

THE USE OF GAS CHROMATOGRAPHY IN CHEMICAL DIAGNOSIS OF POISONINGS WITH CYANIDES

Roman WACHOWIAK, Jarosław TOBOLSKI

Chair and Department of Forensic Medicine, Medical Academy, Poznań

ABSTRACT: A procedure for the quantitative and qualitative analysis of cyanide (HCN) in biological material using gas chromatography with thermoionic detection (NPD) and the headspace technique was proposed. The distribution of cyanides in individual organs was established in a group of experimental animals (Wistar strain rats, sacrificed due to termination of reproduction). The suitability of the technique was tested in conditions of routine toxicological work on autopsy material from animals (Alsatian dogs killed by criminals).

KEY WORDS: Cyanide analysis; GC/NPD detection; Headspace technique.

Problems of Forensic Sciences, vol. LV, 2003, 100–108

Received 17 November 2003; accepted 8 December 2003

INTRODUCTION

Prussic acid and its salts – cyanides – belong to the most dangerous group of chemical poisons noted in cases of poisonings. Recently, a significantly lower percentage of accidental or deliberate poisonings among people have been observed, which one should attribute to the restrictive legislation governing the distribution of all chemical compounds dangerous to life, including (especially) dangerous compounds that are derivatives of cyanide. During the last two years, a new phenomenon has been observed – the criminal use of cyanides in order to put to death dogs protecting special places (stores or warehouses). The necessity of quick identification of cyanide as the xenobiotic and determination of its effective concentration in *post-mortem* material requires suitable toxicological examinations confirming exposure to its activity.

Methods of analysis of cyanides in *post-mortem* material used up till now are based upon three main procedures: spectrophotometric methods [3, 4], selective ionic electrodes [2, 5] and gas chromatography using the headspace technique with various detection methods (TCD, NPD) [1, 6, 7, 8, 9, 10].

The aim of the study was to elaborate a method of qualitative and quantitative analysis of cyanides by means of a chromatographic system such as dual – FID/NPD that is routinely used for forensic examinations. Alternative routine utilisation of the selective and sensitive NPD thermoionic detec-

tor allows us to carry out a directed analysis of chemical compounds containing nitrogen or phosphorus, e.g. cyanides.

MATERIAL AND METHODS

Qualitative and quantitative examinations were performed using an AutoSystem XL chromatograph by Perkin Elmer, equipped with an NPD detector in the DUAL system with a flame ionisation detector (FID). A capillary column of 0.53 mm diameter and 30 m length, with a SUPEL-Q PLOT phase by Supelco was used. In order to obtain an optimal chromatographic separation of the prussic acid, the following temperature parameters were applied: thermostat 60°C, injection chamber 230°C, detector 250°C and flows of gases: carrying – helium (volume flow of 0.30 ml/min), for the detector – hydrogen 2.0 ml/min and air 100 ml/min.

Quantitative examinations were performed with the simplified headspace technique, consisting in analysis of vapours from above the solution of blood or the homogenate of tissues, containing gaseous HCN released from an acidic environment (H_2SO_4).

THE ANALYTICAL PROCEDURE

A sample of blood (1 cm^3) was placed in a reactive phial adapted for analysis by the headspace method; in the case of tissue, an examined sample equivalent to a mass of about 1 g was previously pulped in a mortar. After closing the phial with a membrane, 0.5 cm^3 of 10% H_2SO_4 was added, then after 4 minutes of gentle shaking (at room temperature – about 20 C), 0.5 cm^3 of vapours containing the released prussic acid was collected and injected into the injection chamber of the chromatograph.

THE CALIBRATION CURVE

In order to establish the linearity of the method of quantitative analysis of cyanides, suitable standard solutions (range 2.5–50 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$) were prepared by appropriate dilution of basic aqueous solution of potassium cyanide containing 1 mg of HCN (1 cm^3). Using the same procedure as in the case of the biological material, the equation $a = f(c)$ was checked, where: a – the value of the indications of the chromatograph integrator corresponding to a defined concentration of HCN ($c - \mu\text{g}/\text{cm}^3$).

