. Условия анализа были такими же, как и для дельта-9-ТГК. На рисунке 10 показаны результаты для одного субъекта, который ПЕРЕУСТАНОВКИ seived THC курением. Результаты этого анализа в Excel-одолжил качественном согласии с данными, полученными с помощью стены и cowork-ERS (2). Сам THC быстро возрастает до максимума после прекращения курения, а затем быстро падает. Концентрация метаболита автомобиль- карбоновых кислот повышается довольно быстро, достигая максимум на отметке 20-40 минут, а затем снижается более медленными темпами. Почти идентичные результаты наблюдались во втором предмете.

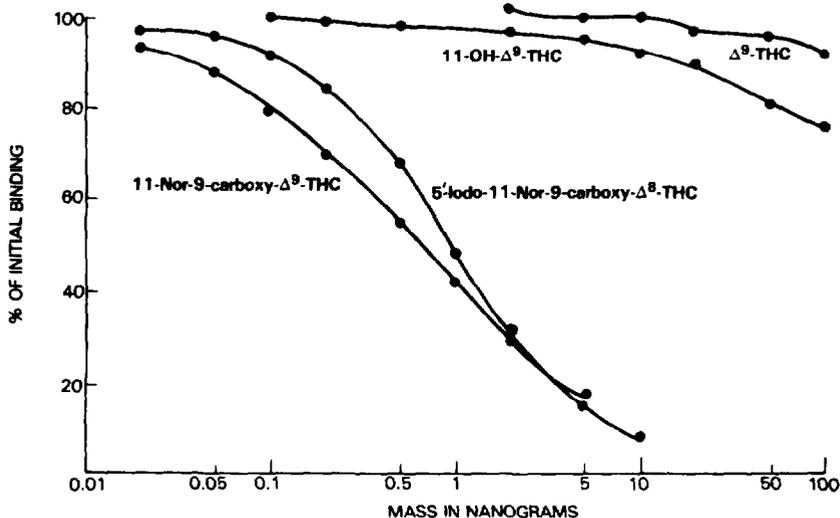


Рисунок 9. Объем кривые для дельта-9-ТГК, метаболиты и иод соединения. Антисыворотка была создана до 11-нор-9-карбоксо-дельта-8-ТГК иммуногена; меченый лиганд был иод-125-5'-иод-11-нор-9-карбоксо-дельта-8-ТГК.

Выводы

Эти исследования показали, что связывание молекул с каннабиноидами белка через 5'-положение цепи приводят боков амиловых к образованию селективной антисыворотки. Сыворотки разработан таким образом, могут быть использованы для анализа образцов плазмы как для дельта-9-ТГК и 11-нор-9-карбоксо-дельта-9-ТГК, основной плазмы метаболита. Кроме того, в сочетании с этими антисыворотки, использование 5'-иод радиолиганда было показано, чтобы быть как практичным и удобным. Как мы уже отмечали, общая концепция введения йода в точке сцепления подхо- груши, чтобы быть одним, которые должны иметь широкое применение в работе радиоиммуноанализа (5). Хотя результаты с 11-нор-9-карбоксо-дельта-9-ТГК анализа в этот момент несколько предварительно и метод требует дальнейшего развития, это насколько нам известно, первым сообщил пример весьма специфического радиоиммуноанализа для этого метаболита в плазме. Мы сейчас в процес- ESS применения этих общих концепций к получению антисыворотки для 11-гидрокси-дельта-9-ТГК.

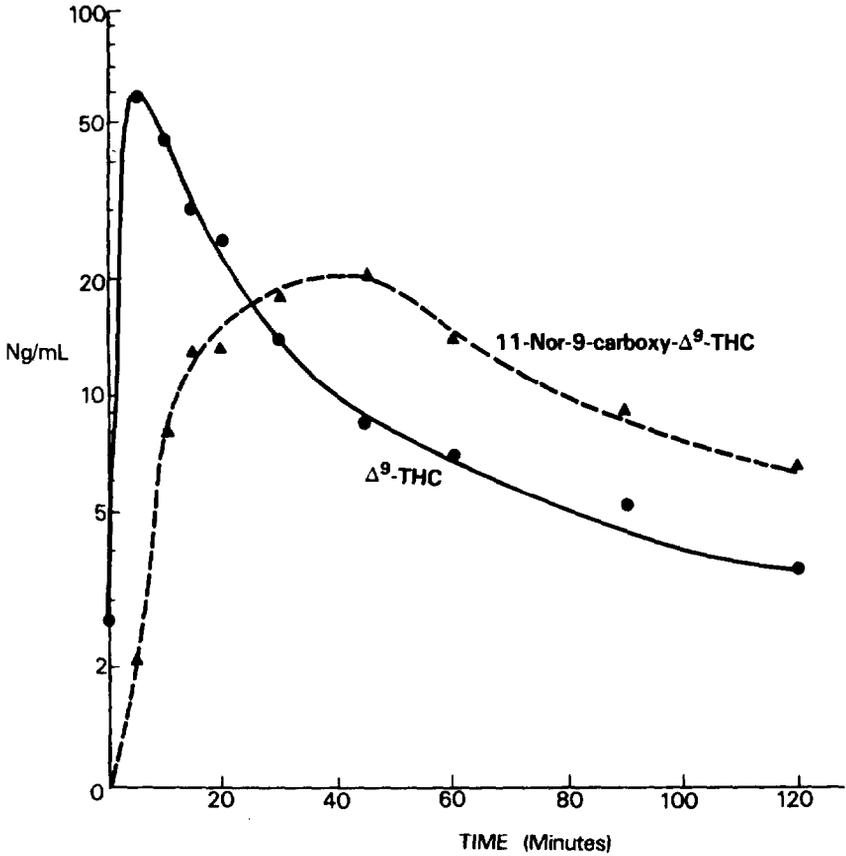


Рисунок 10. Анализ дельта-9-ТГК и 11-нор-9-карбокси-дельта-9-ТГК в моче кто курил одну 9 мг ТНС сигарету.

БЛАГОДАРНОСТЬ

Д-р Роберт Willette первоначально предложил синтез 5^1 - иод радиолиганды к нам. Мы также признаем, полезное обсуждение г-н Майк Оуэнс и д-р Артур McBay. Г-н Оуэнс предложил включающую процедуру экстракции метанола в наш анализ и как г-н Оуэнс и д-р McBay поощряли наше разви тия йодированной радиолиганды.

РЕКОМЕНДАЦИИ

1. К. Ландштайнер. *Специфичность серологических реакций*. Dover Press, Inc., New Йорк (1962).
2. ME Wall, DR рассола, JT Burseу и Д. Розенталя. Обнаружение и количественное ние тетрагидроканнабинола в физиологических жидкостях. В JA Винсон (ред.), *Анализ каннабиноидов в физиологических жидкостях*, ACS Symposium Series 98, Am. Химреагент Soc., Вашингтон, округ Колумбия, 39-57 (1979).
3. JJ Пратт, М. Woldring, P. Boonman, B. Bosman. Специфичность анализов.
III. Использование двух антисыворотки различной специфичности для повышения специфичности стероидного иммуноанализа. *Евро. J. Nucl. Med.* 4, 171-177 (1979).
4. СЕ Кук, ML Хоуз, EW Amerson, CG Питт и DL Williams, Radioim- munoassays дельта-9-тетрагидроканнабинола. В RE Willette (ред.), *Sappabin- O1D Анализы у людей*, Национальный институт по борьбе со злоупотреблением наркотическими исследованиями Монография 7-й серии, SUPT. из Docs., США правительственных служб. Распечатать. Выкл., Вашингтон, округ Колумбия, 15-27 (1976).
6. СЕ Кук. Радиоиммунологическая каннабиноидных соединений. В JA Винсон (ред.), *Анализ каннабиноидов в физиологических жидкостях*, ACS Symposium Series 98, Am. Химреагент С.м., Вашингтон, округ Колумбия, 137-154 (1979).
6. СЕ Кук, ML Хоуз, EW Amerson, CG Питт, DL Williams и RE виль- Летте. Тетрагидроканнабинол (THC) радиоиммуноанализ: Иммуноген и новый йод-125-радиолиганда на основе 5'-замещенного-дельта-8-ТГК. *Pharmacologist* 18, 291 (1976).
7. CG Pitt, HH Seltzman, SR Setzer и DL Williams. Получение 5'-йод-Йод-L25-дельта-8-ТГК; Радиолиганда для радиоиммуноанализа cannabinooids. *J. Этикетка. Комп. Radiopharm.*, 17, 681 (1979).
8. CG Питт, PT Hobbs, H. Schran, СЕ шпагат, младший и DLM Williams. Син- тезис дейтерий, углерод-14 и без носителя меченного трития каннабиноиды. *J. Этикетка. Сопр.*, 11, 551-575 (1975).
9. JD Тил, JM Кло, LJ Кинг, В. Маркс, П. Л. Уильямс, и АС Мофпат. Заболеваемость каннабиноидов в смертельно травмированных водителей: расследование ra- dioimmunoassay и жидкостной хроматографии высокого давления. *J. Forens. Sci. Soc.* 17, 177-183 (1977).
10. Д. Rodbard. Статистический контроль качества и процедура обработки даты для radioim- munoassays и иммунорадиометрических анализов. *Clin. Chem.*, 20, 1255-1270 (1974).
11. HH Seltzman, CG Питт, DL Williams, и СЕ шпагат. Синтез гаптеном для радиоиммуноанализа 9-карбоксии-11-нор-дельта-9-ТГК. Тридцать первая Юго наличия региональной встречи Американского химического общества, аннотация № 249 (1979).
12. Cf.R. Мюллер, А. Шойера, Х. Гердес и К.-О Mosebach. Direkte Kupplung фон steroiden einweiss Durch reduktive aminierung цуп gewinnung spezifischer antikorper. *Fresenius 3. Анал. Chem.*, 290, 164 (1978).

АВТОРЫ

СЕ Кук, HH Seltzman, В.Х. Schindler,
CR Tallent, KM Chin и CG Pitt Research Triangle
института Research Triangle Park, NC 27709

Radioimmunoanalysis Дельта-9- THC в крови с помощью ¹²⁵ Я Tracer

SM Оуэнс, AJ McBay и HM Рейснер

*Радиоиммуноанализа или дельта-9-ТГК в плазме, цельной крови, или гемолизированных образцов крови была представлена. Образцы и стандарты разбавляли метанолом и центрифугировали. Аликвота надосадочной жидкости была ^{in-situ}- замирания РИА буфера, ¹²⁵ I-меченный дельта-8-ТНС и кролик анти-ТНС сыворотки. были добавлены твердофазный козы анти-кроличьи *immunoglobulin* для отделения связанных с свободного ТНС. После центрифугирования надосадочную жидкость отсасывали и радиоактивность осадка подсчитывают в гамма-счетчике. Концентрация ТНС рассчитывали из стандартной кривой, используя преобразование логит-лог средних отсчетов дублирующих трубок. Анализ имел ряд преимуществ. Метанол разбавление дает лучшие результаты, чем непосредственный анализ. ¹²⁵ Я меченный ТНС имел высокую удельную Ак- тельности и может быть подсчитан в гамма-счетчике. *Immunological* отделение анти тела переплета ТНС от свободного ТНС было лучше, чем с использованием методов разделения *antipolymers* сульфата и активированный угля. ТНС был определен в*

0,1 мл образца с чувствительностью 1,5 нг / мл в плазме и 3,0 нг / мл в гемолизированной крови.

ВВЕДЕНИЕ

Существует потребность в точных, чувствительных и специфических radioimmun- assays (RIA) дельта-9-ТГК (ТНС) для фармакологических и forensic- СИК исследований различных биологических жидкостей. РИА образцов плазмы (1,2) и гемолизированной крови (3) было зарегистрировано.

Судебно образцы крови, как правило, грубо гемолизированная. Они вновь деств в RIA, который не зависит от той или иной степени гемолиза.

¹²⁵I-меченый ТНС радиолиганда необходимо для этого приложения (4). Преимущества ¹²⁵I-ТНС над ³H- или ¹⁴C-меченый ТНС в том, что оно не зависит от цвета заделки во время подсчета радиоактивности и может быть синтезирован при более высоком удельной активности (5). ТНС является высоко липофильной молекулой, которая прилипает к стеклу и пластмассам и связывается с различными продуктами крови. Мы обнаружили, что шаг критичная кал в РИА ТНС был разделением связанного антитела радиоактивности от другой радиоактивности. Мы сравнили пять общих методов разделения РИА и обнаружили, что твердая фаза второго анти- тела улучшает разделение.

ПОДГОТОВКА ANTI-ТНС СЕРА И радиолиганда

Дельта-8-ТНС был конъюгирован с альбумином бычьей сыворотки по методу Кука и др (1). Дельта-8-ТГК был использован, чтобы сделать анти- ген, потому что дельта-9-ТГК не был доступен. Концентрация дельта-8-ТГК в марихуане, если он присутствует, является очень низким по сравнению с концентрацией дельта-9-ТГК. Это, следовательно, не будет способствовать концентрации дельта-9-ТГК в этом анализе.

Четыре новозеландских белых кроликов каждый вводили 200 μ г антигена в физиологическом растворе эмульгировал с адьювантом Приводится полным Фрейнда. Все инъекции вводили подкожно рядом регионарных лимфатических центров. Следующие четыре форсирует были даны каждые 3 недели с 100 μ г антигена плюс полный адьювант Фрейнда. Семь месяцев от начала иммунизации кроликов были повышены с 100 μ г антигена и неполный адьювант Фрейнда. Сыворотку тестировали на связывание ТНС после четвертого подъема и на всех последующих повышает. Был высказан титр в том разведении сыворотки, которые связаны 50% от 85 пгов радиолиганды. Анализируемые кон- вий были те, которые указаны в процедуре исключения того, что сульфат аммония было использовано для разделения связанно с свободной радиоактивности. Сыворотка кролика с наивысшим титром был выбран для использования в анализе.

Радиолиганда ⁵¹иод ¹²⁵I-дельта-8-ТГК был синтезирован в нашей лаборатории методом Pitt и соавт (5). Удельная активность была определена в 250 Ки / ммоль в себя смещения методом Морриса (6).

Специфичность антисыворотки

Кросс-реактивность антисыворотки измеряли путем определе- нию концентрации соединения, что вызвало 50% замещение радиолиганды. Поскольку дельта-9-ТГК был интерес аналит,

его концентрация при 50% смещениях рассматривались как 100% перекрестная реактивность. Все другие соединения сравнивали с ним (таблица 1). Условия анализа были те, которые описаны в процедуре.

COMPOUND	%
DELTA-9-THC	100
DELTA-8-THC	420
11-OH-DELTA-9-THC	18
CANNABINOL	4
CANNABIDIOL	< 0,6
11-NOR-DELTA-9-THC-9-COOH	< 0,1
DIAZEPAM	< 0,01
SECOBARBITAL	< 0,01
D-AMPHETAMINE	< 0,01
MORPHINE SULFATE	< 0,01
AMITRIPTYLINE	< 0,01
PHENCYCLIDINE	< 0,01
TESTOSTERONE	< 0,001
HYDROCORTISONE	< 0,001
PROGESTERONE	< 0,001

Таблица 1. Перекрестная реактивность различных каннабиноидов препаратов, и стероиды с antidelta-8-ТГК сыворотки. Все процент крест реактивность, которым предшествует символ «меньше чем» не давали никаких признаков реактивности ворона в концентрации, эквивалентной процент.

БАЗОВЫЕ ПРИГОТОВЛЕНИЯ

ТНС в абсолютном этаноле был получен из Института Research Triangle (RTI), Research Triangle Park, NC. Стандарты и контроли были подготовлены в день анализа путем добавления ТНС в абсолютном этаноле к плазме или гемолизованным пулы проб крови. Стандарты готовили из 1-100 нг / мл. Гемолизируют кровь была сделана путем хранения цельной крови, по крайней мере, одного месяца при температуре 4 ° С с 1% фторида натрия в качестве консерванта. Все стандарты, контроли и незамедленное knowns обрабатывали таким же в течение всей процедуры.

Чувствительность была увеличена, и помехи были снижены на дигерметизирующих образцов с метанолом, а не анализ образцов непосредственно. Применение метанола было сообщено по Тил и др.

(7) .AN Аликвота (100 μ л) образца пипеткой в силанизированного 10 \times 75 мм стеклянную пробирку. Трубки встряхивали при низкой скорости в то время как метанол (500 μ л) был добавлен. Трубки были немедленно закупорены. Через 30 минут пробирки центрифугировали при 1000 x г в течение 15 минут. А 100 μ л аликвоты надосадочной жидкости использовали в анализе. При приблизительно 10 нг / мл радиолиганда был добавлен в плазме крови или гемолизируют (n = 10) процент извлечения составил 99,3 (% CV = 1,4) и 93,3 (% CV = 4,7) соответственно.

Процедура радиоиммунной

Буфер трис-NaCl с бычьим сывороточным альбумином (0,05 М трис (гидрокси метил) аминокетан и 0,15 М NaCl с 0,1% бычьего сывороточного альбумина и 0,2% NaN₃ доводили до pH 7,6 с сосредоточенное HCl). Радиолиганду в 50% этаноле добавляли в буфер в соотношении 40 пга на 500 μ л. А 500 μ л аликвоты радиолиганда в буфере добавляли к необработанным стеклянные пробирки 10 \times 75 мм. Каждый образец анализировали в двух экземплярах. Аликвота (100 μ л) из метанола надосадочной жидкости добавляли в соответствующие пробирки и встряхивают. Анти-ТНС сыворотку разводили 1: 35000 с буфером (20- 35% специфического связывания антител) и 100 μ л добавляли во все пробирки, за исключением контрольных трубок для неспецифического связывания и общего счета. В этих пробирках 100 μ был добавлен л буфера. Все пробирки встряхивают. Стойки труб герметизировали в пластиковом пакете, чтобы предотвратить испарение ния и инкубировали в течение ночи при 4 ° С. На следующий день, 100 μ был добавлен л твердой фазы козьего анти-иммуноглобулинов кролика (иммуногранул, пре- Парета от Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA 94804). Пробирки встряхивают, а затем в холодильнике при 4 ° С в течение 1 часа. Трубки оставляли нагреваться до комнатной температуры в течение 1 часа. Затем их центрифугировали при 1000 x г в течение 8 минут до осаждают татэ связанных антител радиолиганда. Супернатант отсасывали, не нарушая осадок, и добавляли 2 мл буфера. Пробирки встряхивали и центрифугировали, как и раньше. Надосадочную жидкость отсасывали, не нарушая гранул. Эти стиральное место уменьшались специфические и неспецифические связывания приблизительно 5%. Трубки подсчитывали в гамма-счетчике, имеющей эффективность счета 84,6% с ¹²⁵ источник I. Концентрация ТНС в контрольной группе и неизвестных была получена из стандартной кривой с использованием logit- преобразование журнала из средних отсчетов дублирующих трубок.

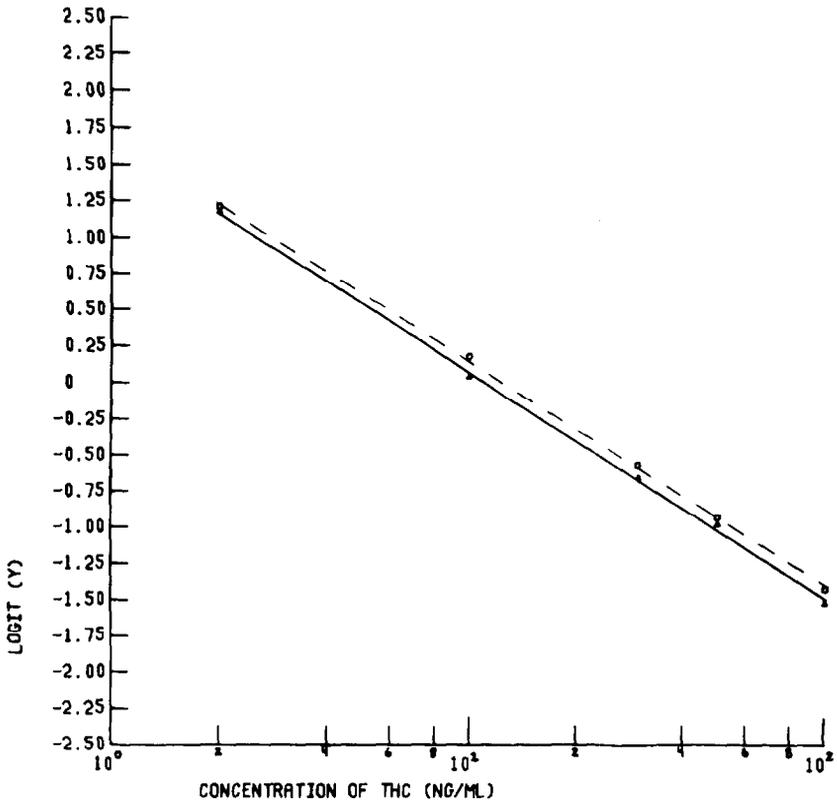


Рисунок 1. Типичные кривые логит-лог RIA для плазмы и крови. Гемолизованной При анализе в том же RIA они были почти совмещаются. Плазмы и гемолизованные кривые крови были склоны -1.56 и -1.55, Y-перехватывает 1,63 и 1,70,

и неспецифические переплеты 0,5% и 1,5%, соответственно. Обе кривые имели $r^2 = 0,999$. Процент от общего связывания составлял 2,8% меньше для гемолизованной крови, чем для плазмы.

Все Испытуемых просили не использовать марихуану в течение 4-х дней до начала исследования. Образцы крови собирали из локтевой вены в точке 0, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90 и 120 минут после начала курения. Часть цельной крови была сохранена с 1% фторида натрия. Оставшаяся кровь гепарина и плазма отстоящей, удаленная. Все образцы хранили в силанизированы сцинтилляционных флаконах по - 20 & deg; C до анализа.

В общей сложности 50 положительных образцов плазмы от 5 субъектов были проанализированы в двойном слепом эксперименте. Результаты сравнивали со временем после курения. Это должно было определить, если ожидаемый концен- трация кривой зависимости времени будет производиться (смотри рисунок 2). Вирна- СИК кривой, который был произведен был похож на стены и др (8).

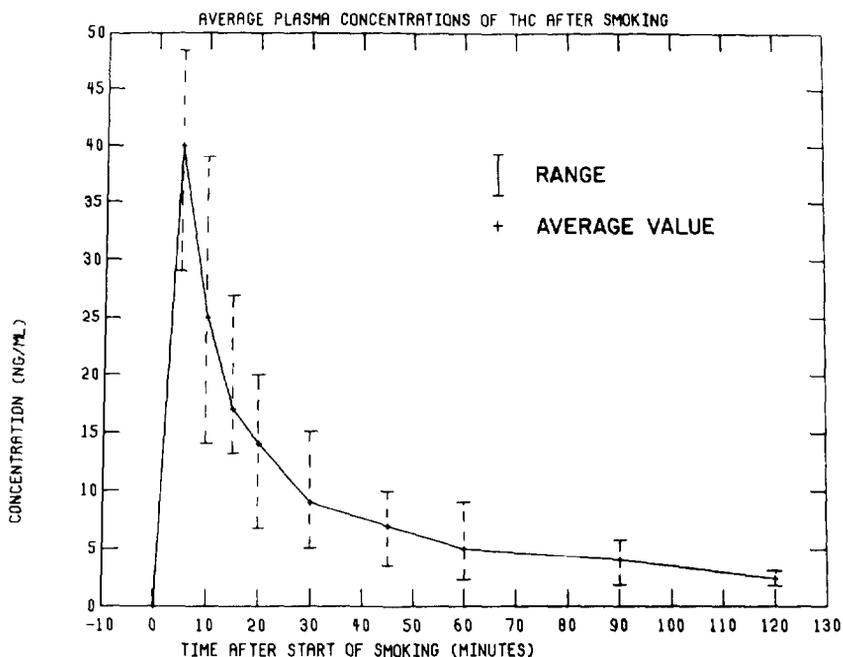


Рисунок 2. Пять предметов курил мексиканских сигареты марихуаны, которые содержали приблизительно 9 мг THC. Потребовалось от 7,5 до 13 минут, чтобы закончить сигареты. Концентрации по сравнению с кривыми временем были все двухфазными и аналогичными по каждому предмету.

Как дальнейшее подтверждение достоверности, 31 положительных и 21 отрицательной плазмы образцы на исследование от курения были проанализированы в двойном слепом моды на RTI по дельта-9-ТГК RIA доктора СЕ Кука и нашим гресе- Dure (смотри рисунок 3) , Коэффициент корреляции составил 0,971. Все образцы отрицательных были правильно идентифицированы как лабораторией. Обычные средства определения чувствительности к RIA является оцени- ели статистически подсчет отклонения нулевых стандартов дозов (9). По этому критерию, чувствительность к THC в плазме и гемолизирующая

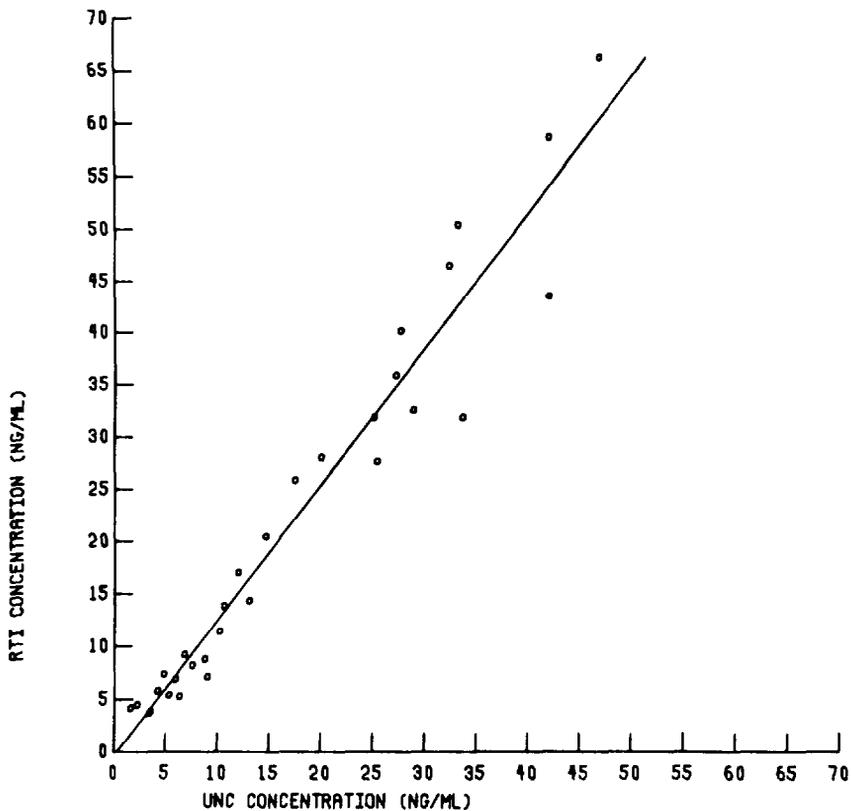


Рисунок 3. Сравнение 31 положительных образцов анализировало в двойной слепой моде на RTI на THC RIA и нашим THC RIA. Коэффициент корреляции составил 0,971.

Образцы крови будет меньше, чем 1 нг / мл. Анализ предварительных SUMED отрицательных образцов оказался более жестким критерий для оценки Чуткости.

Чувствительность была определена путем сравнения расчетных концентраций всех отрицательных образцов со стандартами нулевой дозы. Отрицательные образцы крови были получены от субъектов курения место- BOS и от 10 пользователей марихуаны. В общей сложности были проанализированы 61 отрицательные плазмы и 16 отрицательных гемолизируют крови из 16 различных суб ЕКТЫ. Нет плазмы не была рассчитана больше, чем 1,0 нг / мл и не гемолизируют крови не было рассчитано выше, чем 2,5 нг / мл. Чтобы обеспечить ложные срабатывания, по меньшей мере определяемая концентрация была произвольно установлена на уровне 1,5 нг / мл в плазме и 3,0 нг / мл в гемолизованной крови.

В настоящее время мы пытаемся подтвердить, если все образцы из исследования курения плацебо являются ТНС-бесплатно. Некоторые имели значительно более высокие концентрации, чем концентрации, обнаруженные в непользователях марихуаны. Так как люди в исследовании курения были потребителями марихуаны, низкие концентрации ТНС, найденные в некоторых образцах могут представи- послали низкие остаточные концентрации препарата.

Внутри анализ воспроизводимость была определена с использованием плазмы или гемолизированной крови с добавленной ТНС (смотрите таблицу 2). Межпробная точность для образцов плазмы определяли с использованием образцов из исследования курения (смотри таблицу 3). Гемолизированная точность межпробной крови определяется.

SAMPLE ASSAYED	THC ADDED,		THC FOUND	
	NG/ML	N	MEAN NG/ML	CV, %
PLASMA	5,0	10	5,1	7,9
PLASMA	30,0	10	27,9	4,2
HEMOLYZED BLOOD	5,0	8	5,5	15,0
HEMOLYZED BLOOD	30,0	8	31,3	5,9

Таблица 2. Воспроизводимость анализа известных количеств ТНС. ТНС был добавлен в плазме или гемолизированной пул проб крови. Концентрация ТНС была рассчитана из стандартных кривых, которые были похожи на фиг.1.

MEAN CONCENTRATION THC, NG/ML (N = 8)	CV, %
33,1	7,7
10,7	11,0

Таблица 3. межпробную точность была определена с использованием образцов плазмы из исследования курения марихуаны. В повторностях были проанализированы в тестах spreatate над 3-недельный период.

ВЫВОДЫ

Концентрация ТНС после курения может быть точно определена в различных биологических жидкостях этого RIA, используя ¹²⁵Я копир и специфический метод разделения. Этот анализ будет полезен в foren- SiC и фармакологических исследований.

БЛАГОДАРНОСТЬ

Поддерживается в части по Северной Каролине губернатором Проект программы по безопасности шоссе № 80-08-03-C-308-2.

Внимательные беседы с д-ром СЕ Куком и техническими консультациями при подготовке радиолиганды доктора СG Питтами, DL Уильямсом, и д-р НН Seltzman исследовательского института Triangle признаны. Д-р Марио Перес-Рейес из Университета Северной Каролины в Чапел-Хилл выполнял человеческие исследования.

РЕКОМЕНДАЦИИ

1. СЕ Кук, МL Хоуз, EW Amerson, СG Питт и DW Williams. Radioim-unoassays дельта-9-тетрагидроканнабинола. В RE Willette (ред.), *Каннабиноидов Анализ у человека*, Национальный институт по борьбе со злоупотреблением наркотическими средствами Исследовательского монографию 7 SUPT. из Docs., США правительственных служб. Распечатать. Выкл., Вашингтон, округ Колумбия, 15-27 (1976).
2. SR Гросс и JR Суариш. Удостоверенная прямая кровь дельта-9-ТГК радиоиммунный Количественное. *J. Anal. Toxicol.* **2**, 98-100 (1978).
3. SR Гросс, JR Суариш и ВК Рив. (Личное общение).
4. СЕ Кук. Радиоиммунологическая каннабиноидных соединений. В JA Винсон (ред.), *Каннабиноидов анализ в физиологических жидкостях*, ACS Symposium Series 98, Am. Химреагент Soc., Washington, DC, 137-154 (1979).
5. СG Pitt, НН Seltzman, SR Setzer и DL Williams. Подготовка 5^α- иод 1²⁵ I-дельта-8-ТГК; радиолиганда для радиоиммуноанализа каннабиноидов. *J. меченых Соедов и Radiopharm.* **17**: 681-689 (1980).
6. ВJ Моррис. Удельная радиоактивность радиоиммуноанализа трассера определяется само-смещения: переоценка. *Clin. Хим. Acta*, **73**, 213-216 (1976).
7. JD Тил, JM Кло, LJ Кинг, В. Маркс, П. Л. Уильямс, и АС Моффат. Заболеваемость каннабиноидов в смертельно травмированных водителей: исследование с помощью радиоиммуноанализа и жидкостной хроматографии высокого давления. *J. Forens. Sci. Soc.* **17**: 177-183 (1977).
8. ME Wall, ТМ Харви, JT Bursley, DR рассола и D Розенталь. Аналитические методы определения каннабиноидов в биологических средах. В RE виль- Летте (ред.), *Каннабиноидов Анализ в организме человека*. Национальный институт по борьбе со злоупотреблением наркотическими средствами Исследовательского монографию 7 SUPT. из Docs., США правительственных служб. Распечатать. Выкл., Вашингтон, округ Колумбия, 107-117 (1976).
9. D. Rodbard. Статистическая оценка минимальной обнаруживаемой концентрации («чувствительность») для радиолиганды анализов. *Анальный. Biochem.*, **90**, 1-12 (1978).

АВТОРЫ

SM Owens * и AJ McBay Управление главного
медицинского эксперта в и

Отдел патологии Университета Северной
Каролины Чапел-Хилл, штат Северная
Каролина 27514 и

HM Рейснер

Отдел патологии Университета Северной
Каролины Чапел-Хилл, штат Северная
Каролина 27514

* текущий адрес:

Отдел фармакологии Университета
штата Аризона Тусон, Аризона

Существенные изменения в методах радиоиммунных прикладной к Δ^9 -ТНС и его 9-Замещенные Метаболиты

JR Coares, JD Грант и SJ Gross

Новые RIA были разработаны для обнаружения марихуаны. Модифицированные простые методы измерения «острых» метаболизируемые Lites в минуту слюны, дыхание, и высушенных образцах крови? Твердое очищенное антитело соответствует значениям чувствительности и чувствительности дает идентичные жидкие анализы. Значение полярных 9-замещенных метаболитов (9SM) ТТК в острых пользователей показывает время, конечно, данные, которые указывают на их уровни остаются высокими в критический период после интоксикации когда это

Δ^9 -ТНС очищает от крови. Поэтому анализ одной трубки с использованием твердофазных реагентов был сконструирован, чтобы количественно. Тэйт одновременно ТНС и 9SM. когда Δ^9 - Δ^9 значения ТНС низкие или сомнительные в предметных образцах, 9SM бы оказаться полезным, чтобы подтвердить или опровергнуть острое употребление марихуаны.

ВВЕДЕНИЕ

Эволюция радиоиммуноанализа (RIA) методы подтвердили наше первоначальное понятие (1), что желательна специфичность зависит от стерических свободных химических функций в гаптене и маркерных молекул- связей.

Эти принципы есть аль мычала развитие тетрагидроканнабинола (ТНС) и полярного Δ^9 -9-замещенного ТНС метаболизируемые облегченного (9SM) анализы, требующее одну инкубации 20 μ л образцы сыворотки или крови (гемолизируют). Эти чувствительные анализы (5 нг / мл) имеют обычную клиническую применимость. Например, ТНС дозировка для anti-Metic эффектов эффективно можно контролировать с помощью сыворотки концентрации.

Кроме того, такие определения существенно добавить в клинические эпидемиологические и поведенческие оценки. Принимая во внимание высокую avidность антител, анализ является гибким и может охватывать широкий спектр жидкостей и твердых тел. Поскольку существует очевидное судебно-приложение, существующая методика была распространена на дыхание. Обычные процедуры RIA требуют выберите реагенты и важные шаги в основном для разделения свободного радиолиганда от границы с анти- тела. Это может быть достигнуто путем «вылить» или «масляный щуп» а техник, использующие недавно разработанные твердые матрицы, содержащих сова- lently связанного антитело или гаптен. Эти материалы теперь могут быть использованы для измерения двух (или более) различных объектов одновременно в одном контейнере.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Предметы

Пятнадцать взрослых мужчин-добровольцев были набраны. Их марихуана привычка варьировалась от света (<1 / месяца) до тяжелого (> 3 / дня). Их попросили воздержаться от частного использования каннабиса в течение 24 часов до тестирования и базового (до дыма) негативности их образцов (кровь и дыхание) проверяемых RIA. Добровольцы были аль- мычала 15 минут, чтобы закончить одну сигарету марихуаны жщих THC эквивалент приблизительно 200 мкг

Δ^9 -THC на кг тела

вес предмета. Кровь и дыхание были собраны в различные промежутки времени до 6 часов после курения. Сыворотка была получена centrifu- гинальных образцов в красных верхних трубах вакуумных контейнеров. Пяти бесперебойных вдохов были переданы боросиликатной твердой матрицей. Каннабиноиды были восстановлены путем элюирования с этанолом, разводили в буфере и тестировали на

Δ^9 -THC и 9SM содержание методами жидкой фазы (де- скрайбированные ниже).

