



PROBLEMS FACED BY THE ANALYST-TOXICOLOGIST IN THE AGE OF HYPHENATED TECHNIQUES

Maria KAŁA

Institute of Forensic Research, Krakow, Poland

Abstract

Poisons are as old as humanity. It is a well-known fact that poisons have been used for centuries for various purposes, but for a long time it was impossible to detect their presence in biological materials. Since the times of Theophrastus Bombastus von Hohenheim Paracelsus, James Marsh, Matthew Orfila and Jean Servais Stas, our understanding of toxicology has improved progressively. Numerous ideas put forward by the pioneers of chemical toxicology remain valid today. In recent times, outstanding toxicologists such as Alan Curry (1925–2007), Irving Sunshine (1916–2006) and others, have made considerable efforts and stimulated each other to further the development of analytical toxicology. A growing number of new synthesised compounds and alternative matrices for biological sampling have been introduced. New analytical technologies have been developed enabling use of reliable methods to identify and quantify many toxicologically relevant substances with very low limits of detection and quantification. Among them are hyphenated mass spectrometric techniques, particularly gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS), which have become indispensable tools in clinical and forensic toxicology. Progress in analytical toxicology, concepts and procedures using the GC-MS and LC-MS techniques for screening of modern drugs with respect to their consumption patterns, the role of mass spectral libraries and analytical pitfalls are presented and discussed.

Key words

Modern drug scene; GC-MS; LC-MS; Forensic and clinical toxicology.

Received 7 August 2008; accepted 25 August 2008

1. Introduction

Analysing the development of forensic toxicology over the centuries, it may be said that the majority of principles governing analytical procedures were formulated very early on, and contemporary toxicologists are verifying the ancient principles, having at their disposal a vast body of knowledge and an extensive background of specialist equipment. The leading roles in forensic toxicology are played by the wronged party, the analyst, the evaluator (a physician) and the adjudicator (a lawyer).

The analyst-toxicologist searches for, detects and determines the content of poisons or their biomarkers,

referred to as analytes – ideally in materials regarded as the most suitable and using the most appropriate methods. However, not infrequently, the analyst has no choice in selecting either the method or the material. The selection of analytical methods is limited by equipment available in a given laboratory. At times, there is only a small amount of material available for investigation, but even when its quantity is optimal, problems are encountered in identifying the analyte.

2. Historical background

Poisons are as old as humanity, being mankind's constant companions from the dawn of history to the present day. One of the earliest works referring to medical and non-medical use of jimson weed, henbane, northern water hemlock, arsenic, antimony, tin, copper and the deadly substance obtained from peach stones is the Ebers papyrus. Ancient Greeks executed condemned persons – including Socrates – by hemlock poisoning. Today, in the United States death sentences are carried out using so-called lethal injections. The injection is composed of three successively administered components, each of them in a lethal dose, which induce sleep, cause respiratory and then cardiac arrest.

In 400 B.C., Hippocrates, the father of medicine, and his contemporary Aristotle described the activity of poisons, their properties and antidotes, while in the year 50 A.D., Dioscorides, Emperor Nero's physician, prepared the first classification of poisons, dividing them into substances originating from plants, animals and minerals.

Criminal use of poisons dates back to the Roman Empire; throughout the centuries, it has been associated with such names as Livia, Lucrezia Borgia, Catharine De Medici and Hieronymus Spora. In 364 B.C., Emperor Jovian was most likely poisoned by carbon monoxide, which for a long time was referred to as "carbon smoke". Dioscorides prepared an antidote consisting of 73 components. The official appointments of state poisoners and meal-tasters speak for themselves.

The father of toxicology, Theophrastus Bombastus von Hohenheim Paracelsus, defined poison as a chemical substance with specified properties and structure, but he also drew attention to dosage in his famous saying: "poison is in everything, and no thing is without poison. The dosage makes it either a poison or a remedy".

Matthew Orfila, believed by physicians to be the forefather of toxicology, in 1811, 1817 and 1823 published three treatises on poisons, including curare, carbon monoxide and arsenic, as well as on poisoning symptoms and treatment. The turn of the 19th and 20th centuries was a time of dynamic development of synthesis of chemical compounds; since that time, their number has continued to grow every year.

In spite of the fact that both society and the judiciary were aware of instances of poisoning for centuries, poison continued to remain undetected in corpses. As early as 1775 Carl Scheele isolated arsenic as a volatile compound in the presence of zinc and *aqua regia*, and the alkaloids morphine and nicotine were isolated

from poppies and tobacco respectively, with the precipitation reactions for these compounds being described shortly afterwards, followed by development of microcrystalline tests for alkaloid precipitates. However, the beginnings of toxicological analyses are associated with James Marsh, Matthew Orfila and Jean Stas. In 1836, Marsh was the first investigator to detect arsenic in gastric contents and in coffee during a murder trial; he employed apparatus of his own design. The test enabled detection of arsenic at the level of 20 micrograms. Marsh introduced a way of reasoning that was so simple that he became the object of envy of contemporary chemists. However, short cuts started to be taken with his method – no apparatus was employed, the reaction was performed at too high temperatures – which led to the issuing of numerous incorrect expert opinions and erroneous verdicts. Four years later, Matthew Orfila used nitric acid or saltpeter to remove "interference of other matter", demonstrating the presence of arsenic in internal organs (the liver, kidneys, spleen, heart and muscles). When analysing materials originating from exhumed bodies, he drew attention to the necessity of investigating cemetery soil and advanced the thesis that "circumstances determine everything, while a statement alone determines nothing". Jean Stas, a student of Orfila, observed further developments. He lived at a time when the effects of caustic poisons were sufficiently well known, and he himself harboured suspicion that in some instances, vinegar might be used to obliterate traces of crime or to mask the effect of some other poison. He often observed that poisonous substances decompose at elevated temperatures or in contact with air before they are identified. In 1851, he isolated nicotine from urine, gastric contents, intestines, liver, lungs, tongue and larynx. Stas divided the material submitted for analysis into two parts and stored one half for potential repeated examinations. In order not to irreversibly destroy anything during his analyses, he carried out extraction in closed vessels and repeated the process. In addition to the organoleptic tests that were popular at the time, he employed the standard of pure nicotine, to which he compared the (given) alkaloid isolated from investigated material in reactions with various reagents. He achieved success, since he was the first researcher to demonstrate the presence of a plant poison in biological material. Only in 1868 did the investigations of Dragendorff lead to development of a method of consistent extraction and separation of non-volatile organic compounds originating from biological materials. Pharmacological tests and colour reactions were employed in the identification of the then popular alkaloids in extracts. In the case of strychnine, tetany

spasms were observed in frogs, for atropine – pupillary dilation in cats, for aconitine – a tingling sensation at the tip of the tongue. Some colour reactions are used to this very day, e.g. the test of Erdmann (1861), Fröhde (1866), Vitali (1880), Mandelin (1884), Marquis (1896) and Mecke (1899). At the same time, other researchers took an interest in the processes of biological material decomposition, the products of which were termed “ptomaine”. Cadaverine was discovered by Selmi in 1874; Guareschi and Mosso isolated a compound with curare-like effect from decomposed human brain in 1883, and in the same year, Marino-Zuco isolated from biological material a compound whose composition and chemical properties corresponded to those of neurine [3].

3. Preparation of material

Currently, we have at our disposal a wide range of instrumental analytical techniques that are characterised by a varying degree of specificity, but their sensitivity continues to increase. The so-called hyphenated techniques are the most popular. In one analytical process, these provide several parameters needed for identification of the substance, e.g. relative retention time and spectrophotometric or mass spectrum. Only commercial immunochemical techniques do not require preliminary material preparation (except where the analyst is using the test to analyse a type of material other than that recommended by the manufacturer, in which case a preparatory process may be applied). Selection of the method(s) of preliminary sample preparation depends on the aim of the analysis, and in particular on whether it is a systematic toxicological analysis in the case of searching for a poison – i.e. a so-called screening analysis, or whether confirmation, or whether the aim is quantitative analysis; the choice of method(s) of sample preparation is also dependent on analytical techniques employed in final determinations. Some techniques, particularly GC or GC-MS, require modification of numerous analytes – in other words, their chemical conversion (derivatisation). In general, one may say that the more sensitive the method is, the more requirements there are.

4. TLC and HPLC techniques

Each laboratory should develop its own procedures for screening analyses. These procedures may be based on systems that are commercially available or reported in the literature, but their reproducibility and

robustness under new laboratory conditions must be verified. To date, the highest number of systems of significance in toxicology has been developed to analyse organic compounds employing various methods, the said methods being selected depending on financial resources of a given laboratory rather than their universal character and usefulness. With respect to thin layer chromatography (TLC), we should mention the identification system developed by the Committee on Systematic Toxicological Analysis, International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT), which encompasses approximately 1600 compounds [25] and the commercial system of Toxi-Lab developed by Varian, encompassing not less than 1200 pharmaceuticals and their metabolites. For the GC method, the most popular system of screening analysis for the presence of low volatility organic compounds has been developed by the above-mentioned TIAFT Committee; the system is based on two types of detectors (the flame-ionisation – FID, and the nitrogen phosphorus – NPD – detectors) and retention indices of 4500 compounds [26]. It should be mentioned that as a result of inter-laboratory collaboration, a system of identification of volatile organic compounds of the solvent type has been developed, which are important from the toxicological viewpoint [27]. The MTSS system for identification of pharmaceuticals may be purchased together with high performance liquid chromatographs with diode array detectors (HPLC-DAD) produced by Merck. The MTSS system enables determination of compounds divided into acidic and alkaline (with neutral compounds included in both groups) based on relative retention times and spectrophotometric spectra. Another important HPLC-DAD system, which is compatible with high performance chromatographs offered by various manufacturers, was developed by Pragst et al. [8] for almost 2700 compounds; in addition to the above-mentioned identification elements, the system takes into consideration molecular structure through listing 1600 chromophores or combinations of them.

