



Katedra i Zakład Medycyny Sądowej
Uniwersytetu Medycznego
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Jarosław Tobolski

**Diagnostyka chemiczna śmiertelnych
zatrucí wybranymi, lotnymi związkami
nieorganicznymi /CO, HCN, H₂S/ i jej znaczenie
w opiniowaniu sądowo – lekarskim**

Rozprawa doktorska

Promotor: Prof. dr hab. n. med. Roman Wachowiak

Poznań 2012

*Panu Prof. dr hab. n. med. Romanowi Wachowiakowi
składam podziękowanie za wskazanie tematu
oraz wyrażam wdzięczność za uwagi i życzliwą pomoc
udzieloną w czasie wykonywania pracy*

Spis treści

1.	Część teoretyczna	1
1.1.	Wstęp.....	1
1.2.	Cel pracy.....	4
1.3.	Tlenek węgla	5
1.3.1.	Właściwości fizykochemiczne tlenku węgla	7
1.3.2.	Występowanie tlenku węgla	8
1.3.3.	Wchłanianie, metabolizm oraz działanie toksyczne tlenku węgla	11
1.3.4.	Zatrucia ostre i przewlekłe, leczenie zatruc	12
1.3.5.	Rola i aktywność hemoglobiny i jej pochodnych w procesie intoksykacji tlenkiem węgla	15
1.3.6.	Kryteria klasyfikacji i klasa toksyczności tlenku węgla	19
1.3.7.	Informacje ekologiczne	20
1.3.8.	Tlenek węgla pomocny w terapii symptomów stwardnienia rozsianego.....	21
1.3.9.	Przegląd i charakterystyka metod analizy CO w materiale biologicznym.....	22
1.4.	Cyjanowodór	32
1.4.1.	Właściwości fizykochemiczne.....	33
1.4.2.	Cyjanowodór - występowanie	33
1.4.3.	Wchłanianie, metabolizm, działanie toksyczne	35
1.4.4.	Zatrucia ostre	38
1.4.5.	Zmiany anatomopatologiczne wywołane zatruciem cyjankami	39
1.4.6.	Leczenie.....	39
1.4.7.	Mechanizm działania odtrutek.....	40
1.4.8.	Metody diagnostyki chemicznej cyjanków w materiale biologicznym	41
1.5.	Siarkowodór	47
1.5.1.	Właściwości fizykochemiczne.....	49
1.5.2.	Występowanie	50
1.5.3.	Wchłanianie, metabolizm oraz działanie toksyczne	50
1.5.4.	Pobieranie materiału do badań.....	51
1.5.5.	Pierwsza pomoc i leczenie zatruc siarkowodorem	52
1.5.6.	Przegląd metod oznaczania siarkowodoru.....	53
1.6.	Hipoksja – zagrożenie zdrowia i życia człowieka	56
1.7.	Przegląd detektorów gazów, przydatnych w ratownictwie chemicznym	57
	Część doświadczalna	60
2.	Siarkowodór	60
2.1.	Odczynniki, roztwory pomocnicze, sprzęt laboratoryjny, aparatura	60
2.1.1.	Odczynniki:	60
2.1.2.	Roztwory pomocnicze:	60
2.1.3.	Aparatura:	60
2.1.4.	Sprzęt laboratoryjny:	61
2.1.5.	Zwierzęta doświadczalne:.....	61
2.1.6.	Motywacja badań eksperymentalnych na zwierzętach	61
2.2.	Otrzymywanie siarkowodoru.....	61
2.3.	Analiza ilościowa siarkowodoru metodą spektrofotometryczną w zakresie widzialnym.....	62
2.3.1.	Zasada metody.....	62
2.3.2.	Odczynniki:	62
2.3.3.	Wykonanie oznaczenia	62
2.3.4.	Wykonanie krzywej kalibracyjnej	63
2.4.	Analiza siarkowodoru metodą chromatografii gazowej	67
2.4.1.	Zasada metody.....	68
2.4.2.	Zastosowane odczynniki.....	68
2.4.3.	Przygotowanie kolumny chromatograficznej	69
2.4.4.	Parametry pracy chromatografu	69
2.4.5.	Wykonanie analizy	70
2.4.6.	Wykonanie krzywej kalibracyjnej	74
2.4.7.	Analiza statystyczna wyników	77
2.5.	Analiza ilościowa siarkowodoru w materiale biologicznym	78
2.5.1.	Praktyczne aspekty doboru odpowiedniego materiału biologicznego do badań toksykologiczn ..	78
2.5.2.	Analiza stężeń endogenego siarkowodoru we krwi powstałego w warunkach biologicznej degradacji.....	81
2.5.3.	Analiza statystyczna wyników	82
2.6.	Analiza wybranych przypadków zatruc śmiertelnych z podejrzanym udziałem siarkowodoru	83
3	Diagnostyka toksykologiczno - sądowa z udziałem tlenku węgla.....	87

3.1.	Odczynniki, roztwory pomocnicze, sprzęt laboratoryjny, aparatura	87
3.1.1.	Odczynniki:	87
3.1.2.	Roztwory pomocnicze:	87
3.1.3.	Sprzęt laboratoryjny:	87
3.1.4.	Aparatura:	87
3.2.	Analiza jakościowa lotnych związków nieorganicznych.....	88
3.2.1.	Analiza jakościowa z zastosowaniem wypełnienia - Hays Sep Q.....	88
3.2.2.	Analiza jakościowa lotnych związków o charakterze obojętnym z zastosowaniem sita molekularnego 5 A	88
3.3.	Otrzymywanie karboksyhemoglobiny /COHb/ dla celów eksperymentalnych	89
3.4.	Analiza ilościowa karboksyhemoglobiny metodą chromatografii gazowej.	90
3.4.1.	Zasada metody.....	90
3.4.2.	Parametry pracy chromatografu	91
3.4.3.	Wykonanie analizy	91
3.4.4.	Wykonanie krzywej kalibracyjnej	91
3.4.5.	Krzywa kalibracyjna po uprzedniej eliminacji niezwiązanego tlenu węgla	93
3.4.6.	Ocena statystyczna wyników.....	96
3.4.7.	Rutynowa analiza karboksyhemoglobiny COHb w próbce krwi w przypadku podejrzeń o zatrucie tlenkiem węgla	97
3.5.	Określenie czasu uwalniania się tlenu węgla w przechowywanym materiale	101
4.	Cyjanowódor - i jego sole cyjanki /KCN, NaCN/	103
4.1.	Odczynniki, roztwory pomocnicze, sprzęt laboratoryjny, aparatura	103
4.1.1.	Odczynniki:	103
4.1.2.	Roztwory pomocnicze:	103
4.1.3.	Aparatura:	104
4.1.4.	Sprzęt laboratoryjny:	104
4.1.5.	Dobór materiału biologicznego do badań toksykologicznych.....	105
4.2.	Analiza ilościowa cyjanoków we krwi metodą spektrofotometryczną w zakresie widzialnym z odczynnikiem barbiturowo - pirydynowym (62), (63).	106
4.2.1.	Krzywa wzorcowa otrzymana dla roztworu wodnego KCN.	107
4.2.2.	Ustalenie optymalnego czasu dyfuzji cyjanoków z roztworu wodnego KCN.	108
4.2.3.	Ustalenie optymalnego czasu dyfuzji cyjanoków z krwi	109
4.2.4.	Krzywa wzorcowa z roztworu wodnego KCN z uwzględnieniem optymalnego czasu dyfuzji	111
4.2.5.	Krzywa wzorcowa dla analizy ilościowej KCN we krwi	111
4.2.6.	Ocena statystyczna wyników uzyskanych w metodzie spektrofotometrycznej z odczynnikiem barbiturowo-pirydynowym.	113
4.3.	Analiza ilościowa cyjanowodoru (HCN) metodą chromatografii gazowej	116
4.3.1.	Parametry pracy chromatografu	116
4.3.2.	Wykonanie analizy metodą GC-TCD /użycie detektora przewodnictwa cieplnego – thermal conductivity - detector/	116
4.3.3.	Wykonanie analizy metodą GC-NPD /użycie detektora azotowo-fosforowego - Nitrogen Phosphorus Detector/.....	118
4.3.4.	Oznaczenia stężenia jonów CN ⁻ w materiale sekcyjnym metodą spektrofotometryczną z odczynnikiem barbiturowo-pirydynowym.....	120
5.	Hipoksja – hipoksemia, niebezpieczna przyczyna zagrożenia życia	122
5.1.	Opis przypadku; okoliczności zdarzenia, niezbędne do wydania opinii:.....	123
5.2.	Metody badawcze – zakres wykonywanych badań diagnostycznych.....	124
5.3.	Interpretacyjne aspekty przyczynowo – skutkowe zdarzenia	125
6	Omówienie i dyskusja wyników badań	128
7	Wnioski	140
8	Streszczenie pracy	142
8	Summary	147
	Bibliografia.....	152
	Spis rycin.....	155
	Spis tabel	156

1. Część teoretyczna

1.1. Wstęp

Człowiek jako element ekosystemu we współczesnym świecie narażony jest zawsze na zagrożenia wynikające z niepożądanych działań związków toksycznych, których niebezpieczne oddziaływanie stanowi przedmiot szerokich badań interdyscyplinarnych. Według danych Światowej Organizacji Zdrowia ostre zatrucia, zagrażające zdrowiu czy życiu człowieka zajmują 4-tą pozycję w statystyce światowej, po chorobach serca i naczyń, nowotworach i wypadkach komunikacyjnych. Pomimo szerokiego wdrażania różnych programów profilaktycznych dotyczących ograniczeń skutkom oddziaływań toksycznych czy działań restrykcyjno – naprawczych w zakresie ochrony środowiska, przestrzegania norm i zasad bezpieczeństwa i higieny pracy, problem zatruc pozostaje wciąż otwarty i oczekuje bardziej systemowego rozwiązania. Zwiększające się zagrożenie zdrowia i życia człowieka różnymi toksycznymi substancjami chemicznymi stosowanymi coraz szerzej w przemyśle, rolnictwie i życiu codziennym spowodowało konieczność utworzenia specjalnych ośrodków badań toksykologicznych i opiniodawczych.

Szczególną rolę w tym zakresie należy przypisać statutowej działalności toksykologii klinicznej i sądowej, czy medycyny sądowej zaangażowanych bezpośrednio w leczenie bądź diagnozowanie skutków i opiniowanie następstw niebezpiecznych ekspozycji w wymiarze zagrażających zdrowiu i życiu osób pokrzywdzonych.

Narażenie związane z przypadkową czy ukierunkowaną, rozmyślną ekspozycją substancjami toksycznymi dotyczy więc określonego biochemicznego działania, implikującego efekt nagłej wielonarządowej dysfunkcji zdrowotnej, a w wyjątkowych przypadkach zatrucia śmiertelnego.

Stały wzrost rozmiarów istniejących zagrożeń toksycznych, budzi od wielu lat uzasadnione obawy i wymaga kompleksowych opracowań obiektywnych metod oceny ryzyka zdrowotnego czy zagrożeń życia związanych z narażeniem na nowe, bądź wciąż obecne klasyczne substancje chemiczne towarzyszące życiu współczesnego człowieka.

Struktura przypadków zatruc notowanych w ośrodkach toksykologii klinicznej w Polsce w ciągu ostatnich lat wykazuje podobny przebieg, wskazując dominujący udział leków /45%/ oraz w dalszej kolejności zatruc alkoholem /17.6%/, gazami toksycznymi /5.3%/, pestycydami /4.5%/, narkotykami /4.2%/ oraz rozpuszczalnikami organicznymi /4%/. Podobne obserwacje dotyczą zatruc śmiertelnych notowanych w zakładach medycyny sądowej, przy czym do substancji powodujących najwyższy wskaźnik zgonów należą alkohol

etylowy /51.85%/, zamienniki alkoholowe /14.98%/, tlenek węgla /13.58%/, leki /3.58%/
i narkomania /6.79%/.

Niezależnie od wykazanej powyżej tendencji dominującej niektórych grup ksenobiotyków w strukturze zatruc, należy zwrócić uwagę na znaczący i utrzymujący się udział nieorganicznych trucizn lotnych notowanych w kazuistyce przypadków śmierci nagłej, m.in. w Zakładach Medycyny Sądowej w Polsce w tym również w Poznaniu (1), (2), (3), (4), (5). Ocena statystyczna wskazuje, że w grupie klasycznych lotnych trucizn nieorganicznych znaczącą liczbę zgonów stanowi intoksykacja tlenkiem węgla w porównaniu z rzadziej notowanymi z udziałem siarkowodoru, cyjanowodoru czy fosforowodoru (6), (7), (8), (9) nie tylko w następstwie zażycia ich soli. Kazuistyka i ocena oddziaływań niebezpiecznych związków chemicznych na organizm człowieka w wielu przypadkach wymaga kompleksowej interpretacji współistniejących procesów interakcji, a ich czasowy aktywny udział w relacji zagrożeń jest szczególny, podczas ekspozycji trucizn lotnych. Kompleksowa ocena zagrożeń wynika m.in. z udziału trucizn lotnych ujawnionych najczęściej podczas pożarów, awarii systemów grzewczych, groźnej erupcji przy eksploatacji i wydobywaniu gazów kopalnianych czy ich biogeneracji w oczyszczalniach ścieków komunalnych. Problem dotyczy również przypadkowych toksycznych ekspozycji spalin, występujących podczas eksploatacji pojazdów samochodowych. Niezależne wyniki badań wskazują na znaczące zależności toksykodynamiczne pomiędzy systematycznym wzrostem stężenia zanieczyszczeń spalin w powietrzu atmosferycznym a występowaniem poważnych problemów zdrowotnych. Dynamicznie rozwijający się przemysł motoryzacyjny, wzrastająca ilość pojazdów mechanicznych, których eksploatacja powoduje emisję zanieczyszczeń do atmosfery powietrza m.in. tlenku i ditlenku węgla, tlenków azotu obok niespalonych węglowodorów tworzących benzynę i olej napędowy stanowi bliżej nie dające się określić zagrożenie ekologiczne. Szczególnie niebezpieczną grupę zatruc śmiertelnych notowanych każdego roku stanowią przypadki spowodowane emisją spalin w pomieszczeniach zamkniętych o ograniczonej wentylacji m.in. w garażach, stacjach diagnostycznych czy warsztatach naprawczych pojazdów samochodowych. Aktualnie struktura zatruc śmiertelnych tlenkiem węgla wywołanych bezpośrednio spalinami samochodowymi dotyczy więc zarówno niezamierzonych zatruc przypadkowych jak i rozmyślnych, popełnianych w celach samobójczych (10). Kompleksowa ocena dotyczy również problemu obiektywnej interpretacji przyczynowo - skutkowej notowanych coraz częściej przypadków śmierci nagłej, gwałtownej, osób przebywających czasowo w atmosferze systemów kanalizacyjno-sanitarnych w warunkach obniżonego poziomu tlenu, podwyższonego stężenia ditlenku węgla i dodatkowo udziału siarkowodoru (9). Dotychczasowe badania, w tym obserwacje własne

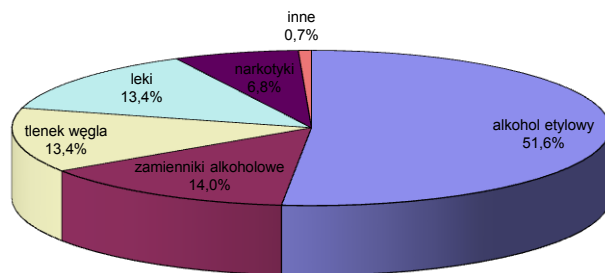
wskazują jednoznacznie, że wyłączny udział toksyczny siarkowodoru dla tych przypadków śmierci nagłej, gwałtownej jest wielokrotnie niewłaściwie interpretowany. Toksyczny udział sprawczy siarkowodoru, dla przypadków śmierci nagłej, osób przebywających w systemach kanalizacyjnych /szamba, studzienki rewizyjne ścieków powinien uwzględnić zawsze niebezpieczny efekt obniżonego poziomu tlenu $/O_2 < 15\%/$ i podwyższony poziom ditlenku węgla $/CO_2 > 5\%/$, który jest najczęściej bezpośrednią przyczyną śmierci z racji hipoksji – niedoboru tlenu.

Postęp naukowo-techniczny ostatnich lat w zakresie diagnostyki fizykochemicznej ksenobiotyków w materiale biologicznym dotyczył przede wszystkim analizy związków organicznych, w szczególności leków najczęściej nadużywanych substancji psychoaktywnych i nie uwzględniał aktualnych zapotrzebowań odnośnie podwyższenia standardów analitycznych związków nieorganicznych w tym lotnych trucizn o charakterze gazów. Właśnie charakter i specyfika fizykochemiczna każdej substancji gazowej implikuje od wielu lat zawsze zespół obiektywnych trudności badawczych na każdym etapie postępowań analitycznych tj. podczas jej zabezpieczania i analizy na miejscu zdarzenia jak i niekwestionowanego potwierdzenia w materiale biologicznym determinującym śmierć ofiary.

Proponowane w tym celu metody analityczne, przeznaczone do rutynowych oznaczeń seryjnych powinny być wystarczająco czułe, bardzo selektywne aby w sposób wiarygodny i obiektywny mogły wykazać zależność między stężeniem ksenobiotyku w materiale biologicznym a efektem stwierdzonych oddziaływań toksycznych skutkujących często zgonem.

Konfrontacja wieloletnich badań własnych z dostępnymi danymi piśmiennictwa w zakresie wskazania standardów analitycznych, przydatnych w diagnostyce chemicznej zatruc klasycznymi gazami toksycznymi nie jest jednoznacznie rozwiązana i wymaga kompleksowego opracowania, co było zasadniczą motywacją i inspiracją do wykonania odpowiednich badań eksperymentalnych.

Notowana od wielu lat struktura zatruc śmiertelnych w badaniach medycyny sądowej utrzymuje się na podobnym poziomie i jej przykładowy graficzny obraz dla makroregionu poznańskiego przedstawiono poniżej.



Rysunek 1 Struktura zatruć śmiertelnych w Poznaniu w latach 2002 – 2010 /Kazuistyka Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej w Poznaniu/

Analiza statystyczna wskazuje, że w grupie lotnych trucizn nieorganicznych dominującą liczbę zgonów stanowi intoksykacja tlenkiem węgla w porównaniu z rzadziej spotykanymi zatruciami siarkowodorem czy cyjankami (1) (2) (3) (5). Kazuistyka i ocena niebezpiecznych oddziaływań związków chemicznych na organizm człowieka wskazuje jednocześnie na zmienny udział zagrożeń wynikających z ekspozycji lotnych trucizn nieorganicznych nie dotyczących tlenku węgla tj. cyjanowodoru, siarkowodoru i fosforowodoru z udziałem hipoksji – niedobór tlenu, które mieszczą się w zakresie podanym jako inne.

1.2. Cel pracy

Mając na uwadze kompleksową ocenę udziału najczęściej notowanych, nieorganicznych trucizn lotnych /tlenek węgla, cyjanowódór, siarkowódór, deficyt tlenu atmosferycznego/ stanowiących często przedmiot wielu kontrowersji analitycznych i interpretacyjno – opiniodawczych postanowiono zaproponować główny cel pracy, który obejmuje:

- weryfikacja najbardziej przydatnych, szybkich i specyficznych metod oznaczania /CO, H₂S, HCN oraz poziomu tlenu w atmosferze/,
- opracowanie standartowych metod analizy jakościowo-ilościowej lotnych trucizn nieorganicznych z wykorzystaniem efektywnej i szybkiej metody chromatografii gazowej oraz techniki „Headspace”,
- wskazanie czynników zakłócających stabilność COHb podczas procesu biodegradacji np.: na skutek nieodpowiedniego przechowywania materiału biologicznego – próbek krwi,
- dobór odpowiedniego materiału biologicznego do badań toksykologicznych oraz weryfikacji dotychczasowych zaleceń jego wyboru jako materiału najbardziej przydatnego w diagnostyce chemicznej zatruć siarkowodorem i cyjanowodorem,

- weryfikacja niebezpiecznych stężeń siarkowodoru, metanu i ditlenku węgla zagrażających życiu człowieka w aspekcie innych czynników interferujących, sprzyjających zatruciom, np. z udziałem hipoksji /niedobór tlenu/,
- konfrontacja wyników badań laboratoryjnych uzyskanych proponowanymi metodami analitycznymi dla wybranych przypadków nagłych zgonów będących przedmiotem ekspertyzy i opiniodawstwa sądowno lekarskiego i toksykologicznego w kazuistyce ZMS w Poznaniu.

Uwzględniając w realizowanym programie badawczym specyfikę właściwości fizykochemicznych niebezpiecznych lotnych związków nieorganicznych zwrócono uwagę na zasadność wykorzystania powszechnie dostępnej lecz niedocenianej dla tych celów badawczych chromatografii gazowej z techniką „headspace” z użyciem detektorów przewodnictwa cieplnego /TCD/ i azotowego /NPD/ jako najbardziej przydatnych systemów detekcji, w porównaniu z innymi metodami.

1.3. Tlenek węgla

Dominującym czynnikiem bezpośredniego zagrożenia zdrowia i życia człowieka stają się lotne produkty przemian chemicznych uwalniane do środowiska podczas produkcji wielu zakładów przemysłowych. Wysoka emisja tlenku węgla do atmosfery jest związana głównie z eksploatacją przestarzałych, niewydajnych sprzętów energetycznych oraz niedoskonałych silników spalinowych, których liczba utrzymuje się jeszcze na wysokim poziomie. Szczególne zagrożenie związane z zatruciem tlenkiem węgla powstaje podczas pożarów. Do wyjątkowo niebezpiecznych, należą pożary pomieszczeń wyposażonych w materiały z tworzyw sztucznych z grupy polikondensacyjnych /aminoplasty, poliamidy polichloroorganiczne/ podczas spalania których, obok tlenku węgla uwalnia się niebezpieczny cyjanowódz i chlorowódz.

Działanie toksyczne tlenku węgla polega na jego łączeniu się w organizmie żywym z hemoglobina krwi, która ulega przemianie w karboksyhemoglobina. Organizm narażony na działanie tlenku węgla, zostaje pozbawiony tlenu, co prowadzi do hipoksji /niedobór tlenu a nawet anoksji – brak tlenu/, a o rozmiarach zagrożenia decyduje poziom karboksyhemoglobiny we krwi (11).

Stwierdzenie obecności karboksyhemoglobiny we krwi oraz określenie jej stężenia staje się niezbędnym badaniem, pozwalającym wyjaśnić przyczynę śmierci gwałtownej, szczególnie istotnej w praktyce sądowo-lekarskiej.

Szczególnie ważne i trudne do diagnozowania są te przypadki, w rozważaniu których, należy rozstrzygnąć czy intoksykacja tlenkiem węgla była jedyną przyczyną prowadzącą do śmierci (np. podczas wypadków samochodowych i samolotowych z udziałem ekspozycji tlenkiem węgla w następstwie defektu technicznego, czy pożaru ze spalaniem tworzyw sztucznych generujących dodatkowo cyjanowodór (12).

Potrzeba szybkiego i dokładnego oznaczania tlenku węgla na miejscu zdarzenia jak i karboksyhemoglobiny we krwi zainicjowała rozwój wielu metod i technik ich oznaczania m.in. w zanieczyszczonym powietrzu atmosferycznym jak i w materiale biologicznym. Biochemicznym podstawowym wskaźnikiem ekspozycji żywego organizmu na tlenek węgla jest jego obecność we krwi w postaci karboksyhemoglobiny. Diagnostyka chemiczna przypadków zatruc tlenkiem węgla wymaga więc szybkich metod analitycznych.

Dotychczasowe metody badawcze karboksyhemoglobiny oparte są przede wszystkim na zasadach spektrofotometrycznych (13), (14), (15) których wartość użytkowa maleje w przypadku analizy materiału sekcyjnego rozłożonego, względnie jest dyskusyjna dla zróżnicowanych gatunkowo układów (człowiek, zwierzęta domowe podlegające równoczesnej intoksykacji). Zgodnie z obowiązującą zasadą w toksykologii sądowej, wiarygodność i wartość danej ekspertyzy wzrasta w przypadku równoczesnego zastosowania dodatkowej specyficznej metody potwierdzającej.

Mając na uwadze znaczenie i wartość dowodową metody potwierdzającej uzyskane pozytywne wyniki analizy tlenku węgla w materiale biologicznym metodą spektrofotometryczną, postanowiono zastosować chromatografię gazową jako najbardziej szybką i specyficzną metodę analityczną (15), (16), (17), (18), (19), (20), (21). Możliwość weryfikacji uzyskanych wyników badań niezależnymi metodami, podnosi wiarygodność wykonanej ekspertyzy i pozwala na bardziej obiektywną ich interpretację, niezbędną w toksykologii sądowej.

Celem badań w tym zakresie jest więc opracowanie efektywnej metody analizy jakościowo-ilościowej karboksyhemoglobiny (COHb), opartej na pośredniej analizie chromatograficznej uwolnionego wcześniej tlenku węgla. W badaniach proponuje się zastosować chromatografię gazową z użyciem detektora przewodnictwa cieplnego (TCD) jako najbardziej przydatnego, uniwersalnego systemu analitycznego dla lotnych związków nieorganicznych. Wykorzystując znaną powszechnie specyfikę detektorów TCD i NPD w odniesieniu do lotnych związków nieorganicznych, dodatkowym zamiarem będzie opracowanie warunków równoczesnej analizy tlenku węgla i cyjanowodoru w materiale

biologicznym, przydatnej w diagnozowaniu przypadków zatruc powstałych w następstwie pożaru.

1.3.1. Właściwości fizykochemiczne tlenku węgla

Tlenek węgla jest bezbarwnym i bezwonnym gazem, pozbawionym smaku. W bardzo dużych stężeniach ma znikomy zapach czosnku. Jest to gaz łatwo palny, palący się niebieskim płomieniem w powietrzu, nie podtrzymuje jednak palenia. Jest nieznacznie lżejszy od powietrza ($d = 0,967$). W powietrzu z tlenem może tworzyć mieszaniny wybuchowe. Słabo rozpuszcza się w wodzie, lepiej w alkoholu i innych rozpuszczalnikach organicznych m.in. w chloroformie i kwasie octowym. Tlenek węgla jest nietypowym bezwodnikiem kwasowym, który z wodorotlenkami metali alkalicznych tworzy mrówczany. Łączy się z siarką dając siarczek karbonylu (COS), związek nietrwały, toksyczny. Z chlorem tworzy tlenochlorek węgla znany jako groźny gaz bojowy - fosgen /COCl₂/ (11).

Z niektórymi metalami, np. żelazem, niklem, kobaltem łączy się w warunkach podwyższonego ciśnienia tworząc karbonylki, związki o charakterze addycyjnym. W tej grupie bardzo toksyczny jest karbonylek niklu Ni(CO)₄. Pozostałe karbonylki mogą również działać toksycznie, bowiem po ogrzaniu wydzielają tlenek węgla. Ustalone charakterystyczne dane fizyko-chemiczne tlenku węgla zamieszczono w tabeli nr 1.

Tabela 1 Wybrane parametry fizyko-chemiczne

Właściwości fizyko-chemiczne	Wartości liczbowe
wzór chemiczny	CO
stan skupienia w temp. 20°C	gaz
masa cząsteczkowa	28,01
gęstość (15°C, 1000 hPa):	1,169 g/dm ³
gęstość gazu względem powietrza (21,1°C, 1013 hPa):	0,9678
prężność gazu (-150°C):	2.25 MPa
gęstość cieczy (-191,5°C):	0,7908 g/cm ³
odległość atomów	1,130 Å
moment dipolowy	0,112 D
temperatura topnienia /1013 hPa/	-199 ⁰ C
temperatura wrzenia /1013 hPa/	-191,5 ⁰ C
temperatura krytyczna	-140,24 ⁰ C
Temperatura zapłonu:	nie dotyczy
temperatura samozapłonu:	605 ⁰ C
granice wybuchowości w powietrzu: - dolna:	12,5% obj.
- górna:	75% obj.
ciśnienie krytyczne	3 498,7 hPa
współczynnik załamania światła (0°C, 1013 hPa):	1.0003342
lepkość (15°C, 1013 hPa):	0,01527 mPa•s
ciepło właściwe (25°C, 1013 hPa):	C _p = 1,043 J/(g•K), C _v = 0,743 J/(g•K)
ciepło topnienia	0,836 kJ/mol
ciepło parowania	6,04 kJ/mol
ciepło tworzenia się przy 20 ⁰ C	110,9 kJ/mol
ciepło przemiany	0,633 kJ/mol
ciepło spalania przy 20 ⁰ C	283,9 kJ/mol
rozpuszczalność w wodzie (0°C, 1013 hPa):	3,5 cm ³ w 100 cm ³ wody
rozpuszczalność w innych rozpuszczalnikach:	rozpuszcza się w rozpuszczalnikach organicznych
wartość opałowa	12690 kJ/mol

1.3.2. Występowanie tlenku węgla

Tlenek węgla powstaje jako produkt niepełnego spalania węgla i różnych substancji pochodzenia organicznego zawierających węgiel i jest produktem działalności wielu gałęzi

przemysłu. Głównym źródłem tlenku węgla w środowisku są gazy spalinowe, gaz świetlny, gaz wodny oraz gazy wybuchowe. Wadliwa konstrukcja i niewłaściwa obsługa grzewczych pieców domowych i przemysłowych, doprowadza do tworzenia się tlenku węgla wskutek niedostatecznego dopływu tlenu do systemu palenisk. Objawy zatrucia tlenkiem węgla występują zależnie od jego stężenia objętościowego w powietrzu:

- 100-200 ppm (0,01% - 0,02%) - lekki ból głowy przy ekspozycji przez 2-3 godziny
- 400 ppm (0,04%) - silny ból głowy zaczynający się ok. 1 godzinę po wdychaniu tego stężenia
- 800 ppm (0,08%) - zawroty głowy, wymioty i konwulsje po 45 minutach wdychania; po dwóch godzinach trwała śpiączka
- 1 600 ppm (0,16%) - silny ból głowy, wymioty, konwulsje po 20 minutach; zgon po dwóch godzinach
- 3 200 ppm (0,32%) - intensywny ból głowy i wymioty po 5-10 minutach; zgon po 30 minutach
- 6 400 ppm (0,64%) - ból głowy i wymioty po 1-2 minutach; zgon w mniej niż 20 minut
- 12 800 ppm (1,28%) - śmierć po 3 minutach.

Węgiel podczas prawidłowego spalania /eksploatacja w warunkach wystarczającej ilości tlenu w powietrzu/ tworzy gazy spalinowe o zawartości około 1% tlenku węgla, a podczas niewłaściwych warunków spalania może powstać aż 30% tlenku węgla. Niedostateczny dopływ powietrza, zawierającego potrzebne ilości tlenu, ma miejsce również w czasie spalania podczas niekorzystnej pogody, w warunkach niskiego ciśnienia atmosferycznego.

Innym znaczącym źródłem zatruc jest gaz świetlny, zawierający 4-10% tlenku węgla. Czasami jest on wzbogacony gazem wodnym, zawierającym 30-40% tego związku, co znacznie zwiększa jego ogólną zawartość w gazie świetlnym.

Tlenek węgla występuje również w spalinach samochodowych. Stwierdzono, że samochód emituje 324g tlenku węgla z 1 dm³ paliwa, przeciętnie około 50g/km przebytej drogi, przy spalaniu 5dm³ na 100km. Normy ekologiczne przewidują spalanie wydzielające tylko 1,1g/km tlenku węgla, co udaje się uzyskać przy zastosowaniu odpowiednich katalizatorów, przekształcających go w ditlenek węgla w systemie wydechowym. Choć silnik benzynowy z zapłonem iskrowym zużywa więcej paliwa oraz przy porównywalnej mocy wydała więcej ditlenku węgla, to emituje znacznie mniej węglowodorów i tlenków azotu, a jego spaliny nie zawierają sadzy. Dzięki zastosowaniu w silnikach diesla filtrów cząstek stałych /podejrzewanych o właściwości rakotwórcze/ poprawiono znacznie czystość

spalin. Niezależnie od stałej poprawy jakości wydalanych spalin, ich skład stanowi zawsze źródło toksycznych emisji, co przedstawiono w tabeli /2/.

Tabela 2 Poziom emisji podstawowych zanieczyszczeń powietrza pochodzących z transportu drogowego w Polsce

Rodzaj zanieczyszczeń	Emisja w tonach w 2003 r.
Ditlenek węgla	28989
Metan	4,2
Podtlenek azotu	1,94
Tlenek węgla	609,3
Niemetanowe lotne związki organiczne	111,1
Tlenki azotu	234,5
Cząstki stałe	14,94
Dwutlenek siarki	2,52
Ołów	0,021

Głównymi składnikami dymu tytoniowego (w 85% masy dymu) obok azotu, tlenu i ditlenku węgla, jest tlenek węgla i to w znacznej ilości, bo około 2 - 6%. W ostatnich latach stwierdzono, że na świecie emituje się rocznie do atmosfery około 232mln ton tlenku węgla, z czego tylko w USA aż 88mln. Znaczącym źródłem tlenku węgla są, użytkowe gazy przemysłowe, co przedstawiono w tabeli 3.

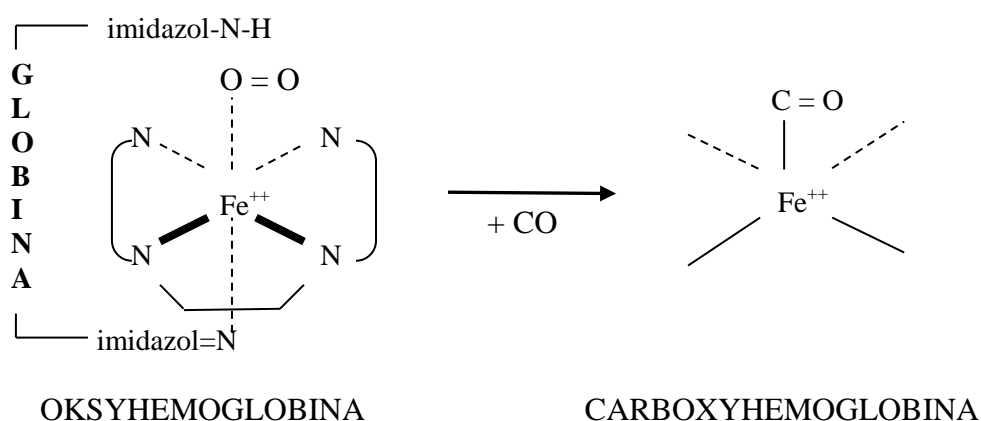
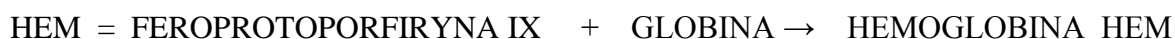
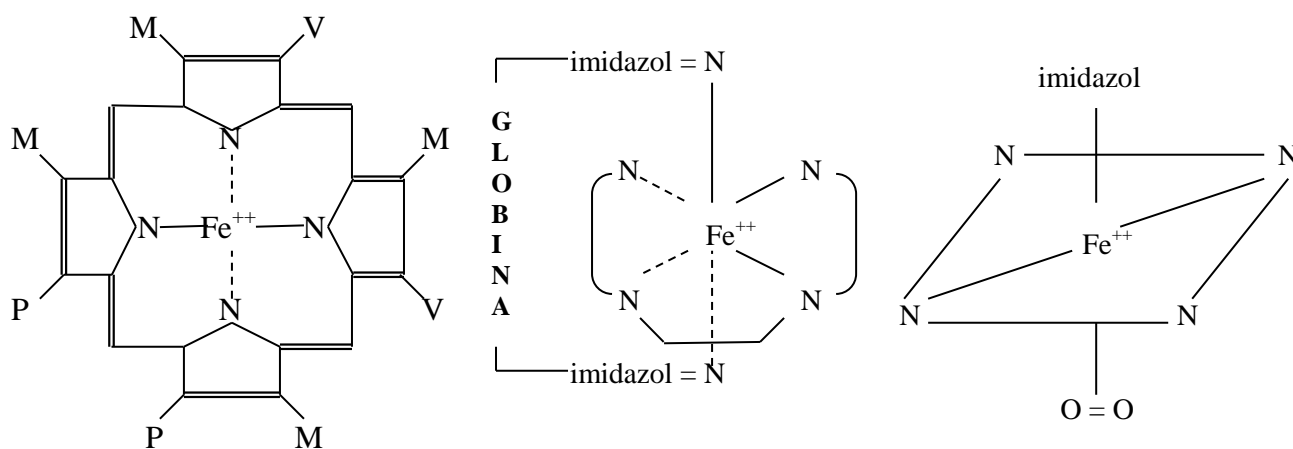
Tabela 3 Skład chemiczny najczęściej używanych gazów przemysłowych dla celów energetycznych.

Rodzaj gazu energetycznego	zawartość CO /%/
gaz powstający w generatorze tlenowym	100%
gaz powstający w piecu karbidowym	70%
gaz wodny	50%
gaz wytwarzany przy spalaniu węgla bitumicznego	40%
gaz generatorowy	35%
gaz powstający przy utlenianiu węgla brunatnego	15%
gaz koksowniczy	ok.13%
gaz koksowniczy	ok.13%
gaz powstający przy utlenianiu węgla kamiennego	ok. 12%
gaz świetlny	10%
gazy spalinowe	8%

1.3.3. Wchłanianie, metabolizm oraz działanie toksyczne tlenku węgla

Tlenek węgla wchłania się do organizmu głównie przez drogi oddechowe w ilości zależnej od jego stężenia w powietrzu, czasu narażenia i wentylacji płuc. W minimalnych ilościach gaz ten może się również wchłaniać przez skórę i błony śluzowe. Wydalanie tlenku węgla odbywa się również przez płuca, głównie w postaci niezmienionej. Tylko minimalne jego ilości mogą być wydalone w postaci ditlenku węgla.

Toksyczne właściwości tlenku węgla są determinowane jego powinowactwem do hemoglobiny, z którą tworzy karboksyhemoglobinę. Jej cząsteczka powstaje w wyniku wiązania jednej cząsteczki hemoglobiny z jedną cząsteczką tlenku węgla, przy czym tlenek węgla ulega wiązaniu z atomem żelaza w cząsteczce hemu (22), co przedstawiono na ryc. 2



Rysunek 2 Mechanizm substytucyjnego wiązania tlenku węgla: $\text{HbO}_2 + \text{CO} \Leftrightarrow \text{HbCO} + \text{O}_2$

Połączenie hemoglobiny z tlenkiem węgla jest niezdolne do przenoszenia tlenu, co powoduje głód tlenowy organizmu – niedobór tlenu /hipoksja/. Symptomy osłabionego transportu tlenu przekazywane są pośrednio przez centralny układ nerwowy, organ

najbardziej wrażliwy na niedotlenienie. Tlenek węgla wykazuje 200 - 250 razy większe powinowactwo do hemoglobiny niż tlen.

W pierwszej fazie szybkość reakcji tlenku węgla z hemoglobina jest bardzo duża, w miarę upływu czasu maleje, aż do ustalenia się stanu równowagi. Reakcja jest odwracalna, lecz dysocjacja karboksyhemoglobiny przebiega 10 razy wolniej niż oksyhemoglobiny. Zregenerowana hemoglobina m.in. aktywnym udziałem tlenu np. w układzie hiperbarii może w dalszym ciągu spełniać swoje pierwotne zadanie.

Szkodliwe działanie tlenku węgla polega nie tylko na dużym powinowactwie do hemoglobiny, ale również na pogłębianiu niedoboru tlenu, wskutek zwiększenia stabilności połączenia hemoglobiny z tlenem (23).

Tkanki osoby z wykładnikami niedokrwistości np.: 50% hemoglobiny, będą zaopatrywane w około dwukrotnie mniejszą ilość tlenu niż osoby mające jej wyższą wartość, zbliżoną do 100% i z tego względu przy znacznej niedokrwistości, śmierć może nastąpić nawet wówczas, gdy stężenie karboksyhemoglobiny we krwi wynosi tylko 20%.

Analizując zatrucie tlenkiem węgla nie do końca wyjaśniono dodatkowe wpływy na objawy niedotlenienia i wiązania się tlenku węgla z innymi aktywnymi hemoproteinami, jak np. z mioglobina cytochromu a_3 , cytochromu P-450. W zatruciach tlenkiem węgla wykazano również zaburzenia w przemianie węglowodanowej, co objawia się zmianą zawartości metabolitów głównie w układach (pirogonian, mleczan).

1.3.4. Zatrucia ostre i przewlekłe, leczenie zatruc

Fizjologiczne stężenie karboksyhemoglobiny we krwi zdrowego człowieka związane z procesami fizjologicznymi wynosi 0.4 – 0.7%. W okresie ciąży poziomy te mogą wzrastać do 0.7 – 2.5%. W populacji ludzkiej, u osób niepalących stężenia COHb związane z narażeniem środowiskowym wynoszą zwykle 0.5 – 1.5%, a u niepalących kierowców samochodów, osób kierujących ruchem, pracujących w garażach do 5% i uważane jest to za dopuszczalne. Wartości te odnoszą się jednak do osób niepalących, ponieważ stężenie hemoglobiny tlenkowej we krwi palaczy wynosi do 10%, co uważane jest już za stężenie szkodliwe.

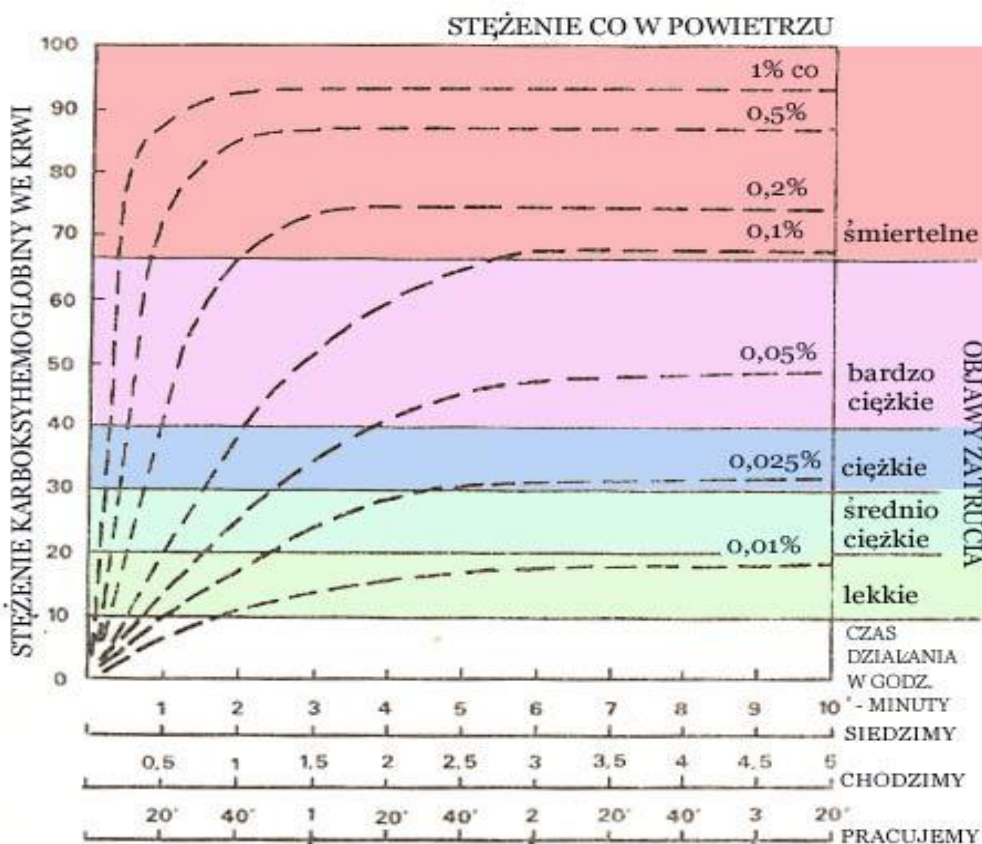
Stałe narażenie na małe stężenia tlenku węgla powoduje kumulację mikrouszkodzeń neuronów, które prowadzą do powstania trwałych zmian struktur mózgowych. Długo trwające lub powtarzające się często niedotlenienia, stają się przyczyną narastających dysfunkcji tkanki mózgowej, utraty czucia w palcach, osłabienia pamięci oraz upośledzenia psychicznego. U osób, które są stale narażone na małe stężenia tlenku węgla w powietrzu, po

pewnym czasie występują bóle i zawroty głowy, uczucie zmęczenia, utrata łaknienia, nudności, senność w ciągu dnia i bezsenność w nocy. Dochodzi też do zmian jakościowo-ilościowych we krwi, jakimi są wzrost liczby erytrocytów i hemoglobiny. W niektórych przypadkach może dochodzić do niedokrwistości.

Objawy zatrucia przewlekłego są bardzo łatwe do zauważenia; skóra barwy szaroziemistej, drżenie kończyn, przyspieszone tętno, utrata powonienia zwiększenie odruchów, maskowaty wyraz twarzy. Występują tu typowe objawy charakterystyczne dla parkinsonizmu.

Objawy zatrucia zależne są od czasu ekspozycji a szczególnie od stężenia karboksyhemoglobiny we krwi /rys. 3/. Stężenie 50% jest już stanem bardzo niebezpiecznym, ponieważ uniemożliwia ratowanie się ucieczką z miejsca zagrożenia i tylko pomoc z zewnątrz może uratować osobę zagrożoną. Przykładem takiej sytuacji mogą być częste przypadki zaccadzenia w czasie pożaru (24):

Rysunek 3 Zawartość karboksyhemoglobiny we krwi i objawy zatrucia w zależności od stężenia CO w powietrzu /pomieszczenie zamknięte/, czasu przebywania i stopnia wysiłku fizycznego.



Za stężenie krytyczne uważa się stężenie 60% karboksyhemoglobiny we krwi. Następstwem może być w takim przypadku śpiączka przerywana drgawkami, upośledzenie czynności serca, oddychania, zagrożenia życia.

Następstwa zatrucia mogą być trudne do leczenia, zależy to od stężenia karboksyhemoglobiny i czasu narażenia. Ważny jest również fakt, czy osoba zatruta była w spoczynku, czy wykonywała jakąś pracę, ponieważ wysiłek fizyczny i związana z nim częstotliwość oddychania znacznie przyspiesza powstawanie karboksyhemoglobiny w warunkach hiperwentylacji płuc.

U osób uratowanych mogą zaistnieć zmiany trwałe lub przemijające. Czas konieczny do wytworzenia we krwi zawartości 80% COHb pokazuje tabela /4/ poniżej wg *DiMaio "Medycyna sądowa"* (25).

Tabela 4 Zależność stężenia COHb we krwi w odniesieniu od czasu ekspozycji oraz stężenia CO w atmosferze powietrza.

Stężenie CO w powietrzu (%)	Zawartość COHb we krwi (%)	Czas ekspozycji
0.02-0.03	23-30	5-6 godz.
0.04-0.06	36-44	4-5 godz.
0.07-0.10	47-53	3-4 godz.
0.11-0.15	55-60	1.5-3 godz.
0.16-0.20	61-64	1-1.5 godz.
0.20-0.30	64-68	30-45 min.
0.30-0.50	68-73	20-30 min.
0.50-1.00	73-76	2-15 min.

Niestety, fakt odratowania ofiar po takim zatruciu, nie jest w pełni gwarantowany w relacji jej powrotu do normalności. Zaburzenia mogą ustąpić nawet dopiero po kilku latach i nie zawsze są kojarzone z odbytą ekspozycją. Pojawiają się silne bóle, utrata pamięci, stany depresyjne, utrata (całkowita lub w pewnej części) mowy, słuchu, smaku, węchu i wzroku, trwałe uszkodzenia mięśnia sercowego. Mogą wystąpić halucynacje, zaburzenia orientacji, spowolnienie ruchów obok trwałych dysfunkcji m.in. demencja, płasawica, porażenia i psychozy.

Stwierdzono również iż u ludzi młodych występuje większa wrażliwość na zatrucie tlenkiem węgla niż u starszych. Bardziej podatne są również osoby ze zmianami chorobowymi dróg oddechowych, serca i układu krążenia a także alkoholicy. Wrażliwość na

działanie tlenu węgla zwiększa się również w warunkach ekspozycji w podwyższonej temperaturze i wilgotności powietrza (26).

U osób, które zmarły w skutek zatrucia tlenkiem węgla, histologiczne badania mikroskopowe wykazały mikro krwawienia i liczne ogniska martwicze wielonarządowe w całym organizmie. Stwierdzono też silne przekrwienia wątroby, nerek, śledziony, wykazano uszkodzenia komórek nerwowych, zwłaszcza kory mózgowej i rdzenia przedłużonego (11).

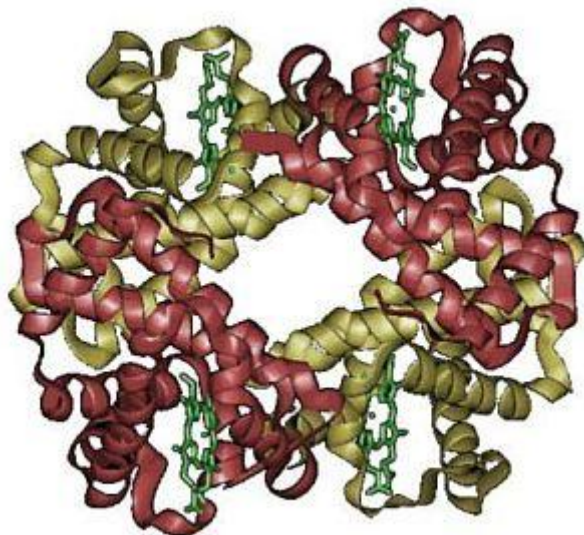
Leczenie osób zatrutych wymaga wielu intensywnych zabiegów medycznych, wśród których wymienić można następujące:

- ◇ Intensywna tlenoterapia, w ciężkich przypadkach wskazane jest skuteczne leczenie w komorze hiperbarycznej, które zmniejsza liczbę powikłań ze strony OUN.
- ◇ Wyrównanie postępującej kwasicy metabolicznej, w każdym przypadku ciężkiego zatrucia podaje się rutynowo roztwory wodorowęglanu sodowego.
- ◇ Podawanie leków moczopędnych w celu uniknięcia obrzęków (Furosemid, Mannitol)
- ◇ W przypadku hipertermii i przy objawach odkorowania-wprowadzenie w hipotermię.
- ◇ W przypadkach długotrwałych śpiączek, zapobieganie przykurczom i zanikom mięśniowym przez odpowiednie ułożenie kończyn.
- ◇ Tlenoterapia: substytucja tlenem uwalnia tlenek węgla z układu HbCO w postaci CO₂-hemoglobina uzyskuje ponownie zdolność przenoszenia tlenu. Czas półtrwania $t_{1/2}$ /HbCO podczas oddychania powietrzem atmosferycznym wynosi ok. 4godz., czystym tlenem \pm 50min. w warunkach hiperbarii tlenowej /2at/ ok. 20min.
- ◇ Biochemiczne wykładniki zatrucia powinny uwzględniać m.in. obecność HbCO > 10%, leukocytozę /12.000 -19.000 w mm²/, podwyższoną glukozę, potas, kreatyninę, mocznik, dehydrogenazę mleczanową, objawy kwasicy metabolicznej (27), (28).

1.3.5. Rola i aktywność hemoglobiny i jej pochodnych w procesie intoksykacji tlenkiem węgla

Hemoglobina jest metaloproteiną syntetyzowaną w erytroblastach i młodszych postaciach retikulocytów. Do jej podstawowych czynności należy transport tlenu i dwutlenku węgla oraz utrzymanie równowagi kwasowo-zasadowej. Szczególną rolę należy przypisać aktywności hemoglobiny w procesie intoksykacji tlenkiem węgla i z tego względu jest on często określany mianem trucizny krwi.

Hemoglobina jest tetramerem, w skład którego wchodzi cztery cząsteczki hemu oraz cztery łańcuchy polipeptydowe globiny. Każda z czterech cząsteczek hemu jest połączona z jednym z czterech łańcuchów polipeptydowych globiny, występujących w dwóch bliźniaczych parach. Schemat modelu cząsteczki hemoglobiny przedstawiono na ryc. 4.



Rysunek 4 Model cząsteczki hemoglobiny. Cztery zasocjowane podjednostki, z których każda zawiera cząsteczkę hemu (zaznaczoną na zielono). Nie pokazano grup bocznych aminokwasów, a tylko konformację łańcuchów peptydowych - tzw. model wstęgowy

Masa cząsteczkowa hemoglobiny wynosi około 64650 daltonów. Zawiera ona ok. 0,347% żelaza (17). W życiu pozapłodowym występują fizjologicznie cztery odmiany łańcuchów polipeptydowych; $\alpha, \beta, \gamma, \delta$. Różnią się one składem i sekwencją aminokwasów.

U zdrowych osób stwierdza się następujące odmiany Hb, które różnią się między sobą jedną z par łańcuchów polipeptydowych a drugą parę stanowią zawsze dwa łańcuchy α .

Hemoglobiny „prawidłowe”:

Różnorodność strukturalna cząsteczki hemoglobiny nie wpływa w sposób zasadniczy na jej powinowactwo i zdolność wiązania tlenu węgla czy innych trucizn lotnych.

- * Hemoglobina A (HbA_1) ($2\alpha 2\beta$) - czyli hemoglobina dorosłych, stanowi ok. 97-98% Hb całkowitej i składa się z dwóch łańcuchów α i dwóch β . Łańcuch α zawiera 141 aminokwasów a jego ciężar cząsteczkowy wynosi 12128, łańcuch β tworzy 146 aminokwasów, a ich łączny ciężar cząsteczkowy równy jest 15870.
- * Hemoglobina A₂ (HbA_2) ($2\alpha 2\delta$) - występuje w ilości ok. 1,5-3% Hb całkowitej i składa się z dwóch łańcuchów α i dwóch łańcuchów δ .
- * Hemoglobina F – (HbF) ($2\alpha 2\gamma$) hemoglobina płodowa, stanowi 1-2% Hb całkowitej i zbudowana jest z dwóch łańcuchów α i dwóch γ . W ostatnich miesiącach życia

plodowego stanowi ona ok. 90% Hb całkowitej. U noworodków występuje ok. 50-80% HbF. Charakteryzuje się ona większym powinowactwem do tlenu i większą opornością na denaturację zasadową.

- * Hemoglobiny embrionalne- mają podobne właściwości jak HbF:
 - Hemoglobina Gower 1 ($\xi_2\varepsilon_2$)
 - Hemoglobina Gower 2 ($\alpha_2\varepsilon_2$)
 - Hemoglobin Portland ($\xi_2\gamma_2$)

- * HbA_{1c} - HbA z przyłączoną nieenzymatycznie, trwale cząsteczką glukozy do N-końcowych aminokwasów łańcuchów globiny. Duże stężenie świadczy o proporcjonalnie podwyższonej glikemii co może pozwolić na określenie średniego poziomu glukozy w surowicy przez okres 2-3 miesięcy, co np. ma znaczenie w ocenie skuteczności leczenia cukrzycy. Norma stanowi 4-6 % ogólnej ilości hemoglobiny. Produkty przejściowe pomiędzy HbA₁ a HbA_{1c} stanowią formy HbA_{1a} oraz HbA_{1b} będące zasadami Schiffa, w których glukoza jest przyłączona odwracalnie. Ogólna liczba wszystkich form glikowanej hemoglobiny powinna mieścić się w zakresie 6-8% ogólnej ilości hemoglobiny.

