



archiwum medycyny sądowej i kryminologii

Opis przypadku
Case report

Marzena Sykutera, Przemysław Piotrowski, Elżbieta Bloch-Bogusławska

Oznaczanie kokainy i benzoilekgoniny w paznokciach metodą chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrem mas z jonizacją przez elektrorozpylanie

Determination of cocaine and benzoylecgonine in nails by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry

Katedra Medycyny Sądowej, *Collegium Medicum* w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Polska
Chair of Forensic Medicine, *Collegium Medicum* in Bydgoszcz, Nicolaus Copernicus University in Torun, Poland

Streszczenie

Paznokcie obok włosów są materiałem biologicznym, którego analiza daje możliwość potwierdzenia przyjęcia ksenobiotyku nawet po kilku miesiącach od ich zażycia. Wyniki analizy paznokci mogą być wykorzystane np. jako dowód w sprawach z zakresu prawa cywilnego i karnego, w których fakt zażywania narkotyków w przeszłości może wpłynąć na decyzję sądu.

W pracy przedstawiono wyniki badań próbki paznokci pobranej od mężczyzny, który był podejrzany o handel kokainą i wprowadzenie jej do obrotu. Mężczyzna przyznał się, że narkotyk posiadał na własny użytek, ponieważ jest uzależniony od kokainy. Analiza paznokci metodą chromatografii cieczowej z detektorem mas (LC-ESI-MS) wykazała obecność kokainy w stężeniu 47 ng/mg oraz benzoilekgoniny w stężeniu 14 ng/mg.

Słowa kluczowe: kokaina, benzoilekgonina, LC-ESI-MS, paznokcie rąk.

Abstract

Nails and hair are a biological matrix which can be analyzed to confirm the use of a xenobiotic even several months after intake. Results of nail analysis can be used, for example, as evidence in civil and criminal law cases in which a history of drug use can influence the court's decision.

The paper presents results of analysis of a nail sample taken from a man who was suspected of trafficking cocaine. The suspect pleaded guilty to the possession of the drug for his own use because, as he claimed, he was addicted to cocaine. A nail sample was taken. Detection and quantification were carried out using liquid chromatography-mass spectrometry (LC-ESI-MS). The concentration of cocaine in nails was found to be 47 ng/mg, and benzoylecgonine – 14 ng/mg.

Key words: cocaine, benzoylecgonine, LC-ESI-MS, fingernails.

Wstęp

Badania prowadzone przez wielu autorów [1–12] dowodzą, że paznokcie są cennym materiałem biologicznym w toksykologii sądowej. Paznokcie obok włosów są materiałem biologicznym, którego analiza daje możliwość potwierdzenia przyjęcia ksenobiotyku, nawet po kilku miesiącach od jego zażycia. W przypadku włosów, mając na uwadze tempo ich wzrostu, każdy centymetr zawiera informację na temat mniej więcej miesięcznej ekspozycji na ksenobiotyk. Paznokcie rosną wolniej. Średni dobowy przyrost płytki paznokciowej kciuka wynosi 0,1 mm na dobę, przeciętnie 0,5–1,2 mm na tydzień, natomiast paznokcie u nóg rosną 0,03–0,04 mm na dobę [6]. Tempo wzrostu zależy od wielu czynników, w tym m.in. od wieku, płci, diety, pory roku. Proces przenikania ksenobiotyków do paznokci przebiega kilkoma drogami [6]. Najważniejszą z nich jest wbudowywanie związków w strukturę paznokcia z krwi podczas dzielenia się komórek w macierzy. Ponadto ksenobiotyki osadzają się w dolnej części płytki paznokcia podczas przepływu krwi przez łożysko paznokcia. Wnikają również z łożu i potu [6].

Wyniki analizy paznokci mogą się okazać użyteczne wówczas, gdy zachodzi konieczność udzielenia odpowiedzi na pytanie, czy dana osoba zażywała narkotyki bądź leki w przeszłości. Mogą być wykorzystane jako dowód w sprawach z zakresu prawa cywilnego i karnego, w których fakt zażywania narkotyków w przeszłości może wpłynąć na decyzję sądu [12].

Niewątpliwą zaletą tego materiału biologicznego jest to, że pobieranie paznokci jest nieinwazyjne, a ich przechowywanie i transport nie wymagają szczególnych warunków. Ponadto paznokcie nie ulegają takim zmianom rozkładowym jak krew czy mocza.

Podczas analizy paznokci mogą się pojawić trudności w interpretacji wyników, które związane są przede wszystkim ze zjawiskiem kontaminacji próbek. Dlatego przed przystąpieniem do właściwej analizy próbki paznokcie muszą być poddane procedurze usuwania zanieczyszczeń z ich powierzchni. W tym celu najczęściej stosuje się kilkukrotne płukanie odpowiednio dobranym rozpuszczalnikiem, zwykle dichlorometanem [2, 12] lub metanolem [4, 5, 13].

