



DETERMINATION OF INHALATION ANAESTHETICS IN BLOOD BY MEANS OF GAS CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY DETECTION USING HEADSPACE SOLID-PHASE MICROEXTRACTION (HS-SPME-GC-MS)

Marta SUCHAN, Wojciech LECHOWICZ

Department of Forensic Toxicology, Institute of Forensic Research, Kraków, Poland

Abstract

In recent years, volatile anaesthetics have increasingly frequently been reported by police as substances which are used to induce loss of consciousness of victims in order to facilitate crime. The main purpose of the present work was to study the effectiveness of the sensitive HS-SPME-GC-MS method in determination of halogenated volatile compounds in blood. The study included three substances which are used in general volatile anaesthesia: desflurane, sevoflurane and isoflurane. Preliminary identification is based on comparison of relative retention times. Final confirmation is done by inspection of the mass spectrum, which is obtained using the HS-SPME-GC-MS method. This method is also used for quantification. The conditions of HS-SPME were optimized. The extraction was performed with a PDMS (100 μ m) fibre. The HS-SPME-GC-MS method was validated. A linear calibration model was applied for the range 0.75–15.0 μ g/ml. For all analytes, limits of quantification were below 1 μ g/ml. Precision and accuracy were within the acceptable range for toxicological analysis (maximum relative error for sevoflurane: 15.2%; the worst precision for isoflurane, $CV=15.5\%$). It was also shown that blood samples have to be kept at low temperature (-20°C).

Key words

Anaesthetics; Volatile organic compounds (VOC); SPME-GC-MS; Blood.

Received 9 September 2009; accepted 12 November 2009

1. Introduction

Volatile organic compounds (VOCs) are a group of organic compounds which are characterized by high vapour pressure and low solubility in water and their boiling point is below 250°C . Substances containing halogen atoms in the molecule (usually F, Cl, Br) form one of the subgroups of the volatile organic compounds – known as halogenated volatile organic compounds (HVOCs). Volatile inhalation anaesthetics currently in use fall into this category.

Anaesthetics are agents used in medicine to cause temporary and reversible loss of consciousness and pain sensation during medical treatment. They are

classified as inhalation or intravenous according to the method of administration. Amongst substances administered by respiratory tract, it is possible to distinguish a group of volatile liquids (halothane, enflurane, isoflurane, desflurane and sevoflurane) and a group of anaesthetic gases (nitrous oxide, oxygen and xenon). Nowadays, halogen derivatives of ethers are used as inhalation anaesthetics: enflurane (1966), isoflurane (1970), sevoflurane (1981) and desflurane (1988)¹. They are considered potentially dangerous. The reason for that is the fact that a toxic dose causing heart failure

¹ Date of introduction of a given substance into clinical practice is given in brackets.

is in most cases only 2 to 4 times higher than the concentration needed for the desired anaesthetic effect [6].

Toxicological analysis of biological material for the presence of inhalation anaesthetics can be performed in cases of their administration during inpatient healthcare (deaths during or shortly after anaesthesia, concentration monitoring of the gas inhaled by the patient, analysis of occupational exposure) and cases of criminal use (e.g. induction of unconsciousness in victims before robbery). Media reports indicate that "homejackings" have been noted throughout Poland since 2004, for example in Białystok and Kielce, as well as in Małopolska, Świętokrzyska and Mazovia Voivodships. However, in most cases, subsequent investigations have refuted the theory that the given break-in was performed using sleep-inducing agents. A contrary opinion is held by the victims, who cannot believe that all persons present at the time of the robbery slept so deeply.

The increasing number of cases of supposed use of rapidly evaporating agents by people committing crimes was the reason for an attempt to develop a method of detection and determination of these substances in biological samples for toxicological purposes. Various analytical methods are applied to determine inhalation anaesthetics, depending on the circumstances of the event and on the form of the sample. The most commonly used method is gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). Nowadays, techniques of analyte extraction from biological material (used with this method) significantly improve analysis parameters, such as limit of detection or quantification.

Inhalation anaesthetic substances can be determined in different biological materials, such as urine, blood, brain, lungs or liver. However, the material most commonly used for analysis is blood, because of the beneficial value of their blood-gas partition coefficients. On the other hand, because of the noninvasive method of sampling, determination of inhalation anaesthetics in urine is becoming more common [7]. Liquid-liquid extraction (LLE) can also be applied to analysis of volatile inhalation anaesthetics in blood [2, 8]. However, since LLE is a multi-step procedure, it is not widely used in volatile inhalation anaesthetics extraction due to the risk of analyte loss.

The headspace (HS) extraction technique [6] is particularly useful in determination of inhalation anaesthetics in blood, due to the value of the blood-gas partition coefficients. In the literature, there are many descriptions of application of this technique in analysis of halogenated volatile organic compounds in different biological material: blood, urine and pieces of organs (brain, lungs, liver). Use of the HS technique

allows analysis of single compounds [10] as well as a mixture of inhalation anaesthetics [1, 4, 11]. The first to perform an analysis of all 5 compounds (halothane, enflurane, isoflurane, desflurane and sevoflurane) in blood by using the HS technique was a group of Taiwanese scientists in 2001 [11]. However, among methods of SPME, of particular interest is one described in one of the earlier works concerned with analysis of inhalation anaesthetics by F. Musshoff [5], and also a method of determination of toluene and styrene published in 2008 [3].

2. Material and methods

2.1. Reagents and biological material

Three substances that are applied as inhalation anaesthetics were analysed: desflurane (trade name: Suprane, liquid for inhalation, Baxter); sevoflurane (Sevorane, liquid for inhalation, Abbot); and isoflurane (Errane, liquid for inhalation, Baxter). The structural formula of inhalation anaesthetics is shown in Figure 1. A solution of 1-chlorobutane (99.5% HPLC grade, Sigma-Aldrich) in methanol (99.9%, Merck) of 88.6 g/ml concentration was used as an internal standard. Material used for determination of halogenated volatile organic compounds was analyte-free blood originating from a blood donor centre.