Właściwości fizykochemiczne wskazują, że hemoglobina jest bardzo słabym kwasem. Odnacza się zdolnością luźnego wiązania cząsteczek tlenu z zachowaniem dwuwartościowego żelaza. Z połączenia tego powstaje oksyhemoglobina, która jest silniejszym kwasem od hemoglobiny zredukowanej. Hb ma zdolność wiązania gazów - jak CO₂, CO - karboksyhemoglobina, HCN - cyjanohemoglobina, H₂S - sulfhemoglobina. Pod wpływem niektórych związków, jak żelazicyjanek, azotyny lub słabe związki utleniające z hemoglobiny powstaje MetHb.

Ponad 90% Hb ma zdolność odwracalnego wiązania tlenu. Są to: hemoglobina utlenowana, czyli oksyhemoglobina HbO₂ oraz Hb odtlenowana. W transporcie tlenu nie biorą udziału karboksyhemoglobina COHb, hemoglobina (methemoglobina) MetHb, sulfhemoglobina SulfHb. Wspomnieć należy również o patologicznych typach hemoglobiny tj. HbS i HbC występujące w niedokrwistości sierpowatej, HbD w dziedzicznej niedokrwistości hemolitycznej.

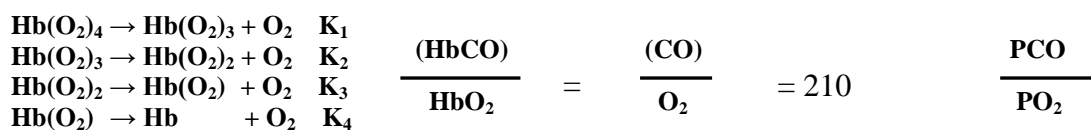
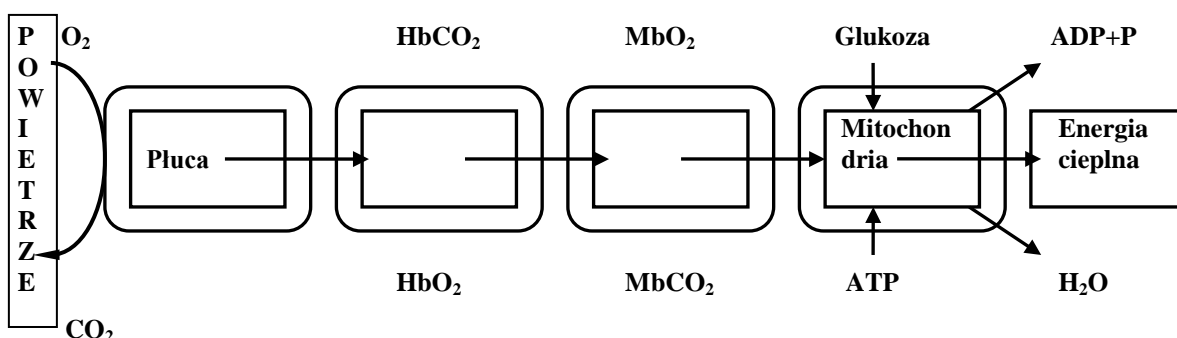
Wysokie stężenia hemoglobiny tlenkowęgłowej HbCO w próbkach krwi pozwalają na potwierdzenie przyczyny zgonu w wyniku zatrucia tlenkiem węgla. Jednak wówczas, gdy dojdzie do termicznej koagulacji krwi, alternatywny materiał diagnostyczny może stanowić próbka mięśni (29). Przyjmuje się bowiem, że po zakończeniu dystrybucji pozanaczyniowej znaczna ilość CO znajduje się w postaci związanej z mioglobina. Mioglobina tlenkowęgłowa

/MbCO/ nie jest jednak powszechnie oznaczana. Dopiero zastosowanie chromatografii gazowej z wykorzystaniem katalitycznej redukcji CO do metanu umożliwiło Ifflandowi i in. (17), (29) na opracowanie metodyki bardziej wydajnej i prostej. Wymaga ona jednak zastosowania nie tylko chromatografu gazowego, ale również spektrofotometru absorpcji atomowej, dlatego może być używana jedynie w dobrze wyposażonych laboratoriach.

Autorzy tej pracy (29) wykazali że, metodyka badań charakteryzująca się dobrą wykrywalnością i powtarzalnością – może być stosowana w rutynowej praktyce toksykologicznej. Zaletą opisywanej metody jest to, iż przy jej użyciu można oznaczyć poziom MbCO w każdym laboratorium wyposażonym w chromatograf gazowy z detektorem O-FID.

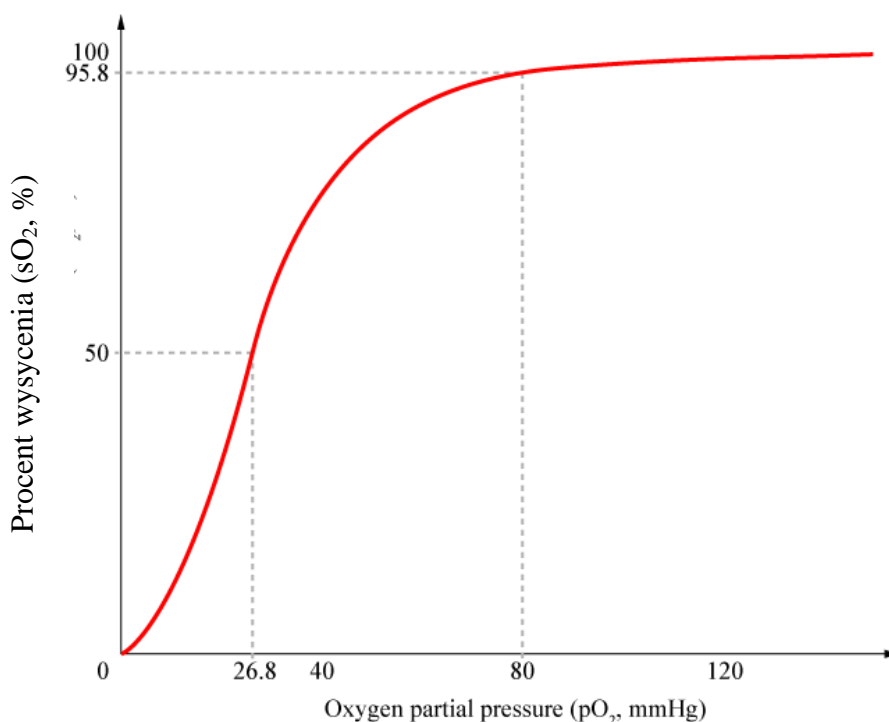
Mechanizm wiązania hemoglobiny i mioglobiny z tlenem w konkurencyjnej reakcji substytucji tlenku węgla przedstawiono na ryc. 5.

Rysunek 5 Powinowactwo i mechanizm wiązania tlenku węgla przez hemoglobinę i mioglobinę



Przedstawione informacje dotyczące hemoglobiny i jej pochodnych odgrywają szczególną rolę podczas opracowywania metod analitycznych związanych z analizą hemoglobiny tlenkowej.

Poniższy rysunek 6 przedstawia krzywą wysycenia hemoglobiny w zależności od ciśnienia cząsteczkowego tlenu, która zostaje całkowicie zregenerowana podczas postępującego procesu detoksykacji osoby zatrutej w warunkach hiperbarii tlenowej.



Rysunek 6 Zależność graficzna wysycenia hemoglobiny tlenem przy różnym ciśnieniu parcjalnym

1.3.6. Kryteria klasyfikacji i klasa toksyczności tlenku węgla

Substancja łatwo palna, toksyczna, działająca na rozrodczość (kat. 1) wg wykazu substancji niebezpiecznych. Substancja nie umieszczona w wykazach czynników rakotwórczych i prawdopodobnie rakotwórczych dla ludzi (wg rozporządzenia MZiOS z 11 września 1996 r.).

Substancja nieoceniona pod względem działania rakotwórczego przez IARC.

Wymagania dotyczące wentylacji

Niezbędna wentylacja miejscowa wywiewna, usuwająca gazy z miejsc ich emisji, oraz wentylacja ogólna pomieszczenia. Instalacje wentylacyjne muszą odpowiadać warunkom ustalonym ze względu na niebezpieczeństwo pożaru lub wybuchu.

Klasyfikacja toksycznych oddziaływań tlenku węgla

Najwyższe dopuszczalne stężenia	NDS	30mg/m ³
Najwyższe dopuszczalne stężenia chwilowe	NDS	180mg/m ³
Najwyższe dopuszczalne stężenie pułapowe (progowe)	NDSP	nieustalone

NDSP - wartość stężenia toksycznego związku chemicznego, która ze względu na zagrożenie zdrowia lub życia pracownika nie może być w środowisku pracy przekroczona w żadnym momencie

Oznaczanie w powietrzu na stanowiskach pracy

PN-ISO 8760: Powietrze na stanowiskach pracy. Oznaczanie stężenia masowego tlenku węgla. Metoda z zastosowaniem wykrywaczy rurkowych o krótkim czasie pobierania próbki z bezpośrednim odczytem.

PN-74/Z-04094 ark. 02 Ochrona czystości powietrza. Badania zawartości tlenku węgla. Oznaczanie tlenku węgla na stanowiskach pracy metodą konduktometryczną.

Stężenia oraz dawki śmiertelne i toksyczne

Próg wyczuwalności zapachu – bez zapachu

LD₅₀ (szczur, doustnie) – nie dotyczy

LC₅₀ (szczur, inhalacja) – 2114,19 mg/m³ (4 h)

LCL₀ (człowiek, inhalacja) – 5850 mg/m³ (5 min)

1.3.7. Informacje ekologiczne

Dopuszczalne/alarmowe poziomy substancji w powietrzu: 8-godzinne średnie na terenie kraju – 10000 µg/m³ na obszarach ochrony uzdrowiskowej – 5000 µg/m³

Dopuszczalne zanieczyszczenie śródlądowych wód powierzchniowych: niestalone

Dopuszczalne zanieczyszczenie w ściekach wprowadzanych do wód i ziemi: niestalone

STABILNOŚĆ I REAKTYWNOŚĆ

Stabilność: w normalnych warunkach substancja stabilna.

Warunki, jakich należy unikać: źródła zapłonu, wysoka temperatura.

Materiały, jakich należy unikać: pod wysokim ciśnieniem czysty tlenek węgla może reagować z metalami (np. żelazem, niklem), tworząc silnie trujące karbonylki. Stwarza zagrożenie pożarowe lub wybuchowe w reakcjach z utleniaczami (ciekłym tlenem, dwutlenkiem chloru), tlenkami metali (Ag₂O, Cs₂O Fe₂O₃), interhalogenami (BrF₃, BrF₅, FJ), metalami alkalicznymi (Li, Na, K).

Postępowanie z odpadem

Najbardziej racjonalnym sposobem likwidacji zasobów tlenku węgla jest możliwość jego wykorzystania np. dla celów spalań energetycznych. Odzysk lub unieszkodliwienie odpadowego produktu przeprowadzać należy zgodnie z obowiązującymi przepisami. Zalecany sposób unieszkodliwiania odpadu polega na procesie jego spalania - przekształcenie termiczne. Tlenek węgla można pochłaniać na węglu aktywnym zmieszonym z hopkalitem (MnO₂ + CuO).

1.3.8. Tlenek węgla pomocny w terapii symptomów stwardnienia rozsianego

Przeprowadzone niedawno badania wykazały, że ekspozycja na niewielkie ilości tlenu węgla może być korzystna w leczeniu stwardnienia rozsianego (SM). Podczas eksperymentów na myszach zauważono, że odpowiednie dawkowanie toksycznego gazu spowalnia rozwój niektórych objawów SM, takich jak np. paraliż, gdyż zmniejsza liczbę wolnych rodników w układzie nerwowym.

Miguel Soares (30) Instituto Gulbenkian de Ciencia (Instytut Nauki im. Gulbenkiana) z Oeiras w Portugalii wraz z współpracownikami wstrzyknął badanym myszom mieszaninę odpowiednich białek, które wywołują mysią odmianę stwardnienia rozsianego.

Dziesięć dni po inicjacji objawów SM część zwierząt umieszczono w pojemniku, w którym przez 20 dni oddychały stymulowanym układem tlenu węgla. Stężenie gazu wynosiło około 500 części na milion. U ludzi tak skoncentrowany gaz wywołuje bóle głowy i omdlenia, myszy znoszą go bez większych problemów.

Pod koniec eksperymentu myszy, które wdychały tlenek węgla wykazywały znacznie większą mobilność, niż zwierzęta z grupy kontrolnej. Te drugie miały bowiem całkowicie sparaliżowane kończyny, podczas gdy pierwsze mogły nimi swobodnie powłóczyć.

Soares przypuszcza, że protekcyjne działanie tlenu węgla polega na tym, iż ułatwia on łączenie się żelaza z molekułami hemu w systemie nerwowym. Natomiast molekuły hemu z którymi nie jest powiązane żelazo, zwiększają produkcję wolnych rodników, uszkadzających komórki nerwowe.

Firmy farmaceutyczne rozpoczęły już badania nad postaciami leku, które byłyby w stanie dozować i dostarczać tlenek węgla w konkretne miejsca systemu nerwowego. Podkreślają przy tym, iż chorzy na stwardnienie rozsiane nie powinni wdychać tlenu węgla w sposób niekontrolowany z uwagi na jego wysoka toksyczność, a farmakologiczny sposób jego podawania wymaga odpowiednich rozwiązań. Zainteresowanie farmakologiczne tlenkiem węgla wynika z wcześniejszych odkryć, związanych również z ciekawymi biologicznymi właściwościami tlenu azotu uznanego powszechnie jako związek obojętny fizjologicznie.

Dokładne badania procesu oddawania elektronów wskazują na istnienie drugiego obok tlenu azotu przekaźnika neuronalnego nowego typu. Podczas tego procesu oksygenaza hemowa uwalnia tlenek węgla. Wiąże się on z hemoglobina i upośledza jej aktywność w transporcie tlenu. Tlenek węgla jest jednak związkiem chemicznym normalnie występującym w organizmie. Wiążąc się z hemem cykazy guanylowej – enzymu

wytwarzającego wtórny przekaźnik, cykliczny GMP – tlenek węgla stymuluje jego powstawanie zupełnie tak, jak czyni to tlenek azotu. A zatem wyraźnie widać, że tlenek węgla normalnie wpływa na utrzymanie poziomu cyklicznego GMP w wielu obszarach mózgu. Wydaje się, że podobne struktury syntezy tlenu azotu i reduktazy cytochromowej P-450 mogą odzwierciedlać ich równoległe role w syntezie dwu siostrzanych przekaźników: tlenu węgla i tlenu azotu. Aczkolwiek te dwa związki znajdujące się w różnych regionach mózgu i wydaje się, że uczestniczą w różnych szlakach nerwowych, natomiast sposoby ich działania są bardzo podobne.

1.3.9. Przegląd i charakterystyka metod analizy CO w materiale biologicznym

Pomiaru stężenia COHb we krwi dokonuje się w celu:

- szybkiej diagnozy ostrego lub podostrego zatrucia tlenkiem węgla
- oceny przewlekłego narażenia na tlenek węgla w przypadkach zatruc chronicznych
- ustalenia pośmiertnej przyczyny zgonu
- potwierdzenia dodatkowego testu ekspozycji w przypadku obecności tlenu węgla np.: w pomieszczeniach użytkowych

Próbki krwi do celów analitycznych pobiera się najczęściej z żyły łokciowej, opuszków palców, ucha i komór serca. Dla podtrzymania wiarygodności wyników, należy przestrzegać warunków przechowywania pobranych próbek, tj. czasu, temperatury, niedostępności tlenu. Określenia HbCO we krwi dokonuje się najczęściej bezpośrednio po odbytej ekspozycji za pomocą bezpośrednich metod analitycznych, wśród których na uwagę zasługuje:

- analiza spektrofotometryczna
- chromatografia gazowa

1.3.9.1. Metody spektrofotometryczne

Spektrofotometria w zakresie nadfioletu i promieniowania widzialnego jest jedną z najstarszych metod instrumentalnych stosowanych w analizie chemicznej. Przedmiotem badań są charakterystyczne widma elektronowe analizowanych związków. Pomiar absorpcji w tej metodzie polega na porównaniu intensywności zabarwienia dwóch roztworów, z których jeden jest roztworem wzorcowym, drugi badanym, w relacji zależności wartości absorpcji (A) jako funkcję stężenia (C), $A = f(C)$

Metody oznaczania COHb przy jednej długości fali

W tej grupie metod najczęściej wymienianą jest skryningowa technika zaproponowana przez Wolfa. Zasada tej metody polega na denaturacji termicznej Hb i HbO₂ w warunkach stałej temperatury (55⁰C) i przy określonym pH (5,0 - 5,1).

W powyższych warunkach denaturacji nie ulega karboksyhemoglobina /COHb/, co umożliwia jej oznaczenie przy: $\lambda = 570\text{nm.}$, $\lambda = 630\text{nm.}$, lub $\lambda = 530\text{nm.}$

Istotny problem analityczny dotyczy właściwej oceny ilościowej karboksyhemoglobiny /COHb/ w odniesieniu do indywidualnej zawartości hemoglobiny w rutynowym oznaczaniu, układem odniesienia są zawsze dwie analityczne próbki tej samej krwi; A /wysyczonej tlenkiem węgla do całkowitej osobniczej zawartości tj. 100% COHb/ i B /próbki badanej/ stanowiący odpowiedni udział procentowy próbki porównawczej /A/ wynikającej z odbytej intoksykacji.

Inna metoda proponuje selektywną redukcję hemoglobiny i oksyhemoglobiny do hemochromogenu za pomocą podsiarczynu lub siarczynu sodu. W tych warunkach HbCO nie podlega reakcji redukcji (31).

Inne metody oznaczania COHb w tej grupie (32), (33) polegają na wykorzystaniu różnic absorpcji dla COHb i HbO₂ wobec dezoksyhemoglobiny. Metody te nadają się do oznaczeń wyłącznie świeżych prób krwi.

Metody pomiaru COHb przy dwóch długościach fal

Zasada oznaczeń przy dwóch długościach fal zakłada we krwi obecność dwóch pochodnych hemoglobiny, z których jedna jest COHb, a drugą może być HbO₂ lub dezoksyhemoglobina /Hb/.

Wartość COHb można oznaczyć:

- przy pomocy krzywej wzorcowej ilorazów absorpcji wyrażanych funkcją stężenia COHb.
- przez odpowiednie przeliczenie, wykorzystanych wcześniej ustalonych współczynników absorpcji dla pochodnych hemoglobiny

Brüchner i Desmond (34) zastosowali metodę pomiaru absorpcji przy dwóch długościach fal: $\lambda_1 = 573\text{nm.}$, $\lambda_2 = 597\text{nm.}$

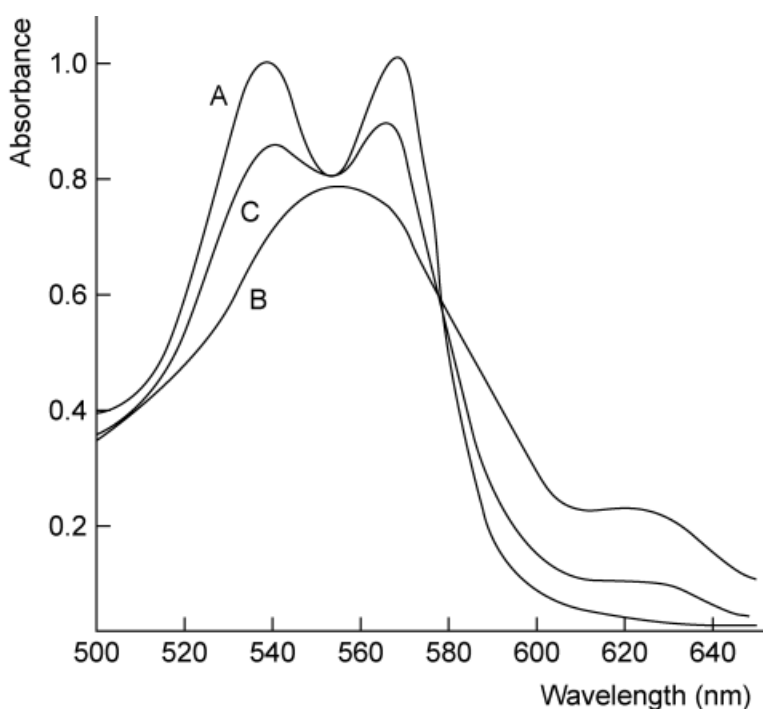
Według Bracketta i Hareckera (35), można oznaczyć COHb obok MetHb we krwi po uprzedniej hemolizie z roztworem zawierającym saponinę z buforem boranowym 1:10.

Pierwszego pomiaru wartości absorpcji dokonuje się przy $\lambda = 800\text{nm}$., następnie po dodaniu cyjanożelazinu wapnia przy $\lambda = 800\text{nm}$. Dokładność metody dla COHb wynosi 1,5% dla MetHb - 0,9%.

Spektrofotometria z pomiarem przy dwóch długościach fal opiera się na założeniu, że jeżeli jeden z dwóch składników (np. COHb, HbO₂) przy każdej z dwóch długości fali ma taką samą absorpcję, to dla drugiego składnika różnica ΔA jest proporcjonalna do jego stężenia. Podstawę takich założeń dał Ramieri dla oznaczeń HbCO we krwi (36). Przy długościach fal $\lambda_1 = 530,6\text{nm}$. i $\lambda_2 = 583,0\text{nm}$. absorpcje dla HbO₂ są identyczne, odmierzona ΔA jest proporcjonalna do stężenia COHb.

Metody oznaczania COHb przy trzech i większej ilości fal analitycznych

Podstawą wyboru analitycznej długości fal dla pomiarów spektrofotometrycznych jest ustalona zależność $Ab = f(\lambda)$ w odpowiednim układzie rozpuszczalników. Typową zależność $Ab = f(\lambda)$ dla najczęściej notowanego układu hemoglobiny przedstawia rys. 7.



Rysunek 7 Widma w ultrafiolecie /A/ - COHb /B/ - Hb hemoglobina zredukowana /C/ - próbka krwi pacjenta zatrutego tlenkiem węgla

Za pomocą specjalnego urządzenia zwanego co-oksymetrem w próbce badanej krwi równocześnie można oznaczyć COHb, a także Hb, oksyhemoglobinę i methemoglobinę (37). Do rutynowych oznaczeń używa się krwi rozcieńczonej czynnikiem hemolizującym. Pomiar absorpcji odbywa się przy $\lambda_1 = 548\text{nm}$, $\lambda_2 = 568\text{nm}$, $\lambda_3 = 578\text{nm}$, tj. przy takich długościach fal, przy których hemoglobina, oksyhemoglobina i karboksyhemoglobina wykazują punkty

izobestyczne (38). Oznaczenia stężeń dokonywane przy użyciu co-oksymetru charakteryzują się dobrą powtarzalnością i aktualnie powinny być one uznane za podstawowe badanie diagnostyczne zatruc tlenkiem węgla w toksykologii sądowej.

Small (39) przedstawił metodę pomiaru COHb w obecności MetHb. Polega on na wyznaczeniu różnicy absorbancji między HbO₂, COHb i MetHb w zakresie $\lambda = 390-440\text{nm}$. W badaniu krew rozcieńcza się w stosunku 1:70 z nasyconym powietrzem roztworu wodorotlenku amonu i po umieszczeniu w kuwecie dokonuje się pomiaru przy czterech długościach fal: $\lambda_1 = 392\text{nm}$., $\lambda_2 = 413\text{nm}$., $\lambda_3 = 421\text{nm}$., $\lambda_4 = 431\text{nm}$. Szukane stężenie COHb oznacza się arytmetycznie po uprzednim wyznaczeniu odpowiednich współczynników absorbancji pochodnych hemoglobiny przy analitycznych długościach fal.

Inne metody oznaczania karboksyhemoglobiny przeprowadzili Zijlstra i Müller (40), (41). Polegają one na jednoczesnym oznaczaniu COHb i MetHb w mieszaninie, którą analizuje się spektrofotometrycznie przy czterech długościach fal, z dodatkiem saponiny po uprzedniej hydrolizie w roztworze wodnym. Pomiarów dokonuje się przy następujących długościach fal: $\lambda_1 = 562\text{nm}$, $\lambda_2 = 558\text{nm}$, $\lambda_3 = 540\text{nm}$, $\lambda_4 = 523\text{nm}$.

Kolejna metoda zaproponowana przez Commini i Lawther (42) to oznaczanie COHb poprzez pomiar absorbancji roztworu krwi w wodorotlenku amonu bezpośrednio przed i po nasyceniu tlenem przy trzech następujących długościach fal: $\lambda_1 = 414\text{nm}$, $\lambda_2 = 420\text{nm}$, $\lambda_3 = 426\text{nm}$.

1.3.9.2. Metoda chromatografii gazowej

Chromatografia gazowa jest jedną z najbardziej przydatnych technik badawczych stosowanych w analizie związków lotnych. Metoda ta pozwala na szybkie i pewne potwierdzenie obecności tlenku węgla w badanym materiale, po uprzednim jego uwolnieniu z materiału biologicznego, głównie krwi.

Dla uzyskania wiarygodnych wyników niezwykle ważne staje się dobranie odpowiedniego detektora oraz wypełnienia kolumny chromatograficznej. Przed rozpoczęciem badań związanych z wykorzystaniem chromatografii gazowej należy zapoznać się z kilkoma podstawowymi pojęciami z teorii chromatografii oraz doбором wyposażenia (detektory, kolumny i ich wypełnienia (43).

Podstawowe definicje z zakresu chromatografii gazowe, przydatne w interpretacji jakościowo - ilościowej

- * niekorygowany czas retencji (t_r) - czas, jaki upływa od wprowadzenia związku do kolumny do momentu, w którym detektor wskaże maksymalne jego stężenie w opuszczającym kolumnę gazie nośnym.
- * czas retencji powietrza - czas przejścia przez kolumnę związku, który nie jest zatrzymywany przez wypełnienie kolumny.
- * zredukowany czas retencji (t_p) - czas jaki spędza w fazie stacjonarnej zatrzymywana substancja

$$t_p = t_r - t_m$$

- * liczba pólk teoretycznych (n) - parametr użyteczny przy kwalifikacji i porównywaniu efektu rozdzielczości kolumn.

$$n = 16 f^2$$

f - względna szerokość pików

- * wysokość równoważna półce teoretycznej (H) - w kolumnie o długości - l każda półka teoretyczna ma wysokość:

$$H = \frac{L}{n}$$

- * rozdzielczość (R_s) - określa stopień rozdzielania dwóch pików i opisana jest wzorem:

$$R_s = \frac{\Delta d}{w} = \left[\frac{d_b - d_a}{w_a + w_b} \right], \text{ gdzie:}$$

d_a, d_b - retencja dwóch określonych składników

w - średnia szerokość pików

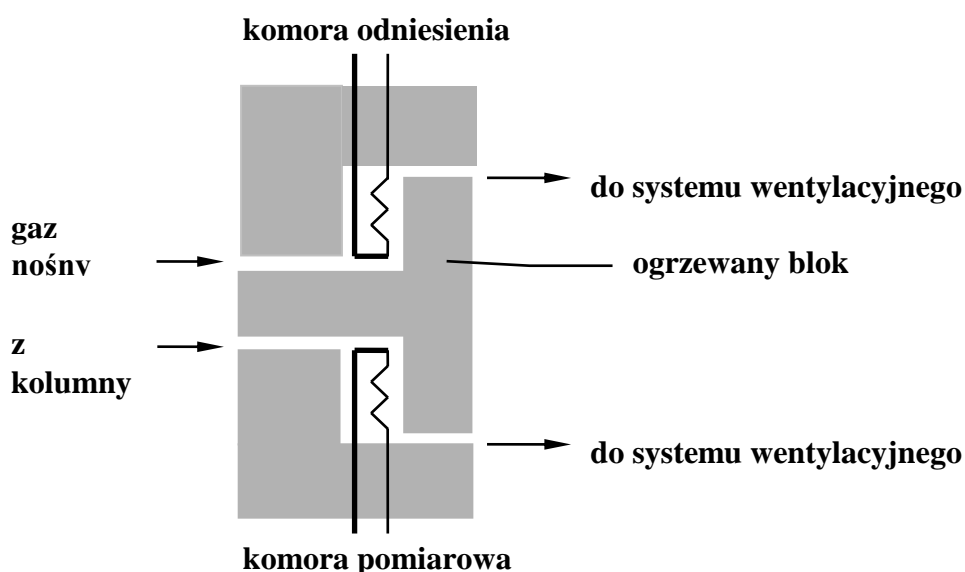
w_a, w_b - szerokość pików substancji a i b

Dla dobrego rozdzielania pików dwóch substancji wartość R_s powinna być co najmniej równa jedności.

Detektory stosowane w chromatografii gazowej do analizy związków nieorganicznych

W analizie związków nieorganicznych podstawowe znaczenie ma zastosowanie detektora przewodnictwa cieplnego (TCD) - katarometr. Detektor ten mierzy zmiany przewodnictwa cieplnego przepływającego gazu nośnego zakłóconego elucją próbki gazu opuszczającego kolumnę rozdzielczą. Schematycznie detektor przewodnictwa cieplnego został przedstawiony na ryc. 8.

Rysunek 8 Schemat budowy detektora przewodnictwa cieplnego (TCD)



Temperatura termistora włączonego w obwód prądu elektrycznego o stałym natężeniu jest funkcją przewodnictwa cieplnego tego gazu. Zmiany składu gazu, a więc i zmiany przewodnictwa cieplnego, wywołują zmiany temperatury i oporności drutu termodetektora, które analizowane w układzie mostka Wheatstone'a, komory porównawczej i pomiarowej pozwalają na detekcję analizowanego komponentu nieorganicznego /CO, CO₂, N₂, O₂, H₂S, HCN/.

Czułość detektora zależy od: rodzaju termistora, natężenia przepływającego prądu, geometrii komory pomiarowej i porównawczej, rodzaju gazu nośnego, różnicy przewodnictw cieplnych gazu nośnego i eluowanego składnika. Czułość jest wprost proporcjonalna do natężenia płynącego prądu i odwrotności objętości retencji, a odwrotnie proporcjonalna do pierwiastka kwadratowego z liczby pól teoretycznych w kolumnie oraz szybkości przepływu gazu przez detektor. Różnica przewodnictwa gazu nośnego /najczęściej He, H₂/ w odniesieniu do analizowanego gazu jest determinowana jego wykrywalnością i oznaczalnością. Fizykochemiczne parametry przewodnictwa cieplnego najczęściej analizowanych gazów przedstawiono w tabeli 5.

Tabela 5 Przewodnictwo cieplne wybranych gazów w temp. 0°C (44)

Gaz	przewodnictwo cieplne λ [$\text{J}\times\text{cm}^{-1}\times\text{s}^{-1}\times\text{K}^{-1}\times 10^{-5}$]
Cl ₂	7,65
SO ₂	8,16
H₂S	12,74
CO ₂	14,20
NO ₂	14,71
NH ₃	21,48
CO	22,70
NO	23,22
N ₂	23,76
O ₂	23,85
He	140,58
H ₂	165,69

Czułość tego typu detektorów zależy od wielu czynników:

- rodzaju termistora
- natężenia przepływającego prądu
- geometrii komory pomiarowej i porównawczej
- rodzaju gazu nośnego
- różnicy przewodnictw cieplnych gazu nośnego i eluowanego składnika

W odniesieniu do innych detektorów czułość detektora przewodnictwa cieplnego nie jest zbyt duża dla typowych związków organicznych /węglowodory alifatyczne/, co ilustruje poniższe zestawienie:

TCD	10⁻⁵ g/dm³
FID	10⁻⁸
ECD	10⁻¹¹
NPD	10⁻¹¹

Równocześnie należy zauważyć, że inne powszechnie używane detektory, takie jak detektor płomieniowo - jonizacyjny (FID), waga gazowa Martina, detektor wychwytu elektronów (ECD), czy detektory jonizacyjne AFID (z gazami szlachetnymi), są praktycznie nieprzydatne w analizie lotnych substancji nieorganicznych z racji ograniczonej detekcji. Z tego też względu użycie detektora TCD - katarometru jest właściwie jedyną alternatywą

w analizie jakościowo – ilościowej najczęściej analizowanych lotnych związków nieorganicznych. Fakt występowania wysokich stężeń COHb > 10% w przypadku zatruc, pozwala z powodzeniem zastosować detektor TCD w rutynowych badaniach diagnostycznych. Równocześnie należy zaznaczyć, że w przypadku analizy lotnych związków nieorganicznych zawierających atom azotu lub fosforu /np. HCN, H₃P/ konkurencyjny może być jedynie detektor azotowo-fosforowy typu NPD, charakteryzujący się wysokimi parametrami detekcji i oznaczalności.

Próby wykorzystania detektora płomieniowo-jonizacyjnego /FID/ w analizie tlenu węgla dotyczyły jego pośredniej analizy jako metanu, po uprzedniej redukcji wodorem w wydzielonym urządzeniu zwanym metanizerem (45). Ograniczenia specyfiki tej metody wynikają z udziału metanu jako integralnego czynnika sprawczego wielu pożarów generujących również obecność tlenu węgla, jak i konieczności posiadania dodatkowego urządzenia – metanizera, co jak dotychczas nie sprzyja jego szerokiej propagacji.

Kolumny chromatograficzne oraz ich wypełnienia stosowane w analizie związków nieorganicznych

Ze względu na rodzaj stosowanych faz: ruchomej i stacjonarnej, możemy podzielić chromatografię gazową na adsorpcyjną i podziałową, co ilustruje tabela nr 6.

Tabela 6 Rodzaje chromatografii w zależności do zastosowanych faz stacjonarnych i ruchomych (46).

Typ	Faza ruchoma	Faza stacjonarna	Mechanizm retencji
gaz - ciało stałe	gaz	ciało stałe	adsorpcja
gaz - ciecz	gaz	ciecz	podział
ciecz - ciało stałe	ciecz	ciało stałe	adsorpcja
ciecz - ciecz	ciecz	ciecz	podział

W analizie lotnych substancji nieorganicznych w odróżnieniu od analizy związków organicznych, najważniejszą rolę odgrywa gazowa chromatografia adsorpcyjna. W tym rodzaju chromatografii stosuje się najczęściej kolumny szklane o średnicach od 2 do 4 mm i długości od 50 cm do kilku metrów.

Adsorbenty stosowane do wypełnienia kolumn w chromatografii adsorpcyjnej /GC/ powinny charakteryzować się takimi cechami jak nośniki w chromatografii podziałowej tj. powinny być nieaktywne chemicznie, mieć jednolitą granulację i homogeniczną porowatość.

Podstawowymi adsorbentami stosowanymi w chromatografii gazowej związków nieorganicznych są różnego rodzaju węgle aktywne, żele krzemionkowe, tlenek glinowy, syntetyczne zeolity i porowate polimery syntetyczne.

Do analizy obojętnego chemicznie tlenku węgla jak również komponentów składowych powietrza azotu i tlenu jako wypełnienie kolumn zastosowano uniwersalny adsorbent - sito molekularne-5A /80-100 mesh/, które przed użyciem odpowiednio aktywowano. Struktura chemiczna sita molekularnego 5A utworzona z aktywnych komponentów tlenków metali alkalicznych głównie magnezu, wapnia, baru, sodu i potasu jest pułapką analityczną lotnych trucizn o charakterze kwasów /CO₂, H₂S, HCN, SO₂/ i pozwala analizować związki obojętne /CO, CH₄, N₂, O₂/. Do analizy gazów polarnych o charakterze kwasów: HCN, H₂S, zastosowano porowate polimery syntetyczne dostępne najczęściej pod nazwą „Porapak”, „Haye Sep” lub „Chromosorb”, które otrzymuje się drogą kopolimercji w odpowiednich rozpuszczalnikach monomerów typu styrenu z diwinylobenzenem lub też przez termiczną asocjację połączeń podobnego typu. Do rodnika aromatycznego mogą być przyłączone różne grupy funkcyjne, których obecność zmienia właściwości adsorbcyjne materiału. Są one trwałe termicznie do temperatury 250 - 300°C, a ich powierzchnie właściwe wynoszą od 50 do 300 m²/g. Większość stosowanych „chromosorbów” i „porapaków” nadaje się do analizy siarkowodoru i innych gazów, włącznie z węglowodorami. Najnowszym osiągnięciem w dziedzinie adsorbentów stosowanych do rozdzielania gazów są wypełnienia o nazwie „Haye Sep”. Czasy retencji dla danego składnika różnią się od siebie w zależności od zastosowanego adsorbenta, co ilustrują zestawienia podane w tabeli 7 i 8.

Tabela 7 Względne czasy retencji (w odniesieniu do etanolu) dla wybranych gazów w zależności od zastosowanego adsorbentu Chromosorb (44).

CHROMOSORB								
	101	102	103	104	105	106	107	108
powietrze	0	0	0	0	0	0	0	0
CH ₄	0,11	0,15	0,11	0,16	0,11	0,13	0,13	0,13
CO ₂	0,36	0,40	0,46	1,16	0,44	0,34	0,69	0,77
C ₂ H ₆	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
C ₂ H ₄	0,74	0,75	0,79	1,00	0,76	0,72	0,84	0,87
C ₂ H ₂	0,73	0,72	0,93	2,32	0,93	0,64	1,49	1,87
C ₃ H ₈	4,03	3,72	3,64	3,44	4,14	4,30	4,16	3,92
C ₃ H ₆	3,58	3,37	3,64	4,20	3,79	3,65	4,15	3,75
N ₂ O	0,53	0,56	0,64	1,20	0,55	0,46	0,69	0,83
SF ₆	0,54	0,52	0,57	0,24	0,61	0,67	0,79	0,57
H ₂ S	1,74	1,77	0,50	5,12	1,86	1,36	2,39	2,91
COS	2,70	2,68	3,32	4,32	2,78	2,45	3,09	3,28
SO ₂	-	-	0,46	28,4	6,01	3,39	13,6	14,4
H ₂ O	4,46	2,95	16,6	46,6	9,58	1,69	15,5	20,6

Tabela 8 Względne czasy retencji (w odniesieniu do etanolu) dla wybranych gazów w zależności od zastosowanego adsorbentu Porapak (47)

PORAPAK							
	N	P	Q	QS	R	S	T
powietrze	0	0	0	0	0	0	0
CH ₄	0,15	0,14	0,12	0,13	0,11	0,11	0,13
CO ₂	0,60	0,45	0,35	0,37	0,41	0,45	0,69
C ₂ H ₆	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
C ₂ H ₄	0,83	0,79	0,74	0,73	0,77	0,75	0,85
C ₂ H ₂	1,40	0,86	0,67	0,62	0,94	0,96	1,71
C ₃ H ₈	4,28	3,34	4,00	4,14	4,13	4,08	4,45
C ₃ H ₆	4,23	3,17	3,52	3,65	3,75	3,80	4,53
N ₂ O	0,68	0,66	0,48	0,50	0,53	0,55	0,73
SF ₆	0,74	0,38	0,63	0,66	0,64	0,59	0,81
H ₂ S	2,17	2,24	1,51	1,55	1,89	2,14	2,38
COS	2,90	2,97	2,55	2,58	2,73	2,86	3,02
SO ₂	10,5	5,17	3,61	4,06	6,25	8,67	13,4
H ₂ O	9,33	3,83	1,36	2,63	6,11	8,87	11,2

Analiza ilościowa w chromatografii gazowej

W chromatografii gazowej analiza ilościowa oparta jest na zależności wielkości sygnału pików od ilości oznaczanej substancji we wprowadzonej próbce. Dla dokonania analizy ilościowej wykorzystuje się jedną z trzech podstawowych metod, do których należą:

1) Określenie pola powierzchni lub wysokości pików.

Powierzchnię pików określa się kilkoma sposobami - najczęściej przez całkowanie automatyczne, albo poprzez bezpośredni automatyczny pomiar w układzie integratora chromatografu. W tym przypadku można posłużyć się planimetrem lub obliczyć pole pików mnożąc jego wysokość przez szerokość w połowie wysokości. Wybór odpowiedniej metody zależy od posiadanego sprzętu a także np. od wielkości powierzchni pików (przy pomiarach małych powierzchni pików nie można stosować planimetru). O wiele łatwiej określić można wysokość pików. Jest to także pomiar bardziej precyzyjny niż obliczanie powierzchni.

2) Dodawanie wzorca wewnętrznego (tego samego co oznaczany składnik).

Oznaczanie polega na wykonaniu nastrzyku danej substancji (chromatogram pierwotny), do której dodaje się następnie znaną ilość wzorca - identycznego z oznaczaną substancją, po czym znów wykonuje się nastrzyk na kolumnę i rejestrację sygnału (chromatogram wtórny). Następnie porównuje się wielkość pików bez wzorca i z wzorcem i z tej zależności określa się ilość badanej substancji.

3) *Wykreślenie krzywej wzorcowej z użyciem wzorca wewnętrznego o innym czasie retencji niż oznaczany składnik (48).*

Krzywą otrzymuje się poprzez odpowiednią ocenę chromatogramów po naniesieniu stałej objętości roztworów wzorcowych zawierających wzrastające stężenia oznaczanego związku i stałą ilość wzorca wewnętrznego. Na wykresie kalibracyjnym uwzględnia się zależność stężenia substancji oznaczanej do stosunku wartości wysokości lub powierzchni piku substancji oznaczanej do wysokości lub powierzchni piku wzorca mierzonych wskazaniami integratora.

Zastosowanie odpowiedniej metody jest w dużym stopniu uzależnione od rodzaju analizowanego materiału. W analizie toksykologiczno - sądowej a także farmaceutycznej najlepsza jest metoda trzecia, oparta na kalibracji z użyciem wzorca wewnętrznego o innym czasie retencji aniżeli związek oznaczany. Jej zastosowanie pozwala uniknąć błędów wynikających z nierównomiernego nastrzykiwania próbek (49), niezależnie od użycia nowoczesnych technik wprowadzania próbki badanej do systemu chromatografu z użyciem autosamplera.

1.4. Cyjanowodór

Cyjanowodór i jego sole cyjanki /sodu, potasu/ należą do grupy najbardziej niebezpiecznych trucizn chemicznych zagrażających życiu współczesnego człowieka. Ze względu na szerokie stosowanie w przemyśle wielu związków chemicznych zawierających ugrupowanie nitrylowe /związki organiczne/ i cyjankowe /związki nieorganiczne/ oraz bezwzględne respektowanie szczególnych wymogów bezpieczeństwa liczba przypadków zatrucia jest znacznie ograniczona i w aktualnej kazuistyce toksykologicznej dotyczy najczęściej przypadków samobójczych. Mimo, że stosowanie cyjanków dla celów samobójczych ma dzisiaj dużo mniejsze znaczenie niż w przypadku użycia np.: środków nasennych czy tlenku węgla, należy również w wyjaśnieniu przypadku przyczyny śmierci gwałtownej mieć na względzie i tę ewentualność. Stwierdzenie obecności jonów cyjankowych, a także określenie ich stężenia w materiale sekcyjnym /krew, narządy wewnętrzne/ staje się niezbędnym badaniem diagnostycznym szczególnie istotnym w każdej praktyce toksykologiczno sądowej czy lekarskiej z racji wyjątkowej toksyczności. Nowym zjawiskiem notowanym w ostatnim okresie lat 2000-2010 jest ukierunkowane użycie cyjanków dla celów przestępczych dotyczących likwidacji psów chroniących obiekty magazynowe czy hurtownie, co stanowi również przedmiot badań diagnostycznych toksykologii sądowej.

1.4.1. Właściwości fizykochemiczne

Cyjanowodór, HCN, zwany także kwasem pruskim jest w temp. 20°C cieczą lotną, bezbarwną o charakterystycznym zapachu gorzkich migdałów. Charakterystyka fizykochemiczna przedstawia się następująco:

Tabela 9 Wybrane parametry fizykochemiczne cyjanowodoru (44).

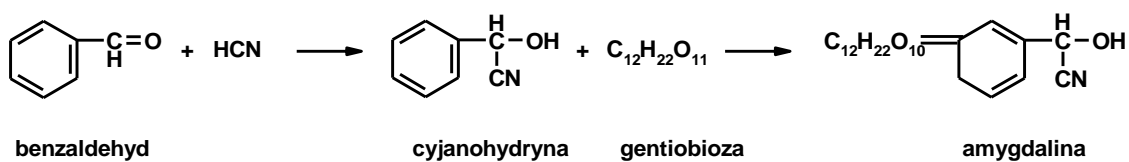
Właściwości fizyko-chemiczne	Wartości liczbowe
wzór chemiczny	HCN
ciężar cząsteczkowy,	27,03
gęstość (w temp. 20 ⁰ C względem wody o temp. 4 ⁰ C)	0,901 g/l
gęstość cieczy /w temp. 20 ⁰ C/	0,699
gęstość przy-195 ⁰ C w stosunku do wody 4 ⁰ C	0,814
odległość atomów	1,130 A
moment dipolowy	0,112 D
temperatura topnienia	-14 ⁰ C
temperatura wrzenia	+26 ⁰ C
pKa	9,40
pKb	2,5 × 10 ⁻⁵
temperatura krytyczna	-140,2 ⁰ C
krytyczne ciśnienie	3 498,7 hPa
ciepło topnienia	0,836 kJ/mol
ciepło parowania	6,04 kJ/mol
ciepło tworzenia się przy 20 ⁰ C	110,9 kJ/mol
ciepło przemiany	0,633 kJ/mol
ciepło spalania przy 20 ⁰ C	283,9 kJ/mol
wartość opałowa	12690 kJ/mol

Cyjanowodór jest słabym kwasem. Chemicznie otrzymuje się go przez działanie silniejszych kwasów na cyjanki. Łatwo rozpuszcza się w wodzie, alkoholu, eterze.

1.4.2. Cyjanowodór - występowanie

Cyjanowodór występuje w świecie roślinnym tylko w stanie związanym w postaci glikozydów cyjanowodorowych. Najczęściej spotykanym w przyrodzie glikozydem jest amygdalina, która występuje w nasionach /pestki/ migdałów, brzoskwiń, wiśni, moreli, śliwek. W świecie zwierzęcym cyjanowodór występuje w gruczołach niektórych stonóg.

Vanquelin w 1803r. po raz pierwszy wyizolował cyjanowodór z pestek brzoskwiń a Bergman w 1812r. z kory czeremchy. Od tego czasu cyjanowodór znaleziono w kilkuset rodzajach roślin w formie związanej jako cyjanohydryna albo jako oksynitryl. Jak wykazały badania Brunswika wolny cyjanowodór może występować w roślinach tylko w ilościach śladowych jako wtórny produkt enzymatycznego rozkładu glikozydów. Budowa cyjanoglikozydów została wykazana na przykładzie amygdaliny. W najbardziej rozpowszechnionej w przyrodzie amygdalinie cyjanohydryna albo oksynitryl aldehydu benzoowego jest glikozydowo związany z dwucukrem gentiobiozą.



W cyjanoglikozydach występują również cyjanohydryny ketonów. W linamarynie występuje aceton a w gynokardynie – 1-trioksyketon, natomiast w lotaustralinie – metylo-etyloketon.

Tabela 10 Występowanie glikozydów cyjanowodorowych w świecie rośliny

Nazwa cyjanoglikozydu	Organ rośliny	Nazwa rośliny	Komponent cukrowy	Komponent karbonylowy, wiążący ugrupowanie -CN
Duryna		<i>Sorghum vulgare</i>	Glukoza	p-oksybenzaldehyd
Gynokardina	Semen	<i>Gynocardia odorata</i>	Glukoza	1-trioksyketon
Hiptagina	Cortex	<i>Hiptaga madablota</i>	Glukoza	Hiptagenina
Linamaryna $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{O}_6\text{N}$	Semen	<i>Linum usitatissimum</i> <i>Havea brasiliensis</i>	Glukoza	Aceton
Lotaustralina		<i>Lotus australis</i> <i>Trifolium repens</i>	Glukoza	Metyloetyloketon
Prulaurazyna	Folium cortex	<i>Prunus laurocerasus</i> <i>Prunus padus</i>	Glukoza	benzaldehyd
Prunazyna	Cortex folium	<i>Prunus Padus</i> <i>Prunus laurocerasus</i>	Glukoza	benzaldehyd
Sambunigryna $\text{C}_{14}\text{H}_7\text{O}_6\text{N}$	Folium	<i>Sambucus nigra</i>	Glukoza	benzaldehyd
Zieryna		<i>Zieria laevigata</i>	Glukoza	m-oksy-benzaldehyd
Amygdalina	Semen cortex	<i>Prunus amygdalus</i> <i>Persica vulgare</i>	gentiobioza	benzaldehyd

Cyjanowódór stosowany jest często jako fumigant do dezynfekcji dużych obiektów, takich jak magazyny, statki, młyny i cieplarnie. Ponadto gazowy cyjanowódór jako substrat znajduje zastosowanie w różnych syntezach związków chemicznych. Przyczyną zatruc bywa także „płynny cyjanowódór”, dotyczy to głównie spożycia tzw. wody migdałowej. Najczęściej spotkaną przyczyną zatruc są sole kwasu cyjanowodorowego, a przede wszystkim cyjanek potasowy i sodowy. Sole te używane są w różnych procesach metalurgicznych, m.in. w elektrolizie, w galwanoplastyce, w fotografii, w procesie utwardzania stali, w przemyśle włókienniczym do bejcowania tkanin. Cyjanek winylu /akrylonitryl/ jako monomer jest stosowany przy produkcji tworzyw sztucznych oraz do dezynsekcji zbóż. Cyjanki mogą się również uwalniać w soku żołądkowym z glikozydów zawartych m.in. w pestkach wiśni, moreli, brzoskwiń, śliwek, a dawką śmiertelną np.: dla dziecka może być już spożycie 5-35 pestek. Cyjanowódór tworzy także sole złożone, w których anion CN^- może być związany kompleksowo. Ich działanie trujące zależy od zdolności i szybkości uwalniania wolnych jonów CN^- . W czasach nowożytnych, szczególnie okres II Wojny Światowej /1939-1945/ charakteryzował się szeroką praktyką trucicielską z racji zapotrzebowań militarnych oraz realizacji ludobójczych programów eksterminacji nazistowskich /masowe zabójstwa z użyciem związków cyjanowych m.in. cyklonu A - cyjanomrówczanu metylu (90%) i chlormrówczanu metylu (10%) i cyklonu B – cyjanowódór zaadsorbowany na adsorbencie – ziemi okrzemkowej.

1.4.3. Wchłanianie, metabolizm, działanie toksyczne

Cyjanowódór i jego sole są łatwo wchłaniane przez błonę śluzową dróg oddechowych, skórę zwłaszcza wilgotną oraz przez przewód pokarmowy. Wyjątkowo łatwo absorbuje się z jamy ustnej i górnych odcinków przewodu pokarmowego jeszcze przed uruchomieniem mechanizmów odtruwających. Szybkość resorpcji z przewodu pokarmowego zależy od stopnia wypełnienia żołądka oraz od rodzaju treści żołądkowej, gdyż np.: węglowodany wiążą cyjanki i hamują proces zatrucia.

Cyjanki związane organicznie ulegają w organizmie człowieka wielu przemianom, przy czym stopień ich toksyczności zależy od przebiegu procesów metabolicznych. Zatrucia ostre powodują tylko te związki, które przy rozkładzie uwalniają wolne jony cyjanowe.

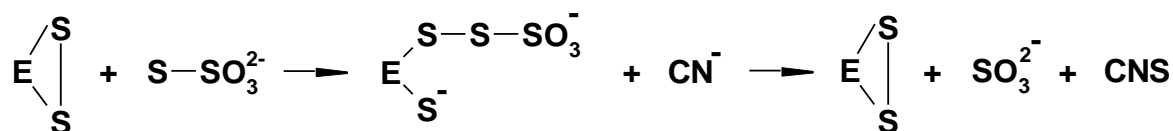
Głównym kierunkiem przemian cyjanowodoru jest tworzenie się rodanków. Obok głównej przemiany cyjanków w rodanki mogą się one w końcowej fazie utlenić do ditlenku węgla i mrówczanów. Wspomniane rodanki są także naturalnym składnikiem płynów ustrojowych, w których stężenia mogą osiągnąć następujące wartości:

- ślina około 0.01% jako CNS^-

- krew około 1.3mg/100ml jako KCNS
- mocz osób narażonych na zatrucie 0.2 – 10.0mg/ml

Proces przemiany cyjanków w rodanki przebiega pod wpływem enzymu rodanazy i jest przyspieszany w obecności tiosiarczanu sodu lub siarki koloidalnej /aminokwasy siarkowe – cysteina, cystyna/ są bardzo słabymi donatorami siarki. Rodanaza działa tylko na wolne jony CN^- , natomiast nie wywiera żadnego wpływu na grupy cyjanowe związane wiązaniem chemicznym kowalencyjnie spolaryzowanym występującym m.in. w np. wiązaniach nitrylowych, cyjanamidzie, kwasie cyjanooctowym.

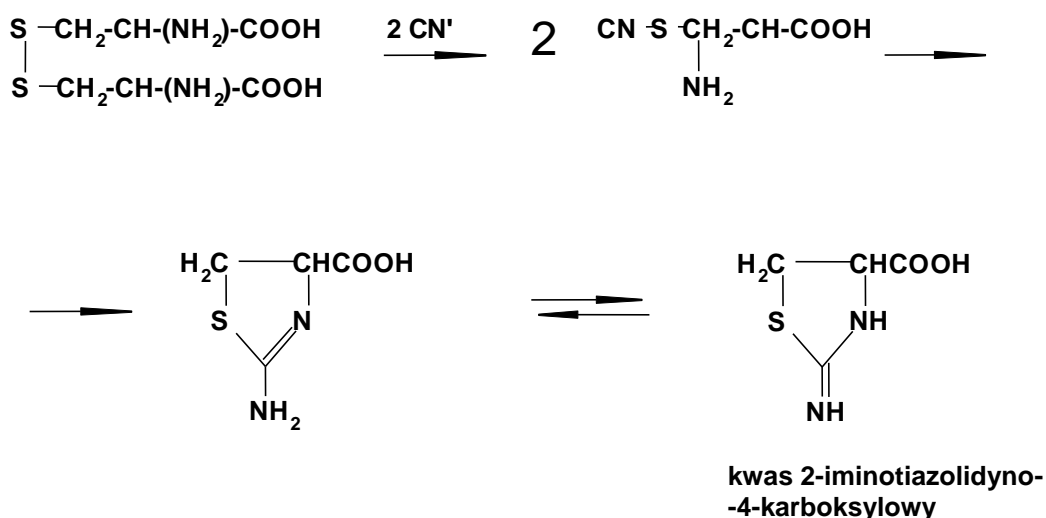
Wg Sörbo (50) roddanaza posiada aktywną grupę disiarkową, a nie sulphydrołową, która reagują z tiosiarczanem i cyjankiem następująco, zgodnie ze schematem:

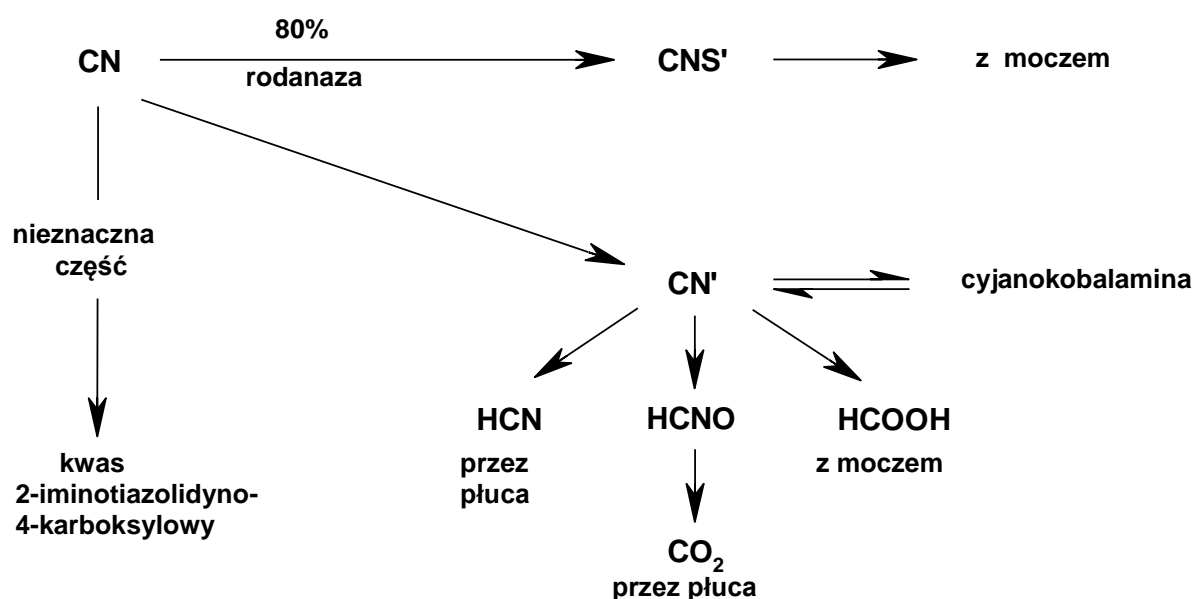


W organizmie żywym istnieje równowaga między cyjankami i rodankami. Po przyjęciu toksycznych dawek rodanków występują również objawy zatrucia cyjankami w wyniku tworzenia się cyjanków we krwi i w komórkach. Przemiany te katalizuje enzym rodanazo-oksydaza /enzym różniący się od rodanazy/.

