



HAIR ANALYSIS AS CONFIRMATION OF LONG-TERM ATROPINE EXPOSURE – CASE STUDY

Agnieszka SKULSKA, Bogdan TOKARCZYK

Institute of Forensic Research, Kraków, Poland

Abstract

The subject, a 45-year-old male, had experienced unpleasant symptoms for a long time – always after a meal or drinking a beverage – e.g. anxiety, tachycardia, widely dilated and nonresponsive pupils, dizziness, nausea, blurred vision, loss of balance, dry mouth, dissociative hallucinations, and loss of consciousness. The described symptoms lasted from a few to several hours. The possibility of anticholinergic syndrome was considered, but urine toxicological screening for the most popular anticholinergic drugs (including atropine), which was carried out in the hospital, did not reveal any positive results. Neither blood nor urine, but only a strand of hair, was sent for analysis. Analyses of hair (divided into two segments) were conducted using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Atropine was found in both segments at concentrations of 25 (segment I) and 33 (segment II) pg/mg. There was no trace of scopolamine. The obtained results suggest that the subject had been consuming atropine from an unknown source for at least three months.

Key words

Atropine; Hair; LC-MS/MS.

Received 21 December 2016; accepted 20 April 2017

1. Introduction

Atropine is a tropane alkaloid which occurs naturally in certain plants from the nightshade family (*Solanaceae*), such as belladonna (*Atropa belladonna*), jimsonweed (*Datura stramonium*), moonflower (*Datura innoxia*), and henbane (*Hyoscyamus niger*; Henneberg, Skrzydlewska, 1984). It is also used in numerous pharmaceutical preparations in the form of injection solutions (in ampoules), eye drops, granules, pellets, and pills.

Atropine is a muscarinic receptor antagonist that selectively blocks parasympathetic system activity. It demonstrates dual action. Atropine has a parasympatholytic effect even at a low dosage – it inhibits salivary, lacrimal, bronchial, and sweat glands secretion, as well as intestinal motility. It relaxes smooth muscles of the respiratory tract, biliary duct, and urinary

tract, and dilates pupils, paralyzing the eye accommodation reflex. It also causes moderate tachycardia (up to 80–90 beats per minute). On the other hand, the stimulating effect on the central nervous system occurs after a relatively high dosage and results in quickening and deepening of breathing, heightened body temperature, intense erythema, psychomotor stimulation, cheerfulness and laughter, tachyphrenia (racing thoughts), the urge to talk and move, and mental confusion with accompanying high suggestibility and sensory disturbances manifesting as visual and auditory hallucinations (Rang, Dale, Ritter, 2001; Henneberg, Skrzydlewska, 1984; Mutschler, Geisslinger, Kroemer, Schäfer-Korting, 2001; Kostowski, 2001).

Due to the engendered effects, atropine has found a broad variety of uses in medicine; however, sometimes it is also used as an intoxicant (mostly in the form of nightshade family plant products containing

tropine alkaloids), inducing an excitatory state and hallucinations.

Cases of atropine and/or scopolamine poisonings have been noted in the literature – mostly poisonings caused by consumption of plant products, less often by administration of pharmaceutical preparations (Balikova, 2002; Steenkamp, Harding, van Heerden, van Wyk, 2004; Papoutsis et al., 2010; Skulska, Kała, Adamowicz, Chudzikiewicz, Lechowicz, 2007; Carlier et al., 2014). The papers cited above focus on atropine determination in blood, urine, and gastric contents.

The present paper presents hair test results for a man exposed to atropine. This kind of data has been presented in only a few papers, which mainly concerned poisonings by *Datura* (Ricard, Abe, Duverneuill-Mayer, Charlier, de la Grandmaison, Alvarez 2012; Kintz, Villain, Barguil, Charlot, Cirimele, 2006).

2. Case description

A 45-year-old male was hospitalised and tested at Emergency Rooms numerous times over a period of ten years, due to panic symptoms occurring after consumption of food or drink. The patient described the following symptoms: anxiety, tachycardia, facial pallor, conjunctival redness, blurred vision, heightened body temperature, urinary retention, dryness of mouth, nose, conjunctiva and palms, and occasional hallucinations and impairment of consciousness. These symptoms lasted, according to the patient, from a few to several hours. In hospital discharge summary reports, symptoms such as tachycardia up to 120/min, pupil dilation, and mucous membrane dryness were recorded. On account of the displayed symptoms, medical personnel diagnosed the patient with anticholinergic syndrome. Atropine toxicosis was ruled out after a urine test during hospitalisation. In connection with recurring health incidents, the attending physician made a decision to secure a hair sample and send it to the Institute of Forensic Research in order to run tests for atropine and scopolamine content.

