

*Originalni članci/
Original articles*

ODREĐIVANJE KOKAINA I NJEGOVIH
METABOLITA U URINU NAKON
ISTOVREMENE KONZUMACIJE SA
ETANOLOM METODOM TEČNE
HROMATOGRAFIJE SA MASENOM
SPEKTROMETRIJOM

DETERMINATION OF COCAINE AND ITS
METABOLITES IN URINE AFTER
CONCURRENT INGESTION WITH ETHANOL
BY LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH
MASS SPECTOMETRY

Correspondence to:

Ema Mladićević

„Zastava”, zavod za zdravstvenu zaštitu
radnika Kragujevac,
Kragujevac, Srbija
mob.tel. 064-2388-107
mladicevic.ema@gmail.com

Ema Mladićević¹, Snežana Đorđević², Vesna Matović³,
Zorica Bulat³, Predrag Vukomanović⁴, Vesna Kilibarda²,
Slavica Vučinić²

¹ „Zastava”, zavod za zdravstvenu zaštitu radnika Kragujevac,
Kragujevac, Srbija

² Centar za kontrolu trovanja, Vojnomedicinska akademija, Beograd,
Srbija

³ Katedra za toksikologiju „Akademik Danilo Soldatović” Univerzitet u
Beogradu, Farmaceutski fakultet, Beograd, Srbija

⁴ ZUA „Lekovita” Mladenovac

Ključne reči

Kokain, kokaetilen, LC-MS metoda,
urin, određivanje

Key words

Cocaine, Cocaethylene, LC-MS method,
urine, determination

Sažetak

Zbog psihostimulativnog efekta do kojeg dovodi, zloupotreba kokaina je široko rasprostranjena u svetu. Neretko se kokain koristi u kombinaciji sa drugim sredstvima zloupotrebe, pre svega sa alkoholnim pićima. Etanol menja biotransformaciju kokaina u jetri, što rezultira transesterifikacijom u aktivni metabolit kokaetilen čime se potencira i produžava euforični efekat kokaina, ali i povećava rizik od nastanka kardiovaskularnih komplikacija i smrtnog ishoda. Dokazivanje kokaina, njegovih metabolita i kokaetilena u uzorcima biološkog materijala je značajno kako sa aspekta sudske toksikologije tako i u kliničkom praćenju i lečenju akutno otrovanih. Zbog brzog metabolizma kokaina u organizmu, urin je uzorak izbora za toksikološku analizu. U radu je prikazana metoda tečne hromatografije sa masenom detekcijom za dokazivanje i određivanje kokaina, benzoilekgonina, ekgonin-metil-estra i kokaetilena u uzorcima urina. Razdvajanje ispitivanih supstanci od komponenti matriksa postignuto je reverzno-faznom hromatografijom na C18 koloni, sa mobilnom fazom acetonitril-formijadni pufer (70:30 V/V), pri brzini protoka 0,3 ml/min. Dužina trajanja analize je 22 minuta. Opisana metoda je brza, precizna, tačna i jednostavna i primenjena je za određivanje sadržaja ispitivanih jedinjenja u uzorcima urina bolesnika sa Odeljenja za urgentnu toksikologiju Vojnomedicinske akademije.

UVOD

Kokain je potentan simpatikomimetik i lokalni anestetik izolovan iz lišća biljke roda *Erythroxylon*. Zbog psihostimulativnog efekta do kojeg dovodi, njegova zloupotreba je široko rasprostranjena, o čemu svedoče i zvanični statistički podaci o brojnosti i učestalosti korišćenja sredstava koja se

zloupotrebljavaju, prema kojima se kokain nalazi na četvrtom mestu u svetu (1).

