

PROPAPHENONE IN FORENSIC MEDICAL PRACTICE

Małgorzata ALBERT, Joanna KULIKOWSKA, Rafał CELIŃSKI, Artur SOJA,
Halina SYBIRSKA

*Chair and Department of Forensic Medicine, Silesian Medical Academy,
Katowice*

ABSTRACT: Results of chemo-toxicological examinations of biological material of 3 deceased persons, of whom 2 died after propaphenone overdose and the third after consumption of unknown therapeutic substances are presented in the paper. Ethanol was found in the body fluids of two of the deceased. The analytical procedures used allowed both identification and quantitative determination of the drug. Its concentrations were as follows: 17.10–24.80 g/ml in blood, 7.5–274.0 g/g in stomach, 6.7–29.40 g/g in liver and 9.4–24.0 g/g in kidney. The obtained results of the determinations and also knowledge about the circumstances of death allowed us to assume that deaths of 2 persons resulted from excessive propaphenone consumption in a state of insobriety and the death of the third was caused by propaphenone overdose alone.

KEY WORDS: Propaphenone; Determination; Post-mortem material.

*Z Zagadnień Nauk Sądowych, z. LI, 2002, 106–118
Received 16 May 2002; accepted 6 September 2002*

INTRODUCTION

The growing incidence of cardiovascular disease has been accompanied by an ever lengthening list of cardiac medicines and an increase in their availability. A consequence of this phenomenon is – and this can be observed in forensic toxicology practice as well – a growth in the number of fatal poisonings caused by new heart drugs, which have been taken either with the aim of committing suicide, or simply not in accordance with the prescription (sometimes with alcohol).

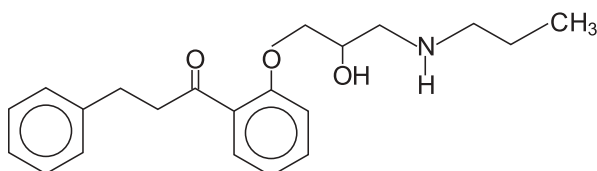


Fig. 1. Propaphenone (Rytmonorm, Rythmol, Polfenon): 2-(2-hydroxy-3-propylaminopropoxy)-3-phenyl-propiofenon.

Propaphenone is an antiarrhythmic drug of the IC group according to the Williams classification. Its chemical structure is similar to that of β -blockers. Besides having β -adrenolytic properties, propaphenone is a local anaesthetic and stabilises the cell membrane. It slows the fast sodium current flow, causing a slowdown of the growth of phase 0 of the action potential. It decreases spontaneous cell automatism and prolongs the duration of ventriculo-atrial conduction [3]. Propaphenone is used to treat ventricular disorders. This effective antiarrhythmic drug shows inter-individual pharmacokinetic variability, manifesting as different elimination half-life durations ranging from 2.4 to 11.8 hours, and also differences in blood concentrations attained after ingestion of the same therapeutic dose (from 64 to 1044 ng/ml). Special caution must thus be exercised when administering the drug, because of the resultant varying pharmacological time of action [5]. If taken without prescription or medical supervision it may constitute a serious threat both to health and life. β -adrenolytic and negative inotropic drug action may result in cardiac activity impairment. This effect may be increased if alcohol is consumed at the same time. Three fatal cases registered at the Forensic Medicine Department of the Silesian Medical Academy in Katowice in 2000 are described by the authors. A chemo-toxicological examination of the biological material obtained during the autopsy revealed that all the deaths were the result of propaphenone poisonings.

CASE NOTES

The first case concerned a 48-year-old man (Marian M.), whose body was found in his flat. Beside him was some medicine packaging. The investigation revealed that the man had shown suicidal tendencies in the past.

The second case concerned a 24-year-old woman (Anita S.), who was taken unconscious to hospital, suspected of suffering from alcohol poisoning of unknown source. The patient died a short time later without regaining consciousness. It was established that she abused alcohol and probably used sedative and cardiac drugs.

The third case concerned a 17-year-old girl (Katarzyna K.) who ingested a drug prescribed for her brother, who was suffering from heart disease, with the intention of committing suicide. She was taken to hospital unconscious, where, despite intensive care and resuscitation, she died after 2 hours.