All data available for the case have been presented above. Unfortunately, the Institute of Forensic Research received no information on the sensitivity, specificity, or kind of tests/analysis methods utilised at the hospital for testing urine.

3. Material and methods

3.1. Biological material

Control hair used in the development of the method came from individuals who were not taking any drugs, including atropine and scopolamine.

3.2. Reagents

Atropine and scopolamine (in the form of a free base and hydrochloride, respectively) were from Sigma-Aldrich Company (Warsaw, Poland), and fentanyl-D₅ from Cerilliant Company, LGC Promochem (Warsaw, Poland). Acetonitrile (MeCN) of a grade suitable for HPLC and 98–100% formic acid were from Merck Company (Warsaw, Poland), and isopropanol from Chempur Company (Piekary Śląskie, Poland).

3.3. Preparation of material for testing

The hair was washed once using 2 ml of isopropanol, then three times using 2 ml of phosphorus buffer solution (pH 7.4) each time, and then once again using 2 ml of isopropanol. Each phase lasted 15 min. Subsequently, the hair was dried. In order to detect possible external hair pollution, hair rinsings obtained during the last phase were analysed for the presence of atropine, scopolamine, and compounds encompassed by the utilised method. A hair sample of length 4 cm and weight 69.2 mg (after washing) was divided into two segments: s I (root to 2 cm) and s II (from 2 to 4 cm). The hair samples were ground separately and 0.1% formic acid in mixture water and acetonitrile (95:5) was added, followed by the internal standards (IS) – fentanyl-D₅. Hair samples were then incubated for 18 h at 37°C. After cooling, the samples were centrifuged and then 100 µl of supernatants were transferred to autosampler vial inserts.

3.4. Equipment and conditions of analysis

An Agilent Technologies 1200 Series liquid chromatograph coupled to a 6460 Triple Quad mass spectrometer was used for analysis. Separation was performed using a Kinetex C18 (100 × 4.6 mm, 4 µm) column. The mobile phase flowing through the column at 0.5 ml/min was a mixture of acetonitrile (MeCN) and water with addition of formic acid in an amount of 1 ml/l phase. The following gradient programme was utilised: 0 min – 5% MeCN, 2 min – 15% MeCN,

6 min – 98% MeCN, 6.5 min – 98% MeCN, 7 min – 5% MeCN, 15 min – 5% MeCN.

The injection volume was 10 μ l. The total analysis time equalled 15 min. The retention time (RT) of atropine and scopolamine amounted to 6.66 and 6.46 min, respectively, while the relative retention time (t_R) amounted to 0.92 and 0.89. Determination was carried out on the basis of m/z values of pseudo-molecular ions ($M + H^+$). Three MRM transitions for atropine and scopolamine, as well as two transitions for fentanyl- D_5 were monitored (as shown in table 1).

Table 1
MRM transitions and conditions for the measurement of atropine, scopolamine and the internal standard

Compound	MRM	Collision energy [eV]	Fragmentor voltage [V]
Atropine	290.2→124.1	20	149
	290.2→93.1	28	
	290.2→77.0	56	
Scopolamine	304.2→138.1	12	116
	304.2→156.1	8	
	304.2→103.0	36	
Fentanyl- D_5	342.3→105.1	36	128
	342.3→188.1	16	

3.5. Method validation

The LC-MS/MS method of atropine and scopolamine determination in hair was validated. The seven-point calibration curve stayed linear in the tested range, i.e. 10–100 pg/mg, and the coefficient of determination (R^2) was 0.99. The limit of detection (LOD) for atropine and scopolamine amounted to 1.5 and 1.0 pg/mg respectively, while the limit of quantitation was 4.5 and 3.5 pg/mg. The LOD was established for the concentration producing a detector signal (S) three times higher than the noise signal (N) – signal to noise $S/N=3$, while the LOQ was the concentration causing a detector signal ten times higher than the noise ($S/N=10$).

The recovery for a concentration of 10 pg/mg, which amounted to 52% for atropine and 55% for scopolamine, was determined using the following formula: $A_1/A_2 \times 100\%$, where A_1 is the surface area of an analyte from a hair sample free of analytes to which a standard was added, reaching a concentration of 10 pg/mg, and was then incubated; A_2 is the surface area of the analyte from a hair sample free of analytes which was incubated, and then had standard added to the macerate, reaching a concentration of 10 pg/mg.

