

**Małgorzata Kłys\*, Wiesława Klementowicz\*, Ewa Gomułka\*\*,  
Agnieszka Opidowicz\*, Wanda Kurowska\***

## **Badania nad przydatnością metod spektrofotometrycznej i chromatografii gazowej (GC/FID) z metanizerem do oznaczeń tlenku węgla we krwi sekcyjnej**

### **Usefulness of spectrophotometry and gas chromatography (GC/FID) with metanizer for evaluation of carbon monoxide in autopsy blood**

\*Z Katedry Medycyny Sądowej CM UJ w Krakowie  
Kierownik: prof. dr hab. B. Turowska

\*\*Z Kliniki Toksykologicznej CM UJ w Krakowie  
Kierownik Kliniki: prof. dr hab. J. Pach

W pracy dokonano oceny porównawczej oznaczeń COHb przy pomocy metody spektrofotometrycznej z zastosowaniem aparatu AVL 912 CO - Oxylite oraz chromatografii gazowej (GC/FID) z metanizerem jako katalizatorem przekształcenia tlenku węgla w metan. Analiza wykonana dla 60 próbek krwi sekcyjnej pobranej w przypadkach podejrzenia zatrucia śmiertelnego tlenkiem węgla, przechowywanych w lodówce przez okres od 1 dnia do 245 dni wykazała negatywny wpływ przekształceń gnilnych na dokładność oznaczeń wartości COHb, otrzymanych zwłaszcza metodą spektrofotometryczną. Oprócz oceny COHb wykonano oznaczenia methemoglobiny (MetHb) oraz sulfhemoglobiny (SulfHb) w gnijących próbach krwi, które wykazywały tendencję wzrostową w miarę postępowania procesów gnilnych.

In the present paper a comparative study between gas chromatography using the microcreator converting CO to CH<sub>4</sub> in reference to the spectrophotometric method for the evaluation of COHb in autopsy blood samples has been performed. An analysis of 60 samples kept in the refrigerator from day 1 to 245 days revealed negative influence on the reproducibility of the results obtained by means of spectrophotometry. The evaluation of methemoglobin and sulfhemoglobin in blood samples tested during a course of postmortem putrefaction showed increasing tendency with the progress of the process.

Słowa kluczowe: hemoglobina tlenowęglowa (COHb), methemoglobina (MetHb), sulfhemoglobina (SulfHb), metoda chromatografii gazowej z metanizerem (GC-CO/CH<sub>4</sub>).

**Key words: Carboxyhemoglobin (COHb), methemoglobin (MetHb), sulfhemoglobin (SulfHb), gas chromatography with microcreator (GC-CO/CH<sub>4</sub>).**

## WPROWADZENIE

Zatrucia śmiertelne tlenkiem węgla zajmują ciągle czołową pozycję w liczbie zatrutych, plasując się, według statystyki Zakładu Medycyny Sądowej CM UJ, na drugim miejscu po alkoholu (12). Opinia sądowno-lekarska w tych przypadkach opiera się o wyniki sekcji zwłok lub oględzin oraz o oznaczenie zawartości hemoglobiny tlenowęglowej we krwi zmarłego (8,17). Z tego punktu widzenia istota poprawnych oznaczeń ma podstawowe znaczenie w toksykologii sądowej.

Podając problem oceny działania tlenku węgla na organizm, trzeba wziąć pod uwagę jakość zastosowanych metod do oceny zatrucia, którego miarą jest zawartość karboxyhemoglobiny (COHb) we krwi. We współczesnym piśmiennictwie opublikowano wiele prac, dotyczących metodyki oznaczeń hemoglobiny tlenowęglowej w materiale biologicznym. Jak wynika z doświadczenia, metodyka powinna być właściwie dobrana do rodzaju i stanu materiału biologicznego, co w toksykologii sądowej odgrywa niezwykle ważną rolę.