SELECTION OF POST-MORTEM MATERIAL AND INTERPRETATION OF THE EFFECTIVENESS OF THE POISONING

In order to select the best post-mortem material for toxicological examinations, an appropriate experiment was carried out. The distribution of cyanides in particular organs and body fluids was checked in a group of experimental animals (Wistar strain rats) designated for termination, as their reproductive abilities had finished. To this end, potassium cyanide (15 mg/kg) was fed directly into the alimentary canal of the rats by a tube. Then, after the death of the animals, blood and internal organs (liver, brain, kidneys and thigh muscle) were collected for examinations.

RESULTS

The proposed conditions of qualitative analysis (Figure 1) can be utilised for the purposes of quantitative analysis.

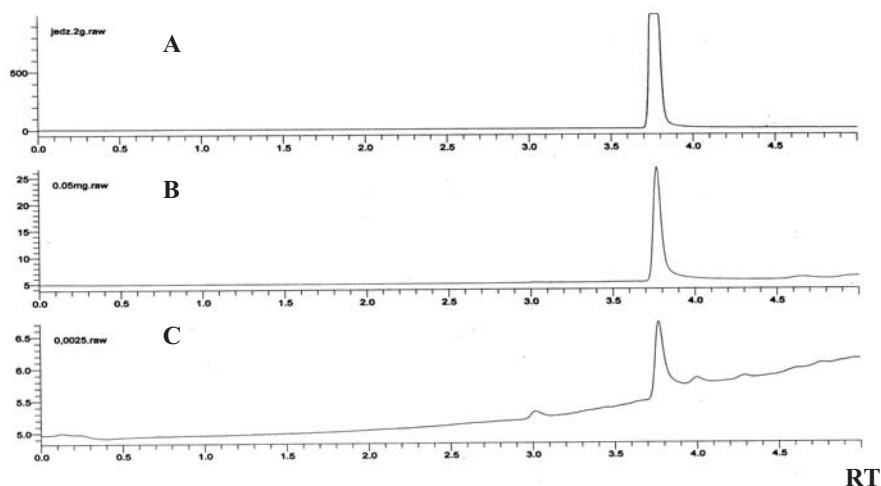


Fig. 1. Chromatographic separation (HCN) by the GLC/NPD method. A – Analysis of evidence material (food collected from the gullet of a dog); analysis of standard-solutions: B – $50 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ of HCN, C – $2.5 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ of HCN.

The performed quantitative analysis of prussic acid, on the basis of the equation $a = f(c)$, using the simplified headspace technique as a routine method, is an exceptionally simple and quick methodical procedure in the case of diagnosing poisonings. The process of releasing prussic acid at room temperature and the precise collection of gases from the headspace of the reactive phial using a Hamilton gas syringe ensures sufficient repeatability of

the injection without the necessity of using an internal standard with a different retention time to that of the compound being determined. The equation $a = f(c)$ for the calibration curve (Figure 2) approximates to the equation of type $y = ax$ with a high value of correlation coefficient, i.e. $R = 0.987$.

