

SUICIDAL BRUCINE INTOXICATION – A CASE REPORT

Roman STANASZEK, Wojciech LECHOWICZ

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

Abstract

The aim of this work was to identify an unknown white substance found by the body of a dead male who had committed suicide, and to detect this compound in post-mortem blood, which had been submitted for analysis. The white substance was analysed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). Determination of brucine – the compound which was detected in the powder – was performed by high pressure liquid chromatography (HPLC). In order to determine brucine in blood, the specimen was extracted with ethyl acetate (pH 9). The extracts were analysed by means of liquid chromatography coupled to electrospray mass spectrometry (LC-ESI-MS). Brucine was detected in the white powder which was found (in a glass) by the corpse. The concentration of brucine in the powder was 97.7%. Brucine was found in the post-mortem blood of the deceased at a concentration of 5.0 g/ml. Brucine is a bitter alkaloid closely related to strychnine. Both compounds are found in *Strychnos nux vomica* L. (vomic nut). Brucine is an alkaloid resembling strychnine, but it is much less potent than strychnine. This poison causes paralysis of the peripheral nerve endings and violent convulsions.

Key words

Brucine; Strychnine; Toxins.

Received 8 October 2009; accepted 31 December 2009

1. Introduction

Brucine (Figure 1) is an indol alkaloid – a dimethoxy derivative of strychnine (Figure 2). Both compounds are contained in the seeds of *Strychnos nux vomica* L. – also known as vomic nut – which grows in South-Eastern Asia. Concentrations of strychnine and brucine in seeds range from 2 to 5%, but the strychnine content is higher than that of brucine. Besides these two alkaloids, the seeds contain smaller quantities of other alkaloids such as colubrine, vomicine, novacine and pseudostrychnine, as well as loganic and chlorogenic acid, lipids and proteins.

Seed extracts show peripheral and central activity in the body. After ingestion of therapeutic doses, their bitter taste increases excretion of gastric juices. Vomic nut alkaloids are readily absorbed in the gastric system, causing stimulation of the vegetative centres in

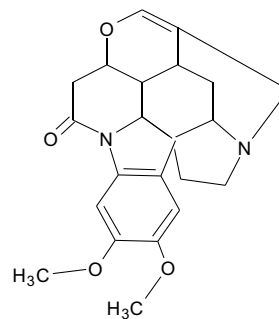


Fig. 1. Chemical structure of brucine.

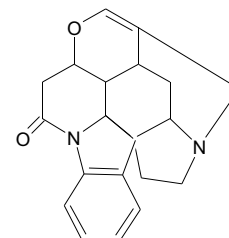


Fig. 2. Chemical structure of strychnine.

the medulla oblongata, which leads to the intensification of visual and auditory sensations. A patient feels better and gets increased strength and energy, which is caused mostly by strychnine. Doses exceeding therapeutic ones lead to increase in tension of transversely

striated muscles. Toxic doses cause tetanic convulsions of all skeletal muscles, leading to suffocation. The swallowing of several seeds of *Strychnos nuxvomica L.* may be fatal.

Due to similarities in chemical structure, brucine itself shows similar although weaker action compared to strychnine. Brucine is toxic after inhalation and ingestion. When heated, this substance emits irritating and toxic nitric oxide fumes. Brucine causes paralysis of the central nervous system and efferent nerve endings. This can cause nausea, vomiting, restlessness, excitement, twitching, shortness of breath, spasms (muscles), violent convulsions and loss of consciousness. Liver and kidney damage can occur. Larger doses may cause death. The estimated lethal dose for human adults is 1 g [2].

Pure brucine is a white, very bitter crystal substance. In laboratory chromatographic analysis, it is applied in the separation of racemic mixtures with use of chiral stationary phases or chiral additives in the mobile phase. The separation is based on creation of intermediate diastereoisomeric complexes between the discriminatory compound, which is an element of the stationary or chiral mobile phase, and a molecule of the separated substance. Differences of stability of these complexes lead to retention time differences. Brucine is also used to denature alcohol products and oils [3] although brucine is not allowed to be a denaturant of ethyl alcohol in Poland. It is used in the production of cosmetics [3], lubricants, glues and tanning preparations [1]. Brucine and other *Strychnos* seeds alkaloids are also used as pesticides, e.g. for extermination of rodents in agriculture. Extracts of *Strychnos nuxvomica L.* are used in production of homeopathic medicines. Brucine is relatively rarely used in households and industry, so intoxications by this compound are uncommon.

