

# DRUGS IN BODY FLUIDS OF ROAD ACCIDENT VICTIMS. AN ANALYSIS OF 6 CASES

Ewa CHUDZIKIEWICZ, Maria KAŁA

*Institute of Forensic Research, Cracow*

**ABSTRACT:** Drugs used in anaesthesia and premedication are sometimes detected during routine forensic screening analysis of blood and urine samples taken from persons injured in various accidents. Six cases subjected to expert examination at the Institute of Forensic Research in Cracow in 2003 are presented in order to illustrate analytical and interpretation problems. Samples were sent to the Institute for analysis for the presence of drugs, narcotics or substances acting similarly to alcohol and to ascertain whether injured persons were under the influence of these drugs during the incident. Only in one of the analysed blood samples was a psychotropic drug that is not on the prescription list in Poland –  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC) – detected, and in one case morphine – a drug of abuse but also an analgesic medicament – was detected at a concentration of 100 ng/ml. Pharmacological drugs (thiopental, midazolam, lidocaine) were identified in each analysed material – these medicines could have been administered as part of the medical aid given to the injured persons. Determined concentrations of these drugs were within the therapeutic range, except in one case where the concentration of midazolam in blood was exceptionally high – 20  $\mu\text{g/ml}$ . In this case there was a note in the blood sample collection records that the patient had undergone an operation requiring general anaesthesia. Intravenous injection of midazolam and collection of the blood sample a short time later explain the very high concentration of this drug found. In the remaining cases, there was no information about the condition of injured persons or the medicines administered to save their health or life after the accident. These kinds of information are very important for the expert analyst, especially when the amount of collected biological material – particularly blood – is small. Moreover, this information is indispensable for interpretation of results of chemical-toxicological analysis concerning the influence of the identified substance on the human organism at the moment of the incident.

**KEY WORDS:** Drugs; Body fluids; Determination; Interpretation.

*Problems of Forensic Sciences, vol. LVIII, 2004, 91–102*

*Received 29 October 2004; accepted 17 December 2004*

## INTRODUCTION

The number of analyses carried out on body fluids collected from users of public roads for the presence of substances acting similarly to alcohol is increasing sharply. Analyses of body fluids taken from perpetrators and vic-

tims of other unfortunate accidents are also common and constitute a significant problem. In most expert examinations of this kind, analysts have only one type of material at their disposal, secured in small amounts, and only scant information about the circumstances of the incident. Even today with satisfactory access to modern analytical techniques, performing multidirectional toxicological analyses in such cases is impossible and interpretation of results is difficult and limited. Six cases subjected to expert examination at the Institute of Forensic Research in Cracow in 2003 have been presented to illustrate analytical and interpretation problems.

### DESCRIPTION OF CASES

Case 1. Blood (7 ml) collected from a driver in connection with a road accident where two persons died was submitted for analysis “for the presence of psychotropic or narcotic substances”.

Case 2. A blood sample (6 ml) was taken from a pedestrian who was involved in a road accident in order to perform analyses “for the presence of substances acting similarly to alcohol”.

Case 3. Blood (2,5 ml) was collected from a man in a case of “a suicidal gunshot wound” for analysis “for the presence of intoxicating substances, pharmacological drugs and poisons”.

Case 4. Blood (5 ml) secured in a case of “exceeding of powers by policemen and shooting of an unknown man” was sent in for analysis “for the presence of intoxicating substances”.

Case 5. A blood sample (10 ml) was taken from a man who had received an accidental electric shock at work. The specimen was sent in for analysis for “the presence of intoxicating substances”.

Case 6. A urine sample (approx. 6 ml) collected from a participant in a road accident was sent in for analysis “for the presence of narcotic drugs, psychotropic substances and barbiturates”.

Materials collection records were enclosed with samples of fluids in all cases. However, only in the case of the man who received an electric shock was information included in the record about the condition of the victim at the moment of collection of material for analysis – he was in a state described as “after resuscitation (unconscious, anaesthetised)”.

### TOXICOLOGICAL INVESTIGATIONS

Due to a lack of specific targeting of analysis, in all cases specimens were analysed in accordance with procedure that is obligatory at the Institute.

