



Τμήμα Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών «Τοξικολογία»

**Δηλητηριάσεις με κυανιούχες ενώσεις και μέθοδοι
προσδιορισμού τους σε βιολογικά υγρά**

Cyanide poisonings and analytical methods of cyanides detection
in biological fluids

Αργυρώ Παπαδοπούλου
Φαρμακοποιός

ΛΑΡΙΣΑ 2022

Δηλητηριάσεις με κυανιούχες ενώσεις και μέθοδοι προσδιορισμού τους σε βιολογικά υγρά

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Μαρία Στεφανίδου- Λουτσίδου (Επιβλέπουσα): Καθηγήτρια Τοξικολογίας, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Δημήτριος Κουρέτας: Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών- Τοξικολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Αρτεμισία Ντονά: Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Τοξικολογίας, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας της Ιατρικής Σχολής, ΕΚΠΑ, στο πλαίσιο του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Τοξικολογία» του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια Χαρά Σπηλιοπούλου, Διευθύντρια του Εργαστηρίου Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών που δέχτηκε να εκπονήσω την διπλωματική μου εργασία στο Εργαστήριο.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω, ιδιαιτέρως, την κυρία Μαρία Στεφανίδου- Λουτσίδου, Καθηγήτρια Τοξικολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών, για την ανάθεση του θέματος της εργασίας καθώς και για την συνεργασία, την επίβλεψη, την καθοδήγηση, τις χρήσιμες και εποικοδομητικές συμβουλές της, προκειμένου να ολοκληρωθεί επιτυχώς η διπλωματική μου εργασία.

Θα ήθελα, επιπλέον, να ευχαριστήσω τον κύριο Σωτήρη Αθανασέλη, Καθηγητή Τοξικολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών για την πολύτιμη βοήθεια και την καθοδήγηση που μου προσέφερε, την κυρία Αρτεμησία Ντονά, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Τοξικολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών, για τη βοήθεια που μου προσέφερε και που δέχτηκε να συμμετέχει στην τριμελή επιτροπή, τον κύριο Samir Qammaz, Αναπληρωτή Καθηγητή στο Πανεπιστήμιο του Αμμάν της Ιορδανίας, για τις πολύτιμες συμβουλές που μου προσέφερε, καθώς και την εκπαίδευσή μου στον τομέα της μικροδιάχυσης και της φασματοσκοπίας. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω όλο το προσωπικό του Εργαστηρίου Τοξικολογίας που βοήθησε στην εκπαίδευσή μου, καθώς και για την πολύ καλή συνεργασία που είχαμε.

Επιπροσθέτως, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Δημήτρη Κουρέτα, Καθηγητή Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών και Τοξικολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την εν γένει συμβολή του στην παρούσα διατριβή.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και τους φίλους μου για τη βοήθεια και τη στήριξη που μου παρείχαν καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Αργυρώ Παπαδοπούλου,
Φεβρουάριος 2022

Περίληψη

Το υδροκυάνιο και τα κυανιούχα άλατα θεωρούνται εξαιρετικά τοξικά και ταχέως δρώντα δηλητήρια. Η απορρόφησή τους από τους βλεννογόνους είναι τάχιστα και κατανέμονται σε όλους τους ιστούς. Αναστέλλουν τη δράση πολλών ενζύμων, με πιο σημαντικό την οξειδάση του κυτοχρώματος c, με αποτέλεσμα την αναστολή της οξειδωτικής φωσφορύλιωσης, την παρεμπόδιση του αερόβιου μεταβολισμού και το θάνατο του κυττάρου από ανοξία. Το κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) και το καρδιαγγειακό επηρεάζονται περισσότερο από τις κυανιούχες ενώσεις που προκαλούν παράλυση και καρδιακή ανακοπή. Έχουν αναπτυχθεί αντίδοτα για την αντιμετώπιση της δηλητηρίασης, όμως είναι και αυτά τοξικά και πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνο σε περιπτώσεις επιβεβαιωμένης δηλητηρίασης από κυανιούχες ενώσεις. Ο προσδιορισμός των κυανιούχων ενώσεων μπορεί να πραγματοποιηθεί σε δείγματα αίματος, ούρων, σιέλου, ιστών και γαστρικού περιεχομένου. Πριν από την ανάλυση, απαιτείται, συνήθως, προκατεργασία του βιολογικού δείγματος, ώστε να απελευθερωθούν τα κυανιούχα από το βιολογικό υλικό, γεγονός που μπορεί να αυξήσει το χρόνο ανάλυσης. Στην εργασία αυτή, γίνεται περιγραφή του τοξικολογικού προφίλ του υδροκυανίου και των κυανιούχων ενώσεων και ανασκόπηση των μεθόδων που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό τους στα βιολογικά υγρά. Η εργασία αυτή φιλοδοξεί να παρουσιάσει τις σημαντικές μεθόδους ανάλυσης των κυανιούχων, ώστε να βοηθήσει στην επιλογή της καταλληλότερης, ανάλογα με τις δυνατότητες και τον εξοπλισμό του κάθε εργαστηρίου.

Λέξεις κλειδιά: υδροκυάνιο, κυανιούχες ενώσεις, δηλητηρίαση, προσδιορισμός, βιολογικά υλικά, μικροδιάχυση, φασματοφωτομετρία, χρωματογραφία

Summary

Cyanide is considered to be the most toxic and rapid acting poison. Its absorption by the mucous membranes is rapid and it is distributed throughout the tissues. Cyanide inhibits the action of cytochrome c oxidase resulting in the inhibition of oxidative phosphorylation and aerobic metabolism and the cell death from anoxia. The central nervous system (CNS) and the cardiovascular system are most affected by cyanide that causes paralysis and cardiac arrest. The antidotes for the treatment of poisoning are also toxic and should only be used in cases of confirmed cyanide poisoning. The cyanide determination can be performed in blood, urine, saliva, tissue and gastric content. Prior to the analysis, pretreatment of the biological sample is usually required in order to isolate the cyanide from the biological material, which may increase the analysis time. This paper presents the toxicological profile of cyanide and reviews the analytical methods for the determination of cyanide in biological fluids, in order to help in determining the most appropriate analytical method for cyanide identification according to the laboratory equipment.

Keywords: hydrogen cyanide, cyanides, poisoning, detection, biological fluids, microdiffusion, spectrophotometry, chromatography

Πίνακας περιεχομένων

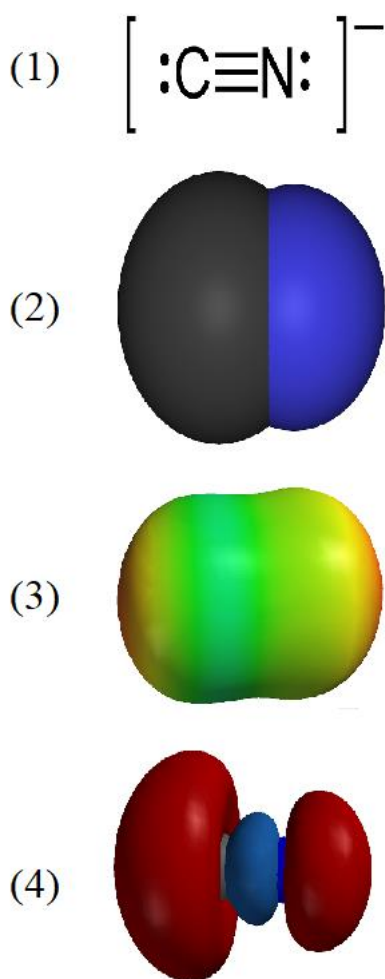
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	4
SUMMARY	5
1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
1.1 Ιστορία του υδροκυανίου και των κυανιούχων αλάτων	8
2 ΦΥΣΙΚΕΣ ΚΑΙ ΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΚΥΑΝΙΟΥΧΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ	10
3 ΠΗΓΕΣ ΕΚΘΕΣΗΣ ΚΑΙ ΧΡΗΣΕΙΣ ΚΥΑΝΙΟΥΧΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ.....	14
3.1 Πηγές κυανιούχων ενώσεων στη φύση.....	14
3.2 Ανθρώπινη δραστηριότητα και χρήσεις	17
3.3 Έκθεση πυροσβεστών και θυμάτων πυρκαγιάς σε κυανιούχες ενώσεις	20
4 ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΚΥΑΝΙΟΥΧΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ	22
4.1 Τοξικοκινητική.....	22
4.1.1 Απορρόφηση	22
4.1.2 Κατανομή	23
4.1.3 Βιομετατροπή.....	23
4.1.4 Απέκκριση	27
5 ΔΗΛΗΤΗΡΙΑΣΕΙΣ ΜΕ ΚΥΑΝΙΟΥΧΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ.....	28
5.1 Μηχανισμός τοξικής δράσης	28
5.2 Κλινική εικόνα οξείας και χρόνιας δηλητηρίασης	32
6 ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΔΗΛΗΤΗΡΙΑΣΕΩΝ.....	34
6.1 Διάγνωση	34
6.2 Θεραπεία.....	35
6.3 Αντίδοτα	36
6.3.1 Επαγωγείς σχηματισμού μεθαιμοσφαιρίνης	36
6.3.2 Δότες σουλφανικού θείου	37
6.3.3 Ουσίες που συνδέονται με τα κυανιούχα.....	38
6.3.4 Νέα, υπό έρευνα, αντίδοτα	39

ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΩΝ ΔΗΛΗΤΗΡΙΑΣΕΩΝ ΜΕ ΚΥΑΝΙΟΥΧΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ	41
7 ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ ΚΑΙ ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ	42
7.1 Δειγματοληψία μεταθανάτιου υλικού (post mortem)	47
8 ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΚΥΑΝΙΟΥΧΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΕ ΟΞΕΙΕΣ ΔΗΛΗΤΗΡΙΑΣΕΙΣ	48
8.1 Ποιοτική ανίχνευση	48
8.1.1 Lee- Jones test.....	48
8.1.2 Με χρήση χημειοαισθητήρα κορρίνης.....	50
8.1.3 Με χρήση κυανοκοβαλαμίνης (Βιταμίνη B ₁₂).....	52
8.2 Ποσοτικός Προσδιορισμός	54
8.2.1 Φασματοφωτομετρικές μέθοδοι (UV-Vis, Φθορισμομετρία).....	54
8.2.2 Χρωματογραφικές μέθοδοι (Υγρή και Αέρια Χρωματογραφία).....	63
8.2.3 Ηλεκτροχημικές μέθοδοι (Βολταμετρία, Ποτενσιομετρία).....	82
9 ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΑ ΔΗΛΗΤΗΡΙΑΣΕΩΝ ΜΕ ΚΥΑΝΙΟΥΧΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ.....	87
9.1 Περιστατικά από τη διεθνή βιβλιογραφία.....	87
9.2 Υποθέσεις του Εργαστήριου Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.....	89
10 ΣΥΖΗΤΗΣΗ	91
11 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	93

1 Εισαγωγή

1.1 Ιστορία του υδροκυανίου και των κυανιούχων αλάτων

Ο όρος *κυανιούχα* (*cyanides*) χρησιμοποιείται για να περιγράψει οποιαδήποτε ένωση περιέχει στο μόριο της τη ρίζα κυανίου ($C\equiv N^-$). Η ομάδα αυτή αποτελείται από ένα άτομο άνθρακα συνδεδεμένο με τριπλό δεσμό με ένα άτομο αζώτου (1), όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.



Εικόνα 1. Κυανιούχο ιόν, CN^- . (1) Δομή σθένους- δεσμού, (2) Μοντέλο συμπλήρωσης κενού, (3) Επιφάνεια ηλεκτροστατικού δυναμικού, (4) Τροχιακό HOMO ασύζευκτου ζεύγους ηλεκτρονίων άνθρακα (2)

Η ανακάλυψη του υδροκυανίου προέκυψε από τη χημική μελέτη της χρωστικής κυανό της Πρωσίας ή κυανό του Βερολίνου, $Fe_4[Fe(CN)_6]_3$. Η χρωστική αυτή ανακαλύφθηκε τυχαία

από το χρωματοποιό Johann Jacob von Diesbach και τον αλχημιστή Johann Conrad Dippel το 1706 στο Βερολίνο (3). Το 1752 ο Pierre-Joseph Macquer επεξεργάστηκε τη χρωστική με θέρμανση και θεικό οξύ και προέκυψε ένα αέριο και οξειδία σιδήρου (4). Το υδροκυάνιο απομονώθηκε από το κυανό της Πρωσίας το 1782 από το χημικό Carl Wilhelm Scheele (5-8). Το 1811 καθορίστηκε η χημική δομή του υδροκυανίου από το Joseph Louis Gay-Lussac (9).

Η ελληνική λέξη κυανό αποτελεί τη ρίζα των ονομάτων του υδροκυανίου και των κυανιούχων ενώσεων και χρησιμοποιήθηκε για να περιγράψει το πρωσικό οξύ που εκλύθηκε κατά τη διάρκεια όλων των ανωτέρω πειραμάτων (3).

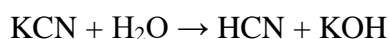
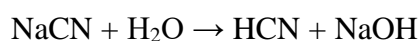
2 Φυσικές και χημικές ιδιότητες κυανιούχων ενώσεων

Το υδροκυάνιο (HCN) είναι ένα γραμμικό μόριο που αποτελείται από ένα άτομο υδρογόνου, ένα άτομο άνθρακα και ένα άτομο αζώτου ομοιοπολικά συνδεδεμένα με μοριακό βάρος 27.03 g/mol. Είναι άχρωμο, εύφλεκτο αέριο ή υγρό, με σημείο ζέσεως στους 25.7 °C και ψύχεται στους -13.24 °C (7, 10, 11). Έχει χαρακτηριστική οσμή πικραμύγδαλου, ωστόσο δεν μπορούν όλοι οι άνθρωποι να ανιχνεύσουν την οσμή του, καθώς αυτή η ικανότητα καθορίζεται γενετικά (7, 12-14). Το αέριο σπάνια υπάρχει στη φύση και είναι ελαφρύτερο του αέρα (7, 10, 11).

Είναι διαλυτό στο νερό και στην αιθανόλη, αλλά ελάχιστα στον αιθέρα. Στο νερό, είναι ασθενές οξύ με pKa 9.2 (10, 15, 16). Σε pH 9.36 το 50% του υδροκυανίου βρίσκεται με τη μορφή ελεύθερων κυανιούχων (CN⁻), ενώ σε pH > 11 το υδροκυάνιο διασπάται πλήρως δίνοντας ένα πρωτόνιο, H⁺ και το κυανιούχο ιόν, CN⁻. Τέλος, σε pH < 7 το μεγαλύτερο ποσοστό των κυανιούχων βρίσκεται με τη μορφή του αέριου υδροκυανίου, το οποίο εξατμίζεται πολύ εύκολα, ως πολύ τοξικό αέριο (17).

Το υδροκυάνιο μπορεί να διαπεράσει τις κυτταρικές μεμβράνες, καθώς και τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, λόγω του μικρού του μεγέθους και του μη ιοντικού χαρακτήρα του και μπορεί να διαχυθεί εύκολα από τα υδατικά διαλύματα στον αέρα. Ενώ στα κυανιούχα ιόντα, η ύπαρξη αρνητικού φορτίου μειώνει αυτή τη δυνατότητα διάχυσης, αλλά τους επιτρέπει να σχηματίζουν σταθερά σύμπλοκα με τα μέταλλα μετάπτωσης. Η ικανότητα αυτή σχηματισμού συμπλόκων με μέταλλα που υπάρχουν στα βιολογικά ένζυμα, καθιστά τα κυανιούχα πολύ τοξικά (7, 18).

Τα πιο γνωστά κυανιούχα άλατα είναι το κυανιούχο νάτριο (NaCN) και το κυανιούχο κάλιο (KCN). Σε θερμοκρασία δωματίου είναι λευκές κρυσταλλικές σκόνες, ευδιάλυτες στο νερό και αυτές με χαρακτηριστική οσμή πικραμύγδαλου. Διαλύονται πλήρως στο νερό, με αποτέλεσμα το σχηματισμό υδροκυανίου σύμφωνα με τις παρακάτω αντιδράσεις (7, 19):



Για την κατηγοριοποίηση των κυανιούχων από χημικής πλευράς χρησιμοποιούνται οι όροι ελεύθερα κυανιούχα, κυανιούχα ιόντα, κυανιούχα σύμπλοκα, νιτρίλια και ολικά κυανιούχα (7).

Τα ελεύθερα κυανιούχα (*free cyanides*) αναφέρονται στο άθροισμα του μοριακού υδροκυανίου HCN και των κυανιούχων ιόντων, CN⁻, ανεξαρτήτως της πηγής προέλευσης. Τα κυανιούχα ιόντα ή ελεύθερα κυανιούχα ιόντα (*free cyanide ion*) αναφέρονται στο κυανιούχο ανιόν που παράγεται σε διάλυμα από το υδροχλωρικό οξύ, σε ισορροπία με τα απλά ή σύνθετα κυανιούχα μόρια. Μοιάζουν με τα αλογόνα και μερικές φορές αναφέρονται ως "ψευδοαλογόνα" (7, 8, 17).

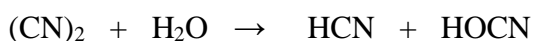
Τα απλά κυανιούχα (*simple cyanides*), αναφέρονται στα υδατοδιαλυτά αλκαλικά κυανιούχα άλατα, όπως κυανιούχο νάτριο, κάλιο, ασβέστιο και υδράργυρος. Επίσης, ο όρος αυτός περιλαμβάνει και άλλα αλκαλικά άλατα, άλατα αλκαλικών γαιών και βαρέων μετάλλων, όπως ψευδαργύρου, καδμίου, νικελίου και αργύρου με διαφορετικούς βαθμούς διαλυτότητας στο νερό. Όλα τα απλά κυανιούχα ιονίζονται στο νερό και δίνουν κυανιούχο ιόν, το οποίο αναλόγως του pH μπορεί να σχηματίσει υδροκυάνιο (7, 8, 17).

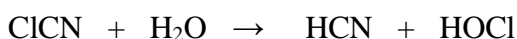
Στα κυανιούχα σύμπλοκα (*complex cyanides*) το κυανιούχο ιόν ενσωματώνεται σε ένα ή περισσότερα σύμπλοκα, τα οποία έχουν διαφορετικές χημικές και τοξικολογικές ιδιότητες. Η σταθερότητα των συμπλόκων σε διάλυμα, εξαρτάται από το είδος του κατιόντος, καθώς και το σύμπλοκο που δημιουργείται, έτσι μερικά σύμπλοκα διασπώνται και δίνουν CN⁻ με την επίδραση ασθενών οξέων, ενώ άλλα με την επίδραση ισχυρών. Η τοξικότητά τους συνήθως εξαρτάται από την ικανότητά τους να απελευθερώνουν κυανιούχα ιόντα. Τα πιο γνωστά σύμπλοκα είναι το σιδηρικού κυανιούχο κάλιο (K₃Fe(CN)₆) και το σιδηροκυανιούχο κάλιο (K₄Fe(CN)₆). Το πρώτο είναι μια κόκκινη κρυσταλλική ουσία, ενώ το δεύτερο είναι κίτρινη. Και οι δύο διαλύονται αργά στο νερό και ελαφρώς στην αιθανόλη (7, 8, 17).

Με τον όρο ολικά κυανιούχα (*total cyanides*) περιγράφονται όλες οι χημικές ενώσεις που περιλαμβάνουν κυανιούχα στο μόριό τους. Αποτελεί ουσιαστικά μια χημική μέτρηση των ελεύθερων κυανιούχων που υπάρχουν σ' ένα διάλυμα ή απελευθερώνονται σε αυτό μετά από οξίνιση ή πέψη του διαλύματος (7, 8, 17).

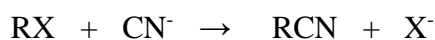
Τα κυανιούχα ιόντα είναι πυρηνόφιλες ομάδες, οι οποίες μπορούν να ενσωματωθούν στα οργανικά μόρια, ως λειτουργικές ομάδες. Παρακάτω αναφέρονται μερικές κατηγορίες μορίων που περιέχουν το μόριο του κυανίου.

Το δικυάνιο ((CN)₂) είναι η πιο απλή ένωση που περιέχει την κυανο- ομάδα. Είναι πολύ τοξικό και εύφλεκτο αέριο, η τοξικότητά του οποίου, καθώς και των αλογονούχων παραγώγων του, είναι συγκρίσιμη με αυτή του υδροκυανίου, ίσως γιατί κατά την υδρόλυσή τους παράγουν υδροκυάνιο (8, 11).





Οι οργανικές κυανιούχες ενώσεις ονομάζονται νιτρίλια (*nitriles*, RCN). Η σύνθεσή τους φαίνεται στην παρακάτω αντίδραση (20):



Τα απλά αλειφατικά νιτρίλια είναι υγρά, ενώ τα αρωματικά, όπως η αμυγδαλίνη είναι στερεά. Το σημείο βρασμού του ακρυλονιτρίλιου είναι 77.3 °C, ενώ του ακετονιτρίλιου είναι 81.6 °C. Τα νιτρίλια έχουν περιορισμένη διαλυτότητα στο νερό, ενώ είναι διαλυτά στους οργανικούς διαλύτες και έχουν την τάση να πολυμερίζονται (8).

Οι κυανυδρίνες (*cyanohydrins*, R₂C(OH)CN) και οι κυανογόνοι γλυκοζίτες (*cyanogenic glycoside*, R₁R₂C(OR₃)CN) αποτελούν ειδικές τάξεις νιτρίλιων που μπορούν να υδρολυθούν σε κατάλληλες συνθήκες και δίνουν υδροκυάνιο και κυανιούχα ιόντα. Οι κυανυδρίνες είναι, κυρίως, υγρά που αντιδρούν εύκολα και διαλύονται στο νερό, την αιθανόλη, τον αιθέρα και την ακετόνη. Μπορεί να γίνουν πολύ τοξικές μετά από κατάποση, επαφή με το δέρμα ή τους οφθαλμούς. Οι κυανογόνοι γλυκοζίτες, με πιο γνωστή την αμυγδαλίνη, βρίσκονται κυρίως σε φυτά. Ως γλυκοζίτες είναι αβλαβείς ουσίες, αλλά αν υδρολυθούν παράγουν υδροκυάνιο (1).

Τα κυανικά (*cyanates*) έχουν στο μόριό τους την ομάδα OCN⁻. Το κυανικό κάλιο και το κυανικό νάτριο θεωρούνται μη τοξικά σε σύγκριση με το υδροκυάνιο. Τα αλκυλο-κυανικά και τα αλκυλο-ισοκυανικά υδρολύονται εύκολα (8, 11).

Τα θειοκυανιούχα (*thiocyanides*, SCN⁻) παράγονται από την αντίδραση των κυανιούχων με ενώσεις που περιέχουν θείο και είναι πιο σταθερά μόρια από τα κυανικά. Τα θειοκυανιούχα αλκάλια και οι αλκαλικές γαίες είναι άχρωμες ενώσεις που διαλύονται εύκολα στο νερό, στην αιθανόλη και την ακετόνη. Όταν αντιδρούν με οξέα, σε οξειδωτικές συνθήκες, δίνουν υδροκυάνιο (11).

Στον πίνακα 1, που ακολουθεί, παρουσιάζονται οι ιδιότητες του υδροκυανίου και μερικών σημαντικών κυανιούχων ενώσεων (7, 11, 15, 17, 19).

Πίνακας 1. Φυσικοχημικές ιδιότητες του υδροκυανίου και άλλων κυανιούχων ενώσεων

ΕΝΩΣΕΙΣ										
	Υδροκυάνιο	Κυανιούχο νάτριο	Κυανιούχο κάλιο	Κυανιούχο ασβέστιο	Δικυάνιο	Χλωριούχο κυάνιο	Αργυροκυ- ανιούχο κάλιο	Κυανικό κάλιο	Κυανικό νάτριο	Θειοκυανι- ούχο κάλιο
ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ										
Μοριακός Τύπος	HCN	NaCN	KCN	Ca(CN) ₂	(CN) ₂	CNCl	KAg(CN) ₂	KOCN	NaOCN	KSCN
Αριθμός Μητρώου CAS	74-90-8	143-33-9	151-50-8	592-01-8	460-19-5	506-77-4	506-61-6	590-28-3	917-61-3	333-20-0
Μοριακή Μάζα (g/mol)	27.03	49.01	65.11	92.12	52.04	61.47	199.01	81.12	6.01	97.18
Χρώμα	Άχρωμο	Άχρωμο ή λευκό	Άχρωμο ή λευκό	Λευκό	Άχρωμο	Άχρωμο	Λευκό	Λευκό	Λευκό	Άχρωμο
Φυσική κατάσταση στους 25 °C	Αέριο ή υγρό	Στερεό	Στερεό	Στερεό	Αέριο	Υγρό ή αέριο	Στερεό	Στερεό	Στερεό	Στερεό
Σημείο Ζέσεως (°C)	25.7	1.96	Δεν υπάρχουν στοιχεία	Δεν υπάρχουν στοιχεία	-20.7	12.8	Δεν υπάρχουν στοιχεία	700-900 αποσυντίθεται	23.5	Αποσυντίθεται στους 500
Σημείο Τήξης (°C)	-13.4	563.7	634.5	Σε T >350 °C αποσυντίθεται	-27.9	-6	Δεν υπάρχουν στοιχεία	315	550	173.2
Πυκνότητα Μάζας (g/cm³)	0.687	1.60	1.55	1.80-1.90	0.9577 στους 21.17 °C	1.18 στους 20 °C	2.36	2.056 στους 25 °C	1.937	1.886 στους 14 °C
Διαλυτότητα στο νερό	Αναμιγνύεται	Διαλυτό	Διαλυτό	Διαλυτό	Διαλυτό	Διαλυτό	Διαλυτό	Αποσυντίθεται	Διαλυτό	Διαλυτό
Διαλυτότητα σε οργανικούς διαλύτες	Διαλυτό σε αιθανόλη και αιθέρα	Ελαφρώς διαλυτό σε αιθανόλη και αιθέρα	Ελαφρώς διαλυτό σε αιθανόλη και αδιάλυτο σε αιθέρα	Διαλυτό σε αιθανόλη και αδιάλυτο σε αιθέρα	Διαλυτό σε αιθανόλη και αιθέρα	Διαλυτό σε αιθανόλη και αιθέρα	Ελαφρώς διαλυτό σε αιθανόλη	Διαλυτό σε αιθέρα	Ελαφρώς διαλυτό σε αιθέρα	Διαλυτό σε αιθανόλη

3 Πηγές έκθεσης και χρήσεις κυανιούχων ενώσεων

3.1 Πηγές κυανιούχων ενώσεων στη φύση

Οι κυανογόνοι γλυκοζίτες έχουν εντοπιστεί σε περισσότερα από 2500 είδη φυτών και αποτελούν μέρος του αμυντικού τους μηχανισμού εναντίον των φυτοφάγων ζώων, καθώς έχουν τη δυνατότητα να απελευθερώνουν υδροκυάνιο (21).

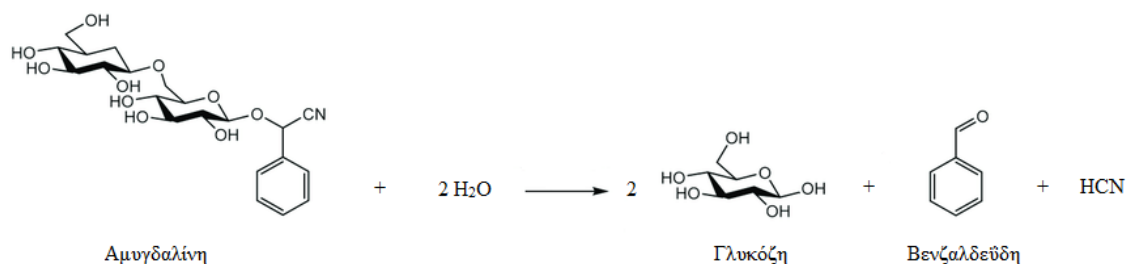
Είναι γλυκοζίτες που το άγλυκο τμήμα τους είναι μια κυανυδρίνη και το σάκχαρό τους είναι κυρίως γλυκόζη. Οι γλυκοζίτες αυτοί μπορούν να υποστούν ενζυμική υδρόλυση και να απελευθερώσουν την κυανυδρίνη, η οποία στη συνέχεια υδρολύεται σε μια καρβονυλική ένωση (αλδεΐδη ή κετόνη) και υδροκυάνιο. Η αντίδραση αυτή λαμβάνει χώρα σε αλκαλικές συνθήκες (7, 19).

Κυανογόνοι γλυκοζίτες έχουν βρεθεί στους πυρήνες φρούτων, όπως στα κεράσια, μήλα, δαμάσκηνα, βερίκοκα, και ροδάκινα. Επίσης, στα βατόμουρα, στα αμύγδαλα, στις φακές, στα φασόλια, στη γλυκοπατάτα, στα κάσιους, στα νεκταρίνια, στα κάστανα, στο καλαμπόκι, στο λιναρόσπορο, στο σόργο και στο βλαστό του μπαμπού (7, 19).

Η Cassava (*Manihot esculenta*, οικ. Euphobiaceae), γνωστή και ως μανιόκα αποτελεί τη βασική τροφή σε περιοχές όπως η Αφρική, η τροπική Αμερική, τα νησιά του Ινδικού Ωκεανού, η Ινδία και η Άπω Ανατολή. Οι ρίζες, ο φλοιός και τα φύλλα του φυτού περιέχουν δύο κυανογόνους γλυκοζίτες, τη λιναμαρίνη (linamarin) και τη λοταυστραλίνη (lotaustralin), οι οποίες διασπώνται από το ένζυμο λιναμαράση, (linamarase) και απελευθερώνεται υδροκυάνιο (22, 23). Με κατάλληλη επεξεργασία, που περιλαμβάνει ξήρανση, ζύμωση, έκπλυση και ψήσιμο, τα τοξικά όρια του υδροκυανίου μπορούν να μειωθούν κατά 97- 99% (24- 26). Η κατανάλωση cassava που δεν έχει επεξεργαστεί σωστά, έχει ενοχοποιηθεί για πολλά νευρολογικά σύνδρομα, με πιο γνωστό το σύνδρομο Konzo που έχει εμφανιστεί σε περιοχές που η διατροφή των κατοίκων περιλαμβάνει κυρίως ή και αποκλειστικά κατανάλωση cassava (27, 28). Τα συμπτώματα που παρουσιάζονται είναι κυρίως αταξία, οπτική νευροπάθεια και χρόνια παράλυση των άκρων. Επιπλέον, έχουν καταγραφεί και άλλα συμπτώματα, όπως απομυελίνωση, διαταραχές του θυρεοειδούς, διαβήτης λόγω τοξικής επίδρασης στο πάγκρεας και αύξηση των επιπέδων των θειοκυανικών στους ιστούς (7, 29, 30).

Η αμυγδαλίνη είναι ο πιο γνωστός κυανογόνος γλυκοζίτης που έχει βρεθεί σε πολλούς καρπούς όπως του κερασιού, του δαμάσκηνου, του βερίκοκου, του μήλου, του αχλαδιού, του ροδάκινου κ.ά. Αν καταποθεί ο καρπός αυτός χωρίς να προηγηθεί μάσηση, τότε η

απελευθέρωση του υδροκυανίου είναι λιγότερη λόγω του όξινου περιβάλλοντος του στομάχου, ενώ αν μασηθεί, η εμουλσίνη (β- γλυκοζιτάση), που παράγεται από τα λυσοσώματα, υδρολύει γρήγορα την αμυγδαλίνη στο αλκαλικό περιβάλλον του λεπτού εντέρου, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του υδροκυανίου. Κατά την υδρόλυση, παράγεται ένα μόριο βενζαλδεΐδης, δύο μόρια γλυκόζης και ένα μόριο υδροκυανίου, όπως φαίνεται στην παρακάτω αντίδραση (31- 35).



Η λαετρίλη είναι χημικώς τροποποιημένη αμυγδαλίνη και έχει χρησιμοποιηθεί στην εναλλακτική ιατρική ως αντικαρκινικό φάρμακο. Η χρήση της ξεκίνησε στη Γερμανία το 1892 αλλά εγκαταλείφθηκε, λόγω τοξικότητας και έλλειψης αποτελεσματικότητας. Στις ΗΠΑ, μελετήθηκε η χρήση της από τα τέλη της δεκαετίας του 1950. Αργότερα, οι μελέτες έδειξαν ότι έχει μικρή αντικαρκινική δράση στα ζώα, η οποία δεν αποδείχτηκε στους ανθρώπους, και έτσι απαγορεύτηκε η κυκλοφορία της σε πολλές Πολιτείες της Αμερικής, στην Ευρωπαϊκή Ένωση, στον Καναδά και την Αυστραλία. Ωστόσο, μπορεί να αγοραστεί διαδικτυακά και με άλλες ονομασίες, όπως βιταμίνη B₁₇. Αν χορηγηθεί από το στόμα βιομετατρέπεται από τα ένζυμα του γαστρεντερικού σωλήνα και απελευθερώνει υδροκυάνιο από την αμυγδαλίνη, ενώ αν χορηγηθεί ενδοφλεβίως δεν θεωρείται τοξική (35-38).

Σε μερικά βακτήρια του εδάφους, μύκητες (όπως ο μύκητας της μούχλας του χιονιού) (39) και άλγη (40) έχουν βρεθεί κυανιούχες ενώσεις, καθώς τις χρησιμοποιούν ως πηγή άνθρακα και αζώτου (41). Πολλοί μικροοργανισμοί του εδάφους, μπορούν επίσης να υδρολύσουν τους κυανογόνους γλυκοζίτες σε υδροκυάνιο. Τέτοιοι είναι οι *Pseudomonas*, *Chromobacterium*, *Anacystis*, *Nostoc*, *Plectonema* και *Rhizobium*, που μεταβολίζουν τη γλυκίνη παράγοντας υδροκυάνιο (42-45). Το υδροκυάνιο που παράγεται διαχέεται, κυρίως, στο έδαφος ή συνδέεται με μεταλλικά ιόντα ή εξατμίζεται στον αέρα, επομένως υπάρχει πολύ μικρή πιθανότητα να μολυνθούν τα τρόφιμα από κυανογόνα βακτήρια ή μύκητες.

Ο κλάδος της Προβιοτικής Χημείας ασχολείται με την προέλευση της ζωής τόσο στον πλανήτη Γη όσο και σε άλλους πλανήτες, και μελετά τον τρόπο που τα απλά οργανικά μόρια συγκροτήθηκαν και προέκυψαν τα σύνθετα χημικά και βιοχημικά συστήματα (46). Το υδροκυάνιο είναι ένα μόριο που έχει απασχολήσει τον κλάδο αυτό, καθώς αποτελεί ένα χημικώς δραστικό δομικό φορέα του αζώτου. Υπάρχουν μελέτες που θεωρούν το υδροκυάνιο πρόδρομη ουσία για το σχηματισμό της αδενίνης, της γουανίνης και άλλων αζωτούχων ουσιών (47).

Το υδροκυάνιο έχει ανιχνευθεί και στο διαστρικό χώρο. Έχει ανιχνευθεί, επίσης, σε νεφελώματα και στη μεσοαστρική ύλη, στον Τρίτωνα, το μεγαλύτερο δορυφόρο του Ποσειδώνα, καθώς και στον Τιτάνα, το μεγαλύτερο δορυφόρο του Κρόνου (48, 49).

3.2 Ανθρώπινη Δραστηριότητα και χρήσεις

Η πιο συχνή αιτία έκλυσης υδροκυανίου στις βιομηχανικές πόλεις είναι οι πυρκαγιές των σύγχρονων κατοικιών (50), λόγω της καύσης προϊόντων που περιέχουν άζωτο, όπως χαρτί, νάιλον, μελαμίνη, πλεξιγκλάς και πλαστικά (κυρίως πολυουρεθάνη και υλικά πολυακρυλονιτριλίου όπως υφάσματα, χαλιά κ.ά.). Το υδροκυάνιο εκλύεται γιατί υπάρχει αυξημένη θερμοκρασία, λόγω της φωτιάς, και η πυρκαγιά λαμβάνει χώρα σε κλειστό χώρο. Ο θάνατος δεν είναι απαραίτητο να επέλθει από την εισπνοή του υδροκυανίου, αλλά αυτό λειτουργεί επικουρικά με το μονοξείδιο του άνθρακα και έτσι παρατηρείται, στα θύματα από αυτές τις πυρκαγιές, η εμφάνιση πολύ υψηλών επιπέδων κυανιούχων στο αίμα (7, 19, 52).

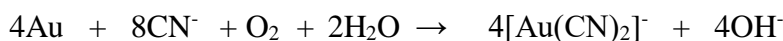
Επιπλέον και κάποια φυτά, κυρίως θάμνοι, κατά την καύση τους εκλύουν υδροκυάνιο. Τέτοια είναι το *Heteromeles arbutifolia* (Τογον), είδη του γένους *Cercocarpus* (Mountain mahogany) και του *Sambucus* (Elderberry), το φυτικό είδος *Prunus virginiana* (Chokecherry), φτέρες του γένους *Pteridium* και αρκετά είδη βελανιδιάς. Επίσης, κάποια φυσικά προϊόντα με την καύση τους παράγουν υδροκυάνιο, όπως το μετάξι, το έριο, οι τρίχες του αλόγου και το βαμβάκι (7, 53).

Έκλυση κυανιούχων ενώσεων μπορεί να προκύψει, ακόμα, από τον καπνό του τσιγάρου. Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι οι καπνιστές έχουν υψηλότερα επίπεδα κυανιούχων στο αίμα σε σχέση με τους μη καπνιστές (54- 57), ενώ υπάρχουν και μελέτες που δεν βρίσκουν καμία διαφορά στα επίπεδα των κυανιούχων στο αίμα. Αυτό μπορεί να συμβαίνει γιατί τα κυανιούχα βιομετατρέπονται τάχιστα σε θειοκυανιούχα στο ήπαρ και στους νεφρούς, συνεπώς, ο πιο σωστός δείκτης μέτρησης είναι η συγκέντρωση των θειοκυανιούχων στο πλάσμα, η οποία είναι μεγαλύτερη στους καπνιστές, σε σχέση με τους μη καπνιστές (58, 59).

Τα κυανιούχα βρίσκουν χρήση σε πολλούς βιομηχανικούς τομείς, όπως στην εξόρυξη μετάλλων, στην ηλεκτρολυτική επιμετάλλωση κοσμημάτων, στον καθαρισμό μετάλλων, στην κατασκευή πλαστικού και καουτσούκ και στην παραγωγή τρωκτικοκτόνων, καπνιστικών εντομοκτόνων και παρασιτοκτόνων. Χρησιμοποιούνται, επίσης, για την παραγωγή απορρυπαντικών ελευθέρων φωσφόρου και ως παράγοντες μη στερεοποίησης του αλατιού (7, 30, 60). Το κυανιούχο ασβέστιο χρησιμοποιείται ως σταθεροποιητής του τσιμέντου και οι σιδηρο- και σιδηρι- κυανιούχες ουσίες, που είναι χρωστικές, χρησιμοποιούνται στην παραγωγή χρωμάτων, στην τυπογραφία και στη φωτογραφία (61, 62).

Το κυανιούχο κάλιο χρησιμοποιείται για την παράνομη σύνθεση της φαινκυκλιδίνης (PCP), γνωστής και ως αγγελόσκονης, που έχει παραισθησιογόνο δράση (61).

Όσον αφορά την εξόρυξη χρυσού και αργύρου, χρησιμοποιείται το κυανιούχο νάτριο ή κάλιο σε κάποιο στάδιο της εξόρυξης για να δημιουργήσει σύμπλοκο με τα μέταλλα. Η αντίδραση που λαμβάνει χώρα για τον χρυσό είναι η εξής:



Αντίστοιχη αντίδραση συμβαίνει και με τον άργυρο. Όμως, στην περίπτωση που ο άργυρος είναι ήδη οξειδωμένος (Ag_2S), δεν χρειάζεται οξυγόνο για τη συμπλοκοποίηση, και η αντίδραση είναι η εξής (63, 64):



Τα κυανιούχα άλατα έχουν χρησιμοποιηθεί και για εγκληματικούς σκοπούς, όπως μαζικές δολοφονίες ανθρώπων, στον χημικό πόλεμο και ως όπλο τρομοκρατίας. Περισσότερες λεπτομέρειες θα αναφερθούν στο κεφάλαιο 9. Πέρα, όμως, από τους ανθρώπους, θύματα των κυανιούχων έχουν υπάρξει και τα ζώα είτε τυχαία, όπως από τη ρύπανση των υδάτων από τις εξορύξεις μετάλλων, ή σκόπιμα, όπως στη δημιουργία δολώματος για τον έλεγχο του πληθυσμού άγριων ζώων, όπως κογιότ και αλεπούδες. Επιπλέον, έχουν χρησιμοποιηθεί και για την παράνομη εξόντωση ζώων συντροφιάς (7, 30). Στην Ελλάδα, από το 1981, έχει χρησιμοποιηθεί το κυανιούχο κάλιο από τη Δασική Υπηρεσία για τον έλεγχο του πληθυσμού των αλεπούδων. Η χρήση του, όπως και όλων των δηλητηριασμένων δολωμάτων, απαγορεύτηκε με απόφαση του Συμβουλίου της Επικρατείας το 1993. Παρά την απαγόρευση, κυκλοφορούν ακόμα παράνομα δολώματα με κυανιούχο κάλιο. Τα δολώματα αποτελούνται από σκόνη κυανιούχου καλίου καλυμμένη από παραφίνη ή κερί, τα οποία προστίθενται σε τεμάχιο κρέατος, όπως φαίνεται στην Εικόνα 7 (65).

