

stwa ojcostwa jak i częstości wystąpienia określonego profilu DNA oraz jako populacyjna próba kontrolna w badaniach klinicznych.

PIŚMIENNICTWO

1. Cakir A.H., Celebioglu A., Altunbas S.: STR data for the AmpFISTR SGM Plus from Marmara region of Turkey. *Forensic Sci. Int.*, 2002, 127, 240-242. - 2. Drobic K., Regent A., Budowle B.: STR data for the AmpFISTR SGM plus from Slovenia. *Forensic Sci. Int.*, 2001, 115, 107-109. -3. Lahiri D.K., Numberger Jr. J. I.: A rapid non enzymatic method for RFLP studies. *Nucleic Acids Res.*, 1991, 19, 5444. -4. Lewis P.O., Zaykin D.: Genetic Data Analysis: Computer program for the analysis of allelic data. Version 1.0, 1997, <http://chee.unm.edu/gda/> - 5. Steinlechner M., Berger B., Scheithauer R., Parson W.: Population genetics of ten STR loci AmpFISTR SGM plus in Austria. *Int. J. Legal Med.* 2001 ;114:288-290. - 6. Tereba A.: Tools for analysis of population statistics: Promega Corporation, Profiles DNA, 2, 1999, 14-164. - 7. Vanek D., Hradil R., Budowle B.: Czech population data on 10 short tandem repeat loci of SGM Plus system kit using DNA purified in FTA™ cards. *Forensic Sci. Int.*, 2001, 119, 107-108.

Adres pierwszego autora:
Katedra i Zakład Medycyny Sądowej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
ul. Sędziowska 18 a
91-304 Łódź

Ewa Pufal, Marzena Sykutera, Karol Śliwka

Oznaczanie bromochlorodifluorometanu (Halon 1211) w materiale biologicznym metodą chromatografii gazowej z detektorem masowym (GC/MS)"

Determination of bromochlorodifluoromethane (Halon 1211) in biological material by gas chromatography with mass detector

Z Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej AM w Bydgoszczy
Kierownik: prof. dr hab. K. Śliwka

W pracy przedstawiono metodę oznaczania bromochlorodifluorometanu (Halon 1211) w materiale biologicznym (krew, wycinki narządów wewnętrznych) metodą chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią masową (GC/MS). Po inkubacji prób w temperaturze 65°C, po 15 minutach pobierano 10 µl powietrza z nadroztworu, który analizowano z wykorzystaniem kolumny kapilarnej DB-5ms (30m x 0,25mm x 0,25µm). Analizę ilościową wykonano w opcji monitorowania pojedynczych jonów (SIM) - m/z 85 i m/z 87. Opracowaną metodę wykorzystano w celu oznaczenia stężenia bromochlorodifluorometanu w materiale biologicznym pobranym ze zwłok mężczyzny, którego zgon nastąpił wskutek odurzenia się zawartością gaśnicy halonowej.

A gas chromatographic method with mass spectrometry has been developed for the determination of bromochlorodifluoromethane (Halon 1211) in biological material (whole blood, organ samples). After incubation of the sample (temp. 65°C, 15 min), 10 µl of the headspace is analysed using a capillary column DB-5ms (30m x 0,25mm x 0,25µm). Quantitative analysis was made with the use of a single ion monitoring option - m/z 85 and m/z 87. This developed method was used to determine the concentration of bromochlorodifluoromethane in biological material collected from the body of the man whose death was due to intoxication of halon 1211 - fire-extinguisher contents.

Słowa kluczowe: bromochlorodifluorometan, halon 1211, chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią masową, materiał biologiczny

Key words: bromochlorodifluoromethan, halon 1211, gas chromatography with mass spectrometry, biological material

WSTĘP

W środowiskach młodzieżowych notowane są coraz częstsze przypadki zażywania narkotyków. Jednakże brak pieniędzy na zakup narkotyków powoduje, że młodzi ludzie szukają środków zastępczych. Szczególnym obiektem zainteresowania stają się ogólnie dostępne i tanie środki inhalacyjne takie jak rozpuszczalniki organiczne (toluen, ksylen, benzen, aceton) oraz inne substancje lotne (3, 4). Również halon 1211 (bromochlorodifluorometan, R12V1, R12B1, Freon 12V1, BCF) bezbarwny, bezwonny, niepalny, mało toksyczny gaz, aktywny składnik gaśnic halonowych jest stosowany w celu odurzania się (1, 2, 7, 8). W literaturze opisano kilka przypadków zgonów wskutek odurzania się zawartością gaśnic halonowych (1, 5, 8).