First, screening analyses were performed with use of immunochemical methods and high-performance liquid chromatography (HPLC-DAD). Positive results were confirmed by targeted analytical procedures using instrumental methods. Furthermore, all blood samples were analysed for amphetamine and its analogues, and also  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC) and 11-nor-9-carboxy- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (THCCOOH). Amphetamines were determined by liquid chromatography coupled with mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization (LC/MS-APCI), and cannabinoids were determined by gas chromatography with mass spectrometry with negative chemical ionization (GC/MS-NCI).

### Screening methods

Blood samples were analysed for the presence of opiates and also benzodiazepines and barbiturates that are commonly abused together with them. The fluorescence polarisation immunoassay (FPIA) method with application of TDx tests manufactured by Abbott was used. Opiates and barbiturates were detected using tests intended for detection of these substances in urine, whilst benzodiazepines were detected with use of tests for serum. Use of tests on material different to that intended by the manufacturer meant that samples required preliminary preparation. Blood samples were diluted 3 times with distilled water for benzodiazepines and barbiturates procedures, whilst blood samples for opiates procedure were precipitated with acetone, centrifuged and then dissolved in Abbott's dilution buffer in order to obtain samples that were 5 times concentrated.

Syva Rapid immunochemical tests by Dade Behring were applied to urine samples for identification of drugs from the above mentioned groups and also cocaine, amphetamines and cannabinoids.

Screening analysis was performed by the HPLC-DAD method using LaChrom D-7000 System apparatus by Merck/Hitachi operating in conditions of the Chrom-Tox system for identification of drugs developed by Merck. Liquid-liquid extraction dependent on pH from three different mediums: acidic (pH 2), alkaline (pH 9) and strongly alkaline (pH 13) was used for the purpose of extraction of xenobiotics. Solvents used for extraction were, respectively, ethyl ether, ethyl acetate and a mixture of n-hexane and isoamyl alcohol (99:1). Separation of compounds present in extracts was achieved on a LiChroCART 125  $\times$  4 column with LiChrospher 60 RP Select B packing material (Merck). A mixture of acetonitrile and 25 mM triethylammonium phosphate buffer solution (pH 3) was used in gradient mode as a mobile phase.

## Confirmation methods

HPLC-DAD or LC/MS-APCI was used for confirmation of the presence and quantification of xenobiotics in blood and urine. Targeted extraction was applied, depending on the type of xenobiotic. Specimens for quantification of barbiturates were extracted with diethyl ether (pH 2) and the extracts analysed by the HPLC-DAD method. A reversed phase column and gradient conditions were applied (the same as in the screening method). The mobile phase consisted of a mixture of acetonitrile and water with addition of 85% phosphoric acid (100  $\mu$ l/l).

Analysis of benzodiazepines and opiates was performed by the LC/MS-APCI method with use of HP-1100 Agilent Technologies apparatus. Blood samples used for quantification of benzodiazepines were extracted directly with diisopropyl ether (pH 7,4) directly, while urine samples were first subjected to enzymatic hydrolysis ( $\beta$ -glucuronidase with arylsulphatase for 12 hours at 37°C). Blood samples for quantification of opiates were also hydrolysed and then extracted with a mixture of methylene chloride and isopropanol (9:1) from an alkaline medium (pH 9). Separation in both cases was carried out on a LiChroCART 125  $\times$  4 column with Purospher RP-18 e packing material. The mobile phase was made up of a mixture of acetonitrile and water with addition of 100  $\mu$ l of concentrated formic acid in 100 ml of each solvent. Analyses were carried out in selected ion monitoring (SIM) mode.

## Targeted analyses

Blood samples for quantification of amphetamine and its analogues were extracted with n-butyl chloride from an alkaline medium (pH 12). Obtained extracts were analysed by the LC/MS-APCI method. Separation was achieved on a LiChroCART 125  $\times$  3 column with Purospher 60 RP-18 e packing material. The composition of the mobile phase was similar to that used for quantification of benzodiazepines.

Quantification of cannabinoids was carried out using an Agilent Technologies gas chromatograph 6890 Series equipped with mass selective detector 5973 Series (GC/MS-NCI).

