

DETERMINATION OF MORPHINE, CODEINE AND 6-MONOACETYL-MORPHINE IN HAIR OF ADDICTED PERSONS

Renata WIETECHA¹, Roman STANASZEK²

¹ *Faculty of Chemistry, Jagiellonian University, Cracow*

² *Institute of Forensic Research, Cracow*

ABSTRACT: In the last decades advances in analytical methods have enabled determination of drugs of abuse in alternative biological samples such as hair, sweat, saliva etc. One important feature of hair analysis is that it provides long-term information on an individual's drug use, in contrast to the short-term information provided by urinalysis. The analytical procedure of determination of opiates in hair which was previously developed in the Institute of Forensic Research was applied to the group of drugs of abuse mentioned in the title, in hair from patients who abused "Polish heroin" and were undergoing detoxification and methadone treatment. This was a preliminary study in this field.

KEY WORDS: Hair; Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS); Opiates; Methadone Treatment Programme.

Z Zagadnień Nauk Sądowych, z. XLIX, 2002, 38–50

Received 20 February 2002; accepted 7 March 2002

INTRODUCTION

Drug addiction has been increasing in Poland recently, as have efforts to prevent and counteract it. Laws have been changed and made more severe to help in the fight against this problem. The results of laboratory analysis are very often the basis for judicial rulings. Nowadays forensic laboratories are requested not only to identify seized illicit substances, but also to confirm drug use or abuse. Thus a need for developing new methods of detection and determination of drugs of abuse and their metabolites in alternative biological specimens such as hair, saliva, etc. [13] (as opposed to classical ones such as blood and urine) has arisen.

Hair is a useful diagnostic specimen thanks to the non-invasive way of collecting samples, their stability, and also because of the fact that hair analysis provides information on short and long-term history of addiction to or abstinence from psychoactive substances in an individual [2].

Hair testing plays an especially significant role in forensic toxicology. Very often a hair sample is the only specimen suitable or available for analysis: for example, in post-mortem examinations where corpses have been found a long time after death (victims of drowning, traffic accidents, aircraft catastrophes victims, exhumed corpses etc.) and are decomposed and it is not possible to collect body fluids samples for analysis [9].

Hair analysis can be used to study an individual's exposure to xenobiotics, for instance in children living amongst adults addicted to cocaine. Another example is analysis of the hair of newborn babies to check for prenatal exposure to drugs of abuse and medicaments taken by the mother during pregnancy. The results can explain an infant's addiction, withdrawal or defective development symptoms. Detection of drugs in hair is more and more frequently applied in clinical studies, e.g. monitoring drug therapy, checking abstinence in drug addiction treatments programmes [11] and epidemiological studies [8].

Another field of application for hair testing is civil cases such as divorces, child custody, adoption or insurance cases [7]. There is also a possibility of its use by institutions issuing driving licences or by employers before hiring staff [14]. Hair analysis can also be used to detect other organic substances – e.g. doping control in athletes or sports animals [5].

PURPOSE

The aim of this work was to apply analytical procedure of determination of opium alkaloids in hair, which was previously developed in the Institute of Forensic Research, to the determination of morphine, codeine, and 6-monoacetylmorphine in hair samples collected from patients treated in the Szczecin Centre for Detoxification and Drug Addiction Treatment [3], as well as to assess the usefulness of hair testing in practice.

MATERIALS AND METHODS

Standards

Standard compounds (morphine, codeine, 6-monoacetylmorphine) and their deuterium labelled internal standards (morphine-D₃, codeine-D₃, 6-monoacetylmorphine-D₃, 6-MAM-D₃) were purchased from Promochem (Radian).

Reagents

The following reagents, all of analytical grade, were used in the study: triethylamine (Merck), dichloromethane (Merck), acetonitrile (Gradient Grade for HPLC, Merck), pentafluoropropionic acid anhydrate – PFPA (Supelco), 75% 2,2,3,3,3-pentafluoro-1-propanol – PFPOH (Sigma – Aldrich), 2-propanol and acetone (Ośrodek Badawczo-Rozwojowy Przemysłu Rafineryjnego w Płocku), chloroform (Polskie Odczynniki Chemiczne), methanol (Eurochem BGD). Bond Elut Certify solid phase extraction columns with mixed mode sorbent (C8 and strong cation exchange resin – SCX), were purchased from Varian (USA).

Hair samples

Hair samples were collected from 36 addicted persons treated in the Szczecin Centre for Detoxification and Drug Addiction Treatment. Hair used to prepare blank and calibration samples was collected from children who had not been exposed to the studied drugs.