Kokain se na tržištu može naći u obliku hidrohloridne soli i čiste baze („crack“). Hidrohloridna so se koristi za nazalnu i intravenskuprimenu, dok se „crack“ koristi za pušenje. Način primene i doza unetog kokaina utiču na dužinu

trajanja i intenzitet efekata do kojih dovodi (2). Nakon inhalacionog i intravenskog unosa stimulatorni efekti se javljaju brzo, traju između 15 i 30 min. i izraženiji su u odnosu na nazalni i oralni put unosa kod kojih su stimulatorni efekti manjeg intenziteta, ali dužeg trajanja, (od 60 do 90 min.) (3). Nakon unosa u organizam, kokain podleže ekstenzivnom metabolizmu, tako da je poluvreme eliminacije kokaina veoma kratko ~ 60 min., dok glavni metaboliti kokaina-benzoilekgonin i ekgonin-metil-estar imaju duže poluvreme eliminacije i dužu mogućnost detektovanja u biološkom materijalu. Metaboliti kokaina su neaktivni (4). Toksični efekti koji se mogu javiti kao posledica zloupotrebe kokaina su različiti i zavise od učestalosti i načina primene. Najznačajniji toksični efekti zloupotrebe kokaina, koji su i najčešći uzrok smrti prilikom zloupotrebe kokaina, su efekti na kardiovaskularni sistem. Kokain dovodi do povećanja srčanog ritma i krvnog pritiska, akutnog infarkta miokarda, dok prilikom hronične upotrebe može doći do ventrikularne hipertrofije, kardiomiopatije, miokardijalne fibroze i miokarditisa (3,5).

Kokain se često zloupotrebljava sa drugim supstancama, pre svega sa alkoholnim pićima. Kada se uzima zajedno sa etanolom, transesterifikacijom u jetri nastaje kokaetilen, aktivni, lipofilni ko-metabolit, koji utiče i na kinetiku i na dinamiku ispoljavanja toksičnih efekata kokaina (6). Kokaetilen kao i kokain blokira ponovno preuzimanje dopamina iz sinaptičke pukotine, što dovodi do pojave osećaja euforije, koja traje duže u odnosu na osećaj euforije koji se javlja kad se uzima samo kokain. Kokaetilen takođe i blokira voltažno-zavisne natrijumske jonske kanale u srčanim ćelijama većom jačinom od kokaina, a osim toga kokaetilen je i srčani depresor te smanjuje snagu i jačinu srčane kontrakcije (7). Potenciranje i produžavanje euforičnog efekata kokaina razlog je istovremene upotrebe etanola i kokaina. Pored aditivnog farmakološkog efekta, potrebno je istaknuti i povećan rizik od smrtnog ishoda kod osoba koje istovremeno zloupotrebljavaju kokain i etanol u odnosu na one koje koriste samo kokain kao i veću učestalost hospitalizacije ovakvih zavisnika (2,9).

Poluvreme eliminacije nastalog kokaetilena je znatno duže od kokaina, te se kokaetilen može detektovati u biološkom materijalu i kada je kokain već izlučen, što je od posebnog analitičkog značaja (8).

Kod identifikacije i određivanja kokaina i njegovih metabolita urin je uzorak izbora za analizu, pre svega zbog brzog metabolizma kokaina i kratkog poluvremena eliminacije iz krvi, ali i zbog jednostavnog i neinvazivnog uzorkovanja (10).

Cilj ovog rada je da prikaže validaciju i primenu metode tečne hromatografije sa masenom detekcijom za identifikaciju i određivanje kokaina, benzoilekgonina, ekgonin-metil-estra i kokaetilena u uzorcima urina.

EKSPERIMENTALNI DEO

Materijal i metode

Uzorci urina za validaciju metode sakupljeni su od zdravih dobrovoljaca, koji u momentu doniranja nisu bili na terapiji komercijalno dostupnim lekovima, niti su koristili psihoaktivne kontrolisane supstance.

Uzorci urina za analizu uzorkovani su od bolesnika primljenih na Odeljenje za urgentnu toksikologiju Vojnomedicinske akademije usled sumnje na akutno trovanje kokainom. Svi dostavljeni uzorci urina su prvo analizirani preliminarnom tehnikom, primenom višekomponentnih imunohromatografskih test traka (*DOA MultiGnost 5*).

