OPTYMALIZACJA I WALIDACJA METOD OZNACZANIA ETANOLU I INNYCH ZWIĄZKÓW LOTNYCH WE KRWI. POSZUKIWANIE MARKERÓW CHOROBY ALKOHOLOWEJ

Dariusz Zuba
Instytut Ekspertyz Sądowych im. prof. dr. Jana Sehna w Krakowie[7]

1 WPROWADZENIE

Częsta konsumpcja napojów alkoholowych w dużych ilościach jest przyczyną wielu problemów zdrowotnych i prowadzi do uzależnienia. Alkohol jest także główną przyczyną wypadków drogowych i wielu wypadków przy pracy. W Stanach Zjednoczonych szacuje się, że straty spowodowane używaniem alkoholu, związane nie tylko z wypadkami, ale również niższą wydajnością pracy, wynoszą około 150 mld USD rocznie, co odpowiada około 600 USD na osobę [14]. W Polsce, mimo znacznego zaostrzenia prawa w zakresie karania pijanych kierowców, nadal na porządku dziennym jest prowadzenie pojazdów mechanicznych po spożyciu napojów alkoholowych. Każdego roku laboratoria policyjne i sądowe przeprowadzają ponad 100 tys. analiz krwi na zawartość alkoholu (należy jednocześnie pamiętać, że w myśl „Prawa o ruchu drogowym" podstawową metodą oznaczania etanolu jest analiza powietrza wydychanego) [3].

Podczas rutynowej analizy krwi na zawartość etanolu możliwe jest oznaczenie również innych lotnych związków organicznych, co może znaleźć szerokie zastosowanie do celów sądowych. Poziomy metanolu, 1-propanolu i 2-propanolu we krwi mogą zostać wykorzystane do oceny wiarygodności zeznań osoby podejrzanej co do ilości, rodzaju oraz czasu konsumpcji napoju alkoholowego. Możliwość ta wynika z faktu, że wymienione związki są produktami ubocznymi procesu fermentacji alkoholowej, dzięki czemu można je wykryć w większości napojów alkoholowych [17]. Po spożyciu takich napojów wszystkie wymienione alkohole są wchłaniane do organizmu, a następnie wraz z krwią przenoszone do poszczególnych tkanek. Ponieważ zarówno metanol, jak i oba propanole są bardzo dobrze rozpuszczalne w wodzie, praktycznie cała wchłonięta ilość przechodzi do krwi, a zatem proporcje pomiędzy zawartością poszczególnych alkoholi w napojach zostają zachowane we krwi. Jednocześnie już przy stosunkowo niskim stężeniu etanolu we krwi, rzędu 0,2–0,3 g/l, zahamowany zostaje metabolizm pozostałych alkoholi, co prowadzi do ich kumulacji w organizmie [1,2,6,7,10]. Zjawisko to jest spowodowane najwyższym powinowactwem do etanolu dehydrogenazy alkoholowej, enzymu odpowiedzialnego za usuwanie alkoholi z organizmu. Zjawisko blokowania metabolizmu pozostałych alkoholi przez etanol może być wykorzystane również do diagnozowania choroby alkoholowej u badanych osób [13,21]. Osoby uzależnione od alkoholu, będąc w tzw. ciągu alkoholowym, piją po kilka - kilkanaście dni bez fazy trzeźwienia. Przez cały ten czas pozostałe alkohole nie są metabolizowane, a dodatkowo ich stężenie wzrasta na skutek endogennej produkcji przez organizm [5]. W konsekwencji stężenia w/w związków u osób uzależnionych znacznie przekraczają poziomy występujące u osób pijących okazjonalnie. Przy długotrwałym spożywaniu alkoholu dochodzi ponadto do zaburzenia równowagi oksydacyjno-redukcyjnej organizmu, co z kolei zaburza procesy metaboliczne. W konsekwencji może dochodzić do tworzenia się znacznych ilości substancji

[7] D. Zuba w trakcie wykonywania badań zawartych w pracy doktorskiej, która jest przedstawiona w niniejszym rozdziale, był doktorantem w Zakładzie Chemii Analitycznej na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego.

szkodliwych, m.in. metabolizm kwasów tłuszczowych prowadzi do tworzenia związków ketonowych. Z tego powodu stężenia acetonu u osób uzależnionych również przekraczają poziomy występujące u osób zdrowych. Nadużywanie alkoholu prowadzić może do aldehydemii, tzn. występowania we krwi podwyższonych poziomów etanalu, metabolitu etanolu, na skutek niewystarczającej aktywności enzymu utleniającego ten związek [8,9].

Oznaczenie we krwi innych alkoholi może pomóc również przy opiniowaniu w sprawach, w których sprawca wypadku zbiegł z miejsca zdarzenia. Osoby te często znajdują się pod wpływem alkoholu w chwili wypadku, w celu uniknięcia konsekwencji prawnych zgłaszają się na posterunek policji po kilku - kilkunastu godzinach po zdarzeniu. Podwyższony poziom pozostałych alkoholi wskazywać może, że dana osoba spożywała napój alkoholowy [6,16].

2 CEL PRACY

Głównymi celami pracy było:
- Opracowanie i walidacja chromatograficznych (GC) metod jednoczesnego oznaczania acetonu, etanalu, etanolu, metanolu, 1-propanolu i 2-propanolu we krwi;
- Zastosowanie opracowanych metod do oznaczania wymienionych związków we krwi osób nadużywających alkoholu oraz pijących okazjonalnie;
- Zbadanie i wszechstronna ocena możliwości stosowania związków lotnych jako markerów choroby alkoholowej.

3 OPRACOWANIE PROCEDUR ANALITYCZNYCH

3.1 *Procedura wykorzystująca analizę fazy nadpowierzchniowej (ang. headspace analysis)*

Technika *headspace* polega na analizie fazy gazowej, znajdującej się nad próbką ciała stałego lub cieczy (w przypadku badań objętych pracą doktorską była to krew), umieszczoną w zamkniętym naczyniu. Przedstawiona metoda jest modyfikacją procedury szeroko stosowanej w polskich laboratoriach toksykologicznych i sądowych.

Oznaczenia związków lotnych prowadzono, stosując chromatograf gazowy Perkin Elmer Autosystem, wyposażony w automatyczny podajnik próbek (autosampler) HS 40. Dodatkowe informacje na temat wyposażenia (kolumna, gaz nośny itp.) można znaleźć z literaturze [18].

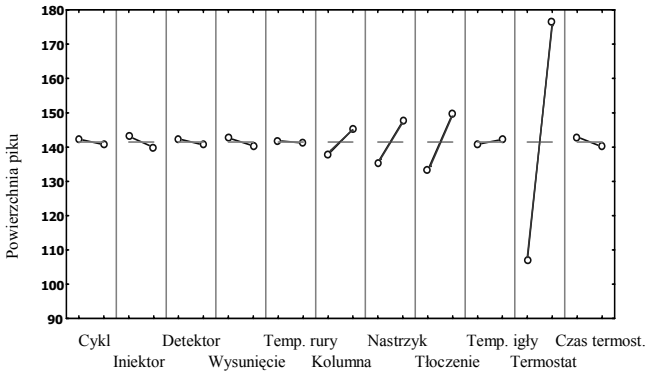
3.1.1 *Optymalizacja warunków pracy autosamplera oraz chromatografu*

Pierwszym etapem opracowania metody była optymalizacja parametrów pracy aparatu (chromatografu oraz autosamplera). Liczba parametrów, które określają pracę zestawu, jest duża, dlatego sprawdzono, jaki wpływ na wielkość sygnału analitycznego może mieć zmiana poszczególnych czynników. W ocenie wykorzystano plan doświadczalny według metody Taguchiego. Jest to plan ortogonalny, w którym każdy czynnik występuje na 2 poziomach. Plan L12, z którego skorzystano, przewiduje wykonanie 12 eksperymentów dla 11 czynników (ze względu na to, że dla każdego punktu planu czynnikowego wykonano 3 pomiary całkowita liczba eksperymentów wyniosła 36). Plan ortogonalny L12 został przedstawiony w tabeli 1.

