

Rafał Celiński, Joanna Kulikowska, Małgorzata Albert, Halina Sybirska

Problemy analityczne w badaniach małych próbek krwi pobranych od osób, które złamały prawo

Analytical problems in examination of small amounts of blood samples taken from law breakers

Z Katedry Medycyny Sądowej Śląskiej AM w Katowicach
Kierownik: prof. dr hab. H. Sybirska

Autorzy na przykładzie badania małych próbek krwi pobranych rutynowo przez policję do kontroli nietrzeźwości od trzech sprawców kolizji drogowych i sprawcy gwałtu, przedstawiają ograniczenia metod spektroimmunologicznych stosowanych do wykrywania środków psychoaktywnych. Użyta metoda FPIA w wersji firmy Abbott pozwoliła na wykrycie i przyporządkowanie do grupy przyjętych substancji, ich pełna identyfikacja była możliwa przy wykorzystaniu metody LC-MS (morfina i kodeina; kokaina; tramal i diazepam; MDMA).

In the paper there have presented results of the analysis of small blood samples taken routinely from 3 cases after car accidents and 1 rapist. Fluorescence polarisation immunoassay (FPIA, Abott) was used for screening examinations of narcotics from the group of both opium and cocaine alkaloids, barbituric acid and benzodiazepine and also drugs from the group of tricyclic antidepressants. Confirmation of the obtained results and full identification of the substances analysed were carried out by liquid chromatography with mass spectrometry (LC-MS). In the causes of car accidents components of „compote” were found (poppy straw extract) morphine and codeine (1 case), cocaine (1 case) and also tramal and diazepam (1 case) were also found. In the rapist methylenedioxymethamphetamine (MDMA) was determined.

Słowa kluczowe: substancje psychoaktywne, analiza małych próbek krwi (met. FPIA i LC - MS)

Key words: psychoactive agents, analysis of small amounts of blood samples, FPIA, LC-MS

Zjawisko narkomanii w Polsce rośnie w ogromnym tempie a świadomość społeczna o szkodliwym oddziaływaniu przyjmowanych środków na funkcje psychofizyczne człowieka jest ciągle bardzo mała. Grupa środków psychoaktywnych innych od etanolu stanowi coraz częściej przyczynę lub współprzyczynę zdarzeń zakończonych zejściem śmiertelnym lub złamaniem prawa (8, 9).

Wykazywanie w płynach ustrojowych i tkankach pobranych ze zwłok osoby zatrutej środkami odurzającymi nie stanowi na ogół większego problemu, o ile materiał biologiczny jest prawidłowo i w dostatecznej ilości pobrany. Poprawne wykonanie badań próbek krwi pochodzących od osób, które weszły w kolizję z prawem nastroić może wiele trudności.

Wynikają one głównie z niedostatecznej ilości materiału przesłanego do badania, pobranego zazwyczaj w objętości od 2-5 ml do kontroli stanu nietrzeźwości. Badania te przeprowadza wojewódzkie laboratorium policji. Po ich wykonaniu i uzyskaniu wyniku ujemnego materiał ten przeznaczony jest do badań na obecność innych substancji psychoaktywnych. Mała objętość materiału badanego a także rząd wielkości poszukiwanych substancji przyjętych w niewielkiej dawce oraz fakt, że badania te są często nieukierunkowane sprawia że, użyte w analizie metody muszą charakteryzować się wysoką czułością i specyficznością.

Stosowana w takich przypadkach metoda spektroimmunofluorescencji w świetle spolaryzowanym (FPIA) mimo wysokiej czułości nie zawsze jest wystarczająca dla ustalenia przyjętej substancji (1).

Wskazują na to wybrane z praktyki toksykologicznej w roku 2001 cztery przypadki.

MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań stanowiły próbki krwi pobrane od trzech kierowców sprawców kolizji drogowych oraz próbka krwi od jednej osoby podejrzanej o gwałt.

Pierwszy przypadek dotyczył kierowcy, który spowodował kolizję drogową. Policja znalazła i zabezpieczyła w jego w samochodzie niewielką ilość polskiej heroiny - „kompotu”.

W przypadku drugim sprawca kolizji zeznał, iż w przeddzień zdarzenia, wieczorem zażył trzykrotnie po dwie tabletki promazyny a rano metadon. Krew do analizy toksykologicznej pobrano po godzinie 15.00.