Ze względu na niską stabilność kokainy w środowisku zasadowym [5, 14] istotne znaczenie podczas izolacji tego związku z materiału biologicznego ma odpowiedni dobór pH środowiska ekstrakcyjnego.

Introduction

Studies by many authors [1–12] have shown that nails are a valuable biological material in forensic medicine. Similarly to hair, nails are a biological matrix which can be analyzed to verify the use of a xenobiotic even several months after intake. Considering the hair growth rate, every centimetre of hair contains information about the exposure to a xenobiotic over a period of approximately one month. Nails, however, grow more slowly. The average growth rate of the thumb nail plate is 0.1 mm a day, and between 0.5 and 1.2 mm a week. In contrast, toenails grow at an average rate of 0.03–0.04 mm a day [6]. The nail growth rate depends on multiple factors including age, sex, diet and season of the year. Xenobiotics penetrate into nails by several mechanisms [6]. The main one is the incorporation of substances into the nail structure from blood during cell divisions in the matrix. Xenobiotics also become deposited in the lower part of the nail plate during blood flow through the nail bed. They penetrate from sebum and perspiration, too [6].

Results of nail analysis can be useful in situations that require determining whether a person has previously taken narcotics or medications. They can be used as evidence in civil and criminal law cases in which a history of drug-taking can impact the court's decision [12].

A definite advantage of this biological material is the fact that nail sampling is a non-invasive procedure, and the storage and transport of nails do not require any special conditions. Furthermore, nails are not susceptible to decomposition processes which affect blood or urine.

The analysis of nails can give rise to difficulties with the interpretation of results, related predominantly to potential sample contamination. This is why before undertaking the analysis proper, nail samples must undergo a procedure of removing contamination from the surface. To this aim, samples are washed several times with a properly selected solvent, usually dichloromethane [2, 12] or methanol [4, 5, 13].

Due to the low stability of cocaine in alkaline environments [5, 14], it is crucially important to ensure an appropriate pH of the extraction environment during the isolation of cocaine from this biological material. As shown in literature, in order to

Jak wynika z danych literaturowych, w celu powtarzalnej ekstrakcji paznokcie poddawano enzymatycznej hydrolizie przez 16 h w temperaturze 40°C [11]. Stosowana była również hydroliza kwaśna z 0,1 N HCl przez 16 h w temperaturze 56°C [12] lub z 37% HCl przez 30 minut w temperaturze 100°C [2]. Po etapie hydrolizy, kokainę i jej metabolity izolowano z próbki z użyciem ekstrakcji ciecz–ciecz przy pH 8–9 [2, 12] oraz ekstrakcji do fazy stałej [2–5, 11, 13].

Dotychczas do oznaczania kokainy i benzoilekgoniny w paznokciach wykorzystywano chromatografię gazową sprzężoną z detektorem mas (GC-MS) [2–5, 12, 13]. W niniejszej pracy do oznaczenia kokainy i jej metabolitu wykorzystano chromatografię cieczową sprzężoną ze spektrometrem mas z jonizacją przez elektrorozpylanie (LC-ESI-MS).

Opis przypadku

Mężczyzna został zatrzymany pod zarzutem handlu kokainą i wprowadzenia do obrotu znacznej ilości tego narkotyku, za co groziła mu kara pozbawienia wolności do lat 10. Broniąc się przed tym zarzutem, mężczyzna oświadczył, że regularnie od 3 lat zażywa kokainę. Aby zweryfikować jego zeznania, pobrano od niego próbkę paznokci (nie było możliwości pobrania próbki włosów) w celu przeprowadzenia badań mających potwierdzić, czy jest uzależniony od kokainy.

Materiał i metody

Odczynniki

Substancje wzorcowe kokainy, benzoilekgoniny, amfetaminy-D5 o stężeniu 1 mg/ml pochodziły z firmy Cerilliant (Texas, USA). Metanol, acetonitryl, chloroform, izopropanol, heptan, kwas trifluorooctowy (TFA) zakupiono w firmie Sigma Aldrich (St. Louis, USA).

Jako standard wewnętrzny podczas oznaczania kokainy i benzoilekgoniny stosuje się deuterowane analogi kokainy czy benzoilekgoniny [3–5, 11–13]. Jednak w niniejszych badaniach napotkano na trudności w doborze standardu wewnętrznego. Analiza ekstraktów próbek paznokci niezawierających ani substancji oznaczanych, ani wzorca wewnętrznego, pochodzących z 6 różnych źródeł, prowadzona

ensure repeatable extraction, nails were subjected to enzymatic hydrolysis at a temperature of 40°C for 16 h [11]. Another method was acidic hydrolysis with 0.1 N HCl at 56°C for 16 h [12] or with 37% HCl at 100°C for 30 min [2]. On completion of the stage of hydrolysis, cocaine and its metabolites were isolated from the sample using the liquid-liquid extraction at the pH of 8–9 [2, 12], as well as solid-phase extraction [2–5, 11, 13].