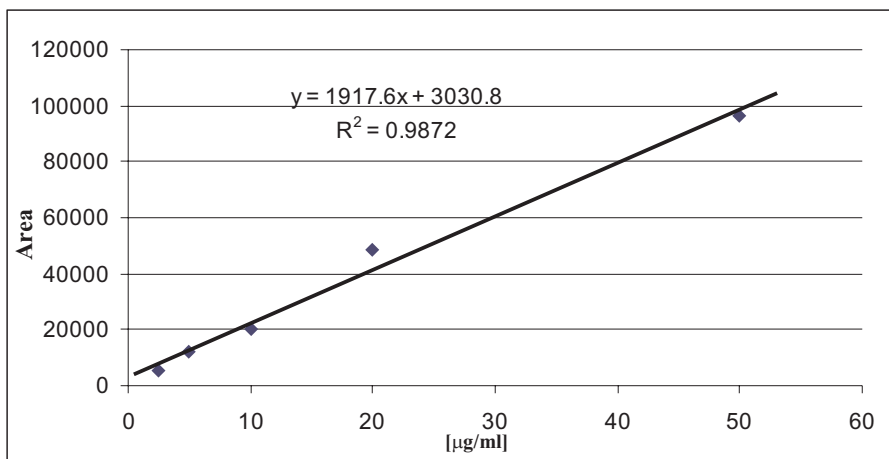


Fig. 2. The calibration curve $a = f(c)$ for determination of HCN by the chromatographic method using an NPD detector.

The established calibration range, 2.5–50 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ and the detectability of HCN using the NPD detector are about 10 times higher than using the thermal conductivity detector (TCD) [9] and are highest in the initial period of the operation of the detector.

Analysis of the repeatability of determinations of prussic acid using the proposed method for the established range of the calibration curve revealed respectively: the standard deviation of an individual result, $s = 3.2$; the percentage of the relative standard deviation, $sr = 2.29$; the standard deviation of the average result = 1.43; the confidence range at the level of probability, 0.95 ($t = 2.776$ for $n = 5$); $\mu = \pm tx(97.2\% \pm 3.96)$.

The performed statistical evaluation of the obtained results reveals great reproducibility and the obtained values of the relative standard deviation for the determined prussic acid would not exceed a value of 3%, typical for sensitive instrumental analytical methods.

The usefulness of the method was ascertained in conditions of the planned experiment whose aim was to establish mean values of concentrations of prussic acid in chosen organs of a rat during intoxication.

The range of concentrations of prussic acid in particular organs of the examined rats is presented in Figure 3. The obtained results reveal that the

concentration of prussic acid was significantly highest in blood – and then, in decreasing order – in the liver, kidneys, brain and muscles.

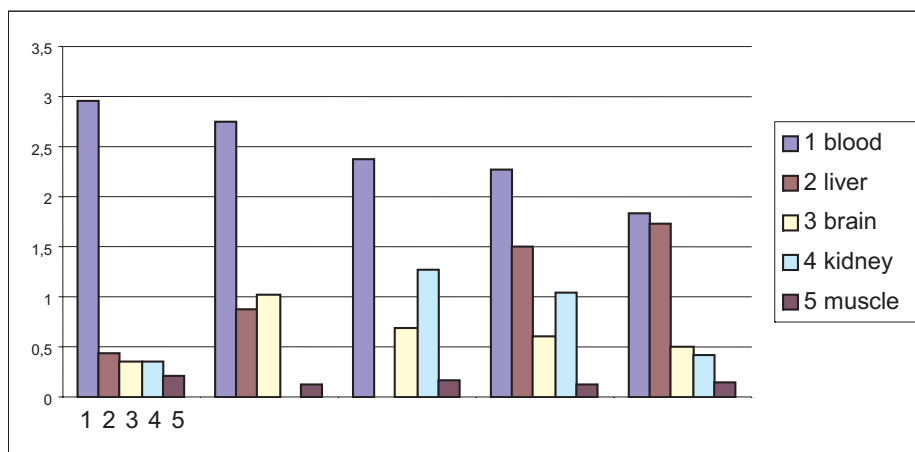


Fig. 3. The observed ranges of concentrations of HCN in blood and chosen organs of the rat ($n = 5$) after acute lethal intoxication with KCN (blood, the liver, the brain, the kidney and the muscle).

The high chemical affinity of the cyanide ion for haemoglobin indicates that blood should be acknowledged as the most preferable biological material, which should be secured for toxicological examinations in the case of suspicion of intoxication with this xenobiotic.