The precision error (for five repetitions) determined for atropine and scopolamine for a concentration of 100 pg/mg was lower than 10%.

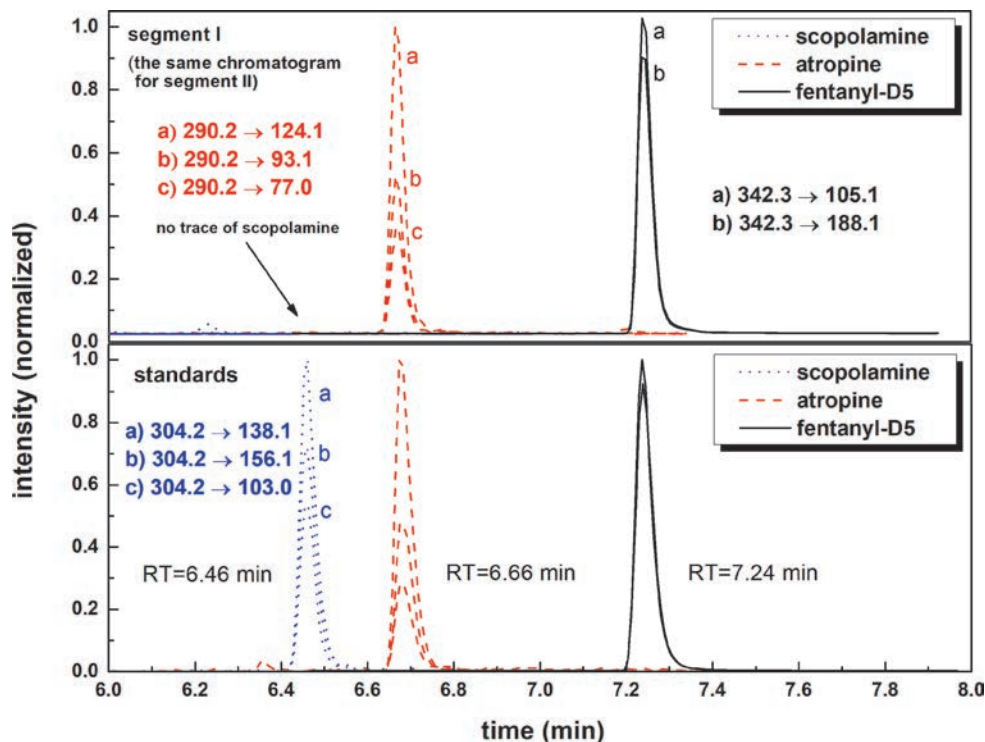


Fig. 1. Chromatograph of: A) a hair extract from the first segment (root to 2 cm) from the subject, B) drug-free hair spiked with atropine and scopolamine.

4. Results and discussion

Confirmation of xenobiotic exposure may be obtained up to a few months after exposure by, e.g. segmental analysis of hair.

In the discussed case, a strand of hair of 4 cm length was sent for analysis. However, the small amount of the secured hair meant that it could only be divided into two segments. As a result of analysis, the presence of atropine was confirmed in both segments at a concentration amounting to 25 pg/mg in segment I, and 33 pg/mg in segment II (Table 2). However, no traces of scopolamine were detected (Fig. 1). Rinsings obtained after washing the hair were tested for atropine, but no trace was found, which proves that the detected atropine did not originate from external contamination of the hair, but was isolated from its structure.

Table 2
Concentrations of atropine and scopolamine in hair segments in the presented case report

Segment	Atropine [pg/mg]	Scopolamine [pg/mg]
0 (root) to 2 cm	25	< LOD*
2 to 4 cm	33	< LOD

*LOD = 1 pg/mg

As has already been mentioned in the introduction, hair analysis for atropine presence has been the subject of only a few papers, which have focused primarily on poisoning by either *Datura innoxia* (Kintz et al., 2006) or *Datura stramonium* (Ricard et al., 2012). As data presented in Table 3 show, scopolamine is present in the hair of people consuming *Datura innoxia* and/or *Datura stramonium* brews. In the case described by Kintz et al. (2006), in which the man in question drank a brew prepared from six dried flowers of *Datura innoxia*, there was no trace of atropine in the hair. The authors explained that the lack of atropine in the hair was connected to its low content in flowers of *Datura innoxia*, i.e. 0.002 µg/g for atropine as compared to 0.346 µg/g for scopolamine. In the case described by Ricard et al. (2012), a man drank a brew made from *Datura stramonium*, and the authors obtained different results. All segments of tested hair contained from seven to fifteen times higher atropine concentration than scopolamine concentration. The differences in atropine and scopolamine concentrations in these two cases are a result of the consumption of products originating from two different plants, i.e. *Datura innoxia*