Until now, cocaine and benzoylecgonine in nails have been quantified by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) [2–5, 12, 13]. In the present study, cocaine and its metabolite have been determined by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS).

Case report

A man was arrested on the charge of cocaine trafficking and supplying a large quantity of the drug on the market, which carries a penalty of imprisonment for a term of up to 10 years. Defending himself against the charge, the man stated that he had been a regular cocaine user for the past three years. To verify the suspect's statements, a nail sample was collected (there was no possibility of collecting a sample of hair) in order to conduct tests verifying whether he was indeed a cocaine addict.

Material and methods

Reagents

Forensic reference standards of cocaine, benzoylecgonine and amphetamine-D5 at a concentration of 1 mg/ml were sourced from Cerilliant (Texas, USA). Methanol, acetonitrile, chloroform, isopropanol, heptane and trifluoroacetic acid (TFA) were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, USA).

The quantification of cocaine and benzoylecgonine is performed with deuterated analogues of cocaine and benzoylecgonine as the internal standard [3–5, 11–13]. The present study, however, encountered problems with the selection of an internal standard. An analysis of extracts of nail samples containing neither the analyzed substances nor the internal standard, which were obtained from 6 dif-

w trybie monitorowania wybranych jonów (SIM) (m/z 293 dla benzoiliekgoniny-D3, 298 dla benzoiliekgoniny-D8, 307 dla kokainy-D3 i 312 dla kokainy-D8) wykazała obecność pików interferujących z pikami dla deuterowanych analogów kokainy i benzoiliekgoniny. W związku z tym w badaniach jako wzorca wewnętrznego użyto amfetaminy-D5. W tym przypadku nie zaobserwowano interferujących pików pochodzących od matrycy biologicznej.

Przygotowanie materiału do badań

Do badań przekazano obcięte fragmenty paznokci (89 mg) o długości 1–2 mm, pobrane z prawej i lewej ręki. W celu usunięcia zanieczyszczeń próbkę paznokci przed ekstrakcją przemyto dwukrotnie 5 ml wody, następnie trzykrotnie dichlorometanem (po 5 ml). Procedurę przeprowadzono w łaźni ultradźwiękowej (10 min). Roztwór dichlorometanu otrzymany po trzecim przemyciu próbki paznokci odparowano do sucha w temperaturze 20–25°C w strumieniu azotu. Pozostałość po odparowaniu rozpuszczono w 100 μ l metanolu i poddano analizie w celu stwierdzenia obecności kokainy i benzoiliekgoniny pochodzącej z ewentualnych zewnętrznych zanieczyszczeń.

Wysuszone paznokcie pocięto nożyczkami na drobne fragmenty (1–2 mm). Do próbek paznokci (50 mg) umieszczonych w probówkach o pojemności 7 ml dodano 50 μ l wzorca wewnętrznego (10 μ g/ml amfetaminy-D5) oraz 2 ml 0,1 M HCl i inkubowano przez 10 h w temperaturze 56°C. Ochłodzone próbki odwirowano, a otrzymany roztwór poddano ekstrakcji z użyciem 5 ml mieszaniny chloroform : izopropanol : heptan (50 : 17 : 33, v/v/v) w środowisku zasadowym (2 ml 1 M buforu fosforanowego pH = 8,4) w łaźni ultradźwiękowej przez 30 minut. Fazę organiczną odparowano do sucha w temperaturze 20–25°C w strumieniu azotu. Pozostałość po odparowaniu rozpuszczono w 200 μ l metanolu.

Analiza metodą LC-ESI-MS

Do badań użyto zestawu chromatograficznego składającego się z chromatografu cieczowego 1100 Series (Agilent Technologies, Niemcy) wyposażonego w binarną pompę gradientową, autosampler, termostat oraz spektrometr mas z pojedynczym kwadrupolem 1100 MSD z jonizacją przez elektro-

ferent sources, conducted by selected-ion monitoring (SIM) (m/z 293 for benzoylecgonine-D3, 298 for benzoylecgonine-D8, 307 for cocaine-D3 and 312 for cocaine-D8), demonstrated the presence of peaks interfering with the peaks for deuterated analogues of cocaine and benzoylecgonine. Consequently, amphetamine-D5 was used in the tests as the internal standard. In this case, no interfering peaks relating to the biological matrix were observed.