$\begin{array}{c} \text{F} \quad \text{H} \quad \text{F} \\ \quad \quad \\ \text{H}-\text{C}-\text{O}-\text{C}-\text{C}-\text{F} \\ \quad \quad \\ \text{F} \quad \text{F} \quad \text{F} \end{array}$	<p>Desflurane (R,S)-2-(difluoromethoxy)- 1,1,1,2-tetrafluoroethane</p>
$\begin{array}{c} \text{F} \quad \text{H} \quad \text{F} \\ \quad \quad \\ \text{H}-\text{C}-\text{O}-\text{C}-\text{C}-\text{F} \\ \quad \quad \\ \text{F} \quad \text{Cl} \quad \text{F} \end{array}$	<p>Isoflurane 2-chloro-2- (difluoromethoxy)- 1,1,1-trifluoroethane</p>
$\begin{array}{c} \text{F} \\ \\ \text{H} \quad \text{F}-\text{C}-\text{F} \\ \quad \\ \text{F}-\text{C}-\text{O}-\text{C}-\text{H} \\ \quad \\ \text{H} \quad \text{F}-\text{C}-\text{F} \\ \\ \text{F} \end{array}$	<p>Sevoflurane 1,1,1,3,3,3-hexafluoro- 2-(fluoromethoxy)propane</p>

Fig. 1. Structural formula of inhalation anaesthetics.

2.2. Equipment

A Focus GC gas chromatograph coupled with a DSQ II mass spectrometer by Thermo Electron Corporation (with an SPB-624 capillary column, 60 m long, I.D. 0.25 mm, film thickness 1.4 mm by Supelco) and an SPME Supelco kit: microsyringe for manual injection and an SPME fibre coated with polydimethyl-

siloxane (PDMS) sorbent with film thickness of 100 μm (red/plain) were used.

A temperature gradient program was used in the procedure. Analysis started at a temperature of 36°C, which was maintained for 4 min. Afterwards the temperature was increased at a rate of 20°C/min up to a final value of 200°C. The final temperature was maintained for an additional 1 min. The total time of the temperature program was 13.20 min.

The helium flow rate through the column was constant at 1.2 ml/min. The temperature of the injector was 200°C. Throughout all analyses, a split injector was used, with a split ratio of 1:10.

The transfer line was heated to 230°C. The temperature of the ion source was 250°C.

Electron impact ionization at an electron energy of 70 eV was applied. The mass detection system worked in total ion current (TIC) mode and in selected ion monitoring (SIM) mode as well. The scanned mass range for TIC was 50–300 amu.

3. Results

3.1. Optimization of HS-SPME

Headspace solid phase microextraction conditions: time and temperature of sorption, addition of other chemical substances to the blood samples and exposure time of the fibre in the injector were selected during the optimization process. The selection criterion was the height of the chromatographic peaks. Results are shown in Figures 2, 3 and 4. One type of fibre was used during the analysis: PDMS 100 μm . The fibre was conditioned in the chromatographic injector (time 30 min, temperature 200°C) before use.

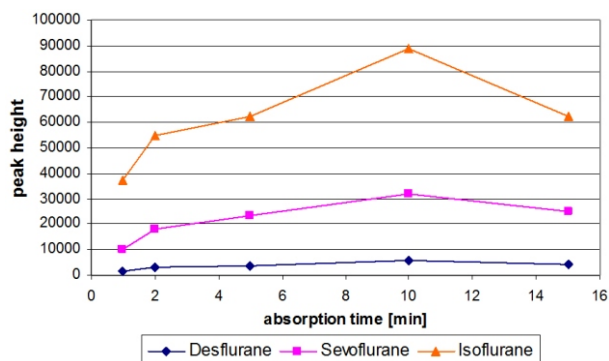


Fig. 2. Optimization of absorption time.

A vial of 10 ml volume was filled with 100 μl of blood, and 10 μl of internal standard (1-chlorobutane in methanol, 88.6 $\mu\text{g/ml}$) was added. Absorption took

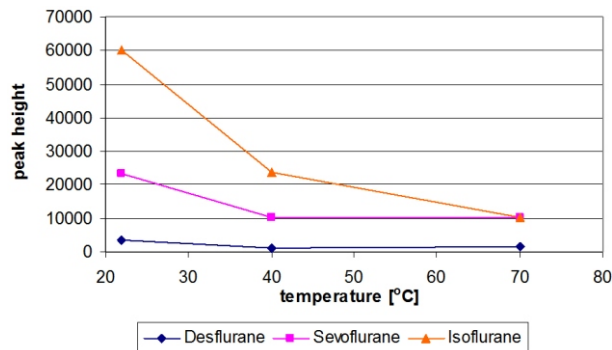


Fig. 3. Optimization of absorption temperature.

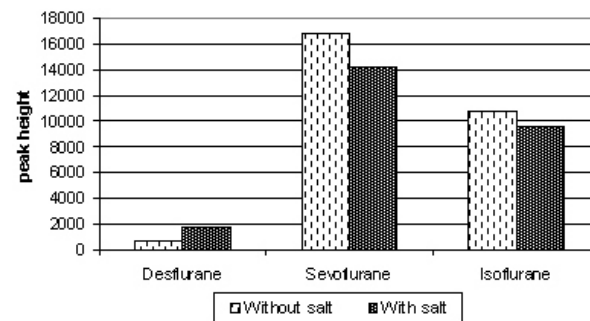


Fig. 4. Comparison of addition and non-addition of salt to the blood sample (100 μl of saturated sodium carbonate).

place immediately after sample preparation; insertion depth of the fibre into the vial was 2 cm (read from the scale of the microsyringe). Absorption occurred at a temperature of 23°C (environment temperature) for 10 min. Afterward the microsyringe was placed inside the injector, where desorption took place for 30 s at a temperature of 200°C. The fibre was inserted to a depth of 3 cm inside the injector.

3.2. Elaboration and validation

3.2.1. Elaboration and validation – general information

Identification of analyzed inhalation anaesthetics was carried out using retention times and m/z values of three fragment ions: the ion with highest intensity in the mass spectrum (the so-called quantitative ion), the ion with the next highest intensity (confirming ion) and an additional ion. The m/z values of the chosen ions are respectively: desflurane 51, 69, 149; sevoflurane 51, 69, 131; isoflurane 51, 115, 117. Mass spectra of analyzed substances obtained in total ion current are shown in Figure 5. Chromatograms obtained in SIM mode for chosen ions of the three analyzed compounds are shown in Figures 6, 7 and 8 for desflurane, sevo-

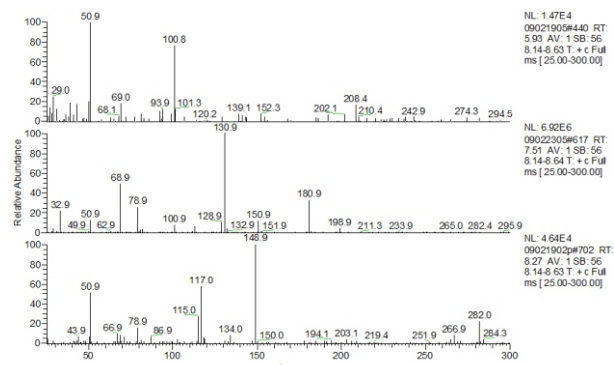


Fig. 5. Mass spectra of desflurane, sevoflurane, and isoflurane.

