



COMPLEX INTOXICATIONS. ANALYTICAL AND INTERPRETATIONAL PROBLEMS

Piotr ADAMOWICZ, Maria KAŁA

Institute of Forensic Research, Kraków, Poland

Abstract

Complex intoxications constitute a complicated methodological problem in toxicological practice. This arises from the necessity of detection and determination of several compounds which have different chemical properties in the specimen, which is most usually blood and (or) urine that is available in small quantities. In cases of multiple drug intoxication, low concentrations of the particular components of the mixture in bio-samples can be expected. Interpretation of the results concerning severity of intoxication is very complicated in such situations. The choice of the method in toxicological analysis depends on the problem to be solved. The analytical strategy is usually based on screening and confirmation methods prior to actual determination of the identified compound. In this paper, the rules of conduct for the toxicologist-analyst have been characterised in respect to three types of expert opinion. The first type, the most frequent, concerns cases in which facts and circumstances linked to the intoxication are not known. In such cases a toxicological analyst proceeds to perform systematic toxicological analysis (STA) in order to detect the largest number of compounds which are toxicologically significant. All analytical methods except simple immunochemical tests require appropriate multi-step sample preparation. Often, negative results necessitate the carrying out of further selective analyses to detect the presence of inorganic and (or) organic poisons which are not detected in the course of the routine analytical procedure. The second type of expert opinions concerns cases in which the analysis is targeted at certain compounds. Often, after exclusion of the presence of suggested compounds, especially in severe intoxication or fatal cases, STA is carried out. Sometimes, there are cases in which a toxin is not known but the intoxicated person's symptoms are described. Medical pitfalls which can be encountered by the analyst in his/her work are described in 8 intoxication cases involving the following pharmacological agents: verapamil, doxepin, bromazepam, mianserin (1), salicylic acid, propafenone, cilazapril, digoxin, thiopental (2), zolpidem, hydroxyzine (3), perazine, pridinol, flupentixol (4), amiodarone, diltiazem, paracetamol, furosemide, midazolam, ketoprofen (5), nordazepam, mianserin, perazine, fluoxetine (6), ethyl alcohol, valproic acid, 7-aminoclonazepam (7), as well as ethyl alcohol and clonidine (8). At least one compound at concentrations within a fatal range was detected in blood samples collected from three individuals. In two individuals, one drug was detected at a toxic concentration. However, in the next three persons, all determined drugs were found to be in therapeutic ranges. In the latter cases, the findings of toxicological analysis were not a convincing element for establishing the cause of death.

Key words:

Chemical-toxicological analysis; Methods; Interpretation.

Received 19 December 2007; accepted 30 December 2007

1. Introduction

Chemical analysis is a cornerstone of forensic and clinical toxicology. In the field of clinical toxicology,

results of analyses are usually used for diagnostic purposes but in cases of hospitalisation of victims and also persons injured and perpetrators in various crimes, the analytical result should have evidential value. In such

situations, clinical toxicology becomes forensic toxicology. From the analytical point of view, the evidential value of the toxicological analysis result depends on the determination method and the type of specimen collected for analysis. An analyst applies screening methods, obtaining preliminary results that are not unequivocal (negative and positive), and then, the positive results are further verified by confirmation methods. The selection of appropriate material for analysis is determined by legal and scientific requirements – which are closely connected. This choice is mainly dependent on the time which has passed from the moment of drug administration to specimen collection, and by the analysis site (clinical or forensic laboratory, crime scene). Different compounds are present in different specimens – parent compounds and active metabolites, which influence biological processes and also inactive metabolites, whose presence can indicate that a long period has elapsed since drug administration.

The final stage of the work is the interpretation of the obtained results in the context of the case history and other evidential material – such interpretations for judicial purposes are becoming increasingly broad. Apart from confirming or excluding the administration of a xenobiotic, common problems that need to be solved currently are: evaluation of the dose and route (active administration and passive exposure) of administration of a drug (THC, amphetamines, cocaine) into the organism, determination of the time of last administration, exclusion of administration after the incident, determination of the source (medical treatment, diet, drug abuse) of the drug which was found in the body, performing a retrospective calculation, statement about the necessity of exhumation to prove the presence of xenobiotics (phenothiazines, amphetamines, LSD, THC).

A toxicologist analyst who is an expert in his/her own field performs interpretation of a analytical result within the limits of his/her authority (competence). He or she does not make any statement about criminal liability (the kind of penalty, criminal act, accusation, prohibition) or about defined behaviour of the particular individual, nor does s/he give a statement about the cause of death. Solving these problems lies within the remit of the adjudicating body and a doctor, respectively, and evaluation of the correctness of their conclusions in the case of contradictory opinions of two experts lies exclusively within the remit of a judge.

The aim of the paper was to present the effectiveness of the available analytical techniques in detection, identification and determination of chemical compounds in biological material recognised as clas-

sic, i.e. blood samples collected during autopsy of individuals whose death was connected to various circumstances.

Analytical procedure depends upon the problem to be solved. If the circumstances of the crime are unknown, application of various analytical techniques is required in order to encompass a broad range of chemically different compounds. In the case of analyses targeted at a particular compound, two independent methods are used. When writing an expert report where only the symptoms of the action of an unknown agent are known, the ability to use complementary techniques is especially important as is knowledge in the field of medicine, pharmacology and pharmacokinetics.

Screening methods applying immunochemical reactions (IE) meant to detect a limited number of compounds or only groups of compounds, are not very specific, not very sensitive, but very fast. Other screening methods, so-called instrumental ones, i.e. high performance liquid chromatography – HPLC, gas chromatography – GC and thin layer chromatography – TLC with different means of detection, are more specific but less sensitive than confirmatory or targeted methods.

The number of compounds which should be covered by the screening analysis is constantly growing – from mineral or plant derived toxic compounds and other toxins known in ancient history to synthetic compounds, the first of which were produced at the turn of the 19th and 20th century. Currently out of 13 million chemical compounds registered in “Chemical Abstract Service”, about 100 thousand are significant from the toxicological point of view. It is impossible to cover such a number of compounds in one analytical process. Toxic compounds can be classified in various ways: e.g. alphabetically, taking into account pharmacological activity (tricyclic antidepressants, antiepileptic drugs) or chemical structure (benzodiazepines, barbiturates, phenothiazines). For the purposes of systematic toxicological analysis (STA) the best system seems to be division into groups according to the type of technique which is used to extract them from various biological matrices. This allows creation of 6 major groups (Figure 1):

- gases and volatile compounds which can be isolated by diffusion to the head space phase;
- non-volatile organic compounds isolated by the means of extraction, dependent on pH, with organic solvents (LLE) or screening solid phase extraction (SPE);

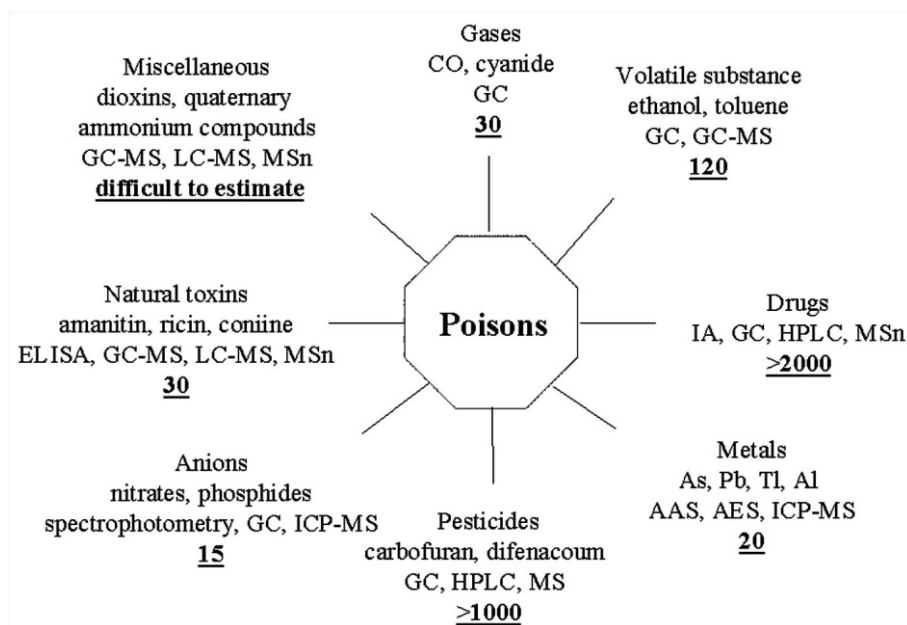


Fig. 1. Classification of poisons for analytical purposes with most commonly used methods for their determination and estimated numbers of toxicologically relevant compounds (underlined).

- metals and nonmetals which require application of various mineralisation techniques (wet, ash, microwave);
- toxic anions isolated by dialysis;
- pesticides, although many of them require a specific isolation procedure because a general procedure is not efficient;
- toxins and a numerous group of compounds, e.g. quaternary ammonium bases or dioxins, which demand application of specific isolation techniques such as ion-pairing, ion exchange resins, derivatisation, continuous extraction, sedimentation or concentration. Detection or exclusion of a broad spectrum of the compounds belonging to each of these groups in biological specimens requires more and more sensitive instrumental techniques.

