

ВОЛОСЫ КАК ОБЪЕКТ ХИМИКО- ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

Ю.В. Слустовская, О.Ю.Стрелова

ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургская химико-фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения РФ, 197376, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

В последнее время увеличивается интерес судебной и клинической токсикологии к обнаружению наркотических и психотропных веществ в образцах волос. Данный биологический объект расширяет возможности обнаружения наркотических средств и других токсических веществ в организме человека. Главной трудностью исследования волос является правильный подбор условий пробоподготовки объекта химико-токсикологического исследования для более полного извлечения токсикантов из внутренней части волоса. Для этого применяются методы: экстракция органическим растворителем; экстракция органическими растворителями при пониженных температурах; термическое разложение объектов; щелочной или кислотный гидролиз, с последующей жидкость-жидкостной экстракцией смесью растворителей; извлечение метанолом или подкисленным метанолом в ультразвуковой бане; ферментный гидролиз с последующей жидкость-жидкостной экстракцией смесью растворителей.

Ключевые слова: *волосы, наркотические средства, психотропные вещества, химико-токсикологический анализ, пробоподготовка, кислотный гидролиз, ферментативный гидролиз, производные барбитуровой кислоты, тропикамид.*

Одним из решающих направлений в борьбе с незаконным оборотом наркотиков является проведение судебно-медицинского обследования подозреваемых с целью установления

факта употребления наркотика, результаты которого во многом зависят от химико-токсикологических исследований биологических проб. При этом чрезвычайно важным является

Слустовская Юлия Викторовна (Slustovskaja Julija Viktorovna), аспирант кафедры фармацевтической химии ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургская химико-фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения РФ, 197376, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация, yulia8356@yandex.ru
Стрелова Ольга Юрьевна (Strelova Ol'ga Jur'evna), кандидат химических наук, доцент, заведующая кафедрой фармацевтической химии ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургская химико-фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения РФ, 197376, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация, ous.chim-tox@yandex.ru.

получение данных о продолжительности, периодичности, интенсивности и срока, прошедшего после последнего употребления наркотических средств. Исследование в судебно-химических и химико-токсикологических лабораториях таких классических объектов, как биологические жидкости (моча, кровь и слюна) и внутренние органы трупа (желудок, печень, почки, желчный пузырь с желчью и др.) на присутствие наркотических средств и психотропных веществ обычно даёт отрицательные результаты спустя 1–3 суток после употребления вещества, а в отдельных случаях – спустя неделю или несколько более. При интерпретации полученных результатов, не всегда можно ответить на вопрос: является ли такая низкая концентрация следствием однократного употребления малой дозы препарата или она обусловлена достаточно большим сроком, прошедшим после прекращения его интенсивного приёма. При этом следует учитывать, что отбор повторных образцов часто бывает по разным причинам затруднён или невозможен.

В последнее время увеличивается интерес судебной и клинической токсикологии к обнаружению веществ в образцах волос [1,2,3]. Основными преимуществами исследования волос перед исследованием биожидкостей являются:

- возможность обнаруживать токсиканты в организме человека спустя недели, месяцы или даже годы после окончания их приёма;
- возможность проследить во времени «историю» поступления вещества в организм;
- возможность исследования широкого диапазона концентраций;
- не требуются особые условия для отбора и хранения проб. Волосы могут храниться длительное время в простом бумажном конверте при комнатной температуре [4,5].

В цикле развития волоса, ороговевшего нитевидного эпителиального придатка кожи, выделяю фазу роста с высокой метаболической активностью матрикса, продолжительностью от 50 дней до 2 и более лет, в зависимости от индивидуальных особенностей организма человека. Переходная фаза роста волоса продолжается 1–2 нед. Мёртвая волосяная фолликула остаётся в толще кожи от 1 до 6 мес. и затем выпадает вместе с волосом. Обычно до 85 % всех волос половозрелого человека находится в фазе роста, около 1 % — в переходной фазе и 14 % — мертвы. При определённых заболеваниях или при интоксикациях соотношение фаз метаболизма волос может меняться. Волосы головы вырастают на 0,1–0,5 мм в сут, что за месяц составляет примерно 3–15 мм. Наибольшая скорость роста наблюдается у лиц в возрасте от 15 до 30 лет [2,6,7].

Химический состав волос различен в зависимости от возраста и пола человека. В химической структуре белков волос также имеется большое число функциональных групп, которые могут обеспечивать связывание их с различными веществами, в том числе и лекарственными. Основную массу волос составляют белки, а так же липиды (4–8 %), холестерин (0,1–0,2 %), меланин, микроэлементы и некоторые ферменты, в частности щелочная фосфатаза, влияющая на рост волос. Твёрдый кератин, является основной субстанцией волос. Это белковое вещество богатое серой (около 5 %) и аминокислотами (цистеин около 14 %, лейцин 14 %, глутаминовая кислота 12 %, тирозин 3 %), отличается большой плотностью, плохо растворяется в воде, устойчив ко многим химическим веществам, в том числе кислотам и щелочам и содержит значительное количество цистина [2,8].

Сердцевина волос человека состоит из белков, богатых аминокислотой цитруллином, и имеющих ковалентные поперечные связи, которые нельзя объяснить только серными мостиками, так как содержание цистеина и цистина в этих белках слишком низко для этого. Изопептидные мостики обнаруживаются в клетках медуллы и внутренних клетках корней волос. Они отвечают за низкую растворимость этих белков в водных растворах и увеличивают химическую стабильность медуллы [5,8,9].