An autopsy of the man performed in the Department of Forensic Medicine, Silesian Medical Academy in Katowice revealed the presence of numerous particles and grains in the stomach content, which might be partly digested tablets.

Moreover, the following were observed: bloody subpleural extravasations, erosive gastritis, pulmonary and cerebral oedema, congestion and blood retention in the internal organs, moderately advanced coronary atheromatosis, postinflammatory nephrosclerosis and chronic gastric mucosa inflammation.

An autopsy conducted by external pathologists (from outside the Department of Forensic Medicine) revealed subconjunctival and subpleural blood extravasations, congestion and pulmonary oedema as well as blood retention in the internal organs. 300 ml of fluid in both pleural cavities was present.

Neither the autopsy nor a histopathological examination of internal organ samples revealed the cause of death.

MATERIALS AND METHODS

The following were taken from the bodies for chemo-toxicological examination:

- femoral blood (in all cases);
- urine (in the case of the woman and the man);
- liver, kidney and stomach (in all cases).

Body fluids (blood, urine) taken from cadavers were analysed for ethanol using gas chromatography (GC) and enzymatic (ADH) methods.

The whole blood and urine as well as liver and kidney taken from the body of Anita S. were separately dried with anhydrous sodium sulphate. They were then extracted with small, precisely measured amounts of 96% ethanol. The obtained ethanolic extracts were preconcentrated by evaporation and analysed by gas chromatography for the presence of glycol and its metabolites.

The chemo-toxicological examination for presence of non-volatile organic poisons encompassed:

- stomach content, kidney and blood (in the case of the man);
- stomach, liver and kidney segments (in the case of the woman);
- stomach, liver and kidney segments and blood (in the case of the girl).

The biological material was hydrolysed and deproteinised according to routine procedures, and then extracted with diethyl ether from acidified solution and with chloroform after its alkylation. Dry residues obtained after evaporation of the organic phase were dissolved in a small, precisely defined volume of 96% ethanol. The solutions were analysed by means of thin layer chromatography. Confirmatory analyses were performed by UV spectrophotometry, high performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD) and mass spectrometry (MS).

UV spectrophotometry was carried out on eluates of the zones (extracted from the thin layer chromatogram with 0.5 N sulphuric acid) of the revealed

substance. Qualitative analysis using mass spectrometry was performed on methanolic eluates of appropriate chromatographic zones. The organic extracts were examined directly by HPLC-DAD. Propaphenone quantitation in biological material was conducted by thin layer chromatography with UV spectrophotometry detection. The drug was extracted from the biological material with dichloromethane – this was based on our own observation that this is a better solvent than routinely used chloroform.

RESULTS AND DISCUSSION

Blood and urine examinations for the presence of ethanol were positive in two cases. Results are shown in Table I.

TABLE I. PROPAPHENONE AND ETHANOL QUANTITATIVE RESULTS

Case no.	Examined material	Concentration of propaphenone in unchanged form [g/g]	Concentration of ethanol [%]
1	Blood	17.1	0.6
	Stomach content	25.5	–
	Kidney	10.1	–
	Urine	–	0.7
2	Blood	–	1.6
	Stomach	7.5	–
	Liver	6.7	–
	Kidney	9.4	–
	Urine	–	3.3
3	Blood	24.8	0.0
	Stomach	274.0	–
	Liver	29.4	–
	Kidney	24.0	–

Performed analyses for ethylene glycol presence in blood, urine and tissues taken during autopsy from Anita S. were negative.

Application of the TLC method gave positive results for examination of alkaline extracts. Spots colour reactions were obtained with Dragendorff, Mandelin, Frohd and chlorobenzidine reagents. Table II presents results of all cases examined using thin layer chromatography.

TABLE II. *R_f* AND COLOUR TEST RESULTS OF PROPAPHENONE ANALYSES OBTAINED IN SELECTED SYSTEMS USING THIN LAYER CHROMATOGRAPHY

Developing system	<i>R_f</i> 100				Reagent/spot colour			
	Standard	Biological extracts			Dragendorff's reagent	Mandelin's reagent	Frohd's reagent	Chlorbenzidine
		I c	II c	III c				
I	51	51	51	51	Orange	Yellow	Yellow	Brown
II	89	89	89	89				
III	92	92	92	92				

I – methanol : 25% ammonia solution (99:1); II – benzene : acetone : methanol : 25% ammonia solution (50:40:5:5); III – isopropanol : chloroform : 25% ammonia solution (60:30:10).
I c, II c, III c – case 1, case 2, case 3.