Гаптенy и Антигены

2- (4'carboxyphenylazo) производные Δ^9 -THC (Азо-THC), 11- гидрокси- Δ^9 -THC (Азо-11-OH) и каннабинол (Азо-CBN) были сова- lently в сочетании с полимерами для иммунизации (2) и аффинной хроматографе matography (3).

Сыворотки

Техас куст козы были иммунизированы гемоцианин гемо- цианин конъюгатов азо-THC и азо-11-OH, как ранее де- скрайбированной (2). Сыворотки собирали плазмафереза тестировали, как следую щим образом.

Титр определяли как разведение, при котором 0,1 мл антисыворотки связывается 40% добавленной Δ^9 -THC (40000 импг). Перекрестные реактивности были вычислены из стандартных кривых и выражали в виде Δ^9 -THC / cannabinoid отношение массы при ингибировании 50% ($\times 100\%$).

Разбавленный THC-специфической антисыворотки используют непосредственно в стандартной жидкой фазе анализа. 9SM антитело, выделенное с помощью аффинного хроматографа графии было соединено с нерастворимой матрицей для твердофазных методов.

Immunosorbant

Азо-эльбора карбоксильной (50 μ моль) превращают в активный эфир по изобутилхлорформиата (60 μ моль) и добавляли к 10% -ной суспензии в аминоалкил агарозы (Affi-Gel 102, BioRad, 35,1 μ моли алкиламина) в диоксане. Иммуноферментный (азо-CBN-S), промывает сухим диоксан (1 л), чтобы удалить несвязанный гаптен, и хранил в дистиллированной воде.

аффинная хроматография

Насыщенный сульфат аммония добавлял к Азо-11-ОН антисыворотке до конечной концентрации 33% и осадки (сырой IgG) в дальнейшем увели- очищенного путем пропускания через QAE Сефадекс (QAE IgG). Анти- разведений тела были сосредоточены (10 нг / мл) и 10 мл аликвоты инкубировали с иммуноферментным, чтобы удалить все антитела из супернатанта. Азо-CBN-S, промывали PBS (0,01 M фосфатного буфера, pH 6,9, 0,9% хлорида натрия) до тех пор, свободного от неспецифической про- Tein (OD <.005). Были окончательные стирки с помощью 1 M бромида лития (100 мл). Чистый иммуноферментный пипеткой в стеклянные колонки (1,2 \times 15 см). Элюирование с помощью 0,09 M хлористоводородной кислоты (30 мл) удаляет специфические антитела. Элюат подвергали диализу против дистиллированной воды (12 часов при температуре 4 ° C) и фосфатным буфером (24 часов при температуре 4 ° C).

Очищенное антитело концентрируют с сахарозой и концентраций, рассчитанных спектрофотометрически (280 нм). Окончательный титр по сравнению с родительскими решениями для документирования восстановления активности.

Матрица Антитело конъюгаты

Фракции антител различной чистоты были соединены с polyfunc- ционного акрилата. Активные полимерные фракции (33 мг) подвергали взаимодействию с 400 μ г на мл антитела (3,0 мл). Несвязанные IgG, удаляли с помощью PBS. Связывание эффективности иммуноферментного-очищенные антитела конъюгата матрицы (Ab-C), сравнивали с IgG-полимером управлением (не иммунный IgG, IgG и сырой QAE IgG-фракция). Твердофазные (джентльмены причин, из 30% -ной суспензии в PBS) хранили при 3 ° C.

Жидкофазные Радиоиммуноанализы

Следующие каннабиноиды были получены из Национального Ин- ментируют по борьбе со злоупотреблением наркотиками (NIDA): Δ^9 -ТНС, - ТНС; 11-гидрокси Δ^9 -ТНС, 11-нор Δ^9 -ТГК-9-карбоновая кислота, каннабинол, каннабидиол и Δ^9 -ТНС (50,3 Ки / мМ).

Стандартные кривые ингибирования построены из непользовательской образцы на содержащих известные количества Δ^9 -ТНС. Сыворотка (50 μ л) инкубировали (16 часов, 4 ° С) с 0,1 мл антисыворотки (разведенной связать 40% добавленного маркера в отсутствие немеченого ТНС) и 188 пг (40000 имп) из Δ^9 -ТНС.

Δ^9 -ТНС. Свободные и антитело переплетает радиоактивных лиганды были отстоящими с использованием 0,5, удаленные мл покрытого декстран угольной суспензии (50 г Норит древесный уголь и 5 г декстран Т-70 в 1,0 л PBS), охлажденного при 4 ° С с помощью холодильных установок.

Антитело-связанный Δ^9 -ТНС подсчитывали в Бекман LS-250 бета-счетчик после декантации супернатанта в scin- лиевы флаконы, содержащих 10 мл Aquasol (New England Nuclear). Преобразование логита (4) было использовано для построения стандартных кривых и рассчитать

Δ^9 -концентрации ТНС неизвестных образцов используя Ван 2200 компьютер.

Твердофазная 9SM RIA

Стандарты сыворотки были получены из объединенной марихуаны отрицательной сыворотки.

Маточные растворы 11-нор Δ^9 -ТГК-9-карбоновая кислота в 50% этанол (0,01 мг / мл) разводили в соотношении 1/100 с сывороткой с получением конечной концентрации 100 нг / мл. Это серийно разводили в сыворотке для стандартных кривых, которые были включены в каждом анализе путем переноса аликвот (20 μ л) из последовательности каннабиноидов концентраций в 10 × 75 мм из боросиликатного стекла труб в двух экземплярах.

Неизвестные образцы на (20 μ л) анализировали идентично. Аб-С (10 μ земельные участки Δ^9 -ТНС (30000 имп / 0,6 мл PBS, 0,1% albu-

Добавляет мин) и пробирки инкубировали в течение 12 часов при 4 ° С с периодическим встряхиванием. PBS (1,0 мл) добавляли, и пробирки vortexed. После центрифугирования (4000 оборотов в минуту, 10 минут), супернатант сливали, а процент Δ^9 -ТНС связан с антителом

рассчитывается путем подсчета матрицы непосредственно в сцинтилляционной жидкости. Log-логит стандартных кривые были использованы для оценки неизвестных 9SM концентраций,

Dual-метаболита RIA

Выше способ был модифицирован для анализа Δ^9 -ТНС и 9SM Si-менно в одной трубе. Δ^9 -стандарты в сыворотке крови ТНС и 9SM

были добавлены в отдельные наборы 10 × 75 мм из боросиликатного стекла труб в двух экземплярах. Δ^9 -ТНС (30000 имп / 0,1 мл), Аб-С (10 μ л) и реше- BLE

Δ^9 -ТНС специфическое антитело (0,5 мл) добавляли к каждому набору и

реагенты инкубировали (12 часов, 4 ° C) с прерывистым встряхиванием. Пробирки центрифугировала и процент метки, св занного с антителом 9SM определяется путем измерения отсчетов матрицы. з ЧАС- Δ^9 - THC обязаны Δ^9 - THC специфическое антитело было измерено в супернатанте. **Неизвестные образцы (20 μ л) анализировали одинаково, и** Δ^9 - THC и концентрация 9SM оценивается из жидкости (Δ^9 - THC) и твердые (9SM) фазовые стандартные кривые.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Сыворотки Специфичность

Перекрестные реактивности приведены в таблице 1. 11-гидрокси Δ^9 - THC, 11-нор-THC-9-карбоновая кислота и Δ^9 - THC в равной степени признаются антителом 9SM. Негомологичная радиолиганда (з ЧАС- Δ^9 - THC) вклад в этот спектр. Δ^9 - THC антисыворотки имеет гораздо больше специфичность, перекрестные реактивности для 11-гидрокси- Δ^9 - THC и 11-нор Δ^9 - ТГК-9-карбоновой кислоты в 26% и 0,5% соответственно.

Таблица 1. Процент Crossreactivities *

Соединение	иммунная сыворотка	
	9SM	Δ^9 -THC
Δ^9 - THC	100,0	100,0
Δ^8 - THC	98,2	96,5
11-гидрокси- Δ^9 - THC	97,6	26,0
11-нор Δ^9 -ТГК-9-карбоновая кислота	96,5	0,5
каннабинол	15,5	22,0
каннабидиола	0,1	0,15

* Δ^9 -] Соотношение / каннабиноидного THC при 50% ингибирования (x 100%).

Уровни каннабиноидов крови

Уровни Pre-интоксикацию 9SM и Δ^9 - THC были отрицательными в сыворотке крови из всех 15 добровольцев. Исходные образцы, взятые 15 минут после того, как completion курения показала THC концентрации от 9 до 42 нг / мл. После этого, уровней быстро снижаются, становясь незаметной при 2 л / 4 до 3 л / 4 ч. Уровни 9SM были значительно выше (20-198 нг / мл), чем соответствующие Δ^9 - THC значения. Сохранение мета-

bolites был длиннее Δ^9 -THC по всем предметам, но изменяется с их индивидуальные привычки. Например, во всех трех субъектов, которые использовали марихуану в значительной степени (> 3 раза / день) уровни 9SM оставались повышенными (> 20 нг / мл) до 6 часов после ингаляции марихуаны (рисунок 1). 9SM повторно обратилось к базовой линии (0) по двум предметам, чьи сыворотки были получены в течение 24 часов. В качестве альтернативы, 9SM снизился до уровня анализе чувствитель- ность (5 нг / мл) во всех умеренных курильщиков (1-4 раза / неделю) на 6 1/2 часов. И, наконец, два легких курильщиков (<1 раза / мес) сыворотки не содержали измеримый 9SM 3 1/4 часа после острого воздействия.

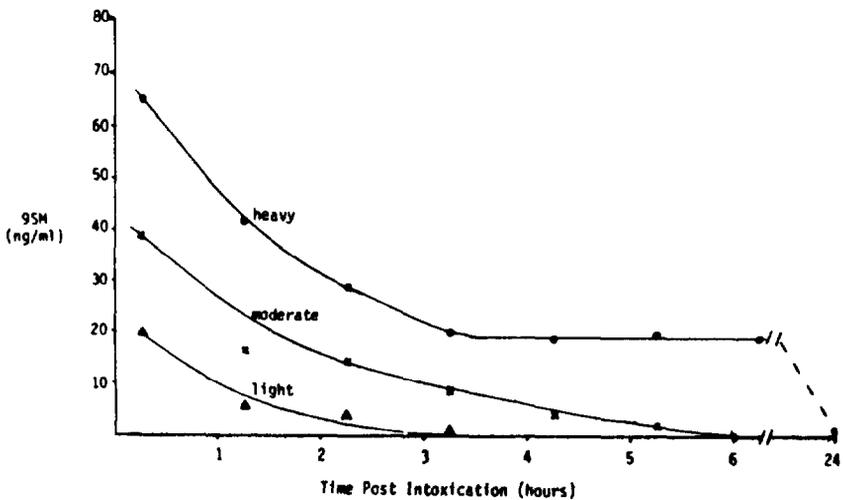


Рисунок 1. Уровни сыворотки Δ^9 -THC 9-полярный метаболит у людей, которые отличаются степень использования марихуаны. Уровни 9SM были определены с различными интервалами после того, как испытуемые курил одну сигарету марихуаны, содержащей 200 μ г THC / кг массы тела. Δ^9 -

Во всех случаях, 9SM очищается более медленно из крови, чем THC. Действительно, среднее 9SM / Δ^9 -THC Соотношение THC для этих субъектов не-увеличилась с 2,9 на 15 минут до 5,7 на 2 1/2 часа. Δ^9 -

дыхание

Каннабиноиды были измерены в ловушке дыхания от десяти из вышеуказанных добровольцев после курения одну сигареты марихуаны. И то и другое Δ^9 -THC и 9SM были обнаружены сразу же после завершения курения (0 времени). Уровни Δ^9 -THC между 10 и 56 нг / образец измеряли через 15 минут после того, как курение и были обнаружены в

1 час. Более высокие концентрации 9SM были отмечены (таблица 2) с максимальными значениями (50-123 нг / образец), наблюдаемых на 15 минут. Установлено значительное количество 9SM были обнаружены до 2 1/2 часов.

ТАБЛИЦА 2. Δ^9 -Метаболиты THCA в выдыхаемом воздухе при различных интервалах после курения сигареты Одно марихуаны (200 μ г THC / кг веса тела) Δ^9 -

Время* Пост-опьянение (минуты)	Уровни 9SM в захваченном дыхании **			
	Предметы			
	RR	EP	JT	DG
0	—	21	31	—
5	—	27	47	—
15	62	110	123	50
30	58	57	19	30
45	—	35	38	—
60	26	28	23	24
120	15	8	8	6
150	2	4	0	0
180	0	0	0	0

* Нулевое время означает завершение дыма.

** Таргет дыхание анализировали с помощью жидкофазных способов с использованием стандартов шипами-буфера и уровень 9SM, выраженные в нг на образец извлекают.

Твердофазный анализ 9SM

Стандартные кривые

Стандартные кривые Ab-C и QAE IgG-C сравниваются на рисунке 2. Шесть повторных анализы были использованы для построения кривых AB-C. Log- логит преобразование этих данных дало линейный отклик на 9SM в диапазоне 2-50 нг / мл. Равномерно низкие коэффициенты вариации для каждого стандарта документально точность по всей кривой отклика. Анализ чувствительности (2 нг / мл) была определена как точка на стандартной кривой больше на 2 стандартных отклонений от 0.0 нг / мл.

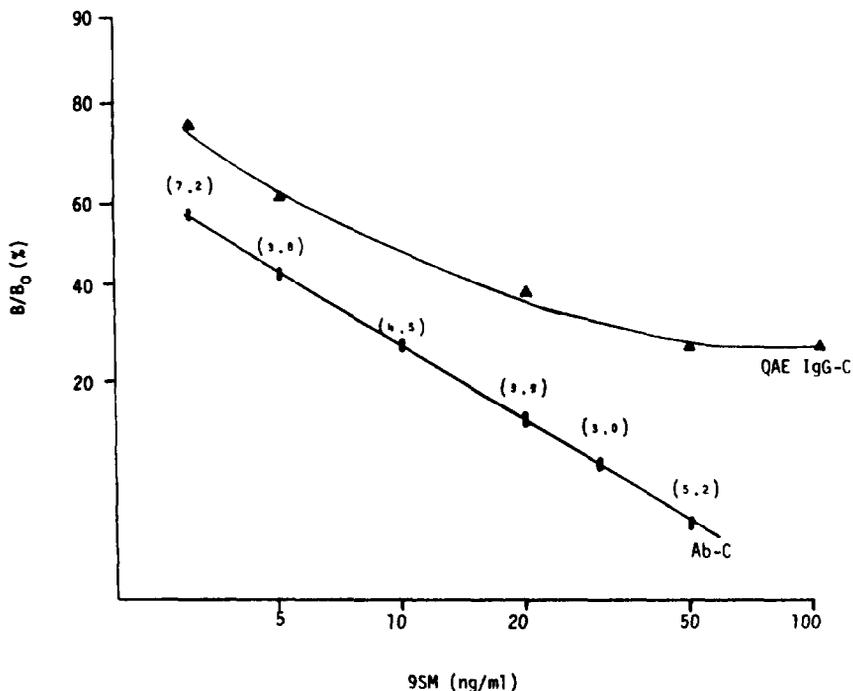


Рисунок 2. Твердофазные стандартные кривые 9SM. THC-отрицательные образцы сыворотки с шипами 9SM добавляли в пробирки, содержащих антитела-матрице и конъюгат э Н- THC. Δ^{B}_0 .

Матрица подсчитывали после инкубации с (B) и без (B₀) гаптен. Log-логит преобразование средних значений из шести повторных анализов были использовано для построения стандартных кривых. Коэффициент вариации для каждой точки линейной калибровочной кривой Ab-C в круглых скобках. Уплотнение кривой QAE IgG-C при высоких

Концентрации 9SM свидетельствует о высокой емкости неспецифического связывания.

В противоположность этому, QAE IgG-C Калибровочные кривые были нелинейными. Это произошло, потому что меньше антител IgG, было доступно для ковалентного связывания на единицу объем матрицы в конкуренции с другими белками в неочищенных фракциях антител. Таким образом, более крупные аликвоты QAE 1GG-C (100 μ л), чем Ab-C (10 μ л) требовалось, чтобы связать достаточное э Н- THC (фигура 3). Результатирующая неспецифическое связывание вызвало крайнее искажение стандартной кривой QAE IgG-C, что приводит к потере специфичности и чувствительности.

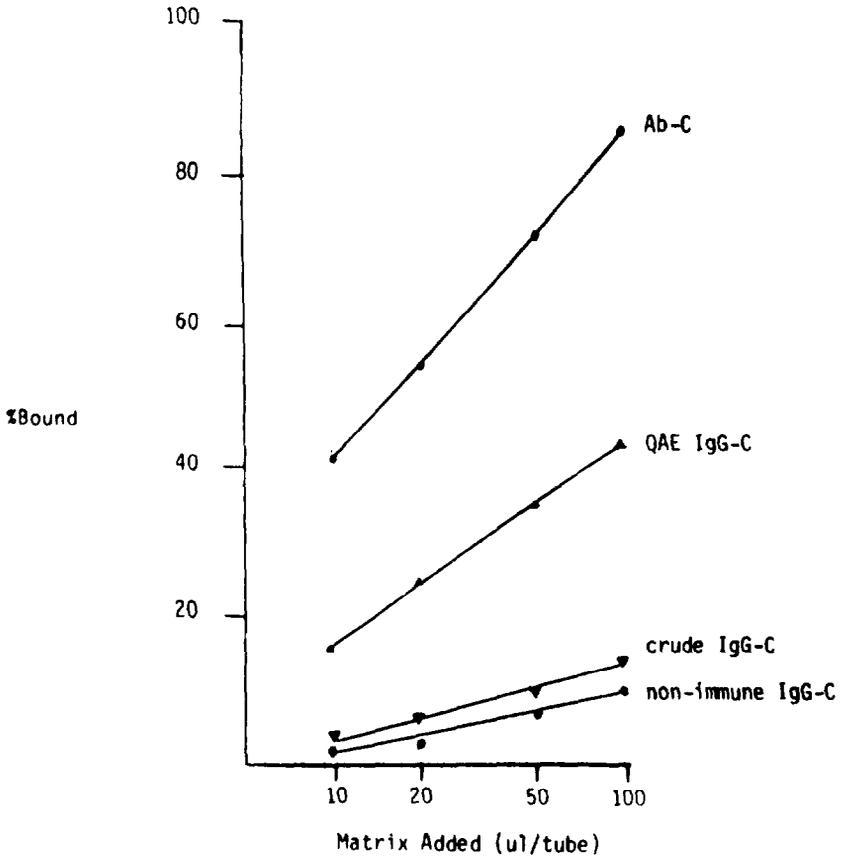


Рисунок 3. SH- Δ^8 -ТНС связывание с полиакрилатными конъюгатов антител. Связывание с ЧАС-

Δ^8 -ТНС в нерастворимую фракции антител различной чистоты. Малые аликвоты иммуноферментного очищенного материала (20 μ л / 30% об / об суспензии) связывает с Н-ТНС хорошо. Δ^8 .

Избыточные количества конъюгата антитела QAE Sephadex (100 μ л / 30% об / об суспензии), необходимой для связывания эквивалентного с ЧАС-

Δ^8 -ТНС результаты в 30% неспецифической связывание.

ТОЧНОСТЬ

Точность внутри анализа была измерена с помощью анализа аликвот единичных образцов в том же самом анализе. О среднем коэффициента вариации 14% был получен с сыворотками четыре добровольцев в дубликатах. Точность Inter-анализа оценивали путем анализа шести образцов в двух отдельных анализах. Коэффициент вариации для этих результатов составил 17%.

Твердофазная Dual-метаболит анализ

Одновременное определение количества и Δ^9 -THC и 9SM в одном Анализ трубка была сделана путем разделения антитела в твердый (9SM) и жидкостей (Δ^9 -THC) фаза. растворимый Δ^9 -THC антитела измеряли Δ^9 -THC. 9SM были измерены с помощью гомологичного нерастворимого антитела.

ТОЧНОСТЬ

Точность оценивали с помощью анализа каннабиноидов отрицательной сыворотки, к которой различным количествам Δ^9 -THC, 9SM, или оба были добавлено (таблица 3). Наблюдаемые (O) и ожидаемые значения (E) сравнивались вычислить процентное восстановление из игольчатой сыворотки ($O / E \times 100\%$). Восстановление 9SM было отлично (92-120%) при концентрации в диапазоне от 0-50 нг / мл, за исключением, когда Δ^9 -уровни THC были высокими (> 10 нг / мл). В этой ситуации превышение Δ^9 -THC вытесняет значительное количество Δ^9 -THC из его гомологичного антитела. Часть Затем эта метка связывается с 9SM-специфическими антителами, что приводит к небольшому занижению 9SM (70-84% регенерации). Важно отметить, что Δ^9 -THC значения были точно измерены независимо от содержания 9SM сыворотки (92-110%).

Таблица 3. Восстановление 9SM и Δ^9 -THC Добавлена каннабиноидный Отрицательная сыворотка Измеряется Одновременный RIA

каннабиноиды добавил (Нг / мл)		каннабиноиды измеряется (Нг / мл)		Восстановление (%)	
Δ^9 -THC	9SM	Δ^9 -THC	9SM	Δ^9 -THC	9SM
0	10	0	10	—	100
0	25	0	30	—	120
0	50	0	55	—	110
5	0	5	0	—	—
5	10	5	10	100	100
5	25	5	23	100	100
5	50	5	45	100	92
10	0	9	0	90	—
10	25	11	20	110	80
10	50	10	42	100	84
20	0	24	0	120	—
20	50	22	35	92	70

Аликвоты сыворотки подсыпали различными количествами

Δ^9 -THC, 9SM, или обих.

Они были проанализированы в одной пробирке с помощью твердофазных методов.

здесь и за рубежом. Антитела связи твердой матрица упрощает и может даже устранить шаги, необходимые для отделения от связанного гаптена бесплатно. Наконец, поскольку твердая фаза отсчитывается, вода и макро- молекулы тушение сцинтиллятора избегают.

Реактивные твердые полимеры могут выборочно удалять и концентрировать нужный гаптен из разбавленного тела жидкости, содержащая большое смесь ингредиентов. Таким образом, такая матрица позволяет измерять сбор и суб секвенции каннабиноидов из образцов дыхания. Следует отметить в этом контексте, что исследования, в которых тритий

Δ^9 -THC вводил внутривенно (Mario Perez-Reyes, средства индивидуальной связи), никакой радиоактивности не была обнаружена в слюне. Если нынешние результаты отражают метаболические процессы на поверхности легкой, каннабиноиды измерение в дыхании имеет потенциальное значение.

Более новые методы, использующие твердые вещества, доступные в геометрических формах, начиная от обычных трубок к аморфным шарикам приводят к Si- multaneous сыворотки THC и измерению 9SM в од Δ^9 кон- TAINER. Это имеет потенциальные достоинства в затворения ухудшения марихуаны, в частности, когда

Δ^9 -THC концентрация является незначительным. Долгосрочный оценки устойчивости очищенного антитела и другие твердые причин, из джентльмены теперь требуется. Многофазные поддерживает, в конечном счете охватывающим передать большое разнообразие молекул в настоящее время испытываемых квалифицированными специалистами в больничных и справочных лабораториях. Новая генера- ция методов позволит упростить свои задачи и, возможно, позволяет количественно фикацию в диапазоне низких нг / мл менее опытным индивиду- uals.

РЕКОМЕНДАЦИИ

1. SJ Gross. Специфичность стероидных антител, глава 3, в *Иммунологические методы в стероиде Определения*, Appleton-Century-Crofts, 41-54 (1970).
2. JD Грант, SJ Gross, П. Ломакс и Р. Вонг. Антитело обнаружение марихуаны. *Природа Новой биологии*, 236, 216-217 (1972).
3. JD Грант, JR Суарес и SJ Gross. Разделение высокого сродства гаптен specif- IC и перекрестно популяция IgG. *Иммунохимии*, 12, 481-484 (1975).
4. Д. Rodbard, В. Bridson, и ЛП Рейфорд. Быстрый расчет radioimmunoas- говорят результаты *J. Lab. Clin. Med.*, 74, 770-781 (1969).
5. RS Ялоу и SA г.Минск. Проблемы проверки радиоиммуноанализов, глава XV, в *Принципы конкурентного белка связывания*, В JP Липпикотт, 374-400 (1970).

АВТОРЫ

JR Coares, JD Грант, и SJ Gross
научно-исследовательский институт Receptor 1707
Gardena Avenue Glendale, CA 91204

Комбинированный высокоэффективной жидкостной
хроматографии и

Радиоиммунологический Метод анализа



Тетрагидроканнабинол и его метаболиты
в плазме крови и моче

Энтони С. Моффат, Питер Л. Уильямс, и Laurence J. King

*Высокоэффективной жидкостной хроматографии-radioimmuno- анализа
метод для измерения каннабиноидов в
плазма и моча описана. Экспериментальная процедура состоит из chromataphing
плазмы экстракта или гидро- лизиса образца мочи с помощью
высокоэффективных жидкостного хроматографа графии и количественного
определение elutip кросса-реагирующего саппа- binoids с радиоиммуноанализом.
Концентрации тетрагидроканнабинола (THC), каннабинол, Δ^9-
моно-гидроксилированные метаболиты, ди-гидроксилированные метаболиты,
 Δ^9- : THC-11-овой
кислота, и Δ^9- THC-11-овой кислоты глюкуронид может быть
измеренный с помощью этой методики.*

ВВЕДЕНИЕ

Радиоиммуноанализы (RIA) для анализа каннабиноидов в жидкостях организма человека, были описаны (1-5) и имеют ряд преимуществ по сравнению с другими аналитическими методами. Биологические жидкости могут быть проанализированы без предварительной обработки, чувствительность методы является высокой, большое количество образцов может быть проанализировано в то же время и селективность антисыворотки для каннабиноидов дает анализу высокой степень специфичности. Тем не менее, каждый анти-сывороткой перекрестно реагирует с различными каннабиноидов в разной степени

и эти перекрестные реакции могут быть дополнительно изменены путем изменения условий анализа, радиолиганды и т.д. (6). Антисыворотки для использования в РИА могут быть получены таким образом, что он может быть специфичным для тетрагидроканнабинола (THC). Таким образом, уровни ТГК в плазме может быть измерена непосредственно с использованием этой антисыворотки, даже если другие каннабиноиды или THC метаболиты могут присутствовать. Однако, если 11-нор

Δ^9 -ТГК-9-карбоновая кислота (THC-11-овая кислота) должна быть измеряется в моче, то отдельный антисыворотки, и, надеюсь, один специфический для кислотного метаболита и никакой другой, должны быть подготовлены для использования в другом РИА (7).

Альтернативный подход заключается в подготовке антисыворотки, которая реагирует кросс-с числом каннабиноидов, включая THC и некоторые из его метаболитов. Эта антисыворотка может быть затем использован для анализа плазмы или мочи, но уровни найдены могут быть выражены только как перекрестно реагирующими каннабиноидов, поскольку аналитические результаты представляют собой сумму всех перекрестно реагирующими каннабиноидов, присутствующих в образце (8). Хотя только один РИА теперь необходим для любой биологической жидкости анализироваться, легкость анализа была обменена на отсутствие специфичности. Другие методы анализа каннабиноидов в биологических жидкостях были разработаны, но почти все требуют длительный раза анализа, частично из-за обширные процедуры очистки, необходимых до инструментального анализа. Применение хроматографических методов автоматизированный анализ имеет из-за разделяющую мощьность технических приемов, но проблемы обнаружения всегда были очевидны. Различные устройства были использованы для повышения селективности ультрафиолетового (УФ) детекторов в высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) анализа, например, за счет использования колонки Sephadex очистки перед HPLC (9) или с использованием одновременного двойной длины волны УФ-обна- щения (10). Тем не менее, большая сила разделения ВЭЖХ была кон- янно было затруднено из-за отсутствия конкретного детектора. Применение высокоэффективной жидкостной хроматографии в качестве Процедура очистки перед использованием другой аналитической методики имеет очевидные преимущества, а также методы, включающие масс-спектрометрии (МС) (11), газовая хроматография (ГХ) с использованием обнаружения захвата электронов (12),

Сочетание РИА с помощью ВЭЖХ имеет очевидные преимущества. Недостаток отсутствия чувствительного и специфического детектор для сапна- binoids в ВЭОМ может быть преодолен путем использования radioimmunoas- сказать, и отсутствие полной специфичности антисыворотки может быть преодолено путем предварительного использованием высокоэффективного жидкостной хроматографии. Таким образом, перекрестно реагирующих компо- ненты могут быть разделены с помощью системы ВЭЖХ, а также путем сбора дробей в конце колонны отдельные каннабиноиды могут быть определены количественно. Эта процедура была использована для количественного определения THC и его метаболитов в плазме крови человека (14), а также для

Анализ THC метаболитов в моче человека (15). Уровни в плазме THC, полученные методом ВЭЖХ-RIA также сравнивали с результатами, полученными с помощью процедуры GGMS. ВЭЖХ-RIA мет- в.п.с. представлены ниже вместе с обсуждением в преимуществах комбинированной методики для использования в судебной токсикологии.

ОТБОР ОБРАЗЦОВ

Добровольцы курили табак сигареты, пропитанные 10 или 8 мг THC над ло-минутного периода. Образцы крови (10 мл) отбирали через определенные промежутки времени после того, как субъект закончил курение. Антикоагулянт (ЭДТА калия, 10 мг) добавляли к крови, который центрифугировали для отделения плазмы. Моча образцы на один и те же из предметов были собраны в silanised стеклянных емкостей в течение 24-часового периода после курения. Образцы мочи управления были получены от добровольцев, не имеющих опыта CAN- наби использования. Все образцы хранили при -20°C до анализа.

радиоиммуноанализ

Антисыворотки (133Y / 22/5) для анализа был получен от доктора JD Тил, кафедра биохимии, Университет Суррей, Великобритания.

Δ^9 - были предоставлены ТГК и другие каннабиноидов соединения

Национальный институт по борьбе со злоупотреблением наркотических средств, Роквилл, штат Мэриленд, США

Δ^9 -(Г-з Н) THC был приобретен у радиохимической

Центр, Амершам, Великобритания, поливинилпирролидона-40 и древесный уголь (Norit A), от Sigma, Сент-Луис, штат Миссури, США, декстран Т70 от Pharmacia, Упсала, Швеция, и метанола (AnalaR) и всех других химических веществ и растворителей, были получены из BDH, Poole, Великобритания. Intertechnique SL30 был использован для жидкостного сцинтилляционного счетчика.

Антисыворотки (133Y / 22/5) хранили в виде аликвот в буфере (0,1 М фосфата

буфер pH 7.5, содержащий 0,2 процента

поливинилпирролидон-40) при -20°C и разбавляют до 1: 300 перед использованием. Решения

Δ^9 - THC используется для калибровки анализа были сделаны в

водный метанол (50 процентов об / об) при концентрациях в пределах от 500 пг / мл до 50 нг / мл и хранили при -20°C .

Δ^9 -(з Н) THC (12 Ки /

ммоль) и хранили при -20°C в концентрации 0,25 $\mu\text{Ки} / \text{мл}$ в водном метаноле (50 процентов объем /

объем, pH 8,6), готовый к использованию. Образец плазмы, чтобы быть проанализированы смешивали с тремя объемами метанола, встряхивали и оставляли стоять в течение 30 мин. Затем смесь центрифугировали и супернатант добавляли непосредственно к пробирок. Нормальная человеческая плазма аналогичным образом обрабатывали использовали в общей сложности,

неспецифическое связывание и нулевое связывание трубок и анализ разведения. Плазмы экстракт (100 μ л) смешивали с радиоактивной (50 μ л), 50 процентов объема / объем метанол (100 μ л), а антисыворотка (100 μ л). Конечный объем пробы доводили до 600 μ л с помощью буфера и метанола с получением конечной концентрации метанола 25 процентов об / об. После перемешивания растворов оставляли стоять при комнатной температуре в течение 1 часа. Декстран-древесный уголь с покрытием (200 μ л, pH 7,4) добавлял ли, пробирки центрифугировали, и через 2 минуты времени контакта Супернатант (500 μ л) из каждой пробирки подсчитывают. Образцы мочи были обработаны аналогичным образом. Все анализы были выполнены в двух экземплярах.

Высокоэффективная жидкостная CHROMATOGRAPHY- для радиоиммуноанализа

Постоянный поток насоса (M-6000A Waters Associates, Milford, Mas- sachusetts, США) использовали для доставки метанол-вода элюента в колонку из нержавеющей стали ВЭЖХ (10 см \times 4,6 мм ID) Суспензия-упакованы с Spherisorb- 5-СОД (фаза сепарация, Флинтшир, Большой Brit- AIN). Образцы вводили в колонку ВЭЖХ с шести- инжекционного порта клапана (Спектроскопия аксессуаров, Sidcup, Великобритания), снабженной петлей инъекции на 10 мл. Колонка элюат либо контро- лем с ультрафиолетовым (УФ) детектора при длине волны 280 нм (Cecil CE212) или собирают с помощью коллектора фракций Струэрс Samplomat (Camlab, Кембридж, Великобритания). Freezedrier (модель SB4, Chemlabora- Тори инструменты, Ilford, Великобритания) использовал для удаления растворителей.

Плазма (0,2-1 мл) смешивают с тремя объемами метанола, встряхивали, оставляли стоять в течение 30 мин и центрифугировали. Надосадочную жидкость удаляли, остаток смешивают с метанолом и образцом снова центрифугировали. Вода добавляла к объединенным супернатантам с получением концентрации метанола 50 процентов (об / об). Моча (0,1-3 мл) смешивали с метанолом и метанол-вода (50:50) буфер (0.1M уксусной кислоты доводили до pH 5,5 с помощью гидроксида натрия) с получением конечного объема 6 мл и концентрацию метанола 50 процентов об / об. Метаболита в моче конъюгаты подвергали гидролизу, добавляя равный объем метанольного гидроксида натрия (1 M) в моче, вакуумирование сосуд, чтобы удалить кислород и оставляя при комнатной температуры в течение 30 минут. Достаточная уксусную кислоту затем добавляли с получением pH 5,6, и объем доводили до 6 мл с мета- нол-вода (50:50) буфера (pH 5,5).

Экстракт плазмы и негидролизованые или гидролизованые образцы мочи, обработанные, как указано выше, были затем вводили в колонку ВЭЖХ с инжектором контура. Была использована программа активизировали растворитель элюции:

10 мл смеси метанол-вода (50:50), 10 мл смеси метанол-вода (62,5: 37,5), 20 мл смеси метанол-вода (72,5: 27,5) при скорости потока 1 мл / мин. Фракции элюата отбирали каждые 30 секунд, и подвергали лиофилизации. Freezedrier продували аргон до и после сушки, чтобы предотвратить окисление атмосферного чувствительных метаболизируемых Lites. Раствор

Δ^9 -(3 H) THC (0.025 μ Ci в 500 μ л смеси

methanoldiluent буфер, 30:70) добавляли в каждую из высушенных трубок с раствором **антисыворотки в буфере для разбавителя (100 μ л 1: 300 анти- раствора сыворотки)**. Неспецифическое связывание трубки получали разбавитель буфера вместо раствора антисыворотки. Последующее РИА просе- Дюре был таким же, как описано выше.