Reagensi za LC-MS:

- metanol, acetonitril, dejonizovana voda - HPLC grade, Merck, Darmstan, Nemačka
- amonijum formijat p.a. - Sigma-Aldrich, Sent Luis, Misuri, USA
- hloroform p.a. - HPLC grade, Fisher Chemical, UK
- mravlja kiselina - Etprom hemikalije, Beograd, Srbija

Hromatografski uslovi za LC-MS:

- tečni hromatograf: Waters 2695 XE Separations Module,
- mobilna faza: acetonitril-formijatni pufer (pH 3,5; podešen mravljom kiselinom) (70:30 V/V)
- brzina protoka mobilne faze: 300 µL/min
- temperatura kolone: 30°C
- injekciona zapremina: 50 µL
- MS detektor: MC Waters ZQ 2000/4000 Single Quadropole Detector, sa elektrosprej pozitivnim jonizacionim modom.

Joni korišćeni za identifikaciju analita i retenciona vremena prikazani su u tabeli 1.

Tabela 1. Retenciona vremena i molekulske joni ispitivanih

Jedinjenje	Retenciono vreme (min)	Molekulske jon (m/z)
I.S. (karbamazepin)	4,69	237
benzoilekgonin	5,13	290
ekgonin-metil-estar	8,52	200
kokain	16,41	304
kokaetilen	19,38	318

Priprema rastvora i postupak ekstrakcije

Osnovni rastvori analitičkih standarda, koncentracije 1 mg/mL dobijeni su rastvaranjem 10 mg (\pm 0,0001 g) odgovarajućeg čvrstog standarda u metanolu u odmernim sudovima od 10 mL. Smeša radnih standardnih rastvora različitih koncentracija dobijena je mešanjem i razblaživanjem osnovnih rastvora u odgovarajućem odnosu.

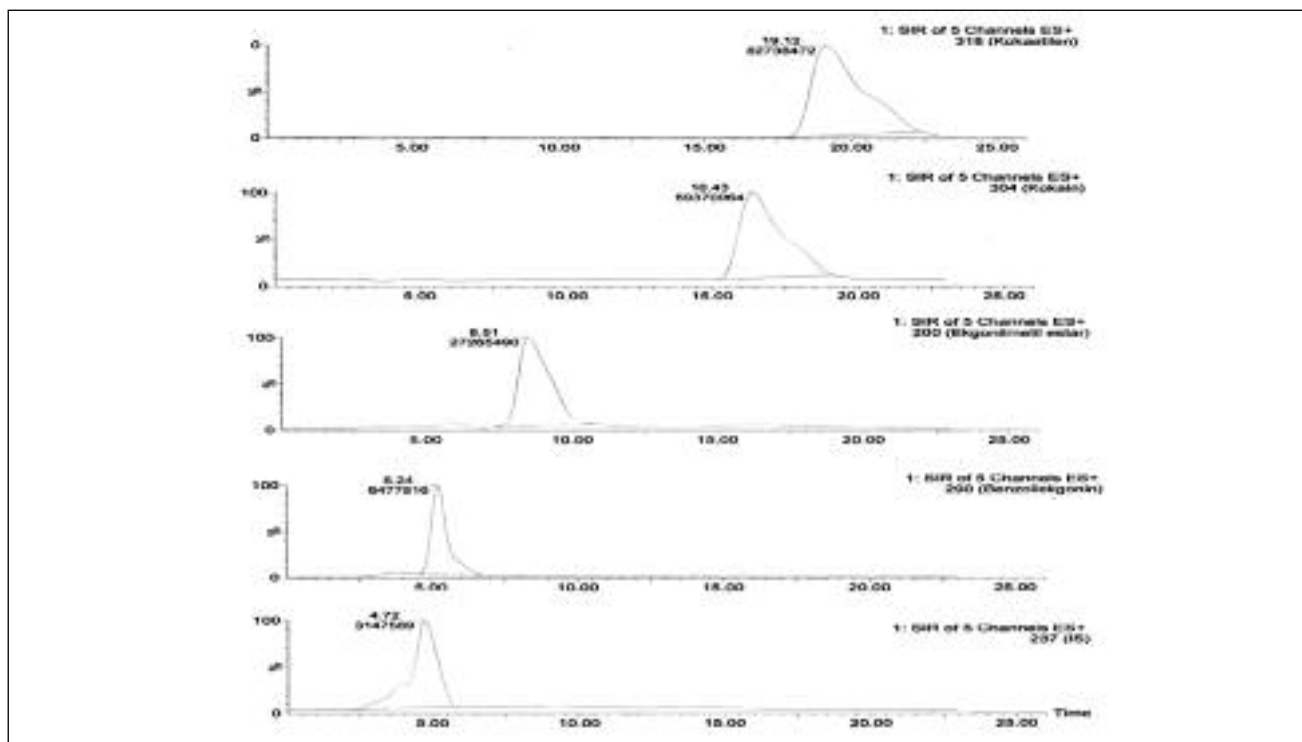
Svi uzorci su pripremani tečno-tečnom ekstrakcijom prema sledećem postupku: u epruvete sa šlifovanim zaptivačem doda se 900 µL ispitivanog uzorka, 100 µL Internog standarda karbamazepina, 3 mL hloroforma i 100 µL amonijum-hidroksida do alkalne reakcije. Uzorci se zatim mučkaju 15 minuta na mehaničkoj mučkalici, a potom centrifugiraju 10 minuta na 3000 obrtaja. Sloj organskog rastvarača se odvaja u posebnu epruvetu i upari do suva u struji vazduha. Upareni ekstrakti se rekonstituišu u 1 mL mobilne faze i prebace u vijalu za analiziranje na LC-MS.

