

## USING HAIR ANALYSIS TO MONITOR ABSTINENCE IN PATIENTS ON A METHADONE TREATMENT PROGRAMME\*

Roman STANASZEK<sup>1</sup>, Wojciech PIEKOSZEWSKI<sup>1, 2</sup>, Beata KARAKIEWICZ<sup>3</sup>,  
Tadeusz KOZIELEC<sup>3</sup>

<sup>1</sup> *Institute of Forensic Research, Cracow*

<sup>2</sup> *Department of Clinical and Industrial Toxicology, Collegium Medicum,  
Jagiellonian University, Cracow*

<sup>3</sup> *Chair and Department of Family Medicine, Pomeranian Medical Academy,  
Szczecin*

**ABSTRACT:** Hair analysis for drugs of abuse has been proposed as an alternative to urine drug testing because it may be considered less invasive and more difficult to cheat on than urine testing. Information about recent exposure to a drug (2–3 days) acquired by urine analysis can be complemented by hair testing, which can provide a retrospective view of drug intake over several weeks or months depending on the length of the hair sample. These advantages of hair analysis are utilised for checking on drug use by addicted patients being rehabilitated. The aim of this study was to apply the determination of major opiates and amphetamines in hair to the monitoring of abstinence of methadone programme patients who were mainly addicted to “Polish heroin”. GC/MS-ITD was used for opiates and LC/MS-APCI for amphetamines. Application of hair analysis to methadone program monitoring revealed 40% of patients who did not fulfil abstinence requirements and abused illicit drugs, most frequently amphetamine and ephedrine.

**KEY WORDS:** Methadone Treatment Programme; Hair; Opiates; Amphetamines.

*Z Zagadnień Nauk Sądowych, z. L, 2002, 17–34*

*Received 20 May 2002; accepted 15 October 2002*

### INTRODUCTION

In contrast to analysis of body fluids, from which xenobiotics are eliminated relatively quickly, hair analysis provides information on the recent and distant history of compound intake or exposure [6, 8]. Hair analysis has become more and more popular in clinical diagnosis, e.g. in monitoring of psychiatric or neurological disease treatment or drug addiction treatment [7]. Compared to urinalysis, hair testing is a more effective tool for revealing

---

\* The study presented in this paper was done within the research project no 4P05D 026 19 which was financially supported by State Committee for Scientific Research.

drug intake because of its non-invasive sampling method, wider detection window, limited possibilities of falsifying hair samples, and the possibility of re-sampling or re-identification e.g. by DNA analysis.

Substitution therapy programmes are therapeutic tools in which an illicit drug of abuse is replaced by a legal substance having similar or the same pharmacological properties but causing less side effects. The main group of patients enrolled on such programmes is persons addicted to heroin [13]. One such kind of therapy is the methadone programme, but there are others that utilise different drugs such as buprenorphine or the longer acting methadone derivative – 1-alpha-acetylmethadole (LAAM) [13]. Methadone occupies opiate receptors but does not cause euphoria, thus allowing it to be used as a therapeutic substitute in individual or group programmes aiming at rehabilitation and social re-adaptation of patients to an extent that enables them to function independently. The methadone programme is one of the tools of the harm reduction strategy. The main aim of applying drug substitutes is to stabilise the life situation of drug addicts by, among other things, eliminating all activities linked to obtaining illicit drugs (reduction of criminal behaviour activities) or reducing health risks stemming from uncontrolled drug use. Methadone therapy is run under medical supervision [1]. The long acting properties of this drug mean that it need be administered only once a day. The fact that methadone is administered by mouth (and not by injection) reduces HIV infection risk [2].

Detection of psychoactive substances in hair is particularly applicable in drug addiction treatment programmes [3]. If a patient does not stick to the methadone program requirements and uses other psychoactive drugs or medicines, he/she can suffer serious intoxication or even death due to the interaction of the drug with methadone. That is why abstinence monitoring is so important [5]. Regular toxicological testing for the presence of psychoactive drugs of abuse in a patient's organism is a permanent feature of the programme [4], and in the case of repetitive abstinence breaking, the patient is excluded from the programme for a period of at least 6 months.

Abstinence monitoring by means of hair analysis also contributes to improving the therapeutic effect in addiction treatment [3]. Due to the possibility of retrospective monitoring of drug intake during therapy and the limited possibility of falsifying hair samples, it is more difficult to hide the fact of drug intake than in monitoring done by urinalysis. Moreover, the hair sampling method is non-invasive, whilst urine sample donating, which should be carried out under strict supervision, is embarrassing both for the patient and for the supervisor [13]. In such a situation hair testing ensures that the patient's right to privacy is respected. Examination of hair also allows therapy compliance control, verification of drug abuse history, estimation of se-

verity of dependence, or revealing switching to a more available or cheaper drug.

The positive features of hair analysis described above are utilised in this study for monitoring abstinence in patients addicted to “Polish heroin” enrolled on a methadone substitution therapy programme.

## MATERIALS AND METHODS

### Hair samples

The study material consisted of hair samples collected from 57 patients enrolled on a methadone therapy substitution programme in Psychiatric Centre SPS ZOZ Zdroje in Szczecin. Hair samples were collected from the posterior vertex head region according to the guidelines of the Society of Hair Testing [10]. Hair specimens were analysed for opium alkaloids (morphine, codeine, 6-monoacetylmorphine), amphetamines (AMP, EP, MTK, PMA, MA, MDA, MDMA, MDEA) and methadone (MTD) – a drug used for the therapy.

### Standards and their solutions

The following standard solutions were used in the opioids determination procedure: morphine (M), 6-monoacetylmorphine (6-MAM), morphine-D<sub>3</sub> (M-D<sub>3</sub>), codeine-D<sub>3</sub> (C-D<sub>3</sub>), 6-monoacetylmorphine-D<sub>3</sub> (6-MAM-D<sub>3</sub>) at a concentration of 100 g/ml, codeine (C) and methadone (MTD) at a concentration of 1 mg/ml. The following standard solutions were used for determination of amphetamines: ephedrine (EP), methcathinone (MCT), paramethoxyamphetamine (PMA), amphetamine (AMP), methylenedioxyamphetamine (MDA), methylenedioxyamphetamine (MDMA), methylenedioxyethylamphetamine (MDEA) at a concentration of 1 mg/ml and methamphetamine (MA), ephedrine-D<sub>3</sub> (EP-D<sub>3</sub>), amphetamine-D<sub>5</sub> (AMP-D<sub>5</sub>), methamphetamine-D<sub>5</sub> (MA-D<sub>5</sub>), methylenedioxyamphetamine-D<sub>5</sub> (MDA-D<sub>5</sub>), methylenedioxyamphetamine-D<sub>5</sub> (MDMA-D<sub>5</sub>), methylenedioxyethylamphetamine-D<sub>5</sub> (MDEA-D<sub>5</sub>) at a concentration of 100 g/ml. Standard substances were purchased from Radian International (USA).

