

Određivanje kratkotrajne stabilnosti koncentracije etanola u uzorcima krvi

Katinac, Fani

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:665165>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-26**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split](#)



SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

I

MEDICINSKI FAKULTET

Fani Katinac

**ODREĐIVANJE KRATKOTRAJNE STABILNOSTI KONCENTRACIJE ETANOLA U
UZORCIMA KRVI**

Diplomski rad

Akademska godina: 2016./2017.

Mentor:

Prof. dr. sc. Davorka Sutlović

Su-mentor:

dr. sc. Maja Veršić Bratinčević, dipl. ing.

U Splitu, listopad 2017.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

I

MEDICINSKI FAKULTET

Fani Katinac

**ODREĐIVANJE KRATKOTRAJNE STABILNOSTI KONCENTRACIJE ETANOLA U
UZORCIMA KRVI**

Diplomski rad

Akademska godina: 2016./2017.

Mentor:

Prof. dr. sc. Davorka Sutlović

Su-mentor:

dr. sc. Maja Veršić Bratinčević, dipl. ing.

U Splitu, listopad 2017.

Zahvaljujem se svojoj mentorici prof. dr. sc. Davorki Sutlović na stručnom vođenju i pomoći pri izradi ovog rada.

Zahvaljujem se svojoj su-mentorici dr. sc. Maji Veršić Bratinčević što me strpljivo svojim savjetima i velikodušnom pomoći vodila tijekom izrade diplomskog rada.

Hvala svim prijateljima što su mi smijehom i optimizmom uljepšali dane studiranja.

Najviše hvala mojoj obitelji koja je uvijek tu za mene. Bez vas ne bih danas bila ono što jesam...

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Kemijsko-tehnološki fakultet i Medicinski fakultet
Integrirani preddiplomski i diplomski studij FARMACIJA
Sveučilište u Splitu, Republika Hrvatska

Znanstveno područje: Biomedicinske znanosti
Znanstveno polje: Farmacija
Nastavni predmet: Farmaceutska toksikologija
Tema rada je prihvaćena na sjednici Vijeća studija Farmacija te potvrđena na sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta i sjednici fakultetskog vijeća Medicinskog fakulteta
Mentor: prof. dr. sc. Davorka Sutlović i dr. sc. Maja Veršić Bratinčević

ODREĐIVANJE KRATKOTRAJNE STABILNOSTI KONCENTRACIJE ETANOLA U UZORCIMA KRVI

Fani Katinac, broj indeksa: 63

Sažetak:

Ciljevi istraživanja: Ispitati kratkotrajnu stabilnost etanola u poslijesmrtim uzorcima krvi, pohranjenim na -20°C , korištenjem GC/FID metode u vremenskom razdoblju od 6 mjeseci, usporediti dobivene rezultate u pohranjenim poslijesmrtim uzorcima krvi sa i bez dodanog antikoagulansa te usporediti dobivene rezultate i procijeniti stabilnost poslijesmrtih uzoraka krvi pohranjenih u spremnicima različitih volumena.

Ustroj istraživanja: eksperimentalna studija

Mjesto istraživanja: Kemijsko-toksikološki laboratorij Kliničkog odjela za sudsku medicinu Zavoda za patologiju, sudsku medicinu i citologiju, Kliničkog bolničkog centra u Splitu.

Materijali i metode: Za vrijeme obdukcije izuzeti su poslijesmrti uzorci krvi, negativni na prisustvo etanola. U dio ispitivanih uzoraka za analizu dodan je 2% antikoagulans- NaF (V_2), dok je drugi dio uzoraka (V_1) uzorka pohranjena i analiziran bez dodatka antikoagulansa. Tako podijeljeni uzorci alikvotirani su u spremnike manjeg ($A1$ i $BA1$) i većeg volumena ($A2$ i $BA2$), te pohranjeni na -20°C do analize. U uzorke pohranjene u spremnike manjeg volumena (1 mL) dodane su različite vrijednosti etanola: 0,5, 1, 1,5 i 2,5 g/kg, dok je u uzorke pohranjene u spremnike većeg volumena, ispunjene do vrha (15 mL), dodan etanol masene koncentracije 1 g/kg. Nakon analize standardnih otopina etanola i izrade umjerne krivulje, pripremljeni su uzorci za kvantitativno određivanje masene koncentracije alkohola dodatkom 1 mL tercijarnog butanola, internog standarda, i 300 μL uzorka poslijesmrtne krvi u staklenu bočicu s magnetiziranim čepom. Stabilnost alkohola navedenih uzoraka krvi ispitivana je ponovljenom analizom istih uzoraka nakon pohrane tijekom šest mjeseci (30 tjedana), koristeći se GC/FID tehnikom. Ukupno je provedeno devet analiza, 0. dan, 1., 2., 4., 7., 11., 15., 21 i 30. tjedan.

Rezultati: GC/FID analizom uspješno je određena kratkotrajna stabilnost etanola poslijesmrtih uzoraka pohranjenih u spremnicima većeg volumena (15 mL) u kojima je uočena veća stabilnost i sljedivost, u odnosu na poslijesmrtne uzorke pohranjene u spremnicima manjeg volumena (1 mL). Utvrđeno je da ne postoji razlika u kratkotrajnoj stabilnosti etanola tijekom svih 6 mjeseci pohrane uzoraka poslijesmrtne krvi u koje je dodan antikoagulans (2% NaF), u odnosu na one bez dodanog antikoagulansa, neovisno o volumenu spremnika uzoraka. Sudeći prema našim rezultatima dobivenim iz uzoraka pohranjenih u manjim spremnicima, u kojima je načelno koncentracija etanola pokazala određenu nestabilnost, ipak su uzorci iz spremnika s dodanim antikoagulansom dali nešto bolje rezultate. Kod uzoraka pohranjenih u spremnicima većeg volumena, potvrđena je kratkotrajna stabilnost etanola, te značajniji utjecaj dodanog antikoagulansa na dobivene rezultate nije uočen.

Zaključak: Kvantitativnom analizom bioloških uzoraka poslijesmrtne krvi, koristeći GC/FID tehniku, uspješno je određena kratkotrajna stabilnost etanola. Uzorci pohranjeni u spremnicima većeg volumena (15 mL) dali su bolju sljedivost rezultata te se pokazali stabilnijima u odnosu na one pohranjene u spremnicima manjeg volumena (1 mL). Utjecaj antikoagulansa potvrđen je analizom uzoraka pohranjenih u spremnicima manjeg volumena, dok kod uzoraka pohranjenih u spremnicima većeg volumena nije uočen. Kako bi se izbjegao utjecaj ventilacije na stabilnost uzoraka te smanjio utjecaj postotka zraka (*engl.* chamber air, CA%), preporučeno je koristiti do vrha ispunjene epruvete većeg volumena (15 mL), napravljene od stakla ili plastike.

Glavne riječi: poslijesmrti uzorci krvi, etanol, kratkotrajna stabilnost, GC/FID

Rad sadrži: 70 stranica, 24 slike, 6 tablica, 42 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav povjerenstva za obranu:

- | | |
|---|---------------------------|
| 1. Izv. prof. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić | predsjednica Povjerenstva |
| 2. doc. dr. sc. Ivana Mudnić | član |
| 3. prof. dr. sc. Davorka Sutlović | član-mentor |

Datum obrane: (24.10.2017.)

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Rudera Boškovića 35 i Medicinskog fakulteta Split, Šoltanska 2.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

Faculty of Chemistry and Technology and School of Medicine
Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy
University of Split, Croatia

Scientific area: Biomedical sciences
Scientific field: Pharmacy
Course title: Pharmaceutical toxicology
Thesis subject: was approved by Council of Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy, as well as by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology and Faculty Council of School of Medicine.
Mentor: Davorka Sutlović, PhD, full prof. and Maja Veršić Bratinčević, PhD

DETERMINATION OF SHORT-TERM STABILITY OF ETHANOL IN BLOOD SAMPLES

Fani Katinac, index number: 63

Summary:

Objectives: Investigate the short-term stability of ethanol in post-mortem blood samples stored at -20°C using a GC / FID method over a 6-month period, to compare the results obtained with stored post-mortem blood samples with and without added anticoagulants and to compare the results obtained and evaluate the stability of post-mortem blood samples stored in containers of different volumes.

Design: Experimental study

Settings: Laboratory of toxicology, Department of pathology, medicine and cytology, University Hospital of Split

Materials and methods: Post-mortem blood samples were excluded during autopsy, negative to the presence of ethanol. 2% anticoagulant NaF was added to the one part of the test sample (V2), while the other part of the sample (V1) was stored and analyzed without the addition of anticoagulants. Divided samples were aliquoted into a smaller (A1 and BA1) and larger volumes (A2 and BA2), and stored at -20°C until next analysis. In the samples stored in smaller volumes (1 mL), different ethanol values were added: 0.5, 1, 1.5 and 2.5 g/kg, while to the samples stored in larger volumes, which were filled up to the top (15 mL), ethanol mass concentration of 1 g/kg was added. After analyzing standard ethanol solutions and making calibration curves, samples were prepared for quantitative determination of the mass concentration of alcohol by addition of internal standard- 1 mL tertiary butanol and 300 μL of post-mortem blood sample in to a glass container with a magnetized cap. The stability of the alcohol in the blood samples was tested by repeated analysis of the same samples after storage for six months (30 weeks), using GC/FID technique. In total, nine analyzes were conducted: day 0, week 1, 2, 4, 7, 11, 15, 21 and 30.

Results: GC/FID analysis was successfully used to determine the short-term stability of the ethanol in the post-mortem samples that were stored in larger volumes (15 mL), in which greater stability and traceability was observed, compared to a post-mortem samples stored in smaller volumes (1 mL). It was found that there was no difference in the short-term stability of ethanol during all 6 months of storage of post-mortem blood samples in which the anticoagulant (2% NaF) was added, compared to those without added anticoagulants, disregarding of the sample tank volume. Judging by our results obtained from samples stored in smaller containers, in which the ethanol concentration has generally shown a certain instability, however, the samples from the containers with the added anticoagulant gave some better results. The short-term stability of ethanol was verified in the samples stored in the larger volumes, and the significant influence of the added anticoagulant on the obtained results was not observed.

Conclusion: Short-term stability of ethanol was successfully determined by quantitative analysis of biological samples of post-mortem blood, using GC / FID technique. Samples stored in larger volumes (15 mL) gave better traceability of the results and proved to be more stable compared to those stored in smaller volumes (1 mL). The effect of anticoagulant was confirmed by the analysis of samples stored in smaller volumes, while it was not detected in samples stored in larger volumes. In order to avoid the effect of ventilation on the stability of the samples and to reduce the effect of the air intake ("chamber air", CA%), it is recommended to use containers (filled up to the top) with larger volumes (15 mL), made of glass or plastic.

Key words: post-mortem blood samples, ethanol, short-term stability, GC/FID

Thesis contains: 70 pages, 24 figures, 6 tables, 42 references

Original in: Croatian

Defence committee:

- | | |
|---|--------------|
| 1. Vedrana Čikeš Čulić – PhD, associate prof. | Chair person |
| 2. Ivana Mudnić – PhD, associate prof. | Member |
| 3. Davorka Sutlović - PhD- full prof. | Supervisor |

Defence date: (24.10.2017.)

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Rudera Boškovića 35 and Library of School of Medicine, Šoltanska 2.

Sadržaj:

1. UVOD	1
1.1. Alkohol (etanol)	3
1.1.1. Farmakokinetika sredstava ovisnosti	5
1.1.2. Stabilnost sredstava ovisnosti.....	7
1.1.3. Stabilnost etanola	8
1.2. Biološki uzorci	9
1.2.1. Krv.....	11
1.2.2. Postupanje s biološkim uzorcima: sakupljanje, označavanje, pohrana i transport.....	11
1.2.3. Pohrana bioloških uzoraka	13
1.2.4. Stabilnost bioloških uzoraka	14
1.2.5. Analiza bioloških uzoraka	15
1.3. Instrumentalna analiza bioloških uzoraka plinskom kromatografijom	15
1.3.1. Plinski kromatograf s plameno ionizacijskim detektorom, GC–FID	16
1.3.2. Plinska kromatografija – <<Headspace>> tehnika	17
2. CILJEVI	19
3. MATERIJALI I METODE	21
3.1. Kemikalije	22
3.2. Priprema standardne otopine etanola	22
3.3. Instrumenti	22
3.3.1. Plinski kromatograf s plameno ionizacijskim detektorom, GC/FID.....	23
3.4. Priprema uzoraka za kromatografsku analizu GC/FID	24
3.5. Biološki poslijesmrti uzorci krvi	24
4. REZULTATI	29
4.1. Umjerna krivulja etanola	30

4.2. Određivanje i usporedba kratkotrajne stabilnosti etanola u epruветama manjeg volumena s dodanim antikoagulansom (A1)	30
4.3. Određivanje i usporedba kratkotrajne stabilnosti etanola u epruветama manjeg volumena bez antikoagulansa (BA1)	33
4.4. Usporedba kratkotrajne stabilnosti jednake vrijednosti etanola, u epruветama većeg volumena s i bez dodanog antikoagulansa (A2 i BA2)	36
4.5. Usporedba dobivenih rezultata u uzorcima poslijesmrtne krvi, jednake vrijednosti etanola, pohranjenim u različitim volumenima	39
5. RASPRAVA	45
6. ZAKLJUČCI	48
7. POPIS CITIRANE LITERATURE	50
8. SAŽETAK	56
9. SUMMARY	59
10. ŽIVOTOPIS	62

1. UVOD

Etilni alkohol (etanol) zauzima važno mjesto u povijesti čovječanstva tijekom najmanje 8000 godina. U zapadnome društvu pivo i vino predstavljali su sastavni dio prehrane u svakodnevnom životu sve do 19. stoljeća. Ova relativno razblažena pića imala su prednost pred običnom vodom za koju se smatralo da je povezana s akutnim i kroničnim bolestima. Kako su sustavi za javnu higijenu i pročišćavanje vode uvedeni u 19. stoljeću, tako su pivo i vino postali manje važni sastojci ljudske prehrane i unosa tekućine. Danas se alkohol naširoko konzumira, a predstavlja i najčešće zloupotrebljavano sredstvo ovisnosti koje u svijetu uzrokuje velike zdravstvene i društvene troškove. [1]

Istraživanja u našoj sredini pokazala su da u Hrvatskoj ima 6% ovisnika o alkoholu, a oko 15% muškaraca starijih od 20 godina prekomjerno pije alkoholna pića, s tim da realno stanje premašuje navedene postotke. Smatra se da je alkoholizam žena daleko opasniji za stabilnost obitelji nego alkoholizam muškaraca. Broj žena alkoholičarki stalno je u porastu. U Hrvatskoj omjer broja muškaraca i žena posljednjih desetak godina iznosi oko 3,6:1. Izraženo u apsolutnim brojkama, u Hrvatskoj ima oko 250.000 ovisnika o alkoholu, a zbog ugroženosti cijele obitelji, osobito djece, broj ugroženih se bliži milijunu stanovnika. [2]

Etanol je najčešći uzrok prometnih nesreća, a vožnja pod utjecajem alkohola predstavlja ozbiljan društveni problem. [3] Iako se broj nesreća u Europskoj uniji od početka devedesetih godina prošlog stoljeća snizio, posljednjih se godina takav pad bitno usporio. Ugrožena dobna skupina, kojoj su prometne nesreće glavni uzrok smrtnosti, mladi su ljudi u rasponu od 14-25 godina. Procjenjuje se da će jedan od tri Europljanina u jednom trenutku života biti ozlijeđen u prometnoj nesreći, što će Europskoj uniji biti direktni trošak od 45 bilijuna eura. Indirektni troškovi, kao što su fizička i psihološka šteta pretrpljena od strane žrtava i njihovih obitelji, bili bi još 3-4 puta veći. [4]

Svaka, pa i najmanja količina alkohola u krvi utječe na vozačke sposobnosti vozača. Granica apsolutne nesposobnosti za sigurno upravljanje motornim vozilom je kod 1.30 g/kg apsolutnog alkohola u krvi, pa su vrijednosti iznad te granice u krvi vozačke sposobnosti bitno smanjene. Uočeno je da s porastom koncentracije apsolutnog alkohola u krvi raste i nesposobnost za sigurno upravljanje motornim vozilom.

