



INHALATION ANAESTHETICS IN BIOLOGICAL MATERIAL

Bogdan TOKARCZYK, Wojciech LECHOWICZ

Institute of Forensic Research, Krakow, Poland

Abstract

Crimes where victims are first incapacitated with volatile sleeping or anaesthetic agents are fairly untypical, but are being reported increasingly frequently. Agents used during the commission of a criminal offence of this kind have characteristics of inhalation anaesthetics. They penetrate the organism through the respiratory tract due to their volatility, and then they act on the central nervous system. They are used for general anaesthesia in medical treatment. In this work, two complementary methods have been evaluated – gas chromatography with flame ionisation detection (GC-FID) and gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS), developed for detection, identification and quantification of volatile organic compounds, including inhalation anaesthetics in biological material (blood, urine, internal tissue specimens) and in various industrial products (glues, cleaning liquids, aerosols, paints). Because of their high resolution, these methods can also be applied to analysis of multicomponent mixtures, consumption of which could cause poisoning. The usefulness of the developed methods for forensic purposes was demonstrated in the analysis of blood and unknown liquid samples encountered during routine expert opinion work. Poisoning with a mixture of chloroform and carbon tetrachloride and also administration of sevoflurane during an operation were confirmed.

Key words

Inhalation anaesthetics; Sevoflurane; Volatile substances; Identification; GC-MS; GC-FID.

Received 4 July 2008; accepted 16 September 2008

1. Introduction

Anaesthetics are substances used for controlled, reversible (temporary) and complete stopping of pain, consciousness and reflexes of the treated person. Volatile liquids, e.g. diethyl ether, chloroform, diethyl chloride, halothane and gases, e.g. nitrous oxide, ethylene and cyclopropane are the best known and earliest used inhalational anaesthetics. Apart from anaesthetic action, many of these compounds are characterised by psychoactive and hallucinogenic effects; thus many of them are used for the purpose of intoxication. Due to their toxic properties, in medical treatment they have been substituted by modern, less harmful or even harmless compounds such as enflurane, isoflurane, sevoflurane and desflurane. The following parameters

are used to characterise and compare the activity of particular inhalational anaesthetics:

- solubility in blood and fats, defined by the blood-gas partition coefficient, which describes the rapidity of anaesthetic induction and awakening and the blood-fat partition coefficient, which measures its potency;
- the minimum alveolar concentration defining the potency of the inhalation anaesthetic. It is defined as the minimum concentration of anaesthetic vapours in alveolar air, which prevents 50% of patients from responding to skin incision;
- the coefficient λ which characterises the time taken for the action to take effect; the higher the value of λ , the longer the time necessary to induce anaesthesia;
- toxicity and metabolism;

– the volume percentage (vol %), meaning the percentage of the gas in the respiratory mixture.

Inhalation anaesthetics are considered potentially dangerous pharmacological agents. This is because of the fact that their toxic dose, causing respiratory failure, is only 2–4 times higher than the concentration inducing the desired anaesthetic effect [14].

The first anaesthetic agent in modern history was diethyl ether (1842) [6]. Then chloroform was applied for general anaesthesia, nitrous oxide, particularly for dental procedures (1844), cyclopropane (1929) and trichloroethylene (1930). The major disadvantages of these compounds (except nitrous oxide) were their high toxicity (chloroform, trichloroethylene) and flammability (cyclopropane).

The first non-flammable inhalation anaesthetic was halothane introduced to use in 1956 [2]. It is a colourless, volatile liquid with a characteristic, pleasant smell. It does not irritate the airways. It is characterised by strong hypnotic and weak analgesic activity. In the anaesthetic mixture it is mixed with air, oxygen or nitrous oxide. Because of its drawbacks (instability, reactivity, weak analgesic effectiveness, high degree of metabolism in the liver and accumulation in the organism during long anaesthesia, induction of respiratory and cardiovascular depression) the use of halothane was abandoned.

Currently, mainly halogen derivatives of ethers are used for anaesthesia; amongst them are enflurane, isoflurane and sevoflurane. The newest of these is sevoflurane, which has been used since 1990. At room temperature it is a colourless, volatile liquid with a pleasant, fruity odour. It is an anaesthetic causing strong skeletal muscle relaxation, but it is characterised by weak analgesic potency.

Crimes where volatile compounds are used to incapacitate victim(s) have been reported for decades (in the case of robberies committed in people's homes they are often referred to as "home-jackings"). A situation which took place in September 1944 in the USA may be presented as an example. A small village, the City of Mattoon, was terrorised by an unknown criminal referred to as the Anaesthetic Prowler, Mad Anaesthetist or Mad Grasser, who used an unidentified volatile agent to poison the citizens. The case is still open and it remains unclear whether it was mass hysteria or the criminal really existed [7]. Well-known French football player Patrick Viera was the victim of a confirmed home-jacking. Burglars sprayed gas inside the building, which put the footballer and his family to sleep, then they robbed the house [9]. A considerable number of domestic crimes of this kind has been reported in recent years. Police have recorded such

cases e.g. in Malopolska, Świętokrzyska or Mazovia Voivodeships [8].

In most cases, subsequent investigations have not confirmed that the theft or break-in was performed using sleep-inducing agents.

Due to:

- the increasing number of cases where victims claim that they were put to sleep, then robbed;
- using compounds which do not leave macroscopic traces, i.e. rapidly vanishing (evaporating) substances, as agents facilitating commission of other crimes (arsons, burglaries, rapes, robberies and other offences);
- accidental or intentional poisonings – most frequently with the aim of intoxication using volatile organic compounds (these have been known about for years) [3, 4, 18];
- increasingly frequent cases of driving under the influence of or after using volatile compounds which impair driving ability;
- occurrence of various toxic volatile compounds in the environment [17];

it is necessary to constantly update, improve the efficiency of and verify methods of detection and determination of these compounds in biological samples.

In the nineteen nineties many papers were published concerning methods for detection and determination of gases, volatile liquids and inhalational anaesthetics, most frequently involving the application of gas chromatography with flame ionisation detection (GC-FID) or gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS) to analysis of various materials. Presently, the GC-MS technique is the most commonly used one, with a variety of methods applied for volatile compounds isolation. Kaneko et al. [11] developed a screening method for detection and quantification of 17 volatile organic compounds in blood samples using cryogenic-oven trapping (COT). Cirimele et al. [1] worked out a procedure for determination of 43 volatile organic compounds in air, which was blown through columns filled with activated carbon. Then absorbed analytes were desorbed with carbon disulphide. Finnish researchers used the headspace technique with a concentrator filled with Tenar for blood analysis. After thermal desorption and chromatographic separation, volatile compounds, including inhalation anaesthetics, were identified using the FTIR and FID techniques. Recently they have automated the procedure and they have applied volatile compounds isolation with automatic headspace in-tube extraction (ITEX) [15].