Modern instrumental techniques, especially coupling of gas or liquid chromatography to mass spectrometry (GC-MS or LC-MS), with single (MS) and multi-stage fragmentation, so-called tandem (MS-MS), with various ionisation techniques (electron – EI, chemical – CI, electrospray – ESI, photoionisation – APPI) producing positive and negative ions as well as various ion monitoring modes (total ion current – TIC, selected ion monitoring – SIM, parent ion scanning – PIS, daughter ion scanning – DIS, selected reaction monitoring) allow – in one analytical process – separation of a mixture of compounds, identification of its particular components and their determination in con-

centration ranges of picogram in several dozen micro-litres or milligrams of the specimen. Methods which apply these techniques need initial multi-stage (hydrolysis, extraction, derivatisation) sample preparation, application of appropriate standard and reference materials and evaluation of validation parameters which ensure control of the whole analytical process. They are becoming very time consuming and expensive. Sophisticated constructional developments in mass analysers (quadrupole – Q, ion trap – IT, triple quadrupole – Q₃, time of flight – TOF, Fourier transformed ion cyclotron resonance – ICR-FT) enable a lowering of the limit of detection (*LOD*) to very low values. During analysis of the growing number of compounds at such low levels, various methodical pitfalls can be encountered.

Analysts apply various strategies in toxicological analyses. In clinical laboratories, a separate procedure is usually used for each compound. Forensic laboratories develop screening methods consisting of one procedure of initial sample preparation, but various final determination techniques (GC, HPLC and less frequently TLC).

Because of the growing number of analyses, screening methods which cover a broad spectrum of compounds and are open, i.e. allowing successive introduction of new analytes, are increasingly frequently being developed [5, 6, 11]. The most robust (universal) method up till now, capable of detecting and identifying over 2000 compounds (drugs and their metabolites

belonging to 20 pharmacological groups) in a single urine extract (pH 8–9) applying GC-MS-EI was developed by Maurer et al. [7]. Gergov et al. [3] used the LC-MS-MS (with Q₃) technique, which encompasses 238 compounds in blood in the screening analysis. The method which was developed by Mueller et al. [8] and used LC-Q-IT-MS-MS, enabled screening of 301 compounds in the serum. Alder et al. [2] developed and compared two methods – LC-MS-MS and GC-MS-EI – of identification of 500 most frequently used pesticides.

Screening methods do not only concern organic compounds. The atomic emission technique (optical emission spectrometry) with inductively coupled plasma (ICP-OES) or mass spectrometry with inductively coupled plasma (ICP-MS) enable analysis of about 70 elements in one analytical process, the exact number depending on the number of standards available to the analyst. In toxicological practice, cases of intoxication with a mixture of various drugs or poisonous agents are often recorded and these constitute a serious analytical problem, necessitating detection and quantification of several compounds of different chemical characteristics in the material, most frequently blood and (or) urine, which is available in small quantities. A major challenge is to proceed with the biological specimen when there is a lack of any information concerning crime (incident) circumstances. In cases of intoxication by several compounds, low concentrations of particular components of the mixture in bio-samples can be expected. The interpretation of the obtained results in respect of the severity of the intoxication then becomes very complicated. In this paper, the rules of conduct for toxicological analysts concerning various types of expert opinions have been characterised. Cases in which no outcomes of initial preparatory proceedings were known are described in the paper as well as those cases which were targeted at specific compounds. The authors have drawn attention to the significance of symptoms seen in intoxicated individuals which can narrow the range of toxicological investigations.

2. Types of cases

In the practice of the Institute of Forensic Research (IFR), Krakow, complex intoxications constitutes a significant part of the routine work of the toxicological analyst. Among this type of cases recorded in 2006, the most numerous group was cases sent to IFR with no information about the circumstances of the crime (incident). Another group included such cases where

targeting of the analysis was possible based on the data given in the file documentation. Frequently after exclusion of the suggested toxic substance, performing STA became necessary. Another group included cases in which the symptoms of the intoxication were described. In these cases, specification of the analysis targets by the analysts was usually accurate. A numerous group concerned cases of medical malpractice and the role of the toxicological expert was to confirm or exclude possible overdosing of drugs administered usually during surgical interventions. The most difficult to classify were cases submitted for analysis for pesticides, which in view of the 900 [12] various active components used currently in the production of different preparations all over the world, and the 1120 products containing pesticides permitted for sale in Poland [9] made targeting quite problematic.

3. General unknown analysis

When there is a lack of information concerning circumstances and facts surrounding an intoxication (crime circumstances, crime scene inspection, age of a victim, type of the toxin, time after exposure) biological specimens – mainly blood and (or) urine, less frequently tissue and inner organs, are subjected to systematic toxicological analysis STA. Firstly, the presence of volatile toxins (gases, ethanol, organic solvents, carbon monoxide, cyanides) and labile compounds (nitrites and nitrates) is excluded. Volatile compounds are detected mainly by gas chromatography with flame ionisation detection (GC-FID) and GC-MS-EI. Then screening methods are applied to look for synthetic or plant derived non-volatile organic compounds. In the initial stage, these are IE methods (currently, an enzyme-linked immunosorbent assay method – ELISA) allowing encompassing of certain groups of compounds in the analysis, mainly amphetamine derivatives, opium alkaloids, cocaine, tetrahydrocannabinols, benzodiazepines and less frequently tricyclic antidepressants. Simultaneously, instrumental methods like HPLC (with diode array detection – DAD), LC-MS (most usually with atmospheric pressure chemical ionisation – APCI) as well as GC-MS-EI covering a broader range of synthetic and plant derived organic compounds, are used. Screening methods utilising GC-MS-EI are applied after trimethylsilyl derivatisation. Negative results obtained during screening analysis necessitate performance of further analysis to search for inorganic poisons (anions, semimetals, corrosive compounds etc.) and (or) other organic poisons, which are not detected in the routine analytical proce-

dures, e.g. cardiac glycosides, muscle relaxants, hypoglycaemic drugs or LSD. The significance of the latter group is demonstrated by the fact that it is frequently the target of international competence tests in qualitative screening analysis (QSA). Lack of data about the circumstances of a crime makes analytical procedure longer and more complicated as well as generating higher costs of the expertise due to the necessity to carry out multi-direction investigations. Lack of information about the type of drugs administered during life-saving (emergency) interventions makes a toxicologist perform quantification of these compounds. The lack of defined initial targets of analysis can result in incorrect performance of the toxicological analysis. This happens in the case of volatile poisons (gases, phosphides) and quickly decomposing poisons (nitrates, pancuronium and other quaternary ammonium muscle relaxants), where the success of the analysis depends on short storage of the specimen, and, furthermore, under conditions of deep freezing.

Examples of non-targeted toxicological analyses carried out in IFR in 2006 are presented below. The results of these analyses are shown in Table I.

3.1. Case 1

From the information submitted together with the biological specimen it was known that an elderly male was admitted to hospital on suspicion of a drug overdose. After a brief period of hospitalisation the man died. In order to identify the drugs which might have caused the death, blood and gastric contents samples were collected *post-mortem*. Because the only information which could limit the scope of the toxicological analysis was the suspicion of a drug overdose, screening analysis was performed by means of HPLC-DAD. Two separate blood extractions were carried out with ethyl ether from acidic solution (pH 3) for acidic drugs and with ethyl acetate from basic solution (pH 9) for basic drugs. As a result of this analysis, diltiazem, amiodarone, paracetamol, furosemide and ketoprofen were detected in blood. Quantification of the detected compounds was performed by means of HPLC-DAD and LC-MS-APCI. During LC-MS-APCI analysis, midazolam was detected in blood. All the identified drugs were found in the gastric contents. We suspected that midazolam and furosemide might have been administered to the patient in the hospital during life-saving procedures.

3.2. Competence test in qualitative screening analysis (QSA 3/06)

An unconscious female was found in a restaurant restroom. Traces of vomiting were discovered at the scene. Earlier the woman accompanied by an unknown male had been seen by the restaurant's customers. Witnesses also reported that the woman had looked drowsy, and many of them described her behaviour as "strange". The woman was admitted to hospital, where she was found to have low blood pressure. She regained full consciousness after 3 days. The patient did not remember the course of events but suspected that her male companion might have added something to her wine. A serum sample collected after admission to the hospital together with a question about the cause of the symptoms were submitted for analysis. On admission to hospital, ethanol was determined in the blood at a concentration of 0.55 g/kg. In connection with the above, routine screening analysis was performed taking into account antihypertensive (blood pressure lowering) agents. Firstly, tests for drugs of abuse (narcotic drugs and psychotropic substances) by ELISA were performed and then analyses for the presence of various medicinal drugs by means of HPLC-DAD and GC-MS-EI were carried out. As a result, no foreign substances were detected in the serum. Only further screening analysis for date-rape and sexual assault drugs carried out by LC-MS-APCI [1] revealed clonidine – a blood pressure lowering drug, in the serum. This medicine is abused as a so called date-rape drug. The obtained results of toxicological analysis correlated with the symptoms observed in the victim.

4. Target analyses

4.1. General comments

Covering letters and requests for analysis by police and public prosecutors submitted with the specimens are characterised by scant information. Information most frequently included is: suspicion of intoxication with narcotic drugs and psychotropic substances (however, it is not known whether this term has been used in the colloquial or scientific sense), medicinal drugs or pesticides. Names of the medicine packages (full or empty) which were found near the victim are rarely listed in the delivered documentation. Every piece of information about possible preparation(s) which might have been taken by the victim obliges the analyst to perform analysis for this preparation's active component first. Despite frequent errors in writing

of the preparation names, professional knowledge enables their identification. Not uncommonly after exclusion of given compounds, STA is started. Targeted analyses in multi-drugs intoxication cases are carried out by HPLC-DAD, LC-MS-APCI or LC-MS-MS-ESI, which are characterised by lower *LOD* and *LOQ* than screening methods. They provide two elements

for identification, e.g. retention time and mass or UV spectrum in one analytical process. Below are described cases in which – based on the available information – targeted analysis could be performed. The results of these analyses have been summarised in Table I.