Меланин — пигмент буровато-черного цвета придаёт природную окраску волосу и способен связываться с большинством физиологически активных веществ. Гранулы, извлечённые из чёрных волос, твёрдые и имеют высокую плотность. Их аминокислотный состав значительно отличается от аминокислотного состава окружающих волос и состоит из полимеров индольно-хинолиновой структуры [2, 6, 10].

Липиды волос имеют в своем составе полярные группы, в число которых входят ненасыщенные связи, гидроксильные и эфирные группы. В результате воздействия различных механизмов все они могут образовывать связи с наркотиками [2,6,8].

Среди факторов, влияющие на процесс накопления наркотических веществ в волосах выделяют следующие: зависимость общего количества вещества в волосах от принятой дозы; родство исследуемого вещества с химическими компонентами волос, в частности, меланином; липофильность самих веществ, а также комбинации указанных факторов [2,6,8,9].

Исследования динамики накопления наркотических веществ и их метаболитов в волосах позволили разделить наркотические и психотропные вещества на группы: вещества с высокой

способностью к включению в состав волос (кокаин и фенциклидин), вещества, занимающие промежуточное положение (метилendioксиамфетамин или МДМА, метилendioксиметамфетамин или МДА), производные лизергиновой кислоты, 6-моноацетилморфин, амфетамин и другие), а также вещества, слабо проникающие в волосы (метаболиты кокаина и амфетамина, морфин и метаболиты каннабиноидов кислотной природы) [12,13].

Многочисленными авторами [2,10,11,13] выявлена общая закономерность влияния меланина на прохождения наркотиков через кожу, а также в накоплении их в различных органах и тканях: наркотические вещества накапливаются в волосах пропорционально содержанию в них меланина, более всего в чёрных, менее в коричневых и ещё менее в белых. Например, A. Mizuno с соавторами (2002) показали на примере никотина и его метаболита котинина, что эти вещества накапливаются в большей степени в чёрных волосах курящих, чем в белых.

S.J. Green и J. Wilson (1996) определяли влияние окраски шерсти крыс на накопление метадона и обнаружили прямую зависимость между принятой дозой и концентрацией наркотика в шерсти, соотношение концентрации метадона в окрашенной шерсти и в неокрашенной равно 21,3 : 1,0. Аналогичные выводы о влиянии меланина на включение наркотиков и других веществ в волосы были сделаны на основании данных об особенностях накопления их в волосах людей различных рас [2].

Изоэлектрическая точка волоса равна 3,67. На мембране, разделяющей кровь и внутренние области волоса, существует градиент pH среды. Поэтому вещества, существующие в виде катионов, будут связываться отрицательным зарядом волоса при pH выше, его изоэлектрической точки. При этом сама точка зависит в основном от содержания в волосе меланина и кислых белков [2].

В настоящее время считается, что наркотические средства и психотропные вещества можно обнаружить в волосах лица (бороды) спустя 2—3 дня, в волосах головы спустя 5—7 дней, в моче, слюне и поте от 30 минут до суток после приёма. Многочисленные авторы изучали динамику накопления наркотических средств в волосах, однако данные противоречивы [12,13]. Если систематизировать, то можно сказать: самая высокая средняя концентрация вещества (например, кодеина) в первом сегменте волос, который составляет около 1 см с луковицей, обнаруживалась через 12 часов после окончания приёма вещества. Через 5 недель концентрация вещества увеличилась в 2 раза. В следующем, втором сегменте волос, 3 см над кожей, веще-

ство (кодеин) обнаруживался спустя 1 неделю. В третьем сегменте (оставшийся волос) через 10 недель вещества обнаружены не были.

Были проведены исследования динамики накопления бензодиазепинов с участием 10 добровольцев: 8 женщин и 2 мужчин, с различной пигментацией и состоянием волос [2]. Целью исследования было выяснить возможность обнаружения в волосах флунизепема и его основного метаболита 7-аминофлунизепема, после приема однократной дозы флунизепема. Образцы волос были собраны у добровольцев непосредственно перед введением, а затем на 1, 3, 5, 14, 21, 28 день после начала приема. Метаболит флунизепема был обнаружен после 24 часов у пяти добровольцев и остался в волосах на протяжении всего периода исследования и обнаружился в концентрации ниже предела количественного определения на 14 и 21 дни после начала приема. Другое исследование бензодиазепинов проводили на примере бромазепема и клоназепема: волосы были собраны через 1 месяц после однократного приема. Бромазепем был обнаружен в волосах, клоназепем нет [12].

Основным и наиболее важным в анализе токсикологических веществ является этап изолирования ксенобиотиков из биологического объекта. На этом этапе можно частично или полностью потерять токсическое вещество и не обнаружить его даже при использовании современного высокочувствительного аналитического оборудования. Существующие методы изолирования лекарственных средств, разработанные ранее, не всегда отвечают требованиям современной аналитической токсикологии [1,2,6].

Для установления факта хронического отравления тяжелыми металлами (в частности, ртутью и мышьяком) волосы используются уже длительное время. Все чаще волосы становятся объектом исследования при диагностике длительного профессионального контакта с некоторыми химическими элементами, тяжелыми металлами. Поставленные цели позволяют авторам использовать для извлечения тяжелых металлов и других химических элементов такие жесткие методы изолирования как минерализация (в вариантах от простого сжигания образца волос, до минерализации смесью концентрированных кислот) [14,15]. Применение таких методов для извлечения наркотических средств и психотропных веществ из волос невозможно, так как интересующие нас вещества относятся к органическим соединениям и при минерализации полностью разрушаются.

Главной трудностью исследования волос является правильный подбор условий пробо-

подготовки для более полного извлечения токсикантов из внутренней части волоса. В соответствии со строением волоса и спецификой образцов волос большинство исследователей выделяют несколько стадий пробоподготовки: отмывка образцов, извлечение веществ из образцов волос, очистка полученных извлечений (гидролизатов) [1,4].