Z danych literaturowych wynika, że najczęściej stosowaną metodą oznaczania lotnych substancji organicznych w tym między innymi halonu 1211 w płynach biologicznych oraz tkankach jest chromatografia gazowa z wykorzystaniem detektora ECD-FID (6, 8) oraz detektora masowego (7). Analizy przeprowadzono z użyciem kolumny pakowanej wypełnionej 0,3% Carbowaxem na Carbopacu (6), kolumny kapilarnej SPB-1 (8) bądź kolumny kapilarnej typu OV-101 (7).

W dostępnej literaturze nie znaleziono publikacji w której do oznaczenia halonu 1211 wykorzystano by kolumnę kapilarną DB-5ms. Dlatego też celem niniejszej pracy było badanie przydatności chromatografii gazowej z detektorem masowym z użyciem kolumny kapilarnej DB-5ms do identyfikacji i oznaczania halonu 1211 w materiale biologicznym pobranym ze zwłok.

Opracowaną metodę wykorzystano w celu oznaczenia stężenia halonu 1211 w materiale biologicznym pobranym w czasie sekcji zwłok mężczyzny, który odurzał się zawartością gaśnicy halonowej. W trakcie odurzania się zawartością gaśnicy mężczyzna zasnął i pomimo podjętej akcji reanimacyjnej zmarł.

MATERIAŁ I METODA

1. Przygotowanie standardu wewnętrznego

Jako standardu wewnętrznego (IS) użyto 1,1,1-trichloroetanu firmy Sigma-Aldrich. Standard wewnętrzny sporządzono przez rozpuszczenie 100 μ l 1,1,1-trichloroetanu w 100 ml etanolu 99,8% (Merck). Standard przechowywano w szklanej butelce w temp. - 10 °C.

2. Sporządzenie krzywej kalibracyjnej

Przygotowano roztwory wzorcowe halonu 1211 (Sigma-Aldrich) we krwi oraz w wycinkach nerki o stężeniach 0,5 mg/L, 1 mg/L, 2 mg/L, 5 mg/L, 10 mg/L, 20 mg/L. W fiolkach z korkiem silikonowym umieszczono po 5 ml (5 g) poszczególnych roztworów wzorcowych i dodano po 100 μ l standardu wewnętrznego, a następnie ogrzewano w bloku grzewczym (Techne DB A2) w temp. 65°C. Po

15 min. pobierano po 10 μ l powietrza z nad roztworu i nastrzykiwano na kolumnę chromatograficzną.

3. Przygotowanie próbek materiału biologicznego pobranego ze zwłok

Do fiolek o poj. 10 ml dodano po 100 μ l standardu wewnętrznego oraz odpowiednio 5 ml (5 g) materiału biologicznego (krew, wycinki nerki, wątroby, mózgu, płuca, treść żołądka) pobranego ze zwłok mężczyzny, którego zgon nastąpił wskutek odurzania się zawartością gaśnicy halonowej. Fiolki zamknięto silikonowym korkiem i ogrzewano w bloku grzewczym (Techne DB A2) w temperaturze 65°C, po 15 minutach pobierano 10 μ l powietrza z nad roztworu i nastrzykiwano na kolumnę chromatograficzną.

4. Warunki analizy halonu 1211 metodą chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrem masowym

Analizę przeprowadzono z wykorzystaniem chromatografu gazowego Auto-System XL, sprzężonego z detektorem masowym TurboMass firmy Perkin-Elmer oraz z wykorzystaniem biblioteki widm masowych Willey'a i NIST. Chromatograf wyposażony był w system elektronicznej kontroli przepływu gazu nośnego (hel 5,5), komorę nastrzykową (injector) typu split - splitless. Analizę chromatograficzną przeprowadzono na kolumnie DB-5 ms (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m). Rozdziału chromatograficznego dokonano w warunkach: temperatura injector: 150°C, temperatura linii transferowej: 175°C, temperatura detektora: 175°C, program temperaturowy pieca chromatografu: temperatura początkowa 35°C utrzymana przez 1,75 min, następnie wzrost z szybkością 20°C/min do 150°C utrzymano przez 5 min, przepływ gazu nośnego: liniowy 35 cm/s. Analizę przeprowadzono w zakresie mas m/z 35-250. Analizę ilościową wykonano w opcji monitorowania wybranych jonów (SIM) - m/z 85, 87 (dla halonu 1211) oraz m/z 95, 97 (dla IS).

