



DETECTION AND QUANTITATION OF COCAINE AND METABOLITES IN URINE AND HAIR AFTER CONSUMPTION OF COCA TEA

Teresa GRAY¹, Larry BRACE², Steve SHAH², Thomas TOLHURST¹, Matthew JUHASCIK¹, Adam NEGRUSZ¹

¹ *Department of Biopharmaceutical Sciences, College of Pharmacy, University of Illinois, Chicago, USA*

² *Department of Pathology, University of Illinois, Chicago, USA*

Abstract

Coca tea is available in individual tea bags from South American countries and is commonly used to combat altitude sickness and fatigue. It contains small amounts of cocaine and its metabolites, benzoylecgonine and ecgonine methyl ester, and as a result, drinkers may test positive for cocaine in urine and hair drug tests. Urine and hair collected from three volunteers who drank one cup of coca tea, and three who drank two cups of coca tea, were analyzed for cocaine and its metabolites. Preliminary screening results showed that for at least twelve hours post-consumption urine remained positive for cocaine-related compounds when 300 ng/ml screening threshold was used. One individual that consumed one cup of tea screened positive for 12 h, one for 24 h, and one for 36 h. The urine samples of all three individuals drinking two cups were positive throughout the entire study period of 36 h. GC/MS quantitation revealed that in a group of subjects drinking one cup of coca tea, one had benzoylecgonine concentration above 150 ng/ml confirmatory threshold for 12 h, one for 24 h, and one for 36 h. All subjects drinking two cups had benzoylecgonine concentrations above the threshold for 36 h. The highest benzoylecgonine and ecgonine methyl ester concentrations of 3035 ng/ml and 7760 ng/ml, respectively, in a single subject who had 2 cups of coca tea were detected at 8-hour time point. Cocaine and norcocaine concentrations in urine were low. Only one out of six individuals had cocaine detected in hair. The samples containing cocaine were collected fourteen and twenty-eight days post-consumption.

Key words

Cocaine, Urine testing; Hair testing; Coca tea; GC/MS.

Received 5 February 2013; accepted 19 March 2013

1. Introduction

The leaves of the cocaine-producing coca plant *Erythroxylon coca* are commercially available as individual tea bags in South America and through the Internet. The bags are steeped in hot water for several minutes then the infusion is drunk with milk, lemon or sugar, if desired. The packaging on the coca tea used in this experiment boasts that the tea is “restorative and energetic, excellent for diet” and “acts against fatigue or altitude sickness, relieves tiredness of voice and regulates the metabolism of carbohydrates”. In fact,

hotels in the Andean region serve coca tea to tourists to combat altitude sickness [15].

Despite its benefits, coca leaves and extracts of coca leaves are both Schedule II controlled substances in the United States because of its alkaloid content. It is well established that coca tea leaves and subsequent tea preparations contain cocaine (COC), benzoylecgonine (BE), and ecgonine methyl ester (EME). In humans, 75–90% of a COC dose is metabolized to BE and EME, both of which are excreted in urine. Liver benzoylesterase and plasma pseudocholinesterase hydrolyze COC to EME; BE is formed as a result of both

chemical hydrolysis and liver methylesterase activity [8]. A small percentage of COC is converted to nor-cocaine (NC) by P450-mediated N-demethylation [8, 12].

Siegel et al. reported that one tea bag of Health Inca Tea averaged 4.8 mg of COC and Mate de Coca averaged 5.7 mg [13]. Jenkins et al. [10] demonstrated that one cup of Peruvian coca tea contained an average of 4.14 mg COC, 0.50 mg BE, and 1.15 mg EME, while a cup of Bolivian coca tea averaged 4.29 mg COC, 0.26 mg BE, and 1.81 mg EME. The same study showed that increasing the steeping time increased the COC and EME content, while BE remained essentially constant.

The presence of COC and metabolites in coca tea is particularly of interest in urine drug testing for the purposes of a drug-free workplace. Following the consumption of one cup of Health Inca Tea, one individual's peak BE concentration was 1274 ng/ml by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) [5]. Jackson et al. analyzed urine from four subjects who drank one cup of coca tea. The group reported positive BE immunoassay results for 21–26 hours post-consumption and maximum BE concentrations of 1.4–2.8 mg/l by GC/MS analysis [9]. One individual drank both Peruvian and Bolivian coca tea at separate times in the previously mentioned study by Jenkins [10]. Peak concentrations from the Peruvian tea were 196 ng/ml of COC, 2520 ng/ml EME, and 3940 ng/ml of BE; peak concentrations from the Bolivian tea were 587 ng/ml COC, 2314 ng/ml EME, and 4979 ng/ml BE.

The 2004 edition of the Federal Register proposed the addition of head hair, sweat, and oral fluid to specimens appropriate for federal workplace drug testing programs [3]. Hair cutoff levels were set at 500 pg/mg of COC metabolites for initial testing; confirmatory testing cutoff levels were set at 500 pg/mg for COC and 50 ng/mg for BE. It was required that the BE/COC concentration ratio is greater than or equal to 0.05, OR cocaethylene (CE) or NC greater than or equal to 50 pg/mg.

Analyzing the hair of ancient coca leaf chewers, Springfield et al. [14] found that the mean concentration of COC in the samples was 0.25 ng/mg and 2.1 ng/mg for BE. Hair samples of modern day Bolivian coca chewers were found to contain COC amounts between 1.4 and 50.6 ng/mg, and BE amounts between 0.4 and 17.6 ng/mg [11].

Coca leaf chewing is an ancient practice of Andean natives. Several leaves of the coca plant along with ashes or other alkaline material are rolled into a packet called a quid. The quid is placed between the gum and

cheek. Saliva saturates the quid and the alkaloids are swallowed in the saliva for several hours [7].

Because of the addition of hair to the list of available testing specimens and the positive results of urine testing, the aim of this study was to investigate whether one or two cups of coca tea could produce a positive result in a hair analysis for COC and metabolites for the cutoff levels described above. Urine samples were also analyzed to confirm positive results. To the best of our knowledge, there have been no reports on hair analysis after drinking coca tea.

2. Experimental

2.1. Human subjects

Six volunteers were recruited to the study, four men and two women. The study was reviewed and approved by the University of Illinois at Chicago Institutional Review Board (IRB).

2.2. Analysis of coca tea

Delisse, Hornimans, and Trimate brands of coca tea were available for use in this study. The origin and age of the tea bags were unknown. To determine the alkaloid content of the different tea bags, one bag of each brand was steeped in 240 ml (approximately 8 ounces) of hot water for 10 min. Aliquots of each tea (200 μ l Delisse, 40 μ l Hornimans, and 60 μ l Trimate diluted to 2 ml with deionised water) were analyzed for COC, BE and EME by GC/MS following solid phase extraction (SPE) and using deuterated internal standards (ISs). All reagents were purchased from Fisher Scientific (Hanover Park, IL) and they were HPLC grade. All analytical standards including ISs were purchased from Cerilliant Corporation (Round Rock, TX).

2.3. Tea consumption and sample collection

Three subjects were recruited to drink one cup of coca tea; another three subjects were recruited to drink two cups of coca tea at the same sitting. Delisse coca tea bags as having the highest COC content were used in the study (see Results). For each volunteer, one coca tea bag was steeped in 240 ml of hot water for 10 min then drunk. For individuals consuming two cups, a second cup was brewed in the same manner immediately following drinking the first. Prior to consumption, pencil-thick sections of head hair and urine specimens were collected from each subject, and aliquots of each cup of tea were saved for later analysis.

Urine samples were collected at 1, 2, 4, 8, 12, 24, and 36 h post-consumption. Hair sections were collected at 12 h and 1, 3, 5, 14, and 28 days after coca tea consumption. Subjects were asked to cut hair sections as close to the scalp as possible from the backs of their heads (*vertex posterior*). Urine and tea samples were frozen until analysis.

2.4. Preliminary urine screening by immunoassay

The collected urine samples were allowed to thaw then a portion (3–5 ml) was pipetted to Vacutainer™ tubes. The Beckman Coulter™ SYNCHRON LX® System and COCM Cocaine Metabolite kit was used according to the manufacturer's instructions to give a preliminary quantitation of BE. The change in absorbance was measured at 340 nm. A qualitative result was reported based on a comparison of the sample value to the calibrated cut-off value. Samples measuring equal or greater than 300 ng/ml were considered positive; those below 300 ng/ml were negative.

