

IDENTIFICATION AND DETERMINATION OF OPIOID PEPTIDES IN BIOLOGICAL MATERIAL USING THE LC-QTOF-MS/MS TECHNIQUE

Magdalena POPŁAWSKA¹, Paulina ŻOLEK¹, Emilia WIDECKA-DEPTUCH², Agnieszka SIWIŃSKA², Małgorzata GRZEŚKIEWICZ-WAROWNA^{1,3}, Michał KARYŃSKI¹, Małgorzata BRZozowska², Agata BŁAŻEWICZ¹

¹ Counterfeit Medicinal Products and Designer Drugs Department, National Medicines Institute, Warszawa, Poland

² Department of Forensic Medicine, Medical University of Warsaw, Warszawa, Poland

³ Department of Analytical Chemistry and Biomaterials, Faculty of Pharmacy, Medical University of Warsaw, Warszawa, Poland

Abstract

“Kambo” is a substance obtained from the skin secretions of frog *Phyllomedusa bicolor*. It is used in the Amazon region, where it is administered into the body *via* the transdermal route. In Europe, the “kambo ceremony” is becoming more popular as a way to cleanse the body from toxins, strengthen the immune system, and restore the body to full health. There is, however, no scientific research confirming these effects. According to the literature, the frog’s skin secretion is rich in biologically active peptides, e.g. deltorphin I and deltorphin II. These opioid peptides are selectively agonists of the δ opioid receptor. The studied materials were dry frog skin secretion and post mortem blood samples collected from a deceased woman who had taken part in the “kambo ceremony”. The aim of this research is to present new methods for the identification and determination of opioid peptides (deltorphin I and deltorphin II) by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry with a time-of-flight analyzer (LC-QTOF-MS/MS) in the skin secretion of a frog, and their application in the qualitative and quantitative analysis of the investigated sample. The developed method of deltorphins determination was adapted to biological material analysis, optimized, validated, and used for blood sample testing. This method allows precise and accurate determination of deltorphins in the blood if the concentration is higher than 8–10 ng/ml. However, due to rapid proteolytic degradation, it can only be used for the analysis of blood samples taken and prepared for testing shortly after poisoning. No peptides were identified in the blood material from the deceased woman. Most likely deltorphins absorbed by the body were metabolized before the autopsy material was collected.

Keywords

“Kambo ceremony”; Opioid peptides; Deltorphin I; Deltorphin II; Mass spectrometry.

Received 28 June 2019; accepted 26 July 2019

1. Introduction

Kambo or *sapo* is a powdered secretion from the skin glands of an anuran amphibian from the family *Phyllomedusidae* (Duellman, Marion, Hedges, 2016), called the giant leaf frog (*Phyllomedusa bicolor*, Fig. 1). The word *sapo* means frog in Spanish and Portuguese, while *kambo* is the common name for

Phyllomedusa bicolor used in South America. This secretion, produced by the skin glands of the animal in response to danger, contains toxins that protect the giant leaf frog against predators. Animals that try to eat this toxic amphibian vomit or die from poisoning. “Kambo” is used during the “kambo ritual” (or ceremony), first described by Daly et al. (1992). This ritual is popular in some regions of South America, mainly

in Bolivia, Brazil, Colombia, Peru and Venezuela, and for centuries native Indians have organized cleansing rituals before hunting.

To obtain the secretion of *Phyllomedusa bicolor*, the Matses Indians (a tribe from north-eastern Peru) capture the amphibian and immobilize it for three days. Over that time, the animal's legs and back are gently irritated (scratched) with a bamboo stick to provoke the secretion of "kambo". To dry the harvested secretion, the stick is repetitively placed in a leaf bag and hung over a bonfire. The operation is repeated several times. After three days, the stick is covered with a yellow substance and the amphibian is released (Erspamer et al., 1993). Indian shamans apply "kambo" during the cleansing ceremony, usually on the skin of the arms or legs in men, or the skin of legs in women (den Brave, Bruins, Bronkhorst, 2014).

The "kambo ritual" is gaining increasing popularity in Europe (Aquila et al., 2017), and its proponents believe that it can cleanse the body of toxins, boost immunity, and restore full health to the body by bringing harmony between the body, soul and mind. Proponents of the use of this substance also believe that it is an excellent remedy for Alzheimer's disease, Parkinson's disease, depression, migraine, cardiovascular diseases, cancer, infertility, Lyme disease, malaria, AIDS, and viral hepatitis. However, there is no scientific evidence to support these claims.

During the "kambo ceremony" a shaman burns several small holes into the top layers of the skin using the end of a burning stick, usually on the arm or leg. Then small balls of "kambo" are applied onto the burns. The substances contained in the secretion are rapidly absorbed into the body through the wound. Ac-



Fig. 1. *Phyllomedusa bicolor* (photo:Tim Vickers, from <https://commons.wikimedia.org>).

cording to literature data, the estimated quantity of the dried secretion from the skin glands of *Phyllomedusa bicolor* rubbed into 2–3 holes during the “kambo ritual” is 20–30 mg (10 mg per hole), and the maximum daily dose should not exceed 100 mg (Erspamer et al., 1993). After the application of the “kambo”, people experience symptoms of poisoning, such as rapid heart rate, fluctuations in blood pressure, a burning sensation throughout their body, headache and dizziness. “Kambo” also induces violent vomiting, often accompanied by diarrhoea and frequent urination.

“Detoxification” (“cleansing the body”) with the poison of *Phyllomedusa bicolor* does not have the status of an official medical procedure in the European Community, and therefore there are no specific doses approved for use in the “kambo ritual”; there is also no toxic dose established and no contraindications or possible side effects, and “kambo” is not standardized for the content of any specific compound.

According to literature data, “kambo” contains many biologically active peptides (Erspamer et al., 1993), including compounds with antifungal and antibacterial activity (Kastin, 2013). During the “kambo ceremony” a mixture of all these compounds is administered, so not only are substances with potentially positive health effects used, but also substances that have a strong toxic effect on the human body.

The following biologically active peptides and their effects on the human body have been identified to date:

- a) deltorphin I, deltorphin II – opioid peptides that selectively stimulate the δ opioid receptor; a toxic effect of deltorphins contained in 20–30 mg of secretion seems unlikely (Erspamer et al., 1993);
 - b) three types of dermorphin (Kastin, 2013) – opioid peptides that selectively stimulate the μ opioid receptor; their concentration in 20–30 mg of secretion from *Phyllomedusa bicolor* is too low to cause toxic effects (Erspamer et al., 1993);
 - c) phyllocaerulein – has a moderately strong effect on blood pressure and a strong effect on the smooth muscles of the gastrointestinal tract, and the secretory function of the stomach and pancreas. This substance may induce nausea, vomiting, redness of the face, changes in blood pressure, tachycardia, sweating and diarrhoea. In addition, by acting on the central nervous system, it inhibits appetite and relieves pain (Erspamer et al., 1993; Kastin, 2013);
- and other substances:
- d) phyllomedusin – has a strong effect on blood pressure, intestinal motor activity, and the secretion of tears and saliva (Erspamer et al., 1993);

- e) phyllokinin – reduces blood pressure (Erspamer et al., 1993);
- f) sauvagine – affects the cardiovascular system by lowering blood pressure and causing tachycardia, contributes to the onset of diarrhoea, and stimulates the release of adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and β -endorphin (Erspamer et al., 1993);
- g) dermatoxin B1 – has antimicrobial activity (Amiche, Seon, Wroblewski, Nicolas, 2000; Kastin, 2013);
- h) dermaseptin B1–B9 – has antiprotozoal, antifungal and antibacterial activity (Kastin, 2013; Nicolas, El Amri, 2009);
- i) phylloxin B1 – has antibacterial activity (Kastin, 2013);
- j) phylloseptin B1 – has antiprotozoal, antifungal and antibacterial activity (Kastin, 2013);
- k) plasticin B1 – has antifungal and antibacterial activity (Nicolas, El Amri, 2009).

Reportedly, among all the effects of the components of *Phyllomedusa bicolor* secretion, the most significant are those produced on the cardiovascular and gastrointestinal systems, although other effects have also been mentioned, including hepatitis (Pogorzelska, Łapiński, 2017), and syndrome of inappropriate antidiuretic hormone secretion (Leban, Kozelj, Brvar, 2016), but so far the clinical symptoms after exposure to the secretion of *Phyllomedusa bicolor* have not been scientifically investigated (Aquila et al., 2017; den Brave et al., 2014; Leban et al., 2016). There are also reports on the deaths of people who used “kambo”. Aquila et al. (2017) reported the case of a man who died immediately after the use of *Phyllomedusa bicolor* secretion. Because of the causal relationship, it cannot be ruled out that “kambo” contributed to his death. Another case of death shortly after the application of *Phyllomedusa bicolor* secretion was reported by da Silva, Monteiro and Bernarde (2019).

The aim of this research was to develop and validate a method for the identification and determination of deltorphin I and deltorphin II in the secretion of *Phyllomedusa bicolor* using the LC-QTOF-MS/MS technique, and a method for the determination of deltorphins in biological material sampled *post mortem*.

2. Case report

A 35-year-old woman who had previously participated in the “kambo ritual” died in Poland in 2016. The case file shows that “kambo” in the form of 5 small balls was applied twice. After some time the woman suffered from severe and very profuse watery

vomiting, followed by diarrhoea. The woman was advised to drink large volumes of water and to provoke vomiting. She lost consciousness in the toilet, and after being transported to hospital she was diagnosed with cerebral oedema, subarachnoid haemorrhage, as well as electrolyte and acid-base disorders. Despite intensive treatment, the patient died after about 50 hours of hospitalization. Multiple toxicological tests of blood, urine and gastric contents collected *post mortem* performed at the Department of Forensic Medicine of the Medical University of Warsaw (ZMS WUM) revealed only the presence of metamizole and its metabolites in all analysed materials. Based on the results of the *post mortem* examination and additional tests, as well as data from medical records and case files, it was concluded that the death of the woman was caused by irreversible damage to the central nervous system in the course of severe brain oedema, and the patient suffered from electrolyte imbalance and had inflammatory lesions in the lungs. Due to the circumstances of the incident, it was necessary to carry out tests targeted at the presence of selected components of secretion from the giant leaf frog in biological material, i.e. peptide compounds not covered by routine analytical procedures at ZMS WUM.