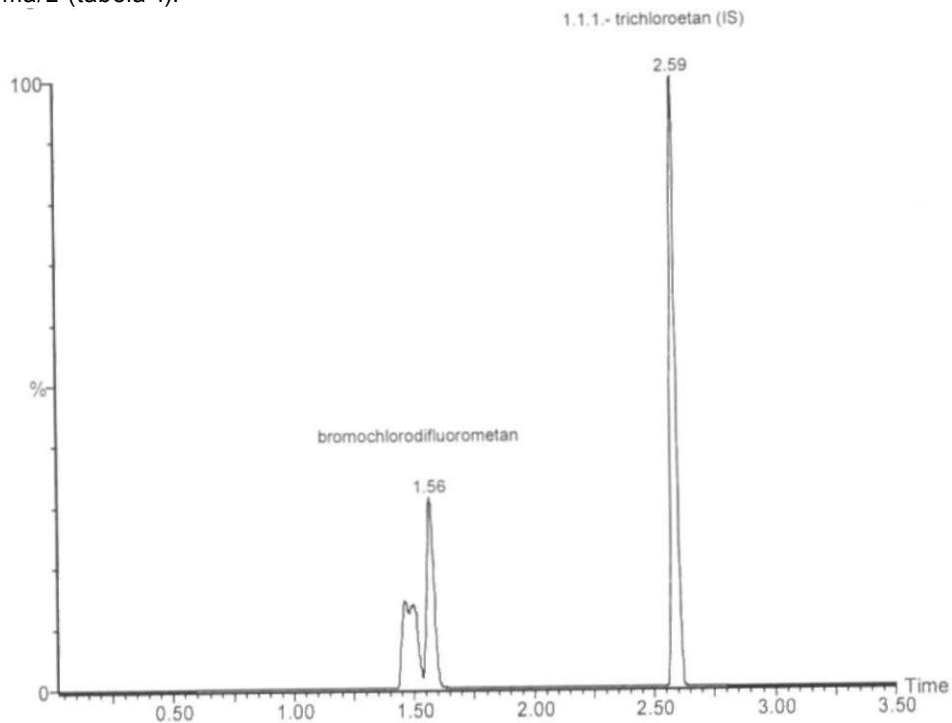
WYNIKI

Na rycinie 1 przedstawiono chromatogram otrzymany w wyniku analizy (w pełnym zakresie wartości m/z 35-250) próby krwi zawierającej halon 1211. Czas retencji dla halonu 1211 wynosił 1,56 min a dla IS 2,59 min. Widmo masowe halotanu 1211 przedstawia rycina 2.

W ramach opracowania metody przeprowadzono proces walidacji oznaczania bromochlorodifluorometanu w materiale biologicznym uwzględniając takie parametry jak: zakres liniowości, granica oznaczalności i precyzja.

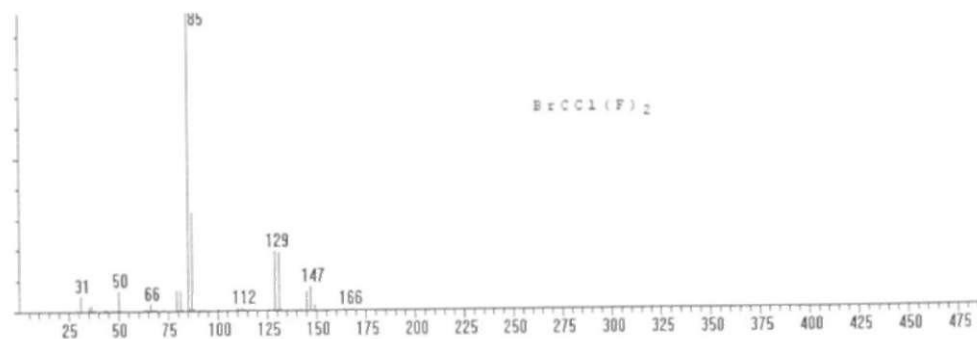
Wykresy kalibracyjne wykonano dla prób krwi i wycinków nerki wzbogaconych halonem 1211 w stężeniach 0,5 mg/L, 1,0 mg/L, 2,0 mg/L, 5 mg/L, 10 mg/L, 20 mg/L oraz standardem wewnętrznym. Uzyskano zadowalającą liniowość w wymienionym zakresie stężeń: współczynnik korelacji (r) dla krwi 0,993, dla