Schemat przemian biochemicznych cyjanowodoru w organizmie człowieka wg Williamsa (51) można przedstawić w następujący sposób:

Rysunek 9 Schemat przemian biochemicznych cyjanowodoru w organizmie człowieka





Cyjanki mogą także powstawać samorzutnie w zwłokach „in corpore” lub narządach pobranych w czasie sekcji zwłok w wyniku ich przechowywania w nieodpowiednich warunkach /temperatura pokojowa/. Poziom powstałych endogennych cyjanków jest bardzo niski i w sposób zasadniczy różnicowany w porównaniu z typową intoksykacją (52), (53).

W organizmie człowieka 80% cyjanków pod wpływem rodanazy w obecności tiosiarczanu sodowego lub siarki koloidalnej ulega przemianom w nietoksyczne rodanki wydalane z moczem. W niewielkiej ilości cyjanki po połączeniu z cystyną są wydalane jako kwas 2-iminotiazolidyno-4-karboksylowy, jako mrówczany oraz przez płuca w formie cyjanowodoru. Śladowe ilości cyjanków są zużywane do tworzenia cyjanokobalaminy (54).

Mechanizm działania toksycznych jonów cyjankowych polega na odwracalnym hamowaniu komórkowych enzymów oksydacyjnych zawierających żelazo trójwartościowe, np.: oksydazę cytochromową. W związku z tym w obecności jonów cyjankowych następuje zablokowanie transportu elektronów, zahamowanie cyklu kwasów trikarboksylowych /Cykl Krebsa/ i oddychania komórkowego (54). Zarówno krew żylna jak i tętnicza pozostają bogate w tlen i wykazują barwę żywo czerwoną, z kolei komórki i tkanki obumierają w wyniku dysfunkcji w przyjmowaniu tlenu. Na niedobór tlenu szczególną wrażliwość wykazują komórki centralnego układu nerwowego a w szczególności ośrodek oddechowy, a śmierć spowodowana jest porażeniem tego ośrodka.

Cyjanowodor wykazuje zdolność do łączenia się z hemoglobina krwi, ale nie ma to większego znaczenia w etiologii mechanizmu śmierci nagłej w następstwie zatrucia. Z kolei

duże znaczenie przy ratowaniu zatrutych ma fakt zwiększonego powinowactwa cyjanowodoru do methemoglobiny co zostało wykorzystane i stanowi podstawę skutecznego procesu detoksykacji.

W przypadkach intoksykacji, ekspozycja następuje głównie poprzez układ oddechowy, przewód pokarmowy, błony śluzowe i skóra. Najwyższe dopuszczalne stężenie cyjanowodoru w powietrzu wynosi 0.0003mg/L. Stężenie w powietrzu rzędu 0.12 – 0.15mg/L HCN powoduje zatrucie śmiertelne po upływie 0.5 – 1.0 godziny, stężenie 0.3mg/L – śmierć natychmiastową. Dawkę śmiertelną cyjanowodoru dla człowieka ocenia się jako 1mg/kg masy ciała. Jako dawkę śmiertelną cyjanków przyjmuje się dla człowieka 0.10 – 0.25g, przy czym opisano przypadki śmiertelne w dawkach niższych tj. powyżej 0.1g. Jednak przy ograniczonej ilości kwasu solnego w żołądku, w przypadku zażycia soli alkalicznych cyjanków przekształconych w węglan powstały podczas dłuższego przechowywania nawet zażyte większe dawki bywają tolerowane przez organizm człowieka. Należy dodać, że na wielkość dawki toksycznej w przypadku cyjanowodoru i cyjanku wpływa czystość preparatu a także wrażliwość osobnicza. Prawdopodobnie jest to zróżnicowane indywidualną tolerancją związaną z różną zdolnością odtruwania organizmu z cyjanowodoru na tiocyjanian przez układy enzymatyczne.

1.4.4. Zatrucia ostre

Cyjanki wprowadzone do żywego ustroju powodują zatrucia ostre o przebiegu nagłym i wysokiej śmiertelności. Nie kumulują się w organizmie i nie dają zatruc przewlekłych. Objawy zatrucia są, różne w zależności od pobranej w czasie ekspozycji wziewnej ilości cyjanowodoru lub od przyjętej dawki cyjanków drogą pokarmową. W zatruciach doustnych dużymi dawkami objawy występują w ciągu kilku sekund, do kilku minut od połknięcia. Jeżeli zużycie cyjanku nastąpiło na „pusty żołądek” lub przy dużej nadkwaśności czas ten jest bardzo krótki. Natomiast wystąpienie objawów zatrucia może się przedłużyć nawet do 4 godzin jeżeli w czasie zażycia cyjanków żołądek był wypełniony treścią pokarmową, szczególnie bogatą w węglowodany /cukry/ (54). Przy wysokich dawkach cyjanku jak i przy wysokim stężeniu cyjanowodoru w powietrzu śmierć następuje nagle – zatruty wydaje ostry krzyk, pada nieprzytomny z charakterystycznymi drgawkami i sztywnością mięśniową. Oddech ulega nagłemu zatrzymaniu w wyniku porażenia ośrodka oddechowego. Jednakże po zażyciu doustnym znacznie częściej śmierć następuje w ciągu dłuższego okresu. Początkowo następuje podrażnienie błon śluzowych, drapanie w gardle i na języku. Błony śluzowe w tych miejscach są zaczerwienione, szczególnie łatwo to zaobserwować na spojówce oka. Równocześnie pojawia się charakterystyczny niepokój, bóle głowy, uczucie osłabienia,

nudności. Następnie niepokój przechodzi w wyraźny lęk, występuje ból i ucisk w okolicy serca, duszność, nasilone oddechy, w końcu drgawki. W ostatnim stadium oddech jest już płytki, następuje gwałtowny spadek ciśnienia krwi, porażenie ośrodka oddechowego i w efekcie zejście śmiertelne. Skóra może mieć zabarwienie ceglasto czerwone, a z ust wyczuwalny może być zapach gorzkich migdałów. Niekiedy po zażyciu niskiej dawki zgon następuje po kilku lub kilkunastu dniach w następstwie nieodwracalnych zmian wywołanych utrzymującym się dłuższym niedotlenieniem mózgu (54).

1.4.5. Zmiany anatomopatologiczne wywołane zatruciem cyjankami

Podczas sekcji zwłok charakterystyczne są (55), (56):

- jasnowiśniowa krew,
- ciemnoczerwone, rozległe plamy opadowe,
- z jam ciała /czaszka, jama brzuszna/ wydobywa się charakterystyczna woń gorzkich migdałów,
- we wszystkich narządach stwierdza się liczne drobne krwawienia w błonach surowiczych,
- płuca powiększone, przekrwione i obrzękłe

1.4.6. Leczenie

W zatruciach cyjankami należy postępować wg następującego schematu leczniczego (54):

1. Jeżeli zatrucie nastąpiło drogą wziewną należy natychmiast usunąć chorego z zanieczyszczonej atmosfery, zdjęć skażoną odzież.
2. Możliwie szybko zapewnić tlenoterapię i oddech zastępczy
3. Podawanie odtrutek:
 - a) dożylnie 10cm^3 3% roztworu azotynu sodowego z prędkością $5\text{cm}^3/\text{min}$. Lub 4-DMAP /4-dimetyloaminofenol/ w dawce 3-4 mg/kg masy ciała /nie obniża ciśnienia krwi – generuje methemoglobinę/, następnie przez tę samą igłę 50cm^3 30% roztworu tiosiarczanu sodowego
 - b) dożylnie 300 mg wersenianu dikobaltowego, a następnie przez tę samą igłę $50\text{-}100\text{cm}^3$ hipertonicznego roztworu glukozy /chemiczny proces wiązania wolnych jonów CN^- /,

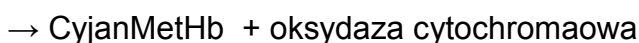
- c) w ciężkich zatruciach dawki odtrutek można powtarzać 2-3 krotnie, kontrolując jednocześnie poziom MetHb, której całkowita zawartość nie powinna przekraczać 40%,
- d) płukanie żołądka w zatruciach doustnych należy wykonać w okresie bezobjawowym, albo po podaniu wyżej wymienionych leków; do płukania żołądka należy użyć nadmanganianu potasowego w stężeniu 1 : 5000 lub 3% wody utlenionej rozcieńczonej pięciokrotnie w celu utlenienia cyjanków.
- e) podanie preparatu Cyanokit /hydroksykobalamina/, która w organizmie wchodzi w reakcję z cyjankiem. W wyniku tej reakcji powstaje cyjanokobalamina /wit. B₁₂/, która wydalana jest z organizmu wraz z moczem. Powoduje to obniżenie stężenia cyjanku w organizmie oraz zapobiega wiązaniu się cyjanku z enzymem komórkowym - oksydazą cytochromową.

1.4.7. Mechanizm działania odtrutek

Połączenia oksydazy cytochromowej z jonem cyjankowym może być odwracalne, enzym ten może zostać zregenerowany przez dysocjację kompleksu i może znów aktywnie przenosić tlen. Odtrutki stosowane w zatruciach cyjankami mają właściwości odblokowywania oksydazy cytochromowej (54) należą do nich:

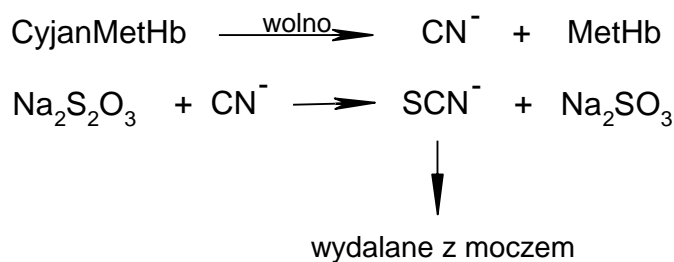
1. Związki methemoglobinotwórcze; azotyn amylu, azotyn sodowy, /4-DMAP/,

Wprowadzenie do organizmu substancji methemoglobinotwórczych powoduje powstanie MetHb, która wykazując wyjątkowe powinowactwo, bowiem łączy się z jonami cyjankowymi, tworząc cyjanomethemoglobinę /CyjanMetHb/. Dzięki tej reakcji MetHb może wejść w połączenie kompetencyjne z oksydazą cytochromową, zablokowaną przez jon cyjankowy i odblokować ten enzym. Mechanizm działania związków methemoglobinotwórczych jest następujący (54):



2 Tiosiarczan sodowy.

W warunkach fizjologicznych cyjanki łączą się w organizmie z aktywnym jonem siarkowym tworząc rodanki - związki nietoksyczne łatwo wydalane z moczem. Enzymem katalizującym tę reakcję jest enzym rodanaza. W celu przyspieszenia tej reakcji potrzebny jest donor siarki m.in. tiosiarczan sodowy. Mechanizm działania jest następujący (54):



Dwa związki chelatujące zawierające kobalt to witamina B₁₂ i wersenian dikobaltowy - CoEDTA preparat Kelocyanor (54), (57), Witamina B₁₂ są lekami mającymi znaczenie wspomagające w leczeniu zatruc cyjankami. Mechanizm działania odtruwającego polega na kompleksowym połączeniu się jonu kobaltowego wit. B₁₂ z jodem cyjankowym związanym z oksydazą cytochromową, a powstający w wyniku tego połączenia kompleks jest długotrwanie wydalany z moczem. Jednak z praktycznego punktu widzenia efektywne stosowanie wit. B₁₂ jako odtrutki nie ma większego znaczenia, ponieważ wymaga stosowania bardzo dużych dawek (58). Natomiast duże znaczenie w tym przypadku ma stosowanie jako odtrutki z grupy związków kompleksowych - wersenianu dikobaltowego. Mechanizm działania tego związku jest podobny do mechanizmu powstawania wiązań koordynacyjnych typowych dla wszystkich związków helatujących. Aktywny chelaton EDTA przejmuje jon cyjankowy z połączenia z oksydazą cytochromowa, uwalniając tym samym czynny enzym. Trwały kompleks środka chelatującego z jodem cyjankowym wydalana się sukcesywnie z moczem.

1.4.8. Metody diagnostyki chemicznej cyjanków w materiale biologicznym

Cyjanki w niskich stężeniach, nie zagrażających życiu człowieka i znajdują się, w organizmie jako wynik normalnych przemian metabolicznych, po spożyciu pokarmów zawierających glikozydy głównie amygdalinę, czy podczas palenia tytoniu. Ekstremalnie zwiększone stężenie cyjanków w organizmie człowieka obserwujemy w wyniku zatrucia cyjanowodorem czy po doustnym przyjęciu soli cyjanku, a także po przedawkowaniu niektórych leków hipotensyjnych, np.: stosowanego rzadko Nitroprusydku sodu (59). Większość cyjanków w krwi znajduje się wewnątrz erytrocytów. W związku z tym do celów toksykologicznych preferowanym materiałem jest świeża krew.

Metody diagnostyki chemicznej cyjanków w materiale biologicznym dotyczą zarówno metod jakościowych jak i ilościowych. Należy dodać, że warunkiem wykonania analizy cyjanków w materiale biologicznym jest ich wstępna izolacja, którą najczęściej dokonuje się metodą mikrodyfuzji w postaci lotnego HCN, związanego w środowisku zasadowym /NaOH/ w postaci soli – cyjanek sodu. Podczas przechowywania krwi mogą wystąpić dwa

konkurencyjne procesy, tworzenie się cyjanków endogennych, jak również rozkład ich, któremu towarzyszy spadek stężenia na skutek niewłaściwego przechowywania. W racjonalnym postępowaniu diagnostycznym podejrzanego zatrucia należy:

- świeżo pobraną krew przechowywać w temperaturze 4°C
- przy pobieraniu krwi, nie dodawać antykoagulantów i środków konserwujących
- wykonać analizę w możliwie jak najkrótszym czasie od momentu intoksykacji

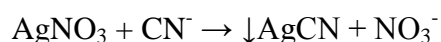
1.4.8.1. Metody jakościowe oznaczania jonów CN^- .

Stosunkowo wysoka dawka inicjująca zejście śmiertelne $>100\text{mg/}$ oraz ograniczona dystrybucja jonów cyjankowych do dolnych odcinków przewodu pokarmowego $/\text{zaleganie w jamie ustnej, treści żołądka}/$ pozwala na wykorzystanie klasycznej jakościowej chemii analitycznej dla celów szybkiej diagnostyki chemicznej.

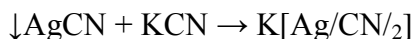
W badaniach jakościowych od wielu lat stosuje się szereg klasycznych reakcji barwnych i osadowych m.in. dotyczą materiału dowodowego zabezpieczonego na miejscu zdarzenia $/\text{KCN, NaCN}/$, które są wyjątkowo proste i niezawodne. Warunkiem przeprowadzenia reakcji jest uprzednia izolacja cyjanowodoru metodą destylacji z parą wodną $/\text{pH 1-3}/$ materiału biologicznego $/\text{treści pokarmowej}/$ i jego związaniem jako alkalicznego destylatu.

Mechanizm przebiegu klasycznych reakcji jakościowych może być wielokierunkowy: (60)

Reakcja z AgNO_3



W wyniku tej reakcji powstaje biały osad AgCN rozpuszczany w roztworze wodnym NH_4OH oraz w nadmiarze KCN ; nie rozpuszcza się w HNO_3



Reakcja tworzenia błękitu pruskiego.

Próbkę frakcji z destylacji z parą wodną po alkalizacji $/\text{KOH}/$ poddaje się reakcji z siarczanem żelazowym $/\text{FeSO}_4/$ w której powstaje cyjanożelazian potasu $/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_4/$ związek ten daje charakterystyczną reakcję barwną z FeCl_3 w środowisku kwaśnym $/\text{HCl}/$ - błękit pruski. W obecności CN^- powstaje zabarwienie zielone aż do modrego, w zależności od ilości jonów cyjankowych w analizowanej próbce.

1.4.8.2. Metody ilościowe analizy cyjanków.

Metody ilościowe oznaczania cyjanków ogólnie dzielą się na:

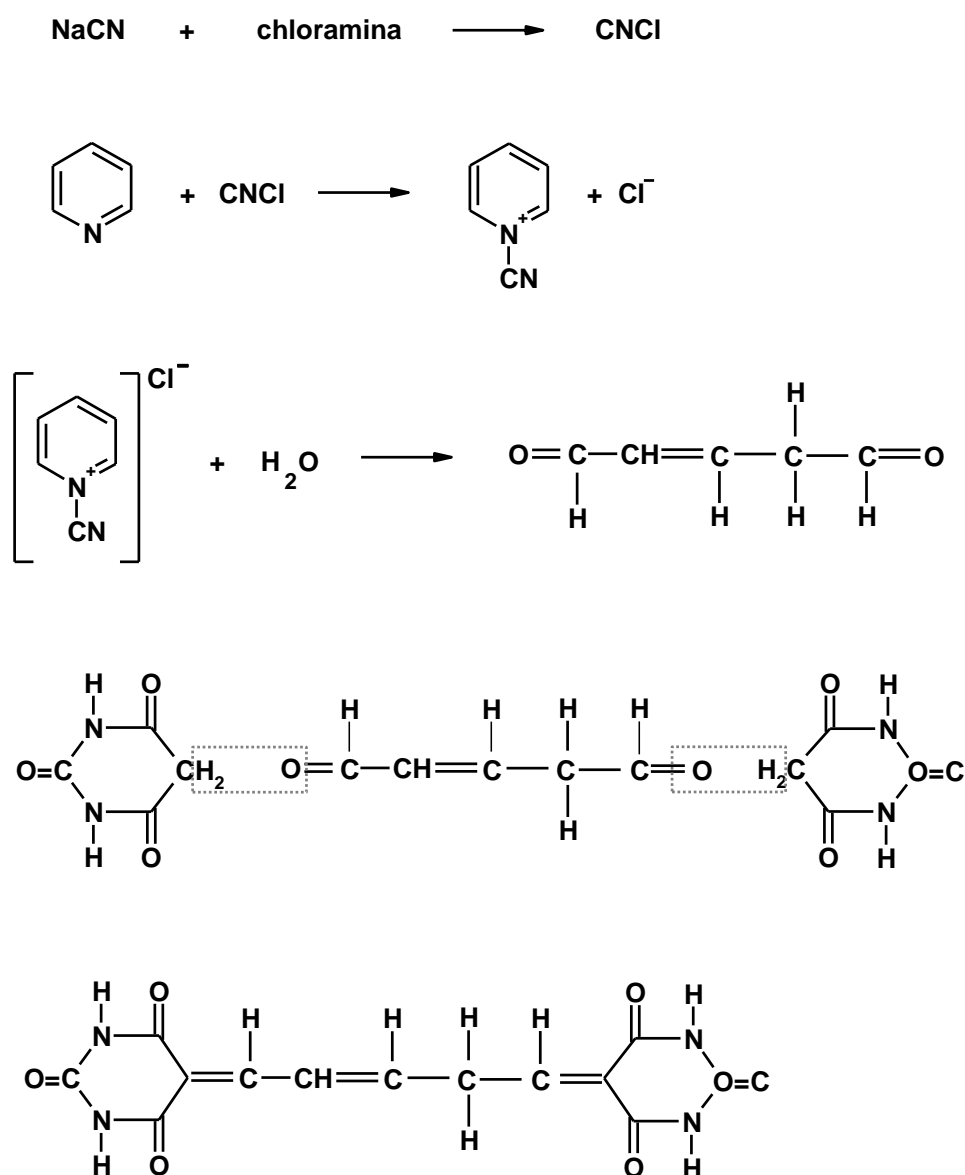
- spektrofotometryczne
- potencjometryczne
- chromatograficzne

1. Metody spektrofotometryczne.

W metodach spektrofotometrycznych istotnym etapem jest izolacja cyjanków z materiału biologicznego po uprzednim przekształceniu ich w cyjanowodór i jego zaabsorbowanie w roztworze wodorotlenku sodowego. Izolacji cyjanków dokonuje się w drodze mikrodyfuzji w specjalnie do tego celu przystosowanych naczynkach mikrodyfuzyjnych Conwaya. Po procesie mikrodyfuzji przeprowadza się reakcję barwną, w której chloramina T przekształca ugrupowanie cyjankowe w reaktywny chlorocyjan, który wykazuje reakcję barwną z kwasem barbiturowym lub pyrazolonem w środowisku bezwodnej pirydyny. Intensywność barwy powstałego roztworu oznacza się spektrofotometrycznie przy określonej długości fali λ wobec próby kontrolnej. Odczytu stężenia jonów cyjankowych dokonuje się z krzywej wzorcowej zależności $Ab = f(c)$. Wysoka czułość tej metody oraz specyficzność predestynują ją do najbardziej używanych metod analitycznych, jedynie chromatografia gazowa z użyciem detektora NPD charakteryzuje się porównywalną czułością, jednak jest ona ograniczona względami ekonomicznymi związanymi z posiadaniem odpowiedniego aparatu.

Przebieg reakcji barwnej, w której powstaniu udział biorą chloramina T i kwas barbiturowy przedstawiają następujące równania rys 10:

Rysunek 10 Reakcja barwna z udziałem chloraminy T i kwasu barbiturowego



2. Metody potencjometryczne

W metodach potencjometrycznych podobnie jak w metodach spektrofotometrycznych istotnym etapem poprzedzającym pomiar zasadniczy jest izolacja cyjanków z materiału badanego. Dokonuje się jej w podobny sposób tj. na drodze mikrodyfuzji w naczynkach mikrodyfuzyjnych Conwaya. Następnie pomiaru stężenia cyjanków dokonuje się potencjometrycznie przy użyciu selektywnej elektrody cyjankowej. Aktualnie, metoda ta z racji wysokiej oznaczalności, niezależnie od innych metod konkurencyjnych stanowi podstawową rutynową metodę analizy cyjanków w analitycznej toksykologii sądowej.

3. Metody chromatograficzne

Analiza chromatograficzna cyjanków w materiale biologicznym opiera się na ich wstępnej izolacji w układzie zamkniętym. Uwolniony lotny cyjanowodór może być

analizowany np. techniką "headspeak". Istotne znaczenie w analizie chromatograficznej ma dobór odpowiedniego detektora. Zastosowanie w tym przypadku selektywnego detektora azotowego /NPD/ o wysokich parametrach oznaczalności ma zasadniczą przewagę nad detektorami przewodnictwa cieplnego /TCD/ czy płomieniowo-jonizacyjnymi /FID/.

1.4.8.3. Dane dostępnego piśmiennictwa dotyczące analizy cyjanków w materiale biologicznym.

Warunkiem oznaczenia poziomu cyjanków w materiale biologicznym jest ich wstępna izolacja, najczęściej na drodze mikrodyfuzji. Materiał biologiczny zostaje poddany działaniu kwasu /roztwór uwalniający/, a zawarte w nim cyjanki są przekształcane w cyjanowodór, który zostaje następnie absorbowany w wodorotlenku sodowym. Oznaczenie ilościowe jonów CN^- /w postaci cyjanku sodu/ odbywa się metodami spektrofotometrycznymi, potencjometrycznymi lub chromatograficznymi. (61)

W metodach spektrofotometrycznych polegających na pomiarze natężenia barwy powstałego związku autorzy proponują użycie następujących odczynników wywołujących barwę:

- chloramina T i kwas -barbiturowy w pirydynie, pomiar spektrofotometryczny przy $\lambda = 580\text{nm}$ (62), (63).
- chloramina T i pyrazolon w pirydynie, pomiar spektrofotometryczny przy $\lambda = 620\text{nm}$ (59)

Malatesta i Ceccarini (64) zaproponowali zamiast pyrazolonu użycie wodorowęglanu etyloacetonu i acetylooctanu etylu lub octanu benzylu, z uwagą, że oznaczenie przy użyciu tych związków daje zależność liniową odpowiednio:

- wodorowęglan etyloacetonu w zakresie stężeń CN^- $0.8 - 2.2\text{mg/dm}^3$, pomiar przy $\lambda = 525\text{nm}$
- acetylooctan etylu lub octan benzylu w zakresie stężeń CN^- $2.0 - 5.0\text{mg/dm}^3$, pomiar przy $\lambda = 525\text{nm}$.

Drugą grupą metod oznaczania cyjanków w materiale biologicznym są pomiary potencjometryczne.

Zasady pomiarów opierają się na potencjometrii bezpośredniej. Potencjometria bezpośrednia z elektrodą jonoselektywną /ISE/ należy do najprostszych metod bezpośrednich. Potencjał jonoselektywnej elektrody wskaźnikowej jest wprost proporcjonalny do aktywności jonów CN^- w badanym roztworze (65). Podobnie jak w metodach spektrofotometrycznych, potencjometryczne oznaczenie ilościowe jonów CN^- dokonuje się poprzedza proces

mikrodyfuzji. Zaproponowana przez autorów (66), (67) metoda potencjometryczna polega na pomiarze stężenia jonów cyjankowych przy użyciu jonoselektywnej elektrody cyjankowej. Podstawa odczytu stężenia jonów cyjankowych w analizowanej próbce jest krzywa wzorcowa, która wykonana tą metodą wykazuje zależność liniową w zakresie stężeń 0.1 – 1.0mg CN⁻/dm³.

Kolejną grupą metod oznaczania jonów cyjankowych w materiale biologicznym stanowią techniki chromatograficzne, głównie chromatografia gazowa.

Analiza ilościowa cyjanków tymi metodami opiera się na wstępnej izolacji cyjanków z materiału biologicznego w układzie zamkniętym. Uwolniony lotny cyjanowodór jest najczęściej analizowany techniką "headspeace". Volentour (68) proponuje przeprowadzenie izolacji cyjanków na drodze mikrodyfuzji do NaOH w środowisku kwaśnym w komorach mikrodyfuzyjnych Conwaya. Kolejnym etapem jest przekształcenie cyjanku w chlorocyjan za pomocą chloraminy T. Rozdział chromatograficzny następuje na kolumnie wypełnionej 7% Halcomidem M-18 na Anakromie ABS, gazem nośnym jest 5% metan w argonie. Jako wzorzec wewnętrzny stosowany jest n-heksan, a detektorem zastosowanym jest detektor jonizacyjny /electron capture/.

Metoda opisana przez Thomsona (69) opiera się na użyciu jako wzorca wewnętrznego KCN lub KSCN znakowanego N¹⁵. W czasie oznaczenia jony CN⁻ /znakowane i z próbki badanej/ są izolowane w fazie gazowej i adsorbowane w NaOH. Następnie w reakcji z chloraminą T są przekształcane w chlorocyjan /CNCl/, który po ekstrakcji heptanem może być analizowany przy użyciu chromatografii gazowej i spektrometrii masowej /w 70 eV/.

Z kolei McAuley (70) proponuje uwolnienie gazowego cyjanowodoru z materiału biologicznego przy użyciu oktanolu i kwasu octowego. Uwolniony lotny cyjanowodór oznacza się następnie przy użyciu techniki "headspeace". Gazem nośnym w tej metodzie jest azot, wypełnienie kolumny stanowi Porapak Q, detektorem stosowanym jest detektor azotowo-fosforowy.

Na bazie metody McAuleya, Zamecnik (71) proponuje oznaczenie stężenia jonów CN⁻ przy użyciu acetonitrylu jako wzorca wewnętrznego i helu jako gazu nośnego.

W/g Imanari (72) do oznaczania poziomu CN⁻ można zastosować metodę chromatografii cieczowej. Rozdział następuje na kolumnie wypełnionej żelazem TSK LS 222 lub IXE 520 QAE z buforem octanowym zawierającym NaNO₂ lub NaClO₄. Po preparatywnym rozdziale chromatograficznym eluat poddaje się reakcji z chloraminą T

i odczynnikiem barbiturowo-pirydynowym a natężenie powstałego barwnego produktu oznacza się przy długości fali $\lambda = 580\text{nm}$, używając detektora UV.

1.5. Siarkowodór

W przypadku zatruc siarkowodorem oprócz typowych, rzadkich intoksykacji z jego udziałem należy wymienić bardziej liczne przypadki śmierci nagłej gwałtownej w warunkach pomieszczeń kanalizacyjnych o ograniczonym poziomie tlenu. Opisano wiele zatruc z udziałem tego gazu i obniżonego poziomu tlenu $<20\%$, między innymi u robotników zatrudnionych przy czyszczeniu urządzeń i systemów kanalizacyjnych, u pracowników gospodarstw rolnych i hodowlanych produkujących biogaz, (73), (9) czy osób pracujących w zakładach chemicznych narażonych na emisję siarkowodoru (7), (8). Coraz większego znaczenia nabiera obecnie nie tylko profilaktyka czy leczenie, co zapobieganie zatruciom poprzez rozwijanie nowoczesnych metod monitoringu stosowanych w zakładach przemysłowych i innych miejscach, w których występuje narażenie na tego typu zatrucia. Jest to szczególnie ważne w fabrykach, w których siarkowodór powstaje podczas procesów technologicznych i jest usuwany do atmosfery, co ma miejsce np. w niektórych zakładach papierniczych i włókienniczych (7). W wielu krajach takich jak USA czy Kanada prowadzone są specjalne badania służące zapobieganiu zatruciom siarkowodorem. Z punktu widzenia ekologii nie bez znaczenia wydaje się być możliwość oznaczania stężenia siarkowodoru w środowisku naturalnym, m.in. w zbiornikach wodnych i powietrzu atmosferycznym, szczególnie przy jego zanieczyszczeniu, podczas erupcji gazu z odwiertów poszukiwawczych. Zanieczyszczenie powietrza związkami siarkowymi (SO_2 , CS_2 , H_2S , DMDS - dimetylodisiarczek, DMS - dimetylosiarczek) pochodzącymi ze spalin samochodowych zostały bardzo znacznie ograniczone dzięki szerokiemu stosowaniu katalizatorów spalin. W praktyce sądowo-lekarskiej potwierdzenie obecności H_2S oraz określenie jego stężenia w materiale biologicznym staje się niezbędnym i podstawowym badaniem, pozwalającym wyjaśnić przyczynę niektórych przypadków śmierci nagłej, gwałtownej. W przypadku podejrzenia o zatrucie przewlekłe, przy którym nie obserwuje się charakterystycznych objawów klinicznych, stwierdzenie obecności siarkowodoru we krwi pozwala na potwierdzenie postawionej właściwej diagnozy i podjęcie odpowiedniego leczenia.

Analiza siarkowodoru w materiale biologicznym, nastęca wielu poważnych trudności z uwagi na następujące czynniki:

- gazowy stan skupienia, w którym występuje siarkowodór

- szybką biotransformację, w wyniku której powstają nieaktywne siarczany wydalone z moczem
- powstawanie endogennego siarkowodoru w procesie rozkładu substancji organicznych, co fałszuje wyniki lub w ogóle uniemożliwia wykonanie oznaczeń

Z uwagi na powyższe trudności, w przypadku zatruc siarkowodorem, ogromnego znaczenia nabiera czas mijający od zatrucia do wykonania analizy oraz pobranie odpowiedniego materiału do badań. Bezpośrednia analiza pozwala wydatnie zmniejszyć błąd interpretacyjny wynikający z tworzenia się endogennego H_2S podczas wtórnego rozkładu białkowych substancji organicznych w procesie dłuższego przechowywania w nieodpowiednich warunkach. Badania przeprowadzone przez naukowców japońskich (74) pozwoliły stwierdzić, że w wątrobie, krwi i nerkach stężenie siarkowodoru zwiększa się znacząco podczas dłuższego przechowywania, natomiast w płucach, mózgu i mięśniach wzrasta nieznacznie lub nie zmienia się.

W dostępnym piśmiennictwie odczuwa się brak odpowiednich metod oznaczenia stężenia siarkowodoru w materiale biologicznym. Proponowane metody pozwalające oznaczyć stężenie H_2S w wodzie i ściekach są skomplikowane, wymagają dużej ilości materiału do badań, i z tego względu nie mogą być zastosowane w rutynowej analizie toksykologiczno - sądowej. Dodatkowym argumentem warunkującym konieczność opracowania prostych i czułych metod oznaczania siarkowodoru w materiale biologicznym były ograniczone dane odnośnie wskazań co do jego doboru jak również opracowań analitycznych pozwalających na zastosowania chromatografii gazowej, jako najbardziej przydatnej techniki badawczej w tym względzie, z racji jego fizykochemicznych właściwości.

W niniejszej pracy podjęto zamiar opracowania odpowiedniej metody analizy jakościowo - ilościowej oraz oceny statystycznej parametrów walidacyjnych odnośnie ich przydatności dla celów rutynowych badań toksykologicznych. W planowanym programie badawczym postanowiono oprzeć się na dwóch rodzajach metod fizykochemicznych:

- spektrofotometrycznej: charakteryzującej się prostym postępowaniem niewymagającym drogich urządzeń, umożliwiającym praktycznie badanie w każdym laboratorium; w badaniach wykorzystano reakcję barwną siarkowodoru z N-N-dimetylo-p-fenylenodiaminą którą uznano za specyficzną i selektywną w odniesieniu do materiału biologicznego

- chromatografii gazowej: uznana obecnie za nowoczesną, szybką i specyficzną metodę, szczególnie przydatną w analizie gazów i związków lotnych do grupy których zaliczany jest badany związek

Równocześnie w badaniach zwrócono szczególną uwagę na czułość stosowanych metod, która powinna być odpowiednio wysoka z uwagi na ograniczony zakres stężenia siarkowodoru w analizowanych materiałach biologicznych.

1.5.1. Właściwości fizykochemiczne

Siarkowodor jest gazem o silnym, charakterystycznym zapachu zgniłych jaj wyczuwalnym już przy stężeniu 5mg/m^3 . Na powietrzu pali się niebieskawym płomieniem z wytworzeniem, w zależności od warunków wody i siarki koloidalnej lub dwutlenku siarki. Dobrze rozpuszcza się w wodzie - w temp. 10°C w 1dm^3 wody rozpuszcza się $3,6\text{dm}^3$ tego gazu. Podstawowe właściwości siarkowodoru ilustruje tabela 11.

Tabela 11 Wybrane parametry fizykochemiczne siarkowodoru (44)

Parametr fizykochemiczny	Wartość liczbowa
wzór chemiczny	H_2S
ciężar cząsteczkowy	34,08
temperatura topnienia	$-85,5^\circ\text{C}$
temperatura wrzenia	$-60,7^\circ\text{C}$
gęstość względem powietrza	1,1906
gęstość w 20°C	$1,539\text{ g/dm}^3$
temperatura krytyczna	$100,4^\circ\text{C}$
współczynnik załamania światła	1,000644
moment dipolowy	$0,93\mu\text{D}$
pKa	6.92
pKb	8.30×10^{-8}

1.5.2. Występowanie

Siarkowodór występuje w środowisku naturalnym przede wszystkim w gazach wulkanicznych, niektórych gatunkach ropy naftowej, gazu ziemnego oraz w niektórych źródłach wody mineralnej (75) (11). Jest obecny w kopalniach siarczków metali, studniach, tunelach. Zawsze można go znaleźć w miejscach gdzie zachodzą intensywne procesy gnilne: ścieki komunalne i przemysłowe, systemy kanalizacyjne, wysypiska śmieci itp. Jest on także obecny jako produkt uboczny w wielu procesach technologicznych w przemyśle. W organizmie żywym ssaków siarkowodór i jego monomery /metylosiarkowodór/ powstaje w jelicie grubym jako produkt metabolizmu bytujących tam bakterii i jest potencjalnie toksyczny dla nabłonka jelitowego (76).

1.5.3. Wchłanianie, metabolizm oraz działanie toksyczne

Siarkowodór jest wchłaniany do organizmu przez płuca i w niewielkim stopniu przez skórę. Ze względu na swój charakterystyczny, nieprzyjemny zapach „zgniłych jaj” jest łatwo wyczuwalny w powietrzu w odróżnieniu np. od tlenu węgla, który jest bezwonny. Siarkowodór posiada jednak bardzo niebezpieczną cechę w większych stężeniach jego wyczuwalność maleje ze względu na to, iż bardzo szybko powoduje on porażenie zakończeń węchowych. W organizmie ulega utlenieniu do kwasu siarkowego, który jest następnie wydalany z moczem w postaci wolnych lub sprzężonych siarczanów. Pewna niewielka część wchłoniętej dawki jest wydalana przez płuca w postaci niezmienionej. Natomiast wykazuje bardzo duże powinowactwo do methemoglobiny, z którą łączy się dając sulfomethemoglobinę (77), (11). Zjawisko to zostało wykorzystane praktycznie do ratowania ludzi zatrutych tym gazem. Przy stężeniu niższym niż 1mg/dm^3 siarkowodór ulega w organizmie człowieka całkowitemu utlenieniu, natomiast powyżej tego stężenia zaczyna się gromadzić we krwi powodując objawy toksyczne.

Na poziomie komórkowym działanie siarkowodoru polega na blokowaniu enzymów zawierających w swojej grupie prostetycznej metale. Szczególnie podatne na to działanie są enzymy biorące udział w cyklach oddechowych, zawierające w swojej grupie prostetycznej żelazo np. enzymy oksydo - redukcyjne. W ten sposób dochodzi do zahamowania oddychania komórkowego. Poziom tlenu w komórkach znacząco się obniża. Taki stan jest nazywany „hipoksją histotoksyczną” (niektórzy badacze kwestionują w tym przypadku nazwę „hipoksja”, ponieważ prężność tlenu w płynie pozakomórkowym może pozostać niezmieniona lub nawet zwiększyć się (78). Taki sam mechanizm działania toksycznego przypisuje się działaniu cyjanków. Poza tym jon SH^- powoduje zablokowanie kanału K^+ co wywołuje w rezultacie hiperpolaryzację neuronów oraz uaktywnienie różnych procesów

hamujących przewodzenie w układzie nerwowym (78). Kliniczne objawy zatrucia siarkowodorem nie są charakterystyczne. Początkowo następuje pogłębienie i przyspieszenie oddechu, a przy wyższych stężeniach jego porażenie i w końcu bezdech. Przy stężeniu 1,2 - 1,8mg/dm³ następuje natychmiastowa śmierć. W odróżnieniu od cyjanków siarkowodór może powodować powstanie wielu reakcji o charakterze miejscowym, takich jak obrzęk i przekrwienie płuc oraz podrażnienie spojówek i nabłonka rogówki, co prowadzi w efekcie do światła wstrętu i silnego bólu. Zatruciu tym gazem mogą towarzyszyć także objawy duszności, zawroty i bóle głowy, niepewny chód, spadek ciśnienia krwi i drgawki. Najnowsze badania laboratoryjne wskazują na zmiany stężeń niektórych białek po długotrwałym narażeniu na działanie tego gazu (wzrost stężenia IgA, IgM, α-2 makroglobuliny w surowicy oraz IgA i lizyny w ślinie) (79). Zanotowano także zmiany w zapisie EEG (80). Skutki działania H₂S zawartego w powietrzu na organizm człowieka ilustruje tabela 12.

Tabela 12 Działanie siarkowodoru zawartego w powietrzu na organizm człowieka (77), (81)

Stężenie siarkowodoru		Działanie toksyczne
w mg/dm ³	w % objętości	
0,14 - 0,21	0,1 - 0,15	słabe objawy po upływie paru godzin
0,28 - 0,42	0,2 - 0,3	znoszone w ciągu godziny bez groźnych objawów
0,7 - 1,0	0,5 - 0,7	w ciągu 30 -60 minut niebezpieczne
1,4 - 4,2	1,0 - 3,0	szybka śmierć

Siarkowodór powoduje zatrucia ostre i podostre, natomiast istnienie zatruc przewlekłych poddawane jest w wątpliwość, gdyż w małych stężeniach ulega on całkowitemu utlenieniu. Jednakże u osób, które uległy zatruciu tym gazem obserwuje się wiele następstw trwających niejednokrotnie po kilka lat, lub nawet nie odwracalnych. Należą do nich przede wszystkim zaburzenia w układzie nerwowym (kłopoty z zapamiętywaniem, upośledzenie funkcji motorycznych, zaburzenia wzroku i słuchu), oddechowym (kaszel, duszność) i pokarmowym (ślinotok, metaliczny smak w ustach, zaburzenia żołądkowe) (80). Pacjenci z takimi objawami wymagają często wieloletniej rekonwalescencji, która nie zawsze zakończona jest pełnym powrotem do zdrowia (82) (83) (84).

1.5.4. Pobieranie materiału do badań

Pobranie odpowiedniego materiału do badań jest w wypadku siarkowodoru zagadnieniem o pierwszorzędowym znaczeniu, i jak dotychczas nie w pełni definitywnie

ustalonym. Najważniejszym warunkiem powodzenia analizy oraz otrzymania wiarygodnych wyników jest odpowiednio szybkie jej rozpoczęcie. Jak już wspomniano siarkowodór powstaje również podczas gnicia białkowych substancji organicznych. Czynnikiem mającym wpływ na szybkość tego procesu jest temperatura. Jej wzrost powoduje przyspieszenie procesu rozkładu, natomiast w niskich temperaturach tworzenie siarkowodoru praktycznie nie zachodzi. Dlatego właśnie w przypadku braku możliwości szybkiego wykonania analizy materiał biologiczny należy przechowywać w lodówce.

Podczas wykonywania niniejszej pracy stwierdzono, że krew przechowywana w temperaturze 4°C nawet po kilku latach nie wykazuje obecności siarkowodoru.

Drugim ważnym czynnikiem mającym znaczący wpływ na wiarygodność analizy jest pobranie odpowiedniego materiału. Jest to szczególnie ważne w przypadku analiz toksykologicznych przeprowadzanych dla celów sądowych, gdzie zasadniczym celem badań jest wydanie opinii wskazującej bądź wykluczającej udział siarkowodoru w mechanizmie przyczyny śmierci.

1.5.5. Pierwsza pomoc i leczenie zatruc siarkowodorem

W ostrym zatruciu siarkowodorem skuteczne leczenie jest nierozdzielnie związane z czasem, jaki upłynął od ekspozycji do podjęcia akcji ratowniczej. Pierwszym zadaniem w czasie akcji ratowniczej musi być zawsze usunięcie osoby zatrutej z atmosfery zawierającej trujący gaz. (85)

Jak już wspomniano grupy SH⁻ łączą się aktywnie z metalem grupy prostetycznej enzymów oddechowych przez co blokują je, uniemożliwiając oddychanie komórkowe. Zasadniczym celem leczenia jest ograniczenie blokady enzymatycznej i niedopuszczenie do tego bardzo niebezpiecznego zjawiska. Uzyskuje się to poprzez celowe, zamierzone wywołanie u osoby zatrutej methemoglobinemii lub oksyhemoglobinemii. Siarkowodór posiada bowiem bardzo duże powinowactwo zarówno do oksyhemoglobiny i methemoglobiny - jest przez nie trwale wiązany a następnie utleniany i wydalany w postaci siarczanów przez układ moczowy. Dla wywołania oksyhemoglobinemii stosowane jest podawanie tlenu. Niektórzy autorzy sugerują, aby podawać go pod zwiększonym ciśnieniem podobnie jak ma to miejsce przy zatruciu tlenkiem węgla czy cyjankami ale skuteczność tej metody nie jest jeszcze udowodniona (86). Duże kontrowersje budzi natomiast wywołanie methemoglobinemii. Dla jej wywołania stosuje się najczęściej azotyny. Może to powodować wiele skutków ubocznych, szczególnie groźnych dla osób będących w ciężkim stanie ogólnym. Udowodniono, iż azotyny można stosować jako antidotum tylko w czasie kilku pierwszych minut po zatruciu, kiedy prężność tlenu jest zmniejszona. W momencie kiedy

zawartość O_2 powraca do normy jego zastosowanie nie tylko nie pomaga ale wręcz uniemożliwia prawidłowe utlenianie siarkowodoru w organizmie (87).

1.5.6. Przegląd metod oznaczania siarkowodoru

Pomiaru stężenia H_2S w materiale biologicznym dokonuje się najczęściej w celu:

- potwierdzenia szybkiej diagnozy ostrego zatrucia siarkowodorem
- oceny przewlekłego narażenia na siarkowodór
- ustalenie przyczyny zgonu (post mortem), wykluczającą anoksemię (deficyt tlenu)

Do badań przyżyciowych pobiera się krew żylną, natomiast w przypadku zwłok można wykorzystać dodatkowo mózg, wątrobę, nerkę, mięsień, krew, płuca denata (88), (89). Wszystkie analizy należy wykonać niezwłocznie po pobraniu materiału. Jeżeli nie jest to możliwe to materiał powinno się przechowywać w szczelnie zamkniętym naczyniu w temperaturze $4^{\circ}C$. Niezmiernie ważne jest aby nie pozostawić materiału w temperaturze pokojowej nawet przez krótki okres czasu, ponieważ może to prowadzić do wytworzenia endogennego siarkowodoru i tym samym błędów w analizie. Na uwagę zasługuje fakt, iż odpowiednie przechowywanie materiału (w naszym wypadku krwi) całkowicie eliminuje powstawanie endogennego siarkowodoru, o czym już wcześniej wspomniano.

W niniejszej pracy do analizy H_2S w materiale biologicznym zastosowano dwie metody, spektrofotometryczną oraz chromatografię gazową. Oprócz nich w badaniach można zastosować również metodę potencjometryczną z użyciem elektrody jonospecyficzej oraz spektrofotometrię w podczerwieni. Zastosowanie powyższych metod jest ograniczone przede wszystkim ich niższą czułością i oznaczalnością oraz koniecznością użycia specjalistycznego sprzętu (odpowiednia elektroda lub spektrofotometr w podczerwieni ze specjalnymi kuwetami z polietylenu co ogranicza rutynowe badania).

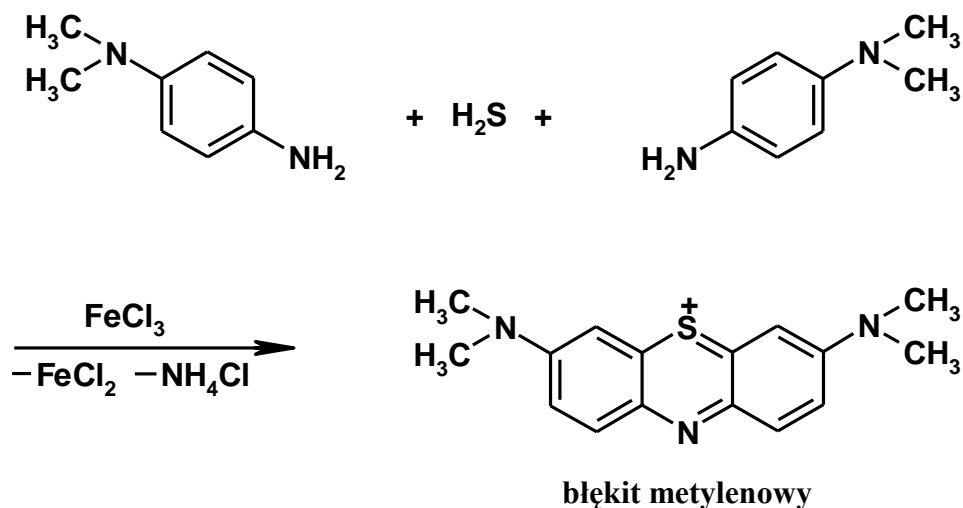
1.4.6.1. Metody spektrofotometryczne

1. Metoda z *N-N*-dimetylo-*p*-fenylenodiaminą.

Izolacja siarkowodoru jest prowadzona metodą mikrodyfuzji w komorze Conwaya. Siarkowodór związany uwalnia się z materiału biologicznego poprzez działanie kwasem siarkowym. Uwolniony gaz dyfunduje w przestrzeni zamkniętej do roztworu wodorotlenku sodowego umieszczonego w wewnętrznej części komory Conwaya. Wyizolowany w ten sposób siarkowodór reaguje z odczynnikiem chromogennym, składającym się z roztworu *N-N*-dimetylo-*p*-fenylenodiaminy i $FeCl_3$ w środowisku kwaśnym, dając błękit metylenowy. Odczyt następuje na spektrofotometrze przy długości fali 670nm. Metoda ta wykorzystuje

reakcję syntezy błękitu metylenowego i jest specyficzna dla siarkowodoru, przedstawiono na rys 11.

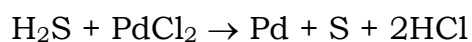
Rysunek 11 Schemat reakcji H_2S z N-N-dimetylo-p-fenylendiaminą i FeCl_3



Istnieje kilka możliwych modyfikacji powyższej metody, w zależności od materiału, w którym siarkowodor ma być oznaczany. Jedna z nich – znajduje zastosowanie w polskich laboratoriach komunalnych, przy oznaczaniu siarkowodoru i siarczków rozpuszczalnych w wodzie i ściekach, wymaga jednak dużej ilości materiału, w przypadku analizy niskich stężeń siarkowodoru (90). Inna, zaproponowana przez T.H.J. Florina w 1990 roku, jest wykorzystywana w diagnostyce schorzeń jelita grubego do oznaczania H_2S w kale (76). Wymaga ona specjalnego toku postępowania przygotowawczego i również nie nadaje się do rutynowej analizy toksykologicznej materiału biologicznego.

2. Metoda z chlorkiem palladu (PdCl_2).

Metoda ta wykorzystuje redukcyjne właściwości siarkowodoru. Izolacji siarkowodoru dokonuje się identycznie jak w poprzedniej metodzie. Uwolniony gaz dyfunduje do barwnego roztworu PdCl_2 i wchodzi z nim w reakcję według następującego równania:



Wykrycie pośrednie obecności siarkowodoru jest możliwe dzięki powstaniu zredukowanego metalu. Przy oznaczeniu należy zwrócić uwagę na czynniki interferujące takie jak: tlenek węgla, wodór, acetylen, cyjanowódor, posiadające podobne właściwości redukujące (91).

Niezwiązaną ilość chlorku palladu można analizować poprzez:

- zastosowanie spektrofotometrii UV
- oznaczanie fotometryczne z kompleksami, np. z p-nitrodietylaminą

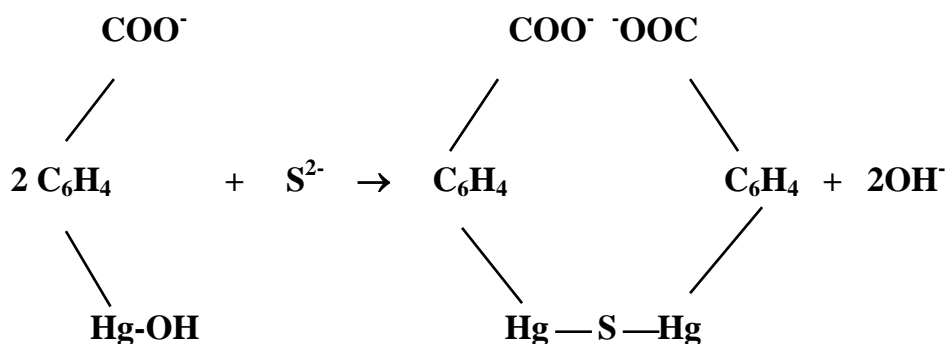
- jodometrycznie

- polarograficznie

3. Metoda z tiofluoresceiną i kwasem o-hydroksyrtęciobenzoesowym (90).

Metoda ta jest stosowana do oznaczania siarkowodoru i siarczków rozpuszczalnych (w przeliczeniu na S) w wodzie i ściekach. Oznaczenie polega na wprowadzeniu do próbki nadmiaru soli kwasu o-hydroksyrtęciobenzoesowego (HMB), który wiąże się z siarczkami tworząc bezbarwne rozpuszczalne kompleksy, które nie reagują z tiofluoresceiną. Nadmiar HMB odmiareczkuje się roztworem tiofluoresceiny do słabo niebieskiego zabarwienia. Zasadę reakcji ilustruje poniższe równanie.

Rysunek 12 Reakcja z tiofluoresceiną i kwasem o-hydroksyrtęciobenzoesowym



Metoda ta nie ma zastosowania w analizie toksykologicznej, z uwagi na niską czułość oraz konieczność użycia dużej ilości materiału.

1.5.6.2. Zastosowanie chromatografii gazowej w analizie siarkowodoru

Tradycyjne metody analityczne, służące wykrywaniu i oznaczaniu siarkowodoru, pomimo swoich niewątpliwych zalet /swoistość i oznaczalność/, posiadają zasadniczą wadę w postaci niekorzystnego czasu wymaganego do wykonywania analizy, co ma duże znaczenie w przypadku, szybkiej diagnostyki chemicznej zatrucia, niezbędnej w podjęciu odpowiedniego leczenia. Tej wady pozbawiona jest jedynie metoda chromatografii gazowej. Pozwala ona na szybkie i pewne potwierdzenie obecności siarkowodoru i nie wymaga wstępnej obróbki materiału, dzięki czemu wynik analizy można otrzymać już kilkanaście minut od pobrania próbek.

W dobie bardzo szybkiego rozwoju metod chromatograficznych ograniczenia sprzętowe nie stanowią dzisiaj jakiegoś szczególnego problemu. Jednak dla uzyskania wiarygodnych wyników niezwykle ważne staje się dobranie odpowiedniego detektora oraz wypełnienia kolumny chromatograficznej, których parametry rozdzielcze podano w tabeli /7, 8/.

1.6. Hipoksja – zagrożenie zdrowia i życia człowieka

Hipoksja jest to niedobór tlenu w tkankach powstający w przebiegu hipoksemii - niedoboru tlenu we krwi. Prężność tlenu we krwi tętniczej (pO_2) spada znacznie poniżej normy (12,7-13,7kPa - 95-98mmHg) w warunkach jego obniżonego stężenia w pomieszczeniach użytkowych. Do hipoksemii dochodzi z różnych przyczyn, które można podzielić na zewnątrz ustrojowe (np. skutek przebywania na dużych wysokościach lub w biologicznie zmienionych układach gazowych pomieszczeń użytkowych o obniżonym ciśnieniu parcjalnemu tlenu), oraz wewnątrzustrojowe (np.: niewydolność krążenia, zaburzenia oddychania, niedobór hemoglobiny w wyniku krwotoku lub niedokrwistości). Do hipoksemii może dojść także w wyniku zatrucia np.: narkotykami, które porażają czynność ośrodka oddechowego (depresja oddechowa), czy kurarą porażającą z kolei mięśnie oddechowe lub zaburzenia transportu tlenu przez krew (zatrucie tlenkiem węgla), czy oddychania komórkowego np. po zatruciu cyjankami.