Каннабиноидов удерживаемые объемы были определены путем мониторинга элюата либо RIA для кросс-реагирующих соединений, или УФ-поглощением (280 нм) для **не-перекрестно-реагирующих соединений. требуется УФ-детектирование μ г величина по сравнению с нг количествами, необходимых для обнаружения RIA.**

Хромато-масс спектрометрия

Внутренний стандарт (5' , 5' , 5'-₂ ЧАС₃ - Δ^9 -¹THC, 10 нг) в метаноле

добавляют к пробе плазмы (1 мл) и смесь экстрагировали с помощью метанола, как описано выше. Экстракт плазмы подвергали хроматографии с использованием колонки ВЭЖХ выше и в качестве элюента смеси метанол-вода (67,5: 32,5). THC фракция (удерживаемый объем 20 мл) трудов собраны, лиофилизировали и остаток растворяли в гексане. Инъекции были сделаны в Pyc 104 GC с использованием 3 процента OV-17 колонку (0,3 м × 2 мм ID, Газ Chrom Q, 80-100 меш) при 190 ° C, когда THC имел время удерживания 4 мин с потоком гелия скорость 20 мл / мин. Масс-спектрометр Micromass В.Г. 16F был использован в режиме обнаружения ионов множественного, настроенном на ионы т / г 299 и 314 для THC и 302 и 317 для три-дейтерированного THC. Концентрации в плазме THC были рассчитаны из отношения интенсивностей ионов для THC и меж- конечного стандарта, используя предварительно подготовленный градуировочный график.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Антисыворотки использовали в этом исследовании, не вступают в перекрестную реакцию с 44 **каннабиноидных препаратов в концентрации 400 μ г / мл в плазме крови и, следовательно, очень селективный для каннабиноидов.** Это, однако, перекрестное реагирует с рядом каннабиноидов (таблица 1). Незначительные модификации молекулы в 8, 9 или 11 позиции не изменяют перекрестную реактивность существенно, так что антисыворотка может быть использована для измерения THC, или любые из метаболитов, образованных изменений на 8, 9 или 11

позиции, либо в плазме или моче. Уровень кросс-реакции кристалла нормально, полученные для заготовки плазмы в области 4 нг / мл, причем только в исключительных случаях быть выше, чем 9 нг / мл. Надосадочная сыворотка из посмертного образца крови, который грубо haemolysed дает близкие значения, так что соответствующий уровень отсечки для положительного результата составляет около 5 нг / мл. Образцы мочи имеют гораздо более низкий уровень отсечки (1 нг / мл) и только в исключительных случаях, например, если большое количество неорганического антибактериального консерванта добавляется, может быть выше этого уровня.

Таблица 1. Поперечной Реактивность Δ^9 -THC Метаболиты и Аналоги в Радиоиммунологическом

каннабиноидов	Количество required на 50% депрессии связывания (нг)
Δ^9 -THC	0.6
Δ^8 -THC	0.6
CBN	0.6
11-Hydroxy- Δ^9 -THC	0.6
Δ^9 -THC-11-oic acid	0.6
11-Hydroxy-CBN	0.6
CBN-11-oic acid	0.6
Hexahydro-CBN	0.6
Δ^9 ,11-THC (Exo-cyclic compound)	0.6
8 α -Hydroxy- Δ^9 -THC	0.6
8 β -Hydroxy- Δ^9 -THC	3.0
8 α ,11-Dihydroxy- Δ^9 -THC	2.0
8 β ,11-Dihydroxy- Δ^9 -THC	9.0
1'-Oxo-CBN	3.0
1'-Hydroxy-CBN	10
5'-Hydroxy- Δ^9 -THC	30
CBD	>50
Cannabicyclol	>50
Cannabichromene	>50
Cannabigerol	>50

Уровни в плазме каннабиноидов, определяемые прямым RIA, для волонтеров, которые курили 10 мг THC были в возрасте от 70 до 6 нг / мл в течение 2-часового периода исследуемого. В таблице 2 приведены результаты для одного курильщика, который был пользователем каннабис и имел THC метаболитов в плазме его перед началом эксперимента.

Таблица 2. Плазменная концентрации Δ^9 -ТНС в Subject
 Кто выкурил 10 мг Δ^9 -ТНС Измеряется
 РИА, ВЭЖХ-РИА и ГХ-МС

Время после курение (мин)	Концентрация в плазме		Δ^9 -ТНС (нг / мл)
	Прямая РИА *	ГХ-МС	ВЭЖХ-РИА
0	23**	0	0
2	67	55	47
12	48	18	15
24	47	9	7
34	48	8	5
64	47	5	3
126	48	2	1

* Эти значения включены вклады от ТНС метаболитов.

** Предмет был пользователем марихуаны и этот уровень представляет собой уровень каннабиноидов присутствующих в его плазмы перед началом эксперимента.

Результаты, полученные с помощью метода ГХ-МС указывают, что ни один ТНС не присутствовал в начале эксперимента и на высоком уровне (55 нг / мл) получали через 2 минуты после прекращения курения. Уровень постепенно снизился до 2 нг / мл в течение 2-часового периода. В Результаты прямых РИА, однако, не показывают ту же падение, так как через 2 часа плазма все еще имели уровень 48 нг / мл перекрестно реагирующими каннабиноидов. Большая часть ТНС оставил плазму к этому времени, но все еще был заметный уровень его метаболитов перекрестно реагирующих в РИД.

Метод ВЭЖХ-РИА можно отделить и индивидуально количественной оценки этих перекрестно реагирующих метаболитов, и на рисунке 1 показана ВЭЖХ-РИА хроматограмма образца плазмы, принятым 13 минут после того, как VOL-unteer закончил курить сигарету, содержащую ТНС. Несмотря на то, есть еще некоторые ТНСы присутствуют, были также перекрестны реагирующими соединения, элюирующиеся при объемах удерживания моно- и ди- гидроксированных метаболитов, с наибольшим вкладом, поступающим из соединений с объемом элюции 10,0 мл, которых соответствуют областям ТНС-LL-овая кислота и ее сложный эфир глюкуронид.

Объемы удерживания ТНС, его метаболитов и других cannabinooids приведены в таблице 3. Количество любого из соединений может быть получено путем интегрирования отдельных точек на пике

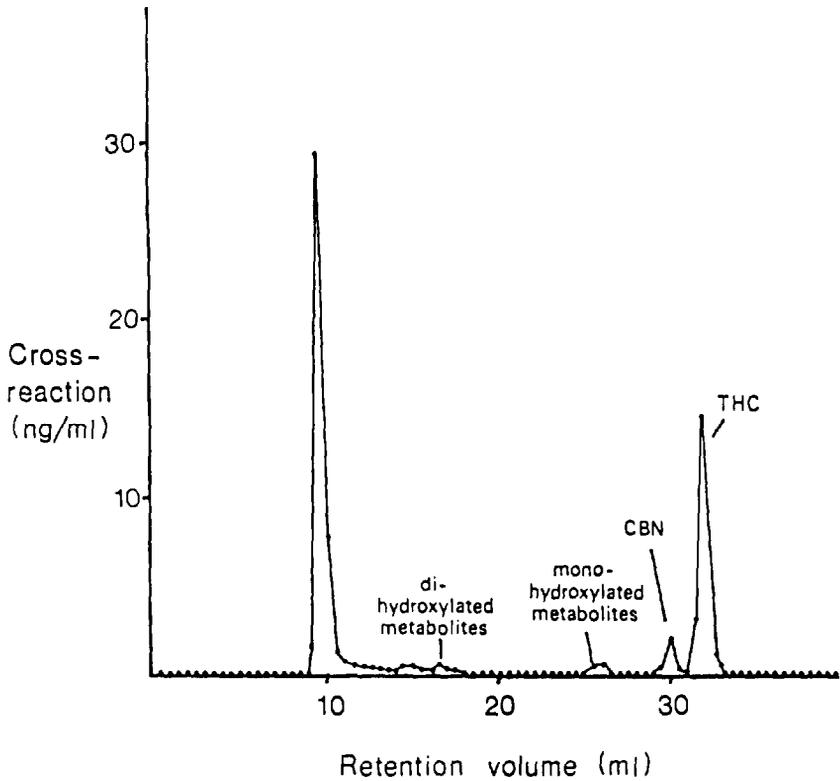


Рисунок 1. ВЭЖХ-хроматограмма РИА образца плазмы от субъекта, взятого 13 минут после курения 10mg Δ^9 -THC. Объемы удерживания THC, CBN, тем моно-гидроксилуют метаболиты и ди-гидроксилуют метаболиты отмечены.

дать общий вклад для этого соединения. Таким образом, при использовании метода ВЭЖХ-РИА используется для количественного определения THC в плазме образцы на очень хорошее согласие с результатами СС-МС получается (таблица 2), так как оба метода измерения теперь один и тот же ком- фунт (THC) без каких-либо других каннабиноидов интерферирующих в анализе.

Обнаружение курения каннабиса человека, который habit- ually использует каннабис гораздо легче, когда моча анализируется RIA, поскольку уровни перекрестно реагирующими каннабиноидов гораздо выше, чем в плазме. Например, одна копченые доза 10 мг THC еще давали уровни 49 нг / мл перекрестно реагирующих каннабиноидов в моче через 24 часа после курения (таблица 4), хотя следует отметить,

Таблица 3. Объемы удерживания каннабиноидов по
Обращенно-фазовой ВЭЖХ

каннабиноидов	удерживаемый объем (мл)
Δ^9 -THC-11-oic acid	10.0
CBN-11-oic acid	10.0
8β , 11-Dihydroxy- Δ^9 -THC	16.5
8α , 11-Dihydroxy- Δ^9 -THC	17.0
8β -Hydroxy- Δ^9 -THC	20.5
1'-Hydroxy-CBN	22.5
11-Hydroxy- Δ^9 -THC	25.5
11-Hydroxy-CBN	25.5
8α -Hydroxy- Δ^9 -THC	25.5
1'-Oxo-CBN	29.0
CBN	30.0
Δ^8 -THC	31.0
Δ^9 -THC	31.5

Таблица 4. Концентрации мочи Δ^9 -THC Метаболиты в субъекте
Кто выкурил 10 мг THC Измеряется RadiImmunoassay

Время после курить (ч)	РИА кросс- реакция (нг / мл)	объем мочи (Мл)	Всего кросс- реагирующий материал (Мкг / ч)
0	35*	132	—
1	117	111	13.0
2	142	34	4.8
3	125	56	7.0
4	145	44	6.4
6	135	38	2.6
8	78	113	4.4
24	49	600	1.8

*Предмет был пользователем марихуаны; этот уровень представляет уровень каннабиноидов, присутствующих в моче до начала эксперимента.

что эта тема, пользователь марихуаны, начал эксперимент с уровнем 36 нг / мл.

Когда негидролизованного образец мочи хроматографируют в нейтральных условиях и элюат анализируют с помощью ВЭЖХ, только один пик видно, что имеет объем удерживания 10 мл. Это соответствует

THC-11-овая кислота и ее сложный эфир глюкуронид. Когда образец хй drolused в условиях, описанных выше, и анализировали с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с использованием кислотного элюента (pH 5,5) для высокоэффективной жидкостной хроматографии, три кросс-реагирующие CAN- nabinoids видны (рисунок 2).

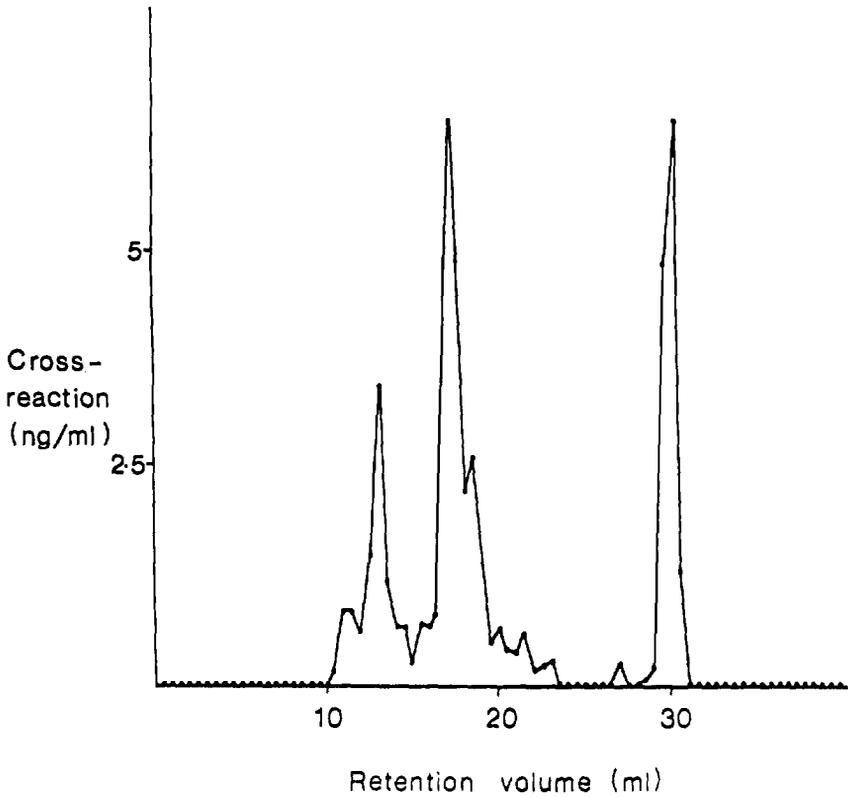


Рисунок 2. ВЭЖХ-хроматограмма РИА гидролизованного образца мочи из лица, подозреваемого в копченой коноплю.

Первый пик (удерживаемый объем 13,5 мл) представляет собой глюкуронид эфира THC-11-овой кислоты, второй пик (удерживаемый объем 16,6 мл) THC-11-овая кислота, и третий пик (удерживаемый объем 30 мл) является метиловый эфир THC-11-овой кислоты. Идентичность всех трех пиков были установлены с помощью ГХ-МС. Преобладающим THC метаболитов в моче, как детектировано с помощью антисыворотки, используемой в данной работе, является там- передняя глюкуронидном эфира THC-11-овой кислоты. В условиях гидролиза, используемого выше, этот глюкуронид подвергается переэтерификации до метилового эфира THC-11-овой кислоты, который затем гидролизуют до

свободная кислота. Три пика могут быть использованы в качестве подтверждения наличия каннабиноидов в пробе мочи таким же образом, как derivatives используются для доказательства идентичности в ГХ анализов. В некоторых случаях может потребоваться более быстрый анализ мочи, и в этом случае может быть сделаны более энергичным условие гидролиза (100 ° C в течение 15 мин, используя равное количество оГО гидроксида натрия в метаноле), когда пик глюкуронид полностью гидролизованый или transesteri - Fied и метиловый эфир полностью гидролизуют с получением одного пика в ВЭЖХ-хроматограммы RIA для THC-11-овой кислоты (16).

Так как антисыворотка используется в данном исследовании, очень селективная для каннабиноидов, РИА может быть использовано для обнаружения неправильного использования конопли в фокусирует gensis случаев путем скрининга сыворотки, плазмы, гемолизирующая крови или мочи на присутствие каннабиноидов. Те, которые являются отрицательными, могут быть представлены как таковые, в то время как те, которые являются положительными, могут быть проанализированы с помощью процедуры ЖХВРА-РИА. Мало того, что это дает дополнительные доказательства наличия каннабиноидов, но это дает возможность каждому каннабиноидов быть идентифицированы и количественно. Три-летний опыт использования этого метода показал, что уровни THC в крови Плес образцы на представленную для судебных анализов, как правило, очень низкие, в то время как уровни глюкуронида эфира THC-11-овых кислот гораздо выше. Это является дополнительным основанием для использования относительно неселективной антисыворотки, чтобы обнаружить все каннабиноиды в то время, используя процедуру ВЭЖХ, чтобы отделить их. Применение этого метода к анализу каннабиноидов в смертельно травмированных водителей было Отчет- издание (17), равно как и его использование для анализа образцов, представленных для судебно-медицинской экспертизы (18).

БЛАГОДАРНОСТЬ

Мы благодарим профессора JW Thompson (Университет Ньюкасл-апон-Тайн) для подачи в плазме крови и мочи от THC курильщиков; Д-р С. Agurell и г-жа А. Олссон (Астра Lakemedel, Sodetalje, Швеция) для образцов дейтерированном THC; Д-р JD Тил (Университет Суррея) для сывороток; и д-р RE Willette (Национальный институт по борьбе со злоупотреблением наркотическими средствами) для образцов каннабиноидов и их метаболитов.

РЕКОМЕНДАЦИИ

1. JD Тил, EJ Forman, LJ Кинг и В. Маркс. Получение антител к тетрагидроканнабинолу в качестве основы для радиоиммуноанализа. *Природа (Лондон)*, 249, 154-155 (1974).

2. JD Тил, EJ Forman, LJ King, EM Piall и В. Маркс. Развитие радиоиммуноанализа для каннабиноидов в крови и моче. *J. Pharm. Pharm. Chem.*, **27**, 465472 (1975).
3. SJ Gross, JR Соарес, SL.R. Вонг и RE Шустер. Merihueene метаболитов, измеренные с помощью метода радиоиммунного. *Природа (Лондон)*, **252**, 581-582 (1974).
4. CE Кук, ML Хоуз, EE Amerson, CC Питт и Д. Уильямс. Radioimmun- oassay из Δ^9 -тетрагидроканнабинол. В RE Willette (ред.), *Каннабиноидов в Assays Люди*, Национальный институт по борьбе со злоупотреблением наркотических средств Исследовательской монографии 7, DHEW Pub. Номер (ADM) 76-339, Зирь. из Docs., США правительственных служб. Распечатать. Off., Вашингтон, округ Колумбия, 15-27 (1976).
5. А. Р. Чейза, PR-Келли, А. Тонтон-Ригби, Р. Т. Джонс и Т. Харвуд. Тащи количественно каннабиноидов в биологических жидкостях с помощью радиоиммуноанализа. В RE Willette (ред.), *Каннабиноидов Анализы у человека*, Национальный институт по борьбе со злоупотреблением наркотических средств Исследовательской монографии 7, DHEW Pub. Номер (ADM) 76-339, Зирь. из Docs., США правительственных служб. Распечатать. Выкл., Вашингтон, н-9 (1976).
6. CE Кук. Радиоиммунологическая из сепнеbinoid соединений. В JA Винсон (объявление.), *Анализ каннабиноидов в физиологических жидкостях*, Американское химическое общество, Вашингтон, округ Колумбия, 137-154 (1979).
7. SJ Гросс и JR Суарис. Отдельный радиоиммунный measurements из тела THC жидкости и 11-нор-9-карбоксит-THC. В RE Willette (ред.), *Каннабиноидов Анализы у человека*, Национальный институт по борьбе со злоупотреблением наркотических средств Исследовательской монографии 7, DHEW Pub. Номер (ADM) 76-339, Зирь. из Docs., США правительственных служб. Распечатать. Выкл., Вашингтон, округ Колумбия, 10-14 (1976).
8. JD Тил, JM Кло, LJ Кинг, В. Маркс, П. Л. Уильямс, и AC Moffet. Антисыворотки тетрагидроканнабинола в радиоиммуноанализе каннабиноидов. В JA Винсон (ред.), *Анализ каннабиноидов в физиологических жидкостях*, Американское химическое общество, Вашингтон, округ Колумбия, 155-173 (1979).
9. JL Валентина, OHM Gan, HC Нью и ED Томпсон. ВЭЖИ анализ тетрагидроканнабинол и 11-нор Δ^9 - Δ^9 -тетрагидроканнабинол-9-карбоновая кислота в плазмы крови человека. В JA Винсон (ред.), *Анализ каннабиноидов в физиологических жидкостях*, Американское химическое общество, Вашингтон, округ Колумбия, 175-205 (1979).
10. SR Аббот, JR Борг, КО Леффлера, С. Kantar, Л. Холлистер. JH Abrams, HL Барась и RT Jones. ВЭЖХ-анализ Δ^9 -тетрагидроканнабинол и метаболизируемые Lites в биологических жидкостях. В JA Винсон (ред.), *Каннабиноидов анализ в физио- логических жидкостей*, Американское химическое общество, Вашингтон, округ Колумбия, 115-136 (1979).
11. JL Валентина, PJ Bryant, PL Guttschall, OHM Gan, ED Thompson, и HC Нью. определение ВЭЖХ-МС Δ^9 -тетрагидроканнабинола в организме человека жидкостей. В RE Willette (ред.), *Каннабиноидов Анализы у человека*, Национальный институт по борьбе со злоупотреблением наркотических средств Исследовательской монографии 7, DHEW Pub. Номер (ADM) 76-339, Зирь. из Docs., США. Правительственные службы. Распечатать. Выкл., Вашингтон, округ Колумбия, 96-106 (1976).
12. ЭР Гаррет, AJ Gouyette, и СА охота. ГЖИ и ВЭЖИ анализ сanna- binoids в биологических жидкостях и приложениях. В JA Винсон (ред.), *Анализ каннабиноидов в физиологических жидкостях*, Американское химическое общество, Вашингтон, округ Колумбия, 13-37 (1979).
13. ЭР Гаррет и СА Хант. Разделение и чувствительным анализом THC в биологических жидкостях с помощью ВЭЖХ и ГЖХ. В RE Willette (ред.), *Каннабиноидов Анализы у человека*, Национальный институт по борьбе со злоупотреблением наркотических средств Исследовательской монографии 7, DHEW Pub. Номер (ADM) 76-339, Зирь. из Docs., США правительственных служб. Распечатать. Выкл., Вашингтон, округ Колумбия, 33-41 (1976).
14. PL Williams, AC Moffet и LJ King. Комбинированная высокоэффективная жидкостная хроматография и radioimmunoessay метод quantitetion тетрагидроканнабинола и некоторые из его метаболитов в Δ^9 -плазме крови человека. *J. Chroma- togr.*, **155**, 273-283 (1978).

15. PL Williams, AC Моффат и LJ King. Комбинированная высокоэффективная жидкостная хроматография и радиоиммуноанализ метод анализа тетрагидроканнабинола метаболитов в моче человека. *J. Chromatogr.*, **186**, 595-603 (1979).
16. В. Закон. Неопубликованные наблюдения.
17. JD Teele, JM Кло, LJ Кинг, В. Марк, П. Л. Уильямс, и AC Moffet. Заболеваемость каннабиноидов в смертельно травмированных водителей: исследование с помощью радиоиммуноанализа и жидкостной хроматографии высокого давления. *J Forens. Sci. Soc.* **17**, 177-183 (1977).
18. В. Закон, PL Williams, и AC Моффат. Обнаружение и количественное определение каннабиноидов в крови и моче с помощью РИА, ВЭЖХ / RIA и ГХ / МС. *Ветеринарный и человеческий Toxicol.*, **21**, 144-147 (1979).

АВТОРЫ

Энтони С. Моффат и Питер Л. Уильямс

Министерство внутренних дел, Центральный Научно-исследовательский институт, Aldermaston,

Чтение, Berks RG7 4PN, Великобритания Laurence J. King

Отдел биохимии Университета Суррея,

Гилфорд, Суррей GU2 5XH,

Великобритании британской короны

Copyright

EMIT Анализ на каннабиноидов в моче метаболита

MJ Делорентис, К. Макнейл, А. Манн, С. Кларк, и Елена М. Greenwood

ВВЕДЕНИЕ

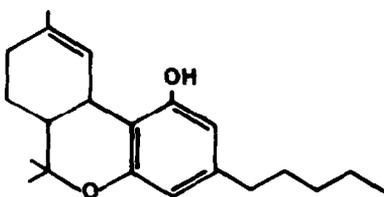
Анализ для обнаружения каннабиноидов метаболитов в моче были разработаны для применения в качестве скринингового теста для использования марихуаны. Метод, используемый был однородный иммуноферментный анализ (EMIT), не-изотопный метод иммуноанализа впервые описан для измерения морфина в моче (1). Иммуноанализа использует фермент в качестве метки. Когда антиген, который необходимо анализировать конъюгирует с ферментом, активность фермента может быть модифицирована путем связывания антитела. Это формирует основу анализа, где активность фермента прямо пропорциональна концентрации свободного антигена. Четыре ен-зимов были использованы при разработке лекарственных средств для анализов, как в моче и сыворотке, для эндогенных гаптенос и более гесепт- л для белков сыворотки; эти применения метода были рассмотрены в другом месте (2,3).

Дальнейшее применение методики, с помощью МДГ, конъюгированного с производным Δ^9 -тетрагидроканнабинол (Δ^9 -THC), имеет demonstrated, что процедура одинаково полезна при определении каннабиноидов в моче. Свины сердце митохондриальной малат dehydrogen- аза (МДГ) EC 1.1.1.37 был выбран для разработки анализа THC из-за его доступности и легкости обнаружения. Это, вместе с антитела, индуцированные у овец, позволило развитие быстрого, чувствительного и специфического анализа, где всего лишь 20 нг THC вместе с его метаболитов могут быть обнаружены в 1 минуте spectrophoto- метрики измерения.

РАЗРАБОТКА ТЕСТА

Для того, чтобы разработать анализ, который бы обнаружить наиболее часто встречающиеся каннабиноиды метаболитов в моче, антитело, индуцированные против молекулы дериватизированной в точке, общей для многих таких метаболитов. Основные метаболиты полагают, присутствует в моче, показаны на рисунке 1. Нужный кислота (I) было

Primary Psychoactive Drug - Δ^9 -THC



Urinary Metabolites

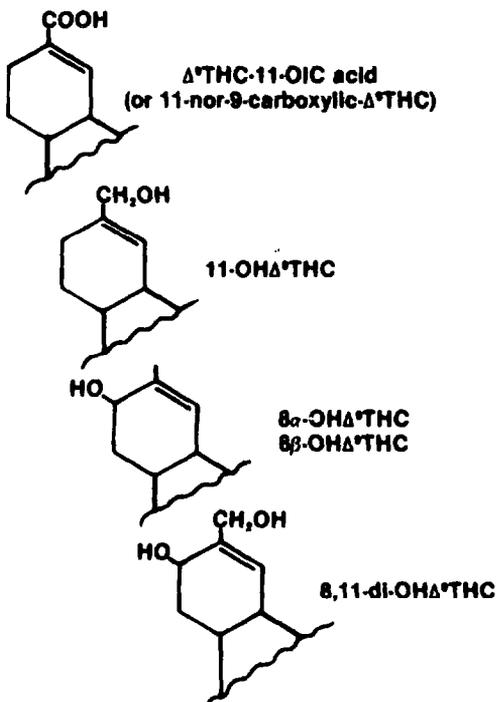
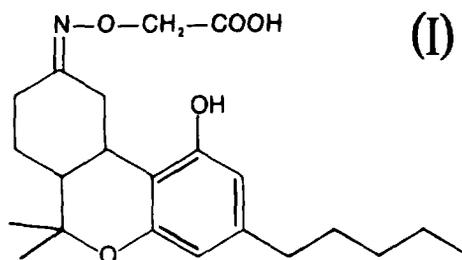


Рисунок 1. Структуры

Δ^9 -THC и метаболиты полагают, присутствует в моче.

получают по методике, описанной ранее (4) и был conjugat- ред с ферментом, свиньи сердца малатдегидрогеназы. Механизм ингибирования гаптена конъюгаты MDH ранее информация дается в иммуноанализе для морфина (5). Антитела к CAN-pabinoid метаболитов были получены от овец путем иммунизации крупного рогатого скота гамма-глобулин конъюгат кислоты (I).



Когда Δ^9 -THC производные кислот конъюгировали с MDH и смешивают с избытком антител, 60% ингибирование активности фермента привело. Это ингибирование может быть отменено путем добавления возрастающих количеств

Δ^9 -THC кислоты таким образом, чтобы можно было разработать Анализ, в котором концентрация лекарственного средства прямо пропорциональна активности конъюгата MDH. С помощью спектрофотометра, скорость фермента с последующим при 340 нм путем измерения скорости превращения кофермента НАД в НАДН.

Протокол анализа

Использование Syva Model 1500 пипетка / разбавителя, 50 μ л образца мочи поступает в кювету для образца с 250 μ л буфера, который содержит субстрат фермента, яблочная кислота. Путем последовательного добавления

1) 50 μ л реагента антитела, который содержит антитела к THC производного и кофермент никотинамидадениндинуклеотида (NAD), вместе с 250 μ л буфера и 2) 50 μ л ферментного реагента плюс 250 μ л буфера для анализа, конечная реакционная смесь производится.

Смесь отсасывают в проточную ячейку спектрофотометра, где скорость фермента измеряют при 30 ° C в течение 30 секунд последовавших 15-секундная задержка.

Активность фермента пропорционально уменьшена, когда меченый препарат в сочетании с антителом; активный фермент преобразует NAD к NADH, что приводит к изменению оптической плотности, которая измеряется спектрофотометрически при длине волны 340 нм.

калибровка

Три испускают калибраторов используются в анализе; Negативный калибратора не содержит лекарственное средства (0,0 нг / мл) и низкие (20 нг / мл) и Medium (75 нг / мл) калибраторы содержат производные лекарственное средство, 11-нор

Δ^9 -THC Carboxylic кислоты. поскольку Δ^9 -THC кислоты трудно как для изо- поздно и подготовить, Δ^9 -THC был выбран в качестве калибратора для анализ. Δ^9 -THC кислота является более доступной, чем Δ^9 -THC кислота, и он обладает практически идентичной иммунохимической реактивностью в этой системе.

Для положительной / отрицательной интерпретации, Отрицательные (0,0 нг / мл), и низкие используются (20 нг / мл) калибраторы. Разность между скоростью, наблюдаемой для отрицательного калибратора и скорости, наблюдаемой для Low калибратора используются в качестве эталона, который позволяет дифференциацию образцов мочи, не содержащие детектируемый препарата из тех, которые содержат лекарственное средство. Низкий калибратор (отсечение) содержит пред- определено количество производного лекарственного средства, которое гарантирует, что по меньшей мере 96% всех образцов, содержащих уровни каннабиноидов, равных или превышающих предела обнаружения пробирного (50 нг / мл) дают ответ поло- TIVE, и по меньшей мере 96% образцов, не содержащих cannabin- OID, дать ответ меньше, чем у калибратора.

Для того, чтобы проверить на наличие или отсутствие каннабиноидов в моче, это было необходимо, чтобы выбрать этот конкретный минимум чтения (отсечку), выше которой образцы могут быть идентифицированы как положительные. Для EMIT каннабиноидов анализа отклика Low калибратора (номинальные концентрация 20 нг / мл) служит в качестве отсечки, так как было найдено, чтобы дать частоту, которая эффективна различие между образцами, содержащих 60 нг / мл и образцами, содержащими нет наркотиков. Это было под- тверждается опробование 60 образцов, известных быть отрицательными для THC, как до, так и после того, как пики каждого из них с 60 нг / мл

Δ^9 -THC acid.

Результаты, при построении графика в виде гистограммы, показывают разделение быть промежуточные кадры две популяции, не перекрываются между положительными и отрицательными образцами (рисунок 2).

В качестве альтернативы, стандартная кривая (фигура 3) для анализа может быть получен путем нанесения показаний анализа (Δ^9 Отрицательного, Low, и средние калибраторов против концентрации на миллиметровой бумаге полулогарифмической. Полуколичественное результат может быть оценена по стандартной кривой. Из-за образец к образцу вариации и тому факту, что анализ обнаруживает определенные каннабиноидов метаболитов и новый alogs с различной чувствительностью от того препарата калибратора, SE- miquantitative результаты для положительных образцов могут быть оценены только в анализе эквивалентах.

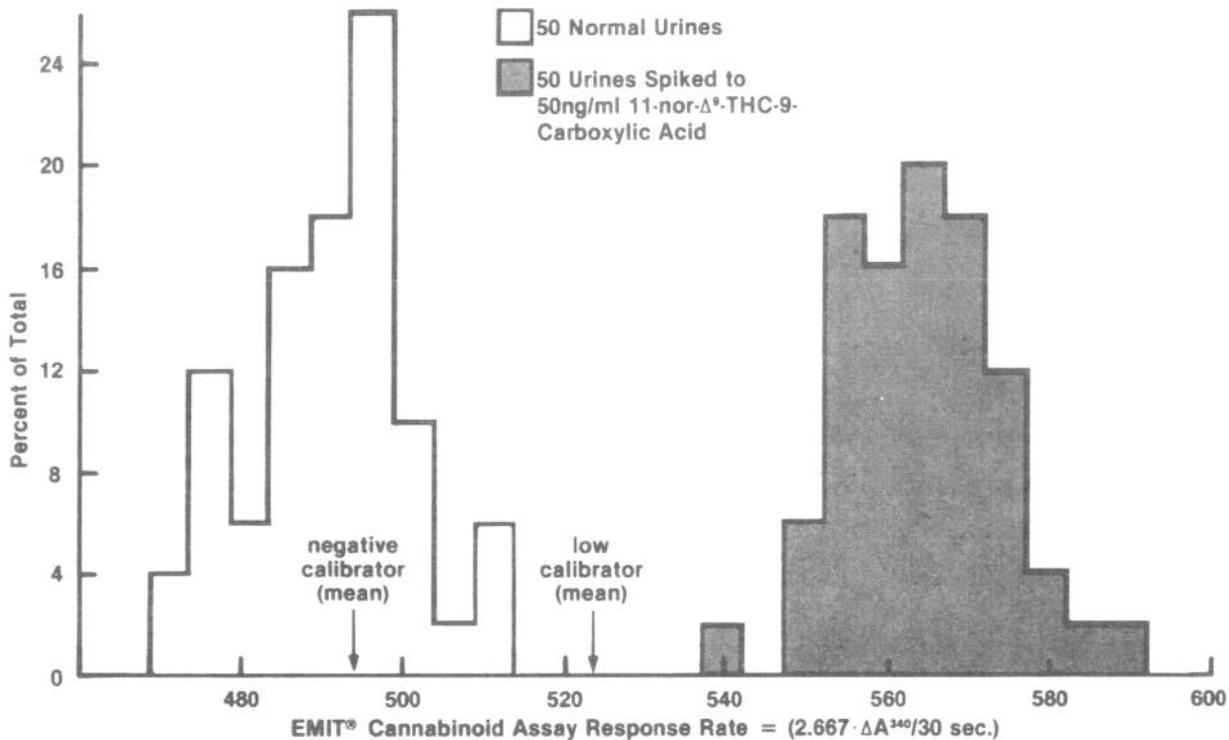


Рисунок 2. Гистограмма показывает ответ анализа THC 50 отрицательных образцов и те же образцы с шипами 50 нг / мл 11-нор- Δ^9 -карбоновая кислота.

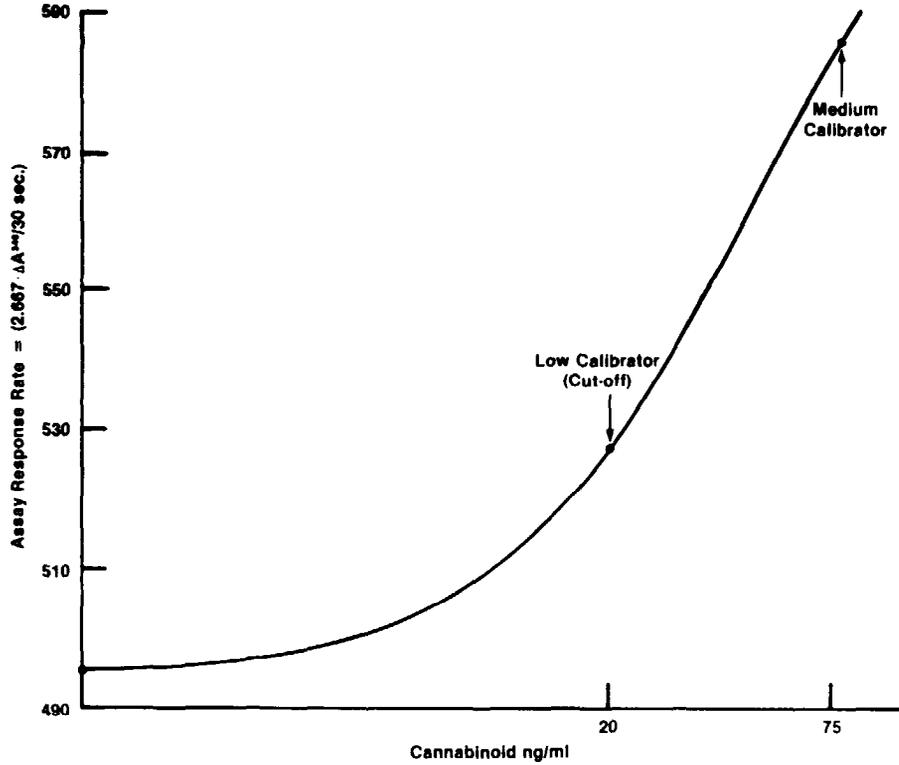


Рис. 3. Кривая для БМТ для БМТ-дана-Бсаидов Assay. Рисунок 3.