### Main chemicals and materials

The derivatising agent was a mixture of pentafluoropropionic acid anhydride (CF<sub>2</sub>CF<sub>2</sub>CO)<sub>2</sub>O (PFPA) (Supelco, USA) and 2,2,3,3,3-pentafluoropropanol CF<sub>3</sub>CF<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH (PFPOH) (Sigma Aldrich, USA). The glass silanising agent – Silon-CT was purchased in Supelco (USA). Acetonitrile (CH<sub>3</sub>CN Gradient Grade for HPLC), dichloromethane (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, analytical grade),

triethylamine ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , analytical grade), n-butyl chloride ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$ , for liquid chromatography) were purchased from Merck (Germany). Isopropanol ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ , analytical grade) and formic acid ( $\text{HCOOH}$ , analytical grade) were purchased from POCh (Poland). Bond Elut Certify solid phase extraction columns (300 mg, 6 ml) were bought from Varian (USA).

### **Determination of opium alkaloids (M, C, 6-MAM) and methadone (MTD) in hair by GC/MS-ITD**

In order to remove (from the hair sample) contamination such as blood, dust, sweat and skin residues and also traces of drugs of abuse originating from external contamination, hair samples were washed with isopropanol, phosphate buffer (pH = 7.4) and rinsed with dichloromethane. In order to perform segmental hair analysis (analysis of sequence of hair strand parts), the samples were divided, starting from the site of cutting, into 2 cm segments corresponding roughly to 2 month time periods of their growth. The segments were pulverised in a ball mill (Retsch KG, Germany). 50 mg of pulverised hair sample taken from each segment was weighed out and subjected to successive stages of analysis. For each determination series, standard calibration hair samples were prepared by spiking hair samples with quantities of analytes (morphine, codeine and 6-MAM) corresponding to concentrations in the range from 0 to 20 ng/mg and internal standards (morphine- $\text{D}_3$ , codeine- $\text{D}_3$ , 6-MAM- $\text{D}_3$ ) corresponding to a concentration of 5 ng/mg of hair.

Hair samples prepared in such a way were digested with 0.1 M hydrochloric acid (1 ml) for 16 h at 50°C. After addition of 2 ml of phosphate buffer (pH = 7.4), samples were centrifuged for 2 min at a speed of 4000 cycles/min.

Collected buffer phases were extracted on Bond Elut Certify<sup>TM</sup> solid phase extraction columns (Varian, USA), whose filling consists of a 300 mg (6 ml) mixture of non-polar C-8 sorbent and a strong cation exchange resin SCX. Isolated analytes were derivatised with 50  $\mu$ l PFFA (pentafluoropropionic acid anhydrate) and 50  $\mu$ l 75% PFPOH (2,2,3,3,3-pentafluoro-1-propanol) for 30 min at 70°C, and then subsequently reconstituted in 50  $\mu$ l of chloroform after evaporation of derivatising agent.

Analysis was performed by means of gas chromatography coupled to mass spectrometry using gas chromatograph series 3400 (Varian, USA) coupled to mass spectrometer (Magnum ion trap version – ITD, Finnigan Mat, USA). The gas chromatograph was equipped with a split/splitless injector maintained at 260°C. Sample injection (2  $\mu$ l) was carried out manually in a splitless mode. Chromatographic separation was achieved on a DB-5MS capillary column (J&W Scientific, USA; length: 30 m, inner diameter 0.25 mm, film thickness 0.25  $\mu$ m). Helium 6.0 was used as a carrier gas with

a flow of 1.2 ml/min. The column temperature programme consisted of 3 segments. Initial column temperature (130°C) was maintained for 1 min, then raised linearly at a rate of 15°C/min to 275°C and maintained at this temperature for 9 min. The mass detector operated in a positive electron ionisation mode (EI) with standard electron beam energy 70 eV. The mass detector worked in a full scan mode (mass range 50 to 600 m/z).

### **Determination of amphetamine and its derivatives (AMP, EP, MTK, PMA, MA, MDA, MDMA, MDEA) in hair by LC/MS-APCI**

In the case of amphetamine determination, hair samples were decontaminated by sonication successively in methylene chloride (5 min), redistilled water (5 min) and methanol (5 min). Segmenting, pulverising and preparation of calibration samples were done similarly to the opioids determination procedure. Internal standards (EP-D<sub>3</sub>, AMP-D<sub>5</sub>, MA-D<sub>5</sub>, MDA-D<sub>5</sub>, MDMA-D<sub>5</sub>, MDEA-D<sub>5</sub>) which were deuterium labelled derivatives of analytes were added to each hair sample. Hair samples were hydrolysed in 1 ml 1 M sodium hydroxide at 70°C for 20 min. In order to isolate analytes from the digestion solution, liquid-liquid extraction was applied utilising n-butyl chloride.

Analysis of amphetamines was performed by an HP-1100 series high performance liquid chromatograph coupled to a mass spectrometer (Hewlett-Packard, USA) equipped with an atmospheric pressure chemical ionisation (APCI) chamber and programming (Hewlett-Packard, USA). Nitrogen was used as a nebulising agent. It was generated in a nitrogen generator (Whatman, USA). Positive ions were analysed in selected ion monitoring mode (SIM). The liquid chromatograph was equipped with LiChroCART 125 4 mm Purospher 60 RP-18e, 5 m column (Merck, Niemcy) maintained at 35°C. The mobile phase consisted of a mixture of bi-distilled water with addition of formic acid (1000 µl/litre) and acetonitrile with addition of formic acid (1000 µl/litre). The mobile phase flow (1 ml/min) took place in gradient conditions. An injection of 20 µl was performed automatically by auto-sampler.

## RESULTS AND DISCUSSION

### **Initial experiments**

Hair samples, which were prepared in the way described above (calibration samples as well as real ones), were analysed for two groups of drugs of abuse – opioids and amphetamines.

Figure 1 shows total ion current and mass chromatograms of separation of morphine-di-PFP, morphine-D<sub>3</sub>-di-PFP, codeine-PFP, codeine-D<sub>3</sub>-PFP, 6-MAM-PFP, 6-MAM-D<sub>3</sub>-PFP and methadone achieved by GC/MS analysis of a standard hair sample spiked with analytes and internal standards at a concentration of 5 ng/mg. Figure 2 presents chromatographic separation of amphetamines and their internal standards achieved by LC/MS analysis of a standard hair sample spiked with analytes and internal standards at a concentration of 5 ng/mg. Mass chromatograms were gained for characteristic and intensive ions for particular compounds chosen from the obtained mass spectra.