Instrumentation

A Varian gas chromatograph (GC 3400 series) coupled to a Finnigan Mat Magnum ion trap mass spectrometer (ITD) was used for determination of opium alkaloids in hair. Chromatographic separation was achieved on a Hewlett Packard HP-5MS Fused Silica Capillary Column (FSCC), length – 30 m, inner diameter – 0.25 mm, film thickness – 0.25 μm . Hair samples were pulverised in a Retsch KG ball mill. Solid phase extraction was done using Baker vacuum apparatus.

Hair sample preparation

Hair samples were cut as close as possible to the skin from the posterior vertex head region according to the guidelines of the Society of Hair Testing [12]. The site of cutting and top site of the strand were marked with a white thread. Detailed data concerning selected patients and their hair samples are presented in Table I.

Each sample was decontaminated by washing hair stands with the following solvents: 2-propanol, phosphate buffer (pH = 7.4) and dichloromethane. To perform segmental hair analysis (analysis of particular hair strand segments), previously air-dried samples were divided into 2 cm segments from the site of cutting to the end of the strand. Assuming average hair growth rate as 1 cm per month [9, 10] and knowing the date of sample collection, by analysing each segment of the hair, segmental hair analysis can provide information on abuse history (abstinence periods) in particular time periods up to the day of sampling.

TABLE I. DATA CONCERNING SELECTED PATIENTS AND THEIR HAIR SAMPLES

Number of patient	Date of sample collection	Hair strand length [cm]	Number of hair segments	Drugs abused	Treatment	Sex, age, hair colour
3	12.11.1999	21	9	Opiates, amphetamine, ephedrine	Detoxification	Male, 38, dark auburn
4	12.11.1999	42	16	Opiates	Detoxification	Female, 38, red (dyed)
28	3.01.2000	28	11	Opiates, amphetamine	Methadone programme	Female, 40, blond
30	3.01.2000	7	3	Opiates, Amphetamine, medicinal drugs	Methadone Programme	Male, 27, auburn
31	7.01.2000	38	13	Opiates	Detoxification, Methadone Programme	Male, 35, auburn
34	7.01.2000	6.5	3	Opiates, barbiturates	Detoxification	Male, 40, dark auburn

First hair samples were cut with scissors into about 1 mm long pieces and then pulverised in a ball mill. 50 mg of milled hair originating from each segment was weighed out and subjected to successive stages of analysis. For each series of determinations, standard hair samples were prepared in order to create a calibration curve. For this purpose, five 50 mg pulverised blank hair samples (hair not containing analytes) were weighed out. Then working solutions of morphine and codeine in methanol (1 µg/ml) and 6-MAM in acetonitrile (10 µg/ml) were added in amounts so that concentration of analytes in the standard hair samples ranged from 0 to 10 ng/mg. 10 µl of 10 µg/ml internal standard solution was added to each sample. The final concentration of internal standard in each sample was 2 ng/mg.

Hydrolysis and extraction

Hair samples spiked with standard substances were digested by acid hydrolysis. 1 ml of 0.1 M hydrochloric acid was added to each sample and then incubated for 16 hours at a temperature of 50°C. After hydrolysis, the aqueous phase was extracted with solid phase extraction using a Bond Elut Certify Column and extraction apparatus. First, incubated samples were cooled to room temperature and centrifuged at a speed of 4000 cycles/min for 2 min. Then, the acidic phase was separated from hair residue and transferred to appropriately marked 20 ml glass vials. Hair residues were then rinsed with 1 ml of phosphate buffer (pH = 7.4) and again centrifuged for 2 min at 4000 revolutions/min. The buffer phase was combined with the acid phase, and then 1 ml of phosphate buffer was added. Before applying supernatant

to the extraction columns, they were conditioned with 2 ml of methanol and 2 ml 0.0115 M of hydrochloric acid. After conditioning, the vacuum was turned off and phosphate buffer was applied onto the columns, allowing it to freely flow through the bed under gravitation. Next, to remove the interfering matrix from the samples, the columns were washed with 2 ml of 0.0115 M HCl, 2 ml of 0.012 M H_3PO_4 , 2 ml of 0.087 M CH_3COOH and 2 ml of 2-propanol. After this step, the columns were dried under vacuum for 30 min. Finally, analytes were eluted, without use of vacuum, with 2 ml of mixture of dichloromethane, isopropanol, and triethylamine (78:20:2, v/v/v) into 2 ml of silanised glass vials.

Derivatisation

Extracts were derivatised by incubation at 70°C for 30 min with 50 μl PFPA (pentafluoropropionic acid anhydrate) and 50 μl 75% PFPOH (2,2,3,3,3-penta-fluoro-1-propanol). The derivatising agent was evaporated under nitrogen. After evaporation the dried residue was dissolved in 50 μl of dried chloroform. The final samples were analysed by means of gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC/MS).