5. GC-MS techniques

The most up-to-date mass-detection based hyphenated chromatographic techniques (GC-MS, GC-MS-MS, LC-MS, LC-MS-MS) have numerous additional features. At present, an integral element of each GC-MS unit is a library of reference mass spectra, which enables singling out of spectra that are potentially similar to the investigated compound and determines the likelihood of fit. For the GC-MS electron ionisation (EI)

technique – in view of its extensiveness – we should first mention updated the Wiley Registry 8th Edition/NIST 2008 (W8/N08, ISBN: 978-0-470-42520-6) library which is a combination of both the Wiley Registry of Mass Spectral Data with the NIST (National Institute of Standards) 2008 library. The W8/N08 contains 562000 EI spectra, 5308 precursor ions for MS-MS, and additionally more than 2 million chemical names and synonyms, 350000 searchable structures and 43000 entries of GC retention indices. Integrated part of this library is Automated Mass Spectrometry Deconvolution and Identification System (AMDIS). The requirements of toxicological analysis are best met by the Pflieger/Maurer/Weber library, which in 2006 contained 7800 spectra of pharmaceuticals, pesticides, their metabolites, derivatisation products (especially methyl and silyl derivatives) and artefacts collected under standard conditions. The library additionally contains important data on chemical compounds, such as the Kovats index, structural or empirical formula, molar mass, CAS (*Chemical Abstract Service*) registry number, the name of the pharmacological group, to which a given compound belongs, the type of biosample and a description of the sample preparation method employed prior to spectrum plotting. Nevertheless, it is not true that a single analytical procedure can encompass all precursor compounds and their metabolites, even those belonging to the above library. However, Maurer et al. (Maurer was one of the co-authors of the aforementioned spectral library) have developed the most universal method of detection and identification to date, encompassing more than 2000 compounds (pharmaceuticals and their metabolites belonging to 20 pharmacological groups) in a single extract of urine (pH 8–9) following acid hydrolysis of urine using the GC-MS-EI technique [14].

In the early days of mass spectrometry, mass spectra of identified compounds were compared visually. With progress in computerised technologies, software packages have been developed that are capable of comparing the spectrum of the investigated compound with spectra contained in the library. The programs are constantly upgraded and significantly decrease the time needed for searches and increase the result specificity. Preliminary spectral identification using the library database is performed by a direct comparison of the unknown spectrum with particular library spectra; alternatively, a reverse process occurs, where the library spectra are compared with the unknown mass spectrum. To achieve identification, it is necessary to obtain an EI-type spectrum through registration of the entire ion current. Identification of an unknown compound in a biological matrix is considered valid for fo-

rensic purposes when a standard identified using the library is analysed under the same conditions as those employed for the tested compound.

6. LC-MS techniques

The GC-MS-EI methods continue to be the most popular in toxicological analysis due to their more extensive mass spectra, which provide the basis for formulating conclusions on the structure of the identified compound; nevertheless, single or tandem LC-MS techniques with electrospray ionization (ESI) or with atmospheric pressure chemical ionisation (APCI) have become increasingly important, especially in quantitative analyses of identified compounds. Atmospheric pressure photoionisation (APPI) is employed in non-polar analyses of compounds, for which ESI and APCI type ionisation is ineffective. Developing a mass screening procedure, and by the same token an identification procedure, by the LC-MS technique, one should bear in mind that ESI and/or APCI-type mass spectra obtained in single fragmentation tests are – in contrast to EI-type spectra – extremely poor in terms of fragments. The pseudomolecular ions obtained in the course of APCI are also characterised by a low identification value. The spectral identification value increases following the use of tandem mass spectrometry (MS/MS) and registration of spectra of parent ion products, i.e. ions formed as a consequence of disintegration of the precursor ion as a result of fragmentation. Another method is to carry out in-source-fragmentation with high fragmentor voltages, which enables formation of a higher number of fragments, including ones that allow conclusions to be drawn as to the character of the compound. Modern apparatus allow a very rapid voltage switch, which in turn makes it possible to register spectra at various fragmentor voltage values, e.g. 100 and 200 V [14] in the course of chromatographic separation. Numerous users of LC-MS apparatus claim that in different LC-MS units, fragmentation occurs in a significantly variable manner and the same value of fragmentor voltage may yield variable intensity of the produced fragments. Weinmann et al. [23] demonstrated that in various types of apparatus, in-source fragmentation may occur in a repetitive manner and mass spectra obtained as a consequence of in-source fragmentation by the collision-induced dissociation (CID) method are reproducible providing that prior to the test, the efficiency of the apparatus is adjusted using the typical mixture of standard substances consisting of haloperidol, paracetamol, metronidazole or metamizole. The same

authors claimed further that it is possible to use the mass spectral library developed using LC-MS-ESI-CID when using different apparatus, providing the CID energy values are regulated using at least two of the above mentioned standard substances. Another significant problem in ESI is analyte ionisation reduction by coexistent compounds contained in the sample; the phenomenon is termed ion suppression and may lead to overlooking of a highly toxic compound, whose concentration in the sample is low. Ion suppression is triggered by lower volatility compounds, since they may affect the formation of the cloud of droplets containing the analyte and (may affect) evaporation of the solvent, resulting in a change in the number of charged ions in the gaseous phase before they reach the detector. Suppressive compounds may include salts, endogenous matrix elements, pharmaceuticals, their metabolites, and even deuterated internal standards. Dams et al. [4] investigated the interactions between the ionisation type, method of sample preparation and the type of biosample (the urine, saliva and serum), as well as the occurrence of the matrix effect. The authors observed that both types of ionisation are very sensitive to the type of matrix, with ESI being more sensitive than APCI, and the method of sample preparation may reduce or increase the matrix effect. Both ionisation suppression and intensification affect the sensitivity, reproducibility, accuracy and linearity of the quantitative LC-MS-MS method of compound determinations in biosamples. In view of the above considerations, it may be stated that to date, the highest number of libraries for LC-MS or LC-MS-MS has been created informally by particular laboratories. These libraries fulfil their role well for particular apparatus or for the same types of instruments. Müller, Weinmann et al. [17] have constructed a library of daughter mass spectra (MS-MS) of the ESI type with in-source CID fragmentation for LC-MS-MS employed in detection of 800 pharmaceuticals using three (low, moderate and high) collision energy values. In addition, the same authors have developed a mass spectral library for a single quadrupole, while Schreiber has created a library of ESI and APCI-type spectra for identification of pesticides and explosives. These four libraries are available commercially (<http://www.chemicalsoft.de/index-ms.htm>).

7. ICP-OES and ICP-MS techniques

The development of analytical techniques has not been restricted to analysis of organic compounds. In addition to flame (F-AAS) and non-flame atomic ab-

sorption spectroscopy, which have been employed for a long time in investigations of biological materials to detect metals, including the technique generating cold mercury vapor (cold vapor atomic absorption spectroscopy – CV-AAS), investigators increasingly often employ inductively coupled plasma with optical emission spectroscopy (ICP-OES) or inductively coupled plasma mass spectroscopy (ICP-MS). These techniques allow analysts to analyse approximately 70 elements in a single analytical process, and their precise number depends on the number of standard substances at their disposal. In determinations of mercury, arsenic, selenium, etc., the method of choice is hydride generation atomic absorption spectroscopy (HG-AAS), while electrothermal atomic absorption spectroscopy (ET-AAS) allows detection of trace amount of heavy metals not only within normal ranges, but also within ranges of values encountered in chronic poisoning, and in the case of some elements, e.g. thallium, lead or selenium – in acute poisonings. In today's "chemicalised" world, in order to rule out or confirm poisoning, especially chronic poisoning, by toxic metals, half-metals and non-metals, it is necessary to know normal levels of these and other trace elements in particular types of biological materials.

8. Modern toxicological analysis

Due to increasing numbers of samples, scientists are endeavouring to automate the analytical process in the field of toxicology, develop software applications for measurement processes, which would carry out automatic tuning, data acquisition, edition and archiving, generation of reports, library searches and quantitative analysis. Extensive literature and Internet publications on the subject are available. The constantly developed analytic procedures are verified by internal and external quality control systems that assess the quality of test results. Having all these procedures at their disposal means that the analyst and the forensic toxicologist in a well-equipped laboratory can perform a screening analysis of approximately 3000 compounds in their daily work. The remaining compounds of significant toxic importance, the number of which is estimated at approximately 100,000, require the use of specific analytic procedures, targeted at a given chemical.

Although analytical principles and methods are well known, although the awareness of methodological pitfalls is high, although universally accepted analytical procedures are employed in searching for, identifying and detecting poisons using biomarkers in-

dicative of exposure, effects and sensitivity in bio-material while symptoms are present (the blood, saliva, urine) or after the period of occurrence of poisoning symptoms (urine, hair, sweat), even in this situation, the general knowledge and inquisitiveness of the analyst and the logical association of facts rather than the incident are decisive factors in the success of analysis. Contemporary analytical methods allow conclusions to be drawn on the cause of death by poisoning based on the analysis of maggots developing in human remains [6, 9]. This material also serves in the determination of time of death both in hot [22] and in cold climates [13].

9. Method validation

In order for any new analytical method (screening, confirmatory, qualitative and quantitative) to be used for the purpose of forensic and/or clinical toxicology, it must be thoroughly developed and completely validated in accordance with international requirements. With respect to quantitative methods employed in biosample analysis, there is a general consensus that parameters such as the following have to be established: selectivity, calibration model (linearity range), analyte stability, accuracy (scatter of results), precision (repeatability, intermediate precision) and lower limit of detection (*LLOD*). Additional parameters that should also be determined are: limit of detection

(*LOD*), recovery, ruggedness or robustness. No consensus has been achieved as to qualitative methods, but the majority of researchers share the opinion that it is necessary to assess selectivity and detection limit, and additionally precision, recovery and sensitivity. For LC-MS-based methods, evaluation should always include the matrix effect, e.g. ion suppression or ionisation intensification, especially in ESI-type ionisation [18]. Employment of deuterated derivatives of analytes as internal standards and verification of method correctness through analysis of internationally accepted reference materials in inter-laboratory comparisons facilitate continuous control of test result uncertainty. The significance of method validation is attested to by the profoundly restrictive requirements that are imposed by European Commission Decision 2002/657/EC with further amendments (the last amendment was introduced in 2004) with respect to analytical methods employed in monitoring of the level of residual controlled substances in food products of animal origin (Table I). Method validation does not constitute research work as such, but it is an integral element of the process of quality assurance and accreditation, as well as a prerequisite necessary for the method to be published in peer-reviewed periodicals. Determination of the validation parameters is time consuming, but they objectively prove the usefulness of the method in achieving the defined goal. This process does not conflict with the statement by Albert Einstein "Make everything as simple as possible, but not simpler".