The aim of this work was to develop two methods for determination of volatile organic compounds in biological material.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

All solvents originated from POCH S.A. (Polskie Odczynniki Chemiczne, Gliwice, Poland) and Sigma (Sigma-Aldrich, Poznań, Poland). A commercially available mixture of volatile organic compounds (8260B Calibration Mix #1A) at a concentration of 2 mg/ml, which was bought from Restek (Anchem, Warsaw, Poland) constituted the standard solution.

2.2. Biological material

Control blood (analyte-free) used for development of the method was obtained from a blood bank. Blood samples originated from various persons. Blood samples and remains of liquid from forensic examinations performed routinely at the Institute of Forensic Research were used as the research material.

2.3. Liquid-liquid extraction

2.3.1. The GC-MS method

Two blood samples (0.2 ml) placed in Eppendorf vials were spiked with cyclohexane (10 μ l of 1% methanol standard solution) as the internal standard (IS). Next, 0.5 ml of n-pentane was added into both blood samples. Samples were extracted for 30 s by vortexing, and then centrifuged for 3 min at 8000 g. After this, the organic layers were transferred to glass vials, and tightly closed. To perform validation, the control blood samples were subjected to the same procedure, but they were also spiked with a standard solution of volatile organic compounds to obtain a concentration of 20.2 and 0.2 μ g/ml.

2.3.2. The GC-FID method

Two blood samples (0.5 ml) put into glass vials of 10 ml capacity were spiked with isoamyl alcohol as the IS (1.5 ml of 0.03%, v/v water solution of isoamyl alcohol). After tightly closing the vials, the samples were subjected to the same procedure.

2.4. Analysis by the GC-MS method

A gas chromatograph (Focus GC) coupled with a DSQ II mass spectrometer by Thermo Co. Electron equipped with a quadrupole mass analyser was used in the development of the GC-MS method. Separation was conducted using an SPB-624 column by Supelco (60 m long, I.D. 0.5 mm, film thickness 1.4 μ m). The temperature gradient started at 36°C and reached 200°C after 40 minutes. The temperature gradient rate was 4°C/min. The splitless injector worked at 250°C. The sample injection volume was 2 μ l. The helium flow rate through the column was 1.2 ml/min. The transfer line was heated to 250°C and the ion source to 200°C. Electron impact ionisation at an electron energy of 70 eV was applied. The mass scanning range was 25–300 amu.

Calibration was performed by analysis of control blood samples, spiked with a mixture of volatile organic compounds (e.g. organic solvents, hydrocarbons and their halogen derivatives) at concentrations of 20, 2 and 0.2 μ g/ml. Identification of components was carried out using retention times, relative retention times and two or three fragmentation ions, characteristic for a particular compound, also supported by an NIST mass spectral library. The monitored ions and the retention times of exemplary substances are presented in Table I.

Chromatograms of some identified compounds are shown in Figures 1a and 1b. The limit of detection of the developed method was estimated (based on a signal-to-noise ratio greater than 3) to be 100 ng/ml for all analytes.

2.5. Analysis by the GC-FID method

A gas chromatograph (Focus GC) coupled with a flame ionisation detector (FID) produced by Thermo Co. was used when working out the GC-FID method. Separation was performed using a BAC-2 column produced by Restek (30 m long, I.D. 0.32 mm, film thickness 1.2 μ m). The temperature gradient started at 40°C, which was maintained for 5 min, then the temperature reached 65°C after 10 minutes. The temperature gradient rate was 5°C/min. After heating the sample for 5 min at 60°C, the headspace was analysed. The splitless injector temperature was 150°C, injection volume was 0.5 ml, and the helium flow rate was 10 ml/min.

In the GC-FID method, compound identification was carried out using relative retention times. Example chromatograms from the headspace analysis of an analyte-free blood sample and a sample spiked with diethyl ether are shown in Figure 2.

