

# THE USE OF ALTERNATIVE MATERIALS IN A TOXICOLOGICAL EXPERT ANALYSIS BY THE LC/APCI/MS METHOD FOR THE EVALUATION OF A COMPLEX LETHAL POISONING WITH MEDICINES: CLOMIPRAMINE, TIANEPTINE AND HYDROXYZINE

Małgorzata KŁYS, Sebastian ROJEK, Artur MOSKAŁA

*Chair and Department of Forensic Medicine, Collegium Medicum,  
Jagellonian University, Cracow*

**ABSTRACT:** In the current work the authors present the case of a suicidal poisoning of a 21-year-old woman A. B. with clomipramine, tianeptine and hydroxyzine. The toxicological expert study executed with the HPLC/APCI/MS method, besides standard materials used in classic toxicological expert studies such as blood, urine, the liver or the kidney, also encompassed alternative materials, such as body fluids, vitreous humour, labyrinthine fluid, the cerebrospinal fluid and hair. Analysis showed the presence of medicines in the classical *post-mortem* material in concentrations explaining the deadly poisoning with clomipramine, tianeptine and hydroxyzine. Analysis of the content of these medicines and of their metabolites enabled us to reveal differences in terms of presence of metabolites in particular materials. The presence of medicines in 12 cm long segments of hair confirmed the fact known from an interview that A. B. was treated for depression during the last year with the medicines revealed in the course of the expert analysis, which she finally took in a toxic dose with suicidal intention.

**KEY WORDS:** Clomipramine; Tianeptine; Alternative materials; Hair; Toxicological analysis.

*Problems of Forensic Sciences, vol. LV, 2003, 76–99*

*Received 14 November 2003; accepted 2 December 2003*

## INTRODUCTION

In regard to social and cultural conditions of the present world, increasing numbers of people suffer from depression, and so the popularity of anti-depressive medicines is increasing. In parallel with the increase in demand for these medicines in recent years one observes, as current statistics show, a constantly increasing number of poisonings due to the use of psychoactive substances, especially tri-cycle anti-depressive medicines [5, 6, 7]. Lethal poisonings with the suicidal intent often concern persons with depression, treated for longer time with medicines, which are finally taken in a le-

thal dose leading to death [3]. Toxicological analysis aiming at detection, identification and quantitative determination of xenobiotics in blood and parenchymous organs obtained during the autopsy concerns the moment of the decease, forming the basis for expert statements regarding its cause.

The observation of directions of the development of the toxicology points on the interest with other kinds of the biological material used to the expertise, such as vitreous humour, the cerebrospinal liquid or the labyrinthine liquid. The possibility of determination of xenobiotics in hair due to sensitive and selective analytical methods, such as mass spectrometry in connection with liquid chromatography (LC/MS) whether gas (GC/MS), permits to evaluate the history of taking of the medicines ante mortem that causes perceiving a case in the wider medical and forensic aspect [2, 4, 9, 11, 14].

The aim of the current work is an attempt to present the history of taking of anti-depressive medicines, settled on the ground of analyses of hair in the collation with toxicological research of body fluids and of tissues. The illustration of the undertaken problem is the case of a suicidal decease of 21-year-old women A. B., after taking a mixture of medicines: clomipramine, tianeptine and hydroxyzine.

#### CASE REPORT

The body of 21-year-old A. B. was found in the orchard by the house, being her residence. Near the body dummy packs after medicines: Coaxil, Anafranil SR, Hydroxyzinum, Aspirin and Panadol as well as empty bottles after alcohol were also found. From the interview an information was obtained that A. B. was being given medical attendance on account of depression from several years, and one and a half of the year ante mortem she undertook an unsuccessful suicidal attempt, taking medicines.

The autopsy of the deceased was executed in the Department of Forensic Medicine, Collegium Medicum, Jagiellonian University, Cracow. The result of the autopsy of the deceased excluded changes of traumatic character and originating from any sickness. In the stomach about 100 ml of the liquid content with whitish softened small parts, some of the shape of tablets, were established.

In the histopathologic examination the congestion and beginning the pneumoedema, the scattered droplets-like steatosis of the liver, whereas the myocardium, the kidney and the brain possessed the unamended structure were ascertained.

During the autopsy there were collected body fluids, segments of internal organs and hair in order to perform a chemical and toxicological research for the presence of alcohol, medicines and drugs.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

Reagents: acetonitrile, isopropanol, methanol, chloroform and ethyl acetate and the deposit SPE C18 was bought from Merck (Darmstadt, Germany), the matter for buffer TRIS and ammonium carbonate from Serva (Heidelberg, Germany), trifluoroacetic acid from Fluka (Buchs, Switzerland).

The standard sample of tianeptine was obtained by diisopropyl ether extraction from aqueous suspension of medicine Coaxil (Sever, France) and the standard samples of prazepam, clomipramine, norclomipramine, hydroxyzine and cetyrizine originated from SIGMA (USA). Stock solutions of the concentration of 1 mg/ml were prepared in methanol. There were examined body fluids (the venous blood, urine, vitreous humour, the cerebrospinal liquid, the labyrinthine liquid), segments of the internal organs (the liver and the kidney) and hair of 12 cm in length.

The comparative materials were samples of blood, urine, the liver, the kidney and hair received from bodies of persons that were not poisoned, examined *post-mortem* in the Department.

### Methods

#### *The pre-analysis*

Samples of blood and urine of the deceased were subjected examinations for the presence of ethyl alcohol with the method of gas chromatography (GC). They showed ethanol in concentrations 0.7‰ in blood and 1.1‰ in urine.

An initial research was executed for urine of the deceased with the use of the diagnostic test Tox/See, Multi-Drug Screen Panel (Bio-Rad, France), which showed the presence of a medicine from the group tri-cycle of anti-depressive medicines.

#### *Identification*

There were taken 5 ml portions of blood and urine, and then both were added 5 ml portions of buffer TRIS of pH = 9.0. The blood sample was additionally processed with ultrasounds and depeptisation with the use of 7.5 ml of acetonitrile. After centrifuging of samples the supernatant was collected and an extraction was performed by shaking it with 30 ml of ethyl acetate. After renewed centrifuging of samples the organic solvent was collected and exuded with a separator Whatman 1PS (Maidstone, Great Britain). The evaporation was performed in the stream of nitrogen. Dry remains were dissolved in 100 µl of methanol.

The identification research was performed with the use of HPLC/APCI-MS method in a screening system. In the course of the examinations of blood and urine of the deceased there was established the presence of clomipramine, norclomipramine, tianeptine, nortianeptine, tianeptine MC5, tianeptine MC3, hydroxyzine and its two metabolites – norhydroxyzine and cetyrizine.

### ***The quantitative analysis***

The estimation of the concentration of the revealed during the identification research xenobiotics was performed with HPLC-APCI/MS method basing on the experimental calibration curves determined for clomipramine and norclomipramine, tianeptine (MC5 was evaluated in relation to tianeptine) and for hydroxyzine. The subject of the investigations were samples of blood, urine, the liver and the kidney and alternative materials – the cerebrospinal liquid, vitreous humour, the labyrinthine liquid and hair. There were collected 2 ml samples of blood, urine, vitreous humour, the liquid cerebrospinal, 0.4 ml of the liquid of labyrinthine (supplementing the sample with a comparative urine to the volume of 2 ml) and for 2 g samples of homogenates of the tissue of the kidney and the liver; then each of them was added 40  $\mu$ l of  $\beta$ -glucuronidase with arylsulphataze.

The samples were enriched with the addition of prazepam (being the internal standard) in the concentration of 1 mg/l. 24-hour process of the enzymatic hydrolysis at temperature of 37°C was performed; at the end of the process the samples were made to reveal pH = 9.0, adding to them 0.4 ml of 0.1 M NaOH and 2 ml of buffer TRIS.

The inspection of pH was carried out using indicator papers. After centrifuging the supernatant was collected and subjected to an extraction by shaking with 12 ml of chloroform and isopropanol 3:1 v/v. After centrifuging the sample was exuded with a Whatman separator and then evaporated in a stream of nitrogen.

In the same manner the comparative material was processed; 2 ml samples of body fluids were enriched with the addition of clomipramine, norclomipramine, tianeptine and hydroxyzine in concentrations 0, 0.25, 1.0 and 5.0  $\mu$ g/ml, respectively and 2 g samples of the homogenates of tissue of the liver and the kidney in concentrations 0, 0.25, 1.0, 5.0 and 50.0  $\mu$ g/g as well as prazepam in the concentration of 1.0  $\mu$ g/ml or 1  $\mu$ g/g.

