

DIGOXIN IN A FORENSIC LABORATORY – AN ANALYSIS OF CASES

Piotr ADAMOWICZ, Ewa CHUDZIKIEWICZ, Maria KAŁA
Institute of Forensic Research, Cracow

ABSTRACT: In this work, methods of determination of digoxin and methyl digoxin in biological (blood, urine and liver) and non-biological material (tablets) have been presented on the basis of two cases of poisoning as examples. It has been shown that in the course of systematic toxicological analysis carried out using TLC, GC/MS and HPLC methods, digoxin and its analogues can be missed, even in cases where they are present in high concentrations. Detection of digoxin and its analogues in *post-mortem* material requires application of a targeted analysis after obtaining a preliminary positive result with immunoenzymatic methods. Identification of digoxin in tablets causes great difficulties due to its low concentrations and weakly characteristic analytical signals obtained with the use of instrumental methods.

KEY WORDS: Digoxin and its analogues; Screening and immunoenzymatic methods; Biological and non-biological materials.

Z Zagadnień Nauk Sądowych, z. XLIX, 2002, 114–127
Received 27 February 2002; accepted 7 March 2002

INTRODUCTION

Digoxin is a crystalline glycoside, cardiac tonic, being obtained from lanatoside C, a matrix glycoside present in *digitalis lanata* (Figure 1). It is a cordial medicine influencing not only the cardiac muscles but also unstriated and skeletal muscles, renal tubules and stray nerve centres. Thus, determination of the concentration of digoxin in blood, the cardiac muscle and the kidney is of a great importance in the confirmation of deadly poisoning with this compound.

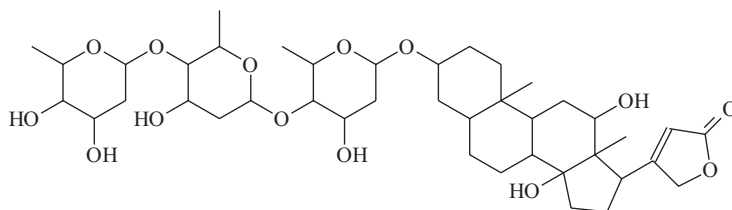


Fig. 1a. Chemical structure of digoxin.

Properties of compound: CAS# 20830-75-5; $C_{41}H_{64}O_{14}$; Mw – 780.95.

Digoxin is most frequently used in hyper-ventricle distemper of the rhythm of the heart as well as in chronic left- and right-ventricle inefficiency and also in acute left-ventricle inefficiency. The therapeutic action of digoxin begins 2 h after oral and 15–30 min after intravenous administration. The half-life period of digoxin after oral and intravenous introduction is 1.5–2 days. Digoxin is a medicine whose concentration in blood should be tested in order to find the appropriate dose for the given individual.

A medicine with a similar action to digoxin is its structural analogue – methylidigoxin, a cordial glucoside obtained semisynthetically (Figure 1b). In comparison to digoxin, methylidigoxin acts much faster: orally introduced – after 5–20 min and intravenously administered after 1–4 min. Its half-life period is 40 h.

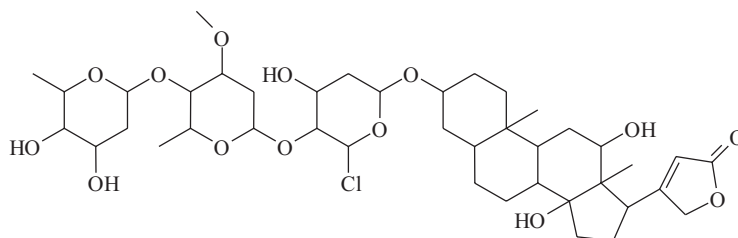


Fig. 1b. Chemical structure of methylidigoxin.

Properties of compound: CAS# 30685-43-9; $C_{41}H_{64}O_{14}$; Mw – 815.39.

Digoxin is most frequently determined with the use of radioimmuno-logical and immunoenzymatic methods. Reagents required for these methods are available on the market.

The concentrations of digoxin presented in the literature, determined in autopsy blood taken from persons who were treated with this compound, are very varied. Values of these concentrations depend on the analytical methods used for their determination and the place from which blood was taken for analysis. In serum of blood taken from the right heart ventricle, the concentrations of digoxin were in the range of 0.5–2.1 $\mu\text{g/l}$; the mean value being 1.3 $\mu\text{g/l}$ in 18 cases. At the same time a significant decrease of the concentration of digoxin was observed in this material, caused by hemolysis of blood during determination of this compound by the radioimmunological method [2].