The aim of this work was to describe a rare case of suicidal intoxication with brucine.

2. Materials and methods

2.1. Case report and description of materials submitted for analysis

The following case concerned the suicidal intoxication of a male who was found dead at his home. A glass with a teaspoon containing 1.10 g of a white crystal substance on the bottom and sides (of the glass), and on the surface of the teaspoon was found beside the corpse. From the obtained information, it transpired that the suicide had access to various types of

chemicals and poisons. The substance which was found at the death scene and the blood sample collected from the dead body were submitted for analysis to identify the white powder and to verify if this substance was linked with the death of the man.

2.2. Chemicals

Chemicals used for analysis: acetonitrile (gradient grade) and methanol (analytical grade) purchased in Merck (Germany).

2.3. Identification of the white substance found in the glass

A small amount of the white substance (approximately 0.01 g) was dissolved in methanol and the solution was analysed by the GC-MS method for semi-volatile organic compounds. The analysis was performed with a gas chromatograph (HP 6890 GC System) coupled to a mass spectrometer (Agilent 5973 Network Mass Selective Detector) equipped with a quadrupole mass analyzer (Agilent Technologies, USA). The gas chromatograph was equipped with a split/splitless detector which was maintained at 280°C. Sample injection (1 μ l) was splitless. Sample components separation was carried out on an HP-5MS capillary column (Agilent Technologies, USA; column length 30 m, inner diameter 0.25 mm, film thickness 0.25 μ m). Helium was used as the carrier gas. The flow rate of helium was 1.0 ml/min. The temperature programme consisted of three segments. The initial temperature of the column (75°C) was maintained for 1 min, then increased linearly by 20°C/min up to 275°C, then maintained for 9 min. The mass detector was set to positive electron impact mode (EI), electron beam energy was 70 eV. The mass detector operated in full scan mode from 40–600 amu.

The white powder was additionally analysed by Fourier transform infrared spectrometry (FT-IR) with attenuated total reflectance (ATR) technique. The analysis was performed with Avatar 370 (Thermo Nicolet) in standard conditions (wavelength range 4000–400 cm^{-1} , scan number 32, resolution 4, detector DTGS KBr).

2.4. Quantitative determination of the compound found in the white residues in the glass

In order to determine brucine in the white powder, 10 mg was weighed out and dissolved in 10 ml methanol-water mixture (1:1, v/v) and diluted 50 times with water containing 100 μ g 185% orthophosphoric acid per

1 litre. The sample solution was analysed by HPLC-DAD with the use of a Merck-Hitachi HPLC Lachom D-7000 System (Germany). Sample components separation was performed on an RP-18e Chromolit® Performance Column maintained at 30°C. The mobile phase was made up with water containing 100 1 85% orthophosphoric acid per 1 litre, and acetonitrile. The flow rate was 1 ml/min. The following elution gradient was applied: 0 min – 0% AcCN, 20 min – 100% AcCN, 21 min – 0% AcCN, 26 min – 0% AcCN. The injection was performed automatically by the auto-sampler. The injection volume was 20 1. The detector was set to monitor 200–400 nm wavelength range.

2.5. Blood analysis

For the determination of brucine in blood, the specimen was extracted with ethyl acetate in an alkaline environment (pH 9). The extracts were analysed by liquid chromatography coupled to mass spectrometry with electrospray ionization (LC-ESI-MS) utilising Agilent Technologies HP-1100 Series apparatus (USA). Nitrogen generated in a Whatman (USA) nitrogen generator was applied as a nebulising gas. The liquid chromatograph was equipped with a LiChroCART 125 3 column with Purospher 60 RP-18e filling, 5 m (Merck, Germany) thermostated at 30°C. The mobile phase consisted of a mixture of re-distilled water and acetonitrile with addition of formic acid (1000 1/l). The mobile phase flow was 0.8 ml/min and took place in a gradient system: 0 min – 0% acetonitrile (AcCN), 15 min – 40% AcCN, 15.20 min – 0% AcCN and 20 min – 0% AcCN. Injection was performed automatically by an autosampler, and the volume of the injection was 20 1. The capillary voltage was set to 3500 V, whilst the fragmentor voltage was 160 V. Positive ions were analysed in selected ion recording (SIR) mode.