TABLE I. CONCENTRATIONS OF DRUGS DETECTED IN DESCRIBED CASES AND RANGES OF THERAPEUTIC, TOXIC AND LETHAL CONCENTRATIONS [10, 13, 14]

| Detected drug | Unit | Determined concentration in blood | Ranges of concentration | | | pKa |
|-------------------|-------|-----------------------------------|-------------------------|-------------|---------|-----------|
| | | | Therapeutic | Toxic | Lethal | |
| Case 1 | | | | | | |
| Diltiazem | g/ml | 3.4 | 0.030–0.250 | 0.8–1 | 2–8 | 7.7 |
| Amiodarone | g/ml | 5.7 | 0.5–2.5 | > 2.5 | – | 6.6 |
| Paracetamol | g/ml | 9.0 | 5–25 | 100–150 | 200–300 | 9,5 |
| Furosemide | g/ml | 1.5 | 1–6 | 25–30 | – | 3.8 |
| Ketoprofen | g/ml | 1.2 | 1–6 | – | 1100 | 4.0 |
| Midazolam | g/ml | 72 | 0.040–0.250 | 1–1.5 | – | 6.2 |
| Test QSA 3/06 | | | | | | |
| Clonidine | ng/ml | 43 | 1–4 | 25–50 | 230 | 8.3 |
| Ethyl alcohol | g/kg | 0.55 | | | | |
| Case 2 | | | | | | |
| Propafenone | g/ml | 10.4 | 0.060–1 | 2–3 | > 7.7 | nd |
| Cilazapril | g/ml | 28 | 3–90 | – | – | nd |
| Salicylic acid | g/ml | 3.3 | 20–200 | 300–350 | > 400 | 3.0 |
| Thiopental | g/ml | 2.4 | 1–5 | > 7 | 10–15 | 7.6 |
| Digoxine | ng/ml | + | 0.5–0.8 | 2.5–3 | 5 | nd |
| Case 3 | | | | | | |
| Mianserin | g/ml | 0.209 | 0.010–0.150 | 0.5–5 | 0,1–2,6 | 7.1 |
| Doxepin | g/ml | 0.342 | 0.010–0.100 | 0.5–1 | 2–4 | 8.0 |
| Bromazepam | g/ml | 0.115 | 0.050–0.200 | 0.300–0.400 | 1–2 | 2.9; 11.0 |
| Verapamil | g/ml | 4.5 | 0.010–0.250 | > 1 | 2.5 | 8.9 |
| Case 4 | | | | | | |
| Valproic acid | g/ml | 31 | 40–150 | 150–200 | 720 | 4.8 |
| 7-aminoclonazepam | – | + | – | – | – | nd |
| Ethyl alcohol | ‰ | 3.6 | – | – | – | – |

“+” – compound present, concentration not determined; “–” – compound not present; “nd” – no data.

TABLE I. CONCENTRATIONS OF DRUGS DETECTED IN DESCRIBED CASES AND RANGES OF THERAPEUTIC, TOXIC AND LETHAL CONCENTRATIONS [10, 13, 14] (cont.)

| Detected drug | Unit | Determined concentration in blood | Ranges of concentration | | | pKa |
|---------------|-------|-----------------------------------|-------------------------|-----------|---------|-----------|
| | | | Therapeutic | Toxic | Lethal | |
| Case 5 | | | | | | |
| Nordazepam | g/ml | 0.096 | 0.020–0.800 | 1.5–2 | – | 3.5; 12.0 |
| Mianserin | g/ml | 0.074 | 0.010–0.150 | 0.5–5 | 0.1–2.6 | 7.1 |
| Perazine | g/ml | 28 | 20–350 | > 500 | – | 8,0 |
| Fluoxetine | g/ml | Traces | 0.16–0.5 | 1 | 6 | 9,5 |
| Case 6 | | | | | | |
| Zolpidem | g/ml | 0.207 | 0.080–0.200 | 0.500 | 2–4 | 6.2 |
| Hydroxyzine | g/ml | 0.149 | 0.050–0.100 | 100 | 39 | 2.1; 7.1 |
| Case 7 | | | | | | |
| Nordazepam | ng/ml | 646 | 20–800 | 1500–2000 | – | 8.0 |
| Perazine | ng/ml | 841 | 20–350 | > 500 | – | nd |
| Flupentixol | ng/ml | 94 | 0.5–2 | – | – | nd |
| Pridinol | ng/ml | 326 | nd | nd | nd | nd |

“+” – compound present, concentration not determined; “–” – compound not present; “nd” – no data.

4.2. Case 2

The case concerned suspicion of mental cruelty to a girl, which resulted in her suicide. Blood and urine samples collected at the autopsy were sent for toxicological investigation. From the available documentation, it was known that medicinal preparations named: Polfenon, Bemecor, Effox, Nitrendypina, Inhibace, Amizepin, Prestarium and Cardiopirin were found secured in the girl's room. Targeted analyses to detect active components of these medicines, that is: propafenone, cilazapril, nitrendipine, methylodigoxin, carbamazepine, perindopril and salicylic acid were conducted. Analysis for isosorbide mononitrate (the active component of a preparation named Effox) was discontinued because it could not be detected by means of the applied techniques – HPLC-DAD and LC-MS-APCI. Due to the small amount of blood sample (1.5 ml) and the need to determine 7 compounds, simultaneous analyses for several drugs were carried out. As a result of LC-MS-APCI analysis, propafenone and cilazapril were found in blood, salicylic acid and thiopental were confirmed by HPLC-DAD and digoxin by fluorescence polarisation immunoassay (FPIA). The concentration of the latter compound was not determined for several reasons, namely: the FPIA

method is calibrated for digoxin and not methylodigoxin; moreover, an insufficient amount of specimen did not allow the determination to be repeated, which was necessary because of the severe decomposition of the blood. In the blood, 4 medicines which were found at the scene of death were confirmed, and the concentration of propafenone was very high and lay in the range of concentrations found in lethal intoxication cases of this drug. Due to these results of blood analyses, urine examination was performed in a limited range, confirming only the presence of salicylic acid and propafenone. Out of the medicines mentioned in the case documentation, thiopental was found in the blood at a therapeutic concentration. The presence of this drug in the unchanged parent form without traces of its metabolite – pentobarbital, may attest to a single recent administration of this drug. Its detection may have been the result of a life – saving procedure at the scene of the incident when the woman was still alive, and her condition was very serious. Thiopental is often administered in severe conditions in order to put a patient into a so-called pharmacological coma. Then, a decrease in cerebral blood flow, oxygen demand of the brain tissue as well as intracranial pressure take place.

4.3. Case 3

A female aged 24 died in hospital where she had been admitted because of suspicion of a drug overdosing. Just before death the woman confessed to having taken about 80 tablets of various medicines named: Mianserin, Lexotan, Doxepin and Ketonal. As a result of LC-MS-APCI analysis targeted at mianserin, bromazepam, doxepin, ketoprofen in blood, the presence of three active compounds – mianserin, doxepin and bromazepam in blood was confirmed. Moreover during screening analysis carried out by HPLC-DAD, verapamil, which was not mentioned, was detected in blood.

4.4. Case 4

After the sudden death of a female, blood, urine and tissues of inner organs were sent to IFR to confirm or exclude the presence of compounds proving drug overdose. The request for the analysis was justified due to the information that the woman had been taking drugs named: Clonazepamum and Depakine.

Head space blood analysis performed to detect volatile solvents revealed ethanol. Its determined concentration was 3.6‰ in blood and 4.7‰ in urine. Toxicological analysis revealed valproic acid and 7-amino-clonazepam (without clonazepam) in blood and urine. These tests confirmed that the woman had been taking the mentioned medicines, but their subtherapeutic concentrations and the presence of the metabolite of clonazepam only, showed that they had been taken a long time before the moment of death. In this case, ethanol intoxication and alcohol – drugs interaction were the cause of death, which was stated by the forensic pathologist.

4.5. Case 5

The corpse of a female was found in the bathroom of her own flat. A blood sample was sent to IFR in order to determine the ethanol content and exclude or confirm use of drugs or other chemicals. In the course of the scene (flat) inspection, medicines, namely Pernazinum, Loratadyna, Lerivon and Bioxetin were found and secured. As a result of the analysis, nordazepam, mianserin, perazine and traces of fluoxetine were detected in blood, which confirmed that the woman had been taking drugs which have been found in her flat, except loratadine. The detected nordazepam was not among the drugs found at the crime scene. Its presence could have been the result of taking this drug itself or the metabolic product of diazepam. All found concen-

trations of the medicines lay in the therapeutic concentration ranges. The statement of the forensic pathologist concerning the cause of death has not been seen by the authors of this paper.

