



GAS CHROMATOGRAPHIC DETERMINATION OF CARBOXYHAEMOGLOBIN (COHb) IN POST-MORTEM BLOOD SAMPLES

Juliusz ADAMSKI, Dariusz ZUBA

Institute of Forensic Research, Kraków, Poland

Abstract

A method for carboxyhaemoglobin (COHb) determination in post-mortem blood samples by headspace gas chromatography with the use of a methanizer and flame ionization detector (FID) was proposed. COHb concentration was determined by referring the analytical signal obtained for a blood sample to a calibration curve, which had been prepared using a portion of the (same) analysed blood sample that had been completely saturated with CO. Development of the method encompassed optimization of the sample preparation procedure and instrumental parameters. Analytical characterization of the developed method was also performed. It was additionally shown that preliminary reduction of oxidized forms of haemoglobin by addition of sodium dithionite is the key factor influencing method accuracy. The applied procedure ensures selectivity and specificity. It was also shown that the method was precise, with the coefficients of variation between 1.2% (for 50% COHb in blood) and 6.5% (for about 1% COHb). Linearity was obtained from *LOQ* (about 0.9% COHb) to 100% COHb. Accuracy was assessed by comparison of the results obtained by the proposed procedure with alternative methods, i.e. the Hartridge reversion spectroscope and the spectrophotometric method by Fretwurst and Meinecke, which showed that the proposed assay can be applied even to the analysis of highly decomposed post-mortem blood samples.

Key words

Carboxyhaemoglobin (COHb); Post-mortem blood analysis; Head space gas chromatography (HS-GC); Methanizer.

Received 3 January 2012; accepted 29 February 2012

1. Introduction

Carbon monoxide (CO) is a colourless and odourless gas that causes acute (including lethal) and chronic toxicity in humans and animals. Although low concentrations (50–120 ppb) are considered a normal constituent of the natural environment, about 60% of carbon monoxide found in the non-urban troposphere is attributed to human activities, as a product of the incomplete combustion of carbon-containing fuels. Ambient concentrations of carbon monoxide in or near urban and industrial areas substantially exceed global background levels. Vehicle emissions in industrial

countries account for about 50–60% of total emission of carbon monoxide.

In animals and humans, CO is also endogenously produced [4]. Under normal physiological conditions, the predominant source of endogenous carbon monoxide is the haem oxygenase-catalyzed degradation of haem, derived from the turnover of haemoglobin (Hb) and other haemoproteins [18, 19]. Other, usually less significant, endogenous CO sources are lipid peroxidation [17], photooxidation [16], bacterial haem metabolism [6] and cytochrome P450-mediated breakdown of halogenated hydrocarbons [2]. CO metabolism to carbon dioxide has also been described [10, 20].

CO mediates its toxic effects primarily by strongly binding to haemoglobin molecules, forming carboxyhaemoglobin (COHb), thereby reducing the oxygen-carrying capacity of blood. CO affinity for Hb is approximately 210 times that of oxygen. Tissue hypoxia, due to decreased arterial oxygen content and tissue oxygen pressure, is engendered [11, 12]. In addition to haemoglobin, CO can be bound with other haem-containing molecules [1], such as cytochrome c oxidase (thus influencing cellular respiration), catalase or myoglobin, which may contribute to the observed toxic effects. The heart and brain are the most vulnerable organs to CO-induced hypoxia due to their high metabolic rate [14].

CO, besides its toxic effects, possesses the ability to stimulate cyclic guanosine monophosphate (cGMP), a common regulator of ion channel conductance, glycogenolysis, and cellular apoptosis [15]. Its vasoactive effects have been reported in the pulmonary vasculature [5] and in the liver [13], where CO acts to maintain portal venous vascular tone in a relaxed state.

Standard spectrometric methods, which are routinely used for COHb determination, can sometimes deliver unreliable results, especially in the case of blood samples that have been stored for a long time or post-mortem ones. A common cause of this phenomenon is spontaneous production of methaemoglobin (MetHb) and sulphaemoglobin (SHb). What is more, when a blood sample is subjected to thermal shock (e.g. in fire victims), thermocoagulation is observed, which results in a significant decrease in total soluble haemoglobin. In many cases, the appearance of MetHb is also noticed. For these reasons, methods based on the release of carbon monoxide from the haemoglobin molecule usually give more accurate results than spectrometric methods [3]. COHb concentration can be assessed on the basis of the amount of the released gas, when the total Hb amount is known. The latter value can be determined separately by several different methods, for example the cyanmethaemoglobin method, or by saturating part of the analysed blood to 100% COHb.

The aim of the study was to develop a gas chromatographic method that can be used for blood COHb determination, which could be useful in the analysis of samples when no satisfactory results can be obtained with spectral methods.

2. Materials and methods

2.1. Instruments

An Autosystem XL gas chromatograph equipped with an HS 40 headspace analyser, a column packed with molecular sieve 5 Å 80/100 mesh and flame ionization detector (FID), all manufactured by Perkin Elmer (USA), were used in the study. The instrument was modified by adding a methanizer unit packed with Ni catalyst between the column and the detector. Totalchrom Navigator 6.3.1 software was used for controlling the instrument parameters and gathering data. A Vortex MS2 by IKA (Germany) was used in sample preparation.

A Hartridge reversion spectroscope by Beckmann (United Kingdom) and Epoll-20 spectrophotometer by Poll Ltd. (Poland) were used for COHb determination based on its spectral properties.

2.2. Chemicals

HCOOH (85%), H₂SO₄ (95%) and NH_{3(aq)} (25%) were obtained from Chempur (Poland). Sodium dithionite (Na₂S₂O₄), Na₂CO₃, NaOH and potassium hexacyanoferrate(III), K₃[Fe(CN)₆], were purchased from POCh (Poland). All reagents were of analytical grade. Working solutions were prepared using purified water obtained from the Barnstead NANOpure Diamond system. Nitrogen (99.99%), used for flushing the samples after their saturation with CO, was generated in the laboratory using the Nitrox Ltd. (Great Britain) NDD FCN system. CO was generated *in situ* by gradually mixing concentrated solutions of H₂SO₄ and HCOOH.

2.3. Procedures of COHb determination

Analysis of each real sample was carried out according to a standard procedure of blood analysis for COHb presence applied at the Institute of Forensic Research, Kraków, Poland. This procedure started with quantitative analysis using a low-resolution spectroscope. To this end, blood samples were diluted with 0.1% ammonia solution, and then measurements were performed before and after reduction with a small amount (about 10 mg) of sodium dithionate. Two bands were visible in both spectra if COHb concentration in blood was higher than ca. 15%. Determination of carboxyhaemoglobin was performed using three different methods described below.