For this purpose, blood samples were extracted with diisopropyl ether from an alkaline medium (pH 13). Then, the obtained extracts were derivatized using trifluoroacetic anhydride (TFAA) and analysed for  $\Delta^9$ -THC. Samples were also analysed for the presence of THCCOOH. For this purpose, the water phase after extraction of  $\Delta^9$ -THC was acidified with hydrochloric acid (pH 3). Then it was extracted with a mixture of hexane and ethyl acetate (7:1), and the obtained extracts were derivatized using a mixture of TFAA and pentafluoro-1-propanol (PFP). Separation was performed on an AT-5MS capillary column [3].

## RESULTS AND DISSCUSION

Results of toxicological analyses obtained in the mentioned cases are presented in Table I.

TABLE I. RESULTS OF TOXICOLOGICAL ANALYSES OF BODY FLUIDS COLLECTED FROM VICTIMS OF ACCIDENTS.

	Case description (kind and quantity of material)	Screening analysis [FPIA, SYVA] HPLC-DAD Chrom-Tox	Quantitative analysis LC/MS-APCI [ng/ml]	Quantitative analysis HPLC-DAD [ng/ml]	Targeted analyses LC/MS-APCI GC/MS-NCI [ng/ml]
1	Driver who caused a road accident where two persons died (blood – 7 ml)	[BAR (+), OPI, BZD (-)] thiopental furosemide	–	1600 –	Amphetamine (-) $\Delta^9$ -THC – 1,2 THCCOOH – 15
2	Participant in road accident (blood – 6 ml)	[BAR (+), OPI, BZD (-)] thiopental		7000	Amphetamine, $\Delta^9$ -THC (-)
3	Suicidal wound from a gunshot (blood – 2.5 ml)	[BAR (+), OPI, BZD (-)] thiopental		~2100 (FPIA)	Amphetamine, $\Delta^9$ -THC (-)
4	Exceeding of powers by policemen and shooting of unknown man (blood – 5 ml)	[BZD (+-), OPI, BAR (-)] midazolam (?)	50		Amphetamine, $\Delta^9$ -THC (-)
5	Electric shock accident (blood – 10 ml)	[BZD, OPI (+), BAR (-)] midazolam	20000 morphine – 100		Amphetamine, $\Delta^9$ -THC (-)
6	Participant in road accident (urine – 6 ml)	[BZD (+) OPI, BAR, KOK, KAN, AMF (-)]* midazolam lidocaine	2500 3600		Amphetamine, $\Delta^9$ -THC (-)

AMF – amphetamine, BAR – barbiturates, BZD – benzodiazepines, KAN – cannabinoids, KOK – cocaine, OPI – opiates, (-) – negative result, (+) – positive result, \* – results obtained by SYVA test.

Barbiturates were identified in three cases, benzodiazepines in two cases and opiates in one case as a result of screening of blood samples using the FPIA method, and also Syva tests on urine. Further screening analyses of blood and urine performed by HPLC-DAD under Chrom-Tox system conditions revealed a barbiturate in a driver's blood (case 1), identified as thiopental. Moreover, furosemide was found in his blood. Thiopental was also detected in the blood of the pedestrian who was the victim of a road accident (case 2) and in the blood of the man who wounded himself by gunshot (case 3). A drug from the benzodiazepines group, identified as midazolam, was detected in the blood of the man who received an electric shock (case 5)

and in the urine of the participant in a road accident (case 6). Furthermore, lidocaine was also found in the analysed urine. Midazolam traces were also detected in the blood of the man who was shot by policemen (case 4).

Using the LC/MS-APCI or HPLC-DAD method, thiopental was determined in blood at concentrations of 1.6 µg/ml (case 1), 2.1 µg/ml (case 3) and 7.0 µg/ml (case 2). Midazolam was determined in blood at concentrations of 50 ng/ml (case 4) and 20 µg/ml (case 5). Concentrations of midazolam and lidocaine determined in urine were 2.5 µg/ml and 3.6 µg/ml, respectively. Furthermore, a compound from the opiate group, detected (besides midazolam) in the blood of the electric shock victim, was identified as morphine using the LC/MS-APCI method. Its concentration was 100 ng/ml. Amphetamine and its analogues were not detected, using targeted analysis, in any of the materials from the mentioned cases. Only the driver who caused a fatal road accident (case 1) had in his blood  $\Delta^9$ -THC at a concentration of 1.2 ng/ml and its inactive metabolite THCCOOH at a concentration of 15 ng/ml.