4.6. Case 6

The case concerned the sudden death of a male as a result of hypothermia. The corpse of the man was found in a forest. Autopsy material was submitted in order to check if “there are sedative and narcotic agents in it” and to answer the question as to whether “the detected drugs could have caused death some time after their consumption or disturbed consciousness (e.g. induced a sudden sleep), which, subsequently, together with a low temperature caused death due to hypothermia”. During the inspection of the scene of the crime, empty packages of medicine: Nitrazepam, Estazolam, Stilnox, Doxepin and empty bottle of Hydroxyzinum were found. LC-MS-APCI analysis revealed zolpidem and hydroxyzine in blood at levels slightly exceeding the therapeutic range. In this case, death caused by drug intoxication was excluded. The medicines might have contributed to causing the man to fall asleep in the forest at a low temperature, and consequently caused his death due to hypothermia.

4.7. Case 7

The direct cause of death of a female was drowning. Toxicological analyses of blood were supposed to clarify whether the woman at the moment of drowning was under the influence of drugs. It was established that the woman had taken Cloranxen, Pridinol, Pernazinum and Fluaxol. The public prosecutor's office requested IFR to perform analysis and issue a written opinion concerning the presence of ethyl alcohol and psychotropic drugs in blood as well as to answer whether concentrations of detected drugs were within therapeutic or lethal ranges. Performing LC-MS-APCI confirmed ingestion of the drugs mentioned in the analysis request. Nordiazepam was detected, whose presence may have been due to the metabolism of dipotassium clorazepate, other benzodiazepines or ingestion of a medical preparation containing the active component itself. Moreover, perazine and flupentixol were detected in the blood, both at toxic concentrations. Reference values for therapeutic, toxic and lethal concentrations for pridinol, which was detected in the body, were not obtained.

5. Results

The results are presented in Table I.

6. Discussion of the results

Problems that toxicologists face in routine work have various sources. If there is a lack of information about the circumstances of the crime it is always possible to contact persons in charge of the initial preparatory proceedings. However, obtaining individual pieces of information, taken out of the context of the whole case, relating to toxic agents mentioned in initial findings can become the cause of false conclusions (pitfalls) in expert reports due to the application of very sensitive analytical methods. An example is detection of zolpidem in the unchanged form, which has a very short biological half-life time (1.4–4.5 h), several days after its possible administration. This case was evaluated in IFR based on the case records. As a consequence, of this result of toxicological analysis, the case lasted several years.

In many cases toxicological analysis can not be limited to the information given by patients about ingested medicines and to drugs whose traces and (or) empty packages were found at the scene of the incident. In four out of seven cases described in this article, at least one drug not mentioned in analysis request documents was identified. In case 1, it was midazolam at a very low concentration, in case 2 – thiopental. In case 3 – the medicines mentioned by the woman, on which she was supposed to have overdosed did not explain the death, and the verapamil detected during the analysis was the basis for the forensic pathologist to draw conclusions that the death was caused by drug intoxication. In case 5 loratadine which was found in the flat, was not determined in the blood collected *post-mortem*.

Initial sample preparation is of great importance for toxicological analysis. The LLE method, dependent on pH, and with preparation of two extracts, was used for screening analysis. Due to the variable acidity index values (pKa) (Table I), not all acidic and basic compounds were extracted with the highest efficiency at pH 3 and 9, respectively. For the screening methods, the most important factor is extraction repeatability for a broad range of compounds. Maurer [7] in his developed screening procedure applied extraction at one pH value (pH 8–9). One should bear in mind that when utilising LLE and SPE screening methods, many of the very toxic compounds e.g. cardiac glycosides, baclofen or nitrates will not be identified. A complex bio-

logical matrix necessitates the monitoring of at least two ions – pseudomolecular and parent when applying LC-MS analysis to identification of a xenobiotic. Fragmentation of components of the matrix can lead to the creation of a random ion of a mass corresponding to a certain xenobiotic. LC-MS-MS method provides more reliable results.

Development of a method for identification of xenobiotics found in biological specimens in low concentrations [1], e.g. crime facilitating drugs, allowed the detection of clonidine in serum which was the subject of a qualitative screening analysis proficiency test (QSA 3/06). Routinely used HPLC-DAD and GC-MS-EI (after trimethylsilyl derivatisation of the extract) were not sensitive enough. Determination of a parent compound together with its metabolite makes the analysis more reliable and allows broader interpretation of the result. From the presence of only the parent compound in the biological specimen, inferences can be made concerning recent administration (case 2), temporary withdrawal of pharmacological therapy and ingestion of a single dose, which can lead to an increase in drug toxicity.

The identity of a drug that has been taken cannot always be unambiguously established. In the described cases (5 and 7), such a situation occurred in the case of nordazepam, which is a medicinal drug itself and also the product of the metabolism of many benzodiazepines e.g. diazepam and clorazepate.

The amount of the material which is delivered for analysis is also crucial. 1.5 ml of autopsy blood (case 2) is not only an insufficient volume to perform a multi-target investigation, but also may not be representative of the whole pool of blood, especially since the collection site is not known.

The toxicity of xenobiotics depends on inner and external factors of the organism, but individual sensitivity also plays a big role. The analyst usually refers determined concentrations to therapeutic levels of the drugs, normal, physiological or endogenous concentrations of other compounds, and to toxic and fatal levels. Due to the various ways of introducing the xenobiotic into the body, the possibility of the occurrence of addiction, tolerance, temporal abstinence and toxicological interactions, this comparison is not always correct. *Post-mortem* material differs very much compared to that collected from living individuals. Autopsy blood is a non-homogeneous mixture of red blood cells that have been hemolysed to varying extents, proteins and ions. The concentration which is determined in the autopsy blood does not completely reflect the concentration at the time of death. Referring such a concentration to the therapeutic range is some-

thing of an estimation. In the presented cases, in blood samples collected from three individuals, concentrations of all detected drugs were within the therapeutic range, two dead individuals had at least one drug in the toxic range, and another three had at least one drug in concentration ranges which are found in fatal single compound intoxication cases

A high concentration of drug is not always the result of an overdose. It can be due to its *post-mortem* redistribution or administration of a therapeutic dose just before death. The need for verification of the latter suggestion was pointed out in the elaborated expert opinions connected to case no 1 and 2.

7. Summary

When dealing with cases where there is a lack of knowledge concerning the circumstances and facts (surrounding the case), the toxicological analyst needs to carry out a multi-target investigation. In cases which have defined targets, after exclusion of suggested xenobiotics, STA is often needed. The symptoms of the intoxicated person can narrow the scope of toxicological analysis. The applied screening methods (HPLC-DAD, GC-MS-EI and LC-MS) are efficient enough to detect drugs of different chemical characteristics in therapeutic and subtherapeutic levels. A broader interpretation of the results of the toxicological analysis is possible provided the circumstances of the incident (crime) are known.

References

- Adamowicz P., Kała M., Application of liquid chromatography-mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization as a screening method for forty-two date-rape drugs, [in:] Proceedings of ICADTS and TIAFT Meeting, Seattle, 26–30.08.2007, available online at <http://www.icadts2007.org/print/177applicationliquid%20.pdf>.
- Alder L., Greulich K., Kempe G. [et al.], Residue analysis of 500 high priority pesticides: better by GC-MS or LC-MS/MS?, *Mass Spectrometry Reviews* 2006, 25, 838–865.
- Gregov M., Ojanperä I., Vuori E., Simultaneous screening for 238 drugs in blood by liquid chromatography-ion spray tandem mass spectrometry with multiple-reaction monitoring, *Journal of Chromatography B. Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2003, 795, 41–53.
- Kała M., Analiza toksykologiczna środków uzależniających, Wydawnictwo Instytutu Ekspertyz Sądowych, Kraków 2001.
- Kała M., Clonidine – new criminal tool, *Problems of Forensic Sciences* 1995, 31, 82–87.
- Lechowicz W., Kała M., Walker J., Screening and quantification of twenty-four drugs in oral fluid relevant for road traffic safety by means of LC-MS-MS/ESI, proceedings of ICADTS and TIAFT Meeting, Seattle, 26-30.2007, available online at <http://www.icadts2007.org/print/169screen24drugs.pdf>.
- Maurer H. H., Hyphenated mass spectrometric techniques – indispensable tools in clinical and forensic toxicology and in doping control, *Journal of Mass Spectrometry* 2006, 41, 1399–1413.
- Mueller C. A., Weinmann W., Dresen S. [et al.], Development of a multi-target screening analysis for 301 drugs using a QTrap liquid chromatography/tandem mass spectrometry system and automated library searching, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2005, 19, 1332–1338.
- Obwieszczenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 3 czerwca 2003 r. w sprawie wykazu środków ochrony roślin dopuszczonych do obrotu i stosowania, *Monitor Polski* 2003, nr 38, poz. 562.
- Schulz M., Schmoldt A., Therapeutic and toxic blood concentrations of more than 800 drugs and other xenobiotics, *Pharmazie* 2003, 58, 447–467.
- Skulska A., Kała M., Parczewski A., Fentanyl and its analogues in toxicological expertise, *Problems of Forensic Sciences* 2005, 63, 227–234.
- Tomlin C. D. S., The pesticide manual, British Crop Protection Council, 2006.
- Winek C. L., Wahba W. W., Winek C. L. Jr [et al.], Drug and chemical blood-level data 2001, *Forensic Science International* 2001, 122, 107–123.
- www.tiaft.org – Reference blood level list of therapeutic and toxic substances.