Методики очистки волос основываются на том факте, что наркотики, попадающие на поверхность волос из окружающей среды, слабо проникают во внутренние их области, где образуют достаточно лабильные связи с белками. Волосы, по мнению многочисленных исследователей, работающих в области косметологии и наркологии, делятся по степени доступности для проникновения в них органических молекул на три чётко различимые зоны. Первая доступная зона представляет собой поверхность волос, в которую вещество из окружающей среды имеет свободный доступ. Эта область без особых затруднений может быть обработана такими растворителями, как безводный этанол или изопропиловый спирт, и слабо связанные с поверхностью волос наркотики просто смываются данными растворителями. Вторая частично доступная зона располагается во внутренних областях волос и практически не имеет контакта с внешней средой, что предотвращает попадание в неё наркотиков, например, в виде паров. Однако в эту зону могут проникать вещества в виде водных растворов, в частности в виде растворов в поте, попавшие в него из плазмы крови. Вещества вымываются из этой области волос с применением интенсивной и многократной промывки растворителями, приводящими к разбуханию ткани волос, например, воды, метанола, смеси воды и этанола или изопропанола. Вода считается самым лучшим растворителем для отмывки данной области волос. Последняя недоступная зона является самой большой и в нормальных условиях в неё не попадают водные растворы наркотиков. У сильных толстых волос она может занимать до 90 % их структуры. Однако её протяжённость сильно уменьшается при повреждении волос, например, при их окраске или химической завивке, избыточной сушке или выгорании на солнце. Вещества, попавшие в эту зону, не могут быть удалены промывкой водой. Высвобождение наркотика из неё возможно только при разрушении структуры волос [2,13].

Этап отмывки образца волос является важным, так как позволяет очистить объекта от внешних наносных загрязнений (например, табачного дыма), таким образом снизить вероятность ложноположительных

результатов. Некоторые исследователи предлагают следующий вариант отмывки: волосы, разделенные на сегменты, моют шампунем или настаивают в течение 15 минут и ополаскивают деионизированной водой, затем ацетоном или метанолом, просушивают в течение ночи на воздухе или при температуре 60 °С. Е.А. Симонов (2000), R.A.Harrison, S. Fu (2014) предлагают волосы последовательно отмывать 2 мл 0,2 М раствора хлористоводородной кислоты и 2 мл метанола (или этанола), по 10 мин каждым. Операция проводится до полного исчезновения в последнем растворителе следов наркотического средства [2,13]. Измельчение объекта рекомендуется проводить ножницами, растиранием в ступке с песком или с использованием шаровой мельницы [1,2].

Описанные в литературе методы изолирования токсикантов из образцов волос можно разделить на несколько групп: экстракция органическим растворителем; экстракция органическими растворителями при пониженных температурах; термическое разложение объектов; щелочной гидролиз или кислотный гидролиз, с последующей жидкость-жидкостной экстракцией смесью растворителей; извлечение метанолом или подкисленным метанолом в ультразвуковой бане; ферментный гидролиз с последующей жидкость-жидкостной экстракцией смесью растворителей [1,2,8,13].

При проведении экстракции наиболее часто в качестве растворителя используется метанол. Обычно экстракция проводится в закрытой посуде при температуре 37–45 °С и выше в течение длительного времени (18–24 ч). Иногда для ускорения реакцию смесь обрабатывают ультразвуком. Соотношение количества образца и растворителя обычно составляет 1–2 мл метанола на 50 мг объекта. Данный способ экстракции можно считать универсальным, так как практически все основные наркотические вещества, такие как героин, кокаин и их метаболиты, не подвергаются гидролизу, а процент извлечения их достаточно высок. Часть вещества, захваченного при росте волос зёрнами меланина, при данном способе остаётся в связанном виде. Затем проводят твердофазную или жидкость-жидкостную экстракцию в условиях, селективных для целевого токсиканта. Данные методики рекомендуются для обнаружения веществ группы опиатов, тетрагидроканнабинола, кокаина [1,2,13,16]. Для выделения меторфана, амфетаминов можно использовать метанол, подкисленный раствором хлористоводородной кислоты при настаивании с использованием ультразвуковой бани в течение 1 ч, а затем ещё настаивание с подкисленным метанолом в течение ночи [2].

Частным методом изолирования для обнаружения 6-моноацетилморфина (6-МAM), метадона, кокаина является настаивание со смесью метанола и трифторуксусной кислоты (9:1) с использованием ультразвуковой бани в течение 1 ч. Затем настаивают при повышенной температуре в течение ночи, после чего проводят твердофазную экстракцию (ТФЭ). Прямое изолирование метанолом показало более высокую степень и чистоту извлечения аналитов [17].

Р. Edder с соавторами (1994) проводили сравнение результатов различных методов изолирования при проведении исследований образцов волос. Выделение опиатов из волос методом сверхкритической экстракции проводили в течение 30 мин смесью CO_2 -метанол-триэтиламин-вода (85 : 6 : 6 : 3). Авторы указывают на быстроту проведения экстракции предложенным методом. Метод пригоден для изолирования 6-МAM, так как он не подвергается разрушению. К недостаткам метода следует отнести высокую стоимость оборудования для проведения экстракции [2].