Assessment of obtained results of toxicological analyses allows us to state with complete confidence only in the first case that the driver, in whose blood  $\Delta^9$ -THC was detected, was, at the moment of the incident, under the influence of a psychotropic substance after abuse of cannabis (marihuana, hashish).

In all six cases, it can not be excluded that the medicinal drugs detected during analyses (thiopental, midazolam, lidocaine, morphine) were administered in order to save the health or life of the victims of accidents.

Thiopental, ascertained in the first three persons (two participants in road accidents and the perpetrator of the attempted suicide by gunshot) is a drug from the barbiturates group. It has soporific, anaesthetic, amnesic and anticonvulsant activity. It is used for induction of general anaesthesia and as an anaesthetic for short surgical procedures. The drug decomposes rapidly and is metabolised to pentobarbital. Thiopental present in the blood in unchanged form can indicate that it was introduced into the organism a short time before blood collection for analysis. Lack of detection of pentobarbital in blood excludes one-off taking of thiopental a long time prior to testing and also multiple administration of this drug even in therapeutic doses. Determined quantities of thiopental in these three cases were within the therapeutic range, which in steady state is between 1.0–5.0 µg/ml, or even 25–42 µg/ml. The latter values are considered extreme but permissible [2]. The concentration determined in the second case (7 µg/ml) is reached 15 minutes after intravenous injection of 400 mg of thiopental [1]. Thiopental concentrations were significantly lower in the first and third case (1.6 and 2.1 µg/ml).

Midazolam is a strongly acting imidazole derivative of benzodiazepine that produces sedating, soporific, amnesic, anxiety-relieving, hypotonic and anticonvulsant effects. It is used orally as a hypnotic drug, and also

intramuscularly and intravenously for induction of anaesthesia and premedication, e.g. for surgical procedures. The midazolam concentration determined in the blood of the shot man was within the therapeutic range – between 40 and 250 ng/ml [2]. Its concentration in blood taken from the person who had received an electric shock was paradoxically high and considerably exceeded the range of toxic concentrations – 1000–1500 ng/ml [2]. Such a concentration of midazolam can occur in blood a short time after intravenous administration of this drug.

The remaining drugs found in body fluids – furosemide and lidocaine – are often given during therapeutic interventions.

#### SUMMARY

It is a fact that specialised laboratories have at their disposal increasingly good apparatus for performing requested toxicological analyses. This enables analysis of an ever wider range of compounds at lower concentrations. Currently, the most common limiting factor in toxicological analyses is the insufficient amount of material (blood, urine) at the analyst's disposal. In such cases, especially if there is a lack of precise specification of the target of analysis, the analyst often has to quantify medicines that he detects in screening analyses – these drugs may have been given to the injured person to save health or life after the accident. Frequently analyses for the presence of these drugs would not be necessary, if the analyst had been informed about operations on the injured person, e.g. surgical interventions or resuscitation. The agency or body that is ordering the analyses is most often interested in establishing whether the given person was under the influence of narcotic drugs or psychotropic substances during the incident, which could have influenced his/her behaviour during the incident. Lack of data about the circumstances of the incident make even a laboratory interpretation of results impossible.

#### References:

1. Baselt R. C., Disposition of toxic drugs and chemicals in man, Biomedical Publications Foster City, California 2002.
2. Moffat A. C., Osselton M. D., Widdop B., Clarke's analysis of drugs and poisons, Pharmaceutical Press, London 2004.
3. Kochanowski M., Opracowanie metody oznaczania  $\Delta^9$ -tetrahydrokannabinolu we krwi techniką GC-MS [nieopublikowana praca magisterska, Wydział Chemii UJ, Kraków 2003].