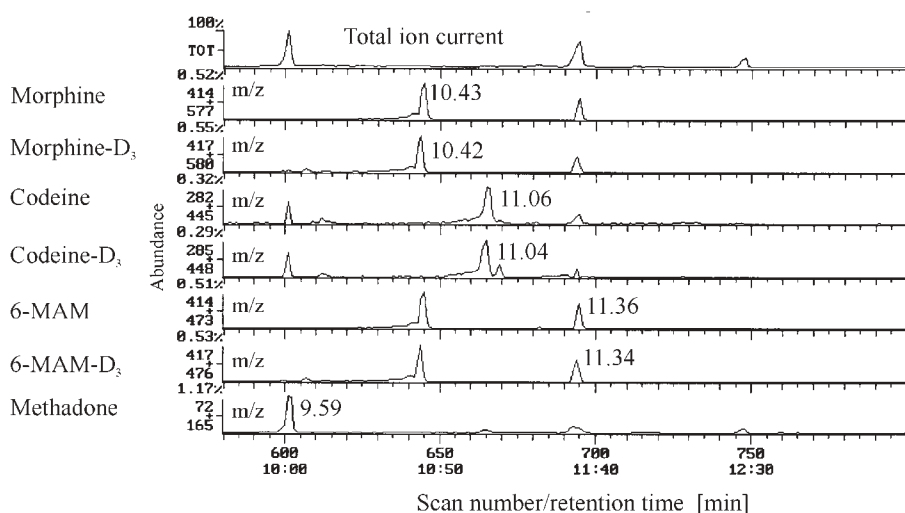


Fig. 1. GC/MS separation (total ion current and mass chromatograms) of morphine-di-PFP, morphine-D<sub>3</sub>-di-PFP, codeine-PFP, codeine-D<sub>3</sub>-PFP, 6-MAM-PFP, 6-MAM-D<sub>3</sub>-PFP and methadone in a spiked standard hair sample containing 5 ng/mg analytes and internal standards.

Identification of chromatographic peaks corresponding to particular compounds was based on relative retention times of analytes and corresponding internal standards.

For opioids, which were analysed in a full scan mode (full mass range), a comparison of the mass spectra of the eluted compounds with the mass spectra of previously analysed standard compounds was made for better identification.

Quantification was based on calibration curves constructed by plotting the value for the ratio of the analytical signal (peak surface area) achieved from the analyte to the analytical signal of a corresponding internal standard versus analyte concentration in hair sample.

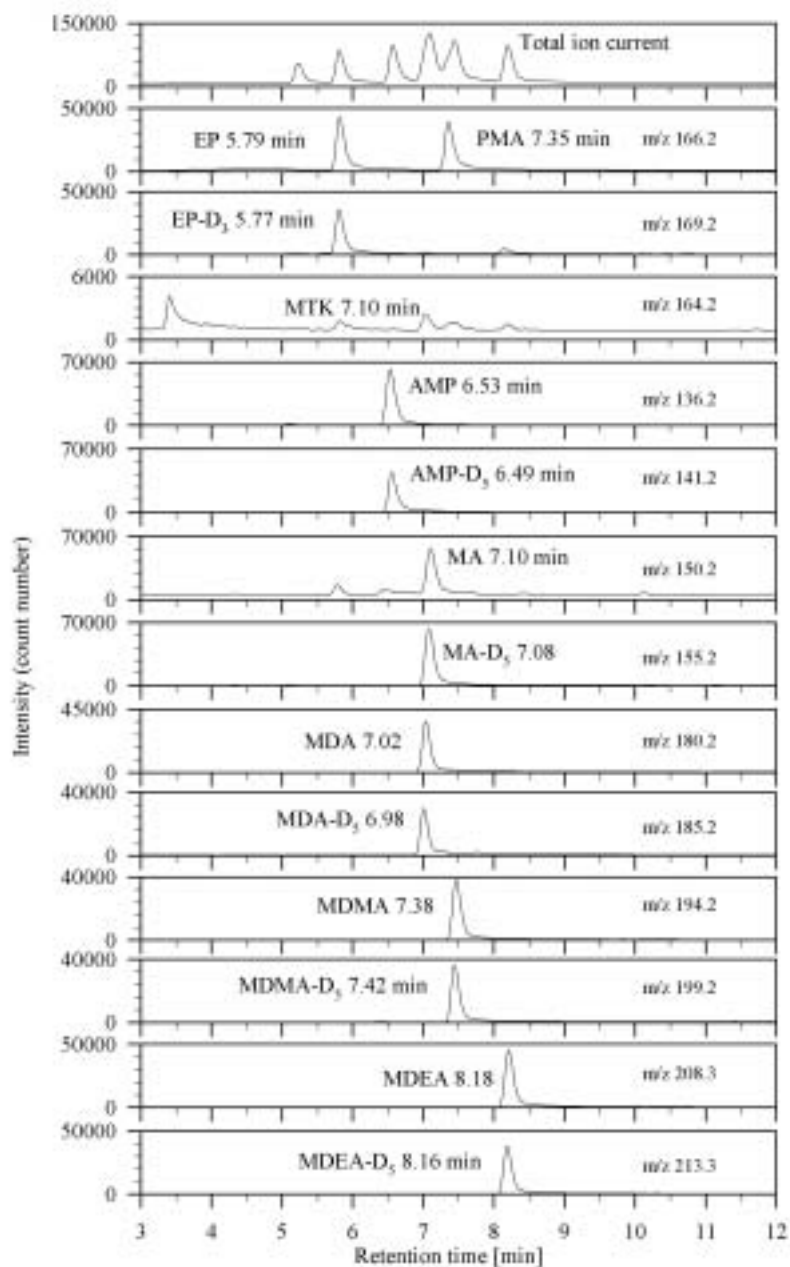


Fig. 2. LC/MS-APCI separation (total ion current and mass chromatograms) of amphetamines (AMP, EP, MTC, PMA, MA, MDA, MDMA, MDEA and their internal standards (AMP-D<sub>3</sub>, EP-D<sub>3</sub>, MA-D<sub>3</sub>, MDA-D<sub>3</sub>, MDMA-D<sub>3</sub>, MDEA-D<sub>3</sub>) in a standard hair sample spiked with analytes and internal standards to a concentration of 5 ng/mg.

The initial investigations were part of a broader study aiming to develop and validate procedures of opioid and amphetamine determination in hair using the analytical techniques described above. A more detailed description and results of these have been published in other papers [10].

### **Application of hair analysis to the monitoring of abstinence in methadone treatment patients**

Knowing the date of hair sample collection, and assuming that the average hair growth rate is 1 cm/month (a 2 cm hair segment corresponds roughly to a 2 month period), analysis of successive hair strand segments can provide information on an individual's history of drug intake or abstinence.