Процесс жидкостной экстракции не может гарантировать полное извлечение целевого вещества, поскольку эффективность извлечения зависит от ранее описанных физических свойств волос. Подбор растворителей для процедуры экстракции не всегда позволяет существенно повысить эффективность этого процесса. Поэтому предпочтение для извлечения остаточных лекарственных веществ из матрицы волос должно быть отдано более жестким методам расщепления. Одним из таких методов является щелочной гидролиз: соотношение щелочи и обрабатываемого объекта рекомендуется 1–2 мл реактива на 50 мг. После проведения гидролиза реакционная смесь охлаждается, нейтрализуется и очищается. Например, к навеске волос (20-100 мг) добавляли 1 мл 1 М раствора калия гидроксида и выдерживали 40 мин при 50 °С [17].

Целесообразность применения щелочного гидролиза так же показана при исследовании каннабиноидов, амфетаминов, нейролептиков и психостимуляторов, так как это позволяет получить более полные извлечения. Щелочной гидролиз проводится настаивание проб волос с 2,5 М раствором натрия гидроксида при 37 °С в течение ночи. При увеличении температуры реакционной массы, время экспозиции соответственно снижается. После этого устанавливают рН среды 9 и проводят жидкость-жидкостную экстракцию.

Метод кислотного гидролиза используется для извлечения веществ морфиновой группы, бензодиазепинов, антипсихотических средств, кокаина [13,17,18]. Кислотный гидролиз воз-

можно проводить несколькими методами с 5М растворами хлористоводородной или серной кислот при 37 °С в течение ночи или с 1 мл 5М хлористоводородной кислоты 5 мин при 90° С [17,18]. Необходимо учитывать, что жесткие агенты, такие как кислоты или щелочи могут изменить структуру некоторых токсикантов и его метаболитов особенно при нагревании, привести к гидролизу кокаина, героина и других сложных эфиров, амидов и т.п. [2].

Поэтому весьма перспективным является применение ферментативного гидролиза, который предлагает более мягкие условия, хотя и требует больших временных затрат. Использование ультразвукового облучения, которое быстро разрушает клеточную мембрану и обеспечивает прямой контакт между ферментом и цитоплазмой, может сократить процедуру экстракции до 30 мин. [18]. Ряд авторов с этой целью предлагают использовать несколько ферментов, такие как β -глюкуронидаза, арилсульфатазы (glusulase), протеиназы К, протеазы Е, протеазы VIII и биопураза [19,20,21,22,23].

Например, описана следующая методика ферментативного гидролиза: к навеске образцов волос добавляют 1 мл водного раствора (рН 6,5) β -глюкуронидазы, пепсина, трипсина или кератиназы (1:10). Выдерживают 12 ч при 40 °С, затем обрабатывают на ультразвуковой бане в течение 1 ч. Центрифугируют в течение 5 мин при 14000 об/мин. Водную фазу отделяют и подвергают очистке методом ТФЭ [21].

Проведенные ранее Н.А. Чувиной с соавт. (2013) исследования показали перспективность ферментативного гидролиза крови или плазмы крови с использованием таких ферментов как папаин, трипсин, химотрипсин, химопсин и пепсин [25, 26, 27, 28]. В то же время, методы ферментативного гидролиза для изолирования токсических веществ из волос для целей химико-токсикологических исследований в литературе не описаны.

Особенно это актуально для выделения фенобарбитала – производного барбитуровой кислоты, часто являющегося причиной как острых, так и хронических отравлений на фоне длительного приема при выраженной зависимости от данного препарата. Методики его химико-токсикологического анализа в биологических жидкостях (кровь, моча) и тканях описаны в литературе. Однако информации об исследовании производных барбитуровой кислоты в волосах в литературе очень мало.

Для извлечения производных барбитуровой кислоты из биологических жидкостей применяют методы жидкость-жидкостной экстракция с использованием порядка разных экстрагентов: дихлорметан, гексан, диэтиловый эфир,

толуол, н-бутил хлорид, хлороформ или смеси растворителей гексан : этилацетат (6:1), толуол : этилацетат (4:1). Экстракцию проводят 10 мл экстрагента (дробно) при рН=2 среды, при добавлении растворов кислот серной, фосфорной или винной. Наиболее полное извлечение показало применение диэтилового эфира или хлороформа (степень экстракции для фенобарбитала составила $29,4 \pm 2,1\%$, для барбитала – $22,1 \pm 0,3\%$) [26]. Экстракция из крови проводится с использованием таких же растворителей, что и для мочи. Кислое значение рН среды достигается путем добавления фосфатного буфера. Объем крови для исследования может варьировать от 1 мл до 7 мл [29].

Для производных барбитуровой кислоты показал свою эффективность метод ТФЭ на патронах марки Oasis HLB, Oasis WCX, Oasis WA. Степень экстракции на патронах марки Oasis HLB для фенобарбитала составила $53,2 \pm 0,8$, для барбитала – $42,9 \pm 1,6$; на патронах марки Oasis MAX для фенобарбитала $61,7 \pm 4,8$, для барбитала $56,5 \pm 3,5$ [27]. В литературе описаны методики использования патронов для ТФЭ следующих производителей: Variant (Bond-Elut Certify II), Waters (Sep-Pak) и International Sorbent Technology (isolut Confirm HCX) [29].