Trzeci sprawca po spowodowaniu wypadku zeznał, że jest uzależniony od tramalu.

Czwarty przypadek dotyczył osoby podejrzanej o gwałt. Mężczyzna ten w momencie zatrzymania znajdował się w stanie pobudzenia.

Część próbek krwi analizowano wstępnie metodą FPIA stosując do oznaczeń testy firmy Abbott na obecność opiatów, kokainy, pochodnych: amfetaminy, kwasy barbiturowego i benzodiazepiny oraz substancji z grupy trójcyklicznych antydepresantów (1).

Pozostałość o objętości do 1 ml odbiałczono acetonitrylem, odwirowano a następnie poddano ekstrakcji octanem etylu przy pH = 9. Fazę organiczną po zagęszczeniu przez odparowanie rozpuszczalnika przeniesiono do ściśle określonej objętości metanolu.

W przypadku 4 (podejrzanie o gwałt) próbkę krwi odbiałczono wg Borkowskiego, (5) poddano ekstrakcji eterem z pH = 11. Zagęszczoną fazę organiczną po odparowaniu rozpuszczono w metanolu.

Analizę prowadzono przy użyciu chromatografu cieczonego i detektorem

masowym firmy Finningan. Do rozdziału chromatograficznego zastosowano kolumnę Hypersil 150x4,6mm _{SJLI} BDS C18 i fazę ruchomą złożoną z buforu mrówczanu amonu o pH = 3,5 i acetonitrylu w systemie gradientowym. Detekcja - pułapka jonowa metoda jonizacji próbki ESI (elektrospray), temperatura kapilary 200°C (2, 3, 4, 5, 6).

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Za pomocą metody FPIA w przypadku pierwszym stwierdzono obecność opiatów i barbituranów, w przypadku drugim wykazano obecność kokainy, u kierowcy trzeciego pochodne benzodiazepiny a u osoby podejrzanej o gwałt pochodne amfetaminy. Zebrane wyniki badań przedstawiono w tabeli I.

Tabela I. Wyniki badań próbek krwi metodą FPIA.

Table I. Results of blood samples examination by the FPIA method.

Lp. No.	Opiaty Opiates	Kokaina Cocaine	Amfetaminy Amphetamines	Benzodiazepiny Benzodiazepines	Barbiturany Barbiturates
	Stężenie w [µg/ml] Concentration in µg/ml				
Przypadek 1 Case 1	0,17	b. ujemne negative	b. ujemne negative	b. ujemne negative	0,34
Przypadek 2 Case 2	b. ujemne negative	0,48 negative	b. ujemne negative	b. ujemne negative	b. ujemne negative
Przypadek 3 Case 3	b. ujemne negative	b. ujemne negative	b. ujemne negative	1,94	b. ujemne negative
Przypadek 4 Case 4	b. ujemne negative	b. ujemne negative	2,25	b. ujemne negative	b. ujemne negative

Wykonana metodą LC - MS weryfikacja uzyskanych rezultatów analizy pozwoliła na potwierdzenie obecności wykrytych metodą FPIA substancji, dokonanie pełnej ich identyfikacji i ujawnienia obecności dodatkowych ksenobiotyków.

W pierwszym przypadku w którym badanie metodą FPIA próbki krwi wykazało obecność opiatów i pochodnych kwasu barbiturowego, dalsza analiza przy użyciu LC - MS pozwoliła na wykazanie w badanym materiale obecności morfiny i kodeiny - głównych składników domowych wyciągów ze słomy makowej.

W drugim przypadku uzyskany metodą FPIA rezultat wskazał na obecność kokainy. Metodą LC - MS potwierdzono obecność tej substancji nie wykazano

natomiast obecności promazyny i metadonu - leków, które miał zażyć sprawca wypadku.

We krwi trzeciej osoby metodą FPIA stwierdzono obecność pochodnych benzodiazepiny. Metodą LC - MS zidentyfikowano diazepam i ujawniono obecność tramalu.

U osoby podejrzanej o gwałt metodą FPIA wykryto obecność pochodnych amfetaminy. Zastosowanie metody LC - MS pozwoliło zidentyfikować metylenodiosymetamfetaminę MDMA tzw. „ekstazy”.

Uzyskane wyniki badań metodą LC - MS w postaci czasów retencji stwierdzonych substancji i wielkości jonu molekularnego w widmie masowym zestawiono z odpowiednimi substancjami wzorcowymi przedstawiono w tabeli II.