3. Materials and methods

3.1. Reagents and reference materials

Reference materials were deltorphin I and deltorphin II ([D-Ala²]-Deltorphin) from TOCRIS Bioscience. We also used acetonitrile (LC-MS grade) from Merck and AppliChem, formic acid (LC-MS grade) from Fluka, and methanol (LC-MS grade) from POCH. Deionized water was prepared using a Nanopure Diamond UV Deionization System from Thermo Fisher Scientific.

3.2. Analytical material

The evidence material provided by the police for investigation was a solid brown substance on a small wooden board (Fig. 2). According to information from the prosecutor's office, it was the secretion of skin glands from the giant leaf frog (*Phyllomedusa bicolor*) used in the "kambo ritual".

Biological material (blood) collected during the *post mortem* examination of the woman who participated in the "kambo ritual" was also analysed. Blood samples free of tested analytes used for the development and validation of the method, and blood samples used to optimize the method, validate it and determine the content of deltorphins, were prepared by the Toxicological Laboratory of ZMS WUM. Before analysis the biological material was stored at -26°C.

3.3. Equipment and analytical parameters

Analyses were performed using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry with a time-of-flight analyzer (LC-QTOF-MS/MS) on an Ultimate 3000 liquid chromatograph (Thermo Scientific, formerly Dionex) and a micrOTOF-QII mass spectrometer (Bruker Daltonik).

Compounds were separated on a Hypersil Gold C18 column; 100 × 2.1 mm; 3 μm, and a relevant precolumn 10 × 2.1 mm; 3 μm, both from Thermo Fisher Scientific, with the temperature set at 25°C. The mobile phase consisted of: A – methanol/acetonitrile/formic acid (900/100/1, v/v/v) and B – methanol/acetonitrile/formic acid (900/100/1, v/v/v). The parameters of gradient HPLC were as follows: 0 min – 10% B; 2 min – 10% B; 7 min – 90% B, 10 min – 90% B, 12 min – 10% B, 14 min – 10% B; flow rate for the mobile phase 0.15 ml/min; the samples were kept at a constant temperature of 10°C in an automated sample feeder.

Electrospray ionization (ESI) was performed in the positive mode, and the ion fragmentation was achieved



Fig. 2. Material provided by the police for investigation.

in a process of collision induced dissociation (CID). Other parameters of spectrometry were as follows: capillary voltage: +4500 V; plate voltage: -500 V; gas pressure in the nebulizer: 0.8 Ba; temperature of drying gas: 180°C; flow rate of drying gas: 8.0 l/min; the m/z range of recorded values: 50–1500. To ensure the best possible accuracy of mass spectrometry, every single analysis was calibrated using a solution of sodium formate. DataAnalysis software was used for qualitative tests, and QuantAnalysis for quantitative tests (both from Bruker Daltonik).

3.4. Qualitative analyses

In the first stage, a non-targeted analysis of a sample of secretion from *Phyllomedusa bicolor* was performed using the LC-QTOF-MS/MS technique to identify the substances present in this secretion. In the next stage, based on the compatibility of retention times (RT) and ion fragmentation spectra recorded for the sample and for reference materials of deltorphin I and deltorphin II, the identity of the two detected compounds was confirmed.

3.5. Quantitative analysis of deltorphin I and II in the secretion of *Phyllomedusa bicolor*

Two methods for the determination of deltorphin I and II were developed, tested and validated: (1) the MS-scan operating mode – scanning ions without fragmentation; (2) MRM operating mode – monitoring for selected fragmentation reactions; for deltorphin I: 769.4 → 497.2; 596.3 at fragmentation energy 40 eV, and for deltorphin II: 783.4 → 511.2; 610.3 at fragmentation energy 35 eV. Parameters related to ion transfer were optimized for pseudomolecular ions and monitored fragment ions. The optimized and validated method was used for the determination of selected opioid peptides identified in the “kambo” sample.

3.6. Quantitative analysis of deltorphin I and II in blood

The MRM method developed for the determination of deltorphins in “kambo” was adapted for the analysis of these peptides in blood. The fragmentation energy, selection of appropriate MRM transitions, and ion transfer parameters were optimized. The following MRM transitions were observed after the modification of parameters: for deltorphin I: 769.4 → 596.3 at fragmentation energy 38 eV, and for deltorphin II: 783.4 → 610.3; 709.3 at fragmentation energy 32 eV. During the determination of deltorphin content in the

blood we did not use internal standards due to the unavailability of isotope-labelled reference materials for deltorphin I and II, and the lack of applicable reference materials for substances of a similar structure which would not be present in the analysed sample.

3.7. Isolation of deltorphins from blood

A blood sample was purified by protein precipitation and isolation of analytes by the addition of an organic solvent. The blood sample was precisely measured, and cold acetonitrile was added in proportions (1 : 2) with stirring after adding each 100 ml portion of acetonitrile, then the sample was centrifuged and the obtained supernatant used for further analysis.

3.8. Preparation of samples for analysis

Samples of secretion for qualitative analysis: the sample was powdered and homogenised. The disintegrated sample of “kambo” was mixed with 500 µl of solution containing acetonitrile/water/methanol (1/1/1; v/v/v). The mixture was stirred and extracted using the ultrasound-assisted technique for 10 min, and then passed through a 0.2 µm PTFE Whatman filter.

Samples of secretion for quantitative analysis: the sample was powdered and homogenised. Exactly 10 mg of powdered sample was weighed and extracted with the mixture of water/acetonitrile (1/1; v/v) with the addition of 0.1% formic acid using the ultrasound-assisted technique for 10 min. The obtained extract was diluted 40-fold with a solution of acetonitrile/water/methanol (1/1/1; v/v/v). Three independent samples were prepared using this procedure.

3.9. Solutions for the validation of a method for the determination of deltorphin I and II

Reference solutions at a concentration of 1 mg/ml were prepared by dissolving precisely weighed amounts of deltorphins in a mixture of water/acetonitrile (1/1; v/v) with the addition of 0.1% formic acid. These solutions were further diluted with a mixture of acetonitrile/water/methanol (1/1/1; v/v/v) to prepare adequate solutions. To establish the validation parameters for the method of determination of deltorphins in “kambo”, reference solutions were prepared in ten concentrations: 0.8 ng/ml, 2.0 ng/ml, 4 ng/ml, 8 ng/ml, 16 ng/ml, 40 ng/ml, 80 ng/ml, 160 ng/ml, 400 ng/ml and 600 ng/ml. To establish the validation parameters for the method of determination of deltorphins in blood, additional reference solutions were prepared in

eight concentrations: 200 ng/ml, 500 ng/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml, 3 µg/ml, 4 µg/ml, 5 µg/ml and 6 µg/ml.

Working solutions which were used in validation studies related to the determination of deltorphins in blood were prepared from reference solutions of deltorphins and extracts of blood free from the analytes. 50 µl of reference solution in each concentration was sampled and added to subsequent Eppendorf tubes containing 950 µl of blood extract. Prepared solutions were thoroughly mixed.

Samples for the determination of the matrix effect and extraction performance. Four model samples with a final concentration of 60 ng/ml deltorphin were prepared in the following procedure: two independent samples D1 and D2 – by adding a reference solution of deltorphins to 100 µl of blood, followed by protein precipitation and isolation of active substances; and samples B1 and B2 – by adding reference solution of deltorphins to blood samples after protein precipitation. A reference solution was prepared in parallel, using the procedure described for sample B, but water was used instead of blood.

3.10. Validation of the method for the determination of deltorphin I and II in “kambo”

The method was validated based on the international guidelines on bioanalytical method validation (Guidance for Industry, 2001; Guideline on Bioanalytical Method Validation, 2011; Guidance for the Validation of Analytical Methodology and Calibration of Equipment Used for Testing of Illicit Drugs in Seized Materials and Biological Specimens, 2009). Method specificity was evaluated by testing it for potential interference in the blank solution and by calculating the repeatability of the chromatographic separation expressed as the RSD of the retention times for each deltorphin. It was assumed that the limit of detection (LOD) is the concentration of an analyte for which the signal to noise ratio S/N is greater than 3. The lower limit of quantitation (LLOQ) was the concentration for which the S/N ratio is higher than 5; the mean measured concentration versus real concentration should be in the range $100 \pm 20\%$, and RSD for measured values should not be higher than 20%. Linearity was evaluated for the range of concentrations from LLOQ to the upper limit of quantitation (ULOQ). In addition, various calibration models were tested, and we selected the one that correctly described the correlation between the measurement signal and the concentration of the analyte. The range was considered linear and relevant when the following requirements were met:

- linear correlation between the detector response and analyte concentration ($r^2 \geq 0.99$);
- the concentration of the substance calculated based on the prepared calibration curve was not higher than:
 - 15% of difference with respect to the real concentration for all concentrations outside LLOQ;
 - 20% of difference with respect to the real concentration for LLOQ;
 - at least 4 out of 6 concentrations had to meet the above-listed criteria, including LLOQ and ULOQ.

The precision and accuracy of the developed method was evaluated based on the results obtained for five independently prepared solutions in each of the tested concentrations in the range of linearity. We tested solutions at the level of LLOQ, ULOQ and medium quality control (MQC). We tested precision and accuracy, both direct (in a single analytical cycle in a short period of time) and indirect (in subsequent analytical cycles, on three different days). The RSD for the results obtained and the mean concentration expressed in percent and determined with respect to the real value should not be higher than 15% except for the LLOQ level, where these values should not be higher than 20%. We also tested the method for the carry-over effect in the blank immediately following injection of a solution in the concentration of ULOQ to make sure it was not higher than 20% of LLOQ.