Εκτός από τα άγρια ζώα, τα κυανιούχα άλατα έχουν χρησιμοποιηθεί στην παράνομη αλιεία, με σκοπό την αιχμαλωσία των ψαριών. Τα άλατα τοποθετούνται στο νερό, με αποτέλεσμα τα ψάρια να ζαλίζονται, να αιχμαλωτίζονται ευκολότερα και στη συνέχεια, να πωλούνται σε ενυδρεία. Η παράνομη αυτή πρακτική έχει χρησιμοποιηθεί σε ψάρια κοραλλιογενών υφάλων, ενώ νόμιμα διενεργείται στην Αγγλία και στη Σκωτία για το ψάρεμα σολομού και πέστροφας. Εντούτοις, πολλά ψάρια δηλητηριάζονται και πεθαίνουν (7, 66). Πέρα από τα ψάρια όμως, καταστρέφεται και ο κοραλλιογενής ύφαλος, καθώς τα κυανιούχα άλατα σκοτώνουν τα άλγη που είναι απαραίτητα για την επιβίωση του κοραλλιού (67).

Εκτός από τη χημικώς τροποποιημένη αμυγδαλίνη, τη λαετρίλη, που αναφέρθηκε παραπάνω, υπάρχουν και άλλα μόρια που παράγουν κυανιούχα άλατα και χρησιμοποιούνται στη θεραπευτική. Ένα από αυτά είναι το νιτροπρωσσικό νάτριο ($\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), το οποίο χρησιμοποιείται ως αγγειοδιασταλτικό για τη θεραπεία της υπέρτασης σε ενήλικες και σε παιδιά. Έχει τα επιθυμητά φαρμακοκινητικά και φαρμακοδυναμικά χαρακτηριστικά, όπως ταχεία δράση και μικρό χρόνο ημιζωής. Όπως φαίνεται στο μόριό του, αποτελείται από 5 μόρια κυανιούχων τα οποία αποτελούν το 44% w/w του ολικού μορίου και απελευθερώνονται μετά την αντίδραση του νιτροπρωσσικού νατρίου με την αιμοσφαιρίνη. Όταν χορηγείται σε μεγάλες ποσότητες μπορούν να εμφανιστούν συμπτώματα δηλητηρίασης, λόγω των κυανιούχων που απελευθερώνονται. Γι' αυτό το λόγο, πρέπει να παρακολουθείται ο ασθενής κατά τη χορήγηση του φαρμάκου. Το FDA (Food and Drug Administration) έχει ορίσει από το 1991, μέγιστο όριο χορήγησης ίσο με 2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ (68- 74).

Ένα ακόμη μόριο που απελευθερώνει κυανιούχα άλατα είναι η σουκινονιτρίλη ($\text{C}_2\text{H}_4(\text{CN})_2$) που έχει χρησιμοποιηθεί ως αντικαταθλιπτικό. Έχει χρησιμοποιηθεί σε αρκετές χώρες της Ευρώπης, αλλά έχουν αναφερθεί περιπτώσεις θανάτου μετά από χορήγησή της, λόγω δηλητηρίασης από τα κυανιούχα και πλέον δεν είναι σε χρήση (70, 75).

3.3 Έκθεση πυροσβεστών και θυμάτων πυρκαγιάς σε κυανιούχες ενώσεις

Ο καπνός που προέρχεται από πυρκαγιά είναι ένα πολύπλοκο μείγμα, που αποτελείται από υγρά και στερεά αερολύματα, αναθυμιάσεις, αέρια και ατμούς που παράγονται από την πυρόλυση ή τη θερμική αποσύνθεση (76- 78). Τα αίτια θανάτου στις πυρκαγιές, έχουν αποδοθεί, κυρίως, στη δηλητηρίαση από μονοξείδιο του άνθρακα και στην έλλειψη οξυγόνου (79). Τα τελευταία χρόνια, όμως, χρησιμοποιούνται τα συνθετικά πολυμερή στις μοντέρνες κατοικίες, τα οποία περιέχουν άζωτο και αλογόνα, που μπορούν να ελευθερώσουν υδροκυάνιο κατά την καύση τους (53). Επομένως, πρέπει να λαμβάνεται υπόψιν η πιθανότητα της δηλητηρίασης από κυανιούχα, στις περιπτώσεις πυρκαγιάς εσωτερικού χώρου. Η διαφοροδιάγνωση της δηλητηρίασης με κυανιούχα από δηλητηριάσεις με ασφυξιογόνα αέρια, και κυρίως μονοξείδιο του άνθρακα, είναι δύσκολη (61). Η δυσκολία αναγνώρισης της δηλητηρίασης από κυανιούχα οφείλεται, κυρίως, στο μικρό χρόνο ημιζωής τους στο αίμα (80). Έχουν υπάρξει πολλές μελέτες που ερευνούν την τοξικότητα των κυανιούχων, σε περιπτώσεις πυρκαγιάς και τη συσχέτιση των δηλητηριάσεων από μονοξείδιο του άνθρακα και από κυανιούχα. Έχει βρεθεί, λοιπόν, ότι η συγκέντρωση των κυανιούχων στο αίμα θυμάτων πυρκαγιάς είναι αυξημένη, γεγονός που δείχνει τη συμβολή των κυανιούχων στην τοξικότητα του καπνού (78, 81- 85). Η συσχέτιση των συγκεντρώσεων κυανιούχων ενώσεων και ανθρακυλαιμοσφαιρίνης στο αίμα είναι δύσκολη (79, 86, 87). Μερικές μελέτες έχουν αποδείξει ότι υπάρχει αθροιστική δράση, και όχι συνεργική (88, 89), ενώ κάποιες μελέτες θεωρούν ότι δεν υπάρχει συσχέτιση (76, 79).

Μελέτες έχουν αποδείξει ότι τα θύματα πυρκαγιάς έχουν ανεβασμένα επίπεδα γαλακτικού οξέος στο πλάσμα (89, 90). Όπως θα αναλυθεί περισσότερο στο κεφάλαιο 5, η σύνδεση των κυανιούχων με την αίμη της οξειδάσης του κυτοχρώματος οδηγεί στην αναστολή της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, στην αναερόβια γλυκόλυση και τέλος, στην παραγωγή και συσσώρευση του γαλακτικού οξέος (γαλακτική οξέωση) και γι' αυτό η γαλακτική οξέωση αποτελεί δείκτη διάγνωσης της δηλητηρίασης με κυανιούχα. Εκτός από τα κυανιούχα (90, 91), η γαλακτική οξέωση μπορεί να οφείλεται σε καρδιαγγειακό σοκ, δηλητηρίαση από μονοξείδιο του άνθρακα, αζίδια ή υδρόθειο, αναπνευστική και καρδιακή ανακοπή, χορήγηση κατεχολαμινών και νεφρική ή ηπατική ανεπάρκεια (91, 92). Έχει βρεθεί ότι στα θύματα πυρκαγιάς υπάρχει καλύτερη συσχέτιση της αυξημένης συγκέντρωσης του γαλακτικού οξέος στο πλάσμα με τη συγκέντρωση των κυανιούχων στο αίμα, παρά με τη

συγκέντρωση του μονοξειδίου του άνθρακα (89). Επομένως, αποτελεί ένα καλό διαγνωστικό εργαλείο για την τοξικότητα των κυανιούχων, ιδιαιτέρως στις περιπτώσεις που αργεί να γίνει η συλλογή αίματος, με αποτέλεσμα η συγκέντρωση των κυανιούχων στο αίμα να έχει μειωθεί (91). Μελέτες έχουν δείξει ότι συγκέντρωση γαλακτικού οξέος στο πλάσμα μεγαλύτερη από 900 mg/L (10 mmol/L) αποτελεί δείκτη παρουσίας κυανιούχων στο αίμα συγκέντρωσης ≥ 1 mg/L (89, 91, 92- 94).

4 Τοξικότητα κυανιούχων ενώσεων

Οι κυανιούχες ενώσεις θεωρούνται από τα πιο τοξικά δηλητήρια. Μολονότι έχουν μελετηθεί αρκετά, δεν είναι εύκολο να οριστεί η θανατηφόρος δόση στους ανθρώπους. Μετά από κατάποση κυανιούχου καλίου και νατρίου, η θανατηφόρος δόση εκτιμάται 0.7-3.5 mg/kg (1). Έκθεση σε συγκεντρώσεις υδροκυανίου 200-300 mg/m³ αέρα, προκαλεί άμεσα θάνατο, ενώ σε συγκεντρώσεις 120-150 mg/m³ αέρα προκαλεί θάνατο σε 30-60 λεπτά (61).

4.1 Τοξικοκινητική

4.1.1 Απορρόφηση

Η απορρόφηση των κυανιούχων εξαρτάται από το είδος της ένωσης (υδροκυάνιο, κυανιούχο νάτριο, κυανιούχο κάλιο κλπ.) και την οδό έκθεσης. Θεωρούνται από τα πιο δραστικά και ταχέως δρώντα δηλητήρια, λόγω της ταχείας απορρόφησής τους και της κατανομής τους στους ιστούς και στο κυκλοφορικό σύστημα. Η απορρόφηση, κυρίως, γίνεται από τους βλεννογόνους, του αναπνευστικού και του γαστρεντερικού, το δέρμα και τους οφθαλμούς (6).

Το υδροκυάνιο έχει πιο γρήγορη έναρξη τοξικότητας, σε σχέση με τα άλατα νατρίου και καλίου, καθώς αυτά θα πρέπει πρώτα να μετατραπούν σε υδροκυάνιο. Το υδροκυάνιο, ως μη ιονισμένο μόριο, μπορεί να διαχέεται μεταξύ των λιπιδικών μεμβρανών και η απορρόφηση καθίσταται εύκολη και ταχεία, λόγω του μικρού μοριακού του βάρους (7,18). Η απορρόφηση μετά από λήψη από το στόμα είναι ταχεία και οι τοξικές επιδράσεις των κυανιούχων ενώσεων μπορούν να εμφανιστούν μέσα σε λίγα λεπτά. Μετά την κατάποση κυανιούχων αλάτων, αυτά αντιδρούν με το υδροχλωρικό οξύ του στομάχου, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση υδροκυανίου, το οποίο απορροφάται γρήγορα από τον βλεννογόνο του στομάχου (6, 95).

Μέσω της εισπνοής, το αέριο υδροκυάνιο απορροφάται τάχιστα (μέσα σε δευτερόλεπτα) από τους βλεννογόνους του πνεύμονα. Στη συνέχεια, εισέρχεται στην κυκλοφορία και κατανέμεται πολύ γρήγορα σε όλα τα όργανα. Εξίσου επικίνδυνη είναι και η εισπνοή σκόνης κυανιούχων αλάτων, τα οποία όταν έρθουν σε επαφή με τους βλεννογόνους, που είναι υγροί, διαλύονται και εισέρχονται στην κυκλοφορία (11). Η εισπνοή κατάλληλης ποσότητας αερίου υδροκυανίου μπορεί γρήγορα να οδηγήσει σε θάνατο.

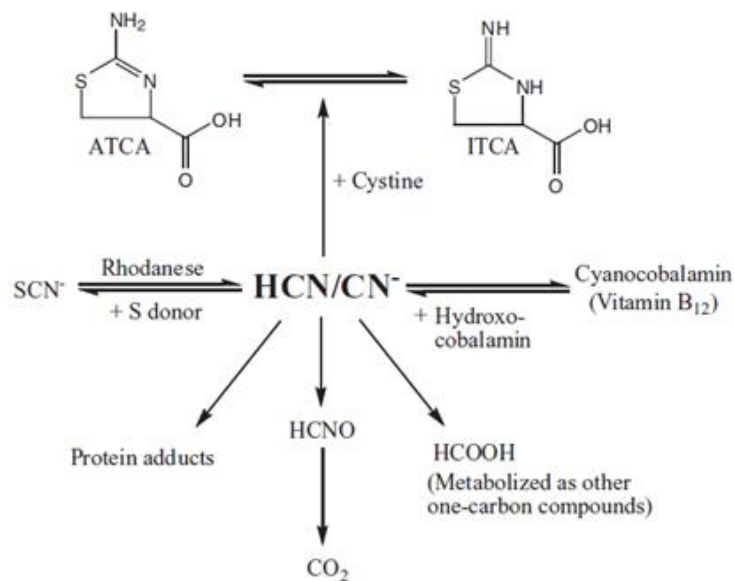
Η διαδερμική απορρόφηση είναι περιορισμένη. Αν τα κυανιούχα άλατα έρθουν σε επαφή με μικρή επιφάνεια του υγιούς δέρματος και για μικρό χρονικό διάστημα, υπάρχει μικρή πιθανότητα να εμφανιστούν τοξικά συμπτώματα λόγω δηλητηρίασης (61). Αν όμως υπάρχει λύση της συνεχείας του δέρματος (πχ τραυματισμός, αμυχή, έγκαυμα ή βρεγμένο δέρμα) η απορρόφηση των κυανιούχων είναι ταχύτερη και πιο εκτεταμένη (7). Ο ρυθμός απορρόφησης εξαρτάται από το pH του διαλύματος. Σε χαμηλό pH, το μεγαλύτερο ποσοστό των κυανιούχων βρίσκεται στη μη ιονισμένη μορφή, με αποτέλεσμα την αύξηση του ρυθμού της απορρόφησης (61). Τα διαλύματα κυανιούχου νατρίου και καλίου είναι διαβρωτικά για το δέρμα, γεγονός που μπορεί να αυξήσει την απορρόφησή τους (19).

4.1.2 Κατανομή

Αμέσως μετά την απορρόφηση, η κατανομή των κυανιούχων, μέσω της κυκλοφορίας του αίματος, γίνεται πολύ γρήγορα σε όλο το σώμα. Σε περίπτωση ενδοφλέβιας χορήγησης κυανιούχων, η κατανομή ολοκληρώνεται μέσα σε 5 λεπτά (96). Οι ιστοί που έχουν τη μεγαλύτερη ανάγκη σε οξυγόνο (της ο εγκέφαλος, η καρδιά, το ήπαρ, οι νεφροί και ο στόμαχος) επηρεάζονται περισσότερο από τα κυανιούχα (19, 97). Επιπλέον, οι ιστοί που έρχονται σε άμεση επαφή με τα κυανιούχα, εξαιτίας της οδού έκθεσης, διατηρούν υψηλά επίπεδα κυανιούχων. Τέτοιοι είναι ο στόμαχος, στην περτησωση της κατάποσης, και οι πνεύμονες, στην τησίπτωση της εισπνοής (19). Όσον αφορά το αίμα, τα κυανιούχα, κυρίως, κατανέμονται στα ερυθροκύτταρα (RBC) σε αναλογία RBC/πλάσμα 100:1 (61).

4.1.3 Βιομετατροπή

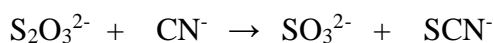
Η βιομετατροπή των κυανιούχων, τόσο στους ανθρώπους όσο και στα ζώα, είναι πολύπλοκη και περιλαμβάνει τη δράση διαφόρων ενζύμων και άλλων ουσιών. Στην Εικόνα 2 φαίνονται όλες οι οδοί βιομετατροπής των κυανιούχων.



Εικόνα 2. Βιομετατροπή των κυανιούχων (67).

Η ενζυματική βιομετατροπή των κυανιούχων σε θειοκυανιούχα είναι ο βασικός αποτοξινωτικός μηχανισμός που μεταβολίζει το 60-80% της προσλαμβανομένης ποσότητας κυανιούχων και ακολουθεί μηδενοταξική κινητική (95). Τα κύρια ένζυμα της βιομετατροπής αυτής είναι δύο θειοτρανσφεράσες, η ροδανάση και η β-μερκαπτοπυροσταφυλική θειοτρανσφεράση (MST) (98).

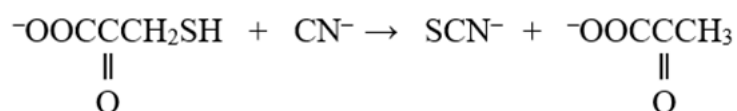
Η ροδανάση βρίσκεται στα μιτοχόνδρια και απαντά σε διάφορους ιστούς, όπως στους νεφρούς, που έχει τη μεγαλύτερη δράση στον άνθρωπο, στο ήπαρ, στους πνεύμονες, στον εγκέφαλο, στον στόμαχο και στους μυς. Καταλύει τη μεταφορά του θείου από πηγές σουλφανικού θείου (-S-S-) σε θειόφιλα παράγωγα. Στην περίπτωση των κυανιούχων, τα θειοθειικά είναι η πηγή σουλφανικού θείου, το καλύτερο pH δράσης του ενζύμου είναι 8 με 9, και η αντίδραση που καταλύεται από τη ροδανάση είναι η εξής (99):



Μελέτες έχουν δείξει ότι ο μηχανισμός αποτοξίνωσης της ροδανάσης είναι ενεργός και λειτουργεί από πολύ μικρή ηλικία, ακόμα και σε νεογέννητα, με μοναδική προϋπόθεση την ύπαρξη επαρκούς ποσότητας πηγής θείου (100).

Η MST βρίσκεται στα μιτοχόνδρια και στο διαλυτό μέρος του κυτταροπλάσματος (cytosol) και απαντά στο ήπαρ, στους νεφρούς και στα ερυθροκύτταρα. Καταλύει τη μεταφορά του θείου από τον άνθρακα του μεθυλίου του 3-μερκαπτοπυροσταφυλικού οξέος σε διάφορους δέκτες θείου, όπως τα κυανιούχα, οι θειώλες και τα θειώδη.

Η αντίδραση στην περίπτωση των κυανιούχων είναι η εξής:



Έχει υποστηριχθεί ότι, η MST είναι το ένζυμο που μεταβολίζει τα κυανιούχα όταν εισαχθούν στο κύτταρο, ενώ κατά τη μετακίνησή τους στα μιτοχόνδρια, βοηθά στη βιομετατροπή και η ροδανάση. Επίσης, υποστηρίζεται ότι τα ένζυμα αυτά λειτουργούν από κοινού, με την παραγωγή πηγών σουλφανικού θείου με κατάλυση της MST και ακολούθως, τη μεταφορά του θείου στα κυανιούχα με δράση της ροδανάσης (61, 101, 102).

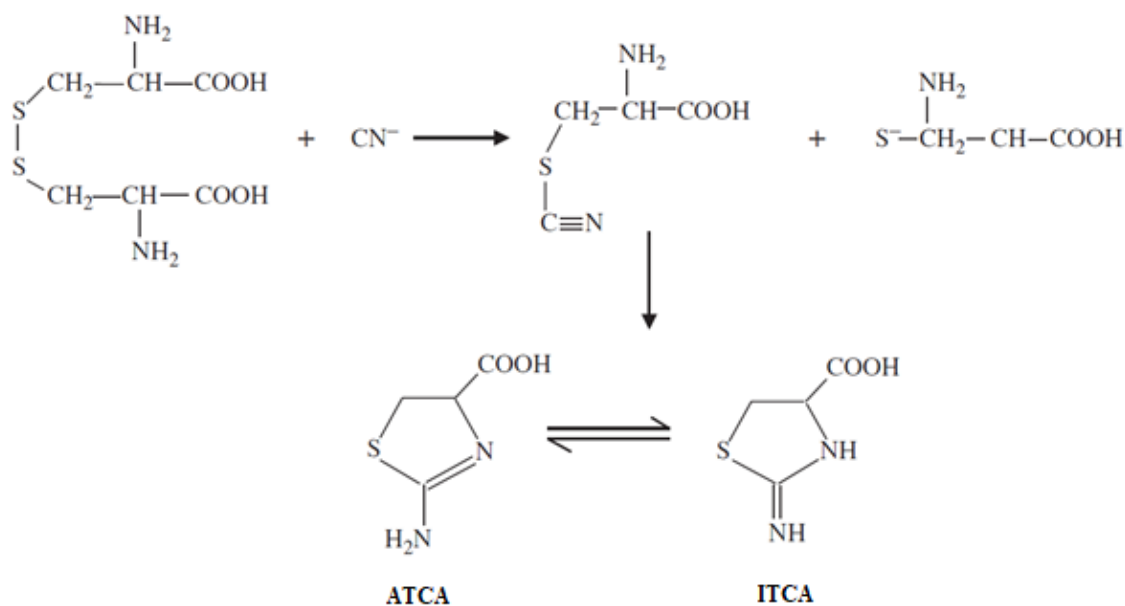
Η θειοθειϊκή αναγωγή είναι μια ακόμα θειοτρανσφεράση που παίζει ρόλο στη βιομετατροπή των κυανιούχων. Βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα και στα μιτοχόνδρια (103). Η αναγωγή αυτή καταλύει τη διάσπαση του δεσμού -S-S- των θειοθειϊκών και μεταφέρει το σουλφανικό θείο σε ένα σουλφυδρυλικό πυρηνόφιλο μόριο. Έτσι, παράγει δισουλφίδια (R-S-S-H) και μεταφέρει το θείο στα κυανιούχα, για την παραγωγή θειοκυανιούχων (103). Το ένζυμο αυτό υπάρχει σε μεγάλη ποσότητα σε ορισμένους ιστούς και φαίνεται να συμμετέχει στη βιομετατροπή των κυανιούχων, ωστόσο χρειάζονται περισσότερες έρευνες ώστε να διερευνηθεί πλήρως ο ρόλος του (104, 105).

Η γ-λυάση της κυσταθειονίνης (γ-κυσταθειονάση) μπορεί να συμμετέχει έμμεσα στο μεταβολισμό των κυανιούχων παράγοντας σουλφανικό θείο (106). Καταλύει την περσουλφυδρίωση της κυστεΐνης (Cys-SSH) που προκύπτει από την υδρόλυση της κυστίνης (107). Η υπερθειϊκή κυστεΐνη θεωρείται καλή πηγή σουλφανικού θείου που μπορεί να χρησιμοποιηθεί από τη ροδανάση, για τη βιομετατροπή των κυανιούχων. *In vitro* μελέτες του συζευγμένου ενζύμου γ-κυσταθειονάσης και ροδανάσης, έχουν δείξει ότι η γ-κυσταθειονάση ενισχύει τη διαθείωση των κυανιούχων και το συμπροϊόν αυτής της αντίδρασης είναι η θειοκυστίνη, που αποτελεί υπόστρωμα για τη δράση της ροδανάσης και θεωρείται καλύτερο υπόστρωμα από τα θειοθειϊκά (108).

Μελέτες έχουν δείξει ότι η αλβουμίνη του ορού μπορεί να μεταφέρει σουλφανικό θείο, με τη μορφή συμπλόκου αλβουμίνης-θείου, το οποίο αντιδρά με τα κυανιούχα και έχει ως αποτέλεσμα τη μετατροπή τους σε θειοκυανιούχα. Στον άνθρωπο, κάθε μόριο αλβουμίνης μπορεί να δεσμεύσει 5 ή 6 άτομα θείου. Έχει θεωρηθεί ότι το σύμπλοκο αλβουμίνης-θείου αποτελεί την πρωταρχική οδό βιομετατροπής των κυανιούχων όταν οι πηγές σουλφανικού

θείου είναι μειωμένες. Όμως, οι *in vivo* μελέτες έχουν αποδείξει ότι η αλβουμίνη παίζει μικρό ρόλο στη βιομετατροπή (105, 109).

Πέρα από τη δράση των παραπάνω ενζύμων, υπάρχουν και μη ενζυμικοί αποτοξινωτικοί μηχανισμοί που οφείλονται σε χημικές αντιδράσεις που μπορεί να συμβούν στον ανθρώπινο οργανισμό. Ο πιο σημαντικός, είναι η αντίδραση των κυανιούχων με την κυστίνη για την παραγωγή του 2-αμινο-4-θειαζολιδινο-καρβοξυλικού οξέος (ATCA), το οποίο είτε μπορεί να αποβληθεί από τα νεφρά ή τον σίελο, είτε να μετατραπεί στο ταυτομερές του 2-αμινο-4-θειαζολιδινο-καρβοξυλικό οξύ (ITCA), και να αποβληθεί (110). Ο σχηματισμός του ATCA εξαρτάται από τη συγκέντρωση των κυανιούχων και τη διαθεσιμότητα της κυστίνης στον οργανισμό, που εξαντλείται γρήγορα σε περιπτώσεις δηλητηρίασης με κυανιούχα. Η αντίδραση που λαμβάνει χώρα είναι η παρακάτω, όπου τα κυανιούχα αντιδρούν με την κυστίνη και σχηματίζουν τη β-θειοκυανολανίνη, η οποία στη συνέχεια μετατρέπεται σε ATCA και ITCA που απεκκρίνονται από τα ούρα και τον σίελο (110, 111).



Θα πρέπει να σημειωθεί ότι το κυανιούχο ιόν μπορεί να σχηματίσει εύκολα σύμπλοκα με τα βαρέα μέταλλα, όπως με το σίδηρο της αίμης της αιμοσφαιρίνης, σχηματίζοντας την κυανομεθαιμοσφαιρίνη (7) και με το κοβάλτιο(III) της υδροξυκοβαλαμίνης, σχηματίζοντας την κυανοκοβαλαμίνη, με αποτέλεσμα να δεσμεύονται τα κυανιούχα και αναστέλλεται η δράση τους (11, 112, 113).

Ως ισχυρά πυρηνόφιλα μόρια, τα κυανιούχα μπορούν να αντιδράσουν με μόρια που περιέχουν καρβονυλομάδες (όπως άλατα ή εστέρες αμινοξέων, πχ πυροσταφυλικού οξέος)

και να σχηματίσουν κυανυδρίνες, οι οποίες μπορούν να μετατραπούν σε μεταβολίτες μικρότερου μεγέθους και να απεκκριθούν (11, 69, 103).

Τα κυανιούχα μπορούν, επίσης, να οξειδωθούν σε κυανικά άλατα ή σε μυρμηκικό οξύ. Το κυανικό άλας μπορεί να σχηματίσει διοξείδιο του άνθρακα και να απομακρυνθεί από τον οργανισμό με την αναπνοή και τις σωματικές εκκρίσεις (95), ενώ το μυρμηκικό ακολουθεί το μεταβολισμό παραγώγων που έχουν έναν άνθρακα στο μόριό τους ή απεκκρίνεται ως έχει από τα ούρα (11, 112).

Τέλος, σε πειράματα έχει αποδειχθεί η παρουσία του άνθρακα των κυανιούχων στη μεθυλομάδα της χολίνης και της μεθειονίνης, καθώς και στον ουρεϊδικό άνθρακα της αλλαντοΐνης, χρησιμοποιώντας κατά πάσα πιθανότητα το μυρμηκικό οξύ ως ενδιάμεσο (93).

Στον μέσο άνθρωπο, οι δράσεις όλων αυτών των μηχανισμών βιομετατροπής έχουν ως αποτέλεσμα, την αποτοξίνωση του οργανισμού με ρυθμό 0.017 mg/kg/min (103, 115).

4.1.4 Απέκκριση

Τα θειοκυανιούχα που έχουν παραχθεί από τη βιομετατροπή των κυανιούχων απεκκρίνονται μέσω των ούρων. Σε υγιείς ανθρώπους, ο μέσος χρόνος ημιζωής απέκκρισης των θειοκυανιούχων είναι 2.7 μέρες, ενώ σε ασθενείς με νεφρική ανεπάρκεια, φτάνει μέχρι τις 9 μέρες. Επομένως, η λειτουργία των νεφρών παίζει σημαντικό ρόλο στην απέκκριση των κυανιούχων (18).

Ένα μικρό ποσοστό των κυανιούχων απεκκρίνεται μέσω της εκπνοής, με τη μορφή υδροκυανίου (11) και διοξειδίου του άνθρακα (στην περίπτωση οξείδωσής τους σε κυανικό άλας ή μυρμηκικό οξύ) (7, 19, 114). Σε περίπτωση οξείδωσής τους σε μυρμηκικό οξύ, αυτό μπορεί να αποβληθεί και ως έχει από τα ούρα (112).

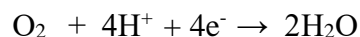
Από τα ούρα και τον σίελο αποβάλλονται, επίσης, με τη μορφή ATCA και ITCA, τα κυανιούχα που έχουν αντιδράσει με την κυστίνη (7, 110).

Αναφέρθηκε παραπάνω ότι τα κυανιούχα σχηματίζουν σύμπλοκο με την υδροξυκοβαλαμίνη, την κυανοκοβαλαμίνη. Στη συνέχεια, η κυανοκοβαλαμίνη μπορεί να απεκκριθεί από τα ούρα και τη χολή (11, 61). Ενώ στην περίπτωση της κυανομεθαιμοσφαιρίνης, αυτή παραμένει στον οργανισμό (7).

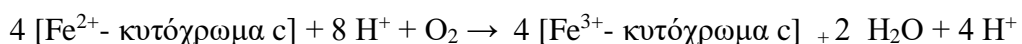
5 Δηλητηριάσεις με κυανιούχες ενώσεις

5.1 Μηχανισμός τοξικής δράσης

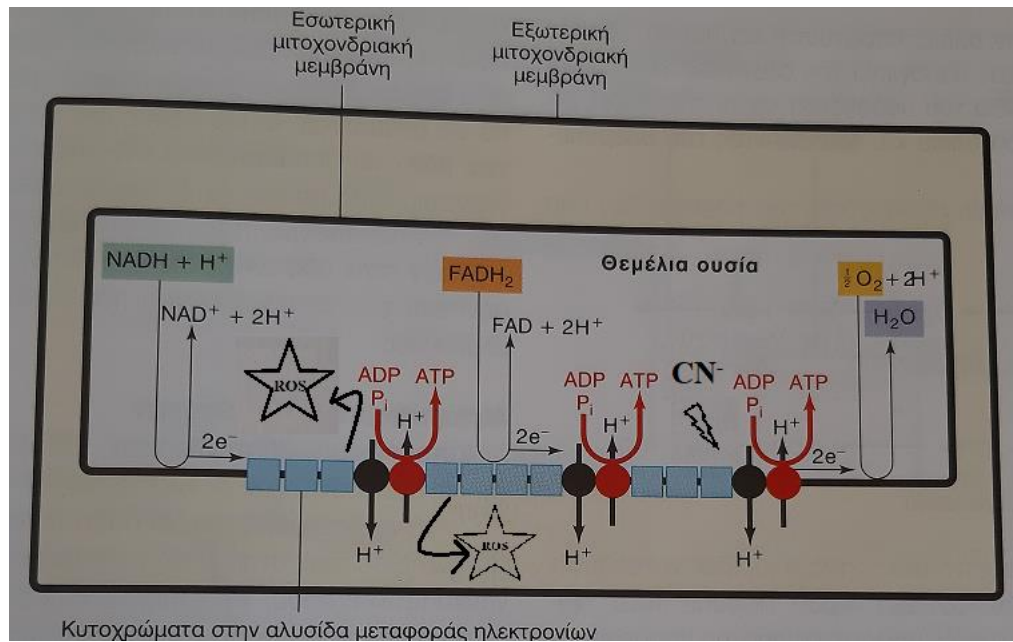
Τα κυανιούχα είναι αναστολείς πολλών ενζυμικών συστημάτων του ανθρώπινου οργανισμού. Το πιο σημαντικό ένζυμο που αδρανοποιούν είναι η οξειδάση του κυτοχρώματος c, ένα ένζυμο απαραίτητο για την οξειδωτική φωσφορυλίωση, επομένως και για την αερόβια παραγωγή ενέργειας (10). Η οξειδωτική φωσφορυλίωση (Εικόνα 3) είναι μια πορεία μετατροπής της γλυκόζης σε τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP) στα μιτοχόνδρια, μέσω μεταφοράς ηλεκτρονίων από το NADH (ανηγμένη μορφή του νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτιδίου) ή το FADH₂ (ανηγμένη μορφή του φλαβινο-αδενινο-δινουκλεοτιδίου) στο οξυγόνο. Μπορεί να διακριθεί σε δύο επιμέρους μηχανισμούς: την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων και τη χημειώσωση (37, 116). Η οξειδάση του κυτοχρώματος c είναι το τελευταίο ένζυμο της αναπνευστικής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων. Αποτελείται από δύο ομάδες αίμης (α και α₃) και δύο ιόντα χαλκού (117). Κάθε μόριο ενζύμου μεταφέρει τέσσερα ηλεκτρόνια σε ένα μόριο οξυγόνου (το οποίο μεταφέρεται από την αιμοσφαιρίνη) και παράγονται 2 μόρια νερού, σύμφωνα με την αντίδραση:



Η μεταφορά ηλεκτρονίων πραγματοποιείται μέσω του οξειδοαναγωγικού συστήματος Fe(II)/ Fe(III) και συνοπτικά αποδίδεται με την αντίδραση (116):



Τα κυανιούχα συνδέονται με το σίδηρο της αίμης του συμπλόκου κυτοχρώματος α₃, με αποτέλεσμα την αναστολή της επανοξειδωσης του αναχθέντος κυτοχρώματος α₃ από το οξυγόνο, έτσι αναστέλλεται το τελικό στάδιο της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και παρεμποδίζεται ο αερόβιος μεταβολισμός, με αποτέλεσμα την ανοξία του κυττάρου (10, 118).



Εικόνα 3. Αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων και θέσεις που δρουν τα κυανιούχα και οι ενεργές μορφές οξυγόνου (119).

Επομένως, στις δηλητηριάσεις με κυανιούχα η ποσότητα του οξυγόνου που φτάνει στα μιτοχόνδρια είναι φυσιολογική, αλλά δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί από το κύτταρο και έτσι δεν παράγονται μόρια ATP. Λόγω της μη χρησιμοποίησης των μορίων οξυγόνου από τους ιστούς, το φλεβικό αίμα έχει μικρότερη διαφορά οξυγόνου από το αρτηριακό απ' ότι σε φυσιολογικά πλαίσια, που η διαφορά ανέρχεται σε 4-5 όγκους οξυγόνου, με αποτέλεσμα το φλεβικό αίμα να έχει πιο ερυθρωπή χροιά (61).

Η γλυκόλυση συνεχίζεται αναερόβια, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση γαλακτικού οξέος, λόγω της αναγωγής του πυροσταφυλικού οξέος σε γαλακτικό. Παρατηρείται, επίσης, οξέωση, η οποία οφείλεται στην υδρόλυση του ATP σε ADP και την ταυτόχρονη παραγωγή ιόντων υδρογόνου (H⁺), τα οποία δεν αναλίσκονται, καθώς η υδρόλυση του ATP σε ADP δεν είναι πλέον αμφίδρομη (37, 61, 120).

Επομένως, η τοξικότητα των κυανιούχων στοχεύει κυρίως στον εγκέφαλο και την καρδιά, καθώς εξαρτώνται πολύ από τον αερόβιο μεταβολισμό και είναι πολύ ευαίσθητα όργανα στην έλλειψη ενέργειας που παρατηρείται από τη δηλητηρίαση.

Εκτός από την οξειδάση του κυτοχρώματος c, έχουν βρεθεί πάνω από 40 ενζυμικά συστήματα που αδρανοποιούνται από τα κυανιούχα (61). Τα κυανιούχα, κυρίως, συνδέονται με τα μέταλλα που υπάρχουν στις δομές των ενζύμων, όπως ο σίδηρος σε ένζυμα που έχουν αίμη στο μόριο τους. Τέτοια ένζυμα είναι η μυοσφαιρίνη (121), η υπεροξειδάση του κυτοχρώματος c (CCP) (122), η υπεροξειδάση του αγριοράπανου (horseradish peroxidase) (123), η καταλάση (124) και η σουκινική δεϋδρογενάση (125).

Ένζυμα που έχουν μολυβδαίνιο στο μόριο τους, όπως η νιτρική αναγωγή (126), η οξειδωμένη και η ανηγμένη μορφή των δεϋδρογενάση της ξανθίνης, οξειδάση της ξανθίνης, οξειδάση της αλδεϋδης και η ανηγμένη μορφή της οξειδάσης τωνθειωδών (127). Στα ένζυμα αυτά, τα κυανιούχα απομακρύνουν το θείο από τα κέντρα μολυβδαινίου (128). Άλλα ένζυμα που αδρανοποιούνται από τα κυανιούχα είναι η αναγωγή των νιτρωδών, που μπορεί να έχει στο μόριο της σίδηρο ή χαλκό (128), η καρβονική ανυδράση που έχει ψευδάργυρο (129) και η σουπεροξειδική δισμουτάση, της οποίας έχουν βρεθεί δύο τύποι στον άνθρωπο: ο ένας περιέχει χαλκό και ψευδάργυρο και ο άλλος μαγγάνιο (130). Τέλος, υπάρχουν ένζυμα όπως η 2-κετο-4 υδροξυγλουταρική αλδολάση που είναι ενδιάμεσο μόριο βάσης του Schiff, η οποία αδρανοποιείται μετά από αντίδραση με τα κυανιούχα και σχηματίζει κυανυδρίνη σε κάποιο ενδιάμεσο στάδιο (131).

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, η μεταφορά ηλεκτρονίων οδηγεί σε παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS), όπως υπεροξειδία, σουπεροξειδία και ρίζες υδροξυλίου, σε μικρές ποσότητες, οι οποίες μεταβολίζονται από τον αποτοξινωτικό μηχανισμό του κυττάρου (132). Όμως, όπως ειπώθηκε παραπάνω, η αδρανοποίηση της οξειδάσης του κυτοχρώματος c έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή H^+ , τα οποία με τη σειρά τους παράγουν περισσότερα ROS και οδηγούν το κύτταρο σε οξειδωτικό στρες και στην υπεροξειδωση των λιπιδικών μεμβρανών του κυττάρου, κυρίως αυτών του εγκεφάλου (84, 133, 134). Το οξειδωτικό στρες, όπως και η εξάντληση των ATP που προκαλείται από τα κυανιούχα, έχει σαν αποτέλεσμα τη διαταραχή της ομοιόστασης του κυττάρου (135). Το οξειδωτικό στρες συνδέεται, επίσης, με την υπερβολική δραστηριότητα των υποδοχέων του N-μεθυλο-D-ασπαρτικού οξέος (NMDA) (136).

Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι μετά την έκθεση στα κυανιούχα, αυξάνονται τα επίπεδα των ιόντων ασβεστίου (Ca^{2+}) στο κυτταρόπλασμα, γεγονός που οφείλεται στην ενεργοποίηση των διαύλων Ca^{2+} , την ενεργοποίηση των αντιμεταφορέων νατρίου- ασβεστίου και την ενεργοποίηση των υποδοχέων NMDA (137- 139), με αποτέλεσμα τη διαταραχή της ομοιόστασης του Ca^{2+} . Η αύξηση του κυτοσολικού Ca^{2+} διεγείρει την απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών και συνδέεται με αυξημένα επίπεδα κατεχολαμινών στο αίμα και γλουταμινικού οξέος στον εγκέφαλο (140). Όλα αυτά τα γεγονότα ενισχύουν την πεποίθηση ότι τα κυανιούχα θεωρούνται ισχυρές νευροτοξίνες.

Τα κυανιούχα έχουν και καρδιοτοξική δράση, η οποία οφείλεται, κυρίως, στην αύξηση των ιόντων ασβεστίου και στη διαταραχή της ομοιόστασης των ιόντων αυτών (141). Αποτέλεσμα αυτών είναι οι διαταραχές διέγερσης και συστολής, η εκπόλωση του

δυναμικού ηρεμίας της μεμβράνης, το μειωμένο εύρος δυναμικού δράσης, η παρατεταμένη διάρκεια δυναμικού ενέργειας, η εκπόλωση δυναμικού μιτοχονδριακής μεμβράνης και η καταστολή της εκπόλωσης του ρεύματος ιόντων καλίου. (1).