Corresponding author:

Piotr Adamowicz
Instytut Ekspertyz Sądowych
ul. Westerplatte 9
31-033 Kraków
e-mail: padamowicz@ies.krakow.pl

ZATRUCIA ZŁOŻONE. TRUDNOŚCI ANALITYCZNE I INTERPRETACYJNE

1. Wstęp

Analiza chemiczna jest kamieniem węgielnym toksykologii sądowej i klinicznej. W toksykologii klinicznej wynik analizy najczęściej służy do celów diagnostycznych, ale w przypadkach hospitalizacji poszkodowanych, ofiar i napastników różnych działań przestępczych, wynik analizy powinien posiadać wartość dowodową. Wówczas toksykologia kliniczna staje się sądową. Z analitycznego punktu widzenia wartość dowodowa wyniku analizy toksykologicznej zależy od metody zastosowanej do oznaczeń oraz rodzaju materiału pobranego do badań. Analityk posługuje się metodami przesiewowymi, uzyskując wyniki wstępne, czyli niejednoznaczne (ujemne i dodatnie), z których dodatkowo weryfikuje metodami potwierdzającymi. Wybór odpowiedniego materiału do badań zależy od uwarunkowań prawnych i naukowych, które są ze sobą ściśle powiązane. Wybór ten determinuje w głównej mierze czas, jaki upłynął od przyjęcia środka do pobrania materiału oraz miejsce przeprowadzenia badania (laboratorium kliniczne, sądowe i miejsce zdarzenia). W różnych materiałach występują różne związki – macierzyste i metabolity aktywne, które wpływają na procesy życiowe – oraz metabolity nieaktywne, których obecność może świadczyć o odległym w czasie przyjęciu środka.

Końcowym etapem pracy jest interpretacja wyników w kontekście historii przypadku oraz pozostałego materiału dowodowego. Interpretacja ta dla potrzeb orzecznictwa sądowego jest coraz szersza. Oprócz potwierdzenia lub wykluczenia przyjęcia ksenobiotyku, aktualnie częstymi problemami do rozwiązania są: oszacowanie dawki i ustalenie drogi (czynne przyjęcie, bierne narażenie) wprowadzenia środka (THC, amfetaminy, kokaina) do organizmu, określenie czasu ostatniego przyjęcia, wykluczenie przyjęcia po wypadku, ustalenie źródła pochodzenia (z leczenia, z diety, w celu wprowadzenia się w stan odurzenia) wykazanego w organizmie środka, przeprowadzenie rachunku retrospektywnego oraz wypowiedzenie się o celowości dokonania ekshumacji, aby ustalić obecność ksenobiotyków (fenotiazyny, amfetaminy, LSD, THC).

Biegły toksykolog analityk interpretuje wynik analizy w ramach swoich kompetencji. Nie wypowiada się o odpowiedzialności karnej (rodzaju kary, czynu, oskarżenia, zakazu) ani o określonym zachowaniu konkretnej osoby, nie wydaje też opinii o przyczynie zgonu. Rozstrzygnięcie tych problemów leży w kompetencji odpowiednio organu orzekającego i lekarza, a merytoryczna ocena słu-

ności wniosków w przypadku sprzecznych stanowisk dwóch biegłych należy wyłącznie do sądu.

Celem pracy było przedstawienie skuteczności aktualnie dostępnych technik analitycznych do wykrywania, identyfikacji i oznaczania związków chemicznych w materiale biologicznym uznawanym za klasyczny, tj. próbach krwi pobranych w czasie sekcji zwłok osób, których zgon związany był z różnymi sytuacjami.

Postępowanie analityczne jest uzależnione od rodzaju postawionego problemu. Nieznane okoliczności zdarzenia wymagają zastosowania różnych technik analitycznych w celu objęcia analizą szerokiej gamy związków o różnym charakterze chemicznym. W sprawach ukierunkowanych na konkretny związek stosuje się dwie niezależne metody. Przy opracowaniu ekspertyzy, w której znane są tylko objawy działania nieznanego czynnika toksycznego, szczególnej wagi nabiera nie tylko umiejętność posługiwania się technikami komplementarnymi, ale wiedza z zakresu medycyny, farmakologii i farmakokinetyki.

Metody przesiewowe wykorzystujące reakcje immunochemiczne (IE) są przeznaczone do wykrywania ograniczonej liczby związków lub tylko grup związków, są mało specyficzne, mało czułe, ale bardzo szybkie. Inne metody przesiewowe, tzw. instrumentalne, czyli wysokosprawna chromatografia cieczowa – HPLC, chromatografia gazowa – GC i chromatografia cienkowarstwowa – TLC z różnymi rodzajami detekcji są bardziej specyficzne, ale mniej czułe niż metody potwierdzające lub ukierunkowane.

Liczba związków koniecznych do objęcia analizą przesiewową stale wzrasta. Od znanych od zarania dziejów toksycznych związków mineralnych lub pochodzenia roślinnego i innych toksyn do związków syntetycznych, z których pierwsze zostały wyprodukowane na przełomie XIX i XX wieku. Obecnie wobec 13 mln związków chemicznych zarejestrowanych w „Chemical Abstract Service” około 100 tysięcy z nich jest istotna z toksykologicznego punktu widzenia. Nie jest możliwe objęcie jednym procesem analitycznym takiej liczby związków. Związki toksyczne można sklasyfikować na różne sposoby, np. alfabetycznie, pod względem działania farmakologicznego (trójpierścieniowe leki przeciwdepresyjne, przeciwdrgawkowe) lub budowy chemicznej (benzodiazepiny, barbiturany, fenotiazyny). Do celów systematycznej analizy toksykologicznej (STA) najlepszy wydaje się podział związków na grupy ze względu na rodzaj techniki, za pomocą której można je wyosobnić z różnych matryc biologicznych. Umożliwia to utworzenie 6 zasadniczych grup (rycina 1):

- gazy i lotne związki, które można wyosobnić za pomocą dyfuzji do fazy nadpowierzchniowej;
- trudno lotne związki organiczne, dla których najkorzystniejsze jest zastosowanie zależnej od pH ekstrakcji rozpuszczalnikami organicznymi (LLE) lub przesiewowej techniki ekstrakcji do fazy stałej (SPE);
- metale i niemetale, które wymagają zastosowania różnych technik mineralizacji (na mokro, przez spiekanie, wspomaganą mikrofalami);
- toksyczne aniony izolowane przez dializę;
- pestycydy, pomimo że wiele z nich wymaga zastosowania określonej procedury wyosabniania, bo postępowanie ogólne nie jest skuteczne;
- toksyny i liczna grupa związków, np. czwartorzędowe zasady amonowe lub dioksyny, które wymagają zastosowania specjalnych technik wyosabniania, jak technika par jonowych, żywic jonowymiennych, tworzenia pochodnych, ekstrakcji ciągłej, strącania i zagęszczania. Wykrycie lub wykluczenie obecności szerokiego spektrum związków z każdej z tych grup w materiale biologicznym wymaga zastosowania coraz czulszych technik instrumentalnych.

Nowoczesne techniki instrumentalne, zwłaszcza sprzężenia chromatografii gazowej lub cieczonej ze spektrometrią mas (GC-MS lub LC-MS) z fragmentacją pojedynczą (MS) i posobną, tzw. tandemową (MS-MS), z różnymi rodzajami jonizacji (elektronową – EI, chemiczną – CI, przez elektrorozpylanie – ESI, fotojonizację – APPI) prowadzącymi do powstawania jonów dodatnich i ujemnych oraz różnymi trybami monitorowania tych jonów (całkowity prąd jonowy – TIC, wybrane jony – SIM, macierzyste – PIS, jony potomne – DIS, wybrane reakcje – SRM), pozwalają w jednym procesie analitycznym rozdzielić mieszaninę związków, zidentyfikować poszczególne jej składniki oraz oznaczyć je w stężeniach rzędu pikogramów w kilkudziesięciu mikrolitrach lub miligramach materiału. Metody wykorzystujące te techniki wymagają wstępnego, wieloetapowego (hydroliza, ekstrakcja, derywatywacja) przygotowania biopróbki, zastosowania odpowiednich materiałów wzorcowych i referencyjnych oraz wyznaczenia parametrów walidacyjnych, które zapewniają kontrolę całego procesu analitycznego. Stają się one bardzo czasochłonne i kosztowne. Ulepszone rozwiązania konstrukcyjne analizatorów mas (kwadrupola – Q, pułapki jonowej – IT, potrójnego kwadrupola – Q₃, czasu przelotu – TOF, rezonansu cyklotronowego z transformacją Fouriera – ICR-FT), umożliwiają obniżenie granic wykrywalności (*LOD*) do bardzo niskich wartości. Przy analizie coraz większej liczby środków w tak niskich stężeniach można napotkać na różne pułapki metodyczne.

Analitycy używają różnych strategii przy analizie toksykologicznej. W laboratoriach klinicznych najczęściej stosuje się oddzielną procedurę dla każdego związku. W laboratoriach sądowych opracowuje się metody prze-

siewowe składające się z jednej procedury wstępnego przygotowania próbki, ale różnych technik końcowego oznaczenia (GC, HPLC i coraz rzadziej TLC). Ze względu na wzrastającą liczbę analiz, coraz częściej opracowuje się metody przesiewowe obejmujące szerokie spektrum związków, metody, które są otwarte, czyli pozwalają na sukcesywne włączanie nowych analitów [5, 6, 11]. Najbardziej dotychczas uniwersalną metodą wykrywania i identyfikacji ponad 2000 związków (leków i ich metabolitów z 20 grup farmakologicznych) w jednym ekstrakcie (pH 8–9) z moczu opracował Maurer i in. [7], wykorzystując technikę GC-MS-EI. Gergov i in. [3] zastosowali metodę LC-MS-MS (z Q₃), obejmując analizą przesiewową 238 związków we krwi, a metoda opracowana przez Muellera i in. [8] z zastosowaniem techniki LC-Q-IT-MS-MS pozwalała na objęcie analizą przesiewową 301 związków w surowicy. Alder i in. [2] opracowali i porównali dwie metody – LC-MS-MS i GC-MS-EI – identyfikacji 500 najczęściej stosowanych pestycydów.