Quantitative analysis was performed in selected ion recording mode (SIR). The pseudomolecular ion and the fragment ions (m/z 301, 324, 395) of the determined compound were monitored together with the pseudomolecular ion of papaverine (m/z 340), which was used as the internal standard.

3. Results and discussion

Figure 3a shows the chromatogram which was obtained by application of GC/MS. The main chromatographic peak (retention time 40.0 min) was related to a mass spectrum (Figure 3b) with main ions m/z 394, 379, and 197.

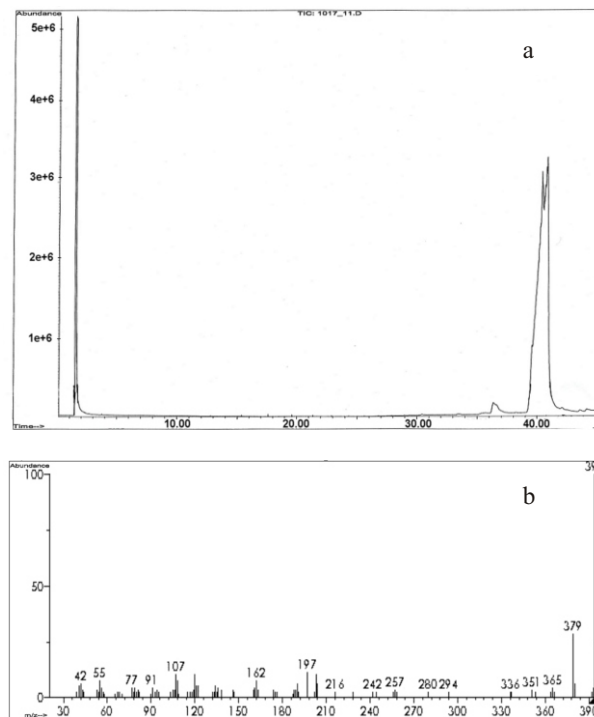


Fig. 3a. GC/MS total ion chromatogram of the components of the powder; Fig. 3b. Mass spectrum of the main component of the powder.

By comparing the obtained mass spectrum with spectra libraries (NIST98, Wiley-VCH), the best match was achieved for brucine. FTIR analysis confirmed the above mentioned result.

Next, in order to quantify the detected compound, HPLC analysis of the powder and brucine reference standard was performed. Figure 4a shows the chromatogram, whilst Figure 4b shows the UV spectrum of the determined brucine. The internal standard method was used for quantification. Brucine was determined at a concentration of 97.7% in the white substance which was found in the glass at the scene of the man's death. Figure 5 shows LC-ESI-MS chromatograms of specifically selected ions for brucine and papaverine. The relative ion intensities of 395, 324 and 340 were similar to those of the reference standards.

Brucine was detected in blood at a concentration of 5.0 g/ml. Such concentrations are found in fatal cases of intoxications with this compound, such as [4], concerning a 34 year old female who died after swallowing powder containing seeds of *Strychnos nux vomica* L. for medical purposes. Analysis of blood and gastric content was performed. The concentration of brucine in blood was 1.88 g/ml, whilst strychnine was found at the level of 2.09 g/ml. In the literature concerning this subject, there are no case reports connected to intoxication with pure brucine.