TABLE I. EXAMPLES OF THE NUMBER OF IDENTIFICATION POINTS EARNED FOR A RANGE OF TECHNIQUES AND COMBINATIONS THEREOF (N = AN INTEGER) ACCORDING TO DECISION 2002/657/EC

Technique(s)	Number of ions	Identification points
GC-MS (EI or CI)	N	N
GC-MS (EI or CI)	2 (EI) + 2 (CI)	4
GC-MS (EI or CI)	2 derivatives; 2 (derivative A) + 2 (derivative B)	4
LC-MS	N	N
GC-MS-MS	1 precursor and 2 daughters	4
LC-MS-MS	1 precursor and 2 daughters	4
GC-MS-MS	2 precursor ions, each with 1 daughter	5
LC-MS-MS	2 precursor ions, each with 1 daughter	5
LC-MS-MS-MS	1 precursor, 1 daughter and 2 granddaughter	5.5
HRMS	N	2n
GC-MS and LC-MS	2 + 2	4
GC-MS and HRMS	2 + 1	4

10. Currently employed substances of abuse

The narcotics market is an unlimited source of substances for contemporary toxicological analyses. The market provides a wide range of narcotic substances, either synthetic or originating from plants. In this paper they have been classed together under the term “classic psychoactive drugs”, enabling discussion of these agents to be kept brief. Many of these substances have been smuggled in; they may also originate from large illegal clandestine laboratories (amphetamine and the increasing number of its derivatives), but they are also home-made from pharmaceuticals sold over the counter, e.g. Tussispect (an expectorant), Efrinol (ephedrine) or Sudafed (pseudoephedrine) [28]. Newly introduced into the narcotics market, psychoactive substances such as fentanyl and its derivatives (e.g. 3-methylfentanyl, known as “the crocodile”) are characterised by their ever increasing activity, while unpredictable mixtures of well-known drugs, such as MDMA or cocaine with atropine, have caused numerous fatal poisonings among many ignorant drug abusers [24]. The appearance on the narcotics market of genetically modified *Cannabis*, which contains small amounts (below 0.20%) of Δ^9 -tetrahydrocannabinol (9THC), but has a high content of Δ^9 -tetrahydrocannabinol-2-carboxylic acid (9THCA-A) has not gone unnoticed either by analysts or by representatives of the judicial system.

Methods allowing determination of the two above-mentioned compounds, either separately or in combination [21], in *Cannabis* have been introduced. On February 1, 2007, the Act of 29 July 2005 on Counteracting Drug Addiction, was amended. Recently, “inventions” have been observed, the purpose of whose preparation and introduction onto the market cannot be easily explained. Lead-enriched marijuana or marijuana mixed with microscopic fragments of glass are examples [24].

A significant problem is posed by the dietary supplements market. At present, pharmacies are the most important distribution channels for these substances. Increased sales of dietary supplements are noted. In 2006, the market increased by 33%; its value was estimated to amount to approximately 1 billion PLN, and the anticipated further increase in 2007 was assessed as 25%. In accordance with the Food and Nutrition Safety Act of August 25, 2006 (Dz. U. 2006, 171, 1225), a dietary supplement is “a product aimed at supplementation of a normal diet, which is a concentrated source of vitamins or trace elements or other substances demonstrating a nutritional or other physiological effect, either simple or composite, that has

been introduced onto the market in a form allowing administration in the form of doses, in appropriate forms, excluding products exhibiting characteristics of a medicinal product in accordance with articles of pharmaceutical law”. Nevertheless, various stores carry numerous products sold as dietary supplements, which undoubtedly may cause health problems and sometimes even pose a threat to life. Preparations sold under the brand names of Testo Stack, Male Multiple and Female Multiple contain – among other components – vitamin A, E and D, respectively. If each preparation is taken at the recommended dose, the daily dose of the above vitamins is 1600 g, 400 IU and 400 IU, respectively, which – in view of the recommended daily intake level values equalling 600 g, 200 IU and 33 IU – is a reason for expressing serious reservations. Ongoing supervision of dietary supplements is the prerogative of organs of the State Sanitary Inspection, which – should the preparation on sale be found not to meet the requirements of a dietary supplement, nutritional product or medicinal product – take a decision to prevent introduction of the product onto the market or withdraw it from the market. However, online sales are under no supervision whatsoever. One can buy anything, from anabolic steroids and performance-enhancing drugs (doping) to various weight-loss medications, especially natural Chinese preparations. The latter are most often advertised as weight loss-assisting preparations of plant origin, but they contain large amounts of synthetic compounds (sibutramine, desmethylsibutramine, fenfluramine), whose structure and activity resemble those of amphetamine derivatives. Additionally, certain Chinese herbal preparations have such a high lead content that prolonged ingestion results in the individual developing symptoms of lead poisoning. Numerous press articles aimed at warning the general public against the disastrous effects of ingesting so-called boosters, but published with such intriguing titles as “Cerebral doping”, “A torpedo in the head”, “Mind cosmetics” – may actually encourage people to experience the effect of such products. Attractive names, such as “Energy pills”, “Euphoric pills”, “Psychedelic pills”, *Salvia divinorum* (diviner’s sage, Mexican sage), “Magic garden”, “Fly agaric” or “Indian warrior”, under which they are available on the Internet, with the seller’s assurance of their harmless character and with labels in keeping with requirements for dietary supplements, tempt many young people. Today, numerous individuals are unable to imagine getting through a day without drinking litres of coffee; in 2007, the consumption of energy drinks increased by 145% – these drinks contain caffeine (with its stimulating activity), taurine (which regenerates mus-

cles), group B vitamins (B₆ and B₁₂, which maintain CNS efficiency) and inositol (a component of lecithin, with mild anxiolytic and mind efficiency-enhancing properties). Others use prescription pharmaceuticals or medications brought from foreign countries, e.g. Ritalin (a medication employed in the treatment of children with ADHD, which improves concentration, ability to focus and ability to learn in normal humans), Aricept (a pharmaceutical which increases the level of acetylcholine in the brain, employed in the treatment of Alzheimer's disease), Vigil (used in managing narcolepsy), Propranolol (when taken in low doses, it is supposed to act on the peripheral nervous system), Nootropil (improves brain function), or Ginko biloba (stimulates brain function). In the United States, the latter is more popular and profitable than aspirin, with a billion dollars in sales annually.

Due to human interest, which does not always develop in desirable directions, the number of venoms and toxins that may be encountered by the forensic toxicologist is on the increase. We know of approximately 750 toxins present in more than 1000 plant species, 1200 species of marine organisms, 700 poisonous fish, 400 venomous snakes, 60 ticks, 75 scorpions, 200 spiders and several birds whose feathers may have a toxic effect when merely touched. Often such an exotic animal, either obtained while travelling in a foreign country or bought on the Internet and kept in inappropriate conditions or even gotten rid of due to the nuisance it has become to its owner, may become a cause of arduous toxicological investigations.

Representatives of all the countries in the world who are responsible for relevant legal regulations, prevention and counteraction of dangers resulting from the dynamically developing narcotics market and unlimited human inventiveness in searching for mind modulating substances, are well aware that some of their activities lag behind the real situation. Exercising legal control over a new psychoactive substance introduced onto the narcotics market requires time and legal foundations. The activities (collection and exchange of information, market control and estimation of health risk) of the Early Warning System (EWS) on new narcotics, which operates under the European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA) established by the European Union Council (decision 2005/387/JHA of May 10, 2005) are aimed at helping to build such legal foundations and bridging the time gap. EMCDDA also collaborates with Europol. In Poland, EWS operates at the National Bureau for Drug Prevention, which is under the aegis of the Ministry of Health.

11. Consumption patterns

Each of the above mentioned substances (and substances that have not been mentioned) may become the subject of toxicological analysis as a factor endangering the health and even life of the consumer. In view of the fact that the analytical process is capable of detecting lower and lower amounts of xenobiotics, interpretation of findings becomes increasingly significant. The interpretation must be performed in relation to the wronged party, taking into consideration three axioms – individual sensitivity, dose and the borderline between medical use and poisoning. Individual sensitivity depends on the properties of the xenobiotic and intraindividual factors, i.e. sex and race; it changes with age and is associated with congenital and acquired pathologies (allergies, civilisation diseases), as well as with genetic defects, which are observed increasingly frequently. The quantitative understanding of poison according to the definition formulated by Paracelsus increases the number of analytes that are significant from the toxicological point of view. However, nowadays, we are only rarely faced with a fatal poisoning as a consequence of ingestion of large doses of compounds characterised by low toxicity. Drug abuse, pharmacomania, polytoxicomania and polypragmasia, which most often lead to addiction, tolerance and abstinence syndromes, are presently extremely common. Widely applied polytherapies have resulted in the availability of numerous pharmaceuticals of various types, and therefore we often observe poisonings by mixtures of medications or toxic substances accompanied by numerous metabolites. The possibility of various interactions occurring with such consumption patterns markedly hinders interpretation of findings with respect to severity of poisoning and differentiation between medicinal use and poisoning by a given substance. It is rare for the dose of the ingested preparation to be known; more frequently, the analyst interprets the determined concentration value. Knowledge of the degree of toxicity of a compound determined by its lethal dose (Table II) facilitates the selection of an appropriate method and material useful for the purpose of analysis. As Table II shows, medicines currently used for therapeutic purposes (and thus potentially available) are much more potent than compounds that have been known for centuries as the most deadly poisons (cyanide, arsenic, thallium). An example here is botulin, which is employed in the treatment of involuntary muscle spasms (dystonia), hyperhidrosis (excessive perspiration), spasticity of various origins (e.g. in cerebral palsy or sclerosis multiplex), hemiparesis in children, or even in the cosmetic indus-

try for aesthetic purposes, i.e. for wrinkle reduction. The forensic toxicologist is increasingly frequently faced with a growing selection of medications employed as muscle relaxants – each dose of which if introduced into the human body without medical supervision is lethal. It should also be mentioned here that these highly toxic compounds, (botulin, 3-methylfentanyl, sodium fluoroacetate) constitute biological weapons.

TABLE II. AN ILLUSTRATION OF THE DEGREE OF TOXICITY OF SOME POISONS TO HUMANS EXPRESSED AS THE NUMBER OF LETHAL DOSES IN RELATION TO THE MASS OF A FIVE PENNY (5 G) OR ONE PLN (5.13 G) COIN.

Poison	Number of lethal doses
Thallium	5
Sodium fluoroacetate	7
Arsenic	25
Cyanide	25
Strychnine	50
Nicotine	125
Ricin	70,000
3-methylfentanyl	1,000,000
Botulin	100,000,000

12. Analytical strategies

Until recently, numerous hospital laboratories have used separate analytical procedures for each compound prescribed by a physician (included on the list of currently performed analyses). As laboratories become equipped with instrumental techniques, attempts are being made to apply one procedure to the broadest possible spectrum of compounds, which has taken place in forensic laboratories for a long time. In view of the sensitivity of hyphenated techniques, some analysts apply a single method of material preparation (extraction and derivatisation) to all analytes, disregarding the low efficiency of the process with respect to acidic compounds extracted from an alkaline medium. Hyphenated techniques enable analysis of an extract under intentionally changing measurement conditions (e.g. at two fragmentor voltages) in the course of a single process. The basis of other analytical procedures is the application of complementary meth-

ods that use different types of detection. Many analysts advocate pH-dependent extraction and a combination of extracts prior to instrumental analysis or analysing them separately. In numerous laboratories, methods are being developed for investigating particular types of biological materials (the blood, urine, saliva, hair) with maximum likelihood ratio (*MAP*) [19], as well as particular pharmacological groups (benzodiazepines [11, 20], antidepressants [10] and beta-blockers [16]). An increasing number of developed methods addresses a particular problem and material, e.g. LC-MS-APCI for detecting and determining blood levels of substances facilitating commission of a crime (rape, robbery) [1], LC-MS-ESI for determinations of substances with alcohol-like properties in the blood of drivers [12], serum phenylalkylamines of plant origin [2], serum phenylalkylamines termed “designer drugs” and belonging to the 2C group, or to be more precise, containing in their structure two dimethoxy groups attached to benzene ring position 2 and 5 [7], and urine toxins (- and -amanitin) [15].