GC/MS analysis

Hair analysis was performed with a Varian series 3400 gas chromatograph coupled to a Finnigan Mat Magnum ion trap detector. The gas chromatograph was equipped with a split/splitless injector. The sample (2 μl) was injected in splitless mode (1 min). Chromatographic separation was achieved on a Hewlett Packard HP-5MS Fused Silica Capillary (length 30 m, inner diameter 0.25 mm, film thickness 0.25 μm). The flow of the carrier gas (helium 6.0) was 1.2 cm^3/min . The injector temperature was set to 260°C. The column temperature programme was made up of 3 stages: 130°C maintained for 1 min, then raised linearly by 20°C/min up to 275°C and maintained at 275°C for 4.5 min. The transfer line was maintained at 280°C and the ion trap was operated at a temperature of 220°C in positive electron impact ionisation mode (EI). The energy of the bombarding electron beam was 70 eV. The electron multiplier voltage was set to 1900 V. Ion trap was operated in a full scan mode (mass range 50 to 600 m/z).

RESULTS AND CONCLUSION

Figure 1 shows chromatographic separation of target compounds (range from 600 to 800 scans) in a standard hair sample containing 5 ng/mg of analytes and 2 ng/mg of internal standards. Identification of chromato-

graphic peaks corresponding to morphine-di-PFP, morphine-D₃-di-PFP, codeine-PFP, codeine-D₃-PFP, 6-MAM-PFP and 6-MAM-D₃-PFP was based on their retention times and comparison of the mass spectra of eluted compounds with reference mass spectra from the Magnum software library.

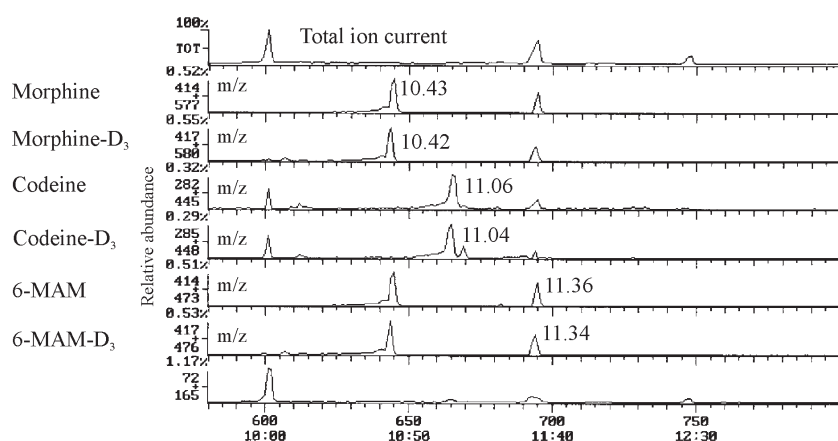


Fig. 1. Chromatographic separation of analytes (morphine-di-PFP, morphine-D₃-di-PFP, codeine-PFP, codeine-D₃-PFP, 6-MAM-PFP, 6-MAM-D₃-PFP) in a range from 600 to 800 scans – standard hair sample containing 5 ng/mg of analytes and 2 ng/mg of internal standards.

Quantitative analysis was based on calibration curves in a concentration range 0–10 ng/mg. Internal standards were deuterium labelled derivatives of analytes. The concentrations of xenobiotics in hair samples collected from 36 patients (12 detoxification and 24 methadone maintenance programme patients) were calculated using calibration data files created with Magnum Software. In 20 cases, the calculated concentrations were below the detection limits of the target substances (morphine – 0.3 ng/mg, codeine – 0.6 ng/mg, 6-monoacetylmorphine – 0.6 ng/mg), so the final results were recorded as negative and the concentration value was regarded as 0.0 ng/mg. The concentrations of the analytes in the remaining patients' hair samples were in the following ranges: morphine: 0.3–32.5 ng/mg, codeine 0.6–8.5 ng/mg, and 6-monoacetylmorphine 0.6–2.4 ng/mg. The concentration of the target xenobiotics found in hair of selected patients are shown in Figure 2.

The method of determination of opium alkaloids in hair allows ascertainment of opiates concentration in particular segments of hair strands corresponding to particular time periods. Contrarily to blood and urine analysis, which gives only gives short-term information on “presence” of xenobiotics (hours – days), hair testing enables determination of chronic drug use

(weeks – months), identification of the type of drug, and detection of the time period in which the drugs were taken.