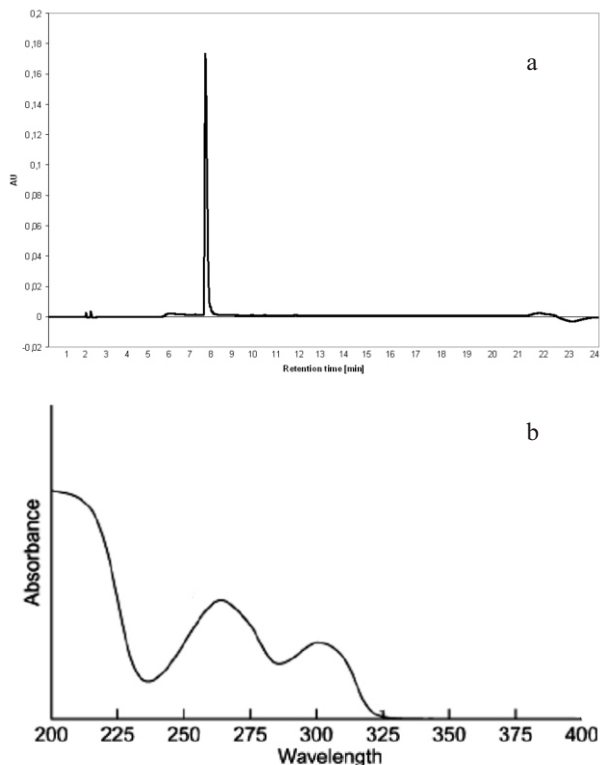


Fig. 4a. HPLC separation of the components of the powder; Fig. 4b. UV spectrum of the active compound (brucine).

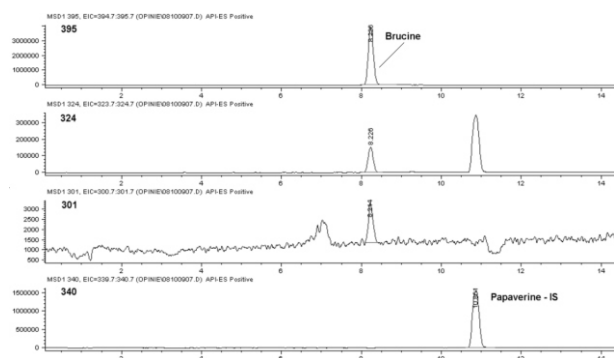


Fig. 5. LC-ESI-MS extracted ion chromatogram of the blood sample.

4. Summary

Brucine and strychnine poisoning have been rare in recent years. There are few scientific publications concerning these intoxications. The described case is exceptional, because the deceased, according to Police information, had access to various types of poisons due to his profession. For identification and (quantitative) determination of brucine, GC-MS and HPLC

methods were used. Confirmation of brucine in blood required application of LC-ESI-MS. Just a dozen or so years ago, colour tests were applied, e.g. with nitric acid and tin chloride, to identification of the above mentioned poisons, or else typical symptoms for strychnine or brucine poisoning were observed, such as characteristic convulsive body bending into a shape resembling an arch or the so-called sardonic smile syndrome (*risus sardonicus*).

References

1. Arena J. M., Drew R. H., Poisoning, toxicology symptoms, treatments, C. C. Thomas, Springfield 1986.
2. Gosselin R. E., Smith R. P., Hodge H. C., Clinical toxicology of commercial product, Williams & Wilkins, Baltimore – London 1984.
3. Merck Index, Merck & Co Inc., Rahway, New Jersey 1989.
4. Wang Z., Zhao J., Xing J. [et al.], Analysis of strychnine and brucine in postmortem specimens by RP-HPLC: A case report of fatal intoxication, *Journal of Analytical Toxicology* 2004, 28, 2, 141–144.

Corresponding author

dr Roman Stanaszek
Instytut Ekspertyz Sądowych
ul. Westerplatte 9
PL 31-033 Kraków
e-mail: rstanaszek@ies.krakow.pl

SAMOBÓJCZE ZATRUCIE BRUCYNĄ – OPIS PRZYPADKU

1. Wprowadzenie

Brucyna (rycina 1) jest alkaloidem indolowym – dimetoksylową pochodną strychniny (rycina 2). Obydwie substancje zawarte są w nasionach rośliny *Strychnos nuxvomica* L. zwanej kulczyba wronie oko, która występuje w krajach południowo-wschodniej Azji. Stężenie strychniny i brucyny w nasionach waha się w granicach 2–5%, jednak zawartość strychniny jest większa niż brucyny. Oprócz tych dwóch alkaloidów w nasionach znajdują się w mniejszych ilościach również inne alkaloidy, takie jak kolubryna, womicyna, nowacyna, pseudostrychnina, a także kwas loganinowy i chlorogenowy, tłuszcze oraz białka.