Hyphenated techniques allow scientists to develop a highly universal method, which in turn allows performance of screening analysis, identification and quantitation. For LC-MS, successive stages of such processing of a single biosample extract consist of: screening analysis, in which suspicious compounds are singled out, followed by identification of these compounds by total ion current registration. Then, to perform quantitation, it is sufficient to monitor a single ion from each identified compound. The LC-MS-MS-QTrap method worked out by Müller et al. is among the more extensive LC-MS-based screening methods [17]; the technique is capable of identifying 301 compounds in the blood and urine. Another method of this type is LC-MS-MS-ESI developed by Gergov et al. [5], which recognises 238 pharmaceuticals in blood.

13. Conclusions and perspectives

Hyphenated techniques are and will continue to be indispensable analytic tools in clinical and forensic toxicology. They allow development of methods for investigating a wide spectrum of compounds. In view of the general availability and accessibility of extensive databases of reference spectra, the GC-MS techniques with EI-type ionisation continue to be more useful in identification of xenobiotics and in screening analyses, in contrast to LC-MS techniques, which are predominantly used in targeted analyses and quantification. However, the increasingly frequent use of tandem fragmentation and new types of mass analysers,

e.g. based on time of flight (TOF) or a hybrid triple quadrupole – linear ion trap (QTrap), has led to an increase in the importance of LC-MS in screening analyses, especially when targeted at compounds associated with a particular problem. The high sensitivity of these analysers allows simultaneous detection and determination of numerous substances at low concentrations and in a small amount of biosample. With such factors in mind, controlling the entire analytical process – the responsibility of the analyst – becomes particularly important. When developing methods, universally accepted international criteria should be borne in mind. It is only when such requirements are met that the results are reliable and may constitute the basis for ruling out or confirming the presence in a biosample of even very rare xenobiotics included in the analytical range, as well as for assessing the determined concentration values in relation to therapeutic use, overdose or abuse of a given substance.

References

1. 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:] T2007 Proceedings of the International Conference on Alcohol, Drugs and Traffic Safety, The International Association of Forensic Toxicologists and 8th International Interlock Symposium, Seattle, Washington, August 26–30, 2007, Washington State Patrol, International Council on Alcohol, Drugs and Traffic Safety, The International Association of Forensic Toxicologists, Washington 2007 [available online at:] <http://www.icadts2007.org/print/177applicationliquid%20.pdf>.
2. Beyer J., Peters F. T., Kraemer T. [et al.], Detection and validated quantification of nine herbal phenalkylamines and methcathinone in human blood plasma by LC-MS/MS with electrospray ionization, *Journal of Mass Spectrometry* 2007, 42, 150–160.
3. Cravey R. H., Baselt R. C. [eds.], Introduction to forensic toxicology, Biomedical Publications, California 1981.
4. Dams R., Huestis M. A., Lambert W. E. [et al.], Matrix effect in bio-analysis of illicit drugs with LC-MS/MS; influence of ionization type, sample preparation and biofluid, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 2003, 14, 1290–1294.
5. 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.
6. Gunn J., Shelly C., Lewis S. W. [et al.], The determination of morphine in the larvae of *Calliphora stygia* using flow injection analysis and HPLC with chemilluminescence detection, *Journal of Analytical Toxicology* 2006, 30, 519–523.
7. Habrdová V., Peters F. T., Theobald D. S. [et al.], Screening for and validated quantification of phenethylamine-type designer drugs and mescaline in human blood plasma by gas chromatography/mass spectrometry, *Journal of Mass Spectrometry* 2005, 40, 785–795.
8. Herzler M., Herre S., Pragst F., Selectivity of substance identification by HPLC-DAD in toxicological analysis using a UV spectra library of 2682 compounds, *Journal of Analytical Toxicology* 2003, 27, 233–242.
9. Kintz P., Godelar B., Tracqui A. [et al.], Fly larvae: a new toxicological method of investigation in forensic medicine, *Journal of Forensic Sciences* 1990, 35, 204–207.
10. Kirchherr H., Kühn-Velten W. N., Quantitative determination of forty-eight antidepressants and antipsychotics in human serum by HPLC tandem mass spectrometry: a multi-level, single-sample approach, *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2006, 843, 100–113.
11. Kratzsch C., Tenberken O., Peters F. T. [et al.], Screening, library-assisted identification and validated quantification of 23 benzodiazepines, flumazenil, zaleplone, zolpidem and zopiclone in plasma by liquid chromatography/mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization, *Journal of Mass Spectrometry* 2004, 39, 856–872.
12. Lechowicz W., Kala M., Walker J., Screening and quantification of the twenty-four drugs in oral fluid relevant for road traffic safety by means of LC-MS-MS/ESI, [in:] T2007 Proceedings of the International Conference on Alcohol, Drugs and Traffic Safety, The International Association of Forensic Toxicologists and 8th International Interlock Symposium, Seattle, Washington, August 26–30, 2007, Washington State Patrol, International Council on Alcohol, Drugs and Traffic Safety, The International Association of Forensic Toxicologists, Washington 2007 [available online at:] <http://www.icadts2007.org/print/169screen24drugs.pdf>.
13. Matoba K., Terazawa K., Estimation of the time of death of decomposed or skeletonised bodies found outdoors in cold season in Sapporo city, located in the northern district of Japan, *Legal Medicine* 2008, 10, 78–82.
14. 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.
15. Maurer H. H., Schmidt C. J., Weber A. A. [et al.], Validated electrospray LC-MS assay for determination of the mushroom toxins alpha- and beta-amanitin in urine after immunoaffinity extraction, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 2000, 748, 125–135.

16. Maurer H. H., Tenberken O., Kratzsch C. [et al.], Screening for library-assisted identification and fully validated quantification of 22 beta-blockers in blood plasma by liquid chromatography-mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization, *Journal of Chromatography A* 2004, 1058, 169–181.
17. Müller 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.
18. Peters F. T., Drummer O. H., Musshoff F., Validation of new methods, *Forensic Science International* 2007, 165, 216–224.
19. Smink B. E., Mathijssen M. P., Lusthof K. J. [et al.], Comparison of urine and oral fluid as matrices for screening of thirty-three benzodiazepines and benzodiazepine-like substances using immunoassay and LC-MS(-MS), *Journal of Analytical Toxicology* 2006, 30, 478–485.
20. Smink B. E., Brandsma J. E., Dijkhuizen A. [et al.], Quantitative analysis of 33 benzodiazepines, metabolites and benzodiazepine-like substances in whole blood by liquid chromatography-(tandem) mass spectrometry, *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2004, 811, 13–20.
21. Stanaszek R., Zuba D., A comparison of developed and validated chromatographic methods (HPLC, GC-MS) for determination of delta-9-tetrahydrocannabinol (⁹-THC) and delta-9-tetrahydrocannabinolic acid (⁹-THCA-A) in hemp, *Problems of Forensic Sciences* 2007, 71, 313–322.
22. van Wyk J. M. C., van der Linde T. C., Hundt H. K. L., Determination of ethanol in dipterous maggots on decomposing carcasses, [in:] *Aspect on forensic toxicology*, Kovatsis A. V., Tsoukali-Papadopoulou H. [eds.], Technika Studio, Thessaloniki 1995.
23. Weinmann W., Stoertzel M., Vogt S. [et al.], Tune compounds for electrospray ionisation/in source collision-induced dissociation with mass spectral library searching, *Journal of Chromatography A* 2001, 926, 199–209.
24. www.emcdda.eu.int, Intoxications with cocaine adulterated with atropine in four EU Member States. Information from the EMCDDA and REITOX Early Warning System (Nov./Dec. 2004 – Feb. 2005).
25. Zeeuw R. A. de, Franke J. P., Degel F. [et al., eds.], Thin-layer chromatographic R_f values of toxicologically relevant substances on standardized systems, Report XVII of the DFG Commission for Clinical-Toxicological Analysis, special issue of the TIAFT Bulletin, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim 1992.
26. Zeeuw R. A. de, Franke J. P., Maurer H. H. [et al., eds.], Gas chromatographic retention indices of toxicologically relevant substances on packed or capillary columns with dimethylsilicone stationary phases, Report XVIII of the DFG Commission for Clinical-Toxicological Analysis, special issue of the TIAFT Bulletin, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim 1992.
27. Zeeuw R. A. de, Franke J. P., Machata G., [et al., eds.], Gas chromatographic retention indices of solvents and other volatile substances for use in toxicological analysis, Report XIX of the DFG Commission for Clinical-Toxicological Analysis, special issue of the TIAFT Bulletin, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim 1992.
28. Zuba D., Medicines containing ephedrine and pseudoephedrine as a source of methcathinone, *Problems of Forensic Sciences* 2007, 71, 323–333.

Corresponding author

Maria Kała
Instytut Ekspertyz Sądowych
ul. Westerplatte 9
PL 31-033 Kraków
e-mail: mkała@ies.krakow.pl

PROBLEMY TOKSYKOLOGA ANALITYKA W DOBIE TECHNIK SPRZĘŻONYCH

1. Wstęp

Analizując rozwój toksykologii sądowej na przestrzeni wieków, można stwierdzić, że większość obowiązujących zasad postępowania analitycznego zostało sformułowanych w początkach jej rozwoju, a współcześni toksykolodzy jedynie weryfikują te zasady, mając do dyspozycji szeroką wiedzę i bogate zaplecze aparaturowe. Główne role w toksykologii sądowej odgrywają: poszkodowany, analityk, oceniający (lekarz) i orzekający (prawnik).

Analityk-toksykolog poszukuje, wykrywa i oznacza trucizny lub ich biomarkery. Stają się one dla niego analitykami w materiale uznanym za najbardziej właściwy, oznaczanymi za pomocą najbardziej odpowiednich metod. Nierzadko analityk nie ma możliwości wyboru ani metody, ani materiału. Dobór metod analitycznych jest ograniczony wyposażeniem laboratorium. Materiału jest czasem bardzo niewiele, ale i przy optymalnych jego ilościach występują trudności z identyfikacją analitu.