Figure 3a shows the results of segmental analysis of a hair sample collected from a 31 year old female who was addicted to opiates from the time when she was 14 and who occasionally took amphetamine. The patient had been treated for 6 months on a methadone programme before the hair sample was taken. The results of analysis of a 30 cm hair sample indicate that from the beginning of methadone therapy the patient ceased to use opium alkaloids (negative results for morphine, codeine and 6-MAM in the first 3 segments). The analysis of all hair segments for stimulants from the amphetamine group also gave negative results.

In spite of the fact that the methadone treatment lasted for only 6 months, hair analysis revealed methadone in all 6 segments (30 cm). In this case, as well as in most other hair samples collected from other methadone treatment patients, there was no correlation between the results of segmental hair analysis for methadone and the period of therapy. This observation is consistent with results of studies done by other authors, although it has not been completely explained [9].

The results of analysis of a hair sample collected from the same patient 2 years after the beginning of the methadone programme indicated that she is continuously negative for opium alkaloids, but uses amphetamines (with a 2 month abstinence period), which was not the case in the period before collection of the first hair sample.

Results of segmental analysis of a hair sample (partially dyed with natural undyed parts that were several cm long) collected from a female aged 30, addicted to opiates and amphetamines for 20 years, who had been a patient of a methadone treatment programme for 11 months, are presented in Figure 3b. The results revealed that the whole length of the hair sample is positive for methadone. Detection of morphine, ephedrine, amphetamine and metamphetamine in hair proves that in spite of abstinence requirements the patient had been using opiates and amphetamines throughout the whole therapy period. The concentration of amphetamines from the tip to the root



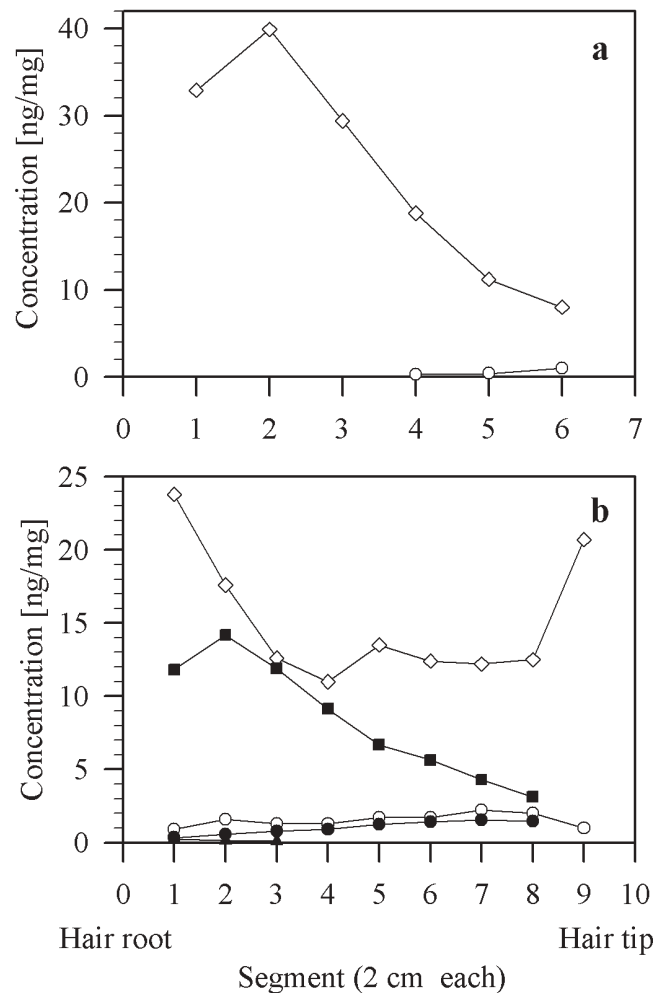


Fig. 3. The results of segmental hair analysis of selected patients. Segment numbering begins at the root and ends at the tip. Empty circles – morphine, full circles – amphetamine, full squares – amphetamine, diamonds – methadone.

segment (closest to the skin) shows raising tendencies. This may be due to a rise in the frequency of amphetamine intake or an increase in the dosing along with time.

The results of study of 57 methadone treatment patients (18 females and 39 males) were analysed concerning compliance with drug abstinence requirements. The hair analysis results of patients who had been on the methadone programme for at least several months were evaluated. The reason for this is that a part of head hair (roughly 10–20%) is at its telogen phase, which means that this part does not grow in a certain period of time. Detec-

tion of traces of drugs in first root segments, corresponding to the beginning of the therapy and abstinence, does not necessarily mean that the patient took some (even small quantities of) drugs after this time, but may be the effect of previous use. A certain part of the hair sample remains in a passive phase, and at the time of sample collection is located on the same segment (at the same distance from the skin) as parts of other hairs within that sample that continued to grow in the period when the person no longer took the given drug. This may sometimes be the reason for positive results of the first root segments analysis.

Males in the studied group (39 persons) were aged 21 to 48. Their addiction time period ranged from 4 to 31 years (average 15 years), and they were treated in the methadone programme from 2 to 34 months (average 14 months). Hair analysis results showed that in this group 25 patients (64%) did not use opiates and amphetamines during therapy, 2 persons (5%) still used opiates, 7 patients (18%) took amphetamines, and 5 patients (13%) used both amphetamines and opiates. The female group consisted of 18 patients aged 21 to 43. Their addiction period ranged from 1 to 24 years (average 13 years) and they were treated in the methadone programme from 3 to 30 months (average 15 months). Hair analysis results showed that in this group 9 patients (50%) complied with the methadone programme requirements, 4 patients (50% of those remaining) used amphetamines during therapy, and 5 patients used amphetamines and opiates.

In general the study revealed that 23 persons (40%) did not comply with the methadone programme requirements (abstinence). From the two groups of drugs of abuse for which hair samples were analysed, amphetamines, mainly amphetamine and ephedrine, (21 persons – 37% of the treated patients) were more frequently used during methadone therapy and less frequently opiates (11 patients – 19%).

## CONCLUSIONS

Hair analysis can be applied to the monitoring of abstinence from drugs of abuse. Roughly 40% of the methadone programme patients did not comply with programme requirements and broke abstinence. These patients most frequently took amphetamine and ephedrine (37%) and less frequently opiates (19%) during therapy. Segmental hair analysis provides information on an individual's substance intake or abstinence history. The majority of patients enrolled on the methadone programme showed mixed dependence symptoms, thus monitoring of other drugs such as cannabis, medicines, alcohol and others is needed, and so methods of determining those substances in hair should be evaluated.

