

Sebastian Rojek, Małgorzata Kłys, Mariusz Ściśłowski

Test kontroli oznaczania środków uzależniających we włosach jako miernik jakości analizy toksykologicznej

A proficiency test of hair for the analysis of drug abuse as an index of quality of toxicological analysis

Z Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej CM UJ
p.o. Kierownik: prof. dr hab. Małgorzata Kłys

Światowe Towarzystwo Badania Włosów (The Society of Hair Testing – SoHT) w 2004 roku po raz czwarty było organizatorem testu kontroli jakości wyników analizy środków uzależniających we włosach (2004 Proficiency Test on Drugs of Abuse in Hair). Do testu przystąpiło 23 laboratoria toksykologiczne, w tym Pracownia Toksykologii Katedry Medycyny Sądowej CM UJ. Przesłano do analizy pięć próbek włosów celem oznaczenia w nich ksenobiotyków w zakresie czterech grup środków uzależniających: opioidów (6-monoacetylmorfiny, morfiny, kodeiny), amfetamin (amfetaminy, metamfetaminy, 3,4-metylenodioksyamfetaminy – MDA, 3,4-metylenodioksyetylamfetaminy – MDMA, 3,4-metylenodioksyetylamfetaminy – MDEA), kokainy i jej metabolitów (benzoiloeogoniny, kokaetylenu) oraz kannabinoli (Δ^9 -tetrahydrokannabinolu – 9-THC, kannabinolu – CBN). Uzyskano pozytywne wyniki we wszystkich grupach oznaczanych ksenobiotyków. Do analizy badanych próbek zastosowano metodę chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas w opcji chemicznej jonizacji pod ciśnieniem atmosferycznym (LC-APCI-MS-MS) i chromatografii gazowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas (GC-EI-MS-MS) z jonizacją elektronową.

The Society of Hair Testing – SoHT organized a quality control test: „2004 Proficiency Test on Drugs of Abuse in Hair”. 23 toxicological units participated in the test, among them the Toxicological Laboratory of The Institute of Forensic Medicine CM UJ.

Five hair samples were obtained for analysis comprising four groups of drugs of abuse as follows: opioids (6-monoacetylmorphine, morphine, codeine), amphetamine

(amphetamine, methamphetamine, 3,4-methylenedioxyamphetamine – MDA, 3,4-methylenedioxyamphetamine – MDMA, 3,4-methylenedioxyethylamphetamine – MDEA), cocaine and metabolites (benzoiloeogonine, cocaethylene) and cannabinoids (D9-tetrahydrocannabinol – 9-THC, cannabinol – CBN). Obtained results were evaluated positively in all groups of drugs which were the subject of examination.

Liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry in chemical ionization under atmospheric pressure option (LC-APCI-MS-MS) and gas chromatography coupled with tandem mass spectrometry and electron-impact ionization mode (GC-EI-MS-MS) were applied for analysis of analytes.

Słowa kluczowe: test kontroli jakości wyników, środki uzależniające we włosach, LC-APCI-MS-MS, GC-EI-MS-MS

Key words: Proficiency Test on Drugs of Abuse in Hair, drugs of abuse in hair, LC-APCI-MS-MS, GC-EI-MS-MS

WSTĘP

Stowarzyszenie Toksykologów Sądowych – Society of Forensic Toxicologists (SoFT) w 1990 roku wydało oświadczenie następującej treści:

Włosy mogą być użytecznym materiałem do sądowych badań toksykologicznych, kiedy wyniki ich analizy zostaną poparte innymi dowodami uży-

wania nielegalnych substancji. Analizy moczu i włosów mogą być działaniami komplementarnymi. Mocz dostarcza informacji na temat niedawnego użycia, włosy zaś mówią o dłuższej historii używania [11, 13].

W 1996 roku w Genewie Towarzystwo Badania Włosów – „The Society of Hair Testing SoHT” na jednej ze swoich konferencji wydało kolejne oświadczenie dotyczące analizy włosów:

1. „Pobieranie próbki włosów powinno odbywać się przy respektowaniu prawnych i etycznych praw danej osoby, a także podstawowych praw człowieka. Próbka powinna być pobrana w środowisku nie zanieczyszczonym *narkotykami*, przez odpowiednio przeszkoloną osobę, niekoniecznie lekarza. Wystarczająca ilość włosów powinna być pobrana w celu zapewnienia możliwości przeprowadzenia analizy porównawczej przez inne laboratoria. Próbka powinna być pobrana z potylicznej części głowy w okolicy karku w sposób umożliwiający identyfikację końców.
2. Materiał referencyjny powinien być przygotowany z włosów pobranych od rzeczywistych narkomanów. Zawartość w nim narkotyków powinna być zbadana przez laboratoria referencyjne.
3. Analiza powinna być prowadzona w zmierzonym segmencie włosów.
4. Wszystkie próbki powinny być poddane procedurom dekontaminacyjnym, składającym się z trzech części: faza organiczna, faza wodna, organiczna lub wodna.
5. Rozpuszczalnik użyty do mycia może być poddany analizie na obecność substancji analizowanej we włosach jeśli to konieczne.
6. Wszystkie pozytywne wyniki uzyskane metodami skryningowymi powinny być potwierdzone innymi bardziej czułymi i specyficznymi fizykochemicznymi metodami np. GC-MS, LC-MS.
7. W celu identyfikacji zanieczyszczenia zewnętrznego powinny być użyte cztery kryteria: identyfikacja metabolitów, określenie stosunku stężeń metabolit/macierzysta substancja, oznaczenie stężenia danej substancji w partiach rozpuszczalników stosowanych do dekontaminacji, ustalenie odpowiednich wartości cut-off” [11, 13].