Table 3
Concentrations of atropine and scopolamine in hair segments after *Datura* intoxication

Segment	Atropine [pg/mg]	Scopolamine [pg/mg]	References
0 (root) to 3 cm	< LOD*	14	[Kintz et al., 2006]
3 to 6 cm	< LOD	48	
6 to 9 cm	< LOD	43	
0 (root) to 1.5 cm	15.0	1.0	[Ricard et al., 2012]
1.5 to 3.5 cm	9.9	1.2	
3.5 to 5.5 cm	8.4	1.2	
5.5 to 8 cm	11.4	1.3	

*LOD = 2 pg/mg

and *Datura stramonium*. While the main alkaloid in the flowers of *Datura innoxia* is scopolamine, for all parts of *Datura stramonium*, atropine is the predominant alkaloid (Miraldi, Masti, Ferri, Comparini, 2001).

In the case described in this paper, only the presence of atropine in the hair was confirmed. Absence of even traces of scopolamine may suggest that the man did not consume any *Datura* based plant products. In the case of consumption of either *Datura innoxia* or *Datura stramonium*, scopolamine should be present in the hair as well. Plants from the nightshade family other than *Datura* are also found in Poland, such as *Hyoscyamus niger* and *Atropa belladonna*, as mentioned in the introduction. However, both these plants, similarly to *Datura* species, contain both atropine and scopolamine.

Apart from plant products, pharmaceutical preparations could also have constituted a source of the man's exposure to atropine. In accordance with the Proclamation of the President of the Office for Registration of Medicinal Products, Medical Devices and Biocidal Products of April 12, 2013 concerning the publication of the official list of medicinal products approved for marketing in the Republic of Poland (Obwieszczenie Prezesa Urzędu Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych z dnia 12 kwietnia 2013 r. w sprawie ogłoszenia Urzędowego wykazu produktów leczniczych dopuszczonych do obrotu na terytorium Rzeczypospolitej Polskiej), products containing atropine or atropine sulphate are available on the Polish market. They are as follows: Atropinum sulfuricum WZF – injection solution in 0.5 mg/ml and 1 mg/ml doses; Atropinum sulfuricum WZF 1% – eye drops, 10 mg/ml; Reasec – combination drug, 25 µg, tablets; and Bellerog – combination drug, 0.1 mg, tablets. Tropane alka-

loids are available as well, mostly in the form of belladonna extracts (Belladonna and Belladonna-homaccord – homeopathic medicinal products; Kapsiplast – therapeutic plaster; Bellapan – tablets; and Spasticol – suppositories). All the aforementioned preparations, except for Kapsiplast and the homeopathic products, are prescription drugs (Rp). However, currently this is only a small impediment to their acquirement, since they are easily obtainable through e-commerce. Thus, based on the obtained results, the most probable scenario seems to be that the man was taking or being given a pharmaceutical preparation, the only (active) component of which was atropine. The question of the source of intoxication source cannot be answered unequivocally.

5. Summary

The obtained results of analysis show that the subject had been taking atropine from an undetermined source and in an unknown form for a few months. It is impossible to determine whether the subject consumed the atropine by choice or whether it was surreptitiously given to him by a third party. However, accidental atropine poisoning by plants from the *Solanaceae* family (e.g. *Datura stramonium*) can be ruled out, since in such a case scopolamine should have been present in the hair as well.