3.11. Validation of the method for determination of deltorphins in blood

Specificity was determined based on detector responses recorded for extracts prepared from deltorphin-free blood samples collected from six patients, and based on the responses recorded for the solutions of medications that were administered to the deceased patient and could be present in her blood. The evaluation criterion was that signals should not be higher than 20% of the LLOQ value. LOD, LLOQ, linearity, precision and accuracy, as well as the carry-over effect were evaluated using identical criteria that were adopted for the validation of the method for the determination of deltorphins in frog secretion. In addition, we analysed the effect of the matrix on the detector response by comparing signals recorded for solutions B1 and B2 and the signals obtained for the reference solution of the same concentration. Extraction performance was determined based on the detector response recorded for solutions D1 and D2, as well as B1 and B2.

3.12. Estimating the degradation of deltorphins in blood

Tests were carried out for two independent matrices, i.e. blood samples collected from two subjects (A, B). A sample containing deltorphins (test sample) and the control sample were prepared for each matrix. 1 ml of blood was collected into Eppendorf tubes. 100 μ l of 6 μ g/ml deltorphin I and II solution was added to the test samples to obtain samples with an initial concentration of 560.3 ng/ml deltorphin I and 545.1 ng/ml deltorphin II. 100 μ l of acetonitrile/water/methanol solution (1/1/1; v/v/v) was added to each control sample. Samples were stored at room temperature for 7 days. 100 μ l of each sample was collected after 2 h, 24 h, 48 h and 168 h (7 days) from the moment of adding deltorphins to the blood and frozen immediately after collection. The samples were thawed and subjected to protein precipitation before analysis. The content of deltorphins was determined using the calibration curve method, and the degree of deltorphins degradation in blood was estimated based on this.

4. Results

4.1. Identification of deltorphin I and II in the analysed sample of secretion from the frog *Phyllomedusa bicolor*

The chromatogram obtained for the extract of the secretion from the frog *Phyllomedusa bicolor* was very complex. For example, two peaks with retention times $RT = 7.31$ min and $RT = 7.40$ min were recorded, corresponding to ions with m/z 783.4050 and m/z 769.3908, respectively. The difference in mass between them indicated the presence of an additional methyl group, which was confirmed by the proposed chemical

formulas of the detected compounds: for the $[M+H]^+$ ion with m/z 783.4050 $C_{38}H_{55}N_8O_{10}^+$ (theoretical value 783.4036; error of mass measurement -1.9 ppm), for the $[M+H]^+$ ion with m/z 769.3908 $C_{37}H_{53}N_8O_{10}^+$ (theoretical value 769.3879; error of mass measurement -3.8 ppm). The ratio of individual elements in the proposed formulas suggested these compounds have an amino acid structure. Their structure was identified by *de novo* sequencing (Fig. 3). As expected, the ions with the highest intensity obtained by the CID fragmentation originated from the b series and y series. In both cases y_2 , y_3 , y_4 and y_5 ions, as well as b_2 , b_3 , b_4 , b_5 and b_6 ions were identified (Tables 1 and 2). The y_2 , y_3 and b_2 , b_3 fragments were identical for both compounds, which suggested that the first three and the last three amino acids in the sequences of the analysed compounds were identical. They only differed for a single amino acid. The ion with m/z 783.4050 originated from a substance containing glutamic acid (E) in its amino acid sequence, and the ion with m/z 769.3908 originated from a substance containing aspartic acid (D). These amino acids differ from each other by one methyl group in the aliphatic chain. The amino acid sequences of both compounds were finally determined, and the analysis revealed that the amide-forming amino group is attached to the C-terminal amino acid. In the next stage of analysis their identity was confirmed based on data recorded for the reference material. The analysis revealed that the first substance was deltorphin II, with the sequence YAFEVVG-NH₂, and the second substance was deltorphin I, with the sequence YAFDVVG-NH₂. The same procedure was used for the identification of phyllocaerulein, but due to lack of a reference material it was impossible to confirm the identity of this compound.

The strongest signal was recorded for two opioid peptides – deltorphin I and deltorphin II, for which quantitative analysis was performed further.

Table 1

Deltorphin I – product ion identification data for b-series and y-series: m/z values, errors and elemental compositions

b-series Ions	m/z	Error [ppm]	Elemental Composition	y-series Ions	m/z	Error [ppm]	Elemental Composition
b_2	235.1089	-5.0	$C_{12}H_{15}N_2O_3$	y_2	174.1238	-0.7	$C_7H_{16}N_3O_2$
b_3	382.1752	2.5	$C_{21}H_{24}N_3O_4$	y_3	273.1908	4.7	$C_{12}H_{25}N_4O_3$
b_4	497.2033	-0.4	$C_{25}H_{29}N_4O_7$	y_4	388.2159	8.1	$C_{16}H_{30}N_5O_6$
b_5	596.2720	-0.9	$C_{30}H_{38}N_5O_8$	y_5	535.2865	1.8	$C_{25}H_{39}N_6O_7$
b_6	695.3414	-2.1	$C_{35}H_{47}N_6O_9$	y_6	–	–	–

4.2. Results obtained for evaluated validation parameters

4.2.1. Determination of deltorphins in the secretion of *Phyllomedusa bicolor*

The RSD values for retention times of deltorphin I and deltorphin II were 0.14% and 0.15%, respectively. We found no interferences in the blank. The values of LOD and LLOQ for both analysed peptides were comparable. Of the two methods tested, the MS-scan

method was more sensitive. Calculations confirmed the validity of using the weighed calibration model in the MS-scan and MRM analyses. In the tested range of concentrations from 4 ng/ml or 8 ng/ml (depending on the spectrometer's mode of operation) to 600 ug/ml, the linear response, appropriate precision and accuracy were obtained using both modes of operation.

Aggregated results for the evaluated validation parameters related to the determination of deltorphins in skin secretion are presented in Table 3.

Table 2

Deltorphin II – product ion identification data for b-series and y-series: m/z values, errors and elemental compositions

b-series Ions	m/z	Error [ppm]	Elemental Composition	y-series Ions	m/z	Error [ppm]	Elemental Composition
b ₂	235.1093	-6.9	C ₁₂ H ₁₅ N ₂ O ₃	y ₂	174.1244	-4.0	C ₇ H ₁₆ N ₃ O ₂
b ₃	382.1756	1.3	C ₂₁ H ₂₄ N ₃ O ₄	y ₃	273.1923	-0.5	C ₁₂ H ₂₅ N ₄ O ₃
b ₄	511.2183	0.9	C ₂₆ H ₃₁ N ₄ O ₇	y ₄	402.2299	12.1	C ₁₇ H ₃₂ N ₅ O ₆
b ₅	610.2881	-1.5	C ₃₁ H ₄₀ N ₅ O ₈	y ₅	549.3019	2.2	C ₂₆ H ₄₁ N ₆ O ₇
b ₆	709.3571	-2.2	C ₃₆ H ₄₉ N ₆ O ₉	y ₆	–	–	–

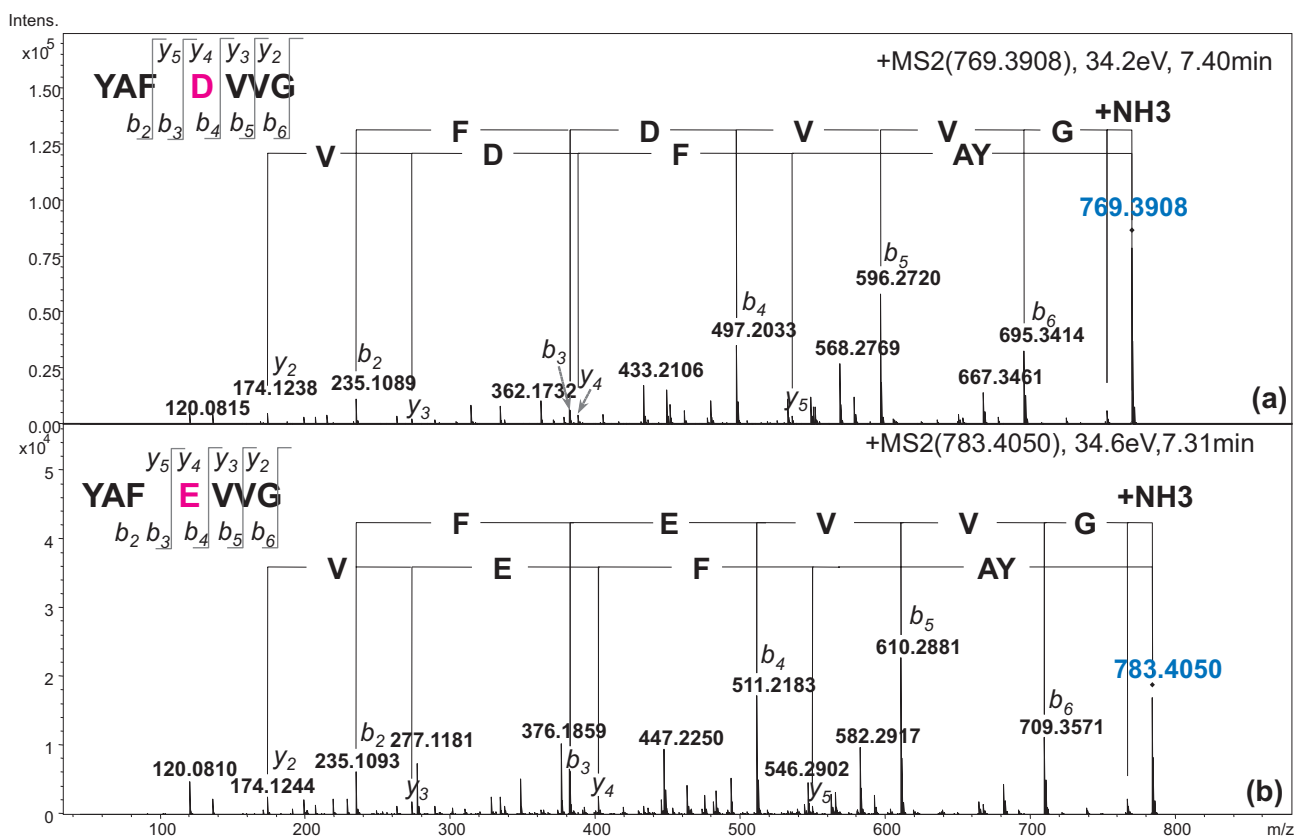


Fig. 3. Fragmentation spectra of pseudomolecular ions of deltorphin I (a) and deltorphin II (b), detected in a frog skin secretion extract.