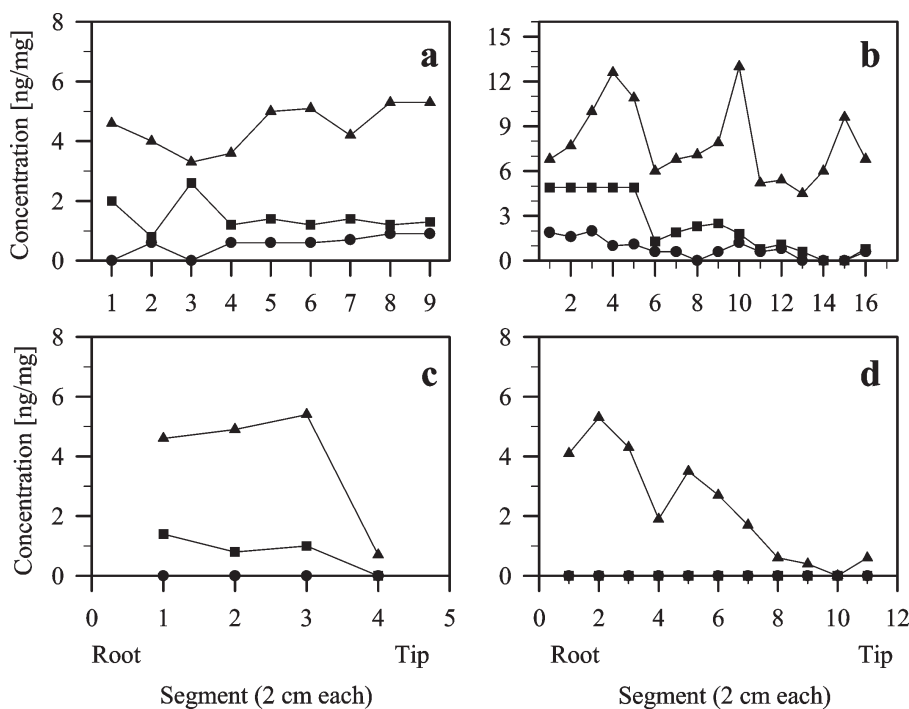


Fig. 2. Concentrations of xenobiotics (S1 – 6-MAM, S2 – codeine, S3 – morphine) in hair segments of: a) patient 3, b) patient 4, c) patient 8 and d) patient 28.

The concentrations of morphine, codeine and 6-monoacetylmorphine found in the hair of selected patients are presented in Figure 2; these indicate opiates use history (e.g. patient 3 – Figure 2a, patient 4 – Figure 2b, patient 8 – Figure 2c) or abstinence periods (patient 28 – segment 10 – Figure 2d).

The obtained results to a large degree reflect the clinical picture of the patients. For instance, they confirm information gained from interviews carried out with patients undergoing treatment, concerning the type of drugs of abuse used and the period of drug addiction. Moreover, hair analysis has enabled the monitoring of abstinence of patients in detoxification and methadone maintenance patients treated in the Szczecin Centre for Detoxification and Drug Addiction Treatment.

To draw more conclusions, hair analysis of a greater number of patients must be performed. This will enable determination of the average concentration of particular opiate compounds in lightly and strongly addicted persons using liquid “Polish heroin”, whose composition differs from solid her-

oin (brown sugar) found in western countries [1, 6]. Furthermore, it will facilitate adjudication in court cases in which addiction must be ascertained.

References:

1. Barnfield C., Burns S., Byron D. L. [et al.], The routine profiling of forensic heroin samples, *Forensic Science International* 1988, vol. 39, pp. 107–117.
2. Baumgartner W. A., Discussion of hair analysis for drugs of abuse, *Journal of Forensic Sciences* 1990, vol. 35, pp. 778–779.
3. Brewer C., Hair analysis as a tool for monitoring and managing patients on methadone maintenance, *Forensic Science International* 1993, vol. 63, pp. 277–283.
4. Chiarotti M., Strano-Rosii S., Offidani C. [et al.], Evaluation of cocaine use during pregnancy through toxicological analysis of hair, *Journal of Analytical Toxicology* 1996, vol. 20, pp. 555–558.
5. Gaillard Y., Vayssette F., Pepin G., Compared interest between hair analysis and urinalysis in doping controls. Results for amphetamines, corticosteroids and anabolic steroids in racing cyclists, *Forensic Science International* 2000, vol. 107, pp. 361–379.
6. Kała M., Lechowicz W., Stanaszek R., Kompot – the Polish source of opium alkaloids, *Problems of Forensic Sciences* 1998, vol. 37, pp. 45–54.
7. Lewis D., Moore C., Morrissey P. [et al.], Determination of drug exposure using hair: application to child protective cases, *Forensic Science International* 1997, vol. 84, pp. 123–128.
8. Ricossa M. C., Bernini M., de Ferrari F., Hair analysis for driving license in cocaine and heroin users. An epidemiological study, *Forensic Science International* 2000, vol. 107, pp. 301–308.
9. Sachs H., Forensic applications of hair analysis, [in:] Drug testing in hair, Kintz P. [ed.], CRC Press, Boca Raton 1996.
10. Sachs H., Theoretical limits of the evaluation of drug concentrations in hair due to irregular hair growth, *Forensic Science International* 1995, vol. 70, pp. 53–61.
11. Smerek J. J., Baumgartner W. A., Tollos J. A. [et al.], Hair analysis for detection of phencyclidine in newly admitted psychiatric patients, *American Journal of Psychiatry* 1985, vol. 142, pp. 950–959.
12. Society of Hair Testing, Statement of the Society of Hair Testing Concerning, the examination of drugs in human hair, *Forensic Science International* 1997, vol. 84, pp. 3–6.
13. Suzuki S., Inoune T., Hori H. [et al.], Analysis of methamphetamine in hair, nail, sweat, and saliva by mass fragmentography, *Journal of Analytical Toxicology* 1989, vol. 13, pp. 176–178.
14. Tagliaro F., de Battisi Z., Lubli G. [et al.], Integrated use of hair analysis to investigate the physical fitness to obtain the driving license: a casework study, *Forensic Science International* 1997, vol. 84, pp. 129–135.

OZNACZANIE MORFINY, KODEINY I 6-MONOACETYLOMORFINY WE WŁOSACH OSÓB UZALEŻNIONYCH

Renata WIETECZA, Roman STANASZEK

WPROWADZENIE

W ostatnich latach w Polsce problemy związane z narkomanią i jej zapobieganiem uległy nasileniu. Spowodowało to zmianę i zaostrzenie przepisów prawa regulującego zapobieganie narkomanii. Wielokrotnie podstawą do sądowego orzekania w tych sprawach są wyniki badań laboratoryjnych. Od laboratoriów sądowych wymaga się obecnie nie tylko identyfikacji skonfiskowanych narkotyków, ale potwierdzenia ich używania. Pojawiła się więc potrzeba opracowania procedur oznaczania narkotyków i ich metabolitów w nowych, alternatywnych w stosunku do klasycznych (krwi i moczu) materiałach biologicznych takich jak włosy, ślina i inne [13].

Włosy stanowią cenny materiał diagnostyczny ze względu na nieinwazyjność pobierania próbek, ich trwałość, a także fakt, że analiza włosów dostarcza informacji na temat bliskiej i dalszej historii uzależnienia lub abstynencji danej osoby od substancji psychoaktywnych [2].

Szczególne znaczenie analiza włosów odgrywa w toksykologii sądowej. Bardzo często zdarza się, że jedynym materiałem do badań toksykologicznych, nadającym się do nich lub w ogóle dostępnym, są włosy. Przykładem mogą być znalezione po długim czasie zwłoki (ofiary utonięć, wypadków drogowych, katastrof lotniczych, zwłoki po ekshumacji itp.), które są tak silnie rozłożone, że nie można z nich pobrać płynów ustrojowych [9].

Dzięki analizie włosów można przeprowadzić badania narażenia osób na działanie ksenobiotyków. Przykładem są badania dzieci, które żyją wśród dorosłych uzależnionych od kokainy, lub też analiza włosów noworodka w celu kontroli narażenia na narkotyki lub leki spowodowanego przyjmowaniem ich przez matkę w czasie ciąży. Dzięki tej analizie można wyjaśnić objawy uzależnienia, abstynencji lub niedorozwoju noworodka [4]. Coraz większe zastosowanie zdobywa analiza włosów w badaniach klinicznych, np. monitorowaniu terapii lekami, kontroli abstynencji w programach leczenia uzależnień [11] oraz badaniach epidemiologicznych [8].

Analiza włosów ma także zastosowanie w sądowych sprawach cywilnych, takich jak rozwody, przyznanie opieki nad dzieckiem, adopcje oraz ubezpieczenia [7]. Istnieje możliwość wykorzystania jej przez instytucje wydające prawo jazdy oraz przez pracodawców przed zatrudnieniem pracowników [14]. Poprzez możliwość oznaczania innych organicznych substancji, analizę włosów wykorzystuje się także do kontroli stosowania środków dopingujących u sportowców i zwierząt sportowych [5].