Absorption curves in the UV range of the medicine isolated from the biological material (from studied bodies) and eluted from well-separated zones by the TLC method were similar to the standard propaphenone curve. Plotted spectra in UV range of well separated on TLC extracted components from biological material were similar to propaphenone UV spectrum. The calibration curve was plotted based on thin layer zone eluates developed in the same chromatographic system.

Selected curves of appropriate biological material and the calibration curve are shown in Figure 2.

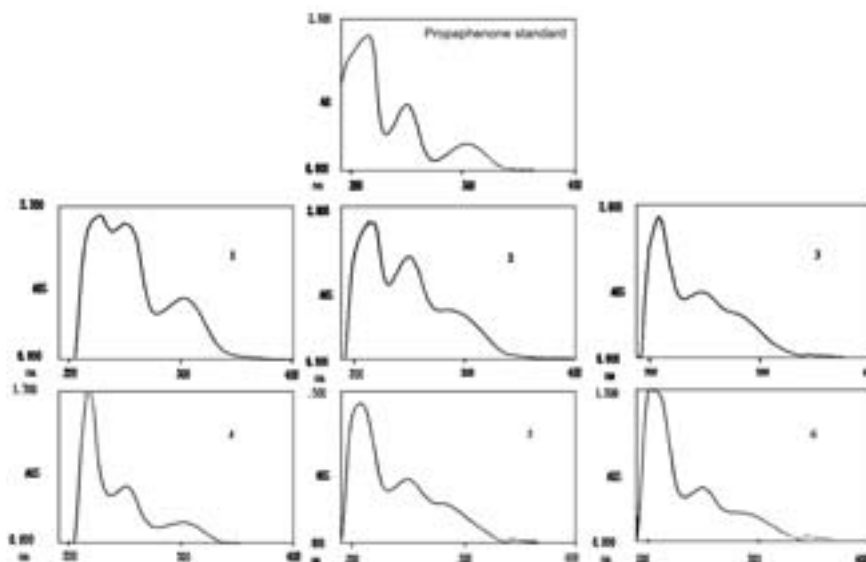


Fig. 2. Comparison of absorption curves in the range of 190–400 nm plotted for a compound eluted from scraped out thin layer zone and the standard. The compound was identified in alkaline extracts obtained from: 1) stomach, 2) blood, 3) kidney, 4) stomach content, 5) liver, 6) kidney.

Propaphenone presence in extracts was confirmed in all cases by the HPLC-DAD method. Both the retention times and absorption curves of the substance found in extracts were similar to those of the standard drug in the same analytical conditions. Curves from selected biological extracts and the standard drug are presented in Figure 3a and 3b.