Also an extraction of hair in the solid phase (SPE) was carried out. 12 cm section of hair was divided in 4 segments of the length of 3 cm.

The process of decontamination of the hair was performed by shaking in water, and then after drainage in isopropanol. Samples of hair were milled in ball mill (Retsch 200 MM), then 50 mg samples of powdered hair were

weighed and placed in glass containers. The acidic hydrolysis process was effected using 0.1 M HCl within 24 hours.

It proceeded at temperature of 57°C and at the end of it the samples were neutralised with 1M NaOH and added 2 ml of the carbonate-ammonium buffer of pH = 9.3. The supernatant collected after centrifuging was carried in on the activated deposit C18-end (Merck, Germany) of small columns.

The analogous procedure was carried out for the comparative material. Portions of 50 mg of powdered "blind" hair enriched with the addition of clomipramine, norclomipramine, tianeptine and hydroxyzine in concentrations 0.5, 1.0 and 2.0 ng/mg ( $\mu\text{g/g}$ ), respectively and prazepam in the concentration of 1.0 ng/mg ( $\mu\text{g/g}$ ). Calibration curves were obtained, on the ground of which suitable calculations were executed.

### *The analytical method*

A liquid chromatograph Finnigan OF MATS (San Jose, United States) equipped with a TSP P 4000 pump in the option of the gradient of the flow of the phase and in an auto-sampler TSP 3000 ACE with a magnifying glass of the volume of injection 10  $\mu\text{l}$ . The separation realised in a column Purospher RP 18, 125-3 mm I.D., the size of grains 5  $\mu\text{m}$ , with precolumn Lichrocard 4.4 mm I.D. filled with the deposit Lichrospher 60, of the size of grains 5  $\mu\text{m}$  (Merck, Darmstadt, Germany). The liquid phase: phase A – 1% trifluoroacetic acid (TFA) in water and phase B – 90% of acetonitrile + 10% of phase A. The flow of the phase 0.4 ml/min was programmed as follows: 5% of A and 95% of B for 2 minutes incrementally to 70% of A and 30% of B for 30 minutes, after that for 2 minutes decrescently to 95 % of A and 5% of B for 8 minutes. The detection: a mass spectrometer LCQ with an ionic trap (Finnigan OF MATS, San Jose, United States) equipped with the source of chemical ionisation under the air-pressure (APCI). Working conditions of APCI: carrying ionising gas (nitrogen) 60 psi and subsidiary feeding gas (helium) 10 psi, the temperature of the source of ions 425°C, a capillary heated up to the temperature of 150°C, current of the crown 5  $\mu\text{A}$ . Mass spectra of the analysed xenobiotics were situated in the range of scanning among 50–650  $m/z$  in the option of the positive ionisation at the tension of capillary 4.0 V. Screening of spectra (SIM), taking into account retention times and masses of the analysed substances.

## RESULTS

In the course of the overall toxicological expertise the following xenobiotics were determined: clomipramine and norclomipramine, tianeptine and its three metabolites: nortianeptine, tianeptine MC5 and MC3 and

hydroxyzine and its two metabolites: norhydroxyzine and cetyryzine. It remains in agreement with the fact of revealing wrappings of these medicines by the deceased.

The determined in the course of the expertise metabolites of medicines are consistent with theoretical schemes of metabolic tracks [10] which are presented in Figures 1a, 1b and 1c.

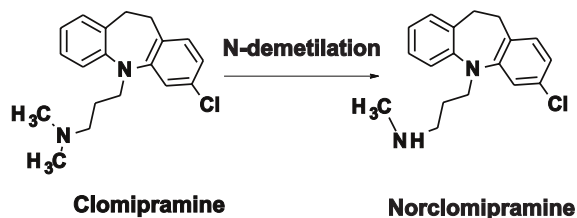


Fig. 1a. The metabolism of clomipramine.

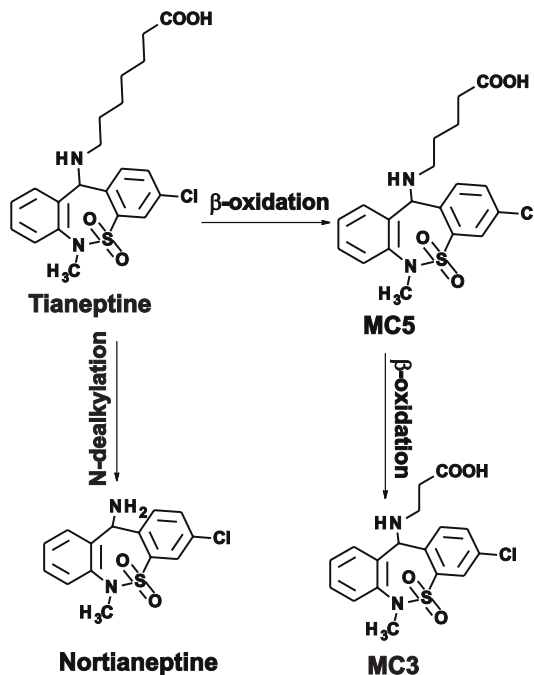


Fig. 1b. The metabolism of tianeptine.

Tables I and II, in which results of toxicological research representing the concentrations of clomipramine, tianeptine and hydroxyzine were listed, explain the deadly poisoning. In the liver and the kidney significantly higher concentrations of xenobiotics than in the remaining material were revealed.

Well visible are differences in the presence of metabolites in classic and alternative material. The metabolites of tianeptine (nortianeptine and

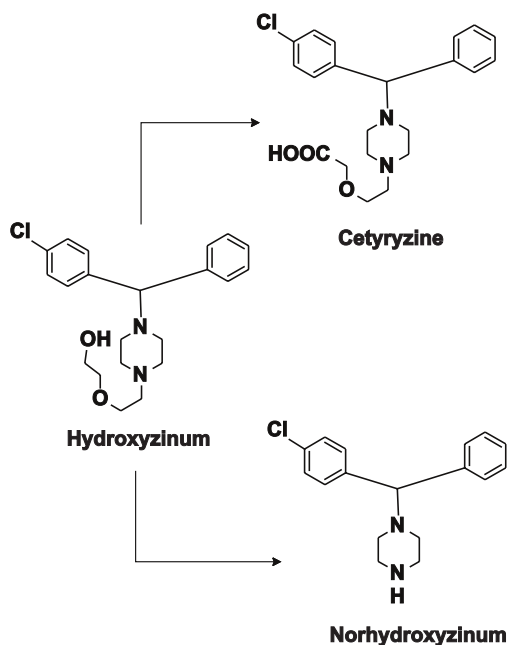


Fig. 1c. The metabolism of hydroxyzine.

MC3) and hydroxyzine (norhydroxyzine and cetyryzine) in extracts of the alternative materials, i.e. in vitreous humour, cerebrospinal and labyrinthine fluids were not present.

TABLE I. RESULTS OF TOXICOLOGICAL EXAMINATIONS OF CLASSIC *POST-MORTEM* MATERIAL OBTAINED FROM THE BODY OF A. B.

Xenobiotic	Concentration [ $\mu\text{g/g}$ ]		
	Blood	Liver	Kidney
Clomipramine	1.64	164.96	72.60
Norclomipramine	0.23; 7.1*	7.56; 21.7*	2.83; 25.7*
Tianeptine	8.35	115.56	107.49
Nortianeptine	+	+	+
Tianeptine MC5	2.53; 3.3*	38.49; 3.0*	78.03; 1.4*
Tianeptine MC3	+	+	+
Hydroxyzine	0.66	13.23	14.49
Norhydroxyzine	+	+	+
Cetyryzine	0.07	1.83	1.05

\* The relative concentration of the precursor of the medicine to the metabolite.

TABLE II. RESULTS OF TOXICOLOGICAL EXAMINATION OF BODY FLUIDS (ALTERNATIVE MATERIAL) OBTAINED FROM THE BODY OF A. B.

Xenobiotic	Concentration [ $\mu\text{g/g}$ ]		
	Cerebrospinal fluid	Vitreous humour	Labyrinthine fluid
Clomipramine	1.12	0.39	0.24
Norclomipramine	0.14; 8.0*	0.06; 6.5*	—
Tianeptine	0.56	0.70	1.62
Nortianeptine	—	—	—
Tianeptine MC5	0.24; 2.3*	0.33; 2.1*	1.09; 1.5*
Tianeptine MC3	—	—	—
Hydroxyzine	0.20	0.09	0.43
Norhydroxyzine	—	—	—
Cetyryzine	—	—	—

\* The relative concentration of the precursor of the medicine to the metabolite.