Do oznaczania we włosach rekomendowane mogą być następujące metabolity substancji psychoaktywnych: benzoiloeckgonina i kokaetylen w przypadku nadużywania kokainy, 6-monoacetylomorfina i morfina w przypadkach stosowania heroiny, kwas 11-nor-9-karboksy- Δ^9 -tetrahydrokannabinolo-

wy jako biomarker konsumpcji produktów *cannabis* zawierających Δ^9 -tetrahydrokannabinol (9-THC). Dla amfetamin brak jest charakterystycznych biomarkerów [13].

W 2003 roku w czasie kolejnego spotkania członków SoHT w Heraklionie (Kreta) dyskutowano nad Konsensusem, który zawierać miał ostateczne zalecenia dotyczące analizy substancji psychoaktywnych we włosach oraz sposobu interpretacji uzyskanych wyników. Oficjalną jego treść wydano podczas spotkania członków zarządu SoHT w styczniu 2004 roku w Sewilli (Hiszpania) [12].

Konsensus zawiera bardzo precyzyjne zalecenia dotyczące pobierania, transportu, przechowywania próbek włosów oraz prowadzenia procedur dekontaminacyjnych. Porusza on ważną kwestię analityczną, jaką jest roztwarzanie matrycy włosa i sposoby izolacji z niej ksenobiotyku, dopuszczając jednak pewną dowolność laboratoriom. Roztwarzanie może poprzedzać ekstrakcję, ale również może być wyłączone z procedury przygotowawczej na rzecz bezpośredniej ekstrakcji ze stałej matrycy włosa po jej odpowiednim rozdrobieniu [12].

Fundamentalną częścią Konsensusu są jednak jasno sprecyzowane wartości progowe tzw. cut-off poddane procedurom walidacji metod stosowanych we wstępnej analizie przesiewowej oraz metod potwierdzających, obejmujących analizę czterech rekomendowanych grup substancji psychoaktywnych.

Zalecenia są następujące:

1. Opiaty

Test immunochemiczny:

- stężenie 0,2 ng/mg dla morfiny lub 6-MAM musi prowadzić do uzyskania dodatniego wyniku.

Test chromatograficzny:

- LOQ \leq 0,2 ng/mg dla każdego związku z tej grupy,
- rozróżnienie konsumenta heroiny od morfiny czy kodeiny powinno być przeprowadzone na podstawie oznaczenia stężenia 6-MAM.

2. Kokaina

Test immunochemiczny:

- stężenie 0,5 ng/mg dla kokainy musi prowadzić do uzyskania dodatniego wyniku.

Test chromatograficzny:

- LOQ \leq 0,5 ng/mg dla kokainy, LOQ \leq 0,05 ng/mg dla metabolitów,
- analiza chromatograficzna powinna zawierać oprócz macierzystej kokainy jeden z następujących metabolitów: benzoiloeckgoninę, kokaetylen, norkokainę lub ester metylowy ekgoniny.

3. Amfetaminy

Test immunochemiczny:

- stężenie 0,2 ng/mg oddzielnie dla każdej pochodnej musi prowadzić do uzyskania dodatniego wyniku.

Test chromatograficzny:

- LOQ \leq 0,2 ng/mg dla każdego związku z tej grupy.

4. Kannabinole

Test immunochemiczny:

- stężenie 0,1 ng/mg 9-THC musi prowadzić do uzyskania dodatniego wyniku.

Test chromatograficzny:

- LOQ \leq 0,1 ng/mg dla 9-THC,
- LOQ \leq 0,2 pg/mg dla THC-COOH,
- oznaczenie THC-COOH jest bezwzględnie wymagane dla potwierdzenia stosowania produktów *cannabis* [12].

Polityka Polskiego Centrum Akredytacji (PCA) dotycząca badania biegłości jest zgodna z dokumentami EA-2/10 *EA Policy for Participation in National and International Proficiency Testing Activities* oraz EA-03/04 *Use of Proficiency Testing as a Tool for Accreditation in Testing*. Norma PN-EN ISO/IEC 17025:2001 wymaga od laboratoriów posiadania procedur sterowania jakością, by zapewnić stałe monitorowanie miarodajnością wyników badań / wzorcowań dostarczonych klientom. Warto tutaj przytoczyć dwie podstawowe definicje podane w ISO/IEC Guide 43-1 *Proficiency testing by interlaboratory comparison – Part 1: Development and operation of proficiency testing schemes*, a mianowicie:

- **badanie biegłości** (*PT, proficiency testing*) – określenie, za pomocą porównań międzylaboratoryjnych, zdolności laboratorium do przeprowadzenia wzorcowań, badań lub zdolności jednostki inspekcyjnej do przeprowadzenia badań,
- **porównanie międzylaboratoryjne** (*ILC, interlaboratory comparison*) – zorganizowanie, wykonanie i ocena wzorcowań / badań tego samego typu lub podobnych obiektów wzorcowań / badań przez co najmniej dwa laboratoria, zgodnie z uprzednio ustalonymi warunkami [9].

Jednym z zadań SoHT jest prowadzenie programów badania biegłości metod analizy substancji kontrolowanych we włosach, stosowanych przez laboratoria sądowe, specjalizujące się w tego typu ekspertyzach. Badaniu biegłości podlegają metody analityczne wykorzystywane do oznaczania wybranych grup substancji psychoaktywnych we włosach, obejmujących opioidy, pochodne amfetaminy, koka-

inę i kannabinole. W ramach tego programu SoHT przesyła „autentyczne” próbki włosów pobrane od osób nadużywających substancji psychoaktywnych do zainteresowanych instytucji. Każdy z uczestników przeprowadza oznaczenie w matrycy tych samych analitów, a następnie uzyskane wyniki przesyła do organizatora programu, gdzie dokonuje się ich porównania z rezultatami otrzymanymi przez zdefiniowane laboratoria referencyjne. Laboratorium uczestniczące w programie badania biegłości zobowiązane jest dokonać oznaczenia objętych testem substancji, tymi samymi metodami, które stosuje w rutynowych oznaczeniach [12].