wycinków nerki 0,992. Powyższy zakres stężeń stanowi również zakres liniowości metody. Granica oznaczalności (LOQ) została obliczona w oparciu o stosunek sygnału do szumu ($S/N=3$). Jako LOQ dla halonu 1211 przyjęto 0,5 mg/L. Granica wykrywalności (LOD) wyznaczono jako połowę LOQ czyli 0,25 ma/L (tabela I).



Ryc. 1. Przykładowy chromatogram próby krwi

Fig. 1. Mass chromatogram of blood sample.



Ryc. 2. Widmo masowe halonu 1211.

Fig. 2. Mass spectrum of halon 1211.

Tabela I. Parametry walidacyjne oznaczania bromochlorodifluorometanu we krwi oraz wycinkach nerki.

Table I. Validation parameters of determination bromochlorodifluoromethane in blood and kidney sample.

Materiał Material	LOQ (mg/L)	LOD (mg/L)	Zakres liniowości Limit of linearity (mg/L)	Współczynnik korelacji (r) Correlation coefficient
Krew Blood	0,5	0,25	0,5-20,0	0,993
Nerka Kidney	0,5	0,25	0,5-20,0	0,992

Precyzję międzygrupową, wyrażoną jako względne odchylenie standardowe, wyznaczono poprzez czterokrotną analizę prób krwi i wycinków nerki wzbogaconych bromochlorodifluorometanem w stężeniu 2 mg/L powtarzaną co dwa dni.

Tabela II. Precyzja międzygrupową.

Table II. Interday precision.

Materiał Material	Stężenie dodane Concentration added (mg/L)	Stężenie obliczone Concentration found (mg/L)	Precyzja międzygrupową Interday precision RSD (%)
Krew Blood	2	1,97	2,9
Nerka Kidney	2	1,96	3,4

Precyzję wewnątrzgrupową, wyrażoną jako względne odchylenie standardowe, wyznaczono przez czterokrotną analizę prób przeprowadzoną tego samego dnia.

Tabela III. Precyzja wewnątrzgrupową.

Table III. Intraday precision.

Materiał material	Stężenie dodane Concentration added (mg/L)	Stężenie obliczone Concentration found (mg/L)	Precyzja wewnątrzgrupową Intraday precision RSD (%)
Krew Blood	2,0	1,96	3,2
Nerka Kidney	2,0	1,95	4,3

Międzygrupową precyzją oznaczania halonu 1211 we krwi i wycinkach nerki wynosi odpowiednio 2,9% i 3,4% natomiast precyzja wewnątrzgrupową wynosi 3,2% dla krwi i 4,3% dla wycinków nerki.

Tabela IV. Stężenie halonu 1211 w materiale sekcyjnym.
Table IV. Halon 1211 concentrations in autopsy material.

Materiał badany Material examined	Stężenie halonu 1211 Concentration of halon 1211
Krew Blood	1,7 mg/L
Wątroba Liver	10,8 mg/L
Nerka Kidney	3,6 mg/L
Płuco Lung	Nie stwierdzono Not detected
Treść żołądka Stomach contents	8,1 mg/L

W tabeli IV przedstawiono wyniki analizy materiału biologicznego, pobranego ze zwłok mężczyzny, który odurzał się halonem wykorzystując gaśnicę halonową. Wyniki przeprowadzonej analizy wykazały obecność halonu 1211 we wszystkich badanych próbach z wyjątkiem wycinków płuc. Być może brak obecności halonu w płucach mógł być spowodowany faktem długotrwałej reanimacji.

DYSKUSJA

Analiza lotnych związków organicznych w materiale biologicznym z uwagi na właściwości fizykochemiczne tych związków napotyka wiele problemów analitycznych w toksykologii klinicznej i sądowej.