Н.А. Чувиной с соавт. (2013) показано, что наилучшие результаты экстракции барбитуратов из крови были получены при использовании фермента трипсина; для фенобарбитала степень экстракции составила $62,1 \pm 3,9\%$, для барбитала $75,1 \pm 3,8\%$. Идентификацию барбитуратов в извлечении из биологических объектов проводили методом газовой хроматографии, для более точной идентификации использовать масс-селективный детектор. Использованы следующие условия: газовый хроматограф Agilent Technologies 6890 N с автоинжектором 7683 и масс-селективным детектором 5973 N. Условия хроматографирования: капиллярная колонка с внутренним диаметром 0,25 мм и длиной 30 м (HP5MS), газ-носитель гелий, скорость потока – 1 мл/мин, температура инжектора 260°C , интерфейса 290°C , температура колонки программируется от 130°C до 290°C со скоростью $20^\circ/\text{мин}$, масс-селективный детектор с температурой источника 230°C , масс-квадрупольный анализатор, энергия ионизации 70 эВ. На хроматограмме отмечался один пик анализируемого вещества, с характерным масс-спектром, совпадающим с данными библиотеки прибора. Количественное определение барбитуратов авторы проводили методом ВЭЖХ, на приборе «Waters 2695» с колонкой Nova Pak C18 4 мкм $3,9 \times 150$ мм. Концентрация лекарственных веществ в растворе составляла 400 мкг/мл. Условия хроматогра-

фирования были следующие: элюент смесь воды деионизованной и ацетонитрила сорта 0 (60:40); изократический режим; скорость элюирования 100 мкл/мин; температура колонок 30°C ; дозирование 10 мкл; детектирование при 220 нм. Расчет выполняли с использованием калибровочного графика зависимости концентрации вещества от площади пика анализируемого вещества [28].

В последние 2–3 года появилось и стало резко возрастать злоупотребление лекарственными средствами из группы холиноблокаторов, циклопентолом (цикломед) и тропикамидом, которые применяются в офтальмологии в виде капель для расширения зрачка [31, 32]. В состоянии интоксикации появлялось ощущение легкости в теле, «трудно держаться на ногах», нарушение тактильной чувствительности, частое мочеиспускание, отмечались беспокойство, сухость во рту, сухость и шероховатость кожи. В ряде случаев после введения героина вместе с тропикамидом у больных наблюдались истинные зрительные и слуховые галлюцинации. Следует отметить быстрый рост толерантности к тропикамиду, в основном за счет увеличения кратности введения препарата. Пациенты, употребляющие тропикамид в сочетании с амфетаминами, обычно присоединяли данный холиноблокатор на 2–3-й год наркотизации. Как и при сочетанном употреблении тропикамида с героином, отмечалось усиление действия психостимуляторов [31].

При целенаправленном исследовании биожидкости на присутствие тропикамида применяют метод прямой экстракции хлороформом или смесью хлороформ : бутанол (6 : 1) при рН=7-8 среда или смесью хлороформ : изопропиловый спирт (9 : 1) при рН=6 среды (степень экстракции 95%) [33,34]. При подозрении на факт употребления тропикамида совместно с другими веществами рекомендуется проводить экстракцию смесью хлороформ: изопропиловый спирт (9 : 1) или хлороформ : бутанол (6 : 1) при рН=9-10. Из внутренних органов предлагается проводить изолирование по методу Карташова, нейтральным ацетоном с последующей жидкость-жидкостной экстракцией хлороформом из щелочной среды (рН=8) [34,35].

Газохроматографическое определение тропикамида проводили на приборе «Кристаллюкс-4000М» с пламенно-ионизационным детектором, на капиллярной кварцевой колонке ZB-5 (30 м*0,25 мм). Температура детектора и испарителя 250°C , температура колонки 240°C [37]. Также была разработана методика идентификации тропикамида в извлечении из биологического материала методом газовой хроматографии с масс-селективным детектором без

дериватизации на приборе Agilent 5860A/5973 с капиллярной кварцевой колонкой HP-5MS (30 м*0,25 мм); режим хроматографирования: скорость газа-носителя 1,2 мл/мин, температура инжектора 250 °С, интерфейса 280 °С, температура колонки: режим «программирования температуры» с 70 °С до 280 °С со скоростью 20 °С. Идентификацию осуществляли по сравнению масс-спектра тропикамида со стандартными спектрами библиотек [37].

Заключение. Таким образом, анализ данных литературы позволяет заключить, что волосы являются весьма перспективным объектом химико-токсикологического исследования с целью установления фактов и длительности контактов с наркотическими и психотропными веществами. Для изолирования токсикантов применяются методы кислотного, щелочного