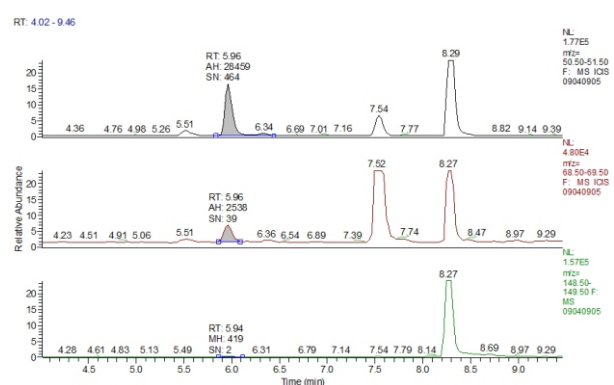


Fig. 6. Chromatograms of desflurane detected in blood sample, concentration 15 g/ml, $RT = 5.96$ min, ions: 51, 69, 149.

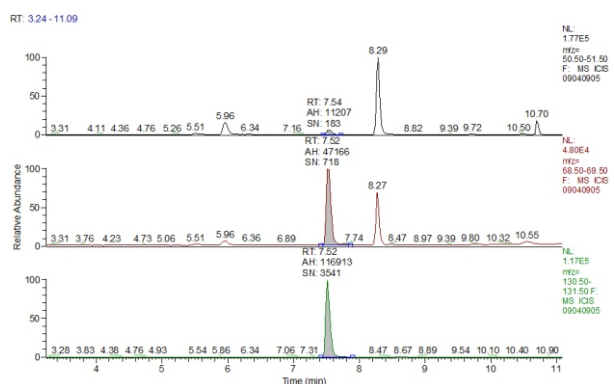


Fig. 7. Chromatograms of sevoflurane detected in blood sample, concentration 15 g/ml, $RT = 7.52$ min, ions: 51, 69, 131.

flurane and isoflurane respectively. Substances were extracted from blood using the developed HS-SPME method.

Validation of the developed method encompassed drawing up of calibration curves and determination of limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), precision, accuracy and specificity.

Furthermore, the effect of the matrix on analyte extraction and the stability of the blood solution contain-

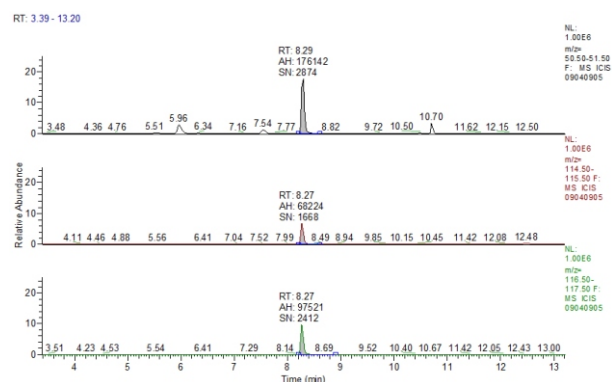


Fig. 8. Chromatograms of isoflurane detected in blood sample, concentration 15 g/ml, $RT = 8.27$ min, ions: 51, 115, 117.

ing inhalation anaesthetics depending on sample preparation (blood collection with a pipette or microsyringe, opening of vials) and storage conditions was studied.

3.2.2. Calibration curves

The linearity range of the concentrations was in the chosen working range and was equal to 0.75–15.0 g/ml (for solutions of substances in blood at 6 concentration levels: 0.75; 1.5; 3.75; 7.5 and 15.0 g/ml). Obtained results were plotted as a relationship between analyte concentration and ratio of analyte peak height to internal standard peak height. For each of the compounds, heights of the peaks of quantitative and confirming ions were used. Linear regression parameters obtained only for quantitative ions are shown in Table I.

TABLE I. PARAMETERS OF CALIBRATION PLOTS

Parameter	Desflurane	Sevoflurane	Isoflurane
a	0.0021	0.0094	0.0144
b	-0.00012	0.0007	0.0023
R^2	0.9988	0.9975	0.9932

3.2.3. Limits of detection and quantification

Obtained values of LOD and LOQ are shown in Table II. The LOQ was taken as the lowest concentration from the established linearity range, because it is the minimal concentration of the analyte that can be quantified using the developed method with assumed precision and accuracy. Limit of detection was calculated from the equation:

$$LOD = \frac{3s}{a}, \quad \{1\}$$

TABLE III. PRECISION AND ACCURACY

Concentration [g/ml]	Desflurane		Sevoflurane		Isoflurane	
Spiked	1.5	15.0	1.5	15.0	1.5	15.0
Average	1.3	14.3	1.3	13.5	1.3	14.6
Confidence interval	0.12	1.03	0.11	1.04	0.17	1.01
Min.	1.1	11.8	1.1	11.6	1.0	12.6
Max.	1.5	15.6	1.5	14.9	1.5	16.3
<i>E</i> [%]	12.8	4.4	15.2	10.1	14.3	2.6
<i>SD</i>	0.14	1.2	0.14	1.2	0.2	1.2
<i>RSD</i> [%]	10.6	8.5	10.7	9.2	15.5	8.3

where: *s* – standard deviation of the blank sample results for analyte retention time, *a* – method sensitivity (calibration line slope coefficient).

TABLE II. LIMITS OF DETECTION AND LIMITS OF QUANTIFICATION

Concentration [µg/ml]	Desflurane	Sevoflurane	Isoflurane
<i>LOD</i>	0.596	0.038	0.027
<i>LOQ</i>	0.750	0.750	0.750

3.2.4. Precision and accuracy

Analyses were carried out for 8 days using two concentrations: 1.50 and 15.0 g/ml. Standard deviation (*SD*) and relative standard deviation (*RSD*) were taken as a measure of precision. Relative error (*E*) was taken as a measure of accuracy. Results are shown in Table III.