Poszukiwanie obecności środków używanych do inhalacji w tym halonu 1211 jest szczególnie ważne w sytuacjach, gdy materiał badawczy został pobrany ze zwłok w przypadkach osób ze środowiska podejrzanego o używanie narkotyków zmarłych śmiercią nagłą w nietypowych okolicznościach.

Jak wynika z danych literaturowych jako prostą i szybką metodę skryningową w analizie lotnych substancji organicznych w materiale biologicznym najczęściej stosowano chromatografię gazową z detektorem FID-ECD (6, 8). Ramsey i Flanagan (6) opracowali metodę analizy mieszaniny lotnych substancji organicznych w tym halonu 1211 we krwi z użyciem 2 m kolumny pakowanej 0,3% Carbowax 20M na Carbopack C. Wykorzystanie przez Streeta ze współ. (8) 60 m kolumny kapilarnej SPB-1 umożliwiło skrócenie czasu analizy i uzyskanie lepszych parametrów rozdzielania mieszaniny lotnych substancji toksycznych.

Izolacja lotnych związków z materiału badawczego w obu przypadkach została przeprowadzona poprzez ogrzewanie prób w temperaturze 65°C przez 15 minut (6) lub 30 minut (8).

Przedstawione przez Ramsey'a i Flanagan (6) oraz Streeta ze współ. (8) warunki analityczne były wykorzystywane do oznaczania halonu 1211 tylko w mieszaninach wzorcowych. Natomiast brak jest danych dotyczących

wykorzystania tych metod w przypadkach zgonów, których przyczyną mogło być zatrucie halonem 1211.

Smeeton i Clark (7) opisali przypadki zatrucia halonem 1211. Potwierdzenie zatrucia tym związkiem uzyskali przeprowadzając tylko analizę jakościową prób krwi z wykorzystaniem chromatografii gazowej z detektorem masowym z użyciem kolumny OV-101.

Z danych literaturowych nie wynika jakie w przypadku podanych metod analitycznych są granice oznaczalności, wykrywalności oraz zakres liniowości w odniesieniu do halonu 1211.

W niniejszej pracy izolację halonu 1211 z materiału biologicznego przeprowadzono podobnie jak Ramsey i Flanagan (6) ogrzewając próby badane w temp. 65°C przez 15 minut. Analizę halonu 1211 wykonano wykorzystując podobnie jak Smeeton i Clark (7) chromatografię gazową z detektorem masowym, jednakże do badań użyto często stosowaną w analizie skryningowej kolumnę chromatograficzną DB-5 ms. Identyfikacji pliku chromatograficznego halonu 1211 dokonano na podstawie porównania czasów retencji analitu i odpowiadającego mu wzorca. Dzięki prowadzeniu analizy mas, w trybie skanowania całkowitego zakresu mas, możliwe było dodatkowo porównanie otrzymanych widm masowych z widmami masowymi wcześniej analizowanego wzorca i z biblioteką widm masowych NISTa i Willey'a. Analizę ilościową halonu 1211 przeprowadzono monitorując charakterystyczne i intensywne jony m/z 85 i m/z 87 co umożliwiło analizę tego związku w zakresie stężeń 0,5-20 mg/L.

Wyniki przeprowadzonych badań dowodzą, że opracowana metoda umożliwia nie tylko potwierdzenie obecności halonu 1211 w materiale biologicznym lecz również jego ilościową analizę.

WNIOSKI

Przedstawiona w niniejszej pracy metoda analityczna z wykorzystaniem chromatografu gazowego z detektorem masowym może być wykorzystana w toksykologii sądowej do jakościowej i ilościowej analizy halonu 1211 w materiale biologicznym.

Wyniki analizy materiału biologicznego, pobranego ze zwłok mężczyzny, który odurzał się halonem 1211 wykazały obecność tego związku we wszystkich analizowanych próbach za wyjątkiem wycinków płuc w stężeniach 1,7-10,8 mg/L. Z uwagi na podjętą reanimację nie można wykluczyć, że stężenie tego związku w materiale biologicznym mogło być wyższe.