CEL PRACY

Przedmiotem niniejszej pracy było zastosowanie opracowanej w Instytucie Ekspertyz Sądowych procedury oznaczania alkaloidów opium we włosach do badania

pacjentów leczonych w Oddziale Detoksykacji Przychodni dla Osób Uzależnionych od Środków Psychoaktywnych Centrum Psychiatrycznego Publicznego Psychiatrycznego Zakładu Opieki Zdrowotnej w Szczecinie oraz uczestników programu metadonowego [3] na obecność alkaloidów opium (morfiny, kodeiny i 6-monoacetylmorfiny – 6-MAM) oraz ocena jej przydatności w praktyce.

MATERIAŁY I METODY

Substancje wzorcowe

Substancje wzorcowe (morfina, kodeina i 6-monoacetylmorfina) oraz ich deuterowe pochodne używane jako standardy wewnętrzne (morfina-D₃, kodeina-D₃, 6-monoacetylo-morfina-D₃ – 6-MAM-D₃) zostały zakupione w firmie Promochem (Radian).

Odczynniki

W badaniach wykorzystano następujące odczynniki: trietyloamina (cz.d.a., Merck), dichlorometan (cz.d.a., Merck), acetonitryl (Gradient Grade for HPLC, Merck), bezwodnik kwasu pentafluoropropionowego – PFPA (Supelco), 75% 2,2,3,3,3-pentafluoro-1-propanol – PFPOH (Sigma – Aldrich), 2-propanol (cz.d.a) oraz aceton (cz.d.a, Ośrodek Badawczo-Rozwojowy Przemysłu Rafineryjnego w Płocku), chloroform (cz.d.a., Polskie Odczynniki Chemiczne), metanol (cz.d.a., Eurochem BGD). Kolumny ekstrakcyjne Bound Elut Certify, których złożę składało się z mieszaniny sorbenta C₈ i silnego wymiennicza kationowego (SCX), nabyto w firmie Varian.

Materiał do badań

Materiał do badań stanowiły próbki włosów pobrane od 36 uzależnionych pacjentów leczonych w Oddziale Detoksykacji Przychodni dla Osób Uzależnionych od Środków Psychoaktywnych Centrum Psychiatrycznego Samodzielnego Publicznego Psychiatrycznego Zakładu Opieki Zdrowotnej w Szczecinie oraz uczestników programu metadonowego. Próbki włosów używane do przygotowania ślepej próby oraz próbek kalibracyjnych były pobrane od dzieci nie narażonych na działanie badanych związków.

Sprzęt i aparatura

Do oznaczania alkaloidów opium we włosach zastosowano chromatograf gazowy (GC) serii 3400 firmy Varian sprzężony ze spektrometrem mas (MS) wersji Magnum firmy Finnigan Mat typu pułapka jonowa (ITD). Rozdział chromatograficzny składników próbki prowadzono na kolumnie kapilarnej FSCC (Fused Silica Capillary Column, HP-5MS, długość – 30 m, średnica wewnętrzna – 0,25 mm, grubość filmu – 0,25 μm). Próbki włosów mielono w młynie kulowym firmy Retsch KG. Ekstrakcję na fazie stałej wykonywano przy użyciu aparatu podciśnieniowego firmy Baker.

Przygotowanie próbek włosów do analizy

Próbki włosów zostały ucięte przy skórze w potylicznej części głowy według zaleceń Towarzystwa Badania Włosów [12]. Miejsce cięcia i końcówkę kosmyka oznaczono białą bawełnianą nitką. Szczegółowe dane dotyczące wybranych pacjentów i pobranych od nich próbek zamieszczono w tabeli I.

Każda próbka została poddana procesowi dekontaminacji, który obejmował mycie włosów przy użyciu sekwencji rozpuszczalników: 2-propanolu, buforu fosforanowego (pH = 7,4) oraz dichlorometanu. W celu przeprowadzenia analizy segmentowej (analizy poszczególnych odcinków włosów), wcześniej wysuszone próbki włosów poddano podziałowi na dwucentymetrowe segmenty, zaczynając od miejsca ucięcia włosów, aż do końca kosmyka. Znając datę pobrania próbki oraz średnią szybkość wzrostu włosów (ok. 1 cm/miesiąc [9, 10]) i analizując kolejne sekwencje włosów, można uzyskać informacje na temat historii używania (lub czasu abstynencji) danego związku chemicznego w poszczególnych odcinkach czasu od momentu pobrania próbki.