2.5. Tea and urine analysis by SPE and GC/MS

Aliquots of the consumed tea samples (20 µl) were diluted in deionised water to 2 ml and ISs were added to a concentration of 200 ng/ml. ISs were added to 500 µl urine aliquots to a final concentration of 800 ng/ml. To each sample, 1 ml of 0.1M HCl, 1 ml 1.93 M acetic acid and 8 ml of deionised water were added. Isolute HCX (10 ml, 200 mg) (International Sorbent Technology, U.K.) columns were conditioned with 3 ml of methanol, 3 ml of water and 1 ml of 1.93 M acetic acid, never allowing the column to dry. Samples were passed through the column using a slight vacuum. Each column was sequentially washed with 3 ml of deionised water (dried for 1–2 min), 1 ml 0.1 M HCl (dried for 1–2 min), and 3 ml of methanol (dried for 5 min). COC and its metabolites were eluted with 3 ml of a methylene chloride : isopropanol : ammonium hydroxide (78:20:2, v/v/v) mixture. Samples were evaporated to dryness under air and reconstituted with 35 µl of acetonitrile. Samples were transferred to 100 µl conical inserts, placed in autosampler vials and 70 µl of BSTFA containing 1% TMCS was added for derivatisation. Samples were capped and incubated at 60°C for 30 min.

For GC/MS analysis, 1 µl of derivatised sample was injected (splitless mode, injector at 250°C) onto a Hewlett-Packard 6890 series GC fitted with a HP-5MS capillary column (30 m × 250 µm × 0.25 µm) attached to a Hewlett-Packard 5973 mass selective detector (ion source was kept at 230°C, quadrupole at 150°C). Ultra

high purity helium (99.999%) was used as the carrier gas at a flow rate of 1.2 ml per min. The GC oven was heated at 70°C for 1 min, then increased to 300°C at 20°C/min, and maintained for 2 min. The following ions were monitored using the mass selective detector in selective ion monitoring (SIM) mode: COC – *m/z* (182), 272, 303; COC-d₃ – (185), 275, 306; BE – 82, (240), 361; BE-d₃ – 85, (243), 364; NC – 240, (346), 361; NC-d₃ – 243, (349), 364; EME – (82), 96, 271; EME-d₃ – (85), 99, 274. Ions in parentheses were used for quantitation. The data were analyzed by Hewlett-Packard Chemstation®. Six-point standard curves for COC, NC, EME and BE in naïve urine were prepared in a concentration range of 5 ng/ml – 8000 ng/ml. In addition, the control urine samples containing COC, NC, EME, and BE were prepared at the concentrations of 120 ng/ml and 6000 ng/ml. All standards and controls were analyzed simultaneously with the urine samples collected from volunteers in this study.

2.6. Creatinine analysis in urine

Creatinine was quantitated using the Beckman Coulter SYNCHRON LX® System employing the CREM reagent kit. Aliquots (3–5 ml) of collected urine samples were pipetted to 10 ml Vacutainer™ sample tubes. Samples were analyzed according to the manufacturer's protocol. The urine sample (5.5 µl) was mixed with an alkaline picrate solution in a ratio of 1 part urine sample to 105 parts reagent. Absorbance was measured at 520 nm between 19 and 25 s after mixing. The absorbance value was directly proportional to the concentration of creatinine in the sample.

2.7. Hair analysis by SPE and GC/MS

Collected hair samples were washed with distilled water and allowed to air dry. From the root end of the hair sample, an approximately 2-cm segment was cut and pulverized in a steel capsule containing two steel balls using Crescent Wig-L-Bug mixer (Lyons, IL). A 50 mg portion of pulverized hair was analyzed. Some samples were too short to be divided into segments; therefore, the entire sample was pulverized and analyzed. Deuterated COC and deuterated BE were added to the pulverized hair to reach the final concentrations of 2 ng/mg and 1 ng/mg, respectively. Methanol (3 ml) was added to the hair, and the samples were sonicated for 1 h. The samples were centrifuged at 2000 rpm for 5 min and the methanol portion was transferred to a new vial and refrigerated. One ml of 0.1 N HCl was added to the pulverized hair and incubated overnight at 55°C. Samples were allowed to cool and centrifuged

at 2000 rpm for 5 min. The supernatant was added to the methanol wash. To the combined washes, 1 ml of 1.93 M acetic acid and 8 ml of deionised water were added. Standard curves ranging from 0.10 ng/mg to 5.0 ng/mg of COC and 0.03 ng/mg to 2.0 ng/mg of BE were prepared by spiking naïve hair with appropriate quantities of both analytes. Two levels of control hair preparations (0.6 ng/mg and 3.0 ng/mg of COC, and 0.2 ng/mg and 1.6 ng/mg of BE) were analyzed simultaneously with the study samples.

3. Results

3.1. Analysis of Delisse, Hornimans and Trimate coca tea bags

The total COC and metabolites contents in the three different types of coca tea are listed in Table I. Based on these results showing the highest COC content, Delisse tea was chosen for the study to be consumed by the study volunteers.

TABLE I. COCAINE AND METABOLITE CONTENT PER BAG IN DELISSE, HORNIMANS, AND TRIMATE COCA TEA

Tea	Cocaine [mg]	Benzoyllecgonine [mg]	Ecgonine methyl ester [mg]
Delisse	5.3	1.7	1.1
Hornimans	1.9	0.5	3.2
Trimate	1.4	0.8	0.3

3.2. COC and metabolite content in consumed tea

The Delisse tea samples ingested by the subjects were analyzed for COC and its metabolites, BE, NC, and EME. The results are presented in Table II. The alkaloid content is consistent with the results obtained when Delisse tea bags were analyzed together with Hornimans and Trimate teas. The range of COC content in a single cup was 3.1 to 5.6 mg; 4.3 mg to 5.0 mg for BE, and 0.7 mg to 1.1 mg for EME.

3.3. Creatinine testing and preliminary urine screening by immunoassay

Creatinine concentrations in urine samples collected from volunteers who consumed one cup of coca tea ranged from 13 to 273 mg/dl (119 ± 75 mg/dl). Similarly, for those who had two cups ranged from 20 to

TABLE II. COCAINE AND METABOLITE CONTENT IN COCA TEA CONSUMED BY SUBJECTS

SAMPLE	Cocaine [mg]	Benzoyllecgonine [mg]	Ecgonine methyl ester [mg]
Subject 1	4.8	4.3	1.0
Subject 2	4.9	4.3	1.0
Subject 3	5.5	4.6	1.1
Subject 4 Cup 1	4.8	4.3	1.0
Subject 4 Cup 2	5.6	5.0	1.1
Subject 5 Cup 1	4.0	4.3	0.9
Subject 5 Cup 2	3.4	4.8	0.8
Subject 6 Cup 1	3.6	4.8	0.8
Subject 6 Cup 2	3.1	4.3	0.7
Average	4.4	4.5	0.9

260 mg/dl (128 ± 83 mg/dl). One individual that drank one cup of tea screened positive for 12 h, one for 24 h, and one for 36 h. The urine samples of all three individuals drinking two cups were positive throughout the entire study period of 36 h.

3.4. COC and metabolite content in urine by GC/MS

Figure 1 shows the chromatogram of urine extract containing COC, NC, EME, and BE. Tables III and IV present the concentrations of COC and metabolites for all urine samples collected. Table V presents the accuracy and precision of urine control preparations.

The standard curves for COC, BE, EME and NC had correlation coefficients of at least 0.99. The concentrations of COC and NC in urine were low or negative for almost all specimens regardless of the amount of coca tea consumed. Generally by 4 h post-consumption no parent COC was detected in urine samples. The highest COC concentration was 15 ng/ml at 1 h post-consumption of two coca tea cups.

Quantitative analysis of urine samples collected in this study revealed that one subject drinking one cup of coca tea had BE concentration above 150 ng/ml confirmatory threshold for 12 h, one for 24 h, and one for 36 h. All three subjects who consumed two cups had BE concentrations above the threshold for 36 h.