## References:

1. Binchy J. M., Molyneux E. M., Manning J., Accidental ingestion of methadone by children in Merseyside, *British Medical Journal* 1994, vol. 308, pp. 1335–1336.
2. Blix O., Gronbladh L., The impact of methadone maintenance treatment on spread of HIV among i.v. heroin addicts in Sweden, [in:] Loimer N., Schmid R., Springer A. [eds.], *Drug addiction and AIDS*, Springer-Verlag, Heidelberg 1991.
3. Brewer C., Hair analysis as a tool for monitoring and managing patients on methadone maintenance, *Forensic Science International* 1993, vol. 63, pp. 277–283.
4. George S., Braithwaite R. A., A pilot study to determine the usefulness of the urinary excretion of methadone and its primary metabolite (EDDP) as potential markers of compliance in methadone detoxification programs, *Journal of Analytical Toxicology* 1999, vol. 23, pp. 81–85.
5. Heinemann A., Iwersen-Bergmann S., Stein S. [et al.], Methadone-related fatalities in Hamburg 1990–1999: implications for quality standards in maintenance treatment?, *Forensic Sciences International* 2000, vol. 113, pp. 449–445.
6. Ishiyama I., Nagai T., Toshida S., Detection of basic drugs (methamphetamine, antidepressants and nicotine) from human hair, *Journal of Forensic Sciences* 1983, vol. 28, pp. 380–385.
7. Kintz P., Marescaux C., Mangin P., Testing human hair for carbamazepine in epileptic patients, is hair investigation suitable for drug monitoring?, *Human Experimental Toxicology* 1995, vol. 14, pp. 812–815.
8. Möller M., Drug detection in hair by chromatographic procedures, *Journal of Chromatography* 1992, vol. 580, pp. 125–134.
9. Möller M., Fey P., Wennig R., Simultaneous determination of drugs of abuse (opiates, cocaine, and methamphetamine) in human hair by GC/MS and its application to a methadone maintenance program, *Forensic Science International* 1993, vol. 63, pp. 185–206.
10. Stanaszek R., Piekoszewski W., Determination of morphine, codeine, 6-MAM and methadone in hair after pentafluoropropionyl derivatisation by means of Ion Trap Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (GC/MS), *Chemia Analityczna* 2002 [in press].
11. Society of Hair Testing, statement of the Society of Hair Testing concerning the examination of drugs in human hair, *Forensic Science International* 1997, vol. 84, pp. 3–6.
12. Wilkins D. G., Angeliq S. V., Krüger G. G. [et al.], Quantitative analysis of l- -acetyl-N-normethadol, and l- -acetyl-N,N-dinormethadol in human hair by positive ion chemical ionization mass spectrometry, *Journal of Analytical Toxicology* 1997, vol. 21, pp. 420–426.
13. Wodowski G., Doświadczenia personelu Oddziału Monaru w Krakowie w promocji i kwalifikacji do programu metadonowego, Materiały z zebrania naukowo-szkoleniowego „Współczesne metody leczenia uzależnienia opiatowego”, Kraków, 15 czerwca 2000.

## ANALIZA WŁOSÓW W KONTROLI ABSTYNENCJI PACJENTÓW PROGRAMU METADONOWEGO\*

Roman STANASZEK, Wojciech PIEKOSZEWSKI, Beata KARAKIEWICZ,  
Tadeusz KOZIELEC

### WPROWADZENIE

W odróżnieniu od badania płynów ustrojowych, z których ksenobiotyki ulegają względnie szybkiej eliminacji, analiza włosów dostarcza informacji na temat bliższej oraz dalszej historii przyjmowania substancji lub narażenia na nie [6, 9]. Badania włosów stają się coraz bardziej popularne w diagnostyce klinicznej, np. w monitorowaniu leczenia schorzeń psychicznych oraz neurologicznych czy w leczeniu uzależnień [7]. Analiza włosów jest skuteczniejszym sposobem stwierdzenia przyjmowania środków odurzających niż analiza moczu ze względu na nieinwazyjność metody pobierania próbki, szersze okno detekcji, ograniczone możliwości sfałszowania próbki, możliwość ponownego jej pobrania lub jej identyfikacji np. przy pomocy analizy DNA.

Programy terapii substytucyjnej to rozwiązania polegające na zastąpieniu nielegalnego narkotyku substancją o podobnym lub takim samym działaniu farmakologicznym, lecz o mniejszych skutkach ubocznych. Główną grupą pacjentów objętych takimi programami są osoby uzależnione od heroiny [13]. Jedną z tego typu terapii jest program metadonowy, choć prowadzone są również terapie wykorzystujące inne leki, jak buprenorfina lub dłużej działająca pochodna metadonu – 1-alfa-acetylmefenadon (LAAM) [13]. Metadon, wysycając receptory opiatowe, nie daje efektu euforii, pozwalając tym samym na podjęcie oddziaływania terapeutycznego w formie indywidualnej lub grupowej ukierunkowanego na rehabilitację i readaptację społeczną w stopniu umożliwiającym uczestnikom programu samodzielne funkcjonowanie. Program metadonowy jest jednym z narzędzi strategii minimalizacji szkód (*harm reduction*). Podstawowym celem wprowadzenia substytutów lekowych jest ustabilizowanie sytuacji życiowej osób uzależnionych poprzez m.in. wyeliminowanie wszystkich czynności związanych ze zdobywaniem nielegalnych narkotyków (redukcji zachowań o charakterze kryminalnym) oraz obniżenie poziomu niebezpieczeństwa dla zdrowia płynących z niekontrolowanego ich używania. Terapia metadonowa odbywa się pod kontrolą medyczną [1]. Dzięki długiemu okresowi działania tego związku może on być przyjmowany tylko raz dziennie. Podawany doustnie stał się również specyfikiem zmniejszającym zagrożenie zakażeniem wirusem HIV [2].

Detekcja środków psychoaktywnych we włosach ma szczególne zastosowanie w programach leczenia uzależnień [3]. Niestosowanie się do wymogów programu metadonowego i przyjmowanie innych środków psychoaktywnych czy leków może skutkować poważnym zatruciem, a nawet zejściem śmiertelnym ze względu na interakcję z metadonem, dlatego kontrola abstynencji jest tak ważna [5]. Stałym

\* Badania zaprezentowane w niniejszej pracy wykonano w ramach projektu badawczego 4P05D 026 19 finansowanego przez Komitet Badań Naukowych.

elementem programu są regularne badania toksykologiczne na zawartość środków psychoaktywnych lub odurzających w organizmie pacjenta [4], a przypadku powtarzającego się łamania abstynencji narkotykowej następuje wykluczenie pacjenta z programu na okres nie krótszy niż 6 miesięcy.