Tabela 1. Plan ortogonalny L12 wg metody Taguchiego. Cyfra „1" oznacza niższy poziom czynnika, liczba „2" – poziom wyższy.

Numer eksperymentu	Czynnik										
	Czas jednego cyklu (15-20 min)	Temperatura iniektora (120-150 ^{0}C)	Temperatura detektora (200-240 ^{0}C)	Czas wysunięcia igły (0,5-1,0 min)	Temperatura rury przesyłowej (105-115 ^{0}C)	Temperatura kolumny (50-70 ^{0}C)	Czas nastrzyku (0,03-0,04 min)	Czas tłoczenia gazu do naczynia (2,0-2,5 min)	Temperatura igły (90-100 ^{0}C)	Temperatura termostatowania próbki (35-50^{0}C)	Czas termostatowania (15-20 min)
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2
3	1	1	2	2	2	1	1	1	2	2	2
4	1	2	1	2	2	1	2	2	1	1	2
5	1	2	2	1	2	2	1	2	1	2	1
6	1	2	2	2	1	2	2	1	2	1	1
7	2	1	2	2	1	1	2	2	1	2	1
8	2	1	2	1	2	2	2	1	1	1	2
9	2	1	1	2	2	2	1	2	2	1	1
10	2	2	2	1	1	1	1	2	2	1	2
11	2	2	1	2	1	2	1	1	1	2	2
12	2	2	1	1	2	1	2	1	2	2	1

Na rysunku 1 przedstawiono wpływ zmiany poszczególnych czynników na wielkość sygnału analitycznego (powierzchnie pików chromatograficznych) dla acetonu.



Rys. 1. Wpływ 11 czynników, paramerów pracy zestawu do chromatograficznego oznaczania związków lotnych techniką *headspace*, na wielkość sygnału analitycznego pochodzącego od acetonu (opis zmiennych w tabeli 1).

Czynnikami, które w sposób statystycznie istotny wpływały na sygnał, były: temperatura termostatowania próbki, czas tłoczenia gazu do naczyńka, czas nastrzyku (parametry pracy autosamplera) oraz, dla niektórych analitów, temperatura pieca, w którym znajduje się kolumna chromatograficzna. Wzrost temperatury termostatowania próbki w największym stopniu wpływał na wielkość powierzchni pików. W dalszych badaniach próbki krwi (z odpowiednimi dodatkami) termostatowane były w 60ºC, najwyższej temperaturze zalecanej do tego typu analiz toksykologicznych (w wyższej temperaturze może dochodzić do zmian w składzie krwi, np. część etanolu może zostać utleniona do etanalu, co znacząco wpływa na dokładność oznaczenia tego drugiego związku). Pozostałe parametry pracy autosamplera zostały zoptymalizowane metodą zmiany pojedynczego czynnika w pojedynczym cyklu optymalizacyjnym.

Przy doborze warunków rozdziału modyfikowanym parametrem była temperatura pieca. W tym przypadku jednak celem optymalizacji było uzyskanie rozdzielczości większej od 1,0 [4], co udało się osiągnąć w temperaturze 50ºC.

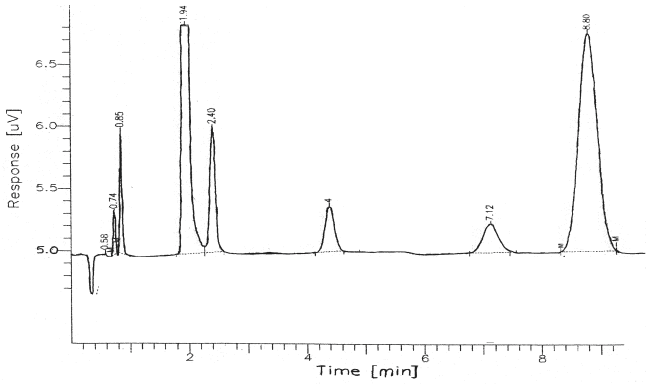
3.1.2 *Modyfikacja procedury przygotowania próbek do oznaczania lotnych związków*

Modyfikacja procedury przygotowania próbek, stosowanej w rutynowych oznaczeniach etanolu, polegała na:
- zwiększeniu objętości próbki krwi z 0,2 ml do 0,5 ml;
- zmniejszeniu objętości dodawanego wzorca wewnętrznego (1,1-dimetyloetanolu) z 1,8 ml do 0,1 ml i jednocześnie zmniejszeniu jego stężenia z 2,0 g/l do 0,020 g/l;
- dodaniu 0,5 ml nasyconego węglanu potasu.

3.1.3 *Walidacja opracowanej metody*

Proces walidacji [11] miał na celu m.in. wyznaczenie takich parametrów metody jak:
- specyficzność (selektywność),
- liniowość oraz zakres roboczy (zakres stężeń występujących w próbkach rzeczywistych),
- dokładność,
- precyzja,
- granica wykrywalności oraz granica oznaczalności.

Chromatogram roztworu wzorcowego sporządzonego na bazie krwi, zawierającego wszystkie anality, przedstawiono na rysunku 2.



Rys. 2. Przykładowy chromatogram roztworu wzorcowego, zawierającego wszystkie oznaczane związki (w kolejności: etanal, metanol, etanol, aceton, 2-propanol, 1-propanol, wzorzec wewnętrzny).

Jak widać na powyższym rysunku, metoda jest selektywna w stosunku do wszystkich analitów (uzyskano pełny rozdział pików chromatograficznych).

Ponadto sprawdzono, czy na sygnał analityczny nie wpływa matryca organiczna próbek krwi. Dla niektórych analitów linie kalibracyjne

otrzymane na podstawie analizy roztworów sporządzonych na bazie krwi leżały powyżej wykresów dla roztworów wodnych. Przesunięcie wykresów wzdłuż osi OY wynikało jednak z fizjologicznej zawartości tych związków we krwi wykorzystanej do badań. Wartości wyrazu wolnego (rzędnej) w równaniach linii kalibracyjnych (po odjęciu tzw. „ślepej próby"), dopasowanych metodą najmniejszych kwadratów, nie różniły się statystycznie istotnie (α=0,05) od średniej uzyskanej dla matrycy (woda lub krew) bez dodatku analitów. Również współczynniki nachylenia linii kalibracyjnych dla roztworów wodnych i na bazie krwi nie różnią się istotnie na przyjętym poziomie istotności α=0,05 (wykresy były do siebie równoległe). Świadczy to o niewystępowaniu błędu proporcjonalnego. Dzięki temu nie było konieczności stosowania kalibracji metodą dodatku wzorców. Analizę błędu oznaczeń chromatograficznych przedstawiono szerzej w literaturze [22,23].

Parametry analityczne metody zebrano w tabeli 2 (zob. poniżej). Osiągnięta czułość pozwoliła na oznaczanie lotnych związków organicznych we krwi osób uzależnionych od alkoholu.