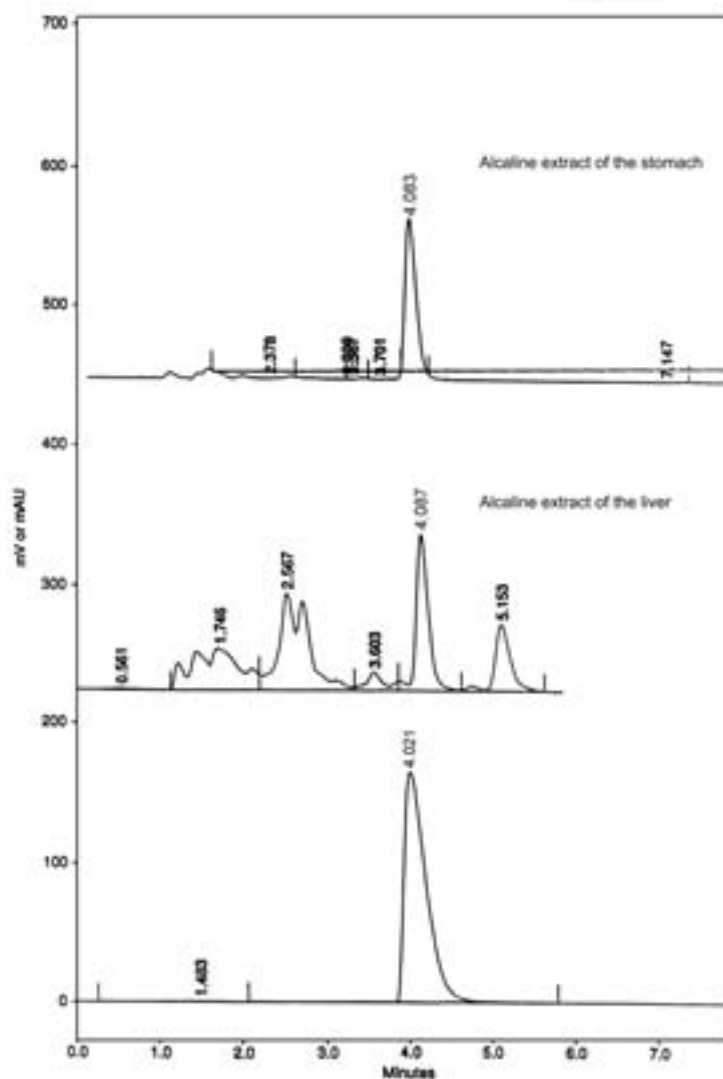


Fig. 3a. Comparison of HPLC-DAD chromatograms of alkaline extracts from stomach, liver and standard. Liquid chromatograph of TSP equipped with RP-18 column of 5 cm 4.6 mm 5 μ m dimensions. The mobile phase consisted of methanol and phosphate buffer mixture. Flow rate was set to 1 ml/min.

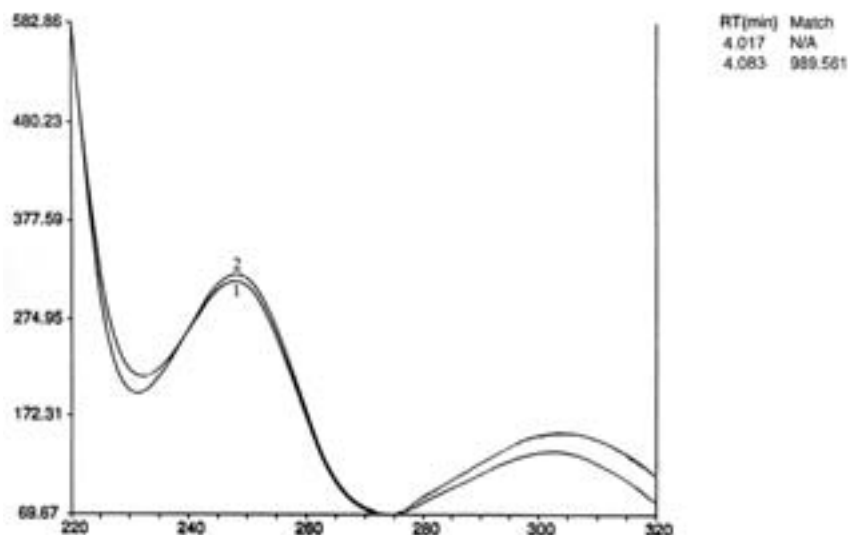


Fig. 3b. HPLC-DAD. Absorption curve in the range 220–320 nm plotted for compound of retention time 4.0 min. The compound was found in the alkaline extract of the stomach (1). The curve was compared to the standard absorption curve of the drug (2).

Verification by means of mass spectrometry of results obtained during qualitative analysis of the biological extracts revealed the presence of a molecular ion ($m/z = 342.3$) which is specific for propaphenone. Example mass spectra of propaphenone found in biological material are presented together with a standard drug spectrum in Figure 4.

Results of quantitative determination of propaphenone in its unchanged form in biological material are shown in Table I.

Therapeutic activity of the discussed drug is achieved (according to literature data on the matter) at blood concentrations of 0.2–3 g/ml. For purposes of medico-legal certification, the therapeutic (“normal”) level for blood is acknowledged to be in the range from 0.17 g/ml to 1.65 g/ml. However, no toxic or lethal concentrations have been proposed [6]. In the two cases described above, the determined concentration levels in blood (17.1; 24.0 g/ml) were much higher than the therapeutic level. This indicates an overdose in the discussed cases.