4.2.2. Method for the determination of deltorphins in blood

The detector response for all analysed blood samples free from deltorphins and solutions of medicinal substances was not higher than 20% of the LLOQ value. The coefficient of correlation r^2 for the calibration curve was determined after the evaluation of different calibration models and selection of the optimal model for a given substance and a given concentration range. Calculations confirmed that the developed method is linear in the range 10 ng/ml to 300 ng/ml for deltorphin I and 8 ng/ml to 300 ng/ml for deltorphin II, and has good precision and accuracy. Aggregated results obtained for the selected evaluated validation param-

eters related to the determination of deltorphins in blood are presented in Table 4.

4.3. Determination of deltorphin I and deltorphin II concentrations in frog secretion.

The concentrations of deltorphin I and II were determined using the calibration curve method. The concentrations and the confidence interval at the significance level $\alpha = 0.05$ determined using the MRM method were $4.4 \pm 0.2 \mu\text{g}/\text{mg}$ for deltorphin I, and $1.9 \pm 0.1 \mu\text{g}/\text{mg}$ for deltorphin II, and using the MS-scan method were $4.5 \pm 0.3 \mu\text{g}/\text{mg}$ for deltorphin I and $1.8 \pm 0.1 \mu\text{g}/\text{mg}$ for deltorphin II.

Table 3

Method validation parameters – determination of deltorphins in dried skin secretions

Parameter	MRM	Deltorphin I		Deltorphin II	
		MS-scan	MRM	MS-scan	
LOD [ng/ml]		2.0	0.8	1.9	0.8
LLOQ [ng/ml]		8.0	4.0	8.0	4.0
Linearity	r^2	1.000	0.998	0.998	0.997
	error [%]*	-4.36–9.81	-2.47–5.46	-4.42–8.05	-4.60–7.66
Precision	intra-day	2.83–3.87	2.03–2.81	1.22–5.59	1.86–4.57
RSD [%]	inter-day	3.79–6.25	5.25–8.01	2.76–6.94	4.39–8.81
Accuracy [%]	intra-day	93.34–99.34	99.08–107.34	100.79–110.67	103.67–113.26
	inter-day	94.33–99.43	97.66–103.71	101.63–109.58	97.06–108.50
Carry-over effect [%]		9.3%	–**	6.7%	–**

*calculations based on the nominal concentrations

**no peaks at the retention time of analyte detected in the chromatogram of blank sample

Table 4

Method validation parameters – determination of deltorphins in blood

Parameter	Deltorphin I	Deltorphin II	
LOD [ng per column]/[ng/ml]	0.02 / 2.0	0.015 / 1.5	
LLOQ [ng/ml]	10.0	8.0	
Linearity	r^2	0.999	1.000
	Error [%]*	-4.77–3.35	-5.61–13.07
Precision RSD [%]	0.44–1.57	0.16–1.95	
Accuracy [%]	96.61–102.84	100.27–113.07	
Carry-over effect [%]	–**	–**	
Matrix effect [%]	143.63	133.17	
Recovery [%]	81.16	88.62	

*calculations based on the nominal concentrations

** no peaks at the retention time of analyte detected in the chromatogram of blank sample

4.4. Estimating the degradation of deltorphins in blood

The concentrations of deltorphins and the percentage of their residues measured in samples A and B are presented in Table 5. No signals from analytes were detected during the analysis of control samples. In sample A the concentration of deltorphins decreased over time (from the moment when this substance was added to blood), but one week later (measurement after 168 h) we still detected 32.68% of the initial concentration of deltorphin I and 14.97% of deltorphin II. In sample B the concentration after one hour decreased to 64.9% for deltorphin I and to 41.19% for deltorphin II, while after 24 h the degradation of peptides was so significant that it was impossible to measure their concentration with the applied method. Deltorphins are small seven-amino acid peptides that can be degraded by proteolytic enzymes present in blood. On the other hand, the D-amino acid present in their structure may increase their stability. Significant differences in measurements between samples A and B may indicate large differences in the concentration or activity of proteases present in the matrices, but neither of these parameters were determined in the performed test. Differences between individuals in the degradation of small peptides in the blood by enzymatic hydrolysis have been observed and reported (Marini, Urbani, Trani, Bongiorno, Roda, 1997). In our test we used samples of blood collected *post mortem*, and the lapse of time from death to the collection of biological material could influence the activity of enzymes present in the

blood. These findings suggest the need for the use of a larger set of matrices to estimate the degradation of peptides, taking into consideration potential differences between individuals in the concentration and activity of proteases.

4.5. Determination of deltorphin I and deltorphin II concentration in the blood sample

100 µl of blood collected *post mortem* from the body of the deceased woman was analysed following the procedure described in section 3.7. and centrifuged. Three independent samples were prepared.

Signals originating from deltorphin I or II were not detected for any of the three analysed samples. This may be due to the small amount of peptides absorbed, their rapid metabolism (Aquila et al., 2017), lapse of time between the exposure to the frog secretion and the death of the patient and, most importantly, the *post mortem* degradation of these peptides (Konikova, Vinarskaya, Nikulin, Pogossova, Petukhova, 1975).

5. Conclusions

Results of analysis performed for the sample of “kambo” indicated the presence of peptides characteristic of the secretion of the giant leaf frog (*Phyllomedusa bicolor*): deltorphin I, deltorphin II and phyllocaerulin. The LC-QTOF-MS/MS technique can be used for the qualitative analysis of secretion from skin glands of *Phyllomedusa bicolor*, as well as for

Table 5

Estimation of deltorphins degradation; surviving percentage after different time intervals of incubation in the blood at ambient temperature

Time interval of incubation [h]	Deltorphin I theoretical concentration 560.3 ng/ml		Deltorphin II theoretical concentration 545.1 ng/ml	
	Determined concentration [ng/ml]	Surviving percentage [%]	Determined concentration [ng/ml]	Surviving percentage [%]
Sample A				
2	570.0	101.72	500.7	91.85
24	529.5	94.49	424.6	77.89
48	447.2	79.81	390.3	71.61
168	183.1	32.68	81.6	14.97
Sample B				
2	363.7	64.91	224.5	41.19
24	< LLOQ	–	< LLOQ	–
48	< LLOQ	–	< LLOQ	–
168	< LLOQ	–	< LLOQ	–

the identification of species-specific opioid peptides, since deltorphins I and II are specifically secreted by this frog (Kastin, 2013). The developed and validated method for quantitative analysis, both in the MS-scan and MRM mode, allows for the determination of deltorphin I and II concentrations, and is characterised by good accuracy and precision. The concentration of opioid peptides measured in the secretion is consistent with previously reported data (Erspamer et al., 1993). Structurally, deltorphins are peptides, and therefore have a short duration of action because they are degraded by peptidases present in the human body. The developed method for the determination of deltorphins in blood allows for the precise and accurate measurement if the concentration is higher than 8–10 ng/ml. However, because of the rapid proteolytic degradation of the analyte, this method can only be used for the analysis of blood samples collected and prepared for testing within a relatively short time after poisoning with “kambo”. The analysis of biological material (three samples of blood) collected post mortem did not reveal the presence of any of the peptides normally found in the secretion of the skin glands of the giant leaf frog (*Phyllomedusa bicolor*). However, considering the information about the time lapse between the admission of the woman to hospital and *post mortem* examination, it can be concluded that the deltorphins absorbed by the body may have been at least partially metabolized during hospitalization, and their residues degraded before the autopsy material was collected.