Potwierdzeniem biegłości laboratorium sądowego w zakresie danych analiz są pozytywne wyniki uzyskiwane w międzylaboratoryjnych badaniach. Należy jednakże zaznaczyć, że pozytywne wyniki uzyskane w badaniach międzylaboratoryjnych, w zakresie oznaczania danego analitu, w szczególności w próbkach włosów, nie muszą jednocześnie oznaczać podobnej biegłości w analizie innego rodzaju próbek np. w surowicy czy moczu [15].

SoHT był organizatorem kilku testów tego typu. Początkowo nie były one przeprowadzane regularnie, pierwszy przeprowadzono w 1995 roku, kolejny w 1997, następny w 2001, zaś czwarty w 2004 roku [5].

MATERIAŁ I METODY

Materiał biologiczny

- a) pięć próbek włosów poddanych segmentacji na 1 cm odcinki oznaczone kolejno od A – E,
- b) próbki kontrolne – włosy pobrane od wolontariuszy, nie przyjmujących substancji psychoaktywnych.

Wzorce substancji psychoaktywnych oraz inne odczynniki chemiczne

Roztwory wzorcowe o stężeniu 1 mg/ml morfiny, kodeiny, 6-monoacetylmorfiny, kokainy, benzoilekgoniny, kokaetyleny, amfetaminy, metamfetaminy, MDA, MDMA, MDEA, Δ^9 -tetrahydrokannabinolu, kwasu 11-nor-9-karboksy- Δ^9 -tetrahydrokannabinolowego oraz roztwory wzorcowe o stężeniu 0,1 mg/ml morfiny- d_3 , kodeiny- d_3 , 6-MAM- d_3 , kokainy- d_3 , benzoilekgoniny- d_3 , kokaetyleny- d_3 , amfetaminy- d_3 , metamfetaminy- d_5 , MDA- d_5 , MDMA- d_5 , MDEA- d_6 , Δ^9 -tetrahydrokannabinolu- d_3 i kwasu 11-nor-9-karboksy- Δ^9 -tetrahydrokannabinolowego- d_9 . Substancje wzorcowe zakupiono w firmie LGC Promochem (Polska).

Acetonitryl czystości spektralnej (Merck, Niemcy), aceton, n-heksan, metanol czystości cz.d.a. (POCH, Polska).

Oznaczanie opioidów, amfetamin oraz kokainy i jej metabolitów

Przygotowanie próbek włosów

Próbki włosów o długości segmentów 1 cm poddano procedurze dekontaminacji z użyciem n-heksanu, a następnie acetonu z jednoczesnym podaniem próbek działaniu ultradźwięków. Próbki suszono na powietrzu, a następnie rozdrabniano przy użyciu młynka kulowego. Odważono po dwie 20 mg porcje z każdej próbki i wzbogacano dodatkiem odpowiednich standardów wewnętrznych w stężeniu 1 ng/mg (20 ng w 20 µl). Izolację ksenobiotyków z matrycy prowadzono stosując jako ekstrahent metanol i ponownie poddając próbki 1 h działaniu ultradźwięków w temperaturze 50° C, po czym próbki pozostawiano na okres około 17 h. Po tym czasie metanol dekantowano, a następnie odparowywano w strumieniu azotu. Przed analizą ekstrakty rozpuszczano ilościowo w 100 µl mieszaniny faz A i B do HPLC w stosunku objętościowym 95:5.

Technika analityczna

Chromatograf cieczowy składa się z następujących elementów: pompy gradientowej TSP P4000, degazera SCM 1000 oraz autosamplera TSP A3000 (Finnigan MAT, USA). Rozdział chromatograficzny prowadzono na kolumnie LiChroCART z wypełnieniem Purospher RP-18 125 x 3 mm i rozmiarem ziaren 5 µm (Merck, Niemcy). Faza ruchoma A składa się z 0,1% wodnego roztworu kwasu mrówkowego i B z acetonitrylu. Przepływ faz ruchomych odbywa się w zaprogramowanym gradiencie ich udziału ze stałą szybkością 400 µl/min.

Spektrometr mas LCQ (Finnigan MAT, USA) z analizatorem w postaci kwadrupolowej pułapki jonowej wyposażonej w głowicę do chemicznej jonizacji pod ciśnieniem atmosferycznym (APCI). Parametry pracy APCI optymalizowano dla każdego analitu. Spektrometr mas pracował w opcji MS-MS, w którym to jony protonowe $[M+H]^+$ (okno izolacji 2 a.m.u. dla każdego analitu) poddawano rozbiciu do jonów potomnych przy zoptymalizowanej wartości energii kolizji. Monitorowanie produktów prowadzono w opcji skanowania pełnego widma masowego w zakresach uzależnionych masami powstających jonów potomnych.

Oznaczenie Δ^9 -tetrahydrokannabinolu i kannabinolu

Przygotowanie próbek włosów

Prowadzono analogiczną procedurę jak poprzednio przy wstępnym procesie przygotowania

materiału. Roztworzenie matrycy włosów przeprowadzono przy użyciu 1 M NaOH w temperaturze 95° C przez 10 minut, po czym izolację kannabinoli prowadzono przy użyciu mieszaniny n-heksanu z octanem etylu w stosunku objętościowym 9:1. Derywatyzację kannabinoli prowadzono mieszaniną BSTFA z 1% TMCS (Sylon BFT).