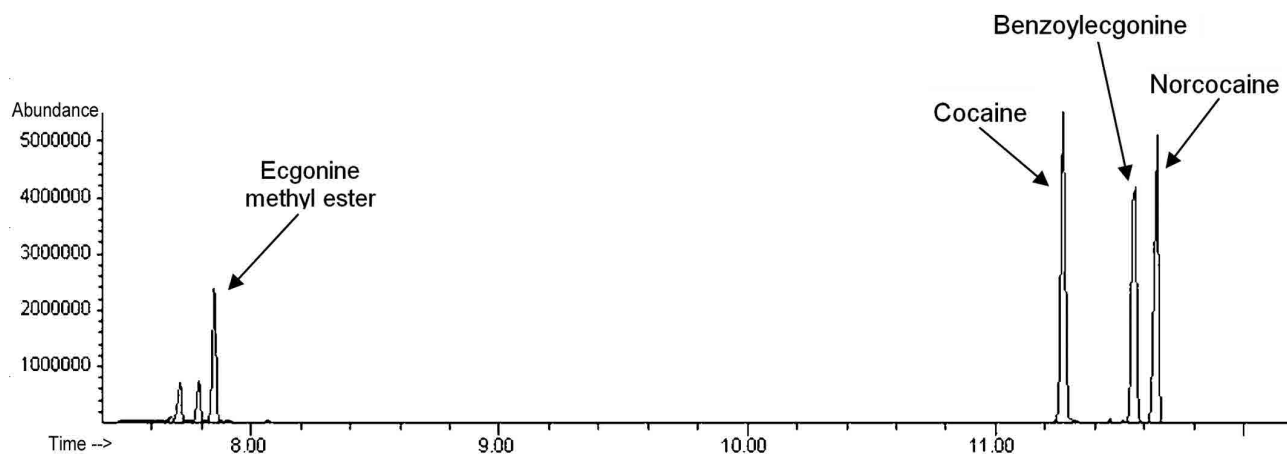


Fig. 1. Total ion chromatogram of urine containing COC, BE, EME and NC.

TABLE III. COCAINE AND METABOLITE CONCENTRATIONS IN URINE FOR SUBJECTS DRINKING ONE CUP OF COCA TEA

Sample	Ecgonine methyl ester [ng/ml]	Cocaine [ng/ml]	Benzoyllecgonine [ng/ml]	Norcocaine [ng/ml]
Subject 1 0 h	Nd	Nd	Nd	Nd
Subject 1 1 h	430	Bql	204	Nd
Subject 1 2 h	513	Bql	243	Nd
Subject 1 4 h	3751	Nd	1758	Nd
Subject 1 8 h	2394	Bql	1647	Nd
Subject 1 12 h	1305	Bql	1398	30
Subject 1 24 h	99	Bql	256	Nd
Subject 1 36 h	Nd	Nd	71	Nd
Subject 2 0 h	Nd	Nd	Nd	Nd
Subject 2 1 h	585	Bql	234	Nd
Subject 2 2 h	1744	12	730	Nd
Subject 2 4 h	2475	Nd	1235	Nd
Subject 2 8 h	1399	Nd	960	Nd
Subject 2 12 h	1188	Bql	1070	Nd
Subject 2 24 h	8	Nd	194	Nd
Subject 2 36 h	Bql	Nd	249	Nd
Subject 3 0 h	Nd	Nd	Nd	28
Subject 3 1 h	1495	Nd	818	31
Subject 3 2 h	1468	Bql	923	Nd
Subject 3 4 h	916	Bql	702	Nd
Subject 3 8 h	232	Nd	228	Nd
Subject 3 12 h	615	Nd	545	Nd
Subject 3 24 h	Bql	Nd	62	Nd
Subject 3 36 h	17	Nd	79	Nd

Nd – None detected; Bql – Below quantitation limit.

TABLE IV. COCAINE AND METABOLITE CONCENTRATIONS IN URINE FOR SUBJECTS DRINKING TWO CUPS OF COCA TEA

Sample	Ecgonine methyl ester [ng/ml]	Cocaine [ng/ml]	Benzoylcegonine [ng/ml]	Norcocaine [ng/ml]
Subject 4 0 h	Nd	Nd	Nd	36
Subject 4 1 h	1285	15	567	Nd
Subject 4 2 h	2921	12	2579	29
Subject 4 4 h	1769	Bql	1705	27
Subject 4 8 h	2462	Bql	3383	27
Subject 4 12 h	748	Nd	2450	Nd
Subject 4 24 h	91	Nd	1301	Nd
Subject 4 36 h	13	Nd	964	Nd
Subject 5 0 h	Nd	Nd	Nd	28
Subject 5 1 h	895	Bql	457	29
Subject 5 2 h	4075	7	1589	Nd
Subject 5 4 h	4476	Bql	1409	Nd
Subject 5 8 h	7760	5	3035	29
Subject 5 12 h	3817	Bql	2919	26
Subject 5 24 h	253	Bql	749	Nd
Subject 5 36 h	124	Nd	308	Nd
Subject 6 0 h	Nd	Nd	Nd	29
Subject 6 1 h	5980	Bql	2299	29
Subject 6 2 h	5587	Nd	2779	Nd
Subject 6 4 h	5552	Bql	3035	Nd
Subject 6 8 h	4449	Bql	2503	Nd
Subject 6 12 h	2627	Bql	1928	Nd
Subject 6 24 h	2016	Bql	2013	27
Subject 6 36 h	113	Bql	437	Nd

Nd – None detected; Bql – Below quantitation limit.

The peak BE concentration for those drinking one cup was 1758 ng/ml at 4 h. Compared to the one cup group, the two cup group had significantly higher BE concentrations. The range of BE concentrations in urine in two cup drinkers was 308 ng/ml at 36 h to 3383 ng/ml at 8 h. BE concentrations peaked between 2 and 8 h in both study groups, and steadily declined over time.

Like BE, EME concentrations peaked between 2 and 8 h. The maximum EME concentration in one cup drinkers was 3751 ng/ml after 4 h and 7760 ng/ml in those who consumed two cups.

For the purpose of normalization, the individual urine concentrations of BE and EME were divided by the creatinine content in each urine sample and then by 100 to make the volume units equivalent. Figures 2 and 3 graph the BE concentrations normalized to creatinine content over the 36 h collection period for

subjects drinking one and two cups of coca tea, respectively. Figures 4 and 5 show the EME concentrations normalized to creatinine content.

3.5. COC and metabolite content in hair

The standard curves used to calculate COC and BE concentrations in hair were linear over the concentration range studied and had correlation coefficients of 0.99 and 0.93, respectively. Table V presents the accuracy and precision of urine and hair control preparations. Only one out of six subjects participating in the study had COC concentration above the proposed 500 pg/mg threshold in hair at fourteen (1.2 ng/mg) and twenty-eight (2.4 ng/mg) days post-consumption, but BE was not seen in any of the hair samples. COC was not found in any other hair sample collected in this study.

TABLE V. ACCURACY AND PRECISION OF URINE AND HAIR PREPARATIONS

	Urine [ng/ml]			
	Cocaine	Benzoyllecgonine	Ecgonine methyl ester	Norcocaine
Target conc.	120	120	120	120
<i>N</i>	12	12	12	12
Mean measured conc. (<i>SD</i>)	116.8 (11.9)	120.4 (5.9)	111.2 (25.7)	108.5 (4.9)
% <i>CV</i>	10.2	4.9	23.1	4.5
% <i>RA</i>	-2.7	0.3	-7.3	-9.5
Target conc.	6000	6000	6000	6000
<i>N</i>	12	12	12	12
Mean measured conc. (<i>SD</i>)	6268 (204)	4594 (1167)	6850 (189)	5406 (157)
% <i>CV</i>	3.3	25.4	2.7	2.9
% <i>RA</i>	4.5	-23.4	14.1	-9.9
	Hair [ng/mg]			
	Cocaine	Benzoyllecgonine		
Target conc.	0.6	0.2		
<i>N</i>	7	6		
Mean measured conc. (<i>SD</i>)	0.7 (0.06)	0.3 (0.05)		
% <i>CV</i>	8.6	16.6		
% <i>RA</i>	16.6	50		
Target conc.	3.0	1.6		
<i>N</i>	8	8		
Mean measured conc. (<i>SD</i>)	3.2 (0.2)	2.5 (0.9)		
% <i>CV</i>	6.2	36		
% <i>RA</i>	6.6	56.2		

Target conc. – Target concentration; Mean measured conc. (*SD*) – Mean measured concentration (standard deviation); *CV* – Coefficient of variation [%]; *RA* – Relative accuracy [%].