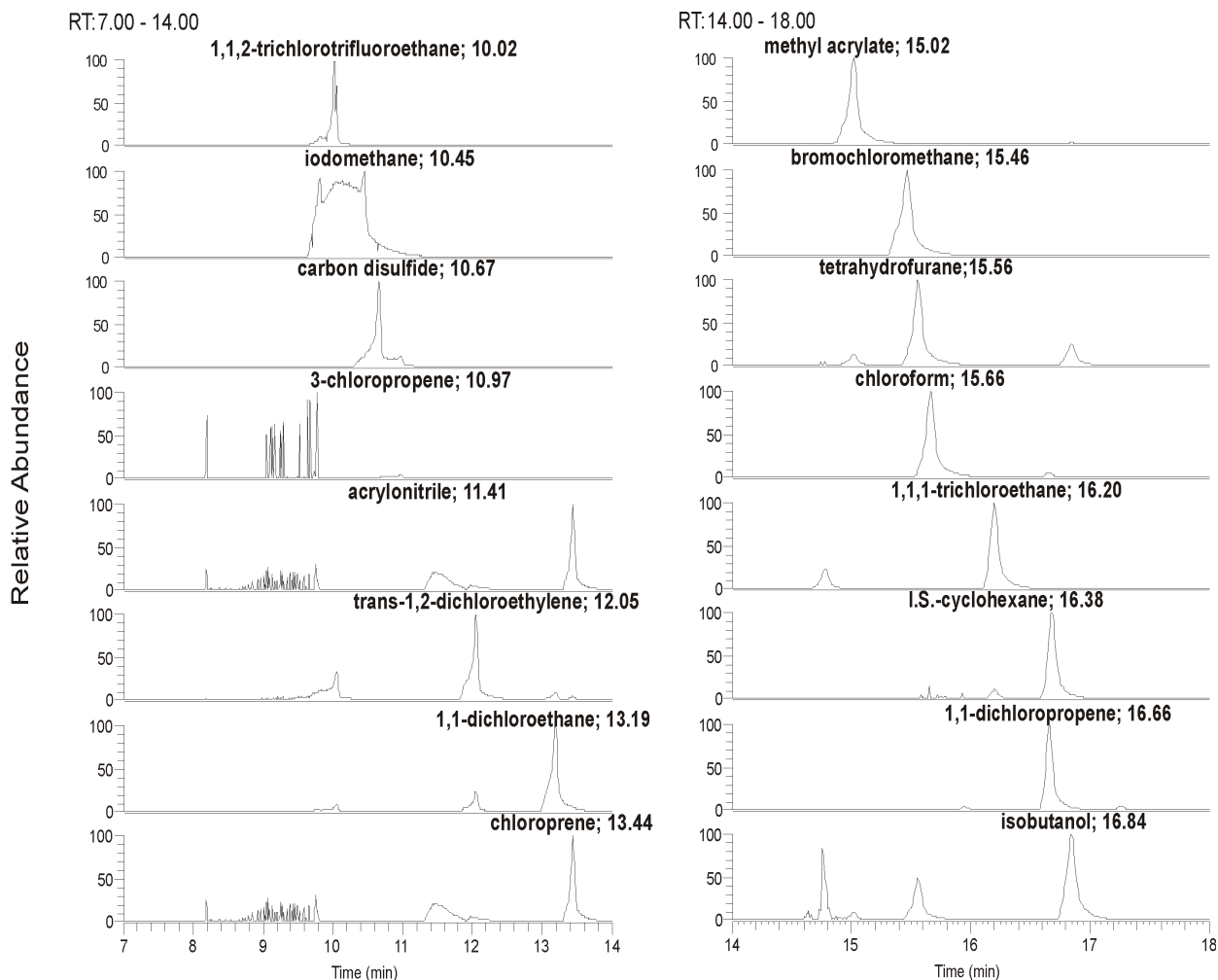


Fig. 1a. Selected chromatograms of volatile organic compounds.

3. Application of the developed methods

3.1. Case I

A male was injured in the course of doing carpentry (sawing wood). It was suspected that he had been working under the influence of alcohol. A blood sample taken after medical treatment, that is after surgery under general anaesthesia, was sent to the IFR. Analysis for alcohol was negative, but an unknown peak appeared in the chromatogram.

3.2. Case II

A young male, age 22, was brought to a hospital in a coma after a suicide attempt. According to witnesses' statements, he had drunk an unknown liquid, most probably an organic solvent, which was inferred on the basis of an intensive chemical odour. A blood

sample collected from the man and the secured liquid were submitted for investigation.

4. Results and discussion

There are no articles in the available professional literature about crimes that have been proved to have been facilitated by inhalation anaesthetics. However, a considerable number of press reports and police statistics allow us to suppose that crimes of this type may take place [4].

Most methods for analysis of volatile organic compounds, including inhalation anaesthetics, in biological and non-biological material were developed many years ago, and have been successfully applied in numerous analytical laboratories to this day. Initially, GC-FID was the technique of choice, while currently it is GC-MS. Most often, methods of isolation of volatile

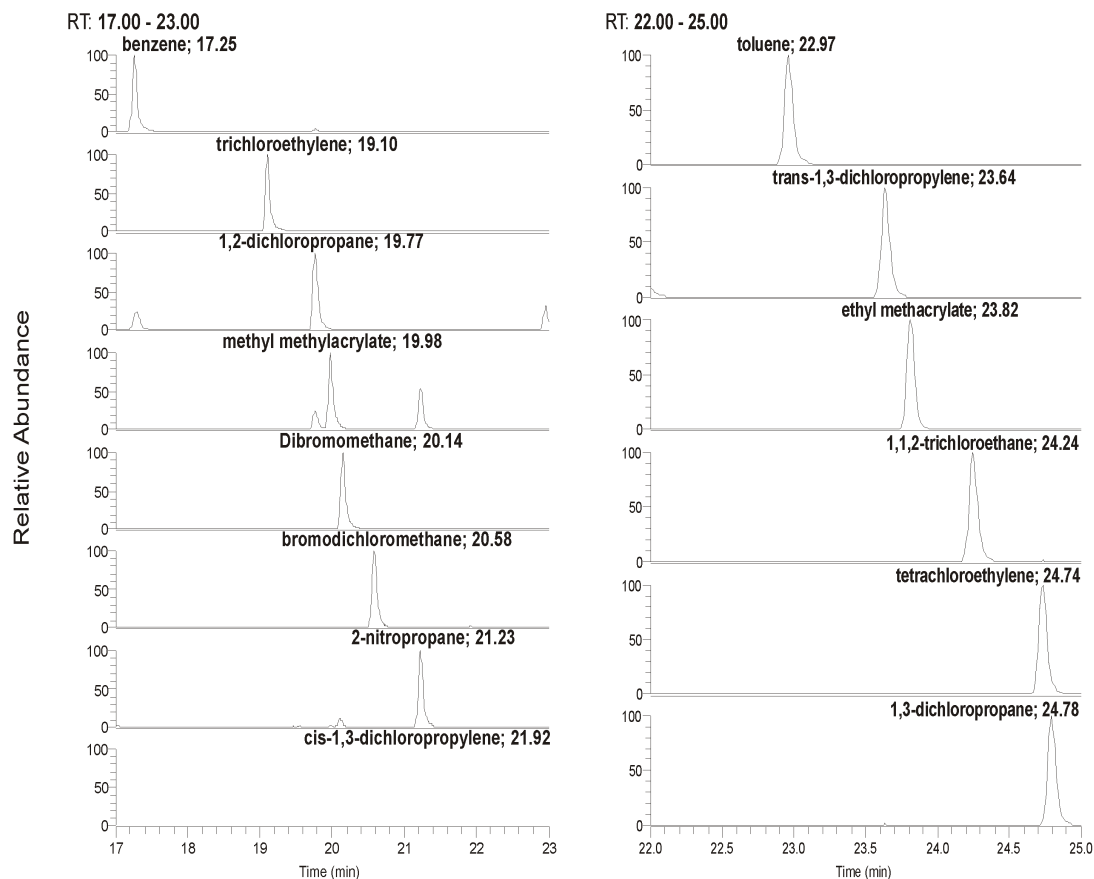


Fig. 1b. Selected chromatograms of volatile organic compounds.

compounds from various matrices are modified depending on the purpose of analysis. It is frequently necessary to determine inhalation anaesthetics in blood samples collected during surgical intervention [12, 16], when fatal incidents occur and there is a suspicion of inappropriate application of anaesthetic [21]. Chiral methods have been also worked out to investigate metabolism of these substances, e.g. for isoflurane, which is used in the form of a racemate in anaesthesia [10].

In this work, a simple liquid-liquid extraction method from small blood samples (0.2 or 0.5 ml) using n-pentane without a concentration step was developed. The application of a multicomponent standard mixture allowed us to demonstrate the selectivity of the elaborated GC-MS and GC-FID methods. The specificity of the method was investigated by analysis of control blood samples collected from various persons.

