



UNIwersytet JAGIELLOŃSKI  
W KRAKOWIE

# **Innowacyjne sposoby analizy krwi i szpiku kostnego na zawartość substancji psychoaktywnych**

Autor: Alicja Majda

Promotor: **Prof. dr hab. Paweł Kościelniak**

Promotor pomocniczy: **dr hab. Renata Wietecha-Posłuszny, Prof. UJ**

Praca doktorska wykonana w Zakładzie Chemii Analitycznej Wydziału Chemii  
Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie

Kraków 2021

## AUTOREFERAT

---

W ostatnich dekadach na świecie gwałtownie wzrosło stosowanie leków psychotropowych zarówno w celach leczniczych, jak i pozamedycznych. Wraz z tym trendem pojawiły się też coraz częstsze przypadki hospitalizacji i zgonów w wyniku przedawkowania tych substancji. W związku z tym analiza ilościowa leków psychotropowych w materiale biologicznym jest jedną z najistotniejszych kwestii podejmowanych podczas postępowania toksykologiczno-sądowego. Równie ważne w tym aspekcie jest opracowanie nowych metod przygotowania próbek pobieranych pośmiertnie, które pozwolą na ograniczenie zużycia próbek i rozpuszczalników, kierując się koncepcją *zielonej chemii*.

Niniejsza praca doktorska obejmowała przygotowanie i analizę krwi oraz aspiratu szpiku kostnego (BMA) pod kątem oznaczania wybranych substancji psychoaktywnych należących do leków z grupy benzodiazepin (BZD), inhibitorów wychwytu zwrotnego serotoniny (SSRI), inhibitorów wychwytu zwrotnego serotoniny i noradrenaliny (SNRI), niebenzodiazepinowych leków nasennych (Z-drugs) jak również leków przeciwpadaczkowych (AED). Badania te zrealizowano w trzech etapach, wykorzystując na każdym z nich inną procedurę i technikę badawczą.

Na początku pracy skupiono się na optymalizacji procedury przygotowania próbek metodą suchej kropli krwi (DBS). Plamy krwi poddano analizie przy pomocy obrazowania hiperspektralnego (HSI), m.in. w celu wyznaczenia czasu ich schnięcia.

Drugi etap prac badawczych związany był z zastosowaniem metody DBS/LC- MS w oznaczaniu wybranych leków psychotropowych. W tym celu w pierwszej kolejności opracowano strategię przeliczania stężeń analitów w próbkach naniesionych na karty DBS, a następnie opracowaną metodę zastosowano do oznaczania 16 substancji psychoaktywnych w próbkach krwi pobranych pośmiertnie.

Ostatnim etapem badań było opracowanie metodologii przygotowania i analizy materiału biologicznego pobranego *post-mortem*, za pomocą mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej prowadzonej bezpośrednio z matrycy próbki (DI-SPME). Aby zrealizować ten krok, najpierw poddano optymalizacji procedurę przygotowania próbek, a następnie wyznaczono parametry walidacyjne metody DI-SPME/LC-MS i zastosowano ją do oznaczenia 25 wybranych leków psychotropowych w próbkach aspiratu szpiku kostnego.

Realizacja pierwszego etapu badawczego z wykorzystaniem obrazowania hiperspektralnego polegała na analizie zmian fizykochemicznych śladów krwi na kartach DBS. Prowadzona była ona z zastosowaniem metody minimalnego szumu (MNF) oraz analizy

głównych składowych (PCA), co poskutkowało rozróżnieniem plam krwi wzależności od czasu naniesienia krwi na podłoże, w przedziałach czasowych – tygodniowych, godzinowych i minutowych. Co niezwykle istotne, wykonana analiza dostarczyła informacji o dynamice zmian zachodzących podczas wysychania plam krwi, a tym samym pozwoliła na wyznaczenie minimalnego czasu schnięcia śladu na karcie DBS. Fakt ten wskazuje, że technika HSI może posłużyć przy wyborze miejsca pobrania próbki do analizy z wykorzystaniem technik separacyjnych.

Kluczowym aspektem badań prowadzonych z wykorzystaniem obrazowania hiperspektralnego jest niewątpliwie jego nieniszcząca natura, szybkość analizy i przede wszystkim możliwość wykrywania różnic niewidocznych gołym okiem. Z tego powodu HSI może być traktowane jako narzędzie do wstępnej analizy śladów kryminalistycznych, co więcej stosowane jako metoda wyznaczania wieku plam krwi na miejscu zdarzenia.

Głównym wyzwaniem związanym z wykorzystaniem techniki DBS w ilościowej analizie materiału biologicznego na potrzeby toksykologii sądowej niewątpliwie jest efekt hematokrytu. Z tej racji, kolejny etap badawczy poświęcony był opracowaniu strategii przeliczania stężenia analitów w przypadku braku informacji na temat poziomu hematokrytu w badanych próbkach. Model obliczeniowy został oparty na pomiarze średnic plam materiału biologicznego. Prawidłowość takiego podejścia została sprawdzona poprzez analizę uprzednio przebadanych próbek sądowych krwi metodą HPLC-ESI-MS/MS. Badania wstępne oznaczania diazepamu i alprazolamu przeprowadzone z wykorzystaniem opracowanej metody DBS/LC-MS, wykazały poprawność zastosowanej strategii przeliczania stężeń. Dzięki temu, możliwe było poszerzenie metody oznaczania o inne leki psychotropowe, co również zakończyło się sukcesem.

Technika DBS może być z powodzeniem stosowana w przypadku analiz toksykologicznych klasycznego jak i alternatywnego materiału biologicznego, przede wszystkim w sytuacji, gdy mamy do czynienia z ograniczoną objętością próbki. Ponadto warto zauważyć, że piśmiennictwo wskazuje na możliwość długiego przechowywania próbek naniesionych na karty DBS nawet w temperaturze pokojowej, co jest dodatkowym atutem przemawiającym za wdrożeniem opracowanej metody do rutynowego stosowania w postępowaniu sądowym.

Na ostatnim etapie badawczym skupiono się na opracowaniu kolejnej metody przygotowania próbek materiału biologicznego, która również spełniła kryteria wymagane dla metod bioanalitycznych. W pierwszej kolejności zoptymalizowano czas adsorpcji i desorpcji oraz proces czyszczenia włókien tak, aby było możliwe ich ponowne użycie. Dla techniki DI-

SPME/LC-MS wyznaczono odpowiednie parametry walidacyjne i zastosowano w oznaczaniu leków psychotropowych w próbkach sądowych aspiratu szpiku kostnego. Przeprowadzona analiza dała zadawalające rezultaty. Wykazano jej szerokie zastosowanie zarówno dla oznaczania badanych substancji zarówno w dawkach terapeutycznych jak i toksycznych.

Technika DI-SPME/LC-MS jest szybka i pozwala na uproszczenie pracochłonnych i skomplikowanych procesów izolacji analitów ze skomplikowanej matrycy biologicznej. Odpowiednio wykonane kondycjonowanie i czyszczenie włókien SPME pozwala na ich wielokrotne użycie.

Zaproponowane w niniejszej pracy procedury przygotowania próbek i ich analiza mogą stanowić cenną alternatywę dla metod stosowanych tradycyjnie w kryminalistycznej analizie śladów i w oznaczaniu substancji psychoaktywnych w materiale biologicznym.