гидролиза, однако ферментативный гидролиз с использованием протеолитических ферментов имеет ряд преимуществ, так как позволяет выделить легкогидролизуемые в других условиях токсиканты и их метаболиты. Идентификацию и количественное определение следует проводить такими высокочувствительными методами как газовой хроматографии с масс-селективным детектором и высокоэффективной жидкостной хроматографии. В литературе представлены многочисленные методики идентификации и количественного определения производных барбитуровой кислоты (например, фенобарбитала) и тропикамида в биологических жидкостях или тканях, однако отсутствуют данные о динамике накопления в волосах и методики их изолирования из указанного объекта.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Савчук С.А., Изотов Б.Н. Идентификация наркотических и психоактивных веществ в биологических жидкостях и волосах методом газовой хроматографии с масс-селективным детектированием. Информационное письмо. М.: ФБГУ ННЦ Наркологии; 2014.
2. Симонов Е.А., Изотов Б.Н., Фесенко А.В. Наркотики: методы анализа на коже, в её придатках и выделениях. М.: Анахарсис; 2000.
3. Калетина Н.И., ред. Токсикологическая химия. Метаболизм и анализ токсикантов: учебное пособие. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2008.
4. Dominguez-Romero J.C., Garcia-Reyes J.F., Molina-Diaz A. Screening and quantitation of multiclass drugs of abuse and pharmaceuticals in hair by fast liquid chromatography electrospray time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 2011; 879: 2034-2042.
5. Pragst F., Balikova M.A. State of the art in hair analysis for detection of drug and alcohol abuse. *Clinica Chimica Acta*. 2006; 370 (1): 17-49.
6. Guidelines for testing drugs under international control in hair, sweat and saliva. United nations international drug control programme. NY; 2001; Available at: <http://www.unodc.org/unodc/en/scientists/publications-drug-testing-laboratories.html>
7. Kintz P., ed. Analytical and practical aspects of drug testing in hair. USA.: Taylor & Francis Group; 2007.
8. Boumba V. A., Ziavrou K. S., Vougiouklakis T. Hair as a Biological Indicator of Drug Use, Drug Abuse or Chronic Exposure to Environmental Toxicants. *International Journal of Toxicology*. 2006; 25(143): 143-163.
9. Horvath A.L. Solubility of Structurally Complicated Materials: 3. Hair. *The Scientific World Journal*. 2009; 9: 255-271.
10. Takayama N., Tanaka S., Kizu R., Hayakawa K. HPLC: Chemiluminescence detection of methamphetamine and amphetamine in black and white hair samples. *Japanese Journal of Toxicology and Environmental Health*. 1998; 44(2): 116-121.
11. Jou C.J.G., Chen Y.S., Wang H.P., Lin K.S., Tai H.S. Hydrolytic dissociation of hog-hair by microwave radiation. *Bioresource Technology*. 1999; 70: 111-113.
12. Balikova M. Hair analysis for drugs of abuse. Plausibility of interpretation. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2005; 149(2): 199-207.
13. Harrison R.A., Fu S. Review of methodology for testing hair for cocaine. *Journal of Forensic Investigation*. 2014; 2(1): 1-7.
14. Власенко М.А. Элементный статус, показатели свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы у сотрудников Федеральной противопожарной службы МЧС России с заболеваниями органов пищеварения: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. СПб.; 2012.
15. Хамидулина Х.Х., Давыдова Ю.О., Рабинова Д.Н. Современные проблемы регулирования свинца и его соединений. В кн.: Материалы пленума научного совета по экологии человека и гигиены окружающей среды Российской Федерации. М.; 2012: 460-463.
16. Strano-Rossi S., Chiarotti M. Solid-phase microextraction for cannabinoids analysis in hair and its possible application to other drugs. *Journal of Analytical toxicology*. 1999; 23: 7-10.
17. Савчук С.А., Никитина Н.М., Зулаева А.С., Несмеянова Н.И., Константинова С.Д. Применение методов ГХ-МС и ВЭЖХ-МС/МС для определения наркотических веществ в волосах. *Наркология*. 2012; 10 (17): 72-79.
18. Савчук С.А. Обнаружение синтетических каннабимиметиков, наркотических, психоактивных веществ и их метаболитов в моче, волосах и ногтях методами жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. Информационное письмо. М.: ФБГУ ННЦ Наркологии; 2014.
19. Yegles M. Detection of benzodiazepines and other psychotropic drugs in human hair by GC/MS. *Journal of Forensic Science International*. 1997; 84: 211-218.
20. Eser H.P. Influence of sample preparation on analytical results: drug analysis (GC/MS) on hair snippets versus hair powder using various extraction methods. *Journal of Forensic Science International*. 1997; 84: 271-279.
21. Moeller M.R. Cocaine and its metabolites, benzoylecgonine and ecgonine methyl ester, in hair. *Journal of Analytical Toxicology*. 1992; 16: 291-296.
22. Baumgartner W.A. Hair analysis method. Patent US, N 6949344; 2005 (in USA).
23. Baumgartner W.A. Detection of marijuana intake in humans; obtain hair sample, digest, incubate with binding agent, filter protease and impurities, evaluate for marijuana use. Patent US, N 6582924; 2003 (in USA).
24. Чувина Н.А. Изолирование лекарственных средств из плазмы крови с применением протеолитических ферментов: Автореф. дис. ... канд. фарм. наук. СПб.; 2013.
25. Чувина Н.А., Стрелова О.Ю., Ку克林 В.Н. Применение ферментативного гидролиза для изолирования токсических веществ различных химических групп из биологической жидкости (крови, плазмы) с целью химико-токсикологического анализа. *Вестник Российской Военной медицинской академии им. Кирова*. 2011; 1(33): 154-155.
26. Чувина Н.А., Стрелова О.Ю., Колупаева А.С., Заблочная И.В. Использование метода ферментативного гидролиза для изолирования производных барбитуровой кислоты из крови на примере фенобарбитала и барбитала. *Судебно-медицинская экспертиза*. 2010; 5: 19-21.
27. Чувина Н.А., Стрелова О.Ю., Ку克林 В.Н. Изолирование лекарственных веществ из плазмы крови методом твердофазной экстракции. *Бутлеровские сообщения*. 2013; 33(1): 35-42.
28. Чувина Н.А., Стрелова О.Ю., Ку克林 В.Н. Ферментативный гидролиз плазмы крови как метод химико-токсикологического анализа, используемый для изолирования токсических веществ. *Токсикологический вестник*. 2013; 1: 31-35.
29. Recommended method for the detection and assay of barbiturates and benzodiazepines in biological specimens. United nations international drug control programme. NY; 1997. Available at: <http://www.unodc.org/unodc/en/scientists/recommended-methods-for-the-identification-and-analysis-of-barbiturates-and-benzodiazepines-under-international-control.html>
30. Хабриева П.У., Калетина Н.И., ред. Токсикологическая химия: аналитическая токсикология: учебное пособие. М.: Гэотар-Медиа; 2010.
31. Рохлина М.Л., Богинская Д.Д., Усманова Н.Н., Мохначев С.О. Злоупотребление производными лекарственными препаратов. *Наркология*. 2012; 11(2): 44-49.
32. Тумилович Е. Ю. Разработка методик определения дицикловерина гидрохлорид и тропикамида для целей химико-токсикологических исследований: Автореф. дис. ... канд. фарм. наук. Пермь; 2012.
33. Банникова Г. А., Лаврентьева А.В., Мелентьев А.Б. Определение тропикамида в крови для судебной и клинической токсикологии. Проблемы экспертизы в медицине. 2011; 11(1-2): 16-18.
34. Мансуров Р.Г., Артемьева И.А., Полкова В.В., Хабиева Н.А. Изолирование, идентификация, количественное определение тропикамида. Актуальные вопросы судебной медицины и права. Казань, 2011; Available at: <http://journal.forens-lit.ru/node/340>
35. Федосеева Л.М., Даутова Д.Д., Кнауз Н.Н., Воронкова Л.Г., Кудрян В.А. Химико-токсикологическое исследование тропикамида. Актуальные вопросы судебной медицины и экспертной практики. Барнаул-Новосибирск, 2011; Available at: <http://journal.forens-lit.ru/node/491>
36. Панова Е.П., Владимирова О.В., Куриленко М.И., Драгина Л.П. Судебно-химическое определение тропикамида. Актуальные вопросы судебной медицины, медицинского права и биозтики, Самара, 2011. Available at: <http://journal.forens-lit.ru/node/666>
37. Бушуев Е.С., Горбачева Т.В., Бычков В.А. Тропикамид как объект химико-токсикологического анализа. Справочно-информационное пособие. СПб., 2013.