Metody przesiewowe nie dotyczą tylko związków organicznych. Technika atomowej spektrometrii emisyjnej z plazmą sprzężoną indukcyjnie (ICP-OES) lub spektrometria mas z jonizacją plazmą wzbudzoną indukcyjnie (ICP-MS) umożliwia w jednym procesie analitycznym objęcie analizą około 70 pierwiastków, a ich konkretna liczba jest uzależniona od liczby wzorców, którymi dysponuje analityk.

W praktyce toksykologicznej często notuje się przypadki zatrucia mieszaniną różnego rodzaju leków lub środków toksycznych, co stanowi poważny problem analityczny. Wynika on przede wszystkim z konieczności wykrycia i oznaczenia kilku związków o różnym charakterze chemicznym, w materiale, najczęściej krwi i (lub) moczu, dostępnym w niewielkich ilościach. Dużym wyzwaniem jest postępowanie z materiałem biologicznym przy braku jakichkolwiek informacji dotyczących okoliczności zdarzenia. Przy zatruciach kilkoma związkami można spodziewać się wystąpienia niskich stężeń poszczególnych składników mieszaniny w biopróbkach. Interpretacja uzyskanych wyników w odniesieniu do ciężkości zatrucia staje się wówczas bardzo skomplikowana.

W pracy scharakteryzowano postępowanie toksykologa analityka, biorąc pod uwagę różne rodzaje ekspertyz. Opisano przypadki, w których nie znano ustaleń z postępowania przygotowawczego oraz znacznie łatwiejsze, ukierunkowane na konkretne związki. Zwrócono uwagę na znaczenie objawów występujących u zatrutego, które mogą zawęzić obszar poszukiwań toksykologicznych.

2. Rodzaje spraw

W praktyce Instytutu Ekspertyz Sądowych w Krakowie (IES) zatrucia złożone stanowią istotną część ru-

tynowej pracy toksykologa analityka. Wśród tego rodzaju spraw zarejestrowanych w 2006 roku najliczniejszą grupę stanowiły przypadki nadesłane bez żadnych informacji o okolicznościach zdarzenia. Do drugiej grupy zaliczono takie, w których możliwe było ukierunkowanie badań na podstawie danych zawartych w dokumentacji. Niejednokrotnie po wykluczeniu obecności zasugerowanego środka toksycznego konieczne było przystąpienie do STA. Następną grupę tworzyły sprawy, w których opisano objawy zatrucia. W tych przypadkach ukierunkowanie badań przez analityka było z reguły trafne. Liczną grupę stanowiły sprawy dotyczące błędów w sztuce lekarskiej, a zadaniem biegłego toksykologa było potwierdzenie lub wykluczenie możliwości przedawkowania leków podawanych najczęściej przy zabiegach operacyjnych. Najtrudniejsze do zaszeregowania były przypadki nadesłane do badań na obecność pestycydów, co wobec około 900 [12] różnych składników czynnych obecnie stosowanych do produkcji preparatów ochrony roślin na świecie, a 1120 preparatów ochrony roślin dopuszczonych do obrotu w Polsce [9], ukierunkowanie czyniło dosyć problematycznym.

3. Analizy nieukierunkowane

3.1. Uwagi ogólne

Przy nieznanymi ustaleniami faktycznymi w sprawie (okoliczności zdarzenia, oględziny miejsca zdarzenia, wiek ofiary, rodzaj trucizny, czas, jaki upłynął od narażenia) materiał biologiczny – głównie krew i (lub) mocz, coraz rzadziej wycinki – poddawany jest STA. W pierwszej kolejności wyklucza się obecność trucizn lotnych (gazów, etanolu, rozpuszczalników organicznych, tlenku węgla, cyjanków) i związków szybko rozkładających się (azotynów i azotanów). Trucizny lotne są wykrywane i oznaczane głównie metodą chromatografii gazowej z detekcją płomieniowo-jonizacyjną (GC-FID) oraz metodą GC-MS-EI. Następnie stosuje metody przesiewowe dla trudno lotnych związków organicznych pochodzenia roślinnego i syntetycznego. We wstępnym etapie są to metody IE (obecnie metoda immunosorbcyjna ELISA) pozwalające na objęcie analizą związków z określonych grup, głównie pochodnych amfetaminy, alkaloidów opium, kokainy, tetrahydrokannabinoli, benzodiazepin, rzadziej trójpierścieniowych leków przeciwdepresyjnych. Równolegle wykorzystuje się metody instrumentalne – HPLC (z detekcją diodową – DAD), LC-MS (najczęściej z jonizacją chemiczną pod ciśnieniem atmosferycznym – APCI) oraz GC-MS-EI, obejmujące szersze spektrum trucizn organicznych pochodzenia roślinnego i syntetycznego. Badania przesiewowe metodą GC-MS-EI prowadzi się po przeprowadzeniu analiz w trimetylosilylowe pochodne.

Ujemne wyniki tych badań powodują konieczność przeprowadzenia dalszych analiz na obecność trucizn nieorganicznych (aniony, metale, półmetale, związki żrące, itp.) i (lub) innych trucizn organicznych, które nie są wykrywane w toku rutynowego postępowania analitycznego, np. glikozydów nasercowych, środków zwiotczających mięśnie, leków hipoglikemicznych czy też LSD. O istotności tej ostatniej grupy związków świadczy fakt, że często stanowi ona przedmiot międzynarodowych testów kompetencji z zakresu jakościowej analizy przesiewowej (QSA).

Brak danych o okolicznościach zdarzenia komplikuje i wydłuża tok postępowania analitycznego oraz podwyższa koszty ekspertyzy ze względu na konieczność prowadzenia wielokierunkowych badań. Nieznajomość rodzaju leków podawanych pacjentom podczas zabiegów ratujących życie sprawia, że toksykolog wykonuje analizy ilościowe tych leków.

Brak ukierunkowania badań może również stać się przyczyną nieprawidłowego wykonania analizy toksykologicznej. Ma to miejsce w przypadku trucizn lotnych (gazy, fosforki) i szybko rozkładających się (azotany, pankuronium i inne środki zwiotczające mięśnie o budowie czwartorzędowych zasad amonowych), kiedy o powodzeniu analizy decyduje krótki okres przechowywania materiału i to w stanie głębokiego zamrożenia.

Poniżej przedstawiono przykłady nieukierunkowanych analiz toksykologicznych opracowanych w IES w 2006 roku. Wyniki tych analiz zestawiono w tabeli I.

3.2. Przypadek 1

Z informacji nadesłanych wraz z materiałem biologicznym wiadomo było, że mężczyzna w podeszłym wieku został przyjęty do szpitala z podejrzeniem zatrucia lekami. Po bardzo krótkiej hospitalizacji mężczyzna zmarł. Podczas sekcji zwłok pobrano próbę krwi i treść żołądkową w celu ustalenia obecności leków, które mogły być przyczyną zgonu.

W związku z tym, że jedyną informacją zawężającą zakres analizy toksykologicznej było podejrzenie zatrucia lekami, przeprowadzono badania przesiewowe metodą HPLC-DAD. Wykonano dwie oddzielne ekstrakcje krwi eterem etylowym ze środowiska kwaśnego (pH 3) w kierunku wykrycia leków o charakterze kwaśnym oraz octanem etylu ze środowiska alkalicznego (pH 9) dla leków o charakterze zasadowym. W wyniku tych analiz w nadesłanej krwi stwierdzono obecność diltiazemu, amiodaronu, paracetamolu, furosemidu oraz ketoprofenu. Analizy ilościowe wykrytych związków przeprowadzono, stosując metody HPLC-DAD oraz LC-MS-APCI. W trakcie oznaczeń metodą LC-MS-APCI wykryto we krwi obecność midazolamu. W treści żołądkowej wykazano wszystkie wyżej wymienione leki z wyjątkiem midazolamu. Podejrzewano, że midazolam i furosemid mo-

gły być podane choremu w szpitalu w czasie zabiegów ratowania życia.

3.3. Test kompetencji z zakresu jakościowej analizy przesiewowej (QSA 3/06)

Nieprzytomna kobieta została znaleziona w restauracyjnej toalecie. Na miejscu ujawniono ślady wymiocin. Wcześniej kobieta była widziana przez gości restauracji w towarzystwie nieznanego mężczyzny. Świadkowie podawali również, że kobieta wyglądała na senną, a wielu z nich określiło jej zachowanie jako dziwne. Kobieta trafiła do szpitala, gdzie stwierdzono u niej niskie ciśnienie. Pełną świadomość odzyskała po 3 dniach. Pacjentka nie pamiętała przebiegu zdarzeń, lecz podejrzewała, że towarzyszący jej mężczyzna mógł dodać jej coś do wina. Do badań nadesłano surowicę krwi pobraną po przyjęciu do szpitala wraz z zapytaniem o przyczynę objawów. Przy przyjęciu do szpitala oznaczono alkohol etylowy we krwi w stężeniu 0,55 g/kg.