PIŚMIENNICTWO

1. Heath M.J.: Solvent abuse using bromochlorodifluoromethane from a fire Extinguisher. Med. Sci. Law., 1986, 26, 33-34.
2. Huttenheim S.H., Literaturstudie der Feuerlöschmittel Halon 1301 und 1211 sowie ihrer

Zersetzungsprodukte. Zbl. Hyg. 1989, 189, 193-204. -3. Madea B., Musshoff F., Homocidal poisoning with halotane. Int. J. Legal Med., 1999, 113, 47-49. -4. Naschelsky M.B., Dix J.D., Adelstein E.H., Homicide facilitated by inhalation of chloroform. J. Forensic Sci. 1995, 40, 134-138. -5. Pufal E., Sykutera M., Bloch-Bogusławska E., Lis G., Śliwka K., Zgon w następstwie odurzenia się Halonem 1211. Arch. Med. Sąd. Krym. 2000, 50, 169-174. -6. Ramsey J.D., Flanagan R.J., Detection and identification of volatile organic compounds in blood by headspace gas chromatography as an aid to the diagnosis of solvent abuse. J. Chrom. 1982, 240, 423-444. -7. Smeeton W.M.I., Clark M.S., Sudden Death Resulting from Inhalation of Fire Extinguishers Containing Bromochlorodifluoromethane. Med.Sci.Law 1985, 25, 258-260. -8. Streete P.J., Ruprah M., Ramsey J.D., Flanagan R.J., Detection and Identification of Volatile Substances by Headspace Capillary Gas Chromatography to Aid the Diagnosis of Acute Poisoning. Analyst, 1992, 117, 1111-1127.

Adres pierwszego autora:

Katedra i Zakład Medycyny Sądowej AM
85-094 Bydgoszcz
ul. M. Curie-Skłodowskiej 9

Grzegorz Teresiński, Grzegorz Buszewicz, Roman Mądro

Pośmiertna dyfuzja tlenu węgla do mięśni i krwi - badania wstępne

Post mortem diffusion of carbon monoxide to muscles and blood - preliminary examinations

Z Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej AM w Lublinie
Kierownik: prof. dr hab. R. Mądro

Celem pracy było wyjaśnienie, czy pośmiertna dyfuzja tlenu węgla (CO) może w istotny sposób wpływać na wyniki oznaczeń poziomu hemoglobiny tlenkowej (COHb) oraz mioglobiny tlenkowej (COMb). Użyto preparatów skórno-mięśniowych i mięśniowych pobieranych ze zwłok dorosłych osób. Na preparaty te oddziaływało CO przez 24 godziny w temperaturze pokojowej. COHb i COMb oznaczono przy użyciu chromatografii gazowej. Stwierdzono, że skóra bardzo ogranicza dyfuzję CO, który przenikał w niewielkim stopniu jedynie do powierzchniowej warstwy pokrytego nią mięśnia, nie wpływając zaś na poziom COHb we krwi znajdującej się pod 4,5-centymetrową warstwą. Dyfuzja CO przez zwęglony powierzchnie i skoagulowany termicznie mięsień nie różniła się przy tym od tej, która obserwowano przez nienaruszone powłoki. Membrana ze skóry pozbawionej całkowicie podściółki tłuszczowej nie stanowiła natomiast bariery dla umiarkowanej dyfuzji do zlokalizowanej pod nią warstwy krwi. W przypadkach zwęglonych zwłok, wyniki oznaczeń COHb i COMb w materiale pobranych spod warstwy zwęglonych i skoagulowanych tkanek pozwalają zatem na ustalenie, czy ofiara żyła w momencie wybuchu pożaru.

The purpose of the study was to determine whether the postmortem diffusion of carbon monoxide (CO) significantly affected the results of carboxyhemoglobin (COHb) and carboxymyoglobin (COMb) determinations. The musculocutaneous and muscular specimens collected from adult cadavers were used. The specimens were treated with CO for 24h at room temperature. COHb and COMb were determined using gas chromatography. It was demonstrated that the skin substantially limited the diffusion of CO which slightly penetrated only the superficial layers of the muscle and did not change the blood level of COHb in the 4.5-cm layer of the muscle located underneath. The CO diffusion through the superficially charred and thermally coagulated muscle did not differ from that observed in the intact integuments. On the other hand, the membrane of the skin completely deprived of the adipose layer was not the barrier to moderate diffusion into the blood layer situated below. Thus, in charred corpses the results of COHb and COMb determinations in the material collected under the layer of charred and coagulated tissues enable us to determine whether the victim was alive at the moment of fire outbreak.