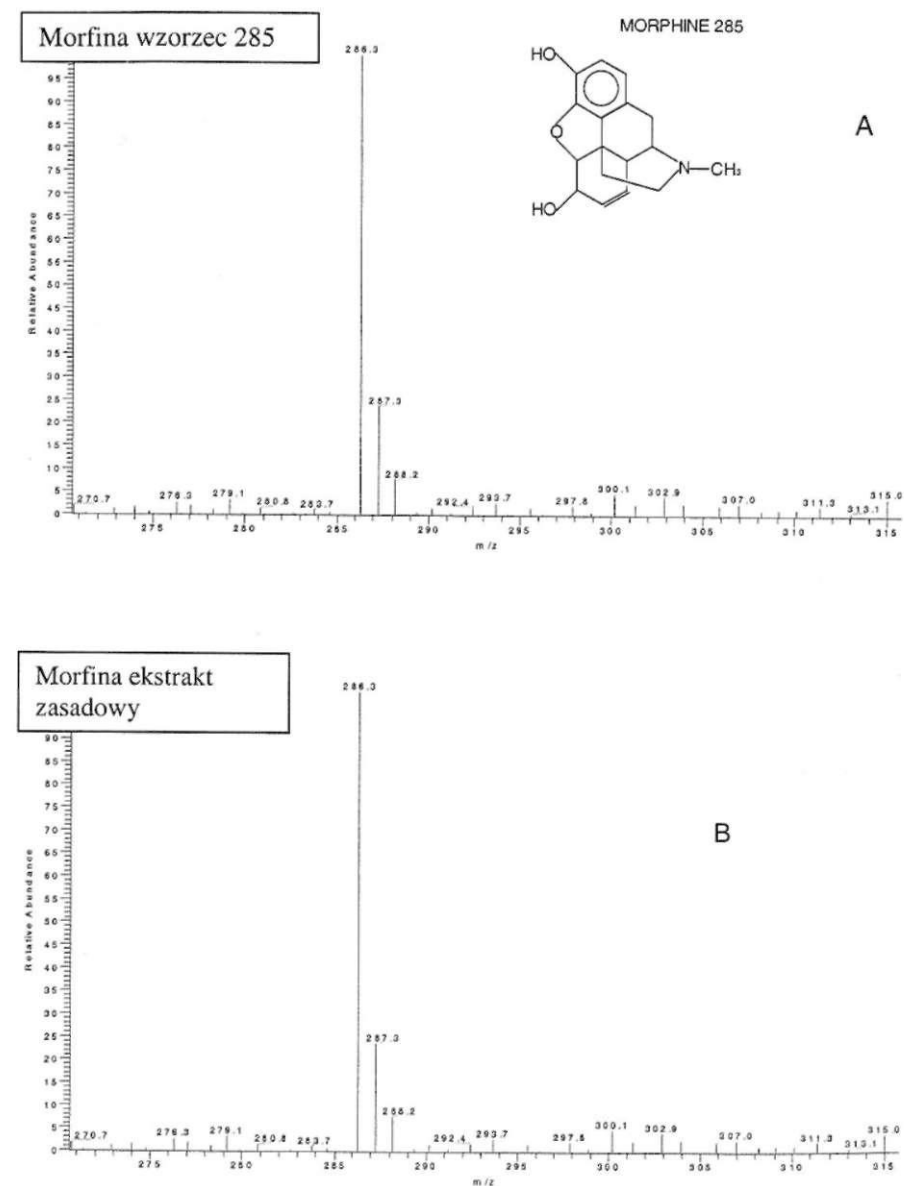
Tabela II. Wyniki badań próbek krwi met LC - MS.

Table II. Results of blood samples examination by LC-MS method.

I.p. przypadku Case number	Wykazane substancje Identified substances	Czas retencji (min) Retention time Wzorzec Standard	Czas retencji (min) Retention time Substancja badana Examined substance	Pik molekularny wzorca Standard molecular peak	Badany pik molekularny Examined molecular peak
1	Morfina Morphine Kodeina Codeine	4,09	4,12	286,3	286,3
		8,55	8,70	300,4	300,4
2	Kokaina Cocaine	19,05	19,22	304,2	304,2
3	Tramal tramadol Diazepam Diazepam	17,42	17,34	264,2	264,1
		23,50	23,54	285,3	285,3
4	MDMA	13,31	13,05	194,1	194,1

Widma masowe wykrytych substancji zestawione z widmami substancji wzorcowych ilustrują ryciny 1-6.