# ŚRODKI FARMAKOLOGICZNE W PŁYNACH USTROJOWYCH OFIAR WYPADKÓW. ANALIZA 6 PRZYPADKÓW

Ewa CHUDZIKIEWICZ, Maria KAŁA

## WSTĘP

Liczba analiz płynów ustrojowych pobranych od użytkowników dróg publicznych na obecność środków podobnie działających do alkoholu gwałtownie wzrasta. Analizy płynów ustrojowych pobranych od sprawców i ofiar innych nieszczęśliwych wypadków stanowią również częsty i istotny problem. W większości tego typu ekspertyz analityk dysponuje jednym rodzajem materiału, zabezpieczonym w niewielkiej ilości, a ponadto skąpyimi informacjami o okolicznościach zdarzenia. Nawet w czasach zadawalającej dostępności do nowoczesnych technik analitycznych przeprowadzenie w takich przypadkach wielokierunkowych badań toksykologicznych jest niemożliwe, a interpretacja wyników niełatwa i ograniczona. W celu zilustrowania trudności analitycznych i interpretacyjnych, przytoczono sześć przypadków będących przedmiotem ekspertyz wykonanych w Instytucie Ekspertyz Sądowych w 2003 roku.

## OPIS PRZYPADKÓW

Przypadek 1. Do badań „na obecność środków psychotropowych lub odurzających” nadesłano krew (7 ml) pobraną od kierowcy, a zabezpieczoną w związku z wypadkiem drogowym, w którym śmierć poniosły dwie osoby.

Przypadek 2. Od osoby, która uczestniczyła w wypadku drogowym jako pieszy, pobrano próbę krwi (6 ml) celem przeprowadzenia badań „na zawartość środków podobnie działających do alkoholu”.

Przypadek 3. Do badań nadesłano krew (2,5 ml) pobraną od mężczyzny, a zabezpieczoną w sprawie „samobójczego uszkodzenia ciała przez postrzelenie” celem przeprowadzenia badań „na zawartość środków odurzających, środków farmakologicznych i trucizn”.

Przypadek 4. Do badań nadesłano krew (5 ml) zabezpieczoną w sprawie „przekroczenia uprawnień przez funkcjonariuszy policji i postrzelenia N.N. mężczyzny” celem przeprowadzenia badań „na obecność środków odurzających”.

Przypadek 5. Od mężczyzny, który uległ nieszczęśliwemu wypadkowi w pracy przez porażenie prądem, pobrano próbę krwi (10 ml) do badań „na zawartość środków odurzających”.

Przypadek 6. Do badań nadesłano mocz (około 6 ml) pobrany od uczestnika wypadku drogowego celem przeprowadzenia badań „na obecność środków odurzających, substancji psychotropowych i barbituranów”.

We wszystkich przypadkach do prób płynów ustrojowych dołączone były protokoły pobrania materiału. Jednak tylko w przypadku mężczyzny porażonego prądem w protokole umieszczono informację o stanie osoby poszkodowanej w chwili pobiera-



nia materiału do badań, z której wiadomo było, że znajdował się on w stanie „po re-suscytacji (nieprzytomny, uśpiony)”.

## BADANIA TOKSYKOLOGICZNE

Ze względu na brak bliższego ukierunkowania badań, we wszystkich przypadkach postępowano zgodnie z tokiem postępowania analitycznego obowiązującym w Instytucie. W pierwszej kolejności obejmował on analizy przesiewowe wykonane metodami immunochemicznymi oraz wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detektorem szeregu diod (HPLC-DAD). Dodatkowo wyniki uzyskane metodami przesiewowymi były potwierdzane z zastosowaniem ukierunkowanych procedur analitycznych wykorzystujących instrumentalne metody oznaczenia. Ponadto wszystkie próby krwi poddano analizom celowanym na obecność amfetaminy i jej pochodnych oraz  $\Delta^9$ -tetrahydrokannabinolu ( $\Delta^9$ -THC) i 11-nor-9-karboksy- $\Delta^9$ -tetrahydrokannabinolu (THCCOOH). Amfetaminy w próbkach krwi analizowano metodą chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas w warunkach jonizacji chemicznej pod ciśnieniem atmosferycznym (LC/MS-APCI), a kannabinole oznaczano metodą chromatografii gazowej ze spektrometrią mas z negatywną jonizacją chemiczną (GC/MS-NCI).