4. Discussion

The alkaloid content observed in the Delisse tea is consistent with the results reported in the literature by Siegel [13] and Jenkins [10]. The Hornimans and Trimate COC content (1.9 mg and 1.4 mg, respectively) were lower than the other brands. This decrease in COC content may be due to the age of the tea bags, geographical area where the leaves were cultivated, or the conditions in which the bags were stored. Because the source and age of the bags are not fully known, determining the factors for the content discrepancy is difficult.

The concentration of BE and EME excreted in urine, like the alkaloid content in the tea, is similar to the other studies on urine analysis after drinking coca tea. The highest urine concentration of parent COC

(15 ng/ml in two cup group) and BE (1758 ng/ml when one cup was consumed) in our study was much lower than the urine concentrations recorded by Jenkins et al. after drinking one cup (587 ng/ml for COC and 3940 ng/ml of BE) [10]. In subjects 3, 4, 5, and 6 (Table III and IV) in our study, low concentrations of NC were detected in 0 hour urine samples. This finding is difficult to explain and would require more studies. It is well documented, however, that COC is present in human environment and its metabolites can be found in urine even after casual contact with contaminated dollar bills, for example [5]. Higher NC concentrations were observed in cholinesterase-deficient and alcohol using subjects [8]. Individuals presented to the urban emergency department because of COC overdose reported by Williams et al. [16] had COC concentrations ranging from 22 ng/ml to as high as 40 µg/ml, BE

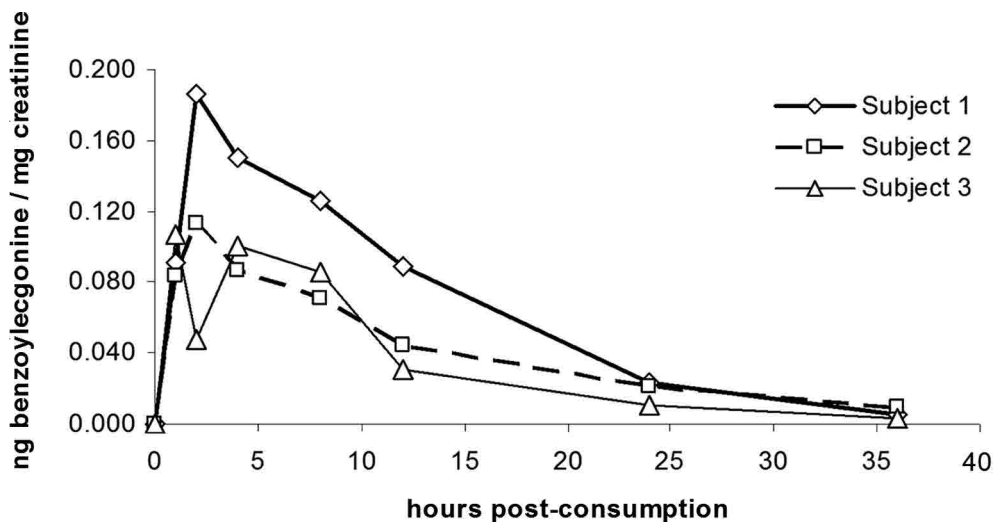


Fig. 2. BE concentrations after consumption of one cup of coca tea normalized to creatinine content.

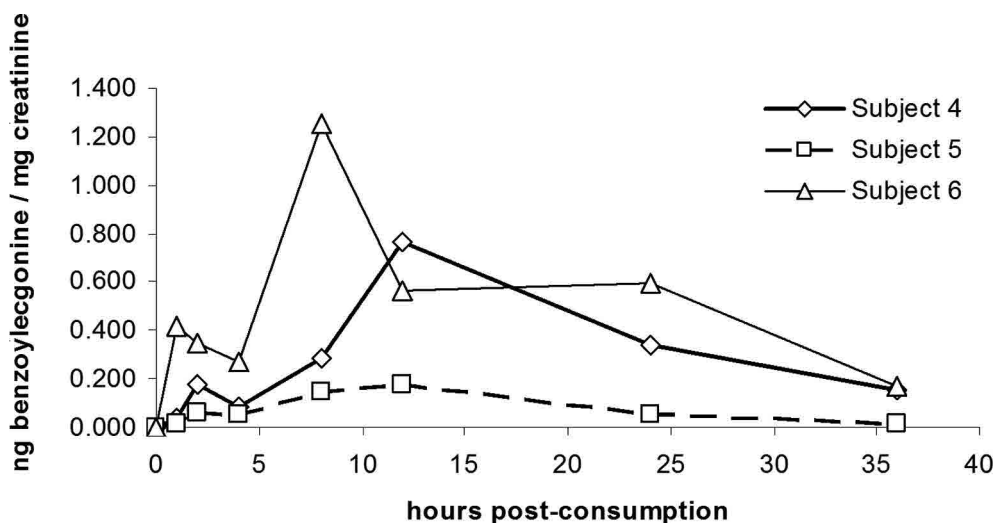


Fig. 3. BE concentrations after consumption of two cups of coca tea normalized to creatinine content.

from 100 ng/ml to 3.3 mg/ml, EME from 36 ng/ml to 661 µg/ml and NC from 35 ng/ml to 2250 ng/ml.

Of the six volunteers in this study, only one had COC detected in hair at fourteen (1.2 ng/mg) and twenty-eight (2.4 ng/mg) days post-consumption. BE was not found in any of the hair samples with a method's lower limit of quantitation as low as 0.03 ng/mg and therefore cannot constitute a positive result. The proposed revisions to mandatory guidelines for federal workplace drug testing programs [3] set the confirmatory COC threshold concentration at 0.5 ng/mg, BE at 50 pg/mg, and the BE/COC concentration ratio to be greater than or equal to 0.05. The Society of Hair Testing proposed guidelines for drug testing in hair established similar confirmatory thresholds for COC and BE clearly requiring the presence of not only the par-

ent COC, but also at least one other analyte including BE, NC, EME, or CE [2]. Perhaps individual variability in the incorporation of COC and metabolites into growing hair in this study caused only one individual to have COC present, while the rest were negative. In addition, the hygienic habits of these subjects, particularly that one, are not known. The applied hair wash did not normalize the subjects by removing or detecting drug likely due to sources other than coca tea. It is also possible that consuming only one or two cups of coca tea did not generate a high enough concentration of COC and/or metabolite to effectively incorporate into hair. In a study involving COC users, Cairns et al. [1] found that COC levels in hair ranged from 0.29 to 227 ng/mg. In 2008 the Department of Health and Human Services issued the revised mandatory guidelines

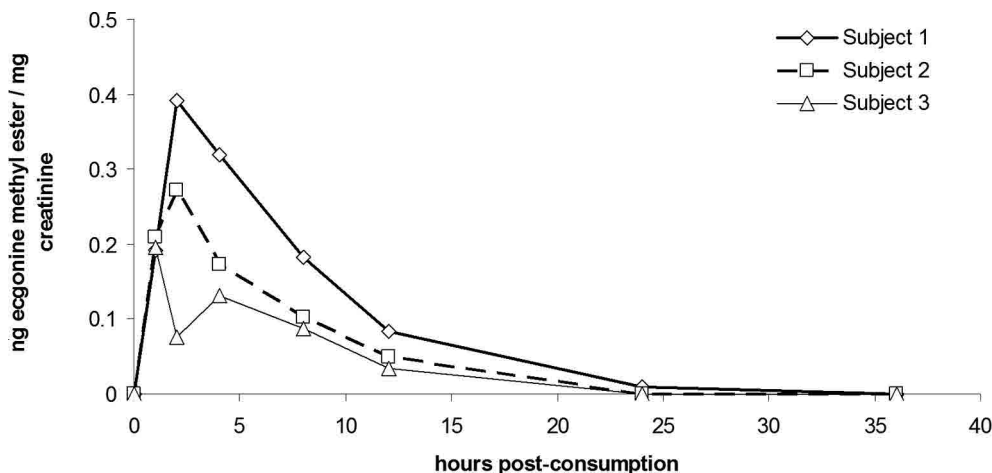


Fig. 4. EME concentrations after consumption of one cup of coca tea normalized to creatinine content.