Analysis of the blood sample collected from the male after surgery (case I) showed its usefulness for detection of sevoflurane after administering a therapeutic dose. A chromatogram of the analysed sample together with the mass spectrum of sevoflurane are presented in Figures 3 and 4. An initial indication of the most probable compound was obtained from the

mass spectral library and characteristic ions, $m/z = 69, 131, 181$. The presence of sevoflurane was confirmed on the basis of spiked blood analysis performed in the same conditions.

In the literature, there are many references to acute or fatal poisonings with volatile organic compounds. There have been reports of deaths caused by intentional inhalation with chlorinated derivatives of methane, ethane and other compounds with the aim of becoming intoxicated [5, 14, 19]. Practices of this kind are also common in Poland, frequently leading to death after nasal inhalation of various solvents [20] or gasoline [18]. Cases of poisonings with volatile organic compounds have also been noted in the practice of the Institute of Forensic Research. The last of these concerned oral consumption of a mixture of solvents for suicidal purposes (case II). A fragment of a chromatogram of a blood sample, in which chloroform and carbon tetrachloride were identified is presented in Figure 5. The identification was performed, similarly to the sevoflurane case, using the mass spectral library and by analysis of a sample spiked with a standard in the same conditions, as well as by relative retention times.

TABLE I. RETENTION TIMES (RT), RELATIVE RETENTION TIMES (RRT) AND SELECTED IONS [m/z] FOR VOLATILE COMPOUNDS DETECTED IN BLOOD

	RT [min]	RRT	[m/z]
Sevoflurane	8.86	0.541	69; 131; 181
1,1,2-trichlorotrifluoroethane	10.02	0.612	101; 103; 151
Iodomethane	10.45	0.638	142
Carbon disulfide	10.67	0.651	44; 76
3-chloropropene	10.97	0.670	41; 76
Acrylonitrile	11.41	0.697	26; 52; 53
Trans-1,2-dichloroethylene	12.05	0.736	61; 96; 98
1,1-dichloroethane	13.20	0.806	63; 65; 27
Chloroprene	13.44	0.821	53; 88; 90
Methyl acrylate	15.02	0.917	27; 55; 85
Bromochloromethane	15.46	0.944	49; 128; 130
Tetrahydrofuran	15.56	0.950	42; 71; 72
Chloroform	15.66	0.956	83; 85; 87
1,1,1-trichloroethane	16.20	0.989	61; 97; 99
Cyclohexane (IS)	16.38	1.000	41; 56; 84
1,1-dichloropropene	16.66	1.018	39; 75; 77
Carbon tetrachloride	16.70	1.020	117; 119; 121
Isobutanol	16.84	1.028	31; 41; 43
Benzene	17.25	1.053	51; 77; 78
Trichloroethylene	19.10	1.166	130; 132; 97
1,2-dichloropropane	19.77	1.207	41; 61; 63
Methyl methylacrylate	19.98	1.220	41; 69; 100
Dibromomethane	20.14	1.230	93; 95; 174
Bromodichloromethane	20.58	1.256	83; 85; 129
mtxtx 1412-nitropropane	21.23	1.296	27; 41; 43
Cis-1,3-dichloropropylene	21.92	1.338	75; 77; 110
Toluene	22.97	1.402	65; 91; 92
Trans-1,3-dichloropropylene	23.64	1.443	39; 75; 77
Ethyl methacrylate	23.82	1.454	41; 69; 86
1,1,2-trichloroethane	24.24	1.480	97; 83; 61
1,3-dichloropropane	24.79	1.513	76; 41
Chlorobenzene	27.57	1.561	112; 77
Tetrachloroethane	27.87	1.701	131
Bromoform	30.42	1.857	173; 171; 252

The submitted liquid was analysed as well. The analysis revealed the presence of carbon tetrachloride, carbon disulphide, trichloroethene and tetrachloro-

ethene, bromotrichloromethane, toluene and hexachloroethane (avlothane).

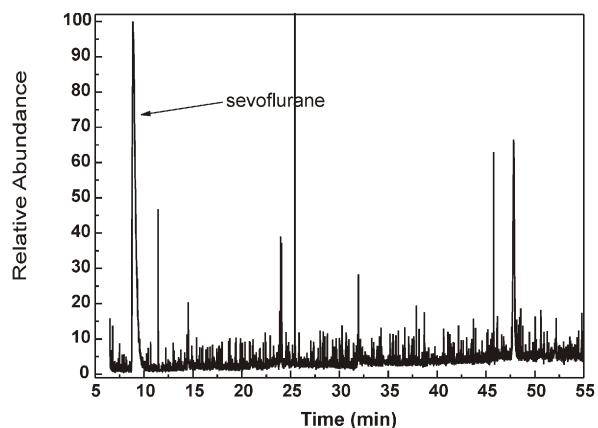


Fig 2. Chromatogram of blood sample – sevoflurane detected.

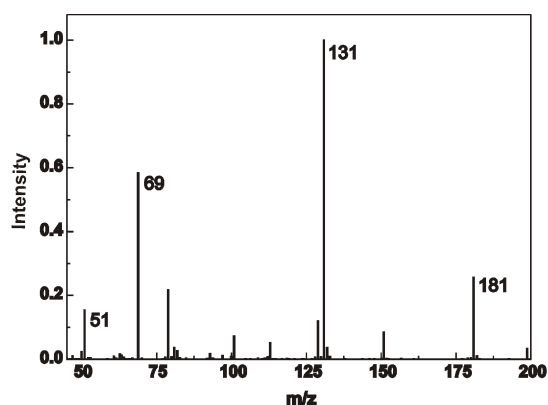


Fig. 3. Mass spectrum of sevoflurane detected in blood sample.

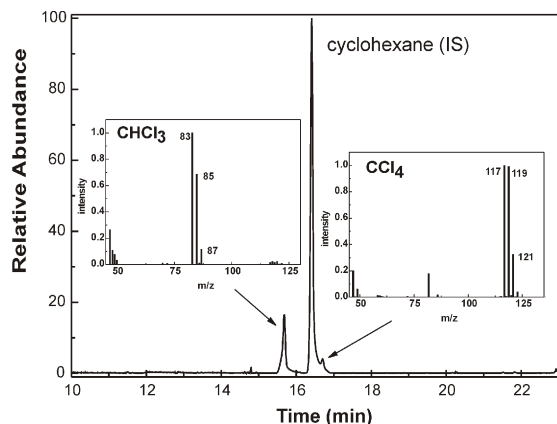


Fig. 4. Part of blood sample chromatogram – chloroform and carbon tetrachloride detected. Mass spectra of the detected compounds in the insets.