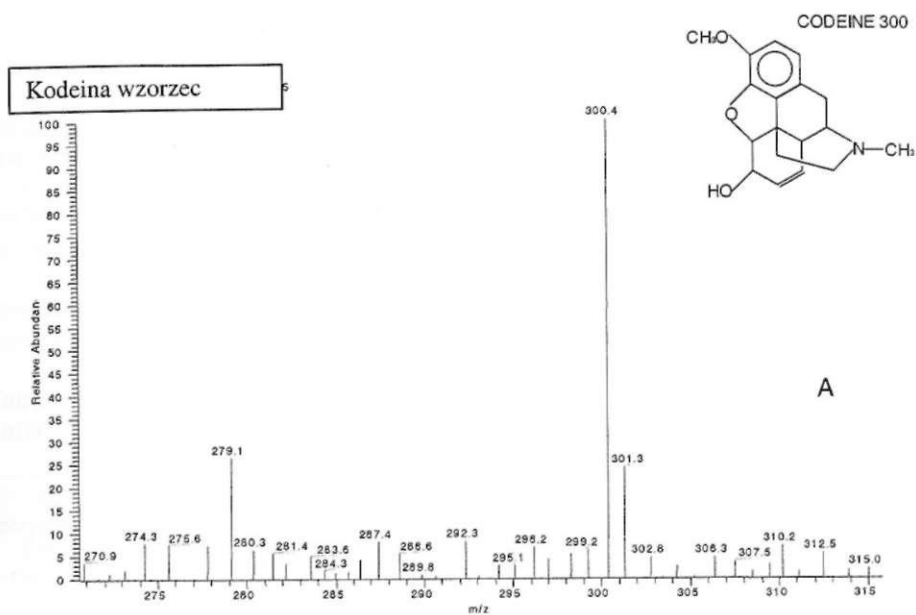
Przedstawione wyniki badań opracowanych w 2001 r. w Katedrze Medycyny Sądowej Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach przypadków dotyczące osób, które złamały prawo wskazują, że użyta metoda FPIA jest metodą z wyboru. Charakteryzuje się ona wysoką czułością i znaczną wybiórczością co określa jej przydatność w badaniach małych próbek krwi pobranych od osób, które przyjęły niewielkie ilości zakazanych środków. Mała ilość czasem poniżej dwóch mililitrów nadesłanego do badań materiału (badane próbki krwi najczęściej to pozostałość po wykonanej analizie na zawartość alkoholu w policji) nie stanowi tu ograniczenia.



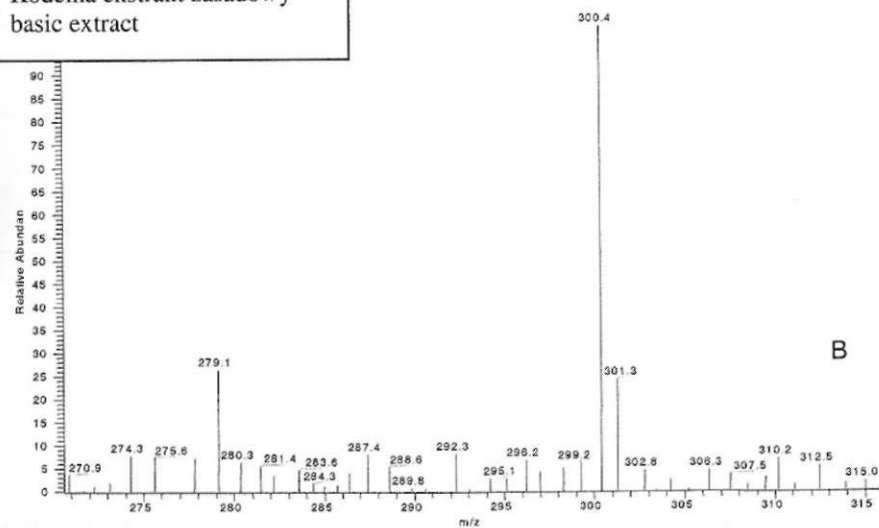
Ryc. 1.