Kalibracioni standardi pravljeni su dodavanjem određene zapremine urina zdravih osoba i analitičkih standarda

poznate koncentracije u prisustvu internog standarda karbamazepina koncentracije 0,1 µg/mL. Kalibraciona kriva pripremljena je od šest standarda, nakon razblaženja odgovarajućih radnih rastvora sa humanim urinom u odnosu 1:9, tako da se dobiju konačne koncentracije: 0,025 µg/mL, 0,05 µg/mL, 0,1 µg/mL, 0,25 µg/mL, 0,5 µg/mL i 1 µg/mL. QC/MV uzorci (engl. *Quality Control, QC uMethod Validation, MV*) razblaženi su na isti način kako bi se dobile koncentracije: 0,2 µg/mL, 0,4 µg/mL i 0,75 µg/mL.

REZULTATI

Linearnost je ispitivana u odabranom opsegu koncentracija (0,025 µg/mL do 1 µg/mL), konstruisanjem kalibracionih krivih koje su napravljene od radnih rastvora. Na slici 1. prikazan je hromatogram rastvora standarda kokaina i metabolita koncentracije 1 µg/mL



Slika 1 Hromatogram radnog rastvora koncentracije 1 µg/mL

Tabela 3. Limit detekcije i limit kvantifikacije

Jedinjenje	LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)
Kokain	0,003	0,010
benzoilekgonin	0,002	0,007
Ekgonin-metil-estar	0,001	0,004
Kokaeten	0,003	0,010

Rezultati za tačnost (izraženu kao recovery) i preciznost (izraženu kao relativna standardna devijacija u %), procenjeni unutar analitičke sekvence, kao i između sekvenci prikazani su u tabelama 4 - 7.

Tabela 4. Tačnost i preciznost unutar analitičke sekvence i između analitičkih sekvenci za kokain

Za svaku koncentraciju urađena su po tri uzastopna merenja. Na osnovu dobijenih rezultata, obrađenih u softverskom programu Microsoft Excel određeni su parametri regresionih jednačina (nagib, odsečak, koeficijent korelacije). Rezultati su prikazani u tabeli 2.

Tabela 2. Parametri linearnosti

Ispitivana jedinjenja	Regresiona jednačina y = ax + b	Koeficijent korelacije
kokain	y = 34,76x - 1,322	0,990
benzoilekgonin	y = 2,913x + 0,027	0,995
ekgonin-metil-estar	y = 25,51x - 1,348	0,991
kokaeten	y = 33,18x + 0,080	0,999

Limit detekcije (LOD) i limit kvantifikacije (LOQ) za svaki od ispitivanih supstanci prikazani su u tabeli 3.