Preparation of material for tests

The material supplied for testing consisted of cut fingernail fragments (89 mg), 1–2 mm long, sampled from the right and left hands. To remove contamination, before the extraction procedure, the nail sample was washed twice with 5 ml of water, and then three times with dichloromethane (5 ml portions). The procedure was carried out in the ultrasonic bath (10 min). The dichloromethane solution obtained after the third washing of the nail sample was evaporated to dryness at a temperature of 20–25°C in nitrogen stream. Evaporation residues were dissolved in 100 μ l of methanol and analyzed to determine the presence of cocaine and benzoylecgonine originating from possible external contamination.

Dried nails were cut with scissors into small pieces (1–2 mm). Nail samples (50 mg) placed in 7 ml test tubes were combined with 50 μ l of the internal standard (10 μ g/ml of amphetamine-D5) and 2 ml of 0.1 M HCl, and incubated for 10 h at a temperature of 56°C. Cooled samples were centrifuged, and the solution thus obtained was subjected to extraction with 5 ml of the chloroform : isopropanol : heptane mixture (50 : 17 : 33, v/v/v) in an alkaline environment (2 ml of 1 M phosphate buffer with pH = 8.4) in the ultrasonic bath for 30 minutes. The organic phase was evaporated to dryness at a temperature of 20–25°C in the nitrogen stream. The evaporation residues were dissolved in 200 μ l of methanol.

Analysis by LC-ESI-MS

The tests were performed using a chromatography system consisting of 1100 series liquid chromatography system (Agilent Technologies, Germany) equipped with a binary gradient pump, autosampler, thermostat, and 1100 MSD single quadrupole mass spectrometer with electrospray

rozpylanie (Agilent Technologies, Niemcy). Analizę przeprowadzono w następujących warunkach: kolumna – Zorbax Eclipse XDB C18 (150 mm × 4,6 mm; 5 μm, Agilent Technologies, Niemcy), faza ruchoma 0,1% TFA/acetonitryl (70 : 30, v/v), przepływ fazy ruchomej 0,4 ml/min. Objętość nastrzyku wynosiła 10 μl. Parametry detektora mas: napięcie fragmentatora 70 V, napięcie kapilary 4 kV, temperatura N₂ 350°C, ciśnienie nebulizera 30 psi, przepływ gazu suszącego 12 l/min. Detekcję prowadzono w trybie monitorowania wybranych jonów (SIM) m/z 304 dla kokainy, m/z 290 dla benzoiloekgoniny oraz m/z 141 dla IS. Wyniki rozdziału chromatograficznego przedstawiono na rycinie 1.

Walidacja metody

Do walidacji metody wykorzystano próbki kontrolne – paznokcie pobrane od osób, które nie przyjmowały kokainy.

Do wykonania krzywej wzorcowej przygotowano próby wzorcowe paznokci zawierające kokainę i benzoiloekgoninę o stężeniu 0,5 ng/mg, 5 ng/mg, 10 ng/mg, 50 ng/mg, 100 ng/mg oraz 50 μl wzorca wewnętrznego (10 μg/ml amfetamina-D5). Tak przygotowane próby analizowano w identycznych warunkach jak próbkę badaną.

Odzysk kokainy i benzoiloekgoniny z próbek paznokci badano na dwóch poziomach stężeń 5 ng/ml i 50 ng/ml. Odzysk obliczono przez porównanie wyników otrzymanych dla próbek paznokci, do których dodano roztwory wzorcowe kokainy i benzoiloekgoniny przed inkubacją w temperaturze 56°C i ekstrakcją, z wynikami dla próbek z wzorcami dodanymi po ekstrakcji. Obliczony w ten sposób odzysk odzwierciedla rzeczywistą wydajność ekstrakcji, wolną od wpływu materiału biologicznego. Parametry walidacyjne metody przedstawiono w tabeli I.

Wyniki i dyskusja

Analizę kokainy i benzoiloekgoniny w paznokciach przeprowadzono z wykorzystaniem chromatografii cieczowej ze spektrometrem mas z jonizacją przez elektrorozpylanie. Pięciopunktowa krzywa kalibracyjna dla kokainy i benzoiloekgoniny wykazywała liniowy przebieg w badanym zakresie stężeń (0,5 ng/mg – 100 ng/mg). Współczynnik korelacji *r*

ionization (Agilent Technologies, Germany). The analysis was carried out in the following conditions: column – Zorbax Eclipse XDB C18 (150 mm × 4.6 mm; 5 μm, Agilent Technologies, Germany), mobile phase 0.1% TFA/acetonitrile (70 : 30, v/v), mobile phase flow rate 0.4 ml/min. The volume of the injection was 10 μl. Mass detector parameters: fragmenter voltage 70 V, capillary voltage 4 kV, temperature N₂ 350°C, nebulizer pressure 30 psi, drying gas flow rate 12 l/min. Detection was conducted in the selected-ion monitoring (SIM) mode: m/z 304 for cocaine, m/z 290 for benzoylecgonine, and m/z 141 for IS. Results of chromatographic separation are shown in Figure 1.

