

# THE CHEMICAL STRUCTURE OF ENDOGENOUS COMPOUNDS OF THE BIOLOGICAL BACKGROUND AND THEIR SIGNIFICANCE IN IDENTIFICATION ANALYSIS OF XENOBIOTICS

Roman WACHOWIAK

*Chair and Department of Forensic Medicine, K. Marcinkowski Medical Academy, Poznań*

**ABSTRACT:** This study concerns thanatochemistry, an important sub-branch of forensic toxicology dealing with uncontrolled biochemical *post-mortem* processes resulting in autolysis of endogenous chemical compounds. Knowledge of chemical structure of endogenous products formed in the course of autolysis and putrefaction is of paramount importance for diagnosis and indispensable for interpretation of typical intoxications involving xenobiotics. In the study, variables influencing putrefaction of dead bodies were taken into account, including appropriate preservation of autopsy material, the problem of endogenous alcohol in cases of evaluation of sobriety and levels of acetone in blood in conditions of diabetes and/or hunger. The effectiveness of the chromatographic technique (GC/MS) was tested in identification of compounds, with the possibility of applying an NIST Library Search to identify sets of compounds contained in extracts of autopsy material originating from cadavers at an extremely advanced stage of putrefaction.

**KEY WORDS:** Biodecomposition of dead body; Biological background; Endogenous compounds, GC/MS identification.

*Problems of Forensic Sciences, vol. LIV, 2003, 60–81*

*Received 12 November 2003; accepted 26 November 2003*

## THANATO-CHEMISTRY – BIOCHEMICAL INDICATORS OF DECOMPOSITION OF CORPSES AND OF BIOLOGICAL MATERIAL AND THEIR IMPORTANCE IN THE CHEMICAL DIAGNOSIS OF POISONINGS

Biochemical processes that are fully controlled during the life of humans change fundamentally after death. The death throes that precede death itself, resulting in stopping of the circulation, respiration and functions of the central nervous system, imply that progressive changes of thanatochemical degradation are taking place. These processes take place with the participation of endogenous enzymes (autolysis – self-digestion) and are additionally successively reinforced by the activity of ubiquitous endo- and exogenous microbes (bacteria, fungi and their enzymes).

The intensity of the process of putrefaction is determined by many factors, among other things the duration of biodegradation, physico-chemical conditions (temperature, moisture, access of air and its circulation, surroundings) and the environment in which the body lies (soil, water, air). In the progressive process of biodegradation, various individual features of the deceased are not without significance: among other things, the structural profile of the tissues, taking into account proteins, lipids, age, diseases prior to death, the influence of medicines or other xenobiotics and the mechanism of death. The process of autolysis of endogenous compounds in post mortem conditions is above all a result of degradation of natural products – carbohydrates, proteins, fats, enzymes and hormones – occurring in tissues and bodily fluids. Among the dominating processes of biotransformation one ought to mention: hydrolysis, decarboxylation, deamination, transamination and reactions of oxidative and reductive character.

In order to prevent uncontrolled posthumous biodegradation processes, both the body and secured autopsy material should be stored at low temperature, limiting decay processes.

Maximum limitation of the course of decay processes is essential for successive stages of chemical diagnosis, particularly toxicological interpretation of the results of qualitative and quantitative analysis of xenobiotics responsible for, e.g. suspected fatal poisonings.

The thanatochemical processes mentioned, particularly the autolysis occurring in the initial stage of biodegradation, imply a dysfunction of the permeability of membranes of cellular organs and, accompanying this, gravitational changes in the displacement of water content, which results in initiation of the process of redistribution of xenobiotics, conditioned by the mechanism of gradients of concentrations that are produced in the biological system.

Knowledge of the consequences of progressive biodegradation processes of the body or secured biological material is important for correct interpretation. It is closely linked to correct differentiation of the interference effects of components of the so-called “biological background” from the real effects of exogenous xenobiotics, in the case of their presence.

#### BIOLOGICAL MATERIAL IN THE TOXICOLOGICAL DIAGNOSIS OF POISONINGS AND ITS UTILISATION IN THE INTERPRETATION OF THE PARTICIPATION OF ENDOGENOUS COMPOUNDS

The use of modern analytical methods in investigations allows a considerable decrease in the quantity of routinely secured *post-mortem* material.

Biological material collected during autopsies has exceptional evidential value and hence is secured in a specific manner.

The physico-chemical specificity of many xenobiotics always requires their immediate analysis, taking into account the possibility of reanalysis after short-term storage in a refrigerator at a temperature of about 5°C (up to two weeks) or the necessity of freezing (–20°C) in the case of a foreseen longer period of storage.

Toxicological interpretative evaluation of the qualitative and quantitative biochemical composition of biological material above all concerns the following:

- blood or possibly plasma (the possibility of establishing ranges of concentrations of xenobiotics, allowing us to compare them with tabular pharmacokinetic data concerning therapeutic, toxic and lethal levels);
- reference systems other than blood such as the vitreous humour of the eye, the cerebrospinal fluid, possibly the aural perilymph or the synovial fluid;
- urine, which should be acknowledged as a preferential diagnostic material, due to the possibility of detection of xenobiotics and their metabolites for a considerably longer period than in blood, as well as due to quick carrying out of homogeneous analysis (eliminating the need for extraction), e.g. immunochemical analysis;
- hair, for which performed comparative segmentation analysis allows objective interpretation of addiction (long-term patterns of taking of drugs/medicines, e.g. psychoactive substances, are revealed).

In the case of extreme degradation of tissues of a revealed corpse, securing of appropriate biological material is most often limited to preserved muscles and in the case of the exhumation of a body, possibly material collected from the vicinity of selected organs or liquid that is available after opening of the corpse.

#### THE CHEMICAL STRUCTURE OF MOST FREQUENTLY NOTED ENDOGENOUS ORGANIC COMPOUNDS

The biodegradation process of biological material, generating a heterogeneous qualitative composition of biological background is an important interpretative issue in toxicological analysis. The products of transformations of natural components of tissues and bodily fluids are numerous secondary organic compounds, among which the most often mentioned are: alcohols, aldehydes, ketonic compounds, phenols, amines, and among inorganic compounds – hydrogen sulphide, ammonia, carbon dioxide and cyanide compounds. The majority of papers on examined cases concern analysis and

mechanisms of the formation of endogenous alcohols in processes of secondary biological degradation.

Results of routine chromatographic analysis of typical organic endogenous volatile components contained in a sample of blood from a corpse that had decayed for about 30 days in a flat (at about 20°C) (A) and in "exhumation blood" (liquid available after opening of body) after 180 days from the time of death (B) are presented in Figure 1.

#### THE PROBLEM OF ENDOGENOUS ALCOHOL IN EVALUATIONS OF STATES OF SOBRIETY

Studies have shown that during ongoing processes of biodegradation of the body, i.e. in corpore, and also in collected samples of blood stored in standard conditions *in vitro*, endogenous alcohol can be formed [16, 19]. The substrate for biochemical transformations in these processes is glucose in blood, whose physiological level of about 120 mg%, with the participation of enzymes of anaerobic microbes, can lead to formation of significant concentrations of ethyl alcohol.