References

- Balikova, M. (2002). Collective poisoning with hallucinogenic herbal tea. *Forensic Science International*, 128, 50–52.
- Carlier, J., Escard, E., Peoc'h, M., Boyer, B., Romeuf, L., Faict, T., Guitton, J., Gaillard, Y. (2014). Atropine eye drops: an unusual homicidal poisoning. *Journal of Forensic Sciences*, 59(3), 859–864.
- Henneberg, M., Skrzydlewska, E. (1984). *Zatrucia roślinami wyższymi i grzybami*. Warszawa: Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich.
- Kintz, P., Villain, M., Barguil, Y., Charlot, J.-Y., Cirimle, V. (2006). Testing for atropine and scopolamine in hair by LC-MS-MS after *Datura innoxia* abuse. *Journal of Analytical Toxicology* 30, 454–457.
- Kostowski, W. (2001). *Farmakologia. Podstawy farmakoterapii. Podręcznik dla studentów medycyny i lekarzy*. Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL.
- Miraldi, E., Masti, A., Ferri, S., Comparini, I. B. (2001). Distribution of hyoscyamine and scopolamine in *Datura stramonium*. *Fitoterapia*, 72, 644–648.
- Mutschler, E., Geisslinger, G., Kroemer, H. K., Schäfer-Korting, M. (2001). *Farmakologia i toksykologia*. Wrocław: Wydawnictwo Medyczne Urban & Partner.
- Obwieszczenie Prezesa Urzędu Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych z dnia 12 kwietnia 2013 r. w sprawie ogłoszenia Urzędowego wykazu produktów leczniczych dopuszczonych do obrotu na terytorium Rzeczypospolitej Polskiej, Dz. U. MZ z 2013 r. poz.15.
- Papoutsis, I., Nikolaou, P., Athanaselis, S., Stefanidou, M., Pistos, C., Spiliopoulou, C., Maravelias, C. (2010). Mass intoxication with *Datura innoxia* – case series and confirmation by analytical toxicology. *Clinical Toxicology*, 48, 143–145, DOI: 10.3109/15563650903524134.
- Rang, H. P., Dale, M. M., Ritter, J. M. (2001). *Farmakologia kliniczna*. Lublin: Wydawnictwo Czelej.
- Ricard, F., Abe, E., Duverneuil-Mayer C., Charlier, P., de la Grandmaison, G., Alvarez, J. C. (2012). Measurement of atropine and scopolamine in hair by LC-MS/MS after *Datura stramonium* chronic exposure. *Forensic Science International*, 223, 256–260.
- Skulska, A., Kała, M., Adamowicz, P., Chudzikiewicz, E., Lechowicz, W. (2007). Oznaczanie Fentanylu, atropiny i skopolaminy w materiale biologicznym metodami LC-MS/APCI. *Przegląd Lekarski*, 64(4–5), 263–267.
- Steenkamp, P. A., Harding, N. M., van Heerden, F. R., van Wyk, B. E. (2004). Fatal *Datura* poisoning: identification of atropine and scopolamine by high performance liquid chromatography/photodiode array/mass spectrometry. *Forensic Science International*, 145, 31–39.

Corresponding author

Agnieszka Skulska
Instytut Ekspertyz Sądowych
ul. Westerplatte 9
PL 31-033 Kraków
e-mail: askulska@ies.krakow.pl

ANALIZA WŁOSÓW POTWIERDZENIEM DŁUGOTRWAŁEGO NARAŻENIA NA ATROPINĘ – OPIS PRZYPADKU

1. Wprowadzenie

Atropina jest alkaloidem tropanowym, który naturalnie występuje w niektórych roślinach z rodziny psiankowatych (*Solanaceae*), m.in. takich jak pokrzyk wilcza jagoda (*Atropa belladonna*), bielun dziedzierzawa (*Datura stramonium*), bielun indiański (*Datura innoxia*) czy też lulek czarny (*Hyoscyamus niger*, Henneberg, Skrzydlewska, 1984). Jest także składnikiem licznych preparatów farmaceutycznych, które mają postać roztworów do iniekcji w ampułkach, kropli do oczu czy też proszków, tabletek i drażetek.

Atropina jest antagonistą receptorów muskarynowych, blokuje wybiórczo aktywność układu parasympatycznego. Wykazuje działanie dwukierunkowe. Działa obwodowo porażająco (działanie to występuje już przy małych dawkach), hamując wydzielanie gruczołów ślinowych, łzowych, oskrzelowych i potowych; hamuje również perystaltykę jelit, rozkurcza mięśnie gładkie dróg oddechowych, żółciowych i moczowych, rozszerza źrenice, porażając akomodację. Wywołuje umiarkowaną tachykardię (do 80-90 uderzeń na minutę). Z kolei efekt pobudzający w ośrodkowym układzie nerwowym występuje po względnie dużych dawkach i objawia się przyspieszeniem oraz pogłębieniem oddechu; podwyższeniem temperatury ciała, intensywnym zaczerwienieniem skóry, pobudzeniem psychomotorycznym, wesołością i śmiechem, gonitwą myśli, chęcią mówienia i ruchu, stanami splątania z zaburzeniami zmysłów objawiającymi się halucynacjami wzrokowymi i słuchowymi oraz silnym uleganiem sugestiom (Rang, Dale, Ritter, 2001; Henneberg, Skrzydlewska, 1984; Mutschler, Geisslinger, Kroemer, Schäfer-Korting, 2001; Kostowski, 2001).