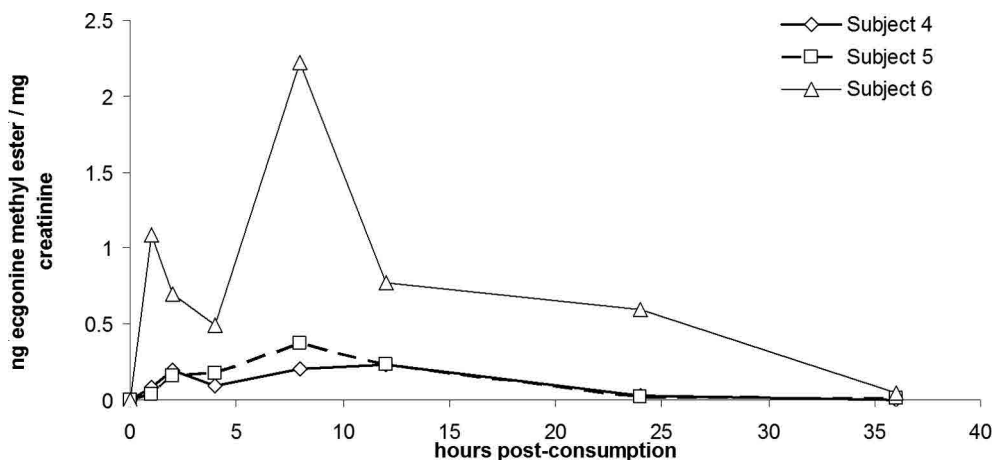


Fig. 5. EME concentrations after consumption of two cups of coca tea normalized to creatinine content.

for federal workplace drug testing programs. According to the document, the only specimen allowed to be tested for that purpose is urine. The screening threshold for BE was lowered to 150 ng/ml and confirmatory to 100 ng/ml [4].

Because of the results in this study and the others involving coca tea, those associated with drug testing programs must be aware of potential instances of testing positive for COC without actual illicit COC or crack ingestion. While coca tea leaves are a controlled substance in the United States, it is not difficult to purchase boxes of coca tea through the Internet or bring past customs screeners. Caution must be taken when interpreting the positive results of a urine or hair tests and the possibility of coca tea consumption should be considered.

References

1. Cairns T., Hill V., Schaffer M. [et al.], Levels of cocaine and its metabolites in washed hair of demonstrated cocaine users and workplace subjects, *Forensic Science International* 2004, 145, 175–181.
2. Cooper G. A. A., Kronstrand R., Kintz P., Society of Hair Testing guidelines for drug testing in hair, *Forensic Science International* 2012, 218, 20–24.
3. Department of Health and Human Services: Proposed revisions to mandatory guidelines for federal workplace drug testing programs, *Federal Register* 2004, 69, 19673–19732.
4. Department of Health and Human Services: Mandatory guidelines for Federal Workplace Drug Testing Programs; Notice, *Federal Register* 2008, 73, 71858–71907.

5. ElSohly M., Urinalysis and casual handling of marijuana and cocaine, *Journal of Analytical Toxicology* 1991, 15, 46.
6. ElSohly M., Stanford D., ElSohly H., Coca tea and urinalysis for cocaine metabolites, *Journal of Analytical Toxicology* 1986, 10, 256.
7. Henderson G., Harkey M., Zhou C. [et al.], Cocaine and metabolite concentrations in the hair of South American Coca Chewers, *Journal of Analytical Toxicology* 1992, 16, 199–201.
8. Isenschmid D.S., Cocaine – effects on human performance and behavior, *Forensic Science Review* 2002, 14, 61–100.
9. Jackson G., Saady J., Poklis A., Urinary excretion of benzoylecgonine following ingestion of Health Inca Tea, *Forensic Science International* 1991, 49, 57–64.
10. Jenkins A., Llosa T., Montoya I. [et al.], Identification and quantitation of alkaloids in coca tea, *Forensic Science International* 1996, 77, 179–189.
11. Möller M., Fey P., Rimbach S., Identification and quantitation of cocaine and its metabolites, benzoylecgonine and ecgonine methyl ester, in hair of Bolivian coca chewers by gas chromatography/mass spectroscopy, *Journal of Analytical Toxicology* 1992, 16, 291–296.
12. Schuster L., Pharmacokinetics, metabolism, and disposition of cocaine, [in:] Cocaine: Pharmacology, physiology, and clinical strategies, Lakoski J. M., Galloway M. P., White F. J. [eds.], CRC Press, Ann Arbor 1992.
13. Siegel R., ElSohly M., Plowman T. [et al.], Cocaine in herbal tea, *Journal of American Medical Association* 1986, 255, 40.
14. Springfield A., Cartmell L., Aufderheide A. [et al.], Cocaine and metabolites in the hair of ancient Peruvian coca leaf chewers, *Forensic Science International* 1993, 63, 269–275.
15. Weil A. T., Coca leaf as a therapeutic agent, *American Journal of Drug and Alcohol Abuse* 1978, 5, 75–86.
16. Williams R., Maggiore J., Shah S. [et al.], Cocaine and its major metabolites in plasma and urine samples from patients in an urban emergency setting, *Journal of Analytical Toxicology* 2000, 24, 478–481.

Corresponding author

Prof. Adam Negrusz
University of Illinois at Chicago
Department of Biopharmaceutical Sciences
(M/C 865), College of Pharmacy
833 South Wood Street
Chicago, IL 60612
e-mail: anegrusz@uic.edu

WYKRYWANIE I OZNACZANIE KOKAINY I JEJ METABOLITÓW W MOCZU ORAZ WŁOSACH PO PRZYJĘCIU HERBATY Z KOKI

1. Wstęp

Liście krasnodrzewu pospolitego (koki) *Erythroxylon coca* zawierające kokainę można zakupić w postaci torebek z herbatą zarówno w Ameryce Południowej, jak i przez Internet. Torebki są zaparzone w gorącej wodzie przez kilka minut, a przygotowany napar jest wypijany, w zależności od potrzeby, z mlekiem, cytryną lub cukrem. Na opakowaniach herbaty z koki stosowanych w niniejszym eksperymencie znajdowały się informacje, że herbata jest „regenerująca i energetyczna, doskonała do diety” oraz „działa przeciwko zmęczeniu i chorobie wysokościowej, łagodzi zmęczenie głosu i reguluje metabolizm węglowodanów”. Faktycznie w hotelach znajdujących się w rejonie And herbata z koki jest serwowana turystom w celu przeciwdziałania chorobie wysokościowej [15].

Pomimo swoich zalet, liście koki oraz ekstrakty z liści koki ze względu na zawartość alkaloidów znajdują się w Stanach Zjednoczonych na Wykazie II substancji kontrolowanych. Udowodniono, że liście kokainowej herbaty i otrzymane z nich napary zawierają kokainę (COC), benzoiloekgoninę (BE) oraz ester metylowy ekgoniny (EME). U ludzi 75–90% dawki COC jest metabolizowane do BE i EME, które są wydalane z moczem. Benzoiloesteraza wątroby i pseudochoolinoesteraza osocza hydrolizują COC do EME; BE powstaje zarówno w wyniku hydrolizy chemicznej, jak i aktywności metyloesterazy wątroby [8]. Niewielki procent COC jest przekształcany do norkokainy (NC) przez zależną od cytochromu P450 N-demetylację [8, 12].

