

doktoratów, 11 prac magisterskich, liczne recenzje na stopnie i tytuły naukowe).

Obecny gest współpracowników i kolegów prof. Haliny SYBIRSKIEJ z kilku Katedr Medycyny Sądowej tj. przesłanie wybranych prac naukowych do Redakcji Archiwum z prośbą o ich wydrukowanie, ma na celu nie tylko podziękowanie i przynajmniej częściowe zadośćuczynienie, za wielki wysiłek wychowawczy i naukowy prof. Haliny SYBIRSKIEJ - ale także przypomnienie, iż należy Ona do pionierów polskiej toksykologii sądowo-lekarskiej i jest twórcą wielu metod badawczych w analizie toksykologicznej (m.in. Jej autorstwa jest szereg metodyk wyosabniania i oznaczania ksenobiotyków oraz ich metabolitów z czynnego chemicznie materiału biologicznego zwłaszcza sekcyjnego).

prof.dr hab. Władysław NASIŁOWSKI  
i współpracownicy

**Zofia Olszowy, Joanna Nowicka, Stanisława Kabiesz-Neniczka**

## Znaczenie diagnostyczne oznaczania kwasu mrówkowego w zatruciu alkoholem metylowym

**Diagnostic importance of formie acid detection in methyl alcohol poisoning**

Z Katedry Medycyny Sądowej Śląskiej AM w Katowicach  
Kierownik: dr hab. n med. Z. Olszowy - profesor Śląskiej AM

W pracy przedstawiono możliwość wykorzystania oznaczania kwasu mrówkowego w materiale biologicznym w diagnostyce zatrutych alkoholem metylowym. Kwas mrówkowy oznaczono w postaci lotnego estru: mrówczanu metylu, metodą chromatografii gazowej techniką „heade-space”. W oparciu o opiniowane w Katedrze przypadki wykazano przydatność tej analizy w toksykologii sądowej zwłaszcza w przypadkach późnych zgonów po spożyciu metanolu a także możliwość jej wykorzystania dla celów klinicznych do oceny fazy zatrucia jak również monitorowania przebiegu leczenia.

In the paper the authors have presented a possible use of formie acid detection in biological specimens in the diagnosis of methanol poisonings. Formie acid was determined as a volatile methyl formate ester by the gas chromatographic head-space method. Based on opinions relating to methanol poisonings, formulated in the Forensic Medicine Department, Silesian School of Medicine, Katowice a potential application of the method mentioned above to forensic medicine was shown, especially in cases of late deaths after methanol intoxication and also a possibility of its use in clinical evaluation of the poisoning phase as well as monitoring the course of treatment.

**Słowa kluczowe:** metanol, kwas mrówkowy, materiał biologiczny, chromatografia gazowa

**Key words:** methanol, formie acid, biological specimens, gas chromatography

Alkohol metylowy znajduje szerokie zastosowanie jako rozpuszczalnik szelaku, pokostów, lakierów, jako środek zapobiegający zamarzaniu, składnik płynów myjących a także substancja używana do skażania etanolu. Zatrucia metanolem najczęściej spowodowane są konsumpcją alkoholu niewiadomego pochodzenia lub spożyciem preparatów gospodarstwa domowego zawierających ten ksenobiotyk.

Metanol ma działanie głównie narkotyczne. Jego silna toksyczność związana jest zasadniczo z produktami biotransformacji. Powstający w pierwszym etapie przemiany aldehyd mrówkowy jest związkiem bardziej toksycznym niż metanol (około 150 razy), wywołującym zmiany zwyrodnieniowe w siatkówce oka, uszkodzenie nerwu wzrokowego, jest przyczyną zmian zwyrodnieniowych w komórkach wątroby, serca, nerek, silnie hamuje oddychanie tlenowe i beztlenową glikolizę (2, 4). Utlanie aldehydu do kwasu mrówkowego in vivo zachodzi bardzo szybko. Panday i wsp. wykazali, że utlenie połowy wprowadzonego do organizmu zwierzęcia aldehydu mrówkowego do mrówczanu trwa około 90 sekund, dlatego próby wykrywania aldehydu są trudne a czasami nawet niemożliwe (8, 14).

Powstający w kolejnym etapie przemiany kwas mrówkowy wywołuje niebezpieczną dla życia kwasicę metaboliczną. Degradacja kwasu mrówkowego do dwutlenku węgla i wody zachodzi na drodze folianowo-zależnej przy nieznacznym udziale katalazy. Ilość i szybkość utleniania ograniczona jest poziomem tetrahydrofolianów (10, 12).

Metabolity metanolu indukują powstawanie reaktywnych form tlenu wywołując stres oksydacyjny. Następstwem tego w hepatocytach są zmiany stężenia niektórych związków układu obronnego. Powstaje  $H_2O_2$ , anionorodnik ponadtlenkowy i inne rodniki wchodzące w skład reaktywnych form tlenu. Wywołują one mutację cząsteczek DNA, zmiany zapalne, nekrotyczne, peroksydację lipidów, która prowadzi do uszkodzenia błon komórkowych (3, 6, 9).