2.3.1. Spectroscopic method with the use of a Hartridge reversion spectroscope [8]

The background to this method is the observation that absorption maxima for oxyhaemoglobin (O₂Hb) and COHb, which are visible as bands in low-resolution spectroscope, are located at slightly different wavelengths. The α -band (about 576 nm) displacement is usually used in the measurements due to greater shift and better spectral properties compared to the β band (541 nm). If a blood sample contains both haemoglobin derivatives, the absorption maximum is located between those characteristic for O₂Hb and COHb. The shift of the band position, which depends (non-linearly) on COHb concentration, can be easily and precisely determined using a reversion spectroscope and can be used for quantitative analysis when compared to the value registered for blood free of COHb.

Procedure: a drop of analysed blood and a drop of blood free of COHb were diluted separately with 0.1% Na₂CO₃ in a similar ratio until light red solutions were obtained. The α -band position was registered for both samples, and the difference was calculated. This value was converted into the COHb concentration based on a calibration function determined beforehand.

2.3.2. Spectrophotometric method according to Fretwurst and Meinecke [7]

Chemical conversion of haemoglobin derivatives (apart from COHb) to haemochromogen is made use of in this method. The absorbance of a diluted blood sample is measured ($\lambda = 560$ nm) before (A) and after reduction (B) with sodium dithionite in alkaline solution.

Procedure: the analysed blood was added to 30 ml of 0.1% ammonia in the amount appropriate to obtain a solution of absorbance value between 0.8–1.0. After 15 minutes (required for full haemolysis), the absorbance value was recorded (A). Next, a small portion of sodium dithionite (30 mg) and 0.1 ml of 30% NaOH was added to 10 ml of this solution, then mixed, and then the second absorbance measurement was performed after another 10 minutes (B). The COHb concentration, C_{COHb} , was then calculated taking into account the calibration function, $C_{COHb} = f\left(\frac{B}{A} \cdot 100\%\right)$, determined beforehand.

2.3.3. Gas chromatographic method

This method is based on CO release from the Hb molecule and its subsequent conversion to CH₄ in the methanizer unit and detection by the use of FID. The

method parameters were developed in the study and are presented below.

3. Results and discussion

3.1. Sample preparation procedure

A preliminary blood dilution was performed. Based on performed experiments and taking into account the amount of blood solution necessary for analysis, 0.75 ml of blood sample was 10-fold diluted with water. Then the solution was divided into two parts. 2.5 ml was introduced into a 20 ml headspace vial (analysed sample). The remaining part (5.0 ml) was saturated with CO and, after flushing with nitrogen, used for preparing calibration solutions containing 25%, 50% (obtained by appropriate dilution with water) and 100% COHb. In order to release CO bound to Hb, a water solution of K₃[Fe(CN)₆] was added to the sealed vials by means of syringe. The samples were then mixed for 2 min at 450 rpm to achieve complete analyte liberation, and subjected to GC analysis.

Preliminary data indicated significant differences between the results obtained by spectral methods and the method described above. Therefore, the authors decided to perform complementary studies. An additional reduction step was introduced before sample saturation with CO. For this purpose, 50 mg of sodium dithionite was added to the diluted blood solution, which was then subjected to the procedure described above. The influence of this treatment on the accuracy of the results is discussed in section 3.4.

Moreover, in order to minimize changes in sample solution volume due to solvent evaporation, nitrogen used to remove CO physically dissolved in the sample (not bound with Hb) was initially saturated with water. The effectiveness of such a procedure was verified experimentally – maximal sample mass change observed for wet and dry nitrogen was 0.02 ± 0.01 g and 0.30 ± 0.01 g, respectively.

Different concentrations of releasing reagent, K₃[Fe(CN)₆], were also tested – from 0.07 g/ml to 5.71 g/ml. It was observed that (practically) the same detector signal was generated for K₃[Fe(CN)₆] concentrations greater than 1.07 g/ml in the analysed sample (Figure 1). However, taking into account the fact that blood can differ in total haemoglobin concentration and that small amounts of reducing agent are also added to analysed samples, a higher concentration (2.85 g/ml) was selected for further studies, i.e. 1.0 ml of 10% K₃[Fe(CN)₆] (w/w) solution was added to each vial.

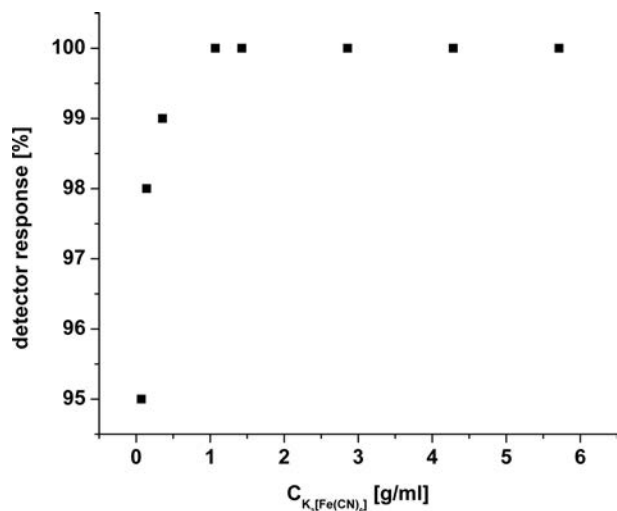


Fig. 1. Influence of releasing agent ($K_3[Fe(CN)_6]$) concentration on detector response.

The duration of the liberation process varied between 5 min and 40 min. Neither a significant difference in CO yield nor a trend in obtained results could be found. Therefore it can be assumed that even a short time of exposure (5 min) to the $K_3[Fe(CN)_6]$ solution leads to complete liberation of bound CO.

As a final step, the influence of preservatives on COHb determination results was taken into account. Both non-preserved blood and blood preserved with sodium fluoride or heparin, taken from the same

person, were analysed. The performed experiments proved that the presence of such preservatives had no significant influence on GC results of COHb determination. The developed procedure of sample preparation is presented in Figure 2.

3.2. Development of chromatographic separation parameters

In the preliminary part of the research, the oven temperature was set according to the literature to 60°C [9]. However, for this temperature, a gradual and significant decrease in CO retention time was observed. The peak returned to its original position after heating the column overnight at 150°C. The observed phenomenon was due to a change (decrease) in column resolution power caused by CO_2 and water adsorption on molecular sieves. In order to overcome this adverse effect, a higher separation temperature (120°C) – at which desorption processes of the mentioned substances were thermodynamically preferential – was used. Moreover, higher temperature allowed sample analysis to be performed in a shorter time. For the selected temperature, CO retention time was 1.388 ± 0.043 min (coefficient of variation, $CV = 3.1\%$, $n = 20$).

Other instrumental parameters of the GC method selected for routine use are presented in Table I.

