

DETERMINATION OF CARBOXYMYOGLOBIN IN CARDIAC AND FEMORAL MUSCLES BY MEANS OF HEADSPACE GAS CHROMATOGRAPHY

Grzegorz BUSZEWICZ, Roman MADRO

Chair and Department of Forensic Medicine, Medical Academy, Lublin

ABSTRACT: The method of carboxymyoglobin (COMb) determination in cardiac and femoral muscles by means of headspace capillary gas chromatography using an O-FID detector is presented. Material was obtained from four corpses. Three samples were collected from each muscle and analysed. Detectibility of several per cents of COMb, precision of not worse than $SDr = 0.11$ and good repeatability of results were achieved. The analytical procedure with simplified calibration proposed earlier [2] can also be used for routine COMb determinations in muscles.

KEY WORDS: Carbon monoxide; Carboxymyoglobin determination; Gas chromatography.

Z Zagadnień Nauk Sądowych, z. XLIV, 2000, 76–84

Received 25 August 2000; accepted 17 October 2000

INTRODUCTION

High concentrations of carboxyhemoglobin (COHb) in blood samples collected during autopsy (heart cavity blood is the best sample) allow us to ascertain that death was caused by carbon monoxide poisoning [1, 8]. However, in situations where thermal coagulation of blood takes place, muscle samples can be used as an alternative material. It is assumed that after ending of distribution, 99% of non-vessel CO is bound with myoglobin [5].

COMb is not determined commonly, because first attempts at its determination were very complicated [1, 5, 6]. It was only when gas chromatography was applied with the use of catalytic reduction of CO to methane by Iffland et al. [5] that a simple and efficient procedure was available. But it requires the application of an atomic absorption spectrophotometer in addition to a gas chromatograph, and can therefore only be used in well-equipped laboratories. For this reason the authors assumed that simplified calibration, based on saturation of an investigated muscle with CO *in vitro* according to a procedure described in the work of Cardeal et al. [4], could also be useful for COMb determination. This method was earlier used in carboxy-

hemoglobin determination by means of a headspace GC with O-FID detection [2, 7].

Therefore the authors decided to determine:

1. The precision [10] which can be achieved in routine analysis¹ with the mentioned simplifications,
2. The repeatability of results [10] obtained using the proposed method and performed on the same material after 2 days.

MATERIAL AND METHODS

Fragments of a left cardiac ventricle and quadriceps femoral muscles collected from four corpses, whose blood COHb concentration exceeded 60%, constituted the investigated material. COMb was determined according to the following procedure: a fragment of muscle was frozen at -20°C and later over 10 g of small shavings (not thicker than 2 mm) were cut from the frozen material and placed in a porcelain mortar. Liquid nitrogen was poured over the shavings and they were immediately ground to powder with a beater. 10 g of powder was weighed and put into a 50 ml beaker, 30 ml of water was added and the mixture was stirred for 5 minutes. After about 1 minute the water extract was decanted, and 10 ml of the extract was saturated with CO for 20 min. This caused 100% saturation of myoglobin². Calibration solutions with COMb content of 10 and 20% were prepared from the CO-saturated water extract. 5 ml of water extract coming from the investigated material was put into 3 headspace vials, and the COMb calibration solutions into the remaining 3 vials. After capping, each vial was flushed with helium for 30 seconds [2]. 1.5 ml of 20% potassium ferricyanide was added using a syringe to each vial. The prepared samples were incubated in a headspace injector thermostat at 80°C for 6 minutes and then analysed by means of the GC method.

A Fisons 8160 gas chromatograph equipped with O-FID detector and HS-800 autosampler was used. A J&W GS-Molesieve 30/0.52 column at constant temperature (40°C) and helium as a carrier gas at 65 kPa were applied.

The carbon monoxide used for saturation of calibration samples was obtained by reaction of concentrated sulphuric acid with 80% formic acid.

¹ I.e. when the result of determination is the mean of the measurements of three samples.

² Similar to blood [2], CO-saturation of water extract from muscles for a time period of over 20 minutes, did not cause an increase in COMb concentration.