Συμπερασματικά, τα κυανιούχα επηρεάζουν πολλές λειτουργίες του οργανισμού. Το κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) και το καρδιαγγειακό επηρεάζονται περισσότερο καθώς, ο εγκέφαλος και η καρδιά είναι τα πιο ευαίσθητα όργανα στις ενεργειακές διαταραχές που προκαλεί η αναστολή της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (37, 61). Στον εγκέφαλο παρατηρείται μεγαλύτερη ευαισθησία στα βασικά γάγγλια, την παρεγκεφαλίδα και τον αισθητικοκινητικό φλοιό (142). Τα συμπτώματα που εμφανίζονται ποικίλλουν, ανάλογα με τη δόση των κυανιούχων, την οδό και την ταχύτητα χορήγησης, τη χημική δομή των κυανιούχων ενώσεων και άλλους παράγοντες που έχουν σχέση με τον ασθενή, όπως ηλικία, βάρος και φυσική κατάσταση του οργανισμού (5).

Στο ΚΝΣ προκαλεί παράλυση, κυρίως στα εγκεφαλικά κέντρα του προμήκη, τα οποία αρχικά διεγείρει για σύντομο χρονικό διάστημα και μετά παραλύει (15). Στη συνέχεια, ακολουθεί παράλυση των λοιπών μερών του ΚΝΣ και τέλος, των περιφερικών νεύρων. Οι δραστικές μορφές οξυγόνου εμπλέκονται σε πολλαπλά μονοπάτια, με αποτέλεσμα να προκαλούν απόπτωση, νέκρωση και νευροεκφύλιση (142).

Η δράση των κυανιούχων ενώσεων στο καρδιαγγειακό σύστημα έχει ως αποτέλεσμα την καρδιακή ανακοπή (143). Αρχικά, παρατηρείται ταχυκαρδία και ελαφρά υπόταση, λόγω της απελευθέρωσης της επινεφρίνης από τα επινεφρίδια (37), όπου τελικά καταλήγει σε συνεχή βραδυκαρδία, λόγω της έλλειψης ATP (15, 142, 144).

Σε περίπτωση κατάποσης, παρατηρείται τοξικότητα στο γαστρεντερικό σύστημα, κυρίως αιμορραγική γαστρίτιδα, με συμπτώματα, όπως κοιλιακός πόνος, ναυτία και έμετος (15, 142, 145, 146). Η γαστρίτιδα αυτή είναι εμφανής και στη νεκροτομή και είναι αποτέλεσμα της διαβρωτικής φύσης των κυανιούχων αλάτων (37,142).

Τέλος, στο δέρμα οι κυανιούχες ενώσεις ασκούν τοπική δράση, η οποία είναι, κυρίως, αναισθητική. Η διάρκεια και ο βαθμός της αναισθησίας εξαρτώνται από την ποσότητα του δηλητηρίου, καθώς και το χρόνο επαφής του με το δέρμα (61).

5.2 Κλινική εικόνα οξείας και χρόνιας δηλητηρίασης

Η δηλητηρίαση με τις κυανιούχες ενώσεις μπορεί να είναι οξεία ή χρόνια. Τα συμπτώματα της οξείας δηλητηρίασης που προέρχονται από τη δράση των κυανιούχων ενώσεων στο ΚΝΣ είναι κεφαλαλγία, ζάλη, λιποθυμική τάση, ανησυχία, νευρικότητα, σύγχυση, λήθαργος, μυδρίαση, οι κόρες των οφθαλμών είναι μη αντιδρώσες, παράλυση και κώμα (14, 15, 143, 147, 148). Επίσης, παρατηρούνται σπασμοί, που οφείλονται, κυρίως, σε αλλαγές στα κεντρικά ντοπαμινεργικά μονοπάτια, με αποτέλεσμα τη γρήγορη μείωση της ντοπαμίνης, καθώς και σε μονοπάτια όπου αμινοξέα λειτουργούν ως νευροδιαβιβαστές, όπως το γ-αμινο-βουτυρικό οξύ (GABA) (149).

Στο αναπνευστικό, παρατηρούνται δύο φάσεις συμπτωμάτων. Στην πρώτη φάση, εμφανίζεται διέγερση των χημειούποδοχέων του κεντρικού αναπνευστικού κέντρου, με αποτέλεσμα την εμφάνιση ταχύπνοιας και στη συνέχεια, δύσπνοια (15, 117, 150). Στη δεύτερη φάση, μειώνεται ο ρυθμός της αναπνοής με τελικό αποτέλεσμα την άπνοια (15, 147). Έχει, επίσης, παρατηρηθεί πνευμονικό οίδημα, το οποίο, ίσως, να οφείλεται στην κάμψη της λειτουργίας της αριστεράς κοιλίας (143).

Στο καρδιαγγειακό, πέρα από την κολπική ταχυκαρδία, έχουν αναφερθεί και περιπτώσεις κολπικής βραδυκαρδίας, κολπικής μαρμαρυγής, κοιλιακής ταχυκαρδίας, κοιλιακής μαρμαρυγής και ασυστολίας (37).

Οι δερματικές αντιδράσεις ποικίλλουν. Μελέτες αναφέρουν μια χαρακτηριστική κερασέρυθηρη χροιά στο δέρμα που όμως, παρατηρείται σπάνια (142, 145, 151). Οφείλεται στη φλεβική αιμοσφαιρίνη που παρουσιάζει αυξημένο κορεσμό οξυγόνωσης, λόγω της μειωμένης κατανάλωσης οξυγόνου από τους ιστούς (37, 115, 150).

Γενικά, η δηλητηρίαση μπορεί να χωριστεί σε τρεις περιόδους. Στην πρώτη, εμφανίζονται κεφαλαλγία, ζάλη, ασθενής και ταχύς καρδιακός ρυθμός, ναυτία και έμετος. Στη δεύτερη, σπασμοί, μυδρίαση, ψυχρό δέρμα και ο καρδιακός ρυθμός γίνεται ακόμα πιο ασθενής και γρήγορος. Στην τρίτη περίοδο, ο καρδιακός ρυθμός είναι πλέον ακανόνιστος και αργός, πέφτει η θερμοκρασία του σώματος, παρατηρείται κυάνωση στα χείλη, στο πρόσωπο και στα άκρα, σίελος ή οροαιματηρό υγρό εκρέει από το στόμα και προκαλείται κώμα και θάνατος (7, 61).

Ο θάνατος επέρχεται λόγω της ανοξίας των ιστών. Αν δεν επέλθει, η ανάνηψη είναι σχεδόν βέβαιη (61), όμως οι επιζώντες από σοβαρή οξεία δηλητηρίαση μπορεί να εμφανίσουν επιβραδυσμένες νευρολογικές επιπλοκές με συμπτώματα που μοιάζουν με τα παρκινσονικά, όπως ακαμψία, βραδυκινησία και δυσαρθρία (15, 142, 148, 152). Αυτό

συμβαίνει γιατί επηρεάζονται τα βασικά γάγγλια (153). Επίσης, έχει παρατηρηθεί μειωμένη βραχυπρόθεσμη μνήμη και έλλειψη προσοχής (15, 147).

Η χρόνια δηλητηρίαση εμφανίζεται πιο σπάνια από την οξεία, κυρίως σε άτομα που εκτίθενται συνεχώς σε μικρές ποσότητες κυανιούχων ενώσεων, στον επαγγελματικό τους χώρο ή σε άτομα που καταναλίσκουν μεγάλες ποσότητες τροφών που περιέχουν κυανογόνους γλυκοζίτες. Τα συμπτώματα που παρατηρούνται είναι, κεφαλαλγία, αδυναμία, διαταραχές γεύσης και οσμής, ζάλη, έμετος, μείωση οπτικής ικανότητας και ψύχωση (15, 61). Επιπλέον, εμφανίζονται δερματικές αλλοιώσεις και έχουν παρατηρηθεί αλλαγές στο χρώμα των μαλλιών εργατών που εκτίθενται σε σιδηροκυανιούχο κάλιο (61). Με τη χρόνια δηλητηρίαση έχουν συνδεθεί μερικές νευροεκφυλιστικές ασθένειες όπως η τροπική αταξική νευροπάθεια (TAN) και η νόσος Konzo που επηρεάζει τον ανώτερο κινητικό νευρώνα. Επίσης, έχουν παρατηρηθεί και οπτικές νευροπάθειες, όπως αμβλυωπία του καπνού και κληρονομική οπτική ατροφία Leber και τέλος, διαταραχές του θυροειδούς αδένου.

Η TAN προκαλεί απομυελίνωση που οδηγεί σε οπτική ατροφία και αταξία. Επιπλέον, εμφανίζεται δερματίτιδα του όσχεου, στοματίτιδα και γλωσσίτιδα (7, 14, 15, 61, 117, 154). Στη νόσο Konzo παρατηρείται μια σπαστική παραπάρεση με αρχικά συμπτώματα γενικής αδυναμίας, δυσκολία στη βάδιση και τρέμουλο. Αργότερα, οι ασθενείς έχουν την τάση να πέφτουν ενώ περπατούν και τέλος, δεν μπορούν να σταθούν όρθιοι και χάνεται η ικανότητα βάδισης (15, 143).

Η αμβλυωπία του καπνού χαρακτηρίζεται από σκοτοδίνη και παροδική ωχρότητα του οπτικού δίσκου (61). Έχει βρεθεί ότι η χορήγηση της υδροξυκοβαλαμίνης μειώνει τις οπτικές διαταραχές που οφείλονται στις κυανιούχες ενώσεις (7, 14, 15, 117).

Οι διαταραχές που παρατηρούνται στο θυροειδή οφείλονται στα θειοκυανιούχα, το μεταβολίτη των κυανιούχων, τα οποία αναστέλλουν τη συσσώρευση του ιωδίου από τον αδένου, με αποτέλεσμα να μην μπορεί ο αδένου να διατηρήσει τη συγκέντρωση του ιωδίου στα επιθυμητά επίπεδα. Έτσι, μπορεί να παρατηρηθούν αυξημένα επίπεδα θυρεοτρόπου ορμόνης (TSH), και μειωμένα επίπεδα θυροειδικών ορμονών, T3 και T4. Τέλος, παρατηρείται διόγκωση του θυροειδούς αδένου (7, 15, 117).

6 Διάγνωση και θεραπεία δηλητηριάσεων

6.1 Διάγνωση

Για τη διάγνωση μιας δηλητηρίασης λαμβάνεται υπόψιν το ιστορικό της έκθεσης, το οποίο βασίζεται στη μαρτυρία του ατόμου, καθώς και στην έρευνα του χώρου έκθεσης, τα εργαστηριακά ευρήματα και η φυσική εξέταση του ατόμου. Η επιβεβαίωση γίνεται με αναλυτικές μεθόδους προσδιορισμού του δηλητηρίου (61). Σημεία που μπορεί να φανερώσουν δηλητηρίαση από κυανιούχα είναι η λαμπρή ερυθρή χροιά στο φλεβικό αίμα ή στις φλέβες του αμφιβληστροειδούς, η κυάνωση του προσώπου, καθώς και η οσμή πικραμύδαλων (10, 15, 148). Τα εργαστηριακά ευρήματα είναι: α) μειωμένη διαφορά κορεσμού οξυγόνου ανάμεσα στο αρτηριακό και στο φλεβικό αίμα, β) μεταβολική οξέωση με φυσιολογική μερική πίεση οξυγόνου και γ) αυξημένη συγκέντρωση γαλακτικού οξέος στο πλάσμα αίματος (5, 6, 10, 14). Βέβαια, τα ευρήματα αυτά δεν διευκολύνουν τη διαφοροδιάγνωση από δηλητηριάσεις από άλλα ασφυξιογόνα αέρια, όπως μονοξείδιο του άνθρακα, υδρόθειο, αζίδια, φωσφίνη, φαινόλη και μεθυλαλογονίδια (14, 61). Υπάρχει, ωστόσο, συσχέτιση της συγκέντρωσης των κυανιούχων στο αίμα με τα ανιχνευόμενα υψηλά επίπεδα γαλακτικού οξέος στο πλάσμα (6, 37).

6.2 Θεραπεία

Οι κυανιούχες ενώσεις είναι ταχέως δρώντα δηλητήρια, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, για το λόγο αυτό θα πρέπει η θεραπευτική αντιμετώπιση να ξεκινήσει το συντομότερο δυνατό. Το πρώτο σημαντικό βήμα είναι ο τερματισμός της περαιτέρω έκθεσης του ατόμου. Αυτό μπορεί να συμβεί, με την απομάκρυνση του ατόμου από το χώρο της έκθεσης και με απομάκρυνση των ρούχων, σε περίπτωση διαδερμικής έκθεσης (5, 6, 51, 61). Στην τελευταία περίπτωση, αν δεν υπάρχει λύση της συνέχειας του δέρματος, είναι απαραίτητη η πλύση του με διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου και στη συνέχεια, με άφθονο νερό (61). Το άτομο που παρέχει τις πρώτες βοήθειες πρέπει να φορά προστατευτική μάσκα. Σε περίπτωση κατάποσης των κυανιούχων, αφού απομακρυνθεί ο ασθενής από το χώρο έκθεσης και παρασχεθούν οι πρώτες βοήθειες, απομακρύνεται η ποσότητα του δηλητηρίου, που πιθανό να έχει παραμείνει στο στομάχι, με γαστρική πλύση, ώστε να μειωθεί περαιτέρω η απορρόφηση των κυανιούχων από το γαστρεντερικό σύστημα (51, 61).

Στη συνέχεια, ακολουθείται υποστηρικτική αγωγή που περιλαμβάνει την χορήγηση καθαρού οξυγόνου (129, 136), τη μηχανική υποστήριξη των αεραγωγών καθώς και τη διατήρηση του καρδιακού παλμού (5, 6, 14, 98, 156, 157). Υπάρχουν μελέτες που εξετάζουν τη χρήση υπερβαρικού οξυγόνου (158), κυρίως σε σοβαρές περιπτώσεις δηλητηρίασης (159) ή σε δηλητηριάσεις από κυανιούχα και μονοξειδίο του άνθρακα που προκαλούνται σε περιπτώσεις πυρκαγιάς σε εσωτερικούς χώρους (160- 163), χωρίς όμως, να είναι γνωστός ο μηχανισμός δράσης του (164). Η αποτελεσματικότητά του βρίσκεται, ακόμα, υπό εξέταση (34). Η χρήση του, όμως, είναι αρκετά δύσκολη, καθώς χρειάζεται η μεταφορά του ασθενούς σε ειδικά διαμορφωμένους θαλάμους, ο αριθμός των οποίων είναι αρκετά περιορισμένος.

Για τη μεταβολική οξέωση που παρατηρείται κατά τη διάρκεια της δηλητηρίασης, προτείνεται η χορήγηση διττανθρακικού νατρίου. Σε περίπτωση εμφάνισης σπασμών, αυτοί αντιμετωπίζονται με τη χορήγηση αντισπασμωδικών φαρμάκων, όπως είναι η διαζεπάμη (5, 6, 14, 156). Τέλος, σε περίπτωση εμφάνισης υπότασης, χορηγούνται συμπαθομιμητικά αγγειοσυσπαστικά φάρμακα, όπως η επινεφρίνη (1, 156).

Τέλος, ακολουθεί η χορήγηση του κατάλληλου αντιδότου.

6.3 Αντίδοτα

Τα αντίδοτα που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία των κυανιούχων χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες, ανάλογα με τον τρόπο δράσης τους και συνήθως χρησιμοποιούνται συνδυαστικά. Οι κατηγορίες είναι οι εξής: επαγωγείς σχηματισμού μεθαιμοσφαιρίνης, δότες σουλφανικού θείου και ουσίες που συνδέονται με τα κυανιούχα. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι τα ήδη υπάρχοντα αντίδοτα είναι αρκετά τοξικά, γι' αυτό χορηγούνται μόνο όταν είναι σίγουρο ότι η δηλητηρίαση του ατόμου προέρχεται από τα κυανιούχα (165).

6.3.1 Επαγωγείς σχηματισμού μεθαιμοσφαιρίνης

Ο βασικός στόχος των κυανιούχων είναι η οξειδάση του κυτοχρώματος c. Έτσι, χρησιμοποιούνται αντίδοτα που έμμεσα ανταγωνίζονται την οξειδάση του κυτοχρώματος για τη δέσμευση των κυανιούχων. Αυτό μπορεί να συμβεί με τη μετατροπή της αιμοσφαιρίνης σε μεθαιμοσφαιρίνη, η οποία ανταγωνίζεται την οξειδάση του κυτοχρώματος c για τη δέσμευση των κυανιούχων (166). Στο μόριο της μεθαιμοσφαιρίνης υπάρχουν ιόντα τρισθενούς σιδήρου, τα οποία συνδέονται ισχυρά με τα κυανιούχα και σχηματίζεται κυανομεθαιμοσφαιρίνη. Έτσι, τα κυανιούχα αποδεσμεύονται από την οξειδάση του κυτοχρώματος c των ιστών, μετακινούνται στο αίμα και εκεί δεσμεύονται από τη μεθαιμοσφαιρίνη (5, 6, 61, 164).

Νιτρώδες αμύλιο

Κυκλοφορεί με τη μορφή αμπούλας και χορηγείται δια εισπνοής. Το νιτρώδες αμύλιο προκαλεί μεθαιμοσφαιριναιμία σε χαμηλό ποσοστό (157), παρ' όλ' αυτά χρησιμοποιείται έως ότου ξεκινήσει η χορήγηση του νιτρώδους νατρίου. Ο συνδυασμός των δύο φαρμάκων χρησιμοποιείται στη θεραπευτική των δηλητηριάσεων από τα κυανιούχα από τη δεκαετία του 1930 (156). Η χορήγηση του νιτρώδους αμυλίου διακόπτεται αν η συστολική πίεση πέσει κάτω από 80 mmHg (61). Πλέον, δεν χρησιμοποιείται ιδιαίτερα.

Νιτρώδες νάτριο

Το νιτρώδες νάτριο, εκτός από επαγωγέας σχηματισμού της μεθαιμοσφαιρίνης, βιομετατρέπεται σε μονοξείδιο του αζώτου (NO), το οποίο μπορεί να απομακρύνει τα κυανιούχα από την οξειδάση του κυτοχρώματος (157, 167, 168). Χορηγείται ενδοφλεβίως και σε συνδυασμό με το θειοθειικό νάτριο (61). Σε περιπτώσεις υπερβολικής παραγωγής μεθαιμοσφαιρίνης παρατηρούνται παρενέργειες, όπως κυάνωση, έμετος, πονοκέφαλος,

κόπωση και κώμα (96, 167). Επιπλέον, το νιτρώδες νάτριο μπορεί να προκαλέσει υπόταση, η οποία μπορεί να είναι κρίσιμη σε ασθενείς με υποογκαιμία (169). Αντενδείκνυται η χορήγησή του σε ασθενείς με έλλειψη του ενζύμου G6PD (αφυδρογονάση της 6 φωσφορικής γλυκόζης), καθώς μπορεί να προκαλέσει αιμολυτικές αντιδράσεις (117). Τέλος, σε περίπτωση θυμάτων πυρκαγιάς, αντενδείκνυται η χορήγησή του, καθώς το μονοξείδιο του άνθρακα αποτρέπει τη μεταφορά οξυγόνου στο αίμα, λόγω της μετατροπής της αιμοσφαιρίνης σε ανθρακυλαιμοσφαιρίνη, με αποτέλεσμα την ανοξία των ιστών (5, 6, 51, 167).

4-διμεθυλοαμινοφαινόλη (DMAP)

Η DMAP αποτελεί το αντίδοτο εκλογής στη Γερμανία και την Αυστρία. Είναι φτηνότερο φάρμακο από το νιτρώδες νάτριο, θεωρείται πιο ισχυρό και δρα ταχύτερα (170). Ένα ακόμα πλεονέκτημά του, είναι η δυνατότητα και ενδομυϊκής χορήγησης πέρα από την ενδοφλέβια. Έτσι, μπορεί να χορηγηθεί γρήγορα σε περιπτώσεις μαζικών δηλητηριάσεων και δεν είναι απαραίτητη η χορήγησή της από εξειδικευμένο προσωπικό (156). Η ενδομυϊκή χορήγηση μπορεί να προκαλέσει πυρετό, φλεγμονή στο σημείο της ένεσης, ακόμα και νέκρωση. Ακόμη μπορεί να προκαλέσει σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες, όπως αυξημένες τιμές ηπατικών ενζύμων, δικτυοερυθροκυττάρωση, αιμόλυση και νεφροτοξικότητα (5, 6, 148, 156, 171).

6.3.2 Δότες σουλφανικού θείου

Όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο της τοξικοκινητικής, το μεγαλύτερο ποσοστό απέκκρισης των κυανιούχων γίνεται μέσω των ούρων με τη μορφή θειοκυανιούχων. Για να μπορέσουν τα ένζυμα να πραγματοποιήσουν αυτή τη βιομετατροπή, χρειάζονται ουσίες που αποτελούν πηγές θείου. Τέτοιες είναι οι ουσίες αυτής της κατηγορίας (148).

Θειοθειικό νάτριο

Χορηγείται ενδοφλέβια και σε συνδυασμό με επαγωγείς σχηματισμού μεθαιμοσφαιρίνης, κυρίως με το νιτρώδες αμύλιο και το νιτρώδες νάτριο, τα οποία κυκλοφορούν σε πολλές χώρες, συμπεριλαμβανομένου και των Ηνωμένων Πολιτειών, με το όνομα «cyanide antidote kit». Το θειοθειικό νάτριο, έχει μικρή μόνο αποτελεσματικότητα όταν χορηγείται μόνο του, καθώς έχει μικρό χρόνο ημιζωής και μικρό όγκο κατανομής (172). Επιπλέον, καθυστερεί να ξεκινήσει η δράση του, γι' αυτό χρησιμοποιείται, κυρίως, σε συνδυασμό με

το νιτρώδες νάτριο (166, 167). Σε ασθενείς με νεφρική ανεπάρκεια, η χορήγησή του χρειάζεται προσοχή, καθώς μειώνεται η απέκκριση των θειοκυανιούχων, αφού αποβάλλονται μέσω των νεφρών, και είναι τοξικά σε μεγάλες συγκεντρώσεις (18, 61). Σε αυτές τις περιπτώσεις, μπορεί να γίνει απέκκριση των θειοκυανιούχων με αιμοδιύλιση (173).

6.3.3 Ουσίες που συνδέονται με τα κυανιούχα

Οι κυριότερες ουσίες που έχουν μελετηθεί και χρησιμοποιούνται στη θεραπευτική, είναι τα παράγωγα κοβαλτίου, καθώς τα ιόντα κοβαλτίου σχηματίζουν σταθερά μεταλλικά σύμπλοκα με τα κυανιούχα ιόντα και τα απομακρύνουν από την κυτοχρωμική οξειδάση (117).

Δικοβάλτιο- EDTA (Co₂-EDTA)

Το δικοβάλτιο- EDTA σχηματίζει χηλικό σύμπλοκο με τα κυανιούχα ιόντα (117), δρα πιο γρήγορα από τα νιτρώδη και απεκκρίνεται από τους νεφρούς. Χορηγείται ενδοφλέβια σε διάλυμα γλυκόζης και χρησιμοποιείται στη Γαλλία και τη Μεγάλη Βρετανία (174). Παρουσιάζει, όμως, σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες, όπως αρρυθμίες, ναυτία, έμετο, άλγος στο θώρακα, οίδημα προσώπου, τρόμο, σπασμούς και γι' αυτό θα πρέπει η χορήγησή του να γίνεται μόνο σε ασθενείς που επιβεβαιωμένα έχουν λάβει κυανιούχα (6, 10, 14, 61, 164, 175).

Υδροξυκοβαλαμίνη

Η υδροξυκοβαλαμίνη (Βιταμίνη B_{12a}) είναι ένα πρόδρομο μόριο, που περιέχει στο κέντρο του ένα άτομο κοβαλτίου, το οποίο ενώνεται με τα κυανιούχα και σχηματίζει την κυανοκοβαλαμίνη (Βιταμίνη B₁₂), που εύκολα απεκκρίνεται από τους νεφρούς (14, 157, 176) ή αποθηκεύεται στο ήπαρ ως προβιταμίνη (176). Έχει το προφίλ του ιδανικού αντιδότη, καθώς η δράση της ξεκινά πολύ γρήγορα, θεωρείται ασφαλές φάρμακο, μπορεί να χρησιμοποιηθεί και σε περίπτωση συνυπάρχουσας δηλητηρίασης με μονοξειδίο του άνθρακα, δεν είναι επιβλαβής, οπότε μπορεί να χρησιμοποιηθεί ακόμα και αν δεν έχει επιβεβαιωθεί η έκθεση σε κυανιούχα και είναι εύκολη η χορήγησή της (6, 175- 177). Όμως, μπορεί να αποσυντεθεί, εξαιτίας του φωτός και η δόση που χρειάζεται για την αντιμετώπιση της δηλητηρίασης είναι πολύ μεγάλη, λόγω της χαμηλής διαλυτότητάς της στο νερό (6, 178). Τέλος, έχει συσχετιστεί με παροδικό ερυθρό χρωματισμό του δέρματος,

των βλεννογόνων και των ούρων (179), γεγονός που μπορεί να παρεμποδίσει μερικές βιοχημικές μετρήσεις στα ούρα, όπως της γλυκόζης, της κρεατινίνης και της χολερυθρίνης (176, 177). Είναι το πρωταρχικό αντίδοτο που χρησιμοποιείται στη Γαλλία, από το 1996 και το 2007 εγκρίθηκε και από την Ευρωπαϊκή Ένωση (177).

6.3.4 Νέα, υπό έρευνα, αντίδοτα

Κοβιναμίδη (cobinamide)

Η κοβιναμίδη είναι το προτελευταίο πρόδρομο μόριο στη βιοσύνθεση της κοβαλαμίνης (156, 157). Η έλλειψη ενός υποκαταστάτη, σε σχέση με την κοβαλαμίνη, έχει ως αποτέλεσμα την ύπαρξη δύο ελεύθερων θέσεων σύνδεσης με το κοβάλτιο. Έτσι, 2 μόρια κυανιούχων συνδέονται με την κοβιναμίδη (178), ενώ στην υδροξυκοβαλαμίνη συνδέεται ένα. Επιπλέον, η σύνδεση είναι πιο ισχυρή, καθώς έχει μεγαλύτερη συγγένεια με τα κυανιούχα (156, 157). Τέλος, είναι 5 φορές περισσότερο υδατοδιαλυτή από την υδροξυκοβαλαμίνη, γεγονός που επιτρέπει τη χορήγηση μικρότερων δόσεων, ώστε να επιτευχθεί το επιθυμητό αποτέλεσμα (178). Έχει μελετηθεί η ενδοφλέβια και η ενδομυϊκή χορήγησή της, τόσο θεραπευτικά, όσο και προφυλακτικά (157), σε πειραματόζωα με πολύ καλά αποτελέσματα.

Έχουν μελετηθεί, επίσης, και διάφορα παράγωγα της κοβιναμίδης, όπως η νιτροκοβιναμίδη, η οποία φαίνεται να έχει καλύτερη απορρόφηση από την κοβιναμίδη, μετά από ενδομυϊκή χορήγηση, λόγω της ύπαρξης της νιτροομάδας (180).

Sulfanegen

Το sulfanegen είναι πρόδρομη ουσία του 3-μερκαπτοπυροσταφυλικού οξέος (3-MP), το οποίο κατά τη διάσπασή του δίνει δύο μόρια 3-MP. Το 3-MP αποτελεί το υπόστρωμα της 3-MST, που καταλύει την απελευθέρωση του σουλφανικού θείου από το 3-MP, το οποίο στη συνέχεια αντιδρά με τα κυανιούχα προς σχηματισμό των θειοκυανιούχων (157, 181). Όπως έχει αναφερθεί στο κεφάλαιο της βιομετατροπής, η 3-MST λειτουργεί ουσιαστικά με τον ίδιο τρόπο με τη ροδανάση, χρησιμοποιώντας διαφορετικά υποστρώματα (το 3-MP και το θειοθειικό νάτριο, αντίστοιχα). Όμως, η 3-MST κατανέμεται ευρέως στους ιστούς, καθώς υπάρχει στο κυτταρόπλασμα και στα μιτοχόνδρια, ενώ η ροδανάση μόνο στα μιτοχόνδρια των ηπατικών και νεφρικών κυττάρων, με αποτέλεσμα το sulfanegen να δείχνει πιο αποτελεσματικό σε σχέση με το θειοθειικό νάτριο (156, 157, 181, 182). Οι

μελέτες που έχουν γίνει στα πειραματόζωα με ενδομυϊκή χορήγηση sulfanegen, δείχνουν ότι η δράση του ξεκινά σε τρία λεπτά και μπορεί, επίσης, να χρησιμοποιηθεί και προφυλακτικά (157). Τέλος, υπάρχει μελέτη για τη χρήση του συνδυασμού κοβιναμίδης και sulfanegen που δείχνει να έχει πολύ καλά αποτελέσματα (183).

Διμεθυλοτρισουλφίδιο (Dimethyl trisulfide, DMTS)

Το DMTS δρα ως δότης θείου σχηματίζοντας με τα κυανιούχα, θειοκυανιούχα. Έχει μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα από το θειοθειικό νάτριο και επιπλέον μπορεί να δράσει και χωρίς τη ροδανάση. Τέλος, είναι εμπορικά διαθέσιμο, καθώς αποτελεί φυσικό προϊόν (παράγωγο του κρεμμυδιού και του σκόρδου) και χορηγείται ενδομυϊκά (167, 184- 186).

Ενώσεις που σχηματίζουν κυανυδρίνες

Όπως έχει αναφερθεί παραπάνω, τα κυανιούχα μπορούν να αντιδράσουν με ενώσεις που περιέχουν καρβονυλομάδες προς σχηματισμό κυανυδρινών, οι οποίες απεκκρίνονται πιο εύκολα από τον οργανισμό. Έτσι, έχουν διεξαχθεί έρευνες που μελετούν αλδεΐδες και κετόνες, ως πιθανά αντίδοτα, με πιο αποτελεσματικά τη διυδροξυακετόνη (DHA) και το α-κετογλουταρικό οξύ (α-KG). Η DHA δείχνει να είναι πιο αποτελεσματική σε συνδυασμό με το θειοθειικό νάτριο και μπορεί να χρησιμοποιηθεί και σε συνυπάρχουσα δηλητηρίαση με μονοξειδίο του άνθρακα (187). Το α-KG δείχνει να είναι πολλά υποσχόμενο αντίδοτο, καθώς είναι πολύ αποτελεσματικό, μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με θειοθειικό νάτριο, έχει προφυλακτική δράση έναντι των κυανιούχων και μελετάται και η δυνατότητα χορήγησής του από το στόμα (6, 148, 156, 164, 188, 189).

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΩΝ ΔΗΛΗΤΗΡΙΑΣΕΩΝ ΜΕ ΚΥΑΝΙΟΥΧΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ

7 Δειγματοληψία και προκατεργασία βιολογικού υλικού

Στους ανθρώπους, τα βιολογικά υλικά που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό των κυανιούχων είναι το αίμα, ο σίελος, τα ούρα, ο εκπνεόμενος αέρας και οι ιστοί, σε μεταθανάτιες (post mortem) περιπτώσεις. Το κύριο υλικό, όμως, είναι το αίμα, καθώς τα κυανιούχα αρχικά εισέρχονται στα ερυθροκύτταρα (61) και υπάρχει συσχέτιση της συγκέντρωσης κυανιούχων στο αίμα με την εκδήλωση των συμπτωμάτων. Προτιμάται το ολικό αίμα για τις αναλύσεις, καθώς το πλάσμα και ο ορός έχουν μικρότερες συγκεντρώσεις κυανιούχων, σε σχέση με τα ερυθροκύτταρα, οπότε χρειάζεται μεγαλύτερη ευαισθησία στις μεθόδους ανάλυσης (190).

Έχουν αναφερθεί μέθοδοι που αναλύουν τον σίελο, κυρίως σε περιπτώσεις καπνιστών και μη καπνιστών, αλλά ακόμα δεν έχει αποδειχθεί η συσχέτιση της έκθεσης σε κυανιούχα με τη συγκέντρωσή τους στον σίελο (57). Επιπλέον, υπάρχουν πολλές πρωτεΐνες στον σίελο, με τις οποίες τα κυανιούχα μπορούν να συνδεθούν, με αποτέλεσμα να δυσχεραίνεται η μέτρηση (62).

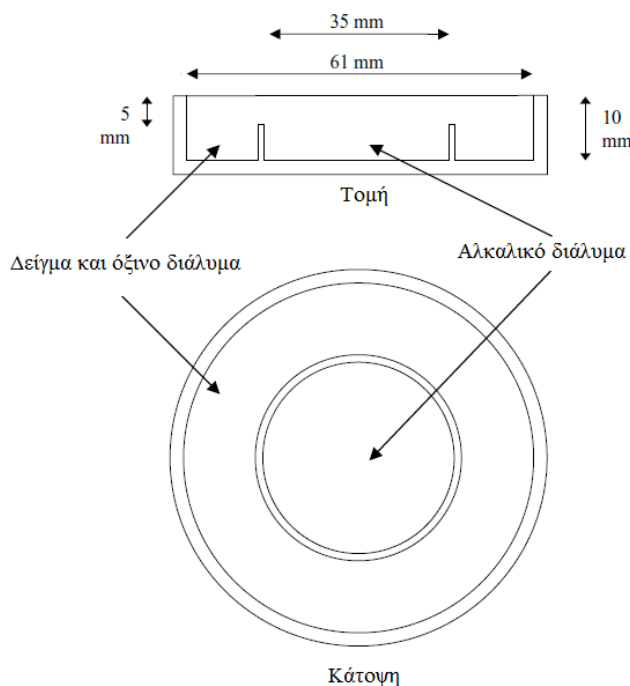
Η συγκέντρωση κυανιούχων στα ούρα είναι αρκετά χαμηλότερη σε σύγκριση με αυτή του αίματος, καθώς προηγείται κατεργασία των κυανιούχων από τα νεφρά (62). Τα ούρα είναι καλύτερο βιολογικό υλικό για την μέτρηση των θειοκυανιούχων που αποτελούν δείκτη έκθεσης σε κυανιούχα (191).

Τέλος, σε μετρήσεις στους ιστούς πρέπει να ληφθούν υπόψιν οι ενδογενείς συγκεντρώσεις των κυανιούχων, καθώς και οι συγκεντρώσεις της ροδανάσης και των δοτών θείου που επηρεάζουν το μεταβολισμό των κυανιούχων (191).

Τα βιολογικά δείγματα που συλλέγονται αποτελούν περίπλοκα υποστρώματα, καθώς περιέχουν πρωτεΐνες, λιπίδια και μικρά μόρια. Αυτό καθιστά δύσκολο τον προσδιορισμό των κυανιούχων σε αυτά.

Στο ολικό αίμα, για παράδειγμα, θα πρέπει πρώτα να απελευθερωθούν τα κυανιούχα από το αίμα. Ένας εύκολος τρόπος είναι με μικροδιάχυση, με χρήση συσκευής διάχυσης Conway (146). Στην Εικόνα 4 παρουσιάζεται η κυψελίδα του Conway, η οποία αποτελείται από δύο ομόκεντρα διαμερίσματα και ένα καπάκι, το οποίο κλείνει ερμητικά. Το χάρισμα μεταξύ των διαμερισμάτων είναι πιο χαμηλό και δεν ακουμπά το καπάκι. Στο εξωτερικό διαμέρισμα, τοποθετούνται το δείγμα και ένα μέσο οξίνισης, όπως διάλυμα θεικού ή φωσφορικού οξέος και στο εσωτερικό διαμέρισμα, ένα αλκαλικό διάλυμα, συνήθως

διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου. Το όξινο διάλυμα προκαλεί την απελευθέρωση των ιόντων CN^- από το αίμα και την παραγωγή αερίου υδροκυανίου, το οποίο «αιχμαλωτίζεται» στο αλκαλικό διάλυμα, ξανά, με τη μορφή ιόντων CN^- . Έτσι, στο αλκαλικό διάλυμα, που βρίσκεται στο εσωτερικό διαμέρισμα της κυψελίδας, παραλαμβάνονται τα κυανιούχα για περαιτέρω ανάλυση.

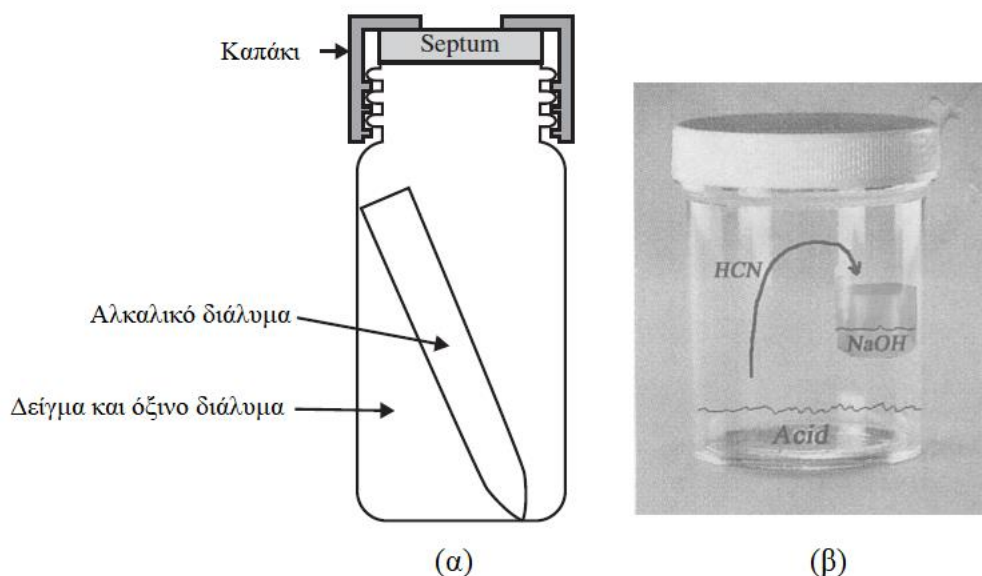


Εικόνα 4. Συσκευή Conway, (Conway cell) (165).

Εκτός από αλκαλικά διαλύματα, στο εσωτερικό διαμέρισμα έχουν χρησιμοποιηθεί και διαλύματα υδροξυκοβαλαμίνης και μεθαιμοσφαιρίνης (59, 165, 192- 199).

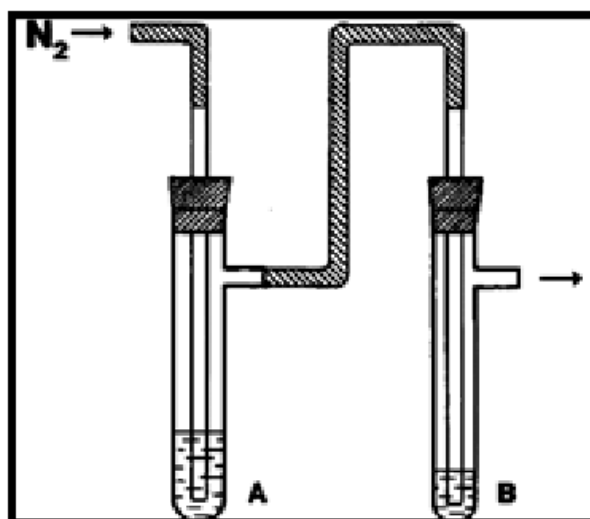
Η μικροδιάχυση είναι αρκετά διαδεδομένη γιατί προσφέρει τη δυνατότητα προσδιορισμού των κυανιούχων, χωρίς την παρεμπόδιση του βιολογικού υποστρώματος. Επιπλέον, χρησιμοποιούνται πολύ μικρότεροι όγκοι στα διαλύματα δέσμευσης, σε σχέση με τον όγκο του αρχικού δείγματος (191).

Η μικροδιάχυση μπορεί να γίνει χωρίς τη χρήση συσκευών Conway, αλλά χρησιμοποιώντας διάφορα φιαλίδια, το ένα μέσα στο άλλο, με το μικρότερο να περιέχει το αλκαλικό διάλυμα και το μεγαλύτερο, το δείγμα και το όξινο διάλυμα. Το μεγαλύτερο φιαλίδιο κλείνει ερμητικά, όπως φαίνεται στην Εικόνα 5. Οι παραλλαγές αυτές παρουσιάζονται αναλυτικά στις μεθόδους παρακάτω (200- 202).



Εικόνα 5. Άλλες συσκευές μικροδιάχυσης, (α) Ένα φιαλίδιο headspace 20 ml, που κλείνει με septum, περιέχει μέσα ένα μικρότερο φιαλίδιο 2 ml (200), (β) Πλαστικό κύπελλο 120 ml περιέχει κύπελλο 10 ml κολλημένο στο τοίχωμα με κολλητική ταινία (201).