Bardzo istotny problem dotyczy zatrucia osób przebywających nawet krótkotrwale m.in. w systemach kanalizacyjnych /szamba, studzienki rewizyjne/, kompostowniki; w przypadku niedostatecznego napowietrzania prowadzi do powstawania m.in. siarkowodoru powstającego w procesach gnilnego rozkładu związków organicznych, amoniaku produktu redukcji związków azotowych oraz w procesach gnilnych roślin i zwierząt czy metanu powstającego w wyniku beztlenowego rozkładu szczątków roślinnych przy równocześnie nagromadzonym stężeniu ditlenku węgla tworzącego się na skutek utleniania i fermentacji gnilnej substancji organicznych występujących m.in. w studzienkach kanalizacyjnych. Generacja wymienionych gazów powoduje zawsze niebezpieczny efekt obniżonego poziomu tlenu $/O_2 < 15\%/$ i podwyższony poziom ditlenku węgla $/CO_2 > 5\%/$, prowadzącego do stanu równowagi gazowej, który jest najczęściej bezpośrednią przyczyną śmierci głównie z racji hipoksji – niedoboru tlenu.

Udział hipoksji /niedobór tlenu/ czy anoksji /całkowity brak tlenu/ w atmosferze powietrza powoduje rozwijające się niedotlenienie i zamartwicę. Szybkość narastania tych objawów zależy od stężenia tlenu w powietrzu. W stężeniu granicznym 16% tlenu w powietrzu nasycenie hemoglobiny tlenem jest jeszcze pełne i wynosi ok. 95% HbO_2 . W mniejszym stężeniu objawy głodu tlenowego rozwijają się niebezpiecznie szybko. Rozróżnia się stadia niedoboru tlenu /anoksja/ we krwi, które umownie można interpretować w czterostopniowej skali, przedstawione w tabeli 13.

Tabela 13 Czterostopniowa skala niedoboru tlenu

stadium	zawartość tlenu w powietrzu	objawy
I	16 – 12%	Wzmożony oddech wskutek pobudzenia ośrodka oddechowego. Następstwem tego jest ubytek CO ₂ z krwi i wzrost pH krwi. Tętno przyspieszone. Lekkie zaburzenie koordynacji ruchów. Dłuższy ubytek CO ₂ może powodować zmniejszenie pobudliwości ośrodka oddechowego i w efekcie utrudnioną wentylację płuc.
II	12 – 10%	Oddech szybki, przechodzący w przerywany lub w oddychanie typu Cheyne-Stockesa. Przy zachowaniu przytomności występują zaburzenia czynności wyższych ośrodków nerwowych. Szybko następuje zmęczenie wskutek utrudnionej pracy mięśni.
III	10 – 6%	Mdłości i wymioty; niemożność poruszania się i wykonywania większych ruchów mięśniowych. Brak możliwości udzielania sobie pomocy. Następuje zanik świadomości i apatia – prowadząca do śmierci.
IV	poniżej 6%	Drgawki, oddech przerywany, często ograniczający się tylko do otwierania ust. Po przedłużających się okresach bezdechu ustaje czynność serca.

1.7. Przegląd detektorów gazów, przydatnych w ratownictwie chemicznym

Wysoka toksyczność lotnych związków nieorganicznych i związane z nią przypadki śmierci nagłej gwałtownej wymagają szybkich i kompleksowych badań często na miejscu zdarzenia. Możliwość wykazania obecności lotnej trucizny, względnie ograniczonego poziomu tlenu < 20%. Podczas ekspozycji ofiary w warunkach powietrza atmosferycznego stanowi integralną część badań diagnostycznych, obok równoległych rutynowych postępowań tanatologicznych i toksykologicznych. Wykorzystanie nowoczesnych technik detekcji w ratownictwie chemicznym stanowi więc integralną część kompleksowych badań potwierdzających, przydatnych w ustaleniu przyczyny zgonu osób pokrzywdzonych już na miejscu zdarzenia.

Detektory gazów palnych i wybuchowych, mierniki substancji wybuchowych i toksycznych są przykładami podręcznych analizatorów gazów, pozwalających ustalić zagrożenie dla zdrowia i życia człowieka. Urządzenia te powinny charakteryzować się prostotą obsługi jak i możliwością wykonania szybkiej analizy jakościowo – ilościowej składu gazów w atmosferze powietrza użytkowego. Możliwości zastosowania podręcznych analizatorów są praktycznie nieograniczone, także można je stosować w wielu dziedzinach m.in. do pomiarów stężeń gazów w obszarach zagrożonych wybuchem, pomiarów i kontroli

stanowisk pracy czy do wykrywania nieszczelności np. w instalacjach przemysłowych. Z tego względu znalazły zastosowanie m.in. w przemyśle chemicznym, w kontroli zagrożeń na składowiskach różnego rodzaju odpadów generujących powstawanie gazów, rutynowych działaniach straży pożarnej, w komunalnych zakładach miejskich, oczyszczalniach ścieków czy żegludzie transportowej surowców chemicznych.

Zasady pomiaru dla gazów palnych, wybuchowych /tlen, wodór, metan, propan.../ polegają na zasadzie mikrospalania katalitycznego /efekt cieplny/. Mieszanka gazów albo pary z powietrzem trafia w wyniku dyfuzji do głowicy pomiarowej, w której znajduje się aktywna spirala pomiarowa /spirala wykrywacza/ oraz pasywna spirala pomiarowa /spirala kompensatora/, które połączone są w układzie mostkowym. Gaz względnie mieszanka gazów spalana jest w spirali detektora, co prowadzi do zmiany oporu na spirali spowodowanej podwyższeniem temperatury. Po czym wzmocniony sygnał mostkowy przesyłany jest do mikrokomputera. Zasada termicznego pomiaru katalitycznego w przypadku istnienia większej liczby wykrywalnych gazów podaje sumę wszystkich składników inicjujących efekt wybuchowy.

W przypadku analizy gazów toksycznych /m.in. CO, H₂S, HCN, NH₃/, czy do wrywania zawartości tlenu w atmosferze wykorzystano czujniki elektrochemiczne. Maksymalnie przyrząd może być wyposażony w 4 dowolne czujniki (dwuzakresowy czujnik stężenia metanu, czujnik stężenia substancji wybuchowych, czujniki gazów toksycznych lub czujnik tlenu). Pomiar dokonywany jest w czasie rzeczywistym, wykrywa przekroczenia zadanego poziomu progowego z jednoczesnym zasygnalizowaniem tego akustycznie i wizualnie, zapamiętuje wartości maksymalne i średnie w czasie pracy miernika, oraz posiada pamięć chwilowych wartości cząstkowych (2880 pomiarów dla każdego medium z datą i czasem zapisu), posiada możliwość komunikacji z komputerem lub drukarką termiczną.

Jednostki Państwowej Straży Pożarnej w zakresie Ratownictwa Chemicznego i Ekologicznego w Poznaniu są wyposażone w następujące urządzenia pomiarowe:

* Miernik gazów typu GasHunter /GH.1.5/ firmy Alter, który równocześnie wykonuje pomiar diagnostyczny dla czterech gazów np.: CH₄, O₂, CO oraz H₂S.

* Miernik substancji wybuchowych i toksycznych typu MX-8 firmy Alter – dwuzakresowy czujnik stężenia metanu, czujnik stężenia substancji wybuchowych, czujnik gazów toksycznych lub czujnik tlenu, maksymalnie może być wyposażony w 4 czujniki pomiarowe.

Do gazów najczęściej mierzonych i wykrywanych przez urządzenia firmy Alter należy zaliczyć m.in.: O₂, CO, H₂S, SO₂, Cl₂, NO, NO₂, H₂, HCN, NH₃, O₃, C₂H₄O /tlenek etylenu/,

PH₃, AsH₃, HBr, HF, F₂, COCl₂ /fosgen/, itp.

* Detektor gazów palnych i wybuchowych MSA Titan - ręczy przyrząd pomiarowy do kontroli i pomiaru gazów palnych /wodór, metan, propan, pentan/

* Detektor gazów SOLARIS MSA – może być przeznaczony do wykrywania: gazów palnych oraz niektórych par substancji palnych /np.: CH₄/ , atmosfery ubogiej lub bogatej w tlen, obecności specyficznych gazów toksycznych /CO, H₂S/, po zainstalowaniu odpowiedniego czujnika.

Część doświadczalna

2. Siarkowodór

2.1. Odczynniki, roztwory pomocnicze, sprzęt laboratoryjny, aparatura

2.1.1. Odczynniki:

- kwas siarkowy cz.d.a. /Polskie Odczynniki Chemiczne/
- kwas solny cz.d.a. /Polskie Odczynniki Chemiczne/
- N-N-dimetylo-p-fenylendiamina /Firmy SIGMA/
- sodu siarczek ($\text{Na}_2\text{S} \times 9\text{H}_2\text{O}$) cz.d.a. Prod. OBR PS „Siarkopol”
- sodu wodorotlenek cz.d.a. /Polskie Odczynniki Chemiczne/
- żelazowy chlorek

2.1.2. Roztwory pomocnicze:

- roztwór $0,1\text{mol/dm}^3$ NaOH sporządzony przez rozpuszczenie 4 gram NaOH cz.d.a. w 1000cm^3 wody destylowanej;
- roztwór $0,5\text{mol/dm}^3$ kwasu siarkowego zawierający 5cm^3 stężonego H_2SO_4 /98%/ w 100cm^3 H_2O destylowanej;
- roztwór 5% HCl sporządzony przez zmieszanie 15cm^3 stężonego HCl /36%/ z 93cm^3 H_2O destylowanej;
- roztwór 10% HCl sporządzony przez zmieszanie 30cm^3 stężonego HCl /36%/ z 78cm^3 H_2O destylowanej;
- roztwór podstawowy siarczku sodu sporządzony przez rozpuszczenie 0,07058g. $\text{Na}_2\text{S} \times 9\text{H}_2\text{O}$ w 50cm^3 H_2O dest. i dopełniony do 100cm^3 H_2O dest; dający roztwór podstawowy H_2S $0,1\text{g/dm}^3$.
- roztwór chlorku żelaza sporządzony przez rozpuszczenie $0,165\text{g}$ $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ w 100cm^3 10% HCl
- roztwór N-N-dimetylo-p-fenylendiaminy sporządzony przez rozpuszczenie 100mg tego związku w 100cm^3 5% HCl;

2.1.3. Aparatura:

- spektrofotometr - SPEKOL - 11
- SPECORD UV - VIS prod. DDR Carl Zeiss Jena
- chromatograf gazowy Chrom 5 prod. CSR
- kuwety kwarcowe o grubości 1cm

- kuwety szklane o grubości 1 cm
- ciepłarka typu CP - 100 (ustawienie temperatury z dokładnością do 1°C)
- waga analityczna WA 34 typ PRL TA - 14

2.1.4. Sprzęt laboratoryjny:

- pipety automatyczne o poj. 100μl, 200μl, 1000μl,
- pipety laboratoryjne o poj. 0,1; 0,2; 1,0; 2,0; 5,0; 10,0cm³
- probówki laboratoryjne
- cylindry miarowe o poj. 10, 20, 50cm³
- zlewki o poj. 100 cm³
- kolbki miarowe o poj. 50 i 100cm³
- eksykator o poj. 3,0dm³
- komory Conwaya (Ø zew. 6cm i Ø wew.3,5cm)
- buteleczki o poj. 2,9cm³ zamykane korkiem z membraną

2.1.5. Zwierzęta doświadczalne:

Szczury białe rasy „WISTAR” – wyselekcjonowano do badań grupę zwierząt /samice, samce/ po wykorzystanym hodowlanym okresie reprodukcyjnym – Zezwolenie Nr 14/2010 na przeprowadzanie doświadczeń na zwierzętach.

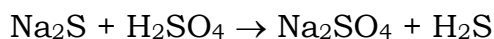
2.1.6. Motywacja badań eksperymentalnych na zwierzętach

Dotychczasowe dostępne dane piśmiennictwa odnośnie właściwego zabezpieczenia materiału biologicznego /sekcyjnego/ w przypadku podejrzenia o zatrucie z udziałem siarkowodoru są ograniczone. Pomimo znanego powinowactwa siarkowodoru do szybkiej reakcji z zasadowymi komponentami jonowymi krwi /Na⁺, K⁺/ i jego transportu w formie zjonizowanej /HS⁻, S⁻²/ nie ustalono jego zróżnicowanej wielonarządowej dystrybucji w warunkach intoksykacji. Powyższe niedoskonałości w wyborze najbardziej właściwego materiału biologicznego do badań toksykologicznych powinny być wyjaśnione, wobec niepotwierdzonych propozycji wielu monografii wskazujących na tkankę płuc jako najbardziej przydatnej w tym względzie.

2.2. Otrzymywanie siarkowodoru

We wszystkich doświadczeniach przeprowadzonych i opisanych podczas wykonywania niniejszej pracy siarkowodór otrzymywany był z roztworu wodnego siarczku sodu (Na₂S × 9H₂O), w reakcji z nadmiarem kwasu siarkowego, w odniesieniu do reakcji

stechiometrycznej. Reakcja tworzenia H_2S przebiegała według następującego równania, w warunkach układu zamkniętego z możliwością jego określonego dozowania:



2.3. Analiza ilościowa siarkowodoru metodą spektrofotometryczną w zakresie widzialnym

Reakcja barwna z N-N-dimetylo-p-fenylenodiaminą.

2.3.1. Zasada metody

Oznaczanie polega na reakcji jonów siarczkowych z N-N-dimetylo-p-fenylenodiaminą w obecności chlorku żelazowego, w wyniku której powstaje błękit metylenowy. Intensywność powstałego zabarwienia jest wprost proporcjonalna do stężenia jonów siarczkowych. W analizie wykorzystano zjawisko mikrodyfuzji uwolnionego z materiału biologicznego siarkowodoru do roztworu wodorotlenku sodowego. Proces uwalniania siarkowodoru z próbki zachodzi po zadziałaniu kwasem siarkowym. Po ukończeniu dyfuzji pobiera się ze środkowej części komory Conwaya roztwór NaOH zawierający związany siarkowodór i dodaje do odczynnika reagującego, złożonego z równych objętości roztworów N-N-dimetylo-p-fenylenodiaminy i FeCl_3 . Intensywność barwy roztworu mierzy się spektrofotometrycznie przy długości fali 670 nm wobec próby ślepej.

2.3.2. Odczynniki:

- (a) roztwór wodorotlenku sodowego $0,1 \text{ mol/dm}^3$
- (b) kwas siarkowy $0,5 \text{ mol/dm}^3$
- (c) roztwór N-N-dimetylo-p-fenylenodiaminy 5% HCl (1 mg/cm^3)
- (d) roztwór FeCl_3 w 10% HCl
- (e) odczynnik barwny złożony z równych objętości roztworów (c) i (d)

2.3.3. Wykonanie oznaczenia

Krawędzie komory Conwaya pokryto cienką warstwą wazeliny (środek uszczelniający) a następnie środkową jej część wypełniono 3 cm^3 $0,1 \text{ mol/dm}^3$ roztworu NaOH. Do zewnętrznej części komory wprowadzono 2 cm^3 badanej próby i całość komory zamknięto przykrywką, pozostawiając niewielki otwór na wprowadzenie kwasu. Po wprowadzeniu 2 cm^3 kwasu siarkowego $0,5 \text{ mol/dm}^3$ komorę natychmiast zamykano i łagodnie wstrząsano. Proces mikrodyfuzji prowadzono w temperaturze 37°C przez 90 minut. Po tym czasie pobrano 2 cm^3 zawartości wewnętrznej części komory przeniesiono do 2 cm^3 odczynnika reagującego i po upływie 10 minut dokonano odczytu na SPEKORDZIE UV-VIS przy długości fali $\lambda = 670 \text{ nm}$.

2.3.4. Wykonanie krzywej kalibracyjnej

2.3.4.1. Krzywa kalibracyjna dla roztworów wodnych.

W celu sprawdzenia zależności $A = f(c)$ z roztworu podstawowego o stężeniu 0,1g H_2S w $1dm^3$ wykonano roztwory wzorcowe o wzrastających stężeniach siarkowodoru według następującego schematu tabela 14:

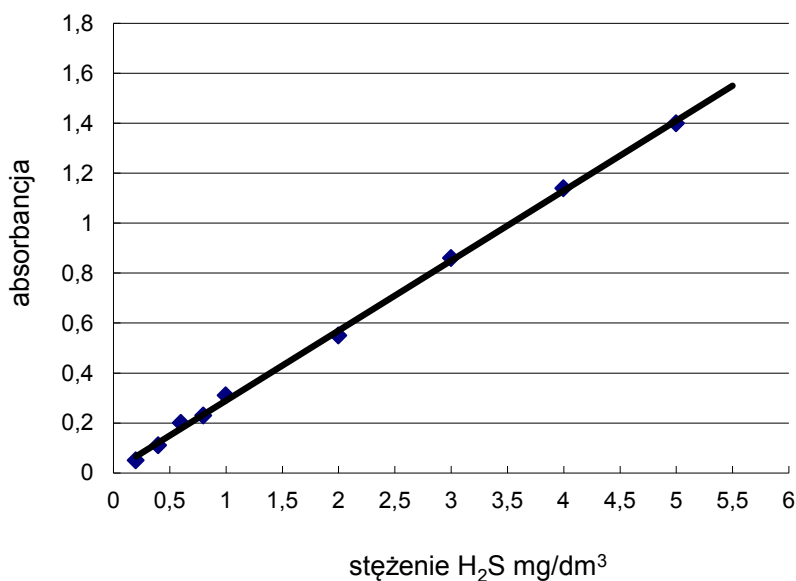
Tabela 14 Rozcieńczenia roztworu podstawowego H_2S

Stężenie H_2S w mg/dm^3	0,40	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0
Objętość roztworu podstawowego H_2S (cm^3)	0,04	0,10	0,20	0,30	0,40	0,50
Objętość wody (cm^3)	9,96	9,90	9,80	9,70	9,60	9,50

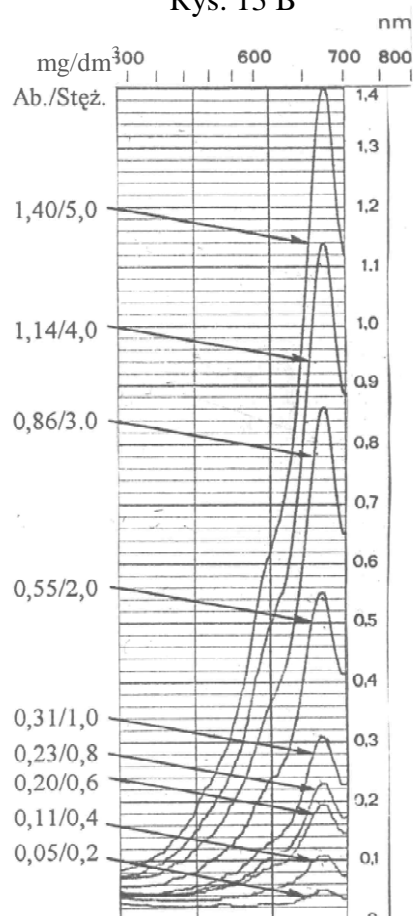
Rysunek 13 Zależność $Ab = f(c)$ (A-krzywa kalibracyjna) dla metody spektrofotometrycznej oznaczania siarkowodoru w reakcji barwnej z N-N-dimetylo-p-fenylendiaminą.

(B-zapis graficzny pomiarów)

Rys. 13 A



Rys. 13 B



Krzywa kalibracyjna $A = f(c)$ została wyznaczona po pięciokrotnym wykonaniu analizy i indywidualnym pomiarze każdego stężenia. Wyniki pomiarów przedstawia tabela 15.

Krzywą kalibracyjną dla roztworów wodnych siarkowodoru wykonaną w oparciu o powyższe wyniki przedstawia rycina 14.

Tabela 15 Wyniki pomiarów absorbancji roztworów wzorcowych siarkowodoru w roztworach wodnych.

Stężenie H ₂ S w mg/dm ³	Absorbancja					\bar{X}
	1	2	3	4	5	
0,4	0,10	0,10	0,11	0,09	0,10	0,10
1,0	0,24	0,27	0,31	0,23	0,28	0,27
2,0	0,51	0,50	0,55	0,58	0,58	0,54
3,0	0,81	0,77	0,83	0,76	0,80	0,79
4,0	1,07	1,03	1,13	1,10	1,06	1,08
5,0	1,30	1,26	1,40	1,36	1,36	1,34

Analiza statystyczna wyników

Linia prosta $y = ax$ DANE: Liczebność $n = 6$

i	x(i)	y(i)
1	0,4	0,10
2	1,0	0,27
3	2,0	0,54
4	3,0	0,79
5	4,0	1,08
6	5,0	1,34

Współczynnik korelacji **r**:

$$r = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{\sqrt{\left(\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n} \right) \left(\sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n} \right)}} = 0,9999581$$

Współczynnik zmienności Wz:

$$Wz = \frac{S}{X} \times 100 = 1,23\%$$

Współczynnik kierunkowy prostej a:

$$a = \frac{\sum xy - \frac{1}{n} \sum x \sum y}{\sum x^2 - \frac{1}{n} (\sum x)^2} = 1,071791 \pm (1,129496) \times 10^{-2}$$

jest istotnie różny od zera: $t = 244,254 > t(n - 1) = 2,574$

Poziom istotności: 0,05

PARAMETRY STATYSTYCZNE

$r = 0,9999581$

$k = 1,075991$

$SSX = 0,9770834$

$SSY = 1,131533$

$n = 6$

2.3.4.2. Krzywa kalibracyjna dla osocza

Do wykonania krzywej kalibracyjnej użyto osocza ludzkiego mrożonego. Roztwory wzorcowe siarkowodoru o stężeniach 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 6,0 mg/dm³ przygotowano analogicznie jak dla roztworów wodnych. Przebieg badania oraz odczyt wyników był taki sam, jak dla roztworów wodnych. Uzyskane wartości absorbancji dla poszczególnych roztworów przedstawia tabela 16. Wykreśloną w oparciu o powyższe wyniki krzywą kalibracyjną, przedstawia rycina 15.

Tabela 16 Wyniki pomiarów absorbancji roztworów wzorcowych siarkowodoru w osoczu

Stężenie H ₂ S w mg/dm ³	Absorbancja			\bar{X}
	1	2	3	
1,0	0,07	0,06	0,04	0,06
2,0	0,18	0,14	0,12	0,15
3,0	0,32	0,28	0,26	0,29
4,0	0,45	0,41	0,40	0,42
6,0	0,71	0,65	0,68	0,68

Analiza statystyczna wyników

Linia prosta $y = ax + b$ DANE: Liczebność $n = 5$

i	x(i)	y(i)
1	1,0	0,06
2	2,0	0,15
3	3,0	0,29
4	4,0	0,42
5	6,0	0,68

Współczynnik korelacji **r**:

$$r = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{\sqrt{\left(\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n} \right) \left(\sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n} \right)}} = 0,9984734$$

Współczynnik zmienności **Wz**:

$$Wz = \frac{S}{X} \times 100 = 5,3\%$$

Współczynnik kierunkowy prostej **a**:

$$a = \frac{\sum xy - \frac{1}{n} \sum x \sum y}{\sum x^2 - \frac{1}{n} (\sum x)^2} = 0,5054055 \pm 5,136246 \times 10^{-2}$$

jest istotnie różny od zera: $t = 31,315 > t(n - 2) = 3,182$

Wartość przesunięcia $b = -8,432436 \times 10^{-2} \pm 4,665227 \times 10^{-2}$

wartość **b** jest istotnie różna od zera: $t = 5,756 > t(n - 2) = 3,182$

Poziom istotności: 0,05

PARAMETRY STATYSTYCZNE

$$r = 0,9984734$$

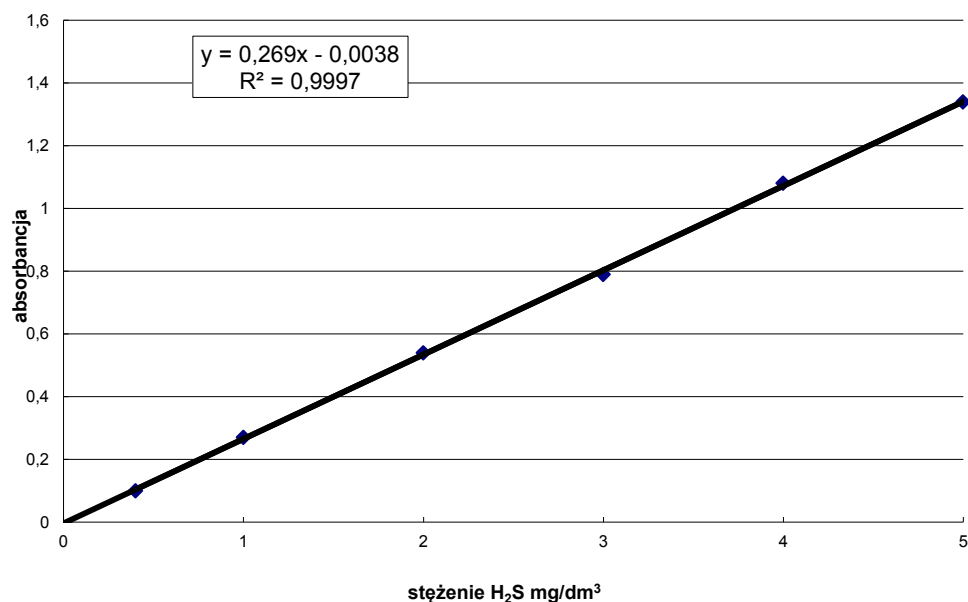
$$k = 0,5054055$$

$$SSX = 0,9249999$$

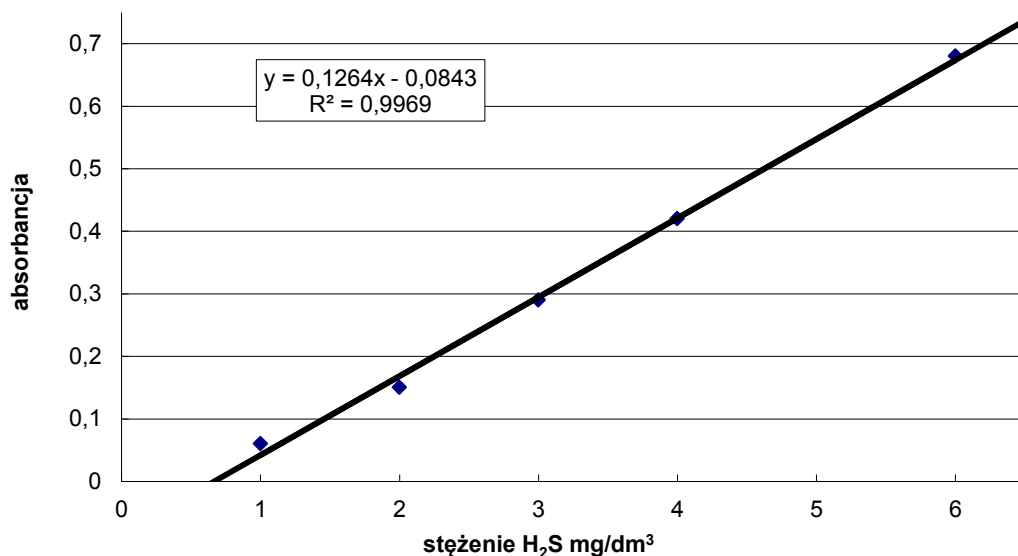
$$SSY = 0,2370001$$

$$n = 5$$

Rysunek 14 Wykres kalibracyjny $A = f(c)$ dla metody spektrofotometrycznej (analiza H_2S w roztworach wodnych)



Rysunek 15 Wykres kalibracyjny $A = f(c)$ dla metody spektrofotometrycznej (analiza H_2S w osoczu krwi ludzkiej)



2.4. Analiza siarkowodoru metodą chromatografii gazowej

Chromatografia gazowa należy do najbardziej przydatnych technik badawczych stosowanych w analizie związków lotnych. W przypadku analizy gazów nieorganicznych używa się standardowo uniwersalnego dla lotnych związków nieorganicznych detektora przewodnictwa cieplnego (TCD) charakteryzującego się niższymi parametrami wykrywalności w porównaniu z innymi (ECD, FID, NPD) stosowanymi w analizie związków organicznych. Możliwości użycia i wykorzystania detektora TCD są więc uzależnione

poziomem występowania oznaczanego związku w próbce badanej, który powinien mieścić się w zakresie kalibracji detektora określonej funkcją $R = f(c)$ (R - wskazania detektora, c - stężenie związku badanego). Biorąc pod uwagę prostotę i szybkość wykonania analizy jakościowo - ilościowej metodę chromatografii gazowej z wykorzystaniem najprostszej techniki izolacji „headspace” postanowiono zbadać jej przydatność w analizie siarkowodoru obok innych najczęściej spotykanych trucizn nieorganicznych (SO_2 , CO , HCN) i niektórych organicznych komponentów biodegradacji (CH_4) notowanych w ekspertyzach toksykologii sądowej.

2.4.1. Zasada metody

W analizie wykorzystano chromatografię gazową adsorbcyjną typu ciało stałe - gaz oraz technikę „headspace”. Postępowanie polega na przeprowadzeniu oznaczanej substancji w stan gazowy i pobieraniu wydzielonego w szczelnym układzie gazu, poprzez odpowiednią membranę do strzykawki. Następnie tak pobraną próbkę wprowadzono do komory nastrzykowej chromatografu.

W analizie siarkowodoru uwzględniono kompleksową równoczesną ocenę obecności innych lotnych związków nieorganicznych uwolnionych w środowisku kwaśnym z soli metali alkalicznych (CO_2 , HCN) jak również tworzących słabsze wiązania z układami białek (CO , CH_4).

Tego rodzaju postępowanie było uwarunkowane koniecznością izolacji siarkowodoru z materiału biologicznego, bowiem jedną z możliwych form transportu kwasowych tego ksenobiotyku w żywym organizmie są jego sole metali alkalicznych. Podobny wybór dotyczył również doboru odpowiedniego, stabilnego wzorca wewnętrznego o charakterze gazu w analizie ilościowej.

Możliwość analizy ilościowej siarkowodoru oraz zbadanie zależności kalibracyjnej $R = f(c)$ dla H_2S obok wzorca wewnętrznego (również produktu gazowego) była możliwa po ich uprzednim uwolnieniu z środowiska kwaśnego.

Wśród przebadanych związków występujących w przedziale temperaturowym $\pm 50^\circ\text{C}$ w postaci gazu uwzględniono wyselekcjonowane sole, które w reakcji z silnym kwasem (H_2SO_4) wydzielają odpowiedni produkt gazowy.

2.4.2. Zastosowane odczynniki

- siarczek sodu Na_2S do otrzymania H_2S
- siarczyn sodu Na_2SO_3 do otrzymania SO_2
- wodorowęglan sodu NaHCO_3 do otrzymania CO_2

- kwas mrówkowy HCOOH do otrzymania CO
- cyjanek potasu KCN do otrzymania HCN
- węgiel glinu Al₄C₃ do otrzymania CH₄
- H₂SO₄ stężony
- H₂SO₄ 10%
- wypełnienie kolumny
 - HAYE SEP Q (80 -100 mesh)
 - firmy ALLTECH ASSOCIATES (APPLIED SCIENCE)
 - PORAPAK Q (80 -100 mesh)
 - SITO MOLEKULARNE 5 A (80 -100 mesh)

2.4.3. Przygotowanie kolumny chromatograficznej

Kolumnę szklaną o długości 3,5 metra i przekroju 2mm przemyto etanolem bezwodnym i acetonem, a następnie wysuszono. Kolumnę pakowano przy pomocy pompy podciśnieniowej.

- wypełnienie HAYE SEP Q - aktywacja w temperaturze 200°C w warunkach przepływu azotu wolnego od tlenu;
- wypełnienie PORAPAK Q - wypełnienie przemyto acetonem w celu usunięcia lotnych monomerów; aktywacja dwugodzinna w temperaturze 100°C przy stałym przepływie gazu nośnego (azot);
- wypełnienie SITO MOLEKULARNE 5A - aktywacja 12 godzinna w temperaturze 250°C, 4 godzinna w temperaturze 300°C i 2 godzinna w temperaturze 350°C przy stałym przepływie gazu nośnego (wodór, hel);

2.4.4. Parametry pracy chromatografu

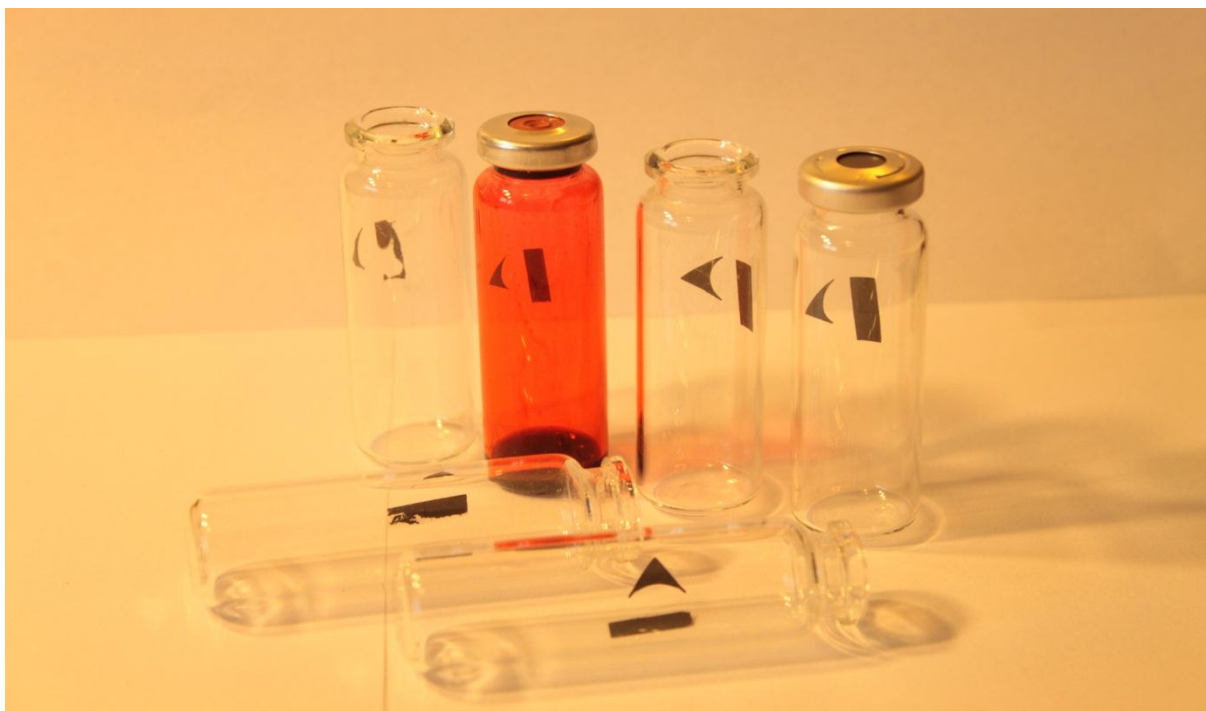
- gaz nośny - wodór
- natężenie przepływu objętości gazu - 20 - 40 cm /min.
- wzmocnienie sygnału - 1 : 8
- prąd katarometru - 140 mA
- parametry temperaturowe dla określonego wypełnienia kolumny:

	<u>HAYE SEP Q</u>	<u>PORAPAK Q</u>	<u>SITO MOL. 5A</u>
temp. pracy kolumny	35°C	50°C	35°C
temp. komory nastrzykowej	40°C	50°C	35°C
temp. detektora	50°C	50°C	50°C

2.4.5. Wykonanie analizy

Próbki badaną i wzorcową /zawierającą siarczek sodu/ wprowadzono do odpowiednio przygotowanej fiolki reakcyjnej o stałej pojemności i wyposażonej w kapsel z membraną gumową umożliwiającą pobranie par ze szczelnie zamkniętego układu fiolki rys 16.

Rysunek 16 Fiolki użyte w technice „headspace”.

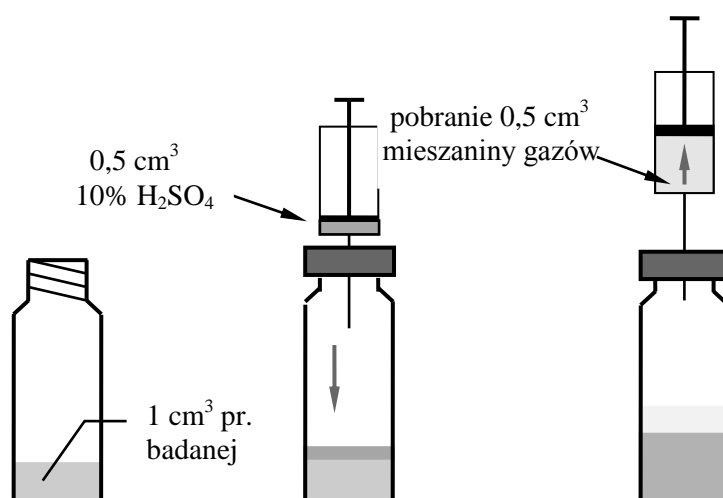


Do fiolki dodano 1cm^3 badanej próby, następnie fiolkę szczelnie zamknięto korkiem z gumową membraną, przez którą wstrzyknięto $0,5\text{cm}^3$ kwasu siarkowego 10%. Po dodaniu kwasu siarkowego do badanej próby, fiolkę umieszczono w komorze cieplnej np; termostacie chromatografu gazowego ($\pm 30^\circ\text{C}$) wraz ze strzykawką gazową (poj; $0,5\text{cm}^3$), służącą do nanoszenia par do układu chromatografu. Po okresie 5 minut termostatowania próbek, strzykawką pobierano $0,5\text{cm}^3$ par z nad roztworu badanego i w nieprzekraczalnym czasie 10 - 15 sekund wprowadzano do układu chromatografu. Kolejne etapy wykonania analizy ilustruje rys 17. W ustaleniu zależności $R = f(c)$ oraz w badaniach właściwych wybrano średnią wartość R obliczoną z trzech kolejno otrzymanych chromatogramów. Wartość R dotyczyła stosunku wysokości piku oznaczanego związku do wysokości piku wzorca wewnętrznego. Równoległe sprawdzono możliwość zastosowania kalibracji zewnętrznej bez użycia wzorca wewnętrznego / $h = f(c)$ gdzie: h - wysokość piku; c - stężenie siarkowodoru/.

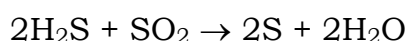
W rutynowych oznaczeniach siarkowodoru w próbach badanych i dla oceny statystycznej w przypadku użycia obu technik przygotowano dwa roztwory: wzorcowy

zawierający związek o znanym stężeniu /siarczek sodu Na₂S/ oraz badany o takiej samej objętości związku analizowanego i wzorca wewnętrznego.

Rysunek 17 Kolejne etapy wykonania analizy:



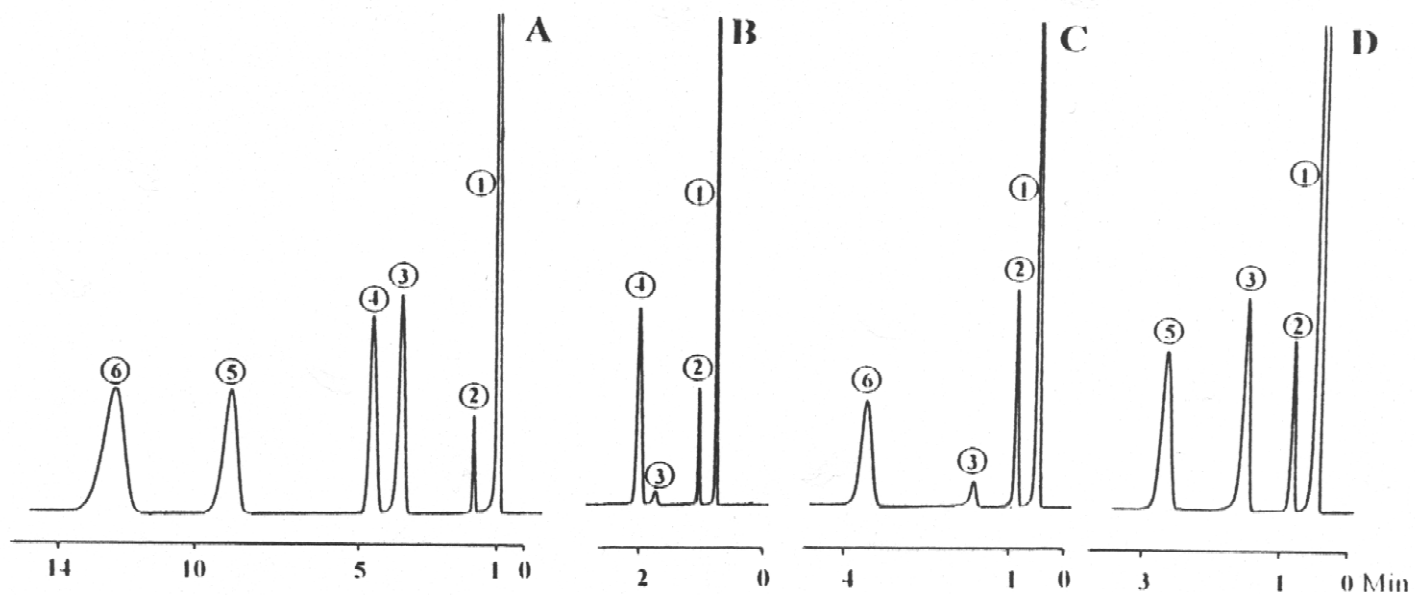
Poszukując odpowiedniego wzorca wewnętrznego, zwrócono uwagę na możliwość jego rozdziału na tym samym wypełnieniu oraz na reaktywność z H₂S. W celu doboru odpowiedniego związku gazowego przydatnego do metody kalibracji opartej na zastosowaniu wzorca wewnętrznego o innym czasie retencji aniżeli oznaczany, sprawdzono możliwość użycia SO₂, CO₂, HCN. Wstępne badania wyeliminowały możliwość zastosowania SO₂ z racji jego właściwości utleniających w stosunku do związku redukcyjnego jakim jest siarkowodór. Obserwowany spadek stężenia obu związków w fiolce reakcyjnej, potwierdzony zanikiem rejestrowania pików na chromatografie ilustruje poniższy schemat wyjaśniający mechanizm działania reakcji w układzie interakcji redukcyjno - utleniającej:



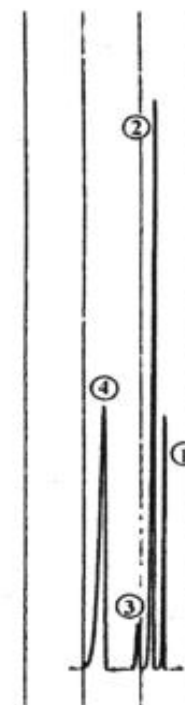
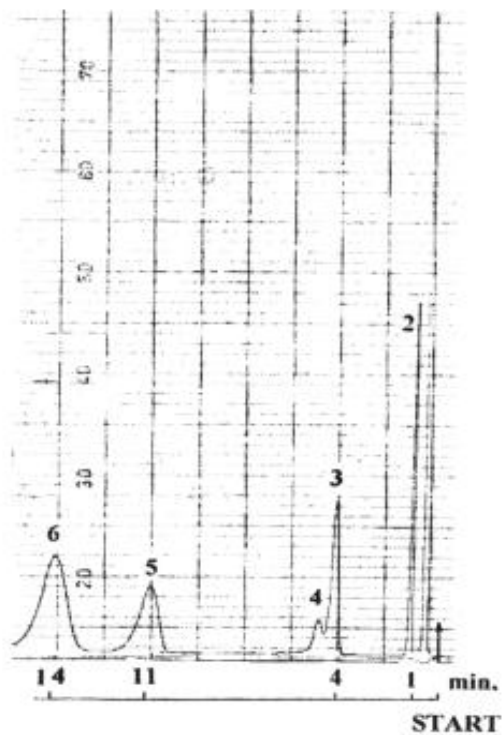
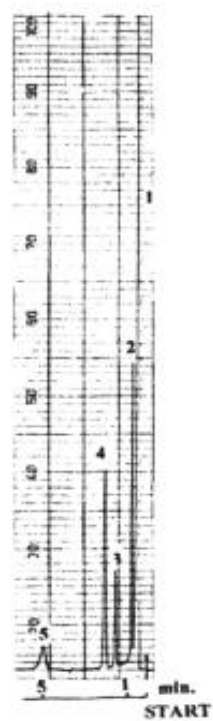
Kolejne zastrzeżenie dotyczyło zasadności użycia CO₂ jako alternatywnego wzorca wewnętrznego. Szczegółowe badania wykazały zawsze jego obecność po uprzednim uwolnieniu z substancji wzorcowej (Na₂S × 9H₂O) zanieczyszczonej (NaHCO₃), jak również jego obecnością w wodzie destylowanej.

Możliwym do zastosowania jako wzorec wewnętrzny, okazał się jedynie HCN, charakteryzujący się również podobnie jak H₂S właściwościami redukcyjnymi.

Efekt rozdziału jakościowego badanej mieszaniny związków na sprawdzonych fazach stacjonarnych przedstawiają odpowiednio rys 18, 19.



Rysunek 18 Rozdział chromatograficzny uzyskany na Haye Sep Q. A – mieszanina wzorcowa B – analiza siarkowodoru C – analiza dwutlenku siarki D – analiza cyjanowodoru 1 – N_2, O_2 , 2 – CO, CO_2 , 3 – H_2O , 4 – H_2S , 5 – HCN , 6 – SO_2



Rysunek 19 Rozdział chromatograficzny na wybranych stałych fazach adsorpcyjnych:

Haye Sep Q

1 – N₂, O₂, 2 – CH₄, 3 – CO, CO₂,

4 – NO₂, 5 – H₂O,

PORAPAK Q

1 – N₂, O₂, 2 – CO, CO₂, 3 – H₂S,

4 – H₂O 5 – HCN, 6 – SO₂

Sito Molekularne 5A

1 – O₂, 2 – N₂

3 – CH₄, 4 – CO

2.4.6. Wykonanie krzywej kalibracyjnej

2.4.6.1. Wykonanie krzywej kalibracyjnej (metoda kalibracji zewnętrznej bez użycia wzorca wewnętrznego).

Wstępne obserwacje wykazały nieprzydatność wypełnienia określanego jako sito molekularne 5A do analizy wszystkich lotnych związków nieorganicznych o charakterze bezwodników kwasowych (CO_2 , SO_2), kwasów (H_2S , HCN) jak również wody. Struktura sita molekularnego 5A utworzona z aktywnych tlenków metali alkalicznych, spełnia rolę „pułapki” dla tej grupy związków uniemożliwiając ich swobodny przepływ i tym samym rejestrację na chromatogramie. Użycie sita molekularnego 5A jako wypełnienia kolumny umożliwiłoby jedynie analizę związków obojętnych nie reagujących z tlenkami metali alkalicznych (CO , O_2 , N_2 , CH_4).

Z tego względu dla celów analizy ilościowej siarkowodoru metodą chromatografii gazowej zastosowano wypełnienia PORAPAK Q lub HAYE SEP Q jako najbardziej przydatną w tym względzie. Warunki pracy chromatografu gazowego dla celów wykonywania analizy ilościowej były analogiczne jak w przypadku analizy jakościowej (rozdz. 2.4.3. - 2.4.5.)

W celu ustalenia zakresu kalibracji zewnętrznej (bez użycia wzorca wewnętrznego) $h = f(c)$ (h - wysokość pików, c - stężenie siarkowodoru) z roztworu podstawowego siarczku sodowego ($\text{Na}_2\text{S} \times 9\text{H}_2\text{O}$) zawierającego w przeliczeniu stechiometrycznym równowartość 1g H_2S w 1dm^3 przygotowano odpowiednie roztwory wzorcowe zgodnie ze schematem tabela 17:

Tabela 17 Rozcieńczenia roztworu podstawowego H_2S

Stęż. H_2S w (g/dm^3)	0,02	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30	0,40	0,50	0,60
Objętość rozt. podst. H_2S (cm^3)	0,2	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	4,0	5,0	6,0
Objętość wody (cm^3)	9,8	9,5	9,0	8,5	8,0	7,5	7,0	6,0	5,0	4,0

Analizę chromatograficzną badanych roztworów wzorcowych przeprowadzono w analogicznych fiolkach reakcyjnych, wykalibrowanych do stałej pojemności $4,5 \pm 0,1 \text{ cm}^3$, wyposażonych w nakrętkę z wymienną membraną, umożliwiającą pobranie par strzykawką gazową. Do fiolki reakcyjnej wprowadzono 1cm^3 roztworu wzorcowego i po zakręceniu poprzez membranę wprowadzono strzykawką $0,5\text{cm}^3$ 10% kwasu siarkowego. Fiolki

reakcyjne pozostawiono w komorze termostatu chromatograficznego w temperaturze 30°C przez okres 15 minut wraz z strzykawką gazową o poj. 0,5 cm³. Po czasie inkubacji pobrano 0,5cm³ par z nad roztworu badanego i wprowadzono do układu chromatografu. Średnią wartość wysokości pików (h) uzyskaną z dwóch kolejnych nastrzyków próbek wzorcowych o odpowiedniej wartości stężeń przedstawiono w tabeli 18.

Tabela 18 Średnie wartości wysokości pików hx dla różnych stężeń H₂S

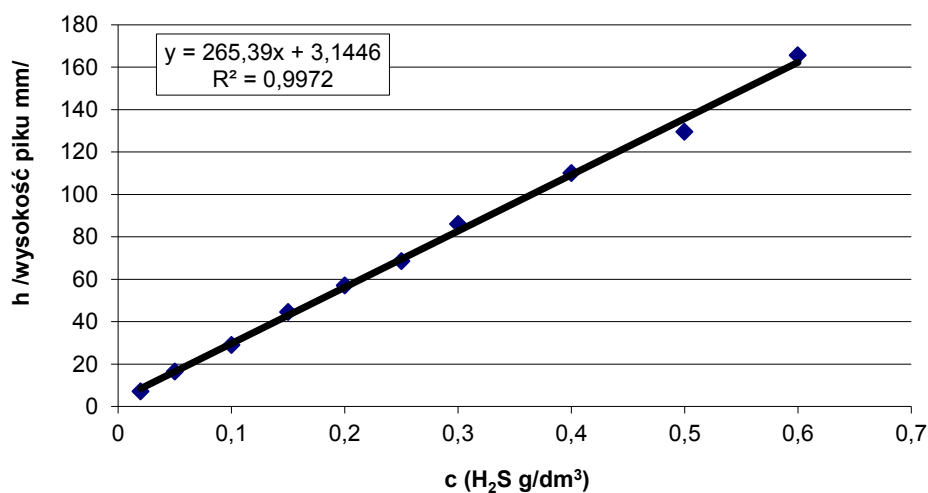
Stęż. H ₂ S w (g/dm ³)	0,02		0,05		0,10		0,15		0,20	
hx (mm)	6,5	7,5		15	29	29	44	45	56	58
Wartość śred. hx (mm)	7		16,5		29		44,5		57	

Stęż. H ₂ S w (g/dm ³)	0,25		0,30		0,40		0,50		0,60	
hx (mm)	68	69	85	87	112	108	127	132	165	166
Wartość śred. hx (mm)	68,5		86		110		129,5		165,5	

hx - wysokość pików siarkowodoru (mm)

W oparciu o uzyskane wartości wykreślono krzywą kalibracyjną rys 20, uwzględniono zależność $h = f(c)$.

Rysunek 20 Wykres kalibracyjny $h = f(c)$ dla metody chromatograficznej



2.4.6.2. Wykonanie krzywej kalibracyjnej (metoda kalibracji z użyciem wzorca wewnętrznego o innym czasie retencji aniżeli związek analizowany).

Wstępne badania jakościowe wykazały, że w zespole analizowanych lotnych związków nieorganicznych metodą chromatografii gazowej, najbardziej przydatny jako wzorzec wewnętrzny może być cyjanowodor. O wyborze cyjanowodoru jako wzorca wewnętrznego w analizie siarkowodoru zdecydowały zróżnicowane wartości czasu retencji oznaczanych związków, jak również właściwości fizykochemiczne zbliżone do siarkowodoru (postać gazowa uwalniająca się z jego soli metali alkalicznych w środowisku kwaśnym).

W badaniach ustalono zakres kalibracji wewnętrznej (z wzorcem wewnętrznym cyjanowodorem) $R = f(c)$ gdzie: $R = h_x/h_w$; h_x - wysokość piku substancji badanej (H_2S); h_w - wysokość piku wzorca wewnętrznego (HCN); c - stężenie;

W analogicznych fiolkach jak poprzednio (rozd. 2.4.5.) z roztworu podstawowego siarczku sodu zawierającego 1g H_2S w dm^3 przygotowano roztwory wzorcowe według następującego schematu tabela 19:

Tabela 19 Rozcieńczenia roztworu podstawowego H_2S

Stężenie H_2S w (g/dm^3)	0,05	0,10	0,15	0,20	0,30
Objętość roztw. podst. H_2S (cm^3)	0,5	1,0	1,5	2,0	3,0
Objętość wody (cm^3)	9,5	9,0	8,5	8,0	7,0

Do każdej fiołki reakcyjnej zawierającej 1 cm^3 roztworu wzorcowego, dodano po 0,5 cm^3 roztworu KCN 0,0024g/ dm^3 odpowiadającemu 0,001g HCN w dm^3 i po zamknięciu poprzez membranę wprowadzono strzykawką 0,5 cm^3 10% H_2SO_4 - dalszy tok postępowania był analogiczny jak w rozdz. 2.4.5.

Dla uzyskania odpowiedniej powtarzalności wyników, objętość używanych w metodzie „headspace” naczyń oraz objętość dodawanych odczynników i próbek, ilość pobranego gazu do analizy muszą być zawsze jednakowe.

Wyniki badań dotyczące ustalenia zależności $R = f(c)$ przedstawia tabela 20.

Tabela 20 Średnie wartości R (stosunek h_x/h_w) dla różnych stężeń H_2S

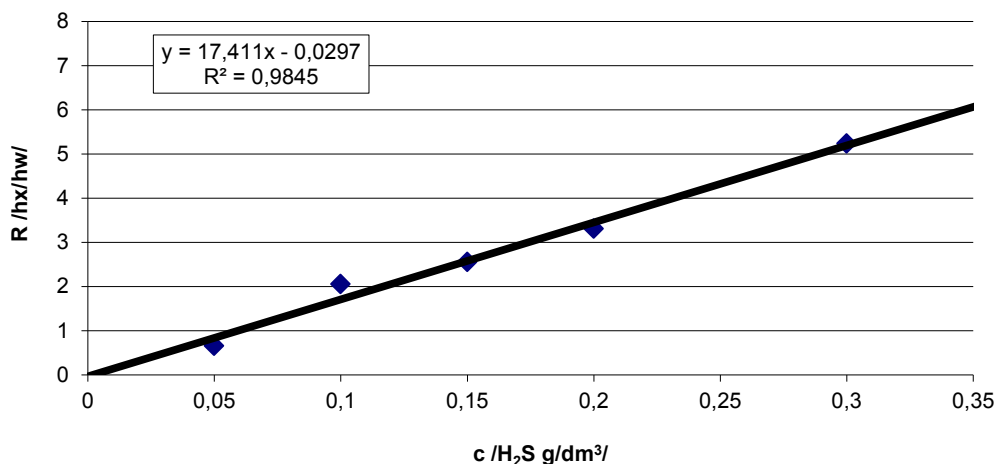
Stężenie H_2S (g/dm^3)	0,05		0,10		0,15		0,20		0,30	
h_x (mm)	5	5,5	16	17	21,5	19,5	27,5	26	45	41
h_w (mm)	8	8	8	8	8	8	8	8	8,5	8
stosunek h_x/h_w	0,6	0,7	2,0	2,1	2,7	2,4	3,4	3,2	5,3	5,1
wartość średnia h_x/h_w	0,65		2,05		2,55		3,3		5,2	

h_x - wysokość piku substancji badanej (H_2S)

h_w - wysokość piku wzorca wewnętrznego (HCN)

W oparciu o uzyskane wartości wykreślono krzywą kalibracyjną (rys. 21) uwzględniającą zależność $R = f(c)$.