Kontrola abstynencji poprzez analizę włosów przyczynia się także do polepszenia efektu terapeutycznego w leczeniu uzależnień [3]. Dzięki możliwości retrospektywnej kontroli przyjmowania środków odurzających w trakcie terapii oraz ograniczonym możliwościom sfalszowania próbki włosów, trudniejsze staje się zatajenie faktu przyjmowania tych środków niż to ma miejsce w przypadku kontrolnej analizy moczu. Ponadto pobieranie próbki włosów jest nieinwazyjne, natomiast pobieranie próbki moczu, które powinno się odbywać pod ścisłym nadzorem, jest kłępujące zarówno dla osoby badanej, jak i nadzorującego [13]. W tej sytuacji analiza włosów zapewnia nienaruszalność prywatności osoby poddawanej badaniom. Badania tego materiału także dają możliwość monitorowania stosowania się do zaleceń lekarzy, weryfikowania historii przyjmowania środków odurzających, określenia stopnia uzależnienia lub stwierdzenia zmiany narkotyku na łatwiej dostępny lub tańszy.

Niniejsza praca wykorzystuje powyżej opisane cechy analizy włosów do kontroli abstynencji pacjentów uzależnionych od „polskiej heroiny”, a leczonych w ramach programu terapii substytucyjnej metadonem.

## MATERIAŁY I METODY

### Próbki włosów

Materiał do badań stanowiły próbki włosów pobrane od 57 pacjentów poddawanych leczeniu substytucyjnemu metadonem w Poradni dla Osób Uzależnionych od Środków Psychoaktywnych Centrum Psychiatrycznego Samodzielnego Publicznego Specjalistycznego Zakładu Opieki Zdrowotnej „Zdroje” w Szczecinie. Próbki włosów pobierano z potylicznej części głowy według zaleceń Towarzystwa Badania Włosów [10].

Próbki włosów poddano analizie na zawartość alkaloidów opium (morfina, kodeina, 6-monoacetylmorfina), amfetamin (AMP, EP, MTK, PMA, MA, MDA, MDMA, MDEA) oraz metadonu (MTD) – środka stosowanego w terapii.

### Substancje wzorcowe i ich roztwory

W procedurze oznaczania opioidów używano roztworów wzorcowych morfiny (M), 6-monoacetylmorfiny (6-MAM), morfiny- $D_3$  (M- $D_3$ ), kodeiny- $D_3$  (K- $D_3$ ), 6-monoacetylmorfiny- $D_3$  (6-MAM- $D_3$ ) o stężeniu 100 g/ml oraz kodeiny (K) i metadonu (MTD) o stężeniu 1 mg/ml. W procedurze oznaczania amfetamin używano roztworów wzorcowych efedryny (EP), metkatynonu (MKT), parametoksyamfetaminy (PMA), amfetaminy (AMP), metylenodioksyamfetaminy (MDA), metylenodioksymetamfetaminy (MDMA), metyleno-dioksyetylo-amfetaminy (MDEA) o stężeniu 1 mg/ml oraz metamfetaminy (MA), efedryny- $D_3$  (EP- $D_3$ ), amfetaminy- $D_3$  (AMP- $D_3$ ), metamfetaminy- $D_3$  (MA- $D_3$ ), metylenodioksy-amfetaminy- $D_3$  (MDA- $D_3$ ), metylenodioksymetamfetaminy- $D_3$  (MDMA- $D_3$ ), metyleno-dioksyetyloamfetaminy- $D_3$  (MDEA- $D_3$ ) o stężeniu 100 g/ml. Substancje wzorcowe zakupione zostały w firmie Radian International (Stany Zjednoczone).

### Podstawowe odczynniki chemiczne i materiały

Odczynnik derywatyzujący stanowiła mieszanina bezwodnika kwasu pentafluoropropionowego ( $(CF_3CF_2CO)_2O$  (PFPA) (Supelco, Stany Zjednoczone) oraz alkoholu 2,2,3,3,3-pentafluoropropionowego  $CF_3CF_2CH_2OH$  (PFPOH) (Sigma Aldrich, USA). Odczynnik do silanizacji szkła Silon-CT zakupiono w firmie Supelco (Stany Zjednoczone). Acetonitryl ( $CH_3CN$  Gradient Grade for HPLC), dichlorometan ( $CH_2Cl_2$  cz.d.a.), trietyloaminę ( $CH_3CH_2Cl_2$  cz.d.a.), chlorek n-butyłu ( $CH_3CH_2CH_2CH_2Cl$  do analiz chromatograficznych) zakupiono w firmie Merck (Niemcy). Izopropanol ( $CH_3CH_2CH_2OH$  cz.d.a.) i kwas mrówkowy ( $HCOOH$  cz.d.a.) nabyto w firmie POCH (Polska). Kolumny do ekstrakcji na fazie stałej Bond Elut Certify (300 mg, 6 ml) nabyto w firmie Varian (Stany Zjednoczone).

### Oznaczanie alkaloidów opium (M, K, 6-MAM) oraz metadonu (MTD) we włosach metodą GC/MS-ITD

W celu usunięcia z próbki zanieczyszczeń typu krew, kurz, pot i naskórek oraz leków i narkotyków pochodzących z tzw. zanieczyszczenia zewnętrznego, włosy poddawano procesowi dekontaminacji z użyciem izopropanolu, buforu fosforanowego ( $pH = 7,4$ ) i dichlorometanu. Następnie w celu przeprowadzenia analizy poszczególnych odcinków włosów (analiza segmentowa) dzielono je, zaczynając od miejsca ucięcia, na dwucentymetrowe odcinki odpowiadające w przybliżeniu dwumiesięcznemu okresowi ich wzrostu. Otrzymane segmenty włosów mielono w młynku kulowym firmy Retsch KG (Niemcy). Do analizy odważano po 50 mg zmielonych włosów każdego segmentu i poddawano kolejnym etapom analizy. Do każdej serii oznaczeń przygotowywano próbki kalibracyjne poprzez dodanie do włosów takiej ilości analitów (morfina, kodeina i 6-MAM), które odpowiadały stężeniom tych związków we włosach w zakresie od 0 do 20 ng/mg oraz wzorców wewnętrznych (morfina- $D_3$ , kodeina- $D_3$ , 6-MAM- $D_3$ ) w ilości odpowiadającej stężeniu 5 ng/mg włosów.

Tak przygotowane próbki włosów poddawano roztwarzaniu hydrolytycznemu w środowisku 0,1 M kwasu solnego (1 ml) przez 16 godzin w temperaturze  $50^\circ C$ . Po dodaniu 2 ml buforu fosforanowego ( $pH = 7,4$ ) próbki odwirowywano przez 2 min przy 4000 obr./min.