Άλλος τρόπος απελευθέρωσης των κυανιούχων από το δείγμα, γίνεται με τη χρήση δύο φιαλιδίων που ενώνονται μεταξύ τις ερμητικά με συνεχή παροχή αέρα (169, 203) ή αζώτου (70, 71, 204- 207) στο δείγμα. Παράδειγμα τέτοιας διάταξης παρουσιάζεται στην Εικόνα 6, όπου το φιαλίδιο A περιέχει το δείγμα, ενώ το B περιέχει διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου. Με αυτόν τον τρόπο το HCN που απελευθερώνεται από το δείγμα μεταφέρεται στο αλκαλικό διάλυμα και μετατρέπεται σε CN^- .



Εικόνα 6. Συσκευή για την απομόνωση των ιόντων CN^- (206).

Σε πολλές περιπτώσεις, γίνεται ο προσδιορισμός των κυανιούχων σε δείγματα ερυθροκυττάρων. Αυτό προτιμάται γιατί μειώνεται η πιθανότητα μετατροπής των θειοκυανιούχων σε κυανιούχα, δίνοντας ψευδή αποτελέσματα, καθώς τα πρώτα υπάρχουν, κυρίως, στο πλάσμα του αίματος. Σ' αυτές τις περιπτώσεις, πρέπει να γίνει διαχωρισμός των ερυθροκυττάρων από το πλάσμα και τη λευκή στιβάδα (λευκά αιμοσφαίρια και αιμοπετάλια). Αυτό πραγματοποιείται με φυγοκέντρηση του αίματος, το οποίο έχει πρώτα προστεθεί ηπαρίνη, ως αντιπηκτικός παράγοντας και στη συνέχεια, φυσιολογικός ορός 0.9% (NaCl). Απομακρύνεται το πλάσμα και η λευκή στιβάδα με πιπέττα pasteur και επαναλαμβάνεται η διαδικασία 3-4 φορές ακόμα, με την προσθήκη φυσιολογικού ορού. Αυτή η διαδικασία μπορεί να γίνει είτε σε θερμοκρασία δωματίου (55, 199, 206, 208), είτε στους 0 °C (209).

Επίσης, υπάρχουν περιπτώσεις στις οποίες δεν χρησιμοποιείται καμία μέθοδος διάχυσης, αλλά γίνεται προκατεργασία με χημική αντίδραση που είναι απαραίτητη για τον προσδιορισμό των κυανιούχων. Τέτοιο παράδειγμα είναι η παραγωγοποίηση με τη χρήση διαλυμάτων ναφθαλινο-2,3-διαλδεϋδης (NDA) και ταυρίνης (55).

Η ανάλυση των δειγμάτων θα πρέπει να γίνεται όσο το δυνατόν γρηγορότερα, μετά τη δειγματοληψία (191). Μελέτες έχουν δείξει ότι η συγκέντρωση των κυανιούχων σε βιολογικά δείγματα μέσα σε 14 μέρες μπορεί να διαφέρει μέχρι και 66%. Η απόκλιση αυτή οφείλεται στη θερμοκρασία που επικρατεί κατά τη διάρκεια αποθήκευσης των δειγμάτων (165, 209- 212). Η ιδανική θερμοκρασία αποθήκευσης είναι 4 °C (59, 165, 205, 209, 210, 213, 214) ή -20 °C (59, 206, 209, 213).

Αν δεν είναι δυνατόν να γίνει απευθείας η ανάλυση των δειγμάτων, θα πρέπει, πριν την αποθήκευση τους, να γίνουν κάποιες διεργασίες, ώστε να μην υπάρχει απώλεια κυανιούχων από το δείγμα. Θα πρέπει να ληφθεί υπόψιν ότι το υδροκυάνιο είναι πολύ πτητικό αέριο, επομένως τα δείγματα θα πρέπει να φυλάσσονται σε ερμητικά κλειστά φιαλίδια. Επιπλέον, η ρύθμιση του pH του βιολογικού δείγματος μπορεί να μειώσει τυχόν απώλειες, αφού τα κυανιούχα θα είναι με τη μορφή ιόντων. Τα κυανιούχα ιόντα, όμως, είναι πυρηνόφιλα και μπορεί να αντιδράσουν με ουσίες που υπάρχουν στο δείγμα, να δεσμευτούν και έτσι να μειωθεί η συγκέντρωση των ελεύθερων κυανιούχων στο δείγμα. Για να μην συμβεί αυτό, χρησιμοποιούνται ουσίες που δεσμεύουν τα κυανιούχα ιόντα σχηματίζοντας σταθερά σύμπλοκα, όπως η υδροξυκοβαλαμίνη προς σχηματισμό κυανοκοβαλαμίνης (113) και το νιτρώδες νάτριο προς σχηματισμό μεθαιμοσφαιρίνης (215).

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι τα θειοκυανιούχα υπάρχουν σε μικρές συγκεντρώσεις φυσιολογικά στον οργανισμό, τα οποία μπορούν να αντιδράσουν και να παράγουν κυανιούχα (209, 210, 216). Μελέτες έχουν δείξει ότι το ασκορβικό οξύ και η μεθανόλη μπορούν να αποτρέψουν την παραγωγή κυανιούχων από τα ενδογενή θειοκυανιούχα (212, 217). Επιπλέον, η συγκέντρωση των κυανιούχων μπορεί να αυξηθεί λόγω ύπαρξης μικροοργανισμών που παράγουν κυανιούχα, όμως η ανάπτυξή τους αποτρέπεται από τη χαμηλή θερμοκρασία αποθήκευσης (216).

7.1 Δειγματοληψία μεταθανάτιου υλικού (*post mortem*)

Τα μεταθανάτια υλικά που συλλέγονται για τις αναλύσεις είναι κυρίως αίμα και ιστοί (όπως σπλήνας, ήπαρ και εγκέφαλος). Στο αίμα, θεωρείται ότι ποσότητα συγκέντρωσης κυανιούχων χαμηλότερη από 0.25 mg/L, είναι φυσιολογική, μεγαλύτερη από 0.25 mg/L έως 2 -3 mg/L θεωρείται υψηλή, αλλά όχι ικανή να προκαλέσει θάνατο, ενώ πάνω από 3 mg/L προκαλεί θάνατο (218).

Πέρα από τα προβλήματα που συζητήθηκαν παραπάνω και αφορούν τα προθανάτια βιολογικά υλικά, για τα μεταθανάτια υλικά πρέπει να αντιμετωπιστούν και προβλήματα που μπορεί να προκύπτουν από το χρόνο που μεσολαβεί μεταξύ θανάτου και λήψης των δειγμάτων. Τα κυανιούχα εύκολα διαχέονται στους ιστούς, γι' αυτό το αίμα θα πρέπει να συλλεχθεί όσο το δυνατόν συντομότερα (218, 219). Επειδή η κατανομή στους ιστούς δεν έχει μελετηθεί αρκετά, έχει προταθεί η λήψη του υλικού να γίνεται από διάφορα σημεία [καρδιακό (από δεξιά και αριστερά καρδία) και περιφερικό αίμα], διαφορετικά υγρά σώματος (γαστρικό υγρό, περικαρδιακό υγρό) και διαφορετικούς ιστούς (μυελό των οστών, λεπτό έντερο) (220- 223). Όμως, οι μελέτες έχουν αποδείξει ότι το καρδιακό αίμα είναι το καλύτερο υλικό για ανάλυση.

Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί αύξηση της συγκέντρωσης των κυανιούχων, η οποία οφείλεται στη δράση μικροοργανισμών (μικρόβια και μύκητες) που μπορεί να αναπτυχθούν κατά την αποσύνθεση του σώματος (216, 224, 225). Σε περίπτωση καθυστέρησης δειγματοληψίας και ανάλυσης, για να επιτευχθεί η σταθερότητα της συγκέντρωσης των κυανιούχων ιόντων στα δείγματα πρέπει η σορός, αλλά και τα δείγματα, να αποθηκευτούν στους 4 °C (226). Επιπροσθέτως, έχει βρεθεί ότι η προσθήκη φθοριούχου νατρίου σε συγκέντρωση 1- 2% διατηρεί σταθερή τη συγκέντρωση των κυανιούχων στο αίμα (205, 225, 227- 229).

Στον Πίνακα 2 φαίνονται οι μέθοδοι ανάλυσης που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανάλυση μεταθανάτιων δειγμάτων.

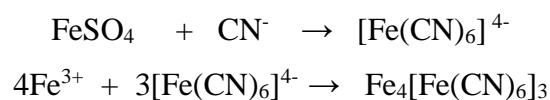
8 Μέθοδοι ανίχνευσης και προσδιορισμού κυανιούχων ενώσεων σε οξείες δηλητηριάσεις

8.1 Ποιοτική ανίχνευση

8.1.1 Lee- Jones test

Η ανίχνευση (230) βασίζεται στην παραγωγή του κυανού τις Πρωσίας και χρησιμοποιείται σε δείγματα γαστρικού περιεχομένου. Το δείγμα τοποθετείται σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα, προστίθενται κρύσταλλοι θειικού σιδήρου (FeSO_4) και διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου (NaOH). Στη συνέχεια, θερμαίνεται και όταν κρυώσει προστίθεται υδροχλωρικό οξύ (HCl). Αν υπάρχουν κυανιούχα, τότε το χρώμα του διαλύματος γίνεται πράσινο- μπλε, λόγω σχηματισμού του κυανό της Πρωσίας.

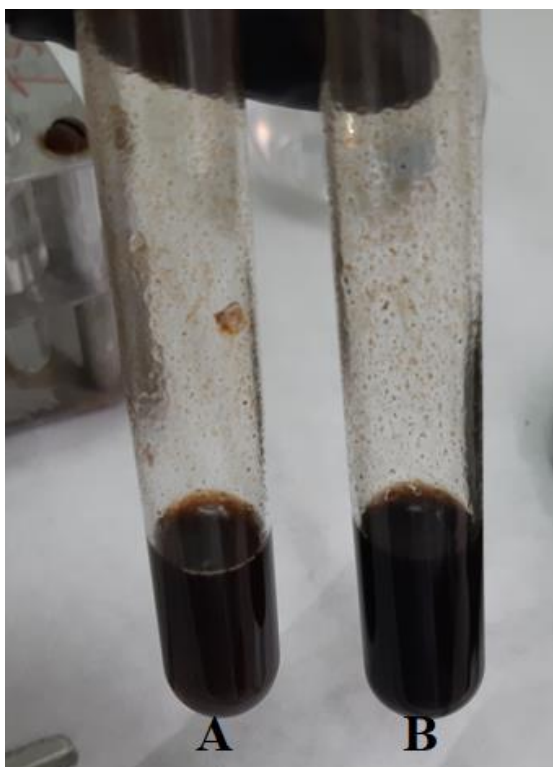
Παραλλαγή του Lee- Jones test χρησιμοποιείται για την ποιοτική ανίχνευση κυανιούχων σε δείγματα γαστρικού περιεχομένου και πειστήρια όπως δολώματα, φαγητά και υγρά, στο Εργαστήριο Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών. Στο δείγμα προστίθεται διάλυμα θειικού σιδήρου (FeSO_4) και διάλυμα τριχλωριούχου σιδήρου (FeCl_3), θερμαίνεται, ψύχεται και προστίθεται διάλυμα πυκνού HCl , έως ότου διαλυθεί το υδροξείδιο του σιδήρου (III) $[\text{Fe}(\text{OH})_3]$, Εικόνα 8]. Σε περίπτωση ύπαρξης κυανιούχων, εμφανίζεται διάλυμα μπλε χρώματος (Εικόνα 9), που στη συνέχεια καθιζάνει ως μπλε ίζημα, σύμφυτος με τις αντιδράσεις:



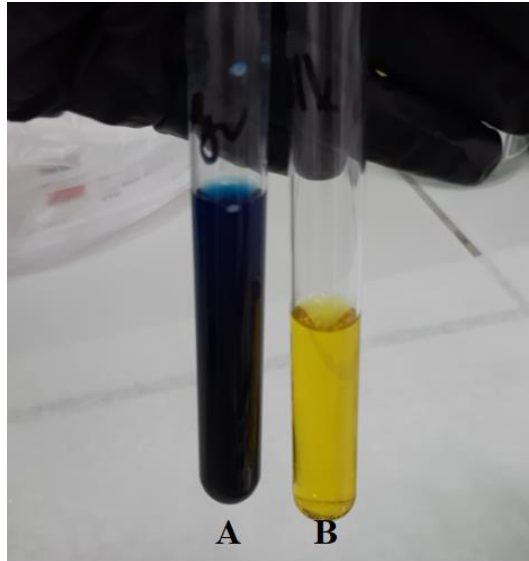
Στις Εικόνες 8 και 9 φαίνονται τα δύο στάδια της μεθόδου. Στην Εικόνα 8, στο φιαλίδιο έχει προστεθεί το δείγμα, το διάλυμα του θειικού σιδήρου, το διάλυμα του τριχλωριούχου σιδήρου και το υδροξείδιο του νατρίου. Στην Εικόνα 9, έχει προστεθεί το πυκνό διάλυμα υδροχλωρικού οξέος και φαίνεται στο Β φιαλίδιο που περιέχει κυανιούχα, ο σχηματισμός μπλε διαλύματος λόγω της παραγωγής του κυανού της Πρωσίας.



Εικόνα 7. Δείγμα δολώματος. Τα κναιούχα είναι επικαλυμμένα με κερί, το οποίο έχει τοποθετηθεί σε κομμάτι κρέατος (υπόθεση του εργαστηρίου).



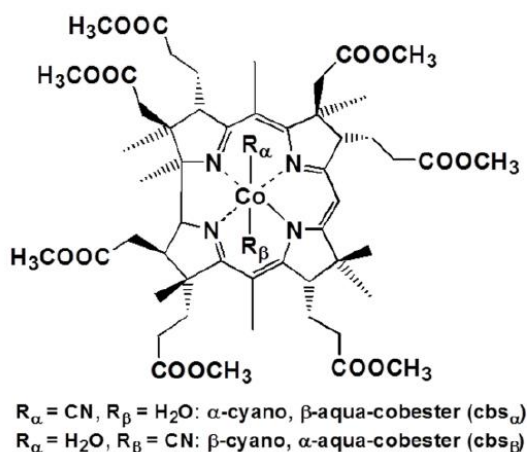
Εικόνα 8. Φιαλίδια που περιέχουν τα διαλύματα $FeSO_4$, $FeCl_3$ και $NaOH$, μετά από θέρμανση και ψύξη ακολουθώντας τη μέθοδο του εργαστηρίου Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας, όπου A) Δείγμα δολώματος και B) τυφλό (υπόθεση του εργαστηρίου).



Εικόνα 9. Φιαλίδια μετά την προσθήκη HCl ακολουθώντας τη μέθοδο του εργαστηρίου Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας, όπου A) Δείγμα δολώματος και B) τυφλό (υπόθεση του εργαστηρίου).

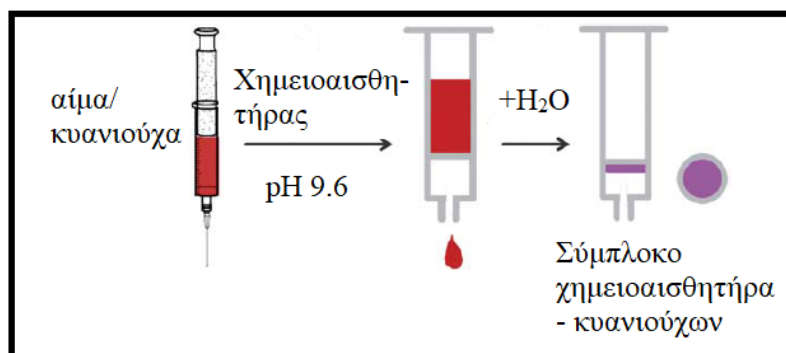
8.1.2 Με χρήση χημειοαισθητήρα κορρίνης

Για τη μέθοδο χρησιμοποιείται ένα παράγωγο της κορρίνης με επτά υδρόφοβες πλευρικές αλυσίδες μεθυλεστέρα που έχει ερυθρό χρώμα (231). Το παράγωγο αυτό προστίθεται στο δείγμα αίματος και στη συνέχεια, ακολουθεί εκχύλιση στερεάς φάσης (solid phase extraction (SPE)), σε στήλη C18, όπου μόνο το παράγωγο κορρίνης συγκρατείται, το οποίο παρουσία κυανιούχων αλλάζει χρώμα από ερυθρό σε ιώδες. Η δομή του παραγώγου κορρίνης φαίνεται στην Εικόνα 10. Όταν το παράγωγο αντιδρά με τα κυανιούχα, τότε R_a , $R_b = CN$.

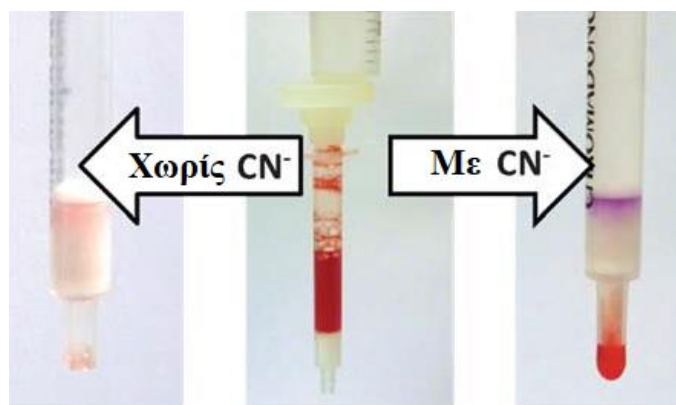


Εικόνα 10. Δομή του παραγώγου κορρίνης (231).

Αρχικά, το αίμα επεξεργάζεται με κιτρικό νάτριο, ως αντιπηκτικό. Στη συνέχεια, ρυθμίζεται το pH του αίματος στο 9.6 με διάλυμα ρυθμιστικό διάλυμα Ches (N-κυκλοεξυλ-2-αμινοαιθανοσουλφονικό οξύ). Ενεργοποιείται η στερεά φάση με μεθανόλη και νερό και στη συνέχεια, προστίθεται το δείγμα. Το αίμα περνά από τη στερεά φάση, δεν συγκρατείται και με επιπλέον νερό απομακρύνονται όλα τα υπολείμματα αίματος. Στη συνέχεια, με προσθήκη μεθανόλης ελευθερώνεται από την στερεά φάση το σύμπλοκο παραγώγου κορρίνης-κυανιούχων (Εικόνες 11, 12).



Εικόνα 11. Σχηματική αναπαράσταση των δύο βημάτων της μεθόδου (231).



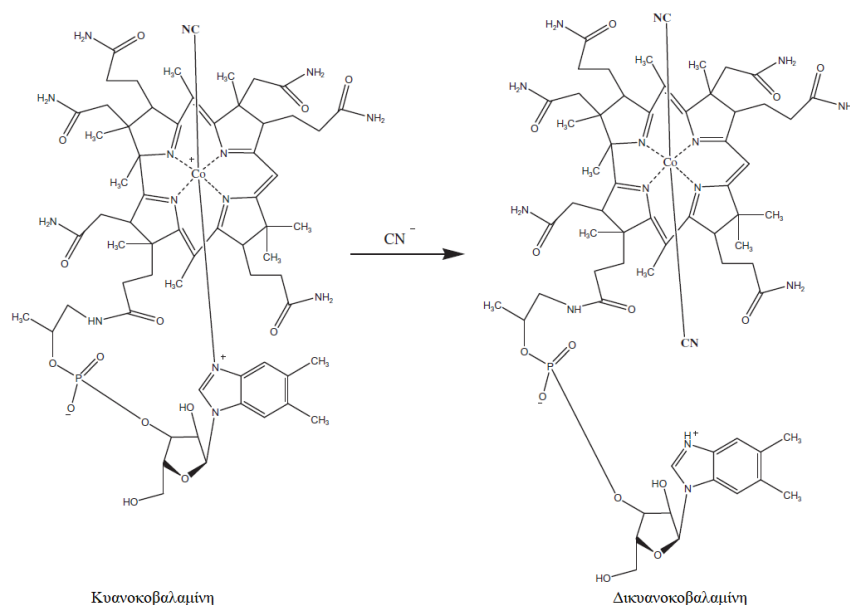
Εικόνα 12. Εικόνες από την ανίχνευση αίματος, όπου αριστερά είναι το τυφλό και δεξιά το δείγμα που περιέχει κυανιούχα (231).

Θα πρέπει να τονιστεί ότι η μέθοδος αυτή ανιχνεύει μόνο τα ελεύθερα κυανιούχα και όχι αυτά που μπορεί να έχουν συνδεθεί με τη μεθαιμοσφαιρίνη, αυτό όμως είναι αρκετό για την ανίχνευση κυανιούχων που προέρχονται από δηλητηρίαση.

Σε περίπτωση που χρειάζεται να προσδιοριστούν ποσοτικά τα ελεύθερα κυανιούχα, αυτό μπορεί να γίνει με ανακλαστική φασματοφωτομετρία σε μήκος κύματος 583 nm και με καμπύλη αναφοράς. Το όριο ανίχνευσης της μεθόδου είναι 0.078 mg/L και η καμπύλη αναφοράς παραμένει γραμμική μεταξύ 0 και 1.3 mg/L.

8.1.3 Με χρήση κυανοκοβαλαμίνης (Βιταμίνη B₁₂)

Η κυανοκοβαλαμίνη αντιδρά με τα κυανιούχα, σε αλκαλικές συνθήκες, με αποτέλεσμα την παραγωγή της δικυανοκοβαλαμίνης, σύμφωνα με την αντίδραση:



Έτσι, μια ταινία από διηθητικό χαρτί εμβαπτίζεται σε διάλυμα κυανοκοβαλαμίνης και αφήνεται να στεγνώσει στον αέρα, σε σκοτεινό μέρος (232). Στη συνέχεια, τοποθετείται

στο εσωτερικό διαμέρισμα της συσκευής Copway και προστίθενται μερικές σταγόνες αλκαλικού διαλύματος (υδροξείδιο του νατρίου ή ανθρακικό νάτριο). Στο εξωτερικό διαμέρισμα τοποθετείται το δείγμα αίματος και διάλυμα υδροχλωρικού οξέος. Ακολουθεί ελαφριά περιστροφή της συσκευής, ώστε να αναμιχθεί το διάλυμα στο εξωτερικό διαμέρισμα και μετά από 5 λεπτά παρατηρείται αλλαγή χρώματος στην ταινία, από ερυθρό σε ιώδες, όπως φαίνεται στην Εικόνα 13:



Εικόνα 13. Αρνητικό (αριστερά) και θετικό (δεξιά) αποτέλεσμα για ύπαρξη κυανιούχων σε συσκευή Copway (232).

Το όριο ανίχνευσης της μεθόδου είναι 1 mg/L. Μελετήθηκε και η ύπαρξη παρεμποδίσεων από αμμωνία, διοξείδιο του άνθρακα, αρσίνη, φωσφίνη, θειοκυανιούχα, οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα, όπως και εντομοκτόνα που περιέχουν άζωτο και βρέθηκε ότι η μέθοδος είναι εκλεκτική προς τα κυανιούχα.

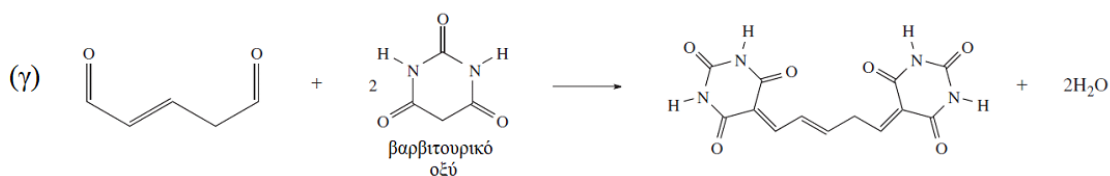
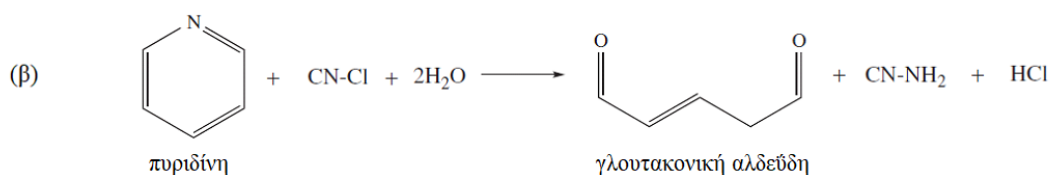
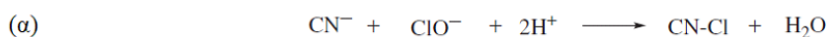
8.2 Ποσοτικός Προσδιορισμός

8.2.1 Φασματοφωτομετρικές μέθοδοι (UV-Vis, Φθορισμομετρία)

Οι φασματοσκοπικές μέθοδοι χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό των κυανιούχων εδώ και πολλές δεκαετίες. Χρειάζεται απλός και φτηνός εξοπλισμός για την πραγματοποίησή τους, όμως τα δείγματα χρειάζονται προκατεργασία, ώστε να γίνει η απελευθέρωση των κυανιούχων από το βιολογικό υπόστρωμα, με αποτέλεσμα να καθίστανται χρονοβόρες και περίπλοκες διαδικασίες. Παρακάτω, αναφέρονται οι πιο βασικές μέθοδοι που έχουν χρησιμοποιηθεί. Υπάρχουν αρκετές παραλλαγές τους, χωρίς μεγάλες διαφορές, όμως, στην ευαισθησία και στην ειδικότητα.

8.2.1.1 Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός κυανιούχων ενώσεων με την αντίδραση König.

Σύμφωνα με την αντίδραση König (206) τα κυανιούχα μετατρέπονται σε χλωριούχο κυάνιο, αντιδρώντας με υποχλωριώδες νάτριο (α), στη συνέχεια αντιδρούν με την πυριδίνη σχηματίζοντας μια αλδεΐδη (β), η οποία με το βαρβιτουρικό οξύ σχηματίζει ένα έγχρωμο προϊόν (γ) που έχει μέγιστη απορρόφηση στα 580 nm. Οι αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα είναι οι εξής:



Για να γίνει η μέτρηση σε δείγμα ολικού αίματος πρέπει, αρχικά, το αίμα να επεξεργαστεί με ηπαρίνη. Προστίθεται θεικός άργυρος ώστε να διατηρήσει σταθερή τη συγκέντρωση των κυανιούχων στο αίμα και να μην υπάρχουν απώλειες. Για μέτρηση στο πλάσμα και στα ερυθροκύτταρα, πρώτα γίνεται φυγοκέντρηση, απομακρύνεται το πλάσμα και προστίθενται σε αυτό ιόντα αργύρου. Για τα ερυθροκύτταρα, μετά τη φυγοκέντρηση,

προστίθεται φυσιολογικός ορός και αργότερα, προστίθενται τα ιόντα αργύρου. Στη συνέχεια, χρησιμοποιείται η συσκευή που φαίνεται στην Εικόνα 6 για τη μετατροπή των κυανιούχων σε υδροκυάνιο και η μεταφορά του τελευταίου σε διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου.

Στο φιαλίδιο A προστίθεται το δείγμα με αντιαφριστικό παράγοντα και θειικό οξύ και στο B υδροξείδιο του νατρίου. Το ρεύμα αζώτου μεταφέρει το υδροκυάνιο στο φιαλίδιο B. Παραλαμβάνεται το διάλυμα του B, προστίθεται οξικό οξύ, υποχλωριώδες νάτριο και το αντιδραστήριο πυριδίνης-βαρβιτουρικού οξέος και μετριέται η απορρόφηση του διαλύματος. Το όριο ανίχνευσης για το ολικό αίμα και τα αιμοπετάλια είναι 3.9 mg/ L, ενώ για το πλάσμα 1.04 mg/ L. Δεν παρατηρούνται παρεμπόδισεις από το ακετονιτρίλιο, την αμυγδαλίνη και τα θειοκυανιούχα, ενώ παρατηρούνται από τα νιτροπρωσσικά ιόντα. Για να αποφευχθεί η παρεμπόδιση, στην περίπτωση ατόμου που λαμβάνει νιτροπρωσσικό νάτριο, κατά την επεξεργασία του δείγματος, δεν προστίθενται ιόντα αργύρου και το δείγμα εισάγεται απευθείας στο φιαλίδιο A.

Με βάση αυτή τη μέθοδο, έχει αναπτυχθεί και άλλη που χρησιμοποιεί αυτόματο αναλυτή και χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση των κυανιούχων σε αίμα ιπποειδών (201). Τα πλεονεκτήματα της αυτοματοποίησης είναι η διατήρηση ιδανικών συνθηκών κατά τη διάρκεια της μέτρησης, η ικανότητα μέτρησης πολλών δειγμάτων σε λίγο χρόνο και τέλος η αυξημένη ευαισθησία, με όριο ανίχνευσης 2 μg/L. Η καμπύλη αναφοράς παρουσιάζεται γραμμική σε συγκεντρώσεις από 2 έως 300 μg/L και παρουσιάζει εκατοστιαία ανάκτηση $99.3 \pm 1.2\%$.

Έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι που χρησιμοποιούν άλλα οξειδωτικά μέσα για τη μετατροπή των κυανιούχων σε αλογονίδιο κυανίου, όπως είναι η χλωραμίνη T και το βρωμιούχο ύδωρ.

8.2.1.2 Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός κυανιούχων ενώσεων με τη μέθοδο του Aldridge.

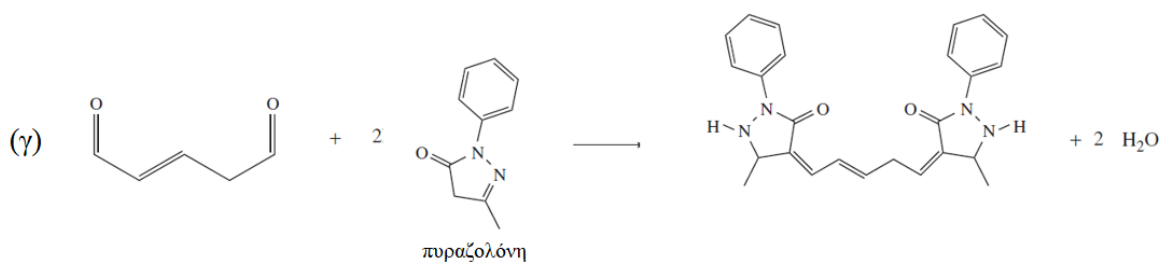
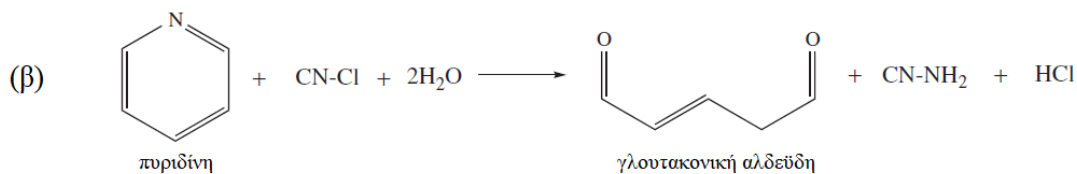
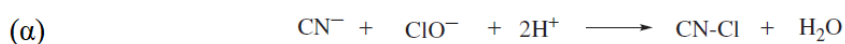
Η μέθοδος αποτελεί ουσιαστικά μια παραλλαγή της αντίδρασης Köpzig και βασίζεται στη μετατροπή των κυανιούχων από το βρωμιούχο ύδωρ σε βρωμιούχο κυάνιο το οποίο στη συνέχεια, αντιδρά με αρωματικές αμίνες, δίνοντας έγχρωμα διαλύματα (203). Ο Aldridge χρησιμοποίησε βενζιδίνη σε διάλυμα πυριδίνης. Για να προσδιορίσει τα κυανιούχα στο αίμα, πρώτα απομάκρυνε τις πρωτεΐνες με τη χρήση τριχλωροξικού οξέος (TCA). Στη συνέχεια, σε όξινο περιβάλλον το δείγμα αντιδρά με βρωμιούχο ύδωρ, η περίσσεια του

οποίου απομακρύνεται με διάλυμα μεταρσενικόδους νατρίου, και τέλος με τη βενζιδίνη δίνοντας πορτοκαλί/κόκκινο διάλυμα. Τέλος, μετρίεται η απορρόφηση σε μήκος κύματος $\lambda_{\max} = 520 \text{ nm}$. Η καμπύλη αναφοράς είναι γραμμική σε εύρος συγκέντρωσης 0.1- 20 mg/L.

Υπάρχουν διαφορετικές παραλλαγές της μεθόδου όπου χρησιμοποιούνται διαφορετικές αμίνες, όπως π-φαινυλοδιαμίνη (59, 233, 234), οξέα όπως ανθρανιλικό οξύ (235) και κετόνες, όπως 4-αμινοακετοφαινόνη (236), καθώς η βενζιδίνη είναι τοξική και καρκινογόνος.

8.2.1.3 Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός κυανιούχων ενώσεων με διάλυμα πυριδίνης/πυραζολόνης και υδροποιημένου αζώτου.

Ο Epstein ανέπτυξε άλλη παραλλαγή της αντίδρασης König. Βασίζεται στη δημιουργία έγχρωμου προϊόντος από την αντίδραση των κυανιούχων με το διάλυμα πυριδίνης/πυραζολόνης. Οι αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα είναι οι εξής:



Δημιουργείται ένα μπλε διάλυμα το οποίο απορροφά σε μήκος κύματος $\lambda_{\max} = 630 \text{ nm}$. Η μέθοδος χρησιμοποιείται για προσδιορισμό δειγμάτων κυανιούχων με εύρος συγκέντρωσης 0.2- 1.2 mg/L κυανιούχων και ανάκτηση 99-100% (193).

Η προκατεργασία του δείγματος γίνεται με χρήση συσκευής Conway. Χρησιμοποιείται το θειικό οξύ ως μέσο οξίνισης και το υδροκυάνιο διαχέεται σε διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου (165, 193).

Σε μια παραλλαγή της μεθόδου του Epstein, το αίμα που αναλύεται πρέπει να επεξεργαστεί με ηπαρίνη ή με διάλυμα EDTA (αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ) (71). Αρχικά, στο αίμα

προστίθεται διάλυμα Triton X-100, ώστε να γίνει η διάσπαση της μεμβράνης των ερυθροκυττάρων. Στη συνέχεια, σε μια φιάλη προστίθεται το δείγμα, διάλυμα θειικού οξέος και συνδέεται με ρεύμα αζώτου, το οποίο παρασύρει το υδροκυάνιο που δημιουργείται σε διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου. Στο διάλυμα αυτό, προστίθεται σε παρόλογο διάλυμα χλωραμίνης T με μονοβασικό φωσφορικό νάτριο ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) και διάλυμα πυριδίνης/πυραζολόνης σε θερμοκρασία δωματίου. Αφήνεται για 30 λεπτά, ώστε να αναπτυχθεί το χρώμα και μετρείται η απορρόφηση σε μήκος κύματος 630 nm. Σε περίπτωση που η απορρόφηση του διαλύματος είναι πολύ υψηλή και δεν μπορεί να μετρηθεί από το φασματοφωτόμετρο, αραιώνεται το διάλυμα με διάλυμα πυριδίνης/πυραζολόνης. Υπολογίζεται η συγκέντρωση των κυανιούχων σε mol/L από την παρακάτω εξίσωση:

$$\text{CN}_u = A_u \times (d/V_u) \times (V_s \times \text{CN}_s) / A_s$$

Όπου:

A_u και A_s είναι οι απορροφήσεις του αγνώστου και του προτύπου διαλύματος,

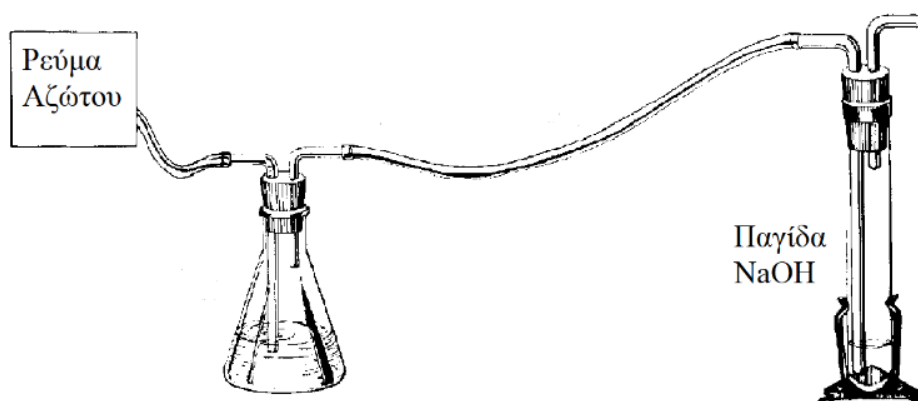
V_u και V_s είναι οι όγκοι του αγνώστου και του προτύπου διαλύματος,

CN_u και CN_s είναι οι συγκεντρώσεις κυανιούχων του αγνώστου και του προτύπου διαλύματος και

d είναι ο συντελεστής αραιώσης, αν υπάρχει.

Υπάρχει μια τροποποίηση της μεθόδου, όπου χρησιμοποιείται αντιαφριστικό (antifoam) αντιδραστήριο στις φιάλες πριν την προσθήκη δείγματος και διαλύματος θειικού οξέος, ώστε να μειωθούν τυχόν απώλειες δείγματος (70). Οι φιάλες έχουν καθαριστεί με οξύ, πριν από τη διεξαγωγή του πειράματος και χρησιμοποιούνται πώματα και σωληνάρια πολυαιθυλενίου. Τέλος, η προσθήκη πυραζολόνης γίνεται εν θερμώ και όχι σε θερμοκρασία δωματίου. Με αυτόν τον τρόπο διαλύεται μεγαλύτερη ποσότητα.

Ο εξοπλισμός που χρησιμοποιείται για την παραγωγή υδροκυανίου και την μεταφορά του στην παγίδα υδροξειδίου του νατρίου φαίνεται στην Εικόνα 14.

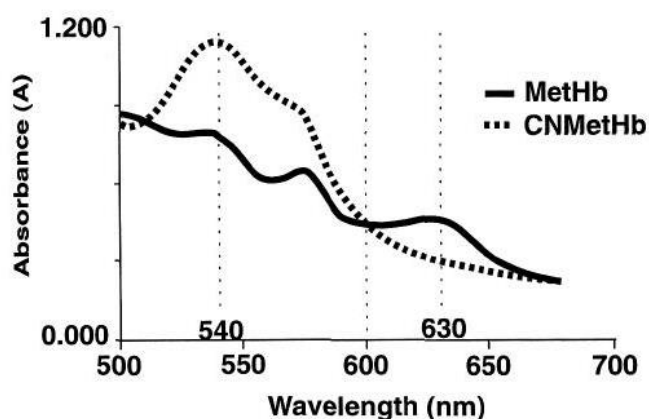


Εικόνα 14. Συσκευή απελευθέρωσης, αερισμού και παγίδευσης των κυανιούχων (70).

8.2.1.4 Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός κυανιούχων ενώσεων με τη χρήση μεθαιμοσφαιρίνης και υγροποιημένου αζώτου.

Η μεθαιμοσφαιρίνη αντιδρά με τα κυανιούχα και οδηγεί στο σχηματισμό της κυανομεθαιμοσφαιρίνης. Η στοιχειομετρία της αντίδρασης είναι 1:1. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το σύνολο, σχεδόν, των κυανιούχων που υπάρχουν σ' ένα διάλυμα παρουσία μεθαιμοσφαιρίνης, να είναι με τη μορφή κυανομεθαιμοσφαιρίνης.

Στην Εικόνα 15 απεικονίζεται το φάσμα απορρόφησης της μεθαιμοσφαιρίνης και της κυανομεθαιμοσφαιρίνης. Ο σχηματισμός της κυανομεθαιμοσφαιρίνης προκαλεί μείωση της απορρόφησης στα 630 nm και αύξηση στα 540 nm, παρατηρείται, επίσης, ένα ισοβεστικό σημείο στα 600 nm. Η απορρόφηση σ' αυτό το σημείο δείχνει την ποσότητα της μεθαιμοσφαιρίνης που υπάρχει στο διάλυμα.

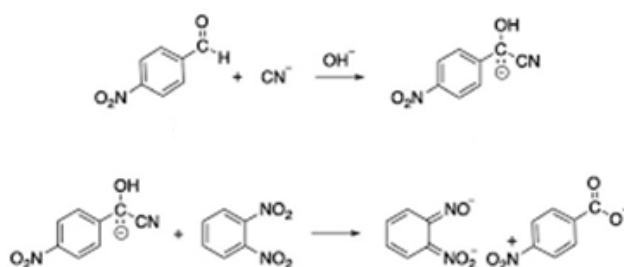


Εικόνα 15. Φάσμα μεθαιμοσφαιρίνης (συνεχής γραμμή) και κυανομεθαιμοσφαιρίνης (με διακεκομμένη γραμμή) (169).