References

1. Amiche, M., Seon, A. A., Wroblewski, H., Nicolas, P. (2000). Isolation of dermatoxin from frog skin, an antibacterial peptide encoded by a novel member of the dermaseptin genes family. *European Journal of Biochemistry*, 267(14), 4583–4592.
2. Aquila, I., Gratteri, S., Sacco, M. A., Fineschi, V., Magi, S., Castaldo, P., Viscomi, G., Amoroso, S., Ricci, P. (2017). The biological effects of kambo: is there a relationship between its administration and sudden death? *Journal of Forensic Sciences*, 63(3), 965–968.
3. den Brave, P. S., Bruins, E., Bronkhorst, M. W. (2014). *Phyllomedusa bicolor* skin secretion and the Kambô ritual. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 20, 40.
4. Daly, J. W., Caceres, J., Moni, R. W., Gusovsky, F., Moos, M. Jr, Seamon, K. B., Milton, K., Myers, C. W. (1992). Frog secretions and hunting magic in the upper Amazon: identification of a peptide that interacts with an adenosine receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(22), 10960–10963.
5. Duellman, W. E., Marion, A. B., Hedges, S. B. (2016). Phylogenetics, classification, and biogeography of the treefrogs (*Amphibia: Anura: Arboranae*). *Zootaxa*, 4104(1), 1–109.
6. Erspamer, V., Erspamer, G. F., Severini, C., Potenza, R. L., Barra, D., Mignogna, G., Bianchi, A. (1993). Pharmacological studies of ‘sapo’ from the frog *Phyllomedusa bicolor* skin: a drug used by the Peruvian Matsigenka Indians in shamanic hunting practices. *Toxicon*, 31(9), 1099–1111.
7. Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation, May 2001, FDA.
8. Guideline on bioanalytical method validation, July 2011, EMA; EMEA/CHMP/EWP/192217/2009 Rev.1 Corr.2
9. Guidance for the Validation of Analytical Methodology and Calibration of Equipment used for Testing of Illicit Drugs in Seized Materials and Biological Specimens, 2009, UNODC.
10. Kastin, A. J. (Ed.) (2013). *Handbook of biologically active peptides*. 2nd ed. San Diego: Elsevier Inc.
11. Konikova, A. S., Vinarskaya, A. A., Nikulin, V. I., Pogossova, A. V., Petukhova, L. M. (1975). Protein degradation to low-molecular compounds after death and during reanimation. *Virchows Archiv B Cell Pathology*, 18(4), 347–55.
12. Leban, V., Kozelj, G., Brvar, M. (2016). The syndrome of inappropriate antidiuretic hormone secretion after giant leaf frog (*Phyllomedusa bicolor*) venom exposure. *Toxicon*, 120, 107–109.
13. Marini, M., Urbani, A., Trani, E., Bongiorno, L., Roda, L.G. (1997). Interindividual variability of enkephalin-degrading enzymes in human plasma. *Peptides*, 18(5), 741–748.
14. Nicolas, P., El Amri, C. (2009). The dermaseptin superfamily: a gene-based combinatorial library of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1788(8), 1537–1550.
15. Pogorzelska, J., Łapiński T. W. (2017). Toxic hepatitis caused by the excretions of the *Phyllomedusa bicolor* frog – a case report. *Clinical and Experimental Hepatology*, 3(1), 33–34.
16. da Silva, F. V. A., Monteiro, W. M., Bernarde, P. S. (2019). “Kambô” frog (*Phyllomedusa bicolor*): use in folk medicine and potential health risks. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 52, e20180467.

Corresponding author

dr Magdalena Popławska
National Medicines Institute
ul. Chełmska 30/34
PL 00-725 Warszawa
e-mail: m.poplawska@nil.gov.pl

IDENTYFIKACJA I OZNACZANIE PEPTYDÓW OPIOIDOWYCH TECHNIKĄ LC-QTOF-MS/MS W MATERIALE BIOLOGICZNYM

1. Wprowadzenie

„Kambo”, inaczej „sapo”, to sproszkowana wydzielina gruczołów skórnych bezogonowego płaza z rodziny *Phyllomedusidae* (Duellman, Marion, Hedges, 2016) – chwytnicy zwinnej (*Phyllomedusa bicolor*, Rys. 1), błędnie nazywanej żabą. Słowo „sapo” oznacza żabę w języku hiszpańskim i portugalskim, natomiast „kambo” jest używana w Ameryce Południowej dla *Phyllomedusa bicolor* nazwą zwyczajową. Wydzielina ta, wytwarzana przez gruczoły skórne zwierzęcia w sytuacji zagrożenia, zawiera toksyny, które służą chwytnicy do zapewnienia ochrony przed drapieżnikami. Zwierzęta, które próbują zjeść toksycznego płaza, wymiotują lub giną pod wpływem trucizny. „Kambo” jest stosowane w obrzędach rytualnych znanych jako „rytuał (inaczej ceremonia) kambo”, po raz pierwszy opisanych przez Daly’ego i współpracowników (1992). Rytuał ten jest popularny w niektórych regionach Ameryki Południowej, głównie w krajach takich jak Boliwia, Brazylia, Kolumbia, Peru czy Wenezuela, gdzie od setek lat Indianie, tuż przed polowaniem, poddają się rytualnemu obrzędowi oczyszczenia z użyciem „kambo”.

Aby pozyskać wydzielinę *Phyllomedusa bicolor*, Indianie Mates (plemię z północno-wschodniego Peru), schwytawszy płaza, unieruchamiają go na trzy dni. W tym czasie kończyny i grzbiet zwierzęcia są delikatnie drażnione (drapane) patykiem z bambusa, co ma spowodować chwytnicę do wydzielania „kambo”. Aby wysuszyć pozyskaną wydzielinę, każdorazowo patyk umieszczony jest w torebce z liścia i zawieszany nad ogniskiem. Czynności te są kilkakrotnie powtarzane. Po trzech dniach patyk pokryty jest żółtą substancją, a płaz jest uwalniany (Erspamer i in., 1993). U Indian „kambo” jest aplikowane podczas ceremonii oczyszczenia przez szamana zwykle na skórę ramion u mężczyzn lub kończyny dolną u kobiet (den Brave, Bruins, Bronkhorst, 2014).

W Europie „rytuał kambo”, który staje się coraz popularniejszy (Aquila i in., 2017), jest reklamowany jako sposób na oczyszczenie organizmu z toksyn i wzmocnienie układu odpornościowego oraz przywrócenie ciała do pełnego zdrowia – uzyskania harmonii ciała, duszy i umysłu. Zwolennicy stosowania tej substancji uważają, że jest to także doskonały środek leczniczy w przypadku choroby Alzheimera, Parkinsona, depresji, migreny, chorób układu krążenia, nowotworów, niepłodności, boreliozy, malarii, AIDS oraz wirusowego zapalenia wątroby. Brak jest jednak badań naukowych potwierdzających te informacje.

W trakcie ceremonii osobie, która jest poddawana rytuałowi, uszkadza się ciągłość naskórka rozżarzoną patyczkiem – zwykle na ramieniu lub kończynie dolnej, powodując w ten sposób kilka drobnych oparzeń. W tych miejscach przylepiane są kulki zrobione z „kambo”. Zawarte w wydzielinie substancje są szybko wchłaniane do organizmu przez ranę. Zgodnie z danymi literaturowymi szacunkowa ilość wysuszonej wydzieliny gruczołów skórnych *Phyllomedusa bicolor* wcierana w trakcie „rytuału kambo” w 2–3 pola oparzonej skóry wynosi 20–30 mg (10 mg na pole), a maksymalna dawka dzienna nie powinna przekraczać 100 mg (Erspamer i in., 1993). Po zaaplikowaniu wydzieliny występują objawy zatrucia – przyspieszona akcja serca, nagłe wahania ciśnienia tętniczego, uczucie gorąca, bóle głowy i splątanie. Efektem działania „kambo” są również gwałtowne wymioty, którym często towarzyszy biegunka i częste oddawanie moczu.

„Detoksykacja” („oczyszczanie organizmu”) jadem *Phyllomedusa bicolor* nie ma statusu oficjalnej procedury medycznej na terenie Wspólnoty Europejskiej, w związku z tym nie ma określonych dawek, jakie można stosować w „rytuale kambo”, nie ma również ustalonej dawki toksycznej i przeciwwskazań oraz możliwych działań niepożądanych, dodatkowo tzw. „kambo” nie jest standaryzowane na żaden związek.

Zgodnie z danymi literaturowymi w „kambo” znajdują się liczne biologicznie aktywne peptydy (Erspamer i in., 1993) – w tym także związki o działaniu przeciugrzybiczym i przeciwbakteryjnym (Kastin, 2013). Podczas „ceremonii kambo” podawana jest cała mieszanina, tak więc aplikowane są nie tylko substancje o potencjalnie pozytywnym działaniu zdrowotnym, ale również te substancje, które wywierają silnie toksyczne działanie na organizm człowieka.

Poniżej wymieniono zidentyfikowane dotychczas biologicznie aktywne peptydy oraz omówiono ich wpływ na organizm ludzki:

- a) deltorfina I i deltorfina II (*deltorphin I*, *deltorphin II*) – peptydy opioidowe pobudzające selektywnie receptor opioidowy δ ; działanie toksyczne deltorfin zawartych w 20–30 mg wydzieliny wydaje się mało prawdopodobne (Erspamer i in., 1993);
- b) trzy dermorfiny (*dermorphin*; Kastin, 2013) – peptydy opioidowe pobudzające selektywnie receptor opioidowy μ ; mają zbyt niską zawartość w 20–30 mg wydzieliny *Phyllomedusa bicolor*, aby spowodować efekt toksyczny (Erspamer i in., 1993);
- c) filocerulina (*phyllocaerulein*, *phyllocaerulein*) – przejawia umiarkowane działanie na ciśnienie krwi i silne

na mięśnie gładkie przewodu pokarmowego, wydzielanie żołądkowe i trzustkowe. Substancja ta może powodować nudności, wymioty, zaczerwienienie skóry twarzy, zmiany ciśnienia krwi, tachykardię, pocenie się i biegunkę. Ponadto, działając na ośrodkowy układ nerwowy, hamuje łaknienie i działa przeciwbólowo (Erspamer i in., 1993; Kastin, 2013)

oraz pozostałe:

- d) *phyllomedusin* – silnie wpływa na ciśnienie krwi, aktywność motoryczną jelit oraz wydzielanie łez i śliny (Erspamer i in., 1993);
- e) *phyllokinin* – obniża ciśnienie krwi (Erspamer i in., 1993);
- f) *sauvagine* – wpływa na układ krążenia (obniżenie ciśnienia krwi z towarzyszącą tachykardią), przyczynia się do wystąpienia biegunki, powoduje uwalnianie hormonu adrenokortykotropowego (ACTH) i β -endorfiny (Erspamer i in., 1993);
- g) *dermatotoxin B1* – działa przeciwbakteryjnie (Amiche, Seon, Wroblewski, Nicolas, 2000; Kastin, 2013);
- h) *dermasseptin B1–B9* – działają przeciwprzerwotniakowo, przeciwgrzybiczo i przeciwbakteryjnie (Kastin, 2013; Nicolas, El Amri, 2009);
- i) *phyllotoxin B1* – działa przeciwbakteryjnie (Kastin, 2013);
- j) *phyllotoxin B1* – działa przeciwprzerwotniakowo, przeciwgrzybiczo i przeciwbakteryjnie (Kastin, 2013);
- k) *plastocin B1* – działa przeciwgrzybiczo i przeciwbakteryjnie (Nicolas, El Amri, 2009).