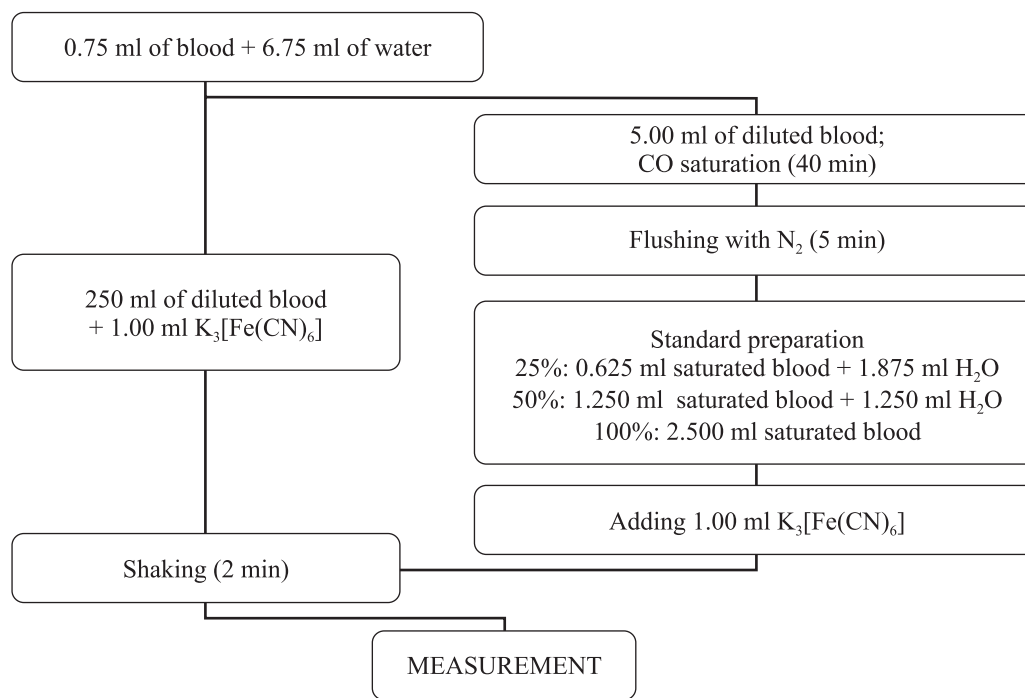


Fig. 2. Procedure of sample preparation prior to GC measurement.

TABLE I. HS-GC-FID METHOD INSTRUMENTAL PARAMETERS

Parameter	Value
Thermostatic temperature	80°C
Thermostatic time	10 min
Needle temperature	100°C
Capillary temperature	110°C
Sample time analysis	3 min
Injection time	0.04 min
Injector temperature	240°C
Carrier gas	N ₂ , 32 ml/min
Methanizer temperature	350°C
Detector temperature	350°C

3.3. Analytical characteristics of the chromatographic method

3.3.1. Selectivity and specificity

Analysis of the gas phase collected above the analyte solution is an easy way to reduce the effect of the matrix and thereby enhance the selectivity of the analytical method. In this case, the selectivity is further enhanced by using chromatographic separation together with a conversion step in the methanizer. Admittedly, not only CO but also CO₂ is transformed to CH₄, which is responsible for detector response, but the carbon oxides are easily and very well separated due to their different retention times. Fig. 3 shows a typical chromatogram of an authentic post-mortem blood sample obtained by the described method (C_{COHb} was 19%). The peaks corresponding to CO and CO₂ were clearly visible and no peaks of other impurities were observed during the analysis. As the CO peak purity is ensured by the chromatographic separation, this method can be considered as specific.

3.3.2. Precision

The precision was estimated at two levels of COHb in blood. The first concentration corresponded to the expected limit of quantification (about 1%), whereas the second one to the lethal level (50%). The CV values were 6.5% ($n = 40$) and 1.2% ($n = 35$), for lower and higher concentrations, respectively.

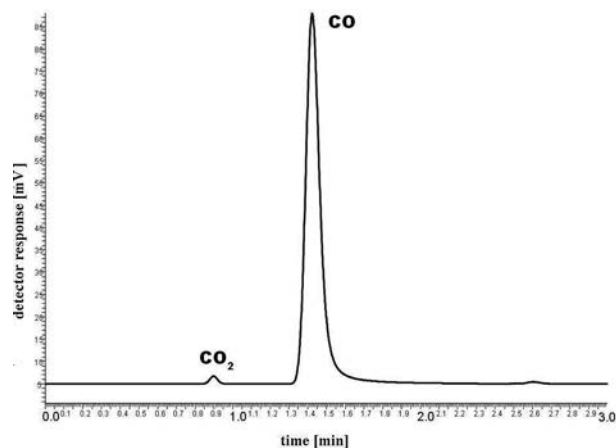


Fig. 3. Typical chromatogram for real blood sample containing COHb.

3.3.3. Sensitivity, LOD and LOQ

As the amount of CO released from the sample (and hence the detector response) depends not only on COHb concentration but also on total haemoglobin content, the latter parameter influences the detector signal. Therefore, different peak areas are obtained for blood samples with the same COHb concentration but different haemoglobin content. This variability can be expressed by differences in method sensitivity. The mean sensitivity was $17962 \pm 5948 \mu V \cdot s \cdot \%^{-1}$ ($CV = 33.1\%$, $n = 28$), and it ranged from $9193 \mu V \cdot s \cdot \%^{-1}$ to $26950 \mu V \cdot s \cdot \%^{-1}$. The results clearly showed that for each sample individual calibration is required.

The values of *LOD* and *LOQ* were calculated according to the following formulas:

$$LOD = \frac{3.3s}{b} \quad LOQ = 3 \cdot LOD,$$

where s is the standard deviation (of the signal) obtained for the solution with low analyte concentration (~1% COHb), while b is the mean method sensitivity. The calculated values of *LOD* and *LOQ* were 0.3% and 0.9%, respectively, which means that the proposed method allows determination of physiological COHb concentrations.

3.3.4. Linearity

In order to examine the linearity, analysis of blood samples with varying COHb concentrations was performed (4 levels of concentrations, 5 replicates on each level). Then, the following plot was constructed:

$$\frac{A}{C_{COHb}} = f(C_{COHb}),$$

where A – CO peak area [$mV \cdot s$] and C_{COHb} – COHb concentration [%].

The plot is presented in Figure 4. Moreover, $\pm 5\%$ deviation from the mean quotient value is drawn (the control lines). As all calculated values are located between these control lines in the whole concentration range, i.e. from LOQ to 100%, one can conclude that a linear relationship between COHb concentration and the detector response exists.

In Figure 5, a typical calibration plot is presented. As described in the “Materials and methods” section, the standard solutions were prepared by saturation of a part of the blood sample to 100% COHb followed by its dilution with water to 25% and 50% COHb. Blank samples were prepared by flushing the analysed blood with air for at least 1 h. An excellent correlation was found, and the coefficients of determination for individual samples were usually greater than 0.9999.