Ακολουθείται η ίδια πρακτική με τη μέθοδο που αναπτύχθηκε παραπάνω, με το διάλυμα πυριδίνης/πυραζολόνης με ρεύμα αζώτου, με τη διαφορά ότι η οξίνιση του δείγματος γίνεται με υδροχλώριο και το αλκαλικό διάλυμα πρέπει να έχει προσαρμοσμένο pH 7.4 που επιτυγχάνεται με χρήση διαλύματος φωσφορικού νατρίου και υδροχλωρίου (169). Στη συνέχεια, προστίθεται το διάλυμα της μεθαιμοσφαιρίνης και μετρίεται η απορρόφηση στα 540 nm, 600 nm και 630 nm, υπολογίζονται οι λόγοι απορροφήσεων A630/A600 και A540/A600 και δημιουργείται η καμπύλη αναφοράς από το άθροισμα των λόγων των απορροφήσεων (A630/A600 + A540/A600), σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση των κυανιούχων. Το όριο ανίχνευσης της μεθόδου είναι 150 µg/L και εμφανίζει εκατοστιαία ανάκτηση πάνω από 90%. Μελετήθηκε η εκλεκτικότητα της μεθόδου, ως προς τα θειοκυανιούχα και βρέθηκε ότι δεν παρατηρείται παρεμπόδιση. Η μέθοδος αυτή υπερέχει από τις αντίστοιχες, καθώς χρησιμοποιεί φτηνά υλικά (μεθαιμοσφαιρίνη), εξοπλισμό που μπορεί να υπάρχει σε ένα εργαστήριο ή νοσοκομείο και παρατηρείται σταθερότητα στο διάλυμα μεθαιμοσφαιρίνης σε θερμοκρασία δωματίου για τρεις μέρες ή τρεις εβδομάδες στους 4 °C, οπότε μπορεί να χρησιμοποιηθεί άμεσα. Το μόνο μειονέκτημα της μεθόδου είναι η ευαισθησία της μεθαιμοσφαιρίνης σε αλλαγές του pH και στην παρουσία αναγωγικών μέσων, με αποτέλεσμα να αλλάζει και το φάσμα απορρόφησής της. Για το λόγο αυτό προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα, ώστε το pH να είναι μεταξύ 7 και 7.4 και διάλυμα οξειδωτικού μέσου, όπως το σιδηρικού κυανιούχο κάλιο (169, 237).

8.2.1.5 Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός κυανιούχων ενώσεων με 1,2-δινιτροβενζόλιο και 4-νιτροβενζαλδεΐδη σε διάλυμα 2-μεθοξυαιθανόλης.

Η 4-νιτροβενζαλδεΐδη αντιδρά με τα κυανιούχα και το προϊόν του παράγεται αντιδρά με το 1,2-δινιτροβενζόλιο, δίνοντας ένα έγχρωμο προϊόν (ιώδες) με μέγιστη απορρόφηση στα 560 nm. Οι αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα είναι οι εξής:



Με αυτή τη μέθοδο μπορούν να αναλυθούν δείγματα ολικού αίματος και γαστρικού υγρού. Αρχικά, η προκατεργασία γίνεται σε συσκευή Conway. Στο κεντρικό διαμέρισμα τοποθετείται υδροξείδιο του νατρίου, 1,2-δινιτροβενζόλιο και 4-νιτροβενζαλδεΐδη, στο εξωτερικό διαμέρισμα θειικό οξύ. Ανακινείται ελαφρώς και αφήνεται για μισή ώρα όπου και αναπτύσσεται το ιώδες διάλυμα στο εσωτερικό διαμέρισμα, η απορρόφηση του οποίου μετριέται στα 560 nm. Το όριο ανίχνευσης είναι 0.05 mg/L (192, 238).

Έχει μελετηθεί μια τροποποίηση της μεθόδου, σύμφωνα με την οποία στην συσκευή Conway χρησιμοποιείται φωσφορικό οξύ για την απελευθέρωση του υδροκυανίου, το οποίο εμποδίζει την πήξη του αίματος (199). Προστίθεται στο εξωτερικό διαμέρισμα και επιφανειοδραστικός παράγοντας (Brij), που μειώνει την επιφανειακή τάση του διαλύματος, με αποτέλεσμα να γίνεται πιο γρήγορα η διάχυση (μέσα σε 6 λεπτά). Αφού γίνει η διάχυση, προστίθεται στο εσωτερικό διαμέρισμα ακετόνη, ώστε να απομακρύνει τα κυανιούχα, με μορφή κυανυδρίνης, και έτσι να σταματήσει η παραγωγή του χρώματος. Με αυτή την τροποποίηση μπορούν να αναλυθούν δείγματα ολικού αίματος και ερυθροκυττάρων.

Τα δείγματα ερυθροκυττάρων χρειάζονται προκατεργασία πριν τοποθετηθούν στην συσκευή Conway.

8.2.1.6 Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός κυανιούχων ενώσεων με τη χρήση υδροξυκοβαλαμίνης.

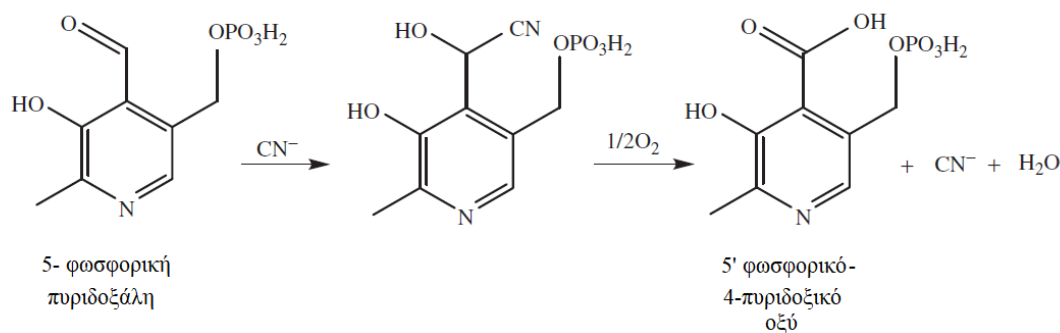
Εδώ χρησιμοποιείται ισχυρό οξύ για να μετατρέψει τα κυανιούχα σε υδροκυάνιο, το οποίο αντιδρά με την υδροξυκοβαλαμίνη σχηματίζοντας την κυανοκοβαλαμίνη και μετριέται η απορρόφηση της τελευταίας σε $\lambda_{\max} = 361 \text{ nm}$ (194). Η προκατεργασία του δείγματος γίνεται σε συσκευή Conway και σε θερμοκρασία 45 °C. Στο εσωτερικό διαμέρισμα τοποθετείται διάλυμα υδροξυκοβαλαμίνης και στο εξωτερικό, το δείγμα με Triton X, νερό και θειικό οξύ. Αναμιγνύονται τα υλικά και αφήνονται για 20 λεπτά στους 45 °C. Στη συνέχεια, μετριέται η απορρόφηση της κυανοκοβαλαμίνης του εσωτερικού διαμερίσματος. Με τη μέθοδο αυτή μπορούν να μετρηθούν τα κυανιούχα στο ολικό αίμα. Δεν παρατηρείται παρεμπόδιση της μεθόδου από ουσίες, όπως το ακετονιτρίλιο, η κυανοκοβαλαμίνη (μετά από χορήγηση υδροξυκοβαλαμίνης) και τα θειοκυανιούχα. Το όριο ανίχνευσης είναι 0.07 mg/L και η καμπύλη αναφοράς είναι γραμμική μέχρι τα 2.5 mg/L.

8.2.1.7 Φθορισμομετρικός προσδιορισμός κυανιούχων ενώσεων με την αντίδραση König

Έχει παρατηρηθεί ότι το προϊόν που παράγεται από την αντίδραση König είναι φθορίζον, με μέγιστο μήκος κύματος διεγέρσεως $\lambda_{\max_{ex}} = 583 \text{ nm}$ και μέγιστο μήκος κύματος εκπομπής $\lambda_{\max_{em}} = 607 \text{ nm}$. Η φθορισμομετρική μέθοδος έχει βρεθεί ότι είναι 10-20 φορές πιο ευαίσθητη από τη φασματοφωτομετρική (239).

8.2.1.8 Φθορισμομετρικός προσδιορισμός κυανιούχων ενώσεων με χρήση 5-φωσφορικής πυριδοξάλης.

Η μέθοδος βασίζεται στην αντίδραση των κυανιούχων με την 5-φωσφορική πυριδοξάλη (240):

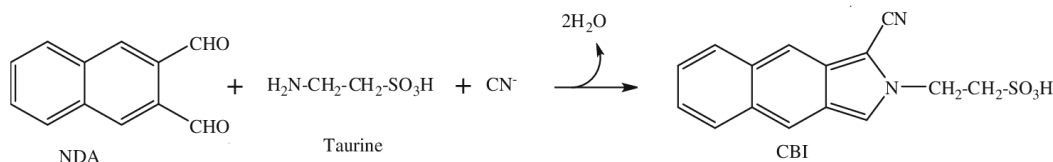


Έτσι, σχηματίζεται φθορίζουσα ουσία, με μέγιστο μήκος κύματος διεγέρσεως $\lambda_{\max_{ex}} = 320 \text{ nm}$ και μέγιστο μήκος κύματος εκπομπής $\lambda_{\max_{em}} = 427 \text{ nm}$. Μπορούν να αναλυθούν δείγματα αίματος, ούρων και στομαχικού περιεχομένου. Ο σχηματισμός της φθορίζουσας ουσίας μπορεί να γίνει και με διάλυμα θειοκυανιούχων. Για να αποφευχθεί αυτό, η μέτρηση του φθορισμού λαμβάνει χώρα σε όξινο περιβάλλον.

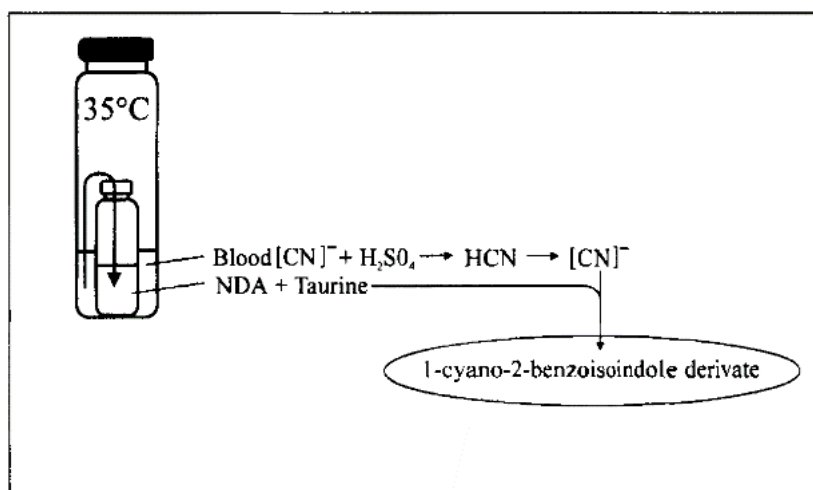
Αναλυτικότερα, σε ένα φιαλίδιο προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου (pH 7.4), διάλυμα 5-φωσφορικής πυριδοξάλης, δείγμα και νερό. Καλύπτεται με parafilm και θερμαίνεται στους $80 \text{ }^\circ\text{C}$ για 45 λεπτά. Στη συνέχεια, προστίθεται τριχλωροξικό οξύ (TCA) και ακολουθεί φυγοκέντρηση. Παραλαμβάνεται το υπερκείμενο υγρό και ρυθμίζεται το pH στο 3.8, με τη χρήση ρυθμιστικού διαλύματος οξικού καλίου και μετρείται η ένταση του φθορισμού. Πρέπει να σημειωθεί ότι στην περίπτωση των ούρων, δεν χρειάζεται η φυγοκέντρηση. Το όριο ανίχνευσης της μεθόδου είναι $1.59 \text{ } \mu\text{g/L}$ και η καμπύλη αναφοράς είναι ευθεία σε εύρος $1.59 - 95.12 \text{ } \mu\text{g/L}$.

8.2.1.9 Φθορισμομετρικός προσδιορισμός κυανιούχων ενώσεων με χρήση ναφθαλινο-2,3-διαλδεϋδης και ταυρίνης.

Τα κυανιούχα αντιδρούν με διάλυμα οξέος και μετατρέπονται σε υδροκυάνιο, το οποίο αντιδρά με τις ναφθαλινο-2,3-διαλδεϋδη (NDA) και ταυρίνη, σχηματίζοντας ένα παράγωγο του 1-κυανο-2-βενζοισοινδολίου (CBI), που φθορίζει με μήκος κύματος διεγέρσεως $\lambda_{\text{max}_{\text{ex}}}$ = 418 nm και μήκος κύματος εκπομπής $\lambda_{\text{max}_{\text{em}}}$ = 460 nm. Η αντίδραση είναι η εξής:



Ο προσδιορισμός μπορεί να γίνει με χρήση φθορισμομέτρου ή με HPLC και ανιχνευτή φθορισμού (200, 241). Χρησιμοποιείται ολικό αίμα που έχει επεξεργαστεί με ηπαρίνη, ως αντιπηκτικό. Ένας τρόπος προκατεργασίας του αίματος είναι η χρήση συσκευής μικροδιάχυσης Conway. Στο εσωτερικό διαμερίσμα τοποθετείται διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου και στο εξωτερικό το δείγμα, διάλυμα οξικού οξέος pH 5.2 ή θεικού οξέος και κλείνει η συσκευή με γυάλινο καπάκι ερμητικά. Στη συνέχεια, παραλαμβάνεται το διάλυμα του εσωτερικού διαμερίσματος, προστίθεται διάλυμα NDA και ταυρίνης και μετριέται ο φθορισμός του διαλύματος. Όμοιος τρόπος ακολουθείται και για δείγματα ούρων (197). Άλλος τρόπος επεξεργασίας του δείγματος αίματος γίνεται με χρήση φιαλιδίων headspace (200), όπως φαίνεται στην Εικόνα 16. Σ' ένα φιαλίδιο headspace τοποθετείται το δείγμα με θεικό οξύ και όξινο θεικό νάτριο. Σ' ένα πιο μικρό φιαλίδιο διάλυμα NDA και ταυρίνης. Το μικρό φιαλίδιο τοποθετείται στο φιαλίδιο του headspace και κλείνεται. Αφήνεται στους 35 °C, έτσι ώστε το υδροκυάνιο να διαχυθεί στο διάλυμα NDA και ταυρίνης και να παραχθεί το CBI.



Εικόνα 16. Φιαλίδιο headspace, όπου γίνεται η παραγωγοποίηση με τις ναφθαλινο-2,3-διαλδεύδη (NDA) και ταυρίνη, σχηματίζοντας ένα παράγωγο του 1-κυανο-2-βενζοισοινδολίου (CBI), σε θερμοκρασία 35 °C. (200).

Με τη χρήση του φθορισμομέτρου και με κατασκευή καμπύλης αναφοράς βρίσκεται η ποσότητα κυανιούχων που υπάρχει στο διάλυμα. Δεν παρατηρείται παρεμπόδιση από θειοκυανιούχα και θειούχα ιόντα. Το όριο ανίχνευσης τους είναι 2 µg/L, η καμπύλη αναφοράς είναι γραμμική σε εύρος 2 µg/L έως 1 mg/L και παρατηρείται 100% ανάκτηση.

8.2.2 Χρωματογραφικές μέθοδοι (Υγρή και Αέρια Χρωματογραφία)

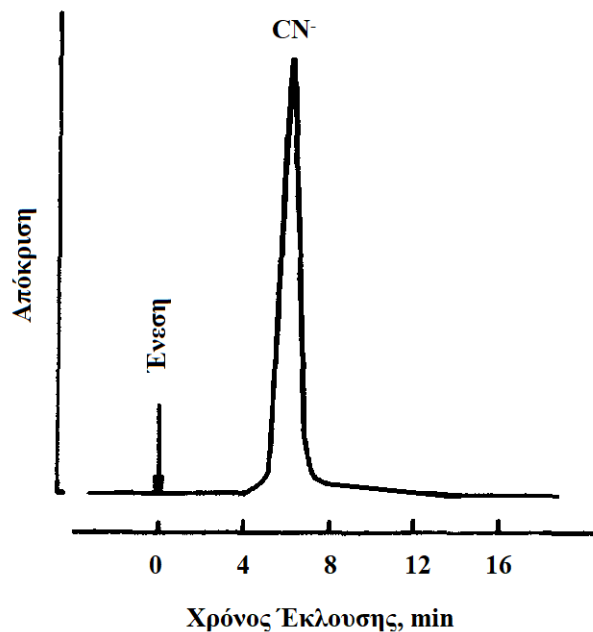
Οι μέθοδοι υγρής χρωματογραφίας παρουσιάζουν καλή διαχωριστική ικανότητα και πολύ καλά όρια ανίχνευσης, όμως, δεν μπορεί να γίνει απευθείας η ανάλυση των κυανιούχων, χωρίς να προηγηθεί κάποια προκατεργασία ή αντίδραση, γεγονός που αυξάνει το χρόνο ανάλυσης.

8.2.2.1 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) με ανιχνευτή φθορισμού.

Με την αντίδραση König.

Η μέθοδος χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό κυανιούχων σε δείγματα ερυθροκυττάρων (208). Αρχικά, το αίμα επεξεργάζεται με ηπαρίνη και ακολουθεί η διεργασία για τα ερυθροκύτταρα που έχει αναφερθεί στο κεφάλαιο 7. Στη συνέχεια, χρησιμοποιείται συσκευή Conway, στο εσωτερικό διαμέρισμα τοποθετείται το υδροξείδιο

του νατρίου και στο εξωτερικό, το δείγμα και ασκορβικό οξύ. Αφήνεται για 1 ώρα και στη συνέχεια, προστίθεται θειικό οξύ στο εξωτερικό διαμέρισμα και ακολουθεί η διάχυση του υδροκυανίου. Στη συνέχεια, το διάλυμα του εσωτερικού διαμερίσματος προχωράει για ανάλυση στην HPLC. Το διάλυμα έκλουσης αποτελείται από ρυθμιστικό διάλυμα οξικού νατρίου pH 5.0 που περιέχει υπερχλωρικό νάτριο, χλωραμίνη T και αντιδραστήριο πυριδίνης-βαρβιτουρικού οξέος, που περιέχει πυριδίνη, βαρβιτουρικό οξύ, πυκνό υδροχλώριο και νερό. Ο ανιχνευτής φθορισμού αποτελείται από λυχνία αερίου ξένου και μήκος κύματος διεγέρσεως $\lambda_{\text{max}_{\text{ex}}}$ = 583 nm και εκπομπής $\lambda_{\text{max}_{\text{em}}}$ = 607 nm. Το χρωματογράφημα φαίνεται στην Εικόνα 17. Ο χρόνος έκλουσης για τα κυανιούχα είναι 6 λεπτά. Η καμπύλη αναφοράς είναι γραμμική σε εύρος συγκεντρώσεων 1.3- 260 $\mu\text{g/L}$ και το όριο ανίχνευσης 0.52 $\mu\text{g/L}$.

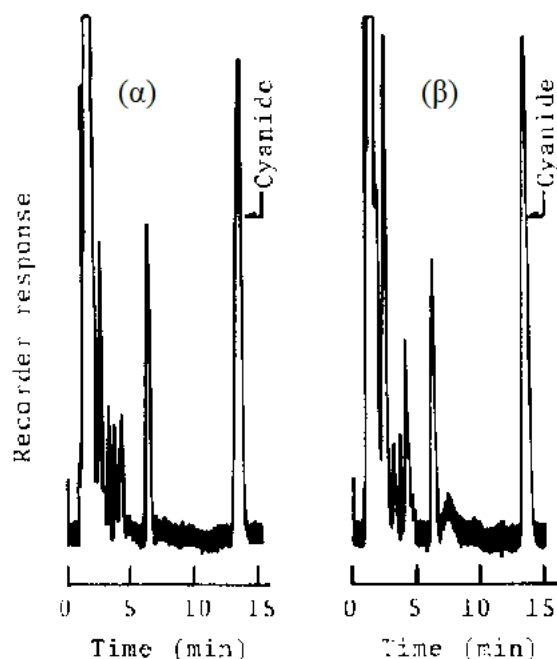


Εικόνα 17. Το χρωματογράφημα των κυανιούχων (CN^-), με χρόνο έκλουσης 6 λεπτά (208).

Με παραγωγοποίηση των κυανιούχων με διάλυμα ναφθαλινο-2,3-διαλδεϋδης (NDA) και ταυρίνης.

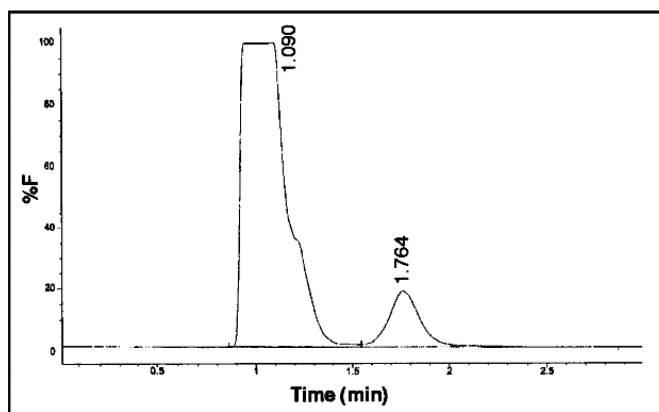
Η μέθοδος χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό των κυανιούχων στα ερυθροκύτταρα και στο ολικό αίμα (55). Αρχικά, ακολουθείται η προκατεργασία των ερυθροκυττάρων, παραλαμβάνεται το υπερκείμενο υγρό για παραγωγοποίηση με NDA και ταυρίνη και στη συνέχεια, τοποθετείται στην HPLC. Χρησιμοποιείται στήλη αντιστρόφου φάσης C18 και κινητή φάση ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου (pH 6.8) και μεθανόλη (58:42 v/v).

Ο ανιχνευτής φθορισμού αποτελείται από λυχνία αερίου ξένου και μήκος κύματος διεγέρσεως $\lambda_{\max_{ex}} = 418 \text{ nm}$ και εκπομπής $\lambda_{\max_{em}} = 460 \text{ nm}$. Ο χρόνος ανάσχεσης είναι 13 λεπτά (Εικόνα 18). Το όριο ανίχνευσης της μεθόδου για τα ερυθροκύτταρα είναι $2.6 \mu\text{g/L}$ και η ανάκτηση $82.5 \pm 7\%$.



Εικόνα 18. Χρωματογράφημα για (α)τα ερυθροκύτταρα, (β) το ολικό αίμα (55).

Άλλη μέθοδος, που αναπτύχθηκε αργότερα, χρησιμοποιεί για την επεξεργασία του δείγματος τα φιαλίδια headspace, όπως φαίνονται στην Εικόνα 5 (200). Και εδώ χρησιμοποιήθηκε στήλη C18 και κινητή φάση αποτελούμενη από 92% δις απιονισμένο νερό/ 8% ακετονιτρίλιο και ο χρόνος ανάσχεσης του CBI βρέθηκε να είναι 1.7 λεπτά (Εικόνα 19).



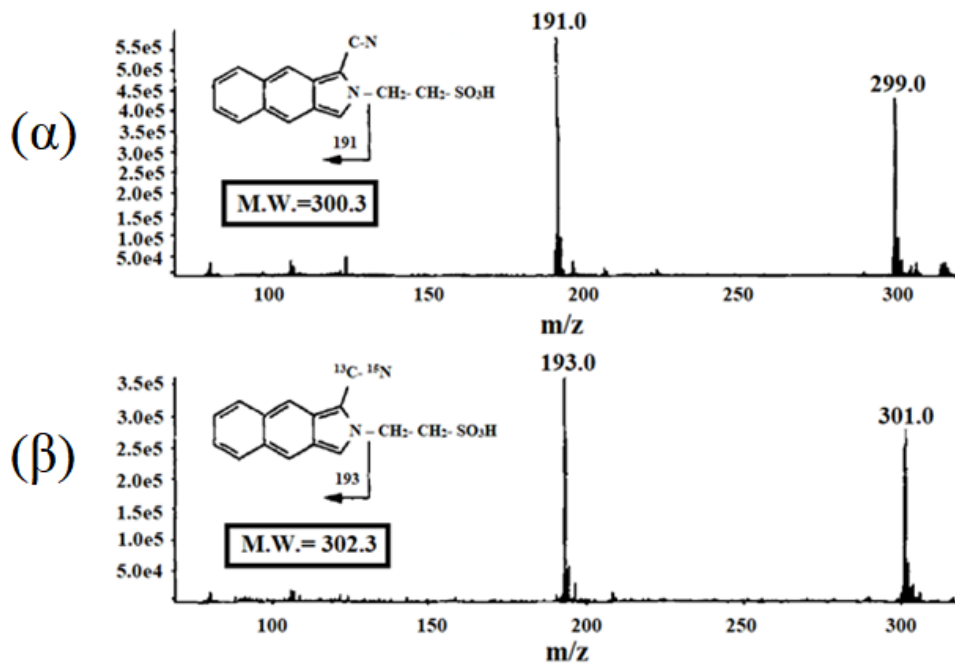
Εικόνα 19. Χρωματογράφημα CBI, χρόνος ανάσχεσης $t_R = 1.7 \text{ min}$ (200).

8.2.2.2 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης συζευγμένη με φασματομετρία μαζών (HPLC-MS).

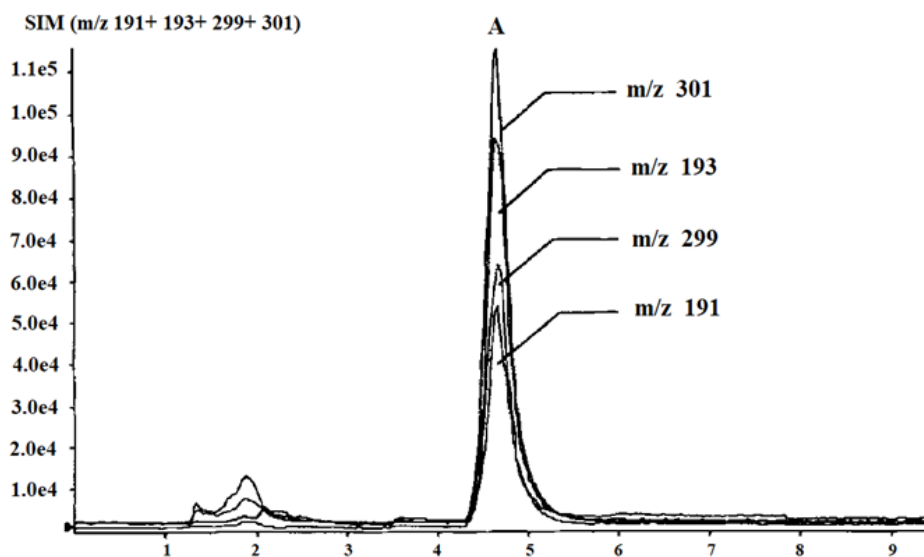
Η μέθοδος βασίζεται στην παραγωγοποίηση του δείγματος με NDA και ταυρίνη, η οποία γίνεται ταυτόχρονα με τη μικροδιάχυση του δείγματος (202). Το δείγμα που αναλύεται με αυτή τη μέθοδο είναι ολικό αίμα. Αναλυτικότερα, για την προκατεργασία του δείγματος χρησιμοποιείται ένα φιαλίδιο headspace στο οποίο προστίθεται το αίμα και διάλυμα $K^{13}C^{15}N$ (εσωτερικό πρότυπο) και ένα μικρό πλαστικό φιαλίδιο τύπου Eppendorf που περιέχει το διάλυμα παραγωγοποίησης (NDA/ ταυρίνη/ μεθανόλη/ αμμωνία σε αναλογίες 25:25:45:5, v/v). Στη συνέχεια, προστίθεται στο φιαλίδιο headspace πυκνό διάλυμα θεικού οξέος και σφραγίζεται. Μετά από 30 λεπτά παραλαμβάνεται το διάλυμα από το εσωτερικό φιαλίδιο και τοποθετείται με ένεση σε στήλη αντιστρόφου φάσεως C18. Η κινητή φάση αποτελείται από ακετονιτρίλιο σε ρυθμιστικό διάλυμα μυρμηκικού αμμωνίου pH 3.0. Για την παραγωγή των ιόντων χρησιμοποιήθηκε η τεχνική ιοντισμού με ηλεκτροψεκάσμο (Electrospray Ionization, ESI). Για την ανάλυση των ιόντων χρησιμοποιήθηκε τετραπολικός αναλυτής μαζών. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε αρνητικό ESI (-) ιοντισμό. Η ανάλυση έγινε με χρωματογράφημα συνολικών ιόντων (TIC) και με παρακολούθηση επιλεγμένου ιόντος (SIM), όπως φαίνεται στην Εικόνα 20 και στην Εικόνα 21, αντίστοιχα. Ο μέσος χρόνος ανάσχεσης των παραγώγων του CBI είναι 4.69 λεπτά.

Παρατηρήθηκε μεγάλη καθαρότητα στις μετρήσεις, εξαιτίας της μικροδιάχυσης, και δεν εμφανίστηκαν παρεμποδίσεις από την ταυρίνη ή το NDA, ακόμα και όταν υπήρχε περίσσεια ποσότητάς τους. Η ποσοτικοποίηση έγινε υπολογίζοντας το κλάσμα ύψους κορυφής των μοριακών ιόντων (m/z 191) / (m/z 193) ή το κλάσμα (m/z 299) / (m/z 301)

από τα παράγωγα του CBI, του CN⁻ και του ¹³C¹⁵N⁻ και συγκρίνοντας τα αποτελέσματα με την καμπύλη αναφοράς. Το όριο ανίχνευσης της μεθόδου είναι 5 µg/L, το όριο ποσοτικοποίησης 15 µg/L, η καμπύλη αναφοράς είναι γραμμική σε εύρος 15- 3000 µg/L και η εκατοστιαία ανάκτηση είναι πάνω από 85%.



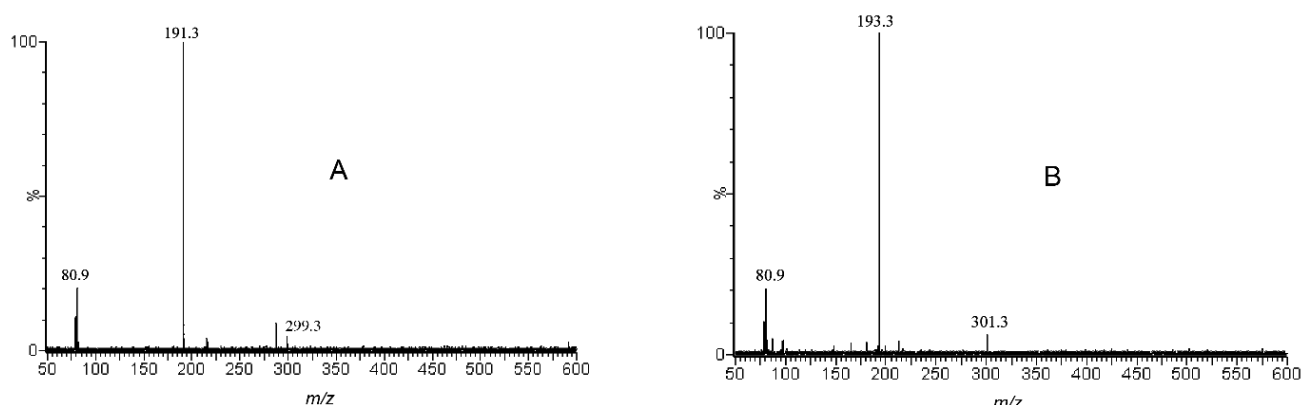
Εικόνα 20. Φάσμα μαζών (TIC) παραγώγου CBI του (α) KCN και (β) K¹³C¹⁵N (202).



Εικόνα 21. Χρωματογράφημα HPLC-MS (SIM; m/z 191+193+299+301), η κορυφή A βγαίνει σε χρόνο 4.69 min (t_R) (202).

8.2.2.3 Υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με διαδοχική φασματομετρία μαζών (LC-MS/MS).

Στη μέθοδο γίνεται παραγωγοποίηση των κυανιούχων με NDA και ταυρίνη και παράγεται CBI, αλλά προηγείται εκχύλιση στερεάς φάσης (solid phase extraction (SPE)) και ο προσδιορισμός γίνεται με διαδοχική φασματομετρία μαζών (242). Και εδώ χρησιμοποιείται το ισότοπο $K^{13}C^{15}N$ ως εσωτερικό πρότυπο. Η στήλη εκχύλισης είναι αντιστρόφου φάσεως και η κινητή φάση αποτελείται από νερό και αμμωνία. Η στήλη είναι C18 αντιστρόφου φάσης με κινητή φάση μυρμηκικό αμμώνιο (pH 2.8) και ακετονιτρίλιο/μυρμηκικό αμμώνιο (pH 2.8) σε αναλογία 90:10 v/v. Ο αρνητικός ιοντισμός πραγματοποιείται με ηλεκτροψεκασμό (ESI). Για την προετοιμασία του δείγματος ολικού αίματος, χρησιμοποιήθηκε μεθανόλη, για να γίνει απομάκρυνση των πρωτεϊνών από το αίμα, και ακολούθησε φυγοκέντρηση. Στο υπερκείμενο υγρό, προστίθενται το NDA και η ταυρίνη και στη συνέχεια, τοποθετείται το δείγμα στο χρωματογράφο. Ο χρόνος ανάσχεσης είναι $t_R = 4.95$ min. Το όριο ανίχνευσης της μεθόδου είναι 10 $\mu\text{g/L}$, η καμπύλη αναφοράς είναι γραμμική σε εύρος 26- 2600 $\mu\text{g/L}$ και παρατηρείται 90% ανάκτηση.

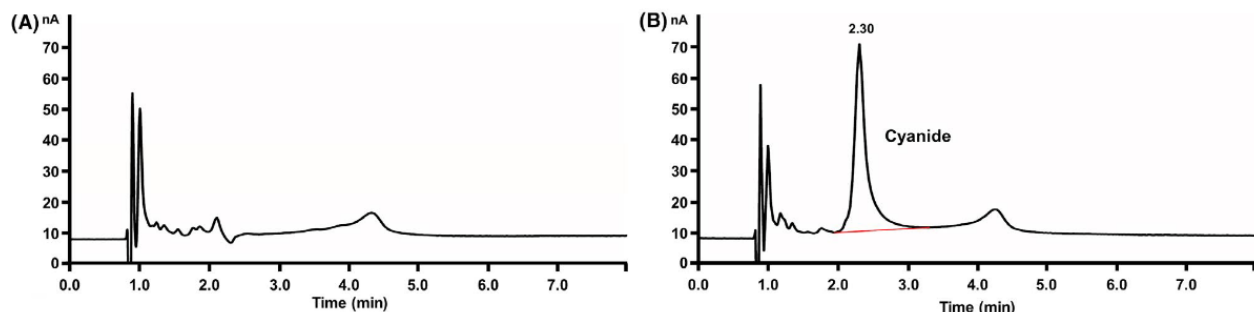


Εικόνα 22. Φάσματα μαζών CBI του (A) κυανιούχου ιόντος, και του (B) ισότοπου ιόντος (242).

8.2.2.4 Ιοντική χρωματογραφία με αμπερομετρικό ανιχνευτή.

Η ιοντική χρωματογραφία είναι μια απλή μέθοδος που προσδιορίζει τα κυανιούχα σε δείγματα ολικού αίματος (243). Η κινητή φάση αποτελείται από διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου και EDTA. Ο ανιχνευτής είναι σε λειτουργία συνεχούς ρεύματος. Σε ένα φιαλίδιο τοποθετείται το αίμα με διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου και ακετόνη και φυγοκεντρείται. Στο υπερκείμενο υγρό προστίθεται νερό, φιλτράρεται και τοποθετείται στο χρωματογράφο. Ο χρόνος ανάσχεσης είναι 2.30 λεπτά (Εικόνα 23), το όριο ανίχνευσης 0.1 mg/L , το όριο ποσοτικοποίησης είναι 0.2 mg/L , η καμπύλη είναι γραμμική σε εύρος 0.2-

50 mg/L και η εκατοστιαία ανάκτηση κυμαίνεται μεταξύ 74- 79.3%. Η ανίχνευση των κυανιούχων με αυτή τη μέθοδο δεν παρεμποδίζεται από τα θειοκυανιούχα και τα θειοθειικά ιόντα.



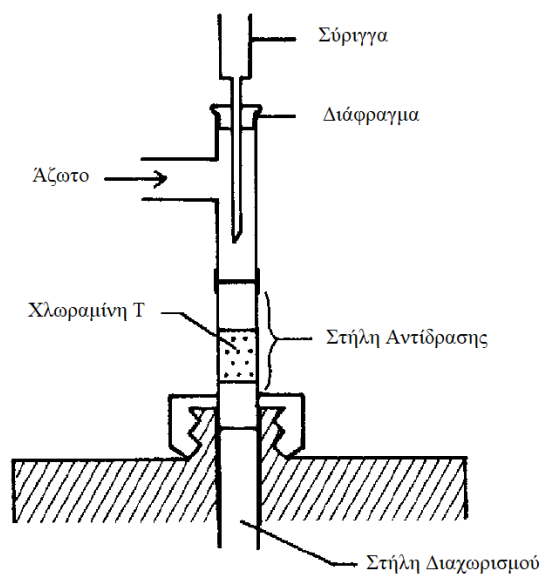
Εικόνα 23. Χρωματογράφημα της IC, όπου A) τυφλό δείγμα και B) δείγμα αίματος με κυανιούχα (243).

Μέθοδοι αέριας χρωματογραφίας έχουν, κατεξοχήν, αναπτυχθεί για τον προσδιορισμό των κυανιούχων, λόγω της πτητικότητας που παρουσιάζει το υδροκυάνιο. Οι περισσότερες μέθοδοι είναι γρήγορες, καθώς δεν χρειάζεται να προηγηθεί επεξεργασία του δείγματος πριν την ανάλυση. Όμως, το μικρό μοριακό του βάρος δυσκολεύει το διαχωρισμό του υδροκυανίου από άλλα μόρια μικρού μοριακού βάρους.

8.2.2.5 Αέρια χρωματογραφία (Headspace- GC) με ανιχνευτή σύλληψης ηλεκτρονίων (electron capture detector, ECD).

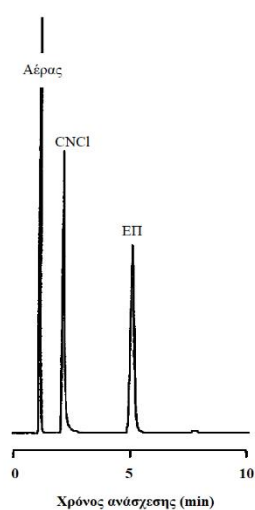
Δύο μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί και βασίζονται στη μετατροπή των κυανιούχων σε υδροκυάνιο, μετά από επεξεργασία με φωσφορικό οξύ και στη συνέχεια, τη μετατροπή του υδροκυανίου σε χλωριούχο κυάνιο, με την προσθήκη της χλωραμίνης T.

Για τη μία μέθοδο χρησιμοποιείται μια στήλη, πριν τη στήλη της χρωματογραφίας, ως προ-στήλης αντίδραση (pre-column reaction), η οποία είναι πληρωμένη με χλωραμίνη T (244). Η μετατροπή γίνεται εύκολα και πλήρως στη γραμμή ροής της χρωματογραφίας. Η στήλη αυτή τυλίγεται με αλουμινόχαρτο και διατηρείται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, ώστε να αποφευχθεί η αποσύνθεση της χλωραμίνης T, εξαιτίας του φωτός ή της θερμοκρασίας. Στην Εικόνα 24 φαίνεται η σύνδεση των δύο στηλών.



Εικόνα 24. Σύνθεση της στήλης διαχωρισμού με τη στήλη αντίδρασης (244).

Η στήλη διαχωρισμού είναι γυάλινη και το φέρον αέριο είναι καθαρό άζωτο. Η στήλη αντίδρασης είναι από γυαλί, πληρωμένη με χλωραμίνη Τ. Ο ανιχνευτής συλλήψεως ηλεκτρονίων περιέχει έλασμα ^{63}Ni . Το εσωτερικό πρότυπο της μεθόδου αποτελείται από διχλωρομεθάνιο διαλυμένο σε διμεθυλοφορμαμίδιο. Σύμφωνα με τη μέθοδο, δείγμα αίματος τοποθετείται σε φιαλίδιο και προστίθεται διάλυμα εσωτερικού προτύπου και φωσφορικό οξύ. Το φιαλίδιο ανακινείται σε υδατόλουτρο στους 50 °C και στη συνέχεια, ακολουθεί η μέτρηση. Στο χρωματογράφημα (Εικόνα 25), οι χρόνοι ανάλυσης του χλωριούχου κυανίου και του εσωτερικού προτύπου (ΕΠ) είναι 2.1 και 5.2 λεπτά, αντίστοιχα.