W związku z powyższym przystąpiono do rutynowych badań przesiewowych ze szczególnym uwzględnieniem środków obniżających ciśnienie krwi. W pierwszej kolejności wykonano analizy w kierunku obecności środków odurzających i substancji psychotropowych metodą ELISA, a następnie na obecność różnego rodzaju leków metodami HPLC-DAD i GC-MS-EI. W wyniku tych badań w surowicy nie stwierdzono żadnych obcych substancji. Dopiero badania skryningowe na obecność środków stosowanych w celu wykorzystania seksualnego, wykonane metodą LC-MS-APCI [1], wykazały w surowicy obecność klonidyny, leku obniżającego ciśnienie tętnicze krwi. Lek ten bywa nadużywany jako tzw. date-rape drug, czyli środek ułatwiający wykorzystanie seksualne. Uzyskane wyniki badań toksykologicznych korelowały z zaobserwowanymi u ofiary objawami.

4. Analizy ukierunkowane

4.1. Uwagi ogólne

Nadsyłane wraz z materiałem do badań pisma przewodnie i postanowienia cechują się skąpyimi informacjami. Najczęściej są to: podejrzenie zatrucia środkami psychotropowymi, narkotykami (przy czym nie wiadomo, czy pojęcie to zostało użyte w potocznym, czy naukowym znaczeniu), lekami oraz środkami ochrony roślin. Rzadko wymienione są nazwy leków, których opakowania (puste lub pełne) zabezpieczono przy ofierze. Każda informacja o rodzaju ewentualnie przyjętego preparatu zobowiązuje analityka do podjęcia w pierwszej kolejności badań na obecność jego składnika czynnego. Pomimo częstych błędów w pisowni nazw preparatów, fachowa wiedza pozwala na ich rozpoznanie. Nierzadko po

wykluczeniu obecności konkretnych związków przystępuje się do STA.

Analizy ukierunkowane w zatruciach złożonych wykonywane są metodami HPLC-DAD, LC-MS-APCI lub LC-MS-MS-ESI, charakteryzującymi się niższymi wartościami *LOD* i *LOQ* niż metody przesiewowe, dostarczające w jednym procesie analitycznym dwóch elementów do identyfikacji, np. czasu retencji i widma masowego lub UV.

Poniżej przedstawiono przypadki, w których – na podstawie dostępnych informacji – można było ukierunkować badania. Wyniki tych badań zebrano w tabeli I.

4.2. Przypadek 2

Sprawa dotyczyła podejrzenia o psychiczne znęcanie się nad dziewczyną, w następstwie którego popełniła ona samobójstwo. Materiał w postaci prób krwi i moczu pobranych podczas sekcji zwłok nadesłano w celu przeprowadzenia badań toksykologicznych. Z dokumentacji wynikało, że w pokoju dziewczyny zabezpieczono leki o nazwach: Polfenon, Bemecor, Effox, Nitrendypina, Inhibace, Amizepin, Prestarium i Cardiopirin.

Przeprowadzono analizy celowane na obecność składników czynnych tych leków, czyli: propafenonu, cylazaprylu, nitrendypiny, metylodigoksyny, karbamazepiny, pyrendoprylu i kwasu salicylowego. Odstąpiono od badań w kierunku monoazotanu izosorbidu (składnika czynnego preparatu Effox), którego nie można było oznaczyć zastosowanymi metodami HPLC-DAD i LC-MS-APCI. Ze względu na niewielką objętość nadesłanej do badań krwi (1,5 ml) oraz konieczności oznaczenia 7 związków, prowadzono równocześnie analizy na obecność kilku leków. W wyniku badań metodą LC-MS-APCI w próbce krwi wykazano propafenon oraz cylazapryl, metodą HPLC-DAD kwas salicylowy oraz tiopental, a metodą immunofluorescencji w świetle spolaryzowanym (FPIA) digoksyny. Stężenia tej ostatniej nie wyznaczono z kilku powodów, a mianowicie: metoda FPIA jest wzorcowana na digoksynę a nie metylodigoksynę, dodatkowo niewystarczająca ilość materiału nie pozwoliła na dokonanie powtórnego oznaczenia koniecznego ze względu na silny rozkład krwi. We krwi stwierdzono obecność 4 leków znalezionych na miejscu zdarzenia, a stężenie propafenonu było bardzo wysokie, spotykane w przypadkach śmiertelnych zatruc tym lekiem. Wobec takich wyników badań krwi, analizę moczu przeprowadzono w ograniczonym zakresie, potwierdzając jedynie obecność kwasu salicylowego i propafenonu. Z leków niewymienionych w dokumentacji wykryto we krwi tiopental w stężeniu terapeutycznym. Obecność tego leku w postaci niezmienionej, bez śladów pentobarbitalu jako jego metabolitu, może świadczyć o jednorazowym i niedawnym wprowadzeniu leku do organizmu chorej. Jego obecność mogła wynikać z zabiegów ratowania życia po-

djętych na miejscu zdarzenia, kiedy kobieta jeszcze żyła, a jej stan był bardzo ciężki. Tiopental jest często podawany w ciężkich stanach w celu wprowadzenia pacjenta w tzw. śpiączkę farmakologiczną. Występuje wówczas zmniejszenie mózgowego przepływu krwi, zapotrzebowania tkanki mózgowej na tlen oraz ciśnienia wewnątrzczaszkowego.

4.3. Przypadek 3

Zgon 24-letniej kobiety nastąpił w szpitalu, do którego została przyjeta w związku z podejrzeniem przedawkowania leków. Tuż przed zgonem kobieta oświadczyła, że zażyła w sumie około 80 tabletek leków: Mianserin, Lexotan, Doxepin oraz Ketonal.

W wyniku analiz przeprowadzonych metodą LC-MS-APCI w kierunku obecności mianseryny, bromazepamu, doksepiny i ketoprofenu we krwi, wykazano obecność trzech składników czynnych – mianseryny, doksepiny oraz bromazepamu. W badaniach przesiewowych przeprowadzonych metodą HPLC-DAD stwierdzono ponadto we krwi obecność niewymienionego werapamilu.

4.4. Przypadek 4

Po nagłym zgonie kobiety przysłano do IES jako materiał badawczy krew, mocz oraz wycinki narządów wewnętrznych w celu wykluczenia lub potwierdzenia obecności związków chemicznych świadczących o przedawkowaniu leków. W uzasadnieniu zawarta była informacja, że kobieta zażywała leki o nazwie Clonazepam oraz Depakine.

Analiza fazy nadpowierzchniowej krwi na obecność lotnych rozpuszczalników organicznych wykazała alkohol etylowy. Wyznaczone jego stężenie wynosiło 3,6‰ we krwi i 4,7‰ w moczu. Analiza toksykologiczna ujawniła we krwi i w moczu obecność kwasu walproinowego i 7-aminoklonazepamu (bez klonazepamu). Badania potwierdziły, że kobieta zażywała wymienione leki, ale ich subterapeutyczne stężenia i obecność jedynie metabolitu klonazepamu świadczyły o ich przyjęciu w czasie odległym od momentu zgonu. W niniejszym przypadku przyczyną śmierci było zatrucie alkoholem etylowym i interakcja alkoholu z lekami, o czym wypowiedział się biegły lekarz z zakresu medycyny sądowej.

4.5. Przypadek 5

Zwłoki kobiety znaleziono w łazience jej mieszkania. Próbkę krwi nadesłano do IES w celu określenia zawartości alkoholu oraz wykluczenia lub potwierdzenia użycia leków lub innych środków chemicznych. Podczas oględzin mieszkania zabezpieczono leki o nazwach Pernazinum, Loratadyna, Lerivon i Bioxetin.

W wyniku analizy stwierdzono we krwi obecność nordazepamu, mianseryny, perazyny oraz śladowe ilości fluoksetyny, co potwierdziło, że kobieta przyjmowała zabezpieczone w mieszkaniu leki z wyjątkiem loratadyny. Wykazany nordazepam nie znajdował się wśród znalezionych leków. Jego obecność mogła być zatem wynikiem przyjęcia tego leku bądź też efektem metabolizmu diazepam. Wszystkie wyznaczone stężenia leków mieściły się w zakresie stężeń terapeutycznych. Autorom pracy nie jest znane orzeczenie medyka sądowego o przyczynie zgonu.

4.6. Przypadek 6

Sprawa ta dotyczyła nagłego zgonu mężczyzny w wyniku wyiębienia ciała. Zwłoki mężczyzny znaleziono w lesie. Materiał pobrany podczas sekcji zwłok nadesłano w celu stwierdzenia, czy „znajdują się w nim środki uspokajające lub nasenne” oraz odpowiedzi na pytanie, czy „wykazane leki mogły wywołać zgon po pewnym czasie od ich spożycia lub zaburzyć świadomość (np. wywołać gwałtowny sen), co w konsekwencji, wraz z działaniem niskiej temperatury, spowodowało zgon z wyiębienia”. W trakcie oględzin miejsca zdarzenia znaleziono puste opakowania po lekach: Nitrazepam, Estazolam, Stilnox, Doxepin oraz butelkę po leku Hydroksyzinum.