3.2 *Procedura wykorzystująca mikroekstrakcję do fazy stałej (ang. solid-phase microextraction, SPME)*

Mikroekstrakcja do fazy stałej jest nowoczesną metodą przygotowania próbki do analizy chromatograficznej. Składa się ona z dwóch etapów:
- adsorpcji lub absorpcji oznaczanych związków z próbki (stałej, ciekłej lub gazowej) do pokrycia włókna;
- desorpcji analitów w komorze nastrzykowej chromatografu.

Do zalet tej techniki można zaliczyć dużą czułość, prostotę oraz fakt, że do przygotowania próbki nie są używane żadne rozpuszczalniki, a zatem jest to metoda „przyjazna dla środowiska".

3.2.1 *Optymalizacja procesu mikroekstrakcji do fazy stałej*

Optymalizacja procesu SPME składała się z kilku etapów i polegała m.in. na:
- wyborze pokrycia włókna do SPME;
- optymalizacji temperatury oraz czasu ekstrakcji;
- doborze rodzaju oraz ilości soli nieorganicznej stosowanej do wysalania analitów z próbki do fazy nadpowierzchniowej;
- optymalizacji objętości próbki;
- doborze temperatury desorpcji analitów z pokrycia włókna.

Ze względu na dużą lotność analitów ekstrakcję prowadzono z fazy nadpowierzchniowej.

Porównano efektywność ekstrakcji badanych związków na sześciu komercyjnych rodzajach pokryć: 65 μm Carbowax/diwinylobenzen (CW/DVB), 85 μm poliakrylan (PA), polidimetylosiloksan (PDMS) o grubościach pokrycia 7 μm, 30 μm oraz 100 μm i 60 μm polidimetylosiloksan/diwinylobenzen (PDMS/DVB). Wybór pokrycia włókna oparty był na zaproponowanej przez autora tzw. funkcji wyboru, która pozwoliła porównać efektywność ekstrakcji jednocześnie dla wszystkich analitów. Funkcja ta ma postać:

$$F_j^1 = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^{n} \frac{H_{ij}}{1/k \sum_{j=1}^{k} H_{ij}}$$

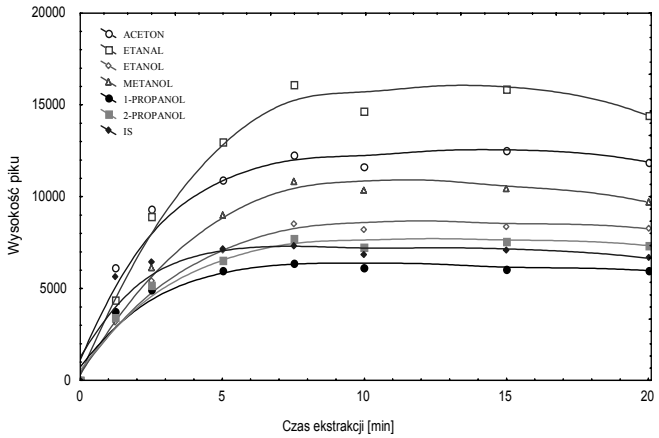
gdzie:

H_{ij} – wysokość piku chromatograficznego i-tego analitu (i= 1...n) przy zastosowaniu j-tego pokrycia włókna (j= 1...k).

Efektywność ekstrakcji badanej grupy związków była najlepsza przy zastosowaniu pokryć zawierających diwinylobenzen. Wartość funkcji wyboru była najwyższa dla pokrycia CW/DVB i właśnie to pokrycie włókna stosowane było w dalszych badaniach.

Drugim etapem opracowania warunków mikroekstrakcji analitów z matrycy próbki do fazy stałej włókna był wybór temperatury odpowiedniej do prowadzenia procesu. Wzrost sygnału od temperatury pokojowej do 50°C był praktycznie liniowy dla wszystkich analitów. Powyżej tej temperatury wysokości pików etanolu i etanalu nadal rosły, dla acetonu, 1-propanolu i 2-butanolu sygnał nie zmieniał się znacząco powyżej temperatury 50°C, a dla metanolu i 2-propanolu powyżej 60°C. Średnie wzmocnienie w 60°C było nieznacznie wyższe niż w 70°C i właśnie temperaturę 60°C wybrano do dalszych badań.

Na rysunku 3 przedstawiono zmiany wysokości pików chromatograficznych analitów przy różnych czasach ekstrakcji.



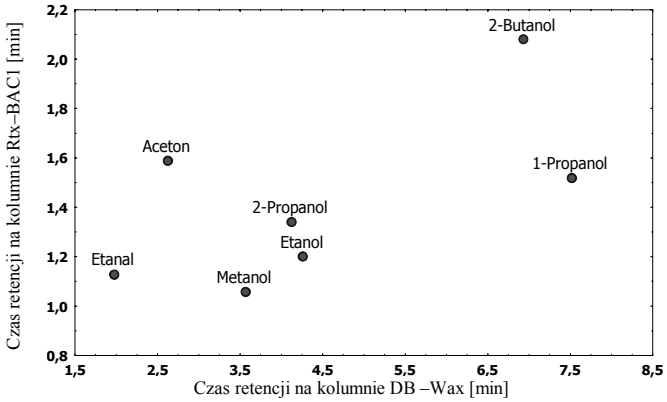
Rys. 3. Profile czasowe zmian sygnałów analitycznych pochodzących od oznaczanych związków (IS – standard wewnętrzny).

Jak wynika z przedstawionego wykresu, równowaga ustala się po ok. 7,5 minutach. Istotność różnic pomiędzy średnimi wysokościami piku analitów, przy różnych czasach ekstrakcji, oceniono, stosując analizę wariancji oraz test post-hoc porównania średnich (test Scheffego). Dla 2-butanolu wysokości pików osiągnięte dla czasu ekstrakcji 2,5 min nie różniły się istotnie (α=0,05) od wysokości dla dłuższych czasów ekstrakcji. Dla acetonu, 1- i 2-propanolu średnie wysokości pików nie różniły się dla czasów ekstrakcji od 5 do 20 min. Dla etanolu, etanalu i metanolu czasem, po jakim średnie ustaliły się na jednym poziomie, było 7,5 min. W dalszych badaniach ekstrakcję prowadzono przez 10 minut, ponieważ dla tego czasu wysokości pików znajdowały się na obszarze plateau wykresu (niewielkie wahania czasu ekstrakcji nie powodują zmian ilości wyekstrahowanych analitów).

Wyniki optymalizacji pozostałych parametrów procesu mikroekstrakcji do fazy stałej można znaleźć w literaturze [20,25].

3.2.2 *Optymalizacja rozdziału chromatograficznego*

Badania nad wykorzystaniem SPME do oznaczania związków lotnych we krwi prowadzone były w dwóch etapach. Badania wstępne przeprowadzono w Uniwersytecie Friedricha-Schillera w Jenie (Niemcy), a następnie były one kontynuowane w Instytucie Ekspertyz Sądowych w Krakowie. Ponieważ laboratoria te wyposażone były w różne aparaty, kolumny chromatograficzne i gazy nośne, opracowano dwie niezależne procedury oznaczania chromatograficznego. Na rysunku 4 porównano czasy retencji oznaczanych związków na obu stosowanych kolumnach, uzyskane w optymalnych warunkach. Szczegółowe procedury przedstawiono w literaturze [19].



Rys. 4. Czasy retencji oznaczanych związków lotnych na dwóch kolumnach chromatograficznych, które wykorzystano w badaniach.