Специфичность / Перекрестная реактивность

Кросс-реактивность ЕМІТ каннабиноидов анализа для широкого спектра каннабиноидных соединений, особенно тех, как полагают, происходит в моче, был изучен при добавлении каждого соединения отрицательного пула мочи ТНС-. Используя репрезентативные много реагентов, образцы мочи анализируют с использованием протокола, описанным.

Перекрестная повторно активность определяли как концентрацию, необходимую для получения повторно sponse в анализе, эквивалентной отсечкой, 20 нг / мл



Соединения, которые были испытаны, показаны на рисунке 4.

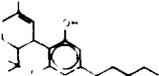
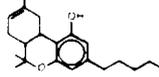
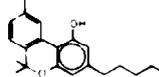
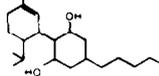
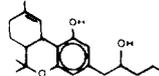
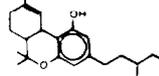
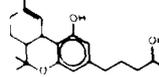
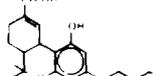
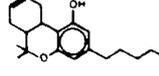
была обнаружена перекрестная реактивность общих мочевых метаболитов в анализе на высоком уровне. По сравнению перекрестной реактивности с исходным лекарственным средством,

$\Delta^9\text{-THC}$, который не обнаруживается в моче, был немного меньше.

Перекрестная реактивность между $\Delta^9\text{-THC}$ кислоты и $\Delta^9\text{-THC}$ кислота, используемая для калибровки анализа было установлено, что приблизительно 100%. Для изучения перекрестной реактивности анализа на различные гормоны, лекарства и их метаболиты, каждое соединение в таблице 1 было изучено тем же методом. Ни один из не-каннабиноидных соединений не тестировалось показал клинический значимую перекрестную реактивность.

Таблица 1. Non-каннабиноидов тестируемых соединений, которые производят
 Ответ Меньше чем калибратор
 (<20 нг / мл 11-нор $\Delta^9\text{-THC}$ -ТГК-9-карбоновая кислота)

Acetylsalicylic кислоты	Метадон Метаквалон
Amitriptyline амфетамина	Methyphenidate Naioxone
бензоила экгонин	РРВЗ Phencyclidine
Карбамазепин	Фенобарбитал
Хлордиазепоксид Кодеин	Phenylpropranolamine
кортизол Демерола	Primidone Прометазин
	Propoxyphene Пропранолол
	Хинидин Secobarbital
	теофиллин Thorazine
декстрометорфан	
Диазепам	
Diphenhydantoin	
Эфедрин Giutethimide	
Imipramine Medazapan	

Compound	Structure	Concentration Yielding Response Equivalent to 20ng/ml Δ^9 -THC-9-Acid
Δ^9 -THC		66ng/ml
Δ^9 -THC		71ng/ml
Cannabinol (CBN)		191ng/ml
Cannabidiol (CBD)		1400ng/ml
2'-OH- Δ^9 -THC		302ng/ml
3'-OH- Δ^9 -THC		271ng/ml
4'-OH- Δ^9 -THC		112ng/ml
11-OH- Δ^9 -THC		19ng/ml
11-OH- Δ^9 -THC		24ng/ml

Compound	Structure	Concentration Yielding Response Equivalent to 20ng/ml Δ^9 -THC-9-Acid
1'2'3'4'5' Penta-nor Δ^9 -THC-3-COOH		>10 μ g/ml
1'2'3'4'5' Penta-nor CBN-3-COOH		>10 μ g/ml
11-nor-CBN-9-COOH		39ng/ml
8 β -11-diOH- Δ^9 -THC		38ng/ml
1'-OH-CNB		>10 μ g/ml
8 β -diOH- Δ^9 -THC		32ng/ml
11-nor- Δ^9 -THC-9-COOH		22.6ng/ml
11-nor- Δ^9 -THC-9-Acid		20ng/ml

Рисунок 4. Перекрестная реактивность представительной партии реагента к различным каннабиноидам соединения.

КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Курение Исследование

В контролируемом исследовании с использованием испускают каннабиноидных Пробирной, три мужчины и три женщины предметы, все обычные пользователи марихуаны, ab- окрашивали от курения в течение по крайней мере 6 дней (10 дней максимум). Каждый субъект затем курил две сигареты марихуаны, каждый из которых содержит 9 мг ТНС, в течение 2-часового интервала. Мочевые каннабиноидов уровни были проверены в течение следующего 10-дневного периода (цифры 5 и 6), в течение которого субъекты воздерживались от дальнейшего использования марихуаны.

Как можно видеть из фигур 5 и 6, данные из контролируемого исследования свидетельствуют о том, что в моче каннабиноидов уровней постоянных пользователей марихуаны, мужской и женский пол, могут быть свыше 20 нг / мл в течение 4-х до 10 и более дней после курения. Хотя каннабиноиды уровней, обнаруженные при анализе ЕМІТ каннабиноидов были самыми высокими в Ве- очистки хлопка исследования, не представляется возможным провести различие между недавним использованием (в течение 24 часов) и нечастые использования (до 10 дней).

Специфичность исследование

Для оценки потенциального анализа для перекрестной реакции в связи с не- ТНС метаболитов наркотиков, клинические исследователи попросили анализ, как много образцов, как это возможно, что было известно, содержат препараты или другие, чем ТНС метаболитов наркотиков (рисунок 7). Наличие или отсутствие каннабиноидов в этих образцах не было подтверждено не-иммунохимическим

техника.

Как видно из рисунка, как представляется, не будет никакой корреляции между образцами положительными для каннабиноидов и образцов, положительных в отношении других препаратов, подразумевая, что ни один перекрестный не существует между этими соединениями. В случае спирта, сульфасалазин, и мепробамат, наблюдались только образцы положительные для обоих ТНС и лекарственного средства. Количество образцов был небольшим, однако, и не со- ключения в отношении потенциальной перекрестной реактивности с этими соединениями и / или их метаболитов не должно быть сделано. Нет подтверждения о наличии или отсутствии ТНС метаболитов не было выполнено на этих образцах.

Соединения, появляющиеся не вызывать помехи с ЕМІТ каннабиноидов анализа включают метадон, кокаин, морфин, РСР, барбитураты, амфетамины, опиаты и бензодиазепины.

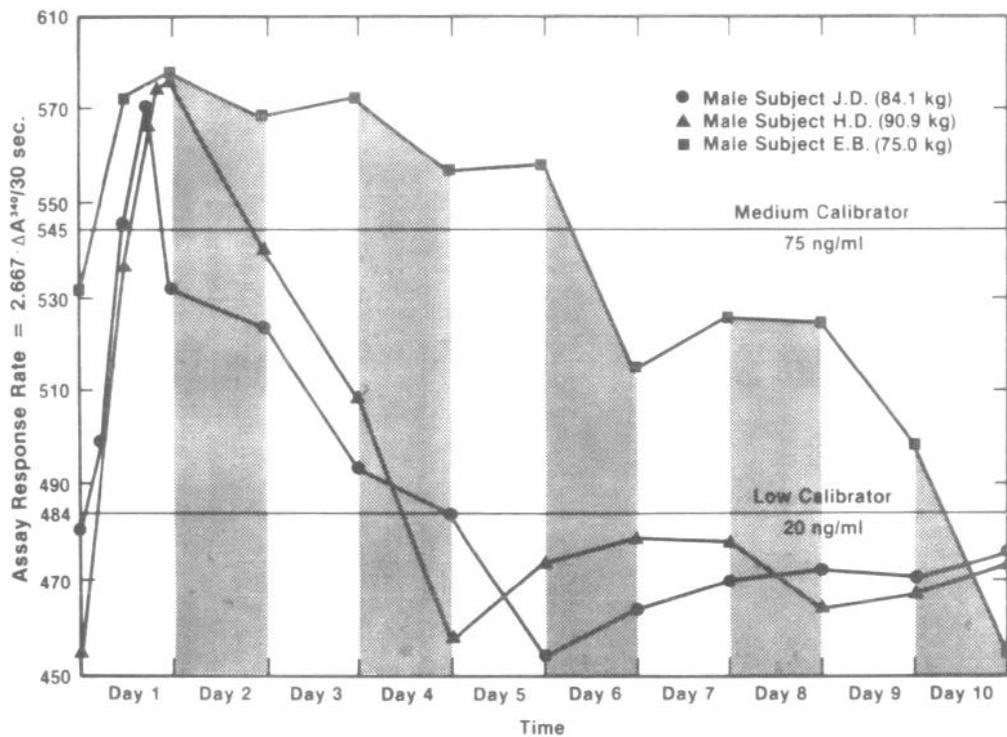


Рисунок 5. Исследование курения каннабиноидов (мужской пол); Точки данных представляют собой ответ, полученный от образцов мочи, когда анализировали с помощью EMIT каннабиноидов Assay.

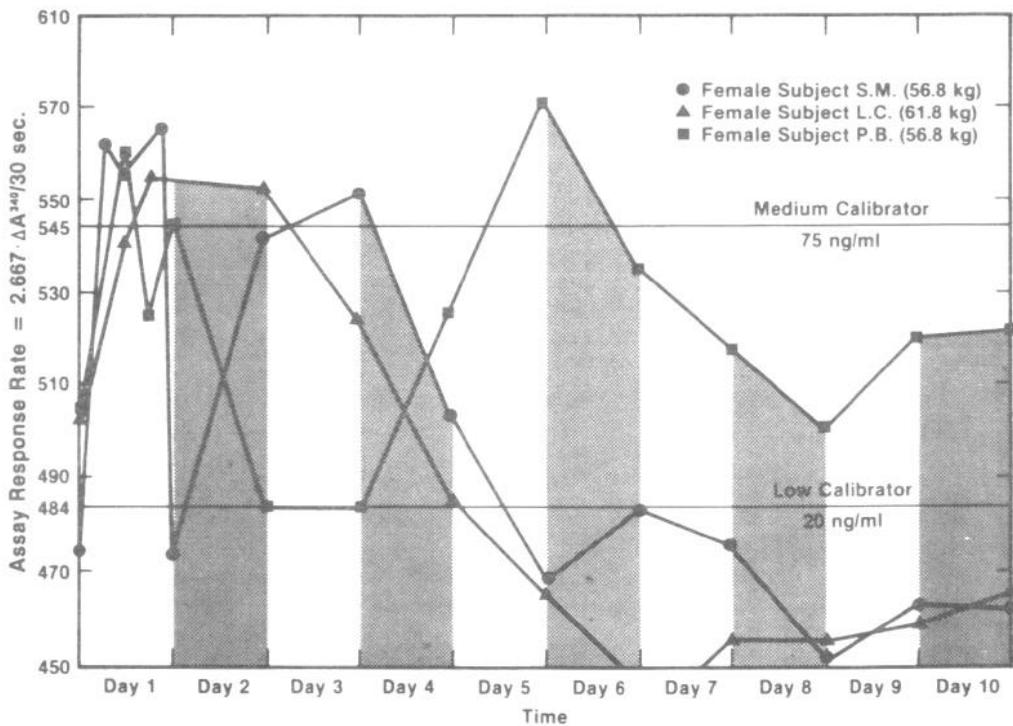


Рисунок 6. Исследование курения каннабиноидов (женские предметы); Точки данных представляют собой ответ, полученный от образцов мочи, когда анализировали с помощью EMIT каннабиноидов Assay.

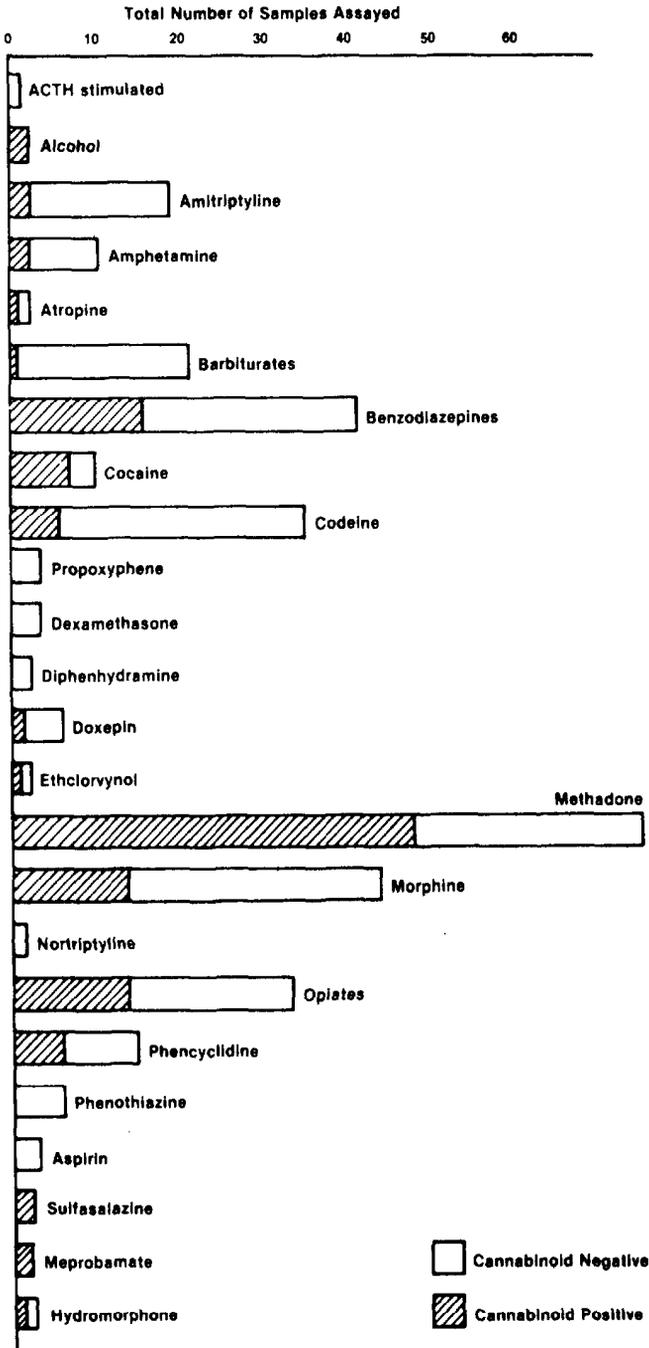


FIGURE 7. Analysis of samples known to contain drugs other than THC.

Пример скрининга населения

Точность оказалась трудно оценить из-за отсутствия уста- неопубликованного и доступного метода. Подтверждение в этом evalua- Тион было доступно только через подтвердили недавнее использование и исследования курения подопытного.

В таблице 2 приведены данные, полученные на экранах населения, проведенных в рамках клинических исследований, проведенных с использованием испускают THC анализа. На поддерживающей метадоновой клинике (III), более 75% лиц, чьи мочи дали положительные результаты (> 50 нг / мл), допущенные к курению марихуаны в течение предыдущих 3-6 дней, а в тюрьмах и центрах досрочного освобождения (IV), 100 % от индивиду- uals с положительными образцами, допущенных к использованию недавно.

ТАБЛИЦА 2. Заболеваемость образцов опробования Positive для THC по EMIT TEST

	Количество образцов Бег	Число положительный	% Положительных
I. Исследование сигарет	28	7 *	-
II. Программа лечения наркомании	95	64	87
III. Метадон Clinic обслуживание	211	115	55
Внутривенно Тюремные / Раголе центры	246	125 *	51
V. токсикология / Лаборатория судебной экспертизы	78	36	49
VI. Метадон Clinic Лечение	48	12	25
VII. Судебная / Уголовная лаборатория	184	112	61
VIII. Больницы скорой Пациентов	96	24	25

* 100% Прием в недавнее использование

В различных популяциях изучены, частота образцов, положительных в отношении каннабиноидов колебалась от 25% до 67%. Накопленные результаты для всех популяций экранированных идентифицированы 491 положительных ему определенных мужские из общего числа 958 образцов, общей положительной заболеваемости на 51%. В ходе исследования было сообщено, что исследователи обнаружили, общо частота положительных результатов, чтобы быть реальной для исследованных популяций.

ОБСУЖДЕНИЕ

Быстрый, простой тест для обнаружения каннабиноидов метаболитов в моче были разработаны для использования в качестве скринингового теста. Дальнейшие исследования ведутся для установления продолжительности времени после курения, что можно обнаружить каннабиноиды в моче с помощью этого метода и эффектов межпредметных изменчивостей в скорости метаболизма препарата. По мере того как тест был разработан в качестве скринингового теста, любые результаты должны быть подтверждены поimmunological техникой. Следует отметить, однако, что эталонный метод, газовая хроматография-масс-спектрометрия, может не использовать стадию гидролиза в экстракции образца, и, следовательно, может обнаружить только неконъюгированную форму мочевых метаболитов. Степень перекрестной реактивности анализа EMIT к конъюгированным метаболитов в настоящее время исследуется.

Считаются, что наличие быстрого, простого скрининг-тест на каннабиноиды значительно облегчат исследования в отношении медицинского, демографического и социального использования марихуаны.

РЕКОМЕНДАЦИИ

1. KE Рубинштейн, RS Schneider, и EF Ульман. Гомогенный иммуноферментный анализ. Новая иммунохимическая техника. *Биохимия и биофизика Ре- поиск Связи*, 47, 846-851 (1972).
2. HM Greenwood и RS Schneider. Современные разработки в области применения иммуноферментного анализа. В *клинической иммунохимии*, С. Natilson, изд. Американский доц. Клиническая биохимия, Вашингтон, округ Колумбия, 455-473 (1978).
3. Д. Kabakoff и HM Greenwood. Последние разработки в области гомогенного иммуноферментного анализа. В *Последние достижения в клинической биохимии*, Том 2, KGMM Альберти и CP Цена, ред., Churchill Livingstone, Edinburgh, Scot- земля, 1-30 (1981).
4. GL Rowley, TA Armstrong, CP Кроул и др. Определение THC и его метаболитов EMIT однородна иммуноферментного: краткий отчет. В *каннабиноидов Assays в организме человека*, Национальный институт по борьбе со злоупотреблением наркотических средств Research монографии 7, RE Willette, изд. Публикация DHEW No. (ADM) 78-339, ранее DHEW Паб. Номер (ADM) 76-339, Зирь. из Docs., США правительственных служб. Распечатать. Выкл., Вашингтон, DC, стр. 28-32 (1977-78).
5. Л. Роули, К. Рубенстеин, Дж Huisjen и EF Ульмана. Механизм, с помощью которого антитела ингибируют гаптен-малатдегидрогеназа конъюгатов. *J. Biol. Chem.*, 250, 3759 (1975).

БЛАГОДАРНОСТЬ

Авторы признательны Р. Bastiani для сбора клинических данных и Венди уключины для ее технической помощи.

АВТОРЫ

МJ Делорентис, К. Макнейл, AJ Манн,
С. Кларк, и Елена М. Greenwood научно-исследовательский
институт Syva 3181 Портер Драйв Пало-Альто, штат
Калифорния. 94304

Лаборатория Оценка

Иммунологические наборы для обнаружения каннабиноидов в биологических жидкостях

Майкл А. Торф, Брайан С. Finkle, и Мэри Е. Deyman

Центр токсикологии человека имеет, наряду с другими токсикологических лабораторий, были вовлечены в области evalua- Тион процедуры радиоиммуноанализа для обнаружения и количественного

Δ^9 -THC в сыворотке крови и фермент, умноженный

Процедура иммуноанализа для обнаружения nor-carbox- метаболита илов кислоты в моче. Каждая лаборатория была выбрана на основе проверенного опыта с коммерчески availa- BLE процедурами иммуноанализа. Первоначально исследование было разра- ботан с целью образцов экрана, собранных от несчастных жертв; Однако, в некоторых местах проведения исследования база данных был протяженным включать другие образцы.

Процедура радиоиммунологической оценены была разработана в

научно-исследовательском институте Resceptor, и включает в себя использование меченого трития

Δ^9 -THC трейсера. В общей сложности восемь лабора-

Риес участие в оценке этого метода, который получает в форме набора производителя. Тринадцать оценивали лаборатории процедуры испускает, разработанную в Syva Corporation.

Протокол исследования необходимо, чтобы каждый экран сайта сыворотка и образцы мочи и перенаправлять все предполагаемые положительные жених в ему определенный центр для человека токсикологии. Эти положительные образцы были затем отправлены либо Battelle Laboratories или Research Triangle института для анализа подтверждения с помощью газовой хроматографии-масс-спектрометрии.

Результаты этих оценок будут представлены и будут включать в себя:

- 1. Корреляция положительного RIA и испускают анализ с хромато-масс-спектрометрии результатов газа;*
- 2. Результаты испытаний по контролю качества;*

3. Критика и предложения, сделанные аналитиками на каждом участке;

4. Результаты оценок, проведенных в Центре токсикологии человека.

ВВЕДЕНИЕ

Широкое использование марихуаны среди населения Соединенных Штатов привело к необходимости интенсивных исследований в фармакологические и психологические эффекты Δ^9 -тетра-*hydrocannabinol* (Δ^9 -ТНС), основной активный ингредиент в марихуане. Более того, Δ^9 -ТНС в настоящее время изучаются для возможного терапевтического применения. Вместе с необходимостью анализа образцов плазмы из этих программ фундаментальных исследований существует растущий спрос со стороны судебно-медицинских экспертизы и клинических токсикологов для улучшения аналитических процедур для скрининга и количественных Δ^9 -ТНС и его метаболитов в биологической жидкостей.

Один аналитический метод, который, как представляется, особенно благоприятным в состоянии из-за своей чувствительности и специфичности радиоиммуноанализ (RIA). На самом деле, несколько групп (1,2,3,4,5) разработали такие действия, чтобы подтвердить. Те, разработанный Кук и др. (1,2) и Гросс и др. (3), как сообщается, специфичные для Δ^9 -ТНС. Процедура разработана Гросс и др. в Научно-исследовательском институте Receptor (ИОС) оценивали в лабораторных условиях эксплуатации.

Разнообразие других методов иммуноанализа, в общем пользовании, в том числе однородной иммуноферментный (EMIT) *prose-Dure*. Этот аналитический метод был применен для образцов мочи для анализа нескольких препаратов злоупотребления и количественного определения различных препаратов и метаболитов в сыворотке крови. Роджерс и др. (6) разработана полуколичественного анализа испускает для каннабиноидов метаболитов в моче и эта процедура с тех пор была усовершенствована. Она также была оценена в ходе проекта.

РИА Комплект из RRI был разработан специально для анализа образцов сыворотки. Это прямая процедура с участием никакого предшествующего *extrac-*ции или хроматографии и использует меченный тритием Δ^9 -ТНС трейсера.

Метод использует 10 μ л сыворотки, которые инкубируют с 100 μ л

Δ^9 -ТНС антитела и 500 μ ккл [з ЧАС] Δ^9 -ТНС трейсера. разделение несвязанного ТНС является *dextrancoated* углем, и техно- *Nique*, как сообщается, чувствительны к 5 нг / мл.

Анализ EMIT был разработан специально для обнаружения метаболитов в моче, структурно похожих на 11-нор ТГК-9-*carbox-*илова кислоты (ТНС Δ^9 кислоты). 11-Нор Δ^9 -ТГК-9-карбоновая кислота используются для

калибровки анализа. 50 μ л мочи смешивают с реагентом ТНС антитела (малат-дегидрогеназы, ковалентно связан с ТНС) и *picos-*

tinamide аденин динуклеотид, субстрат для фермента. En- zymatic скорость реакции измеряют спектрофотометрически при длине волны 340 нм в течение 30-секундного периода времени при 30 ° C. Процедура может обнаружить 50 нг / мл THC-9-кислоты в моче с более чем 95% доверия. Этот проект был разработан, чтобы оценить как RIA и процедуры испускают в лабораторных условиях эксплуатации. Каждая лаборатория в рамках проекта была в основном аналитической токсикологии лаборатория не- volved в судебно-медицинской экспертизы и / или клинической токсикологии. Исследование было де- первоначально подписан с образцами экрана, собранных от несчастных жертв, и, следовательно, каждая лаборатория была обращена просьба обеспечить конфиденциаль- dentiality жертвы до включения в исследование. В ходе исследования становилось все более очевидным, что предвосхитила выборку население не будет получено. Это с особой силой, так с процедурой РИА, в основном из-за количества гемолизованных образцов крови, с которыми сталкиваются. Для того, чтобы увеличить население образца, несколько лабораторий были предложены использовать наборы скопического анализа на других типах образцов; например, обычные наркотиков подозреваются неотложной помощи госпитализаций.

Протокол исследования необходимо, чтобы каждый экран сайта сыворотка и образцы мочи и перенаправлять все предполагаемые положительные образцы в Центр. Затем они были отправлены либо Battelle Laboratories или Research Triangle института для количественного анализа методом газовой хроматографии-масс-спектрометрии (ГХ-МС).

ВЫБОР МЕСТ

Каждая лаборатория в исследовании была выбрана на основе проверенного опыта с коммерчески доступными процедурами иммуноанализа. Это было достигнуто путем личного общения и путем оценки ответов на вопросник.

Двадцать лабораторий были предложены первоначально участвовать в исследовании. Кроме того, в ходе исследования еще четыре места попросили быть включены и ряд сайтов, удалилась. Семь лабораторий оценили комплекты RIA и двенадцать описанную процедуру EMIT. Помимо этих сайтов, лаборатория в Центре токсикологии человека принимал участие в оценке обеих процедур.

ПОЛУЧЕНИЕ И ПЕРЕСЫЛКА аптечки

Оценка процедура РИА началась в декабре 1978 года и продолжалась до августа 1979. Двести комплектов были получены в СНТЕ от ИПРА, из которых 98 были использованы в исследовании. Даты поступления и окончания срока набора приведены в таблице 1.

Таблица 1. Дата получения и Истечение RIA комплектов

Количество комплектов Поступило	Большое число	Дата получения	Дата истечения срока действия
10	X4A	10-10-78	1-15-79
40	X4A	11-29-78	1-15-79
50	X5a	12-20-78	2-15-79
50	X6A	4-04-79	5-15-79
50	X7A	6-26-79	8-15-79

Некоторые лаборатории, в том числе СНТА, столкнулись с аномально высокими неспецифическим связыванием с комплектами (лот нет. X6A), полученных на 4-4-79. Замена антитело было направлено в СНТ на 6-26-79. Все эти комплекты были отправлены в СНТ с ИРРА ночной воздуха курьерской службой и были получены в удовлетворительном состоянии.

В общей сложности 120 комплектов испускают были получены в период с мая по август 1979 г. Хотя эти комплекты были не в их окончательной форме маркетинга, т.е. ферментный препарат не лиофилизируют, оценка Inhouse показали, что они были удовлетворительными. К концу периода исследования было получено и направлено на некоторые сайты, небольшое количество лиофилизируют комплекты. К сожалению, это было слишком поздно для оценки этих конкретных комплектов должны быть завершены.

Около 60 испускают комплекты были погружены на ночь службы на сайты или использовать в СНТ. Невозможно дать более точную оценку, потому что к концу проекта „, калибратор решение и буферные растворы поставляются отдельно.

ОТБОР ОБРАЗЦОВ

Точный протокол для сбора образцов на каждом участке был обязанностью следователя в конкретном месте. Было подчеркнуто, на эти сайты, оценивающих процедуру RIA, что комплект был разработан для анализа проб плазмы / сыворотки, а не для гемолизированных образцов крови. Ряд сайтов, однако, в самом деле использовать набор для скрининга гемолизированной крови. После сбора образцов сыворотки / плазмы, было рекомендовано, чтобы они хранили в замороженном виде в стеклянных трубках и, если возможно, защищенном от света месте. Аналогичные реко- ментации были сделаны для хранения образцов мочи.

Он предназначался в первую, чтобы ограничить население образца сыворотки / плазмы или мочи, собранной из жертв аварии; Однако аналитически ские проблемы с гемолизированными образцами крови и поздним прибытием комплектов испускают ясно дали понять, что ожидаемый образец население не будет удовлетворено. Для того, чтобы увеличить количество образцов, проанализированных, было принято решение разрешить некоторые сайты, в том числе СНТ, чтобы экранировать другие образцы с использованием тест-наборов. Хотя это увеличило количество образцов, общее число анализировали с помощью RIA в течение 12 месяцев все еще ниже, чем предполагалось изначально. Более статистически чески полезным количество образцов подвергали скринингу в течение 6 месяцев, используя процедуру испускают.

ЗАДАЧИ участвующих лабораторий

Каждый участник несет ответственность за:

1. Сбор образцов
2. Анализ образцов с помощью иммуноанализа
3. Перевозки предполагаемых положительных проб в СНТ в течение ночи воздушных курьерской службой

Участники также попросили заполнить анкету Де- подписали, чтобы получить информацию об аварии и возможном участии наркотиков, а также для записи результатов анализа. Заполненные вопросники были возвращены в СНТ вместе с presumpt тивных положительными образцами.

Хотя эти задачи оказываются относительно простыми, что относятся важные понимать, что каждый из участников отвечал за судебно или клинической токсикологии лаборатории с тяжелой рутинной нагрузки. В случае процедуры RIA, весь анализ может использовать квалифицированный специалист для целых 2 дней в то время, и это также способствовало небольшому числу образцов скрининга с помощью этой методики.

ПОДТВЕРЖДЕНИЕ презумптивного позитивов методом газовой хроматографии-масс-спектрометрии

Все предполагаемые позитивов были отправлены с каждым сайта в СНТ по ночному воздуху курьерской службы Затем они были отправлены либо Dr. R. L. Фольц, из Battelle Laboratories, или Dr. J. Bursey, собен поиск Triangle Institute, для ГХ-МС подтверждения. Д-р Фольц был ответственным за анализ примерно половины образцов плазмы и д-ра Bursey на оставшуюся часть этих образцов и все образцы мочи.

Аналитический метод используется для анализа образцов в плазме был подписан де- обнаруживать Δ^9 -ТНС конкретно, и что используется для мочи образцы для определения 11-нор-метаболита карбоновой кислоты. Небольшое количество образцов мочи было гидролизировано до экстракции.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА ОБРАЗЦОВ

Через регулярные промежутки времени на протяжении всего исследования, образцы сыворотки «шипами» с Δ^9 -ТНС были поставлены на слепой основе для каждого сайта оценки процедуры РИА. Они были получены в соответствии со следующим протоколом: а 203 мг / мл Δ^9 -ТНС решение поставляется NIDA серийно разводили до 20,3 (А) и 2,03 нг / μ л (В) концен- трация с этанолом. Эти растворы были затем использованы для «шип» сыворотки; например, 50 μ л В в 25 мл сыворотки приводило к концентрации ТНС от 4,06 нг / мл. Каждая партия образцов была погружена в сухом льду в течение ночи воздушной курьерской службой в каждой лаборатории.

РЕЗУЛЬТАТЫ

РИА

Участники, оценивающие процедуру РИА анализировали в общей сложности 310 образцов из которых 43 (14 процентов) были идентифицированы как presumpt TIVE позитивов. Примерно одна треть этой последней группы были он- molyzed. Результаты количественного анализа проб анализируемых как РИА и ГХ-МС приведены в таблице 2. Количество гемолизированных образцов, включенных в эту группу, неизвестно.

Качество контрольных образцов, приготовленных в сыворотке крови, были отправлены на каждый сайт, участвующего в оценке РИА. В таблице 3 приведены результаты этих анализов. Некоторые из коэффициентов регрессии были г-,

ГХ-МС с РИА: «Шипастые концентрация»	Общая выборка минус 4	(П = 97) = 0,777 г	
против:	ГХ-МС (образцы 1-22 *) СНТ	(П = 21)	г = 0,959 (п
	(образцы 1-22) * УОЛ	= 29)	г = 0,802 (п
	(Образцы 1-12 *)	= 19)	г = 0,950
	* За исключением образца 4		

Помимо анализа образцов контроля качества, ряд образцов плазмы от неотложной помощи Университета штата Юта медицинского центра были также проанализированы в СНТ; они были соединены

Таблица 2. Результаты RIA и анализ ГХ-МС

сайт	РИА (нг / мл)	ГХ-МС (нг / мл)	сайт	РИА	ГХ-МС (нг / мл)	
я	6,6	0	IV	положительный	86	
	5,0	Не Анализируются		положительный	31	
	6,4	0		положительный	220	
	6,5	Менее 1 15		Positive	155	
		9,3		положительный	72	
	9,0	9,9		положительный	69	
	23	интерференция		положительный	11	
	6,5	6,5		положительный	3,0	
	9,4	0		положительный	21	
	6,5	6,2		положительный	0	
	15	5,0		положительный	10	
	II	7,0		2,0	положительный	0
		III		15	10,5	положительный
9,0	3,0		положительный	4,6		
4,0	0		положительный	3,1		
			Положительная интерференция			

с образцами мочи, собранной из того же больного и просеивают положительный результат EMIT. В таблице 4 приведены данные, полученные с помощью RIA и GC- MS.

ИСПУСКАЮТ

В общей сложности 13 лабораторий, в том числе СНТ, участвовали в оценке этой процедуры в период с июня по декабрь

1979. 12 сайтов скрининг в общей сложности 596 образцов от несчастного случая vis-ТИМОВ, из которых 165 (28%) были определены как предполагаемые позитивы. Некоторые из этих сайтов использовали процедуру испускает для скрининга поло- ставителей и только негативов, в то время как другие определяли концентра- ции метаболитов, присутствующих. Следует помнить, что первоначально процедура ОГО-МС количественных только свободный 11-нор-карбоновой кислоту метаболита, и Williams и Моффатты (7), сообщают, что до 80% кислотных метаболитов конъюгируют в моче. Из этих исходных данных, 18 из образцов подвергали скринингу положительного по EMIT, но были отрицательными для метаболита карбоновой кислоты с помощью GC- MS. Впоследствии несколько образцов с низкими или отрицательными зультатов ГХ-МС перепроверки гидролизуют ферментативно, а затем повторно анализировали с помощью GC- MS для метаболита 11-нор-9-карбоновой кислоты.