Sudionici u prometu (vozači, pješaci ili osobe zatečene na mjestu događaja) podvrgavaju se testiranju na prisutnost alkohola, droga, drugih psihotropnih tvari i lijekova koji mogu utjecati na vozačke sposobnosti i ponašanje u prometu. Na temelju zakonskih, zdravstvenih i tehničkih osnova na mjestu događaja obavljaju se probirni (*engl.* screening) testovi, a kasnije i potvrdni (konfirmacijski) testovi u ovlaštenim i osposobljenim laboratorijima. Metode, oprema i način izvođenja testiranja ovise o odabiru te znanstvenoj i praktičnoj pouzdanosti vrste testa, o tehničkim uvjetima i zakonskoj osnovi. Prema trenutno važećim propisima u radu na terenu koriste se alkometri (etilometri) marke Dräger, modeli 7410 i 6510/6810, koji mjere koncentraciju apsolutnog alkohola u izdahnutom zraku (Slika 1). [5]



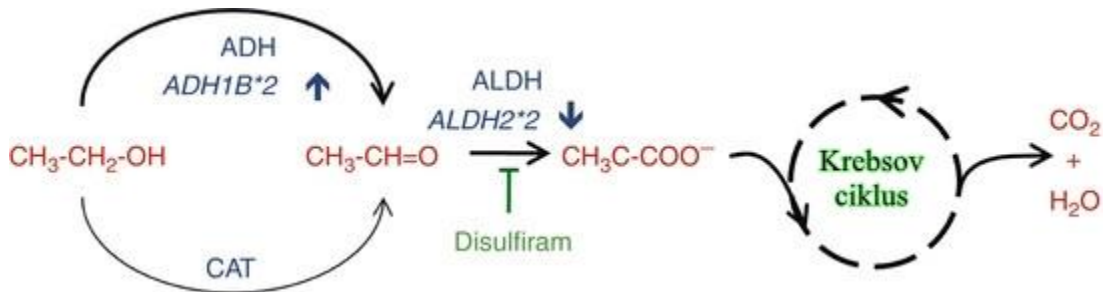
Slika 1. Alkotester Dräger 6810 s usnikom (lijevo) i alkotester Dräger 7410 (desno). [6]

U prometnim nesrećama mjerenje alkohola u krvi može biti odlučujući faktor prilikom utvrđivanja krivca za počinjenu nesreću. [7] Tijekom forenzične obrade veoma je čest zahtjev za ponovnom analizom uzoraka krvi plinskom kromatografijom, posebice u slučajevima kada je točnost rezultata izrađenih analiza upitna ili postoji nekakva sumnja u sami integritet uzoraka. To upućuje na važnost poznavanja kratkotrajne i dugotrajne stabilnosti koncentracije etanola u uzorcima krvi tijekom pohrane u hladnjaku. [8]

1.1. Alkohol (etanol)

Pod pojmom alkohol, kao sredstvo ovisnosti, podrazumijeva se etanol, C_2H_5OH . Etanol je mala hidrofilna molekula koja se, unesena oralnim putem, brzo apsorbira iz gastrointestinalnog trakta (20% putem želuca, dok se ostatak, 80%, apsorbira iz tankog crijeva). [1] Količina

alkohola u tijelu određuje se sadržajem alkohola u krvi (*engl.* BAC–blood alcohol concentration), a definira se kao težina etanola po jedinici volumena krvi. Metabolizam etanola, prikazan na slici 2, odvija se u dvije faze i to konverzijom u acetaldehid, uz alkohol dehidrogenazu (ADH), a potom uz aldehidnu dehidrogenazu (ALDH) u acetat iz kojeg prelazi u vodu i ugljičnog dioksida. [9]



Slika 2. Metabolizam etanola. [10]

Akutni učinci konzumacije etanola posljedica su vezivanja acetaldehida s proteinima, nukleinskim kiselinama i sličnim komponentama, a posljedica čega je smanjena učinkovitost navedenih spojeva. Dodatne akutne posljedice su hipoksija, nedostatak kisika u jetri i nastanak jako reaktivnih molekula koje sadrže kisik te mogu oštetiti ostale stanične komponente. Varijacije u brzini apsorpcije, distribucije i eliminacije alkohola ovise o genetičkim razlikama, spolu, vrsti konzumiranog pića, težini i ostalim, uglavnom individualnim, čimbenicima. Alkohol je anksiolitik i analgetik s depresivnim učinkom na središnji živčani sustav. U maloj dozi može djelovati kao stimulans, te kao relaksant. Ima teratogeno djelovanje uzrokujući „fetalni alkoholni sindrom“ s poremećajima u nervnom sustavu, a može dovesti i do smrtnog ishoda (Tablica 1). [5, 9]

Konzumacijom alkohola razvija se psihička, a kod većih količina, nerijetko i fizička ovisnost. Lijekovi koji su u mnogim zemljama odobreni kao pomoćna sredstva za liječenje ovisnosti o alkoholu su: disulfiram (blokator enzima acetaldehid dehidrogenaze), naltrekson (antagonist opioidnih receptora) i akamprosot (antagonist NMDA i GABA_A agonist). [1]

Tablica 1. Maseni udio alkohola u organizmu i pripadajući simptomi konzumacije alkohola. [9]

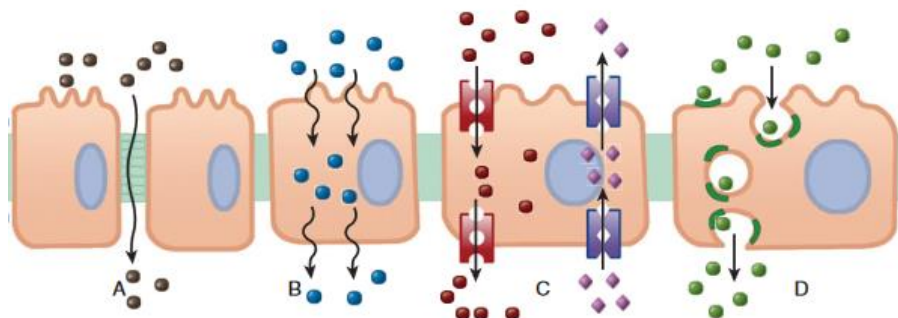
BAC (g/L)	BAC (% v/v)	SIMPTOMI
0,5	0,05	Euforija, opuštenost, razgovorljivost
1	0,1	Depresija središnjeg živčanog sustava, mučnina, moguće povraćanje, umanjene funkcije motorike i osjetila
>1,4	>0,14	Smanjen protok krvi u mozak
3	0,3	Ošamućenost, moguća nesvijest
4	0,4	Moguća smrt
>5,5	>0,55	Smrt

1.1.1. Farmakokinetika sredstava ovisnosti

Farmakokinetika proučava apsorpciju supstancije, odnosno lijekova i sredstava ovisnosti u krv, njihovu raspodjelu po tjelesnim tekućinama i tkivima, metabolizam i izlučivanje (uključujući i njihove potencijalne metabolite) što se zajedno opisuje skraćenicom – ARMI (*engl.* Absorption, Distribution, Metabolism and Excretion- ADME). [11] Svaka od navedenih faza podliježe fizikalno–kemijskim interakcijama između lijeka i organizma. Farmakokinetiku je moguće opisati i izračunati koristeći matematičke jednadžbe koje omogućuju predviđanje ponašanja lijeka, pri čemu je veliki naglasak na odnose između koncentracije lijeka u plazmi i vremenu koje je proteklo od primjene lijeka. [12]

Apsorpcija predstavlja prelazak toksične tvari s mjesta djelovanja u krvotok. Tri su glavna mjesta ulaska toksičnih tvari u organizam, preko kože, probavnog sustava i pluća. Koža je stalno izložena raznim spojevima, stoga potencijalno predstavlja važan put ulaska ksenobiotika u organizam. Ulazak preko pluća je nešto značajniji, s obzirom da se većina toksičnih tvari unese

oralno, a apsorpcija se odvija i duž cijelog probavnog sustava. Ipak, najznačajnija apsorpcija odvija se u tankom crijevu. Toksična tvar prolazi kroz staničnu membranu koja je polupropusni lipidni dvosloj izgrađen od proteina i fosfolipida. Nekoliko je načina prolaska toksične tvari kroz membranu (Slika 3).

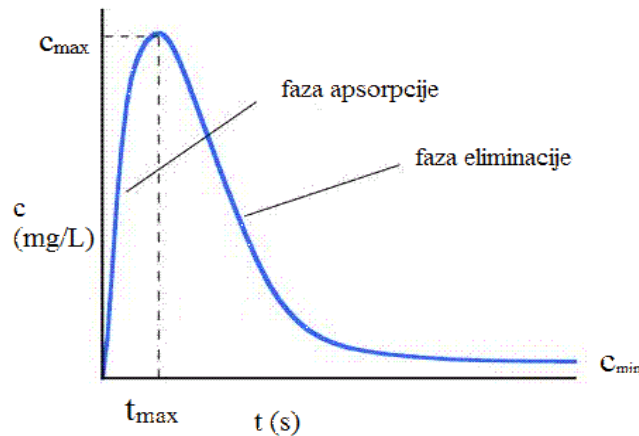


Slika 3. Mehanizmi prolaska lijekova kroz biološke membrane. *Lijekovi mogu pasivno difundirati kroz kanale za vodu koji se nalaze u spojevima među stanicama (npr. čvrsti spojevi, A), ili kroz lipidne membrane (B); mogu se transportirati s pomoću nosača u stanicu ili izvan nje (C), te se također vezati za receptore stanice (tamna vezajuća mjesta), te potom biti invaginirani u staničnu membranu (endocitoza). Nakon toga mogu biti otpušteni unutar stanice ili izbačeni, posredovanjem vezikula, u izanstanični prostor (egzocitoza, D).* [1]

Raspodjela predstavlja distribuciju ksenobiotika preko krvotoka do reaktivnih mjesta u organizmu i mjesta skladištenja. Jednostavnost kemijske distribucije u velikoj mjeri ovisi o topljivosti ksenobiotika u vodi. Poznavanje karakteristika raspodjele ksenobiotika je poželjno za pravilan odabir biološkog materijala za analizu. [13,9]

Biotransformacija je ireverzibilna transformacija toksične tvari biokemijskim reakcijama u metabolite. Postoje dvije faze metabolizma koje se najčešće odvijaju jedna iza druge. U fazi I odvijaju se strukturne promjene preko procesa oksidacije, redukcije i hidrolize, koje kataliziraju jetreni enzimi. Faza II prvenstveno uključuje reakcije konjugacije kojima se stvaraju spojevi veće molekulske mase koji su topljivi u vodi, prilikom čega se inaktiviraju. [5]

Izlučivanje ili **eliminacija** toksičnih tvari iz organizma izražava se vremenom poluraspada ($t_{1/2}$). Brzina vremena potrebnog da se izluči polovica spoja ovisi o njegovoj koncentraciji i metaboličkoj reakciji. Najznačajniji putevi eliminacije su preko bubrega mokraćom, te preko jetre putem žuči. [9]



Slika 4. Farmakokinetika lijeka u plazmi, odnos koncentracije i vremena. [14]

1.1.2. Stabilnost sredstava ovisnosti

Na stabilnost sredstava ovisnosti mogu utjecati brojni čimbenici uključujući fizikalno–kemijska svojstva, svojstva uzoraka i matice, procedure sakupljanja uzoraka, odabir spremnika za izuzimanje i pohranu uzoraka, upotreba antikoagulansa i slično.

U načelu, uzroci nestabilnosti sredstava ovisnosti u svakom uzorku za toksikološku analizu posljedica su metaboličke razgradnje, kemijske transformacije ili njihove kombinacije. Stabilnost sredstava ovisnosti u poslijesmrtim maticama uzoraka predstavlja dodatnu razinu složenosti. Uvjet je teže kontrolirati, moguća je ubrzana degradacija analita zbog procesa truljenja, povećanog prisustva bakterija i gljivica [15, 9].

Nestabilnost lijekova i sredstava ovisnosti uglavnom dovodi do smanjenja koncentracije u ispitivanim uzorcima. Međutim, neki konjugirani lijekovi (primjerice glukuronidi) pod određenim uvjetima, dekonjugacijom mogu povećati koncentracije lijekova ili sredstava ovisnosti.

Ovisno o uzorkovanju, uvjetima pohrane, korištenom antikoagulansu, vrsti spremnika, matici uzorka i drugim čimbenicima koncentracija lijeka u vremenu analize nije uvijek jednaka koncentraciji u vrijeme sakupljanja uzorka. U idealnim uvjetima, stabilnost sredstava ovisnosti trebala bi se vrednovati na više načina: ispitivanjem kratkotrajne i dugotrajne stabilnosti uzorka

ili matice uzorka, učinka ciklusa zamrzavanja i odleđivanja uzoraka te stabilnosti na sobnoj temperaturi. Poznavanje kinetičkih varijabli i utjecaja temperature na sredstva ne znači nužno sposobnost predviđanja konačnih rezultata analize [16, 9].

1.1.3. Stabilnost etanola

Jedna od glavnih briga u provođenju toksikoloških analiza alkohola jest njegova stabilnost u forenzičkim uzorcima. Koncentracija etanola može porasti tijekom vremena pohrane uzoraka ili biti podvrgnuta gubitcima zbog isparavanja, mikrobiološke razgradnje ili procesa oksidacije. Ovo je važno kada se provode ponavljajuće analize nakon pohrane uzoraka, kao na primjer, analize koje su dio osiguranja kontrole kvalitete ili analize zatražene od suda zbog utvrđivanja vjerodostojnosti inicijalnih rezultata. Prilikom predstavljanja rezultata na sudu, sposobnost davanja pouzdanih rezultata i tumačenja bilo kojih značajnih promjena ključna je u ustanovljavanju vjerodostojnosti podataka. Mnogi autori impliciraju važnost preanalitičkih faktora, te su studije pokazale da smanjenje koncentracije etanola u krvi tijekom pohrane ovisi o vremenu i temperaturi očuvanja (bez obzira jesu li konzervansi, kao što je NaF, dodani), vrsti i sigurnosti spremnika i čepova te postotku zraka u spremniku.

Obzirom da je etanol lako isparljiva supstanca za očekivati je da će se sadržaj alkohola u krvi s vremenom smanjivati, no on se može, zbog propuštanja spremnika ili biokemijske degradacije (ako konzervans kao što je NaF nije dodan u uzorak), i povećati.

Prema dosadašnjim saznanjima, ponekad ni konzervansi (primjerice NaF) dodani u biološke uzorke krvi ne poboljšavaju rezultate, čak ni onda kada su uzorci uzeti sterilnom opremom i čuvani na niskim temperaturama. Učestalo otvaranje spremnika ili epruveta s uzorcima prilikom uzimanja alikvota krvi za analize također je jedan od čimbenika koji može uzrokovati veće gubitke etanola, što ukazuje na važnost uloge zraka u procesu degradacije alkohola. Što je veći postotak zraka u spremniku (*engl.* chamber air, CA%), veći je i gubitak koncentracije etanola s vremenom, što se pripisuje mehanizmu gubitka alkohola zbog ventilacije između tekuće i plinovite faze. Osim ventilacije postoje i drugi mehanizmi gubitka alkohola kao što je neenzimska reakcija oksidacije oksihemoglobinom iz eritrocita (proces koji ne ovisi o CA%).

[17]

Mikrobna fermentacija šećera je proces konverzije ugljikohidrata u etanol [18], a do tog procesa dolazi i u ljudskom tijelu. Česti su slučajevi povišene koncentracije alkohola u poslijesmrtim uzorcima krvi pacijenata sa šećernom bolesti, a mogući uzrok tomu je brza reprodukcija mikroorganizama koja dovodi do fermentacije šećera. Konverziju šećera u etanol što ne može biti spriječeno uobičajenom količinom NaF dodanom u uzorke krvi. Proizvodnja endogenog etanola mikroorganizmima postupkom fermentacije ugljikohidrata u urinu potencijalan je problem prilikom testiranja uzoraka urina osoba koje su vozile pod utjecajem sredstava ovisnosti i prilikom poslijesmrtih analiza, što može dovesti do krivih zaključaka o konzumaciji alkohola. Upravo zato bitno je prepoznati koliko je etanola nastalo kao produkt mikroorganizama, a koliko je posljedica konzumiranja alkoholnih pića.