3.2.5. Solutions stability

Investigation of the stability of the inhalation anaesthetic substances solutions in blood is of great importance, because in practice analysis is performed with a time delay after sample collection from a person potentially exposed to these substances.

In the first step of the stability study using standard solutions of anaesthetics in blood, the influence of sample preparation methods on results was studied. Quantification of the same standard solution of 15.0 g/ml concentration was done for 5 consecutive days. Every day, the measurement was repeated three times. Samples of 100 µl volume were collected using a pipette

from a vial of 10 ml volume, which was opened each time. Blood was stored at 4°C.

Obtained results are presented in the form of graph in Figure 9. A repeatable drop in analyte content can be seen. It was estimated that the amount of inhalation anaesthetics in blood which was subjected to the described procedure decreased by approximately 20% each day.

The second step of the stability study using stan-

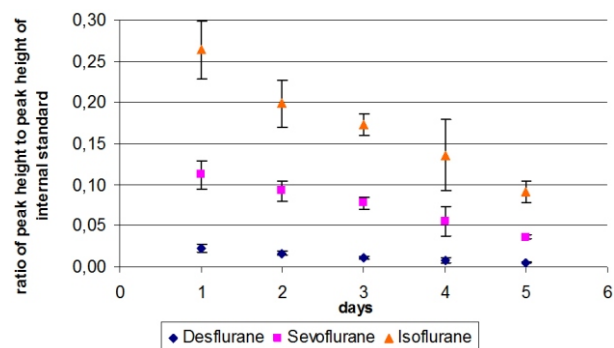


Fig. 9. Results of stability study.

dard solutions of anaesthetics in blood was focused on the influence of the sample storage conditions. Quantification of two standard solutions, both of 15.0 g/ml concentration, but one stored at 4°C and the second at -20°C was carried out. Measurements were repeated three times at defined time intervals. Results are shown in Tables IV and V.

TABLE IV. RESULTS OF STABILITY STUDY –
SAMPLES STORED AT 4 °C

Substance		Concentration [g/ml]		
		After 1 day	After 8 days	After 26 days
Desflurane	I	15.0	3.7	Below <i>LOQ</i>
	II	13.4	3.7	
Sevoflurane	I	12.8	4.6	Below <i>LOQ</i>
	II	11.9	4.4	
Isoflurane	I	14.5	5.1	Below <i>LOQ</i>
	II	14.8	5.4	

TABLE V. RESULTS OF STABILITY STUDY –
SAMPLES STORED AT –20°C

Substance		Concentration [g/ml]		
		After 1 day	After 8 days	After 26 days
Desflurane	I	14.7	16.1	14.8
	II	16.6	17.2	15.6
Sevoflurane	I	15.5	14.5	14.6
	II	14.2	14.5	15.8
Isoflurane	I	15.5	16.2	12.8
	II	16.8	16.4	13.7

3.2.6. Selectivity and estimation of the matrix effect on the extraction degree

In order to estimate the selectivity of the method towards naturally occurring components in the biological matrix, an analysis of 10 blood samples earmarked for toxicological examination was performed, which apart from natural biological background also provided composition variability (e.g. ethyl alcohol). Analysis of the obtained chromatograms did not reveal the presence of substances naturally occurring in blood which would interfere with the quantified substances. It was concluded that the method is selective to the sample matrix.

Estimation of the matrix effect on the HS-SPME extraction degree was based on a comparison between results of analyte extraction from blood and analyte extraction from water solutions using the same method. Quantification was performed on two levels of concentration: 1.5 and 15.0 g/ml. No significant difference was seen in the results obtained from water solutions and from blood samples.

4. Discussion

The initial step of the research was aimed at comparing results obtained by using liquid-liquid extraction and headspace solid phase microextraction. In the case of traditional liquid-liquid extraction using pentane, interference of isoflurane (and also sevoflurane) peaks with overloaded, strongly “tailing” peaks of the extractant was noted. Due to the high volatility of the analytes, vaporization of the solvent was not possible. Co-elution also affected retention times. Attempts using different extractants did not yield satisfactory results either. Only the application of the solvent-free headspace solid phase microextraction technique yielded expected results.

The HS-SPME method proved to be more efficient not only because of better readability of obtained chromatograms, but also because of superior separation and extraction of the compounds. Fewer steps are needed to perform the HS-SPME procedure when compared to LLE, which results in better repeatability and minimization of volatile analyte loss. Moreover, this method is faster, allows analysis of smaller blood sample volumes and obtained extracts contain fewer background compounds. It was ascertained that in the case of volatile organic compounds analysis in biological material, it is recommended to use headspace solid phase microextraction.

In the course of the performed optimization, a procedure of volatile analyte extraction from biological samples was chosen. Optimal absorption time, for which maximal height of all peaks was found, is 10 min (Figure 2). This is the time needed to achieve a blood-gas equilibrium state and also to absorb a maximal amount of the analyzed compounds on the fibre.

The results demonstrate that the optimum temperature for analyte absorption on the fibre is the ambient (room) temperature (without sample heating). This kind of dependence can be explained by the fact that although an increase in temperature increases the blood-gas partition coefficient (equilibrium moved towards gas phase), at the same time the gas-fibre partition coefficient drops, as the absorption process is exothermic.

Comparison of obtained chromatographic peak heights for blood with and without the addition of Na₂CO₃ solution shows that an increase in the ionic strength of the solution does not cause a clear increase in peak heights (Figure 4). A lack of influence of salting on the amount of the absorbed analytes is due to the fact that the substances being determined are poorly soluble in water and therefore they exist in a non-hydrated form.

No significant differences for desorption time of 30 s and 13.20 min (fibre was in the injector for the whole analysis time) were noted. Because of the speed of the analysis and the longer fibre life-span the optimal desorption time was chosen as 30 s.