2. Rys historyczny

Trucizna towarzyszy ludzkości od zarania dziejów do dnia dzisiejszego. Jedne z pierwszych wzmianek o medycznym i pozamedycznym stosowaniu opium, bielunia dziędzierzawej, lulka czarnego, szaleju jadowitego, arsenu, antymonu, cyny, miedzi oraz śmiertelnej substancji z pestek brzoskwiń, znaleziono w papyrusach Ebersa. Starożytni Grecy dokonywali egzekucji skazańców, w tym Sokratesa, za pomocą cykuty. Obecnie w Stanach Zjednoczonych wykonuje się również wyroki śmierci przez zastosowanie tzw. iniekcji śmiertelnej. Iniekcja składa się z trzech kolejno podawanych, każdy w dawce śmiertelnej, środków, które wprowadzają skazanego w sen, zatrzymują oddech, a następnie akcję serca.

Ojciec medycyny, Hipokrates w 400 r. p.n.e. i współczesny mu Arystoteles opisali działanie trucizn, ich właściwości i odtrutki przy przedawkowaniu, a Dioskorides, lekarz cesarza Nerona, w 50 r. podał pierwszą klasyfikację trucizn, dzieląc je na roślinne, zwierzęce i mineralne.

Stosowanie trucizn w celach zbrodniczych datuje się od czasów Cesarstwa Rzymskiego, a na przestrzeni wieków kojarzone są z nim takie postaci, jak Livia, Lukrecja Borgia, Katarzyna Medycejska, Hieronim Spora. Cesarz Jovian w 364 r. p.n.e. został prawdopodobnie otruty tlenkiem węgla, który przez długi czas nazywany był dymem węglowym. Dioskorides przygotował 73-składnikową

odtrutkę, a stanowiska urzędowego truciciela i degustatora posiłków mówią same za siebie.

Ojciec toksykologii, Theophrastus Bombastus von Hohenheim Paracelsus, zdefiniował pojęcie trucizny jako „indywiduum chemiczne o określonych właściwościach i strukturze”, ale zwrócił uwagę również na dawkę: „wszystko jest trucizną i nic nią nie jest. Dawka decyduje tylko, czy coś nie jest trucizną”. Mateusz Orfila, którego lekarze uważają za praojca toksykologii, wydał w latach 1811, 1817, 1823 trzy dzieła o truciznach, w tym o kurarze, tlenku węgla i arsenie, a także o objawach i leczeniu. Przełom XIX i XX wieku to dynamiczny rozwój syntezy związków chemicznych, których liczba z roku na rok wzrasta.

Mimo że dla społeczeństwa i wymiaru sprawiedliwości trucicielska działalność była dobrze znana przez wieki, to trucizna w zwłokach ciągle pozostawała niewykryta. Jakkolwiek już w 1775 r. Carl Scheele wydzielił arsen w postaci lotnego związku w obecności cynku i wody królewskiej, a w krótkim czasie po wyizolowaniu z maku i tytoniu alkaloidów, odpowiednio morfiny i nikotyny, opisano najpierw reakcje strąceniowe dla tych związków, a następnie opracowano testy mikrokrystaliczne strąconego alkaloidu, to początki analizy toksykologicznej kojarzą się z osobami Jamesa Marsha, Mateusza Orfila i Jeana Stasa. Marsh w 1836 r. jako pierwszy wykrył podczas rozprawy sądowej arsen w treści żołądkowej i kawie przy użyciu skonstruowanego przez siebie aparatu. Test pozwalał wykryć arsen na poziomie 20 mikrogramów. Tok myślowy, jaki Marsh wyprowadził, był tak prosty, że ówczesni chemicy zaczęli mu zazdrościć. Metodę zaczęto upraszczać (nie stosowano aparatu, reakcje prowadzono w zbyt wysokiej temperaturze), co doprowadziło do wielu błędnych ekspertyz i mylnych wyroków sądowych. Po czterech latach Mateusz Orfila zastosował kwas azotowy lub saetrę w celu usunięcia „zakłóceń innej materii”, wykazując arsen w narządach wewnętrznych (wątrobie, nerkach, śledzionie, sercu, mięśniach). Przy analizie materiału pochodzącego z ekshumowanych zwłok zwrócił uwagę na konieczność badania ziemi cmentarnej oraz sformułował tezę: „okoliczności stanowią o wszystkim, samo stwierdzenie o niczym”. Jean Stas, student Orfila, śledził rozwój wydarzeń. Żył w czasach, kiedy działanie trucizn żrących było już dostatecznie znane, a sam powziął przypuszczenie, że w niektórych przypadkach ocet mógł służyć do zatarcia śladów zbrodni lub działania innej trucizny. Często stwierdzał, że trucizny łatwo się rozpadają w podwyższonej temperaturze lub pod działaniem powietrza, zanim się je zidentyfikuje. W 1851 r. wyosobnił nikotynę z mo-

czu, treści żołądkowej, jelit, wątroby, płuc, języka i krtań. Materiał, który mu dostarczano, podzielił na połowy, z czego jedną schował do ewentualnych powtórnych badań. By w czasie analizy niczego bezpowrotnie nie zniszczyć, prowadził ekstrakcję w naczyniach zamkniętych i powtarzał proces. Oprócz popularnych wówczas testów organoleptycznych stosował wzorzec czystej nikotyny, z którym porównywał alkaloid wyosobniony z badanego materiału w reakcjach z różnymi odczynnikami chemicznymi. Osiągnął sukces, bo po raz pierwszy wykazał truciznę roślinną w materiale biologicznym. Dopiero w 1868 r. prace Dragendorffa doprowadziły do opracowania metody systematycznej ekstrakcji i rozdziału nielotnych związków organicznych z materiału biologicznego. Do identyfikacji popularnych wówczas alkaloidów w ekstraktach stosowano testy farmakologiczne i reakcje barwne. Dla strychniny obserwowano tężyczkowe skurcze u żab, dla atropiny rozszerzenie źrenic u kota, dla akonityny drętwienie końca języka. Niektóre z reakcji barwnych stosowane są do dnia dzisiejszego, np. test Erdmanna (1861), Fröhdego (1866), Vitaliego (1880), Mandelina (1884), Marquisa (1896) i Meckego (1899). Równocześnie inni badacze zainteresowali się procesami rozkładu materiału biologicznego, których produkty określili mianem „jady trupie”. Kadaweryna została rozpracowana przez Selmiego w 1874 roku, Guareshi i Mosso wyosobnili z rozłożonego mózgu ludzkiego związek o działaniu kurary w 1883 roku, a w tym samym roku Marino-Zuco wyizolował z materiału biologicznego związek o składzie i właściwościach chemicznych odpowiadających neurynie [3].

3. Przygotowanie materiału

Obecnie dysponujemy wieloma instrumentalnymi technikami analitycznymi charakteryzującymi się mniejszą lub większą specyficznością, ale coraz większą czułością. Największą popularnością cieszą się tzw. techniki łączone, dostarczające w jednym procesie analitycznym kilku parametrów do identyfikacji, np. względnego czasu retencji i widma spektrofotometrycznego lub masowego. Tylko skomercjalizowane techniki immunochemiczne nie wymagają wstępnego przygotowania materiału, a jeżeli analityk stosuje proces przygotowawczy, to w celu zastosowania testu do badania innego materiału niż przewidywał producent. Dobór metod wstępnego przygotowania materiału zależy od celu analizy, a w szczególności, czy jest to systematyczna analiza toksykologiczna w przypadku poszukiwania trucizny, czyli tzw. analiza przesiewowa, czy analiza potwierdzająca, czy też analiza ilościowa, a także od technik analitycznych końcowego oznaczania. Niektóre techniki, szczególnie GC lub GC-MS, wymagają modyfikacji wielu analitów, czyli ich konwersji chemicznej (derywatywacji). Ogólnie można

stwierdzić, że im metoda bardziej czuła, tym bardziej jest wymagająca.

4. Techniki TLC i HPLC

Każde laboratorium powinno dysponować własnymi procedurami analizy przesiewowej. Procedury te mogą bazować na skomercjalizowanych lub opublikowanych systemach, ale ich odtwarzalność i wrażliwość (ang. *robustness*) w nowych warunkach laboratoryjnych musi być sprawdzona. Dotychczas najwięcej systemów istotnych dla toksykologii zostało opracowanych do analizy związków organicznych różnymi metodami, które ciągle jeszcze wybiera się w zależności od możliwości finansowych laboratorium, a nie uniwersalności i przydatności. Dla metody chromatografii cienkowarstwowej (TLC) należy wymienić system identyfikacji opracowany przez członków Komisji Systematycznej Analizy Toksykologicznej Międzynarodowego Stowarzyszenia Toksykologów Sądowych (TIAFT), obejmujący około 1600 związków [25] i system o handlowej nazwie Toxi-Lab firmy Varian obejmujący nie mniej niż 1200 leków i ich metabolitów. Dla metody GC najbardziej znanym systemem do analizy przesiewowej na obecność trudno lotnych związków organicznych jest opracowany przez wymienioną wyżej komisję TIAFT, a bazujący na dwóch rodzajach detektorów (płomieniowo-jonizacyjny, FID i uczulony na azot, NPD) i indeksach retencji 4500 związków [26]. Należy nadmienić, że w wyniku międzylaboratoryjnej współpracy powstał również system identyfikacji lotnych związków organicznych typu rozpuszczalniki istotne z toksykologicznego punktu widzenia [27]. Z chromatografiami cieczowymi wyposażonymi w detektory szeregu diod (HPLC-DAD) firmy Merck można nabyć system identyfikacji leków MTSS, przy pomocy którego związki z podziałem na kwaśne i zasadowe (z objęciem obojętnych w obu grupach) identyfikowane są na podstawie względnego czasu retencji i widma spektrofotometrycznego. Drugi istotny system HPLC-DAD, kompatybilny z wysokosprawnymi chromatografiami różnych firm, opracował Pragst i in. [8] dla prawie 2700 związków, uwzględniając, obok wyżej wymienionych elementów identyfikacyjnych, strukturę cząsteczki przez zestawienie 1600 chromoforów lub ich kombinacji.