Promjene u stabilnosti BAC tijekom pohrane također bitno ovise o duljini vremena pohrane uzoraka. Prema tome, razlikujemo ispitivanje kratkotrajne, u vremenskom periodu unutar 6 mjeseci, i dugotrajne stabilnost etanola, unutar 12 mjeseci. [21]

Kada se provode studije ispitivanja dugotrajne stabilnosti, vremenski period trebao bi minimalno obuhvaćati 12 mjeseci, a da bi se dobili valjani podaci, frekvencija testiranja trebala bi biti najmanje svaka tri mjeseca. Kratkotrajna stabilnost, ispitivana unutar 6 mjeseci, trebala bi se testirati minimalno tri puta, uključujući početnu (izmjerenu 0.dan) i krajnju vrijednost (izmjerenu 6.mjesec). [19]

1.2. Biološki uzorci

Pod pojmom biološki uzorci podrazumijevaju se uzorci isključivo biološkog podrijetla, tekućine ili tkiva. Jedan od najvažnijih postupaka koji ima znatan utjecaj na rezultat toksikološke analize jest uzorkovanje uzoraka živih ili mrtvih osoba za toksikološku analizu. U analizama živih osoba koriste se različiti biološki uzorci, ali u oko 98% slučajeva to su mokraćna, krv i želučani sadržaj. Prilikom analize umrlih osoba broj uzoraka za analizu uključuje dostupne uzorke koji se prikupljaju i za vrijeme života (biološke tekućine), ali i sva dostupna biološka tkiva, sakupljena na obdukciji. Pojedine vrste uzoraka, kao što su znoj, kosa, dlake ili slina, u posljednje se vrijeme sve više koriste jer mogu služiti kao dodatni izvor podataka o konzumaciji sredstava ovisnosti. [5]

U slučajevima koji uključuju zločine počinjene uz konzumaciju sredstava ovisnosti, slučajnog ili namjernog trovanja te u slučajevima sumnjive smrti, najčešće analizirani uzorci su biološke tekućine, mokraća i krv. [20, 9] Osnovni preduvjet za dobru toksikološku analizu jest obrada i analiza na vrijeme prikupljenog i pravilno pohranjenog uzorka.

Uzorkovanje biološkog materijala za toksikološku analizu razlikuje se od slučaja do slučaja. U pravilu, poslijesmrtna toksikologija zahtjevnija je i kompliciranija od toksikologije živih osoba. Biološki uzorci su često sve samo ne idealni, moguće je da ih uopće nema na raspolaganju ili su značajno degradirani [21].

Biološki materijal za toksikološku analizu treba biti reprezentativan i predstavljati cijeli uzorak, a svi uzorci moraju biti propisno zavedeni. U tablici 2 prikazane su odgovarajuće vrste i preporučene količine bioloških uzoraka za toksikološku analizu. Predostrožnosti radi potrebno je sakupiti što veći broj raznih uzoraka, zbog bolje „šire slike“ i eventualne potrebe reanalize. Izbor uzoraka i količina ovisi o okolnostima, njihovoj dostupnosti i pozadinskim informacijama [22, 9].

Tablica 2. Smjernice za prikupljanje poslijesmrtnih uzoraka. [9, 23]

UZORAK		VOLUMEN/KOLIČINA
KRV	Iz femoralne ili subklavijalne vene	10–20 mL
	Iz srca	Sva raspoloživa ili 50 mL
MOKRAĆA		Sav raspoloživ ili 50 mL
ŽELUČANI SADRŽAJ		Sav raspoloživ ili 50 mL
TKIVA (mozak, jetra, bubrezi, mišići)		50 g
ŽUČNA TEKUĆINA		Sva raspoloživa
OČNA VODICA		Sva raspoloživa
MJESTO	UBODA INJEKCIJSKOM	2x2x1 cm ³

IGLOM	
UZORAK KOSE	Najmanje 500 mg
UZORAK NOKTIJU	Najmanje 0,2 g

1.2.1. Krv

Krv je tekućina koja cirkulira srčano krvožilnim sustavom te sačinjava oko 8% tjelesne mase čovjeka. Sastoji se od tekućeg dijela (plazme) i krvnih stanica (eritrocita, leukocita i trombocita). Od velikog je značaja za detekciju, a osobito za kvantitativno određivanje i interpretaciju koncentracije lijekova i droga. [5]

Analizom poslijesmrtne uzorka krvi omogućuje se usporedba koncentracija s kliničkim uzorcima i njihovim farmakokinetičkim podacima. [24] Podrazumijeva se, ukoliko je to moguće, uzorkovati dva uzorka krvi, jedan iz srca i drugi s periferije, osim u slučaju analize krvi na alkohol kada se krv iz srca ne smije uzeti jer postoji mogućnost difuzije iz želuca. U poslijesmrtne slučajevima preferira se uzimanje krvi iz femoralne vene da bi se izbjegla kontaminacija trbušnim tekućinama ili sadržajem te reducirali artefakti koji se pojavljuju u krvnim koncentracijama zbog redistribucije. [5]

Većina lijekova i sredstava ovisnosti u poslijesmrtne uzorcima krvi pokazuju promjene u koncentraciji ovisno o tome koliko je vremena prošlo od smrti do uzorkovanja, izboru mjesta izuzimanja uzorka, odabira metoda uzorkovanja i sakupljenoj količini uzorka. [25] Obzirom na velike mogućnosti promjena u koncentraciji sredstava ovisnosti u poslijesmrtne uzorcima krvi izuzetih s raznih mjesta u organizmu potrebno je standardizirati uzorkovanje, da bi se dobiveni rezultati mogli pravilno interpretirati usporedbom s kreiranim bazama podataka. [9]

1.2.2. Postupanje s biološkim uzorcima: sakupljanje, označavanje, pohrana i transport

Na slici 5 shematski je prikazan postupak sakupljanja bioloških uzoraka, pravilno označavanje, njihova pohrana i transport. Kod sakupljanja bioloških uzoraka potrebno je

naznačiti ime i prezime osobe, vrstu uzorka, datum, mjesto i vrijeme prikupljanja uzoraka. Sve uzorke izuzetih bioloških tekućina i tkiva potrebno je pohraniti u zasebne spremnike kako bi se izbjegla uzajamna kontaminacija.



Slika 5. Shematski prikaz postupanja s biološkim uzorcima. [26]

Preporuča se korištenje jednokratnih plastičnih ili staklenih spremnika, a oni ne bi smjeli prekoračiti razinu punjenja od 80% ukupnog volumena spremnika. Prema „Smjernicama za priskrblijevanje poslijesmrtne uzoraka za toksikološku analizu“, u uzorke krvi i mokraće, prilikom analize na alkohol, dodaje se 2% natrijev fluorid (NaF). Dodatkom NaF smanjuje se mikrobiološka aktivnost i proces fermentacije etilnog alkohola *in vitro* i raspadanje labilnih lijekova. Antikoagulansi se, u načelu, dodaju samo u uzorke krvi. Ostali uzorci izuzimaju se u spremnike bez aditiva.

Svi uzorci, osim uzorka kose i noktiju, do analize se pohranjuju u hladnjak na 4⁰C, a ukoliko se analiza neće napraviti unutar 3-4 dana od izuzimanja, potrebno ih je spremiti na -20⁰C. [27,9] Moguće promjene u koncentraciji uzoraka koje mogu nastati tijekom dugotrajne pohrane nisu u korelaciji s vrstom spremnika, bili oni stakleni ili plastični. [28]

Jedan od važnijih koraka je i hermetičko zatvaranje posude u kojoj je smješten uzorak, pogotovo kod analiza hlapljivih tvari u kvantitativnoj analitičkoj proceduri. Stoga je potrebno spremnike sa uzorcima što manje otvarati i s analizom započeti što je prije moguće. Ukoliko se analizira plazma ili serum, te se analiza napravi unutar 2-3 dana od izuzimanja uzoraka, puna krv se ne treba smrzavati. Isto tako, jednom kad su odvojeni, uzorci plazme ili seruma nakon analize se ne združuju, kako bi se onemogućio gubitak hlapljivih komponenti. [22,9]

1.2.3. Pohrana bioloških uzoraka

U kliničkoj i poslijesmrtnoj toksikologiji podjednako su potrebni pouzdani kvalitativni i kvantitativni rezultati, u protivnom rezultati analize mogu dovesti do podcjenjivanja i precjenjivanja učinaka ili do netočnih interpretacija. [29] U „Narodnim novinama“ broj 86/14 donesen je Pravilnik kojim se određuje način i postupak vađenja uzoraka krvi i mokraće za analizu utvrđivanja koncentracije alkohola, prisutnosti opojnih droga te psihoaktivnih tvari kod osoba za koje postoje osnovane sumnje da su počinile kazneno djelo, te vozača i drugih sudionika u prometu, kao i uvjeti koje zdravstvene i druge ustanove moraju ispunjavati da bi mogle obavljati analize tih uzoraka. Člankom 12 istog Pravilnika predviđen je rok čuvanja uzoraka. [30,9] U tablici 3 prikazani su opći zahtjevi temperature za pohranu bioloških uzoraka.

Članak 12.

Uzeti uzorci pohranjuju se u hladnjaku na temperaturi od +4 °C i čuvaju šest mjeseci od izvršene analize.

Tablica 3. Opći zahtjevi pohrane uzoraka. [33]

TEMPERATURA (°C)	METODA POHRANE	PREPORUČENO ZA:
od +18 do +20	sobna temperatura	dijelove tkiva
od 0 do +4	hladnjak	svježe uzorke
od -0.5 do -27	zamrzivač	kratkotrajnu stabilnost DNA
od -27 do -40	zamrzivač	stabilnost DNA
od -40 do -80	zamrzivač	DNA/RNA stabilnost
od -80 do -130	zamrzivač	mokraću, krv i krvne frakcije (plazma, serum, itd.)
od -130 do -150	faza pare tekućeg dušika	pohranu tkiva, očuvanje funkcije stanica
- 196	tekuća faza tekućeg dušika	pohranu živih stanica

1.2.4. Stabilnost bioloških uzoraka

Nakon izuzimanja bioloških uzorka, enzimi mogu nastaviti svoje aktivno djelovanje i tako degradirati ili transformirati lijek *in vitro*. Taj se proces može odvijati nakon smrti u samom tijelu, ili nakon uzimanja poslijesmrtnih i kliničkih uzoraka: tijekom transporta, skladištenja i pohrane.

Poslijesmrtni uzorci, više nego drugi uzorci, pokazuju promjenu stanja uglavnom zbog vremena proteklog od smrti do obdukcije ili zbog neadekvatne pohrane uzoraka prije analize. Nakon smrti u biološkim tkivima može doći do dekompozicije (raspadanja) ili eventualno likvefakcije, što može prouzročiti velike probleme kod interpretacije dobivenih rezultata. [31] Ovi čimbenici, naravno, uvelike ovise o vremenu koje je prošlo od smrti do obdukcije i analitičke pripreme uzoraka za analizu, temperaturi i ostalim uvjetima okoliša.

Prilikom analize alkohola, u izuzetnim uzorcima može doći do raznih promjena ukoliko nisu dodani antikoagulansi. Antikoagulans, u pravilu NaF, u spremniku za uzorke zauzima 1–5 % ukupnog volumena. Samo ukoliko je izuzet manji volumen krvi višak natrijevog fluorida može utjecati na ispitivanje hlapljivih tvari mijenjanjem tlaka pare analita. Dodatkom natrijevog fluorida inhibira se djelovanje mikroorganizama koji pretvaraju glukozu u etanol, odnosno sprječava se oksidacija etanola potaknuta djelovanjem mikroorganizama. Također sprječava se konverzija i drugih sredstava ovisnosti u biološkim uzorcima nakon smrti i pohrane uzoraka. [9]

Korištenje antikoagulansa može imati i suprotne učinke. Očuvanje uzoraka uz pomoć natrijevog fluorida nije dozvoljeno ukoliko su uzroci pozitivni na organofosfate jer može vrlo brzo doći do raspadanja tih spojeva [32].

Alternativni način, još uvijek nedovoljno ispitan, je pohrana poslijesmrtih bioloških tekućina za kvalitativnu analizu upotrebom filter papira. [36] Osušene mrlje krvi predstavljaju vrijedan i relativno jeftin način ispitivanja u kliničkoj toksikologiji, s tim da se ova tehnika u sudskoj toksikologiji još uvijek koristi samo uvjetno za ispitivanje prisustva toksičnih tvari. [33] Analizom mrlja krvi na filter papiru dokazana je velika sljedivost za očuvanje ishodišnih toksičnih tvari i odgovarajućih produkata hidrolize dokazanih u vrijeme uzorkovanja. [9]

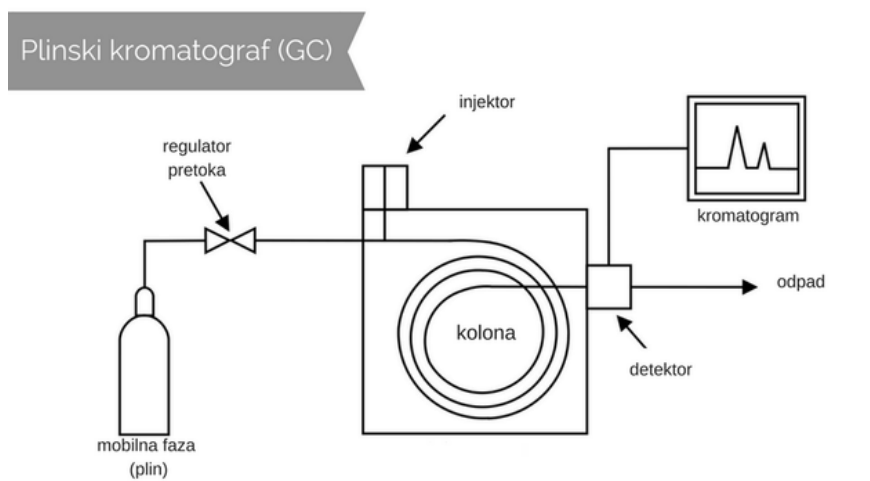
1.2.5. Analiza bioloških uzoraka

Prethodno pripremljeni uzorci ispituju se nekom od prikladnih analitičkih metoda. Izbor analitičke metode ovisi o dostupnim informacijama (opće probiranje ili ciljana analiza), vrsti uzoraka, očekivanim koncentracijama te potrebi za kvalitativnom ili kvantitativnom analizom. Moderna forenzična analiza sasvim je nezamisliva bez instrumentalnih analitičkih metoda. [5]

1.3. Instrumentalna analiza bioloških uzoraka plinskom kromatografijom

Pod plinskom kromatografijom (*engl.* Gas chromatography, GC) podrazumijevaju se sve kromatografske metode u kojima je pokretna faza plin. Metodom plinske kromatografije mogu se ispitivati spojevi koje je moguće dovesti u plinovito stanje pri temperaturi od 400⁰C, a da se pri

tome ne raspadnu. Neke od primjena u forenzičnoj toksikologiji su određivanje koncentracije alkohola, acetona, anestetika, određivanja ugljičnog monoksida i slično.