Validation of the method

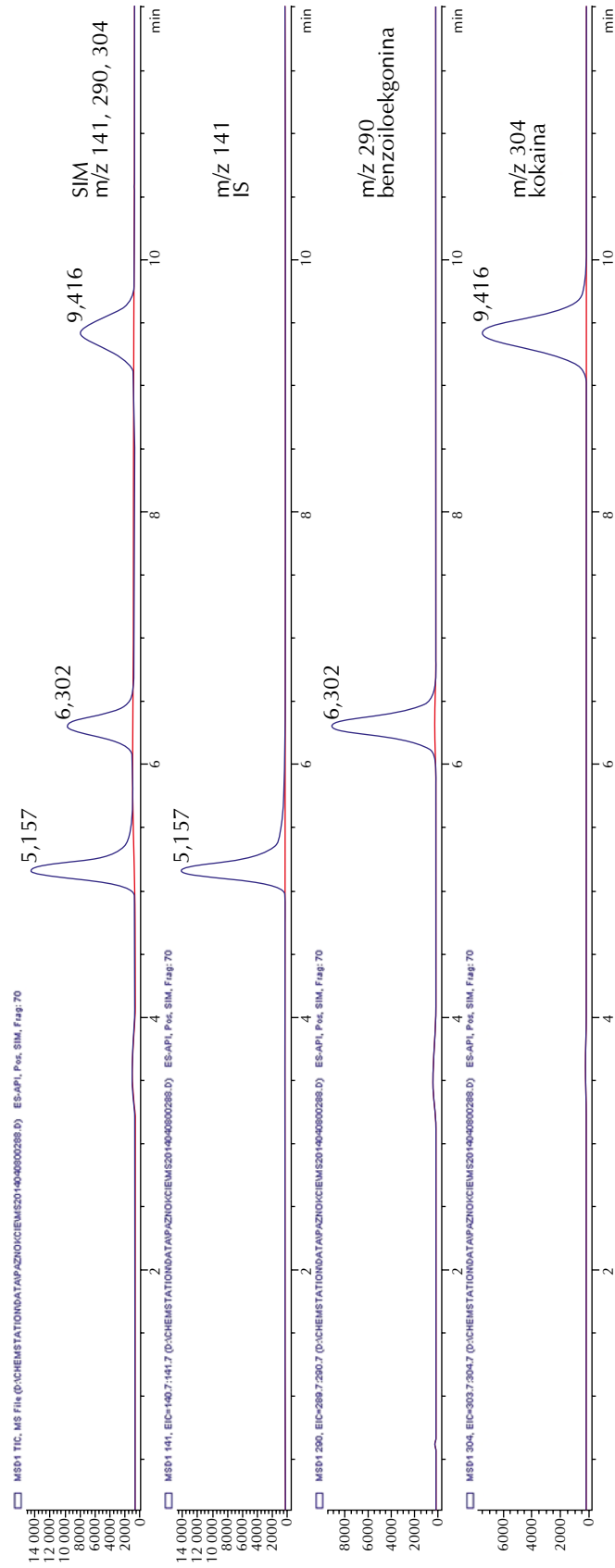
Validation of the method was performed with control samples of nails collected from cocaine non-users.

In order to plot calibration lines, standard samples of nails were prepared, containing cocaine and benzoylecgonine at a concentration of 0.5 ng/mg, 5 ng/mg, 10 ng/mg, 50 ng/mg, 100 ng/mg, and 50 μl of the internal standard (10 μg/ml amphetamine-D5). The samples prepared in this manner were analyzed in identical conditions as the test sample.

The recovery of cocaine and benzoylecgonine from nail samples was studied at two concentration levels: 5 ng/ml and 50 ng/ml. The recovery was calculated by comparing results obtained for nail samples combined with standard solutions of cocaine and benzoylecgonine before incubation at 56°C and extraction, and results recorded for samples with standards added after the extraction process. The recovery calculated in this way reflects the actual yield of extraction, free from the influence of the biological material. The methods' validation parameters are listed in Table I.