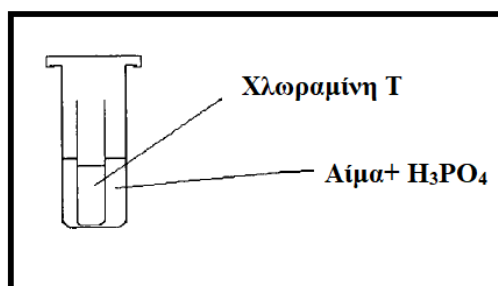


Εικόνα 25. Χρωματογράφημα με χρήση pre column, όπου CNCl: χλωριούχο κυάνιο και ΕΠ: εσωτερικό πρότυπο (244).

Αξίζει να σημειωθεί πως το διάφραγμα (septum) δεν μπορεί να είναι από βουτυλικό καουτσούκ, γιατί το εσωτερικό πρότυπο προσροφάται σε αυτό και παρατηρούνται απώλειες. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε για την οξίνιση το φωσφορικό οξύ, έναντι του θεικού, γιατί το τελευταίο μπορεί να προκαλέσει πήξη του αίματος.

Παρουσιάζεται καλή γραμμικότητα σε εύρος συγκεντρώσεων 100- 5000 $\mu\text{g/L}$ και όριο ανίχνευσης συγκέντρωσης 50 $\mu\text{g/L}$.

Η δεύτερη μέθοδος χρησιμοποιεί ειδικό φιαλίδιο που περιέχει χλωραμίνη T, τοποθετείται στο φιαλίδιο headspace, αλλά είναι έτσι διαμορφωμένο ώστε η βελόνα του headspace να μην έρχεται σε επαφή μαζί του κατά την ένεση του δείγματος (245). Τα φιαλίδια φαίνονται στην Εικόνα 26.

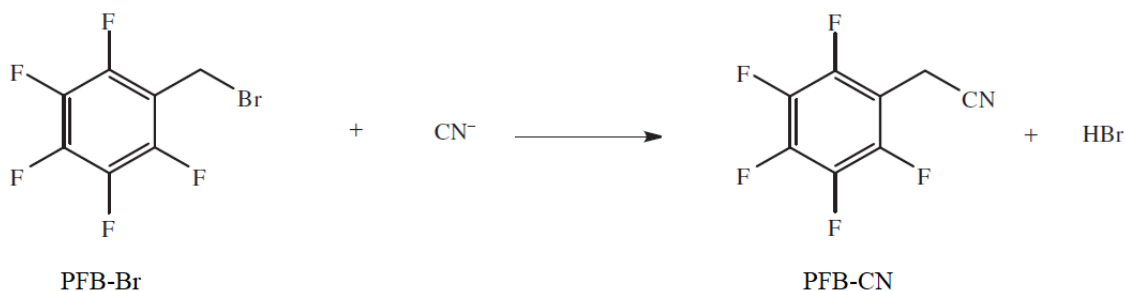


Εικόνα 26. Σχηματική αναπαράσταση της μετατροπής του υδροκυανίου σε χλωριούχο κυάνιο (245).

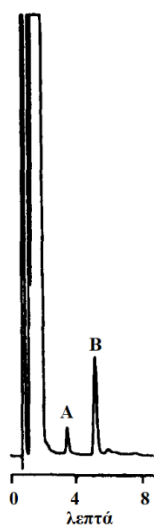
Στο φιαλίδιο headspace τοποθετείται, αρχικά, το αίμα με το φωσφορικό οξύ, στη συνέχεια, τοποθετείται το ειδικό φιαλίδιο που περιέχει χλωραμίνη T, κλείνεται το φιαλίδιο και αφήνεται στους 65 °C για 90 λεπτά, ώστε να απελευθερωθεί το χλωριούχο κυάνιο. Ακολουθεί η μέτρηση. Η στήλη που χρησιμοποιείται είναι τριχοειδής στήλη και το φέρον αέριο είναι το ήλιο. Ο χρόνος ανάσχεσης είναι 2.7 λεπτά, το όριο ανίχνευσης της μεθόδου είναι 5 $\mu\text{g/L}$, το όριο ποσοτικοποίησης είναι 100 $\mu\text{g/L}$, η καμπύλη παρουσιάζει γραμμικότητα σε εύρος συγκεντρώσεων από 5 $\mu\text{g/L}$ έως 1000 $\mu\text{g/L}$ και η εκατοστιαία ανάκτηση κυμαίνεται από 84% έως 96%.

8.2.2.6 Αέρια χρωματογραφία με ανιχνευτή σύλληψης ηλεκτρονίων (ECD) μετά από παραγωγοποίηση.

Στη χρωματογραφία αυτή, προηγείται μια αντίδραση παραγωγοποίησης με το βρωμομεθυλοπενταφθοροβενζόλιο (PFBB_r) και το χλωριούχο βενζυλο-διμεθυλο-δεκατετρυλοαζάνιο, ως καταλύτη (TDMBA) (246). Η αντίδραση είναι η εξής:



Το 1,3,5-τριβρωμοβενζόλιο (TBB) χρησιμοποιείται ως εσωτερικό πρότυπο. Για την προκατεργασία του δείγματος ολικού αίματος, προστίθεται θειώδες νάτριο και παγωμένο τριχλωροξικό οξύ, που παρεμποδίζουν την οξειδωση των κυανιούχων και την καθίζηση πρωτεϊνών, αντίστοιχα. Το δείγμα φυγοκεντρείται και παραλαμβάνεται το υπερκείμενο υγρό. Στη συνέχεια, προστίθενται το PFBBr, το εσωτερικό πρότυπο (ΕΠ) και το TDMBA, και ακολουθεί φυγοκέντρηση. Παραλαμβάνεται το υπερκείμενο υγρό και προστίθεται n-εξάνιο, το οποίο διατηρεί σταθερή την ευαισθησία του PFBBr, και τοποθετείται στο χρωματογράφο. Η στήλη που χρησιμοποιείται είναι γυάλινη και το φέρον αέριο είναι άζωτο. Ο χρόνος ανάλυσης είναι 3.5 και 5.2 λεπτά, αντίστοιχα (Εικόνα 27).

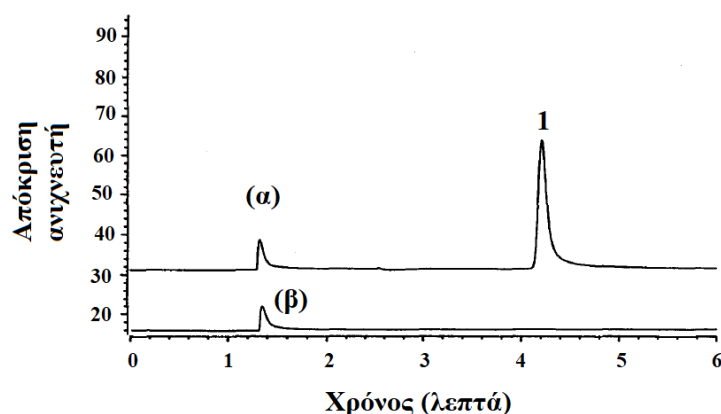


Εικόνα 27. Χρωματογράφημα ,όπου A είναι η κορυφή των CN^- και B η κορυφή του εσωτερικού προτύπου (246)

Το όριο ανίχνευσης της μεθόδου είναι 0.26 mg/L, η καμπύλη είναι γραμμική σε εύρος συγκεντρώσεων από 0.52 έως 26 mg/L και η ανάκτηση 80%. Τα σουλφίδια μπορούν να αντιδράσουν με το PFBBr, αλλά το παράγωγο που σχηματίζεται εμφανίζει κορυφή με χρόνο ανάλυσης 15 λεπτά, οπότε δεν επηρεάζει τη μέθοδο.

8.2.2.7 Αέρια χρωματογραφία (Headspace- GC) με ανιχνευτή αζώτου- φωσφόρου (nitrogen- phosphorus detector, NPD).

Σε αυτή τη μέθοδο η στήλη που χρησιμοποιείται είναι τριχοειδής, το φέρον αέριο είναι το ήλιο και ο ανιχνευτής είναι αζώτου- φωσφόρου (247). Το δείγμα αραιώνεται με νερό και σ' αυτό προστίθεται φωσφορικό οξύ. Ακολουθεί ανάμιξη και επώαση στους 50 °C για 30 λεπτά. Στη συνέχεια, ενίεται το δείγμα στο χρωματογράφο με τη βοήθεια προθερμασμένης σύριγγας στους 50 °C. Το χρωματογράφημα με ανιχνευτή αζώτου- φωσφόρου φαίνεται στην Εικόνα 28.



Εικόνα 28. Χρωματογράφημα όπου το (α) είναι το δείγμα με 1, την κορυφή έκλουσης για το υδροκυάνιο και (β) το τυφλό (247).

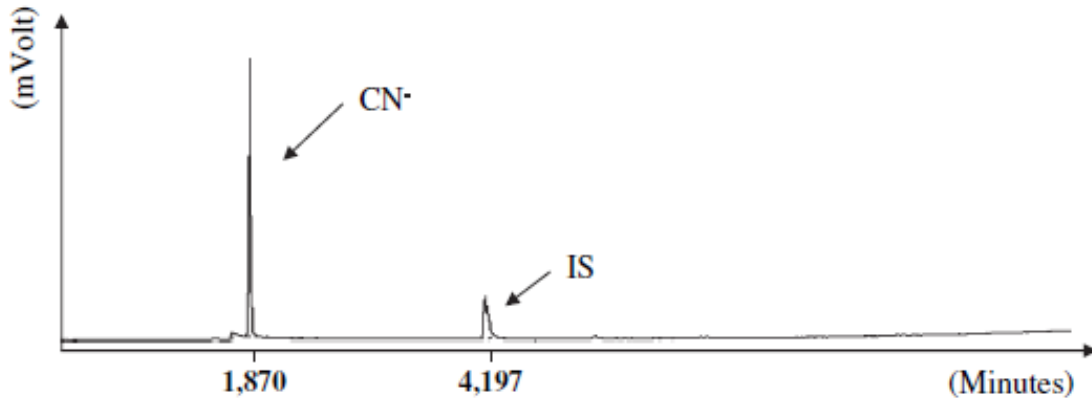
Το όριο ανίχνευσης είναι 1 μg/L και η καμπύλη είναι γραμμική σε εύρος συγκεντρώσεων από 50 μg/L έως 20 μg/L.

Στη μέθοδο παρατηρείται μετατροπή των θειοκυανιούχων σε κυανιούχα, στις συνθήκες που επικρατούν στο Headspace. Αυτό μπορεί να αποτραπεί, με επώαση του δείγματος με ρυθμιστικό διάλυμα οξικού οξέος σε θερμοκρασία δωματίου, πριν το headspace ή μικροδιάχυση σε αλκαλικό μέσο, αφού πρώτα το δείγμα επεξεργαστεί με ρυθμιστικό διάλυμα οξικού οξέος.

8.2.2.8 Αυτόματη αέρια χρωματογραφία (Headspace- GC) με ανιχνευτή αζώτου- φωσφόρου (NPD).

Η μέθοδος είναι πολύ γρήγορη, καθώς δεν χρειάζεται κάποια ιδιαίτερη προκατεργασία του δείγματος (218). Σε ένα φιαλίδιο headspace τοποθετείται το δείγμα, με το εσωτερικό πρότυπο (ακετονιτρίλιο) και το οξικό οξύ, το οποίο προκαλεί την απελευθέρωση του υδροκυανίου, θερμαίνεται και στη συνέχεια εισάγεται στο χρωματογράφο. Η στήλη που

χρησιμοποιείται είναι τριχοειδής, το φέρον αέριο είναι το ήλιο και ο ανιχνευτής είναι NPD. Ο χρόνος ανάσχεσης για τα κυανιούχα ιόντα είναι 1.9 λεπτά και για το ακετονιτρίλιο 4.2, όπως φαίνεται στην Εικόνα 29. Το όριο ανίχνευσης είναι 11 $\mu\text{g/L}$, το όριο ποσοτικοποίησης 55 $\mu\text{g/L}$, η καμπύλη είναι γραμμική σε εύρος 0.05– 5 mg/L , και παρατηρείται ανάκτηση 91.4%.

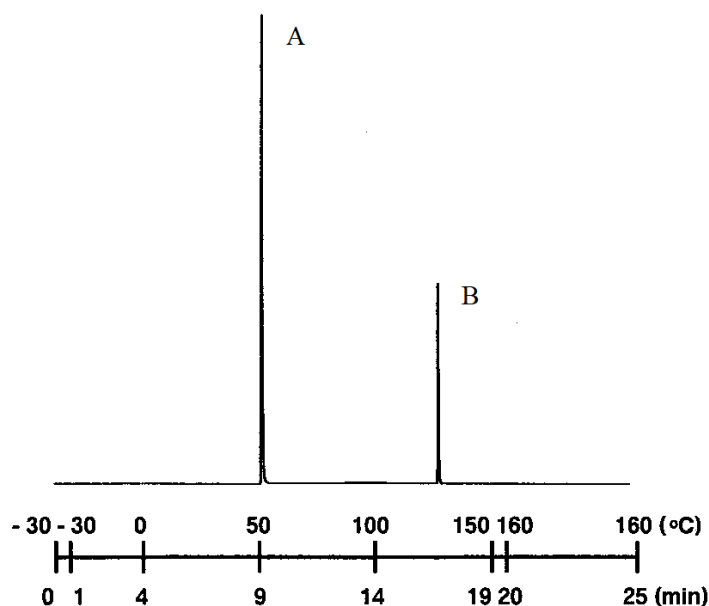


Εικόνα 29. Χρωματογράφημα όπου φαίνονται οι χρόνοι ανάσχεσης των κυανιούχων (CN⁻) και του εσωτερικού προτύπου (IS) (218).

8.2.2.9 Αέρια χρωματογραφία (Headspace- GC) με παγίδευση σε κρυογενή φούρνο (cryogenic oven trapping) και ανιχνευτή αζώτου- φωσφόρου (NPD).

Στη χρωματογραφία αυτή χρησιμοποιείται μια συσκευή που ελέγχεται από υπολογιστή και μπορεί να μειώσει τη θερμοκρασία του φούρνου σε θερμοκρασίες υπό το μηδέν, με αποτέλεσμα τη μείωση του χρόνου της ανάλυσης, καθώς αποφεύγεται το στάδιο της προκατεργασίας του δείγματος (248). Η στήλη είναι τριχοειδής και το φέρον αέριο είναι το ήλιο και ο ανιχνευτής NPD. Το δείγμα που χρησιμοποιείται είναι ολικό αίμα και το εσωτερικό πρότυπο (ΕΠ) αποτελείται από διάλυμα προπανονιτρίλιου. Στο δείγμα προστίθεται το ΕΠ, θειικό νάτριο και φωσφορικό οξύ. Ανακινείται, θερμαίνεται στους 70 °C και το αέριο που δημιουργείται εισέρχεται με σύριγγα στη στήλη στους -30 °C. Στην Εικόνα 30 φαίνεται το χρωματογράφημα, όπου ο χρόνος ανάσχεσης για τα κυανιούχα είναι 9 λεπτά και για το ΕΠ 16.7 λεπτά. Η καμπύλη αναφοράς είναι γραμμική σε εύρος συγκεντρώσεων από 25- 1000 $\mu\text{g/L}$ και το όριο ανίχνευσης είναι 2 $\mu\text{g/L}$.

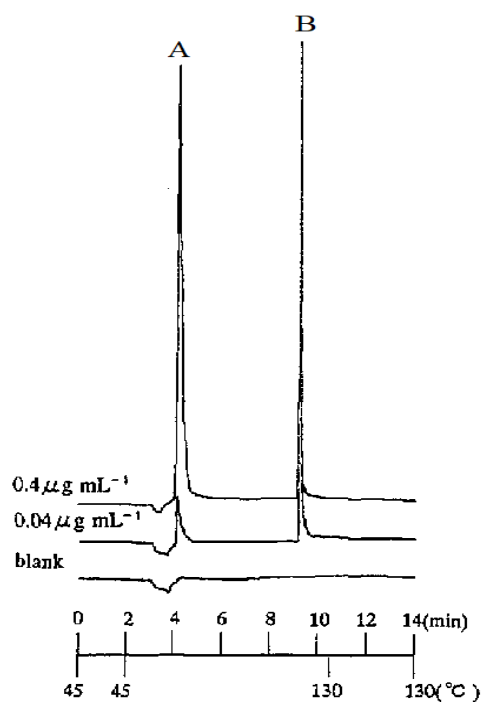
Με τη μέθοδο αυτή μπορούν να μετρηθούν και τα ενδογενή κυανιούχα αρκεί στο δείγμα να προστεθεί ασκορβικό οξύ, ώστε να ανασχέσει τη μετατροπή των θειοκυανιούχων σε κυανιούχα.



Εικόνα 30. Χρωματογράφημα, όπου η κορυφή A είναι για τα CN⁻ και η B για το ΕΠ (248).

8.2.2.10 Αέρια χρωματογραφία με μικροεκχύλιση στερεάς φάσης με δειγματοληψία από την υπερκείμενη φάση (Headspace- GC- Solid phase Extraction, HS- SPME) και ανιχνευτή αζώτου- φωσφόρου (NPD).

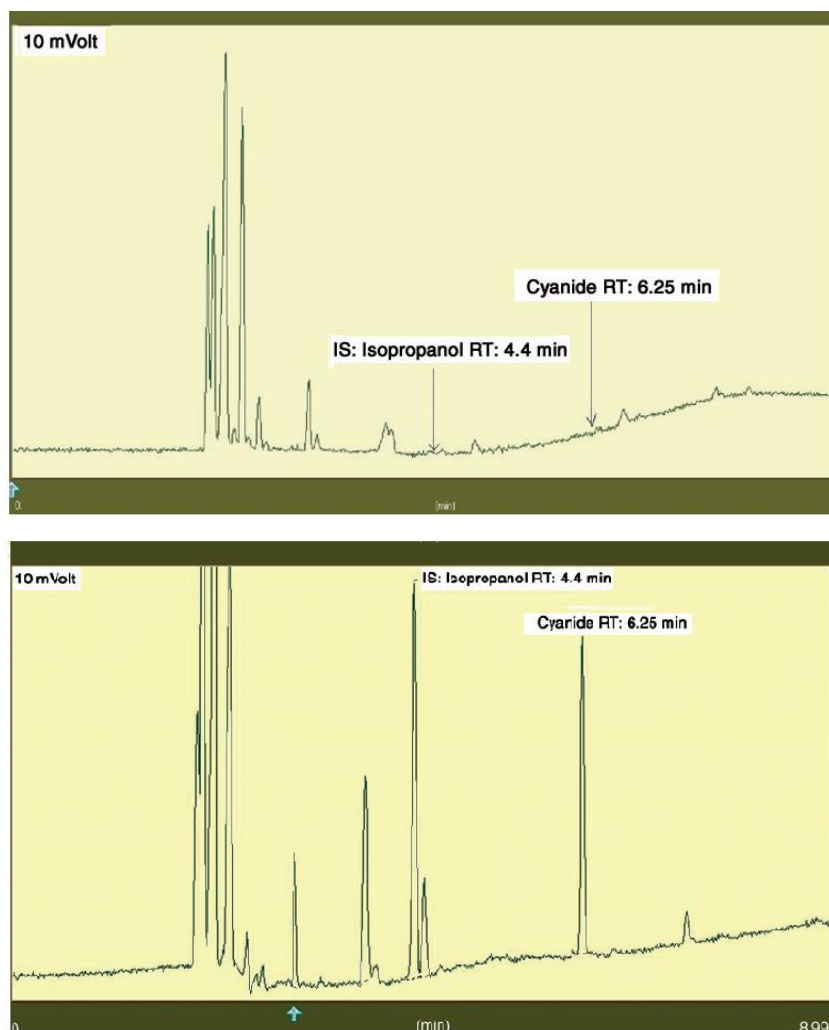
Τα κυανιούχα μπορούν να εκχυλιστούν από το ολικό αίμα με HS- SPME, με ίνα που είναι επικαλυμμένη από Carbowax και διβινυλοβενζόλιο (249). Το δείγμα τοποθετείται σε ένα φιαλίδιο headspace μαζί με ακετονιτρίλιο (εσωτερικό πρότυπο), άνυδρο θειικό νάτριο και φωσφορικό οξύ. Η στήλη είναι τριχοειδής, το φέρον αέριο είναι το ήλιο και ο ανιχνευτής NPD. Το χρωματογράφημα φαίνεται στην Εικόνα 31, όπου ο χρόνος ανάσχεσης για το υδροκυάνιο είναι 4.10 λεπτά για το ακετονιτρίλιο 9.35 λεπτά. Το όριο ανίχνευσης της μεθόδου είναι 20 µg/L και η καμπύλη είναι γραμμική σε εύρος 40- 4000 µg/L.



Εικόνα 31. Χρωματογράφημα, όπου κορυφή A) είναι του υδροκυανίου και κορυφή B) του ακετυλονιτριλίου (249).

8.2.2.11 Αέρια χρωματογραφία (Headspace- GC) με ανιχνευτή ιοντισμού φλόγας (FID).

Ο ανιχνευτής FID χρησιμοποιείται σε τοξικολογικές εξετάσεις ρουτίνας, επομένως, υπάρχει διαθέσιμος σε πολλά εργαστήρια, γι' αυτό προτιμάται από τον NPD, αν και ο τελευταίος είναι πιο εκλεκτικός για τα κυανιούχα. Στη μέθοδο δεν χρειάζεται προκατεργασία του δείγματος, το οποίο είναι ολικό αίμα (250). Σε φιαλίδιο headspace τοποθετείται το δείγμα, η ισοπροπανόλη (εσωτερικό πρότυπο) και χλωριούχο νάτριο διαλυμένο σε πυκνό υδροχλωρικό οξύ, για την μετατροπή των κυανιούχων σε υδροκυάνιο. Η στήλη που χρησιμοποιείται είναι τριχοειδής και το φέρον αέριο είναι το άζωτο. Το χρωματογράφημα φαίνεται στην Εικόνα 32. Ο χρόνος ανάλυσης του εσωτερικού προτύπου είναι 4.40 λεπτά, ενώ του υδροκυανίου είναι 6.25 λεπτά. Το όριο ανίχνευσης είναι 0.02 mg/L, το όριο ποσοτικοποίησης 0.2 mg/L και η καμπύλη αναφοράς είναι γραμμική σε εύρος 0.2- 50 mg/L.



Εικόνα 32. Χρωματογράφημα τυφλού δείγματος (πάνω) και δείγματος με κυανιούχα (κάτω) (250).

8.2.2.12 Αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μαζών μετά από παραγωγοποίηση.

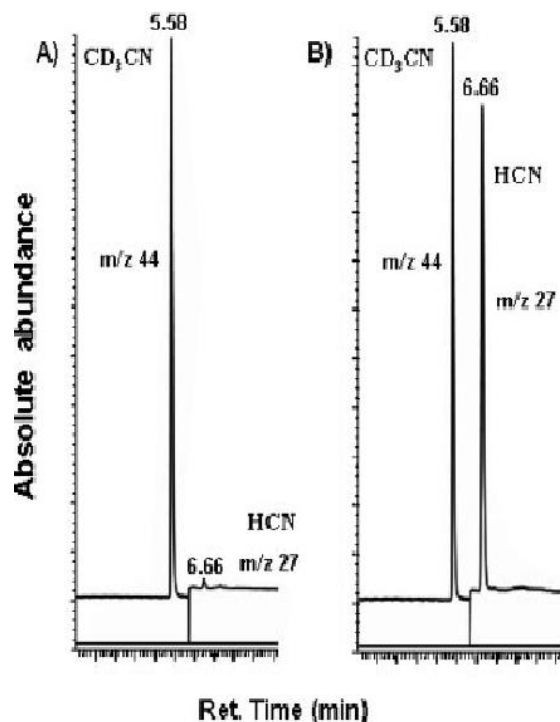
Η μέθοδος χρησιμοποιεί το PFBBr για την παραγωγοποίηση των κυανιούχων, όπως παραπάνω, αλλά καταλύτης της αντίδρασης είναι το θεικό τετραβουτυλαμμώνιο (TBAS) (251). Η δημιουργία ιόντων στο MS γίνεται με χημικό ιοντισμό με αντιδρόν αέριο το μεθάνιο. Για την αέρια χρωματογραφία, η στήλη που χρησιμοποιείται είναι τριχοειδής με στατική φάση αποτελούμενη από 80% διμεθυλο-σιλοξάνιο και 20% πολυδιμεθυλο-σιλοξάνιο. Το φέρον αέριο είναι το ήλιο. Με αυτή τη μέθοδο μπορεί να γίνει ταυτόχρονος προσδιορισμός των κυανιούχων και των θειοκυανιούχων. Τα θειοκυανιούχα αντιδρούν με

8.2.2.13 Αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με διαδοχική φασματομετρία μαζών (GC- MS/MS) μετά από παραγωγοποίηση.

Τελευταία, έχει αναπτυχθεί μια μέθοδος που χρησιμοποιεί την παραγωγοποίηση με PFBBr, με καταλύτη της αντίδρασης το TBAS, αλλά χρησιμοποιεί διαδοχική φασματομετρία μαζών, γεγονός που προσδίδει μεγαλύτερη εκλεκτικότητα και ευαισθησία στη μέθοδο (252). Για την προκατεργασία του δείγματος, ακολουθείται η διαδικασία της παραπάνω μεθόδου, αλλά μετά τη φυγοκέντρηση, ακολουθεί εκχύλιση στερεάς φάσης (solid phase extraction, SPE) της οργανικής στιβάδας, με τριχοειδή στήλη που περιέχει σουλφανική ομάδα και έκλυση του δείγματος με άνυδρο θειικό νάτριο και στη συνέχεια, φόρτωση του δείγματος στο χρωματογράφο. Το εσωτερικό πρότυπο που χρησιμοποιείται είναι $K^{13}C^{15}N$. Η τριχοειδής στήλη που χρησιμοποιείται είναι επικαλυμμένη με 5% φαινυλομεθυλοσιλικόνη, το φέρον αέριο είναι το ήλιο, στο MS επιλέχθηκε αρνητικός ιοντισμός και ο ανιχνευτής είναι τριπλό τετράπολο. Ο χρόνος ανάσχεσης είναι 6.35 λεπτά, το όριο ανίχνευσης 24 $\mu\text{g/L}$, το όριο ποσοτικοποίησης 80 $\mu\text{g/L}$, η καμπύλη αναφοράς είναι γραμμική σε εύρος 0.1- 10 mg/L και η ανάκτηση είναι 98%.

8.2.2.14 Αέρια χρωματογραφία με μικροεκχύλιση στερεάς φάσης με δειγματοληψία από την υπερκείμενη φάση (Headspace- Solid phase Extraction, HS- SPME) συζευγμένη με φασματομετρία μαζών.

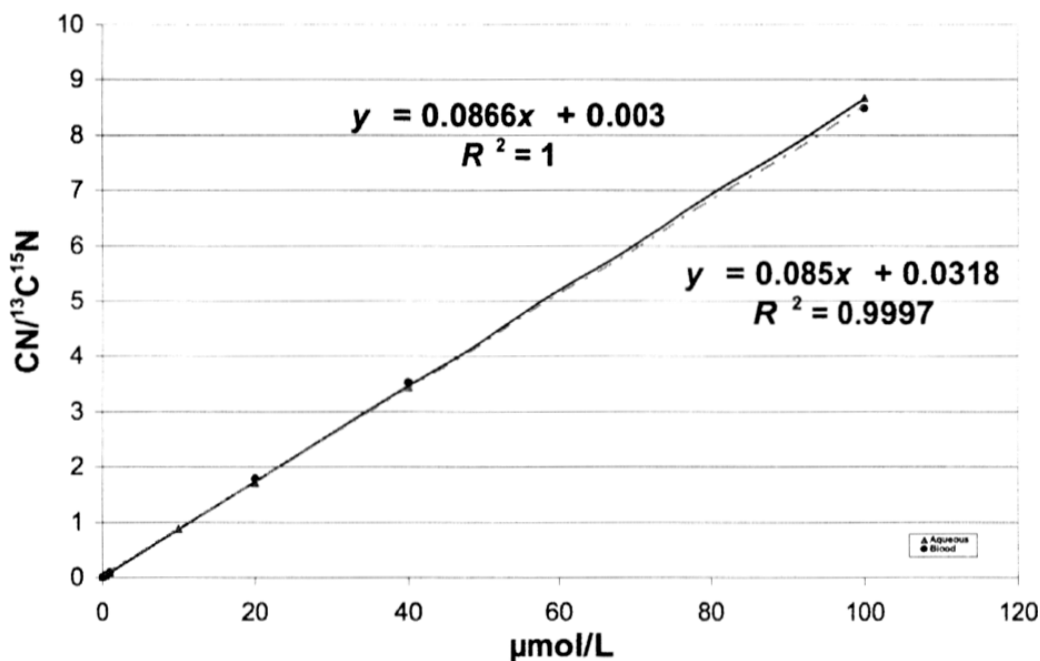
Η μικροεκχύλιση της μεθόδου, ακολουθεί τα ίδια στάδια με την προηγούμενη, με τις εξής διαφορές: 1) το εσωτερικό πρότυπο είναι δευτεριωμένο ακετονιτρίλιο (D_3 - ακετονιτρίλιο, CD_3CN) και 2) η ίνα για τη μικροεκχύλιση είναι επικαλυμμένη με Carboxen και πολυδιμεθυλοσιλοξάνιο (PDMS) (253). Η τριχοειδής στήλη που χρησιμοποιείται είναι πολική τύπου πολυαιθυλενογλυκόλης (acid modified polyethylene glycol phase). Το φέρον αέριο είναι το ήλιο. Η ποσοτικοποίηση γίνεται με παρακολούθηση επιλεγμένου ιόντος (SIM), $m/z= 26$ και $m/z= 27$ για το HCN, και $m/z= 42$ και $m/z= 44$ για το CD_3CN . Το χρωματογράφημα φαίνεται στην Εικόνα 32. Ο χρόνος ανάσχεσης για το υδροκυάνιο είναι 6.66 λεπτά, ενώ για το D_3 - ακετονιτρίλιο 5.58 λεπτά. Η καμπύλη είναι γραμμική σε εύρος 50- 10000 $\mu\text{g/L}$, ενώ το όριο ανίχνευσης είναι 6 $\mu\text{g/L}$, σε υδατικά διαλύματα. Οι ερευνητές αυτής της μεθόδου, δεν κατάφεραν να προσδιορίσουν το όριο ανίχνευσης στο αίμα, λόγω της παρουσίας επιπέδων ενδογενών κυανιούχων στο αίμα. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 34A, τα κυανιούχα δίνουν σήμα και στο τυφλό.



Εικόνα 34. Χρωματογράφημα ιόντων $m/z=27$ για το υδροκυάνιο και $m/z=44$ για το d_3 -ακετονιτρίλιο, όπου A) για τυφλό διάλυμα αίματος και B) για δείγμα αίματος (253).

8.2.2.15 Αέρια χρωματογραφία (Headspace- GC) συζευγμένη με φασματομετρία μαζών και ισοτοπική αραίωση.

Η μέθοδος είναι άμεση, καθώς δεν χρειάζεται καμία προκατεργασία δείγματος, μεγάλης ευαισθησίας και ταχεία (ολοκληρώνεται σε 20 λεπτά) (254). Βασίζεται στην ισοτοπική αραίωση με διάλυμα $K^{13}C^{15}N$, ως εσωτερικό πρότυπο. Το πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η μη εξάρτηση της καμπύλης αναφοράς από το υλικό του υποστρώματος. Έτσι, εμφανίζεται παρόμοια μορφή στην καμπύλη αναφοράς είτε αφορά υδατικό διάλυμα, είτε διάλυμα ολικού αίματος (Εικόνα 35).



Εικόνα 35. Καμπύλες αναφοράς. Συνεχής γραμμή: για υδατικά δείγματα, διακεκομμένη: για δείγματα ολικού αίματος (254).

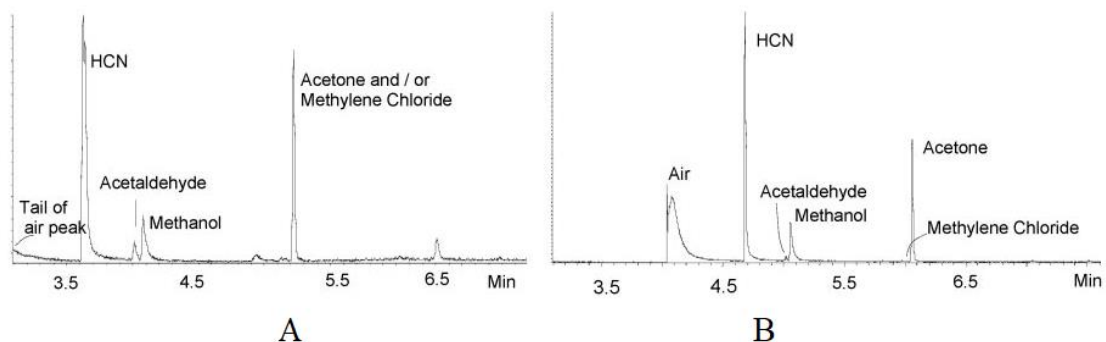
Η στήλη που χρησιμοποιείται στην αέρια χρωματογραφία είναι τριχοειδής και το φέρον αέριο είναι το ήλιο. Το MS χρησιμοποιεί ιοντισμό κρούσης με ηλεκτρόνια (EI) και τετραπολικό αναλυτή μαζών. Η ανάλυση γίνεται με παρακολούθηση επιλεγμένου ιόντος (SIM) $m/z=27$ για το HCN και $m/z=29$ για το $H^{13}C^{15}N$. Ο χρόνος ανάσχεσης και των δύο είναι 6.65 λεπτά.

Σε κάθε φιαλίδιο headspace τοποθετείται το δείγμα ολικού αίματος, διάλυμα EDTA και διάλυμα $K^{13}C^{15}N$, κλείνεται με καπάκι αλουμινίου και μένει σε θερμοκρασία $-80\text{ }^{\circ}C$ για 5 λεπτά. Στη συνέχεια, προστίθεται ασκορβικό οξύ και μίγμα φωσφορικού οξέος 85% και νερού, σε αναλογία 1:1 και τοποθετείται σε υδατόλουτρο στους $60\text{ }^{\circ}C$ για 30 δευτερόλεπτα, ώσπου να τήξει το αίμα. Τέλος, τοποθετείται στο GC με σύριγγες μιας χρήσης, καθώς τα κυανιούχα παρουσιάζουν προσρόφηση στην επιφάνεια της βελόνας, με αποτέλεσμα την επιμόλυνση του δείγματος από τα προηγούμενα δείγματα ανάλυσης.

Το όριο ανίχνευσης της μεθόδου είναι $7.8\text{ }\mu\text{g/L}$, το όριο ποσοτικοποίησης είναι $26\text{ }\mu\text{g/L}$, η καμπύλη είναι γραμμική έως τα $2600\text{ }\mu\text{g/L}$ και η ανάκτηση είναι 98%.

Παράλληλα αναπτύχθηκε μια αυτοματοποιημένη μέθοδος που βασίζεται στην ισοτοπική αραίωση (255). Η στήλη που χρησιμοποιείται είναι τριχοειδής από συνδεδεμένο πολυστυρένιο με διβινυλοβενζόλιο και χρησιμοποιείται παγίδευση σε κρυογενή φούρνο, που αυξάνει την ευαισθησία, αυξάνοντας τη διαχωριστική ικανότητα, όπως φαίνεται στα χρωματογραφήματα στην Εικόνα 36, και μειώνει το χρόνο ανάλυσης. Ο χρόνος ανάσχεσης

είναι 4.7 λεπτά, το όριο ανίχνευσης 3.2 µg/L και η καμπύλη είναι γραμμική σε συγκεντρώσεις 10- 3085 µg/L.



Εικόνα 36. Χρωματογραφήματα από διαφορετικές θερμοκρασίες στήλης, όπου A) T στήλης= 33 °C και B) T στήλης= -15 °C (255).

8.2.3 Ηλεκτροχημικές μέθοδοι (Βολταμετρία, Ποτενσιομετρία)

Οι ηλεκτροχημικές μέθοδοι προσφέρουν ακρίβεια, ευαισθησία και γρήγορη ανάλυση. Όμως, δεν έχουν καλή εκλεκτικότητα και αξιοπιστία. Επίσης, στις περισσότερες περιπτώσεις, είναι απαραίτητη η προκατεργασία του δείγματος, καθώς τα ηλεκτρόδια δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν απευθείας στα βιολογικά δείγματα.

8.2.3.1 Βολταμετρικός προσδιορισμός κυανιούχων ιόντων με περιστρεφόμενο ηλεκτρόδιο δίσκου αργύρου.

Η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μικρά βιολογικά δείγματα, όπως ολικό αίμα, πλάσμα ή μικροί ιστοί (207). Βασίζεται στον ηλεκτροχημικό διαχωρισμό των κυανιούχων με περιστρεφόμενο ηλεκτρόδιο δίσκου αργύρου στα 90 mV με ηλεκτρόδιο αναφοράς αργύρου/ χλωριούχου αργύρου ή με σταγονικό ηλεκτρόδιο υδραργύρου με διαφορική παλμική πολαρογραφία στα -240 mV. Το όριο ανίχνευσης της μεθόδου είναι 52 µg/L.

Αρχικά, το αίμα επεξεργάζεται με κιτρικό οξύ ή ηπαρίνη, ώστε να αποφευχθεί η δημιουργία πηγμάτων. Οι ιστοί επεξεργάζονται με π-τολουολοσουλφινικό νάτριο, που χρησιμοποιείται ως αντιοξειδωτικό και στη συνέχεια, Triton X-100 για την λύση των κυττάρων. Έτσι, αποτρέπεται η υπεροξείδωση των κυανιούχων λόγω της παρουσίας του Triton X-100, σε περίπτωση που περιέχει ίχνη οργανικών υπεροξειδίων. Η μέθοδος που

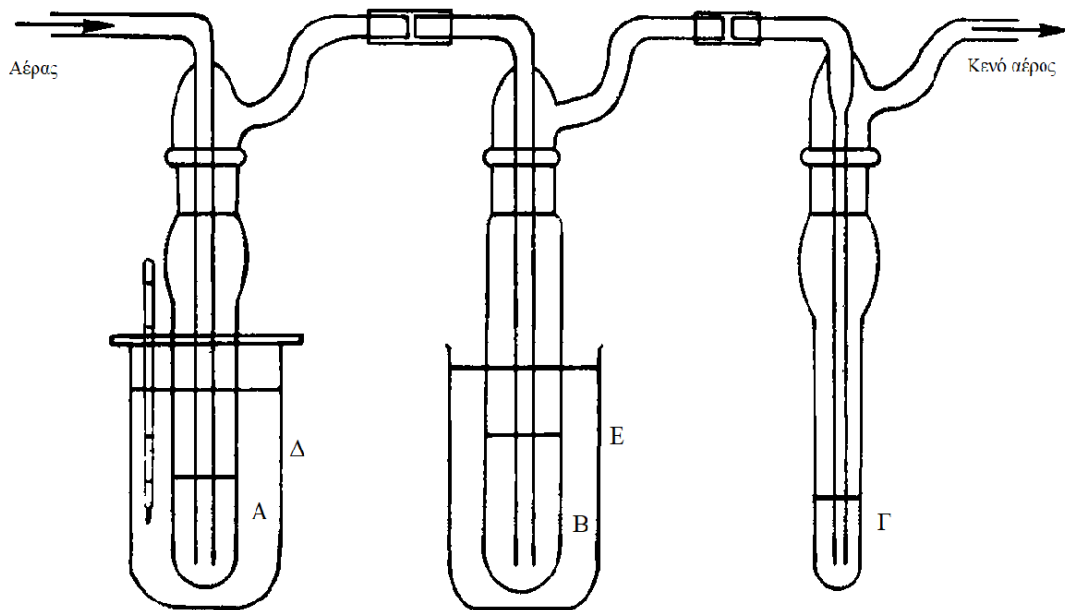
ακολουθείται είναι η γνωστή, με οξίνιση του δείγματος με θειικό οξύ και ρεύμα αζώτου που παρασύρει το παραγόμενο υδροκυάνιο σε διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου. Στη συνέχεια, ακολουθεί βολταμετρικός προσδιορισμός του διαλύματος με χρήση περιστρεφόμενου ηλεκτροδίου δίσκου αργύρου. Επειδή με αυτό το ηλεκτρόδιο μπορούν να δώσουν σήμα και διάφορα οργανικά σουλφίδια, χρησιμοποιείται διαφορική παλμική πολαρογραφία με σταγονικό ηλεκτρόδιο υδραργύρου, όπου μπορεί να γίνει ο διαχωρισμός μεταξύ κυανιούχων και σουλφιδίων. Τα κυανιούχα δίνουν σήμα στα -240 mV ενώ τα σουλφίδια στα -730 mV. Η αποδόμηση διαφόρων πρωτεϊνών, όπως είναι οι πρωτεΐνες του πλάσματος, μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή οργανικών σουλφιδίων. Για την αποφυγή της παραγωγής τους, πρέπει να συντηρούνται τα δείγματα στην κατάψυξη, πριν από την ανάλυσή τους.