Wyciągi z nasion kulczyby wykazują w organizmie ludzkim działanie obwodowe i ośrodkowe. W dawkach leczniczych po podaniu doustnym ich gorzki smak powoduje wydzielanie się soków żołądkowych. Alkaloidy kulczyby zostają szybko wchłonięte z przewodu pokarmowego, po czym powodują one pobudzenie ośrodków wegetatywnych w rdzeniu przedłużonym. Dochodzi do intensyfikacji percepcji wrażeń wzrokowych i słuchowych. Subiektywnie pacjent odczuwa poprawę samopoczucia, przyrost siły i energii; za to działanie jest odpowiedzialna głównie strychnina. Dawki większe od leczniczych prowadzą do nasilenia napięcia mięśni poprzecznie prążkowanych. W dawkach toksycznych dochodzi do porażenia tęczowego wszystkich mięśni szkieletowych, co może prowadzić do uduszenia. Połknięcie kilku nasion kulczyby może okazać się śmiertelne.

Sama brucyna ze względu na analogie w budowie chemicznej wykazuje podobne, lecz słabsze działanie niż strychnina. Działa toksycznie przez drogi oddechowe oraz po jej połknięciu. Związek ten po podgrzaniu wydziela trujące i drażniące opary tlenków azotu. Brucyna poraża ośrodkowy układ nerwowy i zakończenia nerwów ruchomych. Może spowodować nudności, wymioty, pobudliwość, drżenie, duszność, skurcze (objawy mięśniowe), silne konwulsje oraz utratę przytomności. Dochodzi do uszkodzenia wątroby i nerek. Większe dawki mogą doprowadzić do zgonu. Szacowana dawka śmiertelna dla dorosłego człowieka wynosi 1 g [2].

Czysta brucyna jest białą, bardzo gorzką, krystaliczną substancją. Bywa wykorzystywana w chromatograficznej analizie laboratoryjnej do rozdziału mieszanin racemicznych z użyciem chiralnych faz stacjonarnych lub chiralnych dodatków do fazy ruchomej. Rozdział oparty jest na tworzeniu się przejściowych diastereoizomerycznych kompleksów pomiędzy cząsteczką różnicującą, będącą elementem stacjonarnej lub chiralnej fazy ruchomej, a cząsteczką rozdzielanej substancji. Różnica w stabilności tych kompleksów prowadzi do różnicy czasów re-

tencji. Innym zastosowaniem jest wykorzystanie brucyny do skażania wyrobów alkoholowych oraz olejów [3]. W Polsce stosowanie brucyny do skażania alkoholu etylowego jest zabronione. Stosuje się ją w produkcji kosmetyków [3], lubrykantów, klejów czy preparatów do opalania się [1]. Brucyna i inne alkaloidy otrzymane z nasion kulczyby są także stosowane jako pestycydy do likwidacji szkodników, np. gryzoni w rolnictwie. Wyciągi z tej rośliny są używane do produkcji leków homeopatycznych. Brucyna jest stosunkowo rzadko wykorzystywana w gospodarstwach domowych i w przemyśle, stąd zatrucia nią zdarzają się sporadycznie.

Celem tej pracy było opisanie rzadkiego przypadku samobójczego zatrucia brucyną.

2. Materiały i metody

2.1. Opis przypadku i materiał nadesłany do badań

Przypadek dotyczył samobójczego zatrucia mężczyzny, przy którego zwłokach znaleziono szklankę z łyżeczką zawierającą na dnie i na ścinkach szklanki oraz na powierzchni łyżeczki białą, przyschniętą, krystaliczną substancję o masie 1,10 g. Z uzyskanych informacji wynikało, że samobójca miał dostęp do różnego rodzaju chemikaliów i trucizn. Do badań nadesłano znaną na miejscu zgonu substancję oraz próbę krwi pobraną ze zwłok. Materiał dowodowy dostarczono do badań w celu identyfikacji pozostającego na miejscu zdarzenia białego proszku oraz stwierdzenia, czy znaleziona substancja miała związek ze zgonem.

