



Colorimetrische bepaling van cyanide in volbloed met behulp van Conway microdiffusieschaaltjes

R. Langen, C. Wilbers en T. Egberts.
Laboratorium Ziekenhuisapotheek
Midden-Brabant
Dr. Deelenlaan 5
5042 AD Tilburg
RLangen@zamb.tsz.nl

Inleiding

Elk laboratorium kent wel een rustige periode waarin het monsteraanbod minder is. In ons laboratorium worden dit soort momenten aangegrepen om eens kritisch rond te kijken en daar waar nodig eens goed op te ruimen of schoon te maken. Het zal ergens eind 1995 geweest zijn toen één van ons weer die rare glazen schaaltes in handen had. Wat het was of waarvoor ze gebruikt werden, niemand wist het op dat

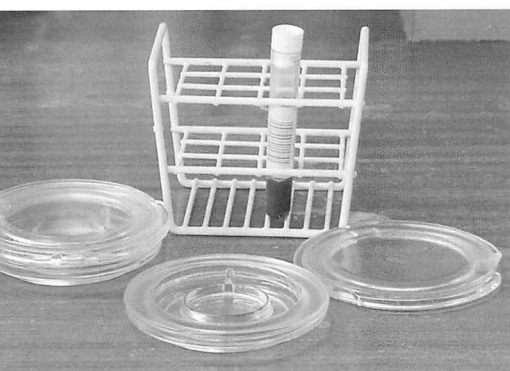
moment; weggooiden dus.

Tot begin 1996 het KKGK programma toxicologie zich aandiende: een cyanide aanvraag. Hoe moeten we dit analyseren? De toenmalig hoofd-analist wist raad: 'Geen probleem, de analyse staat in Clarke en Conway schaaltes hebben we ook nog'. 'Conway schaaltes?' 'Jawel, die zien er uit als.....' (figuur 1). Om een lang verhaal kort te maken: de schaaltes werden terug uit de doos uit de catacomben van het ziekenhuis gehaald. De analyse uitgevoerd en beschreven in een SOP. Omdat we maar 3 van deze Conway microdiffusieschaaltes hadden, hebben we geprobeerd deze bij te bestellen. Kennelijk dachten meer laboratoria er zo over waardoor Conway microdiffusieschaaltes tijdelijk niet leverbaar waren vanwege een explosief toegenomen vraag. De analyse van cyanide is nog onderwerp geweest van een gebruikersbijeenkomst toxicologie in december 1997. [1] Hierna werd het stil rondom de cyanide bepaling in ons laboratorium, tot december 2001. In deze maand werden 4 cyanide spiegels aangevraagd; 1 maal een auto-intoxicatie en 3 maal vanwege een bedrijfsongeval waarbij het personeel was blootgesteld aan acrylonitril en acetonitril.

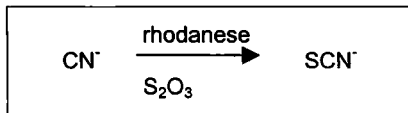
Cyanide

Cyanide en zijn afgeleiden worden gebruikt in bepaalde ontsmettingsprocedures, bij het galvaniseren en polijsten van metaal en in ertsextractie processen. Voor huis-tuin-en-keuken gebruik kan cyanide worden aangetroffen in rattengif en in zilverpoets.

Cyanide is een zeer toxisch, snel werkend vergift. De toxiciteit berust op de hoge affiniteit van cyanide voor hemoglobine in de erythrocyten. Hemoglobine is het transporteiwit voor zuurstof in het bloed. Door de sterke binding van cyanide kan zuurstof niet meer gebonden worden aan hemoglobine. Cyanide wordt bepaald in volbloed omdat het wordt gebonden aan de erythrocyten. Referentie concentraties van cyanide zijn kleiner dan 0,02 mg/L volbloed voor niet-rokers en kleiner dan 0,05 mg/L volbloed voor rokers. De toxische concentratie is groter dan 0,5 mg/L volbloed. Onmiddellijke start van een behandeling na mogelijke blootstelling is geboden, zonder dat op bevestiging door laboratoriumuitslagen wordt gewacht. De analyse van cyanide met Conway microdiffusie schaaltes kost veel tijd. Door brand van zowel natuurlijke als synthetische stikstof houdende



Figuur 1: Conway microdiffusieschaaltes.