Technika analityczna

Zastosowano chromatograf gazowy TRACE (Thermo Electron, USA). Rozdział chromatograficzny prowadzono na kolumnie HP-5MS, 30 m x 0,25 mm I.D., grubość filmu 0,25 µm (Agilent Technologies, USA). Zastosowano następujący program temperaturowy – 120° C (0,5 min), do 230° C – 30° C/min, a następnie 15° C/min do 310° C (7 min). Temperatura iniektora i linii transferowej wynosiła 275° C. Nastrzyk próbki o objętości 1 µl na kolumnę chromatograficzną odbywał się w opcji splitless (1 min).

Zastosowano spektrometr mas Polaris Q (Thermo Electron, USA) wyposażony w analizator mas typu kwadrupolowej pułapki jonowej z jonizacją elektronową. Temperatura pułapki wynosiła 230° C. Spektrometr mas pracował w opcji MS-MS, w której to powstające jony molekularne M^+ (okno izolacji 2 a.m.u. dla każdego analitu) poddawano rozbiciu do jonów potomnych przy zoptymalizowanej wartości energii kolizji. Monitorowanie jonów potomnych prowadzono w opcji skanowania pełnego widma masowego w zakresach uzależnionych masami powstających jonów fragmentowanych.

WYNIKI

Wstępna faza badań polegała na wyznaczeniu parametrów analitycznych, warunkujących właściwy poziom analizy.

W tabeli I przedstawiono parametry uzyskane zastosowanymi metodami analitycznymi w konfrontacji z rekomendowanymi przez SoHT. Przedstawione dane pozostają w analitycznej zgodności.

W tabelach II (a-e) zamieszczono wyniki badań identyfikacyjnych uzyskanych w teście.

W tabelach III (a-j), IV (a-c) i V (a-e) przedstawiono wyniki oznaczeń substancji uzależniających z naszego laboratorium w próbkach odpowiednio B, C i E w konfrontacji z wynikami uzyskanymi przez innych uczestników testu oraz laboratoriami referencyjnymi.

Tabela I. Granice oznaczalności (LOQ) metod stosowanych w Pracowni Toksykologii Katedry Medycyny Sądowej CM UJ w analizie poniższych substancji psychoaktywnych we włosach oraz wartości LOQ rekomendowane przez SoHT.

Table I . Limit of quantitation (LOQ) of the methods used in the Toxicology Laboratory of The Institute of Forensic Medicine CM UJ for analysis of psychoactive substances in hair and the values recommended by SoHT.

OPIOIDY	LOQ (ng/mg)	LOQ -SoHT (ng/mg)
6-MAM	0,1	0,2
Morfina	0,1	0,2
Kodeina	0,1	0,2
KOKAINA		
Kokaina	0,05	0,2
Benzoiloekgonina	0,05	0,05
Kokaetylen	0,05	0,05
AMFETAMINY		
Amfetamina	0,2	0,2
Metamfetamina	0,2	0,2
MDA	0,2	0,2
MDMA	0,2	0,2
MDEA	0,2	0,2
KANNABINOLE		
Δ^9 -THC	0,1	0,1
Kannabinol	0,01	-
Δ^9 -THC-COOH	n.a.	0,0002

Tabele II (a-e). Wyniki identyfikacji ksenobiotyków w próbkach włosów przeprowadzonej w Pracowni Toksykologii Sądowej Katedry Medycyny Sądowej CM UJ w konfrontacji z wynikami identyfikacji uzyskanymi przez laboratoria referencyjne.

Tables II (a-e). The results of xenobiotics identification in hair samples carried out in Toxicology Laboratory of The Institute of Forensic Medicine CM UJ confronted with the results obtained by reference units.

a)

	Próbka A		
Substancja	A	T	F
Ksenobiotyki	N	N	

d)

	Próbka D		
Substancja	A	T	F
Ksenobiotyki	N	N	

b)

	Próbka B		
Substancja	A	T	F
6-MAM	P	P	
Morfina	P	P	
Kodeina	P	P	
Kokaina	P	P	
Benzoiloekgonina	P	P	
9-THC	P	P	
Amfetamina	P	P	
Metamfetamina	P	P	
MDMA	P	P	

e)

	Próbka E		
Substancja	A	T	F
6-MAM	P	P	
Morfina	P	P	
Kodeina	P	P	
Kokaina	P	P	
Benzoiloekgonina	P	P	

c)

	Próbka C		
Substancja	A	T	F
Kokaina	P	P	
Benzoiloekgonina	P	P	
9-THC	P	P	

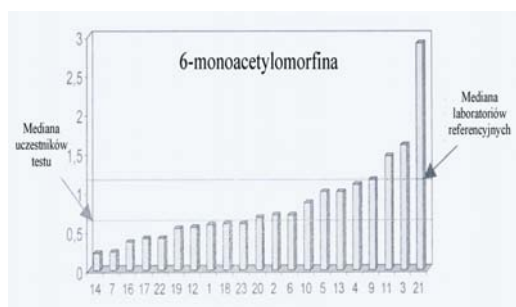
A – wynik naszego laboratorium
 T – wynik laboratorium referencyjnego
 F – wynik błędny
 N – wynik negatywny
 P – wynik pozytywny

Tabele III (a-j). Wyniki analizy ilościowej środków uzależniających w próbce włosów B przeprowadzonej w Pracowni Toksykologii Katedry Medycyny Sądowej CM UJ.

Tables III (a-j). The results of quantification drugs of abuse in hair sample B carried out in Toxicology Laboratory of The Institute of Forensic Medicine CM UJ confronted with the results obtained by other participants of the test and reference units.