In spite of the high specificity of immunoenzymatic techniques – thanks to the antibodies used – there are numerous known cases of false positive results. One of the causes of this is formation of endogenic substances in an organism in vivo and post-mortem, immunoreacting with the antibodies present in the applied test.

Other techniques such as thin layer chromatography (TLC), high pressure liquid chromatography with spectrophotometric detection (HPLC-UVD) and high pressure liquid chromatography with fluorescence detection

(HPLC-FLD) which can be applied after derivatisation of digoxin into its fluorescent analogues (e.g. using dehydroascorbic acid [5] and naphthoyl chloride [8]) are also used, although they require extraction of the analyte from the biological matrix. The methods of extraction have to be specific for digoxin. The most frequently used methods of isolation of this compound are: extraction with XAD-2 resin [1], extraction in a liquid-liquid system with dichloromethane [3] and dialysis [6].

CASE REPORTS

Case I

In the evening hours a wife discovered the dead body of her husband (age: 42 years). The deceased left a farewell letter and at the place of the event unknown tablets were found. In the autopsy report the following was stated: "A visual inspection and the autopsy revealed congestion of the internal organs and features of swelling of the brain and the lungs. Examination of the autopsy blood and urine revealed the presence of ethyl alcohol: 2.3‰, and 2.8‰ respectively. Such a result does not allow establishment of the cause of the death".

The following materials, secured at the scene of the occurrence, were delivered to the Institute of Forensic Research in Cracow for examination: 3 tablets, samples of blood, urine and fragments of the liver, kidney, stomach and intestines of the deceased.

Case II

In a flat, the body of a woman was found and it was suspected that death took place because of a medicine overdose. In the course of the investigation it was established that, because of her psychiatric and cardiologic treatment, she took the following medicines: Bemecor (methyldigoxin), Mononit (isosorbide mononitrate), Verospiron (spironolactone), Vivacor (carvedilol), Sintrom (acenocoumarol), Sorbonit (isosorbide dinitrate) and Furosemidum (furosemide).

Fragments of the brain, stomach (without content), intestines, liver and kidneys and a sample of blood were submitted for examination.

METODOLOGY OF THE STUDIES AND RESULTS

Case I

Firstly, tablets secured near the corpse were examined. Their identification could steer further studies in the right direction. For this reason a tablet was examined after dissolving in ethanol and after extraction with ethyl ether from an acidic solution (pH = 2), with chloroform from an alkaline solution (pH = 9) and with ethyl acetate from a strongly alkaline solution (pH = 12). The following methods were used in the course of the examinations:

- UV/VIS spectrophotometry, creating a spectrum in the range 210–350 nm, using Philips PU-7820 apparatus;
- thin layer chromatography (TLC); the analysis was performed in accordance with the screening procedure worked out at the Institute of Forensic Research, using plates covered with silica gel G-60 by Merck, and the following developing systems: a mixture of chloroform and acetone (9:1), methanol with 25% aqueous ammonia solution (98:2) and methanol with acetone (6:4) and the following spray reagents for o-tolidyne visualisation: iron chloride, Dragendorff reagent, iodine in potassium iodide, ninhydrin and mercury(II)nitrate, sodium nitrite and n-naphthylethylenediamine, concentrated sulphuric and nitric acids, and also Marquis reagent and potassium iodoplatinate [4];
- gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC/MS) with the use of apparatus by Varian/Finnigan Mat, Magnum version, with an ion trap detector (ITD) and DB-5MS capillary column by J&W Scientific as well as apparatus by Agilent, serial number 5973 with a quadruple selective mass detector and a HP-5MS column by Hewlett-Packard;
- high pressure liquid chromatography (HPLC-DAD-MTSS); LaChrom System apparatus by Merck/Hitachi was used for analysis, equipped with diode array detector (DAD) and a LiChroCART 124 × 4 column with LiChroSpher RP SelectB packing, and a mobile phase introduced into the column in a gradient system, in accordance with the system of identification of medicines (MTSS) worked out by Merck;
- liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC/MS), using a liquid chromatograph coupled with an HP-1100 mass spectrometer by Hewlett-Packard. A cell for chemical ionisation under atmospheric pressure (APCI) was also applied. Isolation was carried out using a LiChroCART 125 × 4 column packed with Purospher RP-18e by Merck. The mobile phase was a mixture of acetonitrile and water with an addition of 0.1 ml acetic acid per 100 ml of each component of the phase.