The insufficient amount of blood taken during autopsy in the third case meant that the drug could not be quantitated. On the basis of blood alcohol analyses results and positive toxicological examinations of other tissues, as well as information on the circumstances of death, it was assumed that the acute toxic effect that caused the death in this case was the result of the interaction of consumed alcohol (1.6%) and propaphenone.

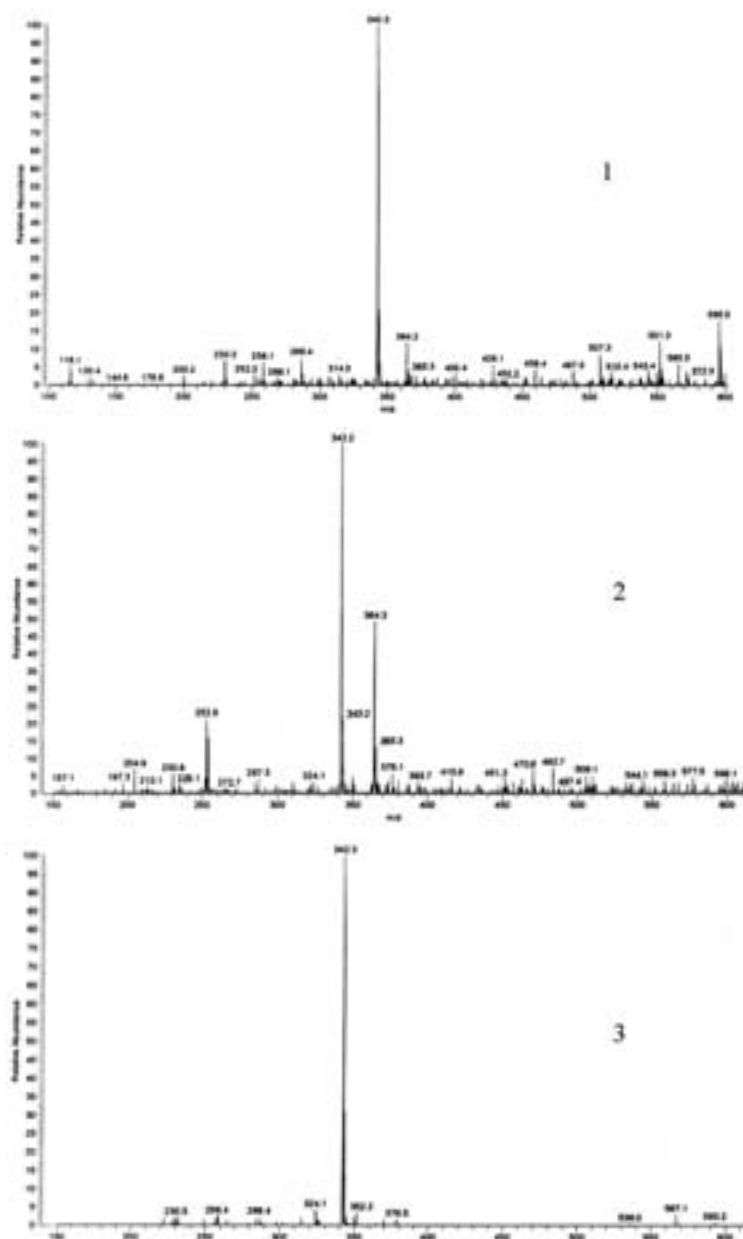


Fig. 4. Comparison of propaphenone mass spectrum found in biological material and mass spectrum of the standard drug. Analyses were performed using LC-MS LCQ DUO by Finnigan with ESI ionisation mode. Direct injection mode was applied. 1 – Mass spectrum of unchanged form of propaphenone found in alkaline extract of stomach MM; 2 – mass spectrum of unchanged form of propaphenone found in alkaline extract of the liver AS; 3 – mass spectrum of propaphenone standard.

Information concerning fatal poisonings due to propaphenone ingestion [2] and also analytical data concerning its identification and quantitation are scarce in the available literature. This was the reason for presenting analytical procedures applied to propaphenone identification in autopsy material taken from persons who had died due to poisoning by an unknown substance.