### Metody skryningowe

Próby krwi analizowano na obecność alkaloidów z grupy opium oraz często im towarzyszących leków z grupy pochodnych benzodiazepiny i pochodnych kwasu barbiturowego metodą immunofluorescencji w świetle spolaryzowanym (FPIA) z zastosowaniem testów TDx firmy Abbott. Do wykrywania opiatów i barbituranów zastosowano testy przeznaczone do wykrywania tych substancji w moczu, natomiast do benzodiazepin testy do surowicy. Użycie testów do innego rodzaju materiału niż przewidywał producent wymagało wstępnego przygotowania próbki. Badanie prób krwi na obecność benzodiazepin i barbituranów wykonano po trzykrotnym ich rozcieńczeniu wodą destylowaną, natomiast próby krwi do badania na obecność opiatów strącano acetonem, a po odwirowaniu rozpuszczano w takiej ilości buforu firmowego, aby były one pięciokrotnie zagęszczone.

Do badań moczu zastosowano testy immunochemiczne Syva Rapid firmy Dade Behring, przeznaczone do wykrywania środków z wymienionych grup oraz dodatkowo kokainy, amfetamin i kannabinoli.

Analizę skryningową metodą HPLC-DAD wykonano z zastosowaniem aparatu LaChrom D-7000 System firm Merck/Hitachi w warunkach systemu Chrom-Tox do identyfikacji leków, opracowanego przez firmę Merck. W celu wyekstrahowania ksenobiotyków stosowano metodę ekstrakcji ciecz-ciecz zależną od pH z trzech środowisk: kwaśnego (pH 2), alkalicznego (pH 9) i silnie alkalicznego (pH 13), używając jako ekstrahentów, odpowiednio, eteru etylowego, octanu etylu i mieszaniny n-heksanu z alkoholem izoamylovym (99:1). Rozdział składników obecnych w ekstraktach prowadzono na kolumnie LiChroCART 125 × 4 z wypełnieniem LiChrospher 60 RP Select B firmy Merck. Jako fazę ruchomą stosowano mieszaninę acetonitrylu i 25 mM fosforanu trietyloamonowego (pH 3) podawaną na kolumnę w układzie gradientu składu.

## Metody potwierdzające

W celu potwierdzenia obecności wykazanych we krwi i moczu ksenobiotyków oraz wyznaczenia ich stężenia stosowano metodę HPLC-DAD lub metodę LC/MS-APCI. W zależności od rodzaju ksenobiotyku stosowano ekstrakcję celowaną. Próbki do oznaczania barbituranów ekstrahowano eterem etylowym przy pH 2, a ekstrakty badano metodą HPLC-DAD w wersji faz odwróconych z użyciem kolumny jak do skryningu i warunków gradientowego składu fazy. Fazę ruchomą stanowiła mieszanina acetonitrylu i wody z dodatkiem 85% kwasu o-fosforowego w ilości 100  $\mu$ l/l.

Benzodiazepiny i opiaty analizowano metodą LC/MS-APCI z zastosowaniem aparatu HP-1100 firmy Agilent Technologies. W celu oznaczenia benzodiazepin próbki krwi bezpośrednio, a próbki moczu po uprzedniej hydrolizie enzymatycznej ( $\beta$ -glukuronidaza z arylosulfatazą przez 12 godzin w temperaturze 37°C), ekstrahowano z eterem diizopropylowym (pH 7,4). Próbki krwi do oznaczenia opiatów również poddawano podobnej hydrolizie, po czym ekstrahowano mieszaniną chlorku metylenu z izopropanolem (9:1) ze środowiska alkalicznego (pH 9). Rozdział w obu przypadkach prowadzono na kolumnie LiChroCART 125  $\times$  4 z wypełnieniem Purospher RP-18 e. Fazę ruchomą stanowiła mieszanina acetonitrylu i wody z dodatkiem 100  $\mu$ l stężonego kwasu mrówkowego na 100 ml każdego rozpuszczalnika. Analizy prowadzono w systemie monitorowania wybranych jonów (SIM).

## Analizy celowane

Próbki krwi do oznaczania amfetaminy i jej pochodnych ekstrahowano chlorkiem n-butyłu ze środowiska alkalicznego (pH 12), a otrzymane ekstrakty analizowano metodą LC/MS-APCI. Rozdział prowadzono na kolumnie LiChroCART 125  $\times$  3 z wypełnieniem Purospher 60 RP-18 e, stosując skład fazy ruchomej podobny jak przy oznaczaniu benzodiazepin.