MV uzorak (µg/mL)	Tačnost unutar analitičke sekvence (Recovery %) ^(a)	Tačnosti između analitičkih sekvenci (Recovery %) ^(b)	Preciznost unutar analitičke sekvence (%RSD) ^(b)	Preciznost između analitičkih sekvenci (%RSD) ^(b)
MV1 (0,2 µg/mL)	103	101	8,9	9,7
MV2 (0,4 µg/mL)	88,4	87,7	5,2	5,4
MV3 (0,75 µg/mL)	88,7	88,8	1,6	2,0

a) (n = 5), računato kao 100 × (srednja izračunata koncentracija)/(nominalna koncentracija)
 b) vrednosti dobijene između dve analitičke sekvence
 b) (n = 5)

Tabela 5. Tačnost i preciznost unutar analitičke sekvence i između analitičkih sekvenci za kokaetilen

MV uzorak (µg/mL)	Tačnost unutar analitičke sekvence (Recovery %)(a)	Tačnosti između analitičkih sekvenci (Recovery %)(b)	Preciznost unutar analitičke sekvence (%RSD)(b)	Preciznost između analitičkih sekvenci (%RSD)(b)
MV1 (0,2 µg/mL)	103	106	2,7	2,8
MV2 (0,4 µg/mL)	106	105	0,89	0,76
MV3 (0,75 µg/mL)	96,7	96,1	1,7	1,7

a) (n = 5), računato kao $100 \times$ (srednja izračunata koncentracija) / (nominalna koncentracija)

b) vrednosti dobijene između dve analitičke sekvence

b) (n = 5)

Tabela 6. Tačnost i preciznost unutar analitičke sekvence i između analitičkih sekvenci za benzoilekgonin

MV uzorak (µg/mL)	Tačnost unutar analitičke sekvence (Recovery %)(a)	Tačnosti između analitičkih sekvenci (Recovery %)(b)	Preciznost unutar analitičke sekvence (%RSD)(b)	Preciznost između analitičkih sekvenci (%RSD)(b)
MV1 (0,2 µg/mL)	105	114	3,7	2,2
MV2 (0,4 µg/mL)	104	97,5	10	5,1
MV3 (0,75 µg/mL)	115	109	0,81	0,78

a) (n = 5), računato kao $100 \times$ (srednja izračunata koncentracija) / (nominalna koncentracija)

b) vrednosti dobijene između dve analitičke sekvence

b) (n = 5)

Tabela 7. Tačnost i preciznost unutar analitičke sekvence i između analitičkih sekvenci za ekgonin-metil-estar

MV uzorak (µg/mL)	Tačnost unutar analitičke sekvence (Recovery %)(a)	Tačnosti između analitičkih sekvenci (Recovery %)(b)	Preciznost unutar analitičke sekvence (%RSD)(b)	Preciznost između analitičkih sekvenci (%RSD)(b)
MV1 (0,2 µg/mL)	87,4	97,1	7,9	5,4
MV2 (0,4 µg/mL)	89,2	86,2	0,82	1,3
MV3 (0,75 µg/mL)	90,1	90,8	5,64	3,3

a) (n = 5), računato kao $100 \times$ (srednja izračunata koncentracija) / (nominalna koncentracija)

b) vrednosti dobijene između dve analitičke sekvence

b) (n = 5)

U postupku validacije metode ispitana je stabilnost uzoraka. Uočena je nestabilnost uzoraka urina ukoliko se oni skladište na sobnoj temperaturi. Preporuka je da se ispitivani biološki materijal uzme u rad što pre, ili da se čuva na temperaturi između 2°C – 8°C do uzimanja u rad, ukoliko taj period nije duži od 14 dana. Za čuvanje uzoraka duži vremenski period preporučuje se zamrzavanje na -20°C.

Za procenu stabilnosti korišćena je sledeća jednačina:

$$\text{Odstupanje (\%)} = (S2-S1)/S1 \times 100$$

gde je S1 sveže pripremljen uzorak, a S2 uzorak nakon primene uslova čiji uticaj se procenjuje. Rezultati su prikazani u tabeli 8.