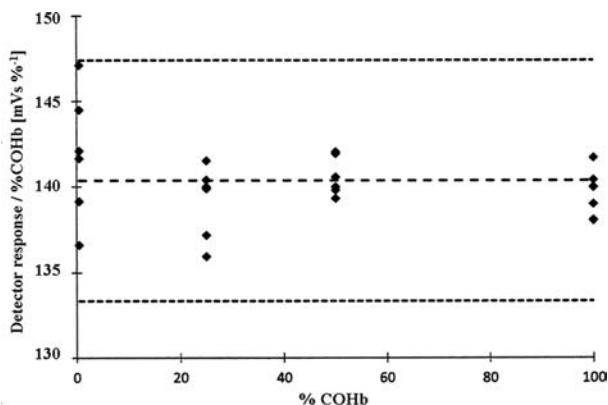


Fig. 4. Linearity examination of GC method of COHb determination.

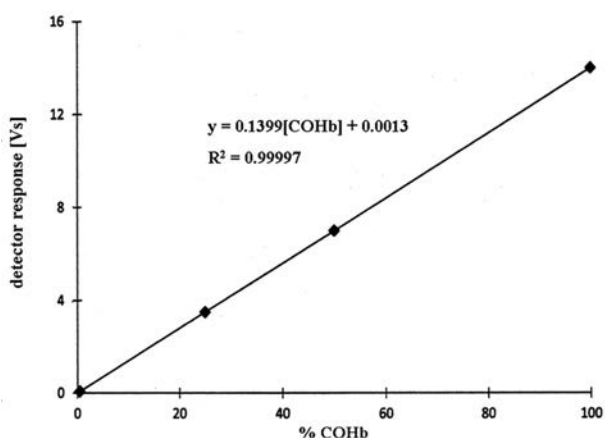


Fig. 5. Typical calibration plot.

3.4. Comparison of COHb determination with the developed chromatographic method and routine spectrometric methods

The practical applicability of the gas chromatographic COHb determination procedure was shown by the analysis of 11 post-mortem blood samples at varying degrees of advancement of putrefaction. Comparison of the results of GC (with and without preliminary sample reduction), spectroscopic and spectrophotometric methods are given in Table II.

For non-reduced samples, a significant overestimation of analyte content, up to 31%, was noted. This phenomenon, observed mainly for highly decomposed blood samples, was probably connected with the presence of other Hb derivatives, such as MetHb or SHb, which do not possess the ability to bind CO molecules. These results clearly show that removal of Hb derivatives containing Fe(III) ion is necessary when the GC method includes a sample saturation step.

When reduction of the analysed samples was performed, very good inter-method agreement in results of COHb determination was observed. Inter-method correlations, expressed as Pearson linear correlation coefficients, were 0.93 (chromatographic-spectroscopic method), 0.97 (chromatographic-spectrophotometric method) and 0.98 (spectroscopic-spectrophotometric method). The obtained results indicate the accuracy of the developed method.

4. Conclusions

The study indicated that the developed method is valid for the intended purposes. The method sensitivity and linearity allow for COHb determination both at physiological and lethal levels. Its specificity, precision and accuracy fulfil the criteria required in forensic toxicology. This method might also be used for other purposes, e.g. to study CO binding kinetics during smoking.

It should be emphasized, however, that the presented GC method relies on full saturation of the sample with CO. If this condition is not fulfilled, significant deviations from the real COHb concentrations can be expected. Therefore, reduction of putrefied blood samples and appropriate time of their saturation with CO should be used.

The developed method presents an alternative to spectral techniques for COHb determination. The GC method proved to be very useful in the analysis of highly decomposed samples or samples with low CO content, where no satisfactory results could be ob-

TABLE II. INTER-METHOD COMPARISON OF THE RESULTS OF COHb DETERMINATION

COHb concentration [%]				Differences [%] between results obtained by GC-FID method after sample reduction and:			
Spectroscopic method (Hartridge)	Spectrophotometric method (Fretwurst-Meinecke)	GC-FID		Spectroscopic method	Spectrophotometric method	GC-FID Non-reduced sample	
		Non-reduced sample	Reduced sample				
50	48	–	43	–7	–5	–	
72	76	80	82	10	6	–2	
52	50	59	51	–1	1	–8	
63	64	63	66	3	2	3	
68	65	64	64	–4	–1	0	
50	50	61	51	1	1	–10	
68	70	84	72	4	2	–12	
76	74	73	71	–5	–3	–2	
52	49	85	54	2	5	–31	
77	75	89	74	–3	–1	–15	
50	46	46	46	–4	0	0	
~18	~15	23	19	–	–	–4	
–	<10	1	2	–	–	1	
				Mean difference	0	1	–7

tained with spectral methods. It should be the method of choice when samples taken from victims of fire or aviation accidents need to be analysed.

References

- Alonso J. R., Cardellach F., López S. [et al.], Carbon monoxide specifically inhibits cytochrome c oxidase of human mitochondrial respiratory chain, *Pharmacology and Toxicology* 2003, 93, 142–146.
- Andersen M. E., Clewell H. J., Gargas M. L. [et al.], Physiologically based pharmacokinetics and the risk assessment process from methylene chloride, *Toxicology and Applied Pharmacology* 1987, 87 185–205.
- Boumba V. A., Vougiouklakis T., Evaluation of the methods used for carboxyhemoglobin analysis in postmortem blood, *International Journal of Toxicology* 2005, 24, 275–281.
- Coburn R. F., Blakemore W. S., Foster R. E., Endogenous carbon monoxide production in man, *Journal of Clinical Investigation* 1963, 42, 1172–1178.
- Cardell L. O., Ueki I. F., Stjärne P. [et al.], Bronchodilation in vivo by carbon monoxide, a cyclic GMP related messenger, *British Journal of Pharmacology* 1998, 124, 1065–1068.
- Engel R. R., Matsen J. M., Chapman S. S. [et al.], Carbon monoxide production from heme compounds by bacteria, *Journal of Bacteriology* 1972, 112, 1310–1315.
- Fretwurst F., Meinecke K. H., Ein neue Methode zur quantitativen Bestimmung des Kohlenoxydhämoglobins im Blut, *Archiv für Toxikologie* 1959, 17, 273–283.
- Hartridge H., A spectroscopic method of estimating carbon monoxide, *Journal of Physiology* 1912, 44, 1–21.
- Kłys M., Klementowicz W., Gomółka E. [i in.], Badania nad przydatnością metod spektrofotometrycznej i chromatografii gazowej (GC/FID) z metanizerem do oznaczeń tlenu węgla we krwi sekcyjnej, *Archiwum Medycyny Sądowej i Kryminologii* 2000, 50, 235–247.
- Ocak A., Valentour J. C., Blanke R.V., The effects of storage conditions on the stability of carbon monoxide in postmortem blood, *Journal of Analytical Toxicology* 1985, 9, 202–206.
- Piantadosi C. A., Biological chemistry of carbon monoxide, *Antioxidants and Redox Signaling* 2002, 4, 259–270.