Για τη μέτρηση των δειγμάτων χρησιμοποιείται διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου, ως τυφλό. Στη συνέχεια, σαρώνεται διάλυμα κυανιούχου καλίου γνωστής συγκέντρωσης, ως εσωτερικό πρότυπο, μετά το δείγμα και μετά πάλι διάλυμα εσωτερικού προτύπου. Το ρεύμα που παράγεται από το δείγμα συγκρίνεται με αυτό του εσωτερικού προτύπου και έτσι, υπολογίζεται η συγκέντρωση του δείγματος, σε σχέση με αυτή του εσωτερικού προτύπου.

8.2.3.2 Άμεσος ποτενσιομετρικός προσδιορισμός κυανιούχων ιόντων με εκλεκτικό ηλεκτρόδιο κυανιούχων.

Το εκλεκτικό ηλεκτρόδιο κυανιούχων είναι ένα ηλεκτρόδιο μεμβράνης με ιωδιούχο άργυρο και θειούχο άργυρο (256). Παρουσία κυανιούχων ιόντων, τα ιόντα αργύρου διαλύονται από την επιφάνεια της μεμβράνης, με αποτέλεσμα τα Ag^+ που υπάρχουν μέσα στη μεμβράνη να κινηθούν προς την επιφάνειά της. Έτσι, δημιουργείται μια αρνητική διαφορά δυναμικού που είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση των CN^- που υπάρχουν στο διάλυμα. Στη μέθοδο (205, 257) χρησιμοποιείται εκλεκτικό ηλεκτρόδιο κυανιούχων, ηλεκτρόδιο αναφοράς αργύρου/ χλωριούχου αργύρου και ψηφιακό πεχάμετρο. Το δείγμα μπορεί να προέρχεται από ολικό αίμα ή ιστό ήπατος. Τα βήματα επεξεργασίας είναι η απελευθέρωση του υδροκυανίου από το δείγμα με χρήση αέρα, η επεξεργασία του αέρα με οξικό μόλυβδο και η απορρόφηση των κυανιούχων από υδροξείδιο του νατρίου. Η διάταξη που χρησιμοποιείται φαίνεται στην Εικόνα 37, όπου το Α περιέχει το αίμα ή τον ομογενοποιημένο ηπατικό ιστό, με θειικό οξύ και αντιαφριστικό παράγοντα, και βρίσκεται μέσα σε νερό 90 °C (Δ). Το Β περιέχει διάλυμα οξικού μολύβδου, για την απομάκρυνση

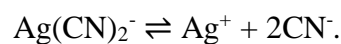
των θειούχων, και βρίσκεται μέσα σε κρύο νερό (E) και το Γ περιέχει υδροξείδιο του νατρίου. Εφαρμόζοντας αέρα στο σύστημα, το υδροκυάνιο που παράγεται από την φιάλη A μεταφέρεται στη φιάλη Γ. Το διάλυμα μεταφέρεται σε φιάλη και ανακινείται με μαγνητικό αναδευτήρα. Στη συνέχεια, τοποθετούνται τα ηλεκτρόδια και μετρείται το ηλεκτρικό δυναμικό σε mV στο ψηφιακό pH/mV. Ο προσδιορισμός της ποσότητας κυανιούχων του δείγματος γίνεται με τη μέθοδο της καμπύλης αναφοράς χρησιμοποιώντας διάφορα διαλύματα κυανιούχων σε εύρος συγκεντρώσεων 26- 13000 µg/L, το όριο ανίχνευσης της μεθόδου είναι 26 µg/L και η ανάκτηση είναι 101- 109%.



Εικόνα 37. Σχηματική απεικόνιση της προκατεργασίας του δείγματος (205).

8.2.3.3 Άμεσος ποτενσιομετρικός προσδιορισμός κυανιούχων ιόντων με εκλεκτικό ηλεκτρόδιο ιόντων αργύρου/ θειούχων ($\text{Ag}^+/\text{S}^{2-}$).

Το εκλεκτικό ηλεκτρόδιο ιόντων αργύρου/ θειούχων μπορεί να μετρήσει πολύ μικρές ποσότητες ιόντων αργύρου (256). Για να μετρήσει κυανιούχα ιόντα, πρέπει να προστεθεί διάλυμα αργυροκυανιούχου καλίου, ως ρυθμιστικό διάλυμα. Το ηλεκτρικό δυναμικό θα είναι ανάλογο με τη συγκέντρωση των ελεύθερων κυανιούχων που παράγονται σύμφωνα με την αντίδραση:



Η προσθήκη κυανιούχων μετατοπίζει την αντίδραση προς τα αριστερά.

Στη μέθοδο χρησιμοποιείται ηλεκτρόδιο αναφοράς διπλής σύνδεσης με νιτρικό κάλιο και υδροξείδιο του καλίου στο εξωτερικό διαμέρισμα και ψηφιακό πεχάμετρο (198). Για τον προσδιορισμό, χρησιμοποιείται ολικό αίμα επεξεργασμένο με ηπαρίνη. Για την απελευθέρωση των κυανιούχων από το αίμα, χρησιμοποιούνται συσκευές μικροδιάχυσης Conway. Στο εσωτερικό διαμέρισμα τοποθετείται διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου και στο εξωτερικό το δείγμα, διάλυμα λαουροθειικού νατρίου και ρυθμιστικό διάλυμα οξικού οξέος pH 5.2. Στη συνέχεια, προστίθεται διάλυμα H₂O₂ στο εσωτερικό διαμέρισμα της συσκευής και μετά διάλυμα θειώδους νατρίου. Τέλος, παραλαμβάνεται το διάλυμα του εσωτερικού διαμερίσματος, προστίθεται διάλυμα αργυροκυανιούχου καλίου και προσδιορίζεται ποτενσιομετρικά η ποσότητα των κυανιούχων με χρήση εκλεκτικού ηλεκτροδίου Ag⁺/S²⁻ και με χρήση καμπύλης αναφοράς βρίσκεται η ποσότητα των κυανιούχων σε σχέση με το παραγόμενο δυναμικό.

Μια άλλη μέθοδος χρησιμοποιεί το εκλεκτικό ηλεκτρόδιο κυανιούχων (195). Η προκατεργασία των δειγμάτων γίνεται, ξανά, με συσκευές μικροδιάχυσης Conway. Στο εσωτερικό διαμέρισμα τοποθετείται διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου και στο εξωτερικό το δείγμα και διάλυμα θειικού οξέος. Αφήνεται για 3 ώρες σε αναδευτήρα σε χαμηλή ταχύτητα, για να γίνει καλύτερη ανάμιξη και διάχυση. Παραλαμβάνεται το διάλυμα του εσωτερικού διαμερίσματος και προστίθεται μια σταγόνα οξικού μολύβδου, ώστε να δεσμεύσει τα θειούχα ιόντα και στη συνέχεια, γίνεται η μέτρηση δυναμικού, όπως και παραπάνω. Η ίδια προκατεργασία μπορεί να γίνει και με τη χρήση εκλεκτικού ηλεκτροδίου ιόντων αργύρου/θειούχων και να χρησιμοποιηθεί ρυθμιστικό διάλυμα KAg(CN)₂, πριν τη μέτρηση του δυναμικού. Και στις δυο περιπτώσεις, το όριο ανίχνευσης είναι 0.1 mg/L.

Πίνακας 1 Αναλυτικές μέθοδοι προσδιορισμού των κυανιούχων

Μέθοδος	Βιολογικό Υλικό	Όρια Ανίχνευσης	Βιβλιογραφική Αναφορά
UV/Vis	Ερυθροκύτταρα, πλάσμα	3.9 mg/L	206
	Ολικό αίμα, μεταθανάτια υλικά	1.04 mg/L	
UV/Vis	Ολικό αίμα, μεταθανάτια υλικά	0.2 mg/L	71, 193
UV/Vis	Ολικό αίμα	150 µg/L	169
UV/Vis	Ολικό αίμα, γαστρικό υγρό, μεταθανάτια υλικά	50 µg/L	192, 238
UV/Vis	Ολικό αίμα	70 µg/L	194
Φθορισμομετρία	Ολικό αίμα, περιεχόμενο στομάχου, ούρα, μεταθανάτια υλικά	1.59 µg/L	240
Φθορισμομετρία	Ολικό αίμα, μεταθανάτια υλικά	2 µg/L	200
HPLC	Ολικό αίμα, πλάσμα, ερυθροκύτταρα	0.52 µg/L	208
		2.6 µg/L	55
HPLC- MS	Ολικό αίμα	5 µg/L	202
LC- MS/ MS	Ολικό αίμα, μεταθανάτια υλικά	10 µg/L	242
IC	Ολικό αίμα, μεταθανάτια υλικά	0.1 mg/L	243
HS- GC- ECD	Ολικό αίμα, μεταθανάτια υλικά	50 µg/L	244
		5 µg/L	245
HS- GC- NPD	Ολικό αίμα, μεταθανάτια υλικά	1 µg/L	247
		11 µg/L	218
HS- GC- NPD/ cryogenic oven	Ολικό αίμα, μεταθανάτια υλικά	2 µg/L	248
HS- SPME- NPD	Ολικό αίμα, μεταθανάτια υλικά	20 µg/L	249
HS- GC- FID	Ολικό αίμα, μεταθανάτια υλικά	20 µg/L	250
GC- MS	Ολικό αίμα, μεταθανάτια υλικά	0.26 mg/L	246
CI- GC- MS	Πλάσμα	26 µg/L	251
GC- MS/ MS	Ολικό αίμα μεταθανάτια υλικά	24 µg/L	252
HS- SPME- MS	Ολικό αίμα, μεταθανάτια υλικά	6 µg/L	253
GC- MS- IS	Ολικό αίμα	7.8 µg/L	254
GC- MS- IS	Ολικό αίμα, μεταθανάτια υλικά	3.2 µg/L	255
Βολταμετρία με δίσκο Ag	Ολικό αίμα, πλάσμα, μικροί ιστοί	52 µg/L	207
Ποτενσιομετρία με εκλεκτικό ηλεκτρόδιο CN ⁻	Ολικό αίμα, ιστοί, μεταθανάτια υλικά	26 µg/L	205
Ποτενσιομετρία με εκλεκτικό ηλεκτρόδιο CN ⁻ και ηλεκτρόδιο Ag ⁺ /S ²⁻	Ολικό αίμα, μεταθανάτια υλικά	0.1 mg/L	195

9 Περιστατικά δηλητηριάσεων με κυανιούχες ενώσεις

9.1 Περιστατικά από τη διεθνή βιβλιογραφία

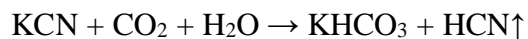
Οι κυανιούχες ενώσεις έχουν χρησιμοποιηθεί ως μέσα αυτοκτονίας, μαζικών δολοφονιών και τρομοκρατίας από τα αρχαία χρόνια.

Ο Νέρων χρησιμοποίησε δαφνοκέρασο (*Prunus laurocerasus*), το οποίο περιέχει κυανιούχα, για να δηλητηριάσει την οικογένειά του και τους αντιπάλους του (6, 115, 166).

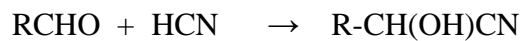
Ο Ναπολέον Γ', κατά τη διάρκεια του Γαλλο- Πρωσικού πολέμου, είχε προτείνει να επικαλύψουν τις ξιφολόγχες των στρατιωτών με κυανιούχα (6, 115, 166). Κατά τη διάρκεια του Α' Παγκοσμίου Πολέμου, οι Γάλλοι σχεδίασαν οβίδες που περιείχαν υδροκυάνιο μεταξύ άλλων δηλητηρίων (6, 115, 166), οι οποίες δεν κρίθηκαν αποτελεσματικές τελικά, λόγω της πτητικότητας των αερίων. Εκτεταμένη χρήση του υδροκυανίου έγινε κατά τη διάρκεια του Β' Παγκοσμίου Πολέμου. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε το Zyklon B (Κυκλώνας Β), το οποίο ήταν εντομοκτόνο που περιείχε υδροκυάνιο προσροφημένο σε γη διατόμων, από τους Ναζί, στους θαλάμους αερίων των στρατοπέδων συγκέντρωσης, με σκοπό την εξόντωση των κρατουμένων (6, 115, 166, 258). Επιπλέον έχει θεωρηθεί ότι χρησιμοποιήθηκε κυανιούχο κάλιο για την εξόντωση κατοίκων δύο πόλεων του Ιράν και μιας του Ιράκ, κατά τη διάρκεια του μεταξύ τους πολέμου (6, 115, 166).

Από το 1924 έως το 1979, το υδροκυάνιο χρησιμοποιήθηκε σε θαλάμους αερίων στις φυλακές της Νεβάδα, για τη θανατική εκτέλεση των κρατουμένων (258). Το 1978, έχει αναφερθεί μια μαζική αυτοκτονία, στο Τζωρτζτάουν της Γουιάνας. Πάνω από 900 Αμερικανοί υπήκοοι εξαναγκάστηκαν σε αυτοκτονία, μετά από τη λήψη ποτού που περιείχε κυανιούχα, έπειτα από εντολή του ηγέτη της θρησκευτικής αίρεσης που ανήκαν (Ναός του Λαού), Τζιμ Τζόουνς (6, 259). Τη δεκαετία του 1980 στο Σικάγο, καταγράφηκαν θάνατοι μετά από λήψη ακεταμινοφαίνης (Tylenol) που είχε επιμολυνθεί με κυανιούχα (6, 260). Αξίζει να σημειωθεί ότι το 1998 ένας τετραπληγικός στην Ισπανία, αυτοκτόνησε λαμβάνοντας κυανιούχο κάλιο, αφού η αίτησή του για ευθανασία είχε απορριφθεί. Έτσι, σημειώθηκε η πρώτη παράνομη ευθανασία στη χώρα (6, 261). Τέλος, πρέπει να αναφερθεί ο Ρώσος μοναχός Γκριγκόρι Ρασπούτιν που το 1916 επέζησε μετά από δηλητηρίαση με κυανιούχο κάλιο. Το δηλητήριο είχε τοποθετηθεί από συνωμότες, με επικεφαλής τον πρίγκηπα Γιουσούποφ, σε διάφορα γλυκά και ποτά που κατανάλωσε ο Ρασπούτιν (262). Δόθηκαν δύο εκδοχές για την επιβίωση του Ρασπούτιν. Σύμφωνα με τη μία εκδοχή, το κυανιούχο κάλιο που χρησιμοποιήθηκε δεν ήταν σωστά φυλαγμένο σε σφραγισμένο φιαλίδιο, οπότε μπορεί να είχε μετατραπεί, εν μέρει ή ολικώς, στο αβλαβές KHCO_3 και τη

διαφυγή του υδροκυανίου στο περιβάλλον, ως αέριο, σύμφωνα με την αντίδραση:



Η δεύτερη εκδοχή υποστηρίζει ότι η κατανάλωση μεγάλης ποσότητας γλυκών μπορεί να είχε ως αποτέλεσμα τη μερική δέσμευση του υδροκυανίου από τα σάκχαρα με τη μορφή κυανυδρινών, σύμφωνα με την αντίδραση:



9.2 Υποθέσεις του Εργαστηρίου Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

Το Εργαστήριο Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας παραλαμβάνει δείγματα για την ανίχνευση δηλητηρίων και τον ποσοτικό προσδιορισμό τους. Τα δείγματα αυτά μπορεί να αποτελούν βιολογικό υλικό του θύματος ή πειστήρια, ιδιαιτέρως σε εγκληματικές ενέργειες ή σε περιπτώσεις αυτοκτονίας. Παρακάτω, αναφέρονται αναλυτικά κάποια από τα περιστατικά των τελευταίων χρόνων.

Υποθέσεις εγκληματικής ενέργειας

Σε ένα περιστατικό θανατηφόρου δηλητηρίασης ατόμου σε σωφρονιστικό ίδρυμα, το Εργαστήριο εξέτασε δείγματα από το αίμα, τα ούρα και το στομαχικό περιεχόμενο του θύματος, καθώς και δείγμα της τροφής (μακαρόνια) που είχε καταναλώσει το θύμα. Έτσι, ανιχνεύθηκε στο στομαχικό περιεχόμενο και στην τροφή μεγάλη ποσότητα κυανιούχου άλατος, που ευθύνεται για το θάνατο του ατόμου.

Το εργαστήριο έχει αναλύσει πειστήριο, που αποτελούταν από άσπρη σκόνη, καλά τυλιγμένη σε διάφανη μεμβράνη. Τη σκόνη αυτή, προσπάθησαν να την εισάγουν παράνομα σε φυλακές. Στη σκόνη ανιχνεύτηκε κυανιούχο άλας.

Επιπλέον, το Εργαστήριο έχει αναλύσει ρόφημα καφέ με έντονη μυρωδιά πικραμύγδαλου, στο οποίο ανιχνεύτηκε κυανιούχο άλας. Το ρόφημα προοριζόταν για τη δηλητηρίαση ενός πολιτικού, ο οποίος είχε υποψιαστεί την αλλοίωση της σύστασης του ροφήματος και έτσι, δεν το κατανάλωσε.

Υποθέσεις αυτοκτονίας

Ένας αργυροχρυσόχοος βρέθηκε νεκρός στο εργαστήριο του από τη γυναίκα του. Τα δείγματα που λήφθηκαν ήταν αίμα, ούρα, τμήματα νεφρού και ήπατος και περιεχομένου στομάχου. Στην ανάλυση του περιεχομένου του στομάχου ανιχνεύτηκαν κυανιούχα άλατα.

Ένας συνταξιούχος αργυροχρυσόχοος αποπειράθηκε να αυτοκτονήσει, καταναλώνοντας μια ποσότητα από το υγρό που χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό και τη στίλβωση των αργυρών αντικειμένων και το οποίο περιέχει κυανιούχο άλας. Το άτομο αυτό οδηγήθηκε στο νοσοκομείο, όπου τελικά κατέληξε. Στο δείγμα του στομαχικού περιεχομένου ανιχνεύθηκαν κυανιούχα άλατα. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι αργυροχρυσόχοοι χρησιμοποιούν συχνά τα κυανιούχα άλατα επομένως, έχουν πρόσβαση σε τέτοια δηλητήρια.

Μια κοπέλα βρέθηκε νεκρή στην οικία της, μετά από κατανάλωση κυανιούχου καλίου. Αναλύθηκε το στομαχικό περιεχόμενο και ανιχνεύθηκε κυανιούχο άλας.

Υποθέσεις τυχαίας δηλητηρίασης

Ένα περιστατικό αφορούσε ένα άτομο που δοκίμασε μια μικρή ποσότητα λευκής σκόνης, χωρίς να γνωρίζει τη σύστασή της, και οδηγήθηκε στο νοσοκομείο. Αναλύθηκε το στομαχικό περιεχόμενο και η σκόνη και ανιχνεύτηκαν κυανιούχα άλατα. Αμέσως, χορηγήθηκαν αντιδότα, νιτρώδες νάτριο και θειοθειικό νάτριο, και το άτομο ανέκαμψε πλήρως, καθώς η ποσότητα που είχε καταποθεί ήταν μικρή.

Ένα ακόμη περιστατικό που έλαβε χώρα σε εργαστήριο αργυροχρυσοχοΐας, αφορά τον ανιψιό του αργυροχρυσόχου, ο οποίος κατανάλωσε άθελα του το υγρό που χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό και τη στίλβωση των αργυρών αντικειμένων που περιέχει κυανιούχο άλας. Το υγρό αυτό ήταν φυλαγμένο μέσα σε ένα μπουκάλι από ούισκι και θεωρώντας ότι είναι ούισκι, κατανάλωσε μεγάλη ποσότητα και κατέληξε λίγα λεπτά αργότερα, λόγω του κυανιούχου αλάτος που περιέχει το υγρό αυτό.

Υποθέσεις δηλητηρίασης ζώων συντροφιάς

Έχουν αναλυθεί δολώματα με τη μορφή κηρώδους ουσίας που περιείχε λευκή σκόνη στο εσωτερικό. Τα δολώματα αυτά βρέθηκαν από πολίτη στην αυλή του σπιτιού του αφού βρήκε δηλητηριασμένα τα δύο του σκυλιά. Η σκόνη που περιείχαν βρέθηκε θετική στην ανίχνευση κυανιούχων αλάτων.

Ένα, ακόμη, περιστατικό δολώματος έχει αναλυθεί στο Εργαστήριο, όπου το δόλωμα αποτελείτο από ψημένο σουτζουκάκι, σε κατεψυγμένη μορφή, που στο εσωτερικό του περιείχε λευκή σκόνη από κυανιούχο άλας.

Τέλος, άλλα δολώματα έχουν βρεθεί σε χωράφι και στάλθηκαν στο Εργαστήριο για ανάλυση. Τα δολώματα αποτελούνταν από κομμάτι κρέατος που στο εσωτερικό περιείχαν μια κηρώδη ουσία που περιείχε λευκή σκόνη. Στη σκόνη ανιχνεύθηκε κυανιούχο άλας. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα δολώματα αυτά έχουν χρησιμοποιηθεί από τη Δασική Υπηρεσία για τον έλεγχο του πληθυσμού των αλεπούδων, αλλά η χρήση τους έχει απαγορευτεί από το 1993, με απόφαση του Συμβουλίου της Επικρατείας.

10 Συζήτηση

Υπάρχει πλούσια βιβλιογραφία για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των κυανιούχων που προσφέρει μια ποικιλία μεθόδων, ώστε το κάθε εργαστήριο να διαλέξει αυτή που ταιριάζει στον εξοπλισμό και στις δυνατότητές του.

Όσον αφορά την ποιοτική ανίχνευση, η παραλλαγή του Lee- Jones test που χρησιμοποιείται από το Εργαστήριο Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών είναι μια πολύ γρήγορη και αξιόπιστη μέθοδος ανίχνευσης. Το μοναδικό μειονέκτημα είναι η χρήση προσφάτως παρασκευασμένων διαλυμάτων τριχλωριούχου και θειικού σιδήρου, με αποτέλεσμα να αυξάνεται λίγο ο χρόνος της μεθόδου.

Τα κριτήρια που λαμβάνονται υπόψιν για την επιλογή της μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού είναι η ευαισθησία, η ειδικότητα, η επαναληψιμότητα, ο χρόνος που απαιτείται για την ανάλυση και το κόστος του εξοπλισμού. Σε αυτή την εργασία αναφέρθηκαν αρκετές μέθοδοι που πληρούν αυτά τα κριτήρια. Παρακάτω θα γίνει αναφορά των πιο σημαντικών.

Οι φασματοσκοπικές μέθοδοι είναι οι πρώτες που αναπτύχθηκαν για τον προσδιορισμό των κυανιούχων αλάτων. Το κόστος του εξοπλισμού είναι χαμηλό, αλλά ο χρόνος ανάλυσης είναι μεγάλος, καθώς χρειάζεται να προηγηθεί μικροδιάχυση των βιολογικών δειγμάτων. Η ευαισθησία τους είναι χαμηλή, αλλά αποδεκτή, όμως, έχουν χαμηλή ειδικότητα, καθώς παρατηρούνται παρεμποδίσεις, κυρίως, από τα θειοκυανιούχα και τα θειοθειικά ιόντα. Οι περισσότερες μέθοδοι βασίζονται στην αντίδραση Köpzig και σε παραλλαγές της (71, 169, 193, 206). Σε αυτές χρησιμοποιείται η πυριδίνη η οποία είναι επιβλαβής σε περίπτωση εισπνοής, κατάποσης ή επαφής με το δέρμα. Έχουν αναπτυχθεί πιο γρήγορες και πιο ευαίσθητες μέθοδοι (192, 194) με μεγαλύτερη ειδικότητα, όμως δεν υπερτερούν των χρωματογραφικών μεθόδων. Οι φθορισμομετρικές μέθοδοι (200, 240) είναι πιο ευαίσθητες από τις χρωματομετρικές, χρειάζονται λιγότερα και πιο σταθερά αντιδραστήρια, όμως ο χρόνος ανάλυσης είναι μεγάλος, είναι πιο ακριβές μέθοδοι από τις χρωματομετρικές και δεν είναι ελεύθερες παρεμποδίσεων.

Οι μέθοδοι υγρής χρωματογραφίας, κυρίως HPLC, παρουσιάζουν καλή διαχωριστική ικανότητα και πολύ καλά όρια ανίχνευσης. Επιπλέον, έχουν καλή ειδικότητα αλλά είναι χρονοβόρες, καθώς δεν μπορούν τα κυανιούχα να ανιχνευθούν απευθείας, χωρίς να προηγηθεί κάποια προκατεργασία. Όταν η HPLC συνδυάζεται με φασματομετρία μαζών (242), τότε αυξάνεται πολύ η ευαισθησία, η ειδικότητα και η εκατοστιαία ανάκτηση. Επιπλέον, μπορεί να ολοκληρωθεί η ανάλυση σε λιγότερο από μία ώρα. Στην ιοντική χρωματογραφία (243), μειώνεται ο χρόνος ανάλυσης, καθώς μπορεί να γίνει άμεση ανάλυση των κυανιούχων, αλλά η επιλογή των ανιχνευτών είναι περιορισμένη και τα όρια ανίχνευσης είναι πιο υψηλά σε σχέση

με την HPLC. Τέλος, πρέπει να αναφερθεί ότι το κόστος των μεθόδων είναι πιο υψηλό σε σχέση με αυτό των φασματοσκοπικών μεθόδων.

Οι μέθοδοι της αέριας χρωματογραφίας, έχουν επικρατήσει κυρίως, λόγω του μικρού χρόνου ανάλυσης και της αυξημένης ευαισθησίας και ειδικότητας, έχουν όμως αρκετά υψηλότερο κόστος από τις προηγούμενες. Δίνεται η δυνατότητα επιλογής πολλών ανιχνευτών, όπως σύλληψης ηλεκτρονίων (ECD) (244, 245), αζώτου φωσφόρου (NPD) (218, 247- 249), και ιοντισμού φλόγας (FID) (250). Επιπλέον, η σύζευξη με φασματομετρία μαζών (246, 221, 253, 254) ή διαδοχική φασματομετρία μαζών (252) αυξάνει πολύ την ευαισθησία και την ειδικότητα. Στις μεθόδους με ανιχνευτή ECD (244, 245), τα κυανιούχα αντιδρούν με τη χλωραμίνη T προς σχηματισμό χλωριούχου κυανίου, αντίδραση που συμβαίνει στη γραμμή της ανάλυσης, αλλά απαιτείται χρόνος για το σχηματισμό του χλωριούχου κυανίου. Οι μέθοδοι GC- NPD (218, 247- 249) είναι πιο γρήγορες από τις μεθόδους GC- ECD, αλλά εμφανίζουν λίγο μεγαλύτερα όρια ανίχνευσης. Η παγίδευση σε κρυογενή φούρνο (248) μειώνει πολύ το χρόνο της ανάλυσης και αποφεύγεται ο αφρισμός του δείγματος που συνήθως παρατηρείται στις μεθόδους της αέριας χρωματογραφίας. Οι μέθοδοι σύζευξης αέριας χρωματογραφίας με φασματομετρία μαζών (251, 253) εμφανίζουν καλύτερη ειδικότητα σε σχέση με τις άλλες GC. Οι πιο γρήγορες μέθοδοι αέριας χρωματογραφίας (254, 255) δεν χρειάζονται κάποια προκατεργασία του δείγματος και χρησιμοποιούν για εσωτερικό πρότυπο το ισοτοπικό διάλυμα $K^{13}C^{15}N$. Επιπλέον μπορεί να χρησιμοποιηθεί κρυογενής παγίδα φούρνου (255) και έτσι να μειωθεί ο χρόνος ανάλυσης στα 15 λεπτά. Τέλος, στην πιο πρόσφατη μέθοδο (252) χρησιμοποιείται διαδοχική φασματομετρία μαζών, γεγονός που αυξάνει κι άλλο την ειδικότητα της μεθόδου.

Τέλος, οι ηλεκτροχημικές μέθοδοι (195, 205, 207, 256) έχουν χαμηλότερη ευαισθησία από όλες τις προηγούμενες και χαμηλότερη ειδικότητα, καθώς παρατηρούνται παρεμποδίσεις από διάφορα σουλφίδια. Προηγείται η μικροδιάχυση, πριν από την ανάλυση, καθώς το αίμα θα μπορούσε να απενεργοποιήσει τα ηλεκτρόδια, γεγονός που καθιστά την ανάλυση χρονοβόρα. Το πλεονέκτημά τους είναι το πολύ χαμηλό κόστος.

Συμπερασματικά, οι καλύτερες μέθοδοι ανάλυσης των κυανιούχων είναι οι χρωματογραφικές, καθώς συνδυάζουν την ευαισθησία, την ειδικότητα και το μικρό χρόνο ανάλυσης. Επιπλέον, δεν χρειάζεται προκατεργασία το δείγμα, γεγονός που μειώνει το σφάλμα της μεθόδου, αφού η εξωτερική παρέμβαση είναι ελάχιστη.

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι ανεξάρτητα από το ποια μέθοδο θα ακολουθήσει ένα εργαστήριο για να αναλύσει ένα βιολογικό δείγμα, κατά την αξιολόγηση ενός αρνητικού αποτελέσματος σε μια τοξικολογική έκθεση, όπου υπάρχει ιστορικό δηλητηρίασης με κυανιούχα, θα πρέπει να ληφθούν υπόψιν ο χρόνος που μεσολάβησε από τη δειγματοληψία μέχρι την ανάλυση και οι συνθήκες αποθήκευσης των δειγμάτων.

11 Βιβλιογραφία

1. Cope RB. Acute cyanide toxicity and its treatment: the body is dead and may be red but does not stay red for long. In: Gupta RC, ed. Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents (Third Edition). Academic Press; 2020. 373-88.
2. Molski M. Theoretical modeling of structure-toxicity relationship of cyanides. *Toxicol Lett.* 2021; 349: 30-39.
3. Kraft A. What a chemistry student should know about the history of Prussian blue. *ChemTexts.* 2018; 4(4): 16.
4. Wisniak J. Pierre Joseph Macquer. *Educación Química.* 2004; 15(3): 300-11.
5. Baskin SI, Brewer TJ. Cyanide poisoning. In: Sidell FR, Takafuji ET, Franz DR, eds. *Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare.* Washington: Office of The Surgeon General at TMM Publications; 1997. 271-286.
6. Bhattacharya R, Flora SJS. Cyanide Toxicity and its Treatment. In: Gupta RC., ed. *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents (Second Edition).* Academic Press; 2015. 301–14.
7. Eisler R. Cyanide Hazards to Fish, Wildlife, and Invertebrates: A Synoptic Review. Laurel, Maryland: U.S. Fish Wildl. Serv, Biol. Rep 85(1.23); 1991.
8. Eisler R. Cyanide. In: *Handbook of Chemical Assessment: Health Hazards to Humans, Plants, and Animals, vol. 2.* Boca Raton, FL: Lewis Publishers; 2000. 903–59.
9. Crosland M. *Gay-Lussac: Scientist and Bourgeois.* Cambridge: Cambridge University Press; 1978. 106–7, 129–30.
10. Egekeze JO, Oehme FW. Cyanides and their toxicity: a literature review. *Vet. Q.* 1980; 2(2): 104-14.
11. Towill LE, Drury JS, Whitfield BL, Lewis EB, Galyan EL, and Hammons AS. *Reviews of the environmental effects of pollutants. V. Cyanide.* United States: 1978.
12. Allison AC. 268. Cyanide-Smelling Deficiency Among Africans. *Man,* 1953; 53: 176–7.
13. Brown K, Robinette R. No Simple Pattern of Inheritance in Ability to smell Solutions of Cyanide. *Nature.* 1967; 215: 406–8.
14. Vogel SN, Sultan TR, Ten Eyck RP. Cyanide poisoning. *Clin Toxicol.* 1981; 18(3): 367–83.
15. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. *Toxicological Profile for Cyanide. ATSDR’s Toxicol Profiles.* 2006.
16. Smith RM, Martell AE. *Inorganic Ligands.* In: *Critical Stability Constants.* Boston,

MA: Springer; 1976. 26-8.

17. Barnes DE, Wright PJ, Graham SM, Jones-Watson EA. Techniques for the determination of cyanide in a process environment: A review. *Geostand Newsl.* 2000; 24(2): 183–95.
18. Sousa AB, Manzano H, Soto-Blanco B, Górnaiak SL. Toxicokinetics of cyanide in rats, pigs and goats after oral dosing with potassium cyanide. *Arch Toxicol.* 2003; 77(6): 330–4.
19. EPA. Toxicological Review of hydrogen cyanide and cyanide salts. US Environ Prot Agency 2010.
20. Mc Murry J. Οργανική Χημεία, Τόμος II. Ηράκλειο: Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης; 1999.
21. Møller BL. Functional diversifications of cyanogenic glucosides. *Curr Opin Plant Biol.* 2010; 13(3): 337–46.
22. Andersen MD, Busk PK, Svendsen BL, Moller I. Cytochromes P-450 from cassava (*Manihot esculenta Crantz*) catalyzing the first steps in the biosynthesis of the cyanogenic glucosides linamarin and lotaustralin: Cloning, functional expression in *Pichia pastoris*, and substrate specificity of the isolated recombinant enzymes. *J Biol Chem.* 2000; 275(3): 1966–75.
23. Padmaja G, Panikkar KR. Intermediary metabolic changes in rabbits administered linamarin or potassium cyanide. *Indian J. Exp. Biol.* 1989; 27(7): 635-639.
24. Burns AE, Bradbury JH, Cavagnaro TR, Gleadow RM. Total cyanide content of cassava food products in Australia. *Journal of Food Composition and Analysis.* 2012; 25(1): 79–82.
25. Ferreira VLP, Yotsuyanagi K, Carvalho CRL. Elimination of cyanogenic compounds from bamboo shoots *Dendrocalamus giganteus* Munro. *Tropical Science.* 1995; 35(4): 342–6.
26. Ngudi DD, Kuo YH, Lambein F. Cassava cyanogens and free amino acids in raw and cooked leaves. *Food Chem Toxicol.* 2003; 41(8): 1193–97.
27. Osuntokun BO, Durowoju JE, McFarlane H, Wilson J. Plasma amino-acids in the Nigerian nutritional ataxic neuropathy. *Br Med J.* 1968; 3(5619): 647–9.
28. Tylleskär T, Howlett WP, Rwiza HT, Aquilonius SM, Stålberg E, Lindén B, Mandahl A, Larsen HC, Brubaker GR, Rosling H. Konzo: a distinct disease entity with selective upper motor neuron damage. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1993; 5(6): 638-43.
29. Jantz ER, Uluwaduge DI. Biochemical aspect of cassava (*Manihot esculenta Crantz*) with special emphasis on cyanogenic glucoside-A review. *J. Natural sciences.* 1997; 25(1):

1–24.

30. Mudder TI, Botz MM, Akçil A. Cyanide and society: A critical review. *Eur J Miner Process Environ Prot.* 2004; 4(1): 62-74.
31. Akyildiz BN, Kurtoğlu S, Kondolot M, Tunç A. Cyanide poisoning caused by ingestion of apricot seeds. *Ann Trop Paediatr.* 2010; 30(1): 39–43.
32. Braico KT, Humbert JR, Terplan KL, Lehotay JM. Laetrile intoxication. Report of a fatal case. *N Engl J Med.* 1979; 300(5): 238-40.
33. Dogan M, Yilmaz C, Kaya A, Caksen H, Taskin G. Cyanide intoxication with encephalitis clinic: A case report. *East J Med.* 2006; 11(1–2): 22–5.
34. Hall AH, Rumack BH. Clinical toxicology of cyanide. *Ann Emerg Med.* 1986; 15(9): 1067–74.
35. Milazzo S, Horneber M. Laetrile treatment for cancer. *Cochrane Database Syst Rev.* 2015; 2015(4).
36. Dorr RT, Paxinos J. The current status of laetrile. *Ann Intern Med.* 1978; 89(3): 389-97.
37. Holstege CP, Forrester JD, Borek HA, Lawrence DT. A case of cyanide poisoning and the use of arterial blood gas analysis to direct therapy. *Hosp Pract.* 2010; 38(4): 69–74.
38. Morse DL, Harrington JM, Heath CW Jr. Laetrile, apricot pits, and cyanide poisoning. *N Engl J Med.* 1976; 295(22): 1264.
39. Bunch AW, Knowles CJ. The effect of growth conditions on cyanogenesis by the snow mould fungus. In: Vennesland B, Conn EE, Knowles CJ, Westley J, Wissing F, editors *Cyanide in Biology.* London UK: Academic Press; 1981. 310-9.
40. Vennesland B, Pistorius EK, Gewitz HS. HCN Production by Microalgae. In: Vennesland B, Conn EE, Knowles CJ, Westley J, Wissing F, editors *Cyanide in Biology.* London UK: Academic Press; 1981. 349-61.
41. Kunz DA, Nagappan O, Silva-Avalos J, DeLong GT. Utilization of cyanide as nitrogenous substrate by *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764: evidence for multiple pathways of metabolic conversion. *Appl Environ Microbiol.* 1992; 58(6): 2022-9.
42. Castric PA. Glycine metabolism by *Pseudomonas aeruginosa*: hydrogen cyanide biosynthesis. *J Bacteriol.* 1977; 130(2): 826-31.
43. Gallagher LA, Manoil C. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 kills *Caenorhabditis elegans* by cyanide poisoning. *J Bacteriol.* 2001; 183(21): 6207-14.
44. Knowles CJ, Bunch AW. Microbial cyanide metabolism. *Adv Microb Physiol.* 1986; 27: 73-111.
45. Rudrappa T, Splaine RE, Biedrzycki ML, Bais HP. Cyanogenic pseudomonads

- influence multitrophic interactions in the rhizosphere. *PLoS One*. 2008; 3(4): e2073.
46. Cleaves HJ. Prebiotic Chemistry: What We Know, What We Don't. *Evol Educ Outreach*. 2012; 5(3): 342–60.
 47. Patel BH, Percivalle C, Ritson DJ, Duffy CD, Sutherland JD. Common origins of RNA, protein and lipid precursors in a cyanosulfidic protometabolism. *Nat Chem*. 2015; 7(4): 301-7.
 48. Burgdorf M, Cruikshank DP, Dalle Ore CM, Sekiguchi T, Nakamura R, Orton G, Quirico E, Schmitt B. A Tentative Identification of HCN Ice on Triton. *Astrophysical Journal Letters*. 2010; 718(2): L53-7.
 49. Thompson WR, Singh SK, Khare BN, Sagan C. Triton: stratospheric molecules and organic sediments. *Geophys Res Lett*. 1989; 16(8): 981-4.
 50. Mégarbane B, Baud F. Cyanide poisoning: Diagnosis and antidote choice in an emergency situation. *Clin. Toxicol*. 2003; 41: 438–9.
 51. Cummings TF. The treatment of cyanide poisoning. *Occup Med (Lond)*. 2004; 54(2): 82–5.
 52. Eckstein M, Maniscalco PM. Focus on smoke inhalation--the most common cause of acute cyanide poisoning. *Prehosp Disaster Med*. 2006; 21(2): s49-55.
 53. Alarie Y. Toxicity of fire smoke. *Crit Rev Toxicol*. 2002; 32(4): 259–89.
 54. Chandra H, Gupta BN, Bhargava SK, Clerk SH, Mahendra PN. Chronic cyanide exposure - A biochemical and industrial hygiene study. *J Anal Toxicol*. 1980; 4(4): 161–5.
 55. Sano A, Takimoto N, Takitani S. High-performance liquid chromatographic determination of cyanide in human red blood cells by pre-column fluorescence derivatization. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 1992; 582(1–2): 131–5.
 56. Chinaka S, Takayama N, Michigami Y, Ueda K. Simultaneous determination of cyanide and thiocyanate in blood by ion chromatography with fluorescence and ultraviolet detection. *J Chromatogr B Biomed Appl*. 1998; 713(2): 353–9.
 57. Tsuge K., Kataoka M., Seto Y., Cyanide and Thiocyanate Levels in Blood and Saliva of Healthy Adult Volunteers, *Journal of Health Science*. 2000; 46(5): 343-50.
 58. Lundquist P, Rosling H, Sorbo B, Tibbling L. Cyanide concentrations in blood after cigarette smoking, as determined by a sensitive fluorimetric method. *Clin Chem*. 1987; 33(7): 1228–30.
 59. Pettigrew AR, Fell GS. Microdiffusion method for estimation of cyanide in whole blood and its application to the study of conversion of cyanide to thiocyanate. *Clin Chem*. 1973; 19(5): 466–71.
 60. Nguyen MV, Thorarinsdottir KA, Thorkelsson G, Gudmundsdottir A, Arason S.