None of the above methods allowed us to identify the tablets unambiguously. Analytical signals obtained by particular methods were weakly characteristic, very faint or non-detectable. For these reasons such medicines were considered that do not reveal characteristic analytical parameters in the course of a routine toxicological analysis. The following were used: Digoxin, Sorbonit and Nitroglycerin. The following methods were used for the analysis:

- TLC with two developing systems: a mixture of chloroform and methanol (90:10) and a mixture of ethyl acetate, methanol and 25% aqueous ammonia solution of (85:10:5), and for colouring – chlorate acid (VII) and ultraviolet light;
- Infrared spectrometry (IR) using an FTS40A Fourier spectrometer with UMA500 microscope by BioRad/Digilab.

As a result of these examinations it was found that:

- coefficient R_f for the evidence and the comparative digoxin were identical;
- the IR spectrum of the evidence material did not completely match any of the spectra of the comparative samples; however it possessed the greatest number of features in common with that of the standard digoxin. In the IR spectrum of the evidence material, absorption bands were present originating from glucose groups and amide bands. The spectrum of the unknown tablet was richer than the spectrum of digoxin; e.g. it revealed amide (protein) bands (Figure 2).

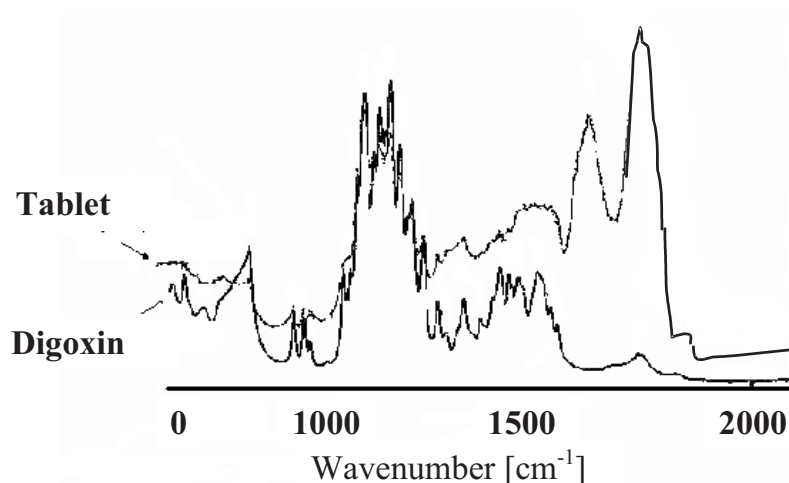


Fig. 2. Spectra of tablet and digoxin standard.

In connection with the obtained results, the tablet was analysed for the presence of digoxin by the immunoenzymatic method using Viva Dade

Behring apparatus. This examination was performed in the Toxicological Laboratory, Clinic of Toxicology, Collegium Medicum, the Jagiellonian University. Digoxin was found in the tablet and this result was finally confirmed by the LC/MS method (Figures 3 and 4).

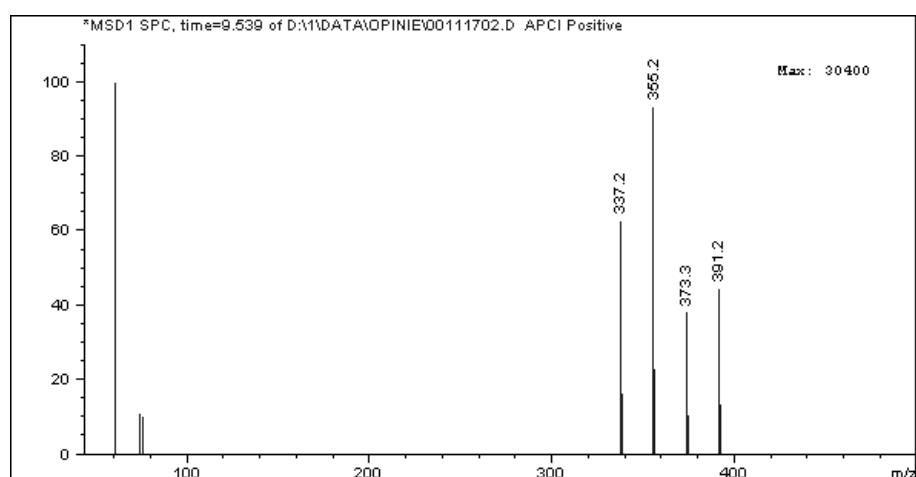


Fig. 3. Mass spectrum of digoxin (LC/MS Hewlett Packard series 1100).