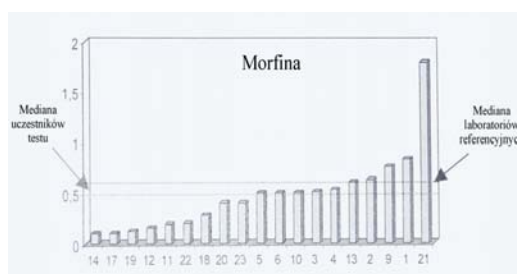
a)

Dane	Lab. uczest.
N	21
Max	2,9
Min	0,22
Średnia	0,84
Mediana	0,67
S.D.	0,59
Laboratorium 11	1,45



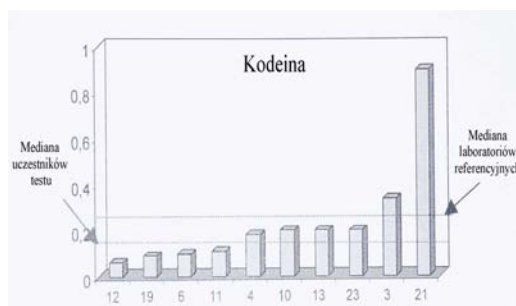
b)

Dane	Lab. uczest.
N	19
Max	1,80
Min	0,10
Średnia	0,48
Mediana	0,50
S.D.	0,38
Laboratorium 11	0,19



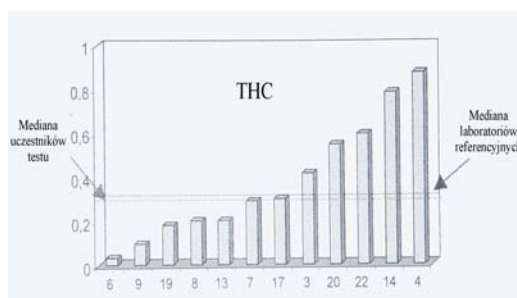
c)

Dane	Lab. uczest.
N	10
Max	0,90
Min	0,06
Średnia	0,24
Mediana	0,19
S.D.	0,23
Laboratorium 11	0,11



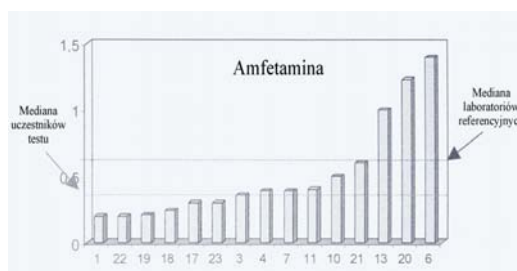
d)

Dane	Lab. uczest.
N	12
Max	0,88
Min	0,03
Średnia	0,38
Mediana	0,30
S.D.	0,26
Laboratorium 11	POS



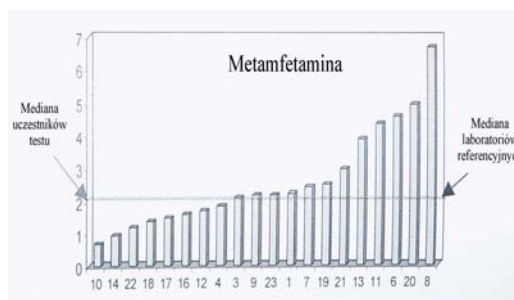
e)

Dane	Lab. uczest.
N	15
Max	1,40
Min	0,20
Średnia	0,51
Mediana	0,39
S.D.	0,37
Laboratorium 11	0,40



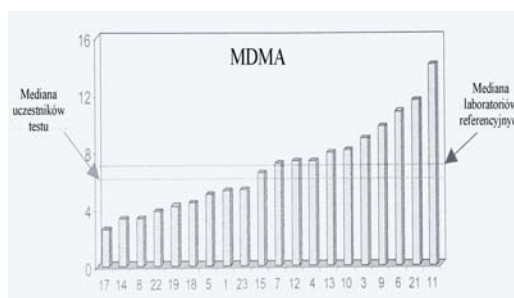
f)

Dane	Lab. uczest.
N	20
Max	6,70
Min	0,70
Średnia	2,60
Mediana	2,19
S.D.	1,51
Laboratorium 11	4,39



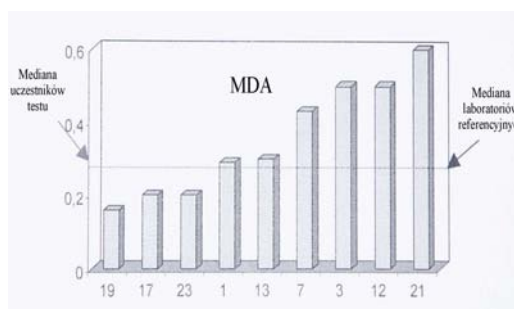
g)

Dane	Lab. uczest.
N	20
Max	14,07
Min	2,60
Średnia	6,83
Mediana	6,83
S.D.	3,00
Laboratorium 11	14,07



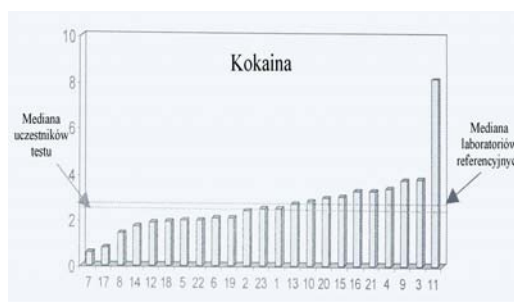
h)

Dane	Lab. uczest.
N	9
Max	0,60
Min	0,16
Średnia	0,35
Mediana	0,30
S.D.	0,15
Laboratorium 11	POS



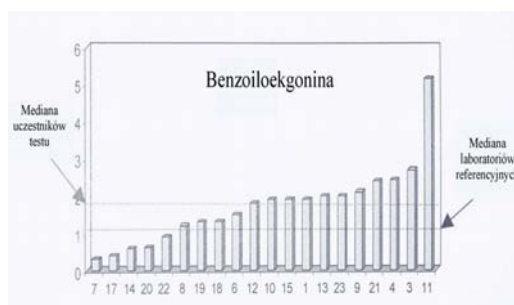
i)