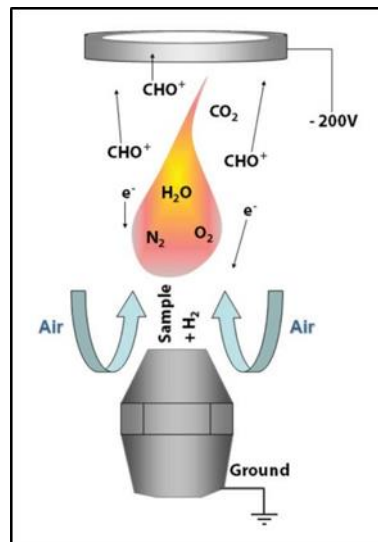
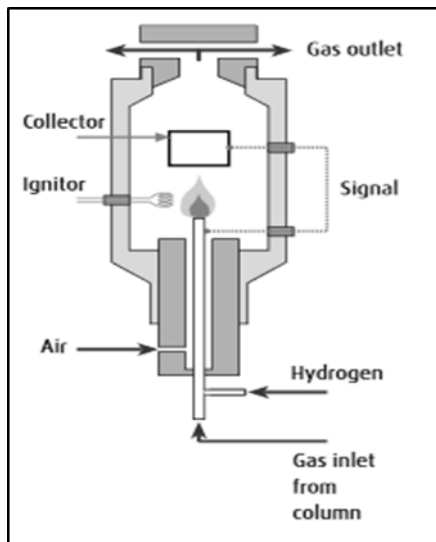


Slika 6. Shema plinskog kromatografa. [34]

Osnovni dijelovi plinskog kromatografa su plin nosioc, regulator protoka, injektor, pećnica, kolona, detektor i pisac, shematski prikazani na slici 6. Princip rada plinskog kromatografa podrazumijeva injektiranje uparenog uzorka na početak kolone te nošen plinom nosiocem prolazi kroz kolonu. Zbog različitih fizikalno-kemijskih svojstava pojedinih sastojaka uzorka oni se razdvajaju i u različitom vremenu dolaze do detektora. Plin nosilac mora biti kemijski inertan, a izbor ovisi o vrsti detektora. Najčešće se upotrebljavaju helij, dušik, argon ili ugljični dioksid. [5]

1.3.1. Plinski kromatograf s plameno ionizacijskim detektorom, GC–FID

Plameno-ionizacijski detektor (*engl.* Flame Ionization Detector, FID) jedan je od najčešće korištenih detektora u forenzičkim laboratorijima. Namijenjen je prvenstveno za detekciju organskih spojeva i u tom području pokazuje bolju osjetljivost od TCD -a. Specifična je metoda bez mogućnosti interferencije drugim organskim lakohlapljivim tvarima koje bi mogle utjecati na određivanje koncentracije apsolutnog alkohola u krvi, mokraći te tkivu mišića (koje se analizira ukoliko nema raspoloživih tjelesnih tekućina). Na slici 7 shematski je prikazan rad FID detektora.



Slika 7. Shematski prikaz FID detektora.[35] **Slika 8.** Prikaz putanje iona u FID detektoru.[36]

Glavni princip rada FID detektora je detekcija iona stvorenih tijekom izgaranja organskih spojeva u plamenu vodika i zraka. Organske komponente kad sagorijevaju na temperaturi vodikovog plamena daju ione i elektrone koji provode elektricitet. Nastali ioni i elektroni putuju prema sabirnoj (kolektorskoj) elektrodi dajući struju koja se registrira kao kromatografski pik. Bilježi broj C atoma u jedinici vremena, pa je njegov odziv proporcionalan masi detektiranog sastojka (*engl.* mass sensitive). Na slici 8 prikazana je putanja iona gdje se pozitivni ioni privlače negativno nabijenom kolektoru, dok su elektroni privučeni protoku plina. FID je relativno osjetljiv detektor s granicom detekcije od 1 ppm za većinu spojeva. [37]

Prednosti plameno-ionizacijskog detektora su niska cijena, jednostavno održavanje, otpornost konstrukcije, linearnost i opseg detekcije (može izmjeriti organske spojeve vrlo niske ili visoke koncentracije proizvodeći linearan odaziv opsega od 10^7). Kao mana ovog detektora ističe se nemogućnost detekcije anorganskih i visoko oksigeniranih spojeva. [38]

1.3.2. Plinska kromatografija – <<Headspace>> tehnika

Plinska kromatografija s „headspace“ tehnikom se rutinski primjenjuje u analizi alkohola, ali jednako tako i u analizi drugih lakohlapljivih organskih spojeva u biološkim i nebiološkim uzorcima. Većina lako hlapljivih tvari ne može se detektirati uobičajenim metodama

pripreme uzoraka, poput ekstrakcije. Za izbor „headspace“ tehnike posebna se pažnja treba posvetiti fizikalno-kemijskim parametrima uzorka prije pripreme (pH vrijednosti uzorka, temperaturi inkubacije i slično), temperaturi plinskog kromatografa i koloni za optimiziranje iskorištenja ekstrakcijske metode i sposobnosti odvajanja komponenti. [9]



Slika 9. Staklena bočica s uzorkom za „headspace“ analizu. [39]

2. CILJEVI

Ciljevi ovog rada bili su:

1. Ispitati kratkotrajnu stabilnost etanola u poslijesmrtim uzorcima krvi, pohranjenim na -20°C , korištenjem GC/FID metode u vremenskom razdoblju od 6 mjeseci.
2. Usporediti dobivene rezultate u pohranjenim poslijesmrtim uzorcima krvi sa i bez dodanog antikoagulansa.
3. Usporediti dobivene rezultate i procijeniti stabilnost poslijesmrtih uzoraka krvi pohranjenih u spremnicima različitih volumena.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Kemikalije

U ovom istraživanju korištene su sljedeće kemikalije:

- 1) Tercijarni butanol, p.a., Merck, Darmstadt, Njemačka
- 2) Etanol, p.a., Merck, Darmstadt, Njemačka
- 3) Voda, redestilirana, Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu, Zagreb

3.2. Priprema standardne otopine etanola

Umjerna krivulja etanola dobivena je razrjeđivanjem početne standardne otopine etanola koncentracije 10 g/kg ($\gamma_1=10$ g/kg). Razrjeđivanjem početne otopine s vodom pripremljene su vrijednosti masenih koncentracija: $\gamma_2=2,5$ g/kg, $\gamma_3=2$ g/kg, $\gamma_4=1,5$ g/kg, $\gamma_5=1$ g/kg i $\gamma_6=0,5$ g/kg (prikazano u tablici 4).

Tablica 4. Priprema standardnih otopina etanola za umjernu krivulju.

Redni br. Konc	V _{početne otopine} (mL)	V _{vode} (mL)	Koncentracija etanola (g/kg)
1	0,5	4,5	0,5
2	1	4	1
3	1,5	3,5	1,5
4	2	3	2
5	2,5	2,5	2,5

3.3. Instrumenti

U istraživanju su korišteni sljedeći instrumenti:

- Plinski kromatograf s plameno-ionizacijskim spektrometrom; Shimadzu GC-2010
- Vorteks; IKA

3.3.1. Plinski kromatograf s plameno ionizacijskim detektorom, GC/FID

Koncentracija etanola u poslijesmrtanim uzorcima krvi (*engl.* Blood alcohol concentration, BAC) izuzetno za vrijeme obdukcije određivala se „headspace“ tehnikom plinskog kromatografa s plameno-ionizacijskim detektorom i autoinjektorom. Korištena kolona plinskog kromatografa je Restek, RTx-BAC1, dužine 30 m, promjera 0,53 mm i debljine filma nepokretne faze 3 μm . Ukupan rad instrumenta i obrada podataka kontrolirani su GCSolution software računalnim programom.

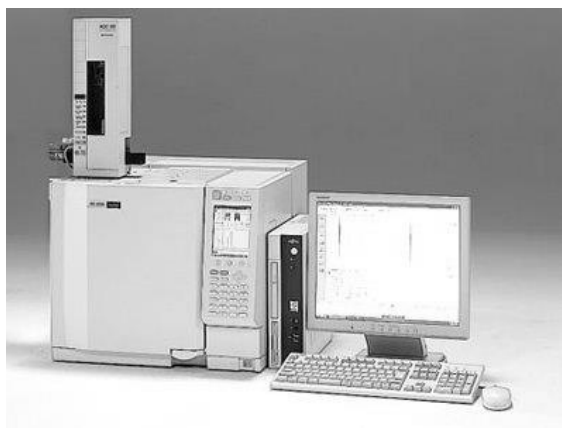
Plinski kromatograf:

- Shimadzu GC-2010
- regulator protoka: 0-970 kPa
- maksimalna temperatura pećnice: 450 $^{\circ}\text{C}$

Plameno-ionizacijski detektor:

Shimadzu AOC-5000

- maksimalna temperatura: 450 $^{\circ}\text{C}$
- elektronički reguliran protok (*engl.* Advanced Pressure Control- APC)



Slika 10. Plinski kromatograf s plameno-ionizacijskim detektorom; Shimadzu GC-2010. [40]

3.3.1.1. Radni uvjeti GC–FID metode

Koncentracija alkohola u biološkim uzorcima krvi kvantitativno je određena koristeći plinski kromatograf s plameno–ionizirajućim detektorom (GC-FID) s kromatografskom kolonom- RTX– BAC1 (30 mx0.53 mm ID, 250 nm).

Optimalni radni uvjeti:

- termostatiranje uzorka: 12 minuta, 75 °C, 500 rpm
- temperatura kolone: 60 °C
- temperatura injektora: 200 °C
- temperatura detektora: 200 °C
- protok plina nosioca: 11,70 mL/min
- trajanje temperaturnog programa: 3 minute

3.4. Priprema uzoraka za kromatografsku analizu GC/FID

Pri izuzimanju uzoraka poslijesmrtnih uzoraka krvi u spremnike za analizu dodano je 2% antikoagulansa- NaF, ali samo u pola cjelokupnog volumena krvi, dok je druga polovina pohranjena bez antikoagulansa radi usporedne analize. Tako podijeljeni uzorci alikvotirani su u spremnike manjeg (A1 i BA1) i većeg volumena (A2 i BA2), te pohranjeni na -20 °C do sljedeće analize.

Poslijesmrtni uzorci krvi za kvantitativno određivanje koncentracije alkohola pripremljeni su dodatkom 1 mL tercijarnog butanola, internog standarda, i 300 µL uzorka poslijesmrtne krvi u staklenu bočicu s magnetiziranim čepom.

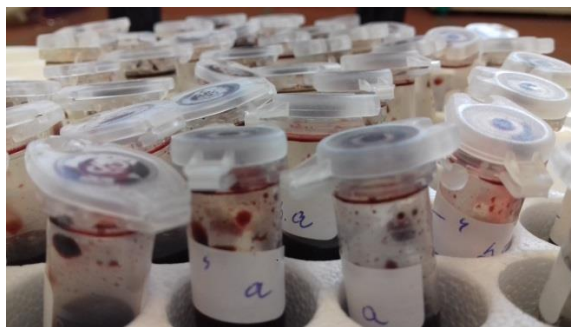
3.5. Biološki poslijesmrtni uzorci krvi

Za analizu poslijesmrtnih uzoraka krvi korišteni su uzorci izuzeti za vrijeme obdukcije namijenjeni standardnoj toksikološkoj analizi, koja uključuje određivanje prisustva lijekova i/ili sredstava ovisnosti te lakohlapljivih organskih otapala. Svi uzorci za analizu stabilnosti etanola pohranjeni su u sterilne i kemijski čiste spremnike. Provedena je kontrolna analiza kojom se

ispitalo prisustvo alkohola u izuzetim uzorcima, jer bi u slučaju pozitivnih rezultata uzorci bili isključeni iz studije.

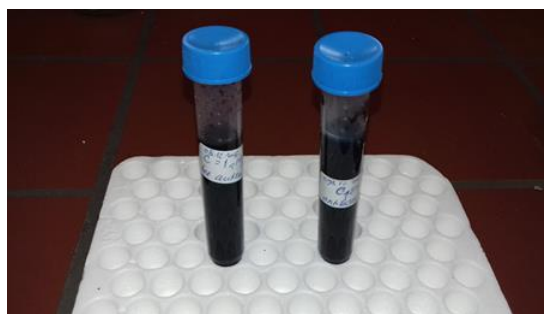
Ukupni volumen uzoraka poslijesmrtne krvi ($V_0 = 100$ mL), negativan na prisustvo etanola, podijeljen je u dva spremnika jednakog volumena ($V_1 = 50$ mL i $V_2 = 50$ mL) od kojih je u V_2 dodano 2% antikoagulansa- NaF, dok je V_1 pohranjen bez antikoagulansa radi usporedbe u promjeni stabilnosti koncentracije etanola uzoraka s i bez dodatka antikoagulansa. Nadalje, iz oba su spremnika radi usporedne analize stabilnosti etanola u različitim volumenima pripremljeni sljedeći uzorci:

- epruvete manjeg volumena (1 mL), različitih vrijednosti etanola: 0.5, 1, 1.5 i 2.5 g/kg → A1 (s antikoagulansom) i BA1 (bez antikoagulansa), (Slika 11).



Slika 11. Uzorci krvi različitih koncentracija etanola u epruvetama volumena 1 mL (A1 i BA1).

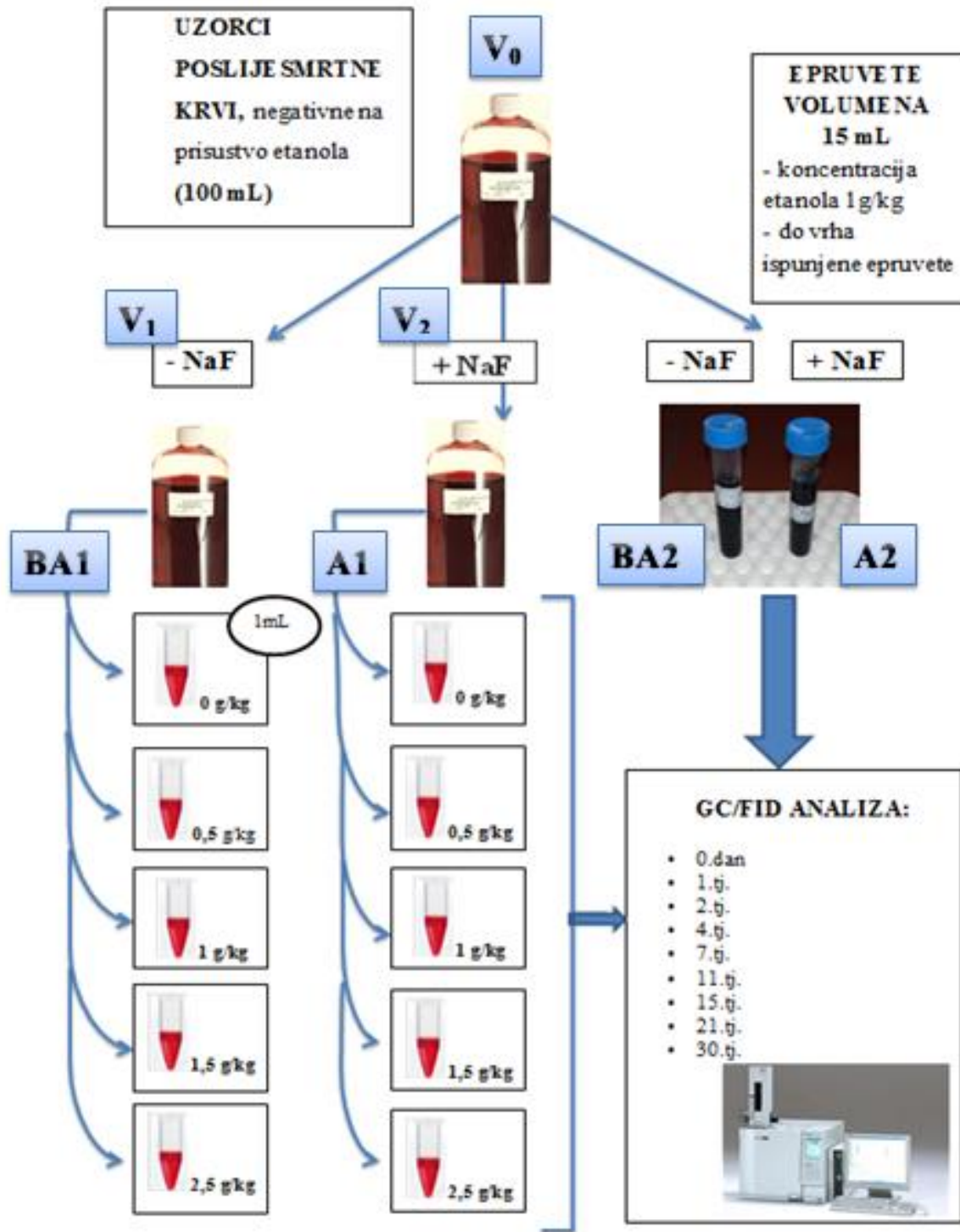
- epruvete većeg volumena (15 mL), vrijednosti etanola 1 g/kg, ispunjene do vrha → A2 (s antikoagulansom) i BA2 (bez antikoagulansa), (Slika 12).