Ze względu na wywoływane efekty atropina znalazła szerokie zastosowanie w medycynie, ale bywa także wykorzystywana jako środek odurzający (głównie w postaci produktów roślinnych z rodziny psiankowatych zawierających alkaloidy tropanowe) umożliwiającą wprowadzenie się w stan pobudzenia z omamami i halucynacjami.

W piśmiennictwie odnotowywane były przypadki zatrucia atropiną i/lub skopolaminą. Dotyczą one głównie zatrucia na skutek zażycia produktów roślinnych, rzadziej preparatów farmaceutycznych (Balikova, 2002; Carlier i in., 2014; Papoutsis i in., 2010; Skulska, Kała, Adamowicz, Chudzikiewicz, Lechowicz, 2007; Steenkamp, Harding, van Heerden, van Wyk, 2004). Cytowane powyżej prace dotyczą oznaczeń atropiny we krwi, moczu i treści żołądkowej.

W niniejszej pracy przedstawiono wyniki badań włosów mężczyzny narażonego na działanie atropiny. Tego

typu dane były prezentowane w nielicznych pracach i dotyczyły głównie zatrucia bieluniem (Ricard, Abe, Duverneuil-Mayer, Charlier, de la Grandmaison, Alvarez 2012; Kintz, Villain, Barguil, Charlot, Cirimele, 2006).

2. Opis przypadku

45-letni mężczyzna w ciągu dziesięciu lat był wielokrotnie hospitalizowany lub diagnozowany w szpitalnych oddziałach ratunkowych z powodu napadów objawów pojawiających się po spożyciu posiłku lub wypiciu płynu. Pacjent zgłaszał następujące dolegliwości: uczucie niepokoju, szybkie bicie serca, blednięcie twarzy, zaczerwienienie spojówek, niewyraźne widzenie, czasem halucynacje i zaburzenia świadomości, suchość jamy ustnej, nosa, spojówek oraz dłoni, niemożność oddania moczu, podwyższoną ciepłotę ciała. Objawy te, według chorego, utrzymywały się od kilku do kilkunastu godzin. W kartach informacyjnych odnotowywano podczas napadów tachykardię do 120 uderzeń na minutę, rozszerzenie źrenic oraz suchość błon śluzowych. Ze względu na występujące objawy personel medyczny zdiagnozował zespół antycholinergiczny. Podejrzenie zatrucia atropiną wykluczono po badaniu moczu w trakcie hospitalizacji. W związku z powtarzającymi się incydentami zdrowotnymi lekarz podjął decyzję o zabezpieczeniu próbki włosów i przesłaniu jej do Instytutu Ekspertyz Sądowych w celu przeprowadzenia badań na obecność atropiny i skopolaminy.

Powyżej przytoczono wszystkie dane, jakimi dysponowano w sprawie. Niestety do IES nie dotarła informacja dotycząca czułości, specyficzności ani rodzaju testów/metod analitycznych zastosowanych w szpitalu do badania moczu.

3. Materiał i metody

3.1. Materiał biologiczny

Włosy kontrolne stosowane do opracowania metody pochodziły od osób nieprzyjmujących leków, w tym atropiny i skopolaminy.

3.2. Odczynniki

Atropina i skopolamina (w postaci odpowiednio wolnej zasady i chlorowodorku) pochodziły z firmy Sigma-Aldrich (Warszawa, Polska), fentanyl-D₅ z firmy Ceril-

liant, LGC Promochem (Warszawa, Polska), acetonitryl (MeCN) o czystości do HPLC oraz kwas mrówkowy 98–100% z firmy Merck (Warszawa, Polska), izopropanol z firmy Chempur (Piekary Śląskie, Polska).

3.3. Przygotowanie materiału do badań

Włosy poddano myciu, używając kolejno: 2 ml izopropanolu, trzykrotnie 2 ml buforu fosforanowego (pH 7,4) i ponownie 2 ml izopropanolu. Każdy z etapów trwał 15 min. Następnie włosy wysuszono. W celu wykrycia ewentualnych zewnętrznych zanieczyszczeń włosów, uzyskane jako ostatnie popłuczyny włosów poddano analizie na obecność atropiny i skopolaminy oraz związków objętych zastosowaną metodyką. Próbkę włosów o długości 4 cm i masie 69,2 mg (po umyciu) podzielono na dwa segmenty: s I (0 do 2 cm od głowy) i s II (2–4 cm). Próbkę rozdrobniono, dodano fentanyl-D₅ (IS), a następnie inkubowano przez 18 godzin w temperaturze 37°C w mieszaninie 0,1% kwasu mrówkowego w wodzie i acetonitrylu (95:5, v/v). Po ostudzeniu próbki odwirowano i przeniesiono po 100 µl supernatantu do fiolek automatycznego podajnika próbek.