Up till now, in numerous cases submitted to the Institute of Forensic Research, in which application of incapacitating agents to facilitate commitment of crimes such as robbery or burglary has been suspected, experts have not succeeded in detecting any volatile organic compounds in biosamples (blood, urine) col-

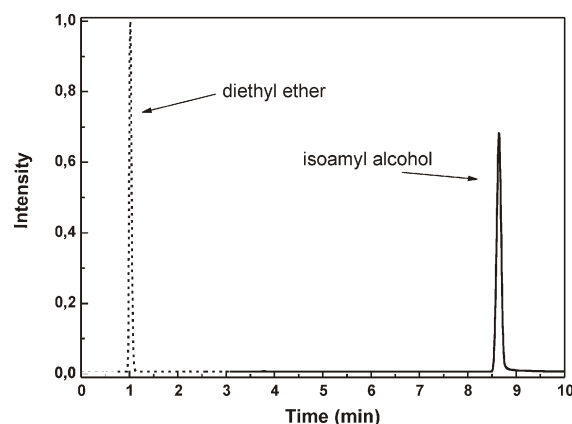


Fig. 5. Diethyl ether in blood sample (detected by means of GC-FID method).

lected from victims. In an incident which took place during the heating season, due to use of gas central heating, the use of all flammable or explosive compounds, e.g. diethyl ether, could be ruled out. Some victims complained of head-aches, vertigo or nausea several hours after waking up. Although there was a lack of other symptoms in rarely performed physical examinations or changes in a variety of biochemical indicators, this was an insufficient basis for categorically ruling out use of agents characterised by a low therapeutic safety index. The kinds of agents used to incapacitate victims during home-jackings and similar crimes are still unknown.

5. Summary

Both developed methods allowed us to rule out or confirm the presence of volatile organic substances, including anaesthetics, in biological (blood) and non-biological (liquid) material. These substances may be used for various purposes, including crimes (arsons, burglaries, rapes and robberies – if the latter are committed in people's homes they are frequently referred to as home-jackings), in biological (blood) and non-biological (liquid) material. These methods have been introduced into routine forensic practice at the Institute of Forensic Research.

The proposed GC-MS method is more versatile, because it enables identification of a mixture of volatile compounds, present in different concentrations and also of an inhalation anaesthetic in blood at a therapeutic concentration within a single run. The identification is based on two factors: relative retention time and the mass spectra of at least two ions.

References

1. Cirimele V., Etter M., Villain M. [et al.], Analysis of volatile organic compounds in ambient air using HS-GC/MS after chemical desorption, *Annales de Toxicologie Analytique* 2008, 20 (S1), 26.
2. Farmakologia. Podstawy farmakoterapii. Podręcznik dla studentów medycyny i lekarzy, Kostrowski W. [red.], Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2001.
3. Flanagan R. J., Ives R. J., Volatile substance abuse, *Bulletin of Narcotics* 1994, 49–78.
4. Flanagan R. J., McVery J., Volatile substance abuse and crime, Abstract book of the 43rd International Meeting TIAFT, Seoul, Korea, August 29 – September 2, 2005.
5. Heath M. J., Solvent abuse using bromochlorodifluoromethane from a fire extinguisher. *Medicine, Science and the Law* 1986, 26, 33–34.
6. Hill J. W., Kolb D. K., Chemistry for changing times, Pearson: Prentice Hall, New Jersey 2004.
7. <http://www.damninteresting.com/?p=268>
8. <http://nowysacz.naszemiasto.pl/wydarzenia/629679.html>
9. <http://www.timesonline.co.uk/tol/news/world/europe/article725307.ece>
10. Juza M., Jakubetz H., Hettesheimer H. [et al.], Quantitative determination of isoflurane enantiomers in blood samples during and after surgery via headspace gas chromatography-mass spectrometry, *Journal of Chromatography B* 1999, 735, 93–102.
11. Kaneko R., Hirata Y., Hamajima M. [et al.], Sensitive analyses of volatile organic compounds by cryogenic-oven-trapping gas chromatography-mass spectrometry, *Annales de Toxicologie Analytique*, 2008, 20 (S1), 26.
12. Maruyama K., Takatsu A., Obata T., The quantitative analysis of inhalational anaesthetics in forensic samples by gas chromatography/mass spectrometry/selected ion monitoring, *Biomedical Chromatography* 1995, 9, 179–182.
13. Ojanperä I., Pihlainen K., Vuori E., Identification limits for volatile organic compounds in the blood by purge-and-trap GC-FTIR, *Journal of Analytical Toxicology* 1998, 22, 290–295.
14. Pihlainena K., Ojanperä I., Analytical toxicology of fluorinated inhalation anaesthetic, *Forensic Science International* 1998, 97, 117–133.
15. Rasanen I., Viinamäki J., Ojanperä I., Analysis of volatile organic compounds by in-tube extraction (ITEX) and GC-MS, *Annales de Toxicologie Analytique* 2008, 20 (S1), 26.
16. Saito K., Takayasu T., Nishigami J. [et al.], Determination of the volatile anesthetics halothane, enflurane, isoflurane, and sevoflurane in biological specimens by pulse-heating GC-MS, *Journal of Analytical Toxicology* 1995, 9, 115–119.
17. Sexton K., Adgate J. L., Church T. R. [et al.], Children's exposure to volatile organic compounds as determined by longitudinal measurements in blood, *Environmental Health Perspectives* 2005, 113, 342–349.
18. Teżyk R., Wachowiak R., Durys R., Fatal poisoning by gasoline, *Problems of Forensic Sciences* 2007, 70, 198–205.
19. Thatcher J. E., Gordon A. M., Logan K. B., An examination of 1,1-difluoroethane in traffic cases, TIAFT Meeting, Seattle, 26–30.08.2007, Conference abstracts.
20. Wiergowski M., Sein Anand J., Jankowski Z. [et al.], Cases of poisonings by volatile organic compounds noted at the Department of Forensic Medicine and Department of Internal Disease, Geriatrics and Clinical Toxicology of the Medical University of Gdańsk during 2001–2006, *Problems of Forensic Sciences* 2007, 70, 213–224.
21. Yang N. C., Hwang K. L., Shen C. H. [et al.], Simultaneous determination of fluorinated inhalation anesthetics in blood by gas chromatography-mass spectrometry combined with a headspace autosampler, *Journal of Chromatography B* 2001, 759, 307–318.