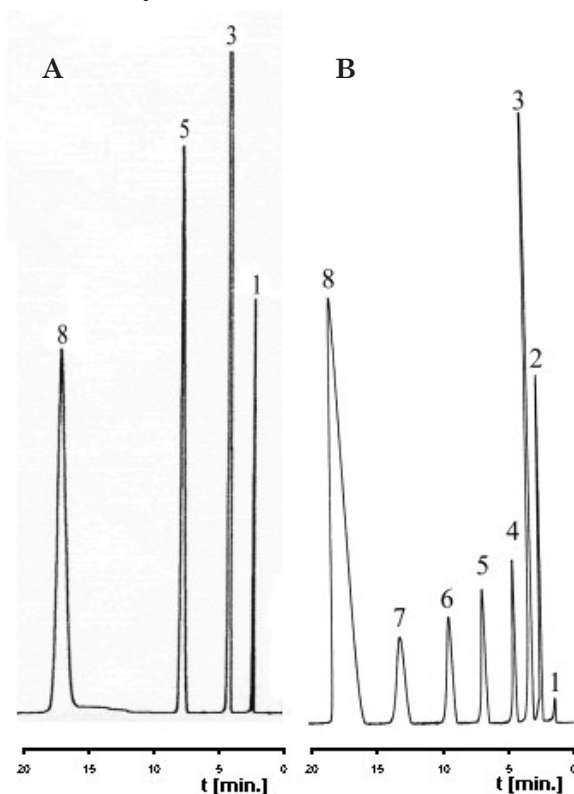


Fig. 1. Headspace chromatographic separation of volatile endogenous compounds contained in a sample of blood taken from a body decomposed in a flat (A) and in exhumation blood (B); a packed column 2.5 m, Ø 3 mm, 80/100 Carboxpack C 0.1% SP-1000 (isothermal conditions 145°C); 1 – acetaldehyde, 2 – acetone, 3 – ethanol, 4 – 2-propanol, 5 – 1-propanol, 6 – 2-butanol, 7 – 2-methyl- 1-propanol, 8 – 1-butanol.

The most often observed ranges of concentrations of endogenous alcohol can have upper values reaching 1‰, and in extreme situations can even exceed values of 3‰. The formation of higher concentrations of alcohol can be attributed to hypoglycaemia, which often occurs in the course of prolonged death throes or in some kinds of death preceded by intensive resuscitative interventions (sudden stopping of the circulation, suffocation or drowning). In the progressive process of putrefactive fermentation, besides ethyl alcohol, higher alcohols are formed at the same time – mostly 1-butanol, 1-propanol, 2-butanol, 2-propanol and 2-methyl-1-propanol. The addition of stabilisers has a significant retarding influence on the course of the above-mentioned biochemical processes – sodium fluoride or sodium azide. At the same time it should be pointed out that beside the dominating processes of creation of endogenous alcohol in anaerobic conditions, sometimes the reverse phenomenon can be observed, i.e. its successive disappearance with the participation of certain *Acetobacter* bacteria. Among currently preferred routine examinations allowing differentiation of exogenous and endogenous alcohol, one can mention the following procedures:

- a comparative assessment of levels of ethyl alcohol in samples of blood collected from several places, amongst others, the heart, femoral, cubital or cervical vein;
- comparative re-analysis of levels of ethyl alcohol during storage in two simultaneously secured samples of *post-mortem* blood – one with the addition of sodium fluoride or sodium azide and one without addition;
- a comparative analysis of the level of alcohol in blood in relation to vitreous humour of the eye, the synovial fluid or cerebrospinal fluid;
- a directed identification demonstrating, beside ethyl alcohol, the presence of other endogenous alcohols, particularly 1-butanol;
- evaluation of the degree of putrefactive decay of the body, changes in colour and intensity of smells;
- microbiological examinations of the activity of strains of bacteria isolated from the blood that are capable of creating ethyl alcohol with the participation of glucose as the substrate.

The proposal of Halander et al [7, 8] should be acknowledged as the latest achievement in the quest for an effective marker of postmortem synthesis of endogenous ethyl alcohol. Their marker is the value of the ratio of the concentration of 5-hydroxyindoloacetic acid (5-HIAA) to that of 5-hydroxyindolacetic alcohol (5-HTOL), which are formed from 5-hydroxyindolacetic aldehyde, being a product of the oxidative deamination of the neurotransmitter serotonin. The courses of the processes are presented in Figure 2.

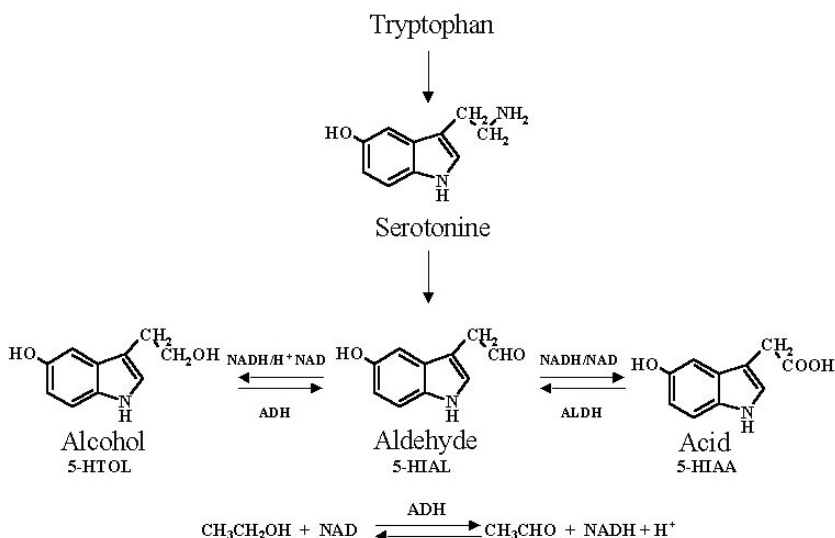


Fig. 2. The metabolism of serotonin in the system of the interaction of ethyl alcohol.

If in examined urine, the ratio

$$R = \frac{5 - \text{HTOL} [\text{picomole}]}{5 - \text{HIAA} [\text{nanomole}]} \quad \{1\}$$

exceeds a value of 15, this evidently shows the presence of exogenous ethyl alcohol in the organism, originating from consumption. A higher concentration of alcohol (5-HTOL) than of acid (5-HIAA) results from the specificity of the process of metabolism of ethyl alcohol always leading to creation of a high concentration of the reduced form of nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) in the system of enzymatic transformations with the participation of NAD<sup>+</sup>/ADH. The presence of exogenous alcohol in the living organism is always conducive to the domination of the reduced form (NADH), implying the generation of the product of reduction of 5-hydroxyindolyl-3-acetic aldehyde, i.e. 5-HTOL alcohol. This system does not work *post mortem*; the established physiological value of  $R < 15$  when ethyl alcohol is present in the blood indicates its endogenous character. Alcoholics always have a lowered level of 5-HIAA in the cerebrospinal fluid [1].

#### OTHER ENDOGENOUS ORGANIC COMPOUNDS IN BIOLOGICAL MATERIAL

The presence of acetone is typical not only for diabetes or states of hunger, but can be the result of consumption of alcohol containing acetone.

The presence of, besides acetone, acetacetic and  $\beta$ -oxybutyric acid in the blood of persons suffering from diabetes, allows us to use their presence to distinguish cases of diabetes from intoxication connected with the presence of exogenous acetone in blood [12]. Defined levels of free acetone in the blood of persons with type I diabetes were situated in a range up to 0.038‰ and were somewhat higher than the level of acetone in blood of persons with established type II diabetes, which was up to 0.028‰. Decidedly higher ranges of levels of acetone in blood (0.04–0.48‰) were found in investigated cases of diabetic coma [14].

The possibility of simultaneous oxidative-reductive enzymatic transformations of the acetone/2-propanol system in the human organism has been confirmed by some authors [13], and differentiated chemical analyses of the blood performed by them makes possible an objective diagnosis with indication of the xenobiotic, to which can be ascribed the dominating role in the exogenous process.

In the evaluation of the participation of reactions of endogenous volatile organic compounds, one ought to also take into account the presence of acetaldehyde (ethanal). In accordance with data contained in the literature, physiological levels of acetaldehyde in blood, resulting from fundamental biochemical transformations in the living organism, vary and lie within a narrow compartment not exceeding a value of 0.2 mg/dm<sup>3</sup>. In the case of acute alcoholic intoxication of healthy persons, the level of aldehyde in the blood remains in the range 0.9–1.3 mg/dm<sup>3</sup>, while in habitual alcoholics it is elevated and situated in the range 1.7–2.5 mg/dm<sup>3</sup> [15]. The highest levels of acetaldehyde (5–22 mg/dm<sup>3</sup>) are observed in blood of persons treated with Disulfiran (Anticol, Antabus, Esperal), who – against recommendations of rational therapy – have consumed alcohol. The elevated level of aldehyde is a result of the inhibition of metabolic aldehydic dehydrogenase blocking its transformation to active acetate, the successive substrate of transformations occurring in the Krebs cycle.