CONCLUSIONS

- The gas chromatography method (headspace technique) with the use of an NPD detector allows quick identification of prussic acid (HCN) in biological material.
- Comparative analysis reveals that calibration ranges obtained using GLC/NPD are comparable to the calibration range of spectrophotometric methods and about ten times higher than the calibration range obtained by the GLC/TCD method.
- The NPD thermoionic detector, in comparison to the thermal conductivity detector (TCD), reveals an appropriate specificity and a high sensitivity of detection of prussic acid, which is a requisite for qualitative-quantitative analysis in biological material.

References:

1. Darr R. W., Capson T. L., Hileman F.D., Determination of hydrogen cyanide in blood using gas chromatography with alkali thermoionic detection, *Analytical Chemistry* 1980, vol. 52, pp. 1379–1381.
2. Egekeze J. O., Oehme F. W., Direct potentiometric method for the determination of cyanide in biological material, *Journal of Analytical Toxicology* 1979, vol. 3, pp. 119–124.
3. Feldstein M., Klendshaj N. C., The determination of cyanide in biological fluids by microdiffusion analysis, *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 1954, vol. 44, pp. 166–170.
4. Laforge M., Buneaut P., A rapid spectrophotometric blood cyanide determination applicable to emergency toxicology, *Journal of Analytical Toxicology* 1994, vol. 18, pp. 173–175.
5. McAnalley B. H., Lowry W. T., Oliver R. [et al.], Determination of inorganic sulfide and cyanide in blood using specific ion electrodes, *Journal of Analytical Toxicology* 1979, vol. 3, pp. 111–114.
6. Odoul M., Fouillet B., Nouri B., Specific determination of cyanide in blood by headspace gas chromatography, *Journal of Analytical Toxicology* 1994, vol. 18, pp. 205–207.
7. Sano A., Takimoto N., Takitani S., High-performance liquid chromatographic determination of cyanide in human red blood cells by pre-column fluorescence derivatization, *Journal of Chromatography* 1992, vol. 582, pp. 131–135.
8. Valentour J. C., Aggarwal V., Sunshine I., Sensitive gas chromatographic determination of cyanide, *Analytical Chemistry* 1974, vol. 46, pp. 924–925.
9. Wachowiak R., Tobolski J., Wykorzystanie chromatografii gazowej w toksykologicznej analizie lotnych związków nieorganicznych w materiale biologicznym, *Archiwum medycyny sądowej i kryminologii* 1997, t. 47, s. 237–243.
10. Zamecnik J., Tam J., Cyanide in blood by gas chromatography with NP detector and acetonitrile as internal standard, *Journal of Analytical Toxicology* 1987, vol. 11, pp. 47–48.

WYKORZYSTANIE CHROMATOGRAFII GAZOWEJ W DIAGNOSTYCE CHEMICZNEJ ZATRUĆ CYJANKAMI

Roman WACHOWIAK, Jarosław TOBOLSKI

WSTĘP

Cyjanowodór i jego sole – cyjanki – należą do grupy najbardziej niebezpiecznych trucizn chemicznych notowanych w kazuistce zatruć. W ostatnim okresie obserwuje się zdecydowanie niższy procentowy wskaźnik zatruć przypadkowych czy rozmyślnych wśród ludzi, co należy przypisać restrykcyjnym przepisom ustawodawczym regulującym dystrybucję wszystkich związków chemicznych zagrażających życiu, w tym szczególnie niebezpiecznych związków cyjanopochodnych. Podczas ostatnich dwóch lat zwrócono uwagę na nowe zjawisko – przestępczego użycia cyjanków w celu likwidacji psów chroniących obiekty specjalne (magazyny, hurtownie). Konieczność dokonania szybkiej identyfikacji ksenobiotyku i określenie efektywnego stężenia cyjanku w materiale sekcyjnym wymaga odpowiednich badań toksykologicznych, potwierdzających narażenie na jego działanie.