Corresponding author

Bogdan Tokarczyk
Instytut Ekspertyz Sądowych
ul. Westerplatte 9
PL 31-033 Kraków
e-mail: btokarczyk@ies.krakow.pl

ANESTETYKI WZIEWNE W MATERIALE BIOLOGICZNYM

1. Wstęp

Anestetyki zwane inaczej środkami znieczulającymi są to substancje pozwalające na kontrolowane, odwracalne (czasowe) i całkowite zniesienie bólu, świadomości i odruchów obronnych osoby znieczulanej. Do najbardziej znanych i najwcześniej używanych anestetyków wziewnych należą lotne ciecze, np. eter dietylowy, chloroform, chlorek etylowy, halotan oraz gazy, np. podtlenek azotu, etylen i cyklopropan. Oprócz działania znieczulającego, wiele z tych związków charakteryzuje się właściwościami psychoaktywnymi i halucynogennymi, dlatego też stosowane są w celu odurzania się. Ze względu na ich toksyczne właściwości zostały zastąpione w medycynie nowoczesnymi, mniej szkodliwymi lub nieszkodliwymi związkami, jak enfluran, izofluran, sewofluran i desfluran. W celu scharakteryzowania oraz porównania działania poszczególnych substancji stosowanych do znieczulania drogą oddechową wykorzystuje się następujące parametry:

- rozpuszczalność we krwi i tłuszczach definiowana przez współczynnik podziału krew-gaz, który określa szybkość indukcji znieczulenia i wybudzenia oraz współczynnik podziału krew-tłuszcz, co jest miarą siły działania;
- współczynnik *MAC* (najmniejsze stężenie pęcherzykowe, ang. minimum alveolar concentration) określający siłę działania anestetycznego środka wziewnego. Jest to minimalne stężenie środka anestetycznego w powietrzu pęcherzykowym, przy którym 50% pacjentów nie reaguje na nacięcie skóry;
- współczynnik charakteryzujący czas wystąpienia działania; im większa wartość tym dłuższy czas jest potrzebny na indukcję znieczulenia;
- toksyczność i metabolizm;
- procent objętościowy (vol %), czyli procentowa zawartość gazu w mieszaninie oddechowej.

Anestetyki wziewne zaliczane są do potencjalnie niebezpiecznych środków farmakologicznych. Wynika to z faktu, że dawka toksyczna, powodująca niewydolność krążenia, jest tylko 2–4 razy większa od stężenia wywołującego pożądany efekt anestetyczny [14].

Pierwszym zastosowanym środkiem znieczulającym w historii nowożytnej był eter dietylowy (1842) [6]. Następnie do znieczulenia ogólnego zaczęto stosować chloroform, podtlenek azotu szczególnie w zabiegach stomatologicznych (1844), cyklopropan (1929) czy trichloroetylen (1930). Główną wadą tych środków (z wyjątkiem podtlenku azotu) była ich wysoka toksyczność (chloroform, trichloroetylen) i łatwopalność (cyklopropan).

Pierwszym niepalnym anestetykiem wziewnym był halotan wprowadzony do użycia w 1956 roku [2]. Jest on bezbarwną, lotną cieczą o charakterystycznym, przyjemnym zapachu. Nie drażni dróg oddechowych. Charakteryzuje się silnym działaniem usypiającym i słabym przeciwbólowym. W mieszaninie znieczulającej łączony jest z powietrzem, tlenem bądź z podtlenkiem azotu. Ze względu na jego wady (nietrwałość i reaktywność, słabe działanie analgetyczne, wysoki stopień metabolizmu w wątrobie i kumulowanie się w organizmie w czasie długotrwałych znieczuleń, powodowanie depresji układu krążeniowego i oddechowego), odstąpiono od jego stosowania.

Obecnie używane środki znieczulające to głównie halogenopochodne etery. Należą do nich m.in. enfluran, izofluran i sewofluran. Najnowszym z nich jest sewofluran stosowany od 1990 roku. W temperaturze pokojowej jest to bezbarwna, lotna ciecz o przyjemnym, owocowym zapachu. Jest anestetykiem powodującym silne zwiótczenie mięśni szkieletowych, lecz charakteryzuje się słabym działaniem analgetycznym.

Doniesienia o przestępstwach, tzw. kradzieżach „na śpiocha”, w których jako narzędzie służące do obezwładnienia ofiary stały się lotne związki, znane są od kilkudziesięciu lat. Przykładem może być zdarzenie, które miało miejsce we wrześniu 1944 w Stanach Zjednoczonych. Małe miasteczko City of Mattoon zostało sterroryzowane przez nieznanego sprawcę nazwanego Anesthetic Prowler, Mad Anesthetist lub Mad Gasser, który używał niezidentyfikowanego środka lotnego do podtruwania mieszkańców. Sprawa nie została rozwiązana i nie wiadomo, czy była to tylko zbiorowa histeria, czy też przestępca rzeczywiście istniał [7]. Ofiarą realnej kradzieży „na śpiocha” stał się znany francuski piłkarz Patrick Viera. Włamywacze rozpylili wewnątrz budynku gaz, który uspił piłkarza i jego rodzinę, a następnie obrabowali dom [9]. W ostatnich latach pojawiła się spora liczba krajowych doniesień o tego typu kradzieżach. Policja notowała takie przypadki m.in. w województwie małopolskim, świętokrzyskim czy mazowieckim [8].

W większości spraw późniejsze śledztwa nie potwierdziły, że kradzież bądź włamanie zostały dokonane z wykorzystaniem środków usypiających.

Ze względu na:

- rosnącą liczbę przypadków, w których osoby poszkodowane twierdzą, że zostały uspione, a następnie okradzione;
- używanie związków niepozostawiających makroskopowych śladów, czyli szybko ulatniających się, jako środków ułatwiających dokonanie innych prze-

stepstw (podpalen, włamań, zgwałceń, grabieży i innych szkód kryminalnych);

- znane od dawna zatrucia przypadkowe i rozmyślne, najczęściej w celu wprowadzenia się w stan odurzenia lotnymi związkami organicznymi [3, 4, 18];
- coraz częstsze prowadzenie samochodu pod wpływem lub po użyciu lotnych związków upośledzających zdolność kierowania;
- występowanie różnych toksycznych lotnych związków w środowisku [17];

zachodzi konieczność ciągłego aktualizowania, poszerzania wydolności i weryfikacji metod wykrywania i oznaczania tych związków w bioprobkach.

