

Mariusz Ścisłowski, Sebastian Rojek, Małgorzata Kłys,
Krzysztof Woźniak, Franciszek Trela

Zastosowanie techniki HPLC/MS w ocenie zatrucia śmiertelnego digoksyną w aspekcie orzecznictwa sądowo-lekarskiego

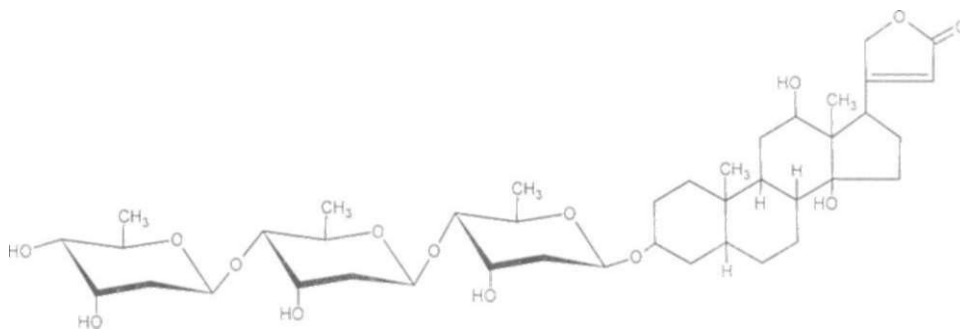
Application of HPLC/MS for evaluation of fatal poisoning with
digoxin in the aspect of medicolegal evidence

Z Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej CM UJ
Kierownik: dr hab. med. F. Trela - profesor UJ

W pracy przedstawiono przypadek samobójczego zatrucia śmiertelnego digoksyną, przyjętą w postaci iniekcji. Sekcję zwłok osoby zatrutej wykonano w Zakładzie Medycyny Sądowej Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, w czasie której zabezpieczono płyny ustrojowe (krew, mocz, płochłonka ucha wewnętrznego) oraz wycinki narządów mięsnych (nerka, wątroba, mózg) celem wykonania badań toksykologicznych, identyfikacji oraz oznaczenia ilościowego ksenobiotyku w ekstraktach płynów ustrojowych i tkanek dokonano z zastosowaniem techniki wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas (HPLC/MS), która wykazała obecność digoksyny w badanym materiale, w stężeniach ekstremalnie wysokich. Zastosowana metoda oznaczania pozwoliła na wiarygodną interpretację wyników badań, wskazując na jej wysoką przydatność w oznaczaniu glikozydów nasercowych w zatruciach śmiertelnych do celów orzecznictwa sądowo-lekarskiego.

This paper presents a case of suicidal poisoning of a woman with digoxin administered by injection. The autopsy of the subject was performed in the Institute of Forensic Medicine CMUJ. Body fluids (blood, urine, perilymph) and tissues (kidney, liver, brain) were collected for toxicological investigation. Digoxin determination was carried out by means of high performance liquid chromatography with mass spectrometry (HPLC/MS) which revealed digoxin in extremely high concentrations in specimens examined. The method is especially useful for analysis of cardiac glycosides in fatal poisonings for medicolegal purposes.

Słowa kluczowe: digoksyną, metyldigoksyna, wysokosprawna chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas
Key words: digoxin, methyl digoxin, high performance liquid chromatography with mass spectrometry



Ryc. 1. Struktura chemiczna cząsteczki digoksyny.
Fig. 1. Chemical structure of digoxin.

WSTĘP

Glikozydy nasercowe stanowią grupę leków wyizolowanych m. in. z Naparstnicy Wełnistej (*Digitalis lanata*). Używane są w leczeniu od ponad 200 lat. Istnieją dwa główne wskazania do stosowania leków tej grupy: niewydolność krążenia i szybkie rytmy nadkomorowe. Spośród glikozydów nasercowych najczęściej używana jest digoksyną. Rzadziej wykorzystuje się lanatozyd C, deslanosyd, acetylodigoksynę, a - acetylodigoksynę, oubainę, strofantynę. Jakkolwiek związki te różnią się nieco budową i posiadają zróżnicowane parametry farmakokinetyczne. to wspólną ich cechą jest działanie nasercowe (1, 10, 13).

Detekcja glikozydów nasercowych w płynach ustrojowych opiera się głównie na szybkich i czułych lecz mało selektywnych technikach immunoenzymatycznych. W toksykologii klinicznej testy te są technikami z wyboru, natomiast w toksykologii sądowej pełnią rolę technik przesiewowych.

W analityce toksykologicznej identyfikacja ksenobiotyku jest koniecznością. Aby sprostać tym zadaniom coraz powszechniej stosuje się techniki chromatograficzne z czułymi i selektywnymi detektorami, z których spektrometr masowy jest niewątpliwie najbardziej selektywny (3, 5).