Dotychczasowe metody analityczne cyjanków w materiale sekcyjnym oparte są na trzech podstawowych postępowaniach: z wykorzystaniem metod spektrofotometrycznych [3, 4], selektywnych elektrod jonowych [2, 5] oraz chromatografii gazowej z użyciem techniki *headspace* przy zróżnicowanych technikach detekcji (TCD, NPD) [1, 6, 7, 8, 9, 10].

Celem badań było opracowanie metody analizy jakościowo-ilościowej cyjanków z wykorzystaniem stosowanego w rutynowych ekspertyzach układu chromatograficznego w systemie DUAL-FID/NPD. Alternatywne rutynowe wykorzystanie selektywnego i czułego termojonowego detektora NPD pozwala dokonać ukierunkowanej analizy związków chemicznych zawierających azot lub fosfor, w tym cyjanków.

MATERIAŁ I METODY

Badania jakościowo-ilościowe przeprowadzono przy pomocy chromatografu AutoSystem XL firmy Perkin Elmer, wyposażonego w detektor NPD w układzie DUAL z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (FID). Stosowano kolumnę kapilarną o średnicy 0,53 mm i długości 30 m, z naniesioną fazą SUPEL-Q PLOT firmy Supelco. Dla uzyskania optymalnego rozdzielania chromatograficznego cyjanowodoru zastosowano następujące parametry temperaturowe: termostat 60°C, komora nastrzykowa 230°C, detektor 250°C oraz przepływy gazów: nośnego – hel (przepływ objętościowy 0,30 ml/min), dla detektora – wodór 2,0 ml/min, powietrze 100 ml/min).

Badania ilościowe przeprowadzono uproszczoną techniką *headspace*, polegającą na analizie par znad roztworu krwi lub homogenatu tkanek, zawierających gazowy HCN uwolniony z środowiska kwaśnego (H₂SO₄).

WYKONANIE OZNACZENIA

Próbkę krwi (1 cm^3) umieszcza się w fiolce reakcyjnej przystosowanej do analizy metodą *headspace*; w przypadku tkanki badaną próbkę równoważną masie $\pm 1 \text{ g}$ uprzednio rozciera się w moździerz. Po zamknięciu fiolki przez membranę dodaje się $0,5 \text{ cm}^3$ 10% H_2SO_4 , następnie po 4 minutach łagodnego wstrząsania (temperatura pokojowa $\pm 20^\circ\text{C}$) pobiera się $0,5 \text{ cm}^3$ par zawierających uwolniony cyjanowódór i wstrzykuje do komory nastrzykowej chromatografu.

KRZYWA KALIBRACYJNA

W celu ustalenia liniowości metody analizy ilościowej cyjanoków przygotowano odpowiednie roztwory wzorcowe (zakres $2,5\text{--}50 \mu\text{g}/\text{cm}^3$) przez odpowiednie rozcieńczenie podstawowego wodnego roztworu cyjanoku potasu zawierającego 1 mg HCN (1 cm^3). Postępując analogicznie jak przy wykonaniu oznaczenia, sprawdzono zależność $a = f(c)$, gdzie: a – wartość wskazań integratora chromatografu odpowiadająca określonymu stężeniu HCN ($c - \mu\text{g}/\text{cm}^3$).

DOBÓR MATERIAŁU SEKCYJNEGO A INTERPRETACJA SKUTECZNOŚCI ZATRUCIA

W celu dokonania oceny właściwego doboru najbardziej właściwego materiału sekcyjnego do badań toksykologicznych, wykonano odpowiedni eksperyment. Rozmieszczenie – dystrybucję cyjanoków w poszczególnych narządach i płynach ustrojowych sprawdzono na grupie zwierząt doświadczalnych (szczury rasy wistar) przeznaczonych do likwidacji z racji ukończonej zdolności do reprodukcji. W tym celu szczurom podano cyjanek potasu ($15 \text{ mg}/\text{kg}$) przez sondę bezpośrednio do przewodu pokarmowego. Następnie, po śmierci zwierząt, pobierano do badań krew oraz narządy wewnętrzne (wątroba, mózg, nerki i mięsień uda).