W latach 90. dwudziestego wieku opublikowano wiele metod wykrywania i oznaczania gazów, lotnych cieczy i anestetyków wziewnych najczęściej z zastosowaniem technik chromatografii gazowej z detekcją płomieniowo-jonizacyjną (GC-FID) oraz chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC-MS) w różnych materiałach. Obecnie technika GC-MS jest częściej używana, ale stosuje się różne metody izolacji związków lotnych z matrycy. Kaneko i in. [11] do metody przesiewowego wykrywania i oznaczania 17 lotnych związków organicznych w próbach krwi wykorzystali technikę wychwytu lotnych związków do komory kriogenicznej (ang. cryogenic-oven trapping, COT). Cirimele i in. [1] opracowali procedurę oznaczania 43 lotnych związków organicznych w powietrzu, które przepuszczali przez kolumny wypełnione węglem aktywnym, a zaabsorbowane związki desorbowali za pomocą disiarczku węgla. Badacze fińscy absorbowali fazę nadpowierzchniową z krwi w koncentratorze wypełnionym Tenarem. Po termicznej desorpcji i rozdziale chromatograficznym lotne związki, w tym anestetyki wziewne, były identyfikowane za pomocą metody FTIR i FID [16]. Ostatnio zautomatyzowali oni procedurę i stosują izolację związków lotnych z fazy nadpowierzchniowej w automatycznym podajniku próbek wyposażonym w próbnik sorpcyjny (ang. headspace in-tube extraction, ITEX) [15].

Celem niniejszych badań było opracowanie dwóch metod oznaczania lotnych związków organicznych z materiału biologicznego.

2. Materiał i metody

2.1. Odczynniki

Wszystkie rozpuszczalniki pochodziły z firmy POCH S.A. (Polskie Odczynniki Chemiczne, Gliwice) i Sigma (Sigma-Aldrich Polska, Poznań). Roztwory wzorcowe stanowiła dostępna handlowo mieszanina lotnych związków organicznych (8260B Calibration Mix #1A) o stężeniu 2 mg/ml, które nabyto w firmie Restek (Anchem, Warszawa).

2.2. Materiał biologiczny

Krew kontrolną (wolną od analitów) stosowaną do opracowania metody otrzymano ze stacji krwiodawstwa. Próbki krwi pochodziły od różnych osób. Materiał do badań stanowiły próby krwi i resztki płynu pochodzące z ekspertyz rutynowo opracowywanych w Instytucie Ekspertyz Sądowych.

2.3. Ekstrakcja ciecz-ciecz

2.3.1. Metoda GC-MS

Do dwóch prób krwi (0,2 ml) umieszczonych w fiolkach Eppendorfa dodawano jako standard wewnętrzny (IS) cykloheksan (10 l metanolowego roztworu o stężeniu 1%, v/v). Następnie do obu prób krwi dodano 0,5 ml n-pentanu. Próbki ekstrahowano przez 30 s przy pomocy wortexu, a następnie odwirowano przez 3 min przy 8000 g, po czym fazę organiczną przenoszono do szklanych fiolek i szczelnie zamykano. Identycznej procedurze poddano próby krwi kontrolnej, do których dodawano mieszaninę wzorcową lotnych substancji organicznych, uzyskując stężenia 20; 2 i 0,2 [g/ml] w celu przeprowadzenia walidacji metody.

2.3.2. Metoda GC-FID

Do dwóch prób krwi (0,5 ml) umieszczonych w szklanych fiolkach o pojemności 10 ml dodawano jako IS alkohol izoamyloowy (1,5 ml wodnego roztworu alkoholu izoamyloowego o stężeniu 0,03%, v/v). Po szczelnym zamknięciu fiolek postępowano jak przy poprzedniej procedurze.

2.4. Analiza metodą GC-MS

Do opracowania metody GC-MS zastosowano chromatograf gazowy (Focus GC) połączony ze spektrometrem mas DSQ II firmy Thermo Co. Electron wyposażony w kwadropolowy analizator mas. Rozdział prowadzono na kolumnie Supelco SPB-624 (długość 60 m, średnica 0,5 mm, grubość filmu 1,4 m). Gradient temperatury rozpoczynał się od 36°C, by po 40 minutach osiągnąć 200°C. Przyrost temperatury następował z szybkością 4°/min. Dozownik bez podziału próbki (*splitless*) pracował w temperaturze 250°C. Objętość wstrzykiwanej próbki wynosiła 2 l. Natężenie przepływu strumienia helu przez kolumnę wynosiło 1,2 ml/min. Temperatura linii transferowej była równa na 250°C, natomiast źródła jonów 200°C. Zastosowano jonizację elektronową (EI) o energii 70 eV. Zakres skanowania mas wynosił 25–300 amu.

Kalibracji metody dokonano przez analizę prób krwi kontrolnej, do której dodano mieszaninę lotnych związków

ków organicznych (m.in. rozpuszczalniki organiczne, węglowodory i ich pochodne halogenowe) o stężeniu odpowiednio 20, 2 i 0,2 g/ml. Identyfikację składników prowadzono na podstawie czasów retencji, względnych czasów retencji i dwóch lub trzech jonów fragmentacyjnych, charakterystycznych dla danego związku, posiłkując się również biblioteką widm masowych NIST. Monitorowane jony oraz czasy retencji przykładowych związków przedstawiono w tabeli I. Na rysunkach 1a i 1b zamieszczono chromatogramy niektórych zidentyfikowanych związków. Granice detekcji (*LOD*) opracowanej metody oszacowano (bazując na stosunku sygnału do szumu nie mniejszym niż 3) na 100 ng/ml dla wszystkich analitów.

2.5. Analiza metodą GC-FID

Do opracowania metody GC-FID zastosowano chromatograf gazowy (Focus GC) połączony z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (FID) firmy Thermo Co. Rozdział prowadzono na kolumnie BAC-2 firmy Restek (długość 30 m, średnica 0,32 mm, grubość filmu 1,2 μm). Gradient temperaturowy rozpoczynał się od 40°C, co było utrzymywane przez 5 min, by po 10 minutach osiągnąć 65°C. Przyrost temperatury następował z szybkością 5°/min. Analizie poddano fazę nadpowierzchniową, po uprzednim termostatowaniu próbki w temperaturze 60°C przez 5 min. Temperatura dozownika pracującego w opcji bez podziału próbki wynosiła 150°C, objętość wstrzykiwanej próbki 0,5 ml, a natężenie przepływu strumienia helu przez kolumnę 10 ml/min.

W metodzie GC-FID identyfikację związków prowadzono na podstawie względnego czasu retencji. Na rycinie 2 przedstawiono przykładowy chromatogram fazy nadpowierzchniowej próby krwi wolnej od analitów, do której dodano eter dietylowy.

3. Zastosowanie opracowanych metod

3.1. Przypadek 1

Mężczyzna doznał obrażeń ciała w trakcie prac stolarskich (cięcie drewna). Podejrzewano, że pracował, będąc pod wpływem alkoholu. Do Instytutu Ekspertyz Sądowych nadesłano próbę krwi pobraną w szpitalu po udzieleniu pomocy lekarskiej, czyli po przeprowadzeniu zabiegu chirurgicznego pod znieczuleniem ogólnym. Badanie na zawartość alkoholu dało wynik ujemny, ale na chromatogramie widoczny był nieznan pik.