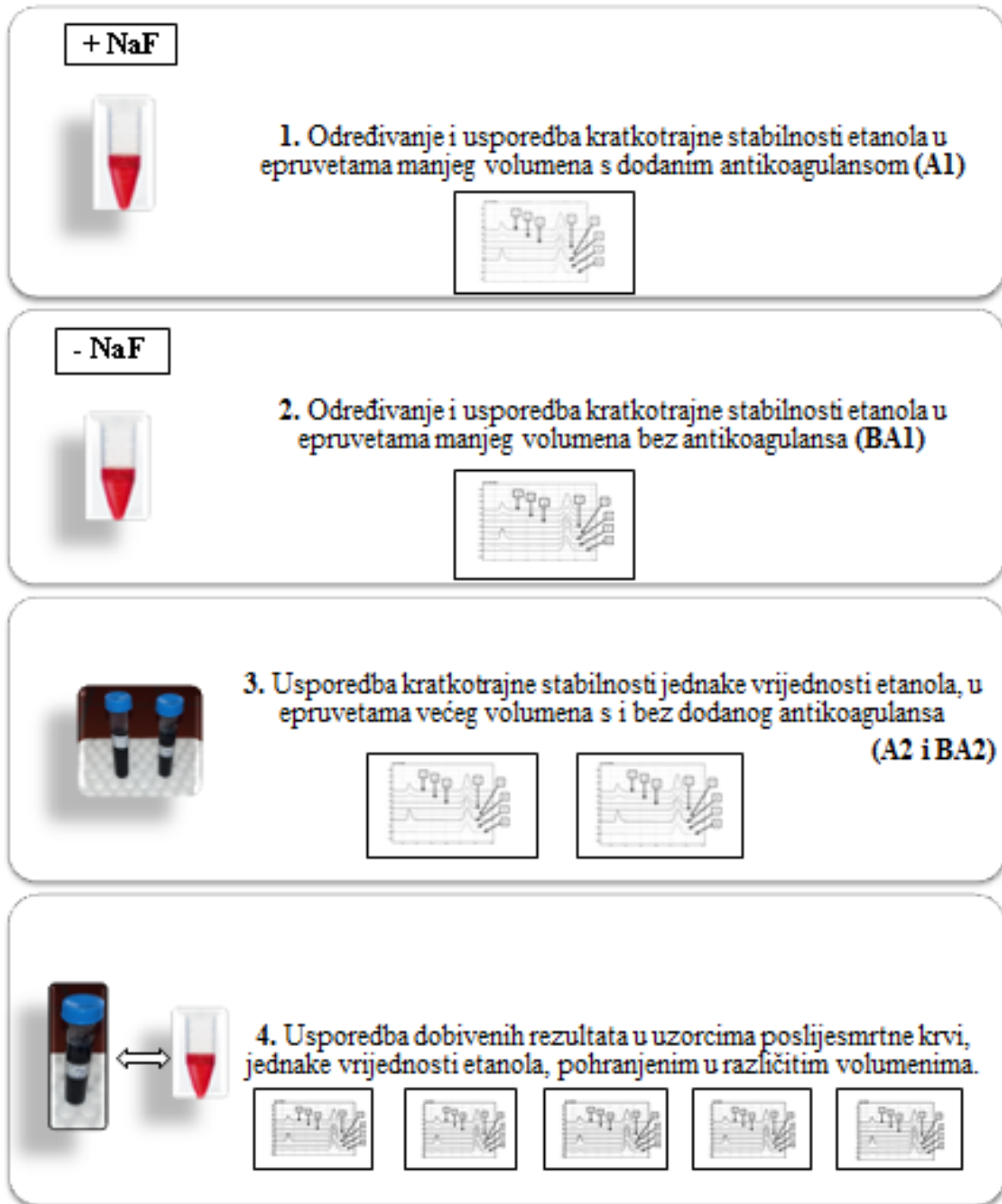
Slika 12. Uzorci krvi koncentracije etanola 1g/kg u epruvetama volumena 15 mL (A2 i BA2).

Nakon analize standardnih otopina etanola i izrade umjerne krivulje, analizirani su pripremljeni biološki uzorci poslijesmrtne krvi, te pohranjeni u hladnjak na -20°C do svake sljedeće analize. Stabilnost alkohola navedenih uzoraka krvi ispitivana je ponovljenom analizom istih uzoraka nakon pohrane tijekom šest mjeseci (30 tjedana), koristeći se GC/FID tehnikom u kemijsko-toksikološkom laboratoriju KBC-a Split.

Analize su se vremenski odvijale sljedećim redom: 0.dan, 1.tjedan, 2.tjedan, 4. tjedan, 7.tjedan, 11.tjedan, 15. tjedan, 21. tjedan i 30. tjedan. Ukupno je provedeno devet analiza (uključujući prvu kojom je ispitivana početna vrijednost masenih koncentracija etanola). Uzorci su analizirani u duplikatu, te je naposljetku, kao rezultat prikazana srednja vrijednost njihovih masenih koncentracija. Na slici 13 pojednostavljen je prikaz postupaka pripreme i analize naših uzoraka.



Slika 13. Shematski prikaz cjelokupnog ispitivanja provedenog na biološkim uzorcima poslijesmrtnih uzoraka krvi.

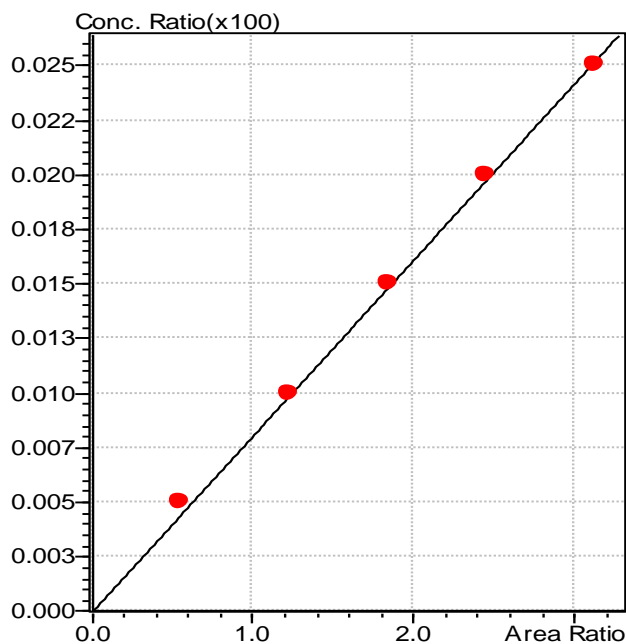


Slika 14. Shematski prikaz tijeka ispitivanja stabilnosti poslijesmrtnih uzoraka krvi s i bez antikoagulansa prije i nakon pohrane uzoraka na vremensko razdoblje od šest mjeseci.

4. REZULTATI

4.1. Umjerna krivulja etanola

Pripremljena je umjerna krivulja etanola dobivena analizom standardne otopine etanola, koristeći GC/FID tehniku koja omogućuje kvantitativnu analizu etanola u poslijesmrtim uzorcima krvi. Na slici 15. su prikazane sljedeće masene koncentracije etanola: 0.5, 1, 1.5, 2 i 2.5 g/kg.



Slika 15. Grafički prikaz umjerne krivulje etanola – koncentracije: 0.5, 1, 1.5, 2 i 2.5 g/kg.

4.2. Određivanje i usporedba kratkotrajne stabilnosti etanola u epruvetama manjeg volumena s dodanim antikoagulansom (A1)

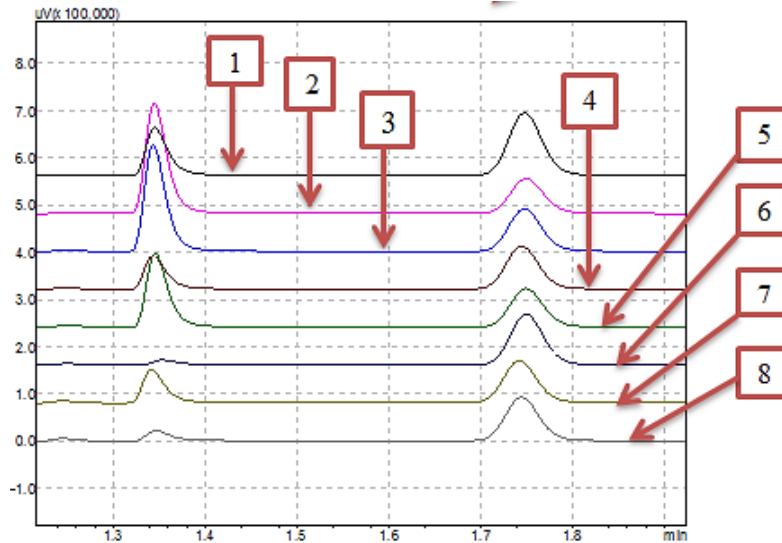
Koristeći se GC/FID tehnikom ispitivana je stabilnost etanola ponovljenom analizom bioloških poslijesmrtih uzoraka krvi, različitih masenih koncentracija etanola (0.5, 1, 1.5 i 2.5 g/kg) pohranjenih na -20°C , s dodanim antikoagulansom (A1), u epruvetama volumena 1 mL tijekom šest mjeseci (30 tjedana) (Slika 16). Dobiveni rezultati prikazani su u tablici 5. Uzorci su ispitani u duplikatu, a dobiveni rezultati prikazani su kao njihova srednja vrijednost. Sve ionske kromatograme karakterizira os x, kojom je prikazano vrijeme zadržavanja uzorka u koloni (retencijsko vrijeme, RT), te os y, kojom je prikazan intenzitet tvari proporcionalan njenoj koncentraciji. Na kromatogramima se mogu uočiti dva signala s karakterističnim retencijskim

vremenima; prvi predstavlja etanol (R_t etanola= 1.35), a drugi interni standard - tercijarni butanol (R_t butanola= 1.75).

Tablica 5. Kvantitativni prikaz rezultata izmjerenih vrijednosti etanola s dodanim antikoagulansom, volumena 1 mL (A1), u uzorcima poslijesmrtne krvi tijekom trideset tjedana (šest mjeseci).

A1				
	Dodana vrijednost 0.5 g/kg	Dodana vrijednost 1 g/kg	Dodana vrijednost 1.5 g/kg	Dodana vrijednost 2.5 g/kg
Vrijeme pohrane (tjedni)	Izmjerena vrijednost- BAC(g/kg) u uzorcima x			
0.dan	0.239	1.010	1.441	2.251
1.tjedan	0.237	0.935	3.884	2.702
2.tjedan	1.740	1.131	1.644	4.738
4.tjedan	0.318	1.267	0.490	0.501
7.tjedan	0	0.626	0.726	2.908
11.tjedan	0.183	0.995	1.210	3.267
15.tjedan	0.374	0.065	0.432	0.936
21.tjedan	0	0.664	0.441	1.352
30.tjedan	0.070	0.210	0.598	2.049

Na slici 16, prikazana je usporedba ionskih kromatograma dobivenih GC/FID analizom stabilnosti koncentracije etanola 1 g/kg u biološkim uzorcima poslijesmrtne krvi (s dodanim antikoagulansom), proučavanih u vremenskom razdoblju od šest mjeseci.



Slika 16. Usporedba rezultata dobivenih mjerenjem kratkotrajne stabilnosti osam uzoraka poslijesmrtne krvi, volumena 1 mL i masene koncentracije etanola **1 g/kg s dodanim antikoagulansom (A1)**, analiziranih GC/FID tehnikom (Rt etanola= 1.35, Rt butanola=1.75)

- 1) Kromatogram ukupne ionske struje uzorka poslijesmrtne krvi s karakterističnim signalima etanola i butanola- izmjereno **0. dan**
- 2) Kromatogram ukupne ionske struje uzorka poslijesmrtne krvi s karakterističnim signalima etanola i butanola- izmjereno **1. tjedan**
- 3) Kromatogram ukupne ionske struje uzorka poslijesmrtne krvi s karakterističnim signalima etanola i butanola- izmjereno **4. tjedan**
- 4) Kromatogram ukupne ionske struje uzorka poslijesmrtne krvi s karakterističnim signalima etanola i butanola- izmjereno **7. tjedan**
- 5) Kromatogram ukupne ionske struje uzorka poslijesmrtne krvi s karakterističnim signalima etanola i butanola- izmjereno **11. tjedan**
- 6) Kromatogram ukupne ionske struje uzorka poslijesmrtne krvi s karakterističnim signalima etanola i butanola- izmjereno **15. tjedan**
- 7) Kromatogram ukupne ionske struje uzorka poslijesmrtne krvi s karakterističnim signalima etanola i butanola- izmjereno **21. tjedan**

- 8) Kromatogram ukupne ionske struje uzorka poslijesmrtne krvi s karakterističnim signalima etanola i butanola- izmjereno **30. tjedan**

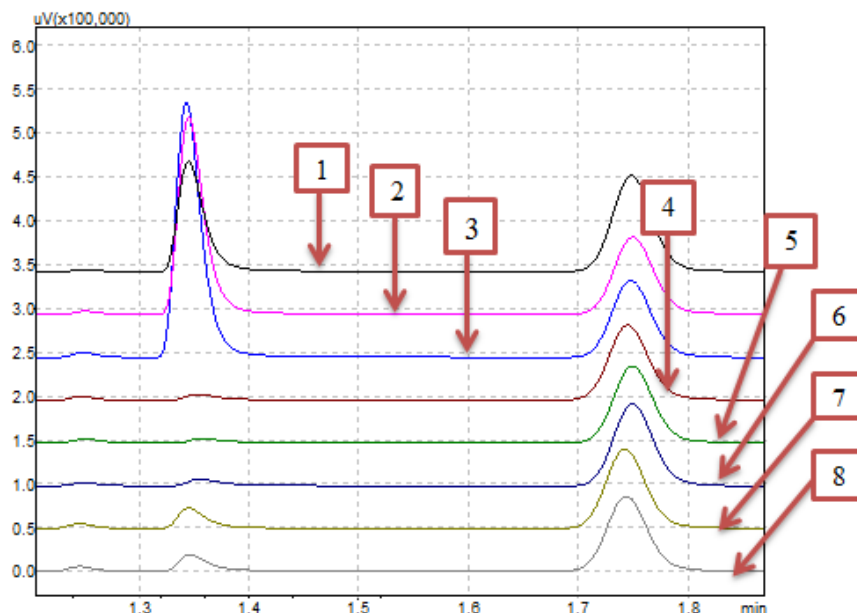
4.3. Određivanje i usporedba kratkotrajne stabilnosti etanola u epruvetama manjeg volumena bez antikoagulansa (BA1)

Uzorci bez dodanog antikoagulansa koncentracija etanola (0.5, 1, 1.5 i 2.5 g/kg) pohranjeni u malim epruvetama volumena 1 mL tijekom šest mjeseci (30 tjedana) analiziranih GC/FID tehnikom, pripremljeni su i analizirani na isti način kao i uzorci pohranjeni s antikoagulansom (Tablica 6, Slika 17).

Tablica 6. Kvantitativni prikaz rezultata izmjerenih vrijednosti etanola bez dodanog antikoagulansa, volumena 1 mL (BA1), u uzorcima poslijesmrtne krvi tijekom trideset tjedana (šest mjeseci).

BA1				
	Dodana vrijednost 0.5 g/kg	Dodana vrijednost 1 g/kg	Dodana vrijednost 1.5 g/kg	Dodana vrijednost 2.5 g/kg
Vrijeme pohrane (tjedni)	Izmjerena vrijednost- BAC(g/kg) u uzorcima x			
0.dan	0.560	1.005	1.537	2,508
1.tjedan	0.261	1.076	1.497	3,907
2.tjedan	0.664	1.957	3.894	4.028
4.tjedan	0.301	1.743	1,743	2.473
7.tjedan	0.145	0.082	0.066	0.161
11.tjedan	0.108	0.036	0.630	1.207
15.tjedan	0,155	0.053	0.393	1.770
21.tjedan	0.480	0.222	0.116	0.786
30.tjedan	0.169	0.191	0.786	4.162

Na slici 17, prikazana je usporedba ionskih kromatograma dobivenih GC/FID analizom stabilnosti koncentracije etanola 1 g/kg u biološkim uzorcima poslijesmrtne krvi (bez dodanog antikoagulansa), proučavanih u vremenskom razdoblju od šest mjeseci.