A. Morfina wzorcowa / Morphine standard

B. Morfina we krwi kierowcy (przypadek 1) / Morphine in the driver's blood sample (case 1)



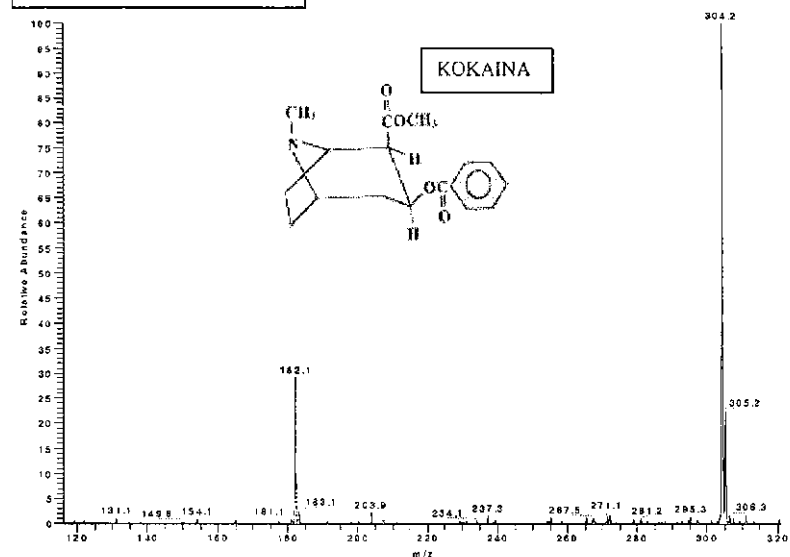
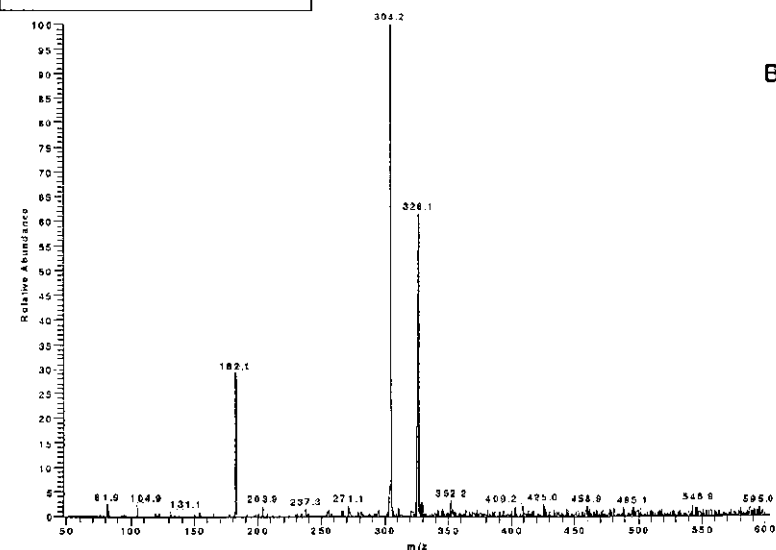
Kodeina ekstrakt zasadowy
basic extract



Ryc. 2.

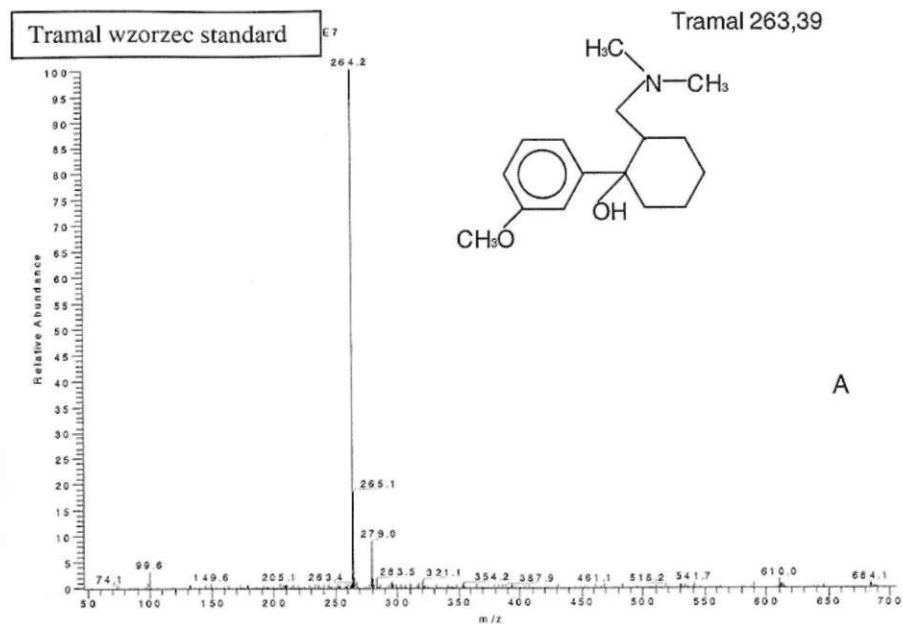
- A. Kodeina wzorcowa / Codeine standard
B. Kodeina we krwi kierowcy (przypadek 1) / Codeine in the driver's blood sample (case 1)