A consequence of the presence of acetaldehyde and formic aldehyde, the products of oxidation of methanol occurring in limited quantities in every alcoholic beverage, are secondary products of their condensation (Pictet-Spenger reaction) with endogenous amines (dopamine, adrenaline, norepinephrine, serotonin; Figure 3). These compounds, categorised as derivatives of tetrahydroisochinoline or tetrahydro- $\beta$ -carboline, can be utilised as diagnostic markers of alcoholic disease, as specific pharmacological properties have been ascribed to them (although this has not been fully researched) which are probably responsible for the mechanism of addiction [2, 4].

In identification analysis of organic compounds of endogenous character, one should also take into account products of their secondary transformations, which are formed as the result of reaction with some xenobiotics, espe-

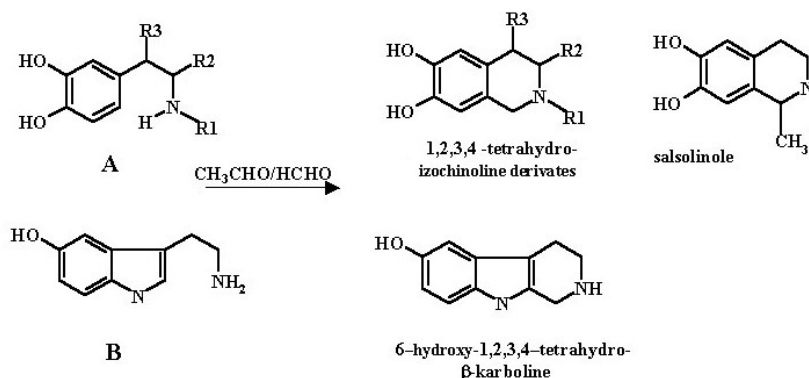


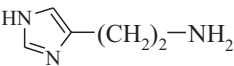
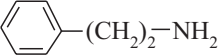
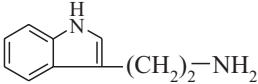
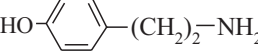
Fig. 3. The course of the reactions of endogenous amines with formaldehyde and acetaldehyde. A – dopamine ( $R_1 = R_2 = R_3 = \text{H}$ ), adrenaline ( $R_1 = \text{CH}_3$ ,  $R_2 = \text{H}$ ,  $R_3 = \text{OH}$ ), norepinephrine ( $R_1 = \text{H}$ ,  $R_2 = \text{H}$ ,  $R_3 = \text{OH}$ ); B – serotonin.

cially ethyl alcohol [9]. Among endogenous compounds useful in the diagnosis of alcoholic addiction, one ought to mention the possibility of determining the presence of ethyl glucuronate in body fluids after its complete disappearance from blood [11, 18]. Similar possibilities are: demonstrating, in hair of persons addicted to alcohol, the presence of ethyl esters of higher fatty acids [10] or else phosphatidyl-ethanol, the product of transesterification of phosphatidylcholine, when ethyl alcohol is present [10]. Amongst significant endogenous compounds present in tissues and body fluids is  $\gamma$ -oxybutyric acid (GHB) from the group of neurotransmitters linked to the metabolism of glutamic acid,  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) or exogenous 1,4-butanediol. Knowledge of ranges of physiological concentrations of GHB is especially important, due to its criminal use – temporary limitation of consciousness for purposes of rape or theft (date-rape drugs, drug facilitated sexual assault).

The established ranges of concentrations of endogenous GHB for a significant representative number of persons were – in the case of urine: 34–575  $\mu\text{g}/\text{dl}$ ,  $\bar{x} = 308$ ,  $n = 670$  and blood: 17–151  $\mu\text{g}/\text{dl}$ ,  $\bar{x} = 74$ ,  $n = 240$  [5]. In thanatochemistry, endogenous amines are the subject of study (and controversy). They are often known as ptomaines or cadaveric alkaloids, among which cadaverine and putrescine can be mentioned. Broad identification studies have shown that endogenous amines are products of microbiological decay of amino-acids released as a result of the post-mortem process of catabolism of proteins. It was shown that the prevailing mechanism of their formation is the process of decarboxylation of amino acids with the participation of suitable enzymes from the following bacteria: *Escherichia coli* (E), *Pseudomonas aeruginosa* (Ps) and *Bacillus subtilis* (B) [3]. The most frequently observed endogenous amines identified in the process of microbiological biodegradation are presented in Table I.



TABLE I. ENDOGENOUS AMINES (PTOMAINES) – PRODUCTS OF MICROBIOLOGICAL BIODEGRADATION OF BIOLOGICAL MATERIAL

Endogenous amine (ptomatine)	Chemical structure	Microorganism and the converting enzyme
Agmatanine	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N} \\ \diagdown \\ \text{C} \\ \diagup \\ \text{HN} \end{array} - \text{NH} - (\text{CH}_2)_4 - \text{NH}_2$	<i>Clostridium propionicum</i> : arginine decarboxylase
$\beta$ -alanine	$\text{HOOC} - (\text{CH}_2)_2 - \text{NH}_2$	<i>E. coli</i> , <i>B. subtilis</i> : aspartic and glutamic decarboxylase
$\gamma$ -aminobutyric acid	$\text{HOOC} - (\text{CH}_2)_3 - \text{NH}_2$	<i>E. coli</i> , <i>B. aeruginosa</i> : aspartic and glutamic decarboxylase
Ethylamine	$\text{HO} - (\text{CH}_2)_2 - \text{NH}_2$	<i>E. coli</i> : serine decarboxylase
Histamine		<i>E. coli</i> , <i>Pr. valgaris</i> : histidine decarboxylase
Isoamylamine	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} \\ \diagdown \\ \text{CH} \\ \diagup \\ \text{H}_3\text{C} \end{array} - (\text{CH}_2)_2 - \text{NH}_2$	<i>E. coli</i> , <i>Pr. valgaris</i> : leucin decarboxylase
Isobutylamine	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} \\ \diagdown \\ \text{CH} \\ \diagup \\ \text{H}_3\text{C} \end{array} - \text{CH}_2 - \text{NH}_2$	<i>Pr. valgaris</i> : valine decarboxylase
Methylamine	$\text{H}_3\text{C} - \text{NH}_2$	<i>Pr. valgaris</i> : glycocol decarboxylase
Aminoethane	$\text{H}_3\text{C} - \text{CH}_2 - \text{NH}_2$	alanine decarboxylase
Tetramethylene-diamine (“putrescin”)	$\text{H}_2\text{N} - (\text{CH}_2)_4 - \text{NH}_2$	<i>E. coli</i> , <i>Pr valgaris</i> , <i>B. subtilis</i> : ornithine decarboxylase
Pentametylene-diamine (“cadaverin”)	$\text{H}_2\text{N} - (\text{CH}_2)_5 - \text{NH}_2$	<i>E. coli</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. cadaveris</i> : lysine decarboxylase
Phenylethylamine		<i>E. coli</i> , <i>S. faecalis</i> : tyrosine decarboxylase
Tryptamine		<i>Pr. valgaris</i> : tryptophan decarboxylase
Tyramine		<i>E. coli</i> , <i>S. faecalis</i> : tyrosine decarboxylase

#### THE PARTICIPATION OF ENDOGENOUS IN ORGANIC COMPOUNDS IN BIOLOGICAL MATERIAL

Directed identification of volatile inorganic compounds is fundamentally justified only in the case of the most dangerous ones – hydrogen sulphide

and cyanides. The levels of endogenous hydrogen sulphide vary not only according to duration or thermal conditions of the process of decay, but also the biochemical structure of organs. Our own research has shown that levels of endogenous hydrogen sulphide for selected organs subjected to the process of decay (for 3 months) at a temperature of about 18°C, determined using the spectrophotometric method with use of N,N-dimethyl-p-phenyldiamine, were: the liver – 15.2 µg/g, the brain – 12.7 µg/g and the kidney – 11.4 µg/g [17]. Samples of fresh blood kept at a temperature of about 5°C for a period of three months did not reveal the presence of hydrogen sulphide, or else its presence was at the limit of detection (0.5 mg/cm<sup>3</sup>), whereas blood samples kept at room temperature, i.e. about 18°C, after a period of only ten days attained the upper limits of concentration (4.5 mg/cm<sup>3</sup>) of the calibration range (0.5–5 mg/cm<sup>3</sup>) [17]. Knowledge of ranges of endogenous hydrogen sulphide seems to be especially important in the context of the interpretation of the mechanism of extreme cases of sudden death with participation of exogenous hydrogen sulphide occurring e.g. in an empty cesspool or in a catch-basin of a sewer system.