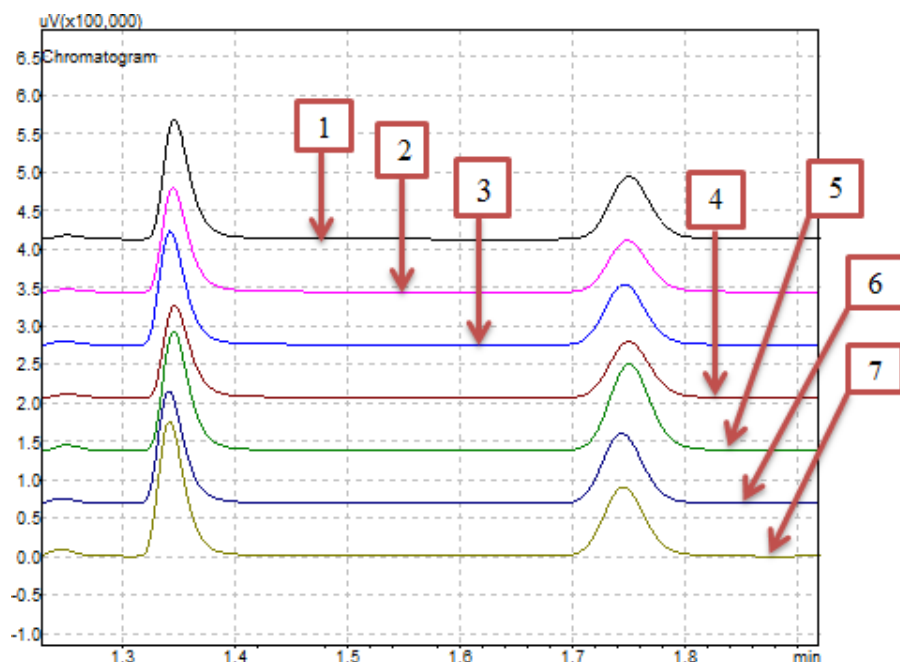
Slika 17. Usporedba rezultata dobivenih mjerenjem kratkotrajne stabilnosti osam uzoraka poslijesmrtne krvi, volumena 1 mL i masene koncentracije etanola **1 g/kg bez dodanog antikoagulansa (BA1)**, analiziranih GC/FID tehnikom (Rt etanola= 1.35, Rt butanola=1.75)

- 1) Kromatogram ukupne ionske struje uzorka poslijesmrtne krvi s karakterističnim signalima etanola i butanola- izmjereno **0. dan**
- 2) Kromatogram ukupne ionske struje uzorka poslijesmrtne krvi s karakterističnim signalima etanola i butanola- izmjereno **1. tjedan**
- 3) Kromatogram ukupne ionske struje uzorka poslijesmrtne krvi s karakterističnim signalima etanola i butanola- izmjereno **4. tjedan**
- 4) Kromatogram ukupne ionske struje uzorka poslijesmrtne krvi s karakterističnim signalima etanola i butanola- izmjereno **7. tjedan**
- 5) Kromatogram ukupne ionske struje uzorka poslijesmrtne krvi s karakterističnim signalima etanola i butanola- izmjereno **11. tjedan**
- 6) Kromatogram ukupne ionske struje uzorka poslijesmrtne krvi s karakterističnim signalima etanola i butanola- izmjereno **15. tjedan**
- 7) Kromatogram ukupne ionske struje uzorka poslijesmrtne krvi s karakterističnim signalima etanola i butanola- izmjereno **21. tjedan**
- 8) Kromatogram ukupne ionske struje uzorka poslijesmrtne krvi s karakterističnim signalima etanola i butanola- izmjereno **30. tjedan**

4.4. Usporedba kratkotrajne stabilnosti jednake vrijednosti etanola, u epruvetama većeg volumena s i bez dodanog antikoagulansa (A2 i BA2)

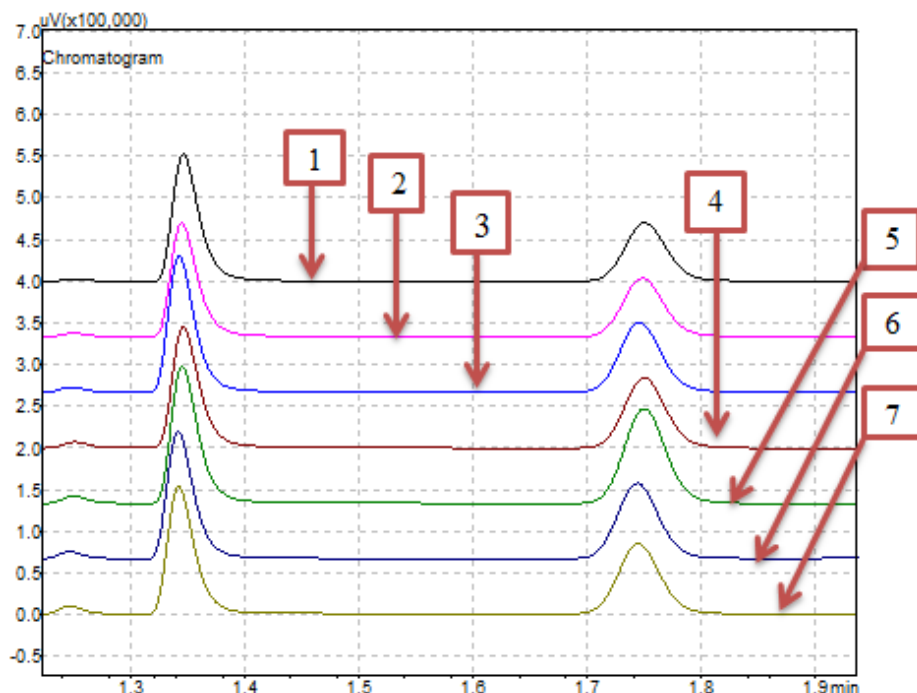
Radi usporedne analize stabilnosti dodanih vrijednosti etanola ispitivana je i stabilnost etanola u različitim volumenima uzoraka s i bez dodanog antikoagulansa (A2 i BA2). Uzorci poslijesmrtne krvi s konačnom masenom koncentracijom etanola 1 g/kg, pohranjeni su na -20°C u epruvete volumena 15 mL, ispunjene uzorcima do vrha (Slike 12 i 13).

Na slikama (18 i 19), prikazane su usporedbe ionskih kromatograma dobivenih GC/FID analizom etanola u biološkim uzorcima poslijesmrtne krvi u spremnicima volumena 15 mL, proučavanih u vremenskom razdoblju od šest mjeseci.



Slika 18. Usporedba rezultata dobivenih mjerenjem kratkotrajne stabilnosti sedam uzoraka poslijesmrtne krvi, volumena 15 mL i masene koncentracije etanola **1 g/kg** s **dodanim antikoagulansom (A2)**, analiziranih GC/FID tehnikom (Rt etanola= 1.35, Rt butanola=1.75).

- 1) Kromatogram ukupne ionske struje uzorka poslijesmrtne krvi s karakterističnim signalima etanola i butanola- izmjereno **2. tjedan**
- 2) Kromatogram ukupne ionske struje uzorka poslijesmrtne krvi s karakterističnim signalima etanola i butanola- izmjereno **4. tjedan**
- 3) Kromatogram ukupne ionske struje uzorka poslijesmrtne krvi s karakterističnim signalima etanola i butanola- izmjereno **7. tjedan**
- 4) Kromatogram ukupne ionske struje uzorka poslijesmrtne krvi s karakterističnim signalima etanola i butanola- izmjereno **11. tjedan**
- 5) Kromatogram ukupne ionske struje uzorka poslijesmrtne krvi s karakterističnim signalima etanola i butanola- izmjereno **15. tjedan**
- 6) Kromatogram ukupne ionske struje uzorka poslijesmrtne krvi s karakterističnim signalima etanola i butanola- izmjereno **21. tjedan**
- 7) Kromatogram ukupne ionske struje uzorka poslijesmrtne krvi s karakterističnim signalima etanola i butanola- izmjereno **30. tjedan**



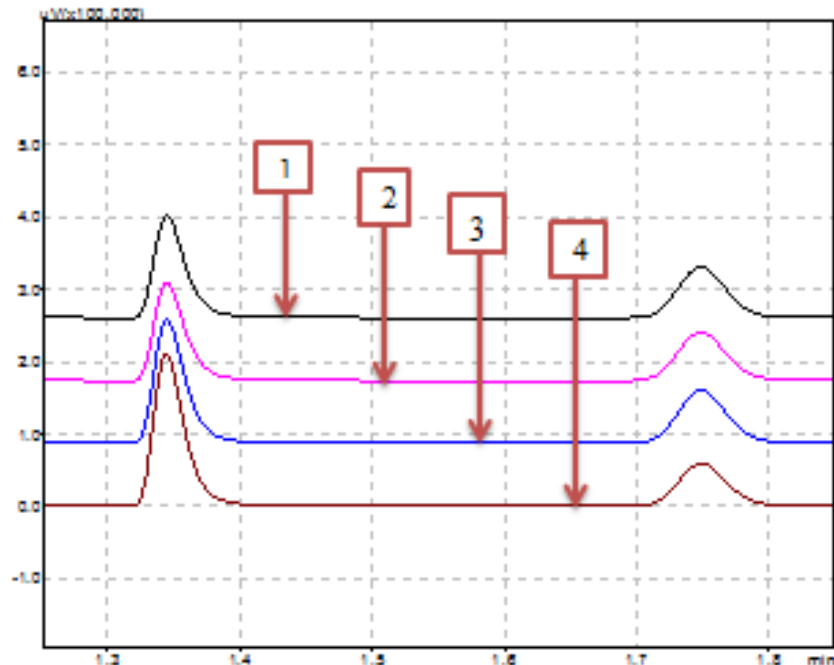
Slika 19. Usporedba rezultata dobivenih mjerenjem kratkotrajne stabilnosti sedam uzoraka poslijesmrtne krvi, volumena 15 mL i masene koncentracije etanola **1 g/kg bez dodanog antikoagulansa (BA2)**, analiziranih GC/FID tehnikom (Rt etanola= 1.35, Rt butanola=1.75).

- 1) Kromatogram ukupne ionske struje uzorka poslijesmrtne krvi s karakterističnim signalima etanola i butanola- izmjereno **2. tjedan**
- 2) Kromatogram ukupne ionske struje uzorka poslijesmrtne krvi s karakterističnim signalima etanola i butanola- izmjereno **4. tjedan**
- 3) Kromatogram ukupne ionske struje uzorka poslijesmrtne krvi s karakterističnim signalima etanola i butanola- izmjereno **7. tjedan**
- 4) Kromatogram ukupne ionske struje uzorka poslijesmrtne krvi s karakterističnim signalima etanola i butanola- izmjereno **11. tjedan**
- 5) Kromatogram ukupne ionske struje uzorka poslijesmrtne krvi s karakterističnim signalima etanola i butanola- izmjereno **15. tjedan**
- 6) Kromatogram ukupne ionske struje uzorka poslijesmrtne krvi s karakterističnim signalima etanola i butanola- izmjereno **21. tjedan**
- 7) Kromatogram ukupne ionske struje uzorka poslijesmrtne krvi s karakterističnim signalima etanola i butanola- izmjereno **30. tjedan**

4.5. Usporedba dobivenih rezultata u uzorcima poslijesmrtne krvi, jednake vrijednosti etanola, pohranjenim u različitim volumenima

Na slikama 20-24, prikazane su usporedbe ionskih kromatograma dobivenih GC/FID analizom etanola u biološkim uzorcima poslijesmrtne krvi, pohranjenih u različitim volumenima te proučavanih u vremenskom razdoblju od šest mjeseci. Uspoređeni su uzorci iste masene koncentracije etanola (1 g/kg), pohranjeni s i bez dodatka antikoagulansa u spremnike manjeg - 1 mL (A1 i BA2) i većeg volumena - 15 mL (A2 i BA2).

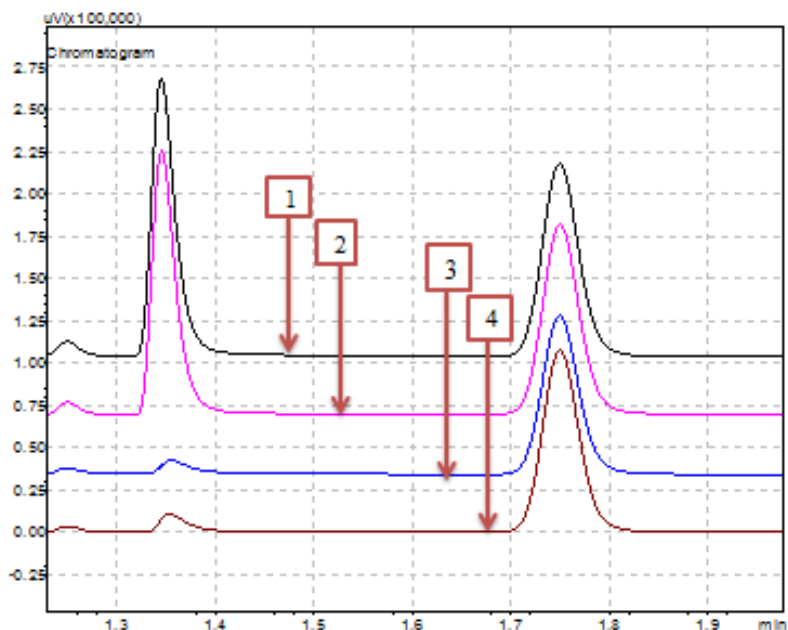
Na slici 20, uspoređeni su dobiveni kromatogrami uzoraka poslijesmrtne krvi s masenom koncentracijom etanola 1 g/kg, izmjerene 4. tjedan, pohranjeni u spremnicima većeg (15 mL) i manjeg (1 mL) volumena.



Slika 20. Usporedba rezultata dobivenih mjerenjem kratkotrajne stabilnosti četiri uzorka poslijesmrtne krvi, masene koncentracije etanola **1 g/kg**, analiziranih GC/FID tehnikom (Rt etanola= 1.35, Rt butanola=1.75).

- 1) Kromatogram ukupne ionske struje uzorka poslijesmrtne krvi (pohranjenog **bez dodatka antikoagulansa u volumenu 15 mL - BA2**) s karakterističnim signalima etanola i butanola, izmjereno 4. tjedan
- 2) Kromatogram ukupne ionske struje uzorka poslijesmrtne krvi (pohranjenog **s dodatkom antikoagulansa u volumenu 15 mL - A2**) s karakterističnim signalima etanola i butanola, izmjereno 4. tjedan
- 3) Kromatogram ukupne ionske struje uzorka poslijesmrtne krvi (pohranjenog **s dodatkom antikoagulansa u volumenu 1 mL - A1**) s karakterističnim signalima etanola i butanola, izmjereno 4. tjedan
- 4) Kromatogram ukupne ionske struje uzorka poslijesmrtne krvi (pohranjenog **bez dodatka antikoagulansa u volumenu 1 mL - BA1**) s karakterističnim signalima etanola i butanola, izmjereno 4. tjedan

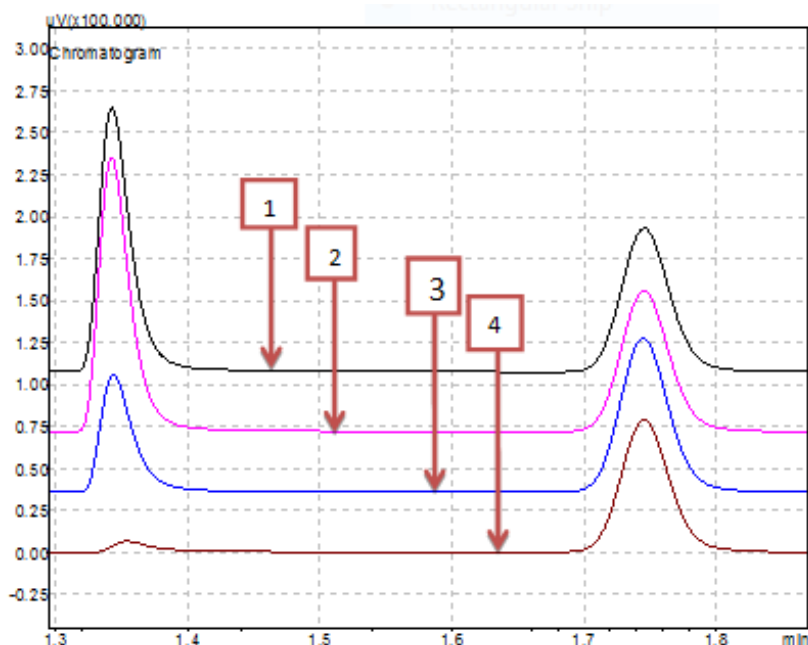
Na slici 21, uspoređeni su dobiveni kromatogrami uzoraka poslijesmrtne krvi s masenom koncentracijom etanola 1 g/kg, izmjerene 15. tjedan, pohranjeni u spremnicima većeg (15 mL) i manjeg (1 mL) volumena.