Dane	Lab. uczest.
N	23
Max	8,15
Min	0,60
Średnia	2,65
Mediana	2,50
S.D.	1,43
Laboratorium 11	8,15



j)

Dane	Lab. uczest.
N	20
Max	5,15
Min	0,31
Średnia	1,72
Mediana	1,85
S.D.	1,04
Laboratorium 11	5,15

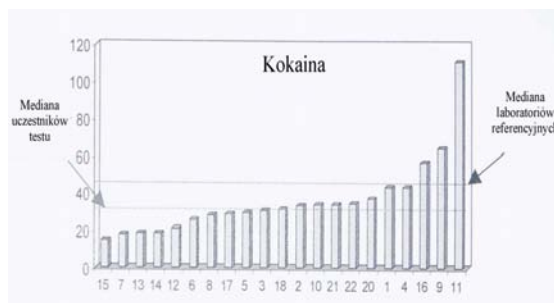


Tabele IV (a-c). Wyniki analizy ilościowej środków uzależniających w próbce włosów C przeprowadzonej w Pracowni Toksykologii Katedry Medycyny Sądowej CM UJ.

Tables IV (a-c). The results of quantification drugs of abuse in hair sample C carried out in Toxicology Laboratory of The Institute of Forensic Medicine CM UJ confronted with the results obtained by other participants of the test and reference units.

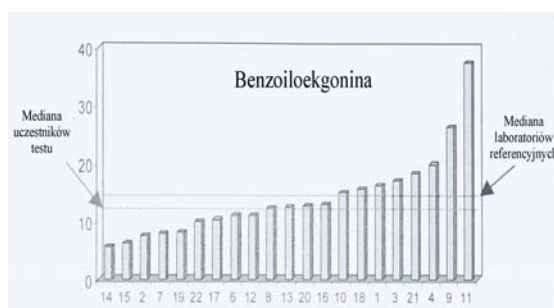
a)

Dane	Lab. uczest.
N	21
Max	111,05
Min	14,70
Średnia	36,30
Mediana	32,00
S.D.	20,60
Laboratorium 11	111,05



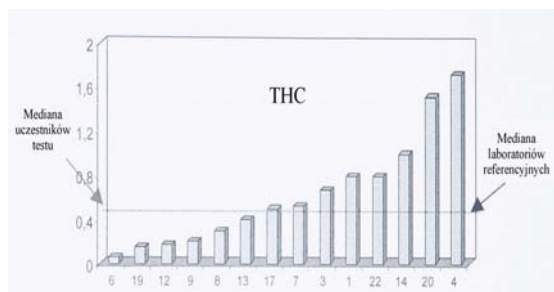
b)

Dane	Lab. uczest.
N	21
Max	37,61
Min	5,60
Średnia	14,01
Mediana	12,50
S.D.	7,17
Laboratorium 11	37,61



c)

Dane	Lab. uczest.
N	14
Max	1,72
Min	0,06
Średnia	0,63
Mediana	0,52
S.D.	0,49
Laboratorium 11	POS

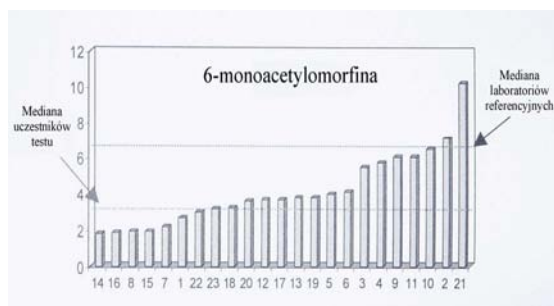


Tabele V (a-e). Wyniki analizy ilościowej środków uzależniających w próbce włosów E przeprowadzonej w Pracowni Toksykologii Katedry Medycyny Sądowej CM UJ.

Tables V (a-e). The results of quantification drugs of abuse in hair sample E carried out in Toxicology Laboratory of The Institute of Forensic Medicine CM UJ confronted with the results obtained by other participants of the test and reference units.

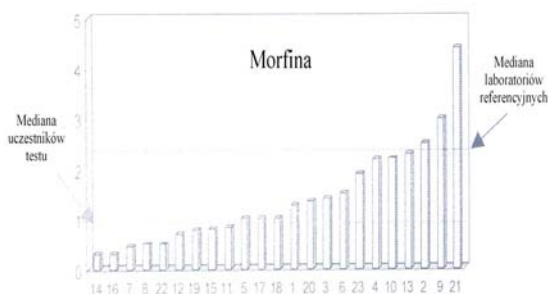
a)

Dane	Lab. uczest.
N	23
Max	10,20
Min	1,78
Średnia	4,16
Mediana	3,70
S.D.	2,02
Laboratorium 11	6,09



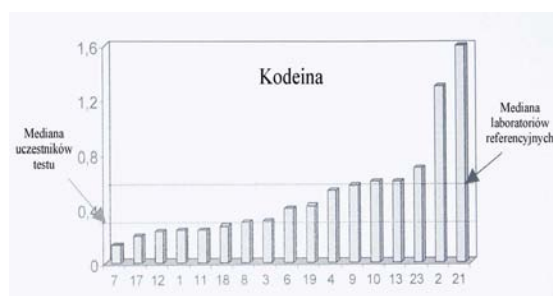
b)

Dane	Lab. uczest.
N	23
Max	4,40
Min	0,30
Średnia	1,40
Mediana	1,02
S.D.	0,98
Laboratorium 11	0,82