12. Stewart R. D., The effect of carbon monoxide on humans, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 1975, 15, 409–423.
13. Suematsu M., Kashiwagi S., Sano T. [et al.], Carbon monoxide as an endogenous modulator of hepatic vascular perfusion, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1994, 2045, 1333–1337.
14. Turino G. M., Effect of carbon monoxide in the cardiorespiratory system. Carbon monoxide toxicity: physiology and biochemistry, *Circulation* 1981, 63, 253A–259A.
15. Verma A., Hirsh D. J., Gatt G. E. [et al.], Carbon monoxide: a putative neural messenger, *Science* 1993, 259, 381–384.
16. Vreman H. J., Gillman M. J., Downum K. R. [et al.], In vitro generation of carbon monoxide from organic molecules and synthetic metalloporphyrins mediated by light, *Developmental Pharmacology and Therapeutics* 1990, 15, 112–124.
17. Vreman H. J., Wong R. J., Sarasi C. A. [et al.], Simultaneous production of carbon monoxide and thiobarbituric acid reactive substrates in rat tissue preparations by an iron-ascorbate system, *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 1998, 76, 1057–1065.
18. Vreman H. J., Wong R. J., Stevenson D. K., Sources, sinks, and measurement of carbon monoxide, [in:] Carbon monoxide and cardiovascular functions (Ch. 15), Wang R. [ed.], CRC Press, Boca Raton 2001.

Corresponding author

Dr Dariusz Zuba
Instytut Ekspertyz Sądowych
ul. Westerplatte 9
PL 31-033 Kraków
e-mail: dzuba@ies.krakow.pl

OZNACZENIE KARBOKSYHEMOGLOBINY (COHb) W PRÓBKACH KRWI SEKCYJNEJ METODĄ CHROMATOGRAFII GAZOWEJ

1. Wprowadzenie

Tlenek węgla (CO) jest bezbarwnym, bezwonny gazem mogącym powodować zarówno zatrucia chroniczne, jak i śmiertelne. I chociaż w niskich stężeniach (50–120 ppb) jest on typowym składnikiem środowiska naturalnego, to 60% zawartości CO w troposferze obszarów niezurbanizowanych związana jest z działalnością człowieka, stanowiąc produkt niecałkowitego spalania paliw zawierających węgiel. W przypadku obszarów zurbanizowanych stężenia CO znacząco przekraczają wartości średnie wyznaczone dla całego globu. Uważa się, że 50–60% całkowitej produkcji tej substancji związane jest z emisją spalin w krajach uprzemysłowionych.

CO jest także substancją endogenną wytwarzaną w organizmach zwierząt i ludzi [4]. W normalnych warunkach fizjologicznych głównym jego źródłem jest proces degradacji cząsteczki hemu będącego składnikiem Hb i innych hemoprotein katalizowany przez enzym – oksydazę hemową [18, 19]. Innym, zazwyczaj mniej znaczącym źródłem endogenego CO, są procesy peroksydacji [17], fotooksydacji [16], metabolizmu hemu przez bakterie [6] oraz procesy przekształcenia halogenowęglowodorów katalizowane przez cytochrom P450 [2]. W literaturze przedmiotu opisano także metaboliczne przekształcenie CO do dwutlenku węgla [10, 20].

Toksyczność CO związana jest w głównej mierze z jego zdolnością do silnego wiązania się z cząsteczką Hb z utworzeniem karboksyhemoglobiny (COHb), który to proces prowadzi do zmniejszenia zdolności transportowania cząsteczek tlenu przez krew. Powinowactwo CO do Hb jest około 210 razy większe niż w przypadku cząsteczki tlenu. W trakcie działania CO w organizmie następuje niedotlenienie tkanek związane ze spadkiem zawartości tlenu we krwi tętniczej i ciśnienia tlenu w tkankach [11, 12]. CO posiada zdolność wiązania się nie tylko z Hb, lecz również z innymi cząsteczkami zawierającymi w swym składzie ugrupowanie hemowe [1], takimi jak oksydaza cytochromu c (wpływając tym samym na procesy oddychania komórkowego), katalaza czy mioglobina. Wiązanie to może być dodatkowym źródłem obserwowanych efektów toksycznego działania CO. Organami najbardziej narażonymi na to działanie są te, w których przebiegają intensywne procesy metaboliczne, a więc serce i mózg [14].

Badania wykazały ponadto, iż CO, prócz efektów toksycznych, posiada zdolność stymulowania cyklicznego guanozynomonofosforanu (cGMP), regulatora przewodnictwa kanałów jonowych, procesu glikogenezy czy apoptozy komórek [15]. Donoszono również o jego

wpływie na naczynia płucne oraz wątrobę [5, 13], w przypadku której CO jest odpowiedzialny za utrzymanie żyły wrotnej w stanie rozluźnionym.

Stosowane rutynowo w oznaczeniach COHb metody spektrofotometryczne mogą czasami prowadzić do uzyskania wyników obarczonych znacznymi błędami, szczególnie w przypadku próbek długo przechowywanych lub też próbek krwi sekcyjnej. Związane to jest między innymi z przebiegającymi w sposób spontaniczny procesami tworzenia methemoglobiny (MetHb) i sulfhemoglobiny (SHb). Dodatkowo w próbkach krwi poddanej działaniu podwyższonej temperatury (np. pobranej od ofiar pożarów) obserwuje się znaczący spadek zawartości hemoglobiny całkowitej związany z procesami termokoagulacji, któremu w wielu przypadkach towarzyszy wzrost stężenia MetHb. W związku z powyższym przyjmuje się, że metody wykorzystujące wydzielenie CO z jego połączenia z cząsteczką Hb pozwalają na uzyskanie wyników dokładniejszych niż metody spektrofotometryczne [3]. W metodach tych zawartość COHb może być oszacowana wówczas, gdy oprócz ilości wydzielonego CO znana jest całkowita zawartość Hb w badanej próbce. Tę ostatnią wartość można wyznaczyć w oddzielnym badaniu kilkoma metodami (np. metodą cyjanomethemoglobinową) lub też przy zastosowaniu tej samej metody, nasycając całkowicie CO część badanej krwi.

Celem prezentowanej pracy było opracowanie chromatograficznej metody oznaczania COHb w próbkach krwi, która mogłaby być wykorzystywana wówczas, gdy rutynowo stosowane sposoby oznaczania tej substancji wykorzystujące jej właściwości spektralne nie pozwalają na uzyskanie zadowalających rezultatów.