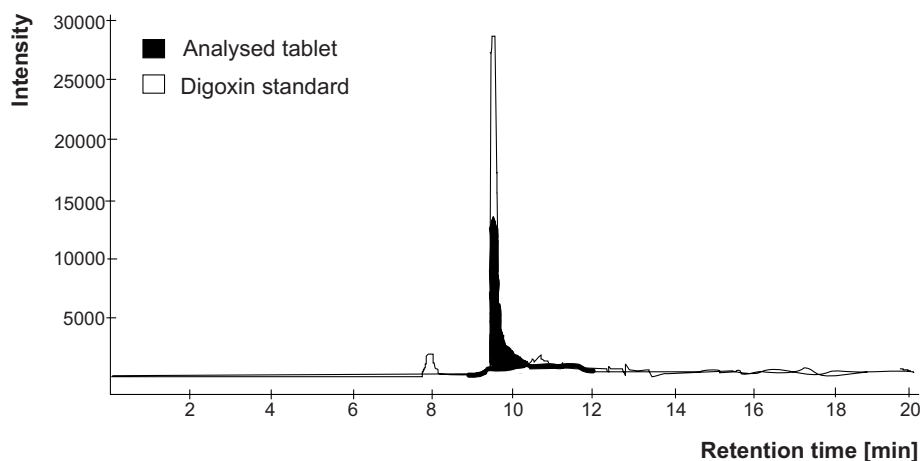


Fig. 4. Extracted ion chromatograms of tablet and digoxin.

Then blood and urine samples were analysed for the presence of digoxin using the above mentioned immunoenzymatic method. Since the obtained concentration of digoxin was contained within the range of toxic concentrations (Table I), a screening analysis of blood was performed according to the analytical procedure elaborated in the Institute of Forensic Research, Cracow.

Blood was examined with the fluorescence polarisation immunoassay method in polarised light using a TDx test by Abbott. Examinations were carried out for the presence of drugs of abuse from the opium alkaloid group, from benzodiazepine analogues and barbituric acid congeners.

As a result of these examinations, the presence of drugs from the group of benzodiazepine analogues was ascertained. For the identification and determination of benzodiazepines, the LC/MS method was applied. Blood samples were extracted with diisopropyl ether at pH = 7.4 and the obtained extracts were analysed using the apparatus described earlier, except that the mobile phase was a mixture of acetonitrile and water with addition of 0.1 ml of concentrated formic acid per 100 ml of each component of the phase and the analysis was performed in selected ion monitoring mode (SIM). Moreover, screening examinations for the presence of other medicines were performed by HPLC-DAD-MTSS.

The results obtained from the analysis of biological materials are presented in Table I.

TABLE I. CONCENTRATIONS [mg/ml] OF DRUGS IN BIOLOGICAL MATERIAL IN CASE I AND CASE II AND DIGOXIN REFERENCE CONCENTRATION RANGES

Case I		
Compound	Material	
	Blood	Urine
Digoxin	3.9	9.2
Nordazepam	1200.0	–
Ethyl alcohol	2.3*	2.8*
Case II		
Compound	Material	
	Blood	Liver**
Digoxin (methyldigoxin)	85.5	41.7
Digoxin blood concentrations [9]		
Therapeutic	Toxic	Lethal
0.7–2.2	2–4	>15 > 7 [1]

* – ‰ ; ** – ng/g.

Case II

Firstly, a routine chemico-toxicological analysis was performed for the presence of drugs with special emphasis on the possibility of the presence of active substances from the preparations listed in the resolution. The examination included a screening analysis of the stomach and the liver with TLC and GS/MS, and analysis of a blood sample with the HPLC-DAD-MTSS method.