3.2.3 *Walidacja metody SPME*

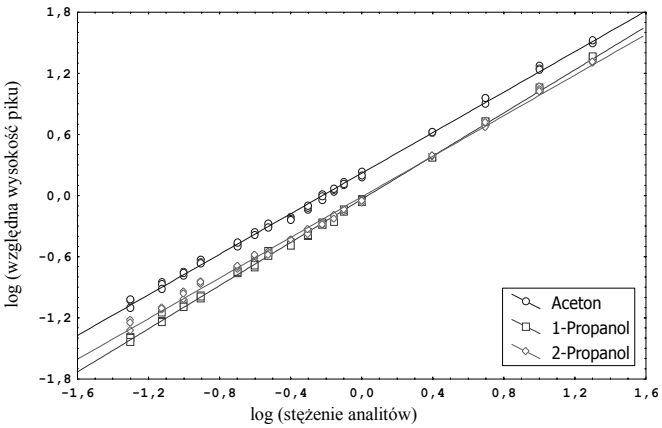
Ostatnim etapem opracowania metody, podobnie jak w metodzie headspace, była jej walidacja.

Zdolność rozdzielcza R_s obu kolumn była wysoka i wyniosła ponad 1,0. Oznacza to, że wszystkie piki chromatograficzne rozdzielone zostały co najmniej w 98 %. Wartość R_S>1 wymagana jest przez europejską Pharmacopeię [4].

W celu oceny wpływu matrycy przygotowano dwie serie roztworów wzorcowych, w jednej matrycę stanowiła krew, a w drugiej – woda. Liczba równoległych oznaczeń na każdym z 3 poziomów stężeń analitów wyniosła 6. Najpierw za pomocą testu F wykazano, że matryca krwi nie ma istotnego wpływu na precyzję metody na określonym poziomie stężenia. Następnie za pomocą testu t Studenta sprawdzono istotność różnic pomiędzy średnimi dla roztworów wodnych oraz sporządzonych na bazie krwi dla poszczególnych analitów, na kolejnych poziomach ich stężenia. Uzyskane wartości testu t Studenta wskazywały, że rodzaj matrycy nie ma istotnego wpływu również na

dokładność metody (nie występuje błąd systematyczny ani proporcjonalny).

Na rysunku 5 przedstawiono zależność sygnału dla trzech analitów od ich stężenia. Ze względu na szeroki zakres wartości zmiennych zastosowano skale logarytmiczne. Jak widać na rysunku, metoda charakteryzuje się liniowością w całym zakresie badanych stężeń.



Rys. 5. Zależność sygnałów analitycznych pochodzących od acetonu, 1- i 2-propanolu od ich stężenia w roztworze.

Parametry metody headspace oraz SPME przedstawiono w tabeli 2.

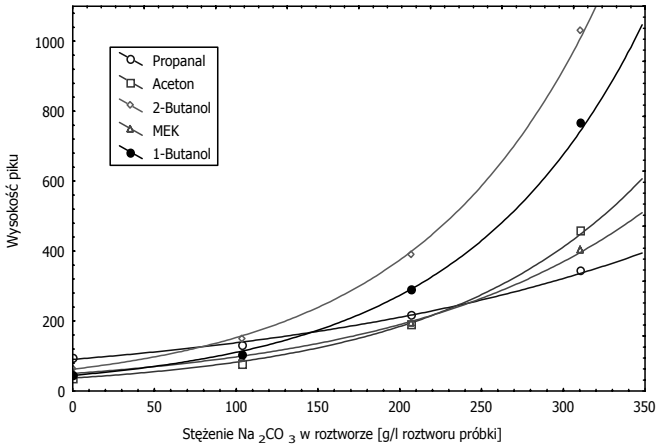
Tabela 2. Parametry analityczne obu opracowanych metod. Podane zakresy opisują zmienność w zależności od oznaczanego związku.

Parametr	Metoda *headspace*	Metoda SPME
Granica oznaczalności	200 – 400 mg/l	45 – 320 mg/l
Granica wykrywalności	75 – 150 mg/l	15 – 110 mg/l
Błąd dokładności	0,5 – 8,8 %	0,5 – 1,4 %
Błąd precyzji	1,8 – 8,8 %	4,5 –7,7 %

3.3 *Wysalanie związków lotnych za pomocą soli nieorganicznej*

W obu opracowanych metodach, w celu zwiększenia czułości oznaczeń, stosowano dodatek węglanu potasu. Autor pracy rozszerzył badania nad wysalaniem związków lotnych, zwiększając liczbę analitów. Badaniami objęto 13 soli nieorganicznych [26].

Efekt wysolenia zależy zarówno od rodzaju analitu, jak i zastosowanej soli. W szeregu homologicznym alkoholi wielkość wzmocnienia sygnału analitycznego wzrastała z liczbą atomów węgla w cząsteczce. O podatności związku na efekt wysalania decyduje przede wszystkim jego polarność. Dla każdej soli wyznaczono zależność wysokości pików chromatograficznych analitów od jej stężenia w roztworze. Przykładowe zależności przedstawiono na rysunku 6.



Rys. 6. Zależność sygnałów analitycznych analitów od stężenia soli w roztworze.

Ilość substancji lotnej w fazie nadpowierzchniowej rośnie wykładniczo ze wzrostem stężenia soli. Uzyskane rezultaty wskazują, że najwyższą czułość uzyskuje się po dodaniu soli w ilości, która powoduje nasycenie roztworu w temperaturze, w której prowadzi się pomiary. Rodzaj soli ma bardzo duży wpływ na wielkość efektu wysolenia. O wielkości tego zjawiska decydują rozmiary jonów, ich efektywny ładunek, liczba jonów, na które dysocjuje sól, jak również jej zdolność do tworzenia hydratów. Rodzaj anionu w stosowanej soli ma większy wpływ na jej zdolności wysalające niż rodzaj kationu. Z przebadanych soli zdecydowanie największe wzmocnienia sygnału dawał węglan potasu.

4 OCENA ZWIĄZKÓW LOTNYCH JAKO MARKERÓW CHOROBY ALKOHOLOWEJ

Aceton, etanal, etanol, metanol, 1-propanol i 2-propanol zostały oznaczone we krwi osób uzależnionych od alkoholu oraz pijących okazjonalnie. Pierwszą grupę stanowiło 171 pacjentów Kliniki Toksykologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego (CM UJ). Od pacjentów pobrano cztery próby krwi: przy

przyjęciu do szpitala, po 6, 18 i 24 godzinach od przyjęcia. Grupę kontrolną stanowiło 13 ochotników, którzy spożywali 0,6 g alkoholu na kg masy ciała (kobiety) lub 0,7 g/kg masy ciała (mężczyźni). Próby krwi od tych osób były pobierane w odstępach 30 minutowych, aż do spadku stężenia etanolu w powietrzu wydychanym poniżej 0,2 g/l.

4.1 *Stężenia związków lotnych we krwi osób uzależnionych od alkoholu*

Stężenia związków lotnych we krwi osób uzależnionych od alkoholu, w zależności od czasu pobrania prób krwi, zebrano w tabeli 3.

Tabela 3. Statystyki opisowe stężeń poszczególnych związków lotnych dla różnych czasów pobrania próby krwi.