Wydaje się, że spośród działań składników wydzieliny *Phyllomedusa bicolor* najistotniejszy jest wpływ na układ krążenia oraz na przewód pokarmowy, chociaż opisywano również ich inne skutki, np.: zapalenie wątroby (Pogorzelska, Łapiński, 2017), zespół niewłaściwego uwalniania wazopresyny (Leban, Kozelj i Brvar, 2016), jednak do tej pory przebieg kliniczny po ekspozycji na wydzielinę *Phyllomedusa bicolor* nie został oceniony naukowo (Aquila i in., 2017; den Brave i in., 2014; Leban i in., 2016). W piśmiennictwie są również doniesienia o zgonach osób, które stosowały „kambo”. Aquila i współpracownicy (2017) opisują przypadek mężczyzny, który zmarł bezpośrednio po zastosowaniu wydzieliny *Phyllomedusa bicolor*; ze względu na związek przyczynowo-skutkowy nie można wykluczyć, że „kambo” przyczyniło się do jego śmierci. Inny przypadek zgonu, do którego doszło wkrótce po zaaplikowaniu wydzieliny *Phyllomedusa bicolor*, odnotowują da Silva, Monteiro i Bernarde (2019).

Celem niniejszej pracy było opracowanie i walidacja metody oznaczania deltorfin I i II techniką LCQTOF-MS/MS w wydzielinie chwytnicy, a następnie metody oznaczania deltorfin w materiale sekcyjnym.

2. Opis przypadku

W Polsce w 2016 roku zmarła 35-letnia kobieta, która wcześniej brała udział w „rytuale kambo”. Z akt sprawy wynika, że aplikacja preparatu w postaci 5 kulek została przeprowadzona dwukrotnie. Po pewnym czasie u kobiety tej nastąpiły silne, bardzo obfite wodniste wymioty, po czym dołączyła do nich biegunka. Uczestniczce rytuału zalecono picie dużej ilości wody i prowokowanie wymiotów. Kobieta straciła przytomność w toalecie, a po przewiezieniu na SOR rozpoznano u niej obrzęk mózgu i krwawienie podpajęczynówkowe oraz zaburzenia gospodarki elektrolitowej i kwasowo-zasadowej. Mimo intensywnego leczenia pacjentka zmarła po ok. 50 godzinach hospitalizacji. Wielokierunkowe badania toksykologiczne krwi, moczu i treści żołądkowej pobranych podczas sekcji zwłok zmarłej, wykonane w Zakładzie Medycyny Sądowej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, we wszystkich badanych materiałach wykazały jedynie obecność metamizolu wraz z produktem jego rozpadu. W oparciu o wyniki sekcji zwłok i przeprowadzonych badań dodatkowych oraz dane z dokumentacji medycznej i akta sprawy stwierdzono, że zgon kobiety spowodowany był nieodwracalnym uszkodzeniem centralnego układu nerwowego w przebiegu nasilonego obrzęku mózgu u osoby z zaburzeniami gospodarki elektrolitowej ustroju, dodatkowo obciążonej zmianami zapalnymi płuc. Ze względu na okoliczności zdarzenia konieczne było wykonanie ukierunkowanych badań pod kątem obecności wybranych składników wydzieliny chwytnicy zwinnej w materiale biologicznym, które jako związki peptydowe nie są objęte rutynowym postępowaniem analitycznym w ZMS WUM.

3. Materiały i metody

3.1. Odczynniki i materiały odniesienia

Materiały odniesienia stanowiły deltorfina I i deltorfina II ([D-Ala²]-Deltorphin) firmy TOCRIS Bioscience. Acetonitryl (czystość LC-MS) zakupiono w firmach Merck i AppliChem, kwas mrówkowy o czystości do LC-MS od firmy Fluka, zaś metanol (czystość LC-MS) od firmy POCH. Woda redestylowana otrzymywana była przy użyciu aparatu Nanopure Diamond UV Deionization System firmy Thermo Fisher Scientific.

3.2. Materiały do badań

Materiał dowodowy stanowiła zabezpieczona przez policję substancja stała w kolorze brązowym umieszczona na drewnianej deseczce (Rys. 2). Według informacji prokuratury substancja ta jest wydzieliną gruczołów

skórnych chwytnicy zwinnej (*Phyllomedusa bicolor*) stosowaną w „rytuale kambo”.

Badaniom poddano również materiał biologiczny (krew) pobrany podczas sekcji zwłok kobiety, która uczestniczyła w „rytuale kambo”. Próbkę krwi wolnej od badanych analitów stosowane do opracowania i walidacji metody oraz próbki krwi stosowane do optymalizacji metody, jej walidacji oraz oznaczenia zawartości deltorfin, przygotowane zostały przez Pracownię Toksykologiczną ZMS WUM. Materiał biologiczny przechowywano do momentu analizy w temperaturze -26°C .

3.3. Aparatura i warunki analizy

Badania prowadzono metodą chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas z analizatorem czasu przelotu (LC-QTOF-MS/MS) z użyciem chromatografu cieczowego Ultimate 3000 (Thermo Scientific, dawniej Dionex) i spektrometru mas micrOTOF-QII (Bruker Daltonik).

Związki rozdzielano na kolumnie Hypersil Gold C18; $100 \times 2,1$ mm; $3 \mu\text{m}$ wraz z odpowiednią prekolumną $10 \times 2,1$ mm; $3 \mu\text{m}$; obie z firmy Thermo Fisher Scientific, termostatowanej w temperaturze 25°C . Fazę ruchomą stanowiły mieszaniny: A – woda/acetonytryl/kwas mrówkowy (900/100/1, v/v/v) oraz B – metanol/acetonytryl/kwas mrówkowy (900/100/1, v/v/v). Stosowano następujący program gradientowy: 0 min – 10% B; 2 min – 10% B; 7 min – 90% B, 10 min – 90% B, 12 min – 10% B, 14 min – 10% B; szybkość przepływu fazy ruchomej wynosiła 0,15 ml/min. Próbkę termostatowaną były w temperaturze 10°C w automatycznym podajniku próbek.

Zastosowano metodę jonizacji typu elektrorozpylanie (ESI) w trybie dodatnim, proces fragmentacji jonów zachodził wskutek dysocjacji indukowanej kolizyjnie CID (*collision induced dissociation*). Pozostałe parametry spektrometru mas były następujące: napięcie kapilary: +4500 V; napięcie płytki: -500 V; ciśnienie gazu w nebulizerze: 0,8 Ba; temperatura gazu suszącego: 180°C ; szybkość przepływu gazu suszącego: 8,0 l/min; zakres rejestrowanych wartości m/z : 50–1500. W celu zapewnienia jak najlepszej dokładności pomiaru masy dla każdej pojedynczej analizy przeprowadzano kalibrację za pomocą roztworu mrówczanu sodu. Do badań jakościowych stosowano program DataAnalysis, zaś do oznaczeń zawartości QuantAnalysis, oba firmy Bruker Daltonik.

3.4. Badania jakościowe

W pierwszym etapie badań przeprowadzono niecelowaną analizę próbki wydzieliny chwytnicy metodą LC-QTOF-MS/MS w celu identyfikacji substancji w niej obecnych. Następnie, na podstawie zgodności czasów retencji (RT) i widm fragmentacyjnych jonów zarejestro-

wanych dla próbki oraz dla materiałów odniesienia deltorfyny I i deltorfyny II, potwierdzono tożsamość dwóch zidentyfikowanych związków.

3.5. Analiza ilościowa deltorfyny I i II w wydzielinie chwytnicy

Opracowano dwie metody oznaczania deltorfyny I i II, które następnie sprawdzono i oceniono w procesie walidacji: (1) tryb pracy MS-scan – skanowanie jonów bez fragmentacji; (2) tryb pracy MRM – monitorowanie wybranych reakcji fragmentacji; dla deltorfyny I: 769,4 \rightarrow 497,2; 596,3 przy energii fragmentacji 40eV, a dla deltorfyny II: 783,4 \rightarrow 511,2; 610,3 przy energii fragmentacji 35eV. Parametry związane z transferem jonów optymalizowane były dla jonów pseudomolekularnych oraz monitorowanych jonów fragmentacyjnych. Zoptymalizowaną i zwalidowaną metodę zastosowano do oznaczenia wybranych peptydów opioidowych zidentyfikowanych w próbce „kambo”.

3.6. Analiza ilościowa deltorfyny I i II we krwi

Metodę MRM opracowaną do oznaczenia zawartości deltorfin w wydzielinie zaadaptowano do analizy tych peptydów we krwi. Optymalizowano energię fragmentacji, dobór odpowiednich przejść MRM oraz parametry transferu jonów. Po modyfikacji parametrów obserwowano następujące przejścia MRM: dla deltorfyny I: 769,4 \rightarrow 596,3 przy energii fragmentacji 38eV, a dla deltorfyny II: 783,4 \rightarrow 610,3; 709,3 przy energii fragmentacji 32eV. Podczas oznaczania zawartości deltorfin we krwi zrezygnowano ze stosowania wzorców wewnętrznych ze względu na brak dostępnych znakowanych izotopowo materiałów odniesienia deltorfyny I i II oraz brak możliwości do zastosowania materiałów odniesienia substancji o podobnej budowie, które nie mogłyby występować w próbce badanej.

3.7. Izolacja deltorfin z krwi

Zastosowano procedurę oczyszczania próbki krwi przez strącanie białek i izolacji substancji badanych za pomocą dodatku rozpuszczalnika organicznego. Do dokładnie odmierzonej próbki krwi dodawano zimny acetonytryl w proporcjach 1 : 2, mieszając każdorazowo po dodaniu 100 μl acetonytrylu, następnie próbkę odwirowywano, a uzyskany supernatant stosowano do dalszych badań.