5. Techniki GC-MS

Najnowsze chromatograficzne techniki łączone wykorzystujące detekcję mas (GC-MS, GC-MS-MS, LC-MS, LC-MS-MS) również doczekały się wielu opracowań aplikacyjnych. Obecnie integralną częścią każdego rodzaju aparatu GC-MS jest biblioteka referencyjnych widm masowych, która umożliwia wytypowanie widm

potencjalnie podobnych do identyfikowanego związku wraz z prawdopodobieństwem dopasowania. Dla techniki GC-MS z jonizacją elektronami (EI) ze względu na obszerność na pierwszym miejscu należy wymienić zaktualizowaną bibliotekę The Wiley Registry 8th Edition/NIST 2008 (W8/N08, ISBN: 978-0-470-42520-6) stanowiącą połączenie dwóch dotychczas oddzielnych bibliotek Wileya (The Wiley Registry of Mass Spectral Data) i NIST 2008 (Państwowego Instytutu Wzorców, National Institute of Standards). W8/N08 zawiera 562000 widm EI, 5308 widm jonów macierzystych (prekursorów) poddawanych fragmentacji w technice MS-MS, a ponadto ponad 2 mln nazw związków chemicznych i ich synonimów, 35 000 wzorów strukturalnych i 43 000 indeksów retencji dla GC. Z biblioteką tą zintegrowany jest również automatyczny program do porównywania widm masowych i identyfikacji (Automated Mass Spectrometry Deconvolution and Identification System, AMDIS). Dla potrzeb analizy toksykologicznej najbardziej przydatną jest biblioteka Pflieger/Maurer/Weber, która w roku 2006 zawierała 7800 widm leków, pestycydów, ich metabolitów, produktów derywatywacji (szczególnie pochodnych metylowych i sililowych) i artefaktów zebranych w standardowych warunkach. Biblioteka ta zawiera również dodatkowe istotne dane o związkach, jak indeksy Kovatsa, wzory strukturalne lub empiryczne, masę molową, numer rejestracyjny (CAS) w *Chemical Abstract Service*, nazwę grupy farmakologicznej, do której związek jest zaliczany, rodzaj biopróbki i opis metody przygotowania tej próbki, która została zastosowana przed wykreśleniem widma. Pomimo tego nie jest prawdą, że wszystkie związki macierzyste i ich metabolity, nawet z tej biblioteki, mogą być objęte jedną procedurą analityczną. Jednakże właśnie Maurer (czyli jeden ze współautorów wyżej wymienionej biblioteki) i in. opracowali najbardziej dotychczas uniwersalną metodę wykrywania i identyfikacji ponad 2000 związków (leków i ich metabolitów z 20 grup farmakologicznych) w jednym ekstrakcie (pH 8–9) z moczu po jego hydrolizie kwaśnej przy wykorzystaniu techniki GC-MS-EI [14].

Na początku rozwoju spektrometrii mas widma masowe identyfikowanych związków były porównywane wizualnie. W miarę rozwoju techniki komputerowej zostały opracowane programy do porównywania widma identyfikowanego związku z widmami z biblioteki. Programy te są stale doskonalone i pozwalają na istotną redukcję czasochłonności przeszukiwań i wzrostu specyficzności wyników tych przeszukiwań. Wstępna identyfikacja widm przy pomocy bazy bibliotecznej odbywa się na zasadzie bezpośredniego porównania nieznanego widma z poszczególnymi widmami z biblioteki i (lub) odwrotnego procesu, w którym widma z biblioteki są porównywane z nieznanym widmem masowym. Do identyfikacji konieczne jest zebranie widma typu EI, rejes-

trując całkowity prąd jonowy. O identyfikacji nieznanego związku w matrycy biologicznej dla celów sądowych można mówić po analizie wzorca wytypowanego przy pomocy biblioteki w warunkach zastosowanych dla związku identyfikowanego.

6. Techniki LC-MS

Metody GC-MS-EI są ciągle najbardziej popularne w analizie toksykologicznej ze względu na bogatsze widma masowe, z których można wnioskować o strukturze identyfikowanego związku, ale pojedyncze lub tandemowe techniki LC-MS z jonizacją przez elektrorozpylanie (ESI) lub jonizacją chemiczną pod ciśnieniem atmosferycznym (APCI) nabierają coraz większego znaczenia, szczególnie do analizy ilościowej zidentyfikowanych związków. Fotojonizacja pod ciśnieniem atmosferycznym (APPI) jest stosowana do analizy niepolarnych związków, dla których jonizacje typu ESI i APCI nie są efektywne. Opracowując procedurę przesiewową, a więc i identyfikacji, z zastosowaniem techniki LC-MS, należy wziąć pod uwagę, że widma masowe typu ESI i (lub) APCI uzyskane w warunkach pojedynczej fragmentacji są – w przeciwieństwie do widm typu EI – bardzo ubogie we fragmenty. Małą wartością identyfikacyjną charakteryzuje się również jon pseudomolekularny uzyskany w warunkach APCI. Wartość identyfikacyjna widm wzrasta po zastosowaniu fragmentacji posobnej i zbieraniu widm produktów jonów macierzystych, czyli jonów powstających w wyniku rozpadu jonu macierzystego po fragmentacji. Drugim sposobem jest prowadzenie fragmentacji związków wewnątrz źródła (ang. in-source fragmentation) przy wysokich napięciach fragmentora, co pozwala na tworzenie się większej liczby fragmentów, w tym pozwalających na wnioskowanie o strukturze związku. Nowoczesne aparaty pozwalają na bardzo szybkie przełączanie napięć, co umożliwi rejestrację widm przy różnych wartościach napięć fragmentora, np. 100 i 200 V [14], w czasie rozdziału chromatograficznego. Wielu użytkowników aparatów LC-MS utrzymuje, że dla różnych aparatów proces fragmentacji może się znacząco różnić i ta sama wartość napięcia fragmentora może skutkować różną intensywnością wytworzonych fragmentów. Weinmann i in. [23] wykazali, że w różnych typach aparatów fragmentacja wewnątrz źródła może zachodzić powtarzalnie i widma masowe uzyskane w wyniku fragmentacji wewnątrz źródła metodą dysocjacji zderzeniowej (ang. collision-induced dissociation, CID) są odtwarzalne, jeżeli przed badaniem sprawność aparatu zostanie wyregulowana przy użyciu typowej mieszaniny substancji wzorcowych, która składa się z haloperydolu, paracetamolu, metronidazolu lub metamizolu. Dalej autorzy ci stwierdzili, że jest możliwe korzystanie z biblioteki widm masowych utworzonej w warunkach metody LC-MS-ESI-

CID przy użyciu innego aparatu, jeżeli energie CID będą regulowane za pomocą co najmniej 2 spośród wyżej wymienionych substancji wzorcowych. Drugim istotnym problemem dla ESI jest redukcja jonizacji analitu przez współobecne związki w próbce, co nazywa się tłumieniem lub supresją jonów, a co może doprowadzić do przecenienia silnie toksycznego związku, którego stężenie w próbce jest niskie. Supresję jonów wywołują trudniej lotne związki, ponieważ mogą one wpływać na tworzenie się chmury kropelek zawierających analit oraz odparowywanie z nich rozpuszczalnika, przez co zmienia się liczba naładowanych jonów w fazie gazowej przed dostaniem się do detektora. Tłumiącymi związkami mogą być sole, endogenne składniki matrycy, leki, ich metabolity, a nawet deuterowane wzorce wewnętrzne. Dams i in. [4] badali wzajemny wpływ typu jonizacji, metody przygotowania próbki i rodzaju biopróbki (mocz, ślina i osocze) na występowanie efektu matrycowego. Stwierdzili oni, że obydwie typy jonizacji są bardzo wrażliwe na rodzaj matrycy, przy czym ESI bardziej od APCI, a metoda przygotowania próbki może zredukować lub spotęgować efekt matrycowy. Zarówno zmniejszenie, jak i zwiększenie jonizacji, ma wpływ na czułość, odtwarzalność, dokładność i liniowość ilościowej metody LC-MS-MS oznaczania związków w biopróbkach. Biorąc powyższe pod uwagę, można stwierdzić, że dla metod LC-MS lub LC-MS-MS najczęściej bibliotek jest dotychczas tworzone „sposobem domowym” przez poszczególne laboratoria. Biblioteki te dobrze spełniają swoją rolę dla poszczególnych aparatów lub tych samych typów aparatów. Müller, Weinmann i in. zbudowali bibliotekę potomnych widm masowych (MS-BUS) typu ESI z fragmentacją CID wewnątrz źródła dla metody LC-MS-MS wykrywania i identyfikacji 800 leków przy trzech (niskiej, średniej i wysokiej) energiach kolizji. Ponadto ci sami autorzy stworzyli bibliotekę widm masowych uzyskanych przy użyciu spektrometru masowego z jednym kwadrupolem, a Schreiber bibliotekę widm typu ESI i APCI do identyfikacji pestycydów i związków wybuchowych. Te cztery biblioteki zostały skomercjalizowane (<http://www.chemicalsoft.de/index-ms.htm>).

7. Techniki ICP-OES i ICP-MS

Rozwój technik analitycznych nie dotyczy tylko analizy związków organicznych. Obok od dawna stosowanych do badania materiału biologicznego na zawartość metali technik spektrometrii absorpcyjnej płomieniowej (F-AAS) i bezpłomieniowej, w tym z generowaniem zimnych par rtęci (CV-AAS), coraz częściej wykorzystuje się technikę optycznej spektrometrii emisyjnej z plazmą wzbudzoną indukcyjnie (ICP-OES) lub spektrometrii mas z jonizacją plazmy wzbudzoną indukcyjnie (ICP-MS). Techniki te umożliwiają w jednym procesie analitycznym objęcie analizą około 70 pierwiastków, a ich kon-

kretna liczba jest uzależniona od liczby substancji wzorcowych, którymi dysponuje analityk. Metodą z wyboru do oznaczania rtęci, arsenu, selenu itp. jest atomowa spektrometria absorpcyjna z generacją wodorków (HG-AAS), natomiast metoda atomowej spektrometrii absorpcyjnej z atomizacją elektrotermiczną (ET-AAS) umożliwia oznaczenie śladowych ilości metali ciężkich nie tylko w zakresie poziomów normalnych, ale również spotykanych w zatruciach chronicznych, a w przypadkach niektórych pierwiastków, np. talu, ołowiu lub selenu, w zatruciach ostrych. Aby w czasach dzisiejszej chemizacji życia zatrucie, szczególnie chroniczne, toksycznymi metalami, półmetalami i niemetalami mogło być wykluczone lub potwierdzone, konieczna jest znajomość poziomów referencyjnych pierwiastków występujących w ilościach śladowych w poszczególnych rodzajach materiału biologicznego.