References:

1. Clarke's isolation and identification of drugs, The Pharmaceutical Press, London 1986.
2. Novakova E., Bradkova E., Fatal propaphenone poisoning. A case report., Proceedings of TIAFT 2000, Helsinki.
3. Podlewski J. K., Chwalibogowska A., Leki współczesnej terapii, Wydawnictwo Split Trading, Warszawa 1994.
4. Sthal E., Thin-layer chromatography, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg; Academic Press Publishers, Inc., New York 1965.
5. Stuart J., Connolly M. D., Clinical pharmacology of propaphenone, *Circulation* 1983, vol. 3, pp. 589–596.
6. Winek C. L., Wahba W. W., Winek Jr. C. L. [et al.], Drug and chemical blood-level data 2001, *Forensic Science International* 2001, vol. 122, pp. 107–123.

PROPAFENON W PRAKTYCE TOKSYKOLOGICZNEJ MEDYCyny SĄDOWEJ

Małgorzata ALBERT, Joanna KULIKOWSKA, Rafał CELIŃSKI, Artur SOJA,
Halina SYBIRSKA

WSTĘP

Rosnąca zachorowalność na choroby układu sercowo-naczyniowego pociąga za sobą rozszerzenie katalogu stosowanych w lecznictwie leków nasercowych i większe ich upowszechnienie. Konsekwencją tego zjawiska jest – obserwowana również w praktyce toksykologicznej medycyny sądowej – wzrastająca liczba zatruc śmiertelnych nie spotykanymi wcześniej lekami o działaniu nasercowym przyjmowanymi w nadmiarze w celach samobójczych, a także niezgodnie z przepisem lekarskim i w połączeniu z konsumpcją alkoholu.

Propafenon jest lekiem antyarytmicznym zaliczanym do grupy I C wg klasyfikacji Wiliamsa. Jego struktura chemiczna jest zbliżona do leków β -adrenolitycznych. Obok działania β -adrenolitycznego, propafenon wykazuje właściwości miejscowo znieczulające i stabilizujące błonę komórkową. Zwalnia szybki prąd sodowy, powodując zwolnienie prędkości narastania fazy 0 potencjału czynnościowego, zmniejsza także spontaniczny automatyzm komórek i wydłuża czas przewodzenia przedsionkowo-komorowego [3]. Propafenon stosowany jest w leczeniu komorowych zaburzeń rytmu serca. Ten skuteczny lek antyarytmiczny wykazuje międzypersonalną zmienność farmakokinetyczną objawiającą się różnicami w okresach jego biologicznego półtrwania i wynoszącą od 2,4 do 11,8 godziny, a także znaczne różnice w stężeniach we krwi osiągniętych po zastosowaniu tej samej dawki terapeutycznej (od 64 do 1044 ng/ml). Różny na skutek tego czas działania farmakologicznego leku wskazuje na konieczność szczególnej ostrożności w jego stosowaniu [5]. Przyjmowany bez przepisu i kontroli lekarskiej może stanowić zagrożenie dla zdrowia i życia. Skutkiem działania β -adrenolitycznego i inotropowo ujemnego może być upośledzenie czynności serca. Efekt ten może być wzmożony przy jednoczesnym spożyciu alkoholu. W roku 2000 w Katedrze Medycyny Sądowej Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach autorzy opracowali 3 przypadki zgonów osób, których śmierć, jak wykazała analiza chemiczno-toksykologiczna materiału biologicznego pobranego ze zwłok, była następstwem toksycznego działania propafenonu.

OPIS PRZYPADKÓW

Pierwszy przypadek dotyczył 48-letniego mężczyzny Mariana M., którego zwłoki znaleziono w jego mieszkaniu, a obok zwłok opakowanie po lekach. Mężczyzna ten, jak wynikało z wywiadu, w przeszłości przejawiał tendencje samobójcze. Drugi przypadek to 24-letnia kobieta, Anita S., która nieprzytomna została przywieziona do szpitala z podejrzeniem zatrucia alkoholem nieznanego pochodzenia. Pacjentka zmarła po upływie krótkiego czasu nie odzyskując świadomości. Jak ustalono, kobie-

ta ta nadużywała alkoholu i prawdopodobnie stosowała leki uspokajające i nasercowe. W trzecim przypadku była to 17-letnia dziewczyna, Katarzyna K., która w celu samobójczym spożyła lek przepisany dla jej chorego na serce brata. W stanie nieprzytomności została przewieziona do szpitala, gdzie po upływie ok. 2 godzin – pomimo intensywnego leczenia i przeprowadzonej akcji reanimacyjnej – zmarła.