Influences of potassium ferrocyanide on lipid oxidation of salted cod (*Gadus morhua*) during processing, storage and rehydration. Food Chemistry. 2012; 131(4): 1322–31.

61. Κουτσελίνης Α. Υδροκυάνιο και άλατα του κυανίου. Τοξικολογία. Αθήνα: Παρισσιανού; 2004. 175-84.
62. Jackson R, Logue BA. A review of rapid and field-portable analytical techniques for the diagnosis of cyanide exposure. Anal Chim Acta. 2017; 960: 18–39.
63. Gönen N, Kabasakal OS, Ozdil G. Recovery of cyanide in gold leach waste solution by volatilization and absorption. J Hazard Mater. 2004; 113(1-3): 231-6.
64. Xie F, Dreisinger DB. Leaching of silver sulfide with ferrocyanide-cyanide solution. Hydrometallurgy. 2007; 88: 98–108.
65. Ntemiri K, Saravia V, Angelidis C, Baxevani K, Probonas M, Kret E, et al. Animal mortality and illegal poison bait use in Greece. Environ Monit Assess. 2018; 190(8): 488.
66. Dee LE, Horii SS, Thornhill DJ. Conservation and management of ornamental coral reef wildlife: Successes, shortcomings, and future directions. Biological Conservation. 2014; 169: 225–37.
67. Logue BA, Hinkens DM, Baskin SI, Rockwood GA. The analysis of cyanide and its breakdown products in biological samples. Crit Rev Anal Chem. 2010; 40(2): 122–47.
68. Bogusz M, Moroz J, Karski J, Gierz J, Regieli A, Witkowska R, et al. Blood cyanide and thiocyanate concentrations after administration of sodium nitroprusside as hypotensive agent in neurosurgery. Clin Chem. 1979; 25(1): 60–3.
69. FDA. New labeling for sodium nitroprusside emphasized risk of cyanide toxicity. J Am Med Assoc. 1994; 265: 847.
70. Johnson DJ, Williams HL. A Modified Method For Measuring Cyanide In Biological Specimens. Anal Lett. 1985; 18(7) :855–69.
71. Rodkey FL, Collison HA. Determination of Cyanide and Nitroprusside in Blood and Plasma. 1977; 23(11): 1969–75.
72. Schulz V. Clinical Pharmacokinetics of Nitroprusside, Cyanide, Thiosulphate and Thiocyanate. Clin Pharmacokinet. 1984; 9(3): 239–51.
73. Thomas C, Svehla L, Moffett BS. Sodium nitroprusside induced cyanide toxicity in pediatric patients. Expert Opin Drug Saf. 2009; 8(5): 599–602.
74. Vesey CJ, Cole P V., Simpson PJ. Cyanide and thiocyanate concentrations following sodium nitroprusside infusion in man. Br J Anaesth 1976; 48(7): 651–60.
75. Contessa AR, Santi R. Liberation of cyanide from succinonitrile. Biochem Pharmacol. 1973; 22(7): 827-32.
76. Anderson RA, Harland WA. Fire Deaths in the Glasgow Area: III The Role of

Hydrogen Cyanide. *Med Sci Law*. 1982; 22(1): 35–40.

77. Stefanidou M, Athanaselis S, Spiliopoulou C. Health impacts of fire smoke inhalation. *Inhal Toxicol*. 2008; 20(8): 761–6.

78. Symington IS, Anderson RA, Thomson I, Oliver JS, Harland WA, Kerr JW. Cyanide exposure in fires. *Lancet*. 1978; 2(8080): 91-2.

79. Yoshida M, Adachi J, Watabiki T, Tatsuno Y, Ishida N. A study on house fire victims: Age, carboxyhemoglobin, hydrogen cyanide and hemolysis. *Forensic Sci Int*. 1991; 52(1): 13–20.

80. Baud FJ. Cyanide: Critical issues in diagnosis and treatment. *Hum Exp Toxicol*. 2007; 26(3): 191–201.

81. Birngruber CG, Veit F, Lang J, Verhoff MA. Inhaled cyanide poisoning as a vital sign in a room fire victim. *Forensic Sci Int*. 2017; 281: e16–8.

82. Breen PH, Isserles SA, Westley J, Roizen MF, Taitelman UZ. Combined carbon monoxide and cyanide poisoning: A place for treatment? *Anesth Analg*. 1995; 80(4): 671–7.

83. Robert G, Jones N. Cyanide and fire victims: A hazard in focus. *Fire Technol*. 1990; 26(2): 141–8.

84. Silverman SH, Purdue GF, Hunt JL, Bost RO. Cyanide toxicity in burned patients. *J Trauma*. 1988; 28(2): 171-6.

85. Stamy K, Thelander G, Ernstgård L, Ahlner J, Johanson G. Swedish forensic data 1992-2009 suggest hydrogen cyanide as an important cause of death in fire victims. *Inhal Toxicol*. 2012; 24(3) :194–9.

86. Clark CJ, Campbell D, Reid WH. Blood carboxyhaemoglobin and cyanide levels in fire survivors. *Lancet*. 1981; 1(8234): 1332-5.

87. Yeoh MJ, Braitberg G. Carbon monoxide and cyanide poisoning in fire related deaths in Victoria, Australia. *J Toxicol - Clin Toxicol*. 2004; 42(6): 855–63.

88. Lynch RD. On the non-existence of synergism between inhaled hydrogen cyanide and carbon monoxide. *Fire Safety Science*. 1975; 1035: 1-6.

89. Baud FJ, Barriot P, Toffis V, Riou B, Vicaut E, Lecarpentier Y, Bourdon R, Astier A, Bismuth C. Elevated blood cyanide concentrations in victims of smoke inhalation. *N Engl J Med*. 1991; 325(25): 1761-6.

90. Baud FJ, Borron SW, Bavoux E, Astier A, Hoffman JR. Relation between plasma lactate and blood cyanide concentrations in acute cyanide poisoning. *Br Med J*. 1996; 312(7022): 26–7.

91. Baud FJ, Haidar MK, Jouffroy R, Raphalen JH, Lamhaut L, Carli P. Determinants of Lactic Acidosis in Acute Cyanide Poisonings. *Crit Care Med*. 2018; 46(6): e523–9.

92. Baud FJ, Borron SW, Mégarbane B, Trout H, Lapostolle F, Vicaut E, Debray M, Bismuth C. Value of lactic acidosis in the assessment of the severity of acute cyanide poisoning. *Crit Care Med*. 2002; 30(9): 2044-50.
93. Houzé P, Laforge M, Baud FJ. Lactate blood measurement in acute cyanide poisoning: effect of preanalytical delay and hydroxocobalamin uses as treatment. *Ann Biol Clin (Paris)*. 2018 Jan 1;76(1):96-103.
94. O'Brien DJ, Walsh DW, Terriff CM, Hall AH. Empiric management of cyanide toxicity associated with smoke inhalation. *Prehosp Disaster Med*. 2011; 26(5): 374–82.
95. Schulz V. Clinical Pharmacokinetics of Nitroprusside, Cyanide, Thiosulphate and Thiocyanate. *Clin Pharmacokinet*. 1984; 9(3): 239–51.
96. Sylvester DM, Hayton WL, Morgan RL, Way JL. Effects of thiosulfate on cyanide pharmacokinetics in dogs. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1983; 69(2): 265-71.
97. Yamamoto K, Yamamoto Y, Hattori H, Samori T. Effects of routes of administration on the cyanide concentration distribution in the various organs of cyanide-intoxicated rats. *Tohoku J Exp Med*. 1982; 137(1): 73-8.
98. Himwich WA, Saunders JP. Enzymatic conversion of cyanide to thiocyanate. *Am J Physiol*. 1948; 153(2): 348–54.
99. Devlin DJ, Smith RP, Thron CD. Cyanide metabolism in the isolated, perfused, bloodless hindlimbs or liver of the rat. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1989; 98(2): 338–49.
100. Schulz V, Roth B. Detoxification of cyanide in a new-born child. *Klin Wochenschr*. 1982; 60(10): 527-8.
101. Nagahara N, Ito T, Minami M. Mercaptopyruvate sulfurtransferase as a defense against cyanide toxication: molecular properties and mode of detoxification. *Histol Histopathol*. 1999; 14(4): 1277-86.
102. Porter DW, Baskin SI. Specificity studies of 3-Mercaptopyruvate sulfurtransferase. *J Biochem Toxicol*. 1995; 10(6): 287-92.
103. Quiroga P, Olmos V. Review of toxicokinetics and toxicodynamics of cyanides and hydrogen cyanide. *Acta Toxicológica Argentina*. 2009; 17(1): 20-32.
104. Westley J. Thiosulfate: cyanide sulfurtransferase (rhodanese). *Methods Enzymol*. 1981; 77: 285-91.
105. Westley J, Adler H, Westley L, Nishida C. The sulfurtransferases. *Fund Appl Toxicol*. 1983; 3: 377–84.
106. Porter DW, Nealley EW, Baskin SI. In vivo detoxification of cyanide by cystathionase gamma-lyase. *Biochem Pharmacol*. 1996; 52(6): 941-4.
107. Szczepkowski TW, Wood JL. The cystathionase-rhodanese system. *Biochim*

Biophys Acta. 1967; 139(2): 469-78.

108. Wood JL. Nutritional and protective properties of thiocysteine. Proc Soc Exp Biol Med. 1980; 165(3): 469-72.

109. Catsimpoolas N, Wood JL. The reaction of cyanide with bovine serum albumin. J Biol Chem. 1964; 239(12): 4131-7.

110. Wood JL, Cooley SL. Detoxication of cyanide by cystine. J Biol Chem. 1956; 218(1): 449-57.

111. Bhandari RK, Oda RP, Petrikovics I, Thompson DE, Brenner M, Mahon SB, et al. Cyanide toxicokinetics: The behavior of cyanide, thiocyanate and 2-amino-2-thiazoline-4-carboxylic acid in multiple animal models. J Anal Toxicol. 2014; 38(4): 218-25.

112. Boxer GE, Rickards JC. Studies on the metabolism of the carbon of cyanide and thiocyanate. Arch Biochem Biophys. 1952; 39(1): 7-26.

113. Houeto P, Levillain P, Hoffman JR, Baud FJ, Imbert M. Relation of blood cyanide to plasma cyanocobalamin concentration after a fixed dose of hydroxocobalamin in cyanide poisoning. Lancet. 1995; 346(8975): 605-8.

114. Johnson JD, Isom GE. The oxidative disposition of potassium cyanide in mice. Toxicology. 1985; 37(3-4): 215-24.

115. Baskin SI, Kurche JS, Maliner BI, Cyanide. In: Roy MJ, editor. Physician's guide to terrorist attack. New Jersey: Humana Press Inc.; 2004. 263-277.

116. Παταργιάς ΘΑ, Κομητοπούλου Κ, Κουγιανού Σ. Οξειδωτική Φωσφορλίωση. Εισαγωγή στη βιολογία. Αθήνα: Πανεπιστήμιο Αθηνών; 1996. 70-8.

117. Way JL. Cyanide intoxication and its mechanism of antagonism. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 1984; 24: 451-81.

118. Parul D, Palmer G, Fabian M. Ligand trapping by cytochrome c oxidase: implications for gating at the catalytic center. J Biol Chem. 2010; 285(7): 4536-43.

119. Vander A, Sherman J, Luciano D, Τσακόπουλος Μ. Φυσιολογία του ανθρώπου. (Ογδοη έκδοση), επιμέλεια ελλ. έκδοσης: Γελαδάς Ν. Τσακόπουλος Μ. Αθήνα: Παρισσιανού; 2001. 107.

120. Salkowski AA, Penney DG. Cyanide poisoning in animals and humans: a review. Vet Hum Toxicol. 1994; 36(5): 455-66.

121. Ver Ploeg DA, Cordes EH, Gurd FR. Comparison of myoglobins from harbor seal, porpoise, and sperm whale. VII. Mechanism and catalysis for addition of cyanide to myoglobins. J Biol Chem. 1970; 246(9): 2725-33.

122. Erman JE. Kinetic and equilibrium studies of cyanide binding by cytochrome c peroxidase. Biochemistry. 1974; 13(1): 39-44.

123. Ellis WD, Dunford HB. The kinetics of cyanide and fluoride binding by ferric horseradish peroxidase. *Biochemistry*. 1968; 7(6): 2054-62.
124. Wolfe AD, Beers RF, Sizer IW. Cyanide inhibition of the catalase system. *Arch Biochem Biophys*. 1957; 72(2): 353-7.
125. Zanetti G, Galante YM, Arosio P, Cerletti P. Interactions of succinate dehydrogenase with cyanide. *Biochim Biophys Acta*. 1973; 321(1): 41-53.
126. Lorimer GH, Gewitz HS, Völker W, Solomonson LP. The presence of bound cyanide in the naturally inactivated form of nitrate reductase of *Chlorella vulgaris*. *J Biol Chem*. 1974; 249(19): 6074-9.
127. Coughlan MP, Johnson JL, Rajagopalan K V. Mechanisms of inactivation of molybdoenzymes by cyanide. *J Biol Chem*. 1980; 255(7): 2694-9.
128. Astuti RI, Nasuno R, Takagi H. Nitric Oxide Signalling in Yeast. *Adv Microb Physiol*. 2018; 72: 29-63.
129. Feeney J, Burgen SV, Grell E. Cyanide binding to carbonic anhydrase. A ¹³C-nuclear-magnetic-resonance study. *Eur J Biochem*. 1973; 34(1): 107-11.
130. Borders CL, Fridovich I. A comparison of the effects of cyanide, hydrogen peroxide, and phenylglyoxal on eucaryotic and procaryotic Cu,Zn superoxide dismutases. *Arch Biochem Biophys*. 1985; 241(2): 472-6.
131. Hansen BA, Dekker EE. Inactivation of bovine liver 2-keto-4-hydroxyglutarate aldolase by cyanide in the presence of aldehydes. *Biochemistry*. 1976; 15(13): 2912-7.
132. Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnefsky EJ. Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J Biol Chem*. 2003; 278(38): 36027-31.
133. Ardelt BK, Borowitz JL, Isom GE. Brain lipid peroxidation and antioxidant protectant mechanisms following acute cyanide intoxication. *Toxicology*. 1989; 56(2): 147-54.
134. Kanthasamy AG, Ardelt B, Malave A, Mills EM, Powley TL, Borowitz JL, Isom GE. Reactive oxygen species generated by cyanide mediate toxicity in rat pheochromocytoma cells. *Toxicol Lett*. 1997;93(1):47-54.
135. Prabhakaran K, Li L, Borowitz JL, Isom GE. Caspase inhibition switches the mode of cell death induced by cyanide by enhancing reactive oxygen species generation and PARP-1 activation. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2004; 195(2): 194-202.
136. Sun P, Rane SG, Gunasekar PG, Borowitz JL, Isom GE. Cyanide interaction with redox modulatory sites enhances NMDA receptor responses. *J Biochem Mol Toxicol*. 1999; 13(5): 253-9.

137. Kiang JG, Smallridge RC. Sodium cyanide increases cytosolic free calcium: evidence for activation of the reversed mode of the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger and Ca^{2+} mobilization from inositol trisphosphate-insensitive pools. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1994; 127(2): 173-81.
138. Patel MN, Yim GK, Isom GE. Blockade of N-methyl-D-aspartate receptors prevents cyanide-induced neuronal injury in primary hippocampal cultures. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1992; 115(1): 124-9.
139. Patel MN, Yim GK, Isom GE. N-methyl-D-aspartate receptors mediate cyanide-induced cytotoxicity in hippocampal cultures. *Neurotoxicology.* 1993; 14(1): 35-40.
140. Kanthasamy AG, Maduh EU, Peoples RW, Borowitz JL, Isom GE. Calcium mediation of cyanide-induced catecholamine release: implications for neurotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1991; 110(2): 275-82.
141. O'Flaherty EJ, Thomas WC. The cardiotoxicity of hydrogen cyanide as a component of polymer pyrolysis smokes. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1982; 63(3): 373-81.
142. Everett JA, Kaide CG, Hays H. Cyanide Poisoning-“*I’m Mr. Blue...*”. In: Kaide CG, Jeanmonod R, San Miguel CE, Ko E, eds. *Case studies in emergency medicine.* Cham, CH: Springer Nature Switzerland 2010. 101– 117.
143. Beasley DM, Glass WI. Cyanide poisoning: pathophysiology and treatment recommendations. *Occup Med (Lond).* 1998; 48(7): 427-31
144. Haxhiu MA, Erokwu B, Van Lunteren E, Cherniack NS, Strohl KP. Central and spinal effects of sodium cyanide on respiratory activity. *J Appl Physiol.* 1993; 74(2): 574-9.
145. Guidotti T. Acute cyanide poisoning in prehospital care: New challenges, new tools for intervention. *Prehosp Disaster Med.* 2006; 21(2): s40-8.
146. Hendry-Hofer TB, Ng PC, Witeof AE, Mahon SB, Brenner M, Boss GR, et al. A Review on Ingested Cyanide: Risks, Clinical Presentation, Diagnostics, and Treatment Challenges. *J Med Toxicol.* 2019; 15(2): 128–33.
147. Baskin SI, Rockwood GA. Neurotoxicological and Behavioral Effects of Cyanide and Its Potential Therapies. *Mil Psychol.* 2002; 14(2): 159–77.
148. Suman SG, Gretarsdottir JM. Chemical and Clinical Aspects of Metal-Containing Antidotes for Poisoning by Cyanide. *Met Ions Life Sci.* 2019; 19: 359–391.
149. Persson SÅ, Cassel G, Sellström Å. Acute cyanide intoxication and central transmitter systems. *Fundam Appl Toxicol.* 1985; 5(6 Pt 2): S150-9.
150. Raza SK, Jaiswal DK. Mechanism of Cyanide Toxicity and Efficacy of its Antidotes. *Def Sci J.* 1994; 44(4): 331–40.
151. Parker-Cote JL, Rizer J, Vakkalanka JP, Rege SV, Holstege CP. Challenges in the diagnosis of acute cyanide poisoning. *Clin Toxicol (Phila).* 2018; 56(7): 609-617.

152. Carella F, Grassi MP, Savoiaro M, Contri P, Rapuzzi B, Mangoni A. Dystonic-Parkinsonian syndrome after cyanide poisoning: clinical and MRI findings. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1988; 51(10): 1345-8.
153. Mohan A, Lee T, Sachdev P. Surviving acute cyanide poisoning: A longitudinal neuropsychological investigation with interval MRI. *BMJ Case Rep*. 2014; 1–4. doi:10.1136/bcr-2013-203025.
154. Van Heijst ANP, Maes RAA, Mtanda AT, Chuwa LMM, Rwiza HT, Moshi NH. Chronic cyanide poisoning in relation to blindness and tropical neuropathy. *Clin Toxicol*. 1994;3 2(5): 549–56.
155. Persson SÅ, Cassel G, Sellström Å. Acute cyanide intoxication and central transmitter systems. *Fundam Appl Toxicol*. 1985; 5(6 Pt 2): S150-9.
156. Borron SW, Baud FJ. Antidotes for acute cyanide poisoning. *Curr Pharm Biotechnol*. 2012; 13(10): 1940-8.
157. Petrikovics I, Budai M, Kovacs K, Thompson DE. Past, present and future of cyanide antagonism research: From the early remedies to the current therapies. *World J Methodol*. 2015; 5(2): 88.
158. Gabb G, Robin ED. Hyperbaric oxygen. A therapy in search of diseases. *Chest*. 1987; 92(6): 1074-82.
159. Goodhart GL. Patient treated with antidote kit and hyperbaric oxygen survives cyanide poisoning. *South Med J*. 1994; 87(8): 814-6.
160. Hart GB, Strauss MB, Lennon PA, Whitcraft DD 3rd. Treatment of smoke inhalation by hyperbaric oxygen. *J Emerg Med*. 1985; 3(3): 211-5.
161. Kulig K. Cyanide antidotes and fire toxicology. *Fire Technol*. 1992; 28(4) :369–72.
162. Lawson-Smith P, Jansen EC, Hilsted L, Hyldegaard O. Effect of hyperbaric oxygen therapy on whole blood cyanide concentrations in carbon monoxide intoxicated patients from fire accidents. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med*. 2010; 18: 32.
163. Lawson-Smith P, Jansen EC, Hyldegaard O. Cyanide intoxication as part of smoke inhalation--a review on diagnosis and treatment from the emergency perspective. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med*. 2011; 19: 14.
164. Bhattacharya R. Antidotes to cyanide poisoning: Present status. *Indian J Pharmacol*. 2000; 32(2): 94–101.
165. Lindsay AE, Greenbaum AR, O'Hare D. Analytical techniques for cyanide in blood and published blood cyanide concentrations from healthy subjects and fire victims. *Analytica Chimica Acta*. Elsevier; 2004; 511(2): 185–95.
166. . Baskin SI, Horowitz AM, Nealley EW. The Antidotal Action of Sodium Nitrite and

- Sodium Thiosulfate Against Cyanide Poisoning. *J Clin Pharmacol.* 1992; 32(4): 368–75.
167. Bhadra S, Zhang Z, Zhou W, Ochieng F, Rockwood GA, Lippner D, et al. Analysis of potential cyanide antidote, dimethyl trisulfide, in whole blood by dynamic headspace gas chromatography–mass spectroscopy. *J Chromatogr A* 2019; 1591: 71–8.
168. Leavesley HB, Li L, Mukhopadhyay S, Borowitz JL, Isom GE. Nitrite-mediated antagonism of cyanide inhibition of cytochrome c oxidase in dopamine neurons. *Toxicol Sci.* 2010; 115(2): 569-76.
169. Tung A, Lynch J, McDade WA, Moss J. A new biological assay for measuring cyanide in blood. *Anesth Analg.* 1997; 85(5): 1045–51.
170. Bhattacharya R. Therapeutic efficacy of sodium nitrite and 4-dimethylaminophenol or hydroxylamine co-administration against cyanide poisoning in rats. *Hum Exp Toxicol.* 1995; 14(1): 29-33.
171. Mégarbane B, Delahaye A, Goldgran-Tolédano D, Baud FJ. Antidotal treatment of cyanide poisoning. *J Chin Med Assoc.* 2003; 66(4): 193-203.
172. Sylvester DM, Hayton WL, Morgan RL, Way JL. Effects of thiosulfate on cyanide pharmacokinetics in dogs. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1983; 69(2): 265-71.
173. Pahl MV, Vaziri ND. In-vivo and in-vitro hemodialysis studies of thiocyanate. *J Toxicol Clin Toxicol.* 1982; 19(9): 965-74.
174. Marrs TC, Thompson JP. The efficacy and adverse effects of dicobalt edetate in cyanide poisoning. *Clin Toxicol.* 2016; 54(8): 609–14.
175. Dodds C, McKnight C. Cyanide toxicity after immersion and the hazards of dicobalt edetate. *Br Med J (Clin Res Ed).* 1985; 291(6498): 785-6.
176. Zelder F. Recent trends in the development of vitamin B12 derivatives for medicinal applications. *Chem Commun.* 2015; 51(74): 14004–17.
177. Brunel C, Widmer C, Augsburger M, Dussy F, Fracasso T. Antidote treatment for cyanide poisoning with hydroxocobalamin causes bright pink discolouration and chemical-analytical interferences. *Forensic Sci Int.* 2012; 223(1–3): 10–2
178. Bebartha VS, Tanen DA, Boudreau S, Castaneda M, Zarzabal LA, Vargas T, et al. Intravenous cobinamide versus Hydroxocobalamin for acute treatment of severe cyanide poisoning in a swine (*Sus scrofa*) model. *Ann Emerg Med.* 2014; 64(6): 612–9.
179. Forsyth JC, Mueller PD, Becker CE, Osterloh J, Benowitz NL, Rumack BH, et al. Hydroxocobalamin as a cyanide antidote: Safety, efficacy and pharmacokinetics in heavily smoking normal volunteers. *Clin Toxicol.* 1993; 31(2): 277–94.
180. Chan A, Jiang J, Fridman A, Guo LT, Shelton GD, Liu MT, et al. Nitrocobinamide, a new cyanide antidote that can be administered by intramuscular injection. *J Med Chem.*

2015; 58(4): 1750–9.

181. Patterson SE, Moeller B, Nagasawa HT, Vince R, Crankshaw DL, Briggs J, et al. Development of sulfanegen for mass cyanide casualties. *Ann N Y Acad Sci.* 2016; 1374(1): 202–9.

182. Nagahara N, Ito T, Kitamura H, Nishino T. Tissue and subcellular distribution of mercaptopyruvate sulfurtransferase in the rat: confocal laser fluorescence and immunoelectron microscopic studies combined with biochemical analysis. *Histochem Cell Biol.* 1998; 110(3): 243-50.

183. Chan A, Crankshaw DL, Monteil A, Patterson SE, Nagasawa HT, Briggs JE, et al. The combination of cobinamide and sulfanegen is highly effective in mouse models of cyanide poisoning. *Clin Toxicol.* 2011; 49(5): 366–73.

184. DeLeon SM, Downey JD, Hildenberger DM, Rhoomes MO, Booker L, Rockwood GA, et al. DMTS is an effective treatment in both inhalation and injection models for cyanide poisoning using unanesthetized mice. *Clin Toxicol* 2018; 56(5): 332–41.

185. Kiss L, Holmes S, Chou CE, Dong X, Ross J, Brown D, et al. Method development for detecting the novel cyanide antidote dimethyl trisulfide from blood and brain, and its interaction with blood. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci.* 2017; 1044–1045: 149–57.

186. Rockwood GA, Thompson DE, Petrikovics I. Dimethyl trisulfide: A novel cyanide countermeasure. *Toxicol Ind Health.* 2016; 32(12):2 009–16.

187. Niknahad H, O'Brien PJ. Antidotal effect of dihydroxyacetone against cyanide toxicity in vivo. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1996; 138(1): 186–91.

188. Bhattacharya R, Vijayaraghavan R. Promising role of alpha-ketoglutarate in protecting against the lethal effects of cyanide. *Hum Exp Toxicol.* 2002; 21(6): 297-303.

189. Moore SJ, Norris JC, Ho IK, Hume AS. The efficacy of α -ketoglutaric acid in the antagonism of cyanide intoxication. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1986; 82(1): 40–4.

190. Ballantyne B. Blood, Brain and Cerebrospinal Fluid Cyanide Concentrations in Experimental Acute Cyanide Poisoning. *J Forensic Sci Soc.* 1975; 15(1): 51–6.

191. Logue BA, Hinkens DM. The Analysis of Cyanide and its Metabolites in Biological Samples. Chemistry and Biochemistry Faculty Publications.2008; 39.

192. Dunn WA, Siek TJ. A rapid, sensitive, and specific screening technique for the determination of cyanide. *J Anal Toxicol.* 1990; 14(4): 256

193. Epstein J. Estimation of Microquantities of Cyanide. *Anal Chem.* 1947; 19(4): 272–4.

194. Laforge M, Buneaux F, Houeto P, Bourgeois F, Bourdon R, Levillain P. A rapid

spectrophotometric blood cyanide determination applicable to emergency toxicology. *J Anal Toxicol.* 1994; 18(3): 173–5.

195. McAnalley BH, Lowry WT, Oliver RD, Garriott JC. Determination of inorganic sulfide and cyanide in blood using specific ion electrodes: Application to the investigation of hydrogen sulfide and cyanide poisoning. *J Anal Toxicol.* 1979; 3(3): 111–4.

196. Morikawa Y, Nishiwaki K, Suzuki S, Yasaka N, Okada Y, Nakanishi I. A new chemosensor for cyanide in blood based on the Pd complex of 2-(5-bromo-2-pyridylazo)-5-[N-n-propyl-N-(3-sulfopropyl)amino]phenol. *Analyst.* 2020; 145(23): 7759–64.

197. Sano A, Takezawa M, Takitani S. Spectrofluorimetric determination of cyanide in blood and urine with naphthalene-2,3-dialdehyde and taurine. *Analytica Chimica Acta.* 1989; 225: 351-8.

198. Sylvester DM, Holmes RK, Sander C, Way JL. Interference of thiosulfate with potentiometric analysis of cyanide in blood and its elimination. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1982; 65(1): 116–21.

199. Vesey CJ, McAllister H, Langford RM. A simple, rapid and sensitive semimicro method for the measurement of cyanide in blood. *Ann Clin Biochem.* 1999; 36(6): 755–8.

200. Felscher D, Wulfmeyer M. A new specific method to detect cyanide in body fluids, especially whole blood, by fluorimetry. *J Anal Toxicol.* 1998; 22(5): 363–6.

201. Hughes C, Lehner F, Dirikolu L, Harkins D, Boyles J, McDowell K, et al. A simple and highly sensitive spectrophotometric method for the determination of cyanide in equine blood. *Toxicol Mech Methods.* 2003; 13(2): 129–38.

202. Tracqui A, Raul JS, Géraut A, Berthelon L, Ludes B. Determination of blood cyanide by HPLC-MS. *J Anal Toxicol.* 2002; 26(3): 144–8.

203. Aldridge WN. A new method for the estimation of micro quantities of cyanide and thiocyanate. *Analyst.* 1944; 69(822): 262–5.

204. Cruz-Landeira A, López-Rivadulla M, Concheico-Carro L, Fernández-Gómez P, Tabernero-Duque MJ. A new spectrophotometric method for the toxicological diagnosis of cyanide poisoning. *J Anal Toxicol.* 2000; 24(4): 266–70.

205. Egekeze JO, Oehme FW. Direct potentiometric method for the determination of cyanide in biological materials. *J Anal Toxicol.* 1979; 3(3): 119–24.

206. Lundquist P, Rosling H, Sorbo B. Determination of cyanide in whole blood, erythrocytes, and plasma. *Clin Chem.* 1985; 31(4): 591–5.

207. Westley AM, Westley J. Voltammetric determination of cyanide and thiocyanate in small biological samples. *Anal Biochem.* 1989; 181(1): 190–4.

208. Toida T, Togawa T, Tanabe S, Imanari T. Determination of cyanide and thiocyanate

- in blood plasma and red cells by high-performance liquid chromatography with fluorometric detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1984; 308(C): 133–41.
209. Vesey CJ, Wilson J. Red cell cyanide. *J Pharm Pharmacol.* 1978; 30(1): 20-6.
210. Ballantyne B. In vitro production of cyanide in normal human blood and the influence of thiocyanate and storage temperature. *Clin Toxicol.* 1977; 11(2): 173–93.
211. Calafat AM, Stanfill SB. Rapid quantitation of cyanide in whole blood by automated headspace gas chromatography. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci.* 2002; 772(1): 131–7.
212. Seto Y. Oxidative conversion of thiocyanate to cyanide by oxyhemoglobin during acid denaturation. *Arch Biochem Biophys.* 1995; 321(1): 245-54.
213. Ballantyne B. Changes in Blood Cyanide as a Function of Storage Time and Temperature. *J Forensic Sci Soc.* 1976; 16(4): 305–10.
214. Rodkey FL, Robertson RF. Analytical precautions in measurement of blood cyanide. *Clin Chem.* 1978; 24(12): 2184–5.
215. Lundquist P, Sörbo B. Rapid determination of toxic cyanide concentrations in blood. *Clin Chem.* 1989; 35(4): 617-9.
216. Seto Y. False cyanide detection. *Anal Chem.* 2002; 74(5): 134A-141A.
217. Sano A, Takezawa M, Takitani S. High performance liquid chromatography determination of cyanide in urine by pre-column fluorescence derivatization. *Biomed Chromatogr.* 1989; 3(5): 209–12.
218. Gambaro V, Arnoldi S, Casagni E, Dell’Acqua L, Pecoraro C, Frolidi R. Blood cyanide determination in two cases of fatal intoxication: Comparison between headspace gas chromatography and a spectrophotometric method. *J Forensic Sci.* 2007; 52(6): 1401–4.
219. Chikasue F, Yashiki M, Kojima T, Miyazaki T, Okamoto I, Ohtani M, Kodama K. Cyanide distribution in five fatal cyanide poisonings and the effect of storage conditions on cyanide concentration in tissue. *Forensic Sci Int.* 1988; 38(3-4): 173-83.
220. Allibe N, Eysseric-Guerin H, Grenier F, Paysant F, Faure A, Barret A, et al. Concentration des cyanures dans les prélèvements sanguins post-mortem : difficultés d’interprétation. *Toxicol Anal Clin.* 2016; 28(2): 164–9.
221. Bogusz M. Disappearance of cyanide in blood and tissues after fatal poisoning. *Forensic Sci.* 1976; 7(2): 173.
222. Seidl S, Schwarze B, Betz P. Lethal cyanide inhalation with post-mortem transcutaneous cyanide diffusion. *Leg Med (Tokyo).* 2003; 5(4): 238-41.
223. Tominaga M, Ishikawa T, Michiue T, Oritani S, Koide I, Kuramoto Y, et al. Postmortem analyses of gaseous and volatile substances in pericardial fluid and bone

- marrow aspirate. *J Anal Toxicol*. 2013; 37(3): 147–51.
224. Kala M, Chudzikiewicz E. The influence of post-mortem changes in biological material on interpretation of toxicological analysis results. *Z Zagadnien Nauk Sadowych*. 2003; 54: 32-59.
225. Lokan RJ, James RA, Dymock RB. Apparent post-mortem production of high levels of cyanide in blood. *J Forensic Sci Soc*. 1987; 27(4): 253-9.
226. Moriya F, Hashimoto Y. Chemical factors affecting the interpretation of blood cyanide concentrations in fire victims. *Leg Med (Tokyo)*. 2003;5 Suppl 1: S113-7.
227. Curry AS, Price DE, Rutter ER. The production of cyanide in post mortem material. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)*. 1967; 25(3): 339-44.
228. McAllister JL, Roby RJ, Levine B, Purser D. The effect of sodium fluoride on the stability of cyanide in postmortem blood samples from fire victims. *Forensic Sci Int*. 2011; 209(1–3): 29–33.
229. Skopp G. Preanalytic aspects in postmortem toxicology. *Forensic Sci Int*. 2004; 142(2–3): 75–100.
230. Lee-Jones M, Bennett MA, Sherwell JM. Cyanide self-poisoning. *Br Med J*. 1970; 4(5738): 780-1.
231. Männel-Croisé C, Zelder F. Rapid visual detection of blood cyanide. *Anal Methods*. 2012; 4(9): 2632–4.
232. Chaudhary MT, Sarwar M, Tahir AM, Tahir MA, Mustafa G, Wattoo SA, et al. Rapid and Economical Colorimetric Detection of Cyanide in Blood Using Vitamin B12. *Aust J Forensic Sci* 2016; 48(1): 42–9.
233. Bark LS, Higson HG. Investigation of reagents for the colorimetric determination of small amounts of cyanide-I. *Talanta*. 1964; 11(3): 471–9.
234. Pettigrew AR, Fell GS. Simplified colorimetric determination of thiocyanate in biological fluids, and its application to investigation of the toxic amblyopias. *Clin Chem*. 1972; 18(9): 996-1000.
235. Upadhyay S, Gupta VK. Spectrophotometric method for the determination of cyanide and its application to biological fluids. *Analyst*. 1984; 109(12): 1619–20.
236. Agrawal O, Sunita G, Gupta VK. A sensitive colorimetric reagent for the determination of cyanide and hydrogen cyanide in various environmental samples. *J Chinese Chem Soc*. 2005; 52(1): 51–7.
237. Tomoda A, Hashimoto K. The determination of cyanide in water and biological tissues by methemoglobin. *J Hazard Mater*. 1991; 28(3): 241–9.
238. Guilbault GG, Kramer DN. Ultra Sensitive, Specific Method for Cyanide Using p-

- Nitrobenzaldehyde and o-Dinitrobenzene. *Anal Chem.* 1966; 38(7): 834–6.
239. Toida T, Tanabe S, Imanari T. Fluorometric Determination of Cyanide and Thiocyanate by Konig Reaction. *Chem Pharm Bull.* 1981; 29(12): 3763-4.
240. Suzuki O, Hattori H, Oya M, Katsumata Y. Direct fluorometric determination of cyanide in human materials. *Forensic Sci Int.* 1982;19(2):189-95.
241. Sano A, Takezawa M, Takitani S. Fluorometric determination of cyanide with 2,3-naphthalenedialdehyde and taurine. *Talanta.* 1987; 34(8): 743-4.
242. Lacroix C, Saussereau E, Boulanger F, Goullé JP. Online liquid chromatography-tandem mass spectrometry cyanide determination in blood. *J Anal Toxicol.* 2011; 35(3): 143–7.
243. Sim J, Kim M, Kim S, Yang W. A novel method for cyanide quantification in human whole blood using ion chromatography with amperometric detection and its application to cyanide intoxication cases. *J Forensic Sci.* 2022; 67(1): 353-7.
244. Maseda C, Matsubara K, Shiono H. Improved gas chromatography with electron-capture detection using a reaction pre-column for the determination of blood cyanide: a higher content in the left ventricle of fire victims. *J Chromatogr.* 1989; 490(2): 319-27.
245. Felby S. Determination of cyanide in blood by reaction head-space gas chromatography. *Forensic Sci Med Pathol.* 2009; 5(1): 39–43.
246. Kage S, Nagata T, Kudo K. Determination of cyanide and thiocyanate in blood by gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Appl.* 1996; 675(1): 27–32.
247. Seto Y, Tsunoda N, Ohta H, Shinohara T. Determination of blood cyanide by headspace gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection and using a megabore capillary column. *Anal Chim Acta.* 1993; 276(2): 247–59.
248. Ishii A, Seno H, Watanabe-Suzuki K, Suzuki O, Kumazawa T. Determination of cyanide in whole blood by capillary gas chromatography with cryogenic oven trapping. *Anal Chem.* 1998; 70(22): 4873–6.
249. Takekawa K, Oya M, Kido A, Suzuki O. Analysis of cyanide in blood by headspace solid-phase microextraction (SPME) and capillary gas chromatography. *Chromatographia.* 1998; 47(3–4): 209–14.
250. Sadeg N, Belhadj-Tahar H. Rapid and sensitive headspace gas chromatographic method for cyanide determination in whole blood. *Toxicol Environ Chem.* 2009; 91(3): 419–24.
251. Bhandari RK, Oda RP, Youso SL, Petrikovics I, Bebarta VS, Rockwood GA, et al. Simultaneous determination of cyanide and thiocyanate in plasma by chemical ionization

gas chromatography mass-spectrometry (CI-GC-MS). *Anal Bioanal Chem.* 2012; 404(8): 2287–94.

252. Osak M, Buszewicz G, Baj J, Teresiński G. Determination of cyanide in blood for forensic toxicology purposes—a novel NCI GC-MS/MS technique. *Molecules.* 2021; 26(18): 1–11.

253. Frison G, Zancanaro F, Favretto D, Ferrara SD. An improved method for cyanide determination in blood using solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2006; 20(19): 2932-8.

254. Dumas P, Gingras G, LeBlanc A. Isotope dilution-mass spectrometry determination of blood cyanide by headspace gas chromatography. *J Anal Toxicol.* 2005; 29(1): 71–5.

255. Murphy KE, Schantz MM, Butler TA, Benner BA, Wood LJ, Turk GC. Determination of cyanide in blood by isotope-dilution gas chromatography-mass spectrometry. *Clin Chem.* 2006; 52(3): 458–67.

256. Durst RA. Analytical techniques and applications of ion selective electrodes: G. Cyanide. In Durst RA, ed. *Ion- selective electrodes.* Washington: National Bureau of Standards Special Publication, 1969. 401-2.

257. Frant MS, Ross JW, Riseman JH. Electrode Indicator Technique for Measuring Low Levels of Cyanide. *Anal Chem.* 1972; 44(13): 2227–30.

258. Συκιώτου Α, Ι. 1. Υδροκυάνιο. *Εγκληματολογία και Τοξικολογία, Προσέγγιση δύο επιστημών με αφορμή τα δηλητήρια και τις δηλητηριάσεις.* Αθήνα- Θεσσαλονίκη: Εκδόσεις Σάκκουλα, 2021. 98-103.

259. Birngruber CG, Veit F, Lang J, Verhoff MA. Inhaled cyanide poisoning as a vital sign in a room fire victim. *Forensic Sci Int.* 2017; 281: e16–8.

260. Murphy DH. Cyanide-tainted tylenol: what pharmacists can learn. *Am Pharm.* 1986; NS26(5): 19-23.

261. Blanco PJ, Rivero AG. First case of illegal euthanasia in Spain: fatal oral potassium cyanide poisoning. *Soud Lek.* 2004; 49(2): 30-3.

262. Max B. This and that: an odorless crime and the mystery of a poet's heart. *Trends Pharmacol Sci.* 1988; 9(8): 276-8.