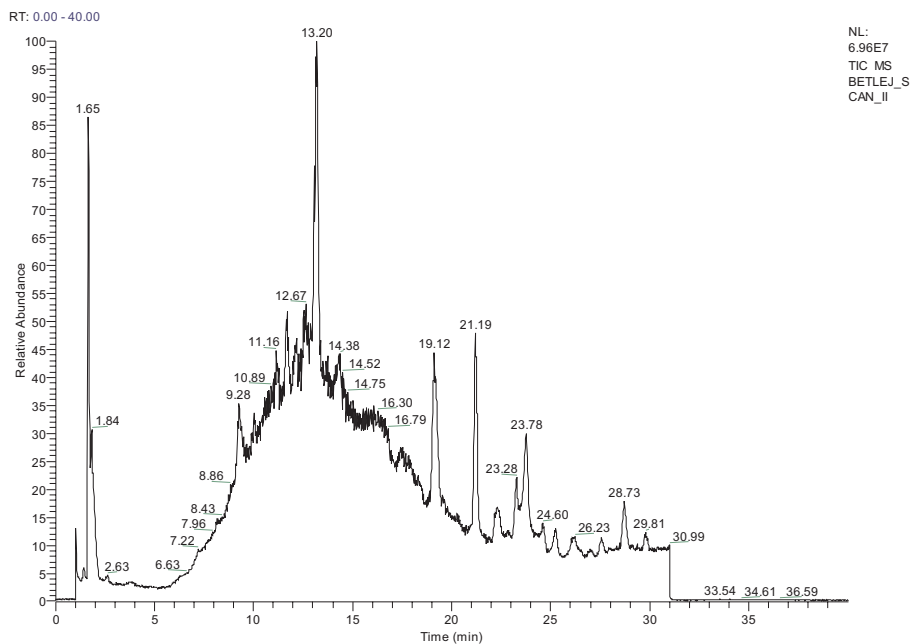


Fig. 2a. Chromatogram (the entire ionic current) of the extract of hair of A. B.



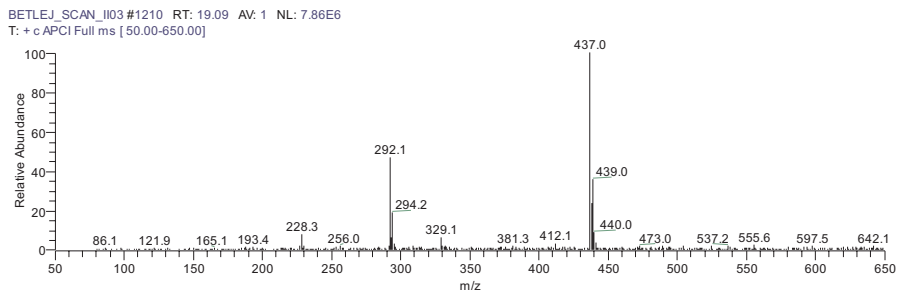
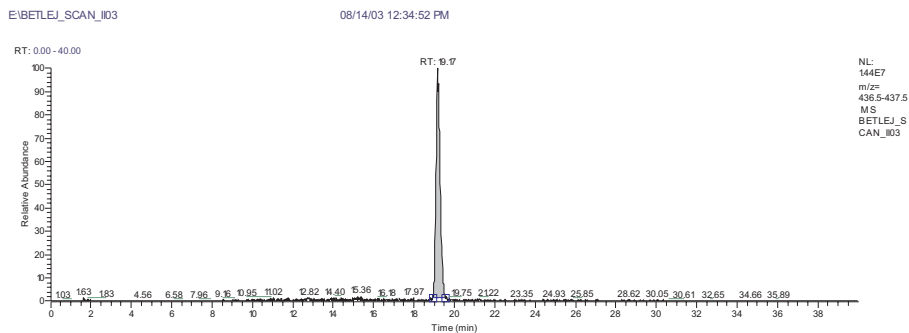


Fig. 2b. Chromatogram and mass spectrum of tianeptine in hair of A. B.

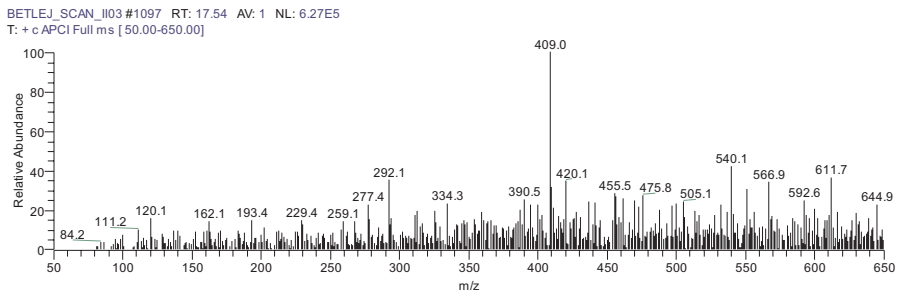
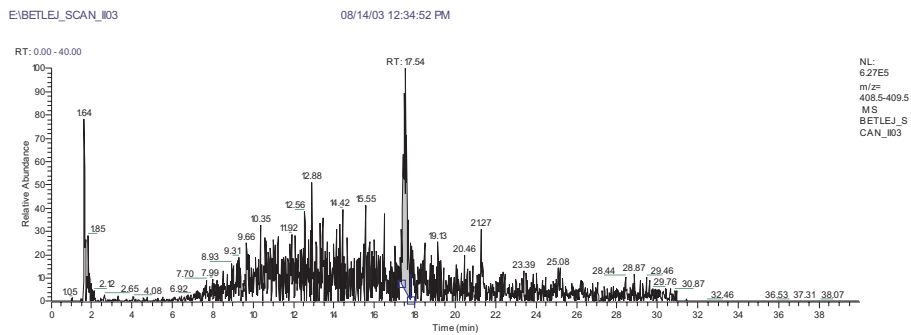


Fig. 2c. Chromatogram and mass spectrum of metabolite of tianeptine – MC5 in hair.

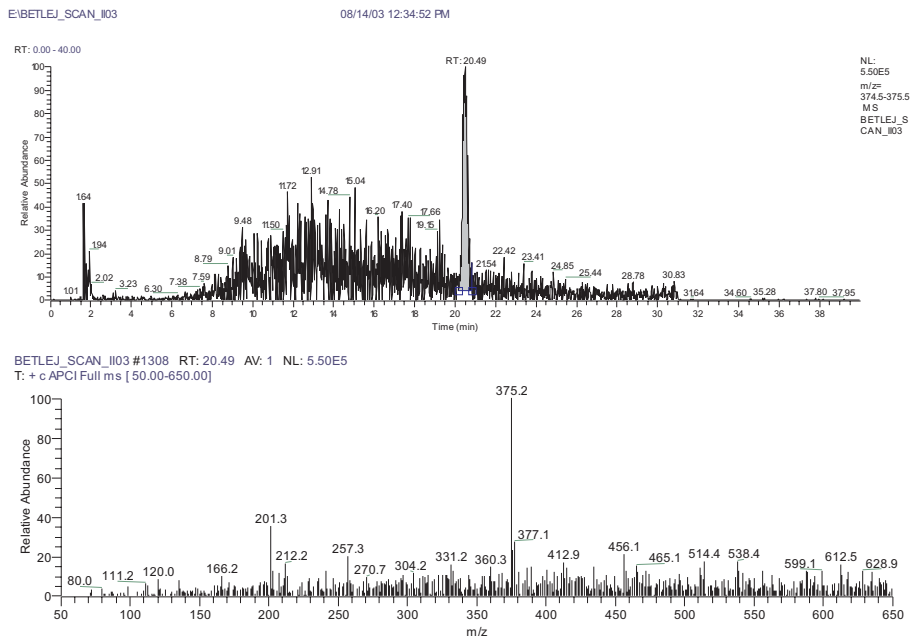


Fig. 2d. Chromatogram and mass spectrum of hydroxyzine in hair.