Celem niniejszej pracy było badanie przydatności wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas w identyfikacji i oznaczaniu glikozydów nasercowych w odniesieniu do przypadku śmiertelnego zatrucia jednym z powyższych leków - digoksyną.

MATERIAŁ I METODA

Wzorce i odczynniki

Digoksyną i metyldigoksyną - Promochem, acetonitryl, metanol czystości spektralnej - Merck, chloroform, 2 - propanol - Polskie Odczynniki Chemiczne, kwas mrówkowy - Riedel de-Haen, bufor TRIS - Serve.

Bufor TRIS (pH 9) sporządzono przez dodanie 60 ml 0.2 M 2-amino - 2-hydroksymetylo - 1,3-propanodiolu do 250 ml 0.1 M HCL i dopełnienie wodą destylowaną do 1000 ml.

Materiał biologiczny

- Płyny ustrojowe (krew, mocz, przychłonka ucha wewnętrznego) oraz wycinki wątroby, nerki i mózgu zabezpieczone w czasie sekcji zwłok zmarłej,
- płyny ustrojowe (krew, mocz) oraz wycinki wątroby, nerki i mózgu pochodzące od osób nie zatrutych poddanych autopsji w Zakładzie Medycyny Sądowej Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego.

Przygotowanie materiału:

W procedurze wstępnej mocz i przychłonkę ucha wewnętrznego pobrane od zmarłej poddano badaniom testem immunoenzymatycznym EMIT na aparacie Viva-Vitaiab (Dade Behring). Analiza wykazała obecność leku z grupy glikozydów nasercowych.

Ekstrakcja:

1 ml płynów ustrojowych (krew, mocz) wzbogacono roztworem wzorcowym metyldigoksyny jako standardem wewnętrznym w stężeniu 100 ng/ml materiału. Następnie do każdej z próbek dodano po 2 ml buforu TRIS (pH = 9) i odbiałczono 1 ml acetonitrylu. Tak przygotowane próby ekstrahowano 20 ml mieszaniny chloroform - 2 - propanol (95:5, v/v), po czym wirowano przy 2000 obr/min przez 20 minut. Fazę organiczną przesączono i odparowano do sucha w 56 °C w strumieniu azotu. Suchą pozostałość rozpuszczono ilościowo w 100 ul mieszaniny metanol - woda (20:80, v/v). Ekstrakty odwirowano przy 10000 obr/min, następnie 5 ul supernatantu nastrzyknięto do układu chromatograficznego. Analogiczne postępowanie przyjęto dla materiałów referencyjnych krwi i moczu, wzbogacając je roztworem digoksyny w stężeniach 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500 ng/ml materiału oraz metyldigoksyną jako standardem wewnętrznym w stężeniu 100 ng/ml materiału.

Ze względu na wysokie stężenie digoksyny mocz badany rozcieńczono 20 - krotnie moczem kontrolnym.

Stężenia leku w narządach mięsnych obliczono z wykorzystaniem biologicznych standardów kalibracji. W tym celu homogenaty tkankowe badanego materiału wzbogacono standardem wewnętrznym w stężeniu 200 ng/g,

natomiast homogenaty tkankowe materiału referencyjnego wzbogacono standardem wewnętrznym i digoksyną w stężeniu 200 ng/g. Zawartość digoksyny w badanym materiale obliczono z poniższych zależności przyjmując do obliczeń pole powierzchni sygnału analitycznego:

$$F = \frac{A_{std}}{A_{analit}} \cdot C_{analit} \quad C_X = \frac{A_X}{A_{std}} \cdot F$$

TECHNIKA ANALITYCZNA

Rozdział chromatograficzny:

Zastosowano chromatograf cieczowy Finnigan-MAT (San Jose, CA, USA) składający się z pompy TSP 4000 i autosamplera TSP AS 3000 (objętość nstrzyku - 5 ul). Rozdział chromatograficzny prowadzono na kolumnie LiChroCART (125 x 3 mm) z wypełnieniem Purospher RP-C₁₈ firmy Merck, przez którą przepływały fazy A (0.1 % wodny roztwór kwasu mrówkowego) i B (mieszanina acetonitrylu i fazy A, 95:5, v/v) z przepływem 0.4 ml/min w zaprogramowanym gradiencie udziału faz.