Slika 21. Usporedba rezultata dobivenih mjerenjem kratkotrajne stabilnosti četiri uzorka poslijesmrtne krvi, masene koncentracije etanola **1 g/kg**, analiziranih GC/FID tehnikom (Rt etanola= 1.35, Rt butanola=1.75).

- 1) Kromatogram ukupne ionske struje uzorka poslijesmrtne krvi (pohranjenog **bez dodatka antikoagulansa u volumenu 15 mL – BA2**) s karakterističnim signalima etanola i butanola, izmjereno 15. tjedan
- 2) Kromatogram ukupne ionske struje uzorka poslijesmrtne krvi (pohranjenog **s dodatkom antikoagulansa u volumenu 15 mL – A2**) s karakterističnim signalima etanola i butanola, izmjereno 15. tjedan
- 3) Kromatogram ukupne ionske struje uzorka poslijesmrtne krvi (pohranjenog **bez dodatka antikoagulansa u volumenu 1 mL – BA1**) s karakterističnim signalima etanola i butanola, izmjereno 15. tjedan
- 4) Kromatogram ukupne ionske struje uzorka poslijesmrtne krvi (pohranjenog **s dodatkom antikoagulansa u volumenu 1 mL – A1**) s karakterističnim signalima etanola i butanola, izmjereno 15. tjedan

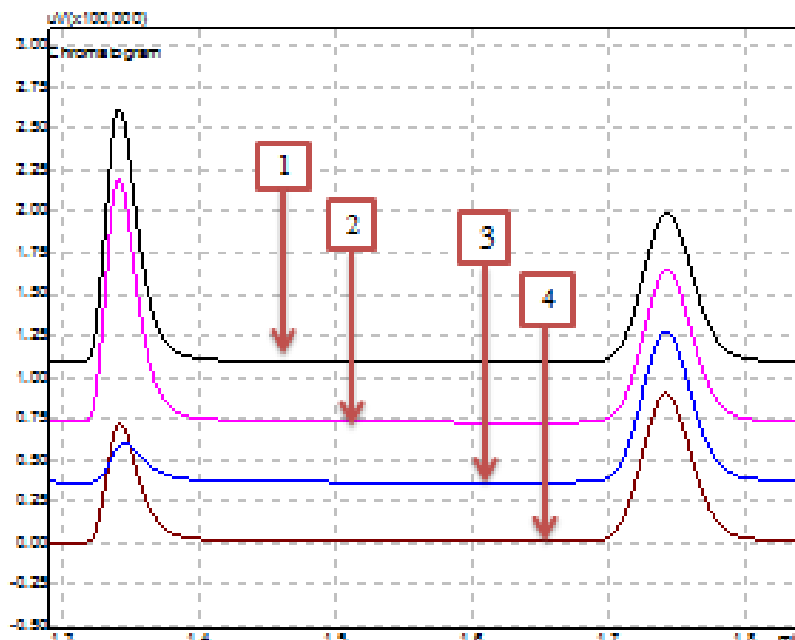
Na slici 22, uspoređeni su dobiveni kromatogrami uzoraka poslijesmrtne krvi s masenom koncentracijom etanola 1 g/kg, izmjerene 7. tjedan, pohranjeni u spremnicima većeg (15 mL) i manjeg (1 mL) volumena.



Slika 22. Usporedba rezultata dobivenih mjerenjem kratkotrajne stabilnosti četiri uzorka poslijesmrtne krvi, masene koncentracije etanola **1 g/kg**, analiziranih GC/FID tehnikom (Rt etanola= 1.35, Rt butanola=1.75).

- 1) Kromatogram ukupne ionske struje uzorka poslijesmrtne krvi (pohranjenog s **dodatkom antikoagulansa u volumenu 15 mL – A2**) s karakterističnim signalima etanola i butanola, izmjereno 7. tjedan
- 2) Kromatogram ukupne ionske struje uzorka poslijesmrtne krvi (pohranjenog **bez dodatka antikoagulansa u volumenu 15 mL – BA2**) s karakterističnim signalima etanola i butanola, izmjereno 7. tjedan
- 3) Kromatogram ukupne ionske struje uzorka poslijesmrtne krvi (pohranjenog s **dodatkom antikoagulansa u volumenu 1 mL – A1**) s karakterističnim signalima etanola i butanola, izmjereno 7. tjedan
- 4) Kromatogram ukupne ionske struje uzorka poslijesmrtne krvi (pohranjenog **bez dodatka antikoagulansa u volumenu 1 mL – BA1**) s karakterističnim signalima etanola i butanola, izmjereno 7. tjedan

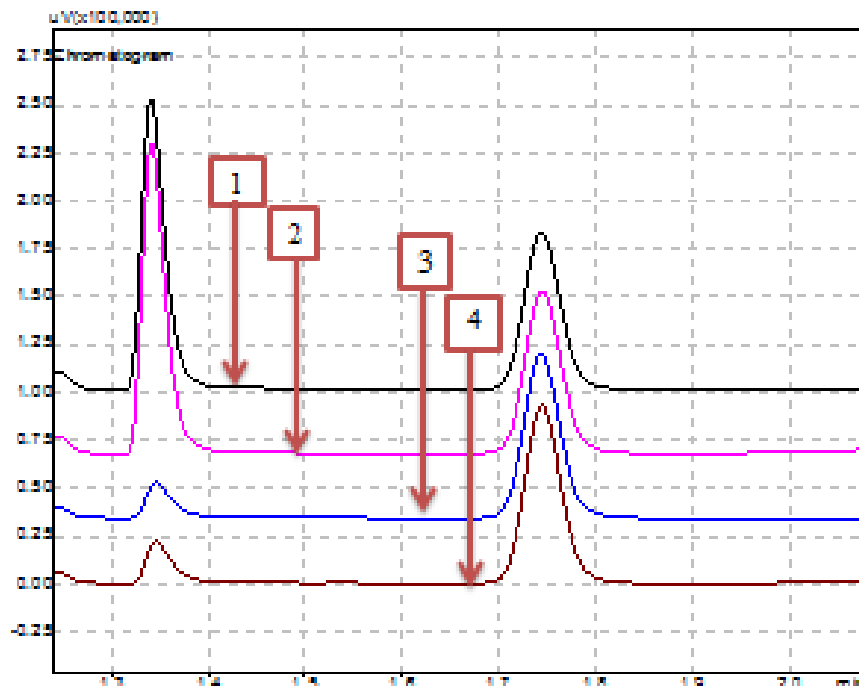
Na slici 23, uspoređeni su dobiveni kromatogrami uzorka poslijesmrtne krvi s masenom koncentracijom etanola 1 g/kg, izmjerene 21. tjedan, pohranjeni u spremnicima većeg (15 mL) i manjeg (1 mL) volumena.



Slika 23. Usporedba rezultata dobivenih mjerenjem kratkotrajne stabilnosti četiri uzorka poslijesmrtne krvi, masene koncentracije etanola **1 g/kg**, analiziranih GC/FID tehnikom (Rt etanola= 1.35, Rt butanola=1.75).

- 1) Kromatogram ukupne ionske struje uzorka poslijesmrtne krvi (pohranjenog **bez dodatka antikoagulansa u volumenu 15 mL – BA2**) s karakterističnim signalima etanola i butanola, izmjereno 21. tjedan
- 2) Kromatogram ukupne ionske struje uzorka poslijesmrtne krvi (pohranjenog **s dodatkom antikoagulansa u volumenu 15 mL – A2**) s karakterističnim signalima etanola i butanola, izmjereno 21. tjedan
- 3) Kromatogram ukupne ionske struje uzorka poslijesmrtne krvi (pohranjenog **bez dodatka antikoagulansa u volumenu 1 mL – BA1**) s karakterističnim signalima etanola i butanola, izmjereno 21. tjedan
- 4) Kromatogram ukupne ionske struje uzorka poslijesmrtne krvi (pohranjenog **s dodatkom antikoagulansa u volumenu 1 mL – A1**) s karakterističnim signalima etanola i butanola, izmjereno 21. tjedan

Na slici 24, uspoređeni su dobiveni kromatogrami uzoraka poslijesmrtne krvi s masenom koncentracijom etanola 1 g/kg, izmjerene posljednjeg 30. tjedna, pohranjeni u spremnicima većeg (15 mL) i manjeg (1 mL) volumena.



Slika 24. Usporedba rezultata dobivenih mjerenjem kratkotrajne stabilnosti četiri uzorka poslijesmrtne krvi, masene koncentracije etanola **1 g/kg**, analiziranih GC/FID tehnikom (Rt etanola= 1.35, Rt butanola=1.75).

- 1) Kromatogram ukupne ionske struje uzorka poslijesmrtne krvi (pohranjenog **bez dodatka antikoagulansa u volumenu 15 mL – BA2**) s karakterističnim signalima etanola i butanola, izmjereno 30. tjedan
- 2) Kromatogram ukupne ionske struje uzorka poslijesmrtne krvi (pohranjenog **s dodatkom antikoagulansa u volumenu 15 mL – A2**) s karakterističnim signalima etanola i butanola, izmjereno 30. tjedan
- 3) Kromatogram ukupne ionske struje uzorka poslijesmrtne krvi (pohranjenog **bez dodatka antikoagulansa u volumenu 1 mL – BA1**) s karakterističnim signalima etanola i butanola, izmjereno 30. tjedan
- 4) Kromatogram ukupne ionske struje uzorka poslijesmrtne krvi (pohranjenog **s dodatkom antikoagulansa u volumenu 1 mL – A1**) s karakterističnim signalima etanola i butanola, izmjereno 30. tjedan

5. RASPRAVA

Uzorci poslijesmrtne krvi, pohranjeni u različitim volumenima spremnika, pokazali su različite rezultate eksperimentalnim mjerenjima. Naime, kao što je vidljivo iz rezultata (Slike 16 i 17; tablice 5 i 6), veće promjene u stabilnosti koncentracije etanola uočene su u uzorcima poslijesmrtne krvi pohranjene u malim epruветama volumena 1 mL, tijekom vremenskog razdoblja od 6 mjeseci (30 tjedana). Kao izuzetci od navedenih rezultata ističu se uzorci analizirani 4. tjedan, u kojem je koncentracija etanola ipak pokazala određenu stabilnost (Slika 20). Posebno su interesantni rezultati dobiveni analizom uzoraka pohranjenim u spremnicima manjeg volumena, jer su u suprotnosti s onima dobivenim analizom uzoraka u spremnicima većeg volumena, ispunjenim do vrha (Slike 18 i 19). Kod takvih je uzoraka došlo do minimalne promjene vrijednosti etanola, bez obzira jesu li pohranjeni s ili bez antikoagulansa, čime su pokazali veću stabilnost.

Cilj ove studije bio je odrediti kratkotrajnu stabilnost etanola, koja podrazumijeva vremensko razdoblje od 6 mjeseci, u poslijesmrtnim uzorcima krvi. Određivanje koncentracije etanola u biološkim uzorcima jedna je od glavnih zadaća toksikoloških analiza. Prema zakonskoj regulativi uzorci trebaju biti pohranjeni barem 6 mjeseci od prve analize [38] kako bi se očuvala početna vrijednost i održala stabilnost, te radi potrebe ponavljanja analiza zatraženih od suda, utvrđivanja vjerodostojnosti inicijalnih rezultata ili zbog novih saznanja u istrazi. [41, 8].

Usporedbom rezultata uzoraka jednake masene koncentracije etanola (1 g/kg), pohranjenih u spremnicima različitih volumena (1 mL i 15 mL), ispitivanih 4., 7., 15., 21. i 30. tjedan, uočena je veća stabilnost i sljedivost kod uzoraka pohranjenih u spremnicima većeg volumena (Slike 20-24).

Moguće je promjene vrijednosti etanola objasniti utjecajem postotka zraka u spremniku (*engl.* chamber air, CA%) na pohranjene uzorke. [21] Kod uzoraka pohranjenih u spremnicima većeg volumena došlo je do manje degradacije etanola, budući da je spremnik bio ispunjen do vrha, te je stoga utjecaj ventilacije (CA%) sveden na minimum. Stojiljkovic i suradnici [21] su u svome radu došli do zaključka kako s porastom postotka zraka u spremniku uzorka (CA%) raste i gubitak koncentracije etanola s vremenom, te su ga prepisali mehanizmu gubitka alkohola zbog ventilacije između tekuće i plinovite faze, što je također mogao biti jedan od faktora koji je utjecao na promjene u koncentraciji etanola naših uzoraka. No, osim ventilacije pretpostavili su

postojanje i drugih mehanizama gubitka alkohola kao što je neenzimska reakcija oksidacije oksihemoglobinom iz eritrocita, koji je proces neovisan o CA%.

Također, ljudski čimbenici, odnosno neprikladno rukovanje uzorcima i priprema uzoraka za analizu, mogu uzrokovati nepravilnu raspodjelu etanola u uzorcima poslijesmrtne krvi što dovodi do nepouzdanih rezultata. Dosadašnja istraživanja uglavnom upućuju na utjecaj pred-analitičkih čimbenika kao uzrok pogrešaka, što je pojam koji definira sve ono što dolazi prije faze analize uzoraka. Han i suradnici, u svom su istraživanju zaključili da, bez obzira koje se promjene odvijaju na molekularnoj razini, miješanje uzoraka može ubrzati te promjene i omogućiti njihov završetak prije početka same analize, stvarajući homogenu molekularnu strukturu te dajući postojanije i pouzdanije rezultate. [42] Dakle, upravo proces miješanja može otkloniti problem promjena u stabilnosti bioloških uzoraka tijekom pohrane.

Jedan od ciljeva ove studije bio je usporediti dobivene rezultate u pohranjenim poslijesmrtnim uzorcima krvi s i bez dodanog antikoagulansa. Ipak, iz prikazanih rezultata uočeno je da ne postoji razlika u kratkotrajnoj stabilnosti etanola tijekom svih 6 mjeseci pohrane uzoraka poslijesmrtne krvi u koje je dodan antikoagulans (2% NaF), u odnosu na one bez dodanog antikoagulansa (Tablica 5 i 6), neovisno o volumenu spremnika uzoraka (Slike 16-19). Stoljković i suradnici u svojim su rezultatima pokazali kako konzervansi (NaF), dodani u biološke uzorke krvi, nisu nužno ključan čimbenik za poboljšanje stabilnosti. [21] Sudeći prema našim rezultatima (Slike 22 i 23) dobivenim iz uzoraka pohranjenih u manjim spremnicima, u kojima je načelno koncentracija etanola bila nestabilna, ipak su uzorci iz spremnika s dodanim antikoagulansom dali bolje rezultate. Kod uzoraka pohranjenih u spremnicima većeg volumena, potvrđena je kratkotrajna stabilnost etanola, te utjecaj antikoagulansa na rezultate, nije uočen.