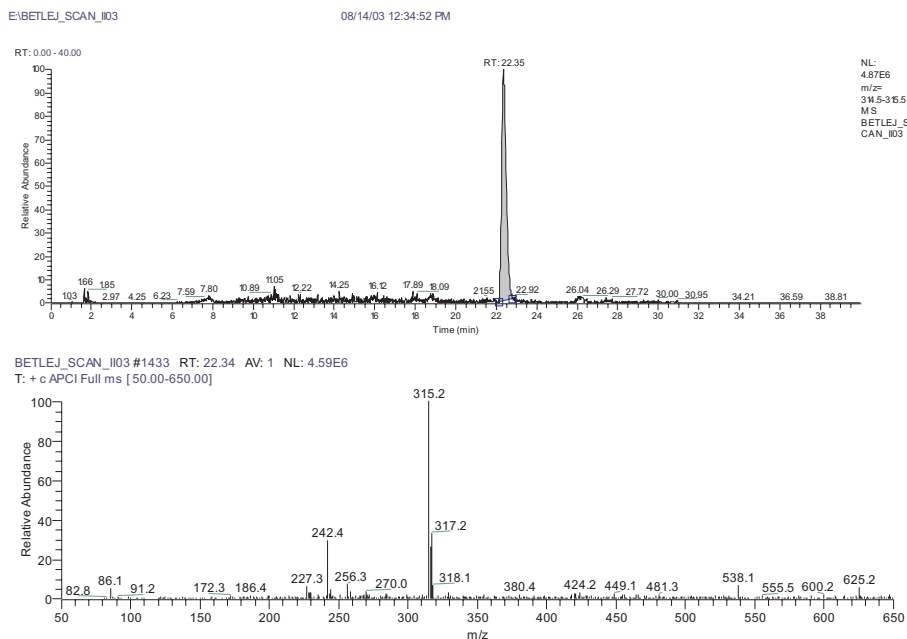


Fig. 2e. Chromatogram and mass spectrum of clomipramine in hair.

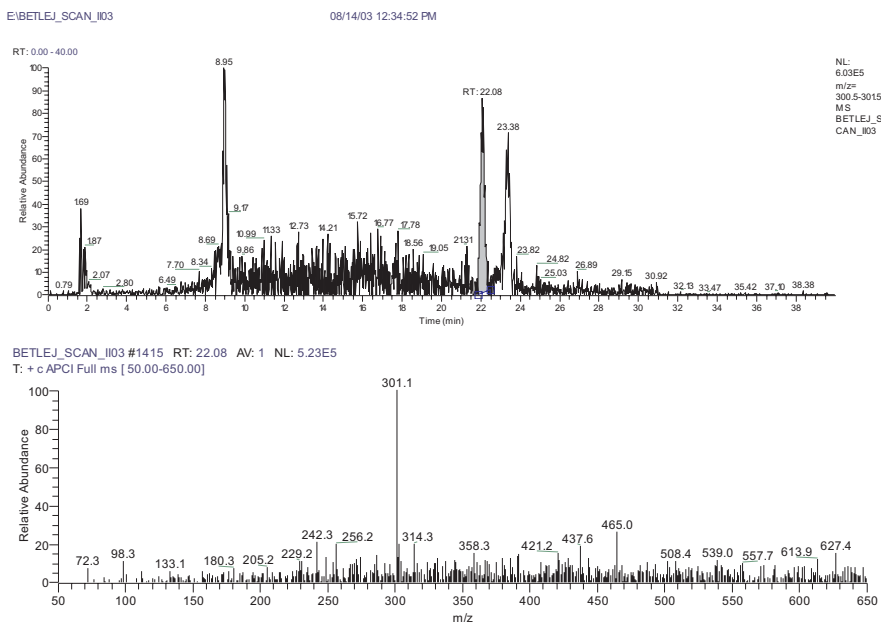


Fig. 2f. Chromatogram and mass spectrum of norclomipramine in hair.

The analysis of hair, which analytical documentation was presented in the form of mass chromatogram and of mass spectra in Figures 2a – 2f and the results of the appropriate determinations in Table III, showed the presence of the same medicines in all four segments of hair about the total length 12 cm, as in the body fluids and tissues, at similar level of concentrations.

The obtained results proved taking of medicines during the period of about 12 months ante mortem by A. B. The analysis showed a systematic increase of the concentration of medicines along hair, beginning from bulbs. This dependence was graphically represented in Figure 3.

In all kinds of the alternative material (Table II and III), except for the labyrinthine liquid, the presence of the main metabolites of clomipramine (norclomipramine) and tianeptine (tianeptine M5) was ascertained. However, in none of the alternative materials the presence of metabolites of hydroxyzine was established.

Ratios of concentrations of the precursor to the metabolite for clomipramine and tianeptine were listed in tables I, II and III and one graphically represented in Figure 4. It results from these lists that the content of tianeptine in hair is significantly higher, especially in segments originating from of the earlier period ante mortem, to the remaining material. For clomipramine, however, these relations represent other dependence, showing rather similar mechanism of passing to hair both the precursor and the metabolite.

TABLE III. RESULTS OF TOXICOLOGICAL EXAMINATION OF HAIR OBTAINED FROM THE BODY OF A. B.

Xenobiotic	Concentration of medicines in hair [ $\mu\text{g/g}$ ]			
	segment I	segment II	segment III	segment IV
Clomipramine	4.76	42.10	46.27	89.64
Norclomipramine	0.48; 9.9*	2.89; 14.6*	3.54; 13.0*	8.64; 10.4*
Tianeptine	1.89	6.54	9.69	14.88
Nortianeptine	–	–	–	–
Tianeptine MC5	0.15; 12.6*	0.02; 32.7*	0.32; 30.3*	0.42; 35.4*
Tianeptine MC3	–	–	–	–
Hydroxyzine	0.37	0.55	0.74	0.92
Norhydroxyzine	–	–	–	–
Cetyryzine	–	–	–	–

\* The relative concentration of the precursor of the medicine to the metabolite.

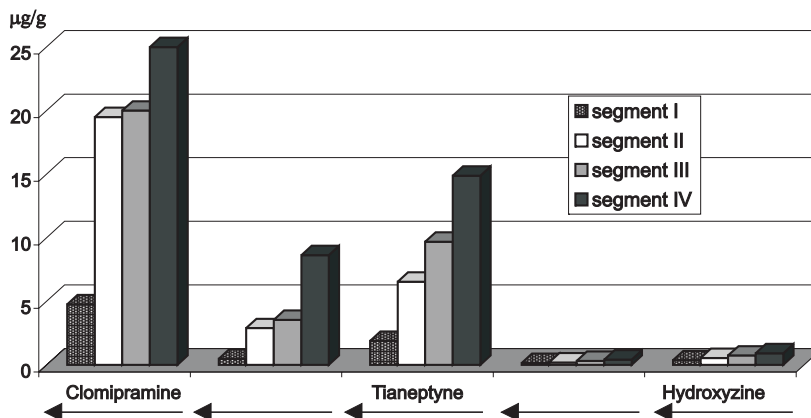


Fig. 3. Concentrations of the revealed medicines in four segments of hair of A. B.

## DISCUSSION OF THE RESULTS

Although the considered case does not introduce any problem in the interpretation of the results of toxicological research, it inspires an interest of a toxicologist from the regard on the complexity of the poisoning. In the interpretation of results of the expertise for forensic and medical purposes an important meaning have high concentrations of the detected medicines and their metabolites in the *post-mortem* material of the deceased and possible interactions among them and with alcohol revealed in her organism.

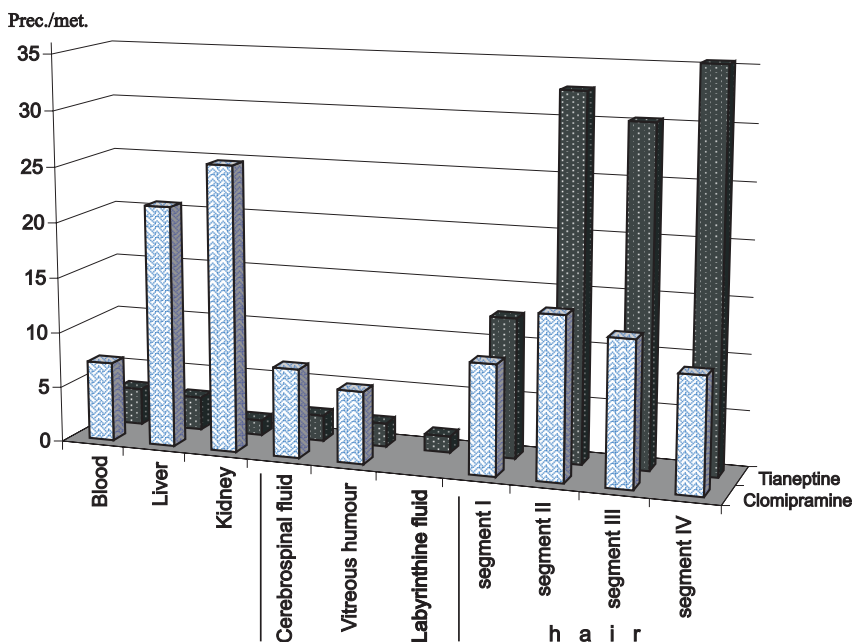


Fig. 4. The relative concentration of the precursor to the metabolite in the examined *post-mortem* material.