Kannabinole oznaczano metodą GC/MS-NCI z użyciem chromatografu gazowego serii 6890 sprzężonego ze spektrometrem mas serii 5973 firmy Agilent Technologies. W tym celu próbki krwi ekstrahowano eterem diizopropylowym ze środowiska alkalicznego (pH 13), po czym otrzymane ekstrakty poddano derywatywacji bezwodnikiem kwasu trifluorooctowego (TFAA) i badano w kierunku  $\Delta^9$ -THC. Ponadto próbki krwi badano na obecność THCCOOH. W tym celu fazę wodną po wyekstrahowaniu  $\Delta^9$ -THC zakwaszono kwasem solnym (pH 3) i ekstrahowano mieszaniną heksanu z octanem etylu (7:1), a otrzymane ekstrakty poddawano derywatywacji mieszaniną TFAA z pentafluoro-1-propanolem (PFP). Rozdział prowadzono na kolumnie kapilarnej AT-5MS [3].

## WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

Wyniki badań toksykologicznych uzyskane w omawianych przypadkach zebrano w tabeli I.

W wyniku analiz przesiewowych wykonanych metodą FPIA w próbach krwi oraz testami Syva w próbach moczu wykazano obecność pochodnych kwasu barbiturowego w trzech przypadkach, pochodnych benzodiazepiny w dwóch przypadkach oraz alkaloidów opium w jednym przypadku. W dalszych badaniach skryningowych prób

krwi i moczu przeprowadzonych metodą HPLC-DAD w warunkach systemu Chrom-Tox, wykryty u kierowcy (przypadek 1) lek z grupy barbituranów zidentyfikowano jako tiopental, a ponadto w jego krwi wykazano furosemid. Obecność tiopentalu wykryto również we krwi pieszego, który uległ wypadkowi drogowemu (przypadek 2) oraz we krwi mężczyzny, który uległ samopostrzeleniu (przypadek 3). Lek z grupy benzodiazepin wykryty we krwi osoby porażonej prądem (przypadek 5) oraz w moczu uczestnika wypadku drogowego (przypadek 6) zidentyfikowano jako midazolam. Ponadto w badanym moczu stwierdzono także lidokainę. Ślady midazolamu stwierdzono również we krwi mężczyzny postrzelonego przez funkcjonariuszy policji (przypadek 4).

Wyznaczone metodami LC/MS-APCI lub HPLC-DAD stężenia tiopentalu we krwi wynosiły 1,6 µg/ml (przypadek 1), 2,1 µg/ml (przypadek 3) i 7,0 µg/ml (przypadek 2), a stężenia midazolamu przyjęły wartości 50 ng/ml (przypadek 4) oraz 20 µg/ml (przypadek 5). Wyznaczone w próbie moczu stężenie midazolamu wynosiło 2,5 µg/ml, a lidokainy 3,6 µg/ml. Ponadto związek z grupy alkaloidów opium, stwierdzony obok midazolamu we krwi osoby porażonej prądem, zidentyfikowano metodą LC/MS-APCI jako morfinę, a jej stężenie wyznaczono na 100 ng/ml.

W żadnym z wymienionych przypadków, stosując analizy celowane, nie stwierdzono w badanym materiale obecności substancji psychotropowych z grupy amfetaminy i jej pochodnych, a tylko u kierowcy, który spowodował wypadek ze skutkiem śmiertelnym (przypadek 1) wykryto  $\Delta^9$ -THC w stężeniu 1,2 ng/ml oraz jego nieaktywny metabolit THCCOOH w stężeniu 15 ng/ml.

Analizując uzyskane wyniki badań toksykologicznych, stwierdzić można z całą pewnością, że tylko w pierwszym przypadku kierujący pojazdem, we krwi którego wykryto  $\Delta^9$ -THC, w chwili zaistniałego zdarzenia znajdował się pod działaniem substancji psychotropowej po użyciu środka odurzającego, jakim są przetwory konopi (marihuana, haszysz).