WYNIKI BADAŃ

Zaproponowane warunki analizy jakościowej (rycina 1) mogą być wykorzystane dla celów analizy ilościowej.

Przeprowadzona analiza ilościowa cyjanowodoru oparta na wyznaczeniu zależności $a = f(c)$ z zastosowaniem uproszczonej techniki *headspace* jako rutynowej metody, jest wyjątkowo prostym i szybkim postępowaniem metodycznym w przypadku diagnozowania zatrucia. Proces uwalniania cyjanowodoru w warunkach temperatury pokojowej oraz precyzyjne pobranie gazów z przestrzeni *headspace* fiolki reakcyjnej przy użyciu strzykawki gazowej Hamiltona zapewnia wystarczającą powtarzalność nastrzyku bez konieczności używania wzorca wewnętrznego o innym czasie retencji aniżeli związek oznaczany. Zależność sporządzonej krzywej kalibracji $a = f(c)$ (rycina 2) spełnia zależność zbliżoną do typu $y = ax$ o wysokim parametrze korelacji $R = 0,987$.

Ustalony zakres kalibracji $2,5\text{--}50 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ oraz oznaczalność HCN przy użyciu detektora NPD są około 10 razy wyższe aniżeli przy użyciu detektora przewodnictwa

cieplnego (TCD) [9] i zdecydowanie najwyższe w początkowym okresie eksploatacji detektora.

Analiza powtarzalności oznaczeń cyjanowodoru przy użyciu proponowanej metody dla ustalonego zakresu krzywej kalibracji wykazała odpowiednio: odchylenie standardowe wyniku pojedynczego $s = 3,2$; procentowe względne odchylenie standardowe $sr = 2,29$; odchylenie standardowe wyniku średniego $= 1,43$; przedział ufności na poziomie prawdopodobieństwa $0,95$ ($t = 2,776$ dla $n = 5$); $\mu = \pm tx$ ($97,2 \% \pm 3,96$).

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.

Przydatność metody stwierdzono w warunkach zaplanowanego eksperymentu, którego celem było ustalenie średnich wartości stężeń cyjanowodoru w wybranych narządach szczura podczas odbytej intoksykacji.

Zakres stężeń cyjanowodoru w poszczególnych narządach badanych szczurów przedstawia rycina 3. Uzyskane zależności wskazują, że zdecydowanie najwyższe stężenie cyjanowodoru było we krwi – i w dalszej malejącej kolejności – występowało w tkankach wątroby, nerek, mózgu oraz w mięśniach.

Wysokie powinowactwo jonu cyjankowego do hemoglobiny wskazuje, że krew należy uznać za najbardziej preferencyjny materiał biologiczny, który trzeba zabezpieczyć do badań toksykologicznych w przypadku podejrzeń intoksykacji tym ksenobiotykiem.

WNIOSKI

1. Metoda chromatografii gazowej (technika *headspace*) z użyciem detektora NPD pozwala na szybką identyfikację cyjanowodoru (HCN) w materiale biologicznym.
2. Analiza porównawcza zakresów kalibracji uzyskana przy zastosowaniu wspomnianych metod chromatograficznych wykazała, że zakres kalibracji metody GLC/NPD jest porównywalny z zakresem kalibracji metodami spektrofotometrycznymi, a około dziesięciokrotnie wyższy niż uzyskany metodą GLC z użyciem detektora przewodnictwa cieplnego (TCD).
3. Detektor termojonowy NPD w porównaniu z detektorem TCD charakteryzuje się odpowiednią specyfiką i wysoką czułością wykrywania cyjanowodoru, warunkującą analizę jakościowo-ilościową w materiale biologicznym.