Detekcja:

Zastosowano spektrometr mas LCQ (Finnigan-MAT, San Jose, CA, USA) z ciałkąjonową. Zastosowano dwie opcje jonizacji'

- opcję chemicznej jonizacji pod ciśnieniem atmosferycznym (APCI - *atmospheric pressure Chemical ionization*) w trybie jonów dodatnich. Ciśnienie gazu jonizującego (azot): 80 psi, pomocniczego (hel): 10 psi, temperatura odoarowalnika: 400° C, prąd korony 5 uA, napięcie korony 5 V. temperatura kapilary 200° C, napięcie kapilary 4 V.
- opcję jonizacji przez rozpylanie w polu elektrycznym (ESI - *electricspray ionization*) w trybie jonów dodatnich. Ciśnienie gazu jonizującego (azot): 80 psi. pomocniczego (hel): 10 psi, napięcie igły rozpylacza: 4.2 kV, temperatura kapilary: 200° C, napięcie kapilary: 3 V.

Badanie fragmentacji digoksyny i metyldigoksyny prowadzono w zakresie m/z od 500 do 1000. Walidację i oznaczenie digoksyny w materiale biologicznym prowadzono w opcji monitorowania wybranych jonów (SIM - *select ion monitoring*) - 798 m/z dla digoksyny i 812 m/z dla metyldigoksyny.

OPIS PRZYPADKU

W miesiącu zimowym w lesie ujawniono zwłoki NN kobiety, przy których znaleziono 6 pustych opakowań po Digoxinie w ampułkach, a ponadto opakowa-

nia Phenazoliny i Lignokainy, kilka strzykawkę i igieł do iniekcji. Sekcję zwłok przeprowadzono w Zakładzie Medycyny Sądowej Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego następnego dnia po ujawnieniu zwłok.

W części dalszej lewego przedramienia, grzbietowo, od strony łokciowej znajdował się venflon, którego koniec umieszczony był w żyłę. Podczas sekcji zwłok nie ujawniono zmian pourazowych, które mogłyby tłumaczyć zgon. Makroskopowo stwierdzono przekrwienie narządów wewnętrznych oraz cechy rozpoczynającego się gnilnego rozkładu zwłok. Zwłoki zostały zidentyfikowane przez rodzinę. Była to 35 - letnia pielęgniarka, leczona z powodu depresji. Kilka miesięcy wcześniej podejmowała próbę samobójczą (zatrucie lekami). Ostatni raz widziana około 6 tygodni przed znalezieniem zwłok.

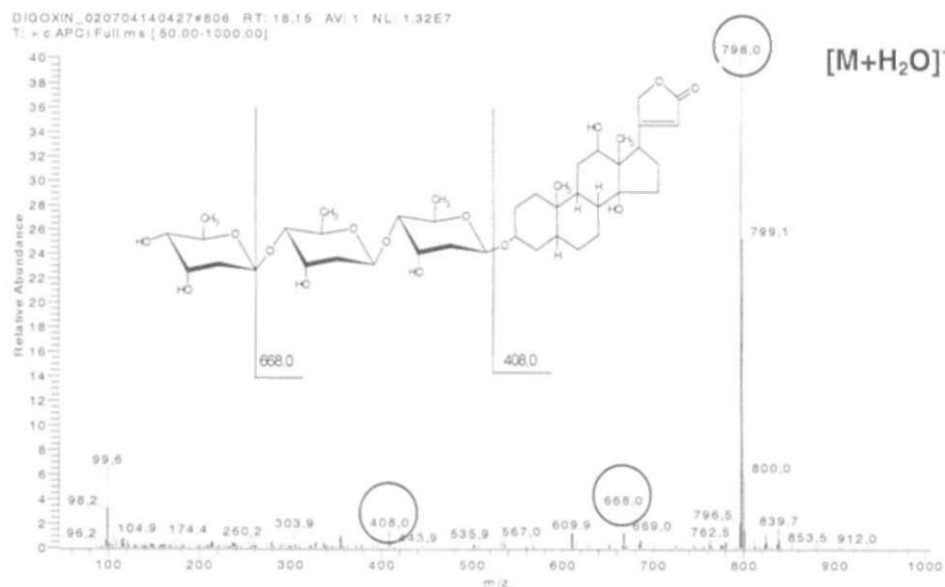
WYNIKI i DYSKUSJA

W ramach opracowania metody zbadano fragmentację digoksyny i metyldigoksyny. następnie dokonano optymalizacji rozdziału chromatograficznego tych związków, a także przeprowadzone proces walidacji oznaczania digoksyny w materiale biologicznym.