In described elsewhere lethal poisonings with clomipramine, tricyclic anti-depressive medicine, concentrations of the precursor were situated in the range of 0.54–3.3  $\mu\text{g/g}$  and of the metabolite norclomipramine in the range of 0.58–1.4  $\mu\text{g/g}$ . Thus, one can accept that the concentration of the medicine and of the metabolite in the examined case is included in the range of concentrations encountered in deadly poisonings [1, 16].

Hydroxyzine, being an anti-histamine medicine, functions also reassuringly and counterphobically. In blood of the deceased A. B. 0.66 mg/l of this medicine was determined that can indicate the toxic level [1, 16].

Tianeptine as an anti-depressive medicine of the serotonergic activity, increasing the escapement of serotonin in the pre-synaptic space, being considered as a safe medicine of a low toxicity [17]. Accessible data provide an information about single lethal poisonings in the mixture with other medicine [10]. Tianeptine determined in blood of the deceased ten times exceeded concentrations being detected during the therapeutic usage of the medicine and was comparable with the level of the concentration established in a poisoning with tianeptine and tramadol as shown in the above mentioned work [10].

In the mechanism of the interaction to the foreground protrudes the synergistic activity of the shown in the course of the expertise medicines among themselves and with alcohol. Clomipramine and hydroxyzine intensify the synergistic effect for medicines influencing the central nervous system.

Moreover, hydroxyzine intensifies the activity of anti-depressive medicines [12, 17]. Thus, there are no doubts that in the sequence of the opinion on the reason of the decease a forensic medic admitted the death of A. B. as result of a complex activity of in their mutual interaction, including an interaction with ethyl alcohol.

The analysis of hair showed the presence of the same medicines at similar level of concentrations, confirming data originating from of the interview that A. B. took medicines on account of depression which at last she took in a lethal dose. Concentrations of the established medicines in subsequent segments of hair (beginning from hair bulbs) presented values systematically increasing (Figure 2). This can speak, on one hand, for reducing doses of the accepted medicines nearer of the moment of the decease, on the other hand can suggest a migration of xenobiotics in the structure of the hair from the bulb toward the end of the hair. At the present stage of knowledge, with reference to the shown in the course of the expertise medicines, the explanation of this matter in the manner rising no doubts is not possible [15]. The performed analytical study suggests a less effective process of the embedding of metabolites into hair in comparison to the precursors. In hair of A. B. there were determined clomipramine and norclomipramine, tianeptine and one of its three metabolites (tianeptine MC5), whereas metabolites of hydroxyzine were not detected. The analysis of the alternative fluids showed in them the presence of precursors of the medicines. The presence of metabolites in these fluids presented a similar arrangement as in hair, except for the labyrinthine fluid, wherein only the metabolite of tianeptine – MC5 was detected.

Inspecting into the presented in Figure 4 coefficients, illustrating the ratios of concentrations of precursors of clomipramine and tianeptine to their main metabolites, one can observe differences in them for hair and the remaining material. In the case of clomipramine these differences are not large, but for tianeptine the differences are clearly visible, presenting many times higher values in hair than in the remaining investigative material.

This picture suggests that tianeptine more than its metabolites builds into the structure of hair, while clomipramine and norclomipramine do this in a similar degree. One-valued picture was received for hydroxyzine, because none of metabolites of hydroxyzine was detect either in hair, or in any of the remaining alternative materials.

Process of the embedding of a xenobiotic into hair is dependent on many factors, among other things on physical and chemical proprieties of given substance and its metabolites. Among them the important role plays the lipophilicity. In process of biotransformation usually originate more polar compounds being more easily eliminated with urine, thus in many cases one can observe in tissues higher concentrations of metabolites than of the mother compound.

With the opposite situation one deals in hair. Lipophilic substances more easily come across membrane of a blood-vessel to the bulb of the hair and penetrate the structure of hair. Thus, one can expect in hair the presence of less polar compounds (precursors) in higher concentration than of polar compounds (metabolites) [2, 4, 9, 11, 14, 15, 18].

It seems that the above-mentioned fragmentary theoretical data to some extent explain the results of toxicological research concerning the described case and presenting these relations. The metabolite of tianeptine MC5 (Figure 1b) originating by shortening of the side chain becomes more polar, but probably to smaller extent than nortianeptine or tianeptine MC3 that were not detected in hair.

In the matter of transfer of “nor-” metabolites of tricycle anti-depressive medicines, e.g. norclomipramine, expressed their opinion other researchers [13], basing on their own observations. They evaluated the process of embedding of these metabolites into the structure of hair as less effective in comparison to the precursors of medicines.

Commenting the examined case in aspect of the selection of biological material to toxicological evaluation, it is necessary to underline that the greatest usefulness, aside from the classic material, offer hair. However, the analysis of hair continually creates difficulties in the interpretation of results in many aspects, such as an evaluation of the stability of xenobiotic in the place of its embedding into hair [12, 18]. Its usefulness for toxicological expertise however is not being called in question that was surely proved by the case presented in the work.

## SUMMARY

The use of other alternative materials such as vitreous humour, the labyrinthine or cerebrospinal fluid, in addition to standard classic material for toxicological analyses, undoubtedly extends the range of an expert study. It seems, however, that these liquids have the greatest value as a material with a poor biological matrix, suitable mainly for determinations of groups of medicines and psychoactive remedies by methods of immuno-chemical tests, in order to guide further stages of the expert study [8].

Hair, thanks to its unique physical and chemical properties, has unquestioned value as a source of information in toxicological, forensic and many other types of research. An advantage of this alternative material is its stability, non-invasiveness of sampling and the lack of special requirements regarding its storage [15].

The analysis of alternative materials, such as hair or pure alternative body fluids, in terms of usefulness for forensic purposes, enriched by the

study of metabolites, has become possible thanks to the application of an extremely sensitive and selective method, i.e. liquid chromatography coupled with mass spectrometry, e.g. in the option described in the examined case (HPLC/APCI/MS).

#### References:

1. Baselt R. C., Cravey R. H. Disposition of toxic drugs and chemicals in man, The Toxicology Institute, Foster City 1995.
2. Chemia sądowa, Kościelniak P., Piekoszewski W. [red.], Wydawnictwo Instytutu Ekspertyz Sądowych, Kraków 2002.
3. Gaillard Y., Pepin G., Testing hair for pharmaceuticals, *Journal of Chromatography B* 1999, vol. 733, pp. 231–246.
4. Goszcz H., Społeczne uwarunkowania zatruc samobójczych, *Przegląd Lekarski* 1999, t. 56, s. 422–425.
5. Ishiyama I., Nagai T., Toshiba S., Detection of basic drugs (methamphetamine, antidepressants, nicotine) from human hair, *Journal of Forensic Sciences* 1983, vol. 28, pp. 380–385.
6. Jaraczewska W., Kotwica M., Acute poisonings with drugs. A review of the data collected at the National Poison Information Centre during period 1991–1995, *Przegląd Lekarski* 1997, t. 54, s. 737–740.
7. Kłys M., Rutkiewicz A., Szkolnicka B. [et al.], Fatal and non-fatal poisonings with drugs in a medico-legal aspect in the material of the Institute of Forensic Medicine and Toxicological Clinic Collegium Medicum Jagiellonian University in the years 1987–1998, *Acta Poloniae Toxicologica* 2000, vol. 8, pp. 101–111.
8. Kłys M., Baran E., Zatrucia śmiertelne w materiale Zakładu Medycyny Sądowej w Krakowie w latach 1946–1995, *Archiwum medycyny sądowej i kryminologii* 1996, t. 46, s. 277–287.
9. Kłys M., Klementowicz W., Bujak-Giżycka B. [i in.], Opiniowanie sądowo-lekarskie w narkomanii w świetle nowoczesnej analityki toksykologicznej, *Przegląd Lekarski* 2000, t. 57, s. 572–576.
10. Kintz P., Tracqui A., Mangin P., Detection of drugs in human hair for clinical and forensic applications, *International Journal of Legal Medicine* 1992, vol. 105, pp. 1–4.
11. Lechowicz W., Complex intoxication by tramadol and tianeptine: a case report, *Problems of Forensic Sciences* 2000, vol. 44, pp. 130–139.
12. Nakahara Y., Hair analysis for abused and therapeutic drugs, *Journal of Chromatography B* 1999, vol. 733, pp. 161–180.
13. Podlewski J. K., Chwalibogowska-Podlewska A., Leki współczesnej terapii, PZWL, Warszawa 1994.
14. Pragst F., Rothe M., Hunger J. [et al.], Structural and concentration effects on the deposition of tricyclic antidepressants in human hair, *Forensic Sciences International* 1997, vol. 84, pp. 225–236.