Kokaina 303.4

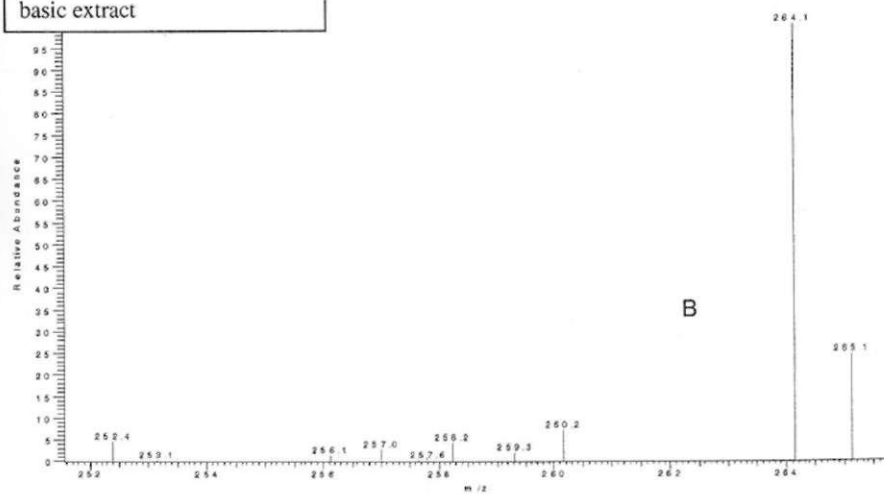
Kokaina ekstrakt zasadowy
krwi
basic extract of blood

Ryc. 3.

- A. Kokaina wzorcowa / Cocaine standard
B. Kokaina we krwi kierowcy (przypadek 2) / Cocaine in the driver's blood sample (case 2)