The performed chemico-toxicological analysis using the methods mentioned above revealed the presence of furosemide and acenocoumarol in blood and in the fragments of stomach, whereas in the fragments of liver, only the presence of acenocoumarol.

At the same time, since death could have been a result of an overdose of Bemecor containing methyldigoxin, a blood sample and fragments of liver were simultaneously examined by the immunoenzymatic method for the presence of digoxin and its analogues, using the above mentioned Viva Dade Behring apparatus. Blood was examined directly after centrifuging and the fragments of liver after their homogenisation with water and centrifuging. The analysis showed that in the blood samples and fragments of liver large amounts of digoxin or its analogues were present. The obtained results of the analysis calculated for digoxin are presented in Table I. Due to the high concentration of digoxin in the post-mortem material, quantitative analysis of the remaining detected medicines was not performed.

CONCLUSIONS

Detection of digoxin and its analogues in biological material is possible using targeted analysis, most quickly by the immunoenzymatic method. In routine screening analyses carried out using TLC, GC/MS and HPLC methods, digoxin and its analogues can be missed, even when they are present in high concentrations

Identification of digoxin in tablets is very difficult because of its low concentrations and weakly characteristic analytical signals.

References:

1. Aderjan R., Buhr H., Schmidt G., Investigation of cardiac glycoside levels in human post mortem blood and tissues determined by a special radio-immunoassay procedure, *Archives of Toxicology* 1979, vol .42, pp. 107–114.
2. Basel t R. C., Disposition of toxic drugs and chemicals in man, Chemical Toxicology Institute, Foster City 2000.

3. Brock A., A radioimmunoassay for digoxin in serum, urine and myocardial tissue, *Acta Pharmacologica et Toxicologica* 1974, vol. 34, pp. 198–204.
4. Chacia T., Kała M., Application of thin-layer chromatography to drug identification, *Problems of Forensic Sciences* 1993, vol. 29, pp. 19–29.
5. Kwong E., McErlane K. M., Analysis of digoxin at therapeutic concentrations using high-performance liquid chromatography with post-column derivatization, *Journal of Chromatography* 1986, vol. 381, pp. 357–363.
6. Phillips, A. P., A radioimmunoassay technique for digoxin in postmortem blood, *Journal of Forensic Sciences* 1974, vol. 19, pp. 900–912.
7. Selesky M., Spiehl V, Carvey R. H. [et al.], Digoxin concentrations in fatal cases, *Journal of Forensic Science* 1977, vol. 22, pp. 409–417.
8. Shepard T. A., Hui J., Chandrasekaran A. [et al.], Digoxin and metabolites in urine and feces: a fluorescence derivatization-high performance liquid chromatographic technique, *Journal of Chromatography* 1985, vol. 380, pp. 89–98.
9. Uges D. R. A., Therapeutic and toxic drug concentrations, *The Bulletin of TIAFT* 1996, vol. 26, pp. 11.

DIGOKSYNA W LABORATORIUM SĄDOWYM – ANALIZA PRZYPADKÓW

Piotr ADAMOWICZ, Ewa CHUDZIKIEWICZ, Maria KAŁA

WSTĘP

Digoksyna jest krystalicznym, tonizującym serce glikozydem, otrzymywanym z lanatozydu C, glikozydu macierzystego występującego w naparstnicy wełnistej (*Digitalis lanata*, rycina 1a). Jest to lek nasercowy działający nie tylko na mięsień sercowy, ale także na mięśnie gładkie i szkieletowe, cewki nerkowe i ośrodki nerwu błędnego. Dlatego wyznaczenie stężenia digoksyny we krwi, mięśniu sercowym i nerce posiada duże znaczenie przy potwierdzeniu zatrucia śmiertelnego tym związkiem.

Digoksyna jest stosowana najczęściej w nadkomorowych zaburzeniach rytmu serca oraz w przewlekłej niewydolności lewo- i prawokomorowej, a także ostrej niewydolności lewokomorowej. Po podaniu doustnym początek działania terapeutycznego digoksyny występuje po 2 h, a po podaniu dożylnym po 15–30 min. Okres półtrwania po podaniu doustnym i dożylnym wynosi 1,5–2 dni. Digoksyna należy do leków, których stężenie we krwi powinno być kontrolowane w celu indywidualnego dobrania dawki leku.