Ascribing significance to the low concentrations of hydrogen sulphide or accompanying methane occurring in these areas most often leads to incorrect interpretation of the cause-effect mechanism of instant death, with omission of the part played by hypoxia, i.e. the phenomenon of a shortage of oxygen, which in these cases has the highest significance.

Similar difficulties in interpretation are related to ranges of the level of endogenous cyanide ions, which are most often determined (in the form of prussic acid – HCN) by gas chromatography. Physiological levels of endogenous prussic acid according to data originating from literature [8] are various and appear in blood on average in the range of 0.5–2.9 µmol/l in non-smokers and 0.5–6.8 µmol/l in persons who smoke tobacco. These ranges deviate significantly from these most often observed in lethal cases, i.e. above 1 mg/l, and they do not pose an interpretational problem.

#### THE POSSIBILITY OF IDENTIFICATION OF COMPONENTS OF THE BIOLOGICAL BACKGROUND IN ROUTINE ANALYSIS OF XENOBIOTICS IN BIOLOGICAL MATERIAL

Qualitative and quantitative analyses of xenobiotics and components of the biological background reveal that the possibilities of maximum purification of extracts using modern separation techniques are always limited. Thus, the choice of a suitable method of identification is a basic analytical aim, independent of the isolation method. Identification analysis of a component of the biological background can be successfully carried out using cou-

pled analytical systems with the use of gas chromatography or liquid chromatography and mass spectrophotometry (GC/MS and HPLC/MS).

The usefulness and values of the GC/MS technique were checked during routine toxicological analysis of (exclusively) muscles secured from the skeleton of a body which was found after a six-month period of decay from September to February 2000–2001 (expert report no. 151/2001 carried out at the Department of Forensic Medicine, Medical Academy, Poznań). Directed identification analysis for the presence of psychoactive drugs, after previous extraction of homogenate according to Borkowski, showed only a set of endogenous compounds. Identification analysis was performed with a GC/MS Hewlett Packard 5890 – AMD 402 coupled system (a magnetic-electrostatic analyser of high resolution), using a DB-1 30 m column,  $\varnothing$  0.25 mm, in conditions of programmed temperature (80°C for 2 minutes, increasing by 10°C/minute up to 300°C). The basis of the identification was a match between the mass spectrum of a chemical compound registered on the chromatogram and the corresponding standard spectrum (NIST library search). A typical distribution of identified components of the acidic extract is presented in Figure 4.

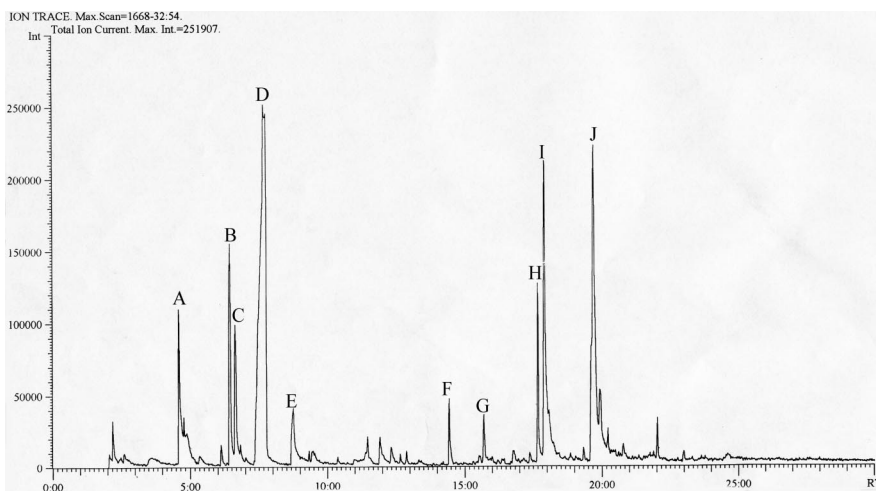


Fig. 4. The distribution of endogenous organic compounds in acidic extract from putrefied muscles (GC/MS method – identification symbols in the text).

Results of the identification analysis (GC/MS) of components of the acidic extract showed the presence of the following compounds:

- lower aliphatic acids: A – propanic acid ( $C_3H_6O_2$ ), B – butanic acid (butyric) ( $C_4H_{10}O_2$ ), C – 2-methylbutanic acid ( $C_5H_{10}O_2$ ), D – pentanic acid (valerian) ( $C_5H_{10}O_2$ ), E – benzenol (phenol) ( $C_6H_6O$ );
- aliphatic-aromatic acids: F – phenylacetic acid ( $C_8H_8O_2$ ), G – phenylpropanoic acid ( $C_9H_{10}O_2$ ), H – p-hydroxyphenylpropanoic acid ( $C_9H_{10}O_3$ );

- higher aliphatic acids: A – hexadecanic acid (palmitic) ( $C_{16}H_{32}O_2$ ), J – octadecanic acid (stearic) ( $C_{18}H_{36}O_2$ ).

In the alkaline extract the presence of the following was shown: para-hydroxyphenylethylamine ( $C_8H_{12}NO$ ), phenylethylamine ( $C_8H_{11}N$ ), piperidinone ( $C_5H_9NO$ ), 5-methylimidazolidinodione 2,4, monoglyceride of octadecanic acid.

Identification analysis of many other similar cases often confirms the presence of glycerine (1, 2, 3-propanetriol), isonicotinic acid amide (the vitamin PP), caffeine (1,3,7-trimethylpurin), theobromine (3,7-dimethylpurine), cholesterol and dibutyl phthalate, butyl-2-ethylhexane phthalate, products from the group of esters of phthalic acid, being impurities of solvents used for extraction.

Routine identification of endogenous components occurring in extracts of tissues and body fluids always accompanies the search for dangerous xenobiotics and constitutes an integral investigative problem of contemporary forensic toxicology. A lack of the possibility of use of complex analytical systems such as GC/MS or HPLC/MS may cause serious identification problems, limiting both the promptness of execution of an expert analysis, and its evidential value for the needs of prosecuting organs and the administration of justice.

## CONCLUSIONS

- Thanatochemical degradation of biological material is conducive to generation of endogenous chemical compounds, whose presence interferes in the identification of xenobiotics.
- The following are amongst the most frequently detected groups of endogenous compounds: volatile inorganic compounds (mostly hydrogen sulphide); alcohols (mostly ethyl alcohol and 1-butanol); acetaldehyde; 2-propanone (acetone); lower and higher monocarboxylic acids; aliphatic-aromatic acids and aliphatic-aromatic amines.
- In the group of endogenous compounds of the biological background, one ought to single out the presence of indirect products of biodegradation connected with the abuse of ethyl alcohol – biomarkers of addiction (Pictet-Spenger alkalies, ethyl esters of higher fatty acids and of phospholipids, ethyl glucuronate), compounds from the group of popular stimulants (caffeine, theobromine), typical biochemical components of body fluids (cholesterol, trichloroethylene, di- and monoglycerides).
- The use of systems of gas or liquid chromatography coupled with mass spectrophotometry (GC/MS, HPLC/MS) equipped with a library of

spectra (WILAY, NIST), ensures prompt and reliable identification differentiating xenobiotics from endogenous compounds.