Таблица 3. Результаты контроля качества образцов (все концентрации нг / мл)

Quality Control Sample	Date	Spiked Value	CHT	I	II	III	IV	V	VI	VII	GC-MS Analysis*
1	Jan 79	0	6.0	5.5	7.0	5.8	8.0, 8.4				0
2	Jan 79	4.1	11.0	Sample ^C broke	11.0	8.5	10.5, 11.0				4.0
3	Jan 79	20.3	18.0	38.6	23.0	20.0	27.0, 26.0				19.3
4	Jan 79	81 ^C	130 ^C	170 ^C	110 ^C	>50 ^C	58 ^C , 82 ^C				73.4 ^C
5 ^A	May 79	0 ^C	3, 5	<2, <2	0	0, 0		0			0
6 ^B	May 79	15	24, 28	15, 12	20.5	14.7, 17.1		20			20.4
7	May 79	0 ^C	8, 8	<2, <2	0	0, 0		4.8			0
8	May 79	25	41, 46	25, 25	30.5	25.3, 28.4		30			29.6
9	May 79	5	18, 19	5, 5	11.4	6.9, 11.1		12.5			9.1
10 ^B	May 79	15	31, 31	15, 16	20.3	11.7, 17.1		18			16.9
11	May 79	0 ^C	9, 12	<2, <2	4.3	0, 0		3			0
12 ^A	May 79	0 ^C	3, 6	<2, <2	0	0, 0		0			0
13 ^B	Jul 79	6	11						7.5	14	10.1
14 ^B	Jul 79	6	10						7.5	11	10.6
15 ^A	Jul 79	0 ^C	0						0	0	0.7
16	Jul 79	2	4						2.8	5.6	4.1
17 ^A	Jul 79	0 ^C	0						0	0	0.7
18	Jul 79	10	11						13	NA	14.3
19	Jul 79	22	26						31	NA	26.4
20 ^B	Jul 79	14	17						18	NA	15.7
21	Jul 79	18	24						25	NA	21.9
22 ^B	Jul 79	14	17						15	NA	13.2

A-Blank Plasma samples

B-Split pairs of samples (numbers 6 and 10, 13 and 14, 20 and 22)

C-Not Included in regression analysis

* Battelle Laboratories

Таблица 4. Образцы плазмы из субъектов, Моча была
Экранированный Positive по ЕМІТ

Образец Нет.	РИА (Нг / мл)	ГХ / МС (Нг / мл)	Образец Нет.	РИА (Нг / мл)	ГХ-МС (Нг / мл)
1	7	0	6	0	1,3
2	0	0	7	0	0
3	<5	0	8	10	<1
4	<5	0	9	0	2,1
5	11	0	10	0	0

Таблица 5. Результаты испускают и ГХ-масс-спектрального анализа После
Ферментативный гидролиз

ИСПУСКАЮТ (Нг / мл)	ГХ-МС свободной кислоты (Нг / мл)	ГХ-МС после гидролиза (Нг / мл)
положительный	4,6	42
положительный	0	4
Более 75	36	600
53	7,1	32
0	0	4
Более 75	31	75
10	6,5	7,9
11	0	2,7
75	6,2	58
0	24	Менее 2
0	0	47
Более 75	5	31
Более 75	2,1	53
Более 75	0	43
Более 75	2,1	77

СНТ принимал активное участие в оценке испускает просе- Dure и исследовал большое количество образцов. Из них 106 были проанализированы как ЕМІТ и ГХ-МС. Полученные результаты приведены в таблице 6. В общей сложности 37 образцов скрининга положительного результата ЕМІТ, но были неподтвержденные с помощью ОГО-МСА для метаболита свободной кислоты. Впоследствии 3 из них были гидролизваны ферментативно и оказались положительными по

Таблица 6. Результаты анализа на ЕМІТ СНТ и ГХ-МС-анализа для свободной кислоты метаболита в RTI

ИСПУСКАЮТ (Нг / мл)	ГХ-МС (Нг / мл)	ИСПУСКАЮТ (Нг / мл)	ГХ-МС (Нг / мл)	ИСПУСКАЮТ (Нг / мл)	ГХ-МС (Нг / мл)
12	0	0	0	57	20
30	4,0	0	0	Более 75	50
Более 75	21	12	11	15	7,5
14	8,1	Более 75	36	58	22
Более 75	55	0	0	36	2,6
Более 75	9,1	53	7,1	60	30
34	26	23	0	Более 75	26
37	35	Более 75	31	27	3,3
15	0	10	6,5	Более 75	41
21	0	11	0	Более 75	7
0	0	0	0	60	9
18	17	Более 75	6,2	Более 75	45
0	0	0	24	Более 75	11
55	24	0	2,3	Более 75	5
15	4,4	19	0	Более 75	2,1
20	20	10	17	54	0
16	0	35	0	Более 75	2,1
11	2,2	15	4	33	145
0	0	0	29	10	4
62	29	0	20	24	0
0	0	Более 75	10	Более 75	2,1
66	38	10	4	22	2,5
15	5	74	22	66	78
0	20	24	25	Более 75	37
0	0	50	2,5	Более 75	39
14	26	0	10,5	56	70
12	0	Более 75	3,4	37	18
14	14	0	0	Более 75	67
0	0	0	7,8	33	2,5
Более 75	5	0	7	Более 75	27
30	0	13	5	25	26
21	3,5	72	32	Более 75	0
57	2,9	35	4	34	0
52	3,6	25	0	40	2,6
37	0	23	0	18	0
52	42				

ГХ-МС. Что еще более важно, может быть, 8 образцов из данных ТЦА скрининга с помощью отрицательного ЕМІТ, но положительный результата GGMS, хотя 4 из них имели концентрации свободных карбоновых кислот метаболита составляет менее 15 нг / мл (то есть меньше, чем низкий калибратор для ЕМІТ) с помощью газохроматографического МИЗ. Следует отметить, что 12 участников не вперед никаких «негативов» для GC-MS подтверждения, так что истинное число «ложных негативов» может быть выше.

Плазма и образцы мочи из некоторых пациентов были проанализированы с помощью ЕМІТ, RIA и ГХ-МС методов. Из этих образцов плазмы, в которых нет

Δ^9 -ТНС был обнаружен с помощью ГХ-МС, 12 из соответствующих мочи были положительны обоими ЕМІТ и ГХ-МС, 5 плазм положительные с помощью ГХ-МС, 11 соответствующих мочи были положительными обоими ЕМІТ и ГХ-МС, тогда как 3 были положительными по ЕМІТ только, хотя в этих случаях не было моча гидролизует.

ОБСУЖДЕНИЕ

Конечно, самый разочаровывающий аспект всего исследования было отсутствие ответа на оценки RIA. Процедура отнимает много времени и проблемы с самим набором были наиболее распространенным объяснением, даваемые участниками. Кроме того, набор был разработан для анализа сыворотки образцов, в то время как реальная потребность среди тех лабораторий, выбранных для исследования была для комплекта для скрининга гемолизует образцы крови и, по сути, набор был ненадлежащим образом используется в некоторых лабораториях, чтобы сделать это.

Корреляция между ГМ-МСОМ и RIA на образцах, проанализированных случаев участников была далека от адекватного. На 6 участках, представляющих данные, шесть ложных срабатываний (1,9% от общей суммы, 13,9% из предполагаемых позитивов) были найдены, хотя вполне возможно, что некоторые из них были гемолизированными. Из 10 проанализированных образцов плазмы в СНТ от субъектов с положительными (по моче ЕМІТ), 2 показали значения RIA выше предела чувствительности анализа, которые были затем два показан равным нулю с помощью ГХ-МС.

Шесть из лабораторий и СНТ принимали участие в анализе образцов контроля качества. Данные из этих образцов приведены в таблице 3. Интересно отметить, что производительность в СНТ улучшилось на протяжении всего исследования, как сотрудники лаборатории стали более знакомы с процедурой. Также стоит отметить, что эти сайты с персоналом опытом методов RIA пер- сформированных лучше, чем эти новые для использования тритием трассеров. Коэффициенты регрессии (GC-MS против RIA) для сайтов-участников больше, чем 0,93 для всех, кроме двух сайтов. Один из них

достигается только 0,46, но это намного лучше, если устраняется одна очевидная ошибка. Так как набор готовят в форме, пригодной для Marketing, необходимо учитывать тот факт, что лаборатории экс-Perience с этим типом комплекта имеет важное значение для адекватных результатов. В конце исследования вопросник был направлен на каждый сайт. Один из вопросов были, в какой более низкой концентрации ограничивает набор ненадежен при нанесении сыворотки. Был, конечно, вариации в ответах, одна лаборатория предполагая, 2 нг /

мл, три suggesting 6 нг / мл и два 10 нг / мл. Наши собственные эксперимен- ENCE в СНТ предполагает ограничение между 5 и 10 нг / мл, когда процедура используется неопытного персонала. Являются ли это для адекватным, судебно-прецедентной работы сомнительно в свете последних данных о концентрации в крови

Δ⁹-THC следует ожидать в медико

судебные дела (Williams и Моффат, 1980). Инструкции комплекта свидетельства- ожидаемой чувствительность 5 нг / мл при применении к сыворотке.

Каждый участник также попросили кратко описать свои взгляды в отношении набора и инструкции и комментарии о полезности процедуры. В целом, все участники нашли набор и инструкции, чтобы быть удовлетворительным. Большинство из них, однако, повторно портирована, что они были проблемы со стандартами на нижнем конце кривой (от 5 до 10 нг / мл), в частности, с воспроизводимостью от анализа к анализу, и они предположили, что образцы, попадающие в этот диапазон повторяется. Один из участников сообщил:

«В целом, я чувствую, что комплект должен быть разработан и пронизан в лабораторных условиях, особенно в случаях, связанных с дорожно-транспортные происшествия, вождение в нетрезвом состоянии, странные несчастные случаи и случаи коронара в целом.»

Эта точка зрения была поддержана другими участниками.

В общей сложности 12 лабораторий и СНТ оценивали испускают ргосе- Дюре. Поскольку метод был прост и знаком, все сайты нашли простой в использовании комплекта. Комплект сравнивали с помощью анализа ГХ-МС, разработанной доктором Joan Burse, научно-исследовательского института треугольника. Анализ предназначен для количественного определения 11-нор-THC Δ⁹-carboxylic кислоты метаболита, в то время как комплект был разработан для обнаружения «cannabin- OИD метаболитов», которые напоминали этот кислотный метаболит в структуре. Уже один этот факт может объяснить низкую корреляцию между значениями испускают и результаты, полученные с помощью ОГО-МСА, особенно образцов на со значительно более высокими значениями испускают. Однако, если данные в таблице 4, рассматриваются, гораздо более вероятно, что расхождение связано с EMIT ответ на глюкуронид сопряженное этого метаболита. К сожалению,

Это гораздо сложнее, однако, внимание на этих образцах с существенно меньшим значением ЕМІТ:

<u>ЕМІТ (нг / мл)</u>	<u>ГХ-МС (нг / мл)</u>
0	20
14	26
0	29
0	20
0	10,5
0	7,8
0	7
33	145

Что касается процедуры RIA, был направлен вопросник каждого парциаль- стника, запрашивая мнения и комментарии. Как правило, участ- ников было несколько проблем. Некоторые вопросы были подняты относительно процедуры для запуска заготовок и является ли набор был удовлетворительным для посмертной мочи из-за экстремальные времена мутности some- видели в таких образцах. Введение лиофилизированных джентльменов причин, из Сообщалось, чтобы облегчить эти проблемы.

Интерпретация ЕМІТ анализы мочи как с медико-правовой и клинической точки зрения следует подходить с осторожностью. Из 34 случаев, в которых были проанализированы как в плазме и моче, как образцы на были положительными только в 14 случаях, показывая, что положительное чтение ЕМІТ не обязательно коррелирует с недавним курением марихуаны, если присутствие

Δ^9 -ТНС в плазме принято указывать

недавнее использование. Кроме того, практическая трудность заключается в том, что подтвержде- ние мочи ЕМІТ показаний не является простым процессом, поскольку существующие процедуры ГХ-МС предназначены для количественной оценки только свободный 11-нор

Δ^9 -ТГК-9-карбоновая кислота метаболит. Гидролиз

конъюгированные метаболиты становятся важными, если такие методы должны быть использованы.

ВЫВОДЫ

Существует потребность в аналитические процедуры скрининга для ТНС в Δ^9 - сыворотке крови и / или крови, и для каннабиноидов метаболитов в моче. Разработка процедуры ЕМІТ прошла долгий путь к удовлетворяют последний спрос, хотя некоторые усилия должны быть направлены на разработке более полную подтверждающую процедуры.

Анализ

Δ^9 -ТНС в сыворотке крови и / или крови является более сложным.

В этом случае подтверждающим методом ГХ-МС является приемлемым, хотя аль- необходимы дальнейшие усовершенствования, так что она будет применима

для всех типов образцов крови и так метаболиты могут быть четко отделенные и идентифицированы.

Скрининг сыворотки и образцы крови с помощью меченного трития РИА набора по-прежнему очень сложно и требует много времени процедуры. Комплект не должен использоваться неопытным персоналом для количественного определения ТНС. Для того, чтобы помочь Δ^9 -преодолеть некоторые из проблем, с которыми сталкиваются с процедурой РИА оцениваемой, мы рекомендуем разработку йодсодержащего I ¹²⁵ меченых

Δ^9 -ТНС, а также для либо 11-гигиеническому дроху или карбоновая кислота метаболит. По нашему мнению, последние бы улучшить как количественный и доверие скрининга.

РЕКОМЕНДАЦИИ

1. CE Кук, ML Хоуз, EW Amerson и др. *Фармаколог*, 18, 291 (1976).
2. CE Кук. ACS Symposium Series 98, Am. Химрегент Soc., Washington, DC, 154 137. (1979).
3. SJ Гросс, JR Суарш, SL Вонг и др. *Природа*, 252, 581 (1974).
4. JD Тил, Е. Фогман, Л. Кинг и др. *Природа*, 249, 154 (1974).
3. А. Р. Чейза, PR-Келли, А. Тонтон-Ригби, Р. Т. Джонс и Т. Харвуд. Тации количественно каннабиноидов в биологических жидкостях с помощью радиоиммуноанализа. В RE Willette, ред. Национальный институт по борьбе со злоупотреблением наркотических средств Исследовательской монографии 7, *Каннабиноидов Анализ в организме человека*. DHEW Pub. Номер (ADM) 76-339. Supt. из Docs., США. Правительственные службы. Распечатать. Выкл., Вашингтон, округ Колумбия, 1-9 (1976).
6. Р. Роджерс и др. *Сип. Химрегент* 24, 95 (1978).
7. PL Williams и AC Моффат. *J. Pharm. Pharmac.*, 32, 445 (1980).

АВТОРЫ

Майкл А. Торф, Брайан С. Finkle, и Мэри Е. Deuman центр университета человека токсикологии штата Юта

Солт-Лейк-Сити, Юта 84112

Количественный анализ для Δ^9 -THC, 11-гидрокси- Δ^9 -THC, и 9-карбокси- Δ^9 -THC в плазме с помощью ГХ / СИ-МС

Rodger Л. Фольц и Брюс Дж Hidy

*Способ количественного измерения Δ^9 -THC концен-
trations в плазме было разработан и применен к анализу более чем 2000 образцов
над способом включает в себя добавление дейтерия-меченный THCA в плазму
для использования в качестве внутреннего стандарта, простой и относительно
быстро растворителя процедуры экстракции, формирования триметилсилили
производная и количественный путем select- ред иона мониторинга с
использованием химической ионизации аммиака. Аналогичная процедура также
была разработана для одновременного анализа*

*Δ^9 -THC и два его основных метаболитов в
плазмы. Последняя процедура требует использования стеклянной capil- колонке
Лари для анализов образцов плазмы, в которых концентрация THC ниже 10 нг / Δ^9 -
Чувствительности для обоих методов позволяют количественно оценивать THC и его
метаболитов в таких низких концентрациях, как 0,2 нг в 1 мл-образцов плазмы.*

ВВЕДЕНИЕ

Интерес к фармакологии каннабиноидов продолжается на высоком уровне, благодаря широкому использованию марихуаны и обнаружения потенциально полезных медицинских приложений для Δ^9 -Tet RA-hydrosannabinol. Каннабиноидов исследование было затруднено из-за ограниченной доступности аналитических средств, способных измерения, как правило, низкие уровни каннабиноидов в физиологических жидкостях после введения каннабиноидов. За последние 4 года Лаборатории шины Баттелль Colum- предоставил аналитический сервис для NIDA-ав-
thorized ученых, занимающихся исследованием каннабиноидов. В cannabin- OID анализы, разработанные и используемые в Battelle основаны на комбинационные

нации газовой хроматографии и масс-химической ионизацией спектрометрии trometry (ГХ / CI-MS).

Количественный анализ Δ^9 - THC

Измерение Δ^9 - THC в плазме с помощью ОГО метода / MS был первым сообщает Agurell и соавт. (1). Их процедура включает в себя добавление. из дейтерий-меченных THC аналога в плазме, экстракции и очистки жидкостной хроматографии на колонке с Сефадексом LH-20 колонке, с последующим количественным измерением с помощью газовой хроматографии и электронно-ударной масс-спектрометрии (GC / EI-MS). Метод, используемый в Battelle аналогичен, за исключением, что он использует относительно простой экстракции, основанной на методике (рисунок 1), разработанный в Re- поиск Triangle Institute (2), и использует аммиак химической ионизацию, а не ионизации электронного удара (3) , Используя эту просе- Дюре, набор из 36 образцов плазмы могут быть извлечены и подготовлены для анализа с помощью одного специалиста в течение 8 часов. Еще 8 часов требуются для выполнения ОГО / MS анализа.

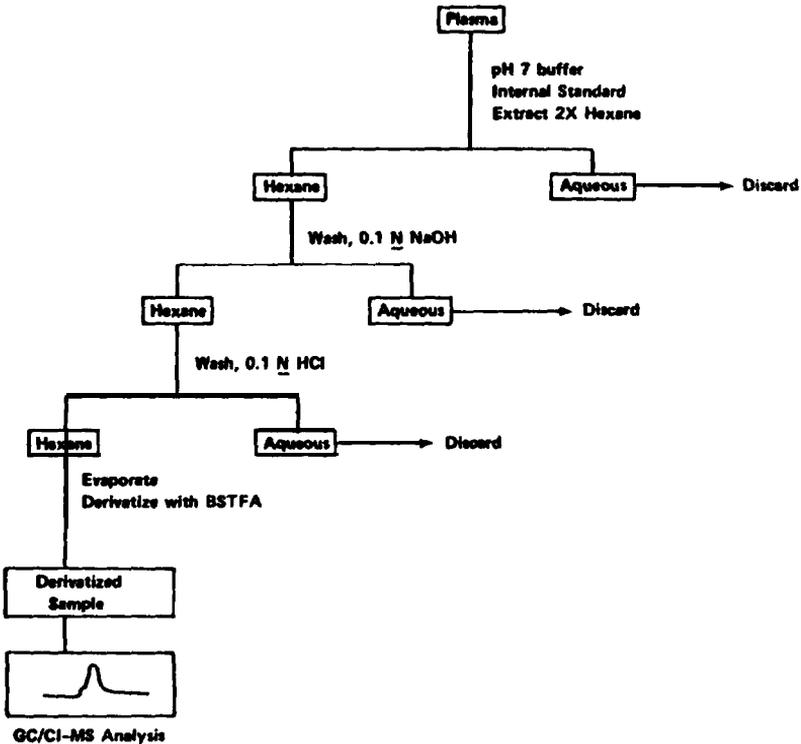


Рисунок 1. Блок-схема для анализа

Δ^9 -THC в плазме.

Большинство ТНС анализов сделано в Battelle в течение последних 2-х лет были выполнены на GC Финнигэн 4000 / МС в сочетании с системой дат ИНКОС. С помощью этой системы работает в нормальном режиме, так же мало, как 20 пг дериватизированного ТНС вводили в ГХ / МС дает ответ достаточную, чтобы обеспечить измерение с хорошей точностью. Как правило, только от 10 до 20 процентов дериватизированного экстракта вводят в одно время. Следовательно, для 1 мл образца плазмы, концентрации ТНС как низко как 0,2 нг / мл могут быть измерены.

ПРОЦЕДУРА ИЗВЛЕЧЕНИЯ

Все изделия из стекла должны быть тщательно очищены и силилированы (4). Стандартные растворы ТНС следует хранить при -10 ° С в темноте, но дают возможность нагреться до комнатной температуры непосредственно перед использованием.

Передача измеренного количества (обычно 1 мл) плазм в культуральной пробирку с 20- мл, **снабженной тефлоновой футеровкой завинчивающейся крышкой. Добавить 100 μ л раствора этанола из Δ^9 -ТНС-2 ЧАС з внутренний стандарт (200 нг /** мл) с последующим добавлением 1,0 мл рН 7,0 буферного раствора (Fisher Scientific Co.). Vortex смеси в течение 10 сек. Добавьте 6 мл гексана высокой чистоты (Дистиллированная-в-Glass, Burdick и Jackson Co.), плотно закрывают трубку, и осторожно перемешивают содержимое в течение 20 мин с использованием автоматического коромысла трубки или ротатора. Центрифуга в течение 6 мин, а затем осторожно переносить слой гексана (сверху) на вторую трубу с помощью культуры одноразового пипетки Пастера. Оставшийся остаток плазмы может быть отброшен.

Раствор гексана теперь последовательно промывают разбавленной щелочи и разбавленной кислотой для удаления сильно кислотных и основных соединениях. Добавить 2,5 мл 0,1 н раствора NaOH в экстракт гексана. После того, как укупорки трубки, поворот или рок в течение 20 мин, а затем центрифуги. С помощью другой одноразовой пипетки, удалить водный слой (нижний) и выбросить. Добавить 2,5 мл 0,1 н раствора HCl в экстракт гексана. Нажмите на трубку осторожно, чтобы вызвать пузырьки газа, образованные кислотно-основной реакции, чтобы избежать. Опять же, плотно закрывают трубы, рок или повернуть его в течение 10 мин, и центрифугируют. Аккуратно перенести только слой гексана (сверху) в 15-мл стеклянной трубки с коническим или сопе- образным дном. Осторожно концентрировать экстракт почти до сухости при температуре 35-40 ° С с использованием либо поток азота или быстрое испарение устройства, такие, как Büchler Vortex-испаритель (Бухлер Instruments).

Остаток экстракта теперь переносят в стеклянную пробирку л-мл, имеющей конусообразную нижнюю и снабженный покрытой тефлоном винтовой крышкой следующим образом. Добавить 0,5 мл пентана высокой чистоты в пробирку, содержащую остаток и вихревые трубки в течение 10 сек. Использование одноразовой пипетки перенос раствора пентана в стеклянной пробирке с 1 мл. Повторите последний шаг, используя дополнительно 0,5 мл пентана, чтобы перенести **оставшийся остаток экстракта на мл 1 флакон. Добавить 10 μ л диметилформамида высокой чистоты** в раствор пентана, чтобы действовать в качестве «хранителя», чтобы свести к минимуму испарительного потери ТНС во время окончательного испарения и служить в качестве растворителя для trimethylsila- ции. Медленно концентрирование раствора пентана путем нагревания стеклянного пузырька с нагревательным блоком, поддерживаемым при 40 ° С. Когда **все пентан испарится (примерно 20 мин), добавляют 15 μ л бис (триметилсилил) трифторацетамида**, содержащей 1 процент триметилсилилхлорид во флакон и крышка плотно. Вихревой флакон и затем нагревают в сушильном шкафу при 90 ° С в течение не менее 1 часа. Образец готов для анализа ГХ / МС. Однако образец можно хранить при температуре от -10 ° С in-определенно.

ГЙ анализ / МС

Химическая ионизация с аммиаком в качестве газа реагента используется для количественного определения триметилсилилировали ТНС, поскольку она дает более высокую чувствительность и специфичность, чем любой ионизации электронным ударом или химической ионизации с использованием метана или изобутан в качестве газообразных реагентов (5). Метод был разработан на системе квадрупольной, но любая масс-спектрометр оснащен для химической ионизации и мониторинга волен выбранной ионны должна быть удовлетворительными, при условии, что имеет адекватную чувствительность. Для систем, в которых газовый хроматограф подключен непосредственно к масс-спектрометра, метана (сверхвысоких чистоты сорта, Матесон газовые продукты, East Rutherford, NJ) следует использовать в качестве газа-носителя. Если ГХ / МС использует сепаратор, гелий может быть использован в качестве газа-носителя. В обоих случаях аммиак (сверхвысокой степени чистоты, Air Products and Chemicals, Tamaqua, PA) должен быть введен в источник ионов через входное отверстие подпиточного газа таким образом, чтобы аммиак и несущие газы поступают в ионизационной камеру в концентрических газовых потоках. Скорость потока аммиака в источник ионов регулируется при соблюдении интенсивностей ионов при m/z 18 и 35. Поскольку скорость потока аммиака увеличивается, интенсивность пика m/z 18 (NH_4^+) **должен сначала увеличиваться, а затем достигают плато, и в этот момент пика при m/z 35 ($NH_3 \cdot NH_4^+$) появляется и начинает возрастать по интенсивности. Оптимальная скорость потока аммиака является точкой, при которой пик m/z 18 достигает максимум и m/z 35 пика просто**

начинает расти в высоту. Общее давление газа-реагента в ионизационной камере должно быть в пределах от 0,3 до 1,0 мм рт.а. Если разделитель используется, это может быть необходимо, чтобы кровь в метане вместе с аммиачным, чтобы достичь этого общего давления.

Различные столбцы газовой хроматографии могут быть использованы, но наилучшие результаты были достигнуты с 1,8-м × 2 мм стекла колонкой, заполненная 3 процента OV-17 на 100/120 меш Gas Chrom Q (Ар-крученной Science Labs, штат колледж, штат Пенсильвания). Инжектор, колонки, и температура линии передачи выдерживают при 280 °, 250 ° и 320 ° C, соответственно. В этих условиях и скорости потока газа-носителя приблизительно 15 мл / мин,

$\Delta^9\text{-THC-TMS}$ должен элюировать в аре проксимальный 4 мин. Разрешение колонке GC может быть оцени- ованный путем введения раствора, содержащий равные смеси $\Delta^9\text{-THC-TMS}$ и $\Delta^9\text{-THC-TMS}$ ($\approx 50 \mu\text{г} / \text{мл}$ в гексане). В соответствии с заявленной Условия GC хорошего качество OV-17 колонок даст хроматограф граммы, показывающие по крайней мере, обнаруживаемую долину между пиками корреспондны к двум производным каннабиноидам.

Для выбранного иона мониторинга в масс-спектрометр настроен для контроля ионных токов при m/z 387 и 390, соответствующие ионы протонированной-молекулы (MH⁺) для $\Delta^9\text{-THC-TMS}$ и $\Delta^9\text{-THC-2-CHAS-2-TMS}$, соответственно. После того, как КС / МС запуск завершен, $\Delta^9\text{-THC}$ концентрация в плазме определяется путем измерения площадей $\Delta^9\text{-THC-TMS}$ и ГТГ-2 ЧА $\Delta^9\text{-THC}$ пики ТМС в выбранном ионном полу- ченная профили («ионные хроматограммы») и соотнесение соотношение площадей пиков к ранее установленной стандартной кривой. Новая стандартная кривая должна быть установлена, когда новые стандартные растворы готовят или при анализе образцов плазмы, содержащих известные концентрации

$\Delta^9\text{-THC}$ показывает неприемлемые точности. Для гоу- зубец анализ плазмы, содержащей неизвестные концентрации THC, по крайней мере, один из каждых 6 образцов должен быть игольчатый стандартом.

На рисунке 2 показан типичный ионный ток выбран профиль с пики, соответствующие 5 нг / мл $\Delta^9\text{-ГТГ-TMS}$ и 20 нг / мл $\Delta^9\text{-THC-2-CHAS-2-TMS}$, в то время как фигура 3 представляет собой стандартное кривая для диапазона концентраций THC от 1 до 100 нг / мл плазмы. Прецизионные данные для различных концентраций ТКА в плазме приведены в таблице 1.

ДОБЫЧА гемолизованной КРОВИ

Описанная процедура доказала, чтобы быть надежным методом для анализа THC в плазме крови и нормальных образцов цельной крови. Однако попытки проанализировать гемолизируют и плохо разлагаются образцы крови давали ошибочные результаты из-за плохой экстракции efficien- CIES. И THC первоначально в крови и добавил дейтон НМ меченных THC по-видимому, тесно связаны с чем-то в

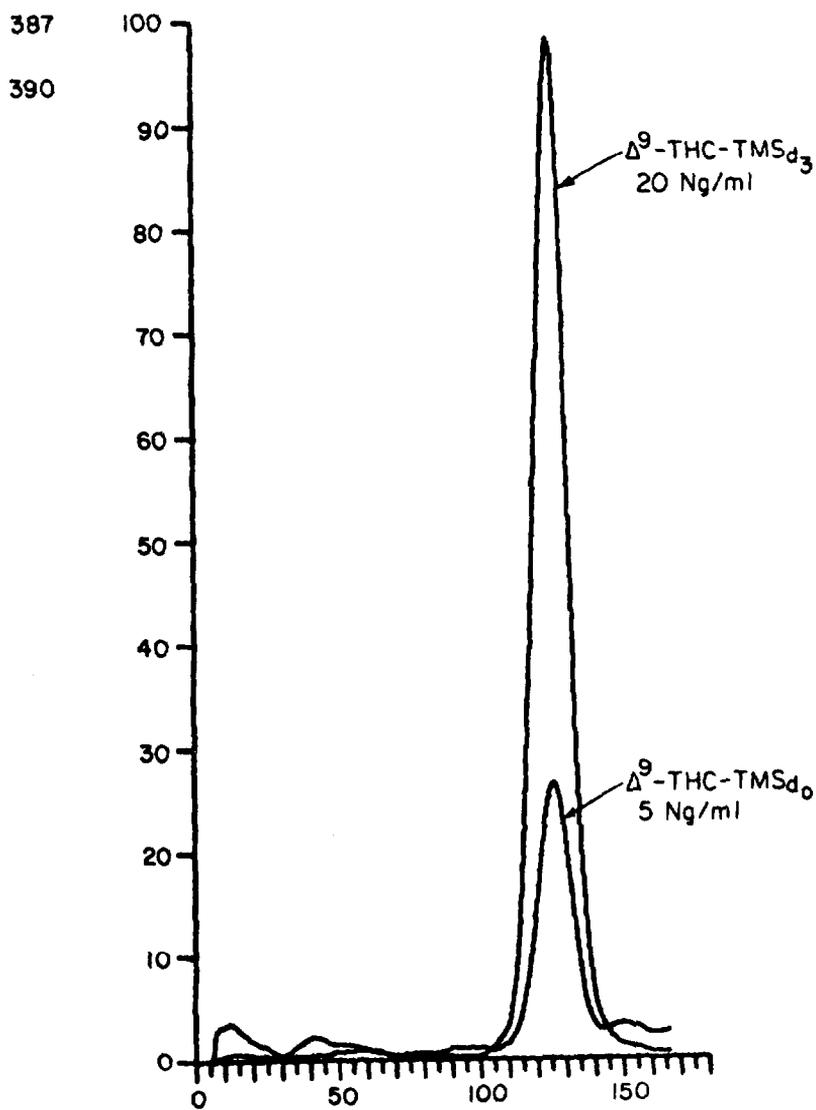


Рисунок 2. Выбранный ионный ток профилей для количественного определения ТНКА в плазме.

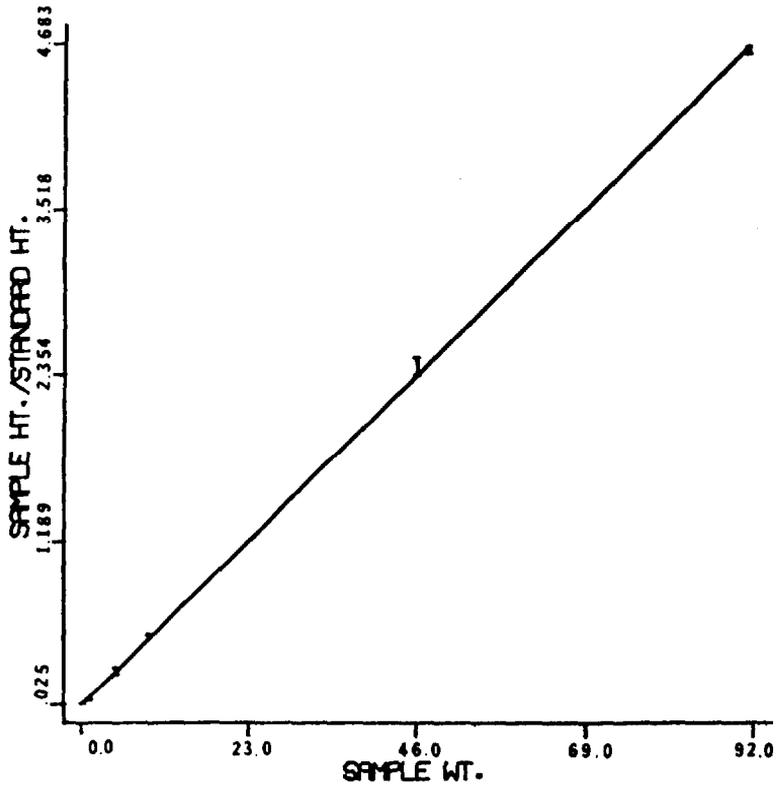


Рисунок 3. Стандартная кривая для измерения

 Δ^9 -ТГК в 1-мл образцы плазмы.Таблица 1. Точность данных для измерения
Добавлено в Плазмы * Δ^9 -ТНС

Δ^9 -ТНС Добавлено (Нг / мл)	Относительное Стандартный Отклонение (%)
92	0.5
46	3.0
9.2	3.9
4.6	5.1
0.9	7.3

* 4 образца анализировали дважды при каждой концентрации.

гемолизируют кровь, предотвращая тем самым эффективную экстракцию гексаном. Розенталь и раскол сообщили процедуру извлечения ТНС из трупной крови (6). Более простая процедура была разработана в Battelle для извлечения ТНС из гемолизованной крови. Prose- Duge дал приемлемые количественные результаты для концентраций ТНС до 1 нг / мл для большинства партий гемолизованной крови. However- эр, иногда большие различия в эффективности экстракции имело место, что указывает, что этот метод заслуживает дополнительного внимания.

На фиг.4 представлена блок-схема для процедуры экстракции, используемой для hemolyzed крови. Раствор этанола из дейтерия-меченных внутривенного стандарта **добавляет к 1 мл гемолизованной крови с последующих 1 мл 3 NH₂ ТАК₄ и 1 мл** ацетонитрила высокой чистоты. Смесь обрабатывают ультразвуком и полученный осадок белок удаляют после центрифугирования. Надосадочную жидкость затем нейтрализуют с помощью 3 N NaOH и 1 мл pH 7,0 добавили буфера. Водный раствор дважды экстрагируют с помощью 6 мл гексана высокой чистоты. Остальные этапы, включающие последовательное промывание гексаном экстрагируют разбавленной щелочи и разбавленной кислоты с последующим концентрированием и derivatization идентичны процедуре экстракции ТНС из нормальной плазмы.

Количественное определение 9-карбокси- Δ^9 -ТНС в плазме крови

Δ^9 -ТНС и 11-гидрокси-

11-гидрокси- Δ^9 -ТНС метаболит обладает активностью психотомиметик сравнима с ТНС. Следовательно, любое исследование, пытаюсь соотнести поведение эффектов к концентрации в крови ТНС должны также включать в себя анализ 11-гидрокси метаболита концентрации в крови. Несмотря на то, 9-карбокси метаболит не имеет psychomimetic активности, он является одним из основных ТНС метаболита, и его концентрация в обеих крови и моче может быть измерена в течение более длительного периода времени, чем концентрация

Δ^9 -ТНС. Следовательно, наблюдается сильная интерес в разработке методов количественного анализа этих два метаболизируемых Lites в крови и других жидкостях организма. Способ способен одновременно измерения концентрации в плазме крови ТНС и два Me- tabolites был бы особенно привлекательным.

Rosenfeld опубликовал метод одновременного количественного определения Δ^9 -ТНС и 11-гидрокси- Δ^9 -ТНС в плазме с участием экстракции в толуол с последующим обратной экстракцией фенольных соединений в щелочи и дериватизации перед ГМ / МСОМ анализа Клайзен (7).

метод определения Δ^9 -ТНС, каннабинол, и 11-гигиеническому droxy- Δ^9 -ТНС был разработан в Research Triangle побуждало

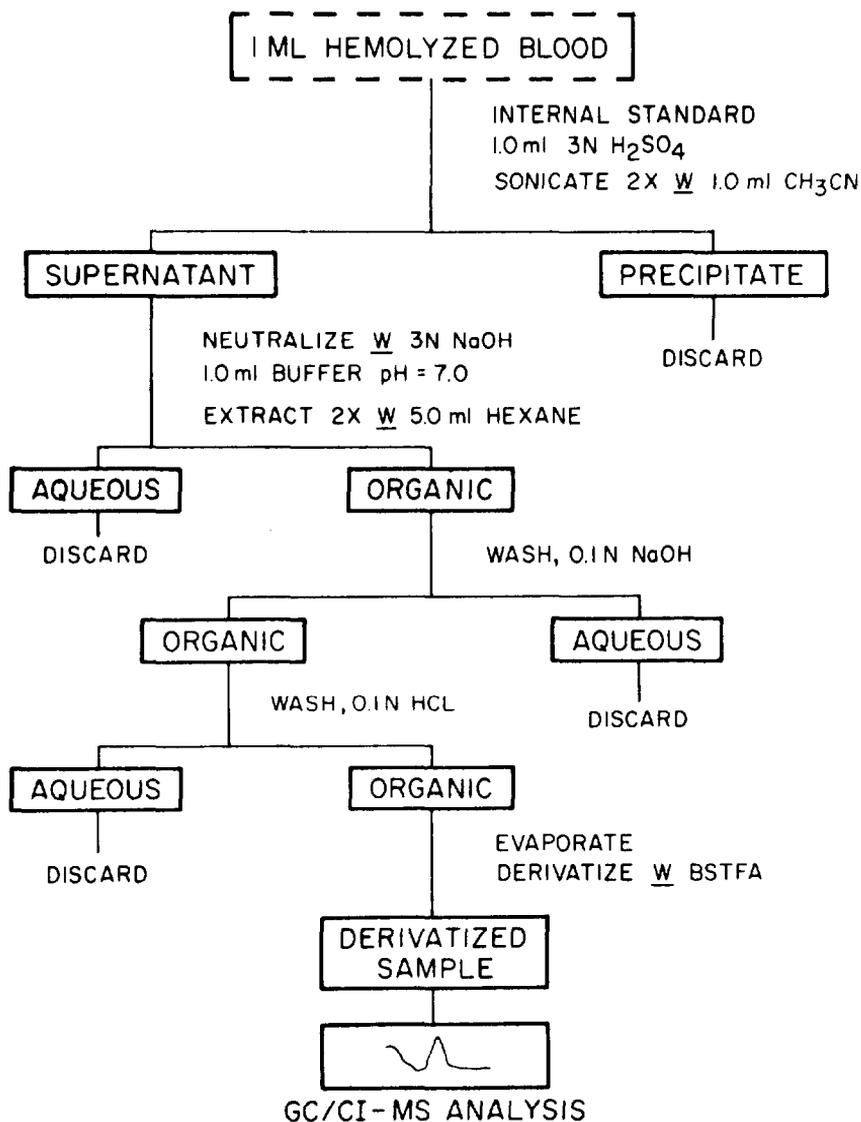


Рисунок 4. Блок-схема для анализа THC в гемолизированной крови.