Na rycinie 2 i 3 przedstawiono widma masowe digoksyny i metyldigoksyny skanowane w pełnym zakresie wartości m/z (50-1000), otrzymane poprzez analizę metanolowego roztworu tych substancji o stężeniu 1 ug/ml w opcji jonizacji chemicznej pod ciśnieniem atmosferycznym (APCI). Na widmach masowych nie obserwuje się pików pochodzących od pozornych jonów molekularnych (M+H)⁺; tym niemniej widoczne są charakteryzujące się dużą intensywnością piki pochodzące prawdopodobnie od adduktów digoksyny i metyldigoksyny z cząsteczką wody (M+H₂O)⁺. Na widmie masowym digoksyny zaobserwować można także piki otrzymane poprzez eliminację związanych z aglikonem cząsteczek cukru - digitoksoz.

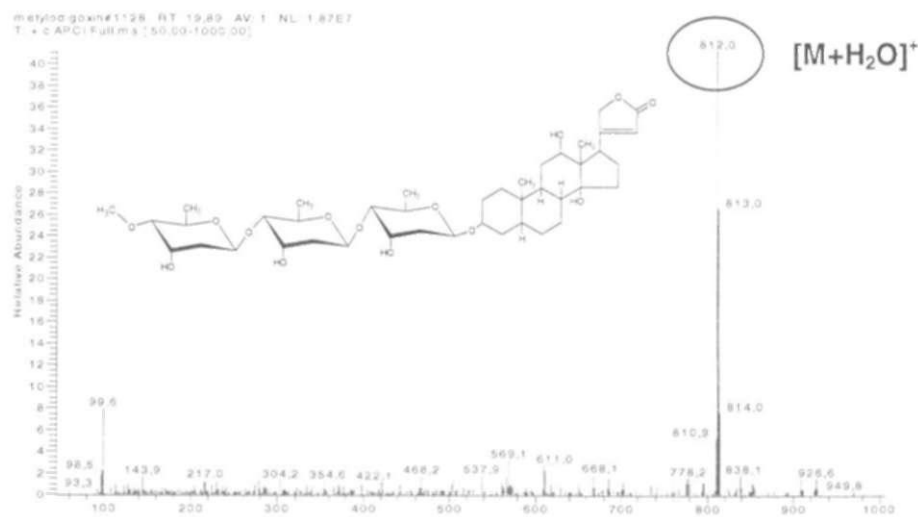
Widmo masowe otrzymane poprzez jonizację w poiu elektrycznym (ESI) dostarcza znacznie więcej informacji na temat digoksyny (Ryc 4). Piki obrazujące fragmentację związanych z aglikonem cząsteczek cukru występują w większej ilości oraz są bardziej intensywne. Widoczny ponadto na widmie masowym jest pik odpowiadający wartości pozornego jonu molekularnego (M+H)⁺, a także wspomniany wyżej pik adduktu digoksyny z cząsteczką wody. Pomimo tych zalet zdecydowano w dalszym postępowaniu zastosować jonizację APCI ze względu na bardziej intensywny sygnał analityczny jonu (M+H₂O)⁺ w porównaniu z jonizacją ESI.

Znaczący wpływ na intensywność sygnału analitycznego miały dwa parametry detektora mas: napięcie kapilary oraz jej temperatura I ch optymalizacja pozwoliła uzyskać intensywny pik przy wartości m/z 798 dla digoksyny i 812 dla metyldigoksyny Warto podkreślić, że analizy wykazywały dużą stabilność w agresywnych warunkach panujących w źródle jonów (temperatura odparowalnika: 400° C), Można było przypuszczać, że analizy posiadające duże masy cząsteczkowe ulegną znacznej fragmentacji. Obserwacja widma masowego jednakże nie potwierdza tego faktu. Jony fragmentaryczne są znacznie mniej intensywne w porównaniu z jonami adduktów.



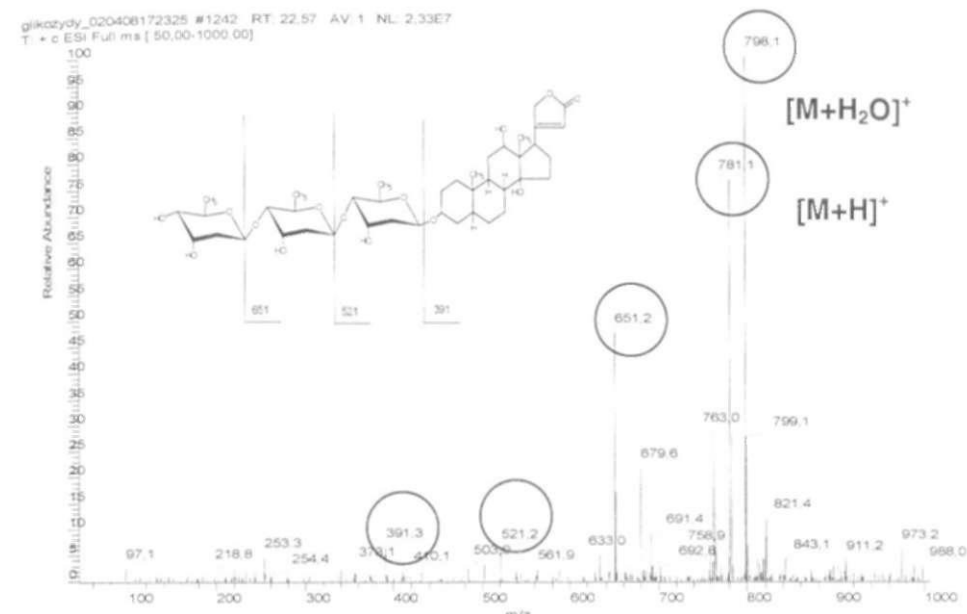
Ryc. 2. Widmo masowe digoksyny (jonizacja chemiczna pod ciśnieniem atmosferycznym).