REFERENCES:

1. Savchuk S.A., Izotov B.N. Identification of drugs and psychoactive substances in biological fluids and hair using gas chromatography with mass selective detection. Informacionnoe pis'mo, Moscow: FBGU NNC Narkologii; 2014 (in Russian).
2. Simonov E.A., Izotov B.N., Fesenko A.V. Drugs: methods of analysis in the skin, its appendages and secretions. Moscow: Anaharsis; 2000 (in Russian).
3. Kaletina N.I., ed. Toxicological Chemistry. Metabolism and analysis of toxicants. Uchebnoe posobie. Moscow: GJeOTAR-Media; 2008 (in Russian).
4. Dominguez-Romero J.C., Garcia-Reyes J.F., Molina-Diaz A. Screening and quantitation of multiclass drugs of abuse and pharmaceuticals in hair by fast liquid chromatography electrospray time-of-flight mass spectrometry. Journal of Chromatography B. 2011; 879: 2034-2042.
5. Pragst F., Balikova M.A. State of the art in hair analysis for detection of drug and alcohol abuse. Clinica Chimica Acta. 2006; 370 (1): 17-49.
6. Guidelines for testing drugs under international control in hair, sweat and saliva. United nations international drug control programme. NY; 2001. Available at: <http://www.unodc.org/unodc/en/scientists/publications-drug-testing-laboratories.html>
7. Kintz P., ed. Analytical and practical aspects of drug testing in hair. USA: Taylor & Francis Group; 2007.
8. Boumba V. A., Zivrou K. S., Vougiouklakis T. Hair as a Biological Indicator of Drug Use, Drug Abuse or Chronic Exposure to Environmental Toxicants. International Journal of Toxicology. 2006; 25(143): 143-163.
9. Horvath A.L. Solubility of Structurally Complicated Materials: 3. Hair. The Scientific World Journal. 2009; 9: 255-271.
10. Takayama N., Tanaka S., Kizu R., Hayakawa K. HPLC:Chemiluminescence detection of methamphetamine and amphetamine in black and white hair samples. Japanese journal of toxicology and environmental health. 1998; 44(2): 116-121.
11. Jou C.J.G., Chen Y.S., Wang H.P., Lin K.S., Tai H.S. Hydrolytic dissociation of hog-hair by microwave radiation. Bioresource Technology. 1999; 70: 111-113.
12. Balikova M. Hair analysis for drugs of abuse. Plausibility of interpretation. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2005; 149 (2): 199-207.
13. Harrison R.A., Fu S. Review of methodology for testing hair for cocaine. Journal of Forensic Investigation. 2014; 2(1): 1-7.
14. Vlasenko M.A. Element status, indicators of free radical oxidation and antioxidant system in employees of the Federal Fire Service of Emergency of Russia with digestive diseases. Dr. biol. sci. diss. Saint-Petersburg; 2012 (in Russian).
15. Khamidulina H.H., Davydov J.O., Rabikova D.N. Modern problems of regulation of lead and its compounds. Proc.: Materials Plenum Scientific Council for Human Ecology and Environmental Health of the Russian Federation. M.; 2012: 460-463 (in Russian).
16. Strano-Rossi S., Chiarotti M. Solid-phase microextraction for cannabinoids analysis in yair and its possible application to other drugs. Journal of analytical toxicology. 1999; 23: 7-10.
17. Savchuk S.A., Nikitina N.M., Zulaeva A.S., Nesmejanova N.I., Konstantinova S.D. Application methods GC-MS and HPLC-MS / MS to determine the drug in the hair. Narkologija. 2012; 10 (17): 72-79 (in Russian).
18. Savchuk S.A. Detection of synthetic cannabimimetics, drugs, psychoactive substances and their metabolites in the urine, hair and nails liquid chromatography method with mass spectrometric detection. Informacionnoe pis'mo, Moscow: FBGU NNC Narkologii; 2014 (in Russian).
19. Yegles M. Detection of benzodiazepines and other psychotropic drugs in human hair by GC/MS. Journal of Forensic Science International. 1997; 84: 211-218.
20. Eser H.P. Influence of sample preparation on analytical results: drug analysis (GC/MS) on hair snippets versus hair powder using various extraction methods. Journal of Forensic Science International. 1997; 84: 271-279.
21. Moeller M.R. Cocaine and its metabolites, benzoylecgonine and ecgonine methyl ester, in hair. Journal of Analytical Toxicology. 1992; 16: 291-296.
22. Baumgartner W.A. Hair analysis method. Patent US, N 6949344; 2005 (in USA). Baumgartner W.A. Detection of marijuana intake in humans; obtain hair sample, digest, incubate with binding agent, filter protease and impurities, evaluate for marijuana use. Patent US, N 6582924; 2003 (in USA).
23. Baumgartner W.A. Detection of marijuana intake in humans; obtain hair sample, digest, incubate with binding agent, filter protease and impurities, evaluate for marijuana use. Patent US, N 6582924; 2003 (in USA).