Tute (8). После добавления дейтерированных внутренних стандартов в плазме, каннабиноиды экстрагируют петролейным эфиром в кон- Taining 1 процента изоамилового спирта. После хроматографии на колонке с Сефадексом LH-20 используется для частичной очистки каннабиноидов. ТНС и каннабинол собраны в одной фракции и анализировали с помощью ГХ / МС без дериватизации. 11-гидрокси-

Δ^9 -ТНС собирается в

Через элюирование фракции и превращают в бис (триметилсилил) де- rivative до анализа ГХ / МС. Же публикации (8) де- книжки отдельной процедуры для анализа 9-карбокси метаболизируемых облегченного ТНСА в плазме или моче. После добавления дейтерированного аналога в качестве внутреннего стандарта, добавляют ацетон в жидкости организма, чтобы осадить белки, ацетон удаляют упариванием и водный остаток экстрагировали диэтиловым эфиром. Обратный фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии используется для очистки саг- квадратное метаболит, который затем превращают в ее диметилловый де- rivative путем обработки диметилсульфатом. ГХ / МС с ионизацией электронным ударом используется для количественного определения соотношения метаболита к внутреннему стандарту.

Процедура измерения специально для 9-карбокси- Δ^9 -ТНС сообщили Nordquist и соавт. (9). Метод использует Δ^9 изомер метаболита в качестве внутреннего стандарта. После подкисления плазмы (pH 4), экстрагируют диэтиловым эфиром и сосредоточенное экстракт обрабатывают диазометаном с образованием метилового эфира карбоксильного метаболита. Метилированный экстракт затем частично очищают хроматографией на колонке с Сефадексом LH-20. И, наконец, trimethylsilylation фенольного ОН достигается непосредственно перед количественным ГМ / EI-MS.

Исследование ЖХ / МС анализ 9-карбокси-ТНС Δ^9 -

В мае 1978 Баттель приобрела систему Финнингэн LC / MS, которая использует движущую ленту для транспортировки элюента из жидкого chromatographic колонны в ионный источник Finnigan 4000 масс-спектрометр. Система предоставляет возможность для прямого анализа полярных метаболитов, таких как 9-карбокси ТНС без derivatization. Были проведены эксперименты, чтобы определить чувствительность этой системы для измерения метаболита. На рисунке 5 показан профиль тока ионов, полученный путем нанесения на движущую ленту, с помощью шприца, гексанового раствора, содержащего 1 нг 9-автомобиль- boxu-

Δ^9 -ТНС. К сожалению, эта чувствительность не может быть прибли- когда близко подошел метаболит пропускали через колонку обратной фазы HPLC, а затем на движущей ленте. Основные причины резко сниженная чувствительность, как представляются, увеличились фоновым благодаря системе растворителей, и более длительному периоду элюирования. Из-за относительно плохой чувствительностью ЖХ / МС для этого

Соединение, внимание было перенесено на разработку способа GC / MS.

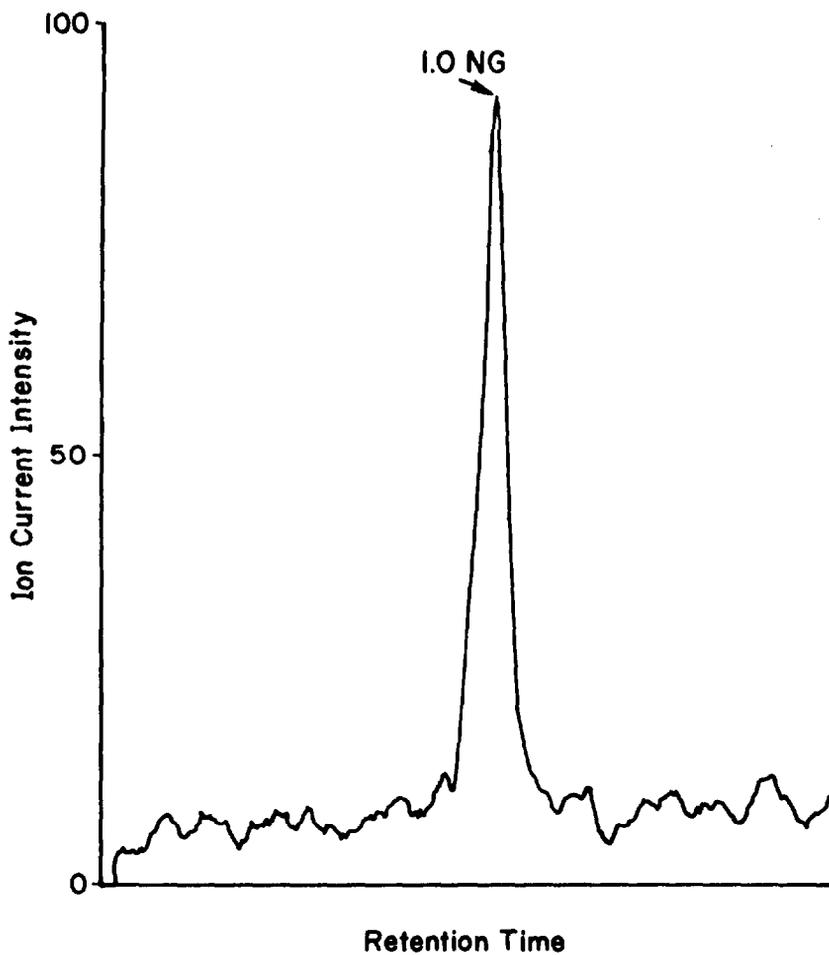


Рисунок 5. Ионный ток профиль для MN + 9-карбокси-ТНС вводятся Δ^9 -ТНС
масс-спектрометр через интерфейс LC / MS.

ГХ / МС Метод

Процедура была запрошена для одновременного извлечения ТНС и двух метаболитов, представляющих интерес из плазмы. Это было достигнуто Δ^9 -ТНС

путем модификации ранее описанной процедуры экстракции

Δ^9 -THC из плазмы. Основные изменения состояли из использования более полярного растворителя и ликвидации разбавленной щелочи. Кроме того, лучший ГХ / МС воспроизводимости был испытан, когда экстракт карбокси метаболит сначала превращают в ее метиловый эфир до trimethylsilylation группы фенольного.

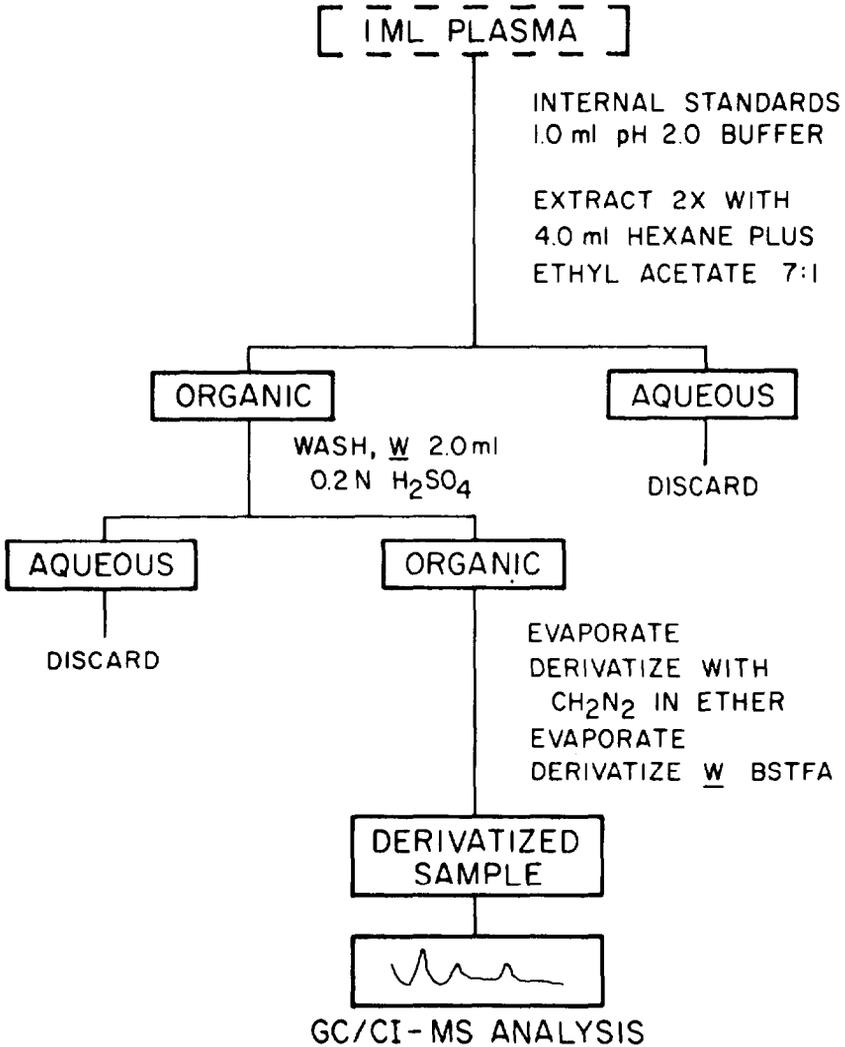


Рисунок 6. Диаграмма потока для одновременного анализа

Δ^9 -THC, 11-гидрокси- Δ^9 -THC, и 9-карбокси- Δ^9 -THC в плазме.

На фиг.6 представлена блок-схема для извлечения Δ^9 -ТНС и его два метаболиты интереса из плазмы. К 1 мл плазмы в 20 мл культуральной трубки, снабженной тефлоном винтовой пробкой, добавляют 1 мл буфера pH 2, а затем 100 μ л раствора этанола, содержащего 50 нг каждого из дейтерий-меченных внутренних стандартов (ТНС Δ^9 -2 ЧАС, 11-гидрокси-ТНС-2 ЧАС, и 9-карбокси-ТНС-2 ЧАС). Вихревая трубка в течение 10 сек, а затем добавляют 4 мл смеси гексан-этил ацетат раствор (7: лв / об). Привинтить крышку плотно и проверить на наличие утечек. Медленно вращать или раскатывать трубку в течение 15 мин. Ослабьте крышку, а затем центрифуге. С помощью пипетки Пастера одноразового использования, передавать органический слой (вверху) на вторую культуральную пробирку и отбросить водный слой плазмы. Добавляют 2 мл 0,2 NH₂ TAK₄ чтобы органический экстракт. Винт на крышке, затяните и снова проверить на наличие утечек. Повторите качалки (10 мин) и центрифугированием (10 мин). Перенести органический слой (вверху) в 15-мл центрифужную пробирку. Старайтесь не передавать какие-либо из водной (нижний) слой в центрифужную пробирку. Удалите водный слой. Осторожно концентрировать экстракт почти до сухости при температуре 35-40 ° C с использованием потока азота. Мытье вниз стороны центрифужную пробирку с 0,5 мл метанола высокой чистоты. Vortex трубку в течение 10 секунд и снова выпаривают почти досуха. Мытье вниз стороны центрифужную пробирку с 0,2 мл метанола. Вихревая трубка в течение 10 сек, а затем передать метанол раствор до 1 мл стеклянного флакона, имеющий конусообразное дно и снабженный тефлоновой футеровкой заворачивающейся крышки. Высокая чистота, диэтиловый эфир (0. 5 мл) используются для окончательной промывки в центрифужной пробирке и эфира в сочетании с метанолом в 1 мл флаконе. Выпаривают объединенные растворители почти досуха с помощью слабого тока азота, осторожно разогрева флакона (40 ° C). Для того, чтобы сформировать метиловый эфир карбокси-метаболита, добавляют раствор диазометана в диэтиловом эфире до тех пор, пока желтый цвет сохраняется. Пробирку закрывают крышкой и нагревают при 50 ° C в течение 0,5 ч. Охлаждают флакон до комнатной температуры, снять крышку и выпарить растворитель почти досуха в слабом токе азота. Добавить 50 добавляют раствор диазометана в диэтиловом эфире до тех пор, пока желтый цвет сохраняется. Пробирку закрывают крышкой и нагревают при 50 ° C в течение 0,5 ч. Охлаждают флакон до комнатной температуры, снять крышку и выпарить растворитель почти досуха в слабом токе азота. Добавить 50 добавляют раствор диазометана в диэтиловом эфире до тех пор, пока желтый цвет сохраняется. Пробирку закрывают крышкой и нагревают при 50 ° C в течение 0,5 ч. Охлаждают флакон до комнатной температуры, снять крышку и выпарить растворитель почти досуха в слабом токе азота. Добавить 50

μ л бис (триметилсилил) ацетамида, содержащего 1 процент триметилсилилхлорид во флакон, крышка плотно и нагревают при 90 ° C в течение 1 часа. Образец готов для анализа ГХ / МС, или он может храниться в морозильной камере (-10 ° C), пока она должна быть проанализирована.

Для анализа ГХ / МС 1,8 м × 2 мм стеклянную колонку упакованы с 3 процентов OV-17 на 100/120 меш Gas Chrom Q (Applied Science Labs, State College, PA), могут быть использованы. Однако, в ТНС концентрации, ниже приблизительно 10 нг / мл, вмешательство эндогенного, кислотный компонент плазмы предотвращает точное измерение ТНС

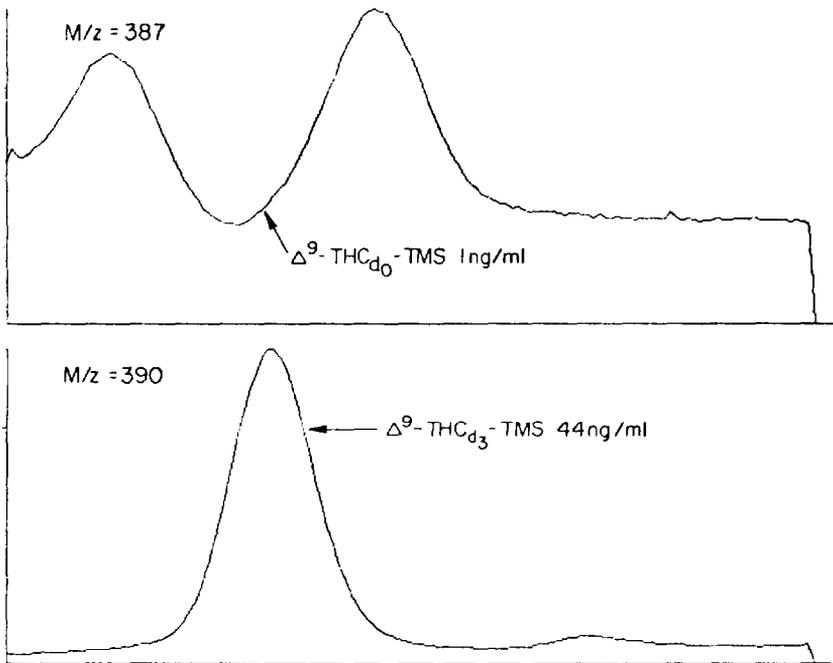


Рисунок 7. Выбранный ионный ток профилей для упакованного анализа колонки GX / MCA
ТНС.

Δ⁹-

высота пика (см рисунок 7). Мешая пик может быть решен с пика ТНС путем использованием капиллярной колонки.

Рисунок 8 показывает текущие профили выбранные ионы, соответствующих ионов протонированной-молекулы для ТНС-ТМС (м / з 387) и ТНС-2 ЧАС-3- ТМС (м / з 390) и Δ⁹-анализа, проведенного на 15-м стеклянного капилляра (0,25 мм ID), покрытой SE-52.

В этом примере ТНС присутствовал при концентрации всего 1 нг / мл, и хорошо разрешен из других пиков в хроматографе matogram, в отличие от насадочной колонки выбранного профиля ионного тока (рисунок 7), где пик, в связи с ТНС-ТМС, является пол ностью затенены мешающего пика. Анализ капиллярной колонки включает в себя инъекцию без деления при температуре колонок 160 ° С из 2 μл силилированного экстракта плюс 1 μл н-тетрадекан, который дает улучшенное разрешение GC из-за так называемого «эффекта растворителя» (10). Через 1 мин температура колонки быстро запрограммирована до 250 ° С. В этих условиях все три саппа- binoids элюируют в течение 6 мин, как показано на рисунке 9.

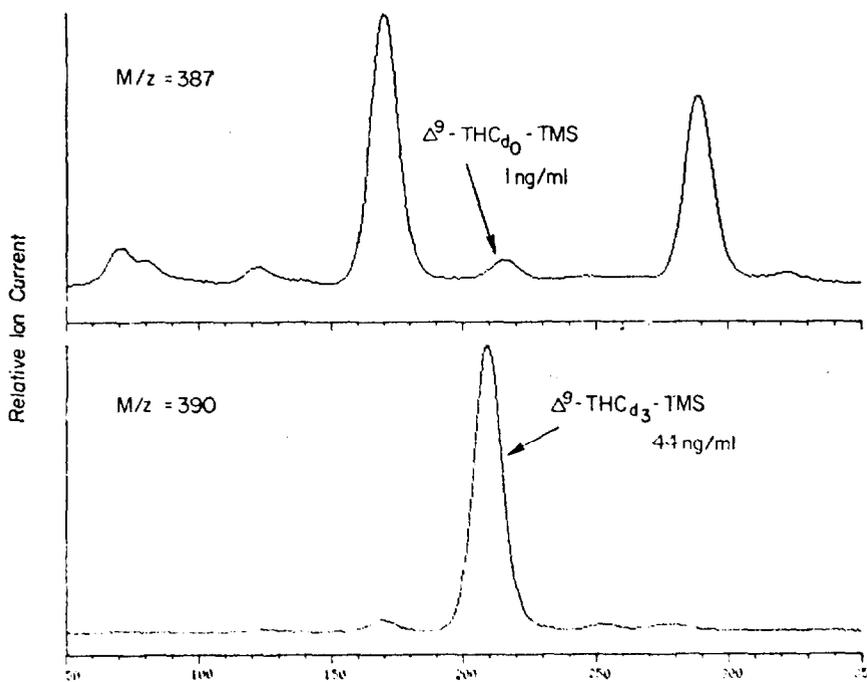


Рисунок 8. Выбранный ионный ток профилей для капиллярной колонки ОГО / МС анализа
ТНС.

Δ^9 -

Для достижения максимальной чувствительности, только два иона массы контролируются в данный момент времени во время анализа ГХ / МС. Таким образом, ионные массы, соответствующие ионы протонированной-молекула

Δ^9 -ТНС-ТМС и его дейтерированный аналог контролируются во время их окна элюции.

Затем, под управлением компьютером, массовые напряжения анализатора переключается, так что ионы, соответствующие протоны ионов ованной-молекулы для LL-гидрокси-ТНС-ТМС и его аналога дейтона ованных контролируются. На Δ^9 , массы-анализатор напряжения устанавливаются для мониторинга протонированной-молекулы ионного тока для метилового эфира 9-карбокси-

Δ^9 -ТНС-ТМС и его дейтерированный аналог.

компьютерная распечатка полученных ионных профилей тока показана на рисунке 10.

Улучшение разрешение ОГО капиллярная колонки может быть достигнуто с- из удлинения времени анализа с использованием водорода в качестве газа-носителя, а не гелия или метана (11). Кроме того, сочетание водорода и аммиака дает лучшее качество СИ масс-спектрометрии TRA, чем комбинация гелия и аммиака. ДИ масс-спектры водорода / аммиака для каждого из триметилсилилировали саппа- binoids показаны на рисунке 11.

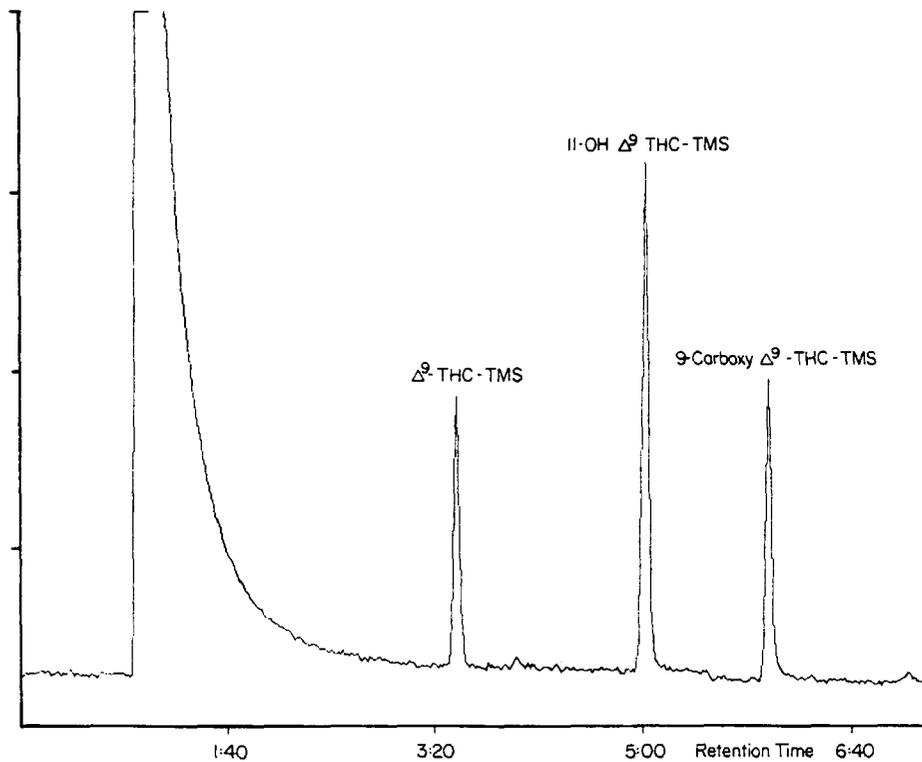


Рисунок 9. Общий ионный ток хроматограмму из капиллярной колонки ГХ / МС анализа стандартной смеси триметилсилилировали каннабиноидов.

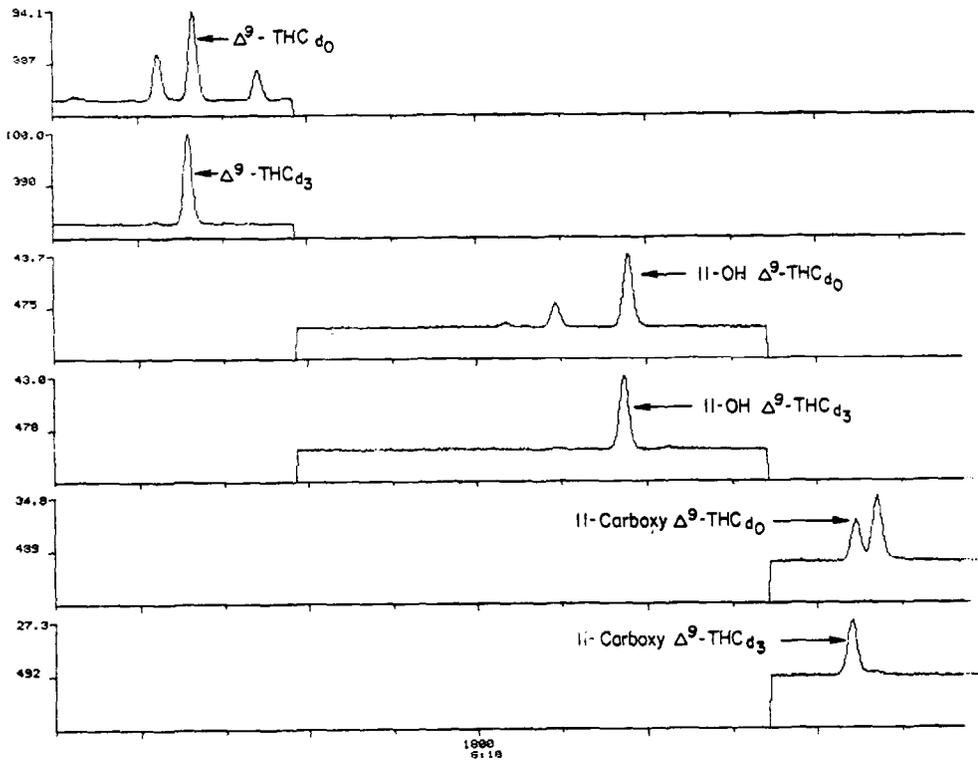
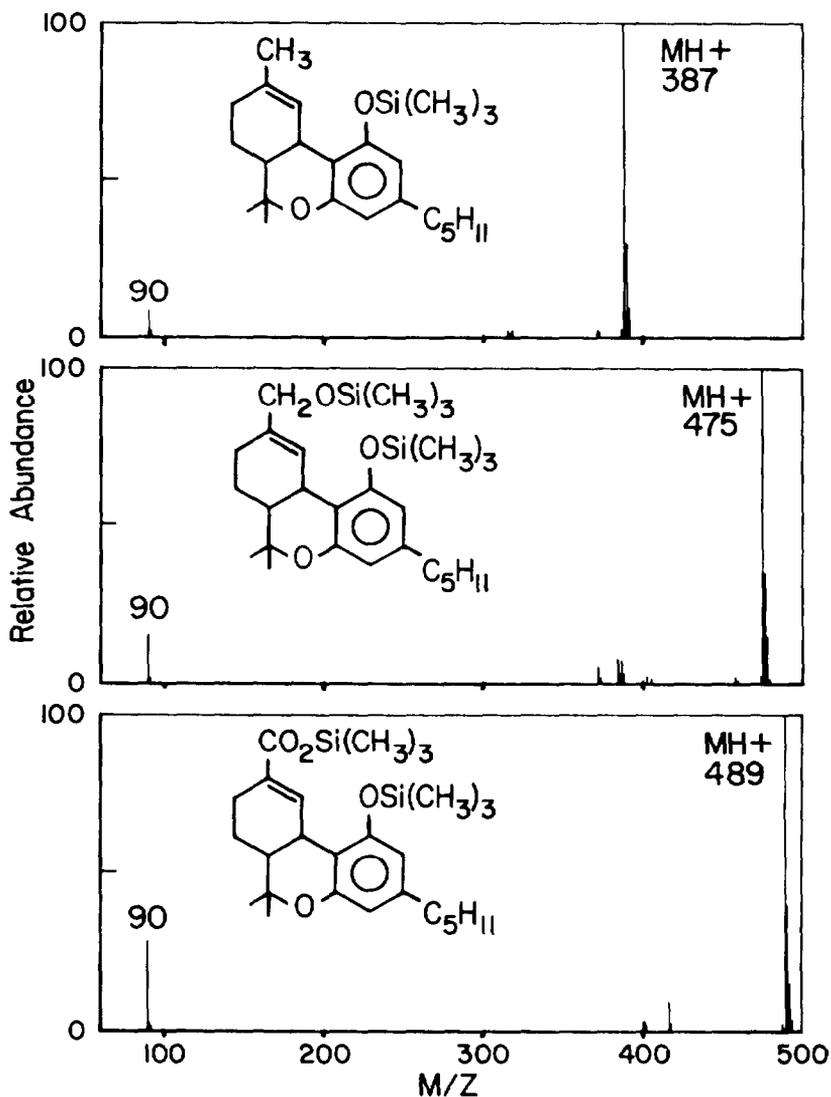


Рисунок 10. Компьютерная распечатка текущих профилей выбраны для ионов ОГО анализа / MCA из Δ^9 -THC и два его метаболитов.



11. СI-МС (N₂/ Нью-Гемпшир) из триметилсилилированных каннабиноидов.

Несмотря на высокую разрешающую способность капиллярной колонки ГХ и специфичность аммиака СI-МС, как видно из рисунка 10, включающие в местителе interfering пики все еще потенциальная проблема. Это в значительной степени из-за относительно метода экстракции, используемого неселективного. Дополнительное негативное следствие процедуры экстракции является то, что в жизни-

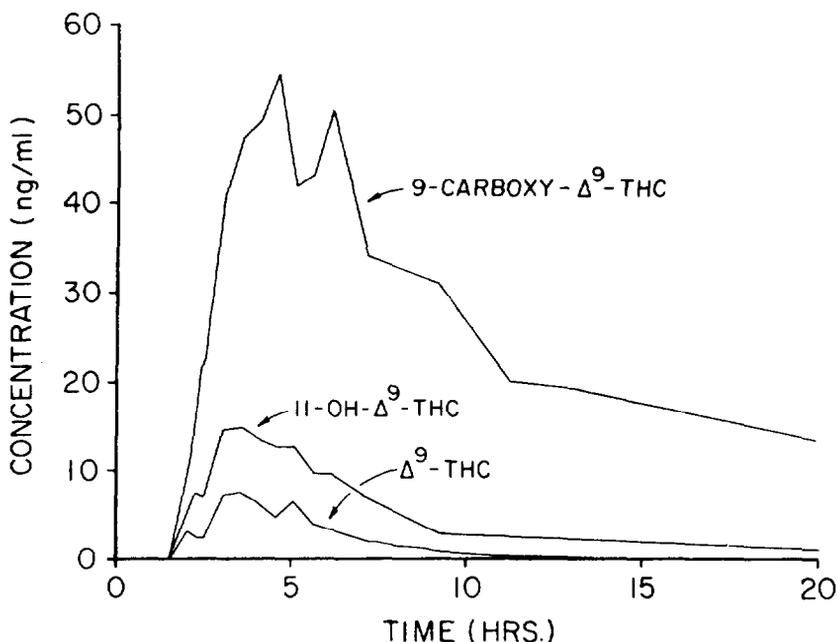


Рисунок 12. Концентрации в крови Δ^9 -THC и два его метаболитов следующих пероральное введение 10 мг препарата у человека.

Время капиллярной колонки сокращается за счет накопления In- послушными, coextracted материалов в передней части колонны. Там- носа, существует необходимость в дальнейшую работу по разработке более селективного экс- тяговой и образец метода очистки, который до сих пор поддается гои- анализа зубов множества образцов.

Описанный способ количественного определения Δ^9 -THC и два метаболиты были применены к измерению плазмы концентраций этих соединений после перорального введения 10 мг

Δ^9 -THC добровольцах. На рисунке 12 приведен концентра- ции в зависимости от времени для типичного случая.

ПОДТВЕРЖДЕНИЕ

Эти исследования были поддержаны Национальным институтом по проблемам злоупотребления наркотиков Contract HSM-42-72-183.

РЕКОМЕНДАЦИИ

1. C. Agurell, Б. Густафссон, Б. Holmstedt, К. Линдер, J.-E. Линдгрэн, И. Нильсон, Ф. Sandberg и М. Asberg. Количественный Δ^9 -тетрагидроканнабинола в плазме курящих конопли. *J. Pharm. Pharmacol.*, 25, 554 (1973).
2. Д. Розенталь, ТМ Харви, JT Bursey, DR рассола и ME Wall. Сравнение методов газовой хроматографии масс-спектрометрии для определения тетрагидроканнабинола в плазме. *Biomed Mass Spectr.*, 5, 312-316 (1978).
3. RL Фольц, PA Clarke, ВJ Hidy, ДВК Лин, А. П. Graffeo и Б. Петерсен. Количественный Δ^9 -тетрагидроканнабинол и 11-нор Δ^9 -тетрагидроканнабинол-9-карбоновой кислоты в жидкостях организма с помощью ГХ / СИ-МС. В JA Винсон (ред.), *Анализ каннабиноидов в физиологических жидкостях*, ACS Symposium Series 98, Американское химическое общество, Вашингтон, округ Колумбия, 59-71 (1979).
4. DL Фенимор, CM Дэвис, JH Уитфорд, и SA Харрингтона. Парофазная Si-lylation стеклянной посуды. *Анальный Chem.*, 48, 2289-2290 (1976).
5. RL Фольц. Количественный анализ злоупотребляли препаратов в физиологических жидкостях с помощью газовой хроматографии / химической ионизации масс-спектрометрии. В AP де Leenheer, P. P. Ronsucci и С. ван Петегем (ред.), *Количественный масс-спектрометрия в Life Sciences II*, Elsevier Scientific Publishing Co., Амстердам, 39-62 (1978).
6. Д. Рос ен т г а л и D. Br, я пе. Quan titati ве де тэ RMI на ти на тетрагидроканнабинола в Δ^9 -трупной крови. *Дж судебной Sci.*, 24, 282-290 (1979).
7. Дж Розенфельд. Одновременное определение Δ^9 -тетрагидроканнабинол а также 11-гидрокси- Δ^9 -тетрагидроканнабинола в плазме. *Анальный. Письма*, 10, 917-930 (1977).
8. ME Wall, DR рассола, JT Bursey и Д. Розенталья. Обнаружение и определение количества тетрагидроканнабинола в физиологических жидкостях. В JA Винсон (ред.), *Саппа- binoid Анализ в физиологических жидкостях*, ACS Symposium Series 98, Американское химическое общество, Вашингтон, округ Колумбия, 39-57 (1979).
9. M. Nordquist, J.-E. Линдгрэн и C. Agurell. Способ идентификации кислотных метаболитов тетрагидроканнабинола с помощью масс-фрагментографии. В RE виль- Летте (ред.), *Каннабиноидов Анализы у человека*, NIDA Research Монография 7, DHEW Pub. Номер (ADM) 78-339. Supt. из Docs., США правительственных служб. Распечатать. Выкл., Вашингтон, DC, 64-69 (1976).
10. K. Grob и K. Grob, младший без деления инъекции и эффект растворителя. *J. High PECO lution Chromatogr. и Chromatogr. Commun.*, 1, 57-64 (1978).
11. K. Grob и Г. Grob. Практический капиллярная газовая хроматография-систематический AP- ный подход. *J. High Resolution Chromatogr. и Chromatogr. Commun.*, 2, 109-117 (1979).

АВТОРЫ

Rodger Л. Фольц
 Центр Университета человека
 токсикологии Юта
 Солт-Лейк-Сити, штат Юта 84112

Bruce J. Hidy
 Battelle Memorial Institute 505 King
 Avenue Columbus, Ohio 43201

Устойчивость Дельта-9- Тетрагидроканнабинола в консервированной крови и сыворотки

Энтони С. Вонг, Майкл У. Orbanosky, Виктор К. Рив, и Джеймс Д.
Бид

ВВЕДЕНИЕ

Литература описана дельта-9-тетрагидроканнабинол (THC) в качестве разлагаемой молекулы, при условии диссипации при воздействии окисления (1), повышенные температуры, а также активные поверхности, таких как стекло и пластмассах, которые вносят вклад (2-6) к потере Δ^9 -THC от водные среды по обширному и иногда невосполнимому связыванию. Поскольку наша работа посвящена главным образом с анализом Δ^9 -THC в крови, беспокойство относительно того, разработаны Δ^9 -THC будет проявлять подобная неустойчивость в образцах крови хранила в течение относительно длительного пери- ODS. Это исследование было разработано для оценки долгосрочного хранения, когда Δ^9 -THC присутствует в крови в высоких физиологических концентрациях. Мы исследовали скорость диссипации Δ^9 -THC во время хранения, эффекты повышенных температур на кроваво-THC образцов, эффекты ре- petitive циклов замораживания / оттаивания на кроваво-THC образцов, а также эффекты перемешивания и колебаний температуры окружающей среды во время отправки.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ДИЗАЙН

Все анализы крови и образцы сыворотки в этом исследовании, были с шипами THC при концентрации 50 нг / мл добавления 50 нг THC дис- решено в 5 μ л спирта к каждому Δ^9 крови или сыворотки. Все стекло- изделия, содержащие концентрированные стандарты силилировали перед использованием. Стеклоаная посуда используется для хранения крови-THC образцы оставляли untreated- под ред. Количественная аналитическая процедура используется в данном исследовании in-

involved добавлением 50 μ л C-11 дейтерированном THC до 1,0 мл крови или сыворотки, подкисление образца до pH 4-5 с использованием 3 мл 0,1 М KH_2PO_4 с последующим кратным 5 экстракциями мл с 1,5% isoа- MYL спирта в пентане. Объединенные органические фазы испаряю- щегося оценили как раз досуха и остаток растворяли в 50 μ л 0,1 М триметилфенил гидроксида аммония, из которых 5 μ л вводили в ГХ / МС. Фундаментальное различие между этим методом и что разработанной Rosenfeld (5) является отсутствие предварительной очистки экстракта.