Fig. 2. Mass spectrum of digoxin (atmospheric pressure chemical ionization).



Ryc. 3. Widmo masowe metyldigoksyny (jonizacja chemiczna pod ciśnieniem atmosferycznym).

Fig. 3. Mass spectrum methylidigoxin (atmospheric pressure chemical ionization).



Ryc. 4. Widmo masowe digoksyny (jonizacja w elektrospreju).

Fig. 4. Mass spectrum of digoxin (electrospray ionization).

Chromatogramy masowe digoksyny i metyldigoksyny (Ryc. 5) obrazują dobry rozdział tych związków. Różnice pomiędzy czasami retencji są niewielkie, co świadczy o ich zbliżonych właściwościach fizykochemicznych. Z tego względu metyldigoksyna z powodzeniem może spełniać rolę standardu wewnętrznego w przypadku braku deuterowanego analogu digoksyny.

Ze względu na dużą intensywność sygnałów analitycznych adduktów digoksyny i metyldigoksyny jony te wybrano do monitorowania.

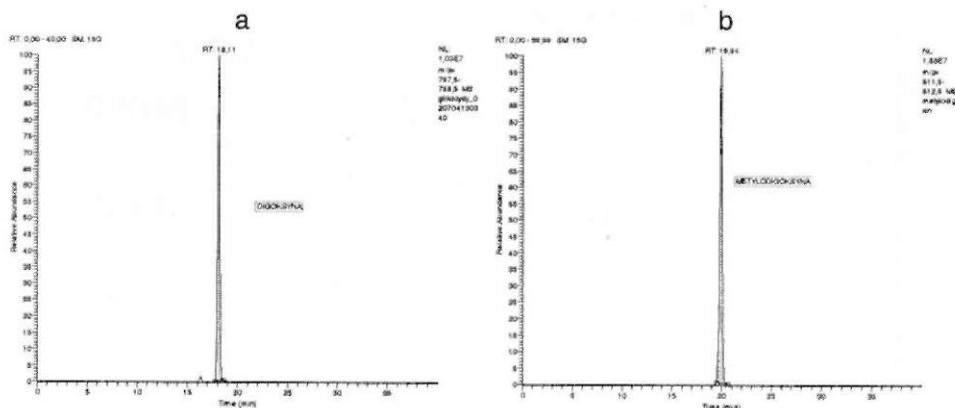
Obserwowane parametry masowe jonów oraz parametry retencji analitów przedstawia Tabela I.

Tabela I. Parametry masowe i chromatograficzne analitów.

Table I. Mass and chromatographic parameters of analytes.

Analit Analyte	Czas retencji Retention time [min.]	Masa związku Mass of compound	Stężenie Concentration [ug/ml]	Monitorowany jon (addukt) Ion monitored (adduct) m/z	Jony fragmentacyjne Źródło jonów APCI Fragment ions m/z Ion source APCI	Jony fragmentacyjne Źródło jonów ESI Fragment ions m/z Ion source ESI
Digoksyna Digoxin	18,11	781	1,0	798	668, 408	781 ⁺ , 651, 521, 391
Metyldigoksyna Methylidigoxin	19,94	795	1,0	812	610, 569	-

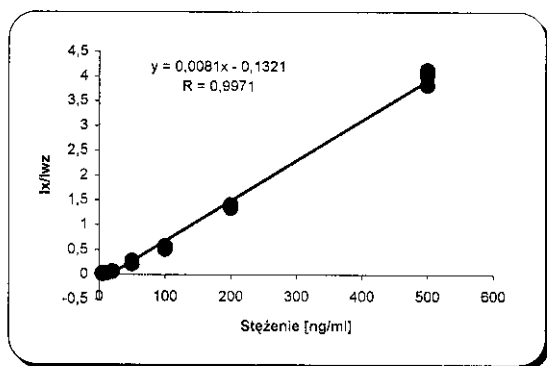
Pozorny jon molekularny [M+H]