Siegel i in. określili, że jedna torebka herbaty Health Inca Tea zawiera średnio 4,8 mg COC, a Mate de Coca średnio 5,7 mg [13]. Jenkins i in. [10] dowiedli, że jedna filiżanka peruwiańskiej herbaty z koki zawiera średnio 4,14 mg COC, 0,50 mg BE i 1,15 mg EME, a filiżanka boliwijskiej herbaty z koki średnio 4,29 mg COC, 0,26 mg BE i 1,81 mg EME. Te same badania wykazały, że zwiększenie czasu parzenia skutkowało wzrostem zawartości COC i EME, podczas gdy stężenie BE pozostawało niezmiennie.

Obecność COC i jej metabolitów w herbacie z koki ma szczególnie znaczenie ze względu na badania moczu na obecność środków odurzających w celu zachowania miejsca pracy wolnego od narkotyków. Po spożyciu jednej filiżanki Health Inca Tea maksymalne stężenie BE oznaczone metodą chromatografii gazowej połączonej ze spektroskopią mas (GC/MS) wynosiło 1274 ng/ml [5]. Jackson i in. analizowali mocz czterech osób, które wypity po jednej filiżance herbaty z koki. Dla tej grupy

uzyskano metodą immunoenzymatyczną dodatkowo wyniki na obecność BE przez 21–26 godzin po konsumpcji, a maksymalne stężenia BE wyznaczone metodą GC/MS wynosiły 1,4–2,8 mg/l [9]. We wspomnianych wcześniej badaniach Jenkins jedna osoba piła w różnym czasie zarówno herbatę peruwiańską, jak i boliwijską [10]. Maksymalne stężenia uzyskane po spożyciu peruwiańskiej herbaty wynosiły 196 ng/ml COC, 2520 ng/ml EME i 3940 ng/ml BE, podczas gdy maksymalne stężenia po herbacie boliwijskiej wynosiły 587 ng/ml COC, 2314 ng/ml EME i 4979 ng/ml BE.

W Dzienniku Urzędowym z 2004 roku zaproponowano dodanie włosów z głowy, potu i śliny jako materiałów odpowiednich dla federalnych programów badania narkotyków u osób znajdujących się w pracy [3]. Dla włosów zaproponowano wartości progowe na poziomie 500 pg/mg dla metabolitów COC w przypadku testów przesiewowych, a dla analiz potwierdzających wartości progowe zostały ustalone na 500 pg/mg dla COC i 50 ng/mg dla BE. Wymagano, aby stosunek stężeń BE/COC był równy lub większy od 0,05 lub stężenia kokaetyleny (CE) lub NC były równe lub wyższe niż 50 pg/mg.

Analizując włosy starożytnych użytkowników liści koki, Springfield i in. [14] odkryli, że średnie stężenia w próbkach wynosiły 0,25 ng/mg dla COC i 2,1 ng/mg dla BE. Próbkę włosów współczesnych boliwijskich użytkowników liści koki zawierały COC w zakresie od 1,4 ng/mg do 50,6 ng/mg, a BE od 0,4 ng/mg do 17,6 ng/mg [11].

Żucie liści koki to starożytna praktyka rdzennych mieszkańców Andów. Kilka liści rośliny koki zawija się wraz z popiołem lub innym alkalicznym materiałem w pakiet nazywany prymką. Prymka jest umieszczona między dżaszem a policzkiem. Ślina nasącza prymkę, a alkaloidy są wchłaniane wraz ze śliną przez kilka godzin [7].

Ze względu na dodanie włosów do listy materiałów mogących być wykorzystanych w badaniach, celem niniejszej pracy było sprawdzenie, czy spożycie jednej lub dwóch filiżanek herbaty z koki może skutkować dodatkowymi wynikami podczas analizy włosów w kierunku obecności COC i jej metabolitów dla podanych powyżej wartości progowych. Próbkę moczu również analizowano w celu potwierdzenia pozytywnych wyników. Zgodnie z wiedzą autorów, jak dotychczas nie opublikowano doniesień na temat analizy włosów po wypiciu herbaty z koki.

2. Część doświadczalna

2.1. Uczestnicy badań

W badaniach uczestniczyło sześciu ochotników – czterech mężczyzn i dwie kobiety. Eksperyment badawczy został oceniony i zatwierdzony przez Zakładową Radę Rewizyjną (Institutional Review Board; IRB) Uniwersytetu Illinois w Chicago.

2.2. Analiza herbaty z koki

W badaniach wykorzystano herbaty marek Delisse, Hornimans i Trimate. Pochodzenie i data produkcji herbaty były nieznane. W celu określenia zawartości alkaloidów w różnych wyrobach jedna torebka każdego produktu była zaparzana w 240 ml (około 8 uncji) gorącej wody przez 10 min. Próbki każdej z herbat (200 µl Delisse, 40 µl Hornimans i 60 µl Trimate rozcieńczone do 2 ml wodą dejonizowaną) analizowano w kierunku obecności COC, BE i EME metodą GC/MS po uprzedniej ekstrakcji do fazy stałej (SPE) przy zastosowaniu deuterowanych wzorców wewnętrznych (ISs). Wszystkie odczynniki były o czystości do HPLC i zostały zakupione w firmie Fisher Scientific (Hanover Park, IL). Wszystkie wzorce analityczne, włączając ISs, zakupiono w firmie Cerilliant Corporation (Round Rock, TX).

2.3. Spożycie herbaty i pobieranie próbek

Trzy osoby wypily po jednej filiżance herbaty z koki, a trzy kolejne wypily jej po dwie filiżanki. Ze względu na najwyższą zawartość COC w herbacie Delisse, w badaniach wykorzystano torebki z herbatą tej marki (zob. wyniki). Każdy ochotnik wypił jedną herbatę uzyskaną przez zaparzenie torebki w 240 ml gorącej wody przez 10 min. W przypadku osób wypijających dwie filiżanki, druga była przygotowywana w taki sam sposób od razu po wypiciu pierwszej. Przed spożyciem od każdego ochotnika pobrano próbki włosów z głowy o grubości ołówka oraz próbki moczu. Próbki każdej ze spożywanych herbat również zabezpieczono do dalszych badań. Próbki moczu pobierano po 1, 2, 4, 8, 12, 24 i 36 godzinach od spożycia herbaty. Próby włosów pobierano po upływie 12 godzin oraz 1, 3, 5, 14 i 28 dni po konsumpcji herbaty z koki. Badanych poproszono o ścięcie prób włosów jak najbliżej skóry z tyłu głowy (*vertex posterior*). Próbki moczu i herbata zostały zamrożone do czasu analizy.

2.4. Wstępna analiza przesiewowa moczu metodą immunoenzymatyczną

Zebrane próbki moczu rozmrożono, po czym ich część (3–5 ml) przeniesiono do probówek Vacutainer.

Wstępną analizę ilościową przeprowadzono przy zastosowaniu aparatu Beckman Coulter SYNCHRON LX oraz zestawu COCM Cocaine Metabolite zgodnie z instrukcją producenta. Zmiana absorbancji była mierzona przy długości fali 340 nm. Wynik jakościowy stwierdzano na podstawie porównania wartości próbki do skalibrowanej wartości progowej. Próbki, których stężenie było równe lub większe niż 300 ng/ml, uważano za pozytywne; poniżej 300 ng/ml określano jako negatywne.

2.5. Analiza herbaty i moczu przy zastosowaniu metod SPE i GC/MS

Próbki spożywanych herbat (20 µl) rozcieńczano wodą dejonizowaną do 2 ml, po czym dodawano ISs do osiągnięcia stężenia 200 ng/ml. Do 500 µl moczu dodawano ISs, osiągając końcowe stężenie 800 ng/ml. Do każdej próbki dodawano 1 ml 0,1 M roztworu HCl, 1 ml 1,93 M kwasu octowego i 8 ml wody dejonizowanej. Kolumny Isolute HXC (10 ml, 200 mg; International Sorbent Technology, Wielka Brytania) kondycjonowano kolejno 3 ml metanolu, 3 ml wody i 1 ml 1,93 M kwasu octowego, nie pozwalając im wyschnąć. Próbki przepuszczano przez kolumny pod zmniejszonym ciśnieniem. Każdą kolumnę przemywano kolejno 3 ml wody dejonizowanej (suszenie przez 1–2 min), 1 ml 0,1 M HCl (suszenie przez 1–2 min) i 3 ml metanolu (suszenie przez 5 min). COC i jej metabolity były wymywane przy użyciu 3 ml mieszaniny chlorek metylenu : izopropanol : wodny roztwór amoniaku (78:20:2, v/v/v). Próbki odparowywano do sucha w strumieniu powietrza, a następnie rozpuszczano w 35 µl acetonitrylu, po czym przenoszono do stożkowych wkładek o pojemności 100 µl umieszczonych we fiolkach do automatycznego podajnika próbek. W celu ich derywatyzacji dodawano 70 µl BSTFA zawierającego 1% TMCS. Następnie próbki zakapslowywano i inkubowano w temperaturze 60°C przez 30 min.