RESULTS AND DISCUSSION

The graphs of eight individual calibrations are shown in Figure 1, and chromatograms relating to the first case in Figure 2.

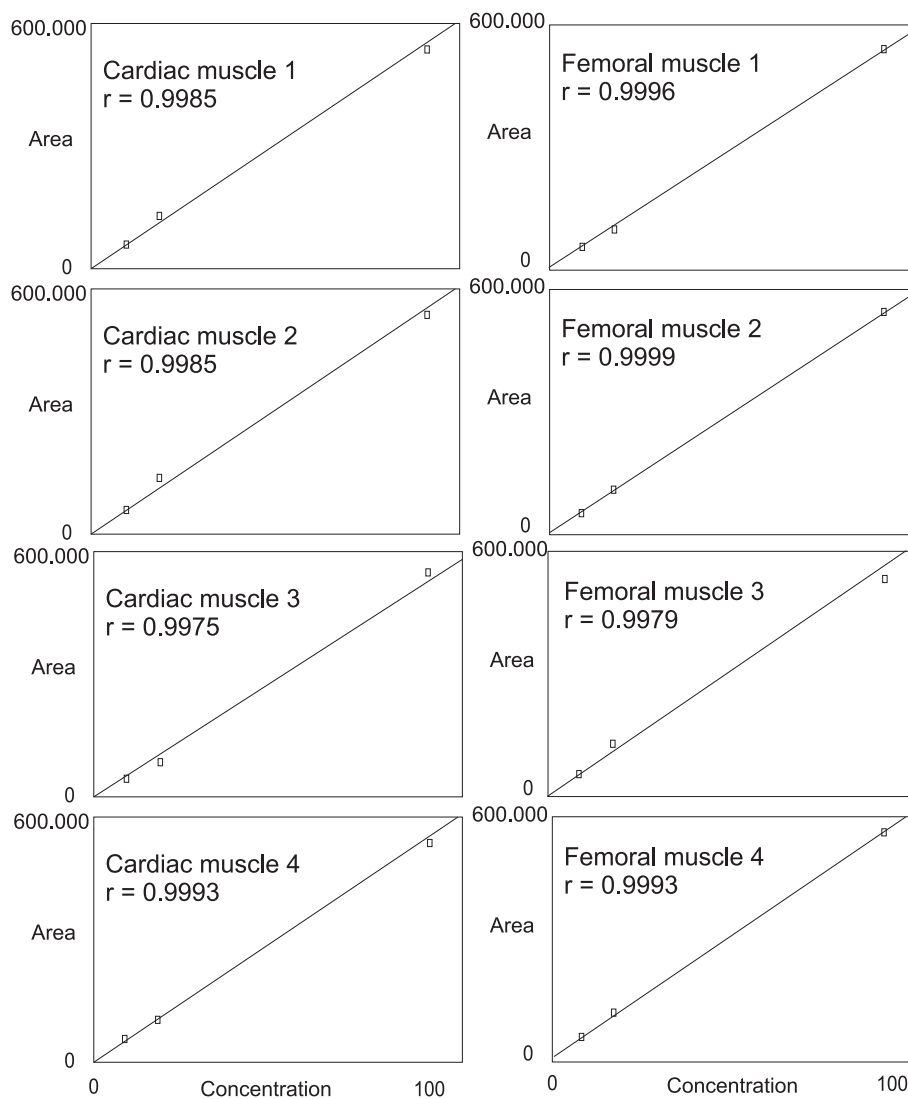


Fig. 1. Calibration curves for COMb determinations in the material collected from 4 cadavers, i.e. in 4 samples of left ventricle muscles and 4 ones of quadriceps femoral muscles.