W celu wstępnego rozdrobnienia próbki włosów, pocięto je nożyczkami na części o długości ok. 1 mm, a następnie zmielono w młynku kulowym. Do analizy odważano po 50 mg zmielonych włosów pochodzących z każdego segmentu i poddano kolejnym etapom analizy. Dla każdej serii oznaczeń przygotowano próbki wzorcowe służące do sporządzenia krzywej kalibracyjnej. W tym celu odważono pięć 50 miligramowych zmielonych próbek „ślepych” (włosów nie zawierających analitów). Następnie dodawano do nich takie objętości roztworów roboczych morfiny i kodeiny w metanolu oraz 6-MAM w acetonitrylu o stężeniu 1 oraz 10 µg/ml, by stężenia analitów w próbkach wzorcowych wynosiły od 0 do 10 ng/mg. Ponadto do każdej analizowanej próbki dodano po 10 µl roztworów wzorców wewnętrznych o stężeniu 10 µg/ml. Ostateczne stężenie standardu wewnętrznego w każdej próbce wynosiło 2 ng/mg.

Hydroliza i ekstrakcja

Próbki włosów wraz z dodanymi substancjami wzorcowymi poddawano kwaśnemu roztwarzaniu hydrolitycznemu. Do każdej próbki dodawano po 1 ml 0,1 M kwasu solnego i inkubowano przez 16 godzin w temperaturze 50°C. Po zakończonej hydrolizie fazę wodną ekstrahowano na fazie stałej przy użyciu kolumn Bond Elut Certify oraz aparatu do ekstrakcji. W pierwszej kolejności próbki po hydrolizie doprowadzono do temperatury pokojowej, po czym odwirowywano przez 2 min przy prędkości 4000 obr./min. Następnie oddzielano fazę kwaśną od próbek włosów i przenoszono do odpowiednio opisanych szklanych fiolek o pojemności 20 ml. Próbki następnie przemywano 1 ml buforu fosforanowego (pH = 7,4) i ponownie odwirowywano przez 2 min przy 4000 obr./min. Fazę buforową dołączano do fazy kwaśnej. Następnie do połączonych faz dodawano 1 ml buforu fosforanowego. Przed naniesieniem supernatantu na kolumny ekstrakcyjne poddawano je kondycjonowaniu 2 ml metanolu oraz 2 ml 0,0115 M kwasu solnego. Po etapie kondycjonowania złoża wyłączano podciśnienie i naniesiono fazę buforową na kolumny, pozwalając jej swobodnie przepłynąć przez wypełnienie kolumn ekstrakcyjnych pod wpływem sił grawitacji. W dalszej kolejności kolumny poddawano myciu za pomocą 2 ml 0,0115 M HCl, 2 ml 0,012 M H₃PO₄, 2 ml 0,087 M CH₃COOH oraz 2 ml 2-propanolu w celu usunięcia interferującej matrycy znajdującej się w ekstrahowanym roztworze. Po wymyciu kolumny osuszano

pod pełnym podciśnieniem przez 30 min. Analizowane substancje eluowano bez użycia podciśnienia 2 ml mieszaniny dichlorometanu, izopropanolu trietyloaminy w stosunku i objętościowym 78:20:2 do oznaczonych, szklanych, wcześniej silanizowanych fiolek o pojemności 2 ml.

Derywatywacja

Ekstrakty poddawano derywatywacji przez dodanie 50 μ l PFPA (bezwodnika kwasu pentafluoropropionowego) oraz 50 μ l 75% PFPOH (2,2,3,3,3-penta-fluoro-1-propanolu) oraz inkubowaniu przez 30 min w temperaturze 70°C. Następnie odparowywano odczynnik derywatyzujący w strumieniu azotu. Po odparowaniu suchą pozostałość rozpuszczano w 50 μ l wcześniej osuszonego chloroformu. Tak przygotowane próbki poddawano analizie metodą chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC/MS).

Warunki analizy GC/MS

Analizę przeprowadzano, stosując chromatograf gazowy (Varian, model 3400) sprzężony ze spektrometrem masowym (pułapka jonowa wersji Magnum) firmy Finnigan Mat. Chromatograf gazowy wyposażony był w dzielnik strumienia gazu nośnego. Nastrzyku próbki (2 μ l) dokonywano przy odpowiedniej konfiguracji dozownika, przy której próbka nie jest dzielona (1 min). Rozdział składników próbki następował na kolumnie kapilarnej HP-5MS o długości 30 m, średnicy wewnętrznej 0,25 mm i grubości filmu 0,25 μ m). Gazem nośnym był hel, którego przepływ przez kolumnę wynosił 1,2 cm³/min. Temperatura injektora wynosiła 260°C. Program temperaturowy kolumny chromatograficznej składał się z 3 etapów: początkowo kolumna była utrzymywana w temperaturze 130°C przez 1 min, następnie temperatura wzrastała liniowo z szybkością 20°C/min do 275°C i przez 4,5 minuty nie zmieniała swojej wartości. Linia transferowa była utrzymywana w temperaturze 280°C, a pułapka jonowa pracowała w temperaturze 220°C. Jonizacja następowała w wyniku bombardowania strumieniem elektronów (EI) o energii 70 eV. Powielacz jonowy pracował pod napięciem 1900 V. Zakres skanowania pułapki jonowej wynosił od 50 do 600 m/z.