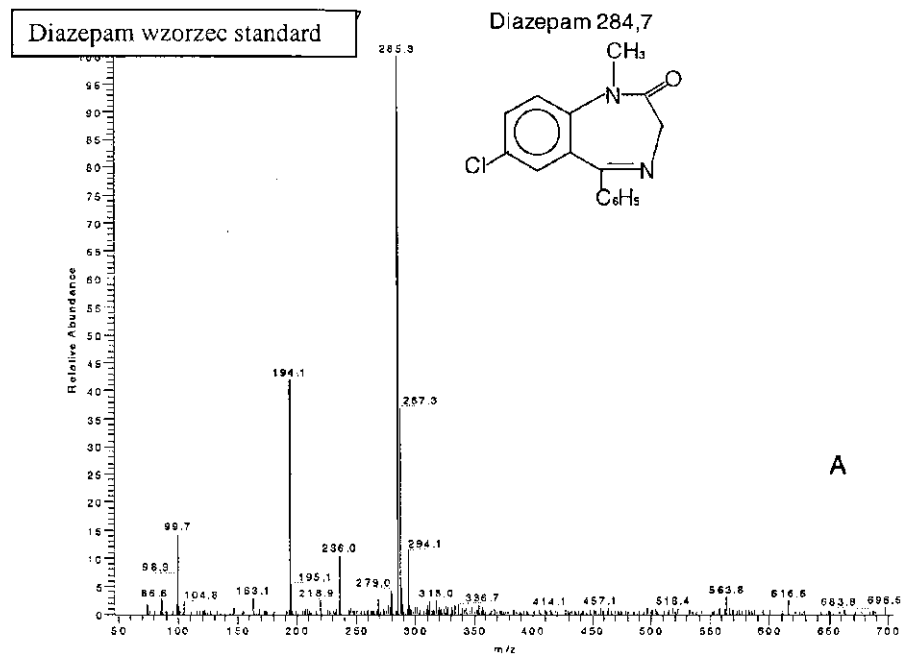


Tramal ekstrakt zasadowy
basic extract

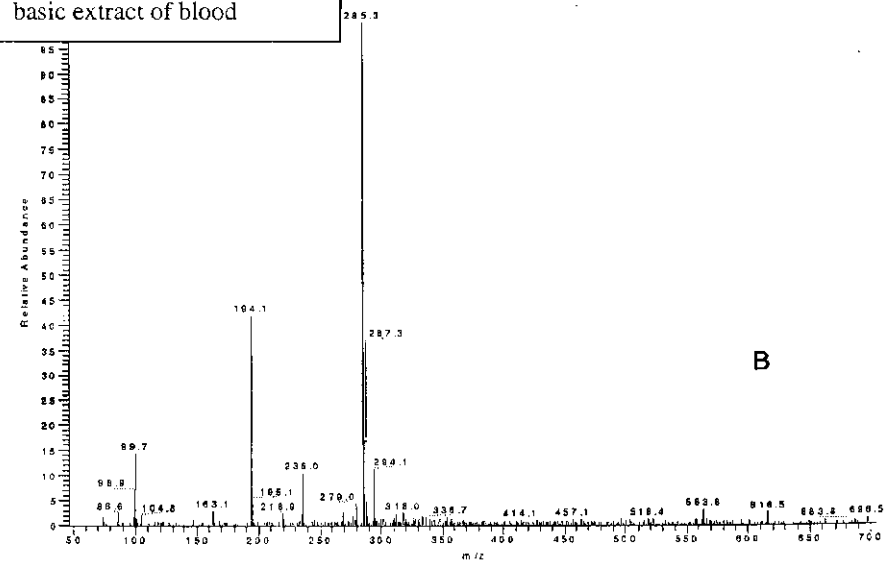


Ryc. 4

A. Tramal wzorcowy / Tramadol standard
B. Tramal we krwi kierowcy (przypadek 3) / Tramadol in the driver's blood sample (case 3)

