

A case study on the fire victim in the vehicle by GC/MS through derivatization of cyanide with pentafluorobenzyl bromide (PFBBr)

Joon-Bae Lee¹ ★, Sung Kun Shon², Sang Hee Woo³, Se Yeon Park³, Jung Ho Hwang³,
O-Seong Kwon¹, Nam Yi Kim¹ and Ki Jung Paeng³

¹Department of Forensic Chemistry, National Forensic Service, Wonju 26460, Korea

²Department of Forensic Science, Daejeon Health Institute of Technology, Daejeon 34504, Korea

³Daegu District Office, National Forensic Service, Chilgok 39872, Korea

⁴Department of Chemistry, Yonsei University, Wonju 26493, Korea

(Received November 12, 2015; Revised February 3, 2016; Accepted February 7, 2016)

시안화이온의 pentafluorobenzyl bromide (PFBBr)에 의한 유도체화 후 GC/MS 분석에 의한 차량화재 변사체 사인규명에 관한 사례연구

이준배¹ ★ · 손성건² · 우상희³ · 박세연³ · 황정호³ · 권오성¹ · 김남이¹ · 팽기정⁴

¹국립과학수사연구원 법화학과, ²대전보건대학교 과학수사과,
³국립과학수사연구원 대구과학수사연구소, ⁴연세대학교 화학과
(2015. 11. 12. 접수, 2016. 2. 3. 수정, 2016. 2. 7. 승인)

Abstract: Hydrogen cyanide (HCN) is an extremely toxic gas frequently produced during the incineration of plastics, such as acrylonitrile-butadiene-styrene (ABS). A victim of a fire who has inhaled smoke could have cyanide in the blood. Therefore, cyanide could be a good marker for a post-mortem examination of a fire as well as carboxyhemoglobine (COHb) test of blood samples. For a particular fire case, a burned body with a suicide note was found inside a burned vehicle. Even though the COHb value is conclusive evidence, measuring the COHb for denatured blood might be difficult due to severe thermal denaturation or the formation of methemoglobin (MetHb). To overcome this difficulty, cyanide could be used as an indicator when investigating the death of a fire victim. In this study, gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) was adopted to measure the levels of cyanide in the blood through derivatization with pentafluorobenzyl bromide (PFBBr) under cation surfactant by scan and SIM mode. The concentration of cyanide in the blood of heart blood and brain of the victim was found to be 0.36 µg/mL and 1.20 µg/mL respectively, which was higher than the average value (0.041 µg/mL) found in the blood of 14 people who smoked.

요 약: 시안화수소는 ABS (acrylonitrile-butadiene-styrene) 등의 플라스틱류 화재시에 발생될 수 있는 유독성 기체이기에 시안화수소가 함유된 연기를 흡입하였을 경우 변사자의 혈액에서도 검출될 수 있다. 따라서 열기로 혈액 등의 생체시료의 손상정도가 강하여 일산화탄소-헤모글로빈 농도의 측정이 어려운 경

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)33-902-5221 Fax : +82-(0)33-902-5933

E-mail : pajlee@korea.kr

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

우 사인규명을 위한 지표로 활용될 수 있으리라 사료된다. 본 연구의 사례는 유서와 함께 화재가 발생한 차량내에서 발견된 번사체의 사인규명과 관련이 있다. 화재사의 경우 일산화탄소-헤모글로빈 농도가 결정적인 정보를 제공하지만 열기로 심하게 손상되어 이에 대한 측정이 어려워 시안화이온을 분석하고자 하였다. 시안화이온을 양이온계면활성제와 함께 pentafluorobenzyl bromide로 유도체화 시킨 다음 기체크로마토그래피/질량분석법으로 scan mode와 SIM mode로 분석하였다. 번사체 심혈과 뇌혈에서 시안화이온이 정상 흡연자 14인의 평균값(0.041 µg/mL)보다 높은 0.36 µg/mL 및 1.20 µg/mL 확인되었다.