Badanie sekcyjne zwłok mężczyzny wykonane w Katedrze Medycyny Sądowej Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach ujawniło w treści żołądkowej obecność licznych stałych okruchów i ziarnistości mogących odpowiadać nadtrawionym tabletkom. Ponadto obserwowano także wybroczyny krwawe podopłucnowe, nadżerki krwotoczne błony śluzowej żołądka oraz obrzęk płuc i mózgu, przekrwienie i zastój krwi w narządach wewnętrznych, średnio zaawansowaną miażdżycę tętnic wieńcowych, cechy marskości pozapalnej nerek oraz przewlekłego zapalenia błony śluzowej żołądka.

Wykonane przez lekarzy spoza Katedry Medycyny Sądowej sekcje zwłok obu kobiet ujawniły wybroczyny krwawe podspojówkowe oraz podopłucnowe, przekrwienie i obrzęk płuc, a także zastój krwi w narządach wewnętrznych. U Katarzyny K. obserwowano ponadto w obu jamach opłucnowych obecność ok. 300 ml płynu.

Przeprowadzone badania histopatologiczne wycinków narządów wewnętrznych, podobnie jak wyniki przeprowadzonych sekcji zwłok, nie wyjaśniły przyczyny zgonu.

MATERIAŁ I METODY

Do analizy chemiczno-toksykologicznej otrzymano pobrane ze zwłok w czasie sekcji:

- próbki krwi (we wszystkich przypadkach);
- próbki moczu (w przypadku kobiety i mężczyzny);
- wycinki wątroby, nerki i żołądka (we wszystkich przypadkach).

Płyny ustrojowe (krew, mocz) pobrane ze zwłok zbadano na obecność etanolu metodami chromatografii gazowej (GC) i enzymatyczną (ADH).

Próbki krwi i moczu oraz wycinek wątroby i nerki pobrane ze zwłok Anity S. rozdrobiono i osuszono bezwodnym siarczanem sodowym. Osuszone próby ekstrahowano małą, ściśle określoną ilością 96% alkoholu etylowego. Uzyskane ekstrakty alkoholowe po zagęszczeniu przez odparowanie badano metodą chromatografii gazowej na obecność glikolu etylenowego i jego metabolitów.

Badaniem chemiczno-toksykologicznym w kierunku obecności trucizn organicznych o charakterze nielotnym objęto:

- w przypadku mężczyzny – treść żołądka, wycinek nerki i krew;
- w przypadku kobiety – wycinki żołądka, wątroby i nerki;
- w przypadku dziewczyny – wycinki żołądka, wątroby i nerki oraz krew.

Materiał biologiczny poddano rutynowym zabiegom hydrolizy, odbiałczania i ekstrakcji eterem ze środowiska kwaśnego, a następnie chloroformem ze środowiska zasadowego. Uzyskane wyciągi organiczne po odparowaniu do suchej pozostałości i rozpuszczeniu jej w małej, ściśle określonej objętości 96% etanolu badano metodą chromatografii cienkowarstwowej.

Dodatkową identyfikację wykrytego związku wykonano metodami spektrofotometrii w świetle nadfioletowym, wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detektorem diodowym (HPLC-DAD) oraz spektrometrii masowej.

Do analizy spektrofotometrycznej w zakresie nadfioletu wykorzystano eluaty (ze zdjętych z chromatogramu cienkowarstwowego za pomocą 0,5 N kwasu siarkowego) stref wykrytej substancji.

W badaniach identyfikacyjnych za pomocą spektrometrii masowej użyto eluatów z odpowiednich stref chromatograficznych sporządzonych w metanolu.

Badania ekstraktów organicznych przeprowadzono bezpośrednio metodą HPLC-DAD.

Oznaczenie ilościowe propafenonu w materiale badanym przeprowadzono metodą spektrofotometrii w świetle ultrafioletowym w połączeniu z techniką chromatografii cienkowarstwową. Do analizy ilościowej wykryty lek wyosobniono z materiału biologicznego za pomocą dichlorometanu, wykorzystując własne obserwacje o jego lepszej rozpuszczalności w tym chlorowcowęgłowodorze aniżeli w rutynowo stosowanym chloroformie.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Badania próbek krwi i moczu na obecność etanolu w dwóch przypadkach dały wynik pozytywny. Wyniki badań przedstawia tabela I.