Zmienna	Średnia	SD	Mediana	Min	Max
Aceton_0	10,75	25,69	4,8	0,0	249,6
Aceton_6	10,83	21,94	5,65	0,8	217,5
Aceton_18	18,84	31,25	7,9	0,6	173,8
Aceton_24	15,91	24,32	6,75	0,4	126,9
Etanal_0	5,58	3,68	4,8	0,0	17,2
Etanal_6	5,38	3,99	4,1	0,0	20,9
Etanal_18	0,92	2,11	0,2	0,0	13,8
Etanal_24	0,20	0,55	0,1	0,0	5,0
Etanol_0	3,10	1,11	3,03	0,76	6,59
Etanol_6	1,54	1,03	1,48	0,0	4,71
Etanol_18	0,10	0,34	0,00	0,0	2,3
Etanol_24	0,00	0,00	0,00	0,0	0,0
Metanol_0	28,69	38,79	22,1	2,0	324,4
Metanol_6	26,29	36,66	20,3	0,0	281,9
Metanol_18	7,30	21,03	1,2	0,0	201,5
Metanol_24	1,43	3,33	0,45	0,0	21,9
1-Propanol_0	1,10	1,31	0,8	0,0	13,5
1-Propanol_6	0,59	0,59	0,4	0,0	3,5
1-Propanol_18	0,14	0,30	0,0	0,0	2,4
1-Propanol_24	0,04	0,14	0,0	0,0	1,3
2-Propanol_0	4,59	8,96	2,3	0,2	75,6
2-Propanol_6	3,42	5,03	1,9	0,0	45,0
2-Propanol_18	0,81	2,06	0,3	0,0	19,4
2-Propanol_24	0,27	0,44	0,0	0,0	2,4

Uwagi:
1. Liczba podana po nazwie związku oznacza czas (w godzinach), jaki upłynął od przyjęcia pacjenta do szpitala;
2. Stężenia związków lotnych podane są w mg/l, za wyjątkiem etanolu, którego stężenie wyrażono w g/l;
3. Oznaczenia w tabeli: SD – odchylenie standardowe, Min – stężenie najniższe, Max – stężenie najwyższe.

4.2 *Porównanie uzyskanych stężeń związków lotnych z wartościami progowymi rozpoznawania uzależnienia od alkoholu*

Jak wspomniano we wstępie, podwyższenie stężenia acetonu, metanolu lub 2-propanolu we krwi może wskazywać na problemy alkoholowe badanej osoby. Jako wartości progowe przyjmuje się 10 mg/l dla metanolu, 7 mg/l dla acetonu oraz 2 mg/l dla 2-propanolu [13]. Porównanie stężeń związków lotnych, oznaczonych przy przyjęciu do szpitala, z wartościami progowymi zebrano w tabeli 4.

Tabela 4. Porównanie stężeń związków lotnych we krwi pacjentów Kliniki Toksykologii CM UJ z wartościami progowymi rozpoznawania uzależnienia od alkoholu.

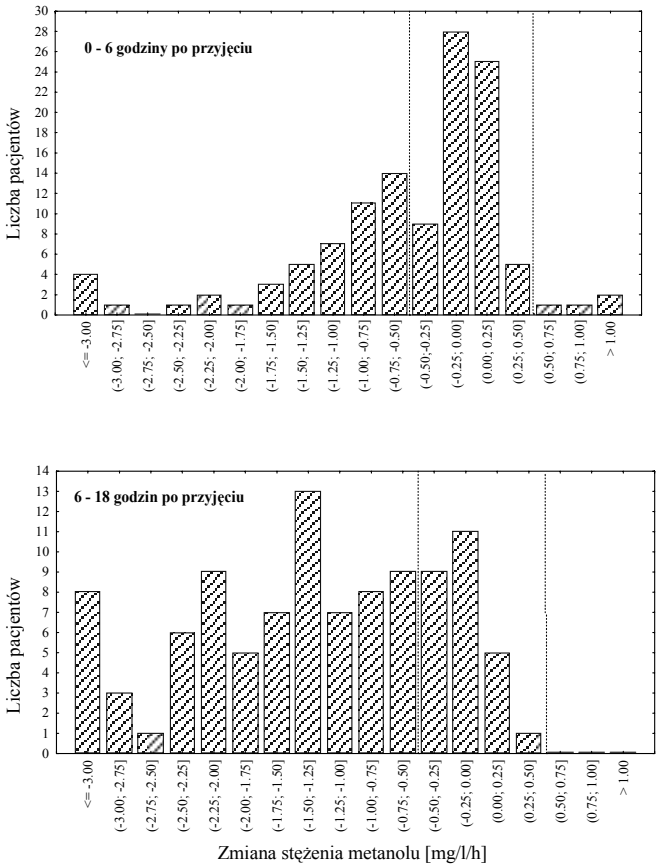
		Metanol			
		poniżej 10 mg/l		powyżej 10 mg/l	
Aceton	powyżej 7 g/l	0	0	4	46
	poniżej 7 mg/l	26	6	39	31
		poniżej 2 mg/l	powyżej 2 mg/l	poniżej 2 mg/l	powyżej 2 mg/l
		2-propanol		**2-propanol**	

Dane przedstawione powyżej skłaniają do wniosku, że najlepszym wskaźnikiem nadużywania alkoholu jest metanol. Stężenie tego związku przy przyjęciu do szpitala przekraczało poziom progowy dla prawie 80% pacjentów. Wysokie poziomy metanolu wynikają z kumulacji tego związku w organizmie przy długotrwałym przebywaniu pod wpływem alkoholu. Jednak jego stężenie u osób pijących nałogowo jest wysokie tylko przez ok. 10-20 godzin od zakończenia konsumpcji (o ile dana osoba nie zacznie pić ponownie). Czas półtrwania metanolu wyniósł 3,4 ± 1,9 h [24]. Zatem metanol jest tzw. Krótkoterminowym markerem choroby alkoholowej. W badanej grupie pacjentów po 18 godzinach od przyjęcia na oddział detoksykacji stężenie metanolu przekraczało wartość progową u 21 pacjentów (19,3% przypadków), natomiast po 24 godzinach u 4 pacjentów (3,8%).

4.3 *Eliminacja związków lotnych u osób uzależnionych od alkoholu*

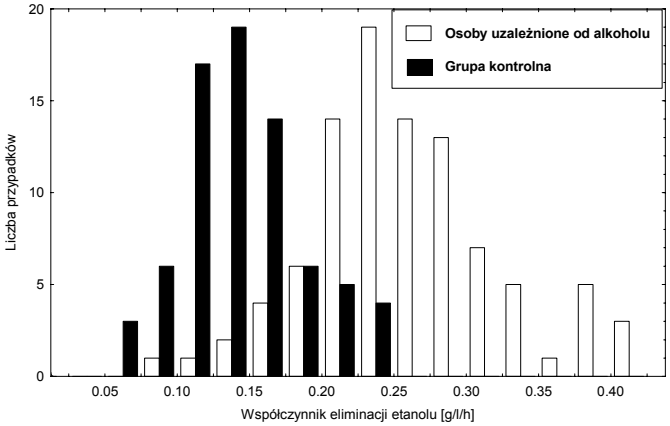
Czterokrotne pobranie prób krwi od pacjentów Kliniki Toksykologii CM UJ pozwoliło na ocenę zmian stężeń związków lotnych w czasie. Na

rysunku 7 (zob. poniżej) przedstawiono zmiany stężenia metanolu w czasie pierwszych 18 godzin hospitalizacji. Jak widać na wykresie, już w trakcie pierwszych 6 godzin od przyjęcia, gdy średnie stężenie etanolu było wyższe niż 1,5 g/l, u wielu pacjentów (49 osób, 40,8%) następował metabolizm metanolu. Dla czterech pacjentów stężenie metanolu wzrastało, co może świadczyć, że do szpitala zostali przyjęci w niedługim czasie od zakończenia konsumpcji (byli w fazie wchłaniania alkoholu). W kolejnych 12 godzinach hospitalizacji metanol metabolizowany był już znacznie szybciej i u znacznie większej liczby pacjentów. Utlenianie metanolu miało miejsce mimo obecności etanolu w organizmie.