Lekiem o działaniu podobnym do digoksyny jest jej strukturalny analog – metyldigoksyna, glikozyd nasercowy otrzymywany półsyntetycznie (rycina 1b). Metyldigoksyna w porównaniu z digoksyną działa znacznie szybciej: podana doustnie po 5–20 min, a dożylnie po 1–4 min. Okres półtrwania metyldigoksyny wynosi 40 h.

Digoksynę najczęściej oznacza się metodami radioimmunologicznymi oraz immunoenzymatycznymi. Odczynniki do użycia tych metod są dostępne w handlu.

Opublikowane stężenia digoksyny, wyznaczone we krwi sekcyjnej pobranej od osób, które były leczone tym związkiem, są bardzo zróżnicowane. Wartość tych stężeń zależy od zastosowanej do jej oznaczania metody analitycznej oraz miejsca, z którego została pobrana krew do badań. W surowicy krwi pobranej z prawej komory serca stężenia digoksyny wahały się w granicach od 0,5 do 2,1 µg/l; osiągając średnią wartość wynoszącą 1,3 µg/l w 18 przypadkach. Równocześnie zaobserwowano znaczne obniżenie stężeń digoksyny w wymienionym materiale, spowodowane hemolizą krwi przy oznaczaniu tego związku metodą radioimmunologiczną [2].

Pomimo dużej specyficzności, którą zapewniają technikom immunoenzymatycznym zastosowane przeciwciała, to znane są liczne przypadki otrzymania wyników błędnie dodatnich. Jedną z przyczyn jest powstawanie w organizmie *in vivo* i w zwłokach substancji endogennych immunoreagujących z przeciwciałami obecnymi w zastosowanym teście.

Inne techniki, jak chromatografia cienkowarstwowa (TLC), wysokociśnieniowa chromatografia cieczowa z detekcją spektrofotometryczną (HPLC-UV) i wysoko- i sprawną chromatografią cieczową z detekcją fluorescencyjną (HPLC-FLD) możliwa do zastosowania po przeprowadzeniu digoksyny we fluorescencyjne pochodne

(np. z kwasem dehydroaskorbinowym w kwasie solnym [5] i chlorkiem naftoilu [8]) są również stosowane, chociaż wymagają wyekstrahowania analitu z matrycy biologicznej. Metody ekstrakcji muszą być ukierunkowane na digoksynę. Najczęściej stosowanymi metodami wyosabniania tego związku są: ekstrakcja na żywicy XAD-2 [1], ekstrakcja w układzie ciecz-ciecz przy użyciu dichlorometanu [3] i dializa [6].

OPIS PRZYPADKÓW

Przypadek I

W godzinach wieczornych żona ujawniła zwłoki męża, lat 42. Zmarły pozostawił list pożegnalny, a na miejscu zdarzenia znaleziono niezidentyfikowane tabletki. W protokole sekcji zwłok widniało stwierdzenie: „Ogłędziny i sekcja zwłok wykazały przekrwienie narządów wewnętrznych oraz cechy obrzęku mózgu i płuc. Badanie krwi pobranej ze zwłok wykazało w niej obecność – 2,3%, a badanie moczu – 2,8% alkoholu etylowego. Taki wynik nie pozwala na stwierdzenie, co było przyczyną zgonu denata”.

Do analizy do Instytutu Ekspertyz Sądowych dostarczono zabezpieczone na miejscu zdarzenia 3 tabletki, a także krew, mocz oraz wycinki wątroby, nerki, jelit i żołądka denata.

Przypadek II

W mieszkaniu znaleziono zwłoki kobiety, wobec której istniało uzasadnione podejrzenie, iż zgon nastąpił wskutek przedawkowania leków. W toku postępowania ustalono, że w związku z leczeniem psychiatrycznym i kardiologicznym zażywała ona następujące leki: Bemecor (metylodigoksyna), Mononit (monoazotan izosorbidu), Verospiron (spironolakton), Vivacor (karwedilol), Sintrom (acenokumarol), Sorbonit (diazotan izosorbidu) oraz Furosemidum (furosemid).

Do badań nadesłano wycinki mózgu, żołądka (bez treści), jelit, wątroby i nerek oraz próbę krwi.