Key words: fire victim, cyanide, pentafluorobenzyl bromide, gas chromatography/mass spectrometry

1. 서 론

일반적인 화재사에서의 사인규명은 혈중 일산화탄소-헤모글로빈 (CO-Hb) 농도를 파악하여 유추할 수 있다. 그러나 차량내부에서와 같이 협소한 공간에서 발생한 화재시, 화염의 급격한 전파로 인한 쇼크가 발생 하였을 경우 일산화탄소-헤모글로빈 농도만으로는 판단이 어렵거나 혹은 강한 열기로 인하여 혈액 등의 생체시료 손상정도가 심하게 발생하게 되면 일산화탄소-헤모글로빈 농도 측정이 곤란하다. 이런 경우 비강이나 인후 등에서 매의 검출여부를 통하여 간접적으로 유추가 가능하기는 하지만 내부공간이 협소한 차량 내부를 구성하는 수지류의 연소 낙하물 등이 비산되어 호흡을 방해하였을 경우 인후에서 매의 검출여부만으로는 판단이 어려울 수가 있다.

본 사례는 차량내 화재사에 관한 것으로, 생체조직이 열기에 의해 고도로 손상되어 일산화탄소-헤모글로빈 농도의 측정이 곤란하였을 때 ABS (acrylonitrile-butadiene-styrene)계 수지 등의 차량 내장재 연소시 발생한 시안화수소 (HCN)¹ 가스 흡입여부² 기체크로마토그래피/질량분석법 (GC/MS)으로 시안이온 (CN⁻)을 분석하여 규명하고자 하였다. 시안화이온의 통상적인 분석방법은 혈액 등의 생체시료에 대하여 미세화산시켜³ 염기성 용액으로 흡수시킨 후에 발색과정을 거친 다음 비색법을 통한 분광광도법 (UV/Vis)⁴을 이용하거나 이온크로마토그래피법 (IC)^{5,6}을 통하여 분석하는 것이 알려져 있다. 그러나 비색법의 경우 시안화

이온뿐만 아니라 다른 산성기체에 의한 방해여부 또한 배제할 수 없으며 이온크로마토그래피법의 경우 전기화학적 검출기를 통한 머무름시간 (retention time)에 의한 판단만으로 이루어진다. 본 연구에서는 Kage⁷ 등에 의해 소개된 황화이온 (S²⁻)의 분석법을 적용하여 Fig. 1과 같이 시안화이온 (CN⁻)을 pentafluorobenzyl bromide (PFBBR)을 이용한 alkylation에 의해 pentafluorobenzyl cyanide (PFBCN)로 전환하여 GC/MS로 분석하고자 하였다.

2. 실험방법

2.1. 시약 및 실험장비

시안화이온 표준품으로 potassium cyanide (KCN)을 이용하였고 유도체화 시약과 내부표준물질 (internal standard, IS)은 pentafluorobenzyl bromide (PFBBR)와 1,3,5-tribromobenzene (TBB)를 각각 사용하였으며 전처리시 사용한 계면활성제로는 benzyldimethylhexadecylammonium chloride (BDHC), cetyltrimethylammoniumbromide (CTMAB), diglycerol 및 sodium dodecyl sulfate (SDS) 등이 있고, pH 조절을 위하여 sodium tetraborate (Na₂B₄O₇) 등을 이용하였으며 이들은 Aldrich사로부터 구하였다. 추출을 위한 용제인 ethyl acetate (EA)와 표준용액 제조시 염기성을 유지하기 위한 sodium hydroxide (NaOH)는 Junsei사 제품을 이용하였다.

전처리를 위한 장비로 교반 및 추출용 vortex mixer와 원심분리기는 Vision Scientific의 기기를 이용하였고, Agilent Technologies의 7890B GC와 5977A MSD system 및 7693 Autosampler를 이용하여 분석하였다.

2.2. 실험

Kage 등에 의해 소개된 extractive alkylation 방법 중 시안화이온 분석을 최적화시키기 위한 계면활성제로

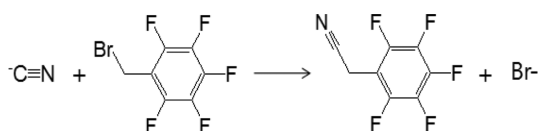


Fig. 1. The net reaction scheme of cyanide with PFBBR to produce PFBCN.