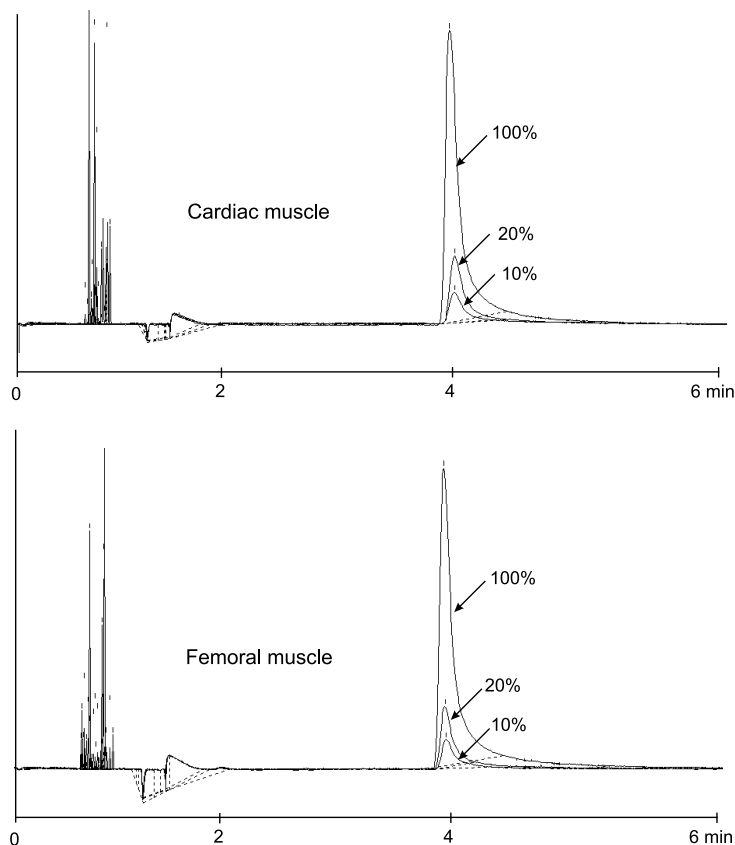


Fig. 2. Chromatograms of carbon monoxide released from standard (10%, 20%, and 100%) solutions of COMb for one cardiac and one femoral muscle.

It follows from Figure 2 that the chromatographic peaks of CO in calibration samples corresponding to the lowest COMb concentration (10%) in femur and heart muscles were significantly above the baseline. This meant that the signal coming from the chromatograph's detector was integrated by the Chrom-Card software applied without the need for manual correction. This means that the detection limit was lower than 10% of COMb³. When the procedure is performed correctly a reduction or disappearance of the detection signal (whose result is an increase of the detection limit⁴) may only indicate that the nickel catalyst has been consumed and needs to be replaced.

³ Visible chromatographic peaks of CO were obtained for 1% COMb solution during preliminary attempts which are not included in this article.

⁴ This is easy to ascertain when calibration is being performed.

But one should remember that long-term use of the “molecular-sieve” column decreases its resolution skills and shortens the retention time of CO [9]. Therefore it is essential to heat the column for 3 hours at 300°C periodically.

The calibration curves were linear in the range from 10 to 100% of COMb and the correlation coefficient between the COMb concentration and peak area exceeded 0.99 for each curve (Figure 1). This means that potassium ferricyanide guaranteed the freeing of CO proportional to COMb concentration. This is essential for the presented procedure because external standard calibration is applied.

The results of COMb determinations in muscles are shown in Table 1. It follows from Table 1 that the standard deviation (SD) calculated from 3 determinations in one muscle for 8 different muscles ranged from 0.29% to 2.40% and the relative standard deviation (SDR) ranged from 0.02 to 0.11.

TABLE I. CARBOXYMYOGLOBIN (COMB) CONCENTRATION [%] IN MATERIAL COLLECTED FROM 4 CADAVERS, I.E. IN 4 SAMPLES OF LEFT CARDIAC VENTRICLE MUSCLES AND 4 SAMPLES OF QUADRICEPS FEMORAL MUSCLES