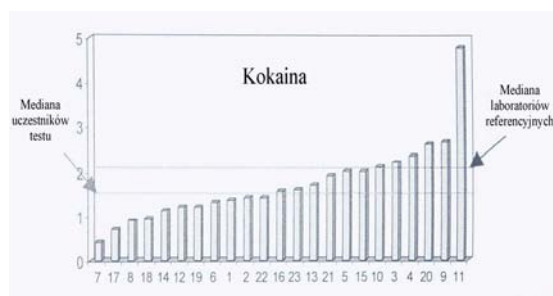
c)

Dane	Lab. uczest.
N	16
Max	1,60
Min	0,13
Średnia	0,50
Mediana	0,36
S.D.	0,39
Laboratorium 11	0,24



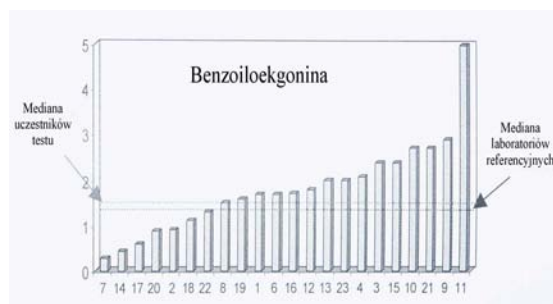
d)

Dane	Lab. uczest.
N	23
Max	4,80
Min	0,41
Średnia	1,71
Mediana	1,56
S.D.	0,88
Laboratorium 11	4,80



e)

Dane	Lab. uczest.
N	22
Max	4,98
Min	0,28
Średnia	1,80
Mediana	1,71
S.D.	0,99
Laboratorium 11	4,98



DYSKUSJA

W 2004 roku, w programie badania biegłości metod analitycznych stosowanych do oznaczania opioidów, pochodnych amfetaminy, kokainy i kannabinioli we włosach wzięły udział 23 laboratoria z całego świata. Test miał charakter poufny, w związku z czym laboratoria zostały zakodowane w systemie liczb 1–23. Pracownia Toksykologii Katedry Medycyny Sądowej CM UJ została zakodowana pod numerem 11.

Spośród przetestowanych przez nas próbek A i D były wolne od ksenobiotyków. Kokainę, benzoilokgoninę oznaczono w próbkach B, C i E, dodatkowo w próbce B i C oznaczono śladowe ilości kokaetyleny. 6-MAM, morfinę, kodeinę oznaczono w próbkach B i E. 6-MAM i kodeinę w śladowej ilości oznaczono również w próbce C. Amfetaminę, metamfetaminę, MDMA, MDA i MDEA oznaczono w próbce B zaś THC i CBN w próbce B i C. Analogiczne wyniki identyfikacji uzyskano w laboratoriach referencyjnych. Z nadesłanych danych przez organizatora testu – SoHT wynikało,

że próbka B ponadto zawierała metadon, benzodiazepiny, a także śladowe ilości dihydrokodeiny i kwasu 11-nor-9-karboksy- Δ^9 -tetrahydrokannabinolowego (THCCOOH), próbka C śladowe ilości benzodiazepin, dihydrokodeiny i THCCOOH, zaś próbka E dihydrokodeinę, metadon i benzodiazepiny. Substancje te nie były jednak objęte testem.

Jakkolwiek wyniki analizy identyfikacyjnej naszego laboratorium wykazywały całkowitą zgodność z wynikami uzyskanymi przez laboratoria referencyjne w zakresie analizy identyfikacyjnej, to uzyskane zarówno przez nas jak przez innych uczestników programu rezultaty analizy ilościowej, charakteryzowały duże rozrzuty. Podobne zależności obserwowano we wcześniejszych testach [5]. Zjawisko to związane jest z co najmniej kilkoma czynnikami. Z pewnością zasadnicze znaczenie, na tak wysokie rozrzuty wyników analizy ilościowej, ma stała i niehomogeniczna struktura materiału do badań, jakim są włosy. Trudna zatem w ocenie jest wydajność ekstrakcji z próbki rzeczywistej, chyba, że prowadzi się całkowite rozтворzenie struktury włosa, a analizy przeprowadzone zostaną do roztworu [11]. Z tego też względu rodzaj zastosowanej metody wyosabniania może być ważnym źródłem błędów i zmienności w analizie ilościowej. Powszechnie stosowane są następujące sposoby izolacji: kwaśna (HCl), zasadowa (NaOH), enzymatyczna z zastosowaniem β -glukuronidazy z arylosulfatazą [1, 3, 7, 8] oraz bezpośrednia inkubacja w metanolu [14, 6].

Zastosowana przez nas bezpośrednia ekstrakcja metanolem zapewniła dobry stopień odzysku w porównaniu z pozostałymi, ale także co najważniejsze, zagwarantowała dużą stabilność wyosabnianych związków. Wadą tego sposobu izolacji jednakże jest bogata matryca biologiczna widoczna w obrazie chromatograficznym. Zastosowana do oznaczania środków uzależniających we włosach dostępna w Pracowni Toksykologii technika LC-APCI-MS z analizatorem w postaci kwadrupolowej pułapki jonowej i możliwością pracy w trybie MS-MS pozwoliła na eliminację wpływu matrycy na wyniki oznaczenia i osiągnięcie rekomendowanych przez SoHT granic oznaczalności dla poszczególnych analitów, a w przypadku niektórych związków nawet obniżenie wymaganych wartości LOQ, co przekłada się na wynik chociażby oznaczenia kodeiny na poziomie 0,11 ng/mg w próbce B.