2. Materiały i metody

2.1. Aparatura

Badania przeprowadzono z wykorzystaniem chromatografu gazowego Autosystem XL oraz przystawki do analizy fazy nadpowierzchniowej HS 40. Chromatograf wyposażony był w standardową kolumnę pakowaną sitami molekularnymi 5 Å 80/100 mesh oraz detektor płomieniowo-jonizacyjny (FID). Jego modyfikacja polegała na wprowadzeniu pomiędzy kolumnę a detektor dodatkowego elementu w postaci katalizatora niklowego (tzw. metanizera). Wspomniane powyżej elementy układu pomiarowego wyprodukowane były przez firmę Perkin Elmer (Stany Zjednoczone). Kontrolę parametrów aparatury oraz gromadzenie i analizę danych doświadczalnych

umożliwiało oprogramowanie Totalchrom Navigator 6.3.1. Na etapie przygotowania próbki wykorzystywano ponadto wytrząsarkę Vortex MS2 (IKA, Niemcy).

Do oznaczania COHb metodami spektralnymi stosowano spektroskop rewersyjny Hartridge'a (Beckmann, Wielka Brytania) oraz spektrofotometr Epoll-20 (Poll Ltd, Polska).

2.2. Odczynniki

HCOOH (85%), H₂SO₄ (95%) oraz NH₃ (25%) zakupione zostały w firmie Chempur (Polska). Ditionian(III) sodu (Na₂S₂O₄), heksacyjanożelazianu(III) potasu (K₃[Fe(CN)₆]), Na₂CO₃, i NaOH pochodziły z firmy POCh (Polska). Wszystkie stosowane odczynniki były czystości cz.d.a. Roztwory przygotowywano z wykorzystaniem wody z systemu NANOpure Diamond (Barnstead). Azot stosowany do przepłukiwania próbek wysycanych uprzednio CO pochodził z generatora azotu NDD FCN (Nitrox Ltd, Wielka Brytania). CO otrzymywany był poprzez stopniowe mieszanie stężonych roztworów kwasów: HCOOH oraz H₂SO₄.

2.3. Procedura oznaczania COHb

Każda próbka poddawana była standardowej procedurze oznaczania COHb we krwi stosowanej w praktyce Instytutu Ekspertyz Sądowych. Zakłada ona przeprowadzenie wstępnego, jakościowego badania próby krwi na obecność COHb z wykorzystaniem spektroskopu o małej zdolności rozdzielczej. W tym celu próbkę krwi rozcieńcza się 0,1% roztworem NH₃, a następnie poddaje badaniu spektroskopowemu przed i po redukcji niewielką ilością (ok. 10 mg) ditionianu sodu. W sytuacji, gdy badana próbka zawiera COHb w stężeniach wyższych niż około 15%, w obu przypadkach widoczne są dwa pasma absorpcyjne. Analiza ilościowa prób krwi wykonywana była z użyciem trzech różnych metod opisanych poniżej.

2.3.1. Metoda spektroskopowa z użyciem spektroskopu rewersyjnego Hartridge'a [8]

Podstawą tej metody jest spostrzeżenie, że maksymalna absorpcja dla oksyhemoglobiny (O₂Hb) oraz COHb w przypadku spektroskopu o małej zdolności rozdzielczej widoczne są w postaci dwóch pasm absorpcyjnych i położone przy różnych długościach fali. W pomiarach wykorzystuje się zazwyczaj przesunięcie tylko jednego z tych pasm, tzw. pasma α (ok. 576 nm) z powodu silniejszej zależności jego położenia od stężenia COHb w badanej próbce oraz lepszych właściwości spektralnych w porównaniu z pasmem β (541 nm). Jeśli w próbce krwi obecne są obie pochodne hemoglobiny (O₂Hb i COHb), pasmo α położone jest na obszarze ograniczonym dłu-

gościami dla nich charakterystycznymi. Obserwowane przesunięcie tego pasma, zależne w sposób nieliniowy od stężenia COHb w próbce, może być w sposób łatwy i precyzyjny określone przy pomocy spektroskopu rewersyjnego, a po odniesieniu do wartości uzyskanej dla krwi wolnej od COHb (próbka odniesienia) może służyć do określenia stężenia COHb w badanej krwi.

Stosując tę metodę, kroplę krwi badanej oraz kroplę krwi wolnej od COHb rozcieńcza się (oddzielnie) 0,1% roztworem Na₂CO₃ do uzyskania roztworu o malinowym zabarwieniu. Dla obu próbek wyznacza się położenia pasma α , a następnie oblicza różnicę. Tak obliczoną wartość porównuje się z uprzednio wyznaczoną zależnością kalibracyjną, odczytując stężenie COHb w badanej próbce.

2.3.2. Metoda spektrofotometryczna wg Fretwursta i Meinecke [7]

W metodzie tej wykorzystuje się przekształcenie innych niż COHb pochodnych hemoglobiny w hemochromogen oraz pomiar absorpcji próbki ($\lambda = 560$ nm) przed i po jej redukcji ditionianem sodu w środowisku alkalicznym.

W celu wykonania pomiarów tą metodą badaną krew dodaje się do 30 ml 0,1% roztworu NH₃ w takiej ilości, by otrzymać roztwór o wartości absorpcji w zakresie 0,8–1,0. Po 15 min (niezbędnych do całkowitej hemolizy) wykonuje się pierwszy pomiar absorpcji (A). Następnie do części tego roztworu (10 ml) dodaje się 30 mg ditionianu sodu oraz 0,1 ml 30% roztworu NaOH, miesza i po 10 minutach odczekiwania wykonuje drugi pomiar absorpcji (B). Stężenie COHb, C_{COHb} , wyznacza się, biorąc pod uwagę uprzednio wyznaczoną zależność kalibracyjną: $C_{COHb} = f\left(\frac{B}{A} \cdot 100\%\right)$.

$$C_{COHb} = f\left(\frac{B}{A} \cdot 100\%\right)$$

2.3.3. Metoda chromatografii gazowej

Metoda ta oparta jest na wydzieleniu CO z jego połączenia z cząsteczkami Hb i katalitycznym przekształceniu w metanizerze w metan, który z kolei jest źródłem sygnału w detektorze FID. Opracowanie takiej metody było tematem niniejszej pracy i opisane zostało poniżej.

3. Wyniki i dyskusja

3.1. Procedura przygotowania próbek

Przygotowanie próbki do pomiaru rozpoczynano od jej rozcieńczenia. Na podstawie wstępnych prób oraz po uwzględnieniu ilości krwi niezbędnej do przeprowadzenia badań, 0,75 ml analizowanej krwi rozcieńczane było 10-krotnie wodą. Następnie otrzymany roztwór dzielono na dwie części. 2,5 ml wprowadzane było do fiołki wyko-

rzystywanej w analizie HS o pojemności 20 ml (próbka badana). Pozostała część, tj. 5,0 ml, nasycana była CO, a następnie, po przepłukaniu azotem, wykorzystywana do sporządzania roztworów wzorcowych zawierających 25%, 50% (rozcieńczenie wodą) i 100% COHb.