Zebrane warstwy buforowe ekstrahowano na fazie stałej kolumn Bond Elut Certify<sup>TM</sup> (Varian, Stany Zjednoczone), których wypełnienie składa się z 300 mg (6 ml) mieszaniny niepolarnego sorbentu C-8 oraz silnego wymiennicza kationowego SCX. Wyizolowane anality poddano derywatyżacji 50  $\mu$ l PFPA (bezwodnika kwasu pentafluoropropionowego) oraz 50  $\mu$ l 75% PFPOH (2,2,3,3,3-pentafluoro-1-propanolu) przez 30 min w temperaturze  $70^\circ C$ , a następnie po odparowywaniu odczynnika derywatyżującego rozpuszczano w 50  $\mu$ l chloroformu.

Analizę przeprowadzano, stosując technikę chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas i wykorzystując chromatograf gazowy serii 3400 (Varian, Stany Zjednoczone) sprzężony ze spektrometrem mas (pułapka jonowa wersji Magnum) firmy Finnigan Mat (Stany Zjednoczone). Chromatograf gazowy wyposażony był w dozownik typu split/splitless utrzymywany w temperaturze  $260^\circ C$ . Nastrzyk próbki (2  $\mu$ l) dokonywano manualnie systemem bez podziału. Rozdział składników próbki następował na kolumnie kapilarnej DB-5MS (J&W Scientific, Stany Zjedno-

czone; długość: 30 m, średnica wewnętrzna 0,25 mm, grubość filmu 0,25  $\mu$ m). Gazem nośnym był hel, którego przepływ przez kolumnę wynosił 1,2 ml/min. Program temperaturowy kolumny składał się z 3 elementów. Temperatura początkowa kolumny (130°C) była utrzymywana przez 1 min, następnie wzrastała liniowo z szybkością 15°C/min do 275°C i przez 9 min nie zmieniała swojej wartości. Detektor masowy pracował w trybie pozytywnej jonizacji elektronowej (EI), a energia wiązki bombardujących elektronów wynosiła 70 eV. Detektor masowy pracował w trybie skanowania całego zakresu mas od 50 do 600 m/z.

### **Oznaczanie amfetaminy i jej pochodnych (AMP, EP, MTK, PMA, MA, MDA, MDMA, MDEA) we włosach metodą LC/MS-APCI**

W przypadku oznaczania amfetamin próbki włosów myto chlorkiem metylenu, wodą i metanolem na łaźni ultradźwiękowej przez 5 min. Podział na odcinki, rozdrabnianie oraz przygotowanie próbek kalibracyjnych przeprowadzono analogicznie jak w procedurze oznaczania opioidów. Do każdej próbki włosów dodawano roztwory wzorców wewnętrznych, które stanowiły deuterowane pochodne analitów (EP-D<sub>3</sub>, AMP-D<sub>5</sub>, MA-D<sub>5</sub>, MDA-D<sub>5</sub>, MDMA-D<sub>5</sub>, MDEA-D<sub>5</sub>). Próbki włosów poddawano hydrolyzie alkalicznej w 1 M roztworze wodorotlenku sodu w temperaturze 70°C przez 20 min. W celu wyizolowania analitów z otrzymanego roztworu zastosowano ekstrakcję typu ciec-z ciec-z z użyciem chlorku n-butylu.

Analizę amfetamin we włosach przeprowadzono, stosując chromatograf cieczowy sprzężony z detektorem mas (kwadrupol) LC/MS serii HP-1100 z komorą do chemicznej jonizacji pod ciśnieniem atmosferycznym (APCI) wraz z oprogramowaniem (Hewlett-Packard, Stany Zjednoczone). Jako gaz rozpylający stosowano azot wytwarzany przez generator azotu firmy Whatman (Stany Zjednoczone). Analizowano jony dodatnie w trybie monitorowania wybranych jonów (SIM). Chromatograf cieczowy był wyposażony w kolumnę LiChroCART 125  $\times$  4 mm z wypełnieniem Purospher 60 RP-18e, 5  $\mu$ m (Merck, Niemcy) termostatowaną w 35°C. Faza ruchoma składała się z mieszaniny wody redestylowanej z dodatkiem kwasu mrówkowego (1000  $\mu$ l/litr) oraz acetonitrylu z dodatkiem kwasu mrówkowego (1000  $\mu$ l/litr). Przepływ fazy ruchomej wynosił 1 ml/min i miał miejsce w warunkach gradientowych. Nastrzyk odbywał się poprzez automatyczny podajnik próbek, a jego objętość wynosiła 20  $\mu$ l.

## WYNIKI I DYSKUSJA

### **Badania wstępne**

Przygotowane w opisanej powyżej procedurze próbki włosów (zarówno kalibracyjne jak i rzeczywiste) poddano analizie na zawartość dwóch grup środków odurzających – alkaloidów opium oraz amfetamin. Rycina 1 przedstawia całkowity prąd jonowy i chromatogramy masowe rozdziału morfiny-di-PFP, morfiny-D<sub>3</sub>-di-PFP, kodeiny-PFP, kodeiny-D<sub>3</sub>-PFP, 6-MAM-PFP, 6-MAM-D<sub>3</sub>-PFP oraz metadonu uzyskane metodą GC/MS poprzez analizę próbki wzorcowej zawierającej anality i standardy wewnętrzne w ilości 5 ng/mg. Na rycinie 2 umieszczono rozdział chromatograficzny amfetamin i ich standardów wewnętrznych uzyskanych metodą LC/MS na

podstawie próbki wzorcowej włosów zawierającej anality i standardy wewnętrzne w ilości 5 ng/mg. Chromatogramy masowe uzyskano dla charakterystycznych i intensywnych dla poszczególnych związków jonów, wybranych na podstawie otrzymanych widm masowych.

Identyfikacji pików chromatograficznych poszczególnych związków dokonywano na podstawie względnych czasów retencji analitów i odpowiadających im wzorców wewnętrznych. Dla opioidów – dzięki prowadzeniu analizy mas w trybie skanowania całkowitego zakresu mas – możliwe było dodatkowo porównanie widm masowych eluowanych związków z widmami wcześniej analizowanych substancji wzorcowych.

Analizę ilościową przeprowadzono w oparciu o krzywe kalibracyjne będące wykresami stosunku sygnału analitycznego (pola powierzchni pików) pochodzącego od analitu do sygnału analitycznego pochodzącego od standardu wewnętrznego od stężenia analitu w próbce włosów.