15. Sachs H., Kintz P., Testing for drugs in hair. Critical review of chromatographic procedures since 1992, *Journal of Chromatography B* 1998, vol. 713, pp. 147–161.
16. Stanaszek R., Włosy jako materiał badawczy w analizie środków uzależniających [praca doktorska, Wydział Chemii UJ, Kraków 2001].
17. Uges D. R. A., Therapeutic and toxic drug concentrations, *The Bulletin of the International Association of Forensic Toxicologists* 1996, vol. 26, Supplement.
18. Wilde M. I., Benfield P., Tianeptine. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy in depression and co-existing anxiety and depression, <http://biopsychiatry.com/tianeptine.htm>

# **WYKORZYSTANIE MATERIAŁÓW ALTERNATYWNYCH W EKSPERTYZIE TOKSYKOLOGICZNEJ Z ZASTOSOWANIEM METODY LC/APCI/MS DO OCENY PRZYPADKU KOMPLEKSOWEGO ZATRUCIA ŚMIERTELNEGO LEKAMI: KLOMIPRAMINĄ, TIANEPTYNĄ I HYDROKSYZYNĄ**

Małgorzata KŁYS, Sebastian ROJEK, Artur MOSKAŁA

## **WSTĘP**

Ze względu na uwarunkowania społeczne i kulturowe współczesnego świata depresja dotyka coraz więcej ludzi, stąd też popularność leków antydepresyjnych wzrasta. Równoległe do wzrostu popytu na owe leki w ostatnich latach obserwuje się, jak informują współczesne statystyki, stale wzrastającą liczbę zatruć spowodowanych użyciem substancji psychoaktywnych, szczególnie trójcyklicznych leków antydepresyjnych [6, 7, 8]. Zatrucia śmiertelne z intencją samobójczą często dotyczą osób dotkniętych depresją, leczonych przez dłuższy czas lekami, które – w końcu zażyte w dawce śmiertelnej – prowadzą do śmierci [4].

Analiza toksykologiczna zmierzająca do detekcji, identyfikacji i oznaczenia ilościowego ksenobiotyków we krwi i narządach miękkich pobranych w czasie sekcji zwłok odnosi się do chwili śmierci, stanowiąc podstawę orzeczenia o jej przyczynie.

Obserwacja kierunków rozwoju toksykologii wskazuje na zainteresowanie także innymi rodzajami materiału biologicznego wykorzystywanego do ekspertyzy, takimi jak płyn z gałki oka, płyn mózgowo-rdzeniowy czy płyn błędnikowy. Największe znaczenie spośród materiałów alternatywnych mają jednakże włosy. Możliwość oznaczeń ksenobiotyków we włosach dzięki czułym i selektywnym metodom analitycznym, takim jak spektrometria mas w sprzężeniu z chromatografią cieczową (LC/MS) czy gazową (GC/MS), pozwala oceniać historię zażywania leku bądź leków przed śmiercią, co sprawia, że dany przypadek postrzega się w szerszym aspekcie medyczno-sądowym [3, 5, 10, 12, 14].

Celem niniejszej pracy jest próba przedstawienia historii zażywania leków antydepresyjnych, ustalona na podstawie analizy włosów w konfrontacji z toksykologicznymi badaniami płynów ustrojowych i tkanek. Ilustrację podjętego zagadnienia stanowi przypadek samobójczej śmierci 21-letniej kobiety, A. B., po zażyciu mieszanki leków: klomipraminy, tianeptyny i hydroksyzyny.

## **OPIS PRZYPADKU**

Zwłoki 21 letniej A. B. ujawniono w sady przy domu, w miejscu zamieszkania. Przy zwłokach znaleziono puste opakowania po lekach: Coaxil, Anafranil SR, Hydroksyzinum, Polopiryna S i Panadol oraz puste butelki po alkoholu. Z wywiadu uzyskano informację, że A. B. była leczona z powodu depresji od kilku lat, a 1,5 roku przed śmiercią podjęła nieudaną próbę samobójczą, zażywając leki. Sekcję zwłok zmarłej

wykonano w Zakładzie Medycyny Sądowej Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. Wynik badań sekcyjnych denatki wykluczyły zmiany o charakterze urazowym i chorobowym. W żołądku stwierdzono około 100 ml płynnej treści z białawymi rozmiękającymi cząstkami, niektórymi o kształcie tabletek. W badaniu histopatologicznym stwierdzono przekrwienie i rozpoczynający się obrzęk płuc, rozsiane drobnokropelkowe stłuszczenie wątroby, natomiast mięsień sercowy, nerka i mózg posiadały niezmienną budowę.

W czasie sekcji zwłok pobrano płyny ustrojowe, wycinki narządów wewnętrznych i włosy celem przeprowadzenia badań chemiczno-toksykologicznych na obecność alkoholu, leków i narkotyków.

## MATERIAŁ I METODY

### Material

Odczynniki: acetonitryl, izopropanol, metanol, chloroform i octan etylu oraz złożo SPE C18 zakupiono w firmie Merck (Darmstadt, Niemcy), substancję do buforu TRIS i węglanowo-amonowego w firmie Serva (Heidelberg, Niemcy), kwas trifluoroctowy w firmie Fluka (Buchs, Szwajcaria).

Wzorzec tianeptyny uzyskano przez ekstrakcję eterem diizopropylowym z wodnej zawiesiny leku Coaxil (Sever, Francja), natomiast wzorce prazepamu, klomipraminy, norklomipraminy, hydroksyzyny i cetyryzyny pochodziły z firmy SIGMA (Stany Zjednoczone). Roztwory podstawowe o stężeniu 1 mg/ml przygotowano w metanolu.

Badano płyny ustrojowe (krew żylna, mocz, ciało szkliste gąłki oka, płyn mózgowo-rdzeniowy, płyn błędnikowy), wycinki narządów wewnętrznych (wątroba, nerka) oraz kosmyk włosów o długości 12 cm.

Materiał kontrolny stanowiły krew, mocz, wątroba, nerka i włosy pobrane od osób niezatrutych, sekcjonowanych w tutejszym zakładzie.

### Metody

#### *Analiza wstępna*

Krew i mocz denatki poddano badaniom na obecność alkoholu etylowego metodą chromatografii gazowej (GC). Wykazały one etanol w stężeniach 0,7‰ we krwi i 1,1‰ w moczu.

Wstępne badania wykonano, badając mocz zmarłej z zastosowaniem testu diagnostycznego Tox/See, Multi-Drug Screen Panel (Bio-Rad, Francja), który wykazał obecność leku bądź leków z grupy tricyklicznych leków antydepresyjnych.

#### *Identyfikacja*

Pobrano po 5 ml krwi i moczu, a następnie dodano do prób po 5 ml buforu TRIS o pH = 9,0. Krew dodatkowo poddano działaniu ultradźwięków i odbiałczaniu z użyciem 7,5 ml acetonitrylu. Po odwirowaniu prób zbierano supernatant i prowadzono ekstrakcję 30 ml octanu etylu przez wytrząsanie. Po ponownym odwirowaniu prób zbierano rozpuszczalnik organiczny i sączono na separatorze typu Whatman 1PS (Maidstone, Wielka Brytania). Odparowywanie prowadzono w strumieniu azotu. Suche pozostałości rozpuszczano w 100 µl metanolu.

Badania identyfikacyjne prowadzono z zastosowaniem metody HPLC-APCI/MS w systemie skryningu. W toku badań wykazano we krwi i moczu denatki obecność klomipraminy, norklomipraminy, tianeptyny, nortianeptyny, tianeptyny MC5, tianeptyny MC3, hydroksyzyny i jej dwóch metabolitów – norhydroksyzyny i cetyryzyny.