Przeprowadzona analiza metodą LC-MS-APCI wykazała obecność we krwi zolpidemu i hydroksyzyny w stężeniach nieznacznie przekraczających zakres terapeutyczny. W niniejszym przypadku wykluczono zgon z zatrucia. Obecność leków mogła przyczynić się do zaśnięcia mężczyzny w lesie w niskiej temperaturze, a w konsekwencji do zgonu w wyniku wyiębienia organizmu.

4.7. Przypadek 7

Bezpośrednią przyczyną zgonu kobiety było utonięcie. Badania toksykologiczne krwi miały wyjaśnić, czy kobieta w chwili tonięcia nie znajdowała się pod wpływem leków. Ustalono, że kobieta przyjmowała Cloraxen, Pridinol, Pernazinum i Fluanxol. Prokuratura zwróciła się do IES z prośbą o przeprowadzenie badań i na ich podstawie wydanie pisemnej opinii dotyczącej ustalenia obecności i stężenia we krwi alkoholu etylowego, leków psychotropowych oraz udzielenia odpowiedzi na pytanie, czy stężenia wykazanych leków mieściły się w zakresie stężeń terapeutycznych, czy też spotykanych w przypadkach zatruc śmiertelnych.

Wykonanie wnioskowanych badań metodą LC-MS-APCI potwierdziło przyjęcie wymienionych w postanowieniu leków. Wykazano nordazepam, którego obecność w organizmie może wynikać z metabolizmu klorazepatu dipotasowego, innych benzodiazepin lub z przyjęcia samodzielnego środka leczniczego zawierającego ten

składnik czynny. Ponadto we krwi były obecne perazyna i flupentyksol, obydwa w stężeniu toksycznym. Dla również stwierdzonego w oranizmie prydynolu nie znaleziono wartości odniesienia, czyli zakresów stężeń: terapeutycznego i toksycznego, a tym bardziej spotykanego w przypadkach śmiertelnych zatruc tym lekiem.

5. Wyniki

Wyniki badań przedstawiono w tabeli I.

6. Dyskusja wyników

Trudności, z jakimi toksykolog spotyka się w rutynowej pracy, posiadają różne przyczyny.

Wobec braku informacji o okolicznościach zdarzenia, zawsze istnieje możliwość kontaktu z osobami prowadzącymi postępowanie przygotowawcze. Uzyskane jednak pojedyncze, wyrwane z całokształtu sprawy, informacje o przewijających się we wstępnych ustaleniach środkach toksycznych mogą stanowić przyczynę błędnego opracowania ekspertyzy ze względu na zastosowanie bardzo czułych metod analitycznych. Przykładem niech będzie wykrycie leku zołpidem w niezmienionej formie, którego biologiczny okres półtrwania jest bardzo krótki (1,4–4,5 h), po paru dniach od ewentualnego jego podania, co stanowiło przedmiot opinii opracowanej w IES na podstawie akt sprawy. W konsekwencji wyniku analizy toksykologicznej sprawa toczyła się przez kilka lat.

W wielu przypadkach analiza toksykologiczna nie może ograniczać się do informacji podawanych przez pacjentów o przyjętych lekach oraz do leków, których pozostałości i (lub) puste opakowania znaleziono na miejscu zdarzenia. W czterech z siedmiu opisanych przypadków wykryto w materiale biologicznym co najmniej po jednym leku niewymienionym w pismach kierujących. W przypadku 1. był to midazolam w bardzo wysokim stężeniu, w 2. tiopental. W 3. przypadku wymienione przez kobietę leki, które miała przedawkować, nie tłumaczyły przyczyny zgonu, a wykryty w toku analizy werapamil dał podstawę lekarzowi sądowemu do opiniowania o przyczynie zgonu w wyniku zatrucia. W 5. przypadku znalezionej w mieszkaniu loratadyny nie stwierdzono we krwi pobranej podczas sekcji zwłok.

Duże znaczenie dla analizy toksykologicznej ma wstępne przygotowanie materiału. Do badań przesiewowych stosowano metodę LLE zależną od pH, przygotowując dwa ekstrakty. Wobec zróżnicowanych wartości wykładnika kwasowości (pKa) (tabela I) nie wszystkie związki o charakterze kwaśnym i zasadowym ekstrahowały się z najwyższą efektywnością przy pH odpowiednio 3 i 9. Dla metod przesiewowych bardziej istotna

jest powtarzalność procesu wyosabniania szerokiego spektrum związków. Maurer [7] w opracowanej procedurze przesiewowej obejmującej 2000 związków o różnym charakterze chemicznym stosował ekstrakcję z jednego środowiska o pH 8–9. Należy mieć na uwadze, że stosując przesiewowe metody LLE i SPE, nie zidentyfikuje się wielu bardzo toksycznych związków, np. glikozydów nasercowych, baklofenu czy nitratów.

Skomplikowana matryca biologiczna powoduje, że do identyfikacji ksenobiotyku metodą LC-MS konieczne jest monitorowanie co najmniej dwóch jonów – pseudomolekularnego i fragmentarycznego. Fragmentacja składników matrycy może spowodować wytworzenie się przypadkowego jonu o masie odpowiadającej jakiemś ksenobiotykwowi. Większą wiarygodność wyniku dostarcza metoda LC-MS-MS.

Opracowanie metody do identyfikacji ksenobiotyków występujących w materiale biologicznym w niskich stężeniach [1], jakimi są środki farmakologiczne stosowane w celu ułatwienia dokonania przestępstwa, pozwoliło na wykrycie klonidyny w surowicy stanowiącej przedmiot testu kompetencji z zakresu jakościowej analizy przesiewowej (QSA 3/06). Rutynowo stosowane metody przesiewowe HPLC-DAD i GC-MS-EI (po trimetylosilacji ekstraktu) nie były wystarczająco czułe.

Oznaczanie związku macierzystego i jego metabolitu podnosi wiarygodność analizy i umożliwia szerszą interpretację wyniku. Z obecności w materiale biologicznym tylko macierzystego związku można wnioskować o niedawnym jego wprowadzeniu do organizmu (przypadek 2.), o czasowym zaprzestaniu terapii farmakologicznej i przyjęciu jednorazowej dawki, co może skutkować zwiększeniem toksyczności leków.

Nie zawsze można jednoznacznie ustalić, jaki lek został przyjęty. W opisywanych przypadkach (5. i 7.) dotyczyło to nordazepamu, który jest samodzielnym środkiem leczniczym i do którego metabolizuje wiele benzodiazepin, np. diazepam i klorazepat.

Istotnym problemem jest ilość materiału dostarczanego do badań. 1,5 ml próba krwi sekcyjnej (przypadek 2.) nie tylko stanowi niewystarczającą objętość do przeprowadzenia wielokierunkowych badań, ale również stawia pod znakiem zapytania reprezentatywność tego materiału w odniesieniu do całej puli krwi, zwłaszcza, że nie wiadomo, z którego miejsca została pobrana.

Toksyczność ksenobiotyków jest uwarunkowana czynnikami wewnątrz- i zewnątrzustrojowymi, ale wrażliwość osobnicza odgrywa dużą rolę. Analityk najczęściej odnosi wyznaczone stężenia do zakresów stężeń terapeutycznych leków, normalnych, fizjologicznych lub endogennych innych związków oraz stężeń toksycznych i śmiertelnych. Ze względu na różne drogi wprowadzenia ksenobiotyku do organizmu, możliwość wystąpienia lekozależności czy uzależnienia, tolerancji, okresowej abstynencji i interakcji toksykologicznych, odniesienie takie

nie zawsze jest słuszne. Materiał sekcyjny bardzo różni się od materiału pobranego od osób żywych. Krew sekcyjna jest niehomogenną mieszaniną mniej lub bardziej zhemolizowanych krwinek czerwonych, białek i jonów. Wyznaczone stężenie ksenobiotyku we krwi sekcyjnej niecałkowicie odzwierciedla jego stężenie w chwili zgonu, a odniesienie tego stężenia do zakresu terapeutycznego jest raczej oszacowaniem wielkości. W przedstawionych przypadkach w próbach krwi pobranych od trzech osób wszystkie wykazane leki mieściły się w zakresie terapeutycznym, u dwóch zmarłych stwierdzono co najmniej jeden lek w stężeniu toksycznym, a u trzech następnych przynajmniej jeden lek w stężeniu, które jest spotykane w zatruciach śmiertelnych i to pojedynczym związkiem.

Wysokie stężenie leku nie zawsze musi być efektem jego przedawkowania. Może ono zostać spowodowane pośmiertną jego redystrybucją lub podaniem terapeutycznej dawki tuż przed zgonem. Konieczność weryfikacji tej ostatniej sugestii analityk zasygnalizował w opracowanych opiniach do przypadku nr 1 i 2.

7. Podsumowanie

Postępowanie toksykologa analityka w sprawach o nieznanym ustaleniach faktycznych wymaga zastosowania wielokierunkowych badań. Przy ukierunkowanych badaniach po wykluczeniu sugerowanych ksenobiotyków niejednokrotnie wymagane jest przystąpienie do STA. Znajomość objawów występujących u zatrutego może zawęzić obszar analizy toksykologicznej.

Stosowane metody przesiewowe (HPLC-DAD, GC-MS-EI i LC-MS) są wystarczająco sprawne do wykrywania leków o różnym charakterze chemicznym w stężeniach terapeutycznych, a nawet subterapeutycznych. Szersza interpretacja wyników analizy toksykologicznej jest jednak możliwa tylko przy znajomości okoliczności zdarzenia.