In the course of the HS-SPME-GC-MS method validation, it was confirmed that the reliability of obtained results depends strongly on the preparation and storage conditions of the blood samples containing halogenated volatile organic compounds. In order to prevent volatile analyte loss it is advisable to keep the samples closed. This is achievable by using a microsyringe instead of an automatic pipette and by using vials of minimal volume, which ensures minimal gas phase volume above the liquid. The opening of vials has the biggest influence on the (in)stability of solutions of inhalation anaesthetics in blood. Therefore it is recommended that samples be collected by puncturing the septum with a micro syringe. It was also found that it is absolutely crucial to store the blood samples at low temperatures (-20°C), even if the analysis is performed shortly after sample collection (less than one week). At temperatures above 0°C , leaking of the substances through the septum of the vial prevents proper quantification of initial analyte content. The decrease in content is very similar for all three determined substances. In the case of storing the samples in the refrigerator, analyte concentrations drop to 2% of the initial value after 26 days. Storage at temperatures below 0°C significantly decreases the rate of analyte evaporation from blood samples. After 26 days of storage at -20°C no significant concentration decrease was found. The largest drop was noted for isoflurane, but the value was still above 80% of the initial one.

5. Summary

1. The developed HS-SPME-GC-MS method of desflurane, sevoflurane, and isoflurane determination in blood samples proved to have satisfactory selectivity, sensitivity, accuracy and precision.
2. The method allows quantification of substances occurring in very low amounts ($LOQ < 1 \text{ g/ml}$).
3. The method is fast (sample preparation time: 10 min, analysis time: 13 min) and the sample preparation steps were kept to a minimum due to the analyte's volatility. Both the storage conditions and the sample preparation procedure affect the reliability of results of analysis of inhalation anaesthetics in blood.
4. The described method can also be applied to determine the presence of other volatile organic compounds in biological material.

References

1. Accorsi A., Valenti S., Barbieri A. [et al.], Enflurane as an internal standard in monitoring halogenated volatile anaesthetics by headspace gas chromatography-mass spectrometry, *Journal of Chromatography A* 2003, 985, 259–264.
2. Atherley R. J., Antognini J. F., A rapid and simple method for determination of halothane, isoflurane and sevoflurane in blood using gas chromatography, *Biomedical Chromatography* 2004, 18, 714–718.
3. Barua R., Chi L., Fitzpatrick R. [et al.], Determination of volatile organic compounds in biological samples using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography: toluene and styrene, *Journal of Analytical Toxicology* 2008, 32, 379–386.
4. Deng X., Simpson V. J., Determination of volatile anaesthetics isoflurane and enflurane in mouse brain tissues using gas chromatography-mass spectrometry, *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 2004, 49, 131–136.
5. Musshoff F., Junker H., Madea B., Rapid analysis of halothane in biological samples using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry – A case of a double homicide, *Journal of Analytical Toxicology* 2000, 24, 372–376.
6. Pihlainena K., Ojanpera I., Analytical toxicology of fluorinated inhalation anaesthetics, *Forensic Science International* 1998, 97, 117–133.
7. Poli D., Bergamaschi E., Manini P. [et al.], Solid-phase microextraction gas chromatographic-mass spectrometric method for the determination of inhalation anaesthetics in urine, *Journal of Chromatography B* 1999, 732, 115–125.
8. Tokarczyk B., Lechowicz W., Inhalational anaesthetics in biological material, *Problems of Forensic Sciences* 2008, 75, 314–325.
9. Wenker O. C., Review of currently used inhalation anaesthetics: Part II, *The Internet Journal of Anesthesiology* 1999, 3, 3.
10. Yang N. C., Hwang K. L., Hung D. Z. [et al.], Reliable gas chromatographic-mass spectrometric method combined with a headspace autosampler for isoflurane determination in blood, *Journal of Chromatography B* 2000, 742, 277–282.
11. Yang N. C., Hwang K. L., Shen C. H. [et al.], Simultaneous determination of fluorinated inhalation anaesthetics in blood by gas chromatography-mass spectrometry combined with a headspace autosampler, *Journal of Chromatography B* 2001, 759, 307–318.

Corresponding author

Marta Suchan
Instytut Ekspertyz Sądowych
ul. Westerplatte 9
PL 31-033 Kraków
e-mail: msuchan@ies.krakow.pl

OZNACZENIE WZIEWNYCH ANESTETYKÓW WE KRWI METODĄ CHROMATOGRAFII GAZOWEJ Z DETEKcją MAS Z WYKORZYSTANIEM NADPOWIERZCHNIOWEJ MIKROEKSTRAKCCI DO FAZY STAŁEJ (HS-SPME-GC-MS)

1. Wstęp

Lotne związki organiczne (VOCs) to grupa związków organicznych, które charakteryzują się wysoką prężnością par i niską rozpuszczalnością w wodzie, a ich temperatury wrzenia są mniejsze lub równe 250°C. Substancje zawierające atomy halogenów w cząsteczce (przeważnie F, Cl, Br) tworzą jedną z podgrup lotnych związków organicznych, tzw. halogenowe lotne związki organiczne (HVOCs). Do tej kategorii zalicza się obecnie stosowane wziewne substancje anestetyczne.

Anestetyki są to środki stosowane w medycynie w celu przejściowego i odwracalnego zniesienia świadomości oraz odczucia bólu w czasie przeprowadzania zabiegów operacyjnych. Ze względu na sposób podania środka te dzielimy na wziewne oraz dożylny. Wśród substancji podawanych drogą oddechową można wyróżnić grupę lotnych cieczy (halotan, enfluran, izofluran, desfluran, sewofluran) oraz gazy anestetyczne (podtlenek azotu, tlen, ksenon). Obecnie stosowane wziewne środki anestetyczne to halogenopochodne etery: enfluran (1966), izofluran (1970), sewofluran (1981) oraz desfluran (1988)¹. Substancje te są zaliczane do potencjalnie niebezpiecznych. Powodem tego jest fakt, że dawka toksyczna powodująca niewydolność krążenia jest w większości przypadków tylko 2–4 razy większa od stężenia wywołującego pożądaną efekt anestetyczny [6].

Analiza toksykologiczna materiału biologicznego na obecność wziewnych anestetyków może być prowadzona w związku z przypadkami dotyczącymi ich użycia w leczeniu zamkniętym (zgony podczas lub zaraz po anestezji, monitorowanie stężenia gazu wdychanego przez pacjenta, analiza narażenia zawodowego) oraz przypadkami dotyczącymi przestępczego wykorzystania tych środków (np. wywołanie stanu nieprzytomności ofiar w celu ułatwienia kradzieży). Jak donoszą media, kradzieże metodą „na śpiocha” są notowane na terenie całej Polski od roku 2004, m.in. w Białymstoku, w Kielcach, w województwie małopolskim, mazowieckim i świętokrzyskim. W większości przypadków późniejsze śledztwa obalają jednak tezę użycia przez włamywaczy środków usypiających. Innego zdania są poszkodowani, którzy nie są w stanie uwierzyć w tak mocny sen wszystkich obecnych na miejscu domowników.