2.2. Odczynniki chemiczne

Użyto odczynników: acetonitrylu (czystości gradientowej) oraz metanolu (cz.d.a.) zakupionych w firmie Merck (Niemcy).

2.3. Identyfikacja białej substancji znajdującej się w szklance

Niewielką ilość białej substancji (około 0,01 g) rozpuszczono w metanolu i poddano analizie na obecność trudno lotnych związków organicznych metodą GC-MS, wykorzystując chromatograf gazowy (HP 6890 GC System) sprzężony ze spektrometrem mas (Agilent 5973 Network Mass Selective Detector) oraz wyposażony w kwadrupolowy analizator mas firmy Agilent Technologies (Stany Zjednoczone). Chromatograf gazowy posiadał dozownik typu z podziałem/bez podziału (*split/*

splitless) utrzymywany w temperaturze 280°C. Wstrzyknięcia próbek (1 l) dokonywano automatycznie w systemie bez podziału. Rozdział składników następował przy użyciu kolumny kapilarnej HP-5MS (Agilent Technologies, Stany Zjednoczone); długość kolumny 30 m, średnica wewnętrzna 0,25 mm, grubość filmu 0,25 m. Gazem nośnym był hel, którego przepływ przez kolumnę wynosił 1,0 ml/min. Program temperaturowy kolumny składał się z 3 segmentów. Temperatura początkowa kolumny (75°C) była utrzymywana przez 1 min, następnie wzrastała liniowo z szybkością 20°C/min do 275°C i przez 9 min nie zmieniała swojej wartości. Detektor masowy pracował w trybie pozytywnej jonizacji elektronowej (EI) przy energii wiązki bombardujących elektronów równej 70 eV i skanowaniu mas zakresie od 40 do 600 amu.

Biały proszek poddano dodatkowo badaniom identyfikacyjnym metodą spektrometrii w podczerwieni (FT-IR) techniką tłumionego wewnętrznego odbicia (ATR) za pomocą aparatu Avatar 370 firmy Thermo Nicolet w warunkach standardowych (zakres widma 4000–400 cm⁻¹, liczba skanów 32, rozdzielczość 4, detektor DTGS KBr).

2.4. Oznaczanie substancji znajdującej się w pozostałości ze szklanki

W celu wyznaczenia zawartości brucyny w białym proszku, 10 mg naważkę rozpuszczono w 10 ml mieszaniny metanol:woda (1:1, v/v) i rozcieńczono 50-krotnie wodą z dodatkiem 85% kwasu ortofosforowego (100 l/litr wody). Otrzymany roztwór poddano badaniom metodą HPLC z detekcją diodową (HPLC-DAD), używając aparatu HPLC Lachom D-7000 System Merck-Hitachi (Niemcy). Rozdział składników próbek był prowadzony na kolumnie RP-18e Chromolit® Performance (4,6 m, 100 mm, Merck, Niemcy) termostатовanej w 30°C. Faza ruchoma składała się z mieszaniny wody z dodatkiem kwasu ortofosforowego (100 l/l) oraz acetonitrylu. Przepływ fazy ruchomej wynosił 1 ml/min. Elucja następowała w następujących warunkach gradientowych: 0 min – 0 % AcCN, 20 min – 100% AcCN, 21 min – 0% AcCN, 26 min – 0% AcCN. Wstrzyknięcia dokonywane były automatycznym podajnikiem próbek, a ich objętość wynosiła 20 l. Detektor rejestrował widmo spektrofotometryczne w zakresie długości fal 200–400 nm.