METODYKA BADAŃ I WYNIKI

Przypadek I

W pierwszej kolejności badaniom poddano zabezpieczone przy zwłokach tabletki. Ich identyfikacja mogłaby umożliwić ukierunkowanie badań. W tym celu tabletkę badano po rozpuszczeniu w etanolu oraz po ekstrakcji eterem etylowym ze środowiska kwaśnego (pH = 2), chloroformem ze środowiska alkalicznego (pH = 9) i octanem etylu ze środowiska silnie alkalicznego (pH = 12). Do badań zastosowano:

- metodę spektrofotometrii (UV/VIS), wykreślając widmo w zakresie 210–350 nm przy użyciu aparatu PU-7820 firmy Philips;
- metodę chromatografii cienkowarstwowej (TLC), badania wykonano zgodnie przyjętym w Instytucie Ekspertyz Sądowych tokiem postępowania przesiewowego na płytkach pokrytych żelem krzemionkowym G-60 firmy Merck, stosując jako układy rozwijające mieszaniny chloroformu z acetonem (9:1), metanolu z 25% wodnym roztworem amoniaku (98:2) i metanolu z acetonem

- (6:4), a jako systemy wybarwiające: o-tolidynę, chlorek żelazowy, odczynnik Dragendorffa, jod w jodku potasu, ninhydrinę i azotan rtęciawy, azotyn sodu i n-naftyloetylenodiaminę, stężone kwasy siarkowy i azotowy oraz odczynnik Marquisa i jodoplatynian potasu [4];
- metodę chromatografii gazowej połączonej ze spektrometrią mas (GC/MS) z zastosowaniem aparatu firm Varian/Finnigan Mat w wersji Magnum z detektorem w postaci pułapki jonowej (ITD) i kolumną kapilarną DB-5MS firmy J&W Scientific oraz aparatu firmy Agilent serii 5973 z kwadropolowym selektywnym detektorem mas i kolumną HP-5MS firmy Hewlett-Packard;
 - metodę wysokosprawnej chromatografii ciekowej (HPLC-DAD-MTSS); do oznaczeń zastosowano aparat typu LaChrom System, firm Merck/Hitachi wyposażony w detektor szeregu diod (DAD) i kolumnę LiChroCART 124 × 4 z wypełnieniem LiChroSpher RP Select B oraz fazę ruchomą podawaną na kolumnę w systemie gradientowym, zgodnie z systemem identyfikacji leków (MTSS), opracowanym przez firmę Merck;
 - metodę chromatografii ciekowej połączonej ze spektrometrią masową (LC/MS), stosując chromatograf ciekowy sprzężony ze spektrometrem masowym HP-1100 firmy Hewlett-Packard. Zastosowano również komorę do chemicznej jonizacji pod ciśnieniem atmosferycznym (APCI). Rozdział prowadzono na kolumnie LiChroCART 125 × 4 z wypełnieniem Purospher RP-18e firmy Merck. Fazę ruchomą stanowiła mieszanina acetonitrylu oraz wody z dodatkiem 0,1 ml kwasu octowego na 100 ml każdego ze składników fazy.

Żadna z powyższych metod nie pozwoliła jednoznacznie zidentyfikować tabletek. Sygnały analityczne uzyskane w poszczególnych metodach były mało charakterystyczne, bardzo słabe lub w ogóle nierejestrowalne. Z tych powodów wzięto pod uwagę te leki, które nie dają charakterystycznych parametrów analitycznych w toku rutynowej analizy toksykologicznej. Były nimi: Digoksyna, Sorbonit i Nitrogliceryna. Do badań zastosowano:

- metodę TLC i dwa układy rozwijające: mieszaninę chloroformu z metanolem (90:10) i mieszaninę octanu etylu z metanolem i 25% wodnym roztworem amoniaku (85:10:5) oraz do wybarwiania kwas chlorowy (VII) i naświetlanie promieniami ultrafioletowymi;
- metodę spektrofotometrii w podczerwieni (IR), przy użyciu spektrometru fourierowskiego FTS 40A z mikroskopem UMA 500, firm BioRad/Digilab.

W wyniku tych badań stwierdzono, że:

- współczynniki R_f materiału dowodowego i wzorcowej digoksyny były identyczne;
- widmo IR materiału dowodowego nie było w pełni zgodne z żadnym z widm materiałów porównawczych, niemniej posiadało najwięcej wspólnych cech z wzorcem digoksyny.