WYNIKI I WNIOSKI

Na rycinie 1 przedstawiono chromatogram obrazujący rozdział chromatograficzny badanych związków w zakresie od 600 do 800 liczby skanów na przykładzie próbki wzorcowej o stężeniu analitów 5 ng/mg i standartów wewnętrznych o stężeniu 2 ng/mg. Identyfikacji pików chromatograficznych morfiny-di-PFP, morfiny-D₃-di-PFP, kodeiny-PFP, kodeiny-D₃-PFP, 6-MAM-PFP oraz 6-MAM-D₃-PFP dokonano na podstawie czasów retencji oraz na drodze porównania widm masowych eluowanych związków z widmami masowymi substancji wzorcowych znajdującymi się w bibliotece widm, wchodzącej w skład oprogramowania Magnum.

Analizę ilościową przeprowadzono w oparciu o krzywe kalibracyjne w zakresie stężeń 0–10 ng/mg. Standard wewnętrzny stanowiły deuterowane pochodne analitów. Na podstawie utworzonych zbiorów danych kalibracyjnych z wykorzystaniem oprogramowania aparatu obliczono zawartość poszczególnych ksenobiotyków w ba-

danych próbkach włosów 36 pacjentów, w tym 12 pacjentów poddanych detoksykacji i 24 pacjentów objętych programem metadonowym. W przypadku 20 pacjentów otrzymane wyniki mieściły się poniżej granicy wykrywalności analizowanych ksenobiotyków (morfina – 0,3 ng/mg, kodeina – 0,6 ng/mg, 6-monoacetylmorfina – 0,6 ng/mg) i w tych przypadkach przyjęto, iż wynik jest „ujemny” i jego wartość wynosi 0,0 ng/mg. We włosach pozostałych pacjentów stężenie morfiny mieściło się w przedziale 0,3–32,5 ng/mg, kodeiny 0,6–8,5 ng/mg, a 6-monoacetylmorfiny 0,6–2,4 ng/mg. Zawartość określonych ksenobiotyków dla wybranych pacjentów zamieszczono na rycinie 2.

Wykorzystując metodę oznaczania alkaloidów opium we włosach, można określić stężenie opiatów w poszczególnych segmentach włosów, które odpowiadają kolejnym przedziałom czasu. Dzięki temu istnieje możliwość stwierdzenia chronicznego używania określonych narkotyków, ich rodzaju oraz okresu przyjmowania w przeciwieństwie do tych metod, w których jako materiał biologiczny stosuje się krew i mocz. W tych przypadkach otrzymujemy wynik określający tylko „obecność” (okres od kilku godzin do paru dni) zawartość ksenobiotyków w organizmie.

Zamieszczone na rycinie 2 wyniki stężeń morfiny, kodeiny oraz 6-monoacetylmorfiny wyznaczonych dla poszczególnych pacjentów przedstawiają historię przyjmowania (np. pacjent nr 3 – ryc. 2a, pacjent nr 4 – ryc. 2b, pacjent nr 8 – ryc. 2c) lub okresy abstynencji (np. pacjentka nr 28 – segment 10 – rycina 2d) środków odurzających z grupy alkaloidów opium.

Uzyskane wyniki w dużym stopniu odzwierciedlają obraz kliniczny pacjenta, m.in. potwierdzają informacje pochodzące z wywiadu przeprowadzonego z leczonymi pacjentami, a dotyczące rodzaju stosowanych substancji odurzających, tj. „komputu” – „polskiej heroiny” oraz okresu uzależnienia. Ponadto umożliwiają monitorowanie abstynencji pacjentów poddanych detoksykacji i objętych programem metadonowym w Oddziale Detoksykacji Przychodni dla Osób Uzależnionych od Środków Psychoaktywnych Centrum Psychiatrycznego Publicznego Psychiatrycznego Zakładu Opieki Zdrowotnej w Szczecinie.

W celu sformułowania dalszych wniosków, konieczne jest przebadanie większej liczby pacjentów. Pozwoli to także określić średnie stężenia poszczególnych związków u średnio i silnie uzależnionych osób przyjmujących tzw. „polską heroinę”, której skład różni się od stałej heroiny, tzw. brown sugar, spotykanej w krajach zachodnich [1, 6] oraz ułatwi orzekanie w sprawach sądowych, w których istnieje konieczność stwierdzenia uzależnienia.