Number of material	Heart muscle						Femur muscle					
	1	2	3	Mean	SD	SDr	1	2	3	Mean	SD	SDr
First series of determinations												
1	29.32	27.34	27.69	28.12	1.06	0.04	14.50	12.66	12.54	13.23	1.10	0.08
2	30.30	29.73	26.75	28.93	1.91	0.07	9.57	11.36	11.79	10.91	1.18	0.11
3	37.37	34.12	35.14	35.54	1.66	0.05	20.42	21.27	19.82	20.50	0.73	0.04
4	10.00	11.56	12.54	11.37	1.28	0.11	12.67	14.76	15.16	13.86	1.34	0.09
Second series of determinations (after 2 days)												
1	28.55	27.78	27.00	27.78	0.78	0.03	13.48	13.03	12.95	13.15	0.29	0.02
2	29.44	30.26	25.76	28.49	2.40	0.08	10.94	12.22	10.18	11.11	1.03	0.09
3	38.36	39.76	37.93	38.68	0.96	0.02	22.74	26.28	22.74	23.92	2.04	0.09
4	12.93	13.94	15.74	14.20	1.42	0.10	11.08	11.67	10.10	10.95	0.79	0.07

SD – standard deviation; SDR – relative standard deviation.

It is expected that the error level will be at several per cents of COMb during routine investigations (when the result is usually based on 3 determinations). Thus precision sufficient for diagnostic and opinion-issuing needs was attained.

A comparison of the results of the first series with those of the second indicated that absolute differences between the series were only from 0.08% to 3.42%. When the standard deviation is taken into consideration, this shows that the proposed method of carboxymyoglobin determination is repeatable.

CONCLUSIONS

1. The proposed investigation procedure is characterised by good detectability and repeatability. Therefore it can be used in routine toxicological practice.
2. An advantage of the described method is that the COMb level can be determined in any laboratory equipped with a gas chromatograph with O-FID detector.

References:

1. Blackmore D. J., The determination of carbon monoxide in blood and tissue, *Analyst* 1970, vol. 95, pp. 439–458.
2. Buszewicz G., Mađro R., Chromatographic determination of carbon monoxide and carboxyhaemoglobin by the head-space technique using catalytic microreactor with FID detector, *Z Zagadnień Nauk Sądowych* 1997, z. XXXVI, s. 132–140.
3. Bogusz M., Pach J., Karboksyhemoglobina i hemoglobina niezwiązana jako wskaźniki ciężkości zatrucia tlenkiem węgla, *Archiwum Medycyny Sądowej i Kryminologii* 1978, s. 5–9.
4. Cardeal Z. L., Pradeau D., Hamon M. [et al.], New calibration method for gas chromatographic assay of carbon monoxide in blood, *Journal of Analytical Toxicology* 1993, vol. 17, pp. 193–195.
5. Iffland R., Klose H., Eiling G. [et al.], Zur Messung des Kohlenmonoxidgehaltes in der Muskulatur, *Archiv für Kriminologie* 1990, Bd. 186, S. 75–84.
6. Kijewski H., Seefeld K. P., Pohlmann K., Eine neue Methode zur Carboxihämoglobin-Bestimmung in flüssigem und getrocknetem Blut mittels Fourier transform Infrarotspektrometrie, *Zeitschrift für Rechtsmedizin* 1985, Bd. 95, S. 67–74.
7. Mađro R., Buszewicz G., Evaluation of the usefulness of the gas chromatography method for the determination of various concentrations of carboxyhaemoglobin in blood samples with different haemoglobin contents, *Z Zagadnień Nauk Sądowych* 1998, z. XXXVII, s. 55–67.
8. Moeschlin S., *Klinik und Therapie der Vergiftungen*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1986, S. 276–291.
9. Palus J., Majka J., Sokal J., Oznaczanie niskich stężeń tlenku węgla w powietrzu metodą chromatografii gazowej, *Medycyna Pracy* 1982, t. 5–6, s. 283–288.
10. Szmal Z. D., Lipiec T., *Chemia analityczna z elementami analizy instrumentalnej*, PZWL, Warszawa 1996, s. 371–375.