Финнигэно 3200 ГХ / МС сопряжен с двухканальным программируемым множественным ионным монитор (PROMIM) был использован для Ана- лиз. Газовая хроматография проводилась на 60 \times 0,4 см стеклянной колонке, содержащей 1,5% SP-2250 / 1,95% SP-2401 на 100/120 Supel- сорорт при 210 $^\circ$ С. Отобранные ионы контролируют при м / е 328 и т / е

331, молекулярные ионы для метилированного THC и его дейтерированного аналога, соответственно. На рисунке 1 и 2 представляют собой ион хроматографе для matogram

Δ^9 - THC и типичная стандартная кривая для неэкстрагированного

THC против 5 нг дейтеризованного THC.

Точность и точность аналитического метода в гемо- лизировал кровь и сыворотки определяли с помощью пичковых повторов на два уровнях концентрации: 10 частей на миллиард (10 нг THC в 5 μ л этанола к 1 мл субстрата) и 50 частей на миллиард (50 нг

Δ^9 - THC в 5 μ л этанола

1 мл субстрата). Все повторности той же подложка были проанализированы в тот же день сразу после пики.

1. Долговременное хранение: 1,0 мл образцы игольчатым крови или сыворотки готовили и хранили в стекле под нитро- ген при 5 $^\circ$ С при окружающей атмосфере при 5 $^\circ$ С, -5 $^\circ$ С и -20 $^\circ$ С. Стабильность при хранении оценивали по би- еженедельно.
2. Повышенные температуры: трехкратном повторе по 1,0 мл образцов крови и сыворотки хранили и поддерживали при 20 $^\circ$, 30 $^\circ$, 40 $^\circ$, 50 $^\circ$ и 60 $^\circ$ С в течение 25 часов до анализа.
3. Повторные замораживания / оттаивания Циклы: Три параллельные пробы 1,0 мл образцы крови и сыворотку замораживали при -20 $^\circ$ С в течение 8 дней, в течение этого времени образцы оттаивают в течение 4 часов каждый день и замораживать. Анализы были сформированы пер- на восьмой день.
4. Почтовый Эффект: Δ^9 -THC (50 μ г в 5 μ л этанола) шипы до 1,0 мл гемолизованной крови и сывороток в стеклянных бутылках 2 мл, снабженных тефлоном винтовой крышки. Затем контейнеры были отправлены на юг Califor- NIA, вернулся в Сакраменто, и THC подвергался анализу. Δ^9 -

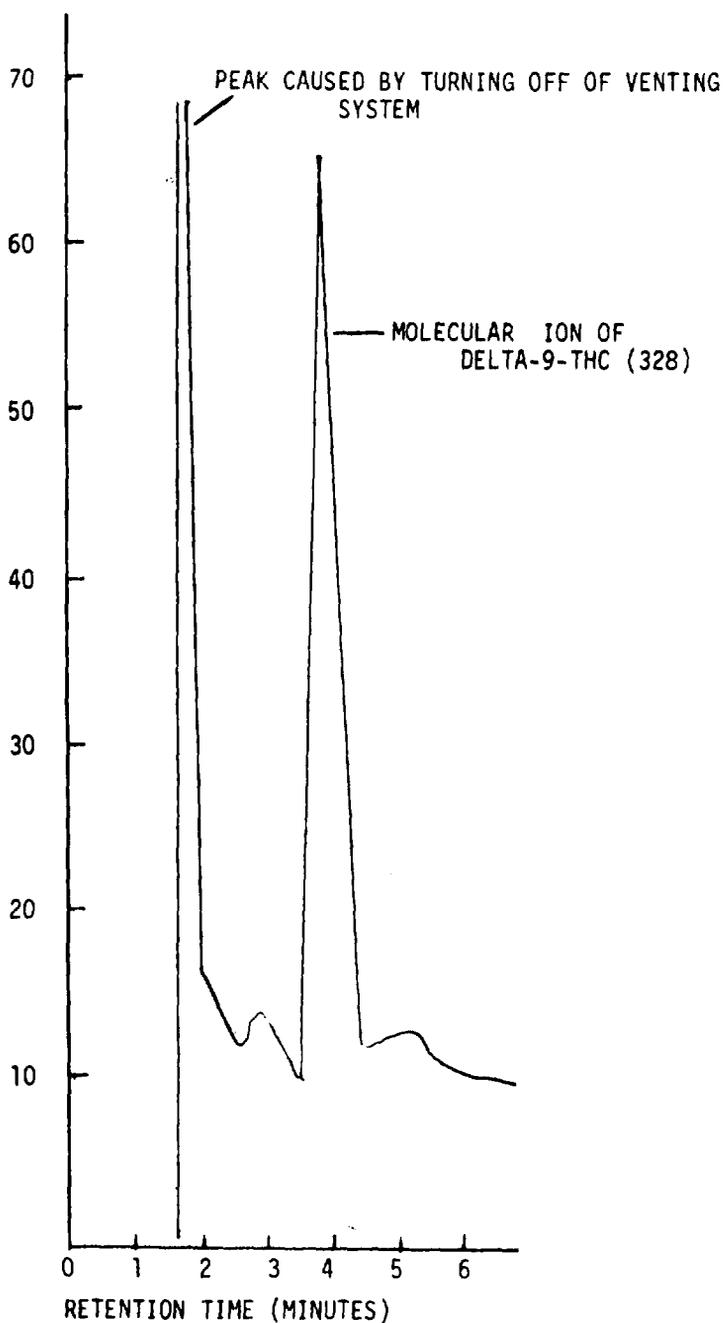
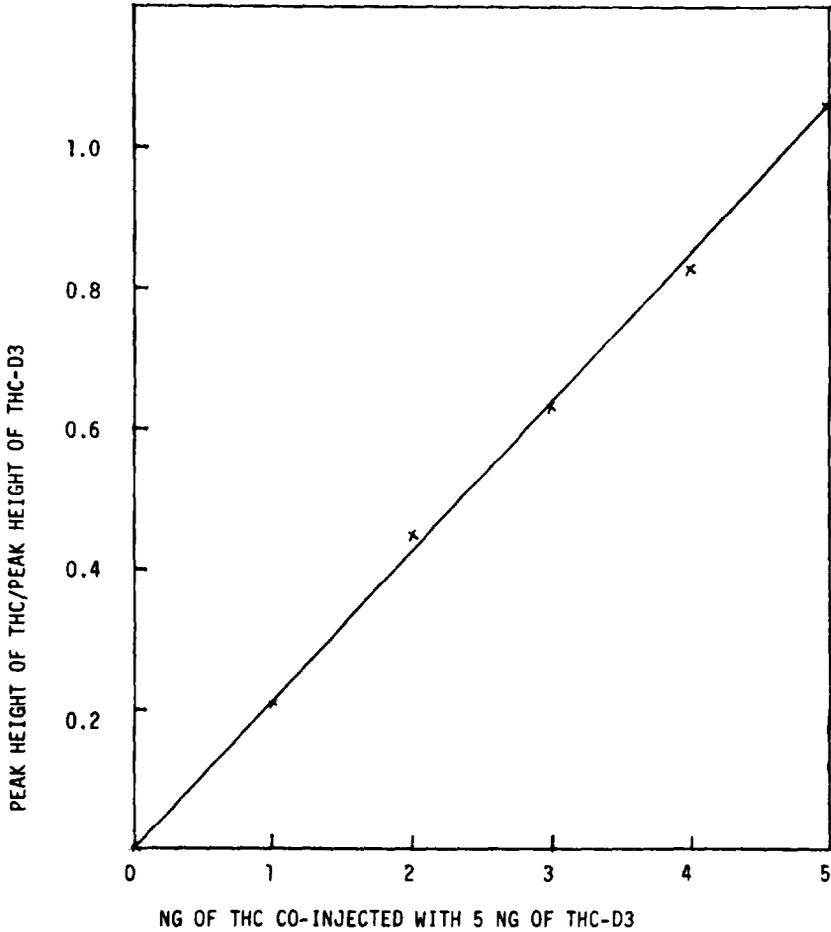


Рисунок 1. Ионный хроматограмма гемолизованной образца крови с шипами 10 частей на миллиард дельта-9-ТГК.



ФИГУРА 2. Положение кривой THC со-инъекции THC-D3. Кривая охватывает диапазон от 0 до 50 нг THC в исходной пробе крови.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Относительное восстановление и воспроизводимость анализа Δ^9 -THC в десяти повторить анализ крови 1,0 мл и сыворотки крови шипов в концентрациях 50 нг / мл и 10 нг / мл, соответственно, были опре- заминированы. Среднее для извлечения крови при 50 нг / мл и 10 нг / мл крови уровня было на 100% (CV = 4%) и 97% (CV = 5%), соответственно.

1. Δ^9 -THC-видимому, остаются стабильными в крови вплоть до недели 17. Анализы проводились на

Образцы хранили до 19 недель, 21 и 23 показали существенных отличий более низкие концентрации, что указывает на потерю ТНС начинается примерно в Δ^9 -неделю 19. Полный Δ^9 -ТНС обнаруживается

Δ^9 -ТНС произошло в неделю 23. Высокая повторного coverage из Δ^9 -ТНС из сыворотки был достигнут до недели 13. Начиная с 15 недели, однако, были получены более низкие и Нерегулярные анализы. Как и в случае крови, определенные потери ТНС произошли после 14 недель хранения.

2. В оба крови и сыворотке крови, ни атмосферные условия, ни температура хранения способствовало существенно к восстановлению Δ^9 -ТНС. Дельта 9-ТГК был оказался стабильным в образцах крови при хранении при температуре 60 ° C в течение 25 часов. В сыворотке, Δ^9 -ТНС может быть гесов-Эред из образцов, хранившихся при 50 ° C в течение 25 часов. При 60 ° C матрица сыворотки гелеобразной, который ингибирует экстракцию.
3. Как и в сыворотке крови образцы, содержащие Δ^9 -ТНС может повторно замораживать и оттаивать, не показывая существенны потери дать значительную препарата.
4. Там не было никаких существенных потерь от субстратов при перемешивании в рассылке при обычном обращении с контейнерами используемыми.

ОБСУЖДЕНИЕ

Внезапные потери Δ^9 -ТНС, который произошел около 17 недели при хранении не может быть в достаточной степени объяснены. Считается, тем не менее, что потери не связаны с фактической деградации или внезапной поверхностной адсорбции Δ^9 -ТНС молекулы. Скорее всего, он догадывался что диссипация Δ^9 -ТНС может быть связано с неспособностью успеш- полностью извлечь препарат, возможно, из-за невосполнимой связывания молекулы разрушающих белков.

Восстановления данных из повторности анализов шипами образцы на четко указывают на пригодность аналитического метода для Δ^9 -ТНС в обоих гемолизированной крови и сыворотки. сравнение ионной хроматограммы типичного гемолизируют образца крови с добавленными 10 частей на миллиард Δ^9 -ТНС (фигура 1) и стандартная кривая (Рисунок 2) показывает, что пик молекулярного иона, 328, из methy- ведена ТНС составил Δ^9 - около 50% от полной шкалы с уровнем шума менее 5% от полной шкалы. Рассчитывается предел обнаружения Δ^9 - ТНС должен быть между 1 и 2 частей на миллиард (от 1 до 2 нг / мл крови). Это обна- предел Тион сравним с таковым другими исследователями (2,5,7). Так как физиологические уровни обычно наблюдается в Δ^9 -

на пользователей в диапазоне от 1 нг / мл до 100 нг / мл в крови (1), метод, разработанный в ходе настоящего исследования для оценки *in пробирке*, Стабилизированное итй из

$\Delta^9\text{-}^r\text{-THC}$ может также использоваться для определения

$\Delta^9\text{-THC}$ в

Кровь курильщиков.

Аналитический метод занимает много времени, и КС / МС входов instrumentation является дорогостоящим. Таким образом, этот метод не является прак- Tical процедуры скрининга.

Использование дейтерированных

$\Delta^9\text{-THC}$ как не-

тренний стандарт имеет важное значение в получении точных и точные ре- зультатов.

РЕКОМЕНДАЦИИ

1. РК Раздан, AJ Putlick, Б. А. Zitko и GR Hendrich. *Experientia*, 28, 121

(1972).

2. Д. Розенталь, Д. рассола, и M. Wall. Количественная Дельта-9-

Tetrahydrocannabinol в сыворотке крови человека методом газовой хроматографии-масс-спектрометрии trometry. Специальный доклад, представленный Национальным институтом по борьбе со злоупотреблением наркотическими средствами, 1 октября 1976 года.

3. Р. Mechoulam. *Наука*, 168, 1159 (1970).

4. РФ Турок, JE Манна, Северная Каролина джайнский и РБ Форни. *J. Pharmas.*, 23, 190 (1971).

5. Дж Розенфельд, Б. Bowins, Дж Робертс, Дж Перкинс, и А.С. Макферсон. *аналитический Химия*, 46, 2232 (1974).

6. Р. Гаррет и Д. Хант. *Журнал Pharmaceutical Sciences*, 63, 1056 (1974).

7. Д. Розенталь и DJ рассола. *Forens. Sci.*, 24, 282 (1979).

АВТОРЫ

Энтони С. Вонг и Майкл У. Orbanosky California Analytical Laboratories, Inc. 401 N. 16th Street, Сакраменто, штат Калифорния. 95814 и

Виктор К. Рив и Джеймс Д. Бид Калифорнийский департамент Бюро юстиции судебно-медицинской экспертизы 3301 С-стрит

Sacramento, штат Калифорния. 95816

Составляющими Cannabis и диспозиции и Метаболизм каннабиноидов

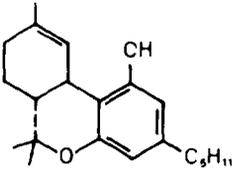
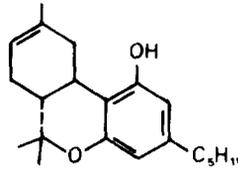
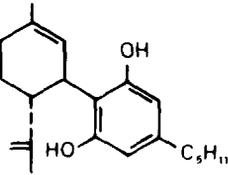
Ричард Л. Ястребов

ВВЕДЕНИЕ

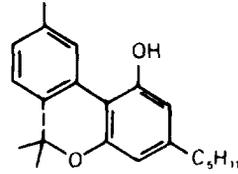
Люди потребляют каннабиноиды в первой очереди от курения подго- ЦИИ из конопли L. Когда растение каннабис материал заранее приготовленном для целей опьянения, он упоминается как «марихуана». Конопля, которая используется как опьяняющее приходит из разных географических источников вокруг мир, и упоминаются как «конопля типа наркотиков», потому что он содержит значительное количество тетрагидроканнабинола (ТНС), первичный химический ингредиент растительного материала, ответственного за психофармакологический эффект. Другой типа каннабиса одинаково распространенного во всем мире достаточно обратиться как «пенька типа» потому, что первоначально, около четырех веков назад, она культивировалась для изготовления канатов материала. Сатта- бис не на самом деле растение коренных жителей Нового Света; он был введен для западного полушария испанскими исследователями,

Более 60 каннабиноидов соединения были определены в «типа наркотиков» каннабис используется незаконно сегодня. Некоторые из более относятся важные из них показаны на рисунке 1. Кроме того, как и в любом растительном материале, существует большое количество других химических соединений, присутствующих, несколько сотен из которых были идентифицированы в конопле

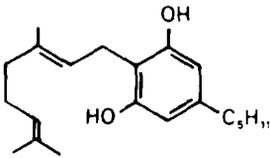
(1) Though конопля содержит много каннабиноидов компонентов и другие химические вещества, ТНС является наиболее известным psuchoas- TIVE компонента каннабиноидов, и его концентрация определяет «потенцию» марихуана. Другие каннабиноиды могут способствовать активностям ТНС пути взаимодействия или прямого воздействия на некоторых конкретных фармакологических мерах, но ТНС представляет собой соединение, на котором

 Δ^9 -THC Δ^8 -THC

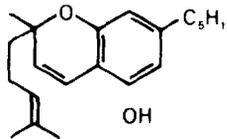
Cannabidiol



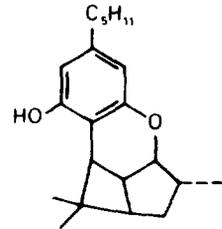
Cannabinol



Cannabigerol



Cannabichromene



Cannabicyclol

Рисунок 1. каннабиноиды первичного интереса найдены в Cannabis Sativa.

большинство исследований на сегодняшний день сосредоточены. В психофармакологической деятельности либо каннабинола или каннабидиол, например, по оценкам, менее чем на 10%, так как велики в человеке, как и у самого ТНС (2). Доминирующий фактор, влияющий на эффективность является генетическим запасом завода. Семена, полученные из конопли относительно высокой ТНС кон- шатра будет производить растения относительно высокой потенции, при прочих равных условий. Следует также отметить, что относительные количества каннабиноидов в растении может значительно варьироваться в зависимости от того, где и как выращивают и собирают растение. Почва, климат, выращивание и возраст может иметь значительное влияние на конечный «продукт».

Образцы марихуаны от незаконных поставок, конфискованных между колебаниями 1979 и 1982 годами Администрацией по борьбе с наркотиками и анализировали с помощью программы мониторинга потенции NIDA, усредненных выше 3,0% ТНС по массе. Эффективность значительно возросла, так как программа началась в 1974 году, когда был найден конфискован материал содержит менее 0,5%. Препарат каннабис под названием «синсемилла» стал более доступным в течение последних 4-х лет и в настоящее время в среднем около 6% ТГК. Отдельные образцы с энергиями выше, чем 10% не возникало. А потенциал глотания психологически Dysphoric количество ТНС, таким образом, значительно увеличен при наличии этих более сильнодействующих форм каннабиса.

ТГК в марихуане находится преимущественно в форме Δ^9 -ТНС-2- (и небольшое количество 4 -) - карбоновая кислота (также называемый «tetrahydrocannabinolic кислоты» или «ТНС-кислота») (1). Эти ТНСacids быстро превращаются в самой ТНС, когда они подвергаются воздействию тепла горячей сигареты. Процесс горения также вызывает разрушение пиролитического части кислоты ТНС и ТНС в сигарете. Фактическое количество ТНС доставлены в дыме, по оценкам, от 20% до 70% в экспериментах, проведенных с курительными машинами (3). Оценка 70% выводятся из исследования, в котором сигарета была сожжена с непрерывным дро, и 20% было обнаружено, когда в 5-вторых слоеном использовали каждую минуту. Последняя ставка является стандартной для экспериментов курения табака. Juana курильщики его семейное, вероятно, попадают между этими оценками, так как они обычно вдыхают больше и чаще, чем раз в минуту в течение 5 секунд. Это предположение подтверждается исследованием которая определила добытого, что биодоступность ТНС от марихуаны сигарет, как измерено в крови человека предметов колебалась от 8% до 24% (в среднем $18 \pm 6\%$) в 11 субъектов (4). Эта «биологическая доступность» является фракционной Тион ТНС в сигарете, которое достигает кровотока. Если, например, 35% ТНС в сигарете были доставлены в дыме и 50% от этого пропускает через легкие в кровь, биодоступность 17,5% привела бы, что находится в пределах указанного диапазона.

За последние 10 лет NIDA поставляет сигарету каннабиса для использования в животных и человек исследованиях токсичности марихуаны, фарм соlogy, фармакокинетику и химии. Сигареты SUP курсировали в потенции в пределах от 0,5% до 3% по весу. Растительный материал выращивают в контролируемых условиях, и материал химически характеризуется количественным анализом восьми основных каннабиноидов. Сигареты поставляются в форме, аналогичной по размеру без фильтрации табака сигареты.

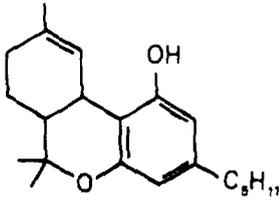
Другие лекарственные формы THC, разработанные NIDA и доступны для исследования включают пероральные дозы THC в кунжутном масле, содержащиеся в желатиновых капсулах, внутривенные растворы THC, которые либо суспендированные в белке сыворотке человека или растворенные в этаноле, а также офтальмологические препараты THC в минеральном масле. Каждые из этих лекарственных форм имеют свою собственную уникальную временную ход эффекта и metabol- IC профиля. Даже если эти лекарственные формы были разработаны для использования в научных исследованиях, направленных на последствия злоупотребления марихуаны, они также служили в качестве лекарственных форм для исследований в ряде областей therapeu- крестиков исследований. Пероральная форма находится под следствием в качестве противорвотного препарата для пациентов, подвергающихся химиотерапии рака и orh- thalmic препарат исследуется в качестве лечения, чтобы уменьшить внутриглазное давление в результате глаукомы.

ОБМЕН И РЕАЛИЗАЦИЯ

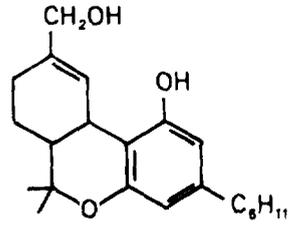
Когда марихуана курят или перорально, THC и многие другие присутствующие каннабиноиды проходят обширные метаболизм в многих кислородсодержащих видов. Большинство исследований по каннабиноидам Me- tabolism было проведено на самом THC. Метаболиты THC, которые были охарактеризованы и изолированы от человека (5,6,7) являются иллюстрированы на рисунке 2.

Общее количество метаболитов в результате человеческой адми- страции THC, несомненно, гораздо больше. В пробирке и в естественных исследованиях на животных показывают, что большое количество гидроксильных метаболитов и карбоксилированных в результате метаболизма THC, а также от других каннабиноидов, найденных на заводе (8-14). Исследователи огра- также показали наличие конъюгатов жирных кислот THC (15,16), различные 0-глюкуронидов (17,18), и C-глюкуронидов (19).

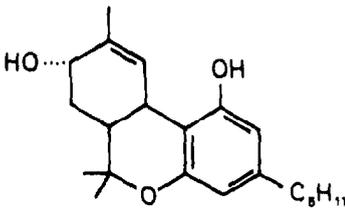
Образование глюкуронид конъюгатов THC и его метаболизируемые Lites Сообщалось, что происходит на положении фенольного (17), на положении карбоновой кислоты в 11-нор $-\Delta^9-$ ТГК-9-карбоновая кислота (9- карбокси-THC) (18), а также непосредственно на двух и четырех положениях ароматического кольца (19). Пока неясно, в это время, как это сопряжение влияет на экскрецию, хранение и рециркуляцию материала, но очевидно, что большая часть каннабиноидов метаболитов выводится из организма с мочой в виде глюкуронида конъюгатов (5,18,20). В случае 9-карбокси-THC, конъюгации может происходить как на фенольных и карбоксильной положении, что приводит к возможности трех различных сопряженных видов. Недавнее исследование при условии, что харак теристики 12 дополнительных метаболитов кислоты THC (21). Техни- ческий и комплекс каннабиноиды метаболический профиль в человеке показываемые



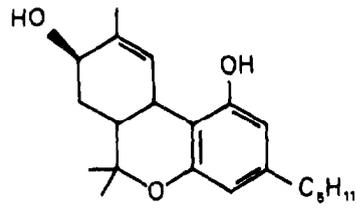
Δ^9 THC
(active)



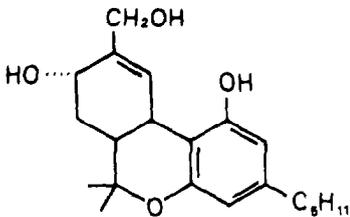
11-Hydroxy- Δ^9 THC
(active)



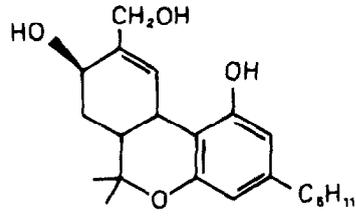
8 α -Hydroxy- Δ^9 THC
(much less active)



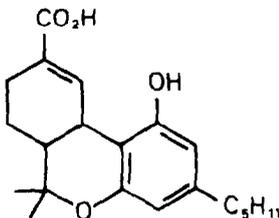
8 β -Hydroxy- Δ^9 THC
(less active)



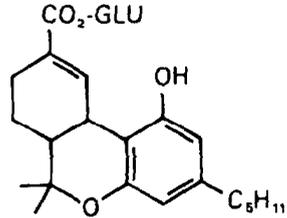
8 α , 11-Dihydroxy- Δ^9 THC



8 β , 11-Dihydroxy- Δ^9 THC



11-nor- Δ^9 THC-9-
Carboxylic Acid
(inactive)



11-nor- Δ^9 THC-9-Carboxylic
Acid Glucuronide

лаборант, когда все возможные каннабиноидов метаболиты и их соответствующие конъюгаты рассматриваются.

Концентрации метаболита на рисунке 3 типичны установлено значительных различий, обнаруженных в крови после перорального введения (22) ТНС по сравнению с введением через курение (23). 11-гидрокси метаболита, вероятно, играет незначительную роль после курения как концентрация очень низка (5), менее 10% от концентрации ТНС в любое время. После перорального введения, однако, 11-ОН-ТНС может играть более важную роль, поскольку его концентрация относительно выше в крови, часто выше, чем у ТНС. Значительные количества ТНС не наблюдается после перорального введения за счет, прежде всего, с относительно медленной абсорбции ТНСА и последующего интенсивного метаболизма с помощью «первого прохождения» через печень. Профиль крови пероральной дозы указывает, 9-карбокси-ТНС, как преобладающий метаболит.

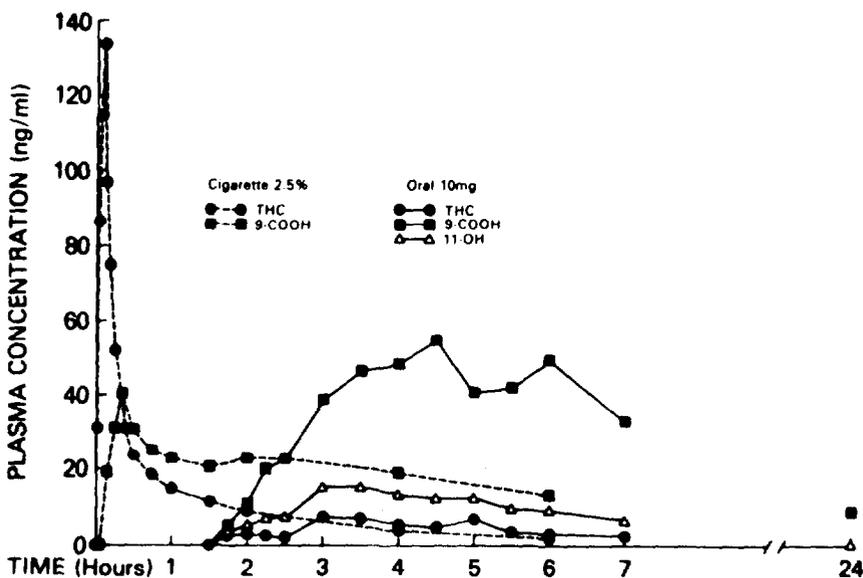


Рисунок 3. концентрации в плазме от времени кривой для ТНС и его метаболитов после того, как оральные и копченных введения.

Некоторые из гидроксированных метаболитов, как было показано, чтобы иметь некоторую активность (24), но 9-карбокси-ТНС показал мало или нет активности, когда вводили либо человека (24) или животного. Только активный метаболит, как известно, происходит в какой-либо значительной концентрации составляет 11-гидрокси- ТНС, которое было показано, обладают активностью, равной или, возможно, немного больше, чем сама ТНС при введении человеку в одиночку (25). Психофармакологическая активность в человеке 8-

бета-гидрокси-ТГК было сообщено, как около 4%, что ТНС и 8-альфа-гидрокси-ТНС менее чем на 10% (24).

△⁹-

В клинических исследованиях было показано, что 80% до 90% от общей дозы вводимого ТНС из организма в течение в кале 5 дней, в основном (65%) (26). Недержание фракция, которая составляет оставшиеся 18% до 23% от дозы, из организма, состоит в основном из кислого мета-болитов, такие как 9-карбокси-ТНС и другие родственные кислоты (21). Только около 5% от общего объема мочевой фракции состоит из нейтрального сапнабин- OIDs, а сам ТНС составляет менее 1% от этого. Конечная точка почечного пути, следовательно, мульти-кислородсодержащие кислотные метаболиты. Калом фракция состоит из приблизительно равных частей нейтральных и кислых метаболитов, 9-карбокси-ТНС что составляет около 29% от выделенных метаболитов, ТНС около 8%, и 11-гидрокси-ТГК около 21% (5).

Когда время курс исчезновения ТНС из плазмы по сравнению с очень медленной экскрецией метаболитов в моче, то становится очевидным, что какой-то механизм вносит свой вклад в эту ликвидацию запаздывающего материала. Как уже упоминалось выше, от 80% до 90% от введенной дозы ТНС IV учитывается в течение 5 дней, то повторно mainer удаляются медленно, в течение более длительного периода времени. Одним из механизмов, который, вероятно, вносит значительный вклад в долгосрочную экскрецию этих метаболитов включают энтерогепатическую рециркуляцию, так как большая часть IV дозы в организме человека удаляются в фекалиях (26) и реабсорбции желчных экскрементов был в ред Украины показаны собаках (27). Другие механизмы, которые могли бы способствовать in-лать вывод почечной реабсорбции и deertissue распределения. Из-за растворимости липидов (28) ТНС, Характерная разделяемая многими из его метаболитов, некоторая часть дозы, вероятно, захваченная в бассейнах жировой ткани для медленного высвобождения. Преимущественное поглощение ТНС в жировой ткани крыс сообщалось, в то время как другие ткани, такие как мозг, легкие, мышцы и всасывается гораздо меньшую пропорцию дозы (29).

Важно, чтобы определить, как механизмы, участвующие в этой медленной экскреции и какие конкретные метаболиты участвуют. Несмотря на то, что кислотные метаболиты, вероятно, не имеют психоактивность, другие виды токсических эффектов не могут быть исключены. Идентифика- цию конъюгатов жирных кислот ТНС привело к предположению, что спе- стотак этого типа могут способствовать хранению каннабиноидов в тканях тела (15161). Много исследований еще предстоит сделать для установления хронической токсичности этих или многих другие ТНС метаболитов. характер метаболитов и способ их устранения является важным, поскольку процесс ликвидации измеряется в днях, а не часов, и повторного введения через курение марихуаны, вероятно

приводит к накоплению как ТНС и метаболитов и возможность при- последующих токсичных последствий.

Большая часть судебно-медицинской экспертиза интереса каннабиноидов анализа жидкостей организма были сосредоточено на 9-карбокси-ТНС метаболита, метаболит основной кислоты ТНС, которые были охарактеризованы и синтезирован размером для исследования. Этот метаболит является одним из важных видов в обоих крови и моче. Как показано на рисунке 3, уровни ТНС, которые изначально довольно высоко падение очень быстро, и пересекают восходящее 9-cag- квадратных-ТНС кривых приблизительно 20 минут. Хотя эта кривая основана на одной дозе, это дает доверие к гипотезе о том, что анализ крови, который показывает аналогичные концентрации для обоих ТНС и 9-карбокси-ТНС может быть признаком совсем недавно ад- раздаянии марихуаны и возможно, с высокая вероятностью того, что объект находится в состоянии алкогольного опьянения. На этом рисунке также показано, что, из-за быстрого уменьшения концентрации ТНС в крови, аналитическая методология менее чувствительны, чем 1 или 2 нанограмм на миллилитр, вероятно, обнаружить присутствие ТНС после нескольких часов, за исключением, возможно, в тяжелой хронической курильщика нет. Кривая для 9-карбокси-ТНС на этом рисунке показывает значительно более длительный временной ход и, следовательно, обеспечивает лучший показатель предыдущего курения.

Моча метаболит анализы, которые недавно стали доступны на коммерческом рынке сделали обнаружение каннабиноидов доступного для гораздо более широкого спектра лабораторий, включая те ассоциироваться с вооруженными силами, с частным сектором, а также штрафные In- stitutions. Эти методы включают в себя систему Syva Co. испускают и систему Roche Diagnostics ABUSCREEN ПИА. Анализ мочи с использованием этих видов анализов обеспечивает индикацию прошлого использования марихуаны. Из-за относительно длительного периода обнаружения саппа- binoid метаболитов в моче, это «прошлое использование» не может быть более Специфично точно определили, чем от 1 часа до 1 недели. Это делает любой анализ мочи, независимо от того, обнаружены уровней, недостаточны для предсказания интоксикации или определенного времени использования.

Как уже упоминалось выше, анализ крови имеет потенциал для предоставления информации, имеющей отношение к отравлению. Образцы крови, однако, трудно получить для многих криминалистических целей из-за их инвазивный характер. Слюна и дыхание гораздо легче образцы, приобретающий для обнаружения наркотиков и оба были исследованы на наличие компонентов марихуаны после курения. Использование ТЭП методов обнаружения ТНС в слюне была предложена несколькими авторами (30-34).

Исследование, проведенные в организме человека с использованием радиоактивно ТНС ведения In- travenous инъекции (35) не удалось обнаружить какую-либо радиоактивность в образцах слюны. Это говорит о том, что ни ТНС или его метаболиты проходят

в слюну или легкие из крови и что каннабиноиды де регистрируемые в этих биологических матрицах поглощенные в процессе курения.

В недавнем исследовании, РИА специфическим для ТНС был использован (36) для анализа чуждой набор образцов слюны (37) от субъектов, которые курили *maijua*- на сигареты, содержащие коноплю приблизительно 2% потенции. Смешанные образцы слюны были взяты из этих предметов в течение периода 24-часовой. Концентрация поглощенных ТНС в этих образцах, изображенных на рисунке 4, при условии значительно более колебания с течением времени, чем уровни в плазме из-за присущую изменчивость концентрации смешанной слюны и трудность в точно Али-цитировании из смешанного образца слюны. Очевидно, однако, что установлено значительные уровни ТНС остаются в слюне в течение нескольких часов после курения марихуаны. В течение первого часа, в отсутствие приема пищи, некоторые уровни превышали 100 нг / мл и выше уровня 5 нг / мл

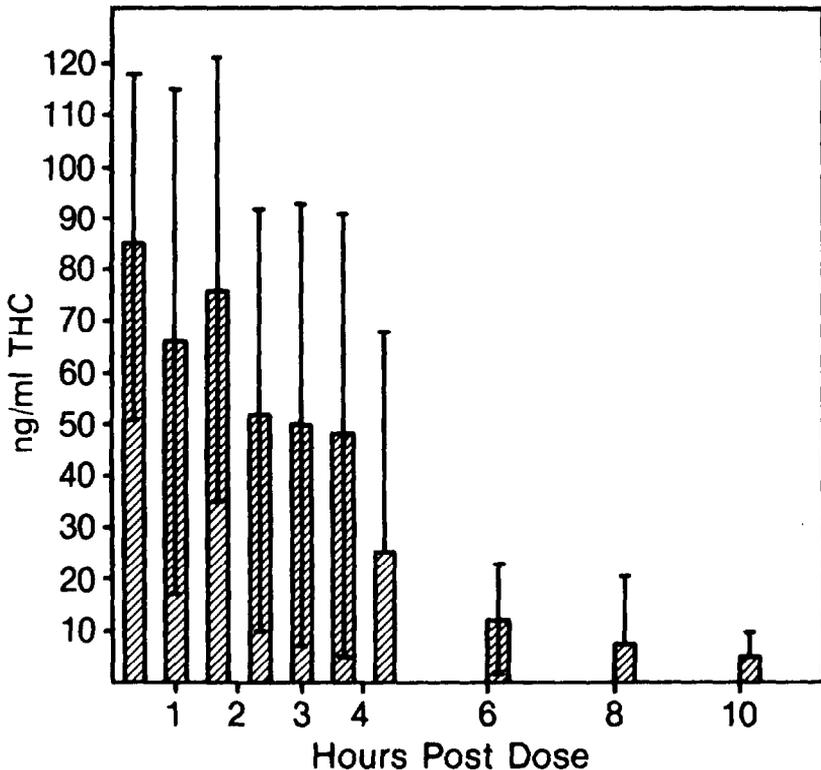


Рисунок 4. Уровни слюны человека после курения одну сигареты марихуаны, содержащей 18 мг ТНС. N = 8 в 20 мин., N = 7 в 60 мин., N = 5 для других.