¹ W nawiasach podano datę wprowadzenia danej substancji do praktyki klinicznej.

Rosnąca liczba przypadków domniemanego wykorzystywania szybko ulatniających się środków przez osoby popełniające przestępstwa była powodem podjęcia próby opracowania metody wykrywania oraz oznaczania tych substancji w próbkach biologicznych na potrzeby analiz toksykologicznych. Do oznaczenia wziewnych anestetyków stosowane są różne metody analityczne w zależności od okoliczności zdarzenia oraz postaci badanej próbki. Najczęściej jest to chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas (GC-MS). Obecnie stosowane z tą metodą techniki ekstrakcji analitów z próbek biologicznych znacznie poprawiają osiągane parametry analizy, takie jak granica wykrywalności czy oznaczalności.

Wziewne substancje anestetyczne mogą być oznaczane w różnych próbkach biologicznych, takich jak mocz, krew, mózg, płuca, wątroba. Jednak ze względu na korzystną wartość ich współczynników podziału krew-gaz najczęściej do analizy wykorzystuje się krew. Z powodu nieinwazyjnej metody pobierania próbek np. od pracowników opieki medycznej coraz częściej spotykane jest oznaczenie wziewnych anestetyków w moczu [7]. Do analizy lotnych wziewnych anestetyków we krwi można również stosować ekstrakcję ciecz-ciecz (LLE) [2, 8]. Ponieważ jednak LLE to procedura wielostopniowa, technika ta nie jest zbyt często używana do wyekstrahowania substancji lotnych z obawy przed ich utratą.

Szczególnie przydatna do oznaczania wziewnych substancji anestetycznych we krwi ze względu na korzystną wartość ich współczynników podziału gaz-krew jest technika analizy fazy nadpowierzchniowej (HS) [6]. W literaturze przedmiotu istnieje wiele opisów użycia tej techniki do analizy halogenowych lotnych związków organicznych z różnych materiałów biologicznych: krwi, moczu oraz wycinków narządów (mózg, płuca, wątroba). Zastosowanie HS pozwala na analizę zarówno pojedynczych związków [10], jak i na jednoczesną analizę mieszaniny wziewnych anestetyków [1, 4, 11]. Po raz pierwszy analizy wszystkich pięciu substancji (halotan, enfluran, izofluran, desfluran, sewofluran) we krwi z użyciem analizy fazy nadpowierzchniowej udało się dokonać tajwańskim naukowcom w 2001 roku [11]. Natomiast spośród metod wykorzystujących SPME na szczególną uwagę zasługuje jedna z nich opisana w jednej z wcześniejszych prac dotyczących analizy wziewnych anestetyków, a opracowana przez F. Musshoffa [5], a także metoda oznaczania toluenu oraz styrenu opublikowana w 2008 roku [3].

2. Materiał i metody

2.1. Odczynniki i materiał

Do analizy wykorzystano trzy substancje stosowane w anestezji wziewnej: desfluran (nazwa handlowa: Suprane, płyn do anestezji wziewnej; Baxter); sewofluran (Sevorane, płyn do anestezji wziewnej; Abbott); izofluran (Errane, płyn do anestezji wziewnej; Baxter). Wzory strukturalne badanych wziewnych anestetyków przedstawiono na rycinie 1. Jako standardu wewnętrznego użyto roztworu 1-chlorobutanu (99,5% HPLC grade, Sigma-Aldrich) w metanolu (99,9%, Merck) o stężeniu 88,6 g/ml. Materiałem służącym do analizy lotnych halogenowych związków organicznych była krew wolna od badanych substancji, pochodząca ze stacji krwiodawstwa.

2.2. Aparatura

W trakcie przeprowadzanych badań wykorzystano chromatograf gazowy Focus GC połączony z detektorem mas DSQ II firmy Thermo Co. Elektron (z kolumną kapilarną SPB-624 60 m \times 0,25 mm I.D., grubość filmu 1,4 μ m, Supelco) oraz zestaw do SPME Supelco: mikrostrzykawka do dozowania manualnego i włókno SPME pokryte sorbentem polidimetylosiloksanowym PDMS o grubości filmu 100 μ m (red/plain).

W metodzie zastosowano gradientowy program temperaturowy. Analiza rozpoczynała się przy 36 $^{\circ}$ C i ta temperatura była utrzymywana przez 4 min. Następnie wzrastała z szybkością 20 $^{\circ}$ C/min aż do osiągnięcia wartości końcowej równej 200 $^{\circ}$ C. Temperatura końcowa była utrzymywana przez 1 min. Czas programu temperaturowego wynosił 13,20 min.

Natężenie przepływu helu przez kolumnę było stałe i wynosiło 1,2 ml/min. Temperatura dozownika wynosiła 200 $^{\circ}$ C. Podczas wszystkich analiz stosowano dozowanie z podziałem strumienia gazu, a stosunek podziału był równy 10.

Temperatura linii transferowej wynosiła 230 $^{\circ}$ C, a źródła jonów 250 $^{\circ}$ C. Zastosowano jonizację elektronową o energii 70 eV. Detektor mas pracował w trybie całkowitego prądu jonowego TIC, jak również w trybie monitorowania wybranych jonów SIM. W przypadku trybu TIC zakres skanowanych mas wynosił 50–300 amu.

3. Wyniki

3.1. Optymalizacja HS-SPME

Warunki procedury nadpowierzchniowej mikroekstrakcji do fazy stałej: czas i temperatura sorpcji, dodatek innych substancji chemicznych do próbek krwi oraz czas

ekspozycji włókna w dozowniku dobrano w procesie optymalizacji. Kryterium wyboru stanowiła wysokość pików chromatograficznych. Wyniki przedstawiono na rycinach 2, 3 i 4. Do analizy wykorzystano jeden rodzaj włókna: PDMS 100 μ m. Przed użyciem włókno było kondycjonowane w dozowniku chromatograficznym (czas 30 min, temperatura 200 $^{\circ}$ C).