We wszystkich sześciu przypadkach nie można wykluczyć, że wykryte podczas wykonywanych badań leki (tiopental, midazolam, lidokaina, morfina) zostały podane w celu ratowania zdrowia lub życia osób podszkodowanych w zaistniałych wypadkach.

Stwierdzony u trzech pierwszych osób (u dwóch uczestników wypadku drogowego i ofiary próby samobójczej przez postrzelenie) tiopental jest lekiem z grupy pochodnych kwasu barbiturowego o działaniu nasennym, znieczulającym, amnestycznym i przeciwdrgawkowym. Jest on stosowany podczas indukcji w znieczulaniu ogólnym oraz jako anestetyk w krótkich zabiegach chirurgicznych. Jest lekiem szybko rozkładającym się i metabolizującym do pentobarbitalu. Jego obecność w postaci niezmięnionej we krwi może wskazywać, że został wprowadzony do organizmu na krótko przed pobraniem krwi do badań. Niewykrycie pentobarbitalu we krwi wyklucza odległe w czasie jednorazowe przyjęcie tiopentalu oraz częste przyjmowanie tego leku nawet w dawkach terapeutycznych. W tych trzech przypadkach wyznaczone we krwi stężenia tiopentalu mieściły się w zakresie stężeń terapeutycznych, który to zakres w stanie stacjonarnym wynosi od 1,0 do 5,0 µg/ml, a nawet 25–42 µg/ml. Te ostatnie wartości uważane są jako ekstremalne, ale dopuszczalne [2]. Stężenie, jakie stwierdzono w przypadku drugim (7 µg/ml), osiągnęte jest po 15 minutach od podania dożylnego 400 mg tiopentalu [1]. W pierwszym i trzecim przypadku wyznaczone stężenia tiopentalu były znacznie niższe (1,6 i 2,1 µg/ml).

Midazolam jest silnie działającą imidazolową pochodną benzodiazepiny, wykazującą działanie upokajające, nasenne, amnestyczne, przeciwłękowe, obniżające napięcie mięśni i przeciwdrgawkowe. Jest stosowany doustnie jako lek nasenny, a także domięśniowo i dożylnie podczas wprowadzania do anestezji oraz w premedykacji, np. do zabiegów chirurgicznych. Wyznaczone we krwi postrzelonego mężczyzny stężenie midazolamu mieściło się w zakresie stężeń terapeutycznych, który wynosi od 40 do 250 ng/ml [2]. Stężenie tego związku wyznaczone we krwi pobranej od osoby porażonej prądem było paradoksalnie wysokie i znacznie przekraczało zakres stężeń toksycznych, który wynosi od 1000 do 1500 ng/ml [2]. Takie stężenie midazolamu może wystąpić we krwi krótko po podaniu tego leku drogą iniekcji dożylniej.

Pozostałe wykazane w płynach ustrojowych leki – furosemid i lidokaina – są często podawane przy zabiegach terapeutycznych.

#### PODSUMOWANIE

Jest faktem, że wyspecjalizowane laboratoria dysponują coraz lepszą aparaturą do wykonywania zleconych analiz toksykologicznych. Umożliwia to dokonywanie badań coraz szerszego spektrum związków w coraz niższych stężeniach. Zasadniczym ograniczeniem w badaniach toksykologicznych jest obecnie najczęściej zbyt mała ilość materiału (krwi, moczu), jaką dysponuje analityk. W takich przypadkach, zwłaszcza jeżeli brak jest bliższego ukierunkowania badań, analityk często zmuszony jest oznaczyć leki, które wykryje w badaniach skryningowych, a które mogły być podawane osobie poszkodowanej po zaistniałym wypadku w celu ratowania jej zdrowia lub życia. Często badania na obecność tych środków nie byłyby konieczne, gdyby podano informacje, czy dana osoba była poddawana np. zabiegom chirurgicznym lub reanimacji. Organ zlecający badania jest bowiem najczęściej zainteresowany ustaleniem, czy dana osoba w chwili wypadku znajdowała się pod działaniem środków odurzających lub substancji psychotropowych, co mogło mieć wpływ na jej zachowanie w czasie zaistniałego zdarzenia. Brak danych o okolicznościach zdarzenia uniemożliwia nawet laboratoryjną interpretację wyników.