OZNACZANIE MIOGLOBINY TLENKOWĘGLOWEJ W MIĘŚNIU SERCA ORAZ MIĘŚNIU UDA TECHNIKĄ *HEADSPACE* CHROMATOGRAFII GAZOWEJ

Grzegorz BUSZEWICZ, Roman MĄDRO

WSTĘP

Wykazanie wysokiego stężenia hemoglobiny tlenkowej (COHb) w próbkach krwi pobranych podczas sekcji zwłok (najlepiej z jam serca) pozwalają na stwierdzenie, że zgon nastąpił w wyniku zatrucia tlenkiem węgla [1, 8]. Jednak wówczas, gdy dojdzie do termicznej koagulacji krwi, alternatywny materiał diagnostyczny mogą stanowić próbki mięśni. Przyjmuje się bowiem, że po zakończeniu dystrybucji 99% pozanaczyniowego CO znajduje się w postaci związanej z mioglobina [5].

COMb nie jest jednak powszechnie oznaczana. Wynika to z faktu, że pierwsze próby jej oznaczania były zbyt skomplikowane [1, 5, 6]. Dopiero zastosowanie chromatografii gazowej z wykorzystaniem katalitycznej redukcji CO do metanu umożliwiło Ifflandowi i in. [5] opracowanie metodyki bardziej wydajnej i prostej. Wymaga ona jednak zastosowania nie tylko chromatografu gazowego, ale również spektrofotometru absorpcji atomowej, dlatego może być używana jedynie w dobrze wyposażonych laboratoriach. W związku z tym autorzy założyli, że uproszczona kalibracja polegająca na wysycaniu badanego mięśnia CO *in vitro* w sposób opisany w publikacji Cardeala i in. [4], która wcześniej została zaadoptowana do metody oznaczania karboksyhemoglobiny techniką *headspace* z detekcją O-FID [2, 7], może również okazać się przydatna do oznaczania COMb.

Autorzy postanowili więc określić:

1. Precyzję [10], jaką w warunkach rutynowej analizy¹ można osiągnąć stosując wspomniane uproszczenia;
2. Powtarzalność wyników oznaczeń [10] otrzymanych tą metodą i dotyczących tego samego materiału po upływie dwóch dni.

MATERIAŁY I METODYKA

Materiał badawczy stanowiły wycinki mięśni lewej komory serca i mięśnia czworogłowego uda pobrane z czterech zwłok osób, w których krwi wykryto COHb w stężeniu powyżej 60%. Procedura oznaczania COMb przebiegała następująco: wycinek mięśnia zamrażano w temperaturze -20°C . Z zamrożonego materiału strugano do porcelanowego moździerza kilkanaście gramów drobnych (nie grubszych niż 2 mm) wiórek. Wiórki te zalewano ciekłym azotem i natychmiast rozdrabniano tłuczkiem do uzyskania proszku. 10 g proszku odważano do zlewek o pojemności 50 ml, dodawa-

¹ Tj. gdy wynik oznaczenia jest średnią z pomiaru trzech próbek.

no 30 ml wody, mieszano 5 przez min, a następnie po ok. 1 min dekantowano wyciąg wodny. 10 ml wyciągu wodnego nasycano CO przez 20 min, co powodowało 100% wysycenie Mb². Z nasycanego CO wyciągu wodnego (100% COMb) sporządzano roztwory kalibracyjne o zawartości 10% i 20% COMb. Do 3 fiolek przeznaczonych do badań metodą *headspace* odpipetowywano po 5 ml wyciągu wodnego z badanego materiału, a do pozostałych 3 fiolek roztwory kalibracyjne COMb. Po zakapslowaniu każdą fiolkę dwukrotnie płukano helem przez 30 sekund [2]. Do każdej fiołki dodawano za pomocą strzykawki 1,5 ml 20% żelazicyjanku potasu. Tak przygotowane próbki inkubowano w termostacie dozownika *headspace* w temperaturze 80°C przez 6 min, po czym analizowano metodą GC.

Użyto chromatografu gazowego Fisons 8160 z detektorem O-FID i autosamplerem HS-800. Zastosowano stałą temperaturę (40°C) kolumny J&W GS-Molesieve 30/0,52 oraz gaz nośny – hel pod ciśnieniem 65 kPa.