Results and discussion

The analysis of cocaine and benzoylecgonine in nails was conducted by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. A five-point calibration curve for cocaine and benzoylecgonine demonstrated linearity in the studied concentration range (0.5 ng/mg – 100 ng/mg). The correlation coefficient (*r*) for cocaine and ben-



Rycina 1. Chromatogramy monitorowanych jonów otrzymane w wyniku analizy LC-ESI-MS próbki paznokci pobranej od mężczyzny
Figure 1. Selected ion monitoring chromatograms obtained for LC-ESI-MS analysis of nails taken from the man

Tabela 1. Parametry walidacyjne oznaczania kokainy i benzoiloeogoniny w paznokciach metodą LC-ESI-MS
Table 1. Validation parameters of determination of cocaine and benzoylecgonine in the nails by LC-ESI-MS

Parametr Parameter	Kokaina Cocaine	Benzoiloeogonina Benzoylecgonine
LOD (ng/mg)	0,1	0,1
LOQ (ng/mg)	0,5	0,5
równanie krzywej kalibracyjnej calibration line equation	$y = 0,5799x + 0,5556$	$y = 0,0984x + 0,0861$
zakres liniowości (ng/mg) limit of linearity	0,5–100	0,5–100
współczynnik korelacji <i>r</i> coefficient of correlation	0,999	0,999
odzysk (%) (<i>n</i> = 3) recovery (%) (<i>n</i> = 3) 5 ng/mg 50 ng/mg	98,5 ±0,86 89,2 ±0,52	93,9 ±2,9 83,9 ±1,4
precyzja wewnątrz serii CV (%) (<i>n</i> = 3) intraday precision, CV (%) (<i>n</i> = 3) 5 ng/mg 50 ng/mg	3,2 1,8	4,4 1,9
precyzja między seriami CV (%) (<i>n</i> = 3 × 3) interday precision, CV (%) (<i>n</i> = 3 × 3) 5 ng/mg 50 ng/mg	4,7 2,9	5,1 4,7

dla kokainy i benzoiloeogoniny wynosił 0,999. Granica wykrywalności (LOD) kokainy i benzoiloeogoniny w paznokciach wynosiła 0,1 ng/mg ($S/N = 3$). Jako granicę oznaczalności przyjęto najniższy punkt krzywej kalibracyjnej (0,5 ng/mg). Precyzję w seriach wewnątrz- i międzygrupowych obliczono na podstawie serii trzech powtórzeń ($n = 3$) analiz prób paznokci na dwóch poziomach stężeń. Serie powtarzono trzykrotnie w różnych dniach ($p = 3$). Wyznaczone precyzje w seriach wewnątrzgrupowych dla kokainy i benzoiloeogoniny nie przekraczały 4,4%, a w seriach międzygrupowych nie były wyższe niż 5,1%. Odzysk kokainy i benzoiloeogoniny oznaczony dla stężenia 0,5 ng/mg i 50 ng/mg był wyższy niż 83,9%. Przeprowadzono również ekstrakcję 6 kontrolnych próbek paznokci pobranych od osób, które nie zażywały kokainy. Na chromatogramach ekstraktów próbek paznokci nie zaobserwowano pików interferencyjnych pochodzących od matrycy biologicznej.

Jak wykazały badania prowadzone przez Engelhart i Jenkins [4], mało znaczącym mechanizmem inkorporacji kokainy w płytkę paznokcia jest zanieczyszczenie zewnętrzne.

zoylecgonine was 0.999. The limit of detection (LOD) of cocaine and benzoylecgonine in the nails was 0.1 ng/mg ($S/N = 3$). The lowest point in the calibration curve (0.5 ng/mg) was adopted as the limit of quantification (LOQ). Intra- and interday precision was calculated on the basis of series of three replicates ($n = 3$) of nail sample analyses at two concentration levels. The series were replicated three times on different days ($p = 3$). Precision determined in intraday series for cocaine and benzoylecgonine did not exceed 4.4%, and in interday series it was not higher than 5.1%. The recovery of cocaine and benzoylecgonine determined for the concentrations of 0.5 ng/mg and 50 ng/mg exceeded 83.9%. Six control samples of nails collected from cocaine non-users were also subjected to extraction. Chromatograms recorded for nail sample extracts showed no interfering peaks caused by the biological matrix.

As demonstrated by Engelhart and Jenkins [4], external contamination is an insignificant mechanism of cocaine incorporation into the nail plate.

The sample of nails collected from the man in the case discussed here was found to contain

W próbce paznokci pobranej od mężczyzny stwierdzono obecność kokainy w ilości 47,5 ng/mg oraz jej metabolitu benzoiloekgoniny w ilości 14,9 ng/mg. W popłuczynach uzyskanych po trzecim myciu paznokci nie odnotowano obecności kokainy i benzoiloekgoniny. Fakt ten świadczy o tym, że kokaina stwierdzona w paznokciach nie pochodziła z zewnętrznego zanieczyszczenia, ale została wbudowana w strukturę paznokcia.