Rysunek 21 Wykres kalibracyjny $R = f(c)$ dla metody chromatograficznej



2.4.7. Analiza statystyczna wyników

W celu sprawdzenia powtarzalności uzyskiwanych wyników, przygotowano 10 prób o stałym stężeniu H_2S ($0,2\text{g/dm}^3$), które poddano rutynowej analizie ilościowej, zgodnie z przepisem metodycznym. Uzyskane średnie wartości poddano analizie statystycznej co przedstawiono w tabeli 21.

Tabela 21 Analiza powtarzalności 10 prób o stałym stężeniu H_2S ($0,2\text{g/dm}^3$)

h_{Xn}	$X - \bar{X}$	$(X - \bar{X})^2$
60	0,6	0,36
58	-1,4	1,96
59	-0,4	0,16
66	6,6	43,56
61	1,6	2,56
54	-5,4	29,16
56	-3,4	11,56
63	3,6	12,96
57	-2,4	5,76
60	0,6	0,36

$$\bar{X} = 59,4$$

Odchylenie standardowe wyniku pojedynczego:

$$S = \sqrt{\frac{(X - \bar{X})^2}{n - 1}} = 3,47$$

Procentowe względne odchylenie standardowe:

$$S_R = \frac{S \times 100}{\bar{X}} = 5,84\%$$

Odchylenie standardowe wyniku średniego:

$$\bar{S} = \frac{S}{\sqrt{n}} = 1,1$$

Przedział ufności na poziomie prawdopodobieństwa 0,95 dla $n = 10$;

$$\mu = \bar{X} \pm t \times \bar{S} \quad (t = 2,26)$$

$$\mu = 59,4 \pm 2,49$$

Oznaczalność siarkowodoru przy użyciu metody chromatografii gazowej wynosi $0,02 \text{ g/dm}^3$ (20 mg/dm^3), co w odniesieniu do stężeń występujących w materiale biologicznym jest wartością niską dla zastosowania tej metody w rutynowych badaniach toksykologicznych z ograniczoną ilością materiału /krew/. Możliwość oznaczeń w dolnym zakresie krzywej kalibracyjnej ma wymiar restrykcyjny, niepewny, niezależnie od wykorzystania chromatografii gazowej jako alternatywnej metody potwierdzającej w analizie jakościowej zatrucie.

2.5. Analiza ilościowa siarkowodoru w materiale biologicznym

2.5.1. Praktyczne aspekty doboru odpowiedniego materiału biologicznego do badań toksykologicznych

W celu dokonania oceny przydatności poszczególnych narządów dla rutynowych badań toksykologicznych w przypadku podejrzeń o zatrucie siarkowodorem, wykonano odpowiedni eksperyment. W tym celu dziesięć szczurów poddano działaniu siarkowodoru w warunkach różnych stężeń, powodujących zróżnicowane wysycenie układu biologicznego przed wystąpieniem śmierci. Zakres badanych stężeń siarkowodoru uwolnionego w reakcji siarczku sodowego w środowisku kwaśnym przedstawiono w tabeli 23.

Doświadczenie przeprowadzano w eksykatorze o pojemności 3 litrów, w którym na płytce Petriego \varnothing 10cm umieszczano odpowiednią ilość siarczku sodowego, a po wprowadzeniu zwierzęcia doświadczalnego uwolniono siarkowodór poprzez dodanie odpowiedniej ilości 0,5M H₂SO₄. Następnie po 5 minutach od momentu śmierci zwierząt, pobrano krew oraz narządy wewnętrzne (mózg, płuca, nerki, wątrobę i mięśnie). Mocz udało się pobrać tylko w jednym przypadku, jednak nie stwierdzono w nim obecności siarkowodoru.

Masę próbek - pobranych narządów przedstawia tabela 22. Każdy narząd homogenizowano z dodatkiem wody (do tkanek nerek, wątroby, mózgu i płuc dodawano 2cm³ wody, do tkanek mięśni 3cm³ wody). Tak przygotowany homogenat w ilości 2cm³ przenoszono do zewnętrznej części komory Conwaya. Dalszy tok postępowania przedstawiono wcześniej w metodyce badań analitycznych siarkowodoru metodą spektrofotometryczną. Stężenie siarkowodoru odczytywano z krzywej kalibracyjnej przygotowanej dla osocza ludzkiego. Stężenia siarkowodoru w poszczególnych narządach w μg na gram tkanki przedstawia tabela 24.

Tabela 22 Masa narządów użyta do oznaczeń siarkowodoru.

Badany szczur	Masa narządów w gramach				
	nerka	wątroba	mózg	płuca	mięśnie
1	1,80	2,0	1,90	1,60	-
2	1,85	2,0	1,85	1,50	2,4
3	1,93	2,0	1,90	1,85	2,0
4	1,74	2,0	1,82	1,45	2,0
5	1,71	2,0	1,60	-	-
6	2,05	2,0	1,90	1,70	2,0
7	2,00	2,0	1,85	-	-
8	1,82	2,0	1,84	1,40	2,0
9	1,90	2,0	1,70	2,80	2,0
10	2,30	2,0	1,80	1,70	2,0

Zależność zmian stężenia siarkowodoru w poszczególnych narządach przedstawiono na rycinach 22 i 23. Analiza krwi wykazała zaledwie wykrywalną obecność siarkowodoru u wszystkich badanych zwierząt.

Tabela 23 Stężenie H₂S (mg/dm³) i czas trwania śmiertelnej intoksykacji badanych szczurów

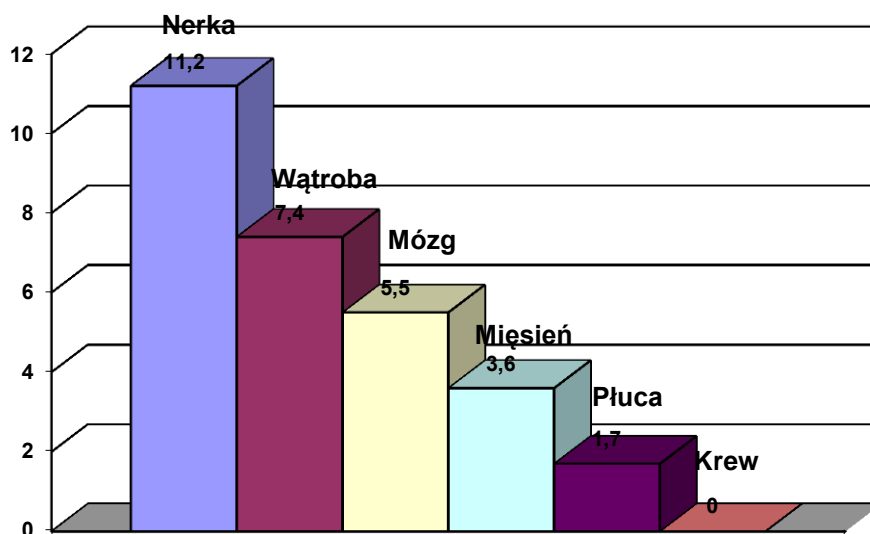
Nr szczura	Masa szczura (w gramach)	Na ₂ S × 9H ₂ O + 0,5M H ₂ SO ₄ (cm ³) (w gramach)		Stężenie H ₂ S (w mg/dm ³)	Okres intoksykacji do czasu śmierci (w sek.)
1	290	1,0	15	47,2	04' 30"
2	301	1,0	15	47,2	05' 20"
3	303	1,0	15	47,2	05' 55"
4	291	1,0	15	47,2	07' 30"
5	286	0,4	8	18,9	03' 30"
6	297	0,2	4	9,4	~30' *
7	285	0,2	4	9,4	10' 20"
8	285	0,1	2	4,7	~19'
9	300	0,1	2	4,7	~31' *
10	300	0,25	5	11,8	12' 30"

* - obserwowano symptomy anoksji

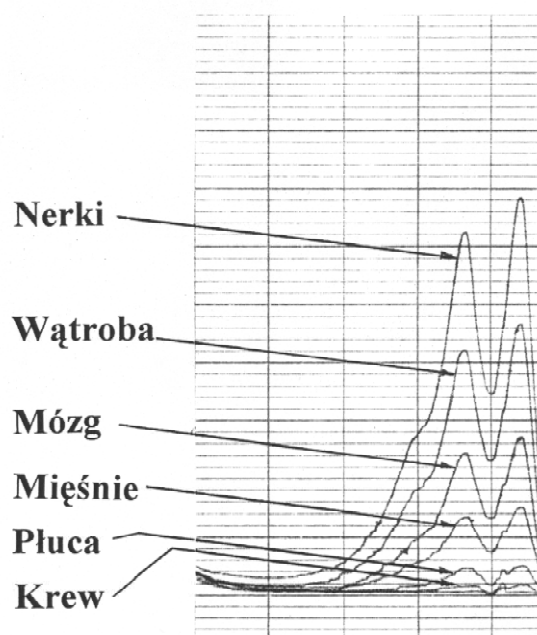
Tabela 24 Stężenie H₂S w µg/gram tkanki

Narząd	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Nerki	12,35	11,55	10,71	10,71	12,24	12,49	10,0	11,29	11,23	9,67
Wątroba	8,70	6,52	7,63	6,52	8,48	8,82	6,50	9,15	6,27	5,19
Mózg	5,59	5,91	5,57	5,87	5,44	5,48	6,00	4,60	5,54	4,83
Mięśnie	-	2,62	4,16	3,40	-	3,30	-	3,98	4,32	3,22
Płuca	1,91	1,49	1,94	1,81	-	1,76	-	1,85	1,30	1,20
Krew	poniżej dolnej wartości krzywej kalibracji									

Rysunek 22 Średnie stężenia siarkowodoru w wybranych narządach po zatruciu śmiertelnym. (w μg na gram tkanki)



Rysunek 23 Zmiany wartości absorbancji dla zróżnicowanych stężeń siarkowodoru poszczególnych narządach wybranego losowo szczura analizowane metodą spektrofotometryczną



2.5.2. Analiza stężeń endogennego siarkowodoru we krwi powstałego w warunkach biologicznej degradacji

W celu zbadania potencjalnego wpływu warunków przechowywania materiału biologicznego na możliwość powstawania endogennego siarkowodoru przeprowadzono odpowiednie badanie. Ocena ilościowa dotyczyła ustalenia zawartości siarkowodoru w próbkach krwi przechowywanej przez okres 2 lat w temperaturze 4°C (lodówka) oraz w czasie krótszym lecz w temp. $\pm 20^{\circ}\text{C}$. Próby przechowywane w temp. $\pm 4^{\circ}\text{C}$ nie

wykazywały obecności siarkowodoru lub wykazywały go na granicy poziomu wykrywalności. Natomiast próby przechowywane w temp. pokojowej $\pm 20^{\circ}\text{C}$ już po okresie 10 - dniowym wykazywały obecność siarkowodoru w zakresie ustalonej krzywej kalibracyjnej.

Uzyskane wyniki wskazują, iż odpowiednie przechowywanie materiału biologicznego zapobiega w sposób znaczący tworzeniu się w nim endogennego siarkowodoru i tym samym wydatnie zmniejsza ryzyko popełnienia błędu np.: co było istotne dla analizy alkoholu etylowego przy użyciu klasycznej metody Widmarka (suma lotnych związków redukujących w przeliczeniu na alkohol etylowy).

2.5.3. Analiza statystyczna wyników

Analizę istotności różnic średnich zawartości siarkowodoru w poszczególnych narządach przeprowadzono z wykorzystaniem testu DUNCANA.

Jeżeli wartość F_e empiryczne jest większe od F granicznego, to na poziomie istotności $\alpha = 0,05$ różnice między porównywanymi poziomami siarkowodoru w poszczególnych narządach są istotne.

Upoważnia to do wniosku, że zawartość siarkowodoru w gradacji malejącej jest największa w nerce i w dalszej kolejności w wątrobie i mózgu.

Tabela 25 Analiza istotnych różnic średnich zawartości siarkowodoru w porównywanych narządach z wykorzystaniem testu DUNCANA

Porównywane stężenia H_2S w grupach (w μg na gram tkanki)	\bar{X}	sd
Grupa I n = 10 (NERKA) 12,35 11,55 10,71 10,71 12,24 12,49 10,0 11,29 11,23 9,67	11,224	0,969
Grupa II n = 10 (WĄTROBA) 8,70 6,52 7,63 6,52 8,48 8,82 6,50 9,15 6,27 5,19	7,378	1,354
Grupa III n = 10 (MÓZG) 5,59 5,91 5,57 5,87 5,44 5,48 6,00 4,60 5,54 4,83	5,483	0,451
Grupa IV n = 7 (MIĘŚNIE) 2,62 4,16 3,40 3,30 3,98 4,32 3,22	3,571	0,606
Grupa V n = 8 (PŁUCA) 1,91 1,49 1,94 1,81 1,76 1,85 1,30 1,20	1,657	0,288
sd - odchylenie standardowe \bar{X} - średnia arytmetyczna		

Tabela 26 TABELA RÓŻNIC

	WARTOŚĆ		RÓŻNICA
	GRANICZNA	EMPIRYCZNA	
Grupa V : I	0,923	9,57	ISTOTNA
Grupa V : II	0,894	7,65	ISTOTNA
Grupa V : III	0,865	5,74	ISTOTNA
Grupa V : IV	0,899	3,84	ISTOTNA
Grupa IV : I	0,894	5,73	ISTOTNA
Grupa IV : II	0,865	3,81	ISTOTNA
Grupa IV : III	0,899	1,90	ISTOTNA
Grupa III : I	0,865	3,83	ISTOTNA
Grupa III : II	0,899	1,91	ISTOTNA
Grupa II : I	0,899	1,92	ISTOTNA

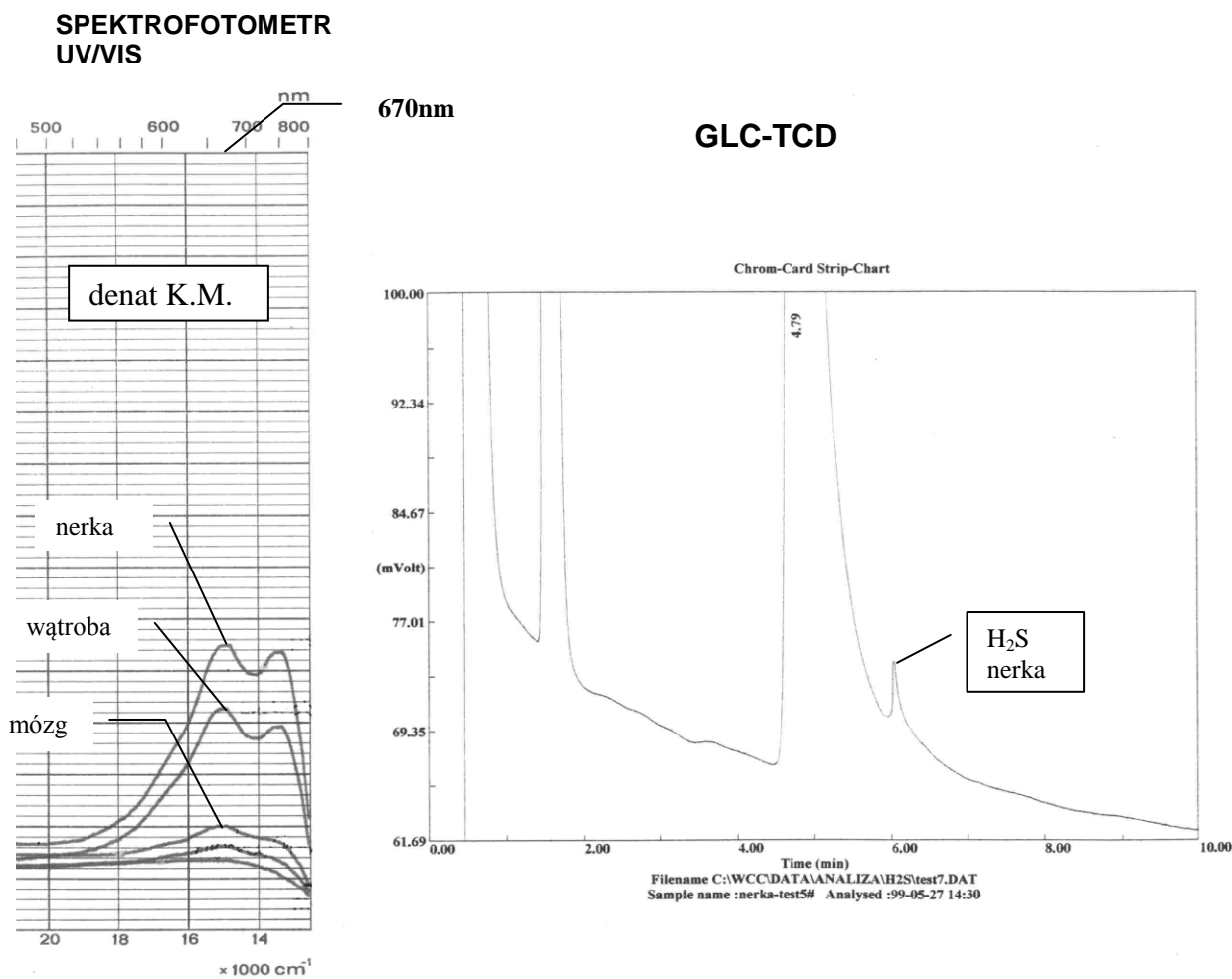
2.6. Analiza wybranych przypadków zatruc śmiertelnych z podejrzanym udziałem siarkowodoru

Przedmiotem badań był materiał sekcyjny zabezpieczony w regionie woj. wielkopolskiego podczas sekcji zwłok osób, których śmierć mogła być następstwem odbycia ekspozycji wziewnej z udziałem siarkowodoru. Ze względu na brak możliwości czy odstępnie od pomiarów składu powietrza w warunkach, których przebywały ofiary wypadku /systemy kanalizacyjne/ bezpośrednio po zdarzeniu nie ustalono poziomu tlenu i ditlenku węgla w powietrzu atmosferycznym na stanowiskach pracy.

Wszystkie próbki materiału sekcyjnego pobrane po czasie ± 2 godzin od zgonu /po uprzednim utarciu tkanek w mózdzierzu/ analizowano specyficzną metodą spektrofotometryczną w zakresie widzialnym $\lambda = 670\text{nm}$ wykazały obecność siarkowodoru, alternatywnie potwierdzono jego obecność metodą GLC.

Wartości absorbancji odczytano z krzywej kalibracyjnej, przygotowanej bezpośrednio przed wykonaniem analizy materiału sekcyjnego dostarczonego do badań. Graficzne zależności stężeniowe jakie wykorzystano do obliczeń poziomu siarkowodoru w badanym materiale sekcyjnym przedstawiono na rys 24, natomiast uzyskane wartości stężenia siarkowodoru przedstawiono w tabeli 27.

Rysunek 24 Graficzne zależności stężenia siarkowodoru w badanym materiale sekcyjnym oznaczane metodą UV/VIS i GLC-TCD



Rysunek 24 c.d.

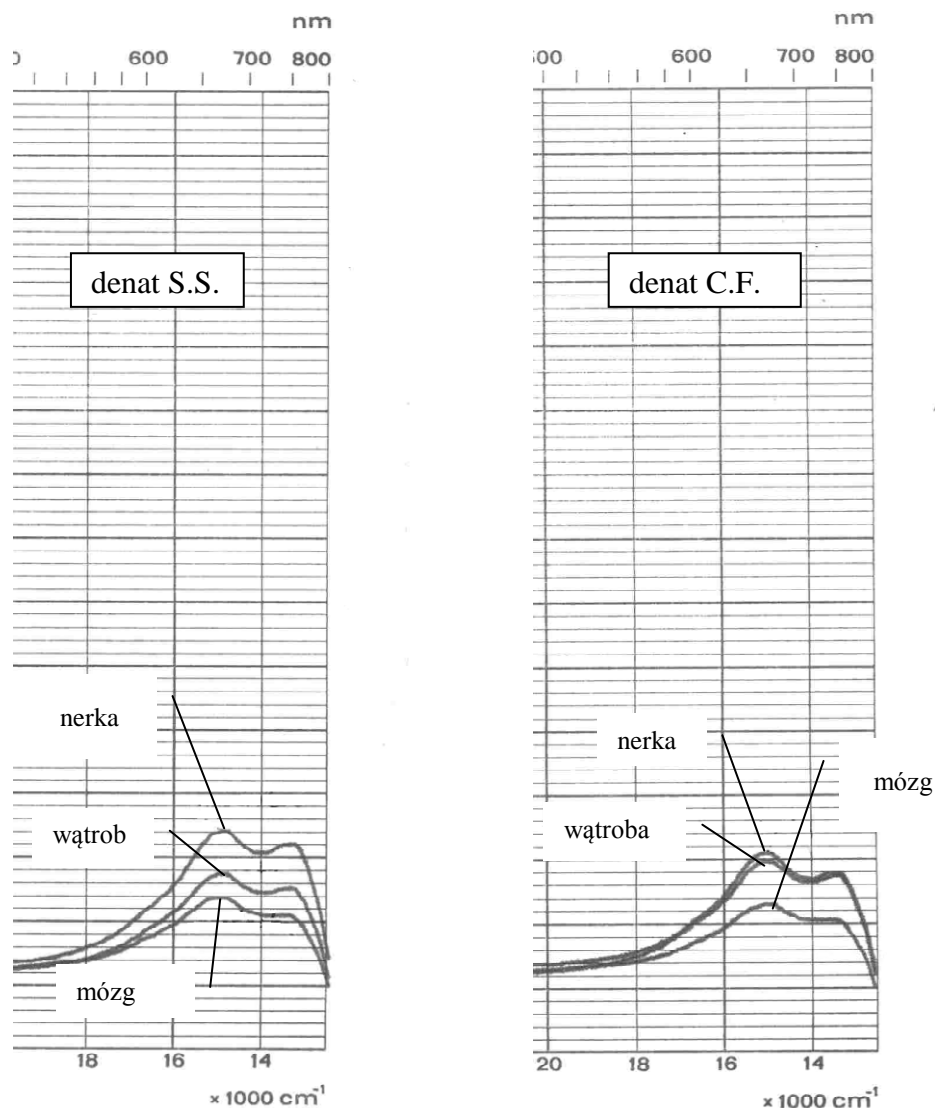


Tabela 27 Steżenia siarkowodoru w materiale sekcyjnym ofiar przypadków śmiertelnych w pomieszczeniach systemów sanitarnych

Badany materiał	ze zwłok K.M.	ze zwłok S.S.	ze zwłok C.F.
nerka	0.75 $\mu\text{g/g}$ tkanki	0.47 $\mu\text{g/g}$ tkanki	0.39 $\mu\text{g/g}$ tkanki
wątroba	0.60 $\mu\text{g/g}$ tkanki	0.38 $\mu\text{g/g}$ tkanki	0.38 $\mu\text{g/g}$ tkanki
mózg	0.42 $\mu\text{g/g}$ tkanki	0.3 $\mu\text{g/g}$ tkanki	0.29 $\mu\text{g/g}$ tkanki
ociekлина narządów	0.27 $\mu\text{g/g}$ tkanki		
krew	0.3 $\mu\text{g/g}$ tkanki		

Równocześnie należy zaznaczyć, że notowane wielokrotne inne przypadki śmierci nagłej gwałtownej w przestrzeniach systemów sanitarnych /ścieki, studzienki rewizyjne, opróżnione szamba/ nie potwierdziły u ofiar obecności siarkowodoru w materiałnie sekcyjnym niezależnie od postępowań przygotowawczych zlecających odpowiednie badania.

3 Diagnostyka toksykologiczno - sądowa z udziałem tlenku węgla

3.1. Odczynniki, roztwory pomocnicze, sprzęt laboratoryjny, aparatura

3.1.1. Odczynniki:

- kwas mrówkowy cz.d.a. /Polskie Odczynniki Chemiczne/
- kwas siarkowy stężony cz.d.a. /Polskie Odczynniki Chemiczne/
- potasu żelazicyjanek cz. /Polskie Odczynniki Chemiczne/
- saponina

3.1.2. Roztwory pomocnicze:

- roztwór uwalniający tlenek węgla z układu HbCO, sporządzony przez rozpuszczenie 0,5g saponiny i 2g $K_3Fe(CN)_6$ w 10cm^3 wody destylowanej.
- roztwór 10% H_2SO_4
- roztwór 0,9% NaCl

3.1.3. Sprzęt laboratoryjny:

- pipety automatyczne 100 μl , 200 μl , 1000 μl .
- pipety laboratoryjne o poj. 0.1, 0.2 cm^3
- probówki laboratoryjne
- cylindry miarowe o poj. 10, 20, 50 cm^3
- zlewki o poj. 100 cm^3
- kolbki miarowe
- fiołki o pojemności 4,5 cm^3 zamykane korkiem z membraną

3.1.4. Aparatura:

- chromatograf gazowy Chrom 5 prod. CSR
- generator do wytwarzania czystego tlenku węgla
- sprężony tlenek węgla z butli /firmy Messer/
- waga elektroniczna WP.300 RADWAG
- cieplarka ELKON CL 65
- waga analityczna *sartorius* AC 211P Max 210g

3.2. Analiza jakościowa lotnych związków nieorganicznych

Zatrucia lotnymi związkami nieorganicznymi w ocenie toksykologiczno - sądowej wymagają potwierdzenia zidentyfikowanego ksenobiotyku niezależną techniką badawczą. Zastosowanie chromatografii gazowej z użyciem detektora przewodnictwa cieplnego (Thermal conductivity detector - TCD) oraz techniki "headspace", można uznać za alternatywną metodę potwierdzającą dla wielu nie w pełni specyficznych metod spektrofotometrycznych.

Stosując chromatografię gazową jako niezależną metodę potwierdzającą obecność lotnych związków nieorganicznych, należy wziąć zawsze pod uwagę charakter fizykochemiczny danego związku w celu użycia do jego identyfikacji odpowiedniego adsorbentu wypełniającego kolumnę /zgodnie z podanymi wcześniej możliwościami i restrykcjami badawczymi/.

3.2.1. Analiza jakościowa z zastosowaniem wypełnienia - Haye Sep Q

Analizę lotnych związków nieorganicznych o charakterze kwaśnym (SO_2 , CO_2 , HCN) można przeprowadzić stosując z powodzeniem wypełnienie Haye Sep Q. Przed użyciem, po umieszczeniu wypełnienia w kolumnie należy dokonać aktywacji w układzie termostatu chromatografu przez 5 godzin w temperaturze 200°C , przy przepływie azotu (20-30 ml/min).

Przy zastosowaniu tego rodzaju adsorbentu, podczas analizy wodnych roztworów wzorcowych, jak i materiału biologicznego, pojawia się zawsze wśród badanych składników towarzyszących sygnał „pik” wody i dwutlenku węgla. Z tego względu, wypełnienie to nieprzydatne jest do analizy jakościowej tlenku węgla, ponieważ posiada on w tym układzie analitycznym taki sam czas retencji jak ditlenek węgla. Efekt rozdziału chromatograficznego mieszaniny wybranych składników przedstawiono wcześniej na rys. 15.

3.2.2. Analiza jakościowa lotnych związków o charakterze obojętnym z zastosowaniem sita molekularnego 5 A

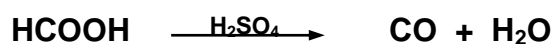
Użycie do identyfikacji lotnych trucizn nieorganicznych sita molekularnego 5A pozwala na równoczesną analizę związków o charakterze obojętnym (CO , CH_4 , N_2 , O_2) nie reagujących z tlenkami zasadowymi, stanowiącymi jego strukturę fizykochemiczną. Z kolei zupełne niepowodzenie rozdzielcze występuje podczas wykorzystania tego typu wypełnienia do analizy związków lotnych o charakterze kwaśnym. Aktywne właściwości zasadowych tlenków metali alkalicznych tworzących strukturę sita 5A sprawiają, że spełnia ono rolę pułapki dla tej grupy związków, uniemożliwiając ich swobodny rozdział w kolumnie i tym samym rejestrację na chromatografie /brak sygnału/.

W niniejszej pracy sito molekularne 5A zostało wykorzystane do analizy jakościowo-ilościowej tlenku węgla. Przed rozpoczęciem pracy, adsorbent poddano odpowiedniej aktywacji /2.4.3./. Równocześnie należy podkreślić, że w układzie standardowym przygotowanym dla kompleksowej analizy wszystkich możliwych lotnych związków nieorganicznych notowanych w praktyce toksykologiczno – sądowej zastosowano równoległy układ „dual” umożliwiający analizę dwu zróżnicowanych chemicznie grup związków obojętnych i kwasowych.

3.3. Otrzymywanie karboksyhemoglobiny /COHb/ dla celów eksperymentalnych

We wszystkich doświadczeniach przeprowadzonych i opisanych w niniejszej pracy, hemoglobinę tlenowęglową otrzymano, poddając świeżą krew o zawartości hemoglobiny od 15 do 16 g/100ml działaniu tlenku węgla, który został wytworzony w prostym generatorze w wyniku reakcji stężonego kwasu siarkowego ze stężonym kwasem mrówkowym (85%).

Reakcja tworzenia tlenku węgla przebiega według schematu:

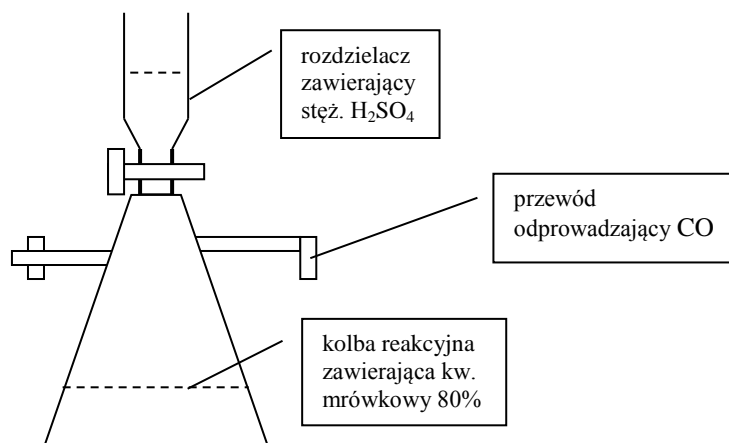


Bardzo ważnym czynnikiem wpływającym na wydajność reakcji jest temperatura w jakiej ona przebiega. Wzrost temperatury przyspiesza proces wytwarzania tlenku węgla a tym samym zwiększa się szybkość wiązania się tego gazu z hemoglobiną.

Proces pełnego wysycania 10cm³ krwi trwa 45min. Szybkość wiązania CO determinowana jest też wartością poziomu hemoglobiny w badanej krwi. Wskazane są więc jak najwyższe wartości hemoglobiny w wyselekcjonowanych próbkach krwi.

Generator do otrzymania czystego tlenku węgla (rys.25) składa się z kolby reakcyjnej /Buchnera/, rozdzielacza o poj. 250cm³, układu rurek przepływowych połączonych do odpowiednich probówek, w których umieszcza się krew. W celu uniknięcia przypadkowego skażenia atmosfery, proces wysycania przeprowadza się pod sprawnym wyciągiem. Ewentualnie istnieje możliwość zakupu butli gazowej zawierającej tlenek węgla, co stanowi alternatywę dla przeprowadzania procesu opisanego wcześniej.

Rysunek 25 Generator do otrzymania tlenku węgla



3.4. Analiza ilościowa karboksyhemoglobiny metodą chromatografii gazowej.

Chromatografia gazowa jest aktualnie uważana za najbardziej przydatną technikę badawczą stosowaną w analizie związków lotnych. W przypadku analizy gazów nieorganicznych jak to podniesiono wcześniej używa się wyłącznie uniwersalnego detektora przewodnictwa cieplnego (TCD). Możliwości użycia i wykorzystania detektora TCD są uzależnione od poziomu występowania oznaczanego związku w próbce badanej, który powinien mieścić się w zakresie kalibracji detektora określonej funkcją: $R = f(c)$, gdzie R - wskazanie detektora, c - stężenie związku badanego. Biorąc pod uwagę prostotę i szybkość wykonania analizy jakościowo-ilościowej metodą chromatografii gazowej z wykorzystaniem najprostszej techniki izolacji "headspace" próbowano zbadać jej przydatność w pośredniej analizie karboksyhemoglobiny poprzez analizę uwolnionego tlenku węgla.

3.4.1. Zasada metody

W analizie wykorzystano chromatografię gazową adsorpcyjną oraz technikę "headspace". Metoda polega na przeprowadzeniu oznaczanej substancji w stan gazowy poprzez jej uwolnienie z próbki krwi badanej i pobraniu jej z wytworzonego w szczelnie zamkniętym układzie gazu. Gaz ten pobieramy poprzez membranę odpowiednią strzykawką gazową i w odpowiedniej ilości wprowadzamy do komory nastrzykowej chromatografu.

Aby uwolnić związany z hemoglobina tlenek węgla do próbki krwi (1cm^3) umieszczonej w fiolce reakcyjnej (headspace), wprowadzono $0,5\text{cm}^3$ roztworu uwalniającego (saponina - 0,5g, $K_3Fe(CN)_6$ - 2g w 10cm^3 H_2O destylowanej). Po czterech minutach wytrząsania w temperaturze 20°C uwolniony tlenek węgla wprowadza się do komory nastrzykowej chromatografu gazowego.

3.4.2. Parametry pracy chromatografu

- * gaz nośny – hel (natężenie przepływu objętości gazu 22-24 cm³/min)
- * wzmocnienie sygnału - 1:16
- * prąd katarometru - 140 mA
- * temperatura komory nastrzykowej - 120°C
- * temperatura termostatu - 110°C

3.4.3. Wykonanie analizy

Badaną próbkę krwi wysyconą tlenkiem węgla uwolnioną od niezwiązanego tlenu węgla /proces dynamicznego wysycania azotem 20cm³/min przez 30 sek./ wprowadza się do odpowiednio przygotowanej fiolki reakcyjnej, wyposażonej w kapsel z membraną gumową, umożliwiającą pobranie par ze szczelnie zamkniętego układu fiolki rys 17.

Do szklanej fiolki dodano 1cm³ krwi badanej, następnie fiolkę szczelnie zamknięto kapslem z membraną gumową, przez którą wstrzyknięto 0,5cm³ roztworu uwalniającego tlenek węgla z wysycanej krwi. Po czterech minutach wytrząsania w temperaturze 20°C uwolniony tlenek węgla zawarty w obj. 0,5cm³ par znad roztworu wprowadzamy do komory nastrzykowej chromatografu gazowego.

3.4.4. Wykonanie krzywej kalibracyjnej

W celu wykonania krzywej kalibracyjnej przygotowano dwie próbki krwi o obj. 5cm³ od jednego dawcy, z których jedną wysycano tlenkiem węgla do możliwie maksymalnej ilości karboksyhemoglobiny - COHb, druga zaś była jej pozbawiona. Umożliwiło to dokonanie odpowiednich rozcieńczeń o różnej procentowej zawartości karboksyhemoglobiny, które przedstawia tabela 28.

Tabela 28 Przygotowanie próbek krwi o różnym wysyceniu CO

stężenie karboksyhemoglobiny we krwi w %	100	80	60	40	20	10
ilość krwi pozbawionej tlenu węgla w ml	-	0,2	0,4	0,6	0,8	0,9
ilość krwi wysycanej tlenkiem węgla w ml	1	0,8	0,6	0,4	0,2	0,1

Każdą z kolejno rozcieńczonych próbek krwi przeniesiono w obj. 1cm³ do fiolki reakcyjnej. Po dodaniu roztworu uwalniającego i wytrząsaniu, dokonano po dwa nastrzyki fazy gazowej z każdego roztworu badanego o odpowiedniej zawartości

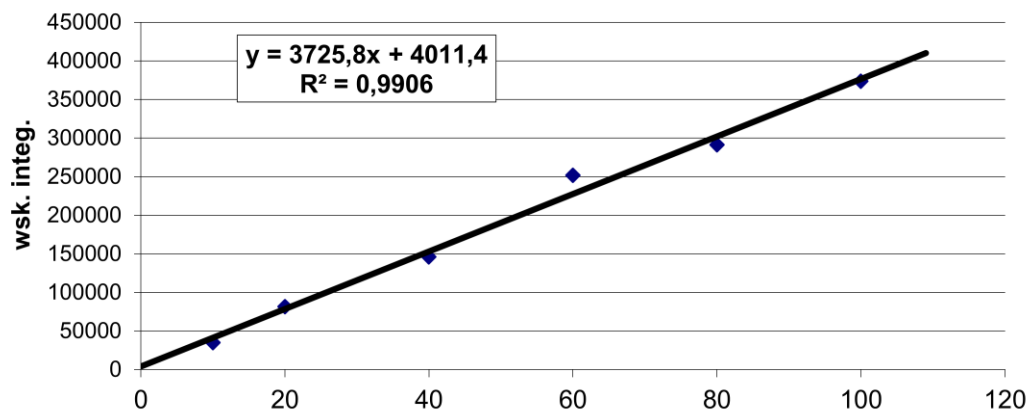
karboksyhemoglobiny. W celu wyeliminowania ewentualnego błędu i upewnienia się co do powtarzalności wyników badań w przeprowadzonej analizie otrzymano sukcesywnie malejące wysokości pików (h) wykreślonych na chromatogramie.

Średnie wartości wskazań integratora rejestrującego piki, uzyskane z dwóch kolejnych nastrzyków próbki tabela 29, pozwoliły na wykreślenie krzywej kalibracyjnej rys 26.

Tabela 29 Wskazania integratora jako funkcji stężenia CO Hb

Stężenie	Wskazanie integratora /w/		
HbCO /%/	1	2	\bar{X}
100%	381951	365249	373600
80%	287894	294776	291335
60%	256309	246902	251605
40%	155027	136914	145971
20%	82498	80557	81528
10%	35015	35008	35012

Rysunek 26 Krzywa kalibracji $w = f(c)$: w – wartość liczbowa wskazań integratora, c - stężenie - COHb (w%).



Współczynnik korelacji r:

$$r = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{\sqrt{\left(\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n} \right) \left(\sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n} \right)}} = 0,995293$$

Odchylenie standardowe ustalone dla wskazań integratora: sd

$$sd = \left(\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \right)^{\frac{1}{2}} = 130571$$

3.4.5. Krzywa kalibracyjna po uprzedniej eliminacji niezwiązanego tlenu węgla

Dla efektywnego procesu wysycania krwi tlenkiem węgla dokonano wyboru odpowiedniego czasu, niezbędnego do całkowitego przekształcenia Hb i HbO₂ w COHb, w warunkach „in vitro”. Biorąc pod uwagę osobnicze, często występujące znaczące różnice wartości hemoglobiny we krwi, trudno jest ustalić indywidualnie wystarczający czas wysycania, tak więc każdą krew poddawaną badaniom, wysycano w dość długim czasie 45 min.

Tak wysycony układ modelowy krwi zawierał karboksyhemoglobinę, obok niezwiązanego tlenu węgla rozpuszczonego fizycznie (wolny, niezwiązany), który nie miał już możliwości połączenia się z hemoglobiną w skutek jej wcześniejszego wysycenia.

Badając wcześniej, możliwość rozpuszczenia się tlenu węgla w soli fizjologicznej i osoczu, ustalono metodę uwalniania fizycznie rozpuszczonego tlenu węgla we krwi, który mógł zawyżać końcowe wyniki badań uzyskane metodą chromatograficzną. Osocze i sól fizjologiczna pozbawione są krwinek czerwonych a jednocześnie hemoglobiny, tak więc w trakcie wysycania tych płynów tlenkiem węgla, nie był on wiązany, lecz rozpuszczał się w nich czysto fizycznie. Następnie płyny te zostały poddane po wysyceniu – „wentylowaniu” azotem, w celu potwierdzenia szybkiej i prostej możliwości eliminacji rozpuszczonego tlenu węgla z roztworu badanego.

W tym celu przez roztwór badany mieszaniny w próbce przepuszczano azot 10cm³/min., przepływający przez układ kapilary (użyto pipety o objętości 1cm³, połączonej wężykiem gumowym z butlą).

3.4.5.1. Analiza rozpuszczalności tlenu węgla w soli fizjologicznej

Po wysyceniu 0,9% roztworu NaCl w czasie 45min., dokonano trzech kolejnych nastryków:

- bezpośrednio po wysyceniu, bez udziału roztworu uwalniającego tlenek węgla, pobrano: z fiolki reakcyjnej 0,5cm³ par nad roztworu. Na chromatogramie pojawił się pik tlenu węgla a jego zawartość procentowa w mieszaninie wyniosła 0,33%.

- po 30s. wentylowania wysyczonego roztworu NaCl, bez roztworu uwalniającego CO, dokonano kolejnego nastrzyku par z nad roztworu, pojawił pik CO, a jego zawartość procentowa wynosiła już tylko 0,05%.
- po 1 min. wentylowania azotem 0,9% roztworu NaCl i nastrzyknięciu na komorę chromatografu par z nad tego roztworu, nie stwierdzono obecności tlenu węgla.

3.4.5.2. Analiza rozpuszczalności tlenu węgla w osoczu

Po wysyceniu tlenkiem węgla osocza w czasie 45min., dokonano trzech kolejnych nastrzyków:

- bezpośrednio po wysyceniu, bez udziału roztworu uwalniającego CO, pobrano 0,5 cm³ par z fiołki reakcyjnej i wprowadzono do komory nastrzykowej chromatografu, pojawił się pik CO, zawartość procentowa tego związku wyniosła 0,35%
- po 30s przewentylowania wysyczonego osocza, zachowując identyczne jak poprzednio warunki, dokonano nastrzyku i zawartość CO w mieszaninie wyniosła już tylko 0,08%
- po 1min. wentylowania azotem tego samego osocza nie stwierdzono obecności tlenu węgla i czas ten uznano za minimalnie skuteczny

3.4.5.3. Analiza krwi

Po wysyceniu krwi tlenkiem węgla w warunkach i czasie ustalonym wcześniej dla soli fizjologicznej i osocza, również dokonano analizy niezwiązanego tlenu węgla. Bezpośrednio po wysyceniu, bez roztworu uwalniającego, stwierdzono obecność niezwiązanego tlenu węgla. Po kolejnym okresie (30s) wentylowania – przepływ azotu ok. 20cm³/min. nie zaobserwowano już sygnału tlenu węgla, a czas 1min. wentylowania azotem roztworu badanego uznano za wystarczający do jego całkowitego usunięcia.

3.4.5.4. Krzywa kalibracyjna

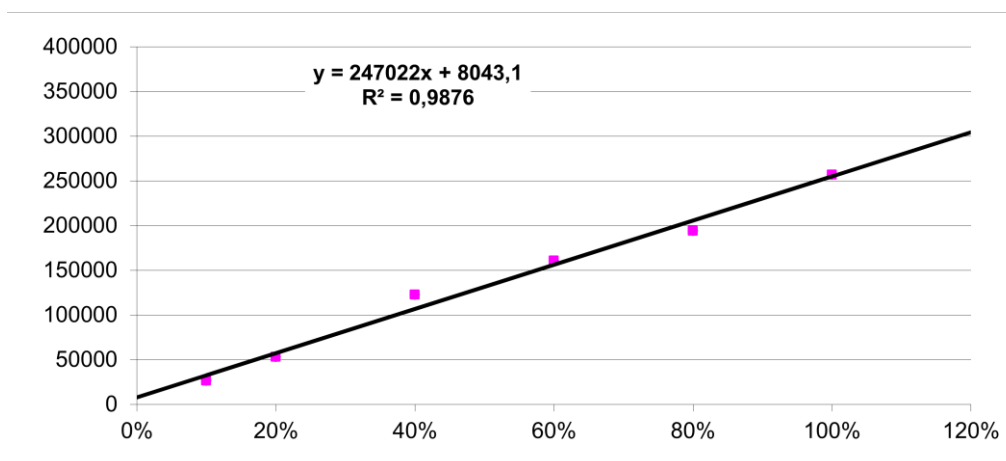
W celu dokonania analizy przygotowano dwie próbki krwi. Jedną z nich wysycano tlenkiem węgla do 100% indywidualnej wartości karboksyhemoglobiny w czasie 45 min., a następnie poddano wentylacji azotem przez 30s. (według wcześniej ustalonych parametrów). Działanie to pozwoliło usunąć wolny fizycznie rozpuszczony tlenek węgla. Z tak przygotowanej krwi dokonano odpowiednich rozcieńczeń (patrz tab.28). Po przeniesieniu krwi do fiołek, dodaniu roztworu uwalniającego i wytrząsaniu, dokonano po dwa nastrzyki fazy gazowej z każdego rozcieńczenia jak poprzednio. Otrzymano sukcesywnie różnicowane wysokości pików na chromatogramach, które okazały się niższe aniżeli poprzednio, tj. z pominięciem procesu wentylowania.

Uzyskane stężenia kalibracyjne przedstawiono w tabeli 30, a na rys 27 podano zależność wskazań integratora jako funkcji stężenia COHb /%/.

Tabela 30 Wskazania integratora jako funkcji stężenia COHb

Stężenie	Wskazania integratora		
HbCO /%/	1	2	\bar{X}
100%	248739	264923	256831
80%	198481	189643	194062
60%	160312	160991	160652
40%	127469	117980	122725
20%	54146	52164	53155
10%	25604	27662	26603

Rysunek 27 Wykres kalibracji $w = f(c)$, w – wartość liczbowa wskazań integratora, c - stężenie - COHb (w%).



$$r = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{\sqrt{\left(\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n} \right) \left(\sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n} \right)}} = 0,993794$$

Odchylenie standardowe: sd

$$sd = \left(\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \right)^{\frac{1}{2}} = 86701,35$$

3.4.6. Ocena statystyczna wyników

W celu sprawdzenia powtarzalności uzyskiwanych wyników, przygotowano po pięć prób z trzech różnych rozcieńczeń, które poddano rutynowej analizie ilościowej. Uzyskane średnie wartości poddano analizie statystycznej.

Tabela 31 Ocena powtarzalności uzyskiwanych wyników

Stęż. w %	Uzyskany wynik x	\bar{X}	$X - \bar{X}$	$(X - \bar{X})^2$	$\sum(X - \bar{X})^2$	S	S_r	\bar{S}	$\mu \pm$
10%	12	10,8	1,2	1,44	4,2	1,02	9,44	0,45	10,8±1,24
	12		1,2	1,44					
	11		0,2	0,4					
	10		-0,8	0,64					
	10		-0,8	0,64					
50%	54	52,6	1,4	1,92	49,16	3,5	6,65	1,6	69,4±7,3
	51		-1,6	2,56					
	58		5,4	29,16					
	51		-1,6	2,56					
	49		-3,6	12,96					
75%	69	69,4	-0,4	0,16	85,2	4,61	6,64	2,66	69,4±7,3
	73		3,6	12,96					
	66		-3,4	11,56					
	75		5,6	31,36					
	64		-5,4	29,16					

W obliczeniach uwzględniono następujące zależności:

x- średnia arytmetyczna

$$\bar{X} = \frac{\sum X_i}{n} \quad X_i - \text{wynik pojedynczy, } n - \text{liczba pomiarów}$$

S – odchylenie standardowe pojedynczego wyniku

Odchylenie standardowe wyniku pojedynczego:

$$S = \sqrt{\frac{\sum (X - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

Procentowe względne odchylenie standardowe:

$$S_R = \frac{S \times 100}{\bar{X}}$$

Odchylenie standardowe wyniku średniego:

$$\bar{S} = \frac{S}{\sqrt{n}}$$

Przedział ufności na poziomie prawdopodobieństwa 0,95 dla $n = 5$;

$$\mu = \bar{X} \pm t \times \bar{S} \quad (t = 2,776)$$

3.4.7. Rutynowa analiza karboksyhemoglobiny COHb w próbce krwi w przypadku podejrzeń o zatrucie tlenkiem węgla

Uwzględniając czynniki zakłócające prawidłowy sposób oznaczania COHb w próbce krwi metodą chromatografii gazowej zwrócono uwagę na konieczność wyeliminowania wpływu wolnej niezwiązanej ilości tlenu węgla powstałego z rozkładu jak i wysycenia. Kolejnym istotnym czynnikiem była konieczność uwzględnienia indywidualnej, osobniczej wartości hemoglobiny, determinującej poziom powstającej COHb.

Po sprawdzeniu liniowej zależności stężenia COHb wyrażonej wielkością piku uwolnionego CO, zarejestrowanego na chromatogramie, oraz potwierdzeniu możliwości usuwania z roztworu niezwiązanej ilości tlenu węgla, procentową wartość hemoglobiny tlenkowej w próbce badanej odniesiono do indywidualnej wartości hemoglobiny osobniczej.

Wykonanie oznaczenia COHb w próbce krwi:

Przekazaną do badań próbkę krwi podzielono na dwie części A i B. Próbkę B poddano procesowi wysycenia tlenkiem węgla przez okres 45min. w celu całkowitego przekształcenia Hb i HbO₂ w COHb.

Następnie krew poszczególnych próbek w objętości 1cm³ umieszczono w dwóch fiolkach „headspace” i przed zamknięciem poddano wysyceniu strumieniem azotu przez okres 1min. W kolejnym etapie do zamkniętych próbek poprzez membranę fiolki wprowadzono 0,5 cm³ mieszaniny uwalniającej tlenek węgla w wytrząsano przez 4min. Uwolniony tlenek węgla z próbki badanej (A) i z próbki (B) pobrane kolejno strzykawką gazową z przestrzeni „headspace” w ilości 0,5cm³ wprowadzono do komory nastrzykowej chromatografu gazowego, otrzymując odpowiednie chromatogramy.

W obliczeniu procentowej zawartości COHb w próbce badanej (A) przyjmuje się wartości wielkości piku determinowanego wskazaniem liczbowym integratora do próbki odniesienia (B), jako odpowiadającej maksymalnej tj. 100% wielkości osobniczej hemoglobiny (po przekształceniu w 100% COHb). Procentową zawartość obliczono ze wzoru:

$$C\% = \frac{wlp(A) \times 100}{wlp(B)}$$

wlp (A) – wartość liczbową wskazań integratora odpowiadająca wielkości pików uwalnianego tlenu węgla w próbce badanej (A)

wlp (B) – wartość liczbową wskazań integratora odpowiadająca wielkości pików uwalnianego tlenu węgla w próbce odniesienia (B)

W celu weryfikacji wartości użytkowej proponowanej metody analizie statystycznej poddano wyniki badań karboksyhemoglobiny wybranych przypadków zatruc tlenkiem węgla, którą oznaczano metodą chromatografii gazowej /GC-TCD/ techniką „headspace”, zmodyfikowaną metodą spektrofotometryczną Wolfa oraz przy pomocy urządzenia hemooksymetru OSM 3. Uzyskane zależności pomiarowe przedstawiono w tabeli 32.

Tabela 32 Zawartość karboksyhemoglobiny /COHb/ w badanych próbkach krwi ustalonej alternatywnymi metodami analitycznymi.