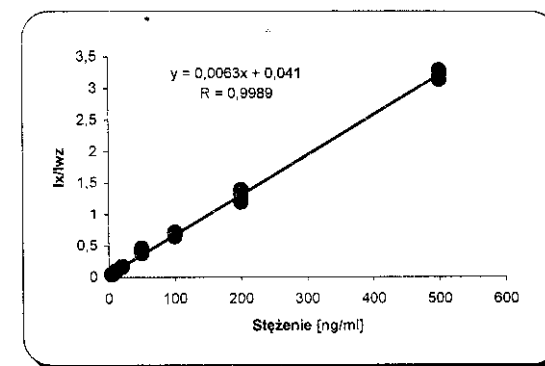
Ryc. 5. Chromatogramy masowe digoksyny (a) i metyldigoksyny (b).
 Fig. 5. Mass chromatograms of digoxin (a) and methyl digoxin (b).

Przystępując do procedury walidacyjnej oznaczania digoksyny we krwi i moczu uwzględniono następujące parametry: zakres liniowości, granica oznaczalności i wykrywalności, odzysk i precyzja.

Wykresy kalibracyjne wykonano dla 1ml prób krwi i moczu wzbogaconych digoksyną w stężeniach 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500 ng/ml materiału oraz standardem wewnętrznym w stężeniu 100 ng/ml materiału w trzech powtórzeniach. Uzyskano zadowalającą liniowość w wymienionym zakresie stężeń: współczynnik korelacji (r) dla krwi - 0.9971, dla moczu - 0.9989. Podany zakres stężeń stanowi także zakres liniowości metody. Wykresy kalibracyjne przedstawiają ryciny 6 i 7.



Ryc. 6. Wykres kalibracyjny oznaczania digoksyny w krwi jako zależność względnego sygnału analitycznego od stężenia ($n=3$).
 Fig. 6. Calibration curve determining of digoxin in blood as a relationship relative analytical signal concentration ($n=3$).



Ryc. 7. Wykres kalibracyjny oznaczania digoksyny w moczu jako zależność względnego sygnału analitycznego od stężenia ($n=3$).
 Fig. 7. Calibration curve determining of digoxin in urine as a relationship relative analytical signal concentration ($n=3$).

Granice oznaczalności (LOQ) wyznaczono w oparciu o stosunek sygnału do szumu (*signal to noise ratio*). Jako LOQ dla digoksyny przyjęto stężenie 5 ng/ml krwi i moczu, w których stosunek ten wynosił 3. Granicę wykrywalności (LOD) wyznaczono jako połowę LOQ czyli 2.5 ng/ml. Wyniki te pokazują, że opracowana metoda nie może być stosowana dla potrzeb toksykologii klinicznej, gdzie stężenia terapeutyczne pokrywają przeciętnie zakres od 0.8 do 2 ng/ml krwi. W tym przypadku techniki immunoenzymatyczne pozostają technikami z wyboru.

Odzysk digoksyny wyznaczono poprzez ekstrakcję referencyjnej krwi i moczu wzbogaconych digoksyną w stężeniu 20 ng/ml i porównaniu otrzymanego sygnału analitycznego z sygnałem nieekstrahowanego wzorca metanolowego o tym samym stężeniu. Wykonano cztery powtórzenia, otrzymując następujące wyniki: (średnia \pm odchylenie standardowe): krew - $80.4 \pm 5.1\%$, mocz - $75.7 \pm 3.2\%$.

Precyzję międzygrupową wyrażoną jako względne odchylenie standardowe wyznaczono poprzez ekstrakcję krwi i moczu wzbogaconych digoksyną w stężeniu 20 ng/ml i standardem wewnętrznym - metyldigoksyna w stężeniu 100 ng/ml w czterech powtórzeniach wykonywanych co dwa dni.

Precyzję wewnątrzgrupową także wyrażoną jako względne odchylenie standardowe wyznaczono podobnie jak precyzję międzygrupową, ale czteroelementową serię prób badano w ciągu jednego dnia.

Międzygrupową precyzją oznaczania dla krwi i moczu wynosi odpowiednio 3.9% i 5.6% natomiast precyzją wewnątrzgrupową to 3.9% dla krwi i 5.6% dla moczu.

Otrzymane wyniki stanowią wartości akceptowalne w praktyce laboratoryjnej, tym niemniej rekomenduje się sporządzanie wykresu kalibracyjnego w przypadku każdej analizy materiału biologicznego.

Wyniki zebrano w tabelach II, III i IV.