Paznokcie mogą być pobierane do badań poprzez zeszkrobanie płytki paznokcia [11] lub obcięcie wolnego brzegu paznokcia [4, 5, 12, 13]. Ropero-Miller i wsp. [11] analizowali próbki paznokci pobrane od osób, którym podano kokainę w postaci iniekcji podskórnej. Próbkę pobierano poprzez zeszkrobanie płytki paznokci z użyciem skalpela. Obecność kokainy w paznokciach stwierdzono w próbkach pobranych po upływie 3 dni od przyjęcia tego związku. Analiza obciętych fragmentów paznokci, biorąc pod uwagę średnie tempo wzrostu paznokci, daje natomiast możliwość potwierdzenia przyjęcia ksenobiotyku w okresie 3–6 miesięcy przed pobraniem próbki [3, 6, 12]. W omawianym w niniejszej pracy przypadku do badań przekazano obcięte fragmenty paznokci o długości 1–2 mm, można zatem przyjąć zgodnie z danymi literaturowymi, że mężczyzna mógł przyjmować kokainę 3–6 miesięcy przed pobraniem próbki do badań.

Oznaczanie kokainy i jej metabolitów w paznokciach było przedmiotem nielicznych prac. Analizę paznokci pobranych od osób uzależnionych od kokainy przeprowadzili w 1998 r. Engelhart i wsp. [5], stwierdzając obecność kokainy w stężeniach 0,2–140,17 ng/mg i benzoiloekgoniny w stężeniach 0,3–315,44 ng/mg. W 2002 r. Engelhart i Jenkins [4] opublikowali również wyniki badań paznokci pobranych ze zwłok osób, które zmarły wskutek przedawkowania narkotyków. Analiza wykazała obecność kokainy i benzoiloekgoniny w granicach stężeń odpowiednio 1,2–414,1 ng/mg oraz 1,4–170,3 ng/mg. Ragoucy-Sengler i wsp. [12] analizowali paznokcie pobrane od dwóch osób, które paliły kokainę. Analiza wykazała obecność kokainy w stężeniu 28,7 ng/mg i 34,5 ng/mg oraz benzoiloekgoniny w stężeniu 7,3 ng/mg i 17,9 ng/mg. Garside i wsp. [3] w swoich badaniach wykazali, że stężenie kokainy w paznokciach jest większe niż stężenie jej metabolitu – benzoiloekgoniny. Obliczyli, że stosunek stężenia kokainy do stężenia benzoiloekgoniny wynosi 2–10 : 1.

47.5 ng/mg of cocaine and 14.9 ng/mg of its metabolite benzoylecgonine. Washings obtained after the third washing of the nails did not contain any cocaine or benzoylecgonine. This finding shows that cocaine detected in the nails was not an effect of external contamination but had been embedded into the nail structure.

Nail samples can be collected for tests either by scraping the nail plate [11] or cutting off the free nail margin [4, 5, 12, 13]. Ropero-Miller *et al.* [11] analyzed nail samples collected from individuals who had been administered cocaine in the form of a subcutaneous injection. Samples were collected by scraping the nail plate using a scalpel. The presence of cocaine in the nails was detected in samples collected 3 days after the administration of the substance. Considering the moderate nail growth rate, an analysis of cut nail fragments offers a possibility of verifying the use of a xenobiotic during a period of 3–6 months preceding sample collection [3, 6, 12]. In the case discussed in this paper, material submitted for tests consisted of cut nail fragments with a length of 1–2 mm. Consequently, based on literature data, it can be assumed that the man could have used cocaine during the period of 3–6 months prior to the collection of the sample for tests.

There are only a few studies investigating the detection of cocaine and its metabolites in nails. An analysis of nails collected from cocaine addicts was conducted in 1998 by Engelhart *et al.* [5]. Cocaine was found at concentrations in the range of 0.2–140.17 ng/mg, and benzoylecgonine – at concentrations of 0.3–315.44 ng/mg. In 2002, Engelhart and Jenkins [4] published results of analysis of nail samples collected from bodies of drug overdose victims. The analysis found cocaine and benzoylecgonine in the concentration ranges of 1.2–414.1 ng/mg and 1.4–170.3 ng/mg, respectively. Ragoucy-Sengler *et al.* [12] analyzed the nails of two cocaine smokers. The researchers detected cocaine in concentrations of 28.7 ng/mg and 34.5 ng/mg, and benzoylecgonine in concentrations of 7.3 ng/mg and 17.9 ng/mg. Garside *et al.* [3] conducted a study which demonstrated that the concentration of cocaine in nails was higher than the concentration of its metabolite benzoylecgonine. The ratio between cocaine and benzoylecgonine concentrations was calculated to be 2–10 : 1. In the case investigated in the present paper, the cal-

Obliczony stosunek stężenia kokainy do stężenia benzoilekgoniny dla przedstawionego przypadku wynosił 3 : 1, a zatem nie odbiegał od wartości podanych przez Garside i wsp. [3].