W celu uwolnienia CO związanego z Hb, do zakapslowanych fiolek dodawano strzykawką wodny roztwór $K_3[Fe(CN)_6]$. Następnie próbki wytrząsane były przez okres 2 min (450 obr/min) i poddawane analizie HS-GC.

Wyniki wstępnych pomiarów pozwoliły na stwierdzenie istnienia znacznych rozbieżności pomiędzy wartościami uzyskanymi metodami spektralnymi oraz wynikiem oznaczeń prowadzonych z wykorzystaniem metody GC. W związku z powyższym zdecydowano o wprowadzeniu do tej ostatniej dodatkowego etapu polegającego na redukcji próbki przed jej nasycaniem CO. W tym celu do wodnego roztworu krwi (7,5 ml) dodawano 50 mg ditionianu sodu. Dalsze postępowanie było identyczne z opisanym powyżej. Wpływ redukcji na dokładność uzyskiwanych wyników omówiony został w rozdziale 3.4.

Aby zminimalizować zmiany objętości próbki związane z odparowaniem rozpuszczalnika, zdecydowano się ponadto na wstępne nasycanie parą wodną azotu wykorzystywanego do jej przepłukiwania w celu usunięcia CO rozpuszczonego w roztworze krwi i niezwiązanego z cząsteczkami Hb. Doświadczalnie wykazano, iż postępowanie takie jest wystarczające – zmiana masy obserwowana w przypadku gazu osuszonego oraz nasyconego parą wodną wynosiła odpowiednio: $0,30 \pm 0,01$ g i $0,02 \pm 0,01$ g.

Do parametrów optymalizowanych należało dodatkowo stężenie $K_3[Fe(CN)_6]$, tj. substancji uwalniającej CO z jego połączenia z Hb. Stężenie tego utleniacza obejmowało zakres od 0,07 g/ml do 5,71 g/ml. Przeprowadzone pomiary pozwoliły na stwierdzenie, że dla stężeń wyższych niż 1,07 g/ml obserwuje się w praktyce stałą odpowiedź detektora (rycina 1). Biorąc jednak pod uwagę, iż krew zawierać może różną ilość Hb oraz uwzględniając, że w toku przygotowania próbki dodaje się do niej niewielkie ilości reduktora, w dalszych badaniach stosowano wyższe stężenie utleniacza (2,85 g/ml), co odpowiada dodatkowi 1,0 ml 10% jego roztworu do 2,5 ml wodnego roztworu badanej krwi.

Długość procesu uwalniania CO zbadano w zakresie 5–40 min. W zakresie tym nie obserwowano ani znaczących różnic, ani też zmian w odpowiedzi detektora, co sugeruje, iż nawet zastosowanie krótkiego czasu działania roztworu $K_3[Fe(CN)_6]$ (5 min) pozwala na całkowite wydzielenie związanego CO.

W badaniach uwzględniono ponadto wpływ standardowo stosowanych substancji konserwujących próby krwi na wyniki oznaczenia COHb. Analizując równoległe próbki z dodatkiem tych substancji oraz próbki,

w których one nie występują, stwierdzono, że obecność zarówno heparyny, jak i fluorku sodu, nie wpływa w sposób znaczący na wyniki oznaczeń przeprowadzonych metodą chromatograficzną.

Pełną procedurę przygotowania próbki przedstawiono schematycznie na rycinie 2.

3.2. Parametry rozdziału chromatograficznego

W początkowej fazie badań, kierując się danymi zaczerpniętymi z literatury przedmiotu [9], rozdzielanie chromatograficzne prowadzono w temperaturze 60°C . W toku pomiarów zaobserwowano jednakże znaczące zmiany (skrócenie) czasu retencji CO. Parametr ten powracał do swych początkowych wartości po całkowitym wygrzaniu kolumny w podwyższonej temperaturze (150°C). Obserwowane zjawisko związane było ze zmniejszeniem zdolności rozdzielczej kolumny spowodowanej procesami adsorpcji CO_2 oraz pary wodnej na jej wypełnieniu, tj. sitach molekularnych. W celu eliminacji tego niekorzystnego zjawiska zdecydowano się na zastosowanie wyższej temperatury rozdziału (120°C), w której z termodynamicznego punktu widzenia uprzywilejowane stają się procesy desorpcji wspomnianych substancji. Dodatkową zaletą takiego postępowania było skrócenie czasu retencji analitu, a tym samym czasu niezbędnego na badanie pojedynczej próbki. Dla wybranej temperatury czas retencji wynosił $1,388 \pm 0,043$ min (współczynnik zmienności, $CV = 3,1\%$, $n = 20$).

Pozostałe parametry aparaturowe zestawiono w tabeli I.

3.3. Charakterystyka analityczna metody chromatograficznej

3.3.1. Selektywność i specyficzność

Badanie fazy gazowej zebranej nad roztworem próbki jest jednym z prostszych sposobów eliminacji wpływu matrycy, a tym samym zwiększenia selektywności metody analitycznej. W opisywanej metodzie dalszy wzrost selektywności osiągnąć jest dzięki zastosowaniu rozdzielania chromatograficznego połączonego z przekształceniem analitu zachodzącym w metanizerze. Co prawda konwersji tej ulega nie tylko CO, ale także CO_2 , lecz oba tlenki ulegają rozdzielaniu w czasie przejścia przez kolumnę chromatograficzną wskutek różnego oddziaływania z fazą stacjonarną i pojawiają się w metanizerze w znacznym odstępie czasu. Na rycinie 3 przedstawiono typowy chromatogram uzyskany metodą chromatograficzną dla próbki krwi sekcyjnej, w której stężenie COHb wynosiło 19%. Jego kształt dowodzi, że piki odpowiadające zarówno CO, jak i CO_2 , są dobrze wykształcone i rozdzielone. W trakcie prowadzonych analiz prób krwi niezawierającej CO nie obserwowano pojawiania się pi-

ków związanych z obecnością innych zanieczyszczeń. Biorąc pod uwagę powyższe rozważania, uznać można rozpatrywaną metodę chromatograficzną za specyficzną.

3.3.2. Precyzja

Precyzję metody wyznaczono dla dwóch stężeń COHb we krwi. Pierwsze z nich odpowiadało oczekiwanej wartości granicy oznaczalności metody (około 1%), drugie – stężeniom COHb spotykanym w przypadku śmiertelnych zatruc CO (50%). Wyznaczone dla tych stężeń wartości współczynników zmienności wynosiły odpowiednio: 6,5% ($n = 40$) oraz 1,2% ($n = 35$).