3.2. Przypadek 2

Młody mężczyzna, lat 22, został przywieziony do szpitala w stanie śpiączki po próbie samobójczej. Z zez-

nań świadków wynikało, że wypił nieznaną płyn, najprawdopodobniej rozpuszczalnik organiczny, co określono na podstawie intensywnej woni chemicznej. Do badań otrzymano próbę krwi pobraną od mężczyzny oraz zabezpieczony płyn.

4. Wyniki i dyskusja

W dostępnym piśmiennictwie fachowym brak jest publikacji o udowodnionych przestępstwach z użyciem anestetyków wziewnych. Jednak spora liczba doniesień prasowych i statystyk policyjnych pozwala domniemywać, że przestępstwa tego typu mogą mieć miejsce [4].

Większość metod służących do analizy lotnych związków organicznych, w tym anestetyków wziewnych w materiale biologicznym i niebiologicznym, zostało opracowane przed wielu laty i do tej pory są stosowane z powodzeniem w wielu laboratoriach analitycznych. Początkowo techniką z wyboru była GC-FID, a obecnie jest to GC-MS. Najczęściej modyfikuje się metody izolacji związków lotnych z różnych matryc w zależności od celu analizy. Często zachodzi konieczność oznaczania anestetyków wziewnych w próbkach krwi pobieranych w trakcie zabiegów chirurgicznych [12, 16], a także w przypadkach zejść śmiertelnych, gdy zachodzi podejrzenie o niewłaściwe zastosowanie środka znieczulającym [21]. Do badania metabolizmu tych środków opracowano także metody enancjoselektywne, np. dla izofluranu, który jest stosowany do znieczuleń jako mieszanina racemiczna [10].

W niniejszej pracy opracowano prostą metodę ekstrakcji ciecz-ciecz z niewielkich próbek krwi (0,2 i 0,5 ml) za pomocą n-pentanu bez zągęszczania próbki. Zastosowanie wieloskładnikowej mieszaniny wzorców pozwoliło na wykazanie selektywności opracowanych metod GC-MS i GC-FID oznaczania analitów. Specyficzność metody została zbadana przez analizę kontrolnych prób krwi pochodzących od różnych osób.

Analiza próbki krwi pobranej od mężczyzny po zabiegu chirurgicznym (przypadek 1) wykazała jej przydatność do wykrywania sewofluranu po podaniu dawki terapeutycznej. Na rycinach 3 i 4 przedstawiono chromatogram analizowanej próbki krwi oraz widmo masowe sewofluranu. Wstępne wytypowanie najbardziej prawdopodobnego związku dokonano dzięki bibliotece widm masowych i charakterystycznych jonów o $m/z = 69, 131, 181$. Obecność sewofluranu potwierdzono na podstawie analizy próbki krwi z dodatkiem wzorca w tych samych warunkach.

W literaturze przedmiotu można znaleźć wiele doniesień dotyczących zatruc ostrych lub śmiertelnych lotnymi związkami organicznymi. Znane są doniesienia o zgonach wywołanych rozmyślnym inhalowaniem się chlorowcopochodnymi metanu, etanu i innych w celu

wprowadzenia się w stan odurzenia [5, 14, 19]. Tego typu praktyki spotykane są również w Polsce, prowadząc często do zgonów po wciągnięciu przez nos różnych rozpuszczalników [20] lub benzyny [18]. Również w praktyce Instytutu Ekspertyz Sądowych zanotowano przypadki zatrucia lotnymi związkami organicznymi. Ostatni z nich to doustne przyjęcie mieszaniny rozpuszczalników w celach samobójczych (przypadek II). Na rycinie 5 zamieszczono fragment chromatogramu próbki krwi, w której zidentyfikowano chloroform i tetrachlorek węgla. Dokonano tego, podobnie jak w przypadku sewofluranu, korzystając z biblioteki widm masowych i analizy próbki krwi z dodatkiem wzorca w tych samych warunkach, jak również względnych czasów retencji.

Analizie poddano również nadesłany płyn. Wykazano w nim obecność tetrachloru węgla, chloroformu, disiarczku węgla, trichloroetenu i tetrachloroetenu, bromotrichlorometanu, toluenu oraz heksachloroetanu (awlotanu).

Jak dotąd w licznych sprawach nadsyłanych do Instytutu Ekspertyz Sądowych, w których podejrzewano użycie środka obezwładniającego w celach ułatwienia dokonania przestępstwa typu grabież lub rabunek, nie udało się wykryć lotnych związków organicznych w biopróbkach (krew, mocz) pobranych od poszkodowanych. Przy zajściu, które miało miejsce w domu w sezonie grzewczym, ze względu na ogrzewanie pomieszczeń gazowym centralnym ogrzewaniem, można było wykluczyć użycie wszystkich łatwopalnych lub wybuchowych związków, np. eteru dietylowego. Niektórzy poszkodowani kilka godzin po przebudzeniu skarżyli się na bóle i zawroty głowy lub nudności. Brak innych objawów w rzadko przeprowadzanych badaniach fizykalnych lub zmian różnych wskaźników biochemicznych nie dawało jednoznacznych podstaw do wykluczenia środków charakteryzujących się niskim indeksem bezpieczeństwa terapeutycznego. Rozdaj środków stosowanych do obezwładnienia ofiar przy tzw. kradzieżach „na śpiocha” pozostaje w dalszym ciągu niewyjaśniony.

5. Podsumowanie

Obie opracowane metody pozwalają na wykluczenie bądź potwierdzenie obecności w materiale biologicznym (krew) i niebiologicznym (płyn) lotnych substancji organicznych, w tym również anestetyków, które mogą być użyte w różnych celach, także jako środki ułatwiające dokonanie przestępstw (podpaleń, włamań, zgwałceń, grabieży, często określanym mianem „kradzież na śpiocha”). Zostały one wdrożone do rutynowej praktyki opiniotwórczej w Instytucie Ekspertyz Sądowych.

Zaproponowana metoda GC-MS jest bardziej uniwersalna, ponieważ umożliwia w trakcie jednego pomiaru identyfikację mieszaniny lotnych związków o róż-

nym stężeniu składników oraz anestetyku wziewnego we krwi zastosowanego w dawkach terapeutycznych. Identyfikacja tą metodą oparta jest na dwóch elementach: względnym czasie retencji i widmach masowych co najmniej dwóch jonów.