Rys. 7. Zmiany stężenia metanolu podczas pierwszych 18 godzin hospitalizacji (liniami przerywanymi zaznaczono przedział, w który wyniki zmieniają się na skutek przypadkowych fluktuacji).

Powyższe wyniki świadczą o tym, że u osób uzależnionych metabolizm metanolu może zachodzić niezależnie od utleniania etanolu. Prawdopodobnie w metabolizmie alkoholi u tej grupy osób w znacznie większym stopniu, w porównaniu do osób zdrowych, biorą udział inne systemy metaboliczne, np. układ MEOS – mikrosomalny system utlenienia alkoholu czy system katalazy. Zjawisko włączania się innych systemów metabolicznych do utlenienia alkoholi potwierdza bardzo wysoka średnia wartość współczynnika eliminacji etanolu (β_{60}), która dla badanej grupy osób uzależnionych wyniosła 0,264 ± 0,074 g/l/h (mediana 0,258 g/l/h). Porównanie uzyskanych wartości współczynnika β_{60} z wynikami uzyskanymi dla grupy osób pijących okazjonalnie przedstawiono na rysunku 8.



Rys. 8. Porównanie szybkości eliminacji etanolu u osób uzależnionych od alkoholu oraz pijących okazjonalnie.

4.4 *Ocena korelacji między stężeniami związków lotnych u osób uzależnionych od alkoholu*

4.4.1 *Współczynnik korelacji r Pearsona*

Wysokie wartości współczynnika korelacji Pearsona uzyskano głównie dla stężeń tego samego związku w różnych czasach pobrania próbki krwi (aceton, etanol, metanol, 2-propanol), oraz dla pary aceton – 2-propanol, związków pozostających w organizmie w równowadze. Istnieje również statystycznie istotna korelacja pomiędzy poziomami metanolu oraz poziomami acetonu i 2-propanolu (korzystna pod kątem stosowania ich jako markerów choroby alkoholowej). Stężenia w/w związków praktycznie nie korelują ze stężeniami etanolu (z wyjątkiem wyników po 18 godzinach od przyjęcia), co również jest korzystne w sensie ich zastosowania jako markerów uzależnienia.

4.4.2 *Testy nieparametryczne*

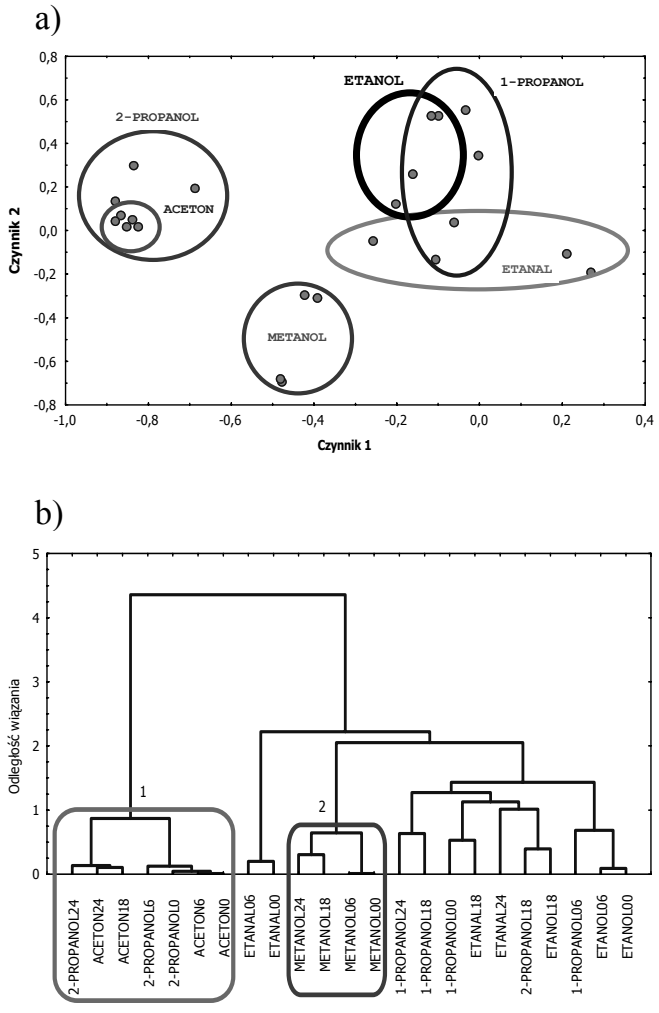
Ze względu na fakt, że część wyników znacznie przewyższała pozostałe, a także rozkłady zmiennych prawdopodobnie nie były normalne,

postanowiono zastosować testy nieparametryczne. Korelacje pomiędzy zmiennymi oceniono za pomocą współczynników: R Spearmana, τ Kendalla oraz γ.

Zastosowane współczynniki korelacji były statystycznie istotne dla wszystkich analitów w różnych czasach pobrania oraz dla pary aceton – 2-propanol. Wyniki wskazują również na korelację pomiędzy poziomami metanolu oraz acetonu i 2-propanolu. Można zatem stwierdzić dużą zgodność wyników testów nieparamertycznych z wynikami oceny korelacji za pomocą współczynnika r Pearsona.

4.4.3 *Metody chemometryczne*

Do oceny korelacji pomiędzy zmiennymi zastosowano również standardowe metody chemometryczne, takie jak: analiza składowych głównych (Principial Component Analysis, PCA) oraz analiza skupień (Cluster Analysis, CA). Wyniki przestawiono na rysunku 9.



Rys. 9. Ocena korelacji między poziomami związków lotnych przy wykorzystaniu metod chemometrycznych: (a) PCA, (b) CA – odległość Warda.

Wyniki analizy czynnikowej i analizy skupień potwierdzają silną korelację pomiędzy stężeniami metanolu, acetonu i 2-propanolu w trakcie detoksykacji pacjentów (dla różnych czasów pobrania prób krwi). Obszary zajmowane przez wyniki stężeń metanolu nie pokrywają się z obszarami dla innych analitów. Na obu wykresach stężenia acetonu i 2-propanolu dla wszystkich czasów pobrania próbek krwi znajdują się bardzo blisko siebie. Potwierdza to silną korelację między stężeniami acetonu i 2-propanolu w organizmie. Obszar zajmowany przez zmienne dotyczące poziomów etanolu pokrywa się z obszarami dla 1-propanolu i etanalu.

4.5 *Poziomy obecnie stosowanych markerów choroby alkoholowej u badanej grupy pacjentów Kliniki Toksykologii CM UJ*

W badaniach oznaczono poziomy siedmiu substancji, które traktowane są jako markery uzależnienia od alkoholu. Były to aktywności enzymów wątrobowych: gamma-glutamylotransferazy (GGTP), aminotransferazy asparaginowej (AspAT), aminotransferazy alaninowej (AlAT), fosfatazy zasadowej (AP), jak również średnia objętość krwinek czerwonych (MCV), przeciętna zawartość hemoglobiny w krwince (MHC) oraz poziom bilirubiny.

Największy odsetek pacjentów wykazywał przekroczenie normy dla aktywności trzech enzymów wątrobowych: GGTP, AspAT i AlAT. Wskazywać to może na alkoholowe uszkodzenie wątroby u tych osób. Znaczne przekroczenia normy występują szczególnie dla GGTP (63,2% przypadków), enzymu przemiany białkowej. Poziom bilirubiny został przekroczony w przypadku około 1/3 liczby badanych pacjentów.