3.4. Aparatura i warunki analizy

Do oznaczeń zastosowano chromatograf cieczowy sprzężony ze spektrometrem mas 6460 Triple Quad firmy Agilent Technologies. Rozdział prowadzono na kolumnie Kinetex C18 (100 × 4,6 mm, 4 µm). Fazę ruchomą przepływającą przez kolumnę w warunkach gradientu składu z szybkością 0,5 ml/min stanowiła mieszanina acetonitrylu (MeCN) i wody z dodatkiem kwasu mrówkowego w ilości 1 ml/l fazy. Zastosowano następujący program gradientowy: 0 min – 5% MeCN, 2 min – 15% MeCN, 6 min – 98% MeCN, 6,5 min – 98% MeCN, 7 min – 5% MeCN, 15 min – 5% MeCN.

Wstrzykiwano 10 µl próbki. Całkowity czas analizy wynosił 15 min. Czas retencji (*RT*) atropiny i skopolaminy wynosił odpowiednio 6,66 i 6,46 min, a względny czas retencji (*t_R*) 0,92 i 0,89. Oznaczenia prowadzono na podstawie wartości *m/z* pozornych jonów molekularnych (*M* + *H*⁺). Monitorowano po trzy przejścia (*MRM*) dla atropiny i skopolaminy oraz dwa dla fentanylu-D₅ (tabela 1).

3.5. Walidacja metody

Metoda LC-MS/MS oznaczania atropiny i skopolaminy we włosach została zwalidowana. Sporządzone siedmiopunktowe krzywe kalibracyjne były liniowe w badanym zakresie, tj. 10–100 pg/mg, a współczynnik determinacji (*R*²) wynosił 0,99. Granica wykrywalności (*LOD*) dla atropiny i skopolaminy wynosiła odpowiednio 1,5 i 1,0 pg/mg, a granica oznaczalności 4,5 i 3,5 pg/mg.

Za *LOD* przyjęto stężenie wywołujące sygnał detektora (*S*) trzykrotnie większy niż wysokość szumów (*N*), czyli dla *S/N* = 3, za *LOQ* stężenie wywołujące pik dziesięciokrotnie większy od szumów (*S/N* = 10).

Wyznaczono odzysk dla stężenia 10 pg/mg, który wynosił 52% i 55%, odpowiednio dla atropiny i skopolaminy, korzystając z następującej zależności: $A_1/A_2 \times 100\%$, gdzie *A*₁ to pole powierzchni analitu z próbki włosów wolnej od analitów, do której dodano wzorce, osiągając stężenie 10 pg/mg, a następnie poddano inkubacji; *A*₂ to pole powierzchni analitu z próbki włosów wolnej od analitów, którą poddano inkubacji, a następnie do maceratu dodano wzorce, osiągając stężenie 10 pg/mg.

Błąd precyzji (dla pięciu powtórzeń) wyznaczony dla atropiny i skopolaminy dla poziomu o stężeniu 100 pg/mg był niższy niż 10%.

4. Wyniki i dyskusja

Potwierdzenia narażenia na ksenobiotyk w odległym czasie, do kilku miesięcy od zdarzenia, można dokonać m.in. wykonując analizę segmentową włosów.

W omawianym przypadku do badań nadesłano kosmyk włosów o długości 4 cm. Jednakże niewielka ilość zabezpieczonych włosów umożliwiła ich podział tylko na dwa segmenty. W wyniku analiz w obu segmentach wykazano obecność atropiny w stężeniu wynoszącym odpowiednio 25 i 33 pg/mg dla segmentu I i segmentu II (tabela 2). Nie stwierdzono natomiast obecności skopolaminy (rysunek 1). W poddanych badaniach popłuczynach uzyskanych po myciu włosów nie stwierdzono obecności atropiny. Świadczy to o tym, że wykryta atropina nie pochodziła z zanieczyszczenia zewnętrznego włosów, lecz została wyizolowana z ich struktury.