24. Chuvina N.A. Isolation of drugs from blood plasma using proteolytic enzymes. Dr. pharm. sci. diss. Saint-Petersburg; 2013 (in Russian).
25. Chuvina N.A., Strelova O.Ju., Kuklin V.N. Application of enzymatic hydrolysis to isolate toxic substances of various chemical groups from the biological fluids (blood, plasma) to chemical-toxicological analysis. Vestnik Rossijskoj Voennoj medicinskoj akademii im. Kirova. 2011; 1(33): 154-155 (in Russian).
26. Chuvina N.A., Strelova O.Ju., Kolupaeva A.S., Zablockaja I.V. The use of enzymatic hydrolysis to isolate derivatives of barbituric acid from the blood (for example, phenobarbital and barbamy). Sudebno-medicinskaja jekspertiza. 2010; 5: 19-21 (in Russian).
27. Chuvina N.A., Strelova O.Ju., Kuklin V.N. Isolation of drugs from blood plasma by solid phase extraction. Butlerovskie soobshhenija. 2013; 33(1): 35-42 (in Russian).
28. Chuvina N.A., Strelova O.Ju., Kuklin V.N. Enzymatic hydrolysis of plasma as a method of chemical-toxicological analysis is used to isolate the toxic substances. Toksikologicheskij vestnik. 2013; 1: 31-35 (in Russian).
29. Recommended method for the detection and assay of barbiturates and benzodiazepines in biological specimens. United nations international drug control programme. NY; 1997. Available at: <http://www.unodc.org/unodc/en/scientists/recommended-methods-for-the-identification-and-analysis-of-barbiturates-and-benzodiazepines-under-international-control.html>
30. Habrieva R.U., Kaletina N.I., ed. Toxicological chemistry: analytical toxicology: a tutorial. Moscow: Gjeotar-Media; 2010 (in Russian).
31. Rohlina M.L., Boginskaja D.D., Usmanova N.N., Mohnachev S.O. Abuse derived drugs. Narkologija. 2012; 11(2): 44-49 (in Russian).
32. Tumilovich E. Ju. Development of methods for determining dicycloverin hydrochloride and tropicamide for chemical-toxicological studies. Dr. pharm. sci. diss. Perm'; 2012 (in Russian).
33. Bannikova G. A., Lavrent'eva A.V., Melent'ev A.B. Determination of tropicamide in the blood for forensic and clinical toxicology. Problemy jekspertizy v medicine. 2011; 11(1-2): 16-18 (in Russian).
34. Mansurov R.G., Artem'eva I.A., Popkova V.V., Habrieva N.A. Isolation, identification, quantification of tropicamide. Aktual'nye voprosy sudebnoj mediciny i prava. 2011, 11. Available at: <http://journal.forens-lit.ru/node/340> (Accessed 08 October 2011).
35. Fedoseeva L.M., Dautova D.D., Knaub N.N., Voronkova L.G., Kodrjan V.A. Chemical-toxicological research of tropicamide. Aktual'nye voprosy sudebnoj mediciny i prava. 2011, 17. Available at: <http://journal.forens-lit.ru/node/491> (Accessed 12 November 2011).
36. Panova E.P., Vladimirova O.V., Kurilenko M.I., Dragina L.P. Forensic chemical determination of tropicamide. Aktual'nye voprosy sudebnoj mediciny i prava. 2011. Available at: <http://journal.forens-lit.ru/node/666> (Accessed 30 March 2012).
37. Bushuev E.S., Gorbacheva T.V., Bychkov V.A. Tropicamide as an object of chemical-toxicological analysis, Saint-Petersburg: Spravochno-informacionnoe posobie; 2013 (in Russian).

Ju.V. Slustovskaia, O. Ju. Strelova

HAIR AS OBJECT OF CHEMICAL AND TOXICOLOGICAL ANALYSIS

St. Petersburg State Chemical-Pharmaceutical Academy, 197376, St. Petersburg, Russian Federation

Lately there is an increasing interest in forensic and clinical toxicology to detect drugs and psychotropic substances in hair samples. This biological object extends opportunity to detect drugs and other toxic substances in the human body. The main difficulty in investigating the hair is a correct selection of sample preparation conditions of the object subject to chemical and toxicological studies in order to obtain a more complete extraction of toxins from the inside of the hair. For this purpose the following methods are applied: organic solvent-based extraction; organic solvent-based extraction at lower temperatures; thermal decomposition of objects; alkaline or acidic hydrolysis followed by mixed solvents-based liquid-liquid extraction; methanol-based extraction or acidified methanol-based extraction in an ultrasonic bath; enzymatic hydrolysis followed by mixed solvents-based liquid-liquid extraction.

Keywords: hair; drugs; psychotropic substances; chemical and toxicological analysis; sample preparation; acid hydrolysis; enzymatic hydrolysis, barbituric acid derivatives, tropicamide.

Переработанный материал поступил в редакцию 29.04.2015 г.