8. Współczesna analiza toksykologiczna

Ze względu na wzrastającą liczbę próbek, w analizie toksykologicznej dąży się do automatyzacji procesu analitycznego, opracowuje się programy komputerowe służące do obsługi procesu pomiarowego, czyli strojenia automatycznego, zbierania, edycji i archiwizacji danych, tworzenia raportów, przeszukiwania bibliotek i analizy ilościowej. Dostępna jest obszerna literatura przedmiotu i publikacje internetowe. Stale opracowywane procedury analityczne są weryfikowane poprzez wewnętrzne i zewnętrzne systemy kontroli jakości wyników badań. To wszystko umożliwia analitykowi toksykologowi sądowemu objęcie analizą przesiewową około 3000 związków w codziennej pracy dobrze wyposażonego laboratorium. Pozostałe związki, o istotnym znaczeniu toksycznym, określane na około 100 000, wymagają zastosowania specyficznej, ukierunkowanej na dany związek, procedury analitycznej.

W sytuacji, kiedy znane są kanony i metody analityczne, istnieje świadomość pułapek metodycznych, stosuje się powszechnie akceptowane procedury analityczne do poszukiwania i identyfikacji trucizn oraz ich wykrywania za pomocą biomarkerów narażenia, skutków i wrażliwości w materiale umożliwiającym potwierdzenie zatrucia w okresie występowania objawów (krew, ślina, mocz) lub w okresie po wystąpieniu objawów zatrucia (mocz, włosy, pot), to i tak ogólna wiedza, dociekliwość analityka, logiczne kojarzenie faktów, a coraz rzadziej przypadek, decydują o powodzeniu analizy. Współczesne metody analityczne pozwalają na wnioskowanie o przyczynie zgonu w wyniku zatrucia na podstawie analizy larw much rozwijających się na resztkach szczątków ludzkich [6, 9]. Materiał ten służy również do szacowania czasu zgonu zarówno w gorącym [22], jak i zimnym klimacie [13].

9. Walidacja metod

Aby jakkolwiek nowa metoda (przesiewowa, potwierdzająca, jakościowa i ilościowa) mogła być zastosowana dla celów toksykologii sądowej i (lub) klinicznej, musi być zwalidowana w pełnym zakresie zgodnie z międzynarodowymi wymaganiami. W odniesieniu do metod ilościowych stosowanych do analizy bioprobek panuje ogólna zgoda, że muszą być wyznaczone takie parametry, jak selektywność, model kalibracji (zakres liniowości), trwałość analitów, dokładność (rozrzut wyników), precyzja (powtarzalność, pośrednia precyzja) i najniższa granica oznaczalności (*LLOD*). Za dodatkowe parametry, które również powinny być zbadane, uważa się granicę detekcji (*LOD*), odzysk, odtwarzalność i wrażliwość metody na niewielkie zmiany (*ruggedness* lub *robustness*). Dla metod jakościowych nie osiągnięto jeszcze konsensusu, ale większość badaczy uważa, że konieczna jest ocena selektywności i granicy wykrywalności, a dodatkowo precyzji, odzysku i wrażliwości. Dla metod wykorzystujących LC-MS zawsze powinien być zbadany efekt matrycowy, np. supresja jonów lub wzmoczenie jonizacji szczególnie w jonizacji typu ESI [18]. Zastosowanie deuterowych pochodnych analitów jako wzorców wewnętrznych, sprawdzenie poprawności metod przez analizę materiałów referencyjnych o zasięgu międzynarodowym i udział w porównaniach międzylaboratoryjnych ułatwia stałą kontrolę niepewności wyniku. O znaczeniu walidacji metod mogą świadczyć bardzo restrykcyjne wymagania, jakie stawia decyzja Komisji Europejskiej 2002/657/EC z późn. zm. (ostatnia z roku 2004) metodom analitycznym stosowanym do monitorowania pozostałości środków objętych ścisłą kontrolą w produktach spożywczych pochodzenia zwierzęcego (tabela I). Walidacja metody jest integralną częścią procesu zapewniania jakości badań w każdym współczesnym laboratorium analitycznym stosującym zasady dobrej praktyki laboratoryjnej i stanowi warunek konieczny zarówno do uzyskania akredytacji, jak i uznania wyników prowadzonych w nim badań na arenie międzynarodowej. Wyznaczenie parametrów walidacyjnych bezsprzecznie wydłuża czas opracowania metody, ale jest niezbędne dla potwierdzenia jej przydatności do osiągnięcia zamierzonego celu analitycznego. Proces ten nie stoi w sprzeczności z powiedzeniem Alberta Einsteina, że „wszystko powinno być zrobione tak prosto, jak to jest możliwe, ale nigdy prościej”.

10. Współcześnie przyjmowane środki

Nieograniczonym źródłem środków będących przedmiotem współczesnej analizy toksykologicznej jest rynek narkotykowy. Dostarcza on szerokiego asortymentu środków syntetycznych i pochodzenia roślinnego, które

w niniejszej pracy określono mianem klasycznych środków psychoaktywnych, co pozwoliło zredukować do minimum ich omówienie. Wiele z nich pochodzi z przemytu, mogą także pochodzić z dużych nielegalnych laboratoriów (amfetamina i jej coraz liczniejsze pochodne), ale są również wytwarzane sposobem domowym z dostępnych bez recepty leków, np. Tussipect, Efrinol czy Sudafet [28]. Nowo wprowadzane na rynek narkotykowy specyfiki, jak fentanyl i jego pochodne (np. 3-metylofentanyl zwany Krokodylem), charakteryzują się coraz silniejszym działaniem, a nieprzewidywalne pod względem działania mieszaniny znanych środków, np. MDMA lub kokainy z atropiną, stały się przyczyną śmiertelnych zatruc wielu nieświadomych użytkowników [24]. Pojawienie się na rynku narkotykowym konopi modyfikowanych genetycznie, zawierających niewielkie ilości (poniżej 0,20%) ⁹-tetrahydrokannabinolu (9THC) i wysoką zawartość kwasu ⁹-tetrahydrokannabinolo-2-karboksylowego (9THCA-A), nie uszło uwadze analityków ani przedstawicieli wymiaru sprawiedliwości.

Do badania konopi wprowadzono metody pozwalające na oznaczenie bądź obu związków oddzielnie, bądź łącznie [21]. 1 lutego 2007 roku znowelizowano ustawę z dnia 29 lipca 2005 roku o przeciwdziałaniu narkomanii. Ostatnio odnotowano „wynałazki”, których celowości przygotowania i wprowadzania do obrotu nie da się praktycznie wytłumaczyć. Można tu wymienić marihuanę wzbogaconą łożem lub zmieszaną z mikroskopijnymi drobkami szkła [24].

Dużym problemem jest rynek suplementów diety. Największym kanałem dystrybucji tych środków są obecnie apteki. Obserwuje się wzrost ich sprzedaży. W roku 2006 wyniósł on 33%, jego wartość oszacowano na około 1 miliard złotych, a wzrost sprzedaży w 2007 r. wyniósł 25%. Suplement diety to zgodnie z Ustawą z dnia 25 sierpnia 2006 r. o bezpieczeństwie żywności i żywienia (Dz. U. nr 171, poz. 1225) „środek spożywczy, którego celem jest uzupełnienie normalnej diety, będący skoncentrowanym źródłem witamin lub składników mineralnych lub innych substancji wykazujących efekt odżywczy lub inny fizjologiczny, pojedynczych lub złożonych, wprowadzony do obrotu w formie umożliwiającej dawkowanie, w odpowiednich postaciach, z wyłączeniem produktów posiadających właściwości produktu leczniczego w rozumieniu przepisów prawa farmaceutycznego”. W różnych sklepach można jednak nabyć wiele produktów sprzedawanych jako suplementy diety, które niewątpliwie mogą spowodować rozstrój zdrowia, a czasem nawet zagrażać życiu. W skład preparatów sprzedawanych pod nazwą Testo Stack, Male Multiple, Female Multiple, wchodzi między innymi witaminy odpowiednio A, E i D. Dzienna dawka tych witamin, po przyjęciu preparatu w zalecanej ilości, sięga odpowiednio 1600 g, 400 IU i 400 IU, co przy dziennym na nie zapotrzebowaniu wynoszącym 600 g,

200 IU i 33 IU, budzi duże zastrzeżenia. Nadzór bieżący nad suplementami diety sprawują organy Państwowej Inspekcji Sanitarnej, które w przypadku stwierdzenia, że sprzedawany środek nie spełnia wymagań dla suplementu diety, środka spożywczego czy też środka leczniczego, podejmują decyzję o wstrzymaniu wprowadzania tego środka do obrotu lub wycofaniu z obrotu. Bez jakiegokolwiek kontroli pozostają zakupy w sklepach internetowych. Do „koszyka” można włożyć wszystko, od sterydów anabolicznych i środków dopingujących, do różnych środków odchudzających, zwłaszcza naturalnych preparatów chińskich. Te ostatnie reklamowane są najczęściej jako wspomagające odchudzanie preparaty pochodzenia roślinnego, a zawierają duże dawki związków syntetycznych (sibutamina, desmetylosibutamina, fenfluramina) o strukturze i działaniu pochodnych amfetaminy. Ponadto niektóre chińskie preparaty ziołowe mają tak wysoką zawartość ołowiu, że przy dłuższym ich przyjmowaniu wywołują objawy zatrucia tym metalem. Liczne artykuły prasowe mające na celu ostrzeżenie społeczeństwa przed zgubnymi skutkami przyjmowania tzw. dopalaczy, ale publikowane pod intrygującymi tytułami – „Doping mózgu”, „Torpeda w głowie”, „Kosmetyka umysłu” – mogą zachęcać do doświadczenia działania takich środków. Atrakcyjne nazwy, np. Energy pills, Euphoric pills, Psychedelic pills, *Salvia divinorum* (szałwia meksykańska), Magiczny ogród, Fly agaric (muchomor czerwony), Indiański wojownik, pod którymi są dostępne w sklepach internetowych z zapewnieniem o nieszkodliwości i etykietce zgodnej z wymaganiami dla suplementów diety, kuszą wielu młodych ludzi. W obecnych czasach wiele osób nie wyobraża sobie codziennego życia bez wypijania wielu litrów kawy dziennie, a w 2007 r. wzrosła o 145% konsumpcja napojów energetyzujących, zawierających kofeinę (działającą pobudzająco), taurynę (regenerującą mięśnie), witaminy z grupy B (B₆ i B₁₂, które utrzymują sprawność ośrodkowego układu nerwowego) oraz inozytol (składnik lecytyny, który łagodnie uspokaja i podnosi sprawność umysłu). Inni sięgają po preparaty farmakologiczne dostępne wyłącznie na receptę lub przywiezione z zagranicy, np. Ritalin (preparat stosowany w leczeniu dzieci z ADHD, a u ludzi zdrowych poprawiający koncentrację uwagi i zdolność uczenia się), Aricept (lek zwiększający poziom acetylocholino w mózgu, stosowany w leczeniu choroby Alzheimera), Vigil (stosowany w leczeniu narkolepsji), Propranolol (w małych dawkach ma działać na obwodowy układ nerwowy), Nootropil (usprawnia pracę mózgu), Ginko biloba (pobudza działanie mózgu). Ten ostatni preparat w Stanach Zjednoczonych jest popularniejszy i bardziej dochodowy od aspiryny, dostarczając wytwórcy miliard dolarów rocznie.