Reactievergelijking 1:

Enzymatische conjugatie van thiocynaat uit cyanide en thiosulfaat door rhodanese (thiosulfaat cyanide zwavel transferase). Thiocynaat wordt uitgescheiden in de urine. [3]

polymeren kunnen waterstofcyanide bevattende rook en brandgassen ontstaan. Deze gassen worden verantwoordelijk gehouden voor 5% van alle letale brandslachtoffers. Andere mogelijke bronnen van cyanide intoxicatie zijn het gebruik van natriumnitroprusside bij de behandeling van hoge bloeddruk of blootstelling aan stikstof bevattende organische oplosmiddelen.

Natriumnitroprusside en stikstof bevattende organische oplosmiddelen (bijvoorbeeld acetonitril) worden in het lichaam gemetaboliseerd tot cyanide. Cyanide wordt gebonden aan eiwit en/of gemetaboliseerd tot thiocynaat (zie reactievergelijking 1). Bij een natriumnitroprusside therapie worden volbloed cyanide spiegels gemeten die als toxisch of zelfs letaal beschouwd kunnen worden, terwijl de patiënt toch geen tekenen van een intoxicatie vertoont. Een mogelijke verklaring voor dit fenomeen is de binding van cyanide aan methemoglobine bij natriumnitroprusside therapie. Gebonden aan dit eiwit is cyanide niet toxisch. Bij de analyse van cyanide in volbloed wordt dit gebonden cyanide vrij gemaakt met als resultaat een verhoogde cyanide spiegel die niet gerelateerd kan worden aan de dosis natriumnitroprusside of een cyanide intoxicatie. Er is geen geschikte laboratorium test voorhanden om de toxiciteit van cyanide spiegels te bepalen van patiënten die behandeld worden met natriumnitroprusside. [2,3]

Analyse

Conway microdiffusie werd in 1950 door Conway beschreven. [4] In het buitenste ringcompartiment van

een Conway microdiffusieschaaltje wordt cyanide uit volbloed vrijgemaakt als HCN gas door toevoeging van zwavelzuur. Het gevormde HCN gas wordt vervolgens kwantitatief geabsorbeerd in natronloog wat zich in het binnenste compartiment van het schaalpje bevindt.

In de literatuur worden verschillende analysemethoden voor cyanide in volbloed beschreven (zie tabel 1 voor een overzicht). [3]

In het laboratorium van de ziekenhuisapotheek Midden-Brabant wordt de methode gebruikt zoals deze beschreven is in Clarcke. [5] Na monstervoorbewerking volgens Conway wordt het in loog geabsorbeerde cyanide spectrofotometrisch bepaald bij 581 nm na complexering met chloramine T en barbituurzuur-reagens.

Tabel 1: Overzicht analyse methoden cyanide. [3]

Principe	Detectiegrens	Analyse methode, referenties
Conway microdiffusie	0,1 mg/L	Feldstein & Klendshoj 1954 [6]
		Pettigrew & Fell 1973 [7]
		Blanke 1976 [8]
Benzidine en pyridine methoden, colorimetrie	0,1 mg/L	Aldridge 1944 [9]
Dräger vacuüm bemonstering, colorimetrie	0,2 mg/L	Epstein 1947 [10]
	0,05 mg/L	Bruce et al. 1955 [11]
GC/NPD	0,05 mg/L	Zamecnik & Tam 1987 [12]

Materiaal en methode

De analyses zijn uitgevoerd met een Varian Cary 1E UV/VIS spectrofotometer. Conway microdiffusieschaaltjes zijn tegenwoordig weer leverbaar via Fisher Sci. Kaliumcyanide (KCN), kaliumdiwaterstoffosfaat (KH_2PO_4) en barbituurzuur ($\text{NHCONHCOCH}_2\text{CO}$) watervrij zijn geleverd door Baker. Chloramine T ($\text{C}_7\text{H}_7\text{ClNNaO}_2\cdot 3\text{H}_2\text{O}$), natriumhydroxyde (NaOH), zoutzuur 37% (HCl), zwavelzuur 95-97% (H_2SO_4), dinatriumwaterstoffosfaat dihydraat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$) en pyridine ($\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$) zijn verkregen bij Merck. Alle gebruikte reagentia zijn PA kwaliteit. Barbituurzuurreagens: Meng 3 gram barbituurzuur met 5 mL demi water. Voeg achtereenvolgens toe 5 mL pyridine, 25 mL demi water en 3 mL zoutzuur 37%. Meng en filtreer de oplossing in een stopperlenmeyer. Bereid deze oplossing altijd vers.