Jak już wspomniano we wstępie, analiza włosów w kierunku atropiny była przedmiotem jedynie kilku prac i doniesienia te dotyczyły zatrucia bieluniem indiańskim (Kintz i in., 2006) lub bieluniem dziędzierzawą (Ricard i in., 2012). Z danych zamieszczonych w tabeli 3 wynika, że we włosach osób spożywających napary z bielunia indiańskiego i/lub bielunia dziędzierzawy obecna jest skopolamina. W przypadku opisywanym przez Kintza (2006), w którym to mężczyzna wypił napar przygotowany z sześciu wysuszonych kwiatów bielunia indiańskiego, nie wykazano we włosach atropiny. Autorzy wyjaśniają, że nieobecność atropiny we włosach jest związana z jej niskimi stężeniami występującymi w kwiatach *Datura innoxia*, tj. 0,002 µg/g dla atropiny w porównaniu z 0,346 µg/g dla skopolaminy. Z kolei w przypadku prezentowanym przez Ricarda (2012) mężczyzna pił napar z bielunia dziędzierzawy. W tym przypadku autorzy uzyskali inne wyniki. We wszystkich segmentach włosów wykazane stężenie atropiny było od siedmiu do piętnastu razy wyższe niż skopolaminy. Różnice stężeń atropiny

i skopolaminy w tych dwóch przypadkach spowodowane są spożyciem/zażywaniem surowców pochodzących z różnych roślin, tj. bielunia indiańskiego i dziędzierzawy. I o ile w bieluniu indiańskim (w kwiatach) głównym alkaloidem jest skopolamina, to w bieluniu dziędzierzawie przeważającym we wszystkich częściach rośliny alkaloidem jest atropina (Miraldi, Masti, Ferri, Comparini, 2001).

W prezentowanym w niniejszym opracowaniu przypadku wykazano we włosach jedynie obecność atropiny. Brak nawet śladowych ilości skopolaminy może sugerować, że mężczyzna nie spożywał produktów roślinnych pochodzących z bielunia. Zarówno w przypadku spożycia przetworów z bielunia indiańskiego, jak i dziędzierzawy, we włosach powinna być wówczas obecna także skopolamina. Na terenie Polski występują także inne niż bielun rośliny z rodziny psiankowatych, m.in. wspomniane we wstępie lulek czarny oraz pokrzyk wilcza jagoda. Jednakże obie te rośliny, podobnie jak bielunie, zawierają w swoim składzie zarówno atropinę, jak i skopolaminę.

Innym niż produkty roślinne źródłem narażenia uszkodzonego mężczyzny na atropinę mogły być preparaty farmaceutyczne. Na rynku polskim, zgodnie z Obwieszczeniem Prezesa Urzędu Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych z dnia 12 kwietnia 2013 r. w sprawie ogłoszenia urzędowego wykazu produktów leczniczych dopuszczonych do obrotu na terytorium Rzeczypospolitej Polskiej, dostępne są preparaty zawierające w swoim składzie siarczan atropiny lub atropinę. Są to: Atropinum sulfuricum WZF – roztwór do wstrzykiwań w dawce 0,5 mg/ml i 1 mg/ml; Atropinum sulfuricum WZF 1% – krople do oczu, 10 mg/ml; Reasec – preparat złożony, 25 µg, tabletki; Bellergot – preparat złożony, 0,1 mg, tabletki. Dostępne są również alkaloidy tropanowe głównie w postaci wyciągów z pokrzyku wilczej jagody (Belladonna i Belladonna-homaccord – homeopatyczne produkty lecznicze; Kapsiplast – plaster leczniczy; Bellapan – tabletki; Spasticol – czopki). Wszystkie wymienione preparaty, z wyjątkiem Kapsiplastu oraz produktów homeopatycznych, wydawane są z apteki na podstawie recepty. Oczywiście w chwili obecnej jest to niewielkie utrudnienie, ponieważ środki te są łatwo dostępne w sprzedaży internetowej. Dlatego też, opierając się na uzyskanych wynikach, najbardziej prawdopodobne wydaje się, że mężczyzna przyjmował bądź też podawano mu preparat farmaceutyczny zawierający w swoim składzie wyłącznie atropinę. Kwestia źródła intoksykacji pozostaje bez jednoznacznej odpowiedzi.

4. Podsumowanie

Uzyskane wyniki badań wskazują, że mężczyzna przyjmował w ciągu paru miesięcy atropinę z nieustalonego źródła i w nieznannej formie. Nie można stwierdzić, czy atropinę zażywał samowolnie, czy też była mu podawana skrycie przez osoby trzecie. Można natomiast wykluczyć zatrucie przypadkowe roślinami z rodziny *Solanaceae* (np. bieluniem), gdyż w takim przypadku we włosach powinna być także obecna skopolamina.