#### References:

1. Balenger J. C., Goodwin F., Brown W. [et al.], Alcohol and central serotonin metabolism, *Archives of General Psychiatry* 1979, vol. 36, pp. 224–227.
2. Bates H. A., Pictet-Spengler reaction of epinefrine with formaldehyde and acetaldehyde, *Journal of Organic Chemistry* 1981, vol. 46, pp. 4931–4935.
3. Bonte W., Blleifurs J., *Post-mortem* dating of putrefied material through ptomaine estimation, *Journal of Forensic Sciences* 1977, vol. 22, pp. 558–572.
4. Cohen G., Collins M. S., Alkaloids from catecholamines in adrenal tissue. Possible role in alcoholism, *Science* 1970, vol. 167, pp. 1749–1751.
5. Elian A. H., Determination of endogenous gamma-hydroksybuturic acid (GHB) levels in *antemortem* urine and blood, *Forensic Science International* 2002, vol. 128, pp. 120–122.
6. Helander A., Bek O., Jones A. W., Urinary 5HTOL/5HIAA as biochemical marker of *post-mortem* ethanol synthesis, *Lancet* 1992, vol. 340, p. 1159.
7. Helander A., Bek O., Jones A.W., Distinguishing ingest ethanol from microbial formation by analysis of urinary 5-hydroxytryptophol and 5-hydroxyindoleacetic acid, *Journal of Forensic Sciences* 1995, vol. 40, pp. 95–98.
8. Konichiro T., Mieko K., Yasuo S., Cyanide and thiocyanide levels in blood and saliva of healthy adult volunteers, *Journal of Health Science* 2000, vol. 46, pp. 343–350.
9. Musshoff. F., Chromatographic methods for the determination of markers of chronic and acute alcohol consumption (Review), *Journal of Chromatography B* 2002, pp. 457–480.
10. Pragst F., Auwaerter F., Sporkert F. [et al.], Analysis of fatty acid ethyl ester in hair as possible markers of chronically elevated alcohol consumption by headspace solid-phase microextraction (HS-SPME), and gas chromatography – mass spectrometry GC/MS, *Forensic Science International* 2001, vol. 121, pp. 76–88.
11. Schmitt L., Betsch P., Droenner R. [et al.], Ethyl glucuronide in human hair, *Alcohol and Alcoholism* 2000, vol. 35, pp. 283–285.
12. Sulway M. J., Malins J. M., Acetone in diabetic ketoacidosis, *Lancet* 1970, vol. 10, pp. 736–749.
13. Tiess D., Hammer U., Uber endogene Aceton (propan-2-on) und Isopropanol (propan-2-ol) Konzentration im Menschlichen Korper nach Ketoacidotschem Zustanden, *Zeitschrift fur das Gesamte Hygiene* 1985, Bd. 31, S. 527–529.
14. Wachowiak R., Rahhal A. N., Endogenne lotne związki organiczne we krwi i ich znaczenie sądowo-lekarskie. Cz. I. Medyczne i toksykologiczne aspekty zatruc acetonem, *Archiwum medycyny sądowej i kryminologii* 1994, t. 40, s. 736–740.
15. Wachowiak R., Rahhal A. N., Endogenne lotne związki organiczne we krwi i ich znaczenie sądowo-lekarskie. Cz. II. Poziomy aldehydu kwasu octo-

- wego we krwi w aspekcie intoksykacji alkoholem etylowym, *Archiwum medycyny sądowej i kryminologii* 1994, t. 44, s. 390–396.
16. Wachowiak R., Rahhal A. N., Endogenne lotne związki organiczne we krwi i ich znaczenie sądowo-lekarskie. Cz. III. Skład jakościowo-ilościowy wyższych alkoholi obserwowany w przypadkach intoksykacji oraz podczas rozkładu zwłok, *Archiwum medycyny sądowej i kryminologii* 1996, t. 46, s. 269–275.
  17. Wachowiak R., Tobolski J., Miskowiak B., Distribution of hydrogen sulphide in rats' organs and associated histological changes in experimental intoxication, *Problems of Forensic Sciences* 2000, vol. 43, pp. 275–282.
  18. Zimmer H., Schmitt G., Aderjan R., Preliminary immunochemical test for the determination of ethylglucuronide in serum and urine: comparison of screening method results with gas chromatography – mass spectrometry, *Journal of Analytical Toxicology* 2002, vol. 26, pp. 11–16.
  19. Zumwalt R. E., Bost R. O., Sunshine I., Evaluation of ethanol concentration in decomposed bodies, *Journal of Forensic Sciences* 1982, vol. 27, pp. 549–554.

# STRUKTURA CHEMICZNA ENDOGENNYCH ZWIĄZKÓW TŁA BIOLOGICZNEGO I ICH ZNACZENIE W BADANIACH IDENTYFIKACYJNYCH KSENOBIOTYKÓW

Roman WACHOWIAK

## TANATOCHEMIA – WYKŁADNIKI BIOCHEMICZNE GNICIA ZWŁOK I MATERIAŁU BIOLOGICZNEGO ORAZ ICH ZNACZENIE W DIAGNOSTYCE CHEMICZNEJ ZATRUĆ

Procesy biochemiczne kontrolowane całkowicie podczas życia człowieka ulegają zasadniczym zmianom po śmierci. Proces agonii poprzedzający śmierć, następstwem której jest zatrzymanie krążenia, oddychania i funkcji ośrodkowego układu nerwowego, implikuje postępujące zmiany tanatochemicznej degradacji. Proces ten przebiega z udziałem endogennych enzymów (autoliza – samotrąwienie) i jest sukcesywnie potęgowany dodatkowo aktywnością wszechobecnych endo- i egzogennych drobnoustrojów (bakterie, grzyby i ich enzymy).

Intensywność procesu gnilnego jest determinowana udziałem wielu czynników, m.in. czasem biodegradacji, warunkami fizykochemicznymi (temperatura, wilgotność, dostęp powietrza oraz jego cyrkulacja, otoczenie) i środowiskiem, w którym utrzymywane są zwłoki (gleba, woda, powietrze). Nie bez znaczenia w postępującym procesie biodegradacji są zróżnicowane indywidualne cechy denata, m.in. profil strukturalny układu tkankowego w relacji białko – lipidy, wiek, choroby poprzedzające zgon, wpływ zażywanych leków czy innych ksenobiotyków oraz mechanizm śmierci. Proces autosyntezy endogennych związków w warunkach *post mortem* dotyczy przede wszystkim degradacji naturalnych produktów występujących w tkankach i płynach ustrojowych z grupy węglowodanów, białek, tłuszczów, enzymów i hormonów. Wśród dominujących procesów biotransformacji wymienić należy: hydrolizę, dekarboksylację, deaminację, transaminację oraz reakcje o charakterze oksydacyjno-redukcyjnym.

W celu zapobiegania niekontrolowanym pośmiertnym procesom biodegradacji, należy zarówno zwłoki, jak i zabezpieczony materiał sekcyjny, przechowywać w niskiej temperaturze ograniczającej procesy gnicia. Konieczność maksymalnego ograniczenia przebiegu procesów rozkładu jest niezbędna dla kolejnych etapów diagnostyki chemicznej, a w szczególności toksykologicznej interpretacji wyników analizy jakościowo-ilościowej ksenobiotyków odpowiedzialnych np. za podejrzone zatrucia śmiertelne. Wspomniane procesy tanatochemiczne, a w szczególności autoliza zachodząca w początkowym okresie biodegradacji, implikuje dysfunkcję przepuszczalności błon komórkowych narządów i towarzyszące jej grawitacyjne zmiany przemieszczania zawartości wody, których następstwem jest zainicjowany proces redystrybucji ksenobiotyków uwarunkowany mechanizmem wytworzonych w układzie biologicznym gradientów stężeń.

Znajomość następstw postępującego procesu biodegradacji zwłok czy zabezpieczonego materiału biologicznego stanowi ważny problem interpretacyjny, ściśle związany z właściwym rozróżnieniem wpływów interferencyjnych składników, tzw.

„tła biologicznego” od faktycznego udziału egzogennych ksenobiotyków w przypadku ich obecności.