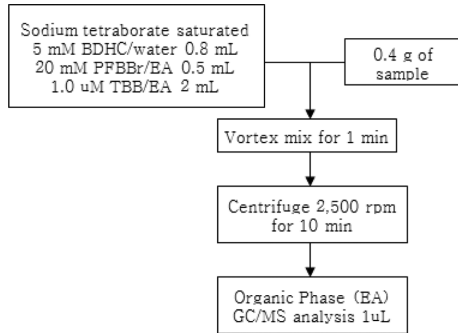


Fig. 2. Cyanide analysis diagram by GC/MS through extractive alkylation.

양이온계면활성제는 benzyldimethylhexadecyl ammonium chloride (BDHC)와 cetyltrimethyl ammonium bromide (CTMAB), 음이온계면활성제로는 sodium dodecyl sulfate (SDS), 비이온계면활성제로는 diglycerol에 대해 확인하였으며 아울러 추출시의 pH 영향을 알아보기 위해 sodium tetraborate ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$) 첨가여부에 대해 알아보았다. 표준용액으로는 시안화이온이 GC/MS (gas chromatography/mass spectrometry)로 확인되지 않는 0.1 M 수산화나트륨 (NaOH) 수용액에 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 되도록 표준원액을 준비하였으며 이를 시안화이온이 확인되지 않는 혈액을 sodium tetraborate 포화 수용액으로 5 배 희석하여 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 되도록 제조함으로써 검량선 작성에 사용하였다. 유도체화 시약인 pentafluorobenzyl bromide (PFBBr)은 ethyl acetate (EA)에 20 mM 되도록 하였고 내부표준물질은 1,3,5-tribromobenzene (TBB)이 1.0 μM 되도록 추출용제인 ethyl acetate (EA)에 제조하였으며 각각의 계면활성제는 5 mM 되도록 탈염수에 용해하였다. 분석은 Fig. 2에서와 같이 시료 0.4 g에

Table 1. GC/MS condition

Instrument	Condition
Injector temp.	250 °C
Split ratio	10 : 1
Transfer line temp.	280 °C
Carrier Gas	He 1.0 mL/min
Oven temp.	80 °C (3 min)→(10 °C/min)→280 °C (3 min)
Column	DB-5MS (0.25 mm i.d.× 0.25 μm film thickness× 30 m length)
Ion source temp.	230 °C

대하여 전처리한 다음 Table 1의 GC/MS 조건에서 scan mode로 확인하고 selected ion monitoring (SIM) mode로 정량하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 추출조건의 최적화

수용성 시료에 함유된 시안화이온을 유기층으로 이동시키기 위하여 phase transfer catalysis로 계면활성제가 사용되었으며 최적의 추출을 위한 계면활성제에 대하여 조사한 결과 양이온계면활성제가 양호한 결과를 보여주었다. 음이온이나 비이온계면활성제는 추출 효율을 보이지 않았다 (Fig. 3). 이로부터 유도체화 과정은 다음 Fig. 4에서와 같은 과정에 의해 진행된 것으로 사료된다. 아울러 양이온계면활성제 가운데 benzyldimethyl hexadecyl ammonium chloride (BDHC)가 더 우수한 결과를 보여 이를 사용하였으며 황화이온 분석에 적용된 것과 마찬가지로 계면활성제를 sodium tetraborate로 포화시킨 용액에 제조하였을 경우 더 나

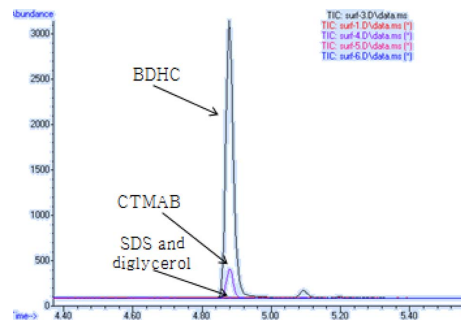


Fig. 3. GC/MS chromatogram in the selected ion monitoring (SIM) mode for the 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ cyanide standard with various surfactants.