Badania wstępne stanowiły część eksperymentów mających na celu opracowywanie i zwalidowanie metod oznaczania opioidów i amfetamin we włosach z zastosowaniem powyżej opisanych technik analitycznych, których opis i wyniki znajdują się w szerszych opracowaniach [10]

#### **Zastosowanie analizy włosów do kontroli abstynencji pacjentów programu metadonowego**

Znając datę pobrania próbki włosów oraz przyjmując, że średnia szybkość wzrostu włosów wynosi 1 cm na miesiąc (dwucentymetrowy odcinek odpowiada około dwumiesięcznemu okresowi wzrostu) i analizując kolejne segmenty włosów, można uzyskać informacje na temat historii używania (lub abstynencji) danych związków chemicznych w indywidualnych przypadkach.

Rycina 3a przedstawia wyniki analizy włosów kobiety w wieku 31 lat uzależnionej od opiatów od 14 roku życia oraz przyjmującej sporadycznie amfetaminę. Przez 6 miesięcy przed pobraniem próbki uczestniczyła ona w programie metadonowym. Wyniki analizy 30 cm próbki włosów wskazują, że od czasu rozpoczęcia kuracji metadonem pacjentka zaprzestała przyjmowania alkaloidów opium (uzyskano ujemne wyniki na obecność morfiny, kodeiny i 6-MAM w 3 pierwszych segmentach). Analiza wszystkich badanych segmentów włosów na obecność środków pobudzających z grupy amfetamin dała również wyniki ujemne. Pomimo tego, że terapia metadonem trwała tylko 6 miesięcy, analiza włosów wykazała we wszystkich 6 segmentach (30 cm) obecność metadonu. W przypadku wspomnianej pacjentki, podobnie jak w przypadku większości próbek włosów pobranych od innych pacjentów leczonych metadonem, wykazano brak korelacji wyników analizy segmentowej włosów z okresem terapii. Obserwacja ta jest zgodna z wynikami badań różnych autorów, jednakże dotychczas zjawisko to nie zostało całkowicie wyjaśnione [8].

Analiza próbki włosów pobranej od tej pacjentki po dwóch latach od rozpoczęcia programu metadonowego wykazała ciągłą abstynencję od środków odurzających typu alkaloidy opium, ale zarazem ujawniła przyjmowanie amfetaminy (z około dwumiesięcznym okresem abstynencji), co nie miało miejsca w okresie przed pobraniem pierwszej próbki.

Wyniki segmentowej analizy włosów (częściowo farbowanych z naturalnymi kilkucentymetrowymi odrostami) pobranych od kobiety lat 30, od 20 lat uzależnionej od opiatów i amfetamin, a będącej uczestniczką terapii substytucyjnej metadonem



od 11 miesięcy, przedstawione są na rycinie 3b. Badania wykazały obecność metadonu w całej długości włosa. Dodatkowo, mimo wymogu abstynencji, pacjentka przyjmowała w okresie terapii opiaty, o czym świadczy wykryta we włosach morfina, a także efedrynę, amfetaminę i metamfetaminę. Stężenie amfetaminy, począwszy od końca włosów do pierwszego segmentu najbliższego skórze, wykazuje tendencję rosnącą. Może to świadczyć o zwiększaniu częstotliwości przyjmowania amfetaminy lub jej dawki z upływem czasu.

Przeanalizowano wyniki badań włosów 57 pacjentów leczonych metadonem (18 kobiet i 39 mężczyzn) pod kątem stosowania się do wymogu nieprzyjmowania środków odurzających (abstynencja). Opracowaniu poddano wyniki badań włosów pobranych od pacjentów uczestniczących w terapii metadonowej od co najmniej kilku miesięcy. Spowodowane to było tym, że pewna część włosów na głowie (około 10–20%) znajduje się w fazie nieczynnej, czyli w danym okresie czasu nie rośnie. Wykrycie środków psychoaktywnych w pierwszym odcinku włosa – odpowiadającemu czasowi rozpoczęcia terapii i abstynencji – nie musi wówczas świadczyć o tym, że pacjent przyjmował po tym czasie choćby niewielkie ilości środków odurzających, ale może być efektem poprzedniego ich używania. Pewna część włosów pozostaje w fazie nieczynnej i w momencie pobrania próbki po jakimś czasie znajduje się w tej samej części pobranej próbki włosów co ich część, która wyrosła w okresie, kiedy już dana osoba nie przyjmowała tego środka. Dlatego wynik analizy takiego odcinka włosów może być dodatni.

Mężczyźni w badanej grupie (39 osób) byli w wieku od 21 do 48 lat. Ich okres uzależnienia wahał się od 4 do 31 lat (średnio 15 lat), a w programie metadonowym uczestniczyli od 2 do 34 miesięcy (średnio 14 miesięcy). Na podstawie wyników analizy włosów stwierdzono, że w tej grupie 25 pacjentów (64%) nie przyjmowało środków odurzających (opiatów i amfetamin) w trakcie terapii, 2 osoby (5%) nadal przyjmowały opiaty, 7 pacjentów (18%) przyjmowało wyłącznie amfetaminy, a 5 pacjentów (13%) równocześnie amfetaminy i opiaty. Badana grupa kobiet składała się z 18 pacjentek w wieku od 21 do 43 lat, których okres uzależnienia wynosił od 1 roku do 24 lat (średnio 13 lat), a w programie metadonowym uczestniczyły od 3 do 30 miesięcy (średnio 15 miesięcy). Analiza włosów wykazała, że w grupie tej 9 pacjentek (50%) przestrzegało warunków programu metadonowego, 4 pacjentki (50%) przyjmowały w trakcie terapii amfetaminy, a 4 pacjentki przyjmowały amfetaminy i opiaty.

Ogółem stwierdzono, że 23 osoby (40%) nie dotrzymują warunków abstynencji od środków odurzających. Z dwóch grup środków odurzających, w kierunku których przeprowadzono analizę włosów, częściej w czasie terapii metadonowej przyjmowane były środki z grupy amfetamin, w tym głównie amfetamina i efedryna (21 pacjentów – 37% leczonych metadonem), a rzadziej opiaty (11 pacjentów – 19%).

#### PODSUMOWANIE

Analiza włosów może być wykorzystana w kontroli abstynencji od środków uzależniających. Około 40% pacjentów programu metadonowego nie zachowywało abstynencji, przez co nie stosowało się do warunków uczestnictwa w terapii substytucyjnej tym lekiem. Pacjenci ci w czasie terapii najczęściej przyjmowali amfetaminę i efedrynę (37%), a rzadziej opiaty (19%). Na podstawie segmentowej analizy włosów

możliwe jest więc uzyskanie informacji na temat historii używania danych związków chemicznych lub abstynencji od ich w indywidualnych przypadkach.

Ze względu na to, że większość pacjentów objętych programem metadonowym wykazuje symptomy uzależnienia mieszanego, potrzebna jest również kontrola używania innych środków odurzających, w tym kannabinoli, leków, a także alkoholu i innych, co wymaga opracowania metod ich oznaczania we włosach.