#### MATERIAŁ BIOLOGICZNY W DIAGNOSTYCE TOKSYKOLOGICZNEJ ZATRUCI I JEGO WYKORZYSTANIE W INTERPRETACJI UDZIAŁU ZWIĄZKÓW POCHODZENIA ENDOGENNEGO

Zastosowanie nowoczesnych analitycznych metod badawczych pozwala na znaczne obniżenie ilości zabezpieczanego rutynowo materiału sekcyjnego. Materiał biologiczny pobierany podczas sekcji zwłok posiada wyjątkową wartość dowodową i z tego względu podlega specyficznemu zabezpieczeniu. Specyfika fizykochemiczna wielu ksenobiotyków nakazuje zawsze jego natychmiastową analizę z uwzględnieniem perspektywicznego wykonania reanalizy po krótkotrwałym przechowywaniu w lodówce w temperaturze  $\pm 5^{\circ}\text{C}$  (do dwóch tygodni) lub konieczność zamrożenia ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) w przypadku przewidywanego dłuższego okresu przechowywania. Toksykologiczna ocena interpretacyjna biochemicznego składu jakościowo-ilościowego materiału biologicznego dotyczy przede wszystkim:

- krwi, ewentualnie osocza (możliwość ustalenia zakresów stężeń ksenobiotyków, pozwalających na ich konfrontacje z tabelarycznymi danymi farmakokinetycznymi dotyczącymi poziomu terapeutycznego, toksykologicznego i śmiertelnego);
- alternatywnych w stosunku do krwi innych układów odniesienia, które dotyczą ciała szklistego oka, płynu mózgowo-rdzeniowego, ewentualnie przychłonki usznej czy mazi stawowej;
- moczu, który należy uznać za preferencyjny materiał diagnostyczny z racji możliwości wykrywania w nim ksenobiotyków i ich metabolitów w czasie znacznie dłuższym aniżeli we krwi, jak również z uwagi na szybkie wykonanie analizy homogenicznej (eliminującej proces ekstrakcji), np. immunochemicznej;
- włosów, dla których przeprowadzona segmentacyjna analiza porównawcza pozwala na obiektywną interpretację uzależnienia w aspekcie kumulacyjnych skutków długotrwałego zażywania leków, m.in. środka psychoaktywnego.

W przypadku ekstremalnej degradacji tkanek ujawnionych zwłok, zabezpieczenie odpowiedniego materiału biologicznego ogranicza się najczęściej do zachowanych mięśni, ewentualnie w przypadku ekshumacji zwłok, materiału pobieranego z okolic wybranych narządów czy tzw. posoki, tj. płynu dostępnego po ich otwarciu.

#### STRUKTURA CHEMICZNA NAJCZĘŚCIEJ NOTOWANYCH ENDOGENNYCH ZWIĄZKÓW ORGANICZNYCH

Proces biodegradacji materiału biologicznego, generujący zróżnicowany skład jakościowy tła biologicznego, stanowi ważny problem interpretacyjny w analizie toksykologicznej. Produktami przemian naturalnych składników tkanek i płynów ustrojowych są liczne, wtórne organiczne związki, wśród których najczęściej wymieniane są alkohole, aldehydy, związki ketonowe, fenole, aminy, a z nieorganicznych siarkowodor, amoniak, dwutlenek węgla oraz związki cyjankowe. Wśród badanych przypadków przeważają doniesienia dotyczące analizy i mechanizmów powstawania en-



dogennych alkoholi w procesach wtórnej degradacji biologicznej. Wyniki rutynowej analizy chromatograficznej typowych organicznych endogennych składników lotnych zawartych w próbkach krwi zwłok rozłożonych po czasie 30 dni w mieszkaniu ( $\pm 20^{\circ}\text{C}$ ) (A) oraz w posoju ekshumacyjnej (płyn dostępny po otwarciu zwłok) po 180 dniach od czasu śmierci (B) przedstawiono na rycinie 1.

#### PROBLEM ALKOHOLU ENDOGENNEGO W INTERPRETACJI STANU TRZE WOŚCI

Badania wykazały, że podczas zachodzących procesów biodegradacji zwłok, czyli *in corpore*, jak też w pobranych próbkach krwi przechowywanych w standardowych warunkach *in vitro*, może powstać alkohol endogenny [16, 19]. Substratem przemian biochemicznych dla tego procesu jest glukoza krwi, której fizjologiczny poziom  $\pm 120\text{ mg}\%$ , przy udziale enzymów drobnoustrojów beztlenowych, może prowadzić do powstania znacznych stężeń alkoholu etylowego. Notowane najczęściej zakresy stężeń alkoholu endogennego osiągają wartość 1‰, a w sytuacjach ekstremalnych mogą nawet przekroczyć wartość 3‰. Powstanie wyższych stężeń alkoholu przypisuje się hipoglikemii, która występuje często w przebiegu długotrwałej agonii czy w niektórych rodzajach śmierci poprzedzonej intensywnymi zabiegami resuscytacyjnymi (nagle zatrzymanie krążenia, uduszenie, utonięcie). W postępującym procesie gnilnej fermentacji powstają równocześnie, obok alkoholu etylowego, wyższe alkohole, głównie 1-butanol, 1-propanol, 2-butanol, 2-propanol oraz 2-metylo-1-propanol. Znaczący wpływ hamujący na przebieg powyższych procesów biochemicznych posiada dodatek stabilizatorów – fluorku czy azydku sodu. Równocześnie należy zaznaczyć, że obok dominujących procesów tworzenia się alkoholu endogennego w warunkach beztlenowych obserwuje się niekiedy zjawisko odwrotne, tj. sukcesywne jego zanikanie przy udziale niektórych bakterii z rodzaju *Acetobacter*. Wśród aktualnie preferowanych rutynowych badań pozwalających na rozróżnienie alkoholu egzogenego i endogenego można wymienić następujące postępowania:

- ocena porównawcza poziomów alkoholu etylowego w próbkach krwi pobranych z kilku miejsc, m.in. serca, żyły udowej, łokciowej lub szyjnej;
- porównawcza reanaliza poziomów alkoholu etylowego w czasie przechowywania w dwóch równolegle zabezpieczonych próbkach krwi sekcyjnej, tj. z dodatkiem fluorku czy azydku sodu i bez ich obecności;
- analiza porównawcza poziomu alkoholu we krwi w odniesieniu do ciała szklistego oka, mazi stawowej czy płynu mózgowo-rdzeniowego;
- ukierunkowana identyfikacja wykazująca obok alkoholu etylowego obecność innych alkoholi endogennych, a w szczególności 1-butanolu;
- ocena stopnia rozkładu gnilnego zwłok, zmiany zabarwień i intensywność zapachów;
- badania mikrobiologiczne aktywności wyizolowanych szczepów bakteryjnych krwi zdolnych do tworzenia alkoholu etylowego z udziałem glukozy jako substratu.

Za najnowsze osiągnięcia w poszukiwaniu skutecznego markera pośmiertnej syntezy endogenego alkoholu etylowego należy uznać propozycje Halandera i in. [7, 8]. Podstawą kwalifikacji jest wartość stosunku stężeń kwasu 5-hydroksyindolooctowego (5-HIAA) do alkoholu 5-hydroksyindoloetylowego (5-HTOL), które powstają z aldehy-

du 5-hydroksyindoloctowego, produktu oksydacyjnej deaminacji neurotransmitera serotoniny. Przebieg zachodzących procesów przedstawiono na rycinie 2.