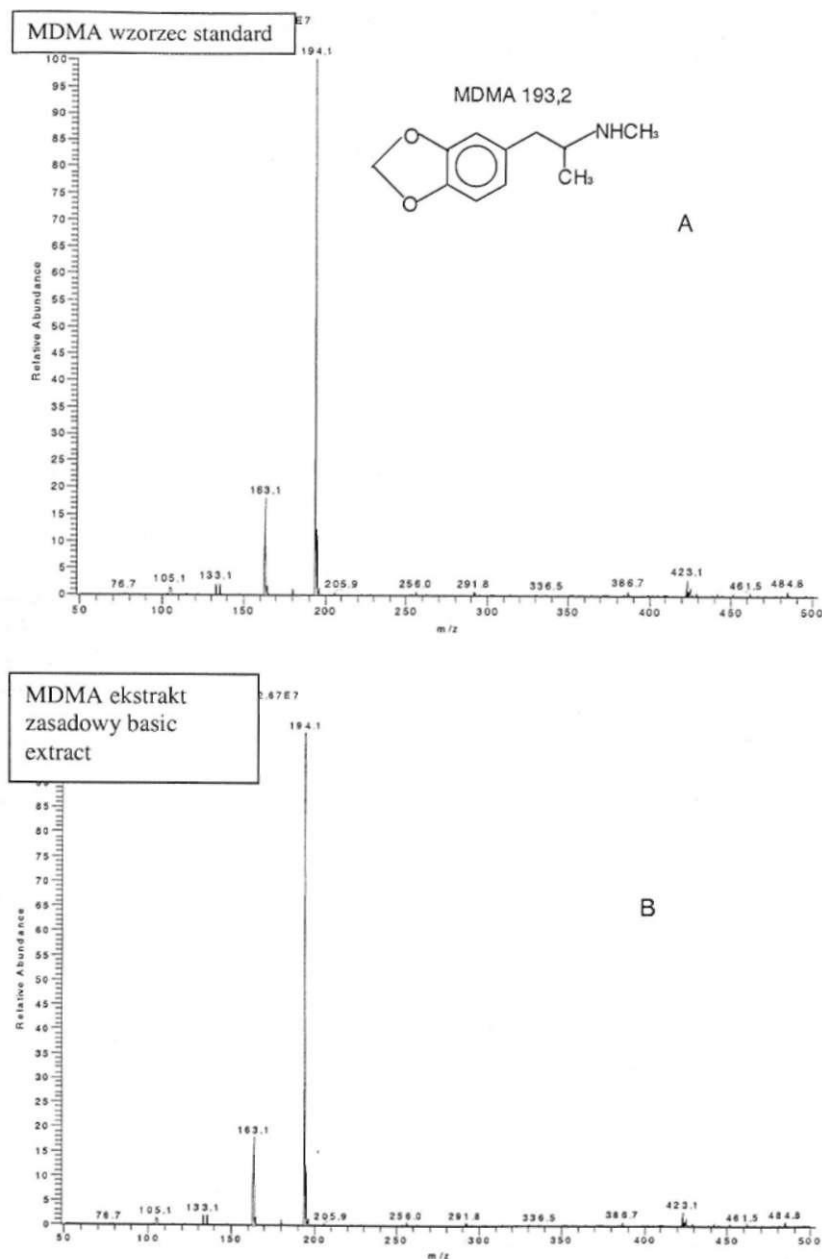


Diazepam ekstrakt zasadowy krwi
basic extract of blood



Ryc. 5.

A. Diazepam wzorcowy / Diazepam standard
B. Diazepam we krwi kierowcy (przypadek 3) / Diazepam in the driver's blood sample (case 3)



Ryc. 6.

- A. Metylenodioxymetamfetamina wzorcowa / MDMA standard
 B. Metylenodioxymetamfetamina we krwi sprawcy gwałtu (przypadek 4) / MDMA in the rapists blood sample (case 4)

Jak na to wskazują przedstawione wyniki badań odznaczające się wysoką czułością metody spektroimmunologiczne w tym FPIA w wersji firmy Abbot mają jednak ograniczone zastosowanie. Pozwalają one wprawdzie na wykrycie grupowe i oznaczenie ilościowe stwierdzonych substancji - pełna identyfikacja tych substancji nie jest jednak możliwa. Dotyczy to pochodnych amfetaminy, opiatów, pochodnych benzodiazepiny, trójcyklicznych antydepresantów). Mogą być zatem użyte jako przesiewowe a uzyskane rezultaty winny być weryfikowane na innej drodze analitycznej najlepiej metodą LC - MS (wysoka czułość i specyficzność), która umożliwi pełną identyfikację przyjętej substancji i rozszerza diagnozę o środki które nie dają odpowiedzi w warunkach metody FPIA.

PIŚMIENNICTWO:

1. Abbott Laboratories, TDx FLx, 1992.
2. Bogusz M.J., Maier R-D., Erkens M., Driessen S.: Determination of morphine and its 3- and glucuronides, codeine, codeine glucuronide and 6-monoacetylmorphine in body fluids by liquid chromatography atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 703 (1997) 115- 127.
3. Bogusz M.J., Maier R-D., Kruger K-D., Kohls U.: Determination of common drugs of abuse in body fluids using one isolation procedure and liquid chromatography- atmospheric-pressure chemical-ionization mass spectrometry, *J. Anal. Toxicol.*, 1998, 22, 549-558.
4. Bogusz M.J., Maier R-D., Driessen S.: Morphine, morphine-3-glucuronide, morphine-6-glucuronide, and 6-monoacetylmorphine determined by means of atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry-liquid chromatography in body fluids of heroin victims, *J. Anal. Toxicol.*, 1997, 21, 347-355.
5. Borkowski T.: Metody wyosabniania trucizn organicznych z materiału biologicznego, *Arch. Med. Sąd. Krym.* 1968, 18, 95 - 100.
6. E. de Hoffmann, J. Charette, V.: Stroobant: Spektrometria mas, Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa, 1998.
7. R. A.W. Johnstone, M. E. Rose: Spektrometria mas, PWN, Warszawa 2001.
8. H. Sybirska, J.Szczepański, J. Kulikowska: Substancje odurzające we krwi uczestników ruchu drogowego - doświadczenia KMS Śl.A.M. w Katowicach, *Z Zagadnień Nauk Sądowych*, 1999, XXXIX, 65 - 76.
9. H.Sybirska, J.Kulikowska, J. Szczepański: Narkomania w praktyce opiniodawczej medycyny sądowej, *Arch. Med. Sąd. Krym.*, 2000, 50, supl. 1, 39 - 47.

Adres pierwszego autora:
 Katedra Medycyny Sądowej Śląskiej AM
 ul. Medyków 18
 40-752 Katowice