Tabela II. Parametry walidacyjne metody oznaczania digoksyny we krwi i moczu.
Table II. Validation parameters of determination of digoxin in blood and urine.

Materiał Material	Czas retencji Retention time [min.]	Odzysk ¹ Recovery %	LOQ [ng/ml]	LOD [ng/ml]	Zakres liniowości Limit of linearity [ng/ml]	Współczynnik korelacji Correlation coefficient r
Krew Blood	18,39	80,4±5,1	5,0	2,5	5-500	0,9971
Mocz Urine		75,7±3,2	5,0	2,5	5-500	0,9989

¹średnia ± odchylenie standardowe (n=4)

¹mean ± standard deviation (n=4)

Tabela III. Precyzja międzygrupową.
Table III. Interday precision.

Materiał Material	Stężenie dodane Concentration added [ng/ml]	Stężenie obliczone ¹ Concentration found ¹ [ng/ml]	Precyzja międzygrupową ² Interday precision ² R.S.D., %
Krew Blood	20,0	19,5±0,8	3,9
Mocz Urine	20,0	19,6±1,1	5,6

¹średnia ± odchylenie standardowe (n=4)

¹ mean ± standard deviation (n=4)

²odchylenie standardowe stężenia obliczonego/średnia stężenia obliczonego (n=4)
standard deviation of concentration found/mean of concentration found (n=4)

Tabela IV. Precyzja wewnątrzgrupową.
Table IV. Intraday precision.

Materiał Material	Stężenie dodane Concentration added [ng/ml]	Stężenie obliczone ¹ Concentration found ¹ [ng/ml]	Precyzja wewnątrzgrupowa ² Intraday precision ² R.S.D., %
Krew Blood	20,0	19,5±0,9	4,6
Mocz Urine	20,0	19,2±1,1	5,7

¹średnia ± odchylenie standardowe (n=4)

¹ mean ± standard deviation (n=4)

²odchylenie standardowe stężenia obliczonego/średnia stężenia obliczonego (n=4)
standard deviation of concentration found/mean of concentration found (n=4)

Tabela V. Rezultat analizy toksykologicznej.
Table V. Toxicological findings.

Materiał Material	Stężenie digoksyny Concentration of digoxin [ng/ml, ng/g]
Krew Blood	251,3
Mocz Urine	10250,1
Przychłonka ucha wewnętrznego Perilymph	129,4
Wątroba Liver	457,3
Nerka Kidney	362,5
Mózg Brain	–

Analiza toksykologiczna materiału, pochodzącego z przypadku zatrucia śmiertelnego digoksyną z zastosowaniem opracowanej metody analitycznej wykazała ekstremalnie wysokie stężenia tego leku zarówno w płynach ustrojowych jak i w narządach miękkich (Tabela V). W badanym materiale oznaczono także doksepinę występującą w stężeniach uznanych za terapeutyczne, niemniej jednak opis tego ksenobiotyku jak i metodyka jego oznaczania w materiale biologicznym wykraczają poza ramy tego opracowania.

Dane toksykologiczne (2, 7, 11) wskazują na zakres 0.8 - 2.0 ng/ml krwi jako przedział stężeń spotykany w terapii. Efekty toksyczne zazwyczaj wiążą się z poziomem mieszczącym się w zakresie 2.0 - 7.0 ng/ml krwi. W zatruciach śmiertelnych digoksyną podane wyżej wartości stężeń mogą zostać znacznie przekroczone.

Oznaczone stężenia digoksyny w materiale badanym jednoznacznie wskazują na przyczynę zgonu. Stężenie ksenobiotyku we krwi ponad stukrotnie przewyższa górną granicę stężenia uznanego za terapeutyczne. W kazuistyce sądowo-lekarskiej rzadko spotykamy się z takimi sytuacjami (8).

W badanym przypadku nie wykryto digoksyny jedynie w mózgu, co mogłoby nasuwać przypuszczenie, że transport tego ksenobiotyku przez barierę krew-mózg jest utrudniony. Fakt ten znajduje odzwierciedlenie w danych z piśmiennictwa. W opisywanych w tych pracach (4, 6, 9, 12) przypadkach wykazano niskie stężenie digoksyny w mózgu, bądź też ksenobiotyku tego nie wykryto, pomimo oznaczenia wysokich stężeń leku w innych narządach i płynach ustrojowych. *Steentoft* (12) w badanym przez siebie przypadku nie wykazał obecności digoksyny w tkance mózgowej, podczas gdy stężenie tego ksenobiotyku we krwi wynosiło 150 ng/ml, a w wątrobie i nerce odpowiednio 230 i 680 ng/g. Z kolei *Selesky* (9) w innym przypadku zatrucia śmiertelnego oznaczył digoksynę w mózgu na poziomie 0,86 ng/g, natomiast w wątrobie 35 ng/g, a w nerce 130 ng/g.