4.6 *Korelacja pomiędzy obecnie stosowanymi markerami choroby alkoholowej a stężeniami związków lotnych*

Korelacja pomiędzy poziomami związków lotnych a biochemicznymi markerami choroby alkoholowej była słaba. Jedynie testy nieparametryczne (τ Kendalla oraz γ) wykazały korelację między poziomami metanolu oraz AspAT, AlAT, AP i MCV, acetonu oraz AspAT i AlAT, jak również 2-propanolu i AP. Oznacza to, że na stężenie związków lotnych we krwi może nie mieć wpływu stan wątroby badanej osoby,

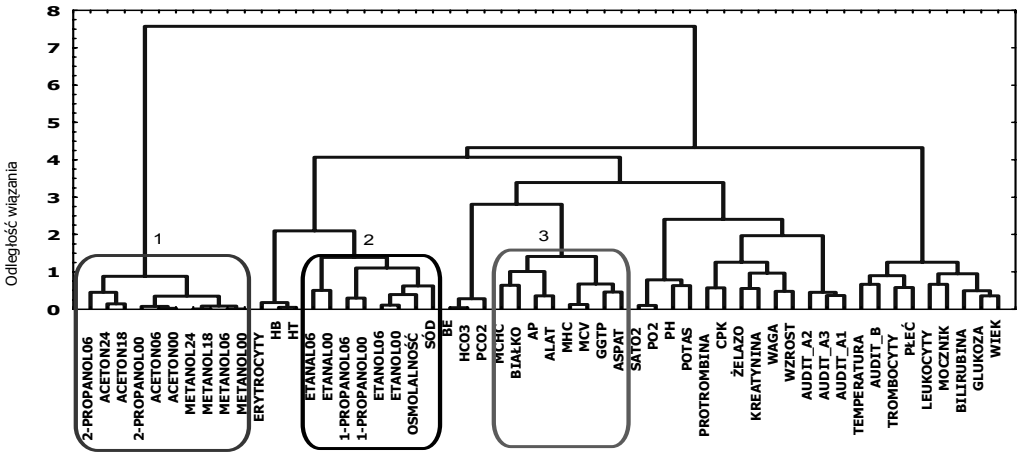
a przyczyn podwyższenia ich poziomu należy upatrywać w innych źródłach.

4.7 *Wyniki podstawowych testów laboratoryjnych*

Stężenia związków lotnych porównano również z wynikami podstawowych testów laboratoryjnych (morfologia krwi, gazometria, pierwiastki śladowe itd.). Zbudowana baza danych o pacjentach zawierała dane ogólne (wiek, wzrost, waga itp.) oraz wynik testu AUDIT, zalecanego przez WHO [15] jako narzędzia przesiewowego do wykrywania problemów alkoholowych.

Średnie wartości testów diagnostycznych wykonanych na badanej grupie pacjentów dla wielu zmiennych znajdują się w normie. Najwięcej pacjentów, ponad 95%, przekroczyło normę dla osmolalności, co wynika z faktu, że etanol jest związkiem, który powoduje zmianę osmolalności roztworu. U dużej grupy badanych przekroczona została norma dla enzymu mięśniowego, jakim jest kinaza kreatyninowa (CPK), dla zawartości globulin α_2, których zawartość wzrosła głównie kosztem globulin γ, oraz dla ciśnienia cząstkowego tlenu (pO_2). Zauważalny był również wzrost liczby leukocytów (który powoduje jednocześnie wzrost wartości hematokrytu) oraz spadek liczby ciał odpornościowych, czyli trombocytów. Wyniki gazometrii wskazują, że u kilkudziesięciu osób zauważalne były objawy kwasicy metabolicznej (spadek pH, pCO_2, BE oraz stężenia HCO_3^- we krwi).

Oceniono również zależności pomiędzy poziomami poszczególnych zmiennych. Ze względu na ich dużą liczbę najlepszą metodą oceny korelacji okazały się metody chemometryczne. Na rysunku 10 przedstawiono dendrogram pogrupowanych zmiennych (stosując odległość 1- r Pearsona oraz metodę aglomeracji Warda). Na dendrogramie zaznaczono 3 skupienia. Pierwsze, zdecydowanie odbiegające od pozostałych, obejmuje lotne markery choroby alkoholowej przy różnych czasach pobrania prób krwi. Klaster nr 2 zawiera etanol oraz związane z nim osmolalność i stężenie jonów sodu, a ponadto etanal i 1-propanol. Skupienie nr 3 zawiera wszystkie, oprócz bilirubiny, obecnie stosowane markery choroby alkoholowej.



Rys. 10. Dendrogram - wynik analizy skupień zmiennych zawartych w bazie danych obejmującej wyniki pacjentów Kliniki Toksykologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego.

4.8 *Wyniki oznaczeń związków lotnych we krwi osób okazjonalnie spożywających napoje alkoholowe*

Badane związki lotne, czyli aceton, etanal, etanol, metanol, 1-propanol i 2-propanol, oznaczono we krwi osób pijących okazjonalnie, stosując metodę chromatografii gazowej w połączeniu z mikroekstrakcją do fazy stałej (SPME).

U żadnej z badanych osób wartości progowe rozpoznawania choroby alkoholowej nie zostały przekroczone. W tabeli 5 porównano maksymalne stężenia związków lotnych we krwi osób okazjonalnie pijących alkohol z ich stężeniami

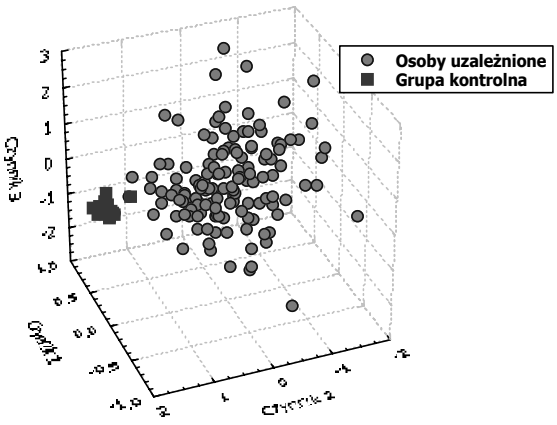
u pacjentów Kliniki Toksykologii Collegium Medicum UJ przy przyjęciu do szpitala, i poddano ocenie statystycznej (różnicę między średnimi oceniono za pomocą testu t-Studenta).

Tabela 5. Porównanie maksymalnych stężeń związków lotnych uzyskanych dla grupy kontrolnej z ich stężeniami u pacjentów Kliniki Toksykologii CM UJ przy przyjęciu do szpitala.

Związek	Grupa kontrolna		Osoby uzależnione		t	p
	Średnia	SD	Średnia	SD		
Aceton	1,75	0,65	10,75	25,69	1,26	0,210
Etanal	1,58	0,85	5,58	3,68	3,90	< 0,001
Etanol	0,77	0,17	3,10	1,11	7,55	< 0,001
Metanol	3,36	1,04	28,69	38,79	2,35	0,020
1-Propanol	0,29	0,19	1,10	1,31	2,23	0,027
2-Propanol	0,80	0,39	4,59	8,96	1,52	0,130

Różnice pomiędzy stężeniami związków lotnych we krwi osób uzależnionych oraz pijących okazjonalnie są znaczne i dla większości analitów statystycznie istotne. Niskie wartości współczynników t wynikają z wysokich wartości odchylenia standardowego dla grupy osób uzależnionych.