Tlenek węgla służący do nasycania prób kalibracyjnych otrzymywano w wyniku reakcji stężonego kwasu siarkowego z 80% kwasem mrówkowym.

WYNIKI BADAŃ I OMÓWIENIE

Wykresy ośmiu indywidualnych kalibracji przedstawia rycina 1, a rycina 2 chromatogramy, które dotyczyły przypadku nr 1.

Z ryciny 2 wynika, że te piki chromatograficzne CO, które w próbach kalibracyjnych odpowiadały najniższemu (10%) stężeniu COMb w mięśniach uda oraz mięśniach serca, były wyraźnie uniesione ponad linię podstawową, co sprawiało, że sygnał z detektora chromatografu był integrowany przez użyty program Chrom-Card bez konieczności wprowadzania ręcznych korekt. Osiągnięto zatem próg wykrywalności niższy od 10% COMb³. Przy prawidłowo wykonanej procedurze osłabienie lub zanik sygnału detekcji (którego skutkiem jest podwyższenie progu wykrywalności⁴) może więc świadczyć jedynie o zużyciu katalizatora niklowego i należy go wówczas wymienić na nowy.

Trzeba jednak pamiętać, że długotrwałe używanie kolumny typu „sita molekularnego” powoduje zmniejszanie zdolności rozdzielczej, co objawia się skróceniem czasu retencji tlenku węgla [9]. W związku z tym niezbędne jest okresowe wygrzewanie kolumny przez 3 godziny w temperaturze 300°C.

Krzywe kalibracyjne miały liniowy przebieg w zakresie od 10 do 100% COMb, zaś współczynnik korelacji między stężeniem COMb a powierzchnią pików wynosił powyżej 0,99 dla każdej z krzywych (rycina 1). Żelazicyjanek potasu zapewniał zatem uwalnianie tlenku węgla proporcjonalnie do stężenia COMb. Jest to bardzo istotne dla omawianej metodyki, przede wszystkim ze względu na zastosowanie w niej kalibracji metodą standardu zewnętrznego.

² Podobnie jak w przypadku krwi [2], nasycanie tlenkiem węgla wodnego wyciągu z mięśni przez okres czasu dłuższy 20 minut nie powodowało wzrostu stężenia COMb.

³ Podczas wstępnych prób, których nie ujęto w tej pracy, udało się uzyskać wyraźne piki chromatograficzne CO dla 1% roztworu COMb.

⁴ Jest to łatwe do stwierdzenia w trakcie wykonywania kalibracji.

Wyniki oznaczeń COMb w mięśniach przedstawia tabela I. Wynika z niej, że odchylenie standardowe (SD) obliczone na podstawie 3 oznaczeń w jednym mięśniu dla 8 różnych mięśni wynosiło od 0,29% do 2,40%, zaś względne odchylenie standardowe (SDr) od 0,02 do 0,11.

Podczas rutynowych badań (w których wynik przeważnie opiera się na 3 oznaczeniach) należy się spodziewać błędów zaledwie na poziomie kilku procent COMb. Osiągnięto więc precyzję zupełnie wystarczającą dla potrzeb diagnostycznych (opiniotwórczych).

Natomiast zestawienie rezultatów pierwszej serii oznaczeń z rezultatami drugiej serii wykazało, że bezwzględne różnice między nimi wynosiły zaledwie od 0,08% do 3,42%, co (przy uwzględnieniu wielkości odchylenia standardowego) świadczy o tym, że zaproponowana w niniejszej pracy metoda oznaczania mioglobiny tlenkowej jest powtarzalna.

PODSUMOWANIE

1. Przedstawiona w tej pracy metodyka badań charakteryzuje się dobrą wykrywalnością i powtarzalnością – może więc być stosowana w rutynowej praktyce toksykologicznej.
2. Zaletą opisywanej metody jest to, iż przy jej użyciu można oznaczać poziom COMb w każdym laboratorium wyposażonym w chromatograf gazowy z detektorem O-FID.