Monstervoorbereiding:

Neem altijd de standaarden 0,5 en 5,0 mg CN/L demiwater mee.

Neem een Conway microdiffusieschaaltje en vet de rand het schaalpje goed in met siliconenvet.

Pipetteer in het buitenste ringcompartiment van een Conway microdiffusieschaaltje, aan de ene kant 2,00 mL standaard of monster en aan de andere kant 2,00 mL

0,1 M H_2SO_4 . Let er op dat de twee vloeistoffen nu niet met elkaar in aanraking komen.

Pipetteer in het binnenste compartiment van het schaalpje 2,00 mL 0,1 M NaOH. Sluit het schaalpje.

Meng standaard en monster voorzichtig met het zuur door voorzichtig te zwenken. Vermijd hierbij contact van de inhoud van het binnenste compartiment met de inhoud van

het buitenste compartiment. Plaats de schaalpjes 2 uur in een stoof van 37°C. Maak nu het barbituurzuurreagens en de chloramine T 1% (g/v) oplossing. Breng na incubatie de inhoud van het binnenste compartiment kwantitatief over in een maatkolf van 50 mL. Spoel na met Sörensenbuffer pH 6,0. Vul de maatkolf aan met buffer tot ca. 40 mL. Voeg 2,00 ml 0,1 M HCl toe en meng de oplossing. Voeg nu 1,00 mL chloramine T oplossing toe en na precies 1 minuut 3,00 mL barbituurzuurreagens. Vul de maatkolf aan met buffer. Meet de standaarden en het monster tussen 5 en 20 minuten na reagenstoevoeging bij 581 nm ten opzichte van demi water.

De concentratie cyanide in volbloed wordt door middel van interpolatie op de lineaire regressielijn van de standaarden berekend.

Conclusie

De analyse van cyanide kan, in het kader van klinische toxicologie, kwalitatief uitgevoerd worden met Berlijns blauw, semi-kwantitatief met Dräger buisjes en kwantitatief met GC of colorimetrisch met Conway microdiffusie monstervoorbewerking. [1,13] De colorimetrische bepaling van cyanide met Conway microdiffusie is een relatief eenvoudige bepaling die gebruik maakt van algemeen gangbare apparatuur. Cyanide aanvragen hebben meestal geen cito karakter. Dit maakt dat de 2 uur durende incubatie geen bezwaar hoeft te zijn om gebruik te maken van deze 'klassieke' techniek.

Literatuur

1. Analyse cie. Gebruikersbijeenkomst toxicologie. Extract; 1998: 9(1);22.
2. http://www.aruplab.com/guides/clt/tests/clt_a164.htm
3. <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehd 54.htm>
4. Conway EJ. Microdiffusion analysis and volumetric error. New York, Van Nostrand Reinhold Co, 1950.
5. Clarcke's Isolation and Identification of Drugs. The Pharmaceutical Press, 2th ed, 1986:65-66.
6. Feldstein M & Klendshoj NC. The determination of cyanide in biologic fluids by microdiffusion analysis. J Lab Clin Med 1954;44: 166-170.
7. Pettigrew AR, & Fell GS. Microdiffusion method for estimation of cyanide in whole blood end its application to the study of conversion of cyanide to the thiocyanate. Clin Chem 1973;19:466-471.
8. Blanke RV. Analysis of drugs and toxic substances. In: Tietz NW 1976 ed. Fundamentals of clinical chemistry. Philadelphia, Pennsylvania, W.B. Saunders Co., 1117-1118.
9. Aldridge WN. A new method for the estimation of microquantities of cyanide and thiocyanate. Analyst 1944;69:262-265.
10. Epstein J. Estimation of microquantities of cyanide. Anal Chem 1947;19:272-274.
11. Bruce RB, Howard JW, & Hanzal RF. Determination of cyanide, thiocyanate, and alpha-hydroxynitriles in plasma or serum. Anal Chem 1955;27:1346-1347.
12. Zamecnik J & Tam J. Cyanide in blood by gas chromatography with NP detector and acetonitrile as internal standard. Application on air accident fire victims. J Anal Toxicol 1987;11:47-48.
13. Sibon C en Pepping T. Semi-kwantitatieve cyanide bepaling in volbloed. Extract;1996:7(3);11.