L.p.	Stężenie COHb /%/			
	GC	Met. Wolfa	M. Wolfa z dosyc.	Hemooksymetr.
1	7,2	5	13,4	8,1
2	32,4	19	44,1	22,3
3	45	28	47	44,5
4	4,1	~1	2,2	16,7
5	17	8	19,7	18,9
6	6,7	~3	7,1	6,0
7	4	~2	6,2	2,8
8	21,5	12,5	33	18
9	17	11	83	5,2
10	19	10	21,5	3,3
11	8,2	9,9	13,3	4,1
12	23	13	25,8	21,9
13	22,5	22	26,4	25,2
14	42	31	58,1	40
15	5,8	4,5	7,4	4,7
16	5	4	6,2	2,3
17	68	65	77	71,8
18	79	85	91	65,3
19	14,2	10,5	15,5	14,4
20	27,5	21,5	28	29,2
21	14,8	14	16	15,1
22	31	14	38,7	32,4
23	22	13	32,5	29,3

Tabela 33 Statystyki opisowe

Zmienna	(tab23)									
	N ważnych	Średnia	Ufność -95%	Ufność +95%	Mediana	Minimum	Maksimum	Dolny Kwartyl	Górny Kwartyl	Odch.std
GC	23	23,34	14,85	31,84	19,00	4,00	79,00	7,20	31,00	19,64
Met. Wolfa	23	17,69	9,06	26,32	12,50	1,00	85,00	5,00	21,50	19,95
M. Wolfa z dosyc.	23	31,00	20,02	41,99	25,80	2,20	91,00	13,30	44,10	25,40
Hemooksymetr.	23	21,80	13,55	30,06	18,00	2,30	71,80	5,20	29,30	19,10

Tabela 34 Test Shapiro – Wilka każdej metody /brak zgodności z rozkładem normalnym /wartości p na czerwono/

Zmienna	Testy normalności (tab23)					
	N	maks D	K-S p	Lillief. p	W	p
GC	23	0,202629	p > ,20	p < ,05	0,835537	0,001504
Met. Wolfa	23	0,269039	p < ,10	p < ,01	0,693264	0,000011
M. Wolfa z dosyc.	23	0,164346	p > ,20	p < ,15	0,873489	0,007479
Hemooksymetr.	23	0,153568	p > ,20	p < ,15	0,862548	0,004633

Tabela 35 Test nieparametryczny w modelu zmiennych powiązanych Friedmana /porównuje wszystkie metody każda z każdą/

Zmienna	ANOVA Friedmana i współczynnik zgodności Kendalla (tab23) Chi kwad. ANOVA (N = 23 , df 3) =46,14783 p<0 ,00000 Współczynnik zgodności= ,66881 r śred. rang = ,65375			
	Średnia Ranga	Suma Rang	Średnia	Odch.std
GC	2,521739	58,00000	0,233435	0,196382
Met. Wolfa	1,304348	30,00000	0,176913	0,199527
M. Wolfa z dosyc.	3,869565	89,00000	0,310043	0,254046
Hemooksymetr.	2,304348	53,00000	0,218043	0,190985

Ponieważ test Friedmana istotny do znalezienia między którymi metodami jest różnica zastosowano test wielokrotnych porównań Dunna – nie daje on dokładnych wartości p, tylko: ns-brak różnicy,

p<0,05*

p<0,01**

p<0,001***

Tabela 36 Test wielokrotnych porównań Dunna

Dunn's Multiple Comparisons Test

If the difference between rank sum means is greater than 23.109 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Difference	P value
GC vs. Met Wolfa	28.000	** P<0.01
GC vs. M Wolfa z dosyc	-31.000	** P<0.01
GC vs. Hemooksymetr	5.000	ns P>0.05
Met Wolfa vs. M Wolfa z dosyc	-59.000	*** P<0.001
Met Wolfa vs. Hemooksymetr	-23.000	ns P>0.05
M Wolfa z dosyc vs. Hemooksymetr	36.000	*** P<0.001

Rysunek 28 Graficzne porównanie metod /GC, Met. Wolfa, Met. Wolfa z dosycaniem oraz Hemooksymetru/

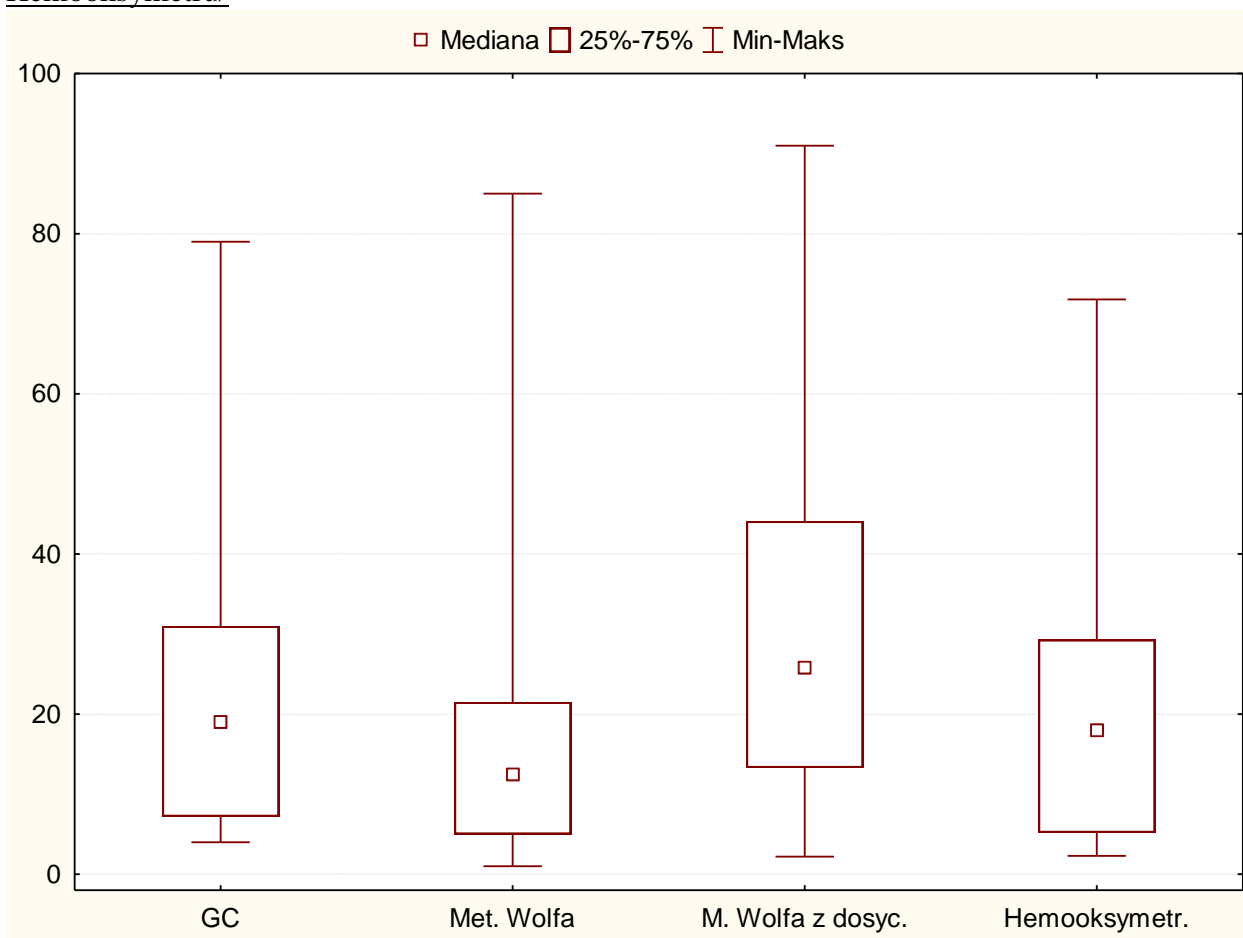


Tabela 37 Test nieparametryczny Wilcoxona – porównujący metodę GC z trzema pozostałymi metodami

Para zmiennych	Test kolejności par Wilcoxona (tab23) Zaznaczone wyniki są istotne z $p < 0,05000$			
	N	T	Z	poziom p
GC & Met. Wolfa	23	17,00000	3,680209	0,000233

Jest różnica $p=0,0002$

Para zmiennych	Test kolejności par Wilcoxona (tab23) Zaznaczone wyniki są istotne z $p < 0,05000$			
	N	T	Z	poziom p
GC & M. Wolfa z dosyc.	23	7,000000	3,984359	0,000068

Jest różnica $p < 0,0001$

Para zmiennych	Test kolejności par Wilcoxona (tab23) Zaznaczone wyniki są istotne z $p < 0,05000$			
	N	T	Z	poziom p
GC & Hemooksymetr.	23	106,0000	0,973279	0,330416

Brak różnicy $p=0,3304$

3.5. Określenie czasu uwalniania się tlenu węgla w przechowywanym materiale

W badaniach dotyczących analizy ilościowej COHb nie bez znaczenia jest problem trwałości kompleksu karboksyhemoglobiny we krwi (92). Zagadnienie to jest szczególnie ważne w przypadku analizy nieświeżych próbek krwi, krwi zhemolizowanej, próbek dłużej przechowywanych bądź pobranych ze zwłok po znacznym upływie czasu od chwili zdarzenia. Możliwość ustalenia precyzyjnej wartości stężenia COHb, obok znajomości biochemicznych czynników modyfikujących jej wartość w relacji czasów zgonu (92), przechowywania i wykonania analizy, stanowią istotę obiektywnej interpretacji przyczynowo – skutkowej zatrucia tlenkiem węgla i jest przedmiotem ciągłych badań. Dotychczasowe wyniki badań (93) wskazują na możliwość uwolnienia się tlenu węgla z układu COHb, który systematycznie wzrasta dopiero w warunkach ekstremalnie długiego /rok/ przechowywania w temp. > 5°C.

Należy więc stwierdzić, że standardowe, rutynowe warunki wykluczają znaczącą możliwość biodegradacji COHb podczas przechowywania próbek krwi sekcyjnej w temp. lodówki ± 5°C w okresie miesiąca.

W celu ustalenia możliwych zmian stężenia karboksyhemoglobiny, przeprowadzono własne badania trwałości COHb w czasie jej przechowywania. Próbki krwi poddano procesowi wysycania do uzyskania maksymalnej COHb, świeżo po wysyceniu krwi tlenkiem węgla umieszczono je w szczelnie zamkniętych probówkach i przechowywano w temp. ok. ±20°C, określając poziom COHb w odpowiednich przedziałach czasowych. Uzyskane zmiany stężenia w czasie, dla analizowanych prób krwi przechowywane w temp. ± 20°C i odpowiednio w temp. ± 5°C przedstawiono w tabeli 38.

Tabela 38 Zmiany stężenia COHb w czasie przechowywania próbek krwi w temp. 20°C,
* - wartość COHb w czasie przechowywania próbek krwi w temp. ± 5°C

okres /dni/ przechowywania	Zmiany wartości stężenia COHb we krwi /%/									
0	105	84	103	103	112	100	115	105	95	103
1	102	84	103	102	112	95	115	103	95	100
2	101	84	100	102	112	95	112	103	94	100
3	100	84	100	100	105	95	112	101	94	98
4	100	83	99	95	104	92	110	101	94	98
5	95	79	99	94	103	84	105	90	84	95
6	84	61	90	84	103	84	100	90	78	90
7	84	58	87	83	92	73	100	80	63	84
8	76	25	73	68	87	72	90	78	59	84
9	68	24	70	67	73	63	84	78	53	84
10	67	22	68	63	73	61	45	73	52	73
*	102	82	101	102	110	98	111	102	94	98

Z otrzymanych danych wynika, że znaczący spadek wartości COHb występuje od piątego dnia przechowywania prób krwi w temp. 20°C, który po dziesięciu dniach przechowywania przyjmuje wartości średnie zbliżone do połowy wartości wyjściowej. Ta obserwacja jest niezwykle cenna dla właściwej interpretacji stabilności parametru stężenia COHb w materiale badanym w warunkach niewłaściwego przechowywania zabezpieczonych próbek krwi w dłuższym okresie czasu od chwili zdarzenia i wskazuje zawsze na zasadność wykonania odpowiednich oznaczeń w możliwie jak najkrótszym czasie.

4. Cyjanowódór - i jego sole cyjanki /KCN, NaCN/

Ze względu na dopuszczalne stosowanie związków grupy cyjanków w wielu działach gospodarczo – użytkowych: synteza organiczna, zakłady jubilerskie, galwaniczne, laboratoria chemiczne, istnieje zawsze wysokie zagrożenie toksykologiczne w przypadku niewłaściwej ich dystrybucji i użycia. Konsekwencją istniejącego zagrożenia jak i kontroli bezpieczeństwa jest konieczność wykonywania szybkich badań analitycznych dla celów rutynowej diagnostyki chemicznej przypadków zatruc prowadzonych w laboratoriach toksykologiczno – sądowych. W programie badawczym uwzględniono ocenę przydatności metod umożliwiających szybką i wiarygodną diagnostykę materiału biologicznego i dowodowego w przypadku podejrzenia o zatrucie związkami cyjanowymi.

4.1. Odczynniki, roztwory pomocnicze, sprzęt laboratoryjny, aparatura

4.1.1. Odczynniki:

kwasy siarkowy cz.d.a. /Polskie Odczynniki Chemiczne/

potasu cyjanek /KCN/ Potassium Cyanide G.R. CHEMAPOL Praha Czechoslovakia

chloramina T

fosforan potasowy

fosforan sodowy

kwasy barbiturowe

kwasy siarkowy cz.d.a. /Polskie Odczynniki Chemiczne/

kwasy solne

pirydyna

4.1.2. Roztwory pomocnicze:

- roztwór podstawowy KCN 0.01% sporządzony poprzez rozpuszczenie 0.01g KCN w 100cm³ wody destylowanej
- roztwór 0.1mol NaOH /2g NaOH/500cm³ wody destylowanej/
- roztwór 0.5 mol /H₂SO₄ /14cm³ stężonego H₂SO₄ /500cm³ wody destylowanej/
- roztwór 10% H₂SO₄ /9.8cm³ stężonego H₂SO₄ uzupełniono wodą destylowaną do 100cm³/

- bezwodna pirydyna otrzymywana w procesie jej ogrzewania w temperaturze wrzenia pod chłodnicą zwrotną z pastylkami NaOH lub KOH (94) i destylacji bez dostępu wilgoci z powietrza /temperatura wrzenia bezwodnej pirydyny 115,5°/
- roztwór kwasu barbiturowego i pirydyny tj. odczynnik barbiturowo-pirydynowy otrzymywany przez rozpuszczenie 1,5g kwasu barbiturowego, 7.5cm³ pirydyny, 1.5cm³ stężonego kwasu solnego i uzupełnieniu mieszaniny do 25cm³ woda destylowaną. Mieszaninę ogrzewa się i miesza do rozpuszczenia.
UWAGA: przygotować roztwór na świeżo.
- roztwór 0.25% chloraminy T /250mg chloraminy T w 100cm³ wody destylowanej/
UWAGA ! - przechowywać w lodowce.
- roztwór 1mol KH₂PO₄ /68g KH₂PO₄ w 500cm³ wody destylowanej/
- roztwór 1mol NaH₂PO₄, /60g NaH₂PO₄ w 500cm³ wody destylowanej/
- odczynnik chloraminowo-fosforanowy sporządzony poprzez zmieszanie 1 części 0.25% chloraminy T i 3 części 1 molowego roztworu NaH₂PO₄.
- UWAGA: roztwór od chwili mieszania przechowywać w temperaturze topniejącego lodu
- nasycony roztwór wodny fenylo-3-metylopyrazolonu-5
- 10% roztwór kwasu siarkowego sporządzony przez zmieszanie 10cm³ stężonego H₂SO₄ z 90cm³ H₂O dest;
- roztwór podstawowy cyjanku potasu sporządzony przez rozpuszczenie 0,12037g KCN w 10cm³ H₂O dest.; dający roztwór podstawowy KCN 0,05g/dm³.

4.1.3. Aparatura:

Spektrofotometr typu SPECOL 11

Kuwety kwarcowe o grubości 1cm

Termostat typu ELKOM CI-65

Waga analityczna WA 34 typ PRL TA 14

Chromatograf gazowy Chrom 5 prod. CSR

Chromatograf gazowy AutoSystem XL firmy *PERKIN ELMER*

4.1.4. Sprzęt laboratoryjny:

- pipety automatyczne o poj. 100μl, 200μl, 1000μl, 5000μl
- probówki laboratoryjne pojemności 10cm³

- probówki zamykane na szlif o pojemności 10.0cm³
- cylindry miarowe o poj. 10, 20, 50cm³
- kolby miarowe o poj. 10, 25, 50, 100, 500cm³
- zlewki o poj. 100cm³
- komory Conwaya ø zewnętrzna 6cm, ø wewnętrzna 3.5cm
- płytki szklane
- buteleczki o poj. 2,9cm³ zamykane korkiem z membraną

4.1.5. Dobór materiału biologicznego do badań toksykologicznych

Dobór właściwego materiału biologicznego /sekcyjnego/ stanowi ważny etap badawczy warunkujący kolejny pozytywny przebieg analizy jakościowo – ilościowej ksenobiotyku. Wobec ograniczonych danych odnośnie wskazania faktycznych parametrów dystrybucji jonów cyjanowych układzie krew – narządy w realizowanym programie badawczym uwzględniono wykorzystanie w tym celu doświadczalnego modelu zwierzęcego z udziałem eksperymentalnej intoksykacji.

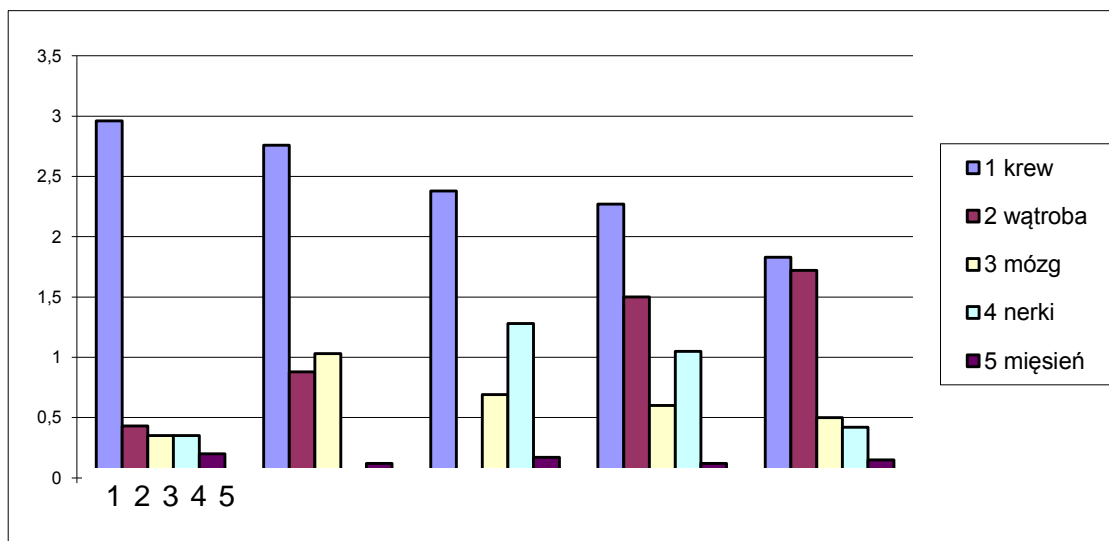
W tym celu w badaniach eksperymentalnych wykorzystano szczury białe rasy „WISTAR”.

W celu dokonania oceny właściwego doboru najbardziej właściwego materiału sekcyjnego do badań toksykologicznych, wykonano odpowiedni eksperyment. Rozmieszczenie – dystrybucję cyjanów w poszczególnych narządach i płynach ustrojowych sprawdzono na grupie zwierząt doświadczalnych /szczury rasy wistar/ przeznaczono do likwidacji z racji ukończonego procesu reprodukcji. W tym celu szczurom podano cyjanek potasu /15mg/kg/ przez sondę bezpośrednio do przewodu pokarmowego. Następnie po śmierci zwierząt pobierano krew oraz narządy wewnętrzne /wątroba, mózg, nerki, mięsień uda/. Wyniki analizy ilościowej cyjanowodoru wykonano metodą /GC-NPD/ uwolnionego z krwi i narządów szczura przedstawiono w tabeli 39 i graficznie na rys 29.

Tabela 39 Notowane zakresy stężeń HCN we krwi i wybranych narządach szczura /n=5/ po ostrym śmiertelnym zatruciu /KCN/ w µg/g tkanki

Nr eksperymentu	Poziom HCN we krwi - µg/ml, narządy - µg/g				
	krew	wątroba	mózg	nerka	mięsień
1	2,96	0,43	0,35	0,35	0,2
2	2,76	0,88	1,03		0,12
3	2,38		0,69	1,28	0,17
4	2,27	1,5	0,6	1,05	0,12
5	1,83	1,72	0,5	0,42	0,15

Rysunek 29 Notowane zakresy stężeń HCN we krwi i wybranych narządach szczura /n=5/ po ostrym śmiertelnym zatruciu /KCN/ w $\mu\text{g/g}$ tkanki



4.2. Analiza ilościowa cyjanków we krwi metodą spektrofotometryczną w zakresie widzialnym z odczynnikami barbiturowo - pirydynowym (62), (63).

Zasada metody:

Zasada metody izolacji podobnie jak w przypadku siarkowodoru polega na uwolnieniu lotnego cyjanowodoru z soli cyjanków zawartych we krwi przez kwas siarkowy. Cyjanki w postaci kwasu cyjanowodorowego są następnie pochłaniane przez wodorotlenek sodowy znajdujący się w środkowej części komory Conwaya /rys 30/.

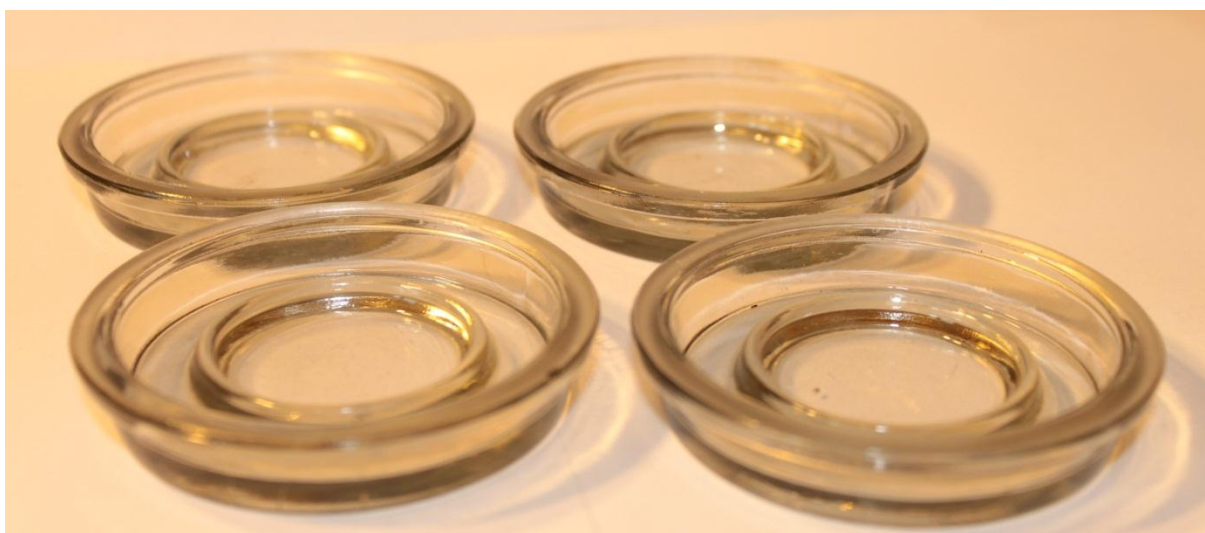
Po zakończeniu procesu mikrodyfuzji roztwór ze środkowej części komory Conwaya reaguje z chloraminą T, która przeprowadza ugrupowanie cyjankowe w chlorocyjan. Chlorocyjan reaguje następnie z pirydyną tworząc aldehyd glutakonowy. Aldehyd kondensuje z kwasem barbiturowym, wytwarzając niebieskofioletowy barwnik (65). Intensywność barwnego kompleksu /od różowego do fioletowego/ jest proporcjonalna do stężenia cyjanków. Natężenie barwy mierzono spektrofotometrycznie przy długości fali $\lambda=580\text{nm}$, Odczytu stężenia dokonano na podstawie ustalonej wcześniej krzywej wzorcowej.

Wykonanie analizy:

Przesmarowano górne krawędzie komory mikrodyfuzyjnej Conwaya olejem silikonowym w celu zapewnienia szczelności układu. W wewnętrznej części komory umieszczono 2cm^3 0.1m NaOH, w części zewnętrznej 2cm^3 krwi. Komorę nakrywano płytką szklaną, pozostawiając niewielką szczelinę, przez którą wlewano do części zewnętrznej 2cm^3 0.5m H_2SO_4 . Komorę szczelnie zamykano i przez ostrożne jej przechylenie mieszano ciecze

w części zewnętrznej. Następnie komory umieszczano w cieplarni w temperaturze 37°C na okres 3 godzin w celu przeprowadzenia procesu dyfuzji. Po okresie dyfuzji pobrano 1cm³ płynu z centralnej /wewnętrznej/ części komory i umieszczono go w probówce o pojemności 10cm³.

Następnie, do probówki dodano 2cm³ 1m KH₂PO₄, 1cm³ 0.25% chloraminy T i po wymieszaniu odstawiono na 2-3 minuty. Po tym okresie czasu dodano 3cm³ odczynnika barbiturowo-pirydynowego, wymieszano i odstawiono na 10 minut. Po ukończonym czasie reakcji dokonano odczytu wartości absorbancji na SPECOLU przy długości fali $\lambda = 580\text{nm}$ wobec próby kontrolnej /analogicznie przygotowanej próbki z użyciem krwi wolnej od cyjanku/.



Rysunek 30 Komora mikrodyfuzyjna Conwaya używana do izolacji lotnych trucizn nieorganicznych

4.2.1. Krzywa wzorcowa otrzymana dla roztworu wodnego KCN.

Do przygotowania krzywej wzorcowej $A_b = f(c)$ sporządzono 7 roztworów KCN w 0.1m NaOH. Roztworem podstawowym do przygotowania roztworów wzorcowych był roztwór wodny KCN o stężeniu 0.01g KCN/100cm³.

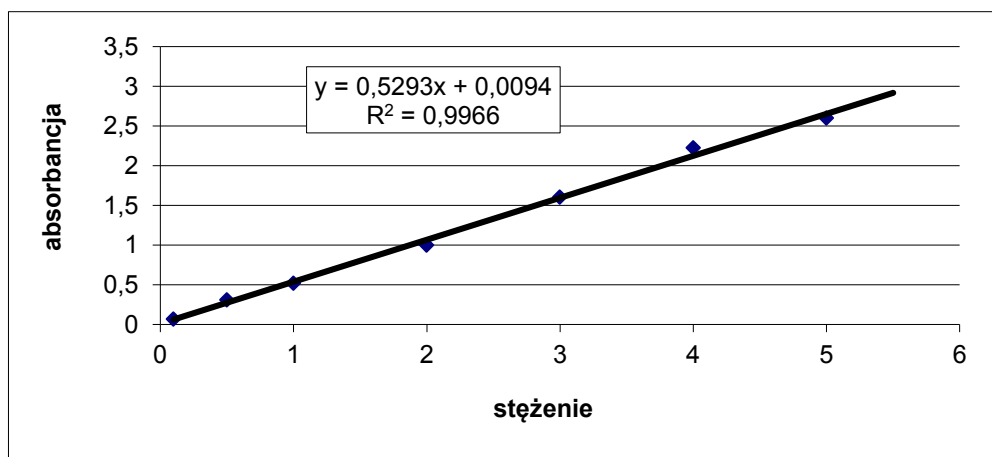
Przygotowano roztwory wzorcowe o stężeniach: 0.1; 0.5; 1.0; 2.0; 3.0; 4.0; 5.0mg CN⁻/dm³ Dokonano 3-krotnych pomiarów absorbancji dla których sporządzono każdorazowo świeże roztwory wzorcowe z przygotowanego oddzielnie roztworu podstawowego. Tabela 40 przedstawia skład stężeń roztworów wzorcowych oraz średnie wartości absorbancji wykorzystane do sporządzenia krzywej wzorcowej rys 31.

Roztwór podstawowy 0.01g KCN/100cm³ wody destylowanej, którego powyżej podane objętości uzupełniono do 10cm³ 0.1m NaOH uzyskując zakres stężeń pomiarowych /tab. 40/.

Tabela 40 Zależność absorbancji funkcją stężenia $Ab = f / c /$

Stężenie $CN^-/mg/l/$	Roztwór podstawowy /ml/	Ab I	Ab II	Ab III	Ab średnia
0.1	0.025	0.066	0.070	0.064	0.066
0.5	0.125	0.314	0.307	0.306	0.309
1.0	0.250	0.518	-	0.520	0.519
2.0	0.500	1.067	-	0.910	0.998
3.0	0.750	1.508	1.699	-	1.603
4.0	1.000	-	2.203	2.251	2.227
5.0	2.250	2.430	2.700	2.670	2.600

Rysunek 31 Zależność graficzna absorbancji funkcją stężenia jonów cyjankowych $Ab = f / c /$ dla analizowanych roztworów wodnych cyjanków



4.2.2. Ustalenie optymalnego czasu dyfuzji cyjanków z roztworu wodnego KCN.

W celu ustalenia optymalnego czasu dyfuzji zapewniającego ilościową przemianę cyjanków w cyjanowodór sporządzono z roztworu podstawowego roztwór o stężeniu $2mg\ CN^-/dm^3$ i po przeprowadzonej reakcji uwalniania lotnego cyjanowodoru zgodnie z podanym przepisem odczytywano zmiany wartości absorbancji w czasie.

Proces dyfuzji zachodził w $37^\circ C$, a uzyskane wyniki badań zebrano w tabeli 41, niezależnie od przedstawionej graficznej zależności $Ab = f / t /$ rys 32.

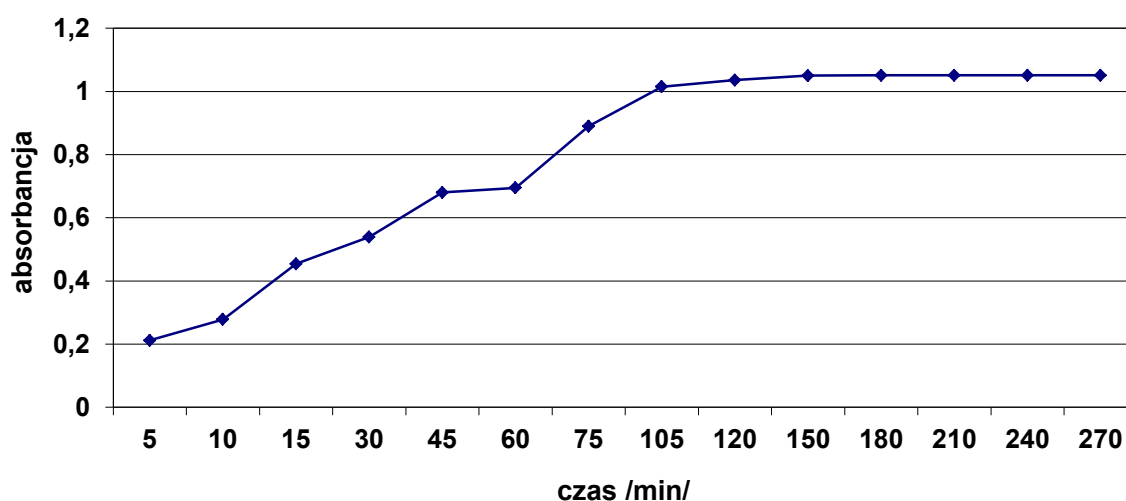
Badany układ eksperymentalny uwzględniał:

Warunki $c = 2mg\ CN^-/dm^3$ – roztwór wodny, $t = 37^\circ C$

Tabela 41 Zależność $Ab = f/t/ \text{ min}$

Czas dyfuzji t/min/	Ab	Czas dyfuzji t/min/	Ab	Czas dyfuzji t/min/	Ab
5	0.212	60	0.695	180	1.051
10	0.278	75	0.890	210	1.051
15	0.454	105	1.015	240	1.051
30	0.539	120	1.036	270	1.051
45	0.680	150	1.050	-	-

Rysunek 32 Zależność $Ab = f/t/ \text{ min}$ dla analizowanego roztworu wodnego KCN $c = 2 \text{ mg CN}^-/\text{dm}^3$



4.2.3. Ustalenie optymalnego czasu dyfuzji cyjanków z krwi

W celu ustalenia optymalnego czasu ilościowej dyfuzji cyjanków z krwi, sporządzono analogiczny roztwór o stężeniu $2 \text{ mg CN}^-/\text{dm}^3$ w krwi i po przebiegu reakcji barwnej, odczytywano zmiany wartości absorbancji w czasie. Proces dyfuzji zachodził w temp. 37°C .

Dane zebrano w tabeli 42, a zależność $Ab = f/t/$ ilustruje rys 33.

Warunki $c = 2 \text{ mg CN}^-/\text{dm}^3$ w krwi, $t = 37^\circ\text{C}$

Tabela 42 Zależność $Ab = f/t/ \text{ min}$

Czas dyfuzji t/min/	Ab	t/rain/	Ab
5	0.062	120	0.960
15	0.240	150	1.002
45	0.585	180	1.081
75	0.770	240	1.081
105	0.829	270	1.081

Dokonując oceny statystycznej uzyskano następujące wyniki:

współczynnik korelacji $r = 0.98771415$

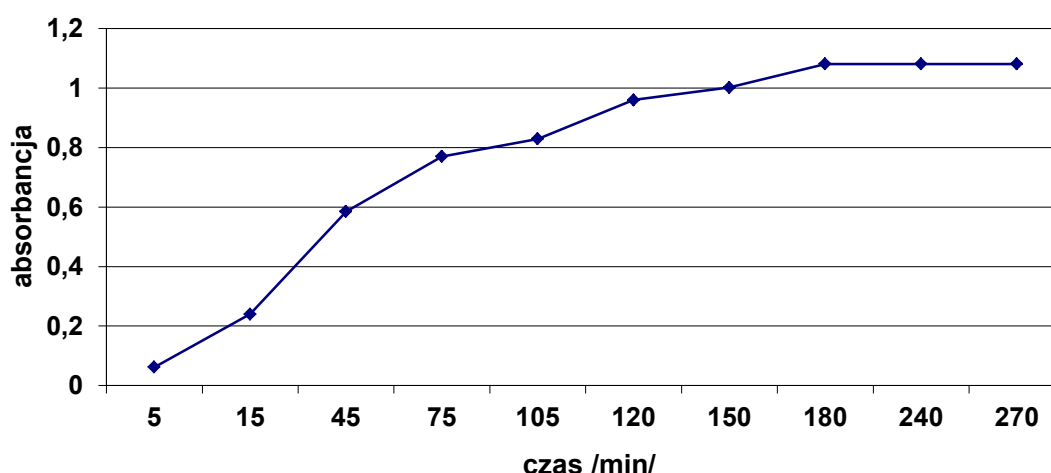
$S_b = 0.14862255$

błąd względny = 12.101001

$k = 0.016850359$ $Dk = \pm 0.026245601$

$t_{0.5} = 41.135455$ $D_{t_{0.5}} = \pm 6.4071319$

Rysunek 33 Zależność $Ab = f/t/$ min dla analizowanego roztworu w krwi KCN
 $c = 2\text{mg CN}^-/\text{L}$



4.2.4. Krzywa wzorcowa z roztworu wodnego KCN z uwzględnieniem optymalnego czasu dyfuzji

W celu wykreślenia krzywej wzorcowej sporządzono roztwór podstawowy KCN 0,01%, poprzez rozpuszczenie 0,01g KCN w 100cm^3 wody destylowanej /roztwór A/. Z roztworu 0,01% sporządzono kolejny roztwór o stężeniu 0,001% /roztwór B/, z którego wykonano profil roztworów wzorcowych o stężeniu: 0,1; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; $\text{mg CN}^-/\text{dm}^3$ co przedstawia tabela 43:

Tabela 43 Profil stężeniowy wodnych roztworów wzorcowych $\text{CN}^- \text{mg}/\text{dm}^3$ użytych do dyfuzji w Komorze Conwaya

stęż. $\text{CN}^- \text{mg}/\text{dm}^3$	objętość 0,001% uzupełniona do 2cm^3 /roztwór B/
0,5	$0,25\text{cm}^3$
0,1	$0,05\text{cm}^3$
1,0	$0,50\text{cm}^3$
2,0	$1,00\text{cm}^3$
3,0	$1,50\text{cm}^3$
4,0	$2,00\text{cm}^3$
5,0	$0,25\text{cm}^3$ z roztworu 0,01% /roztwór A/

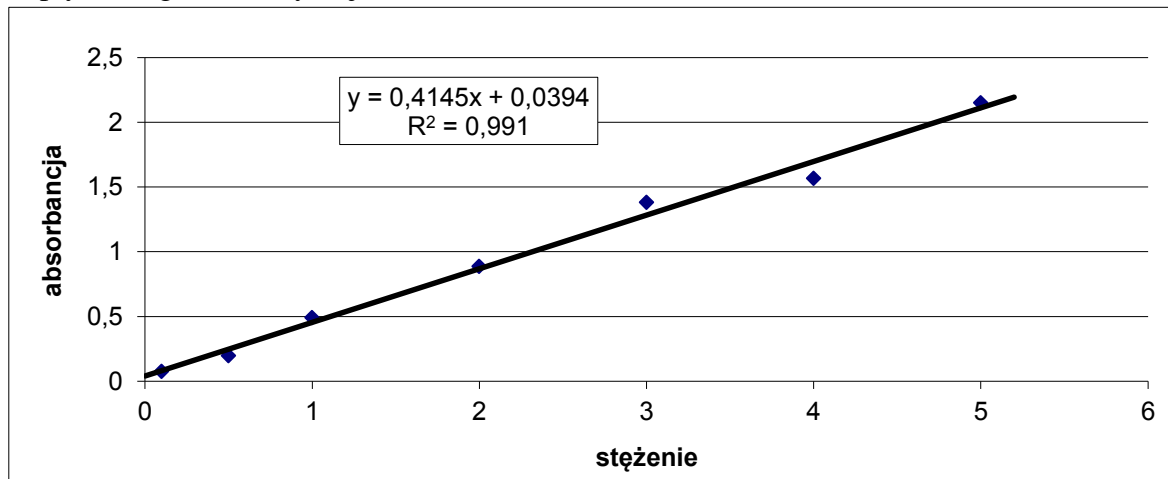
Dyfuzję prowadzono przez 3 godziny w temperaturze 37°C a pomiary absorbancji dokonano 3-krotnie, sporządzając każdorazowo świeże roztwory wzorcowe z przygotowanego roztworu podstawowego, zgodnie powyższym schematem.

Tabela 44 przedstawia wartości absorbancji uzyskane w czasie pomiarów oraz wartości absorbancji średniej wykorzystane do sporządzenia krzywej wzorcowej rys 34.

Tabela 44 Zależność $Ab = f/c$, uzyskane dla kalibracji krzywej wzorcowej cyjanoków w roztworze wodnym

stęż. CN ⁻ mg/ml	Ab I	Ab II	Ab III	Ab śr.
0.1	0.063	0.084	0.078	0.075
0.5	0.190	0.211	0.184	0.195
1.0	0.560	0.440	0.470	0.490
2.0	0.920	0.860	0.880	0.886
3.0	1.361	1.400	-	1.380
4.0	1.610	1.525	-	1.567
5.0	2.199	-	2.100	2.149

Rysunek 34 Zależność $Ab = f/c$ dla analizowanych roztworów wodnych z uwzględnieniem optymalnego czasu dyfuzji



4.2.5. Krzywa wzorcowo dla analizy ilościowej KCN we krwi

Oznaczenia przeprowadzono w krwi pełnej bez dodatku środków konserwujących i antykoagulantów. Aby zapobiec wytworzeniu skrzepu, krew po pobraniu wytrząsano przez 15 minut w szklanym pojemniku z umieszczonymi wewnątrz szklanymi kulkami.

Roztworami podstawowymi były 0.1% i 0.01% KCN. Roztwór 0.1% KCN uzyskano przez rozpuszczenie 0.01g KCN w 10cm³ wody destylowanej, zaś 0.01% przez rozpuszczenie 0.01g KCN w 100cm³ wody destylowanej. Z powyższych roztworów sporządzono 0.01%

i 0.001% roztwór KCN we krwi w następujący sposób: 1cm³ 0.1% KCN uzupełniono krwią do 10cm³ i uzyskano roztwór 0.01%; 1cm³ 0.01% KCN uzupełniono krwią do 10cm³ i uzyskano roztwór 0.001%.

Roztwory 0.01% i 0.001% KCN w krwi posłużyły za roztwory podstawowe do sporządzenia roztworów wzorcowych o stężeniu: 0.1; 0.5; 1.0; 2.0; 3.0; 4.0; 5.0mg CN⁻/dm³. W celu ich uzyskania przyjęto następujący schemat postępowania tabela 45:

Tabela 45 Profil stężeniowy roztworów wzorcowych we krwi CN⁻ mg/dm³

stęż. CN ⁻ mg/dm ³	objętość 0.001% KCN uzupełniono do 2cm ³
0.1	0.05cm ³
0.5	0.25cm ³
1.0	0.50cm ³
2.0	1.00cm ³
3.0	1.50cm ³
4.0	2.00cm ³
5.0	z roztworu 0.01% pobrano 0.25cm ³

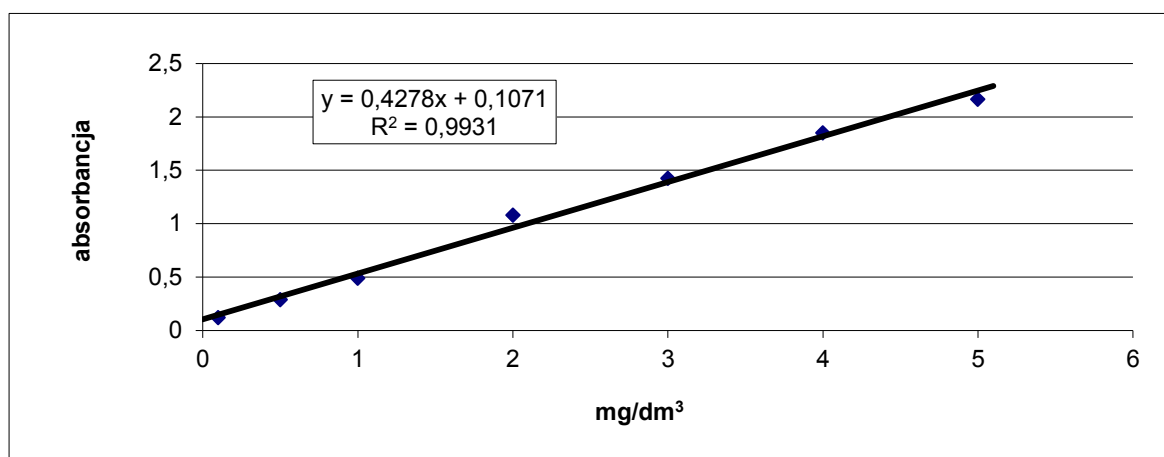
Pobrane objętości uzupełniono wodą destylowaną do 2cm³ /ilość materiału badanego w zewnętrznej części komory Conwaya/. Dyfuzję przeprowadzano w 37°C przez 3 godziny. Pomiaru absorbancji dokonano 3-krotnie, sporządzając każdorazowo świeże roztwory wzorcowe z przygotowanych roztworów podstawowych.

Tabela 46 przedstawia wartości absorbancji uzyskanych w czasie pomiarów i wartości absorbancji średniej wykorzystanej do sporządzenia krzywej wzorcowej rys 35.

Tabela 46 Zależność Ab = f /c/ roztwór podstawowy KCN 0.001% i 0.01% w krwi, dyfuzja 3 godziny w temp. 37°C.

stężenie CN ⁻ mg/l	Ab I	Ab II	Ab III	Ab średnia
0.1	0.130	0.099	0.138	0.122
0.5	0.268	0.259	0.341	0.289
1.0	0.452	0.425	0.600	0.492
2.0	1.095	0.985	1.160	1.080
3.0	1.500	1.245	1.531	1.425
4.0	1.908	1.850	1.790	1.849
5.0	2.275	2.090	2.133	2.166

Rysunek 35 Zależność $Ab = f(c)$ dla analizowanych roztworów krwi z uwzględnieniem optymalnego czasu dyfuzji:



4.2.6. Ocena statystyczna wyników uzyskanych w metodzie spektrofotometrycznej z odczynnikiem barbiturowo-pirydynowym.

Przeprowadzona analiza statystyczna otrzymanych wyników miała na celu ocenę powtarzalności wartości uzyskanych daną metodą. W obliczeniach uwzględniono następujące parametry:

1. \bar{X} - średnia arytmetyczna

$$\bar{X} = \frac{\sum x_i}{n}$$

gdzie: Σ - suma wartości wszystkich wyników

x_i - poszczególny wynik pomiaru

n - liczba wyników

2. s - odchylenie standardowe pojedynczego wyniku

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

gdzie: $n-1$ - liczba stopni swobody

3. W_z - współczynnik zmienności /procentowe względne odchylenie standardowe/

$$W_z = \frac{s \times 100}{\bar{x}}$$

4. $S\bar{x}$ - odchylenie standardowe wyniku średniego /błąd średni/

$$S\bar{x} = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

5. μ - przedział ufności średniej arytmetycznej

dla oznaczenia przedziału ufności przyjęto prawdopodobieństwo = 95%

t jest wartością krytyczną rozkładu t-Studenta dla prawdopodobieństwa = 95% i liczby stopni

$$\mu = \pm t \times \bar{Sx}$$

swobody $k = n-1$

W obliczeniu uwzględniono: dla $k = 8$ $t = 2.306$

$k = 5$ $t = 2.571$

przy prawdopodobieństwie = 95%

\bar{x}

uzyskane zależności statystyczne zebrano w tabeli 47.

Tabela 47 Analiza statystyczna wyników oznaczeń CN⁻ we krwi metodą spektrofotometryczną z odczynnikiem barbiturowo - pirydynowym

stęż. mg/dm ³	n	x _i	$\bar{x} = \sum x_i / n$	x _i - \bar{x}	$(x_i - \bar{x})^2$	$\sum (x_i - \bar{x})^2$	s	W _z %	S _{\bar{x}}	$\mu \pm$
0,5	1	0,214	0,228	-0,014	0,000196	0,000287	0,0059	2,59	0,0019	$\pm 0,004$
	2	0,255		0,027	0,000729					
	3	0,242		0,014	0,000196					
	4	0,232		0,004	0,000016					
	5	0,221		-0,007	0,000049					
	6	0,251		0,023	0,000529					
	7	0,225		-0,003	0,000009					
	8	0,219		-0,009	0,000081					
	9	0,200		-0,028	0,000784					
1,0	1	0,461	0,449	0,012	0,000144	0,001424	0,0133	2,96	0,0044	$\pm 0,010$
	2	0,475		0,026	0,000676					
	3	0,506		0,057	0,003249					
	4	0,382		-0,067	0,004489					
	5	0,410		-0,039	0,001521					
	6	0,495		0,046	0,002116					
	7	0,428		-0,021	0,000441					
	8	0,455		0,006	0,000036					
	9	0,437		-0,012	0,000144					
3,0	1	1,499	1,472	0,027	0,000729	0,000791	0,0126	0,85	0,0051	$\pm 0,013$
	2	1,485		0,013	0,000169					
	3	1,418		-0,054	0,002916					
	4	1,478		0,006	0,000036					
	5	1,457		-0,015	0,000225					
	6	1,498		0,026	0,000676					
5,0	1	2,158	2,143	0,015	0,000225	0,002190	0,0209	0,98	0,0085	$\pm 0,021$
	2	2,230		0,087	0,007569					
	3	2,091		-0,052	0,002704					
	4	2,159		0,016	0,000256					
	5	2,124		-0,019	0,000361					
	6	2,098		-0,045	0,002025					

4.3. Analiza ilościowa cyjanowodoru (HCN) metodą chromatografii gazowej

Mając na uwadze konieczność równoczesnej analizy jakościowo-ilościowej tlenu węgla i cyjanowodoru dla niektórych przypadków intoksykacji jakie występują w warunkach pożaru, sprawdzono przydatność metody chromatografii gazowej z użyciem detektora przewodnictwa cieplnego GC-TCD obok selektywnego detektora NPD /detektor termojonowy – *nitrogen-phosphorus detector*/ w oznaczaniu cyjanowodoru. Badania wykonano sprawdzając zakres zależności kalibracyjnej metody oraz wyznaczono dolną granicę wykrywalności. Sprawdzenie przydatności metod ustalono po analizie odpowiedniego materiału biologicznego zabezpieczonego dla wybranych przypadków złożonej intoksykacji.

4.3.1. Parametry pracy chromatografu

dla GC-TCD

- * wypełnienie kolumny - Haye Sep Q
- * gaz nośny - hel
- * natężenie przepływu objętości gazu - 22-24 cm³/min
- * prąd katarometru
- * wzmocnienie sygnału - 1:4
- * temperatura komory nastrzykowej - 70°C
- * temperatura termostatu - 80°C

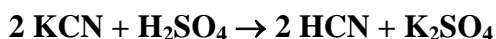
dla GC-NPD

- * aparat AutoSystem XL firmy *PERKIN ELMER*
- * kolumna: Supel-Q™ PLOT* Fused Silica Capillary Column 30m × 0.53mm
- * termostat - 60°C /0min./ → 160°C przyrost temp. 20 °C/min.
- * gaz nośny – hel 2.5cm³/min.
- * detektor: NPD, 250°C
- * komora nastrzykowa: 230°C
- * wypełnienie kolumny - Haye Sep Q

4.3.2. Wykonanie analizy metodą GC-TCD /użycie detektora przewodnictwa cieplnego – *thermal conductivity - detector*/

Po odważeniu 0,12037g KCN (0,05g HCN) przygotowano roztwór podstawowy poprzez jego rozpuszczenie w 10cm³ wody destylowanej. Roztwór podstawowy (5mg/cm³) rozcieńczano w odpowiednim stosunku wodą i do każdej z prób po umieszczeniu w fiołce

„headspace” dodano 10% H₂SO₄ w ilości 0,5cm³, w celu przeprowadzenia KCN w gazowy cyjanowodór zgodnie z reakcją:



Dla uzyskania krzywej kalibracyjnej przygotowano następujące rozcieńczenia roztworu podstawowego tabela 48.

Tabela 48 Rozcieńczenia roztworu podstawowego KCN

stężenie HCN w mg/cm ³	0,5	1	2	4
objętość roztworu podstawowego HCN (cm ³)	0,05	0,1	0,2	0,4
ilość wody destylowanej (cm ³)	0,45	0,4	0,3	0,1

Po wymieszaniu szczelnie zamkniętej fiolki reakcyjnej ogrzewając wraz ze strzykawką gazową w układzie termostatu temp. 70°C przez okres 5 min. i po wyjęciu, w czasie 10-20sek, wprowadzano mieszaninę gazową w obj. 0,5cm³ do komory nastrzykowej chromatografu.

4.3.2.1. Krzywa kalibracyjna

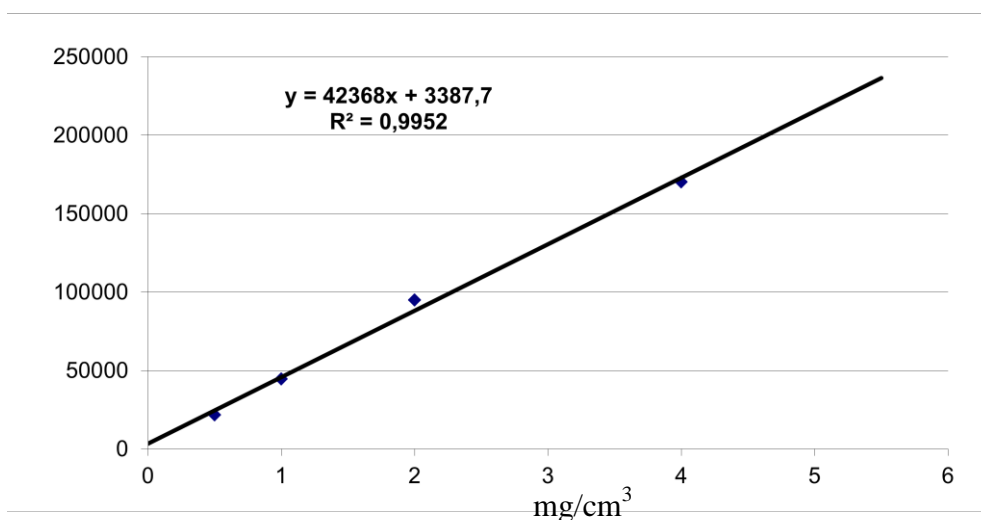
Z każdej fiolki redukcyjnej zawierającej 1cm³ mieszaniny pobrano 0,5cm³ par nad roztworu.

W celu zbadania powtarzalności oznaczenie uwalnianego cyjanowodoru z każdego roztworu wzorcowego wykonano po dwa nastrzyki. Uzyskano sukcesywnie proporcjonalnie zmienne wartości wskazań integratora dla zarejestrowanych pików na chromatogramie, co przedstawia tabela 49 oraz wykres kalibracyjny $w = f(c)$ rys 36.

Tabela 49 Wskazania integratora funkcją stężenia HCN

Stężenie HCN (mg/cm ³)	Wskazania integratora		
	1	2	\bar{X}
4	381951	365249	170149
2	287894	294776	94833
1	256309	246902	44584
0,5	155027	136914	21739

Rysunek 36 Wykres kalibracji $w = f(c)$



4.3.2.2. Ocena statystyczna parametrów uzyskanych metodą GC/TCD

Współczynnik korelacji r:

$$r = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{\sqrt{\left(\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n} \right) \left(\sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n} \right)}} = 0,997613$$

Odchylenie standardowe: sd

$$sd = \left(\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \right)^{\frac{1}{2}} = 65736$$

4.3.3. Wykonanie analizy metodą GC-NPD /użycie detektora azotowo-fosforowego - Nitrogen Phosphorus Detector/

W badaniach wykorzystano specyfikę detektora azotowo – fosforowego /NPD/ warunkującą najwyższą czułość i oznaczalność determinowaną obecnością atomu azotu w strukturze chemicznej analizowanego związku.

4.3.3.1. Wykonanie krzywej kalibracyjnej

W celu ustalenia zakresu kalibracji $P = f(c)$ sygnał parametru powierzchni na chromatogramie (P) funkcją stężenia (c), przygotowano odpowiednie roztwory wzorcowe /zakres 2.5 - 50µg/cm³/ przez odpowiednie rozcieńczenie podstawowego wodnego roztworu cyjanku potasu zawierającego 1mg HCN w 1cm³ o wzrastających stężeniach cyjanowodoru według następującego schematu tabela 50:

Tabela 50 Rozcieńczenia roztworu podstawowego KCN

Stężenie HCN w $\mu\text{g}/\text{cm}^3$	2,5	5,0	10	20	50
Objętość roztworu podstawowego HCN (cm^3)	0,025	0,05	0,10	0,20	0,50
Objętość wody (cm^3)	9,975	9,95	9,90	9,80	9,50

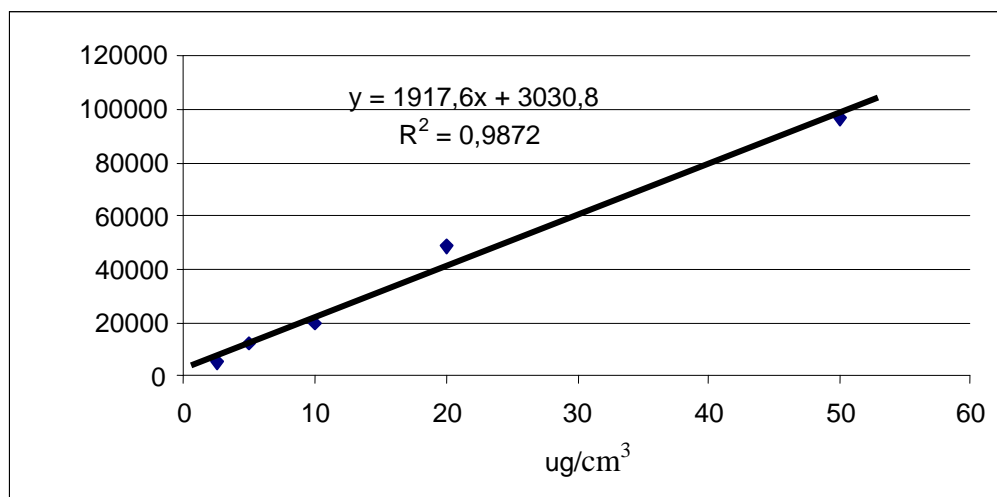
Krzywą kalibracyjną $A = f(c)$ dla metody chromatograficznej GC/NPD wykonano w oparciu o wyniki przygotowanych stężeń HCN przedstawionych w tabeli 51.

Tabela 51 Wyniki pomiarów wskazań integratora dla zróżnicowanych stężeń cyjanowodoru $\mu\text{g}/\text{ml}$

stężenie HCN w $\mu\text{g}/\text{ml}$	2,5	5,0	10	20	50
sygnał wskazań integratora	5350	12257	20004	48780	96551

W oparciu o uzyskane wartości wykreślona krzywą kalibracyjną rys 37 uwzględniając zależność $A = f(c)$

Rysunek 37 Krzywa kalibracyjna $A = f(c)$ dla oznaczenia HCN metodą chromatograficzną z użyciem detektora NPD



4.3.3.2. Ocena statystyczna

Analiza powtarzalności oznaczeń cyjanowodoru przy użyciu proponowanej metody dla ustalonego zakresu krzywej kalibracji wykazała odpowiednio:

$$\text{odchylenie standardowe wyniku pojedynczego } s = \sqrt{\frac{\sum / x - \bar{x} /}{n - 1}} = 3.2$$

procentowe względne odchylenie standardowe $sr = \sqrt{\frac{s * 100}{\bar{x}}} = 2.29$

odchylenie standardowe wyniku średniego $\bar{s} = \frac{s}{\sqrt{n}} = 1.43$

przedział ufności na poziomie prawdopodobieństwa 0.95

/t = 2.776 dla n = 5/

$\mu = \bar{x} \pm t \times \bar{s} /97.2\% \pm 3.96/$

Dokonana ocena statystyczna uzyskanych wyników wykazuje dużą odtwarzalność, a uzyskane wartości względnego odchylenia standardowego dla oznaczonego cyjanowodoru nie przekroczyłyby wartości 3%, typowej dla czułych instrumentalnych metod analitycznych.

4.3.4. Oznaczenia stężenia jonów CN⁻ w materiale sekcyjnym metodą spektrofotometryczną z odczynnikiem barbiturowo-pirydynowym.

Wykorzystując metodę spektrofotometryczną z odczynnikiem barbiturowo-pirydynowym dokonano oznaczeń stężeń jonów cyjankowych w materiale sekcyjnym osób podejrzanych o zatrucie. Przeprowadzone badania wykazały następujące wartości stężeń w materiale biologicznym.