W świetle tych danych w diagnostyce zatrucia alkoholem metylowym dla potwierdzenia zatrucia metanolem, oceny fazy zatrucia a także monitorowania przebiegu leczenia oznaczanie kwasu mrówkowego jest celowe i uzasadnione. Potwierdzają to prace Kinoshity i wsp., Tanaki i wsp. (5, 11).

## MATERIAŁ I METODY

Wśród metod analitycznych opisanych w literaturze znajdują się metody kolorymetryczne, enzymatyczne, chromatografii gazowej (GC) (1, 13). Tę ostatnią, Abolin i wsp. oraz Kuo i wsp. wykorzystali do oznaczania kwasu mrówkowego techniką „head-space” i zastosowali ją w analizie materiału biologicznego (1, 7). Polegała ona na oznaczaniu kwasu mrówkowego w postaci lotnego estru mrówczanu metylu. Zastosowana procedura pozwoliła na użycie detektora FID oraz na uzyskanie czułości na poziomie 0,01 mg/ml. Ponadto metoda GC - "head-space" minimalizowała wpływ tła biologicznego tak uciążliwego w toksykologii sądowej.

W niniejszej pracy stężenie kwasu mrówkowego we krwi, moczu i tkankach wykonano wg metody podanej przez Kuo Tsung-Li (7). Do analizy wykorzystano chromatograf gazowy FISON S HRGC 5300, kolumnę kapilarną DB-WAX (30 m x 0,32 mm x 0,5 urn), oraz następujące warunki analizy: temp. nastrzyku 120°C, temp. kolumny 50°C, temp. detektora FID 200°C, gaz nośny hel.

## WYNIKI BADAŃ

Tabela I. Stężenie etanolu, metanolu i kwasu mrówkowego w materiale biologicznym.

Table I. Ethanol, methanol and formic acid concentrations in biological specimens.

	krew, mg/ml blood			mocz, mg/ml urine		wątroba, mg/g liver		nerka, mg/g kidney	
	EtOH ethanol	MeOH metha- nol	HCOOH formie acid	MeOH met- hanol	HCOO H formie acid	MeOH methanol	HCOOH formie acid	MeOH metha- nol	HCOOH formie acid
przyp.1 case1	0,0	0,0	0,51	-	-	-	-	-	-
przyp.2 case 2	0,0	0,0	1,50	-	-	-	-	-	-
przyp.3 case 3	0,0	0,0	0,40	-	-	-	-	-	-
przyp.4 case 4	0,0	0,0	0,20	0,0	0,35	-	-	-	-
przyp.5 case 5	2,30	0,0	1,23	-	-	0,0	1,13	-	-
przyp.6 case 6	0,20	0,0	0,11	-	-	0,0	0,16	-	-
przyp.7 case 7	2,72	0,0	0,11	-	-	0,0	0,65	-	-
przyp.8 case 8	3,91	0,30	0,10	-	-	0,14	0,76	0,10	0,10
przyp.9 case 9	5,00	0,7C	0,45	-	-	0,20	1,36	0,16	0,29

W tabeli I zebrano wyniki badań toksykologicznych dla dziewięciu różnych przypadków z wywiadem zatrucia alkoholem niewiadomego pochodzenia i ub w których jak to wynikało z danych aktowych, śmierć nastąpiła po libacjach alkoholowych a w analizie obok alkoholu etylowego należało także uwzględnić jego zamienniki.

W trzech pierwszych przypadkach materiał do badań toksykologicznych zabezpieczono w ograniczonym zakresie - tylko próby krwi (sekcje wykonywane poza Zakładem Medycyny Sądowej), w pozostałych analizę wykonano w moczu i w materiale tkankowym.

We wszystkich sprawach wykluczono zatrucie glikolem etylenowym i alkoholem izopropylowym.

W badaniach toksykologicznych w czterech przypadkach badanie na obecność alkoholu etylowego i metylowego dała wynik ujemny. We krwi tych osób udało się jednak wykazać obecność kwasu mrówkowego od 0,20 do 1,50 mg/ml, co pozwoliło przyjąć, że zgon nastąpił w późnej fazie zatrucia alkoholem metylowym.

W kolejnych trzech sprawach (zwłoki trzech osób ujawniono na melinie) we krwi wykazano obecność alkoholu etylowego w stężeniach: od 0,20 do 2,72%

oraz kwas mrówkowy w stężeniach od 0,11 do 1,23 mg/ml, wątrobie stężenia kwasu mrówkowego były wyższe: od 0,16 do 1,13 mg/ml. W tej sprawie prawdopodobnie czynnikiem decydującym o zgonie był efekt długotrwałego narażenia na alkohol etylowy skażony alkoholem metylowym (kilkudniowy „ciąg alkoholowy”).

Dwa pozostałe przypadki, w których we krwi stwierdzono wysokie stężenia alkoholu etylowego także alkohol metylowy i kwas mrówkowy świadczą o tym, że osoby zmarłe spożywały w dużej ilości alkohol etylowy skażony alkoholem metylowym co ostatecznie pozwoliło przyjąć iż przyczyną zgonu stało się złożone, ostre zatrucie tymi alkoholami.