2.5. Analiza krwi

W celu oznaczania brucyny we krwi materiał ten poddano ekstrakcji octanem etylu ze środowiska zasadowego (pH 9). Ekstrakty analizowano metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas, stosując jonizację przez elektrorozpylanie (LC-ESI-MS) z wykorzystaniem aparatu firmy Agilent Technologies HP-1100 Series (Stany Zjednoczone). Jako gazu rozpyla-

jącego użyto azotu wytwarzanego w generatorze azotu firmy Whatman (Stany Zjednoczone). Chromatograf cieczowy był wyposażony w kolumnę LiChroCART 125 3 z wypełnieniem Purospher 60 RP-18e, 5 m (Merck, Niemcy) termostатовaną w 30°C. Faza ruchoma składała się z mieszaniny wody i acetonitrylu z dodatkiem kwasu mrówkowego (1 ml/l). Przepływ fazy ruchomej wynosił 0,8 ml/min i odbywał się w systemie gradientowym: 0 min – 0% acetonitryl (AcCN), 15 min – 40% AcCN, 15,20 min – 0% AcCN i 20 min – 0% AcCN. Wstrzyknięcia dokonywano za pomocą automatycznego podajnika próbek, a objętość wstrzykiwanej próbki była równa 20 l. Napięcie kapilary wynosiło 3500 V, a napięcie fragmentora 160 V. Analizę ilościową przeprowadzono, stosując tryb akwizycji wybranych dodatnich jonów (SIR). Monitorowano pozorny jon molekularny oraz jony fragmentaryczne oznaczanej substancji (*m/z* 301, 324, 395) i jon pseudomolekularny papaweryny (*m/z* 340), która była użyta jako wzorzec wewnętrzny.

3. Wyniki i ich omówienie

Przy zastosowaniu metody GC/MS uzyskano chromatogram (rycina 3a), na którym zasadniczemu pikowi chromatograficznemu (czas retencji 40,0 min) odpowiadało widmo masowe (rycina 3b) z głównymi jonami *m/z* 394, 379, 197. Porównując uzyskane widmo masowe z bibliotekami widm (NIST98, Wiley-VCH), najlepsze dopasowanie uzyskano dla brucyny. Analiza tej substancji metodą FTIR potwierdziła wspomniany wynik.

Następnie przystąpiono do analizy proszku metodą HPLC wraz z substancją wzorcową brucyny w celu określenia zawartości zidentyfikowanego związku. Rycina 4a przedstawia chromatogram, a rycina 4b widmo spektrofotometryczne UV oznaczanej brucyny. Do celów analizy ilościowej stosowano metodę wzorca zewnętrznego. W białej substancji będącej pozostałością znajdującą się w szklance znalezionej na miejscu zgonu mężczyzny stwierdzono brucynę o stężeniu 97,7%. Rycina 5 przedstawia chromatogramy LC-ESI-MS dla wybranych jonów dla brucyny i papaweryny. Stosunki intensywności jonów 395, 324 i 340 były takie, jak dla substancji referencyjnej.

We krwi stwierdzono brucynę o stężeniu 5,0 g/ml. Stężenia takie są spotykane w przypadkach śmiertelnych zatruc tą substancją [4]. W cytowanym przypadku analizowano krew i treść żołądka 34-letniej kobiety, która zmarła po zjedzeniu w celach medycznych proszku zawierającego nasiona rośliny *Strychnos nux-vomica* L. Stężenie brucyny we krwi zmarłej osoby wynosiło 1,88 g/ml, a strychniny 2,09 g/ml. W literaturze przedmiotu brak jest opisanych przypadków zatrucia czystą brucyną.

4. Podsumowanie

Zatrucia brucyną lub strychniną są rzadko spotykane w ostatnich latach. Mało też jest publikacji naukowych dotyczących tych zatruc. Opisany przypadek należy do wyjątków, gdyż zmarły, jak wynika z informacji podanych przez policję, z racji wykonywanego zawodu mógł mieć dostęp do różnego typu trucizn. Do identyfikacji i analizy ilościowej brucyny zastosowano metody GC-MS oraz HPLC. Potwierdzenie obecności tego związku we krwi wymagało zastosowania techniki LC-ESI-MS. Jeszcze kilkanaście czy kilkadziesiąt lat temu do identyfikacji wyżej wymienionych trucizn stosowano reakcje barwne np. z kwasem azotowym i chlorkiem cyny lub obserwowano typowe dla zatruc strychniną czy brucyną objawy u zatrutego, takie jak charakterystyczne wygięcie konwulsyjne ciała na kształt łuku czy tzw. uśmiech sardoniczny (*risus sardonicus*).