Wnioski

Obecność kokainy i jej metabolitu w analizowanych obciętych fragmentach paznokci wskazuje na to, iż mężczyzna mógł przyjmować kokainę co najmniej 3–6 miesięcy przed pobraniem paznokci do badań.

Opracowana metoda oznaczania kokainy i benzoilekgoniny w paznokciach może być stosowana do oznaczania tych związków w próbkach pobranych od osób, u których zachodzi podejrzenie zażywania kokainy w przeszłości.

Autorzy deklarują brak konfliktu interesów.

culated ratio between cocaine and benzoylecgonine concentrations was 3 : 1, and thus did not deviate from the values reported by Garside *et al.* [3].

Conclusions

The presence of cocaine and its metabolite in the cut nail fragments analyzed in the study shows that the man concerned could have used cocaine for at least 3–6 months prior to the sampling of nails for tests.

The method of cocaine and benzoylecgonine quantification reported in the study can be used for identifying the two compounds in samples collected from people who are suspected of past cocaine use.

The authors declare no conflict of interest.

Piśmiennictwo

References

1. Chen H, Xiang P, Shen M. Determination of clozapine in hair and nail: The role of keratinous biological material in the identification of a bloated cadaver case. *J Forensic Leg Med* 2014; 22: 62-67.
2. Cingolani M, Scavella S, Mencarelli R, Mirtella D, Frolidi R, Rodriquez D. Simultaneous detection and quantitation of morphine, 6-acetylmorphine, and cocaine in toenails: comparison with hair analysis. *J Anal Toxicol* 2004; 28: 128-131.
3. Garside D, Ropero-Miller JD, Goldberger BA, Hamilton WF, Maples WR. Identification of cocaine analytes in fingernail and toenail specimens. *J Anal Toxicol* 1998; 5: 974-979.
4. Engelhart DA, Jenkins AJ. Detection of cocaine analytes and opiates in nails from postmortem cases. *J Anal Toxicol* 2002; 26: 489-492.
5. Engelhart DA, Lavins ES, Sutheimer CA. Detection of drugs of abuse in nails. *J Anal Toxicol* 1998; 22: 314-318.
6. Palmeri A, Pichini S, Pacifici, Zuccaro P, Lopez A. Drugs in nails, physiology, pharmacokinetics and forensic toxicology. *Clin Pharmacokinet* 2000; 38: 95-110.
7. Pufal E. Determination of medicines in epidermis products and their usefulness in forensic toxicology. *Problems of Forensic Sciences* 2002; 52: 7-20.
8. Pufal E. Research on the determination of xenobiotics in epidermal products and their usefulness in forensic toxicology. *Problems of Forensic Science* 2004; 59: 38-49.
9. Pufal E, Sykutera M, Piotrowski P. Opracowanie metody oznaczania leków przeciwdepresyjnych w paznokciach i jej wykorzystanie w toksykologii sądowej. *Arch Med Sąd Kryminol* 2008; 58: 167-170.
10. Pufal E, Sykutera M, Nowacka T, Stefanowicz A, Śliwka K. Opracowanie metody oznaczania citalopramu i desmetylocitalopramu w paznokciach i włosach i jej wykorzystanie w toksykologii sądowej. *Arch Med Sąd Kryminol* 2010; 60: 216-222.
11. Ropero-Miller JD, Goldberger BA, Cone EJ, Joseph RE. The disposition of cocaine and opiate analytes in hair and fingernails of humans following cocaine and codeine administration. *J Anal Toxicol* 2000; 24: 496-508.
12. Ragoucy-Sengler C, Kintz P. Detection of smoked cocaine marker (anhydroecgonine methylester) in nails. *J Anal Toxicol* 2005; 29: 765-768.
13. Campos SV, Yonamine M, De Moraes Moreau RL, Silva OA. Validation of a method to detect cocaine and its metabolites in nails by gas chromatography-mass spectrometry. *Forensic Sci Int* 2006; 159: 218-222.
14. Kiszka M, Buszewicz G, Mądro R. Stability of cocaine in blood and in other tissues. *Problems of Forensic Sciences* 2001; 45: 16-35.

Marzena Sykutera, Przemysław Piotrowski, Elżbieta Bloch-Bogusławska
Oznaczanie kokainy i benzoilokogoniny w paznokciach metodą chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrem mas z jonizacją przez elektrorozpylanie

Adres do korespondencji

Marzena Sykutera
Katedra Medycyny Sądowej
Collegium Medicum w Bydgoszczy
ul. M. Curie-Skłodowskiej 9
85-094 Bydgoszcz, Polska
e-mail: marzenasykutera@wp.pl

Address for correspondence

Marzena Sykutera
Chair of Forensic Medicine
Collegium Medicum in Bydgoszcz
M. Curie-Skłodowskiej 9
85-094 Bydgoszcz, Polska
e-mail: marzenasykutera@wp.pl