3.8. Przygotowanie próbek do badań

Próbki wydzieliny do analizy jakościowej: próbkę sproszkowaną i zhomogenizowaną. Do rozdrobnionej próbki wydzieliny chwytnicy zwinnej dodano 500 μl

roztworu o składzie: acetonitryl/woda/metanol (1/1/1; v/v/v). Całość wymieszano i poddano ekstrakcji wspomaganą ultradźwiękami przez 10 min, a następnie przesączono przez filtr Whatman 0,2 μm PTFE.

Próbki wydzieliny do analizy ilościowej: próbkę sproszkowano i zhomogenizowano. Odważano dokładnie po około 10 mg sproszkowanej próbki i ekstrahowano mieszaniną woda/acetonitryl (1/1; v/v) z dodatkiem 0,1% kwasu mrówkowego z zastosowaniem ultradźwięków (10 min). Następnie, uzyskany ekstrakt rozcieńczono 40-krotnie za pomocą roztworu acetonitryl/woda/metanol (1/1/1; v/v/v). W powyższy sposób przygotowano trzy niezależne próby.

3.9. Roztwory do walidacji metody oznaczania deltorfin I i II

Roztwory wzorcowe o stężeniu 1 mg/ml przygotowano poprzez rozpuszczenie odważonych dokładnie deltorfin w mieszaninie woda/acetonitryl (1/1; v/v) z dodatkiem 0,1% kwasu mrówkowego. Z tak sporządzonych roztworów za pomocą roztworu acetonitryl/woda/metanol (1/1/1; v/v/v) przygotowano odpowiednie rozcieńczenia. Do wyznaczenia parametrów walidacyjnych dla metody oznaczania deltorfin w wydzielinie sporządzono roztwory wzorcowe na dziesięciu poziomach stężeń 0,8 ng/ml, 2,0 ng/ml, 4 ng/ml, 8 ng/ml, 16 ng/ml, 40 ng/ml, 80 ng/ml, 160 ng/ml, 400 ng/ml oraz 600 ng/ml. Do wyznaczenia parametrów walidacyjnych dla metody oznaczania deltorfin we krwi sporządzono dodatkowo roztwory wzorcowe na poziomach stężeń: 200 ng/ml, 500 ng/ml, 1 $\mu\text{g/ml}$, 2 $\mu\text{g/ml}$, 3 $\mu\text{g/ml}$, 4 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$ oraz 6 $\mu\text{g/ml}$.

Roztwory robocze, które stosowano w badaniach walidacyjnych związanych z oznaczaniem deltorfin we krwi, przygotowano z roztworów wzorcowych deltorfin i ekstraktów z krwi wolnej od analitów. Pobierano 50 μl roztworu wzorcowego z każdego poziomu stężeń i dodawano go do kolejnych fiolek Eppendorfa zawierających 950 μl ekstraktu z krwi. Tak uzyskane roztwory dokładnie mieszano.

Próbki do określenia efektu matrycy i wydajności ekstrakcji. Cztery próbki modelowe o stężeniu końcowym deltorfin 60 ng/ml przygotowano w następujący sposób: dwie niezależne próbki D1 i D2 – dodając roztwór wzorcowy deltorfin do 100 μl krwi, a następnie przeprowadzając procedurę strącania białek i izolacji substancji czynnych, zaś próbki B1 i B2 – dodając roztwór wzorcowy deltorfin do próbek krwi po ekstrakcji strąceniu białek. Równolegle przygotowano roztwór porównawczy w sposób opisany dla próbki B, ale zamiast krwi użyto wodę.

3.10. Walidacja metody oznaczania deltorfin I i II w wydzielinie

Walidację metody przeprowadzono w oparciu o międzynarodowe wytyczne dotyczące walidacji metod bioanalitycznych (Guidance for industry, 2001; Guideline on bioanalytical method validation, 2011; Guidance for the Validation of Analytical Methodology and Calibration of Equipment used for Testing of Illicit Drugs in Seized Materials and Biological Specimens, 2009). Specyficzność metody oceniano, sprawdzając występowanie potencjalnych interferencji w roztworze ślepej próby oraz wyliczając powtarzalność rozdzielienia chromatograficznego wyrażoną jako RSD czasów retencji każdej z deltorfin. Jako granicę wykrywalności (LOD – *limit of detection*) uznano takie stężenie analitu, przy którym stosunek sygnału do szumu S/N jest większy od 3. Za dolną granicę oznaczalności (LLOQ – *lower limit of quantitation*) uznano takie stężenie, dla którego stosunek S/N będzie przekraczał 5, średnia wartość mierzonego stężenia względem stężenia rzeczywistego powinna mieścić się w przedziale $100 \pm 20\%$, a RSD pomiarów nie powinno przekraczać 20%. Liniowość oceniano w zakresie stężeń od poziomu LLOQ do górnej granicy oznaczalności (ULOQ – *upper limit of quantitation*). Ponadto sprawdzano różne modele kalibracji i wybrano ten, który właściwie opisuje zależność sygnału pomiarowego od stężenia badanej substancji. Zakres uznawano za liniowy i odpowiedni, gdy spełniał następujące wymagania:

- liniowa zależność odpowiedzi detektora od stężenia analitu ($r^2 \geq 0,99$);
- stężenie substancji wyliczone z otrzymanej krzywej kalibracyjnej nie przekraczało:
 - 15% różnicy od stężenia rzeczywistego dla wszystkich poziomów stężeń poza LLOQ;
 - 20% różnicy od stężenia rzeczywistego dla poziomu LLOQ;
 - co najmniej 4 z 6 poziomów stężeń musiało spełniać powyższe kryteria, w tym LLOQ i ULOQ.

Precyzję oraz dokładność opracowanej metody oceniano na podstawie wyników uzyskanych dla pięciu niezależnie przygotowanych roztworów na każdym z testowanych poziomów stężeń w zakresie liniowości. Badano roztwory na poziomie LLOQ, ULOQ oraz na pośrednim poziomie stężeń (MQC – *medium quality control*). Sprawdzano precyzję i dokładność, zarówno bezpośrednią (w pojedynczym cyklu analiz, w krótkim okresie czasu), jak również pośrednią (w kolejnych cyklach analiz, w trzech różnych dniach). RSD uzyskanych wyników oraz średnia wartość procentowa stężenia oznaczonego względem wartości rzeczywistej nie powinny przekraczać 15% z wyjątkiem poziomu LLOQ, gdzie wartości te nie mogą przekroczyć 20%. Sprawdzono również, czy efekt przeniesienia w próbie ślepej następującej bez-

pośrednio po nastrzyku roztworu o stężeniu ULOQ nie przekracza 20% wartości LLOQ.

3.11. Walidacja metody oznaczania deltorfin we krwi

Specyficzność określono na podstawie odpowiedzi detektora zarejestrowanych dla ekstraktów przygotowanych z wolnej od deltorfin krwi pochodzącej od sześciu różnych pacjentów oraz na podstawie odpowiedzi zarejestrowanych dla roztworów leków, które były podane pacjentce i mogły być obecne w próbce jej krwi. Za kryterium oceny przyjęto, że sygnały nie powinny przekraczać 20% wartości LLOQ. Do oceny LOD, LLOQ, liniowości, precyzji i dokładności oraz efektu przeniesienia przyjęto identyczne kryteria oceny jak w przypadku walidacji metody oznaczania deltorfin w wydzielinie. Ponadto sprawdzono wpływ matrycy na odpowiedź detektora, porównując sygnały zarejestrowane dla roztworów B1 i B2 z sygnałami uzyskanymi dla roztworu porównawczego o takim samym stężeniu. Wydajność ekstrakcji określono na podstawie odpowiedzi detektora zarejestrowanej dla roztworów D1 i D2 oraz B1 i B2.

3.12. Szacowanie degradacji deltorfin we krwi

Test prowadzono dla dwóch niezależnych matryc, którymi była krew pobrana od dwóch osób (A, B). Dla każdej matrycy przygotowano próbkę zawierającą deltorfiny (próbka testowa) i próbkę kontrolną. Pobrano po 1 ml krwi do fiolek Eppendorfa. Do próbek testowych dodano 100 µl roztworu deltorfiny I i II o stężeniu na poziomie 6 µg/ml, uzyskując próbki o początkowym stężeniu 560,3 ng/ml deltorfiny I i 545,1 ng/ml deltorfiny II. Do próbek kontrolnych dodano 100 µl roztworu acetonitrylu/woda/metanol (1/1/1; v/v/v). Próbki przechowywano w temperaturze pokojowej przez 7 dni. Pobierano po 100 µl próbki po czasie: 2 h, 24 h, 48 h i 168 h (7 dni) od momentu dodania deltorfin do krwi i zamrażano bezpośrednio po pobraniu. Przed analizą próbki rozmrożono i poddano procesowi strącenia białek. Zawartość deltorfin wyznaczono metodą krzywej kalibracyjnej i na tej podstawie oszacowano stopień ich degradacji we krwi.