Analizę GC/MS prowadzono przy zastosowaniu chromatografu gazowego (GC) Hewlett-Packard serii 6890 wyposażonego w kolumnę kapilarną HP-5MS (30 m × 250 µm × 0.25 µm) i połączonego z selektywnym detektorem masowym Hewlett-Packard 5973 (źródło jonów utrzymywano w temperaturze 230°C, a kwadrupol w temperaturze 150°C). Do aparatu nastrzykiwano 1 µl zderywatyzowanej próbki (tryb bez podziału, temperatura dozownika 250°C). Przepływ gazu nośnego, którym był ultraczysty hel (99,999%), wynosił 1,2 ml/min. Piec GC utrzymywano w temperaturze 70°C przez 1 min, po czym wzrastała ona o 20°C/min do osiągnięcia temperatury 300°C, która była utrzymywana przez 2 min. Selektowny detektor mas pracujący w trybie monitorowania wybranych jonów (SIM) rejestrował następujące jony: COC – *m/z* (182), 272, 303; COC-d₃ – (185), 275, 306; BE – 82, (240), 361; BE-d₃ – 85, (243), 364; NC – 240, (346), 361; NC-d₃ – 243, (349), 364; EME – (82), 96,

271; EME-d₃ – (85), 99, 274. Jony podane w nawiasach stosowano w analizie ilościowej. Dane były analizowane przez oprogramowanie Hewlett-Packard Chemstation. Sześciopunktowe krzywe kalibracyjne w zakresie stężeń 5 ng/ml–8000 ng/ml dla COC, NC, EME sporządzono dla próbek moczu osób niestosujących kokainy. Ponadto przygotowano kontrolne próbki moczu zawierające COC, NC, EME i BE w stężeniach 120 ng/ml i 6000 ng/ml. Wszystkie próbki wzorcowe oraz kontrolne analizowano równocześnie z próbkami moczu zebranymi od ochotników uczestniczących w badaniach.

2.6. Analiza kreatyniny w moczu

Kreatyninę oznaczano przy użyciu aparatu Beckman Coulter SYNCHRON LX i zestawu odczynników CREM. Część (3–5 ml) pobranego moczu przenoszono do probówek Vacutainer o pojemności 10 ml. Próbkę analizowano zgodnie z instrukcją producenta. Próbkę moczu (5,5 µl) mieszano z alkalicznym roztworem pikrynianu w stosunku 1 część moczu do 105 części odczynnika. Absorbancję mierzono przy długości fali 520 nm pomiędzy 19 a 25 s po zmieszaniu. Wartość absorbancji była wprost proporcjonalna do stężenia kreatyniny w próbce.

2.7. Analiza włosów przy zastosowaniu metod SPE i GC/MS

Zebrane próbki włosów przemywano wodą destylowaną, po czym suszono. Odcięty od strony cebulek włosów segment o długości około 2 cm mielono w stalowej kapsule zawierającej dwie kulki przy użyciu młynka Crescent Wig-L-Bug (Lyons, IL). Analizie poddawano 50-mg porcje sproszkowanych włosów. Niektóre próbki były zbyt małe, aby mogły zostać podzielone na segmenty; w tym przypadku całe próbki mielono i analizowano. Deuterowaną COC i deuterowaną BE dodawano do zmieszanych włosów do osiągnięcia końcowych stężeń, odpowiednio: 2 ng/mg i 1 ng/mg. Następnie włosy zalewano metanolem (3 ml) i poddawano działaniu ultradźwięków przez 1 h. Próbkę wirowano przy 2000 obr/min przez 5 min, a roztwory metanolowe przenoszono do nowych fiolek i umieszczano w lodówce. 1 ml 0,1 N kwasu solnego dodawano do zmieszanych włosów i inkubowano przez noc w temperaturze 55°C. Próbkę pozostawiono do ochłodzenia, po czym wirowano przy 2000 obr/min przez 5 min. Supernatant łączono z roztworem metanolem. Do połączonych roztworów dodawano 1 ml 1,93 M kwasu octowego i 8 ml wody dejonizowanej. Krzywe kalibracyjne w zakresie od 0,10 ng/mg do 5,0 ng/mg dla COC i od 0,03 ng/mg do 2,0 ng/mg dla BE przygotowano przez dodanie odpowiednie ilości obu analitów do włosów pobranych od osób nieprzyjmujących kokainy. Próbkę włosów kontrolnych przygotowano dla dwóch poziomów (0,6 ng/mg i 3,0 ng/mg dla COC oraz

0,2 ng/mg i 1,6 ng/mg dla BE) analizowano równocześnie z badanymi próbkami.

3. Wyniki

3.1. Analiza herbat z koki Delisse, Hornimans i Trimate

Całkowita zawartość COC i metabolitów w trzech różnych rodzajach herbaty z koki została przedstawiona w tabeli I. Na podstawie tych wyników stwierdzono najwyższą zawartość COC w herbacie Delisse, która została wybrana do dalszych badań.

3.2. Zawartość COC i metabolitów w spożywanej herbacie

Próbki spożywanej przez ochotników herbaty Delisse analizowane były na obecność COC i jej metabolitów: BE, NC i EME. Wyniki przedstawiono w tabeli II. Zawartość alkaloidów była zgodna z wynikami uzyskanymi wcześniej, kiedy próbki herbaty Delisse analizowano wraz z herbatami Hornimans i Trimate. Zawartość COC w jednej filiżance mieściła się w zakresie od 3,1 do 5,6 mg, BE od 4,3 mg do 5,0 mg, a EME od 0,7 mg do 1,1 mg.

3.3. Badania kreatyniny i wstępna przesiewowa analiza moczu metodą immunoenzymatyczną

Stężenia kreatyniny w próbkach moczu pobranych od ochotników, którzy spożywali jedną filiżankę herbaty z koki, wahały się w zakresie od 13 do 273 mg/dl (119 ± 75 mg/dl). Podobnie w przypadku tych osób, które wypili dwie filiżanki, wartości te znajdowały się w zakresie od 20 do 260 mg/dl (128 ± 83 mg/dl). W wyniku przesiewowej analizy moczu u jednej osoby, która wypila jedną filiżankę herbaty, uzyskano pozytywne odczyty przez 12 h, u kolejnej przez 24 h, a u ostatniej przez 36 h. Próbkę moczu u każdego z trzech badanych, którzy wypili po dwie filiżanki, były pozytywne przez cały 36-godzinny okres badań.

3.4. Zawartość COC i metabolitów w moczu oznaczona metodą GC/MS

Rycina 1 przedstawia chromatogram ekstraktu moczu zawierającego COC, NC, EME i BE. W tabelach III i IV przedstawiono stężenia COC i jej metabolitów we wszystkich zebranych próbkach moczu. Tabela V przedstawia dokładność i precyzję kontrolnych prób moczu.

Krzywe kalibracyjne dla COC, BE, EME i NC charakteryzowały się współczynnikami korelacji nie mniejszymi niż 0,99. W moczu wykazano niskie stężenia

nia COC i NC lub uzyskano ujemne wyniki dla prawie wszystkich prób, niezależnie od ilości spożywanej herbaty z koki. Generalnie po 4 h od przyjęcia w moczu nie wykrywano związku macierzystego COC. Najwyższe stężenie COC wynosiło 15 ng/ml i zostało oznaczone po 1 h od spożycia dwóch filiżanek herbaty z koki.