Jeżeli w badanym moczu stosunek zależności:

$$R = \frac{5 - HTOL \text{ [pikomol]}}{5 - HIAA \text{ [nanomol]}} \quad \{1\}$$

przekracza wartość 15, to wskazuje on ewidentnie na obecność w organizmie alkoholu etylowego egzogenego, pochodzącego z konsumpcji. Wyższe stężenie alkoholu (5-HTOL) aniżeli kwasu (5-HIAA) wynika ze specyfiki procesu metabolizacji alkoholu etylowego prowadzącego zawsze do wytworzenia wysokiego stężenia zredukowanej formy dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NADH) w układzie enzymatycznych przemian z udziałem  $NAD^+/ADH$ . Obecność alkoholu egzogenego w organizmie żywym sprzyja zawsze dominacji zredukowanej formy (NADH) implikującej generację produktu redukcji aldehydu 5-hydroksyindolilo-3-octowego, tj. alkoholu 5-HTOL. Układ ten nie funkcjonuje po śmierci; stwierdzona fizjologiczna wartość  $R < 15$  przy równoczesnej obecności alkoholu etylowego we krwi wskazuje na jego endogeny charakter. Alkoholicy mają zawsze obniżony poziom 5-HIAA w płynie mózgowo-rdzeniowym [1].

#### INNE ENDOGENNE ZWIĄZKI ORGANICZNE W MATERIALE BIOLOGICZNYM

Obecność acetonu we krwi jest typowa nie tylko dla cukrzyicy czy stanów głodowych, ale może być następstwem spożywania napoju alkoholowego zawierającego w składzie aceton. Obecność we krwi osób chorych na cukrzycę, obok acetonu, kwasu acetylooctowego i  $\beta$ -hydroksymasłowego, pozwala wykorzystać ich obecność do odróżniania przypadków cukrzyicy od intoksykacji związanej z obecnością we krwi acetonu egzogenego [12]. Określone poziomy wolnego acetonu we krwi osób z cukrzycą typu I mieściły się w przedziale do 0,038‰ i były nieco wyższe od poziomu acetonu we krwi osób z ustaloną cukrzycą typu II, który wynosił do 0,028‰. Zdecydowanie wyższe zakresy poziomów acetonu we krwi (0,04–0,48‰) dotyczyły badanych przypadków śpiączki cukrzycowej [14].

Możliwość równoległych enzymatycznych przemian oksydacyjno-redukujących układu aceton/2-propanol w ustroju człowieka został potwierdzony przez niektórych autorów [13], a dokonana przez nich zróżnicowana analiza chemiczna krwi umożliwia obiektywną diagnostykę ze wskazaniem ksenobiotyku, któremu można przypisać dominującą rolę w egzogennej ekspozycji.

W ocenie udziału oddziaływań endogennych lotnych związków organicznych należy również uwzględnić obecność aldehydu octowego (etanal). Zgodnie z danymi zawartymi w piśmiennictwie, poziomy fizjologiczne aldehydu octowego we krwi, a wynikające z podstawowych przemian biochemicznych żywego organizmu, są zróżnicowane i mieszczą się w wąskim przedziale nie przekraczającym wartości 0,2 mg/dm<sup>3</sup>. Podobne zależności dotyczą ostrego zatrucia alkoholowego osób zdrowych, przy którym poziom aldehydu we krwi utrzymuje się w przedziale 0,9–1,3 mg/dm<sup>3</sup>, podczas gdy u nałogowych alkoholików jest podwyższony i mieści się w zakresie 1,7–2,5 mg/dm<sup>3</sup> [15]. Najwyższe poziomy aldehydu octowego (5–22 mg/dm<sup>3</sup>) są notowane we krwi osób leczonych Disulfiranem (Anticol, Antabus, Esperal), którzy – wbrew zaleceniom racjo-

nalnej terapii – spożywali napój alkoholowy. Podwyższony poziom aldehydu jest następstwem inhibicji metabolicznej dehydrogenazy aldehydowej blokującej jego przemianę do aktywnego octanu, kolejnego substratu przemian zachodzących w cyklu Krebsa.

Konsekwencją obecności aldehydu octowego i mrówkowego, produktów utleniania alkoholu metylowego występujących w ograniczonych ilościach w każdym napoju alkoholowym, są wtórne produkty ich kondensacji (reakcja Pictet-Spengera) z endogennymi aminami (dopamina, adrenalina, nor-adrenalina, serotonina; ryцина 3). Związki te, zaliczane do pochodnych tetrahydroizochinoliny czy tetrahydro- $\beta$ -karboliny, mogą być wykorzystane jako diagnostyczne markery choroby alkoholowej, bowiem im przypisuje się nie w pełni udokumentowane specyficzne właściwości farmakologiczne odpowiedzialne prawdopodobnie za mechanizm uzależnienia [2, 4].

W badaniach identyfikacyjnych związków organicznych o charakterze endogennym należy uwzględnić również produkty ich wtórnych przemian, jakie powstają w następstwie reakcji z niektórymi ksenobiotykami, a szczególnie z alkoholem etylowym [9]. Wśród endogennych związków przydatnych w diagnostyce uzależnienia alkoholowego należy wymienić możliwość wykazania w płynach ustrojowych glukuronianu etylu po czasie jego całkowitego zaniku we krwi [11, 18]. Podobne możliwości dotyczą wykazania we włosach osób uzależnionych od alkoholu estrów etylowych wyższych kwasów tłuszczowych [10] czy też fosfatydylo-etanolu, produktu transestryfikacji fosfatydylocholiny przy obecności alkoholu etylowego [10].

Do znaczących endogennych związków obecnych w tkankach i płucach ustrojowych należy kwas  $\gamma$ -hydroksymasłowy (GHB) z grupy neurotransmiterów związanych z metabolizmem kwasu glutaminowego,  $\gamma$ -aminomasłowego (GABA) czy egzogenego 1,4-butanodiolu. Znajomość zakresów fizjologicznych stężeń GHB jest szczególnie ważna z racji jego przestępczego wykorzystywania do celów czasowego ograniczenia świadomości ofiary gwałtu czy kradzieży po uprzednim egzogennym podaniu (*data-rape drugs, drug facilitated sexual assault*).

Ustalone zakresy stężeń endogennych GHB dla znaczącej reprezentatywnej liczby osób wykazały w przypadku moczu: 34–575  $\mu\text{g}/\text{dl}$ ,  $\bar{x} = 308$ ,  $n = 670$  i krwi: 17–151  $\mu\text{g}/\text{dl}$ ,  $\bar{x} = 74$ ,  $n = 240$  [5].

W nekrochemii przedmiotem badań i związanych z nimi kontrowersji są endogenne aminy (ptomainy), nazywane często „jadami trupimi” czy alkaloidami trupimi (*cadaveric alkaloids*), wśród których wymienia się kadawerynę i putrescynę. Szerokie badania identyfikacyjne wykazały, że aminy endogenne są produktami mikrobiologicznego rozkładu aminokwasów uwolnionych w następstwie pośmiertnego procesu katabolizmu białek. Wykazano, że dominującym mechanizmem ich powstawania jest proces dekarboksylacji aminokwasów przy udziale odpowiednich enzymów bakterii z rodzaju *Escherichia coli* (*E*), *Pseudomonas aeruginosa* (*Ps*) i *Bacillus subtilis* (*B*) [3]. Najczęściej notowane aminy endogenne zidentyfikowane w procesie biodegradacji mikrobiologicznej przedstawia tabela I.

#### UDZIAŁ ENDOGENNYCH ZWIĄZKÓW NIEORGANICZNYCH W MATERIALE BIOLOGICZNYM

Zasadność ukierunkowanej identyfikacji w grupie lotnych związków nieorganicznych ogranicza się w zasadzie do najbardziej niebezpiecznych – siarkowodoru

i cyjanoków. Poziomy endogennego siarkowodoru są zróżnicowane nie tylko warunkami czasowymi czy termicznymi procesu rozkładu, ale również strukturą biochemiczną narządów. Badania własne wykazały, że poziomy endogennego siarkowodoru dla wybranych narządów poddanych procesowi gnicia (3 miesiące) w temperaturze  $\pm 18^{\circ}\text{C}$ , oznaczone metoda spektrofotometryczną z użyciem N,N-dimetylo-p-fenylo-diaminy, wykazały odpowiednio: wątroba –  $15,2 \mu\text{g/g}$ , mózg –  $12,7 \mu\text{g/g}$ , nerka –  $11,4 \mu\text{g/g}$  [17].