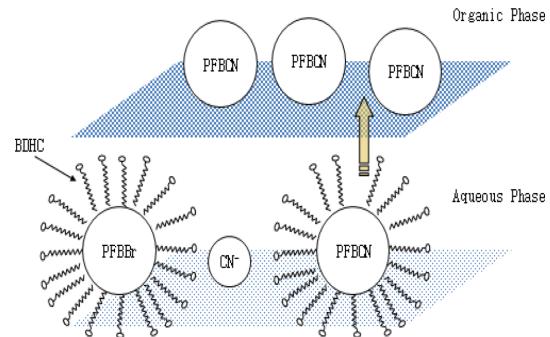


Fig. 4. Schematic diagram for the extractive alkylation of cyanide with PFBBr.

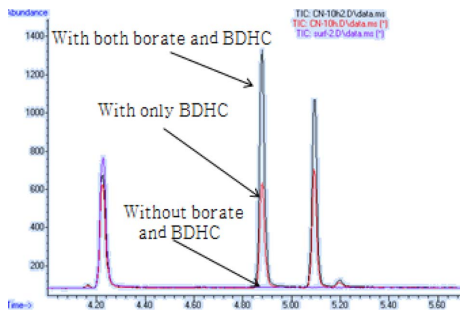


Fig. 5. GC/MS chromatogram in the selected ion monitoring (SIM) mode for the 10 $\mu\text{g/mL}$ cyanide standard solution with borate.

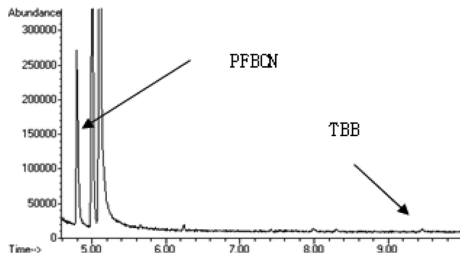


Fig. 6. Total ion chromatogram for the alkylated cyanide (PFBCN) of 25 $\mu\text{g/mL}$ cyanide solution and internal standard, tribromobenzene (TBB).

은 결과를 얻었다 (Fig. 5). 이는 시안화이온이 황화이온과 마찬가지로 약산성가스의 음이온으로서 시안화수소 (HCN)와 황화수소 (H_2S)의 pK_a 값이 각각 9.1과 7로 서로 유사한 값을 갖기 때문인 것으로 추정되었다.

3.2. 유도체화 및 GC/MS 분석

약산성 기체인 시안화수소 (HCN)의 짝염기인 시안화이온 (CN^-)에 대한 pentafluorobenzyl bromide (PFBBR)의 alkylation 반응은 pentafluorobenzyl ($\text{C}_6\text{F}_5\text{CH}_2-$) group에 형성되는 강력한 부분양전하로의 nucleophilic substitution 반응에 의해 진행되며 생성된 pentafluoro-

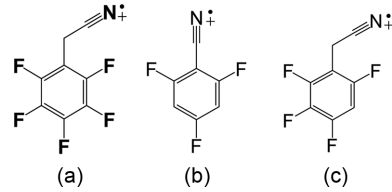


Fig. 8. Proposed structure for the ion of m/z 207 (a), m/z 157 (b) and m/z 188 in alkylated cyanide (PFBCN).

benzyl cyanide ($\text{C}_6\text{F}_5\text{CH}_2\text{CN}$)는 계면활성제의 작용으로 유기층으로 이동하여 안정화된다. 25 $\mu\text{g/mL}$ 의 시안화이온이 첨가된 혈액에 대한 GC/MS 분석결과 얻어진 chromatogram을 보면 Fig. 6의 머무름시간 (retention time) 약 4.8분에서 Fig. 7a)의 mass spectrum에서와 같이 m/z 207인 base ion과 함께 m/z 157 및 188인 이온을 나타내는 pentafluorobenzyl cyanide (PFBCN)이 확인되고 이로부터 각각의 이온구조는 Fig. 8과 같이 추정되었으며 내부표준물질인 tribromobenzene (TBB)에 대해서는 Fig. 7b)의 mass spectrum에서와 같이 머무름시간 약 9.4분에서 m/z 312, 314, 316 및 318 이온의 비가 약 1:3:3:1인 내부표준물질이 확인되었다.