Tabela 8. Stabilnost ispitivanih jedinjenja

Jedinjenje	Kratkoročna stabilnost uzorka (% odstupanja)	Stabilnost zaleđeno-odleđeno (% odstupanja)	Stabilnost uzorka u autosempleru (% odstupanja)	Dugoročna stabilnost radnog rastvora (% odstupanja)
Kokain	- 15	0,1	13	8,7
Benzoilekgonin	15	6,5	12	4,8
Ekgonin-metil-estar	- 18	- 1,6	13	2,2
Kokaetilen	- 6,1	1,1	14	5,5

Razvijena i validirana analitička metoda primenjena je za određivanje sadržaja kokaina i njegovih metabolita u uzorcima bolesnika. Ukupno je analizirano jedanaest uzoraka urina, koji su bili pozitivni nakon pleriminarnog imunohromatografskog testa. Osim analize psihoaktivnih kontrolisanih supstanci, kod ispitivanih pacijenata određen je i sadržaj etanola u krvi, primenom GC-FID tehnike. Dobijeni rezultati prikazani su u tabeli 9.

Tabela 9. Koncentracije kokaina, njegovih metabolita i kokaetilen u urinu (LC-MS metoda); koncentracije etanola u krvi (GC-FID metoda)

Broj uzorka	Koncentracija ispitivanih jedinjenja u urinu µg/mL (X ± Up)				Koncentracija etanola u krvi (%)
	Kokain	Benzoilekgonin	Ekgonin-metil-estar	Kokaetilen	
1.	3,03	24,6	3,82	-	-
2.	0,32	21,4	2,70	-	-
3.		11,4	1,65	0,45	0,5
4.	0,46	26,5	4,70	0,05	0,3
5.	3,94	43,3	9,25	0,64	1
6.	2,31	1,86	1,65	1,43	1,53
7.	2,54	4,54	1,96	1,63	1,67
8.	0,050	0,2	0,11	-	-
9.	0,175	1,06	0,56	-	-
10.	1,67	12,9	1,89	0,57	0,63
11.	-	0,78		1,65	-

DISKUSIJA

Za potrebe rutinske analize razvijena je brza, jednostavna i efikasna metoda pripreme uzoraka urina tečno-tečnom ekstrakcijom, što potvrđuje prinos ekstrakcije za ispitivana jedinjenja koji iznosi 99,3% za kokain, 99,2% za benzoilekgonin, 102% za ekgonin-metil-estar, i 104% za kokaetilen.

Za indentifikaciju i određivanje kokaina, njegovih metabolita i kokaetilena u urinu korišćeni su odgovarajući molekularni joni i retencionna vremena, pri čemu je nakon procene selektivnosti utvrđeno da na retencionim vremenima analita nema interferencija prilikom analize „praznih” uzoraka urina iz različitih izvora (slika 1).

Uz korišćenje internog standarda karbamazepina, čime su prevaziđene varijacije odgovora detektora, metoda je validirana. Dobijeni parametri validacije ukazuju da je uvedena metoda osjetljiva, pouzdana, precizna i tačna.

Razvijena i validirana analitička metoda primenjena je za određivanje sadržaja kokaina i njegovih metabolita u uzorcima bolesnika. Ukupno je analizirano jedanaest uzoraka urina. Kod devet uzoraka detektovan je i kvantifikovan kokain, dok je benzoilekgonin kao glavni metabolit kokaina detektovan i kvantifikovan kod svih bolesnika. Ekgonin-metil-estar je indentifikovan i kvantifikovan u deset od jedanaest ispitivanih uzoraka. Dobijene vrednosti kokaina bile su niže u odnosu na dobijene vrednosti benzoilekgonina što se može objasniti brzim metabolizmom kokaina, post-

mortem hidrolizom ali i hidrolizom kokaina u toku ekstrakcije. Kod sedam ispitivanih bolesnika indentifikovan je i određen sadržaj kokaetilena u urinu koji nedvosmisleno ukazuje da su ove osobe uz kokain konzumirale i alkohol (tabela 9).

Primenom tečne hromatografije sa maseno-spektrometrijskom detekcijom moguće je potvrditi prisustvo kokaina i njegovih metabolita, kao i prisustvo kokaetilena u veoma niskim koncentracijama kod osoba koje su zloupotrebljavale i alkohol zajedno sa kokainom⁽¹¹⁾. Ovakav pristup je posebno značajan u urgentnim stanjima kada je neophodno u što kraćem vremenu izdati pouzdan i tačan rezultat.