3.3.3. Czulość, LOD i LOQ

Ilość CO wydzielonego z próbki (a co za tym idzie, również odpowiedź detektora) zależy nie tylko od stężenia COHb, lecz również od całkowitej zawartości Hb w próbce. W związku z powyższym dla tego samego stężenia COHb w różnych próbkach obserwuje się różną wartość sygnału analitycznego, co można wyrazić w postaci zmienności czulości metody definiowanej jako wariancja stosunku przyrostu sygnału analitycznego do przyrostu stężenia analitu. Średnia czulość metody wynosiła $17962 \pm 5948 \mu V \cdot s \cdot \%^{-1}$ ($CV = 33,1\%$, $n = 28$), przy czym obserwowany zakres zmienności tego parametru obejmował wartości od $9193 \mu V \cdot s \cdot \%^{-1}$ do $26950 \mu V \cdot s \cdot \%^{-1}$. Przytoczone wyniki w sposób jednoznaczny wskazują na konieczność przeprowadzenia kalibracji dla każdej z analizowanych próbek z osobna.

Wartość granicy wykrywalności (LOD) oraz oznaczalności (LOQ) wyznaczono na podstawie poniższych zależności:

$$LOD = \frac{3.3s}{b} \quad LOQ = 3 \cdot LOD,$$

gdzie s jest wartością odchylenia standardowego sygnału rejestrowanego w roztworze o niskim stężeniu analitu (~1% COHb), natomiast b – podaną powyżej wartością średniej czulości metody. Obliczone w ten sposób wartości LOD i LOQ, które wynosiły odpowiednio: 0,3% oraz 0,9%, wskazują, iż opracowana metoda umożliwia oznaczanie COHb na poziomie stężeń fizjologicznych.

3.3.4. Liniowość metody

W celu wyznaczenia zakresu liniowości metody przeprowadzono badania próbek krwi zawierających różne ilości COHb (4 poziomy stężeń, 5 powtórzeń na każdym z tych poziomów), a następnie skonstruowano wykres zależności:

$$\frac{A}{C_{COHb}} = f(C_{COHb}),$$

gdzie A – powierzchnia pików odpowiadającego CO [$mV \cdot s$], C_{COHb} – stężenie COHb [%].

Wykres ten, na którym dodatkowo linią przerywaną zaznaczono także 5% odchylenie od wartości średniej (tzw. linie kontrolne), przedstawiono na rycinie 4. Wynika z niego, że wszystkie wartości eksperymentalne położone są na obszarze ograniczonym wspomnianymi liniami kontrolnymi, co pozwala przyjąć, że w całym zakresie stężeń, tj. od LOQ do 100% COHb, istnieje liniowa zależność pomiędzy stężeniem analitu a odpowiedzią detektora.

Na rycinie 5 przedstawiono z kolei typowy wykres kalibracyjny. Roztwory kalibracyjne, jak to szczegółowo opisano w rozdziale „Materiały i metody”, przygotowano przez nasycenie części badanej próbki krwi CO do 100% COHb, a następnie jej rozcieńczenie wodą do 50% i 25% COHb. Próbkę ślepe przygotowano przez przepłukiwanie krwi powietrzem przez co najmniej jedną godzinę. Przeprowadzone badania pozwoliły na wykazanie doskonałej liniowej zależności pomiędzy odpowiedzią detektora a stężeniem analitu, przy czym obserwowane wartości współczynników korelacji liniowej Pearsona zazwyczaj przekraczały 0,9999.

3.4. Porównanie wyników oznaczeń COHb metodą chromatograficzną oraz rutynowymi metodami spektrometrycznymi

Możliwość praktycznego wykorzystania chromatograficznej metody oznaczania COHb wykazana została poprzez analizę jedenastu próbek krwi sekcyjnej znajdujących się w stanie mniej lub bardziej zaawansowanego rozkładu gnilnego. Porównanie wyników uzyskanych metodami GC (ze wstępną redukcją próbki oraz bez tej redukcji), spektroskopową i spektrofotometryczną, przedstawiono w tabeli II.

Z wartości tam zebranych wynika, że w przypadku próbek, w których wstępnej redukcji nie przeprowadzono, obserwować można znaczące, sięgające nawet 31%, przeszacowanie stężenia analitu. Tak znaczący błąd związany jest prawdopodobnie z obecnością w tych próbkach innych pochodnych hemoglobiny, takich jak MetHb i SHb, nie posiadających zdolności wiązania cząsteczek CO. Wyniki pomiarów jasno wskazują, że usunięcie z próbki cząsteczek Hb, w skład których wchodzi jon Fe^{3+} , jest niezbędne w przypadku stosowania metody oznaczania COHb wykorzystującej jako próbkę odniesienia porcję krwi całkowicie wysycaną CO.

W przypadku próbek, w których została przeprowadzona wstępna redukcja pochodnych hemoglobiny, zaobserwowano bardzo dobrą zgodność wyników otrzymanych trzema stosowanymi metodami. Współczynniki korelacji liniowej Pearsona wynosiły dla poszczególnych par: 0,93 (metoda GC – metoda spektroskopowa), 0,97 (metoda GC – metoda spektrofotometryczna) oraz

0,98 (metoda spektroskopowa – metoda spektrofotometryczna). Przeprowadzone badania pozwalają na przyjęcie, że opisywana metoda chromatograficznego oznaczania COHb jest dokładna.

4. Wnioski

Wyniki uzyskane w trakcie badań pozwoliły na stwierdzenie, iż opracowana metoda spełnia założone wymagania. Jej czułość i zakres liniowości pozwala na oznaczanie COHb zarówno na poziomie fizjologicznym, jak i w przypadku stężeń śmiertelnych. Specyficzność, precyzja i dokładność proponowanej metody spełniają wymagania stawiane metodom stosowanym w toksykologii sądowej. Może być ona ponadto użyteczna do innych celów, np. badania kinetyki wiązania CO w trakcie palenia tytoniu.

Podkreślić jednak należy, że opisana metoda chromatograficznego oznaczania COHb opiera się na pełnym wysyceniu próbki krwi CO. Gdy warunek ten nie jest spełniony, spodziewać można się znaczących odchyleń uzyskiwanych wyników od rzeczywistej zawartości COHb w próbce. Tak więc kluczowe znaczenie ma redukcja utlenionych form Hb oraz stosowanie odpowiednio długiego czasu nasycania CO.

Podsumowując, opracowana metoda stanowi alternatywę dla metod spektralnych oznaczania COHb. Metoda chromatograficzna jest użyteczna w przypadku konieczności badania próbek krwi w stanie daleko posuniętego rozkładu gnilnego oraz zawierających niewielką ilość COHb, w przypadku których metody spektralne nie pozwalają uzyskać satysfakcjonujących wyników. Powinna być też metodą z wyboru, gdy konieczna jest analiza krwi pobranej od ofiar pożarów czy wypadków lotniczych.