3.3. 검량선 및 혈액 중 시안화이온 농도

유도체화된 시안화이온에 대하여 GC/MS 분석결과 얻어지는 mass spectrum에서 m/z 207인 이온이 base ion이기는 하지만, 분석에 사용된 DB-5MS 컬럼의 column breeding시 발생할 수 있는 m/z 207 이온의 방해롤 고려하여 m/z 157과 188인 이온을 정량에 사용하였다. 5 배로 희석된 혈액에 시안화이온이 0.1 $\mu\text{g/mL}$ ~2.5 $\mu\text{g/mL}$ 되도록 제조한 검량선 작성용 표준 시료에 대한 GC/MS 분석결과, 약 4.8분에서 확인되는 유도체화된 시안화이온의 m/z 157과 188인 이온을 약 9.4분에서 확인되는 내부표준물질의 m/z 314와

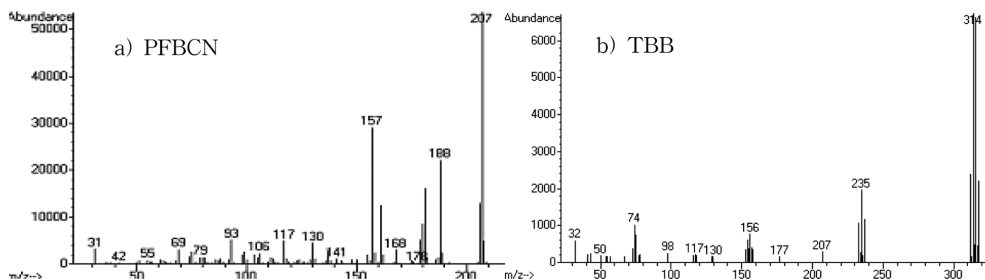


Fig. 7. Mass spectra of pentafluorobenzyl cyanide (PFBCN) a) and internal standard (TBB) b).

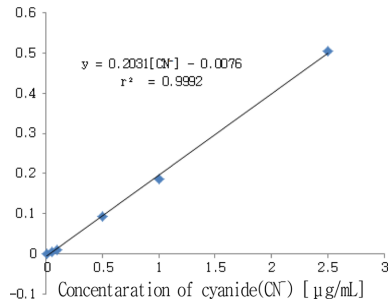


Fig. 9. Calibration curve plotted with the area ratio of the m/z 157 and 188 ions of alkylated cyanide and the m/z 314 and 316 ions of the internal standard (IS) against the cyanide concentration by GC/MS.

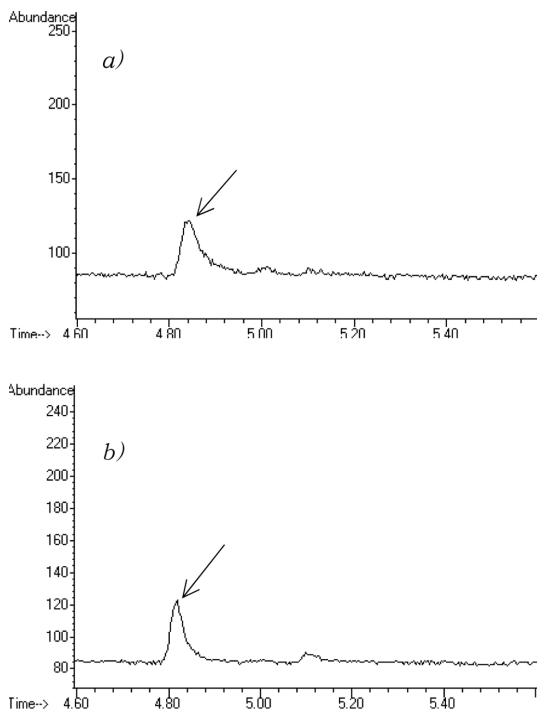


Fig. 10. GC/MS chromatogram for the heart a) and cerebral b) blood of the victim in selected ion monitoring (SIM) mode.