## DYSKUSJA

Dawka letalna metanolu waha się w granicach 1-1,4 g/kgmc (2, 12). Stężenie metanolu powyżej 4 mg/ml uważane jest za dawkę śmiertelną. Przy niższych stężeniach, zdaniem Kinoshity, przyczyną zgonu jest efekt skumulowanego działania metanolu i kwasu mrówkowego oraz narastającej kwasicy. Za dawką krytyczną kwasu mrówkowego uważa się stężenie 0,5 mg/ml (5). W przytoczonych przez nas przypadkach aż w siedmiu nie wykazano obecności metanolu. W opisanych przez Tanaka i wsp. badaniach także nie stwierdzono obecności metanolu i etanolu a jedynie kwas mrówkowy, który jak podkreślają autorzy można potraktować jako marker narażenia na metanol (11).

Stężenia kwasu mrówkowego we krwi zawarte były w szerokich granicach od 0,11 mg/ml do 1,50 mg/ml. Wykazane stosunkowo niskie stężenia kwasu mrówkowego najprawdopodobniej związane były z obecnością w organizmach osób zmarłych także alkoholu etylowego, blokującego przemianę metaboliczną, metanolu.

Należy podkreślić, że wykorzystując do oznaczania kwasu mrówkowego, szeroko zabezpieczony materiał sekcyjny można uwiarygodnić i potwierdzić charakter zatrucia. Szczególnie przydatna może być wątroba, w której w naszych badaniach stężenie kwasu mrówkowego było z reguły wyższe niż we krwi, podobnie zresztą jak w cytowanej wyżej pracy Tanaki i wsp.

Wobec wzrastającej liczby spraw dotyczących nielegalnego wprowadzania do obrotu alkoholu etylowego skażonego alkoholem metylowym, uwzględnienie w postępowaniu analitycznym kwasu mrówkowego - metabolitu alkoholu metylowego, być może pozwoliłoby wyjaśnić wiele trudnych medyczo-sądowych i toksykologicznych spraw.

## PIŚMIENNICTWO

1. Abolin C, McRae J., Tozer T.N., Takki S.: Gas chromatographic headspace assay of formic acid as methyl formate in biological fluids: potential application to methanol poisoning, *Biochem.Med.*, 1980, 23: 209-218. -2. Bogdanik T.: Alkohol etylowy oraz Alkohol Metylowy, w: Toksykologia Kliniczna,

Alkohol etylowy oraz Alkohol Metylowy, w: Toksykologia Kliniczna, pod redakcją T. Bogdanika, PZWL, Warszawa 1988: 440-459, -3. Dikalova A., Kadiiska M., Mason R.: An in vivo ESR spin-trapping study: Free radical generation in rats from formate intoxication - role of the Fenton reaction, *PNAS*, 2001, 98:13549-13553, -4. Jacyszyn K. Toksyczność rozpuszczalników, w: Toksykologia, pod redakcją W. Seńczuka, WL PZWL, Warszawa 1994, 337-402, -5. Kinoshita H., Ijiri I., Ameno S., Tanaka N., Kubota T., Tsujinaka M., Watanabe R., Ameno K.: Combined toxicity of methanol and formic acid: two cases of methanol poisoning, *Int.J.Legal.Med.*, 1998, 111: 334-335, -6. Kukielka E., Diker E., Cederbaum A.: Increased production of reactive oxygen species by rat liver mitochondria after chronic ethanol treatment, *Arch.Biochem.Biophys.*, 1994, 309: 377-386, -7. Kuo T.: The effects of ethanol on methanol intoxication. I. A simple headspace gas chromatography for the determination of blood formic acid, *Jpn.J.Legal Med.*, 1982, 36 (5): 669-675, -8. Pandey C, Agarwal A., Baronia A., Singh N.: Toxicity of ingested formalin and its management, *Hum.Exper.Toxicol.*, 2000, 19: 360-366, -9. Sergeant O., Griffon B., Cillard P., Cillard J.: Alcohol et stress oxydatif, *Pathol.Biol.*, 2001, 49, 689-695, -10. Skrzydlewska E., Farbiszewski R.: Decreased antioxidant defense mechanisms in rat liver after methanol intoxication, *Free Rad.Res.*, 1997, 27:369-375,

11. Tanaka E., Honda K., Horiguchi H., Misawa S.: Postmortem determination of the biological distribution of formic acid in methanol intoxication, *J.Forensic.Sci.*, 1991, 36: 936-938, -12. Thepaly T.: The toxicity of methanol, *Life Science*, 1991, 48:1031-1041, -13. Triegig G., Schaller K.: A simple and reliable enzymatic assay for the determination of formic acid in urine, *Clin.Chim.Acta*, 1980, 108: 355-360, -14. Ulrich R., Bacon J., Brass E., Cramer C, Petrella D., Sun E.: Metabolic, idiosyncratic toxicity of drugs: overview of the hepatic toxicity induced by the anxiolytic, panadiplon, *Chem.Biol.Interact.*, 2001,134: 251-270,

Adres pierwszego autora:

Katedra Medycyny Sądowej Śląskiej AM

ul. Medyków 18

40-752 Katowice