Identyfikacja oraz ilościowe oznaczenie glikozydów Naparstnicy Wełnistej jest problemem zarówno w przypadku monitorowania terapii tymi lekami jak i w odniesieniu do zatruc śmiertelnych. Stężenia terapeutyczne pokrywają niski zakres stężeń we krwi (0.8 do 2.0 ng/ml). Powyżej tego zakresu spotyka się stężenia notowane w zatruciach śmiertelnych (2, 7, 11). W niektórych przypadkach nadwrażliwości osobniczej na leki z grupy glikozydów nasercowych w zakresie terapeutycznym mogą wystąpić objawy zatrucia. Ponadto digoksyną posiada tendencje do kumulacji w ustroju. Wynika stąd niebezpieczeństwo zatrucia. Dlatego też stosowanie tych leków podlega ścisłej kontroli lekarskiej i odbywa się w lecznictwie zamkniętym.

WNIOSKI

1. W wyniku badania fragmentacji w opcji APCI digoksyny i metylodigoksyny na widmach masowych nie obserwowano pików pochodzących od pozornych jonów molekularnych. Do monitorowania wybrano więc jony adduktów $(M+H_2O)^+$. Jonizacja w polu elektrycznym (ESI) charakteryzowała się bogatym widmem masowym, jednak sygnał analityczny był mniej intensywny, stąd zdecydowano o użyciu jonizacji chemicznej pod ciśnieniem atmosferycznym do dalszych badań.
2. Uzyskano zadowalający rozdział chromatograficzny digoksyny i jej metylowej pochodnej - metylodigoksyny.
3. Opracowana metoda pozwala na identyfikację oraz oznaczenie digoksyny w próbach biologicznych i rutynowo może być stosowana dla potrzeb toksykologii sądowej, jednakże nie jest przydatna dla monitorowania stężeń terapeutycznych w toksykologii klinicznej.
4. Oznaczone stężenia w badanym materiale za wyjątkiem tkanki mózgowej były ekstremalnie wysokie, wskazując na przyczynę zgonu.

PIŚMIENNICTWO

1. Adamska-Dyniewska H.: *Terapia monitorowana*. Wydawnictwo Towarzystwa Terapii Monitorowanej, Łódź, 1994. -2. Baselt R. C.: *Disposition of toxic drugs and Chemicals in man*. Chemical Toxicology Institute Foster City, California. -3. de Hoffmann E., Charette J., Stroobant V.: *Spektrometria mas*. Wydawnictwo naukowo-techniczne. Warszawa 1998. -4. Dickson S. J., Blazey N. D.: *Postmortem digoxin level-two unusual case reports*. Journal of Forensic Sciences, 9 (1977) 145-150. -5. Hoja H., Maquet P., Verneuil B., Lotfi H., Penicaut B., Lachatre G.: *Applications of liquid chromatography - mass spectrometry in analytical toxicology: a review*. Journal of Analytical Toxicology, vol. 21, march/april 1997. -6. Kłys M., Gross A.: *Determination of deslanosid in antemortem and postmortem specimens. Unusual case report*. Forensic Science International 45 (1990) 231-238. -7. Moffat A. G.: *Clarke's isolation and*

Identification of drugs in pharmaceuticals, body fluids and post - mortem material. Second edition. The Pharmaceutical Press, London 1986. -8. Peschel O., Betz P., Eisenmenger W.: *Injection of toxic agents: an unusual cause of death*. Forensic Science International 75 (1995) 95-100. -9. Selesky M., Spiehler V., Cravey R. H., Elliot H. W.: *Digoxin concentrations in fatal cases*. Journal of Forensic Sciences, 22 (1977) 409-417. -10. Seńczuk W. (red.): *Toksykologia*. Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, Warszawa 1994.

11. Stead A. H., Moffat A. C.: *A collection of therapeutic, toxic and fatal drug concentrations in man*. Human Toxicology (1983), 3, 437 - 464. -12. Steentoft A.: *Fatal digitalis poisoning*. Acta Pharmacol. Toxicol., 32 (1973) 353-357. -13. Tracqui A., Kintz P., Ludes B., Mangin P.: *High-performance liquid chromatography-ion spray mass spectrometry for the specific determination of digoxin and some related cardiac glycosides in human plasma*. Journal of Chromatography B, 692 (1997) 101-109.

Adres pierwszego autora:

Katedra i Zakład Medycyny Sądowej CM UJ w Krakowie
ul. Grzegórzecka 16
31-531 Kraków