Przypadek 1. Śmierć studenta z Nigerii /dot. spr. Ds. xxx/

<u>Przypadek 2.</u> T.J. /dot. spr.540/90 /:	krew	0.1 mg CN ⁻ /dm ³
	ociekлина z narządów	4,8 mg CN ⁻ /dm ³
	narządy /płuca, wątroba/	0.58 mg%

<u>Przypadek 3.</u> K.R. /dot. spr.393/90/:	krew	0.44 mg CN ⁻ /dm ³
	żółć	0.05 mg CN ⁻ /dm ³
	narządy /wątroba/	0.23 mg%

Przypadek 4. N.K. /dot. 181/11; 234/11; 251/11/: kobieta zażywająca biały proszek w celach samobójczych, krew pobrana w czasie przyjęcia do szpitala wykazała 10mg/dm³ cyjanków;

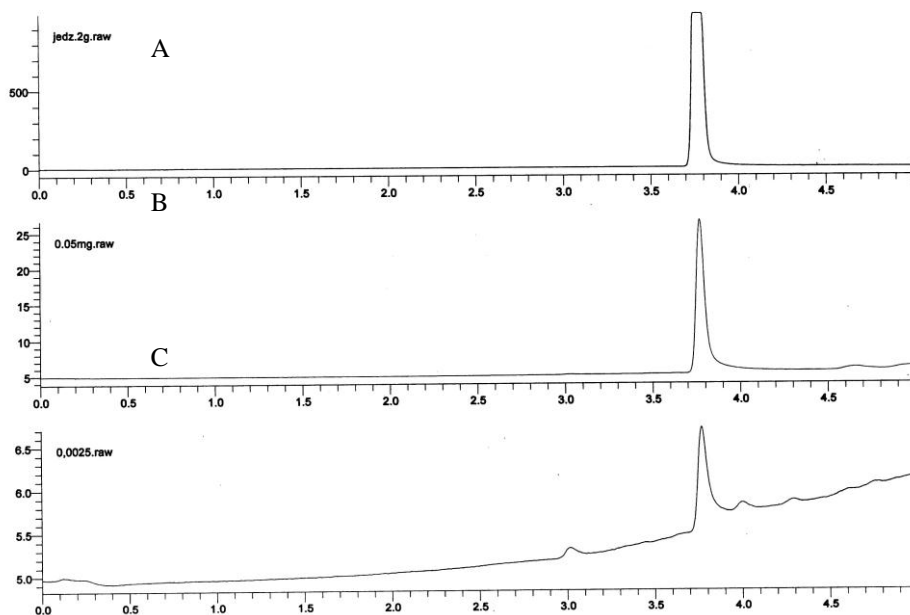
następnie pobierano próby krwi co 2godz. które nie wykazały obecności cyjanków na skutek prowadzonej skutecznej terapii hydroksykobalaminą, która łączy się z cząsteczkami cyjanku tworząc cyjanokobalaminę /wit. B₁₂/ wydalaną z moczem;

analiza materiału dowodowego – śladowe ilości białego proszku zabezpieczonego w dwóch woreczkach strunowych dotyczące zgonu w/w N.K. - potwierdziły obecność cyjanków

Przypadek 5. Poniżej przedstawiono analizę materiału dowodowego zabezpieczonego pokarmu z przelyku psa oraz dla porównania roztwory wzorcowe z górnego i dolnego zakresu krzywej kalibracyjnej / $50\mu\text{g}/\text{cm}^3$ HCN oraz $2.5\mu\text{g}/\text{cm}^3$ HCN/ rys 38.

Rysunek 38 Rozdział chromatograficzny /HCN/ metodą GLC/NPD

A – Analiza materiału dowodowego /pokarm zabezpieczony z przelyku psa/
Analiza roztworów wzorcowych: B - $50\mu\text{g}/\text{cm}^3$ HCN C – $2.5\mu\text{g}/\text{cm}^3$ HCN



5. Hipoksja – hipoksemia, niebezpieczna przyczyna zagrożenia życia

Hipoksja – niedotlenienie jest następstwem deficytu tlenowego tkanek żywego organizmu, spowodowanego najczęściej niewydolnością oddychania i krążenia krwi, potęgowanego znacząco niskim poziomem tlenu atmosferycznego < 15%. Niezależnie od charakterystycznych czynników implikujących hipoksję wynikające z przyczyn nagłych /zatrzymanie akcji serca i krążenia krwi, ostra niewydolność oddechowa/ kontrolowanych z medycyny ratunkowej, notowane są incydentalne przypadki śmierci nagłej z przyczyn bez chorobowych. Problem dotyczy następstw hipoksji oddechowej osób przebywających czasowo w warunkach obniżonego poziomu atmosferycznego tlenu i podwyższonego stężenia ditlenku węgla /okresowa, awaryjna penetracja i rewizja systemów ściekowych, opróżnianych szamb i pojemników sanitarno – produkcyjnych/. Podczas hospitalizacji osób z ostrą niewydolnością oddechową rozpoznaje się wyraźne obniżenie ciśnienia parcjalnego tlenu we krwi tętniczej /hipoksemia < 60mmHg/ przy wzrastającym ciśnieniu parcjalnym ditlenku /hiperkapnia > 50mmHg/, oraz postępująca kwasica wyrażająca się podwyższeniem stężenia we krwi jonów wodorowych pH < 7.4. Przedłużający się stan hipoksji na niekontrolowanych, niebezpiecznych stanowiskach pracy prowadzi do bezpowrotnego uszkodzenia mózgu, utratę właściwego zaopatrzenia tlenowego mięśnia sercowego, skutkującego jego zatrzymaniem i śmiercią. Właśnie takie przypadki śmierci nagłej, gwałtownej w następstwie hipoksji są przedmiotem badań medycyny i toksykologii sądowej, które w odróżnieniu od chorobowych mają inny wymiar diagnostyczny w ustaleniu mechanizmu i przyczyny śmierci. Jednym z przedstawionych postępowań diagnostycznych obiektywnej oceny „ex post” przyczyny śmierci ofiar z wskazaniem efektu hipoksji, przy ograniczonych możliwościach pośmiertnych badań tanatologicznych, może być obiektywna analiza jakościowo – ilościowa składu powietrza pomieszczeń użytkowych w których nastąpił zgon. Ustalenie poziomu tlenu i ditlenku węgla ewentualnie siarkowodoru czy innych związków egzogennych, w składzie powietrza użytkowego pomieszczenia w którym przebywały osoby poszkodowane, stanowić może jedno z najważniejszych postępowań diagnostycznych przyczyny śmierci.

Wielokierunkowy, rutynowy program postępowania na miejscu zdarzenia z udziałem specjalistycznych jednostek ratownictwa przeciw pożarowego wyposażonych w odpowiedni sprzęt kontrolno – pomiarowy, udział toksykologa sądowego w celu zabezpieczenia dodatkowo próbki powietrza dla celów chromatograficznej analizy jakościowo – ilościowej, stanowić może podstawowy standard właściwego działania w ustaleniu przyczyny zgonu. Zbyt późne działania decyzyjno-wykonawcze na miejscu zdarzenia, sprzyjają samoczynnym

zmianom postępującego wyrównawczego procesu równowagi fizykochemicznej składu powietrza atmosferycznego, które mogą całkowicie w sposób nieodwracalny ograniczyć obiektywną ocenę sytuacji, zbliżonej do okoliczności czasu zdarzenia.

Dla zachowania standardów rutynowego postępowania diagnostycznego na miejscu zdarzenia w przypadku śmierci nagłej gwałtownej z podejrzanym udziałem hipoksji, przedstawiono odpowiedni przypadek kazuistyczny notowany w ostatnim okresie.

5.1. Opis przypadku; okoliczności zdarzenia, niezbędne do wydania opinii:

W lipcu 2006r. na terenie zakładu spółki „ (...) -Kompost” wykonywano prace konserwacyjne systemu napowietrzającego w zbiorniku gnojowicy /rys. 39/. Zbiornik ten, o głębokości ok. 3m, umieszczony jest w wykopie, poniżej linii gruntu . Około godziny 13⁰⁰ do zbiornika tego wszedł jeden z pracowników w celu zamontowania uszczelki w pompie znajdującej się na jego dnie. Awarii uległ wentylator napowietrzający zbiornik gnojowicy /rys. 40/. Po chwili pracownik ten zasłabł i spadł z trzeciego szczebla drabiny, po której miał zejść na dno zbiornika. Na pomoc temu pracownikowi przyszli inni koledzy, którzy również doznali zapaści w czasie akcji ratunkowej. W wyniku kontaktu z gazem zalegającym w zbiorniku śmierć ponieśli dwie osoby, natomiast trzech inni zostali przewiezieni do szpitala z objawami bliżej nieokreślonej dysfunkcji centralnego układu nerwowego.

Rysunek 39 Dokumentacja dotycząca zbiornika gnojowicy o głębokości ok. 3m.



Rysunek 40 Dokumentacja – pracy wentylatora napowietrzającego zbiornik gnojowicy.



5.2. Metody badawcze – zakres wykonywanych badań diagnostycznych

Zgodnie z postanowieniem Organów postępowania przygotowawczego /Ds. xxx. /2006/, bezpośrednio na miejscu zdarzenia zabezpieczono ciecisz w dwóch plastikowych pojemnikach ze zbiorniku gnojowicy, z którego ujawniono ofiary wypadku. Przeprowadzone badania gazu nad powierzchnią cieczy dostarczonej w dwóch plastikowych pojemnikach nr 1 i nr 2 do Zakładu Medycyny Sądowej w Poznaniu wykonano metodą chromatografii gazowej techniką „headspace” z użyciem detektora przewodnictwa cieplnego /TCD/. Analizę wykonano zgodnie z wcześniej opisanymi metodami /2.4.4. 2.4.5./ używając dwóch różnych wypełnień: HAYE SEP Q /tabela 52/ do analizy lotnych związków nieorganicznych o charakterze bezwodników kwasowych /dwutlenek węgla - CO₂, dwutlenek siarki - SO₂, dwutlenek azotu - NO₂/, kwasów /siarkowodór - H₂S, cyjanowodór - HCN/ jak również wody; oraz na wypełnieniu Sito Molekularne 5A /tabela 53/ do analizy związków obojętnych /tlenek węgla - CO, tlen - O₂, azot - N₂, metan - CH₄/.

Tabela 52 Analiza gazu z nad cieczy zabezpieczonej w plastikowych pojemnikach nr 1 i 2 na wypełnieniu HAYE SEP Q w przeliczeniu na zawartość procentową /%/:

analizowany składnik	powietrze pobrane w pracowni chemiczno-toksykologicznej	gaz z nad cieczy pojemnik nr 1	gaz z nad cieczy pojemnik nr 2
powietrze - N ₂ , O ₂	98.4%	75%	73.7%
metan - CH ₄	-	5.1%	4.4%
dwutlenek węgla - CO ₂	0.1%	14.5%	14.1%
para wodna - H ₂ O	1.5%	3.4%	5.9%
siarkowodór - H ₂ S	-	2%	1.9%

Tabela 53 Analiza gazu z nad cieczy zabezpieczonej w plastikowych pojemnikach nr 1 i 2 na wypełnieniu Sito Molekularne 5A w przeliczeniu na zawartość procentową /%/:

analizowany składnik	powietrze pobrane w pracowni chemiczno-toksykologicznej	gaz z nad cieczy pojemnik nr 1	gaz z nad cieczy pojemnik nr 2
tlen - O ₂	20.99%	1.57%	1.44%
Azot - N ₂	79.01	90.86%	91.65%
metan - CH ₄	-	7.57%	6.91%

Zgodnie z deklaracją technologiczną producenta biomasy użytkowej dla celów ogrodniczych w zachodzących procesach fermentacji sprzyjającej biodegradacji substratów następuje w warunkach zróżnicowanego stopnia dotleniania /napowietrzania/ w celu wyeliminowania beztlenowej fermentacji białka /prowadzącego do powstawania toksycznego i uciążliwego siarkowodoru - H₂S/. Następnie, kolejny proces pasteryzacji jest kontrolowany z użyciem odpowiedniego sterującego oprogramowania komputerowego regulującego utrzymanie odpowiednich parametrów temperatury i ilości tlenu koniecznych do utrzymania optymalnego przebiegu procesu wraz z monitoringiem zawartości amoniaku są przeprowadzane zgodnie z w/w deklaracją producenta.

5.3. Interpretacyjne aspekty przyczynowo – skutkowe zdarzenia

Przeprowadzone sądowno – lekarskie pośmiertne badania tanatologiczne /ogłędziny zewnętrzne i wewnętrzne ofiar zdarzenia nie pozwoliły na wykazanie specyficznych symptomów śmierci z wskazaniem czynników chorobowych. W ocenie ogólnej zdarzenia badania toksykologiczne nie wykazały obecności alkoholu etylowego oraz innych lotnych związków organicznych /chromatografia gazowa techniką „headspace”/. W rutynowym postępowaniu sądowno – lekarskim nie udało się wskazać innych charakterystycznych wykładników zmian somatycznych narządów i tkanek, które można by przypisać czynnikom

zewnątrznym. Z tego też względu w kompleksowej sądowno – lekarskiej i toksykologicznej ekspertyzie prowadzonej do ustalenia przyczyny śmierci uwzględniono wyniki badań materiału dowodowego zabezpieczonego na miejscu zdarzenia. Wśród interdyscyplinarnych ocen uwzględniono specyfikę składu powietrza atmosferycznego w której przebywały ofiary. Zwrócono uwagę na sytuację zagrożenia życia z udziałem zauważonego deficytu tlenowego przy obecności dodatkowych ksenobiotyków w układzie niebezpiecznej interakcji. Wśród przyczyn implikujących mechanizm śmierci uwzględniono udział:

Tlen O₂: Brak tlenu w powietrzu powoduje rozwijające się niedotlenienie i zamartwicę. Szybkość narastania tych objawów zależy od stężenia tlenu w powietrzu. W stężeniu granicznym 16% tlenu w powietrzu nasycenie hemoglobiny tlenem jest jeszcze pełne i wynosi ok. 95% HbO₂. W mniejszym stężeniu objawy głodu tlenowego rozwijają się niebezpiecznie szybko. Rozróżnia się 4 stadia niedoboru tlenu /anoksja/ we krwi co przedstawiono wcześniej w /tabeli 13/.

Siarkowodor H₂S: powstaje m.in. w procesach rozkładu gnilnego związków organicznych, łatwo wchłania się przez płuca, powodujący zaburzenia, a czasami nawet porażenie oddychania wewnątrzkomórkowego. Siarkowodor w większych stężeniach > 150mg/m³ działa bardzo gwałtownie, następuje nagłe zatrzymanie oddechu, utrata przytomności, śmierć wskutek uduszenia następuje w ciągu kilku minut. W mniejszych stężeniach w zależności od stężenia siarkowodoru występuje działanie drażniące błony śluzowe dróg oddechowych, powodujące napady kaszlu, zmiany zapalne i nieżyty, a także podrażnienie spojówek.

Amoniak NH₃: bezbarwny gaz o charakterystycznym ostrym zapachu /działający ostrzegawczo/, powstaje jako produkt redukcji związków azotowych oraz w procesach gnilnych roślin i zwierząt. Amoniak wchłania się głównie z dróg oddechowych. W większych stężeniach w zetknięciu z wilgotną powierzchnią błon śluzowych tworzy wodorotlenek amonowy o silnym działaniu żrącym, wywołujący nieżyt oskrzeli, a w ostrych zatruciach obrzęk płuc, skutkiem działania jest silny kaszel, plwocina śluzowa lub krwawa, objawy duszności, sinica. W ciężkich przypadkach > 28mg/m³ rozwija się odoskrzelowe zapalenie płuc, obrzęk głośni, porażenie ośrodka oddechowego, niewydolność krążenia, co prowadzi do śmierci.

Metan - CH₄: znany także jako gaz błotny i gaz kopalniany to najprostszy węglowodór nasycony (alkan). W temperaturze pokojowej jest bezwonnym i bezbarwnym gazem. Metan powstaje w przyrodzie w wyniku beztlenowego rozkładu szczątków roślinnych (np. na bagnach). Stanowi też główny składnik gazu ziemnego. Metan wchłania się głównie przez płuca i tą drogą może wywołać objawy ogólnego zatrucia. Efekt działania toksycznego

objawia się postępującą sinicą, drgawkami, utratą przytomności a nawet śmiercią przy znacznych stężeniach /przypadki erupcji systemów eksploatacji gazu ziemnego/. Mechanizm zatrucia dotyczy działania depresyjnego na ośrodkowy układ nerwowy /OUN/ - typowego dla lotnych wziewnych narkotyków /zatrzymanie ośrodka naczyniowo – ruchowego/.

Dytlenek węgla CO₂: bezbarwny, bezwonny i niepalny gaz. Jest dobrze rozpuszczalny w wodzie i cięższy od powietrza (ok. 1,5 razy). W naturze występuje w stanie wolnym w atmosferze i związanym (głównie jako składnik CaCO₃). Dwutlenek węgla jest produktem spalania i oddychania. Jest wykorzystywany przez rośliny w procesie fotosyntezy. Tworzy się przy utlenianiu i fermentacji substancji organicznych występuje m.in. studzienkach kanalizacyjnych. W małych stężeniach nie jest trujący, w większych stężeniach dwutlenek węgla jest szkodliwy dla zdrowia a nawet zabójczy, a jego działanie powoduje powstawanie hiperkapni /podwyższone ciśnienie parcjalne dwutlenku węgla (pCO₂) we krwi/, a co za tym idzie kwasicy oddechowej i w następstwie obrzęku mózgu, stężenie > 12% w powietrzu powoduje natychmiastową śmierć.

W diskutowanym przypadku w zbiorniku gnojowicy, w którym pracownicy wykonywali prace konserwacyjne w celu zamontowania uszczelki zachodziły intensywne procesy fermentacji w układzie statycznym przy braku napowietrzania tego pomieszczenia lub jego niedostatecznym napowietrzeniem co spowodowało powstanie siarkowodoru - H₂S /fermentacja beztlenowa/, powstanie amoniaku NH₃, metanu - CH₄, nagromadzenie dwutlenek węgla - CO₂, jednak decydującym czynnikiem śmierci nagłej, gwałtownej był znaczący spadek tlenu O₂ w atmosferze diskutowanego pomieszczenia.

W kompleksowej ocenie ustalone zakresy stężeń komponentów gazowych powietrza użytkowego w pomieszczeniach gospodarczo – produkcyjnych stwarzały warunki zagrożenia życia i im należy przypisać znaczący udział w mechanizmie śmierci nagłej gwałtownej opisanego zdarzenia i innych podobnych.

6 Omówienie i dyskusja wyników badań

Aktualne zapotrzebowania metodyczne nowoczesnej toksykologii sądowej w zakresie wykrywalności i oznaczalności ksenobiotyków wynikają z wymogów prowadzenia wiarygodnej naukowej interpretacji oddziaływań toksycznych, ustalonych często dla skomplikowanych mechanizmów zatruc.

Potrzeba rozwiązywania kompleksowych analitycznych problemów toksykologii sądowej zaznaczyła się szczególnie w ostatnim dziesięcioleciu, dotyczyła głównie leków oraz najbardziej niebezpiecznej grupy związków psychoaktywnych i nie obejmowała klasycznych trucizn lotnych tlenku i ditlenku węgla, cyjanowodoru, siarkowodoru czy efektów następstw deficytu tlenowego implikującego nagłą, groźną hipoksję.

Cel utylitarny pracy zwraca uwagę na zasadność doboru i stosowania odpowiednich selektywnych i specyficznych metod i technik analitycznej toksykologii w analizie lotnych trucizn nieorganicznych ale również podkreśla złożoność zagadnień interpretacyjnych w wyjaśnieniu mechanizmu śmierci nagłej. Konfrontacja wyników badań własnych z dotychczasowymi możliwościami badawczymi pozwoliła na przybliżenie standardów całościowego postępowania diagnostycznego dla tej grupy związków, niezbędnego w kompleksowym i obiektywnym opiniodawstwie sądowym.

W grupie zagadnień praktycznej toksykologii stosowanej ostatnich lat, zwrócono uwagę na złożone problemy opiniodawcze m.in. dotyczące interpretacji mechanizmu śmierci nagłej przypadków ofiar pożarów. Biegły dla tych przypadków śmierci powinien wziąć pod uwagę całościowy układ przyczynowo – skutkowy tj. następstwa termicznego działania ognia, uduszenia wskutek braku tlenu, zatrucie gazami spalinowymi tj. tlenkiem węgla i produktami rozkładu termicznego tworzyw sztucznych w tym związkami cyjanowymi (12). Niezależnie, w interpretacji przyczyny śmierci należy uwzględnić zawsze udział zaburzeń towarzyszących, głównie krążeniowo-oddechowych, ewentualnie rozległość oparzeń i obrażeń mechanicznych – urazów, co wynika zawsze z interdyscyplinarnego charakteru opinii toksykologiczno – lekarskiej.

Rutynowe, często stosowane niespecyficzne i czasochłonne metody analityczne, dotyczące diagnostyki chemicznej zatruc tą grupą związków, oparte są najczęściej na zasadach spektrofotometrii w zakresie widzialnym (13), (14), (15) obarczonych zawsze bliżej niedających się określić efektami niespecyficznych interferencji, co w przypadku śmierci nagłej wymaga zawsze dodatkowego potwierdzenia inną niezależną techniką badawczą. Alternatywna analityczna ocena potwierdzająca obecność czynnika sprawczego każdego przypadku niebezpiecznej intoksykacji ze skutkiem śmiertelnym dodatkową metodą

specyficzną ma wymiar standardowych wymogów współczesnej toksykologii sądowej, regulowanych wytycznymi Światowej Federacji Toksykologów Sądowych /TIAFT/.

Użycie w diagnostyce toksykologicznej krwi osób podejrzanych o zatrucie tlenkiem węgla, bardziej uniwersalnych urządzeń pomiarowych typu CO-oksymetr /równoczesny pomiar spektrofotometryczny przy kilku długościach analitycznych fal pomiarowych/ z możliwością analizy różnych postaci hemoglobiny nie zawsze jest wystarczające do pełnej, obiektywnej interpretacji i jak dotychczas nie znajduje jeszcze szerszego zastosowania laboratoryjno – diagnostycznego również ze względów ekonomicznych.

Dostępne dane piśmiennictwa (15), (16), (17) wskazują na ograniczone zainteresowanie i wykorzystanie potencjału badawczego powszechnie dostępnej techniki chromatografii gazowej w analizie nieorganicznych trucizn lotnych w materiale biologicznym, co zadecydowało m.in. o jej sprawdzeniu w zasadniczym wyborze metodycznym w proponowanym kierunku badań analitycznych. Wybór tej techniki analitycznej dla rutynowych badań toksykologicznych lotnych trucizn nieorganicznych wydawał się tym bardziej uzasadniony, nie tylko z uwagi na ich charakter fizykochemiczny /układ gazowy w temperaturze pokojowej/ ale przede wszystkim na stworzenie alternatywnej możliwości wykonawczej tzw. standardowej metody potwierdzającej. Użycie tej metody jako alternatywy dla nie w pełni specyficznych metod spektrofotometrycznych spełnić może oczekiwane proceduralne wymagania diagnostyczne.

Możliwości badawcze z wykorzystaniem chromatografii gazowej w diagnostyce lotnych trucizn nieorganicznych w materiale biologicznym i dowodowym są determinowane doбором optymalnych warunków rozdzielczych oraz wyborem odpowiednich systemów detekcyjnych. Zaproponowany uniwersalny układ dwóch niezależnych kolumn rozdzielczych pozwala na równoczesną analizę związków o charakterze kwasowym /CO₂, H₂S, HCN/ na standardowej kolumnie z wypełnieniem Haye Sep Q oraz związków obojętnych /CO, CH₄/, składników powietrza O₂, N₂, na sicie molekularnym 5A. Sprawdzony system rozdzielczy „dual” pozwala na równoczesną analizę wszystkich wybranych związków stanowiących bezpośrednie jak i pośrednie niebezpieczeństwo zdrowia i życia osób poddanych ekspozycji względnie przebywających w warunkach restrykcyjnego deficytu tlenowego, bądź podwyższonego stężenia ditlenku węgla. Drugim istotnym elementem chromatograficznego układu analitycznego jest dobór odpowiedniego systemu detekcji, specyficznej dla lotnych związków nieorganicznych. Wśród istniejących w tym względzie możliwości, należy wskazać na korzystne użycie detektora azotowego NPD/AFID pozwalającego na analizę jakościowo-ilościową związków lotnych zawierających atom azotu w cząsteczce /HCN/ oraz

uniwersalnego w tym przypadku detektora przewodnictwa cieplnego – katarometru /TCD/ umożliwiającego wykrycie zarówno związku organicznego m.in. metanu/ jak i pozostałych związków nieorganicznych /CO, CO₂, H₂O, HCN, H₂S/. Praktyczne użycie podstawowego detektora chromatografii gazowej płomieniowo – jonizacyjnego /FID/ w analizie lotnych związków nieorganicznych dotyczy wyłącznie tlenku węgla, który wymaga wstępnego przekształcenia w zredukowaną postać metanu, przy użyciu dodatkowego urządzenia tzw. metanizera. Pośrednia analiza uwolnionego tlenku węgla z materiału biologicznego /krew/ czy też jego bezpośrednia analiza w próbce powietrza badanego na miejscu odbytej ekspozycji ofiary ogranicza w tym względzie możliwość ustalenia stężenia metanu – jako niezależnego czynnika sprawczego, towarzyszącego często zatruciu tlenkiem węgla.

Ważnym kryterium decyzyjnym użycia metod chromatografii gazowej jest niewątpliwie właściwy dobór detektora. Wśród wymienionych już możliwości, najwyższe parametry oznaczalności w kolejności użycia wykazują NPD /10⁻¹¹/, FID /10⁻⁸/, TCD /10⁻⁵/, niezależnie od ich specyficzności. Wymienione ważne parametry detekcji czułość, oznaczalność są zawsze wyjątkowo ważne w analitycznej toksykologii, jednakże notowane sprawcze stężenia toksykokinetyczne badanych lotnych związków nieorganicznych w materiale biologicznym wielu przypadków zatruc pozwala na możliwości alternatywnego użycia dowolnego detektora w zależności od wyposażenia laboratorium. Decyzyjne kryterium wyboru chromatograficznej metody potwierdzającej, niezależnie od powszechnie akceptowalnych metod spektrofotometrycznych, stanowić może podstawę obiektywnej oceny przyczynowo – skutkowej wielu niebezpiecznych ekspozycji notowanych każdego roku, grupą lotnych ksenobiotyków.

Podstawą akceptacji każdej metody analitycznej przydatnej dla celów rutynowych toksykologicznych badań laboratoryjnych jest jej specyficzność, oznaczalność, zakres detekcji /czułość/, powtarzalność oraz coraz bardziej znaczące względy ekonomiczne.

Przeprowadzone badania dotyczyły kompleksowej oceny przydatności analitycznych metod wykrywania i oznaczania lotnych związków nieorganicznych tj. tlenku węgla w układzie generacji karboksyhemoglobiny /COHb/, cyjanowodoru oraz siarkowodoru w zróżnicowanym materiale biologicznym w warunkach przebiegu intoksykacji.

Wykonane badania uwzględniły ocenę przydatności metody chromatografii gazowej z wykorzystaniem techniki „headspace” w analizie karboksyhemoglobiny, cyjanowodoru czy siarkowodoru z innymi metodami analitycznymi w tym spektrofotometrycznymi.

Jak wcześniej przedstawiono dużą zaletą metody chromatografii gazowej z wykorzystaniem techniki „headspace” jest możliwość równoczesnego oznaczania CO i HCN dzięki zainstalowaniu w systemie rozdzielczym chromatografu dwóch kolumn

z różnym wypełnieniem: Haye Sep Q i sita molekularnego 5A. Użycie dwóch rodzajów adsorbentów jest konieczne z uwagi na zróżnicowany charakter chemiczny kwasowo – zasadowy rozdzielanych ksenobiotyków i użytych wypełnień chromatograficznych. Stosując wypełnienie sito molekularne 5A możemy analizować związki o charakterze obojętnym (CO) oraz komponenty powietrza atmosferycznego (N₂, O₂), natomiast przy użyciu wypełnienia Haye Sep Q oznaczamy z powodzeniem związki o charakterze kwaśnym (HCN, H₂S, CO₂).

Mając na uwadze wyżej wspomniane zalety proponowanych metod możemy równocześnie badać próbkę krwi osoby podejrzanej o zatrucie tlenkiem węgla z towarzyszącą intoksykacją cyjanowodorem, nastrzykując odpowiednio przygotowane mieszaniny gazowe w układzie dwóch kolumn chromatograficznych zmieniając tylko parametry analityczne pracy chromatografu.

Metoda ta charakteryzuje się dużą uniwersalnością, łatwością wykonania oraz jak potwierdziły badania statystyczne nie jest obciążona dużym błędem wykonawczym. Podkreślić też należy, że prowadząc równoległe porównawcze, ukierunkowane wysycenie próbek krwi tlenkiem węgla pozwala na indywidualną i obiektywną ocenę stopnia zatrucia.

Przy wykonywaniu analizy chromatograficznej po wstępnym wysyceniu krwi tlenkiem węgla, należy zawsze pamiętać o niezbędnej eliminacji niezwiązanego tlenku węgla, który może zawyżać wynik. Jeśli przestrzegane są dokładnie warunki pracy chromatografu, z użyciem detektora TCD to metoda nie kryje żadnych niedogodności wykonawczych.

Uzyskane wyniki badań oraz ich ocena statystyczna pozwoliły wskazać najbardziej właściwe i optymalne postępowanie metodyczne, przydatne w rutynowej analizie tlenku węgla w toksykologii sądowej i klinicznej.

Przeprowadzone kompleksowe badania porównawcze dla oznaczania proponowanymi metodami karboksyhemoglobiny, biochemicznego markera odbytej ekspozycji tlenkiem węgla, którego udział stanowi drugą pozycję po alkoholu w kazuistyce śmiertelnych zatruc w medycynie sądowej /ok. 13% udziału/. Weryfikacja wartości użytkowej metod oznaczania COHb w wybranych losowo 23 przypadków zatruc wykonanych metoda chromatografii gazowej GC-TCD techniką „headspace”, przy użyciu klasycznych metod spektrofotometrycznych – metoda Wolfa i jej własnej modyfikacji uwzględniającej udział osobniczego poziomu hemoglobiny oraz uniwersalnej metody z użyciem hemooksymetru OSM-3 wskazuje na ich kompatybilną, porównawczą zależność badanych parametrów statystycznych. Statystyka opisowa wyników oznaczeń /tab. 32/ wyrażonej parametrem mediany wskazuje na wysoką porównywalną zależność wyników generowanych metodą GC/TCD /19/ jak i przy użyciu hemooksymetru /18/, oraz ich zakresu czułości wartości niskich i maksymalnych, co graficznie odzwierciedla wykres konwergencji /Rys. 28/. Ciekawe zależności porównawcze wyników oznaczeń COHb uzyskano podczas oceny proponowanej metody GC z pozostałymi metodami spektrofotometrycznymi.

Przeprowadzony test nieparametryczny Wilcoxon na poszczególnych parach zmiennych /tab. 37/ wskazuje na równowartość metody GC i hemooksymetrycznej, wskazuje na brak różnic wartości $p = 0.3304$ z $p < ,05000$ oraz parametry korelacji $r = 0.9732$.

W przeprowadzonych badaniach z zakresu rutynowej diagnostyki chemicznej zatruc tlenkiem węgla zwrócono dodatkowo uwagę na stabilność układu COHb w zabezpieczonych próbkach krwi przeznaczonych do analizy ilościowej. Wykonane badania własne potwierdziły wcześniejsze informacje (92) wskazujące na konieczność niezwłocznego przechowywania zabezpieczonych próbek krwi standardowych warunkach temperaturowych $\pm 5^{\circ}\text{C}$ warunkującą jej długotrwałą stabilność w ciągu nawet jednego roku (92). Niewłaściwe warunki przechowywania próbek krwi zawierających COHb, najczęściej w temperaturze pokojowej $\pm 20^{\circ}\text{C}$ powodują ich szybką biodegradację, który już po czasie 10 dni może wykazać spadek pierwotnego stężenia o 50%. Podwyższona niestabilność COHb stanowi w tym przypadku ważny problem diagnostyczny – interpretacyjny, który może być rozwiązany po uwzględnieniu niezamierzonego efektu samo degradacji COHb w warunkach niewłaściwego jej przechowywania od momentu pobrania, zatem analiza krwi powinna nastąpić w możliwie najkrótszym czasie od jej zabezpieczenia.

W praktyce toksykologii klinicznej oraz w opiniodawstwie sądowo – lekarskim i toksykologicznym ocena narażenia na substancje lotne m.in. tlenku węgla obecnych w powietrzu użytkowym i w pomieszczeniach przeznaczonych na pobyt stały sprawdza się do porównania stężeń substancji zmierzonych ze stężeniami tej substancji uznanymi za dopuszczalne. Układem odniesienia jest w tym przypadku tzw. Najwyższe Dopuszczalne Stężenie – NDS jak również Najwyższe Dopuszczalne Stężenie Chwilowe – NDSCh. Ocena narażenia na tlenek węgla oparta na systemie NDS ($30\text{mgCO}/\text{m}^3$) – możliwość ekspozycji w czasie dopuszczalnym 8 godzin, lub NDSCh ($180\text{mgCO}/\text{m}^3$) nie może występować dłużej niż 15 minut i ma wymiar odniesienia progowego. Problem opiniodawczy dotyczy wielu przypadków osób narażonych na ekspozycję tlenkiem węgla, który można w warunkach pomiarów bezpośrednich tj. określenie emisji na miejscu zdarzenia /użycie czujników typu GasHunter /GH.1.5/ czy MX-8 firmy Alter, MSA Titan lub SOLARIS MSA/ lub pośrednich /metoda GC-TCD/ po wstępnym zabezpieczeniu próbek powietrza przy użyciu specjalnie do tego przeznaczonych worków foliowych z zaworem automatycznego pobrania próbki firmy Supelco. Jak dotychczas w dostępnym piśmiennictwie (95) wykazano jedynie, że relacja stężenia emisji tlenku węgla w powietrzu wdychanym 50, 100, 200ppm odpowiadają przybliżonemu poziomowi COHb 8, 16 i 30% oraz ustalono wartości biologicznego czasu półtrwania COHb w warunkach ciśnienia atmosferycznego tlenu $T_{1/2} = 4 - 5$ godz. Przydatność diagnostyczna chromatografii gazowej /GC-TCD/ w tym zakresie wydaje się być niekwestionowana, bowiem w tym samych warunkach metodycznych można równocześnie określić efekt emisji tlenku węgla jak i jego biomarker hematologiczny – poziom karboksyhemoglobiny we krwi osoby poddanej ekspozycji.

W grupie innych znaczących czynników interferencyjnych wyjaśniających przypadki, m.in. fakt śmierci jednej osoby i przeżycia drugiej poddanych ekspozycji tlenkiem węgla w tych samych pomieszczeniach należy uwzględnić dodatkowo.

- Udział czynnika biologicznego – zaobserwowano różnice wrażliwość działania toksycznego, ludzie młodzi są bardziej wrażliwi niż starsi. Osoby z chorobami dróg oddechowych czy układu krążenia również wykazują większą wrażliwość na działanie tlenu węgla (11).
- Zróżnicowana indywidualnie objętość krwi, mioglobiny uwarunkowana masą ciała osób zatrutych, związanych z przekroczeniem granicznych wartości poziomu karboksyhemoglobiny ($\pm 50\%$ osłabienie, porażenie mięśni kończyn, $>60\%$ zagrożenie życia).
- Udział postępującej samoczynnej detoksykacji osoby zatrutej tlenem powietrza atmosferycznego $/\pm 21\% \text{ O}_2/$ sprzyjają sukcesywnemu obniżeniu się poziomu karboksyhemoglobiny zgodnie z parametrem farmakokinetycznym czasu półtrwania $/T_{1/2}$ 4-5 godz./, sprzyjającej przeżyciu.

W przypadku hospitalizacji, przydatnymi w opiniodawstwie sądowo – lekarskim elementami diagnostycznymi stanu klinicznego pacjenta są opisowe symptomy zatrucia dla określonego poziomu karboksyhemoglobiny oraz wymienione wcześniej, inne biochemiczne wykładniki działania tlenu węgla /podwyższone poziomy glukozy, potasu, dehydrogenazy mleczanowej, leukocytów, ALAT, ASPAT/.

Proponowane metody analityczne tlenu węgla, karboksyhemoglobiny z wykorzystaniem obok metod spektrofotometrycznych, potwierdzającej chromatografii gazowej /GC-TCD/ przeznaczonej dla celów rutynowej diagnostyki charakteryzują się wysoką specyficnością oraz wystarczającą czułością adekwatną do istniejących zapotrzebowań praktycznych.

Problem zatruc cyjankami w toksykologii sądowej sprowadza się głównie do oceny efektu działania cyjanowodoru, który wchłania się do krwioobiegu po uprzednim uwolnieniu się w środowisku kwaśnym żołądka najczęściej po zażyciu rozmyślnym lub przypadkowym jego soli potasowej czy sodowej. Niezależnie od powyższych notowań, należy wskazać na obecność cyjanowodoru jako znaczącego składnika emisji atmosferycznej obok tlenu węgla, uwalnianych podczas pożarów pomieszczeń użytkowych wyposażonych w elementy tworzyw sztucznych grupy amino i amidoplastów, jak również na stanowiskach pracy /galwanoplastyka, synteza przemysłowa i laboratoryjna/.

Wysoka toksyczność cyjanowodoru determinująca stosunkowo niski zakres jego stężeń w materiale biologicznym, czy niebezpiecznych poziomów w potencjalnie zagrożonych pomieszczeniach użytkowych m.in. podczas pożarów wymagają odpowiednich metod analitycznych.

W ocenie poziomu stężenia cyjanowodoru w materiale biologicznym /krew/ przydatną i wystarczającą metodą okazała się metoda spektrofotometryczna w zakresie widzialnym z odczynnikiem barbiturowo-pirydynowym, która to pozwala na ocenę poziomu intoksykacji cyjanowodoremi w przypadkach zatruczeń śmiertelnych. Sprawdzony użytkowy zakres kalibracyjny metody spektrofotometrycznej z wysokim parametrem współczynnika korelacji $A_b = f(c) \rightarrow R^2 = 0.99$ dla specyficznego oznaczania cyjanków w materiale biologicznym /0.1 – 5mg/L/ należy uznać za wystarczający dla oceny najczęściej notowanych przypadków zatruczeń klinicznych i śmiertelnych. Ustalone eksperymentalne parametry czasowe i temperaturowe analitycznego procesu dyfuzji cyjanowodoru są istotne dla uzyskiwania wysokiej powtarzalności wyników badań. Potwierdzeniem tego stwierdzenia są wyniki przeprowadzonej analizy statystycznej /tab. 47/ wykonane dla całego zakresu stężeń kalibracyjnych z niskim parametrem W_z współczynnika zmienności procentowego odchylenia standardowego $W_z\% = /0.85-2.96\%/$, które pozwala uznać tą metodę jako użyteczną w rutynowych badaniach zatruczeń cyjankami w toksykologii klinicznej i sądowej.

W poszukiwaniu alternatywnej standardowej metody potwierdzającej oznaczenia cyjanków w postaci cyjanowodoru konsekwentnie wykorzystano metodę chromatografii gazowej. Metoda ta z użyciem detektora przewodnictwa cieplnego GC-TCD jest wystarczającą metodą do oceny poziomu stężenia HCN w materiale dowodowym jednak niewystarczająco czuła dla oceny jego stężenia w materiale biologicznym. Niezależnie od wystarczającej przydatności analitycznej dla celów jakościowych, wysokiego parametru korelacji wskazania sygnału detektora TCD jako funkcji stężenia / $R = 0.99$ /, sprawdzony zakres kalibracji stężeniowej /0.5 – 4g/L/ okazuje się mało przydatny dla celów badań klinicznych, czy toksykologiczno – sądowych i wymaga użycia bardziej czułego detektora.

Zdecydowanie bezkonkurencyjną okazała się metoda chromatografii gazowej z użyciem selektywnego detektora NPD /detektor termojonowy – *nitrogen-phosphorus detector*/, która okazała się metodą wystarczająco czułą, selektywną i specyficzną w oznaczaniu cyjanowodoru. Pozwala ona na ocenę zakresu stężenia HCN /1 - 50mg/L/ zarówno w materiale biologicznym, dowodowym jak i na ocenę jego stężenia w atmosferze pomieszczeń użytkowych.

Ocena parametru oznaczalności /mg/L/ oraz wysoka odtwarzalność wyrażona niską wartością procentowego względnego odchylenia standardowego $s_r = 2.29$ czyni metodę chromatografii z użyciem detektora NPD jako odpowiednią alternatywę dla bardziej skomplikowanej ale i czulszej specyficznej metody spektrofotometrycznej.

W ocenie doboru najbardziej właściwego materiału sekcyjnego do badań toksykologicznych, wykonano odpowiedni eksperyment. Rozmieszczenie cyjanków w poszczególnych narządach i płynach ustrojowych dokonano poprzez określenie ich poziomów po eksperymentalnej śmierci zwierząt, we krwi oraz narządach wewnętrznych /wątroba, mózg, nerki, mięsień uda/. Wyniki analizy ilościowej cyjanowodoru uwolnionego z krwi i narządów szczura wykazały jednoznacznie, że najbardziej właściwym materiałem do oceny poziomu intoksykacji cyjanowodorem jest krew, jednak w przypadku obiektywnych trudności z pobraniem tego materiału, do oceny intoksykacji tym ksenobiotykiem można pobrać alternatywnie inny materiał biologiczny /wątroba, mózg, nerki/.

Parametry oznaczalności dla rutynowego wykorzystania obu metod analitycznych wskazuje jednoznacznie na priorytetowe wykorzystanie metody spektrofotometrycznej, która pozwala na ilościową ocenę cyjanków w materiale bionicznym /krew/ zarówno przypadków zatruc klinicznych /kontrola toksykologiczna monitorowanej detoksykacji/ jak i śmiertelnych notowanych w toksykologii sądowej.

Niezależnie od powyższego stwierdzenia należy uznać metodę chromatografii z użyciem detektora NPD i TCD jako jedyną alternatywę metody potwierdzającej w badaniach toksykologiczno – sądowych.

Zatrucia siarkowodorem są przypisane najczęściej notowanym przypadkom śmierci nagłej w pomieszczeniach kanałów ściekowych, dołach kloacznych, studzienkach rewizyjnych systemów ściekowych czy zbiornikach zamkniętych oczyszczalni ścieków. Przyjmuje się, że ciężkie stany zatrucia o przebiegu gwałtownym występują dla zakresów siarkowodoru $150 - 300\text{mg/m}^3$ użytkowego powietrza atmosferycznego i takie praktycznie nigdy nie występują w w/w pomieszczeniach sanitarnych. Stan zagrożenia życia osób przebywających okresowo w tych pomieszczeniach wynika najczęściej z bardziej złożonego mechanizmu działania toksycznego implikowanego obok udziału siarkowodoru efektem obniżonego poziomu tlenu i podwyższonego poziomu ditlenku węgla jako następstwa wysokiej aktywności biologicznej drobnoustrojów, grzybów, pleśni odpowiedzialnych za rozkład biomasy organicznej. Ten złożony modelowy układ interpretacyjny przyczynowo – skutkowy dla niektórych przypadków śmierci nagłej, gwałtownej wymagał więc kompleksowej oceny wyników analizy materiału dowodowego sekcyjnego jak również warunków atmosferycznych pomieszczeń użytkowych w których nastąpił zgon. Charakter fizykochemiczny składników gazowych i lotnych ksenobiotyków wymagał wskazania właściwego doboru odpowiedniego materiału biologicznego jak również użycia odpowiednich rozdzielczych układów analizy jakościowo – ilościowej, warunkujących

równoczesną analizę stężeń tlenu, siarkowodoru i ditlenku węgla w pomieszczeniach użytkowych. Zgodnie z podstawowym założeniem celu pracy w badaniach zwrócono uwagę na walory użytkowe metody chromatografii gazowej jako alternatywnej metody potwierdzającej, która w przypadku analizy składu powietrza jest niezastąpiona. Brak odpowiednich danych piśmiennictwa z zakresu dystrybucji siarkowodoru w tkankach i płynach ustrojowych osób narażonych na ekspozycję wziewną był inspiracją do wykonania badań eksperymentalnych. W dostępnym piśmiennictwie z zakresu zatruc siarkowodorem wynika, że jego stężenie w poszczególnych narządach może być zróżnicowane i występuje w niskich granicach. Z tego względu dla oznaczania tak niskiego tego zakresu stężeń wymagana jest wysoka oznaczalność, czułość metody analitycznej oraz odpowiednia metoda izolacji z materiału biologicznego czy dowodowego powietrza użytkowego pomieszczeń odbytej ekspozycji.

Z wykonanych badań wynika, iż warunek wysokiej czułości i oznaczalności siarkowodoru przydatnej dla celów diagnostyki chemicznej materiału biologicznego spełnia metoda spektrofotometryczna wykorzystująca mechanizm reakcji siarkowodoru z N-N-dimetylo-p-fenylendiaminą o maksimum absorbancji przy długości fali $\lambda = 670\text{nm}$, której produktem jest barwna pochodna - błękit metylenowy. Specyfika syntezy analitycznej pochodnej sprawiają, że jest to wysoce selektywna reakcja barwna pozwalająca na oznaczanie niskich stężeń siarkowodoru w różnych materiałach dowodowych spotykanych w analizie toksykologicznej. Za motywacją zastosowania metody spektrofotometrycznej przemawiają także niskie koszty wykonawcze, i niewielka pracochłonność. Obserwowany zakres kalibracji siarkowodoru w metodzie spektrofotometrycznej $/1-6\text{mg}/\text{dm}^3/$ wskazuje na jej niekwestionowaną przydatność dla celów rutynowej analizy toksykologicznej. Dokonana analiza statystyczna wyników potwierdza, iż metoda ta spełnia wszystkie kryteria niezbędne dla jej zastosowania w praktyce. Jediną niedogodnością, której nie można wyeliminować jest dość długi czas analizy związany z koniecznością prowadzenia procesu mikrodyfuzji - 90 minut. Poniższa niedogodność nie ma większego znaczenia przy wykonywaniu analizy siarkowodoru dla celów sądowych, natomiast jest ważna dla przypadków diagnostyki chemicznej zatruc osób żywych spotykanych w toksykologii klinicznej co może stanowić pewne ograniczenie w jej szerszej przydatności w tym względzie. W związku z dużą lotnością siarkowodoru analizę należy zawsze wykonywać w jak najkrótszym czasie od momentu pobrania materiału biologicznego, niezależnie od jego zjonizowanej formy transportu $/\text{HS}^-$, $\text{S}^{2-}/$. Podczas prowadzonych badań z wykorzystaniem metody spektrofotometrycznej niezmiernie ważne jest przestrzeganie wszystkich parametrów użytkowych dla niej zaproponowanych. Powtarzalność w uzyskiwaniu wiarygodnych wyników wymaga

spełnienia podstawowych zaleceń analitycznych związanych z przeprowadzaniem ilościowej reakcji barwnej z N-N-dimetylo-p-fenylendiaminą:

- Odczynnik reagujący powinien być sporządzony zawsze bezpośrednio przed wykonaniem analizy bowiem jest nietrwały. Jego użycie po 2 godzinach od chwili przygotowania powoduje zaniżanie wartości wyniku w stosunku do otrzymanych bezpośrednio po reakcji.
- Odczytów wartości absorbancji należy dokonać nie wcześniej niż po 10 minutach od chwili dodania odczynnika reagującego, kompleks barwny jest stały w czasie, wartość absorbancji po 24 godzinach nie różniła się znacząco od wyników otrzymanych od razu po reakcji.
- W procesie prowadzenia mikrodyfuzji nie należy używać kwasu siarkowego o stężeniu wyższym niż $0,5\text{mol/dm}^3$. W czasie wykonywania odpowiedniego doświadczenia zauważono, iż użycie bardziej stężonego kwasu może powodować zaniżanie wyników, związane z jego właściwościami utleniającymi, prowadzącymi do powstania ditlenku siarki SO_2 .
- Optymalny czas przewidziany dla przebiegu procesu mikrodyfuzji wynosi 90 minut w temperaturze 37°C , jednakże przeprowadzane wielokrotnie doświadczenia wykazały, że już czas sześćdziesięciu minut jest wystarczającym okresem inkubacji, który może być wykorzystany do przypadków nagłych. Należy przy tym pamiętać, że skracanie procesu mikrodyfuzji może prowadzić do obniżenia czułości metody, co jest istotne w przypadku wykonywania oznaczeń ilościowych.
- Bardzo ważna uwaga dotyczy oznaczeń siarkowodoru w materiale biologicznym dla którego należy sporządzić krzywą kalibracyjną z użyciem materiału o podobnych właściwościach fizykochemicznych. Zdolność wiązania zjonizowanej formy siarkowodoru przez materiał biologiczny z racji tworzenia wiązań wodorowych z amfoterycznymi układami białek jest znaczący w porównaniu z analogicznymi wartościami analitycznymi obserwowanymi w roztworach wodnych. W przypadku oznaczeń siarkowodoru w materiale biologicznym (narządy wewnętrzne) nie należy wykorzystywać krzywej kalibracyjnej wykreślonej w oparciu o roztwory wodne, ponieważ wyniki uzyskane w ten sposób mogą różnić się od rzeczywistych w sposób znaczący. Właśnie w badaniach własnych takie rozbieżności zaobserwowano dla wykonanych krzywych kalibracyjnych reakcji $A_b = f(c)$ dla roztworów wodnych i osocza (ryc. 14 i 15).

W poszukiwaniu alternatywnej metody analizy siarkowodoru próbowano wykorzystać chromatografię gazową z użyciem detektora przewodnictwa cieplnego TCD, oraz technikę „headspace” jako najbardziej przydatną dla jego izolacji z materiału badanego.

Zastosowane wypełnienie kolumn o charakterze polimerów (Haye Sep Q oraz Porapak Q) pozwoliło na przeprowadzenie analizy jakościowej siarkowodoru obok innych najczęściej spotykanych nieorganicznych związków lotnych (SO_2 , CO , CO_2 , NO_2 , HCN). Jak już wcześniej podkreślono użycie (Sita Molekularnego 5A) okazało się nieprzydatne do analizy

związków lotnych o charakterze tlenków kwasowych (SO₂, CO₂) jak również typowych kwasów (HCN i H₂S) z racji ich selektywnej reaktywności z tlenkami alkalicznymi, tworzącymi aktywną strukturę chemiczną tego wypełnienia.

Opracowane dwie metody analizy ilościowej: bezpośrednia kalibracja $h = f(c)$ / oraz z wykorzystaniem wzorca wewnętrznego o innym czasie retencji co oznaczany $R = f(c)$ / pozwoliły ustalić zakres kalibracji, które sprawdzono dla przedziału stężeń (0,02 - 0,6g/dm³) siarkowodoru. Ustalona oznaczalność siarkowodoru przy użyciu chromatografii gazowej z detektorem TCD (0,02g/dm³) powoduje ograniczoną możliwość jej zastosowania w szerokiej analizie toksykologicznej materiału biologicznego jak również w pomieszczeniach użytkowych skażonych niebezpiecznym stężeniem siarkowodoru.

W celu sprawdzenia doboru odpowiedniego materiału biologicznego warunkującego analizę ilościową siarkowodoru dla przypadków intoksykacji, wskazano na metodę spektrofotometryczną, jako najbardziej przydatną.

Analiza poziomów siarkowodoru w narządach szczurów poddanych śmiertelnej intoksykacji wykazała, że najwyższe jego stężenie obserwowano zgodnie z następującym szeregiem malejącym: tkanka nerki (11,2μg/gram tkanki), wątroby (7,4μg/gram tkanki), mózgu (5,5μg/gram tkanki), mięśni (3,6μg/gram tkanki), płuc (1,7μg/gram tkanki) i krwi (poniżej dolnej wartości krzywej kalibracji).

Powyzsza obserwacja potwierdzona u wszystkich badanych zwierząt pozwoliła zweryfikować dotychczasowe niesłuszne zalecenia wskazujące na przydatność tkanki płucnej i krwi z pominięciem tkanki nerek jako narządu z wyboru w diagnostycznych badaniach zatruc siarkowodorem.

Przeprowadzone dodatkowe badania potwierdziły możliwość wykorzystania zarówno metody spektrofotometrycznej jak i chromatografii gazowej w analizie siarkowodoru uwolnionego podczas gnilnych procesów biodegradacji zwłok i materiału biologicznego, w których jego stężenie osiąga wysokie stężenie (powyżej 0,02g/dm³).

Uzyskane wyniki badań oraz ich ocena statystyczna pozwoliły wskazać najbardziej optymalne postępowanie metodyczne, którym w tym przypadku może być specyficzna metoda spektrofotometryczna przydatna w rutynowej analizie siarkowodoru dla celów toksykologii sądowej.

Chromatografia gazowa /GLC, GC-TCD/ w diagnostyce zatruc z udziałem siarkowodoru z równoczesnym udziałem hipoksji jako następstwa deficytu tlenu i podwyższonego stężenia ditlenku węgla jest ważnym elementem w postępowaniu

metodycznym analitycznej toksykologii. Opracowanie metody GC/TCD we wskazanym systemie z wykorzystaniem równocześnie sita molekularnego 5A oraz wypełnienie „Hay Sep” może stanowić alternatywną metodę potwierdzającą dla stosowanej szybkiej detekcji bezpośredniej z użyciem analizatorów powietrza przez specjalistyczne zespoły Ratownicze Straży Pożarnej. Mimo, że liczba notowanych przypadków tego rodzaju zatruc jest niewielka, to konieczność dysponowania odpowiednim postępowaniem metodycznym jest niezbędna dla potwierdzenia ujawnionych podejrzeń. W okresie prowadzonych badań eksperymentalnych opracowane postępowanie wykorzystano z powodzeniem dla potwierdzenia udziału hipoksji dwóch przypadków zgonów w pomieszczeniach użytkowych produkcji biomasy m.in. do uprawy pieczarek, w których wystąpiła awaria systemów wentylacji. Wykorzystana metoda GC/TCD jako potwierdzająca dla analizy zabezpieczonego powietrza potwierdziła wstępne przypuszczenia. Z powodzeniem w omawianym wcześniej systemie w dwiema kolumnami /Sito Molekularne 5A oraz Hye Sep/ udało się wykazać obniżony poziom tlenu /zakres 1-2%/, przy wysokim stężeniu CO₂ /14%/. Potwierdzony efekt hipoksji, z równoczesnym podwyższonym poziomem ditlenku węgla pozwolił wyjaśnić mechanizm śmierci nagłej dwóch mężczyzn przebywających czasowo w pomieszczeniach produkcyjnych biomasy oraz skutki następstw odbytej hospitalizacji, która dotyczyła dwóch kolejnych osób pokrzywdzonych w tym samym zdarzeniu.