Stężenia związków lotnych w obu grupach porównano również, stosując metody chemometryczne. Na rysunku 11 przedstawiono współrzędne poszczególnych probantów w układzie trzech pierwszych składowych głównych.



Rys. 11. Obiekty (probanci) w układzie współrzędnych trzech pierwszych składowych głównych.

Jak widać na powyższym rysunku, przy uwzględnieniu tylko trzech pierwszych składowych (czynników) głównych grupa kontrolna jest dobrze oddzielona od osób uzależnionych od alkoholu.

5 PODSUMOWANIE

- Zmodyfikowano „tradycyjną" chromatograficzną (GC) procedurę oznaczania etanolu metodą *headspace*, co pozwala na równoczesne oznaczanie innych związków lotnych we krwi.
- Opracowano chromatograficzną (GC) metodę z zastosowaniem SPME. Ze względu na połączenie analizy fazy nadpowierzchniowej z selektywną adsorpcją na włóknie, metoda pozwala na oznaczanie analitów nawet na fizjologicznych poziomach stężeń.
- Obie opracowane metody analityczne, ze względu na swoją prostotę oraz fakt, że są „przyjazne dla środowiska", mogą być rekomendowane do wykorzystania w laboratoriach klinicznych i sądowych.
- Opracowane metody wykorzystano do oceny przydatności związków lotnych jako markerów choroby alkoholowej.
- Z przebadanej grupy związków najefektywniejszym markerem okazał się metanol.
- Stwierdzono, że eliminacja metanolu u osób uzależnionych zachodzi równolegle z eliminacją etanolu.
- Szybkość eliminacji etanolu u osób uzależnionych znacznie przewyższała wartość przyjmowaną w retrospektywnych obliczeniach stężenia etanolu.
- Stężenia związków lotnych we krwi osób uzależnionych były znacząco wyższe w porównaniu do osób pijących okazjonalnie.
- Korelacja pomiędzy poziomami związków lotnych a biochemicznymi markerami choroby alkoholowej była słaba. Oznacza to, że na stężenie związków lotnych we krwi może nie mieć wpływu stan wątroby badanej osoby, a przyczyn podwyższenia ich poziomu należy upatrywać w innych źródłach.

BIBLIOGRAFIA

1) Barz J., Sprung R., Freudenstein P., Nimmerrichter A., Lesch O.M., Jacob B. (1988). Investigations on methanol kinetics in alcoholics. *Blutalkohol*, 25, 163-171.
2) Bilzer N., Penners B.M., Conrad A. (1991) Die Methanolkinetik bei chronischem Alkoholismus. *Blutalkohol*, 28, 377-392.
3) DzU 1997, nr 98, poz. 602; zm. Nr 123, poz.779 oraz nr 160, poz.1086.
4) European Pharmacopeia. (1987). 2nd Edition, Sainte Ruffine, France.

5) Gilg Th., von Meyer L., Liebhardt E. (1987). Formation and accumulation of endogenous methanol under the influence of ethanol. *Blutalkohol*, 24, 321-332.
6) Haffner H.-Th., Banger M., Graw M., Besserer K., Brink T. (1997). The kinetics of methanol elimination in alcoholics and the influence of ethanol. *Forensic Science International*, 89, 129-136.
7) Haffner H.-Th., Wehner H.-D., Scheytt K.-D., Besserer K (1992). The elimination kinetics of methanol and the influence of ethanol. *International Journal of Legal Medicine*, 105, 111-114.
8) Iffland R., Schmidt V., Öhmichen M., Schmidtmann U., Norpoth, T. (1988). Aceton- und Isopropanol-Konzentration im Blut Abhängigkeit vom akuten und chronischen Alkoholkonsum (Alkoholismus). *Blutalkohol* 25, 80-96.
9) Jones AW. (2000). Elimination half-life of acetone in humans: case reports and review of the literature. *Journal of Analytical Toxicology*, 24, 8-10.
10) Jones AW., Sternebring B. (1992). Kinetics of ethanol and methanol in alcoholics during detoxification *Alcohol & Alcoholism*, 27, 641-647.
11) Massart D.L., Vandeginste B.G.M., Deming S.N., Michotte Y., Kaufman L. (1989). *Chemometrix: a textbook*, vol.2, Elsevier, Amsterdam.
12) Musshoff F., Daldrup Th., Bonte W., Leitner A., Nimmerichter A., Walter H., Lesch O.M. (1995). Ethanolunabhängige Methanolelimination bei chronischen Alkoholikern. *Blutalkohol*, 32, 317-336.
13) Musshoff F., Dalrup Th. (1998). Determination of biological markers of alcohol abuse. *Journal of Chromatography B*, 713, 245-264.
14) National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism (NIAAA). (1998). *The Economic Costs of Alcohol and Drug Abuse in the United States*, Bethesda, USA.
15) Saunders JB. (1993). Development of the Alcohol Use Disorders Identification Test (AUDIT): WHO Collaborative Project on Early Detection of Persons with Harmful Alcohol Consumption. *Addiction* 88, 791-804.
16) Zuba D. (1999). The determination of ethanol and other volatile compounds in biological fluids. *Beiträge zur Analytischen Chemie, Umweltanalytik und Chemometrik*, FSU Jena, 3, 9-15.
17) Zuba D., Chłobowska Z., Parczewski A. (1997) Identification of alcoholic beverages on the basis of quantitative analysis of impurities. *Problems of Forensic Sciences*, 35, 42-58.
18) Zuba D., Chłobowska Z., Parczewski A. (1998) Analysis of volatile organic compounds in blood of people consuming alcoholic drinks by means of gas chromatography. *Problems of Forensic Sciences*, 38, 36-55.
19) Zuba D., Gubała W., Piekoszewski W., Pach J., Parczewski A. (2002). Methanol as a marker of alcohol addiction. *Problems of Forensic Sciences*, 49, 59-72.
20) Zuba D., Parczewski A. Optimization of solid phase microextraction conditions for GC determination of volatiles. *Proceedings of the 39th TIAFT Triennial Meeting*, Praga 2001.
21) Zuba D., Parczewski A. (2001). Usefulness of volatiles determination for screening of alcohol addicted drivers. *Proceedings of the 5th International Symposium on Forensic Sciences*, Liptovský Ján, P 22, 1-6.
22) Zuba D., Parczewski A. (2001). Wykorzystanie metod chemometrycznych w ocenie danych do kalibracji w wieloskładnikowej analizie chromatograficznej. *Materiały konferencyjne I Konferencji „Chemometria – metody i zastosowania"*, 93-101.
23) Zuba D., Parczewski A., Chłobowska Z. (2001). Random error propagation in gas chromatographic analysis. *Chemia Analityczna,* 46, 653-667.
24) Zuba D., Piekoszewski W., Pach J., Winnik L., Parczewski A. (2002). Concentration of ethanol and other volatile compounds in the blood of acutely poisoned alcoholics. *Alcohol*, 26/1, 17-22.
25) Zuba D., Parczewski A., Reichenbächer M. (2002). Optimization means of solid phase microextraction conditions for gas chromatographic determination of ethanol and other volatile compounds in blood. *Journal of Chromatography B*, 773/1, 75-82.
26) Zuba D., Parczewski A., Różańska M. Effect of salt addition on sensitivity of HS-SPME-GC method of volatiles determination. *Proceedings of the 39th TIAFT Triennial Meeting*, Praga 2001.