W wyniku ilościowej analizy zebranych prób moczu u jednego badanego pijącego jedną filiżankę herbaty z koki wykazywano stężenia BE powyżej wartości progowej 150 ng/ml przez 12 h, u kolejnego przez 24 h, a u ostatniego przez 36 h. U wszystkich trzech osób, które wypily po dwie filiżanki, stężenia BE były wyższe od wartości progowej przez 36 h.

Maksymalne stężenie BE u osób pijących jedną filiżankę z koki wynosiło 1758 ng/ml i było osiągnięte w 4. godzinie badania. W porównaniu z grupą osób pijących jedną filiżankę, w grupie pijącej dwie filiżanki stwierdzono znacznie wyższe stężenia BE. Stężenia BE w moczu osób pijących po dwie filiżanki mieściły się w zakresie od 308 ng/ml w 36 h do 3383 ng/ml w 8 h. BE osiągała najwyższe stężenia pomiędzy 2 a 8 h u osób w obu badanych grupach, po czym jej ilość malała z upływem czasu.

Podobnie jak w przypadku BE, maksymalne stężenia EME osiągnęte były między 2 a 8 h. Maksymalne stężenie EME w grupie osób pijących jedną filiżankę wynosiło 3751 ng/ml po 4 h i 7760 ng/ml u osób, które piły dwie filiżanki.

W celu normalizacji poszczególne stężenia BE i EME w moczu podzielono przez zawartość kreatyniny w każdej próbce moczu, a następnie przez 100, aby uzyskać równoważne jednostki objętości. Ryciny 2 i 3 obrazują stężenia BE znormalizowane do zawartości kreatyniny przez 36-godzinny okres eksperymentu u osób pijących odpowiednio jedną i dwie filiżanki herbaty z koki. Ryciny 4 i 5 przedstawiają stężenia EME znormalizowane do zawartości kreatyniny.

3.5. Zawartość COC i metabolitów we włosach

Krzywe kalibracyjne stosowane do obliczania stężenia COC i BE we włosach były liniowe w całym zakresie badanych stężeń i charakteryzowały się współczynnikami korelacji odpowiednio 0,99 i 0,93. Tabela V przedstawia dokładność i precyzję dla kontrolnych prób moczu i włosów. Tylko w przypadku jednego z sześciu ochotników uczestniczących w badaniu uzyskano stężenie COC powyżej zaproponowanego dla włosów progu 500 pg/mg w czternastym (1,2 ng/mg) i dwudziestym ósmym (2,4 ng/mg) dniu po przyjęciu herbaty, ale w żadnej z prób włosów nie wykazano BE. COC nie została wykryta w żadnej z pozostałych prób włosów pobranych podczas opisanych tu badań.

4. Dyskusja

Zawartość alkaloidów w herbacie *Delisse* była zgodna z wynikami opisanymi w literaturze przez Siegela [13] i Jenkins [10]. Zawartość COC w herbatach Horniman i Trimate (1,9 mg i 1,4 mg) była niższa niż w produktach innych marek. Niższa zawartość COC mogła zostać spowodowana nieokreśloną datą produkcji herbaty, obszarem geograficznym, gdzie liście były uprawiane lub warunkami, w których torebki z herbatą były przechowywane. Ponieważ pochodzenie i data produkcji torebek z herbatą nie były w pełni znane, określenie czynników, które spowodowały te rozbieżności, stanowi trudność.

Stężenia BE i EME wydalanych z moczem, jak i zawartość alkaloidów w herbacie, były zbliżone do opisanych w innych pracach poświęconych badaniom moczu po wypiciu herbaty z koki. Najwyższe stężenia w moczu macierzystej COC (15 ng/ml w grupie pijącej dwie filiżanki) i BE (1758 ng/ml w przypadku spożycia jednej filiżanki) oznaczone w przedstawionych tu badaniach były znacznie niższe niż stężenia w moczu wspomniane przez Jenkins i in. po wypiciu jednej filiżanki (587 ng/ml dla COC i 3940 ng/ml dla BE) [10]. W badaniach opisanych w niniejszej pracy w zerowych próbach moczu ochotników nr 3, 4, 5 i 6 (tabela III i IV) wykryto niskie stężenia NC. Wynik ten jest trudny do wyjaśnienia i wymaga dalszych badań. Jest jednak dobrze udokumentowane, że COC jest obecna w środowisku człowieka i jej metabolity można znaleźć w moczu nawet po przypadkowym kontakcie z zanieczyszczonymi banknotami dolarowymi [5]. Podwyższone stężenia NC obserwowano u osób z niedoborem cholinesterazy oraz używających alkoholu [8]. U osób, które trafiły do miejskiego oddziału ratunkowego z powodu przedawkowania COC, Williams i in. [16] oznaczyli COC w zakresie stężeń od 22 ng/ml do tak wysokiego, jak 40 µg/ml, BE od 100 ng/ml do 3,3 mg/ml, EME od 36 ng/ml do 661 µg/ml i NC od 35 ng/ml do 2250 ng/ml.

Wśród sześciu ochotników biorących udział w tym badaniu, tylko u jednego wykryto COC we włosach w czternastym (1,2 ng/mg) i dwudziestym ósmym (2,4 ng/mg) dniu po konsumpcji. W żadnej z prób włosów nie stwierdzono BE powyżej dolnej granicy oznaczalności metody wynoszącej 0,03 ng/mg i w związku z tym nie mogą one stanowić wyniku dodatniego. Proponowane zmiany do obowiązujących wytycznych federalnych programów antynarkotykowych, a dotyczących badania osób w miejscu pracy [3], ustanawiają progi wymagające potwierdzenia obecności COC w wysokości 0,5 ng/mg i BE – 50 pg/mg, zaś stosunek stężeń BE/COC powinien być większy lub równy 0,05. Stowarzyszenie Badań Włosów (The Society of Hair Testing) zaproponowało w wytycznych do badania narkotyków we włosach podobne progi wymagające potwierdzenia obecności nie tylko COC, ale także co najmniej jednego innego analitu

– BE, NC, EME lub CE [2]. Być może zmienność osobnicza podczas wbudowywania się COC i metabolitów do rosnących włosów spowodowała, że w badaniach tylko u jednej osoby wykazano COC, podczas gdy pozostałe wyniki były ujemne. Dodatkowo nie są znane nawyki higieniczne badanych, a w szczególności wspomnianej wyżej osoby. Zastosowana procedura mycia włosów nie doprowadziła do ujednoczenia materiału pochodzącego od ochotników biorących udział w badaniach przez usunięcie kokainy obecnej we włosach, ale pochodzącej ze źródeł innych niż herbata z koki. Możliwe jest również, że spożycie tylko jednej lub dwóch filiżanek herbaty z koki nie prowadzi do wystąpienia wystarczająco wysokiego stężenia COC i/lub metabolitów, które mogłyby być skutecznie wbudowane we włosy. Cairns i in. [1] wykazali w badaniach z udziałem użytkowników COC, że stężenia tego związku we włosach mieściły się w zakresie od 0,29 do 227 ng/mg. W 2008 roku Departament Zdrowia i Opieki Społecznej wydał poprawione obowiązkowe wytyczne dla federalnych programów dotyczących badania narkotyków u osób w miejscu pracy. Według tego dokumentu jedynym materiałem, który może być stosowany w tym celu, jest mocz. Wartość progowa dla BE w metodach przesiewowych została obniżona do 150 ng/ml, a dla potwierdzających do 100 ng/ml [4].

Ze względu na wyniki uzyskane w przedstawionych tu badaniach oraz w innych, związanych z herbatą z koki, osoby uczestniczące w programach testowania narkotyków muszą być świadome możliwości uzyskania pozytywnych wyników dla COC, które nie są wynikiem przyjęcia nielegalnej COC lub kraku. Podczas gdy liście koki są substancją kontrolowaną w Stanach Zjednoczonych, zakup pudełek herbaty z koki przez Internet lub ich przemyt podczas odprawy celnej nie stanowi problemu. Należy zachować więc ostrożność przy interpretacji pozytywnych wyników badań moczu lub włosów, a możliwość konsumpcji herbaty z koki powinna być także brana pod uwagę.