Próby świeżej krwi przechowywane w temperaturze  $\pm 5^{\circ}\text{C}$  w okresie trzech miesięcy nie wykazały obecności siarkowodoru lub ujawniono jego obecność na granicy poziomu wykrywalności ( $0,5 \text{ mg/cm}^3$ ), natomiast przetrzymywane w warunkach pokojowych  $\pm 18^{\circ}\text{C}$  już po dziesięciu dniach osiągały górne stężenia ( $4,5 \text{ mg/cm}^3$ ) zakresu kalibracji ( $0,5\text{--}5 \text{ mg/cm}^3$ ) [17]. Znajomość zakresów endogennego siarkowodoru wydaje się szczególnie ważna w kontekście interpretacji mechanizmu ekstremalnych przypadków nagłej śmierci z udziałem egzogennego siarkowodoru występującego np. w pomieszczeniu opróżnionego szamba czy studzienki rewizyjnej systemu kanalizacji.

Przypisanie znaczącego udziału niskim stężeniom siarkowodoru czy towarzyszącemu mu metanowi, występujących w tych pomieszczeniach, znajduje najczęściej błędną interpretację przyczynowo-skutkową mechanizmu nagłej śmierci przy pominięciu udziału hipoksji, tj. zjawiska niedoboru tlenu, który dla tych przypadków ma priorytetowe znaczenie.

Podobne znaczenie interpretacyjne dotyczy zakresów endogennego poziomu jonu cyjanokowego, który najczęściej jest oznaczany metodą chromatografii gazowej w postaci cyjanowodoru (HCN). Poziomy fizjologiczne endogennego cyjanowodoru wg danych pochodzących z piśmiennictwa [8] są zróżnicowane i występują we krwi średnio w przedziale  $0,5\text{--}2,9 \mu\text{mol/l}$  u osób niepalących i  $0,5\text{--}6,8 \mu\text{mol/l}$  u osób palących tytoń. Zakresy te odbiegają znacząco od najczęściej notowanych przypadków śmiertelnych (powyżej  $1 \text{ mg/l}$ ) i nie stanowią problemu interpretacyjnego.

#### MOŻLIWOŚĆ IDENTYFIKACJI SKŁADNIKÓW TŁA BIOLOGICZNEGO W RUTYNOWEJ ANALIZIE KSENOBIOTYKÓW W MATERIALE BIOLOGICZNYM

Badanie jakościowo-ilościowe ksenobiotyków, obok składników tła biologicznego, wskazują, że możliwości maksymalnego oczyszczenia ekstraktów przy zastosowaniu nowoczesnych technik wyodrębniania są zawsze ograniczone. Wybór odpowiedniej metody identyfikacji jest więc podstawowym celem analitycznym niezależnym od metody izolacji. Badania identyfikacyjne składnika tła biologicznego można z powodzeniem prowadzić przy użyciu sprzężonych układów analitycznych z wykorzystaniem metod chromatografii gazowej czy cieczowej oraz spektrofotometrii masowej (GC/MS i HPLC/MS).

Użyteczność i walory techniki GC/MS sprawdzono podczas rutynowej analizy toksykologicznej wyłącznie mięśni zabezpieczonych ze zeszkieletowanych zwłok, które ujawniono po okresie sześciomiesięcznego rozkładu od września do lutego 2000–2001 r. (ekspertyza nr 151/2001 wykonana w Zakładzie Medycyny Sądowej AM w Poznaniu). Ukierunkowana analiza identyfikacyjna na obecność środków psychoaktywnych, po uprzedniej ekstrakcji homogenatu wg Borkowskiego, wykazała wyłącznie zespół związków endogennych. Badania identyfikacyjne wykonano na

sprężonym układzie GC/MS Hewlett Packard 5890 – AMD 402 (analyzer magnetyczno-elektrostatyczny wysokiej rozdzielczości), używając kolumny DB-1 30 m,  $\varnothing$  0,25 mm, w warunkach temperatury programowej (80°C przez 2 min, wzrost o 10°C/min do 300°C). Podstawą identyfikacji była zgodność widma masowego związku chemicznego zarejestrowanego na chromatogramie z odpowiadającym widmem wzorca rejestru widm (NIST *library search*). Typowy rozdział zidentyfikowanych składników ekstraktu kwaśnego przedstawia rycina 4.

Wyniki analizy identyfikacyjnej (GC/MS) składników ekstraktu kwaśnego wykazały obecność:

- niższych kwasów alifatycznych: A – kwas propanowy ( $C_3H_6O_2$ ), B – kwas butanowy (masłowy) ( $C_4H_{10}O_2$ ), C – kwas 2-metylobutanowy ( $C_5H_{10}O_2$ ), D – kwas pentanowy (walerianowy) ( $C_5H_{10}O_2$ ), E – benzenol (fenol) ( $C_6H_6O$ );
- kwasów alifatyczno-aromatycznych: F – kwas fenylloctowy ( $C_8H_8O_2$ ), G – kwas fenylpropanowy ( $C_9H_{10}O_2$ ), H – kwas para-hydroksyfenylpropanowy ( $C_9H_{10}O_3$ );
- wyższych kwasów alifatycznych: I – kwas heksadekanowy (palmitynowy) ( $C_{16}H_{32}O_2$ ), J – kwas oktadekanowy (stearynowy) ( $C_{18}H_{36}O_2$ ).

W ekstrakcie zasadowym wykazano obecność: para-hydroksyfenyletoaminy ( $C_8H_{12}NO$ ), fenyletoaminy ( $C_8H_{11}N$ ), piperidionu ( $C_5H_9NO$ ), 5-metyloimidazolidinodionu 2,4, monoglicerydu kwasu oktadekanowego.

Badania identyfikacyjne wielu innych podobnych przypadków potwierdzają często obecność gliceryny (1,2,3-propanotriol), amidu kwasu izonikotynowego (witamina PP), kofeiny (1,3,7-trimetylopuryna), teobrominy (3,7-dimetylopuryna), cholesterolu oraz ftalanu dibutylo, ftalanu butylo-2-etyloheksanowego, produktów z grupy estrów kwasu ftalowego, stanowiących zanieczyszczenia rozpuszczalników użytych do ekstrakcji.

Prowadzona rutynowa identyfikacja endogennych składników występujących w ekstraktach tkanek i płynów ustrojowych towarzyszy zawsze poszukiwaniu niebezpiecznych ksenobiotyków i stanowi integralny problem badawczy współczesnej toksykologii sądowej. Brak możliwości użycia złożonych układów analitycznych (GC/MS czy HPLC/MS) stwarza poważne problemy identyfikacyjne, ograniczające zarówno szybkość wykonania ekspertyzy, jak i jej wartość dowodową dla potrzeb organów ścigania i wymiaru sprawiedliwości.

## WNIOSKI

- Procesy tanatochemicznej degradacji materiału biologicznego sprzyjają generacji endogennych związków chemicznych, których obecność interferuje w identyfikacji ksenobiotyków.
- Do najczęściej wykrywanych grup endogennych związków należą: lotne związki nieorganiczne (głównie siarkowodór); alkohole (głównie alkohol etylowy i 1-butanol); aldehyd octowy; 2-propanon (aceton); niższe i wyższe kwasy jednonakarboksyłowe; kwasy alifatyczno-aromatyczne oraz aminy alifatyczno-aromatyczne.
- W grupie endogennych związków tła biologicznego należy wyróżnić obecność pośrednich produktów biodegradacji związanej z nadużywaniem alkoholu etylowego – biomarkery uzależnienia (zasady Pictet-Spengera, estry etylowe wy-

- źszych kwasów tłuszczowych i fosfolipidów, glikuronian etylu); związki z grupy stosowanych używek (kofeina, teobromina); typowe biochemiczne składniki płynów ustrojowych (cholesterol, tri, di i mono glicerydy).
- Użycie sprzężonych układów chromatografii gazowej czy cieczowej i spektrofotometrii masowej (GC/MS, HPLC/MS) wyposażonej w bibliotekę widm (WILAY, NIST), zapewnia szybką i wiarygodną identyfikację różnicującą ksenobiotyki od związków endogennych.