### ***Analiza ilościowa***

Ocenę stężenia wykazanych w badaniu identyfikacyjnym ksenobiotyków przeprowadzono metodą HPLC-APCI/MS w oparciu o wyznaczone w drodze eksperymentu krzywe kalibracyjne dla klomipraminy i norklomipraminy, tianeptyny (MC5 oceniano względem tianeptyny) oraz dla hydroksyzyny. Badaniu poddano krew, mocz, wątrobę i nerkę oraz materiały alternatywne – płyn mózgowo-rdzeniowy, płyn z gałki oka, płyn błędnikowy oraz włosy.

Pobrano po 2 ml krwi, moczu, ciała szklistego gałki oka, płynu mózgowo-rdzeniowego, 0,4 ml płyn błędnikowy (uzupełniając próbę moczem kontrolnym do objętości 2 ml) oraz po 2 g homogenatów tkankowych nerki i wątroby; następnie dodano do nich po 40  $\mu$ l -glukuronidazy z arylosulfatazą. Próby wzbogacano dodatkiem prazepam (stanowiącego standard wewnętrzny) o stężeniu 1 mg/l. Prowadzono 24-godzinny proces hydrolizy enzymatycznej przebiegający w temperaturze 37°C; po zakończeniu próby doprowadzano do pH = 9,0, dodając do nich 0,4 ml 0,1 M NaOH i 2 ml buforu TRIS. Kontrolę pH prowadzono przy użyciu papierków wskaźnikowych. Po odwirowaniu zbierano supernatant, który poddawano ekstrakcji z wytrząsaniem 12 ml chloroformem i izopropanolem 3:1 v/v. Całość po odwirowaniu sączono na separatorze typu Whatman, a następnie odparowywano w strumieniu azotu.

Analogicznie postępowano z materiałem kontrolnym; 2 ml próby płynów ustrojowych wzbogacano dodatkiem klomipraminy, norklomipraminy tianeptyny i hydroksyzyny w stężeniach odpowiednio 0, 0,25, 1,0, 5,0  $\mu$ g/ml oraz 2 g próby homogenatów tkankowych z wątroby i nerki w stężeniach 0, 0,25, 1,0, 5,0, 50,0  $\mu$ g/g oraz prazepamu w stężeniu 1,0  $\mu$ g/ml lub 1  $\mu$ g/g. Otrzymano krzywe kalibracyjne, z których dokonano obliczeń stężenia leków.

Przeprowadzono również ekstrakcję włosów na fazie stałej (SPE). 12 cm odcinek włosów podzielono na 4 segmenty o długości 3 cm. Prowadzono proces dekontaminacji przez wytrząsanie w wodzie, a następnie po ich osuszeniu w izopropanolu. Próbki włosów mielono w młynie kulowym (Retsch MM 200), po czym do naczynek szklanych odważano po 50 mg sproszkowanych włosów. Prowadzono przez 24 h proces hydrolizy kwaśnej przy użyciu 0,1 M HCl. Przebiegał on w temperaturze 57°C, a po jego zakończeniu próbki zobojętniano 1 M NaOH i dodano do nich 2 ml buforu węglanowo-amonowego o pH = 9,3. Supernatant zebrany po odwirowaniu наносzono na zaaktywowane złoże C18-end (Merck, Niemcy) kolumnienek.

Analogicznie postępowanie prowadzono z materiałem kontrolnym. Porcje po 50 mg sproszkowanych włosów „ślepych” wzbogaconych dodatkiem klomipraminy, norklomipraminy, tianeptyny i hydroksyzyny w stężeniach odpowiednio 0,5; 1,0; 2,0 ng/mg ( $\mu$ g/g) oraz prazepamu w stężeniu 1,0 ng/mg ( $\mu$ g/g). Otrzymano krzywe kalibracyjne, na podstawie których dokonano odpowiednich obliczeń.

### **Metoda analityczna**

Chromatograf cieczowy: aparat Finnigan MAT (San Jose, Stany Zjednoczone) wyposażony w pompę TSP P 4000 w opcji gradientu przepływu fazy oraz w auto-sampler TSP AS 3000 z lupą o objętości wstrzykiwania 10  $\mu$ l. Rozdział przeprowadzono na kolumnie Purospher RP 18, 125-3 mm I.D., 5  $\mu$ m rozmiar ziaren, z przedkolumną Lichrocard 4, 4 mm I.D. wypełnioną złożem Lichrospher 60, o rozmiarze ziaren 5  $\mu$ m (Merck, Darmstadt, Niemcy). Faza ciekła: faza A – 1% kwas trójfluorooctowy (TFA) w wodzie i faza B – 90% acetonitrylu + 10% fazy A. Przepływ fazy 0,4 ml/min programowano następująco: 5% A i 95% B przez 2 min wzrastająco do 70% A i 30% B przez 30 min, potem po 2 min malejąco do 95% A i 5% B przez 8 min.

Detekcja: spektrometr masowy LCQ z pułapką jonową (Finnigan MAT, San Jose, Stany Zjednoczone) wyposażony w źródło chemicznej jonizacji pod ciśnieniem atmosferycznym (APCI). Warunki pracy APCI: gaz nośny jonizujący (azot) 60 psi i gaz pomocniczy zasilający (hel) 10 psi, temperatura źródła jonów 425°C, podgrzewana kapilara do temperatury 150°C, prąd korony 5  $\mu$ A. Widma masowe analizowanych ksenobiotyków mieściły się w zakresie skanowania pomiędzy 50–650 m/z w opcji jonizacji dodatniej przy napięciu kapilary 4,0 V. Przeprowadzono przesiewanie widm (SIM), bazując na czasach retencji i masach analizowanych substancji.

### WYNIKI

W toku całościowej ekspertyzy toksykologicznej oznaczono następujące ksenobiotyki: klomipraminę i norklomipraminę, tianeptynę i jej trzy metabolity: nortianeptynę, tianeptynę MC5 i MC3 oraz hydroksyzynę i jej dwa metabolity: norhydroksyzynę i cetyryzynę. Potwierdza to fakt ujawnienia przy denatce opakowań po tych lekach.

Wykazane w toku ekspertyzy metabolity leków są zgodne z teoretycznymi schematami szlaków metabolicznych [11], które są przedstawione na rycinach 1a, 1b i 1c.

Tabele I i II, w których zamieszczono wyniki badań toksykologicznych przedstawiających stężenia klomipraminy, tianeptyny i hydroksyzyny, tłumaczą zatrucie śmiertelne. W wątrobie i nerce wykazano istotnie wyższe stężenia ksenobiotyków w porównaniu z pozostałym materiałem.

Zauważalne są różnice w obecności metabolitów w materiale klasycznym i alternatywnym. Nie wykazano obecności metabolitów tianeptyny (nortianeptyny i MC3) oraz hydroksyzyny (norhydroksyzyny i cetyryzyny) w ekstraktach materiałów alternatywnych, tj. w ciałku szklistym oka, płynie mózgowo-rdzeniowym i płynie błędnikowym.

Analiza włosów, której dokumentację analityczną przedstawiono w postaci chromatogramu masowego i widm masowych na rycinach 2 a–f, a wyniki oznaczeń w tabeli III, wykazała obecność tych samych leków, jak w płynach ustrojowych i tkankach we wszystkich czterech fragmentach włosów o sumarycznej długości 12 cm i na podobnym poziomie stężeń, jak w pozostałym materiale. Wyniki dowodzą zażywania leków przez okres około 12 miesięcy przed śmiercią przez A. B. Analiza wykazała systematyczny wzrost stężenia leków na całej długości włosów, począwszy od cebulki. Przedstawiono tę zależność graficznie na rycinie 3.

We wszystkich rodzajach materiału alternatywnego (tabela II i III), z wyjątkiem płynu błędnikowego, stwierdzono obecność głównych metabolitów klomipraminy

(norklomipraminy) i tianeptyny (tianeptyny M5). Nie wykazano natomiast obecności metabolitów hydroksyzyny w żadnym z materiałów alternatywnych.

Stosunki stężeń prekursor/metabolit dla klomipraminy i tianeptyny zamieszczono w tabelach I, II i III oraz przedstawiono graficznie na rycinie 4. Wynika z tych wykazów, że zawartość tianeptyny we włosach jest znacząco wyższa, zwłaszcza w segmentach pochodzących z wcześniejszego okresu przed śmiercią, w porównaniu z pozostałym materiałem. Dla klomipraminy relacje te przedstawiają inną zależność, wskazując raczej na podobny mechanizm przechodzenia do włosów zarówno prekursora, jak i metabolitu.