Najbardziej dyskusyjna wydaje się sprawa oznaczenia w badanych próbkach włosów kannabinoli. Spośród 23 uczestników testu w próbce B 9-THC oznaczyło tylko 12 laboratoriów, zaś w próbce C – 14. W przypadku naszego laboratorium zarówno w próbce B jak i C stężenie 9-THC było poniżej granicy oznaczalności zastosowanej metody analitycz-

nej GC-EI-MS-MS. Udało się natomiast oznaczyć w tych próbkach kannabinol, dla którego LOQ wynosił 0,01 ng/mg i był 10-krotnie niższy od granicy oznaczalności dla 9-THC wynoszącej 0,1 ng/mg.

Osobnego komentarza wymaga oznaczanie kwasu 11-nor-9-karboksy- Δ^9 -tetrahydrokannabinolowego (THC-COOH). Związek ten, jakkolwiek rekomendowany przez SoHT w przypadkach potwierdzenia nadużywania produktów *cannabis*, nie jest powszechnie oznaczanym analitem we włosach albowiem narzucona przez SoHT granica oznaczalności na poziomie 0,2 pg/mg napotyka w wielu laboratoriach na trudności analityczne. Stąd też test nie obejmował oznaczania tego związku. Istnieją w piśmiennictwie doniesienia opisujące metody umożliwiające oznaczanie tego związku, wszystkie jednak są związane z odpowiednią aparaturą analityczną opartą na tandemowej spektrometrii mas wykorzystującą potrójne liniowe analizatory kwadrupolowe z opcją chemicznej jonizacji negatywnej w sprzężeniu z chromatografią gazową (GC-MS-MS-NCI) [4, 10, 14]. Tylko jedno doniesienie przedstawiało możliwość osiągnięcia wymaganej granicy oznaczalności dla tego analitu przy zastosowaniu metody dwuwymiarowej chromatografii gazowej w sprzężeniu ze spektrometrią mas wykorzystującą pojedynczy kwadrupolowy analizator mas (GC-GC-MS-NCI) [2].

Nie oznaczyliśmy THCCOOH, gdyż metodyka oznaczania tego związku znajduje się w fazie opracowywania.

Test kontroli jakości wyników analitycznych stanowi niezwykle ważne ogniwo w pracy laboratoryjnej. Pozytywny wynik testu bowiem świadczy o tym, że zastosowano właściwe procedury analityczne, gwarantujące wiarygodność otrzymanych wyników. Postęp na polu analityki sprawia, że w chwili obecnej nie wystarczają dobre chęci i sprawna ręka analityka. Podstawę stanowi niezwykle specyficzna i niestety wysoce kosztowna aparatura analityczna.

Podjęcie tego typu zadań jest korzystne także z psychologicznego punktu widzenia, stanowiąc ważny element kształcący dla personelu jednostki laboratoryjnej.

Dowodzi ono, że nie tylko wyposażenie aparaturowe, ale także szlifowanie procedur analitycznych prowadzi do sukcesu, którego miarą jest wysoki standard prac analitycznych, znajdujących swoje odzwierciedlenie w poziomie ekspertyz opracowywanych dla potrzeb toksykologicznego opiniowania sądowo-lekarskiego. Należy także podkreślić, że procedury kontroli jakości wyników wydawanych przez laboratoria diagnostyczne są jednym z wymogów w skomplikowanej procedurze ubiegania się o akredytację.

PIŚMIENNICTWO

1. Dachs H., Kintz P.: Testing for drugs in hair
Critical review of chromatographic procedures since 1992, *Journal of Chromatography B*, 1998, 713, 147-161.
 2. Feyerherm F.: Improvements in the Determination of THC-COOH in Hair by 2D GC with Single Quadrupole MS Detection, Annual Meeting of Society of Hair Testing, Chicago 2004.
 3. Gaillard Y., Pepin G.: Testing hair for pharmaceuticals, *Journal of Chromatography B*, 1999, 733, 231-246.
 4. Huestis M.: Δ^9 -tetrahydrocannabinol and 11-nor-9-Carboxy-THC in Hair Prior to Following Controlled Cannabinoid Administration, Annual Meeting of Society of Hair Testing, Chicago 2004.
 5. Jurado C., Sachs H.: Proficiency test for the analysis of hair for drugs of abuse, organized by the Society of Hair Testing, *Forensic Science International* 2003, 133, 175-178.
 6. Kłys M., Rojek S., Kulikowska J., Brożek E.: Usefulness of multi-parameter opiate analysis in hair of drug users and victims of fatal poisonings, *Przeegląd Lekarski*, 2005, 62, 6, 585-590.
 7. Moffat A. C., Oseelton M. D., Widdop B. (Eds): *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*, 3rd ed. (vol. 1), Pharmaceutical Press. London 2004, 8, 124-133.
 8. Nakahara Y.: Hair analysis for abused and therapeutic drugs, *Journal of Chromatography B*, 1999, 733, 161-180.
 9. Polskie Centrum Akredytacji – Dokumenty stosowane przy ocenie laboratoriów badawczych – www.pca.gov.pl/start.php.
 10. Smeal S.: Hair Analysis: Cannabinoids, Annual Meeting of Society of Hair Testing, Chicago 2004.
 11. Stanaszek R.: Włosy jako materiał badawczy w analizie środków uzależniających, Praca doktorska, Wydział Chemii UJ, Kraków 2001.
 12. Towarzystwa Badania Włosów (SoHT) – Consensus on Hair Analysis – www.soht.org/?ref=soft-tox.
 13. Towarzystwa Badania Włosów (SoHT) – Statement – www.soht.org/?ref=soft-tox.
 14. Uhl M.: Tandem mass spectrometry: a helpful tool in hair analysis for the forensic expert, *Forensic Science International*, 2000, 107, 169-179.
- Wytyczne dla medycznych laboratoriów diagnostycznych obowiązujące przy ubieganiu się o akredytację – www.diagnostykalab.pl/diagnost/edukacja/akredytacja/akredytacja.htm.