Do fiołki o pojemności 10 ml pobierano 100 μ l krwi, do której dodawano 10 μ l wzorca wewnętrznego (chlorek butylu w metanolu, 88,6 g/ml). Absorpcja następowała zaraz po przygotowaniu próbki; głębokość wsunięcia włókna w fiołce wynosiła 2 cm (zgodnie z podziałką na mikrostrzykawce). Absorpcja przebiegała w temperaturze 23 $^{\circ}$ C (temperatura otoczenia) przez 10 min. Następnie mikrostrzykawkę przenoszono do dozownika chromatograficznego, gdzie przez 30 s zachodziła desorpcja w temperaturze 200 $^{\circ}$ C. Włókno wsunięte było do dozownika na głębokość 3 cm.

3.2. Opracowanie i walidacja

3.2.1. Opracowanie i walidacja – informacje ogólne

Do identyfikacji analizowanych wziewnych anestetyków wykorzystano czasy retencji oraz wartości m/z trzech jonów fragmentacyjnych: jonu o najwyższej intensywności w widmie masowym (tzw. jon ilościowy), jonu o kolejno niższej intensywności (jon potwierdzający) oraz jonu dodatkowego. Wybrane wartości m/z jonów analizowanych substancji to odpowiednio: desfluran 51, 69, 149; sewofluran: 51, 69, 131; izofluran: 51, 115, 117. Widma masowe analizowanych substancji otrzymane w trybie całkowitego prądu jonowego pokazano na rycinie 5. Na rycinach 6, 7, 8 przedstawiono chromatogramy uzyskane w trybie SIM dla wybranych w metodzie jonów trzech analizowanych substancji, odpowiednio: desfluranu, sewofluranu oraz izofluranu. Substancje były wyekstrahowane z krwi opracowaną metodą HS-SPME.

Walidacja opracowanej metody obejmowała wyznaczenie (dla trzech badanych substancji) zależności kalibracyjnej, granicy wykrywalności, granicy oznaczalności, precyzji, dokładności oraz specyficzności. Zbadano także wpływ matrycy na ekstrakcję analitów oraz stabilność roztworów krwi zawierającej wziewne anestetyki w zależności od sposobu przygotowania próbek (pobieranie krwi pipetą lub mikrostrzykawką, otwieranie fiołek) oraz warunków przechowywania.

3.2.2. Zależności kalibracyjne

Zakres liniowości stężeń pokrył się z wybranym zakresem roboczym i wynosił 0,75–15 g/ml (dla roztworów substancji we krwi na 6 poziomach stężeń: 0; 0,75; 1,5; 3,75; 7,5 i 15 g/ml). Otrzymane wyniki określono w postaci zależności stężenia analitu od sto-

sunku wysokości pików analitu do wysokości pików odpowiadającego standardowi wewnętrznemu. Dla każdego związku uwzględniono wysokość pików jonu ilościowego oraz potwierdzającego. Parametry prostych otrzymanych dla jonów ilościowych zebrano w tabeli I.

3.2.3. Granica wykrywalności i oznaczalności

Otrzymane wartości granicy wykrywalności LOD i granicy oznaczalności LOQ zebrano w tabeli II. Za granicę oznaczalności LOQ przyjęto najniższe stężenie z wyznaczonego zakresu liniowości metody, ponieważ jest to minimalna wartość stężenia analitu, którą można wyznaczyć opracowaną metodą analityczną z założoną precyzją i dokładnością. Granicę wykrywalności LOD wyznaczono ze wzoru:

$$LOD = \frac{3s}{a}, \quad \{1\}$$

gdzie: s – odchylenie standardowe wyników ślepej próby dla czasu retencji analitu, a – czułość metody (współczynnik nachylenia linii kalibracyjnej).

3.2.4. Precyzja i dokładność

Oznaczenia prowadzono przez 8 dni na dwóch poziomach stężeń: 1,50 oraz 15,0 g/ml. Jako miarę precyzji przyjęto wartość odchylenia standardowego SD oraz względnego odchylenia standardowego RSD . Jako miarę dokładności przyjęto błąd względny E . Wyniki zebrano w tabeli III.

3.2.5. Stabilność roztworów

Zbadanie stabilności roztworów wziewnych substancji anestetycznych we krwi jest szczególnie istotne, ponieważ w praktyce wykonuje się analizy próbek po pewnym czasie od momentu pobrania krwi od osoby narażonej na działanie tych substancji.

W pierwszym etapie badania stabilności roztworów wzorcowych anestetyków we krwi sprawdzano wpływ metody przygotowania próbek na otrzymywane wyniki. Prowadzono oznaczenia dla tego samego roztworu wzorcowego o stężeniu 15,0 g/ml przez 5 dni. Każdego dnia pomiar powtarzano trzykrotnie. Próbkę krwi o objętości 100 l pobierano za pomocą pipety z fiolki o pojemności 10 ml, która zawsze była otwierana. Krew przechowywano w temperaturze 4°C.

Otrzymane wyniki zostały przedstawione w postaci wykresu na rycinie 9. Widoczny jest na niej powtarzalny spadek zawartości analitów. Oszacowano, że zawartość wziewnych substancji anestetycznych we krwi, która była poddawana opisanemu procedurze badawczej, maleje o około 20% w ciągu jednego dnia.

W drugim etapie badania stabilności roztworów wzorcowych anestetyków we krwi skupiono się na wpływie warunków przechowywania próbek. Prowadzono oznaczenia dla dwóch roztworów o stężeniu 15 g/ml, które przechowywano w różnych warunkach: jeden w temperaturze 4°C, drugi w temperaturze -20°C. Oznaczenia były powtarzane trzykrotnie w określonych odstępach czasu. Wyniki zebrano w tabelach IV i V.

3.2.6. Specyficzność oraz ocena wpływu matrycy na stopień ekstrakcji

W celu zbadania specyficzności metody pod kątem składników naturalnie występujących w matrycy biologicznej, przeprowadzono analizę 10 próbek krwi przeznaczonych do badań toksykologicznych, co, oprócz naturalnego tła biologicznego, zapewniło zmienność składu (np. alkohol etylowy). Analiza otrzymanych chromatogramów nie wykazała obecności substancji naturalnie występujących we krwi, które interferowałyby z oznaczanymi substancjami. Stwierdzono, że opracowana metoda jest specyficzna ze względu na matryce próbek.