Analiza prób krwi i moczu oraz wycinków tkankowych pobranych ze zwłok kobiety Anity S. na obecność glikolu etylenowego dała wynik negatywny.

W badaniach metodą TLC rezultaty dodatnie w postaci barwnych plam na chromatogramach cienkowarstwowym uzyskano dla ekstraktów chloroformowo-zasadowych w reakcji z odczynnikami Dragendorffa, Mandelina, Froehdego i w teście chloro-benzodynowym.

Zebrane wyniki badań wszystkich przypadków metodą chromatografii cienkowarstwową przedstawiono w tabeli II.

Wykreślone w obszarze nadfioletu krzywe absorpcji leku wyosobnionego z materiału biologicznego pochodzącego ze zwłok badanych osób i wyluowanego z dobrze rozdzielonych metodą TLC stref miały przebieg zgodny z krzywą wzorcową propafenonu.

Krzywą wzorcową leku wykreślono również z eluatów ze stref chromatogramów cienkowarstwowym rozwiniętych przy użyciu tego samego układu rozwijającego. Wybrane krzywe z poszczególnych ekstraktów biologicznych oraz krzywą wzorca przedstawiono na rycinie 2.

Dokonana metodą HPLC-DAD dodatkowa identyfikacja wyosobnionej substancji potwierdziła obecność propafenonu w ekstraktach organicznych pochodzących ze wszystkich badanych zwłok. Uzyskane czasy retencji, a także przebieg krzywych absorpcji wykazanej w ekstraktach biologicznych substancji, były zgodne z cechami wzorca leku uzyskanymi w tych samych warunkach analitycznych. Zestawione krzywe z wybranych ekstraktów biologicznych i wzorca leku przedstawiono na rycinie 3a i 3b.

Przeprowadzona za pomocą spektrometrii masowej weryfikacja uzyskanych wyników badań identyfikacyjnych ujawniła obecność w ekstraktach biologicznych charakterystycznego dla propafenonu jonu molekularnego o $m/z = 342,3$.

Przykładowe widma masowe propafenonu wykrytego w materiale biologicznym zestawione z widmem wzorca leku obrazuje rycina 4.

Wyniki oznaczeń ilościowych niezmienionej formy propafenonu w materiale biologicznym przedstawiono w tabeli I.

Działanie terapeutyczne omawianego leku osiągnane jest już (wg danych zaczerpniętych z literatury przedmiotu) przy jego stężeniu we krwi wynoszącym 0,2–3 g/ml. Za poziom terapeutyczny („normalny”) leku dla orzecznictwa toksykologicznego uznano zakres stężeń we krwi od 0,17 g/ml do 1,65 g/ml. Nie podano jednak stężeń toksycznych i śmiertelnych [6]. W dwu opisanych powyżej przypadkach oznaczona we krwi wartość stężeń (17,1; 24,0 g/ml) znacznie przekraczała ten poziom, co wskazuje, że lek przyjęto w nadmiernej dawce.

W trzecim z analizowanych przypadków poziom leku we krwi nie został oznaczony ze względu na zbyt małą ilość materiału zabezpieczoną do badań. Na podstawie wyniku analizy krwi na obecność alkoholu i pozytywnych wyników badań toksykologicznych innych tkanek a także znajomości okoliczności śmierci można było założyć, że ostry efekt toksyczny prowadzący do zgonu w tym przypadku był następstwem interakcji wcześniej spożytego alkoholu (1,6‰) z propafenonem, która prowadziła do upośledzenia czynności mięśnia sercowego.

Informacje na temat zatruc śmiertelnych propafenonem [2] a także parametrów analitycznych dotyczących identyfikacji i oceny ilościowej propafenonu w materiale biologicznym, są w dostępnym piśmiennictwie bardzo skąpe, dlatego też celowe wydawało się przedstawienie postępowania analitycznego zastosowanego do jego identyfikacji w materiale sekcyjnym pochodzącym od osób zmarłych w przebiegu zatrucia nieznanym środkiem.