7 Wnioski

1. Niebezpieczne zatrucia z udziałem nieorganicznych lotnych związków chemicznych; tlenkiem węgla /CO/, siarkowodorem /H₂S/, cyjanowodorem /HCN/, oraz hipoksji /niedobór tlenu/ niezależnie od zróżnicowanej kazuistycznie częstotliwości zdarzeń, stanowią ważny problem współczesnej toksykologii klinicznej i sądowej.
2. Specyfika fizykochemiczna lotnych trucizn nieorganicznych /CO, H₂S, HCN/ oraz gazowych komponentów oddychania organizmów żywych /tlen, ditlenek węgla/ stanowi bardziej złożony układ problemów analitycznej toksykologii /izolacja, skryning, analiza jakościowo-ilościowa/ w porównaniu z analogicznymi postępowaniami diagnostycznymi stosowanymi dla innych grup ksenobiotyków o charakterze substancji stałych.
3. Weryfikacja porównawcza dostępnych metod klasycznej spektrofotometrii oraz proponowane praktyczne wykorzystanie specyficznych metod chromatografii gazowej z użyciem zróżnicowanych detektorów /TCD, NPD/ jako alternatywnych metod porównawczych stanowić może standardowy model użytkowy analitycznej toksykologii przydatnej w diagnostyce lotnych trucizn nieorganicznych.
4. Metoda chromatografii gazowej z użyciem uniwersalnej techniki izolacji „headspace” z wykorzystaniem dwóch niezależnych systemów rozdzielczych w układzie „dual” tj. kolumny z wypełnieniem Sita Molekularnego 5A i adsorbentu Haye Sep Q stanowi najlepszy układ analityczny dla najczęściej notowanych nieorganicznych trucizn lotnych /CO, H₂S, HCN/ oraz komponentów powietrza atmosferycznego /O₂, N₂, CO₂/.
5. Zastosowanie klasycznej spektrofotometrii w zakresie widzialnym /CO-oxymetr, zmodyfikowana metoda Wolfa/ oraz opracowane metody chromatografii gazowej z użyciem detektora przewodnictwa cieplnego /TCD/ jako alternatywnej metody porównawczej pozwala na obiektywną ocenę intoksykacji tlenkiem węgla - analiza ilościową COHb oraz ewentualnego udziału cyjanowodoru w przypadku ofiar pożarów.
6. Ocena stabilności karboksyhemoglobiny /COHb/ biochemicznego wykładnika ekspozycji tlenkiem węgla, wskazuje na jej ograniczona trwałość w warunkach temperatury pokojowej /± 20°C/ oraz istotnie podwyższoną stabilność w niższej temperaturze przechowywania /± 5°C/, co warunkuje procedury wykonawcze i interpretacyjne wyników badań.
7. Metoda spektrofotometryczna z wykorzystaniem specyficznej reakcji barwnej siarkowodoru z N,N-dimetylo-8-fenylo-diaminą jest najbardziej przydatną dla celów jego

rutynowej analizie w materiale biologicznym w zakresie /1 – 6mg/dm³/ i stanowi w tym przypadku priorytet wykonawczy nad metodą chromatografii gazowej z użyciem detektora TCD wykazującą niższą oznaczalność w zakresie /20-600mg/dm³/, przydatną w analizie skażonego powietrza atmosferycznego.

8. Sprawdzone walidacyjne parametry analityczne spektrofotometrycznej metody oznaczania cyjanowodoru z wykorzystaniem specyficznej reakcji barwnej z odczynnikiem pirydynowo – barbituranowym oraz opracowana metoda chromatografii gazowej z użyciem selektywnego układu detektora azotowo – fosforowego /NPD/ stanowić może niezależny układ analityczny o porównywalnych zakresach kalibracji /0.1 – 5mg/dm³ i 2.5 – 50mg/dm³/.
9. Eksperymentalne badania na zwierzętach doświadczalnych zweryfikowały dobór najbardziej odpowiedniego materiału biologicznego, sekcyjnego dla celów analitycznej toksykologii:
 - w przypadku zatruc cyjankami najbardziej odpowiednia jest krew oraz alternatywnie tkanki wątroby, mózgu oraz nerek
 - w przypadku zatruc siarkowodorem jego stężenie w profilu malejącym dotyczy kolejno tkanki nerek, wątroby, mózgu, mięśni oraz krwi.
10. Zachowanie odpowiednich standardów diagnostycznych, /użycie selektywnych metod chromatograficznych/ dla badanych przypadków śmierci nagłej, gwałtownej z udziałem hipoksji – niedoboru tlenu, stanowi ważny element obiektywnej interpretacji toksykologicznej.
11. Opracowane warunki badań spektrofotometrycznych i chromatograficznych składu jakościowo – ilościowego materiału biologicznego zabezpieczonego od ofiar odbytej ekspozycji lotnymi związkami nieorganicznymi oraz zmodyfikowanego biologicznie składu użytkowego powietrza atmosferycznego mogą być przydatne w rutynowej ekspertyzie i opiniodawstwie sądowo – lekarskim i toksykologicznym.

8 Streszczenie pracy

Przedstawiona rozprawa doktorska dotyczy opracowania specyficznych i szybkich metod diagnostyki chemicznej zatruc z udziałem najczęściej notowanych lotnych trucizn nieorganicznych: (tlenek węgla CO, siarkowodór H₂S, cyjanowodór HCN), oraz określenia efektów następstw deficytu tlenowego – hipoksji (obniżonego poziomu tlenu O₂, podwyższonego stężenia ditlenku CO₂). W realizowanym programie badawczym uwzględniono znaczenie standardowych metod jakościowo – ilościowych lotnych związków nieorganicznych z wykorzystaniem chromatografii gazowej w równoległym układzie izolacji techniką „Headspace”, niezależnie od powszechnie dostępnych metod spektrofotometrii w zakresie widzialnym.

Opracowane warunki analizy jakościowej lotnych związków nieorganicznych z zastosowaniem chromatografii gazowej z techniką „headspace” oraz z wykorzystaniem selektywnych kolumn rozdzielczych z wypełnieniem – Haye-Sep Q pozwoliły z powodzeniem dokonać selektywnej równoczesnej analizy lotnych związków nieorganicznych o charakterze kwasów /CO₂, H₂S, HCN/. Alternatywne użycie kolumn rozdzielczych z zastosowaniem sita molekularnego 5A, pozwoliło na równoczesną analizę związków o charakterze obojętnym /CO, N₂, O₂ i CH₄/, nie reagujących z tlenkami zasadowymi. Sprawdzone aktywne właściwości zasadowych tlenków metali alkalicznych tworzące strukturę sita molekularnego 5A, potwierdziły jego rolę jako efektywnej „pułapki” dla grupy związków kwasowych oraz wysoką przydatność użytkową w analizie związków o charakterze obojętnym. Opracowane chromatograficzne metody analizy jakościowo – ilościowej w układzie „dual” – równoczesnego użycia kolumn rozdzielczych Haye-Sep Q i sita molekularnego 5A zostały zaproponowane jako modelowe dla analizy całej grupy lotnych trucizn nieorganicznych oraz komponentów powietrza atmosferycznego niebezpiecznych pomieszczeń użytkowych /O₂, N₂, CO₂/. Dla dokonania obiektywnej oceny udziału efektu toksycznej ekspozycji lotnymi związkami nieorganicznymi w interpretacji przyczynowo – skutkowej, zaproponowano alternatywne metody badania odpowiedniego materiału biologicznego.

W celu weryfikacji wartości użytkowej proponowanych metod, analizie statystycznej poddano wyniki badań karboksyhemoglobiny /COHb/ dla wybranych przypadków zatruc tlenkiem węgla, którą oznaczano pośrednią metodą chromatografii gazowej /GC-TCD/ techniką „headspace”, zmodyfikowaną własną metodą spektrofotometryczną Wolfa oraz przy pomocy standardowego urządzenia hemooksymetru OSM 3. Badania wykazały, że użycie

w diagnostyce toksykologicznej krwi osób podejrzanych o zatrucie tlenkiem węgla, uniwersalnych urządzeń pomiarowych typu CO-oksometr /równoczesny pomiar spektrofotometryczny przy kilku długościach analitycznych fal pomiarowych/ z możliwością analizy różnych postaci hemoglobiny nie zawsze jest wystarczający i dla obiektywnej interpretacji wymaga alternatywnej metody potwierdzającej.

Weryfikacja wartości użytkowej metod oznaczania COHb w wybranych losowo 23 przypadków zatruc wykonanych metoda chromatografii gazowej GC-TCD techniką „headspace”, przy użyciu klasycznych metod spektrofotometrycznych – metoda Wolfa i jej własnej modyfikacji uwzględniającej udział osobniczego poziomu hemoglobiny oraz uniwersalnej metody z użyciem hemooksymetru OSM-3 wskazuje na ich porównywalną, zależność badanych parametrów statystycznych. Statystyka opisowa wyników oznaczeń /tab. 32/ wyrażonej parametrem mediany wskazuje na wysoką porównywalną zależność wyników generowanych metodą GC/TCD /19/ jak i przy użyciu hemooksymetru /18/. Ciekawe zależności porównawcze wyników oznaczeń COHb uzyskano podczas oceny proponowanej metody GC/TCD z pozostałymi metodami spektrofotometrycznymi. Przeprowadzony test nieparametryczny Wilcoxon na poszczególnych par zmiennych /tab. 37/ wskazuje na równowartość metody GC/TCD i hemooksymetrycznej, potwierdzając brak różnic dla ustalonych parametrów statystycznych wartości $p = 0.3304$ z $p < 0,05000$ oraz parametry korelacji $r = 0.9732$.

W przeprowadzonych badaniach z zakresu rutynowej diagnostyki chemicznej zatruc tlenkiem węgla zwrócono dodatkowo uwagę na stabilność układu COHb w zabezpieczonych próbkach krwi przeznaczonych do analizy ilościowej. Wykonane badania własne potwierdziły wcześniejsze informacje (92) wskazujące na konieczność niezwłocznego przechowywania zabezpieczonych próbek krwi w standardowych warunkach temperaturowych $\pm 5^{\circ}\text{C}$ / warunkującą jej długotrwałą stabilność w ciągu nawet jednego roku (92). Niewłaściwe warunki przechowywania próbek krwi zawierających COHb, najczęściej w temperaturze pokojowej $\pm 20^{\circ}\text{C}$ / powodują ich szybką biodegradację, który już po czasie 10 dni może wykazać spadek pierwotnego stężenia o 50%. Podwyższona niestabilność COHb stanowi w tym przypadku ważny problem diagnostyczny – interpretacyjny, który niezależnie od restrykcyjnych warunków przechowywania próbek krwi wymaga wykonania odpowiedniej analizy w możliwie najkrótszym czasie od jej zabezpieczenia.

W przypadku intoksykacji cyjanowodorem dla wskazania najbardziej właściwego materiału biologicznego - sekcyjnego do badań toksykologicznych, wykonano odpowiedni eksperyment z użyciem zwierząt doświadczalnych. Rozmieszczenie cyjanków w poszczególnych narządach /wątroba, mózg, nerki, mięsień, krew/ dokonano po eksperymentalnej intoksykacji zwierząt /szczury rasy Vistar/. Wyniki analizy ilościowej cyjanowodoru uwolnionego z krwi i narządów szczura wykazały jednoznacznie,

że najbardziej właściwym materiałem do oceny poziomu intoksykacji cyjanowodorem jest krew, a w przypadku trudności jej pobrania, do oceny intoksykacji można alternatywnie wykorzystać inny materiał biologiczny /wątroba, mózg, nerki/.

Kompleksowe badania porównawcze wykazały, że dla obiektywnej analizy ilościowej cyjanowodoru w materiale biologicznym /krew/ przydatnej w diagnostyce zatruc można wykorzystać metodę spektrofotometryczną w zakresie widzialnym. Specyfika i selektywność odczynnika barbiturowo-pirydynowego, pozwala na odpowiednią ocenę poziomu intoksykacji cyjanowodorem. Ustalony zakres kalibracyjny metody spektrofotometrycznej /0.1 – 5mg/L/ wskazuje na jej wystarczającą przydatność w ocenie interpretacyjnej notowanych przypadków zatruc klinicznych i śmiertelnych.

W poszukiwaniu alternatywnej standardowej metody potwierdzającej oznaczenia cyjanków w postaci cyjanowodoru w materiale biologicznym wykorzystano metodę chromatografii gazowej. Sprawdzona metoda chromatograficzna z użyciem detektora przewodnictwa cieplnego GC-TCD jest wystarczająco czułą do oceny poziomu stężenia HCN w materiale dowodowym o wyższym zakresie stężeniowym. Sprawdzony zakres kalibracji /0.5 – 4g/L/ okazuje się nie przydatny w przypadku materiału biologicznego zabezpieczonego dla celów badań klinicznych, czy toksykologiczno – sądowych. W poszukiwaniu alternatywnej metody potwierdzającej ekspozycję cyjanowodoru z zatruciami ostrymi czy u ofiar pożarów bezkonkurencyjną okazała się metoda chromatografii gazowej z użyciem selektywnego detektora NPD /detektor termojonowy – *nitrogen-phosphorus detector*/. Użycie detektora /NPD/ pozwala w zakresie stężenia HCN /2.5 - 50mg/L/ na jego analizę jakościowo - ilościową zarówno w materiale biologicznym, dowodowym jak i w atmosferze pomieszczeń użytkowych m.in. w warunkach pożarów.

Sprawdzone parametry walidacyjne i statystyczne wskazują na możliwość szerszego wykorzystania metody spektrofotometrycznej, która pozwala na ilościową ocenę cyjanków w materiale biologicznym /krew/ zarówno przypadków zatruc klinicznych jak i śmiertelnych notowanych w toksykologii sądowej.

Niezależnie, wskazano metodę chromatografii z użyciem detektora NPD i TCD jako alternatywną metodę potwierdzającą przydatną w specjalistycznych badaniach toksykologiczno – sądowych.

Zweryfikowano zasadność zatruc siarkowodorem, któremu są przypisane najczęściej notowane przypadki śmierci nagłej w pomieszczeniach kanałów ściekowych, dołach kloacznych, studzienkach rewizyjnych systemów ściekowych czy zbiornikach zamkniętych pomieszczeń oczyszczalni ścieków.

W opracowaniu metod analizy ilościowej zaproponowano wstępną izolację siarkowodoru metodą mikrodyfuzji oraz pomiar spektrofotometryczny w zakresie widzialnym przy długości fali $\lambda = 670\text{nm}$ (metoda z N-N-dimetylo-p-fenylendiaminą).

W przeprowadzonych badaniach eksperymentalnych siarkowodór otrzymywano z roztworu wodnego siarczku sodu ($\text{Na}_2\text{S} \times 9\text{H}_2\text{O}$), w reakcji jego uwolnienia z udziałem kwasu siarkowego.

Wstępne badania analityczne wykazały zasadnicze walory metody spektrofotometrycznej z użyciem N-N-dimetylo-p-fenylendiaminy, którą uznano za specyficzną i selektywną do analizy ilościowej siarkowodoru (zakres kalibracji od 0,1 - 5,0 mg/dm³).

W kompleksowych badaniach metodycznych określono dodatkowo możliwość zastosowania chromatografii gazowej w analizie jakościowo - ilościowej siarkowodoru obok innych lotnych związków nieorganicznych (CO_2 , CO, NO_2 , HCN, SO_2). Zaproponowana analiza chromatograficzna z użyciem wypełnienia kolumny: Haye Sep Q i Porapak Q umożliwiają wykonanie analizy jakościowo - ilościowej siarkowodoru w odróżnieniu od użycia Sita Molekularnego 5A, które okazało się nieprzydatne do analizy gazów nieorganicznych o charakterze tlenków kwasowych lub słabych kwasów. Zastosowane metody analizy ilościowej oparte o wzorzec wewnętrzny (HCN) o innym czasie retencji niż oznaczany, oraz kalibracja zewnętrzna bez użycia wzorca wewnętrznego pozwoliły na możliwość oznaczania siarkowodoru w zakresie 20 - 600 mg/dm³. Ustalony zakres kalibracji siarkowodoru ogranicza możliwość analizy toksykologicznej materiału biologicznego, ale jest wystarczający do oceny siarkowodoru endogennego, powstałego w postępującym procesie rozkładu włók oraz dla przypadków rutynowych badań chemicznych, erupcji przemysłowej czy ekologicznej / $\text{C} = \text{H}_2\text{S} > 20\text{mg/dm}^3$ /.

Dokonano oceny przydatności tkanek wybranych narządów dla celów analitycznych, która była determinowana zawartością siarkowodoru, skumulowanego w następstwie procesu eksperymentalnej intoksykacji. Wykonane badania eksperymentalne na zwierzętach /szczury rasy Visar/ wykazały, że najbardziej przydatnym materiałem sekcyjnym z racji występującego w nim stężenia siarkowodoru są tkanki: nerek, wątroby i mózgu oraz w dalszej kolejności tkanka mięśni i płuc. Wykazano całkowitą nieprzydatność krwi oraz tkanki płucnej dla celów rutynowej diagnostyki chemicznej przypadków zatruc siarkowodorem.

Wykonane ukierunkowane oznaczenia siarkowodoru w materiale biologicznym (krew) przechowywanym przez okres dwu lat w temp. 4°C potwierdzają, iż odpowiednie warunki

przechowywania tego materiału zapobiegają powstawaniu endogennego siarkowodoru. Ocena parametrów kalibracyjnych i walidacyjnych analitycznych zależności badań siarkowodoru pozwalają uznać metodę spektrofotometryczną w zakresie widzialnym, jako najbardziej przydatną dla celów rutynowej analizy toksykologiczno - sądowej.

W badaniach zwrócono uwagę na ważny problem następstw hipoksji /niedobór tlenu oddechowego/ występującej u osób przebywających czasowo w warunkach obniżonego poziomu tlenu O_2 i podwyższonego stężenia ditlenku węgla CO_2 , siarkowodoru H_2S i metanu CH_4 . Zaproponowano standardowy tok postępowania diagnostycznego z możliwością wykorzystania chromatografii gazowej (GC/TCD) w analitycznym układzie „dual” /użycie kolumny rozdzielczej – sito molekularne 5A dla analizy ilościowej tlenu, metanu i kolumny z wypełnieniem Haye-Sep Q dla analizy ilościowej CO_2 , H_2S . Przeprowadzone kompleksowe badania eksperymentalne oraz uzyskane wyniki i poczynione obserwacje dostarczają ważnych informacji przydatnych w rutynowej diagnostyce chemicznej zatruc lotnymi związkami nieorganicznymi z udziałem hipoksji, notowanych w kazuistyce medycyny i toksykologii sądowej.

8 Summary

Chemical diagnosis of fatal cases of poisoning with selected volatile inorganic compounds /CO, HCN, H₂S/ and its significance in medico legal opinioning.

The doctoral thesis pertains to development of specific and rapid techniques of chemical diagnosis related to intoxications with the most frequently noted volatile inorganic toxins (carbon monoxide CO, hydrogen sulphide H₂S, hydrogen cyanide HCN), and to determination of oxygen deficit sequels – hypoxia (lowered levels of oxygen O₂, elevated levels of carbon dioxide CO₂). The implemented research programme took into account significance of standard qualitative/quantitative assays of volatile inorganic compounds employing gas chromatography with the parallel system of „headspace” isolation technique, in line with the generally available techniques of spectrophotometry in the visible range.

The worked out conditions of qualitative analysis targeted at volatile inorganic compounds using gas chromatography with headspace technique and selective chromatographic columns with Haye-Sep Q filling allowed for a successful selective parallel analysis of volatile inorganic compounds of acidic type /CO₂, H₂S, HCN/. Alternative use of resolving columns with the use of 5A molecular sieve permitted to conduct parallel analysis of neutral compounds /CO, N₂, O₂ i CH₄/, not reacting with alkaline oxides. The corroborated active properties of alkaline metal oxides, forming the structure of 5A molecular sieve, confirmed its role of an effective trap for the group of acidic compounds and its high utility in analysis of compounds of a neutral character. The worked out chromatographic techniques for qualitative/quantitative analysis in the dual system, employing in parallel use of selective Haye-Sep Q columns and 5A molecular sieve were suggested to form a model approach to analysis of the entire group of volatile inorganic toxins and compounds of atmospheric air dangerous in utility spaces /O₂, N₂, CO₂/. Objective evaluation of inputs manifested by toxic exposure to volatile inorganic compounds to the cause-effect considerations was suggested to involve alternative methods of investigations on the respective biological material.

In order to verify utility value of the suggested techniques, results of assays of carboxyhemoglobin /COHb/ were subjected to statistical analysis in selected cases of carbon monoxide intoxications. The carboxyhemoglobin was estimated by an indirect headspace gas chromatography technique /GC-TCD/, a modified by us Wolfe’s spectrophotometric technique and using the standard OSM3 haemoximeter. The studies demonstrated that the use of universal measuring instruments of CO-oximeter type (parallel spectrophotometric assays at several analytic wavelengths) with the potential for analysis of various haemoglobin forms

was not always sufficient for toxicological analysis of blood of individuals suspected of carbon monoxide intoxication and objective interpretation requires confirmation using an alternative approach.

Verification of utility value manifested by techniques of COHb estimation in randomly selected 23 cases of intoxication, including GC-TCD headspace gas chromatography, the classical spectrophotometric techniques of Wolf and its modification by ourselves, considering an individual haemoglobin level and the universal approach with use of OSM-3 haemoximeter pointed to their comparable value of statistic parameters. Descriptive statistics of assays results (see Table 32) expressed by median values pointed to highly comparable results generated by GC-TCD (19) and those obtained with use of haemoximeter (18). Interesting inter-relationships of COHb assay results were obtained upon comparison of GC-TCD technique with the remaining spectrophotometric techniques. The non-parametric Wilcoxon test performed on individual pairs of variables (Table 37) indicated comparable value of GC-TCD and haemoximetric techniques, confirming absence of differences between estimates of statistical parameters $p = 0.3304$ $z p < 0.05000$ and the correlation index of $z = 0.9732$.

In the conducted investigations within the scope of routine chemical diagnosis in carbon monoxide intoxications an attention was also paid to stability of COHb system in the blood samples secured for quantitative analysis. Our own studies confirmed the earlier data (92) pointing to necessity of an immediate storage of secured blood samples in standard temperature conditions $/\pm 5^{\circ}\text{C}/$, which warrants their long-term stability for even up to one year (92). Improper conditions of storage of COHb-containing blood samples, most frequently at room temperature $/\pm 20^{\circ}\text{C}/$ result in their rapid biodegradation: already after 10 days of such a storage COHb content may decrease by 50%. In such cases the increased instability of COHb poses a significant diagnostic/interpretation problem and, thus, irrespectively of restrictive conditions of blood sample storage the analysis should be performed as soon as possible after securing the sample.

In order to select the most appropriate biological material in cases of intoxication with hydrogen cyanide an experiment with laboratory animals was performed. Following experimental intoxication of animals (Wistar strain rats) distribution of cyanides was examined in individual organs (liver, brain, kidneys, muscle, blood). Results of quantitative analysis unequivocally demonstrated that blood is the most appropriate material to evaluate the extent of intoxication with cyanides and in cases when blood is difficult to sample intoxication can be established using an alternate biological material /liver, brain, kidneys/.

The complex comparative studies showed that an objective quantitative analysis of hydrogen cyanide in biological material (blood) useful for diagnosis of intoxications may take

advantage of visible light spectrophotometry. Specificity and selectivity of the barbiturate/pyridine reagent allows for an appropriate evaluation of cyanide intoxication level. The established calibration range of the spectrophotometric technique /0.1 – 5mg/L/ points to its sufficient suitability in interpretation of noted clinical and lethal intoxications.

In the search for an alternative standard technique which would corroborate assays of cyanides in the form of hydrogen cyanide in a biological material gas chromatography was tested. The examined technique of gas chromatography with the use of GC-TCD thermal conductivity detector is sufficiently sensitive to evaluate HCN concentration in an evidence material with higher concentrations of cyanides. The examined calibration range /0.5 – 4g/L/ proves to be unsuitable in cases of a biological material secured for clinical or toxicological/forensic purposes. In the search for alternative methods capable of confirming exposure to cyanides in acute intoxications or victims of fire the technique of gas chromatography with use of nitrogen/phosphorus detector (NPD) proved to be unrivalled. In the range of HCN concentrations of 2.5 to 50 mg/L use of the NPD detector allowed for the qualitative/quantitative analysis of the agent in both the biological material, evidentiary material and in atmosphere of utility spaces in conditions of, e.g. fire.

The checked validation and statistical parameters demonstrated a potential for broader application of the spectrophotometric technique, which allows for a quantitative analysis of cyanides in a biological material (blood) both in clinical intoxications and lethal cases, noted in forensic casuistry.

Independently, the technique of chromatography with use of NPD and TCD detector was selected as an alternative, confirming approach, useful in specialist forensic studies.

Cases of intoxication with hydrogen sulphide, the agent frequently held responsible for cases of sudden death intoxications in sewage drainage system, cesspools or closed facilities of sewage purification plants, were verified.

Designing the technique of quantitative analysis it was suggested to be preceded by preliminary isolation of hydrogen sulphide by microdiffusion and spectrophotometric measurement within the visible light wavelength of $\lambda = 670\text{nm}$ (technique with N-N-dimethyl-p-phenylenediamine).

In the conducted experimental investigations hydrogen sulphide was obtained from aqueous solution of sodium sulphide ($\text{Na}_2\text{S} \times 9\text{H}_2\text{O}$), releasing it from the solution using sulphuric acid.

Preliminary analytical investigations demonstrated principal value of the spectrophotometric technique with use of N-N-dimethyl-p-phenylenediamine, which was found specific and selective for hydrogen sulphide quantitative analysis (calibration range of 0.1 to 5.0 mg/dm³).

In complex methodical studies additionally the potential was demonstrated for application of gas chromatography in qualitative/quantitative analysis of hydrogen sulphide and other volatile inorganic compounds (CO₂, CO, NO₂, HCN, SO₂). The suggested chromatographic analysis using columns filled with Haye Sep Q and Porapak Q allowed for a qualitative/quantitative analysis of hydrogen sulphide in contrast to use of 5A molecular sieve, which proved to be unsuitable for analysis of inorganic gases manifesting character of acidic oxides or weak acids. The applied methods of quantitative analysis, based on internal standard with a retention time of retention as compared to that of assayed agent and an external calibration with use of no internal standard permitted to assay hydrogen sulphide in the range of 20 to 600 mg/dm³. The established calibration range of hydrogen sulphide restricts the potential of using the technique for toxicologic analysis of biological material but it is sufficient for evaluation of an endogenous hydrogen sulphide, arising in the process of body decomposition or in cases of routine chemical studies, industrial or ecological eruptions /C = H₂S > 20mg/dm³/.

Suitability of tissues of selected organs for analytical purposes was examined, determined by the content of hydrogen sulphide, cumulated in the process of experimental intoxication. The experimental studies on rats (Wistar strain rats) showed that, in view of the contained hydrogen sulphide, the most suitable biological material included tissues of kidneys, liver and brain, followed by muscles and lungs. Blood and pulmonary tissue was shown to be fully inappropriate for routine chemical diagnosis of intoxications with hydrogen sulphide.

Directional assays of hydrogen sulphide in biological material (blood) stored for two years at the temperature of 4°C confirmed that appropriate conditions of evidentiary material storage prevent against development of endogenous hydrogen sulphide. The estimated calibration and validation parameters of hydrogen sulphide assays and their relationships permitted to regard the visible light spectrophotometric technique as the most suitable approach in routine toxicologic/forensic analysis.

In the studies an attention of potential readers was drawn to the important problem of hypoxia sequels (deficiency of respiratory oxygen) in persons transiently exposed to lowered oxygen concentrations /O₂/ and elevated concentrations of carbon dioxide /CO₂/, hydrogen

sulphide /H₂S/ and methane /CH₄/. A standard diagnostic procedure was suggested with potential of using gas chromatography (GC/TCD) in a dual analytical system (use of separation column: 5A molecular sieve for quantitative analysis of oxygen, methane plus Haye-Sep Q filled column for quantitative analysis of CO₂, H₂S. The performed complex experimental studies, the obtained results and observations made provided important data suitable in routine chemical diagnosis of intoxications with volatile inorganic compounds with input of hypoxia, noted in medical casuistry and forensic toxicology.

Piśmiennictwo

1. **Hauser R. Miścicka D.** Zatrucia śmiertelne w Gdańsku w latach 1970-1979. *Arch. Med. Sąd. Krym.* 1982, 32, strony 39-45.
2. **Klys M. Baran E., 1996, 46, 277-287.** Zatrucia śmiertelne w materiale Zakładu Medycyny Sądowej w Krakowie w latach 1946-1995. *Arch. Med. Sąd. Krym.* 1996, 46, strony 277-287.
3. **Marek Z. Packo Z.** Zatrucia śmiertelne w Krakowie w latach 1947-1973. *Arch. Med. Sąd. Krym.* 1975, 25, strony 69-76.
4. **Molenda.** Wpływ stężenia etanolu na toksyczność tlenku węgla. *Arch. Med. Sąd. Krym.* 1991, 31, strony 178-184.
5. **Pach J. Marek Z., Kamenczak A., Winnik L.** Ocena zagrożenia ostrymi zatruciami substancjami chemicznymi mieszkańców Krakowa w roku 1993. *Arch. Med. Sąd. Krym.* 1994, 44, strony 281-291.
6. **Adelson L. Sunnshine I.** Fatal hydrogen sulfide intoxication. *Arch. Pat.* 1996, 81, strony 375-380.
7. **Campanya M. Sanz P.** Fatal hydrogen sulfide poisoning. *Med. Law.* 1989, 80, strony 251-253.
8. **Deng J.F. Chang S.C.** Hydrogen sulfide poisoning in hot-spring reservoir cleaning; two case report. *Am. J. Ind. Med.* 1987, 11, strony 447-451.
9. **Vathanen A.S., Emberton P i Wales J.M.** Hydrogen sulfide poisoning in factory worker. *Lancet.* 1988, 18, strony 245-248.
10. **Avneesh Gupta Melissa A. Pasquale-Styles Bradford R. Hepler, Daniel S. Isenschmid, and Carl J. Schmidt.** Apparent Suicidal Carbon Monoxide Poisonings with Concomitant Prescription Drug Overdoses. *J. Anal. Toxicol.* 2005, 29, strony 744-749.
11. **Seńczuk W.** Toksykologia, podręcznik dla studentów farmacji. PZWL, 1994, strony 356-362.
12. **Arvind K. Chaturvedi.** Aviation Combustion Toxicology: An Overview. *J. Anal. Toxicol.* 2010, 34, strony 1-16.
13. **Sakata M. Haga M.** Rapid determination of carboxyhemoglobin by absorbance difference between double wave length. *The J. Toxicol. Sci.* 1980, 5, strony 113-121.
14. **Siek T.J. Rieders F.** Determination of carboxyhemoglobin in the presence of other blood hemoglobin pigments by visible spectrophotometry. *The J. Toxicol. Sci.* 1984, 29, strony 39-54.
15. **Winek Ch.L. Prex D.M.** A comparative study of analytical methods to determine postmortem changes in carbon monoxide concentration. *Foren. Sci. Internat.* 1981, 18, strony 181-187.
16. **Sakata M. Haga M.** Determination of carbon monoxide in blood by head space analysis. *The J. Toxicol. Sci.* 1980, 5, strony 35-43.
17. **Iffland R. Sticht G.** Gaschromatographisches Verfahren zur Bestimmung des Kohlenmonoxidgehaltes im Blut. *Arch. Toxikol.* 1972, 29, strony 325-330.
18. **Russell J. Lewis Robert D. Johnson, Dennis V. Canfield.** An Accurate Method for the Determination of Carboxyhemoglobin in Postmortem Blood Using GC-TCD. *J. Anal. Toxicol.* 2004, 28, strony 59-62.
19. **Ainsworth C. A. Schoegel E. L., Domański T. J., Goldbaum L. R.** A gaschromatographic procedure for the determination of carboxyhemoglobin in postmortem samples. *J Forensic Sci.* 1967, 12, strony 529-537.
20. **G. Machata.** Die Differenzierung der Kohlenoxidvergiftung. *Arch. Toxikol.* 1968, 23, strony 136-140.
21. **Hessel D. Modglin F. R.** The determination of carbon monoxide in blood gas solid chromatography. *J Forensic Sci.* 1967, 12, strony 123-130.
22. **I.L. Lambert.** Determination of carbon monoxide in blood. *Analyt. Chem.* 1972, 44, strony 1529-1530.
23. **Mary O. Amdury Ph. D.** Caserett and Doull's Toxicology. *The Basic Science of Poison.* 1991.
24. **W. Schmitt.** Zur Problematik der chronischer Kohlenoxid-Vergiftung Nervenarzt. 1960, 31, strony 351-358.
25. **DiMaio D. DiMaio V.** Podręcznik: Medycyna Sądowa. Urban & Partner, 2003.
26. **J. Siggard-Andersen.** A possible connection between carbon monoxide exposure, capillary filtration rate and atherosclerosis. *Acta. Med. Scand.* 1960, 182, strony 397-399.
27. **Mathieu D. Mathieu-Nolf M.** Oxygen therapy for CO poisoning: rationale and recommendations. *Przeg. Lek.* 2005, 62/6, strony 436-437.
28. **Gawlikowski T. Groszek B., Urbanik A.** Ciężkie zatrucie tlenkiem węgla: różny przebieg kliniczny – to samo źródło narażenia. *Prze. lek.* 2001, 58/4, strony 354-356.
29. **Buszewicz G. i Mądro R.** Determination of carboxymyoglobin in cardiac and femoral muscles by means of headspace gas chromatography. *Z Zagadnień Nauk Sądowych.* 2000, 44, strony 76-84.
30. **Portugali Miguel Soares z Instituto Gulbenkian de Ciencia (Instytut Nauki im. Gulbenkiana) z Oeiras w.** stwardnienie rozsiane SM, tlenek węgla, układ nerwowy, wolne rodniki. *źródło New Scientist.*
31. **W.G. Zijlstra.** Die quantitative Bestimmung von Hämoglobin, Oxyhämoglobin, Kohlenoxid hämoglobin und Methämoglobin in kleinen Blutproben mittels Spektrophotometrie. *Klin. Wochenschr.* 1956, 34, strony 384-389.
32. **K. Lehmanu.** CO-Schnelltest. *Kriminal. Forens Wiss.* 1977, 27, strony 56-57.
33. **C. Maehly A.** Analyse von Kohlenoxid-Vergiftung Metodik und Ergebnisse. *Dt. Z. ges. gericht. Med.* 1962, 52, strony 369-382.

34. **Brüchner J. Desmond F.B.** A spectrophotometric method of the estimation of carbon monoxide hemoglobin in blood. *Clin. Chim. Acta.* 1958, 3, strony 173-178.
35. **Brackett F.S. Harecker B.L.** A rapid spectrophotometric method for determination of methemoglobin and carboxyhemoglobin. *J. biol. chem.* 1944, 152, strony 669-677.
36. **Ramieri A. Jatrow P., Seligson D.** New method for rapid determination of carboxyhemoglobin by use of double-wavelength spectrophotometry. *Clin. Chem.* 1974, 20, strony 278-281.
37. **Dorsch J. Köster E.** Eine Methode zur schnellen Bestimmung von Kohlenmonoxid im Blut mittels. *Atlas-Oxymeter Med. Welt.* 1965, 9, strony 1068-1070.
38. **Dubowski K. M. Luke J. L.** Measurement of carboxyhemoglobin and carbon monoxide analysis in blood. *Analyt. Chem.* 1972, 44, strony 74-76.
39. **Small K.A., i inni i inni.** A rapid method for simultaneous measurement of carboxy- and methemoglobin in blood. *J. appl. Physiol.* 1971, 31, strony 154-160.
40. **G. Zijlstra W.** Die quantitative Bestimmung von Hämoglobin, Oxyhämoglobin, Kohlenoxid hämoglobin und Methämoglobin in kleinen Blutproben mittels Spektrophotometrie. *Klin. Wochenschr.* 1956, 34, strony 384-389.
41. **Müller R.K.** Die toxikologisch - chemische Analyse. Kohlen-monoxid. *Steinkopff. Dresden.* 1976, strony 184-185.
42. **Commins B.T. i Lawther P.J.** A sensitive method for the determination of carboxyhemoglobin in a finger prick sample of blood. *Brit. J. ind. Med.* 1965, 22, strony 139-143.
43. **Witkiewicz Z.** Podstawy chromatografii. *Wydawnictwa Naukowo-Techniczne.* 2005.
44. **Zbiorowa Praca.** Poradnik fizykochemiczny. *WNT Warszawa.* 1974.
45. **Klys Małgorzata i Klementowicz W. Gomulka E., Opidowicz A., Kurowska W.** Badania nad przydatnością metody spektrofotometrycznej i chromatografii gazowej (GC/FID) z metanizerem do oznaczeń tlenku węgla we krwi sekcyjnej. *Arch. Med. Sąd. Krym.* 2000, 50, 3, strony 235-247.
46. **Munson J.M.** A Study Guide for gas and liquid chromatography. *Lexington, USA.* 1978.
47. **Thompson B.** Fundamental of gas analysis by gas chromatography. *Warian Press.* 1977.
48. **Pawelczyk E. i Wachowiak R.** Chromatografia gazowa w analizie leków Cz. I – Farmacja Polska. 1977, 32-7.
49. **Kisielew A.W. i Jaszin J.I.** Adsorpcyjna chromatografia gazowa. *PWN Warszawa.* 1969.
50. **Sörbo B. H.** On the mechanism of rhodanese inhibition by sulfite and cyanide. *Acta chem. Scand.* 1962, 16, strony 2455-2456.
51. **Williams P i B Ballantyne S P Boardman, J Bright, D J Coffee, T D Webber.,** Tissue cyanide concentrations and cytochrome oxidase in experimental cyanide poisoning. *Br J Pharmacol.* 1972, February, 44(2), strony 382-383.
52. **Ballantyne B.** Changes in Blood Cyanide as a Function of Storage Time and Temperature. *J. Forensic Sci. Soc.* 1976, 16, strony 305-310.
53. **Ballantyne B., Bright J. i Williams P.** Experimental assessment of decreases in measurable cyanide levels in biological fluids. *J. Forensic Sci. Soc.* 1973, 13, strony 111-117.
54. **Bogdanik T.** Toksykologia kliniczna. *PZWL.* 1988.
55. **Schilling-Siengalewicz S.** Toksykologia. *PZWL.* 1952.
56. **Moeschlin S.** Zatrucia - klinika i leczenie. *PZWL.* 1960.
57. **Frankenberg L i Sörbo B.** Effect of Cyanide Antidotes on the Metabolic Conversion of Cyanide to Thiocyanate. *Arch. Toxicol.* 1975, 33, strony 81-89.
58. **Friedberg K.D. i Shukla U.R.** The Efficiency of Aquocobalamine as an Antidote in Cyanide Poisoning when Given Alone or Combined with Sodium Thiosulfate. *Arch. Toxicol.* 1975, 33, strony 103-113.
59. **Rodkey F. i Collison Harold A.** Determination of Cyanide and Nitroprusside in Blood and Plasma. *Clinical Chemistry.* 1977, vd 23 nr 11, strony 1969-1975.
60. **Pawlaczyk J., Grochmalicka-Mikolaczek J. i Umbreit M.H.** Ćwiczenia z chemii analitycznej jakościowej iz podstaw chemii ogólnej. *WUAM Poznań.* 1979.
61. **Rieders F.** Methodology for Analytical Toxicology. strony 113-117.
62. **Feldstein M. i Klendshoj N.C.** The determination of cyanide in biological fluids by microdiffusion analysis. *J. Lab. Clin. Med.* 1954, 44, strony 166-170.
63. —. The determination of volatile substances by microdiffusion analysis. *J. Forensic Sci.* 1957, 2/1/, str. 30.
64. **Malatesta P. i Ceccarini G.** New reagents for colorimetric microdetermination of cyanide. *Bolletino della Societa Italiana di Biologia Sperimentale.* 1981, 120/11/, strony 681-686.
65. **Prochazka L., Polakovicz J. i Opekar F.** Oznaczanie cyjanków w destylatach z owoców pestkowych. *Przemysł fermentacyjny i owocowo-warzywny.* 1988, 8, strony 7-10.
66. **Mc Analley B.H., i inni i inni.** Determination of inorganic sulfide and cyanide in blood using specific ion electrodes. *J. Analyt. Tox.* 1979, 3, strony 111-114.
67. **Egekeze J.O. i Oeheme F.W.** Direct potentiometric method for the determination of cyanide in biological materials. *J. Analyt. Tox.* 1979, 3, strony 119-124.
68. **Volentour J.C., Aggarwal V. i Sunshine J.** Sensitive gas chromatographic determination of cyanide. *Anal. Chem.* 1974, 46, str. 924.

69. **Thomson I. i Anderson R.A.** Determination of cyanide and thiocyanate biological fluids by gas chromatography mass spectrometry. *Anal. Abstr.* 1980, vol. 39, str. 4 D 21.
70. **McAuley E. i Reive D.S.** Rapid quantitation of cyanide in blood by gas chromatography. *Anal. Abstr.* 1984, vol 46, str. 5 D 26.
71. **Zamecnik J. i Tam J.** Cyanide in blood by gas chromatography with N-P detector and acetonitrile as internal standard. *Anal. Abstr.* 1987, vol. 49, str. 10 D 33.
72. **Imanari T., Tanabe S. i Toida T.** Simultaneous determination of cyanide and thiocyanate by high - performance liquid chromatography. *Anal. Abstr.* 1983, vol. 45, str. 1 D 39.
73. **Peters J.W.** H₂S poisoning in a hospital setting. *JAMA.* 1981, 246, strony 1588-1589.
74. **Nagata T.** Sulfide concentrations in postmortem mammalian tissues. *J. Forensic Sci.* 1990, 35, strony 706-712.
75. **Casarett Doull.** Toxicology. *Doull's, New York.* 1991.
76. **Florin T.H.J.** Hydrogen sulfide in faeces, determined with a direct spectrofotometric method. *Clin.Chim.Acta.* 1991, 196, strony 127-134.
77. **Dutkiewicz T.** Chemia toksykologiczna. PZWL, 1974.
78. **Reiffenstein R.J., Hulbert W.C. i Roth S.H.** Toxicology of hydrogen sulfide. *Annu. Rev. Pharm. Toxicol.* 1992, 32, strony 109-134.
79. **Wagner V. i Wagnerova M.** Relationship of blood protein levels to outdoor air pollutant concentrations in a semicohort of school-age children. *J. of Hyg. Epid. Microbiol. Immunol.* 1988, 32, strony 121-136.
80. **Tvedt B., Brunstad O.P. i Mathiesen T.** Nervous system damage caused by H₂S poisoning with-out unconsciousness. *Tidsskr. Nor. Laegeforen.* 1989, 109, strony 845-846.
81. **Jethon Z., Krasucki P. i Rogoziński A.** Normy fizjologiczno-higieniczne w medycynie przemysłowej. PZWL, 1982.
82. **Adelson L. i Sunshine I.** Fatal hydrogen sulfide intoxication. *Arch. Path.* 1966, 81, strony 375-380.
83. **Tvedt B. i Skyberg K.** Brain damage caused of hydrogen sulfide: a follow- up study of six patients. *Am. J. Ind. Med.* 1991, 20, strony 91-101.
84. **Beck J.F., Bradbury C.M. i Connors A.J.** Nitrite as antidote for acute hydrogen sulfide intoxication. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* 1981, 42, strony 805-809.
85. **Landrigen P.J. i Miller B.** The Arienyattah epidemic: Home interview data and toxicological aspects. *Lancet.* 1983, 11, strony 1474-1476.
86. **Smilkstein M.J. i Bronstein A.C.** Hyperbaric oxygen therapy for severe hydrogen sulfide poisoning. *J. Emerg. Med.* 1985, 3, strony 27-30.
87. **Ravza A.G., Carugo D. i Cerchiari E.L.** The treatment of hydrogen sulfide intoxication, oxygen versus nitrites. *Vet. Hum. Toxicol.* 1982, 24, strony 241-242.
88. **Debevere J.M. i Voets J.P.** A rapid microdiffusion method for the determination of sulfides in biological fluids. *Lab. Prac.* 1972, 21, strony 713-714.
89. **Goodwin L.R. i Francom D.** Determination of sulfide in brain tissue by gas dialysis/ ion chromatography: post mortem studies of two cases. *J. Anal. Toxicol.* 1989, 13, strony 105-109.
90. **Norma Polska.** Badania zawartości siarki i jej związków. *PN-82; C-04566.02.*
91. **Allen T.H. i Root W.S.** An improved palladium chloride method for determination of carbon monoxide in blood. *J. biol. chem.* 1944, 152, strony 669-677.
92. **Dietz G.** Gerichtliche Medizin. *Barth. Leipzig.* 1975.
93. **Kunzman Gary, W., Presses Carolyn, L. i Rodriguez Paola.** Carbon Monoxide Stability in Stored Postmortem Blood Samples. *J. Anal. Toxicol.* 2000, vol. 24, strony 572-578.
94. **Vogel A.,I.** Preparatyka organiczna. WNT, 1964.
95. **Peterson J.E. i Stewart R.D.** Absorption and elimination of carbon monoxide by inactive young men. *Arch. Env. Health* 21: 165-171, 1970. Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man:.

Spis rycin

Rysunek 1	Struktura zatruc \acute{e} śmiertelnych w Poznaniu w latach 2002 – 2010	4
Rysunek 2	Mechanizm substytucyjnego wiązania tlenku węgla: $HbO_2 + CO \Leftrightarrow HbCO + O_2$	11
Rysunek 3	Zawartość karboksyhemoglobiny we krwi i objawy zatrucia w zależności od stężenia CO w powietrzu /pomieszczenie zamknięte/, czasu przebywania i stopnia wysiłku fizycznego.....	13
Rysunek 4	Model cząsteczki hemoglobiny	16
Rysunek 5	Powinowactwo i mechanizm wiązania tlenku węgla przez hemoglobinę i mioglobinę	18
Rysunek 6	Zależność graficzna wysycenia hemoglobiny tlenem przy różnym ciśnieniu parcjnym	19
Rysunek 7	Widma w ultrafiolecie /A/ - COHb /B/ - Hb hemoglobina zredukowana /C/ - próbka krwi pacjenta zatrutego tlenkiem węgla.....	24
Rysunek 8	Schemat budowy detektora przewodnictwa cieplnego (TCD)	27
Rysunek 9	Schemat przemian biochemicznych cyjanowodoru w organizmie człowieka	36
Rysunek 10	Reakcja barwna z udziałem chloraminy T i kwasu barbiturowego	44
Rysunek 11	Schemat reakcji H_2S z N-N-dimetylo-p-fenylendiaminą i $FeCl_3$	54
Rysunek 12	Reakcja z tiofluoresceiną i kwasem o-hydroksyrtęciobenzoowym	55
Rysunek 13	Zależność $Ab = f(c)$ (A-krzywa kalibracyjna) dla metody spektrofotometrycznej oznaczania siarkowodoru w reakcji barwnej z N-N-dimetylo-p-fenylendiaminą, (B-zapis graficzny pomiarów)	63
Rysunek 14	Wykres kalibracyjny $A = f(c)$ dla metody spektrofotometrycznej (analiza H_2S w roztworach wodnych).....	67
Rysunek 15	Wykres kalibracyjny $A = f(c)$ dla metody spektrofotometrycznej (analiza H_2S w osoczu krwi ludzkiej).....	67
Rysunek 16	Fiolki użyte w technice „headspace”.....	70
Rysunek 17	Kolejne etapy wykonania analizy:.....	71
Rysunek 18	Rozdział chromatograficzny uzyskany na Hays Sep Q.	
Rysunek 19	Rozdział chromatograficzny na wybranych stałych fazach adsorpcyjnych:.....	73
Rysunek 20	Wykres kalibracyjny $h = f(c)$ dla metody chromatograficznej	75
Rysunek 21	Wykres kalibracyjny $R = f(c)$ dla metody chromatograficznej.....	77
Rysunek 22	Średnie stężenia siarkowodoru w wybranych narządach po zatruciu śmiertelnym. (w μg na gram tkanki).....	81
Rysunek 23	Zmiany wartości absorpcji dla zróżnicowanych stężeń siarkowodoru poszczególnych narządach wybranego losowo szczura analizowane metodą spektrofotometryczną.....	81
Rysunek 24	Graficzne zależności stężenia siarkowodoru w badanym materiale sekcyjnym oznaczane metodą UV/VIS i GLC-TCD	84
Rysunek 25	Generator do otrzymania tlenku węgla.....	90
Rysunek 26	Krzywa kalibracji $w = f(c)$: w – wartość liczbowa wskazań integratora, c - stężenie - COHb (w%).	92
Rysunek 27	Wykres kalibracji $w = f(c)$, w – wartość liczbowa wskazań integratora, c - stężenie - COHb (w%).	95
Rysunek 28	Graficzne porównanie metod /GC, Met. Wolfa, Met. Wolfa z dosycaniem oraz Hemooksymetru/	100
Rysunek 29	Notowane zakresy stężeń HCN we krwi i wybranych narządach szczura /n=5/ po ostrym śmiertelnym zatruciu /KCN/ w $\mu g/g$ tkanki	106
Rysunek 30	Komora mikrodyfuzyjna Conwaya używana do izolacji lotnych trucizn nieorganicznych.....	107
Rysunek 31	Zależność graficzna absorpcji funkcją stężenia jonów cyjankowych $Ab = f/c$ dla analizowanych roztworów wodnych cyjanków.....	108
Rysunek 32	Zależność $Ab = f/t$ min dla analizowanego roztworu wodnego KCN c = 2 mg CN $^-$ /dm 3	109
Rysunek 33	Zależność $Ab = f/t$ min dla analizowanego roztworu w krwi KCN c = 2mg CN $^-$ /L.....	110
Rysunek 34	Zależność $Ab = f/c$ dla analizowanych roztworów wodnych z uwzględnieniem optymalnego czasu dyfuzji.....	111
Rysunek 35	Zależność $Ab = f/c$ dla analizowanych roztworów krwi z uwzględnieniem optymalnego czasu dyfuzji:	113
Rysunek 36	Wykres kalibracji $w = f(c)$	118
Rysunek 37	Krzywa kalibracyjna $A = f(c)$ dla oznaczenia HCN metodą chromatograficzną z użyciem detektora NPD.....	119
Rysunek 38	Rozdział chromatograficzny /HCN/ metodą GLC/NPD.....	121
Rysunek 39	Dokumentacja dotycząca zbiornika gnojowicy o głębokości ok. 3m	123
Rysunek 40	Dokumentacja – pracy wentylatora napowietrzającego zbiornik gnojowicy.....	124

Spis tabel

Tabela 1 Wybrane parametry fizyko-chemiczne	8
Tabela 2 Poziom emisji podstawowych zanieczyszczeń powietrza pochodzących z transportu drogowego w Polsce.....	10
Tabela 3 Skład chemiczny najczęściej używanych gazów przemysłowych dla celów energetycznych	10
Tabela 4 Zależność stężenia COHb we krwi w odniesieniu od czasu ekspozycji oraz stężenia CO w atmosferze powietrza	14
Tabela 5 Przewodnictwo cieplne wybranych gazów w temp. 0°C (43)	28
Tabela 6 Rodzaje chromatografii w zależności do zastosowanych faz stacjonarnych i ruchomych (45).....	29
Tabela 7 Względne czasy retencji (w odniesieniu do etanolu) dla wybranych gazów w zależności od zastosowanego adsorbentu Chromosorb (44).....	30
Tabela 8 Względne czasy retencji (w odniesieniu do etanolu) dla wybranych gazów w zależności od zastosowanego adsorbentu Porapak (46).....	31
Tabela 9 Wybrane parametry fizykochemiczne cyjanowodoru (43).....	33
Tabela 10 Występowanie glikozydów cyjanowodorowych w świecie rośliny.....	34
Tabela 11 Wybrane parametry fizykochemiczne siarkowodoru (43).....	49
Tabela 12 Działanie siarkowodoru zawartego w powietrzu na organizm człowieka (79), (83).....	51
Tabela 13 Czterostopniowa skala niedoboru tlenu	57
Tabela 14 Rozcieńczenia roztworu podstawowego H ₂ S	63
Tabela 15 Wyniki pomiarów absorbancji roztworów wzorcowych siarkowodoru w roztworach wodnych.	64
Tabela 16 Wyniki pomiarów absorbancji roztworów wzorcowych siarkowodoru w osoczu.....	65
Tabela 17 Rozcieńczenia roztworu podstawowego H ₂ S	74
Tabela 18 Średnie wartości wysokości pików h _x dla różnych stężeń H ₂ S	75
Tabela 19 Rozcieńczenia roztworu podstawowego H ₂ S	76
Tabela 20 Średnie wartości R (stosunek h _x /h _w) dla różnych stężeń H ₂ S	76
Tabela 21 Analiza powtarzalności 10 prób o stałym stężeniu H ₂ S (0,2g/dm ³).....	77
Tabela 22 Masa narządów użyta do oznaczeń siarkowodoru.	79
Tabela 23 Stężenie H ₂ S (mg/dm ³) i czas trwania śmiertelnej intoksykacji badanych szczurów	80
Tabela 24 Stężenie H ₂ S w µg/gram tkanki.....	80
Tabela 25 Analiza istotnych różnic średnich zawartości siarkowodoru w porównywanych narządach z wykorzystaniem testu DUNCANA	82
Tabela 26 TABELA RÓŻNIC.....	83
Tabela 27 Stężenia siarkowodoru w materiale sekcyjnym ofiar przypadków śmiertelnych w pomieszczeniach systemów sanitarnych.....	85
Tabela 28 Przetworzenie próbek krwi o różnym wysyceniu CO.....	91
Tabela 29 Wskazania integratora jako funkcji stężenia CO Hb	92
Tabela 30 Wskazania integratora jako funkcji stężenia COHb	95
Tabela 31 Ocena powtarzalności uzyskiwanych wyników	96
Tabela 32 Zawartość karboksyhemoglobiny /COHb/ w badanych próbkach krwi ustalonej alternatywnymi metodami analitycznymi.	98
Tabela 33 Statystyki opisowe.....	99
Tabela 34 Test Shapiro – Wilka każdej metody /brak zgodności z rozkładem normalnym /wartości p na czerwono/	99
Tabela 35 Test nieparametryczny w modelu zmiennych powiązanych Friedmana /porównuje wszystkie metody każda z każdą/	99
Tabela 36 Test wielokrotnych porównań Dunna.....	99
Tabela 37 Test nieparametryczny Wilcoxon – porównujący metodę GC z trzema pozostałymi metodami.....	100
Tabela 38 Zmiany stężenia COHb w czasie przechowywania próbek krwi w temp. 20°C, * - wartość COHb w czasie przechowywania próbek krwi w temp. ± 5°C	102
Tabela 39 Notowane zakresy stężeń HCN we krwi i wybranych narządach szczura /n=5/ po ostrym śmiertelnym zatruciu /KCN/ w µg/g tkanki	105
Tabela 40 Zależność absorbancji funkcją stężenia $Ab = f/c/$	108
Tabela 41 Zależność $Ab = f/t/ \text{ min}$	109
Tabela 42 Zależność $Ab = f/t/ \text{ min}$	109
Tabela 43 Profil stężeniowy wodnych roztworów wzorcowych CN ⁻ mg/dm ³ użytych do dyfuzji w Komorze Conwaya.....	110
Tabela 44 Zależność $Ab = f/c/$, uzyskane dla kalibracji krzywej wzorcowej cyjanków w roztworze wodnym	111
Tabela 45 Profil stężeniowy roztworów wzorcowych we krwi CN ⁻ mg/dm ³	112
Tabela 46 Zależność $Ab = f/c/$ roztwór podstawowy KCN 0.001% i 0.01% w krwi, dyfuzja 3 godziny w temp. 37°C.....	112

Tabela 47 Analiza statystyczna wyników oznaczeń CN ⁻ we krwi metodą spektrofotometryczną z odczynnikiem barbiturowo - pirydynowym	115
Tabela 48 Rozcieńczenia roztworu podstawowego KCN	117
Tabela 49 Wskazania integratora funkcją stężenia HCN	117
Tabela 50 Rozcieńczenia roztworu podstawowego KCN	119
Tabela 51 Wyniki pomiarów wskazań integratora dla zróżnicowanych stężeń cyjanowodoru /µg/ml/	119
Tabela 52 Analiza gazu z nad cieczy zabezpieczonej w plastikowych pojemnikach nr 1 i 2 na wypełnieniu HAYE SEP Q w przeliczeniu na zawartość procentową /%/;	125
Tabela 53 Analiza gazu z nad cieczy zabezpieczonej w plastikowych pojemnikach nr 1 i 2 na wypełnieniu Sito Molekularne 5A w przeliczeniu na zawartość procentową /%/;	125