6. ZAKLJUČCI

1. Uzorci pohranjeni u spremnicima većeg volumena (15 mL) dali su bolju sljedivost rezultata te se pokazali stabilnijima u odnosu na one pohranjene u spremnicima manjeg volumena (1 mL).
2. Utjecaj antikoagulansa potvrđen je analizom uzoraka pohranjenih u spremnicima manjeg volumena, dok kod uzoraka pohranjenih u spremnicima većeg volumena nije uočen.
3. Kako bi se izbjegao utjecaj ventilacije na stabilnost uzoraka te smanjio utjecaj postotka zraka (*engl.* chamber air, CA%), preporučeno je koristiti do vrha ispunjene epruvete većeg volumena (15 mL), napravljene od stakla ili plastike.

7. POPIS CITIRANE LITERATURE

1. Katzung, Bertram G, Masters S.B, Trevor A.J. Basic & Clinical Pharmacology. New York: McGraw-Hill Medical, 2012.

2. URL: <http://www.cybermed.hr/clanci/alkoholizam> (pristup 23.04.2017.)

3. Ying YH, Wu CC, Chang K. The effectiveness of drinking and driving policies for different alcohol-related fatalities: a quantile regression analysis. *Int J Environ Res Public Health*. 46 (2013); 28–44.

4. URL: http://www.eurocare.org/resources/policy_issues/road_safety (pristup 22.04.2017.)

5. Sutlović D. Osnove forenzične toksikologije. Split: Redak; 2011.

6. URL: <http://safetyconsulting.be/drageralcohol.html> slika (22.04.2017.)

7. Kocak FE, Isiklar OO, Kocak H, Meral A. Comparison of blood ethanol stabilities in different storage periods. *Biochem Med. Zagreb*: 25 (2015); 1:57-63.

8. A.W. Jones. Are changes in blood–ethanol concentration during storage analytically significant? Importance of method imprecision. *Clin.Chem.Lab.Med*. 45 (2007); 1299–1304.

9. Veršić Bratinčević M. Sredstva ovisnosti u biološkim uzorcima: određivanje i stabilnost, doktorska disertacija. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu; 2015.

10.URL:https://www.researchgate.net/publication/278652355_Neurobiology_of_Alcohol_Addiction (pristup 28.04.2017.)

11. Verbanac D, Stepanić V. Novi pogled na istraživanje lijekova - nove formulacije i kombinacije. *Farmaceutski tehničar: stručno informativni časopis farmaceutskih tehničara Hrvatske*. 63 (2013); 7-12 .

12.URL:http://www.pharmpress.com/files/docs/clinical_pharmacokinetics_samplechapter.pdf (pristup 27.06.2017.)

13.URL:http://www.merckmanuals.com/vet/toxicology/toxicology_introduction/absorption_distribution_metabolism_and_excretion.html (pristup 27.06.2017.)

14.URL:<http://apotential.wordpress.com/2010/11/02/death-march-of-pharmacology> (pristup: 26.06.2017.)

15. Carroll FT, Marraccini JV, Lewis S, Wright W. Morphine-3-D Glucuronide Stability in Postmortem Specimens Exposed to Bacterial Enzymatic Hydrolysis, *Am. J. Forensic Med. Pathol.* 21 (2000) 323-329.

16. Negrusz A, Cooper G. Clarke's analytical forensic toxicology. Pharmaceutical Press, London. 2013. Vol. 2, p. 633.

17. Stojiljkovic G. et al. Ethanol Concentration Changes in Blood Samples During Medium-Term Refrigerated Storage, *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2016. 20:(23), 4831-4836.

18. Houghton J, Wratherwax S, Ferrell J. Breaking the Biological Barriers to Cellulosic Ethanol: A Joint Research Agenda, A Research Roadmap Resulting from the Biomass to Biofuels Workshop, Report from the December 2005 Workshop, DOE/SC-0095. U.S. Department of Energy Office of Science.

19.URL:https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q1A_R2/Step4/Q1A_R2__Guideline.pdf (pristup: 12.9.2017.)

20.URL:<http://www.tiaft.org/data/uploads/documents/tiaft-sta-recommendations-on-sample-preparation.pdf> (pristup: 27.06.2017.)

21. Drummer OH. Requirements for bioanalytical procedures in postmortem toxicology, *Anal. Bioanal. Chem.* 388 (2007) 1495-1503.

-
22. Skopp G. Preanalytic aspects in postmortem toxicology, *Forensic Sci. Int.* 142 (2004) 75-100.
23. Karch SB. *Postmortem toxicology of abused drugs.* CRC Press, Taylor & Frances Group, Boca Raton. 2008, p.13–26.
24. Kraemer T, Paul LD. Bioanalytical procedures for determination of drugs of abuse in blood, *Anal. Bioanal. Chem.* 388 (2007) 1415-35.
25. Plueckhahn VD. The evaluation of autopsy blood alcohol levels, *Med. Sci. Law.* 8 (1968) 168-176.
26. Vaught JB, Henderson MK. Biological sample collection, processing, storage and information management. *IARC Sci Publ.* 163 (2011); 23-42.
27. Flanagan RJ, Connally G, Evans JM. Analytical toxicology: guidelines for sample collection postmortem, *Toxicol. Rev.* 24 (2005) 63-71.
28. Jones AW, Ericsson E. Decreases in blood ethanol concentrations during storage at 4°C for 12 months were the same for specimens kept in glass or plastic tubes, Elsevier (2016.), volume 4, p. 76-81.
29. Peters FT. Stability of analytes in biosamples - an important issue in clinical and forensic toxicology? *Anal Bioanal Chem.* 388 (2007) 1505-1519.
30. URL:http://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2014_07_86_1723.html
(pristup:29.06.2017.)
31. Drummer OH. Postmortem toxicology of drugs of abuse, *Forensic Sci. Int.* 142 (2004) 101-113.

-
32. Moriya F, Hashimoto Y. Comparative studies on tissue distributions of organophosphorus, carbamate and organochlorine pesticides in decedents intoxicated with these chemicals, *J. Forensic Sci.* 44 (1999) 1131-1135.
33. Chace DH. i sur. Electrospray tandem mass spectrometry for analysis of acylcarnitines in dried postmortem blood specimens collected at autopsy from infants with unexplained cause of death, *Clin. Chem.* 47 (2001) 1166-82.
34. URL: <https://petraratajc.com/2017/03/18/gcms/> slika (pristup 03.05.2017.)
35. URL: http://www.aga.lt/internet.lg.lg.ltu.lt/images/AGA%20HIQ%20Flame%20Ionization%20Detector%20Ddatasheet%20UK619_102263.pdf?v=1.0 (pristup 13.06.2017.)
36. URL: <https://www.sepscience.com/Techniques/GC/Articles/208-/GC-Solutions-11-The-Flame-Ionization-Detector> (pristup 13.06.2017.)
37. McWilliam IG, Dewar RA. Flame Ionization Detector for Gas Chromatography. *Nature.* 181 (4611):760.
38. Halász I., Schneider W. Quantitative Gas Chromatographic Analysis of Hydrocarbons with Capillary Column and Flame Ionization Detector. *Analytical Chemistry.* 1961. 33(8):978–982.
39. URL: <http://www.ncids.com/forensic/drugs/toxicology.shtml> slika (pristup 12.06.2017.)
40. URL: <http://www.biocompare.com/12536-Gas-Chromatographs-Gas-Chromatography-Systems/1064690-GC2010-Plus-Gas-Chromatograph/> slika (pristup 18.07.2017.)
41. Sutlovic D, Nestic M, Kovacic Z, Gusic S, Mlinarek T, Salamunic I, Sardelic S. Microbial ethanol production in postmortem urine sample. *Med Sci Law.* 2013 Oct; 53(4): 243-6.

42. Han X, McShane M, Sahertian R, White C, Ledger W. Pre-mixing serum samples with assay buffer is a prerequisite for reproducible anti-Mullerian hormone measurement using the Beckman Coulter Gen II assay. *Hum Reprod.* May, 2014. 29(5):1042-8.



8. SAŽETAK

NASLOV RADA:

Određivanje kratkotrajne stabilnosti koncentracije etanola u uzorcima krvi

CILJEVI ISTRAŽIVANJA:

Ispitati kratkotrajnu stabilnost etanola u poslijesmrtim uzorcima krvi, pohranjenim na -20°C , korištenjem GC/FID metode u vremenskom razdoblju od 6 mjeseci, usporediti dobivene rezultate u pohranjenim poslijesmrtim uzorcima krvi sa i bez dodanog antikoagulansa te usporediti dobivene rezultate i procijeniti stabilnost poslijesmrtih uzoraka krvi pohranjenih u spremnicima različitih volumena.

USTROJ ISTRAŽIVANJA:

eksperimentalna studija

MJESTO ISTRAŽIVANJA:

Kemijsko-toksikološki laboratorij Kliničkog odjela za sudsku medicinu Zavoda za patologiju, sudsku medicinu i citologiju, Kliničkog bolničkog centra u Splitu.

MATERIJALI I METODE:

Za vrijeme obdukcije izuzeti su poslijesmrti uzorci krvi, u kojima se kontrolnom analizom dokazala negativnost na alkohole. U polovinu cjelokupnog volumena krvi (V2) dodano je 2% antikoagulansa- NaF, dok je druga polovina (V1) pohranjena bez antikoagulansa. Tako podijeljeni uzorci alikvotirani su u spremnike manjeg (A1 i BA1) i većeg volumena (A2 i BA2), te pohranjeni na -20°C . Uzorci pohranjeni u manjem volumenu (1 mL) sadržavali su različite vrijednosti etanola: 0.5, 1, 1.5 i 2.5 g/kg, dok su uzorci pohranjeni u do vrha ispunjene epruvete većeg volumena (15 mL), sadržavali vrijednost etanola 1 g/kg. Nakon analize standardnih otopina etanola i izrade umjerne krivulje, pripremljeni su uzorci za kvantitativno određivanje koncentracije alkohola dodatkom 1 mL terciarnog butanola, internog standarda, i 300 μL uzorka poslijesmrtne krvi u staklenu bočicu s magnetiziranim čepom. Stabilnost alkohola navedenih uzoraka krvi ispitivana je ponovljenom analizom istih uzoraka nakon pohrane tijekom šest mjeseci (30 tjedana), koristeći se GC/FID tehnikom. Ukupno je provedeno devet analiza.

REZULTATI:

GC/FID analizom uspješno je određena kratkotrajna stabilnost etanola poslijesmrtnih uzoraka pohranjenih u spremnicima većeg volumena (15 mL) u kojima je uočena veća stabilnost i sljedivost, u odnosu na poslijesmrtne uzorke pohranjene u spremnicima manjeg volumena (1 mL). Utvrđeno je da ne postoji razlika u kratkotrajnoj stabilnosti etanola tijekom svih 6 mjeseci pohrane uzoraka poslijesmrtne krvi u koje je dodan antikoagulans (2% NaF), u odnosu na one bez dodanog antikoagulansa, neovisno o volumenu spremnika uzoraka. Sudeći prema našim rezultatima dobivenim iz uzoraka pohranjenih u manjim spremnicima, u kojima je načelno koncentracija etanola bila nestabilna, ipak su uzorci iz spremnika s dodanim antikoagulansom dali bolje rezultate. Kod uzoraka pohranjenih u spremnicima većeg volumena, potvrđena je kratkotrajna stabilnost etanola, te utjecaj antikoagulansa na rezultate, nije uočen.

ZAKLJUČAK:

Kvantitativnom analizom bioloških uzoraka poslijesmrtne krvi, koristeći GC/FID tehniku, uspješno je određena kratkotrajna stabilnost etanola. Uzorci pohranjeni u spremnicima većeg volumena (15 mL) dali su bolju sljedivost rezultata te se pokazali stabilnijima u odnosu na one pohranjene u spremnicima manjeg volumena (1 mL). Utjecaj antikoagulansa potvrđen je analizom uzoraka pohranjenih u spremnicima manjeg volumena, dok kod uzoraka pohranjenih u spremnicima većeg volumena nije uočen. Kako bi se izbjegao utjecaj ventilacije na stabilnost uzoraka te smanjio utjecaj postotka zraka (*engl.* chamber air, CA%), preporučeno je koristiti do vrha ispunjene epruvete većeg volumena (15 mL), napravljene od stakla ili plastike.



9. SUMMARY

DIPLOMA THESIS TITLE:

Determination of short-term stability of ethanol in blood samples

OBJECTIVES:

Investigate the short-term stability of ethanol in post-mortem blood samples stored at -20°C using a GC / FID method over a 6-month period, to compare the results obtained with stored post-mortem blood samples with and without added anticoagulants and to compare the results obtained and evaluate the stability of post-mortem blood samples stored in containers of different volumes.

DESIGN:

Experimental study

SETTINGS:

Laboratory of toxicology, Department of pathology, forensic medicine and cytology, University Hospital of Split.

MATERIALS AND METHODS:

Post-mortem blood samples were excluded during autopsy, and the control analysis proved them to be negative for alcohol. In the half of the total volume of blood (V2) was added 2% of anticoagulant NaF, while the other half (V1) was stored without anticoagulant for comparison of changes in stability of ethanol concentration with and without the addition of anticoagulants. Divided samples were aliquoted into a smaller (A1- with anticoagulant and BA1- without anticoagulant) and larger volume (A2- with anticoagulant and BA2- without anticoagulant), and stored at -20°C . Samples stored at a lower volume (1 mL) contained different ethanol concentrations: 0.5, 1, 1.5 and 2.5 g/kg, while the samples stored in the larger volume (15 mL), filled up to the top of the tube, were containing 1 g/kg concentration of ethanol. After analyzing standard ethanol solutions and making calibration curves, samples were prepared for quantitative determination of alcohol concentration by adding 1 mL tertiary butanol, internal standard, and 300 μL of post-mortem blood sample to a glass container with a magnetized cap. The stability of the alcohol in the blood samples was investigated by repeated analysis of the same samples after storage for six months (30 weeks), using GC / FID technique in the KBC Split Laboratory of toxicology. In total, nine analyzes were conducted,

which took time in the following order: day 0, week 1, week 2, week 4, week 7, week 11, week 15, week 21 and week 30.

RESULTS:

GC/FID analysis was successfully used to determine the short-term stability of the ethanol in the post-mortem samples which were stored in larger volumes (15 mL) and showed greater stability and traceability compared to a post-mortem samples stored in smaller volumes (1 mL). It was found that there was no difference in the short-term stability of ethanol during all 6 months of post-mortem blood samples storage in which the anticoagulants (2% NaF) were added, compared to those without added anticoagulants, desregardnig of the sample tank volume. Judging by our results obtained from samples stored in smaller containers, in which the ethanol concentration was generally unstable, however, the samples from the containers with the added anticoagulant showed better results. The short-term stability of ethanol was verified in the samples stored in the larger volumes, and the effect of anticoagulants on the results was not observed.

CONCLUSION:

Short-term stability of ethanol was successfully determined by quantitative analysis of biological samples of post-mortem blood, using GC / FID technique. Samples stored in larger volumes (15 mL) gave better traceability of the results and proved to be more stable compared to those stored in smaller volumes (1 mL). The effect of anticoagulant was confirmed by the analysis of samples stored in smaller volumes, while it was not detected in samples stored in larger volumes. In order to avoid the effect of ventilation on the stability of the samples and to reduce the effect of the air intake ("chamber air", CA%), it is recommended to use containers (filled up to the top) with larger volumes (15 mL), made of glass or plastic.



10. ŽIVOTOPIS

Fani Katinac rođena je 17. kolovoza 1993. godine u Splitu. S odličnim uspjehom završava Osnovnu školu Manuš te Prvu jezičnu gimnaziju u Splitu. 2012. godine upisuje Integrirani preddiplomski i diplomski studij Farmacije Sveučilišta u Splitu. Tijekom studija učlanjuje se u Udrugu studenata farmacije i medicinske biokemije Hrvatske (CPSA). Od ožujka do rujna 2017. godine odrađuje stručno osposobljavanje u Ljekarnama Splitsko-dalmatinske županije, u ljekarničkoj jedinici Dobri. Tečno govori, piše i služi se engleskim i njemačkim jezikom.