316인 이온에 대하여 면적비로 검량선을 작성한 결과 Fig. 9와 같았으며 r^2 값은 0.9992로 양호한 선형성을 보였다.

검출한계에 대해서는 노이즈에 대한 peak 높이의 3 배를 하였을 때 혈액에 0.01 µg/mL의 시안화이온을 함유한 혈액에 대하여 검출한계는 0.01 µg/mL인 것으로 확인되었다. Fig. 10에서와 같이 변사체 혈액에 대한 SIM mode에 의한 chromatogram에서 Fig. 9에 의

한 검량선을 적용하여 얻은 시안화이온의 농도는 심혈과 뇌혈에서 각각 0.36 µg/mL와 1.20 µg/mL 검출되었고 이는 정상 흡연자 14인의 평균값인 0.041 µg/mL⁸ 보다 현저히 높은 값인 것으로 보아 화재발생시 연기를 흡입하였을 것이라 추정할 수 있었다.

4. 결 론

차량내 화재로 사망한 변사체의 사인 규명시, 열기로 심하게 훼손된 혈액에서 일산화탄소-헤모글로빈 (CO-Hb) 농도의 측정이 어려울 수 있다. 따라서 본 연구에서는 차량 내장재의 주요 구성재료인 ABS 등의 플라스틱 연소시 함께 발생될 수 있는 시안화수소를 흡입하였을 경우 변사체 혈액에서 시안화이온을 기체크로마토그래피/질량분석법 (GC/MS)로 검출하고자 하였다. 시안화이온을 GC/MS로 분석하기 위하여 alkylating agent로 pentafluorobenzyl bromide를 이용하였고 생성물을 유기층으로 이동시키기 위해 사용한 계면활성제 가운데 양이온계면활성제인 benzyltrimethylhexadecylammonium chloride (BDHC)가 양호한 결과를 보여주었다. 정량시 유도체화된 시안화물의 m/z 207인 이온은 base ion이기는 하지만 column bleeding 시에도 발생될 수 있어 m/z 157과 188인 이온을 특성이온으로 사용하였다. 특성이온에 대하여 내부표준물질의 m/z 314 및 316 이온의 면적비로 검량선을 얻었으며 0.1 µg/mL~2.5 µg/mL의 농도범위에서 선형성은 r^2 값이 0.9992로 양호하였고 검출한계는 0.01 µg/mL이었다. 본 사례에서 변사체 중 심혈과 뇌혈에서 시안화이온이 0.36 µg/mL와 1.20 µg/mL 확인된 것으로 보아 화재 발생시까지 적어도 생존하였을 가능성을 추정할 수 있었다. 이는 기존의 분광학적 방법 (UV/Vis)이나 이온크로마토그래피법 (IC)에 비하여 검출하고자 하는 시안화이온의 질량을 확인할 수 있다는 점에서 사건 규명에 보다 확실한 정보를 제공할 수 있으리라 사료된다.

References

1. J. V. Rutkowski and B. C. Levint, *Fire Mater.*, **10**(3-4), 93-105 (1986).
2. B. C. Levin, R. Rechani, L. Gurman, H. M. Landron, M. F. Clark, J. Yoklavich, R. Rodriguez, L. Droz, F. M. de Cabrera and S. Kaye, *J. Forensic Sci.*, **35**(1), 151-168 (1990).

3. A. R. Pettigrew and G. S. Fell, *Clin. Chem.*, **19**(5), 466-471 (1973).
4. A. R. Pettigrew and G. S. Fell, *Clin. Chem.*, **18**(9), 996-1000 (1972).
5. T. T. Christison and J. S. Rohrer, *J. Chromatogr A.*, **1155**(1), 31-39 (2007).
6. P. E. Jackson, *Trends Anal. Chem.*, **20**(6), 320-329 (2001).
7. S. Kage, S. Ito, T. Kishida, K. Kudo and N. Ikeda, *J. Forensic Sci.*, **43**, 652-655 (1998).
8. C. B. Randall, 'Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man', 9th ed., pp. 411-414 Biomedical Publications, California, 2011.