W widmie IR materiału dowodowego występowały pasma absorpcji pochodzące od ugrupowań glukozy oraz wiązań amidowych. Widmo nieznanego tabletki było bogatsze od widma digoksyny między innymi o pasma amidowe (białkowe) (rycina 2).

W związku z uzyskanymi wynikami, tabletkę poddano analizie metodą immunoenzymatyczną z zastosowaniem aparatu Viva Dade Behring na obecność digoksyny. Badania przeprowadzono w Laboratorium Toksykologicznym Kliniki Tok-

sykologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego. W tabletkę stwierdzono digoksynę, a wynik ten potwierdzono ostatecznie metodą LC/MS (rycina 3 i 4).

W dalszej kolejności krew i mocz poddano analizie ukierunkowanej na obecność digoksyny przy użyciu wymienionej wyżej metody immunoenzymatycznej. W związku z tym, że wykazane stężenie digoksyny mieściło się w zakresie stężeń toksycznych (tabela I), wykonano analizę skryningową krwi, zgodnie z przyjętym w Instytucie Ekspertyz Sądowych tokiem postępowania analitycznego.

Krew badano metodą immunofluorescencji w świetle spolaryzowanym przy użyciu testów TDx firmy Abbott. Badania przeprowadzono w kierunku obecności środków odurzających z grupy alkaloidów opium, leków z grupy pochodnych benzodiazepiny oraz pochodnych kwasu barbiturowego.

W wyniku tych badań we krwi wykazano obecność leków z grupy pochodnych benzodiazepiny. Do identyfikacji i oznaczenia benzodiazepin zastosowano metodę LC/MS. Próbkę krwi ekstrahowano eterem diizopropylowym o pH = 7,4, a otrzymane ekstrakty analizowano z zastosowaniem opisanego wcześniej aparatu, z tym, że fazę ruchomą stanowiła mieszanina acetonitrylu i wody z dodatkiem 0,1 ml stężonego kwasu mrówkowego na 100 ml każdego ze składników fazy, a analizę prowadzono w systemie monitorowania wybranych jonów (SIM). Ponadto przeprowadzono badania skryningowe na obecność innych leków metodą HPLC-DAD-MTSS.

Wyniki badań materiału biologicznego zestawiono w tabeli I.

Przypadek II

W pierwszej kolejności przeprowadzono rutynową analizę chemiczno-toksykologiczną na obecność leków, ze szczególnym uwzględnieniem substancji czynnych preparatów wymienionych w postanowieniu. Analiza obejmowała dla wycinków żołądka i wątroby badania skryningowe metodami TLC oraz GC/MS, natomiast dla próby krwi badania metodą HPLC-DAD-MTSS.

Przeprowadzona wymienionymi metodami analiza chemiczno-toksykologiczna wykazała obecność furosemidu i acenokumarolu we krwi oraz w wycinkach żołądka, natomiast w wycinkach wątroby wykryto jedynie acenokumarol.

Równoległe, w związku z faktem, iż zgon w tym przypadku mógł nastąpić na skutek przedawkowania preparatu Bemecor zawierającego metylodigoksynę, próbę krwi oraz wycinki wątroby poddano badaniom metodą immunoenzymatyczną na obecność digoksyny i jej pochodnych, używając wymienionego wyżej aparatu Viva Dade Behring. Krew badano bezpośrednio po odwirowaniu, a wycinki wątroby po zhomogenizowaniu z wodą i odwirowaniu. Analiza wykazała, że we krwi i wycinkach wątroby znajdują się duże ilości digoksyny lub jej pochodnych. Wyniki analizy, w przeliczeniu na digoksynę, podano w tabeli I. W związku z wysokim stężeniem digoksyny w materiale pobranym ze zwłok nie przeprowadzono analizy ilościowej pozostałych wykrytych leków.

WNIOSKI

Wykrycie digoksyny i jej pochodnych w materiale biologicznym jest możliwe przy zastosowaniu analizy ukierunkowanej, najszybciej metodą immunoenzymatyczną.

W rutynowej analizie przesiewowej przeprowadzonej metodami TLC, GC/MS i HPLC, nawet w przypadku wysokich stężeń, digoksyna i jej pochodne mogą być pominięte.

Identyfikacja digoksyny w tabletkach sprawia duże trudności ze względu na niskie jej stężenia w tabletkach i mało charakterystyczne sygnały analityczne.