4. Wyniki

4.1. Identyfikacja deltorfiny I i II w badanej próbce wydzieliny chwytnicy

Chromatogram uzyskany dla ekstraktu z wydzieliny chwytnicy miał bardzo skomplikowany obraz. Zarejestrowano m.in. dwa piki o czasach retencji RT = 7,31 min i RT = 7,40 min, którym odpowiadały jony odpowiednio o m/z 783,4050 i o m/z 769,3908. Różnica masy między nimi wskazywała na obecność dodatkowej grupy

metylowej, co potwierdziły zaproponowane wzory sumaryczne wykrytych związków: dla jonu $[M+H]^+$ o m/z 783,4050 $C_{38}H_{55}N_8O_{10}^+$ (wartość teoretyczna 783,4036; błąd pomiaru masy – 1,9 ppm), a dla jonu $[M+H]^+$ o m/z 769,3908 $C_{37}H_{53}N_8O_{10}^+$ (wartość teoretyczna 769,3879; błąd pomiaru masy – 3,8 ppm). Stosunek poszczególnych pierwiastków w zaproponowanych wzorach sugeruje, że są to substancje o budowie aminokwasowej. Ich strukturę zidentyfikowano, stosując sekwencjonowanie *de novo* (Rys. 3). Jak można było oczekiwać, w efekcie zastosowania fragmentacji typu CID jony o najwyższej intensywności pochodziły z serii b i serii y. W obu przypadkach zidentyfikowano jony y_2 , y_3 , y_4 oraz y_5 , a także b_2 , b_3 , b_4 , b_5 i b_6 (Tabele 1 i 2). Fragmenty y_2 , y_3 oraz b_2 , b_3 były identyczne dla obu związków, co pozwala przypuszczać, że pierwsze trzy i ostatnie trzy aminokwasy w sekwencjach badanych związków są identyczne. Różniły się one jednym aminokwasem. Jon o m/z 783,4050 pochodził od substancji zawierającej w swojej sekwencji aminokwasowej kwas glutaminowy (E), a jon o m/z 769,3908 – kwas asparaginowy (D). Aminokwasy te różnią się między sobą jedną grupą metylową w łańcuchu alifatycznym. Ostatecznie ustalono sekwencje aminokwasowe obu związków oraz stwierdzono, że do C-końcowego aminokwasu przyłączona jest grupa aminowa tworząca amid. W kolejnym etapie potwierdzono ich tożsamość na podstawie danych zarejestrowanych dla materiału odniesienia. Stwierdzono, że pierwszą substancją była deltorfina II o sekwencji YAFEVVG-NH₂, zaś drugą – deltorfina I o sekwencji YAFDVVG-NH₂. Ponadto w analogiczny sposób zidentyfikowano floceculinę, jednak z powodu braku materiału odniesienia nie było możliwe potwierdzenie tożsamości tego związku.

Największą intensywność sygnałów zarejestrowano dla dwóch peptydów opioidowych – deltorfiny I i deltorfiny II, dla których następnie przeprowadzono analizę ilościową.

4.2. Wyniki uzyskane dla ocenianych parametrów walidacyjnych

4.2.1. Metoda oznaczania deltorfin w wydzielinie chwytnicy

Wartości RSD czasów retencji deltorfiny I i deltorfiny II wynosiły odpowiednio 0,14% i 0,15%. Nie stwierdzono występowania interferencji w ślepej próbce. Wartości LOD i LLOQ były zbliżone dla obu badanych peptydów. Spośród dwóch badanych metod metoda MS-scan okazała się bardziej czuła. Otrzymane wyniki obliczeń potwierdziły zasadność zastosowania modelu kalibracji ważonej w badaniach, w trybie pracy MS-scan i MRM. W badanym zakresie stężeń od 4 ng/ml lub 8 ng/ml (zależnie od trybu pracy spektrometru) do 600 µg/ml oba

tryby pracy pozwalały uzyskać liniową odpowiedź, odpowiednią precyzję i dokładność.

Zbiorcze wyniki uzyskane dla ocenianych parametrów walidacyjnych dla oznaczania deltorfin w wydzielinie przedstawiono w tabeli 3.

4.2.2. Metoda oznaczania deltorfin we krwi

Odpowiedź detektora dla wszystkich testowanych próbek krwi wolnych od deltorfin i roztworów substancji leczniczych nie przekraczała 20% wartości LLOQ. Współczynnik determinacji r^2 dla krzywej kalibracyjnej wyznaczono po ocenie różnych modeli kalibracji i wyborze modelu optymalnego dla danej substancji i danego zakresu stężeń. Wyniki obliczeń potwierdziły, że opracowana metoda jest liniowa w zakresie od 10 ng/ml do 300 ng/ml dla deltorfiny I i od 8 ng/ml do 300 ng/ml dla deltorfiny II charakteryzuje się dobrą precyzją i dokładnością. Zbiorcze wyniki uzyskane dla wybranych ocenianych parametrów walidacyjnych dla metody oznaczania deltorfin we krwi przedstawiono w tabeli 4.

4.3. Oznaczanie zawartości deltorfiny I i deltorfiny II w wydzielinie

Zawartość deltorfiny I i II oznaczano metodą krzywej kalibracji. Zawartości wraz z przedziałem ufności na poziomie istotności $\alpha = 0,05$ oznaczone metodą MRM wynoszą dla deltorfiny I: $4,4 \pm 0,2 \mu\text{g}/\text{mg}$, a dla deltorfiny II: $1,9 \pm 0,1 \mu\text{g}/\text{mg}$, zaś oznaczone metodą MS-scan dla deltorfiny I: $4,5 \pm 0,3 \mu\text{g}/\text{mg}$, a dla deltorfiny II: $1,8 \pm 0,1 \mu\text{g}/\text{mg}$.

4.4. Szacowanie degradacji deltorfin we krwi

Oznaczone zawartości deltorfin i ich procentowa pozostałość w próbkach A i B przedstawiono w tabeli 5. W próbkach kontrolnych nie stwierdzono sygnałów pochodzących od oznaczanych substancji. W próbce A w miarę upływu czasu (od momentu dodania substancji do krwi) stężenie deltorfin obniżało się, jednak jeszcze po tygodniu (pomiar po 168 h) w próbce obserwowano 32,68% początkowego stężenia deltorfiny I i 14,97% deltorfiny II. W próbce B już po 1 h zawartość procentowa deltorfiny I wynosiła 64,9%, a deltorfiny II 41,19%, zaś po 24 h nastąpił na tyle znaczny rozkład oznaczanych peptydów, że nie było możliwe określenie ich stężenia zastosowaną metodą. Deltorfiny jako niewielkie, siedmioaminokwasowe peptydy mogą być rozkładane przez enzymy proteolityczne obecne we krwi. Z drugiej strony wydaje się, że obecność D-aminokwasu w ich strukturze jest czynnikiem zwiększającym ich stabilność. Znaczące różnice pomiędzy wynikami próbki A i B mogą wskazywać na duże różnice w stężeniu lub aktywności enzymatycznej proteaz obecnych w matrycach, jednakże oba te parametry nie były wyznaczane w przeprowa-

dzonym teście. Zmienność międzysobnicza degradacji niewielkich peptydów we krwi na drodze enzymatycznej hydrolizy jest zjawiskiem obserwowanym i opisywanym w literaturze (Marini, Urbani, Trani, Bongiorno, Roda, 1997). Jako że do przeprowadzenia testu wykorzystano próbki krwi pobranej pośmiertnie, mogły w tym przypadku występować różnice w czasie od momentu śmierci do pobrania materiału sekcyjnego, co potencjalnie mogło mieć wpływ na obecne we krwi enzymy. Wyniki te sugerują potrzebę zastosowania większej puli matryc do szacowania degradacji peptydów, co uwzględniłoby ewentualne różnice międzysobnicze związane ze stężeniem i aktywnością enzymatyczną proteaz.

4.5. Oznaczenie zawartości deltorfiny I i II w próbce krwi

Pobrano 100 μl badanej krwi zabezpieczonej podczas sekcji zwłok kobiety. Krew poddano procedurze opisanej w punkcie 3.7. i odwirowano. Przygotowano trzy niezależne próby.

W żadnej z trzech badanych próbek nie zarejestrowano sygnałów pochodzących od deltorfiny I lub II. Może to wynikać z małej ilości wchłoniętych peptydów, ich szybkiego metabolizmu (Aquila i in., 2017), wpływu czasu pomiędzy ekspozycją na wydzielinę a zgonem pacjentki oraz przede wszystkim – z ich pośmiertnego rozkładu (Konikova, Vinarskaya, Nikulin, Pogossova, Petukhova, 1975).

5. Wnioski

Na podstawie uzyskanych wyników w badanej próbce „kambo” stwierdzono obecność peptydów charakterystycznych dla wydzieliny chwytnicy zwinnej (*Phyllo-medusa bicolor*): deltorfiny I, deltorfiny II oraz filoceruliny. Metoda LC-QTOF-MS/MS może być stosowana do analizy jakościowej wydzieliny gruczołów skórnych chwytnicy zwinnej, a także do identyfikacji gatunkowej peptydów opioidowych, ponieważ deltorfiny I i II są specyficzne dla wydzieliny tego gatunku (Kastin, 2013). Opracowana i zwalidowana metoda analizy ilościowej oznaczania zawartości deltorfiny I i II z dobrą dokładnością i precyzją. Oznaczona ilość peptydów opioidowych w wydzielinie jest zgodna z danymi literaturowymi (Erspamer i in., 1993). Ze względu na budowę peptydową deltorfiny mają krótki czas działania, gdyż są rozkładane przez obecne w organizmie człowieka peptydazy. Opracowana metoda oznaczania deltorfin we krwi pozwala na precyzyjne i dokładne określenie ich stężenia we krwi, o ile jest ono wyższe od wartości 8–10 ng/ml. Jednak ze względu na szybką degradację proteolityczną metoda ta może znaleźć zastosowanie jedynie do analizy próbek

krwi pobranych i przygotowanych do badań w stosunkowo krótkim czasie od zatrucia „kambo”. W nadesłanym materiale sekcyjnym w postaci krwi w żadnej z trzech pobranych pośmiertnie próbek krwi nie stwierdzono obecności żadnego z peptydów występujących w wydzielinie gruczołów skórnych chwytnicy zwinnej (*Phyllomedusa bicolor*). Biorąc jednak pod uwagę informację o tym, ile czasu upłynęło od momentu przyjęcia kobiety do szpitala do czasu sekcji zwłok, wydaje się, że najprawdopodobniej wchłonięte przez organizm deltorfiny mogły ulec co najmniej częściowemu zmetabolizowaniu podczas hospitalizacji, a ich pozostałość – rozkładowi jeszcze przed pobraniem materiału sekcyjnego.