Изменчивость выражается как стандартное отклонение.

были еще обнаружены в большинстве образцов за 8 часов, даже если нормальная еда и потребление жидкости возобновилась после 3-х часов. Эти результаты дают дополнительную индикацию, что слюна может быть полезной для жидкости предполагаемого обнаружения недавнего использования. Даже если не кван- корреляции ственном не может быть сделана между уровнями слюны и intoxicaci- ции, поскольку только sequested THCA обнаружения, способность уменьшить «прошлое использование» сроки от нескольких недель до нескольких часов может иметь полезные исследования и судебно-приложения.

Использование дыхания в качестве скринингового среды было исследовано с помощью растворителя и криогенные ловушки с последующим анализом с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии / масс-спектрометрии (38), а также с использованием твердой матрицы ловушки с последующим conventional RIA (39). Уровни в дыхании, как представляется, ниже, чем те, что в слюне после курения, и использование такой среды для обнаружения бы, следовательно, требуют относительно большей чувствительности в методе анализа, а также более сложные средства выборки коллектив- лекции.

Фармакокинетика

Исследования фармакокинетики THC были получать приведет к усилению внимания в последние несколько лет, как аналитические методы для количественного определения каннабиноидов в биологических жидкостях улучшились. Фармакокинетика THC и его метаболитов важно несколько направлений исследований. Различные исследования показали, что в долгосрочной перспективе, хроническое употребление марихуаны может привести к ад- воздействия на здоровье стихотворного в личности (40). Некоторые из этих эффектов могут быть связаны с токсическим накоплением либо THC или метаболизируемые Lites ТГК в организме. Фармакокинетические исследования ме- ханизмов, с помощью которого эти каннабиноиды выводятся из организма имеют важное значение в понимании потенциальной степени и темпов этого накопления.

Детальные фармакокинетические исследования THC в организме человека при острых и хронических графиках дозирования начинают предоставлять основные данные, которые позволяют уровни в крови активного лекарственного средства, связаны с психотомиметическими, поведенческими и физиологическими эффектами (4,23,26). С увеличением доступности аналитических методов для анализа каннабиноидов в крови и моче, наблюдается повышение интереса в предоставлении аналитических данных для судебно-медицинских целей, которые могут быть relat- ред к интоксикации лиц, участвующих в аварии, а также лиц, которые по закону ответственность за поведение употребления наркотиков в вооруженных силах, на испытательном сроке, или в промышленности. Важно понимать, что кинетические механизмы, связанные с THC и других каннабиноидов для того, чтобы связать эти судебные вопросы к

смысл данного уровня в крови, особенно в тех случаях, когда intoxi- катион является фактором. Наличие более чувствительной и более доступной аналитической технологии для количественного анализа компонентов марихуаны в жидкостях организма будет играть ключевую роль в этих эффек- фортах.

РЕКОМЕНДАЦИИ

1. CT Turner, MA Elsohly и EG Boeren. Составляющие Cannabis Sativa L. XVII. Обзор природных компонентов. *J. Natural Products*, **43**, 169-234 (1980).
2. М. Перес-Рейес, МС Тиммонс, КН Дэвис и МЕ Wall. Сравнение фармакологической активности в человеке внутривенного введения дельта-9-ТГК, каннабинола и каннабидиола. *Experientia*, **29**, 1368-1369 (1973).
3. Х. Дэвис, Research Triangle Institute, частное сообщение.
4. А. Олссон, JE. Линдгрэн А. Wahlen, С. Agurell, LE Hollister, и НК Гиллисли. Плазменная дельта-9-ТКА концентрации и клинические эффекты после перорального и внутривенного введения и курения. *Clin. Pharm Ther.*, **98**, 409-1413 (1980).
5. ME Wall, DR рассола и М. Перес-Рейес. Метаболизм каннабиноидов в человеке. В *Фармакология марихуаны*, Vol. 1, МС Брауде и С. Szaga, ред., Raven Press, Нью-Йорк, 93-116 (1976).
6. ME Wall, DR рассола, CG Питт, и М. Перес-Рейес. Идентификация дельта-9 ТНС и метаболитов в человеке. *Варенье. Химреагент Soc.*, **94**, 8579-8681 (1972).
7. Л. Лембергер, С. Д. Зильберштейн, Дж Аксельрода и И.Я. Копин. Дельта-9-ТНС в человеке. *Наука*, **170**, 1320-1322 (1970).
8. SH Бурштейн, Ф. Мenezес, Э. Уильямсон, Р. Mechoulam. Метаболизм дельта-л (6) ТНС, активного компонента марихуаны. *Природа*, **225**, 87-88 (1979).
9. И. М. Нильссон, С. Agurell, JLG Nilsson, А. Олссон, Ф. Сандберг, и M. Wahlq-Вист. Дельта-1-ТНС: структура основного метаболита. *Наука*, **168**, 1228-1229 (1970).
10. ME Wall, DR рассол, рассол Г.А., CG Pitt, RI Freudenthal и HD Кристенсен. Выделение, структура и биологическая активность нескольких метаболитов дельта-9-ТГК. *Варенье. Химреагент Soc.*, **92**, 3466-3468 (1970).
11. С. Agurell, И. М. Нильссон, M. Widman. Каннабиноиды метаболиты гидроксилированный в боковой цепи пентил. В *Марихуана Химия, биохимия и клеточная эф- фектов*, Г. Nahas, изд., Springer-Verlag, New York, 141-158 (1976).
12. С. Берстеин. Исследование метаболических превращений дельта-1-ТНС. В *Можно- Анализ pavidoid в физиологических жидкостях*. JA Винсон, изд., Американское химическое общество, Вашингтон, округ Колумбия, 1-12 (1979).
13. ME Wall и DR рассола. Применение масс-спектрометрии в каннабиноидной перепроверке поиска. В *Марихуана: Биологические эффекты*, Г. Nahas и WDM Патон, ред., Пергамон Пресс, Лондон, 15-43 (1979).
14. DJ Harvey, BR Martin и WDM Патон. Определение и измерение каннабиноидов и их метаболитов в печени в естественных условиях с помощью газовой хроматографии-масс-спектрометрии. В *Марихуана: Биологические эффекты*, GG Nahas и WDM Патон, ред., Пергамон Пресс, Лондон, 45-62 (1979).
15. E. Leighty, А. Ф. Фентимэн и RE Фольц. Длинные сохранил метаболиты дельта- 9-ТНС, определенных в качестве новых коныюгатов жирных кислот. *Местожителство Cotinul Chem. Pathol. Pharmacol.*, **14**, 13-23 (1976).

16. B. Yisak, C. Agurell, JE. Линдгрэн, и M. Widman. В естественных метаболитов каннабинола идентифицирован как конъюгатов жирных кислот. *J. Pharm. Pharmacol.*, **30**, 462-463 (1978).
17. C. Pallante, M. A. Лайл и C. Fenselau. Синтез и характеристика глюкуронидов 5'-гидрокси-дельта-9-ТГК и 11-гидрокси-дельта-9-ТГК. *Drug Metab. Dispos.*, **6**, 389-395 (1978).
18. PL Williams и AC Моффат. Идентификация в моче человека дельта-9-ТГК-11оис глюкуронида кислоты: А THC метаболита. *J Pharm. Pharmacol.*, **32**, 445-448 (1980).
19. С. Леви, Б. Yagen и Р. Mechoulam. Идентификация С-глюкуронид delta6-тетрагидроканнабинола в качестве конъюгата печени мыши в естественных условиях. *Наука*, **200**, 13911392 (1978).
20. С. Л. Кантер, Л. Холлистер, и ЦЗЮЙ Замора. Марихуана метаболиты в моче человека XI. Обнаружение un conjugated и сопряженного дельта-9-ТГК-11-овая кислота с помощью тонкослойной хроматографии. *J. Chromatogr.*, **235**, 507-512 (1982).
21. M. M. Halldin, C. Carlsson, С. Л. Кантер, M. Widman и C. Agurell. Мочевые метаболиты Δ^1 -тетрагидроканнабинола в человеке. *Arzneimittelforschung* в прессе.
22. X. Гросс, МН Эберт, В. Б. Faden, Южная Каролина Голдберг, WH Кэй, ED Caine, RL Ястребы, и Н. Зинберг, двойное слепое испытание дельта-9-тетрагидроканнабинола в первичной нервной анорексии. Представлено к публикации, 1982.
23. М. Перес-Рейес, С. DiGuiseppe, К. Х. Дэвис, В.Х. Шиндлер и СЕ Кук. Заготовку Com-эффектов марихуаны сигарет трех разных энергий. *Clin. Pharmacol Ther.*, **31**, 617-624 (1982).
24. М. Перес-Рейес, MD Тиммонс, М.А. Lipton, HD-Кристенсен и К. Х. Дэвис. Сравнение фармакологической активности дельта-9-ТГК и его метаболитов monohy droxylated в человеке. *Experientia*, **29**, 1009-1010 (1973).
26. М. Перес-Рейес, MC Тиммонс, М. А. Липтон, К. Х. Дэвис и Е. Стена. Внутри- венозной инъекции в человеке дельта-9-ТГК и 11-ОН-дельта-9-ТГК, *Наука*, **177**; 633-635 (1972).
26. AC Ханта и РТ Джонс. Толерантность и расположение THC в человеке. *J. Pharm. Exp. Ther.*, **215**, 35-44 (1980).
27. ЭР Гаррет и СА Хант. Фармакокинетика дельта-9-ТГК в собак. *J. Pharm. Sci.*, **66**, 395-407 (1977).
28. ЭР Гаррет и СА Хант. Физико-химические свойства, растворимость, и связывание белка дельта-9-ТГК. *J. Pharm. Sci.*, **63**, 1056-1064 (1974).
29. Д. С. Кройцы и Дж Аксельрод. Дельта-9-тетрагидроканнабинол: локализация в теле жира. *Наука*, **179**, 391-393 (1973).
- 30 IS Форрест, DE зеленый, SE Rose, GC Скиннер, и DM Торрес. Fluorescent- мечены каннабиноиды. *Местоительство Commun. Химрегент Pathol. Pharmacol*, **2**, 787-792 (1971).
31. AP Меликян и IS Форрест. Дансил производные дельта-9- и дельта- & tetrahydrocannabinols. *J. Pharm Sci.*, **62**, 1025-1026 (1973).
32. WW Просто, Г. Вернер, M. Weichmann. Bestimmung фон дельта-I- и дельта- 1 (6) тетрагидроканнабинол в Blut, Урин унд Speichel фон Haschisch-Rauchern. *Naturwiss.*, **59**, 222-223 (1972).
33. F. Friedrich-Fiechtl, Г. Spittler, WW Просто, Г. Вернер, M. Weichmann. Au Nachweis унд Identifizierung фон тетрагидроканнабинол в Biologischen Flussigkeiten. *Naturwiss.*, **60**, 207-208 (1973).
34. WW Jut, Н. Филипович, и Г. Вернер. Обнаружение дельта-9-ТГК в слюне мужчин с помощью тонкослойной хроматографии и масс-спектрометрии. *J. Chroma- togr.*, **96**, 189-194 (1974).
36. M. Perez-Reyes. Университет Северной Каролины, при личном общении.

36. CE Кук, Research Triangle Institute, NC, выполненный в соответствии с NIDA контракта 271-80-3705.
37. Н. Москович, Southern California Research * Институт, CA, образцы, собранные в рамках NIDA контракта 271-76-3316.
38. JL Валентина, PJ Bryant, PL Gutshall, OHM Gan и HC Нью. Обнаружение дельта-9-ТГК в человеческом дыхании следя курения марихуаны. *Анальный. Письма, 12* (В8) 867-880 (1979).
39. JR Соарес, JD Грант и SJ Gross. Значительные изменения в радиоиммунологический методов применительно к дельта-9-ТГК и его 9-замещенных метаболитов этого объема.

40. *Марихуана и здоровье.* Отчет об исследовании Комитета Института по

Медицина, AS. Reiman, председатель. Национальный пресс-академии, Вашингтон, округ Колумбия, 1982.

АВТОР

Ричард Л. Ястребов

Исследование технология отделение

Отдел исследований

Национальный институт по борьбе со

злоупотреблением наркотическими Роквилл, Мэриленд 20857



серия монографии

В то время как ограниченные поставки последних, единичные экземпляры монографии могут быть получены бесплатно от Национального координационного механизма по борьбе со злоупотреблением наркотическими средствами информации (NCDIA). Пожалуйста, свяжитесь с NCDIA также информация о наличии ближайших выпусков и других публикаций Национального института по борьбе со злоупотреблением наркотическими средствами, имеющих отношение к исследованию наркомании.

Дополнительные копии можно приобрести в типографии правительства США (GPO) и / или Национальной службой технической информации (NTIS) в Indicated. Цены NTIS предназначены для бумажной копии. Микрошрифт копии, в \$ 4,50, также доступны NTIS. Цены от любого источника могут быть изменены.

Адреса являются:

NCDIA

Национальный координационный центр по Наркомания Информация Номер Лоа-43

5600 Fishers Lane
Роквилл, Мэриленд 20857

объект групповой политики

Суперинтендант документов

Правительство США Printing офис

Вашингтон, округ Колумбия 20402

NTIS

Национальная техническая информация

обслуживание

Министерство торговли США Спрингфилд, Virginia
22161

1 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ злоупотреблением наркотическими средствами. Не доступно от NCDIA. Том 1:

ПОЧТАМТ в наличии

NTIS PB # 272 867 / AS \$ 32,50

Том 2: ПОЧТАМТ в наличии

NTIS PB # 272 868 / AS \$ 29,50

2 РАБОЧИЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ В СОЦИАЛЬНО-поведенческой употреблении наркотиков ИССЛЕДОВАНИЯ

1975. Джек Ellnson, доктор философии, и David Nurco, доктор философии, ред. Не доступно от NCDIA. GPO в наличии

NTIS ПБ # 246 338 / AS 16 \$

3 аминергическая ГИПОТЕЗА ПОВЕДЕНИЯ: реальность или трафарет? Bruce J. Bernard, Ph.D., объявления. Не доступно от NCDIA. ПОЧТАМТ Stock # 017-024-00486-3 \$ 6,50

NTIS ПБ # 246 687 / AS 16 \$

4 НАРКОТИЧЕСКИЕ АНТАГОНИСТЫ: ПОИСКИ препаратов длительного действия. Роберт Willette. Кандидат технических наук, изд. GPO в наличии

NTIS PB # 247 096 / AS \$ 8,50

5 молодых мужчин и ПРЕПАРАТЫ: общенациональное обследование. Джон А. О'Доннел, доктор философии, и др. Не доступно от NCDAI. ПОЧТАМТ Stock # 017-024-00511-8 \$ 6,50

NTIS PB # 247 446 / AS 16 \$

6 ВЛИЯНИЕ мечения «наркоман»: ЗАПРОС. Джей Р. Уильямс, доктор философии Не доступно от NCDAI. ПОЧТАМТ Stock # 017-024-00512-6 \$ 4,75

NTIS PB # 249 092 / AS \$ 8,50

7 каннабиноидных АНАЛИЗЫ в организме человека. Роберт Willette, доктор философии, изд. ПОЧТАМТ Stock # 017-024-00510-0 \$ 6,00

NTIS PB # 251 905 / AS \$ 14,50

8 Rx: 3x / Неделя LAAM - АЛЬТЕРНАТИВА метадона. Джек Блейн, MD, и Пьер Рено, MD, ред. Не доступен из объекта групповой политики

NTIS PB # 253 763 / AS \$ 14,50

9 НАРКОТИЧЕСКИЕ АНТАГОНИСТЫ: налтрексон ОТЧЕТ О ХОДЕ. Деметрий Julius, MD, и Pierre Renault, MD, ред. Не доступен из NCDAI.

ПОЧТАМТ Stock # 017-024-00521-5 \$ 7,00

NTIS PB # 255 833 / AS \$ 17,50

10 ЭПИДЕМИОЛОГИЯ злоупотребления наркотическими средствами: ТЕКУЩИЕ ПРОБЛЕМЫ. Луиза Г. Ричардс. Доктор философии, и Lourse B. Blevens, ред. Не доступно от NCDAI. ПОЧТАМТ Stock # 017-024-00571-1 \$ 6,50

NTIS PB # 266 691 / AS \$ 22

11 Наркотики и управление автомобилем. Роберт Willette. Кандидат технических наук, изд. Не доступно от NCDAI.

ПОЧТАМТ Stock # 017-024-00576-2 \$ 5,50

NTIS PB # 269 602 / AS 16 \$

12 психодинамика наркотической зависимости. Джек Д. Блейн, MD, и Деметрий А. Julius, доктор медицинских наук, ред. Не доступно от NCDAI. ПОЧТАМТ Stock # 017-024-00642-4 \$ 5,50

NTIS PB # 276 084 / AS \$ 17,50

13 КОКАИНА: 1977. Роберт К. Петерсен, доктор философии, и Ричард С. Стиллман. MD, ред. Не доступно от NCDAI. ПОЧТАМТ Stock # 017-024-00592-4 \$ 6,00

NTIS PB # 269 175 / AS \$ 19

14 марихуана Результаты исследований: 1976. Роберт К. Петерсен, доктор философии, изд.

Не доступно от NCDAI. GPO в наличии

NTIS PB # 271 279 / AS \$ 22

15 ОБЗОР ингалянтами: ЭЙФОРИЯ дисфункцией. Чарльз Wm. Sharp, доктор философии, и Мэри Ли Брем. Кандидат технических наук, ред. ПОЧТАМТ Stock # 017-024-00650-5 \$ 7,50

NTIS PB # 275 798 / AS \$ 28

16 эпидемиология героина и другие наркотики. Джоан Данн Rittenhouse, Ph.D .. изд. Не доступно от NCDAI. ПОЧТАМТ Stock # 017-024-00690-4 \$ 6,50

NTIS PB # 276 357 / AS \$ 20,50

17 ИССЛЕДОВАНИЯ НА КУРЕНИЕ ПОВЕДЕНИЯ. Мюррей Е. Джарвик, кандидат медицинских наук, и др., Ред. Включает епидемиологию, этиологию, последствия использования, и подходы к изменению поведения. Из NIDA поддерживаемой конференции UCLA.

ПОЧТАМТ Фото # 017-024-00694-7 \$ 67,50

NTIS PB # 276 353 / AS \$ 29.50

18 ПОВЕДЕНИЯ ТОЛЕРАНТНОСТЬ: ИССЛЕДОВАНИЯ И ПОСЛЕДСТВИЯ ЛЕЧЕНИЕ. Норман А. Krasnegor, доктор философии, изд. Теоретические и эмпирические исследования нефармакологических факторов в развитии толерантности наркотиков. ПОЧТАМТ Stock # 017-024-00699-8 \$ 5,50

NTIS PB # 276 337 / AS \$ 16 \$

19 МЕЖДУНАРОДНЫЙ ВЫЗОВ злоупотребления наркотическими средствами. Роберт К. Петерсен, доктор философии, изд. Документы от VI Всемирного конгресса по психиатрии. ПОЧТАМТ Stock # 017-024-00822-2 \$ 7,50

NTIS PB # 293 807 / AS \$ 28

20 самоуправление злоупотребляли ВЕЩЕСТВ: Методы исследования. Норман А. Krasnegor, доктор философии, изд. Методы, используемые для изучения основных процессов, лежащее злоупотребления наркотиков, этанола, продуктов питания и табака. ПОЧТАМТ Stock # 017-024-00794-3 \$ 6,50

NTIS PB # 288 471 / AS \$ 22

21 Phencyclidine (PCP) НАРУШЕНИЯ: AN APPRAISAL. Роберт К. Петерсен, доктор философии, и Ричард С. Стиллман. MD, ред. Для врачей и исследователей, оценивающих проблему злоупотребления PCP. ПОЧТАМТ Stock # 017-024-00785-4 \$ 7,00

NTIS PB # 288 472 / AS \$ 25

22 КВАЗАРА: КОЛИЧЕСТВЕННАЯ структура-активность анальгетиков, НАРКОТИЧЕСКИЕ антагонисты и галлюциногены. Джин Барнетт, Ph.D. ; Милан Trsic, Ph.D. ; и Роберт Willette, Ph.D. ; ред. Не доступно от NCDAI. ПОЧТАМТ Stock # 017-024-00786-2 \$ 8,00

NTIS PB # 292 265 / AS \$ 35,50

23 Курильщик КАК ПРОЦЕСС ЗАВИСИМОСТИ. Норман А. Krasnegor. Кандидат технических наук, изд. Рассматриваются факторы, влияющие на начало, обслуживание и прекращение привычки курения сигарет. Включает в себя программу для будущих исследований. ПОЧТАМТ Stock # 017-024-00895-8 \$ 6,00

NTIS PB # 297 721 / AS \$ 19

24 SYNTHETIC СМЕТА МАЛЫХ РАЙОНОВ: СТАТИСТИЧЕСКАЯ СЕМИНАРА ДОКУМЕНТОВ И ОБСУЖДЕНИЕ. Jos. Steinberg, изд. Документы из работы- магазина на статистических подходах, которые дают необходимы оценки данных для государств и местных районов. Не доступно от NCDAI. ПОЧТАМТ Stock # 017-024-00911-3 \$ 8,00

NTIS PB # 299 009 / AS \$ 23,50

25 поведенческий анализ И ЛЕЧЕНИЕ токсикомании. Норман

А. Krasnegor, доктор философии, изд. Работы по общностей и последствия для лечения зависимости от наркотиков, этанола, продуктов питания и табака.

ПОЧТАМТ Stock # 017-024-00939-3 \$ 5,00

NTIS PB # 80-112428 \$ 22

26 поведенческого АСПЕКТЫ КУРЕНИЯ. Норман А. Krasnegor, доктор философии, изд. Перепечатка поведенческой части 1979 Доклад хирурга по вопросам курения и здоровья; введение редактора. GPO в наличии

NTIS PB # 80-118755 \$ 17,50

27 ПРОБЛЕМЫ нарколепению 1979: Труды 41-й ежегодной научной конференции, Комитет по проблемам наркозависимости, INC Л. Харрис, доктор философии, изд.. Не доступно от NCDAI. ПОЧТАМТ Stock # 017-024-00981-4 \$ 9,00

NTIS PB # 80-175482 \$ 37

28 НАРКОТИЧЕСКИХ антагонисты: налтрексон Фармакохимия И поступательный-релиз ПРЕПАРАТЫ. Роберт Willette, доктор философии, и Джин Барнетт, доктор философии, ред. Документы сообщают исследования о и высвобождении давно действующих устройствах для использования с наркотическим antag- onist налтрексон. Не доступно от NCDAI. ПОЧТАМТ Stock # 017-024-01081-2 \$ 7,00

NTIS PB # 81-238875 \$ 23,50

29 НАРУШЕНИЙ НАРКОТИКОВ СМЕРТИ в девяти городов: сюрвейерский. Луис А. Готшалк, MD, и др. Не доступно от NCDAI. ПОЧТАМТ Stock # 017-024-00982-2 \$ 6,50

NTIS PB # 80-178882 \$ 17,50

30 ТЕОРИЙ НА НАРКОТИЧЕСКИЕ: ОТДЕЛЬНЫЕ СОВРЕМЕННЫЕ ПЕРСПЕКТИВЫ. Dan J. Lettleri. Кандидат наук.; Mollie Сейерс; и Хелен Валленштейн Пирсон, ред. Объем представлены конспекты основных современных теорий злоупотребления наркотиков каждый из 43 ведущих теоретиков. ПОЧТАМТ Stock # 017-024-00997-1 \$ 10,00

Не доступно от NTIS

31 марихуана Результаты исследований: 1980. Роберт К. Петерсен, доктор философии .. изд. Текст 8 марихуаны и Доклада о состоянии здравоохранения в Конгресс и фоновые научных работ, на которых оно основано. GPO в наличии

NTIS PB # 80-215171 \$ 20,50

32 ГХ / МС анализы для злоупотребляли наркотиками в теле ЖИДКОСТЕЙ. Rodger Л. Фольц, доктор философии .; Allison Ф. Fentman, младший, доктор философии и Рут .: Б. Фольц. Совокупность методов quantitative анализа нескольких важных наркотических веществ методом газовой chromatography- масс-спектрометрии. ПОЧТАМТ Stock # 017-024-01015-4 \$ 6,00

NTIS PB # 81-133746 \$ 19

33 бензодиазепинов: обзор результатов исследований, 1980. Стивен I. Szara, MD, D.Sc .. и Жаклин П. Ludford. МИЗ. ред. RAUS (исследование Анализ и использование система) Обзор Отчет о злоупотреблении бензодиазепиновых «транквилизаторы.» ПОЧТАМТ Stock # 017-024-01108-8 \$ 5,00

NTIS PB # 82-139106 \$ 13

34 ПРОБЛЕМЫ нарколепению 1980: Труды 42-й ежегодной научной конференции, Комитет по проблемам наркозависимости, INC Луи С. Харрис, доктор философии, изд.. Не доступно от NCDAI.

ПОЧТАМТ Stock # 017-024-01061-8 \$ 8,00

NTIS PB # 81-194847 \$ 34

35 Демографические тенденции и злоупотребления наркотиками, 1980-1995. Луиза Г. Ричардс, доктор философии, изд. Оценки вероятной степени и характера использования немедицинских наркотиков, 1980-1995. на основе возрастной структуры и других характеристик населения США. ПОЧТАМТ Stock # 017-024-01087-1 \$ 4,50.

NTIS PB # 82-103417 \$ 13

36 Новые подходы к лечению хронической боли: обзор МНОГОПРОФИЛЬНОГО PAIN клиник и центры боли. Лоренц KY Ng, MD.

Дискуссии в активных практиков в лечении боли. ПОЧТАМТ Stock # 017-024-01082-1 \$ 5,50.
NTIS PB # 81-240913 \$ 19

37 ПОВЕДЕНЧЕСКОЙ ФАРМАКОЛОГИЯ ЧЕЛОВЕКА лекарственной зависимости. Трэвис Томпсон, доктор философии, и Крис Е. Johanson, доктор философии, ред. Представляет растущий объем данных, систематически выводится на поведенческих механизмов, участвующих в использовании наркотиков и злоупотребления ими.

ПОЧТАМТ Stock # 017-024-01109-6 \$ 6,50

NTIS PB # 82-136961 \$ 25

38 Злоупотребление наркотиков и Американские ПОДРОСТКИ. Dan J. Lettieri, доктор философии, и Жаклин П. Ludford. MC, ред. Доклад RAUS обзор, подчеркивающий использование марихуаны: эпидемиология, социально-демографических и личностных факторов, семьи и влияние сверстников, правонарушениям и медико-биологических последствий. ПОЧТАМТ Stock # 017-024-01107-0 \$ 4,50

NTIS PB # 82-148198 \$ 14,50

39 молодых людей и наркотики в МАННАТТАН: анализ ПРИЧИННОГО. Ричард Р. Клейтон, доктор философии, и Harwin Л. Восс, Ph.D. Рассматривает этиологию и естественную историю употребления наркотиков, с особым акцентом на героине. Включает в себя Lifetime Drug Индекс использования. ПОЧТАМТ Stock # 017-024-01097-9 \$ 5,50

NTIS PB # 82-147372 \$ 19

40 ПОДРОСТКОВ марихуана Насильников и их семьи. Герберт Hendin. MD. Энн Pollinger, доктор философии .. Ричард Ульман, доктор философии, и Артур Карр, Ph.D. Психодинамическое исследование подростков, участвующих в интенсивном использовании марихуаны, чтобы определить, что взаимодействие между семьей и подростком приводит к наркомании. ПОЧТАМТ Stock # 017-024-01098-7 \$ 4,50

NTIS PB # 82-133117 \$ 13

41 ПРОБЛЕМЫ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ЗАВИСИМОСТИ, 1981: Труды 43-й ежегодной научной конференции, Комитет по проблемам наркозависимости, INC Луи С. Харрис, доктор философии, изд.. Не доступно от NCDAI.

Не доступен из объекта групповой политики

NTIS PB # 82-190760 \$ 41,50

42 АНАЛИЗ каннабиноидов в биологических жидкостях. Ричард Л. Ястребов, кандидат технических наук, изд. Разнообразные подходы к чувствительным, надежным и доступным количественным анализам для химической constituents марихуаны. для исследователей. Не доступно от NCDAI. ПОЧТАМТ Stock # 017-024-01151-7 \$ 5

NTIS PB # 83-136044 \$ 1643

43 ПРОБЛЕМЫ нарколечению 1982: Труды 44-й ежегодной научной конференции, Комитет по проблемам наркозависимости, INC Louis S. Harris, Ph.D .. изд.. Не доступно от NCDAI.

ПОЧТАМТ Stock # 017-024-01162-2 \$ 8,50

NTIS PB # 83-252-692 / AS \$ 40

44 марихуана ЭФФЕКТЫ эндокринную и репродуктивную системы. Моник С. Брауде, доктор философии, и Жаклин П. Ludford, MS, ред. Отчет RAUS Обзор исследований на животных и доклинические и клинические исследования воздействия каннабиноидов на организм человека эндокринной и репродуктивной функции. ПОЧТАМТ Stock # 017-024-01202-5 \$ 4.

NTIS PB # 85-150563 / AS \$ 14,50

45 современных исследований в боли и анальгезии, 1983. Роджер М. Браун, доктор философии.; Теодор М. Pinkert, MD, JD; и Жаклин П. Ludford, MS, ред. Отчет RAUS обзор по анатомии, физиологии и биохимии нервной боли и ее управления. ПОЧТАМТ Stock # 017-024-01191-6 \$ 2,75

NTIS PB # 84-184670 / AS \$ 11,50

46 ПОВЕДЕНИЯ МЕТОДИКИ ВМЕШАТЕЛЬСТВА в лечении наркомании. Джон Грабовски. Кандидат наук.; Максин Л. Ститцер, доктор философии, и Джек Е. Хеннингфилд, доктор философии, ред. Отчеты о процедурах управления в чрезвычайных ситуациях поведенческих, используемых в условиях исследования / лечения. ПОЧТАМТ Stock # 017-024-01192-4 \$ 4,25

NTIS PB # 84-184688 / AS 16 \$

47 ПОДРОСТКОВ ПРОФИЛАКТИКА ЗЛОУПОТРЕБЛЕНИЯ НАРКОТИКОВ: интервенция СТРАТЕГИИ. Томас Дж Глинн, доктор философии. Карл Г. Leukefeld, Д; и Жаклин П. Ludford, MS, ред. Отчет RAUS обзор на различных подходов к профилактике подростковой наркомании, как они могут быть применены, их шансы на успех, и необходимы дальнейшие исследования.

ПОЧТАМТ Stock # 017-024-01180-1 \$ 5,50

NTIS PB # 85-159663 / AS \$ 22

48 Измерение в АНАЛИЗА И ЛЕЧЕНИЯ КУРЕНИЯ поведения. Джон Грабовски, доктор философии, и Кэтрин С. Белл, MS, ред. Основываясь на встрече соучредителей NIDA и Национальный институт рака очертить необходимые и достаточные меры для анализа поведения курения в научно-исследовательских и лечебных settings.

ПОЧТАМТ Stock # 017-024-01181-9 \$ 4,50

NTIS PB 84-145-184 \$ 14,50

49 ПРОБЛЕМЫ нарколечению 1983: Труды 45-й ежегодной научной конференции, Комитет по проблемам наркозависимости, ИНС Луи С. Харрис, доктор философии, изд.. Сборник документов, которые вместе записывают успехи в году в научных исследованиях злоупотребления наркотиков; также включает в себя отчеты по испытаниям новых соединений на предмет эффективности и ответственности зависимости. ПОЧТАМТ Stock # 017-024-01198-3 \$ 12

NTIS ПБ 85-159663 / AS 22 \$.

50 КОКАИНА: ФАРМАКОЛОГИЯ, эффекты и лечение злоупотребления. Джон Грабовски, доктор философии, изд. Содержание колеблется от вводного обзора через нейрофармакологию, фармакологию, животное и поведенческую фармакологию человека, закономерности использования в естественной среде потребителей кокаина, лечение, через комментарии к социальному восприятию использования. ПОЧТАМТ Stock # 017-020-01214-9 \$ 4

NTIS ПБ 85-150381 / AS \$ 14,50

51 ПРЕПАРАТ ОЦЕНКА НАРУШЕНИЯХ ЛЕЧЕНИЕ: СТРАТЕГИИ, ДОСТИЖЕНИЯ, ПЕРСПЕКТИВЫ. Франк М. Tims. Кандидат технических наук, изд. Обзор состояния дел в современной оценке лечения наркомании, выявление потребностей в области исследований, перспективные подходы, и возникающие проблемы.

ПОЧТАМТ Stock # 017-020-01218-1 \$ 4,50 NTIS PB 85-150365 / AS \$ 17,50

52 ИСПЫТАНИЯ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ФИЗИЧЕСКОЙ ЗАВИСИМОСТИ потенциал и ЗЛОУПОТРЕБЛЕНИЕМ ответственности. Джозеф В. Brady, доктор философии, и Скотт Е. Лукаш, доктор философии, ред. Описывает животных и процедуры тестирования человека для оценки зависимость потенциала и злоупотребления ответственности опиоиды, стимуляторы, депрессанты, галлюциногены, каннабиноиды и диссоциативных анестетиков.

ПОЧТАМТ Stock # 017-024-0204-1 \$ 4,25

NTIS PB 85-150373 / AS 16 \$

54 МЕХАНИЗМЫ Толерантность и зависимость. Чарльз Wm. Sharp, доктор философии, изд. Обзор основных знаний о механизме действия опиатов и других препаратов, в производстве толерантности и / или зависимости.

ПОЧТАМТ Stock # 017-024-01213-1 \$ 8,50

NTIS PB No. быть назначены.

55 ПРОБЛЕМЫ нарколечению 1984. ТРУДЫ 46-й ежегодной научной конференции, Комитет по проблемам наркозависимости, INC. Louis S. Harris, доктор философии, изд.

В ПРЕССЕ ИЛИ ПРЕПАРАТА

53 ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ адъюнкты В Курении. Джон Грабовски, доктор философии, изд.

56 ЭТИОЛОГИЯ злоупотребления наркотическими средствами: ПОСЛЕДСТВИЯ ДЛЯ ПРЕДОТВРАЩЕНИЯ. Coryl LaRue Джонс, доктор философии, и Роберт Дж Батъес, DСВ, ред.

57 самоотчета Методы оценки наркотиков: КОНФЕРЕНЦ ТЕКУЩИЕ ПРОБЛЕМЫ валидности. Беатриче А. Раус, доктор философии, Николас Дж Козел, МС, и Луиза Г. Ричардс, доктор философии, ред.

58 РЕЗУЛЬТАТЫ РАЗВИТИЯ рентабельного ЛЕЧЕНИЯ наркоманам. Ребекка С. поташа, Д. редактор

59 ТОК ИССЛЕДОВАНИЯ НА ПОСЛЕДСТВИЙ МАТЕРИНСКОЙ токсикомании. Теодор М. Pinkert. MD, JD, изд.

60 ПРЕНАТАЛЬНОГО ВОЗДЕЙСТВИЕ НАРКОТИКОВ: КИНЕТИКА И ДИНАМИКА. С. Нора Chlang, доктор философии, и Чарльз С. Ли, доктор философии, ред.