Oceny wpływu matrycy próbki na stopień ekstrakcji HS-SPME dokonano na podstawie porównania wyników ekstrakcji analitów z krwi z ekstrakcją analitów przeprowadzoną tą samą metodą z roztworów wodnych. Oznaczenia dokonano na dwóch poziomach stężeń: 1,5 oraz 15 g/ml. Nie stwierdzono istotnych różnic w wynikach uzyskanych dla roztworów wodnych oraz dla próbek krwi.

4. Omówienie wyników

Wstępny etap badań miał na celu porównanie wyników uzyskanych przy zastosowaniu ekstrakcji ciecz-ciecz oraz nadpowierzchniowej mikroekstrakcji do fazy stałej. W przypadku tradycyjnej ekstrakcji ciecz-ciecz z zastosowaniem pentanu stwierdzono interferencje pików izofluranu (a także sewofluranu) z przeładowanymi, silnie „ogonującymi” pikami pochodzącymi od ekstrahenta. Ze względu na dużą lotność analitów, odparowanie rozpuszczalnika było niemożliwe. Koelucja wpływała także na czasy retencji. Próba użycia innych ekstrahentów również nie rozwiązała problemu w zadawalającym stopniu. Dopiero zastosowanie bezrozpuszczalnikowej techniki nadpowierzchniowej mikroekstrakcji do fazy stałej przyniosło spodziewane rezultaty.

Metoda HS-SPME okazała się bardziej efektywna zarówno ze względu na czytelność uzyskanych chromatogramów, jak i rozdział substancji i stopień ekstrakcji. Liczba etapów opracowanej procedury HS-SPME w porównaniu z ekstrakcją ciecz-ciecz jest znacznie mniejsza, co wpływa na zwiększenie powtarzalności oraz minimalizację strat lotnych analitów. Metoda ta jest także

szybsza, umożliwia analizę mniejszych objętości próbek krwi, a otrzymane ekstrakty zawierają mniej składników tła. Jednoznacznie stwierdzono, że w przypadku analiz lotnych związków organicznych w materiale biologicznym wskazane jest zastosowanie nadpowierzchniowej mikroekstrakcji do fazy stałej.

W toku przeprowadzonej optymalizacji dobrano procedurę ekstrakcji lotnych analitów z próbek biologicznych. Optymalny czas absorpcji, dla którego uzyskano maksymalną wysokość wszystkich pików, to 10 min (rycina 2). Czas ten jest potrzebny na osiągnięcie stanu równowagi krew-gaz oraz na zaabsorbowanie na włóknie maksymalnej ilości badanych substancji.

Uzyskane wyniki pozwalają stwierdzić, że optymalna temperatura absorpcji analitów na włóknie to temperatura otoczenia (bez podgrzewania próbki). Taką zależność można tłumaczyć tym, że co prawda wzrost temperatury powoduje wzrost współczynnika podziału krew-gaz (równowaga jest przesunięta w stronę przechodzenia do fazy gazowej), ale jednocześnie spada współczynnik podziału gaz-włókno, ponieważ absorpcja jest procesem egzotermicznym.

Porównanie otrzymanych wysokości pików chromatograficznych dla krwi bez dodatku oraz z dodatkiem roztworu Na_2CO_3 pokazuje, że zwiększenie siły jonowej roztworu nie spowodowało jednoznacznego wzrostu wysokości pików (rycina 4). Brak wpływu wysalania na ilość zaabsorbowanych analitów związany jest z faktem, że badane substancje są bardzo słabo rozpuszczalne w wodzie, a zatem występują one w postaci niezhydratowanej.

Nie stwierdzono istotnych różnic dla czasu desorpcji 30 s oraz 13,20 min (włókno pozostało w dozowniku przez cały czas trwania analizy). Ze względu na szybkość wykonywanych analiz oraz dłuższą żywotność włókna, za optymalny czas desorpcji przyjęto 30 s.

W trakcie walidacji metody HS-SPME-GC-MS potwierdzono, że na wiarygodność uzyskiwanych wyników ma bardzo duży wpływ sposób przygotowania oraz przechowywania próbek krwi, które zawierają lotne halogenowe związki organiczne. Aby zapobiec stratom lotnych analitów, wskazane jest utrzymanie zamkniętych próbek. Można to uzyskać m.in. poprzez pobieranie ich mikrostrzykawką (a nie pipetą automatyczną) oraz stosowanie fiolek o możliwie minimalnej pojemności, co gwarantuje minimalną objętość fazy gazowej nad cieczą. Największy wpływ na niestabilność roztworów wziewnych anestetyków we krwi ma otwieranie fiolek, dlatego zaleca się pobieranie próbek krwi poprzez przekłucie sept mikrostrzykawką. Stwierdzono także, że bezwzględnie konieczne jest przechowywanie próbek krwi w niskich temperaturach (-20°C), nawet jeśli analiza przeprowadzana jest w krótkim czasie po pobraniu (mniej niż jeden tydzień). W temperaturach dodatnich ulatnianie się substancji przez septę fiolki uniemożliwia prawidłowe oznaczenie pierwotnej zawartości analitów. Spadek za-

wartości jest bardzo zbliżony dla trzech badanych substancji. W przypadku przechowywania próbek w lodówce, po 26 dniach stężenia analitów zmalały do około 2% zawartości początkowej. Temperatura ujemna znacznie spowalnia proces ulatniania się analitów z próbek krwi. Po 26 dniach przechowywania w temperaturze -20°C nie stwierdzono znacznego spadku stężeń analitów. Największy spadek zauważono dla izofluranu, ale i tak jego zawartość wyniosła ponad 80% zawartości początkowej.

5. Podsumowanie

1. Opracowana metoda HS-SPME-GC-MS oznaczania desfluranu, sewofluranu i izofluranu w próbkach krwi charakteryzuje się zadowalającą selektywnością, czułością, dokładnością i precyzją.
2. Metoda pozwala na oznaczenie substancji występujących w bardzo małych ilościach ($LOQ < 1 \text{ g/ml}$).
3. Metoda jest szybka (czas przygotowania próbki: 10 min, czas analizy 13 min), a etapy przygotowania próbki zostały maksymalnie ograniczone ze względu na lotność analitów. Zarówno sposób przechowywania, jak i metodyka przygotowania próbek wziewnych substancji anestetycznych we krwi ma wpływ na uzyskanie wiarygodnych wyników analizy.
4. Opisana metoda może być wykorzystana także do analizy obecności innych lotnych związków organicznych w materiałach biologicznych.