Ze względu na nie zawsze w dobrym kierunku rozwijające się zainteresowania człowieka, wzrasta liczba jadów i toksyn, z którymi toksykolog sądowy może się

spotkać. Znanych jest około 750 toksyn. Występują one w ponad 1000 gatunków roślin, 1200 trujących morskich organizmach, u 700 ryb, 400 jadowitych wężów, 60 kleszczy, 75 skorpionów, 200 pajaków i u kilku ptaków, których pióra tylko przez dotyk mogą działać toksyczne. Niejeden taki egzotyczny osobnik przywieziony z zagranicznej podróży lub kupiony przez internet i hodowany w niewłaściwych warunkach bądź wyrzucony ze względu na uciążliwość, jaką stworzył właścicielowi, może stać się przyczyną podjęcia żmudnych badań toksykologicznych.

Przedstawiciele wszystkich krajów świata, odpowiedzialni za regulacje prawne, prewencje i przeciwdziałanie zagrożeniom, jakie niesie dynamicznie rozwijający się rynek narkotykowy i nieograniczona inwencja człowieka do poszukiwania środków modulujących psychikę, są świadomi, że niektóre ich działania nie nadążają za stanem faktycznym. Objęcie kontrolą prawną nowo wprowadzonego na rynek narkotykowy środka psychoaktywnego wymaga czasu i podstaw. Takie podstawy i wypełnienie luki czasowej daje działalność (zbieranie i wymiana informacji, kontrola rynku i szacowanie ryzyka zdrowotnego) Systemu Wczesnego Ostrzegania (EWS) o nowych narkotykach, który funkcjonuje przy Europejskim Centrum Monitorowania i Narkotyków i Narkomanii (EMCDDA), powołany przez Radę UE (Decyzja 2005/387/JHA z 10 maja 2005 r.). EMCDDA współpracuje również z Europolem. W Polsce EWS działa przy Krajowym Biurze ds. Przeciwdziałania Narkomanii, które jest agendą Ministerstwa Zdrowia.

11. Wzorce konsumpcyjne

Każdy z wyżej wymienionych oraz wiele innych, niewymienionych tutaj środków, może stać się przedmiotem analizy toksykologicznej jako czynnik zagrażający zdrowiu a nawet życiu konsumenta. Wobec możliwości wykrycia w procesie analitycznym coraz mniejszych ilości ksenobiotyków, szczególnej wagi nabiera interpretacja uzyskanych wyników. Musi ona być dokonana w odniesieniu do poszkodowanego z uwzględnieniem trzech aksjomatów – wrażliwości osobniczej, dawki i granicy pomiędzy leczeniem a zatruciem. Wrażliwość osobnicza zależy od właściwości ksenobiotyku, czynników wewnątrzustrojowych, czyli rasy i płci, zmienia się z wiekiem i jest związana ze stanami chorobowymi wrodzonymi i nabytymi (alergie, choroby cywilizacyjne) oraz wadami genetycznymi, których obserwujemy coraz więcej. Ilościowe ujęcie trucizny w definicji Paracelsusa zwiększa liczbę analitów istotnych z toksykologicznego punktu widzenia. Rzadko jednak w dzisiejszych czasach spotyka się zatrucia śmiertelne po przyjęciu dużych dawek mało toksycznych związków. Narkomania, lekomania, politoksykomania i polipragmazja, które najczęściej prowadzą do uzależnień, tolerancji i zespołów abstynencji, są obec-

nie najbardziej rozpowszechnione. Szeroko stosowana politerapia powoduje dostępność do wielu różnego rodzaju leków. W związku z tym obecnie często obserwuje się zatrucia mieszaniną leków lub środków toksycznych, w wyniku których występują liczne metabolity. Możliwość wystąpienia różnego typu interakcji przy takich wzorcach konsumpcyjnych znacznie utrudnia interpretację wyniku w odniesieniu do ciężkości zatrucia i rozgraniczenia leczenia od zatrucia. Rzadko kiedy znana jest dawka przyjętego środka, najczęściej analityk musi ją sam określić poprzez interpretację wyznaczonego stężenia. Znajomość stopnia toksyczności związku określonego przez dawkę śmiertelną (tabela II) ułatwia dobór odpowiedniej metody i przydatnego materiału do analizy. Jak wynika z tabeli II, obecnie w leczeniu są stosowane, a więc potencjalnie dostępne, środki pod względem działania wielokrotnie silniejsze od związków uznawanych powszechnie za największe trucizny (cyjanek, arsen, tal). Przykładem może być botulina, która znajduje zastosowanie przy leczeniu mimowolnych skurczów mięśni (dystonii), nadmiernego pocenia się, spastyczności różnego pochodzenia (np. przy porażeniu mózgowym, stwardnieniu rozsianym), niedowładzie połowicznym u dzieci, a nawet w kosmetyce w celach estetycznych, tj. do usuwania zmarszczek. Toksykolog sądowy coraz częściej spotyka się z rozszerzającym się asortymentem leków stosowanych w leczeniu w celu zwiótczenia mięśni, których każda dawka wprowadzona do organizmu człowieka bez kontroli medycznej jest śmiertelna. Należy również nadmienić, że te bardzo toksyczne związki (botulina, 3-metylofantyl, fluorooctan sodu) stanowią broń biologiczną.

12. Strategie analityczne

Do niedawna w wielu laboratoriach szpitalnych stosowano oddzielne procedury postępowania analitycznego dotyczące każdego związku zleconego przez lekarza, a będącego w spisie wykonywanych analiz. W miarę wyposażania laboratoriów w techniki instrumentalne dąży się do objęcia procedurą jak najszerszego spektrum związków, co od dawna ma miejsce w laboratoriach sądowych. Ze względu na czułość technik sprzężonych niektórzy analitycy stosują jedną metodę przygotowania materiału (ekstrakcja i derywatyzacja) dla wszystkich analitów, nie zważając na niską wydajność procesu dla związków o charakterze kwaśnym poddawanych ekstrakcji ze środowiska alkalicznego. Techniki sprzężone umożliwiają analizę ekstraktu w zaplanowane zmieniających się warunkach pomiarowych (np. przy dwóch napięciach fragmentora) w ciągu jednego procesu. Podstawą innych procedur analitycznych jest zastosowanie uzupełniających się metod wykorzystujących odmienne rodzaje detekcji. Liczni analitycy są zwolennikami eks-

trakcji zależnej od pH i łączenia ekstraktów przed analizą instrumentalną lub rozdzielnego ich analizowania. W wielu laboratoriach opracowuje się metody przeznaczone do badania określonego rodzaju materiału biologicznego (krew, mocz, ślina, włosy) z maksymalnym ilorazem wiarygodności (*MAP*) [19], a także konkretnych grup farmakologicznych (benzodiazepiny [11, 20], leki przeciwdepresyjne [10], beta-blokery [16]. Coraz więcej opracowywanych metod dotyczy konkretnego problemu i materiału, np. metoda LC-MS-APCI wykrywania i oznaczania we krwi środków ułatwiających dokonanie przestępstwa (gwałtu, grabieży) [1], metoda LC-MS-ESI oznaczania środków podobnie działających do alkoholu we krwi kierowców [12], fenyloalkilamin pochodzenia roślinnego w osoczu [2], fenyloalkilamin określanych mianem narkotyków projektowanych zaliczanych do grupy 2C, a ściślej zawierających w swej strukturze dwie grupy dimetoksyłowe przyłączone do pierścienia benzenowego w pozycji 2 i 5, w osoczu [7] oraz toksyn (- i -amanityny) w moczu [15].

Techniki sprzężone umożliwiają opracowanie bardzo uniwersalnej metody, która pozwala na przeprowadzenie analizy przesiewowej, identyfikacji i analizy ilościowej. Dla techniki LC-MS na kolejne etapy takiego postępowania z jednym ekstraktem z biopróbki składa się analiza przesiewowa, w której typowane są podejrzane związki, a następnie identyfikacja tych związków w trybie rejestrowania całkowitego prądu jonowego. Wówczas do analizy ilościowej wystarczające jest monitorowanie po jednym jonie każdego zidentyfikowanego związku. Jako jedne z obszerniejszych dotychczas opracowanych metod przesiewowych z zastosowaniem techniki LC-MS należy wymienić metodę LC-MS-MS-QTrap opracowaną przez Müllera i in. [17] obejmującą 301 związków we krwi i w moczu oraz metodę LC-MS-MS-ESI opracowaną przez Gergova i in. [5] obejmującą 238 leków we krwi.

13. Wnioski i perspektywy

Techniki sprzężone są i będą niezastąpionymi narzędziami analitycznymi w klinicznej i sądowej toksykologii. Pozwalają na opracowanie metod obejmujących szerokie spektrum związków. Ze względu na powszechny dostęp do obszernych zbiorów widm referencyjnych techniki GC-MS z jonizacją typu EI znajdują jeszcze ciągle większe zastosowanie do identyfikacji ksenobiotyków i analizy przesiewowej w przeciwieństwie od technik LC-MS, które są stosowane głównie do analiz ukierunkowanych i ilościowych. Jednakże coraz częstsze stosowanie fragmentacji posobnej i nowych typów analizatorów mas, np. czasu przelotu (TOF) lub połączenia kwadrupola z pułapką jonową (QTrap) zwiększa znaczenie techniki LC-MS w analizie przesiewowej, zwłaszcza ukierunko-

wanej na związki dotyczące określonego problemu, np. środków podobnie działających do alkoholu. Wysoka czułość tych analizatorów umożliwia równoczesne wykrycie i oznaczenie wielu związków w przypadkach niskich stężeń i niewielkiej ilości biopróbki. Dla takich założeń szczególnej wagi nabiera kontrola całego procesu analitycznego, za którą odpowiedzialny jest analityk. Przy opracowywaniu metod powinny być uwzględnione ogólnie akceptowalne kryteria międzynarodowe. Tylko przy zachowaniu takich warunków uzyskane wyniki są pewne i mogą stanowić podstawę do wykluczenia lub potwierdzenia obecności w analizowanej biopróbce rzadko spotykanych ksenobiotyków, a następnie dokonania oceny, czy wyznaczone stężenia są wynikiem stosowania ich w celach terapeutycznych czy też przedawkowania lub nadużywania.