ZAKLJUČAK

Opisana metoda tečne hromatografije sa masenom detekcijom je tačna, precizna, specifična i osjetljiva što potvrđuju dobijeni i prikazani parametri validacije.

Predloženom metodom mogu se u urinu relativno brzo (vreme trajanja analize 22 minuta) i pouzdano detektovati i odrediti kokain, njegovi glavni metaboliti benzoilekgonin i ekgonin-metil-estar, ali i kokaetilen koji ukazuje na istovremenu upotrebu kokaina i alkohola.

Podaci o povećanju incidence hospitalizacije i smrtnosti usled istovremene zloupotrebe kokaina i alkohola ukazuju na značaj određivanja kokaetilena u uzorcima zavisnika, što predložena metoda omogućuje.

Abstract

Due to its stimulatory effect, the abuse of cocaine is widespread throughout the world. Cocaine is frequently used in combination with other psychoactive controlled substances, primarily with alcoholic beverages. Ethanol alters the hepatic biotransformation of cocaine, favoring transesterification to an active metabolite, cocaethylene, and thus resulting in prolonged euphoric cocaine effects but also in increased risk of cardiovascular complications and lethality. Determination of cocaine, its metabolites and cocaethylene in biological material is significant for forensic toxicology as well as clinical management and treatment of acutely poisoned. Due to the rapid metabolism of cocaine in the body, urine is the specimen of choice for toxicological analysis. This paper presents a method of liquid chromatography-mass spectrometry for determination of cocaine, benzoylecgonine, ecgonine methyl ester and cocaethylene in urine samples. Separation of investigated compounds from the matrix was achieved by reversed-phase chromatography on a C18 column, with a mobile phase acetonitrile-formate buffer (70:30 V/V), at a flow rate 0.3 ml/min. The analytical run was 22 minutes. Described method was proven to be rapid, precise, accurate and simple, and was applied for the determination of tested compounds in the urine of patients from the Department of Emergency Toxicology, Military Medical Academy.

LITERATURA

1. United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC), World drug report: Austria, Vienna, (2015).
2. Denić K, Rusić B, Đorđević S, Lukić V, Kilibarda V, Perković-Vukčević N, Jović-Stošić J, Gasna hromatografija sa masenom spektrometrijom kao skrining metoda u detekciji kokaetilena nakon zloupotrebe kokaina i etanola, MD Medical Data 2013; 5(2): 163-166
3. Gorelick D, Cocaine use disorder in adults: Epidemiology, pharmacology, clinical manifestations, medical consequences, and diagnosis, 2015, Official reprint from UpToDate, www.uptodate.com.
4. Costa J. L., Gustavo Tonin F., Zanolli A., Aparecida da Matta Chasin A., Franco Maggi Tavares M., Simple method for determination of cocaine and main metabolites in urine by CE coupled to GC, Electrophoresis, 2009, 30(12): 2238–2244.
5. Reid MS, Flammino F, Howard B., Nilsen D., Pritchep LS., Topographic imaging of quantitative EEG in response to smoked cocaine self-administration in humans. Neuropsychopharmacology, 2006; 31:872.
6. Harris D, Everhart T, Mendelson J, Jones R, The pharmacology of cocaethylene in humans following cocaine and ethanol administration, Drug and Alcohol Depend, 2003; 72: 169–1826.
7. Cocaethylene: Responding to combined alcohol and cocaine use, 2010, AERC Alcohol Academy briefing paper 004
8. Moffat A. C, Osselton M D., Widdop B, Watts J., Clarke's Analysis of Drugs and Poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material, Fourth edition, 2011, Pharmaceutical Press
9. Fettiplace M. R, Pichurko A., Ripper R., Kowal K., Schwartz D., Feinstein D.L., Weinberg G, Cardiac Depression Induced by Cocaine or Cocaethylene Is Alleviated by Lipid Emulsion More Effectively Than by Sulfobutylether- β -cyclodextrin, Acad. Emerg. Med, 2015; 22:508–517.
10. European Workplace Drug Testing Society, European Guidelines for Workplace Drug Testing in Urine, 2015.
10. Snozek CL, Bjergum MW, Langman LJ, Cocaine and metabolites by LC-MS/MS., Methods Mol Biol, 2012; 902:91-103.