## DYSKUSJA WYNIKÓW

Jakkolwiek rozważany przypadek nie przedstawia większego problemu w interpretacji wyniku badania toksykologicznego, to wzbudza on zainteresowanie toksykologa ze względu na kompleksowość zatrucia. W interpretacji wyników ekspertyzy dla celów orzecznictwa sądowo-lekarskiego znaczenie mają wysokie stężenia wykrytych leków i ich metabolitów w materiale sekcyjnym ofiary oraz możliwe interakcje pomiędzy nimi i alkoholem ujawnionym w organizmie denatki.

W udokumentowanych zatruciach śmiertelnych klomipraminą, trójpierścieniowym lekiem antydepresyjnym, stężenia prekursora mieściły się w zakresie 0,54–3,3 µg/g, a metabolitu norklomipraminy w zakresie 0,58–1,4 µg/g. Można więc przyjąć, że stężenie leku i metabolitu w badanym przypadku zawiera się w przedziale stężeń spotykanych w zatruciach śmiertelnych [1, 17].

Hydroksyzyna, będąc lekiem antyhistaminowym, działa także uspokajająco i przeciwłękowo. We krwi zmarłej A. B. ujawniono 0,66 mg/l tego leku, co może wskazywać na poziom toksyczny [1, 17].

Tianeptyna jako lek antydepresyjny o działaniu serotoninergicznym, zwiększającym wychwyt serotoniny w przestrzeni presynaptycznej, uważana jest za lek bezpieczny, o niskiej toksyczności [18]. Dostępne dane informują o pojedynczych zatruciach śmiertelnych w mieszaninie z innym lekiem [11]. Tianeptyna oznaczona we krwi denatki kilkadziesiąt razy przekraczała stężenia oznaczone podczas terapeutycznego stosowania leku i była porównywalna z poziomem stężenia oznaczonym w zatruciu tianeptyną i tramadolem wykazanych w wyżej cytowanej pracy [11].

W mechanizmie interakcji na pierwszy plan wysuwa się synergistyczne działanie wykazanych w toku ekspertyzy leków między sobą oraz z alkoholem. Klomipramina i hydroksyzyna nasilają efekt synergistyczny dla leków działających na ośrodkowy układ nerwowy. Hydroksyzyna ponadto nasila działanie leków antydepresyjnych [13, 18]. Nie wzbudza więc wątpliwości fakt, że w sekwencji opinii o przyczynie śmierci medyk sądowy przyjął zgon A. B. w wyniku kompleksowego działania wielolekowego w interakcji, w tym z alkoholem etylowym.

Analiza włosów wykazała obecność tych samych leków na podobnym poziomie stężeń, potwierdzając dane pochodzące z wywiadu, że A. B. zażywała leki z powodu depresji, które ostatecznie przyjęła w dawce śmiertelnej. Stężenia wykazanych leków w kolejnych segmentach włosów (począwszy od cebulki włosa) przedstawiały wartości systematycznie wzrastające (rycina 2). Może to przemawiać, z jednej strony, za zmniejszającymi się dawkami przyjmowanych leków bliżej momentu śmierci,

z drugiej strony może sugerować migrację ksenobiotyków w strukturze włosa w kierunku od cebulki do końca włosa. Na obecnym etapie wiedzy, w odniesieniu do wykazanych w toku ekspertyzy leków, wyjaśnienie tej kwestii w sposób nie budzący wątpliwości nie jest możliwe [16].

Przeprowadzone badania analityczne wskazują na mniej efektywny proces wbudowywania się we włosy metabolitów w porównaniu z prekursorami. We włosach A. B. zostały oznaczone klomipramina i norklomipramina, tianeptyna i jeden spośród trzech metabolitów (tianeptyna MC5), natomiast metabolity hydroksyzyny nie zostały wykryte. Analiza płynów alternatywnych wykazała w nich obecność prekursorów leków. Obecność metabolitów w tych płynach przedstawiała podobny układ jak we włosach, z wyjątkiem płynu błędnikowego, w którym wykryto jedynie metabolit tianeptyny MC5.

Analizując przedstawione na rycinie 4 współczynniki, obrazujące stosunek stężeń prekursorów klomipraminy i tianeptyny do ich głównych metabolitów, zauważa się różnice w tych wielkościach we włosach i pozostałym materiale. W przypadku klomipraminy różnice te są niewielkie, natomiast dla tianeptyny różnice są wyraźnie widoczne, przedstawiając we włosach wielokrotnie wyższe wartości w porównaniu z pozostałym materiałem badawczym.

Obraz ten sugeruje, że tianeptyna – bardziej niż jej metabolity – wbudowuje się w strukturę włosa, natomiast klomipramina i norklomipramina czynią to w podobnym stopniu. Jednoznaczny obraz otrzymano dla hydroksyzyny, gdyż metabolitów hydroksyzyny nie wykryto we włosach, jak zresztą i w pozostałych materiałach alternatywnych.

Proces wbudowywania się ksenobiotyku we włosy jest zależny od wielu czynników, m.in. fizykochemicznych właściwości danej substancji i jej metabolitów. Wśród nich ważną rolę odgrywa lipofilność. W procesie biotransformacji powstają w większości bardziej polarne związki, które są łatwiej wydalane z moczem, stąd też w wielu przypadkach obserwuje się w tkankach wyższe stężenia metabolitów niż macierzystego związku. Z odwrotną sytuacją mamy do czynienia we włosach. Substancje lipofilne łatwiej przechodzą przez membranę naczyń krwionośnego do cebulki włosa i wnikają do struktury włosa. Z tego też względu można się spodziewać obecności we włosach związków mniej polarnych (prekursorów) w wyższym stężeniu niż związków bardziej polarnych (metabolitów) [2, 3, 5, 10, 12, 15, 16].

Wydaje się, że powyższe fragmentaryczne dane teoretyczne w pewnym stopniu tłumaczą wyniki badań toksykologicznych dotyczących opisywanego przypadku i przedstawiających te relacje. Metabolit tianeptyny MC5 (rycina 1b) powstały przez skrócenie łańcucha bocznego staje się bardziej polarny, ale być może w mniejszym stopniu niż nortianeptyna czy tianeptyna MC3, które nie zostały wykryte we włosach. Analizując metabolizm hydroksyzyny, przy podobnych założeniach można wyciągnąć podobne wnioski tłumaczące brak metabolitów we włosach.

W kwestii przechodzenia metabolitów „nor-” trójcyklicznych leków antydepresyjnych, w tym norklomipraminy, wypowiedzieli się inni badacze [14], opierając się na swoich obserwacjach. Ocenili oni proces wbudowywania się w strukturę włosa tych metabolitów jako mniej efektywny w porównaniu z prekursorami leków.

Komentując badany przypadek pod kątem doboru materiału biologicznego do oceny toksykologicznej, trzeba podkreślić, że największą przydatność oprócz materiału podstawowego (klasycznego) oferują włosy. Jednakże analiza włosów wciąż



stwarza trudności w interpretacji wyników w wielu jej aspektach, jak chociażby przy ocenie stabilności ksenobiotyku w miejscu wbudowywania się do włosa [2, 13]. Przydatność dla toksykologicznej ekspertyzy medyczo-sądowej jest jednak niekwestionowana, czego dowodzi zapewne przedstawiany w niniejszej pracy przypadek.

#### PODSUMOWANIE

Zastosowanie do analizy toksykologicznej innych materiałów alternatywnych takich płyn z gałki oka, płyn błędnikowy czy mózgowo-rdzeniowy obok standardowego materiału klasycznego niewątpliwie poszerza zakres ekspertyzy. Wydaje się jednakże, że największą wartość przedstawiają te płyny jako materiał z ubogą matrycą biologiczną, służący głównie do oznaczeń grup leków i środków psychoaktywnych metodami testów immunochemicznych, celem ukierunkowania dalszych etapów procedury ekspertyzy [9].

Włosy, dzięki swoim unikalnym właściwościom fizykochemicznym, przedstawiają niekwestionowaną wartość jako źródło informacji w badaniach toksykologicznych, kryminalistycznych i wielu innych dziedzinach. Zaletą tego materiału alternatywnego jest jego trwałość, nieinwazyjność pobierania oraz brak szczególnych wymogów co do jego przechowywania [16].

Natomiast analiza materiałów alternatywnych, takich jak włosy czy czyste alternatywne płyny ustrojowe, w aspekcie przydatności do celów ekspertyzy toksykologicznej, wzbogacona badaniami metabolitów, stała się możliwa dzięki zastosowaniu wysoce czulej i selektywnej metody, jaką niewątpliwie jest metoda chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrem masowym, także w opcji opisanej w badanym przypadku (HPLC-APCI/MS).