Metody analizy hemoglobiny tlenowęglowej można odpowiednio pogrupować: Jedną z najstarszych jest metoda z użyciem spektroskopu rewersyjnego Hartridge'a (8), opisana na początku ostatniego stulecia. Wykorzystuje się w niej wielkość przesunięcia widma karboxyhemoglobiny (próba badana) w odniesieniu do oksyhemoglobiny (próba ślepa).

Metody spektrofotometryczne są najszerzej stosowane do celów ekspertyzy toksykologicznej. W jednej z pierwszych prac metoda ta opisana została przez Fretwurst-Meinecke (6), później zmodyfikowana przez Fukui (7). Zasada metod spektrofotometrycznych opiera się na pomiarze maksimum absorpcji widma COHb przed i po redukcji np. dwutioninem sodu. Dwutionin sodu konwertuje oksyhemoglobinę oraz inne pochodne jak np. methemoglobinę do deoksyhemoglobiny, podczas gdy karboxyhemoglobina pozostaje niezmienną.

Pewną odmianę technik spektrofotometrycznych stanowią metody strącenio-we, w których wykorzystuje się strącanie oksyhemoglobiny, a procedura ta, opisana przez Wolffa i zmodyfikowana przez Maehly'ego (16) jest najbardziej znana i ciągle stosowana. Opublikowano jeszcze wiele innych odmian i modyfikacji metod bazujących na kombinacjach właściwości spektrofotometrycznych (11, 13, 18, 19, 21, 22) pochodnych hemoglobiny oraz dokonano ich ocen w studiach porównawczych (15, 19, 23, 24).

Ze względu na stosunkowo małą specyfikę metodyki spektrofotometrycznej, zwłaszcza w odniesieniu do materiału biologicznego, dotkniętego zmianami

gnilnymi coraz większe uznanie zyskują sobie metody chromatograficzne (1, 4, 5, 10, 20, 21, 22, 24), rekomendowane jako bardziej specyficzne w stosunku do innych. Polegają one na oznaczeniu uwolnionego tlenku węgla z kompleksu COHb jako wolnego związku lub w postaci przetworzonej np. do metanu (4).

W niniejszej pracy, do oznaczeń prób krwi sekcyjnej, pobranej w podejrzeniach zatruc tlenkiem węgla zastosowano metodę chromatografii gazowej z metanizerem jako katalizatorem przemiany chemicznej tlenku węgla w metan (4) oraz metodę spektrofotometryczną jako metodę odniesienia. Dokonano ponadto oceny zawartości methemoglobiny (MetHb) i sulfhemoglobiny (SulfHb) w testowanych próbkach krwi, jako wskaźników przekształceń gnilnych.

## MATERIAŁ

Materiał do badań stanowiło 60 prób krwi, pobranych w czasie sekcji zwłok, w przypadkach podejrzeń zatruc tlenkiem węgla (pożary, zatrucia w mieszkaniach). Szczegółowe pochodzenie próbek zostało zamieszczone w Tabeli I. Próby te przechowywano w lodówce. Czas przechowywania dla poszczególnych prób wynosił od 1-go dnia do 245 dni. Oznaczano karboxyhemoglobinę (COHb), methemoglobinę (MetHb) i sulfhemoglobinę (SulfHb) w różnych odstępach czasowych od chwili pobrania.

Tabela I. Zawartość karboxyhemoglobiny (COHb), methemoglobiny (MetHb), sulfhemoglobiny (SulfHb) w testowanych próbkach krwi sekcyjnej.  
Table I. Carboxyhemoglobin (COHb), methemoglobin (MetHb) and sulfhemoglobin (SulfHb) in the tested autopsy blood samples.

L. p. Number	M * P I	Czas Dni Days	Sp/Ox (%)			GC/FID (%)	
			MHb	Shb	COHb	COHb	CF*
1. J.L	I	1	0,1	0,0	40,0	32,0	0,9999
2. Z.U.	M	2	0,2	0,0	2,6	0,0	0,9587
3. S.P.	M	3	0,1	0,3	2,9	0,0	0,9366
4. Z.S.	P	3	3,0	0,2	25,5	17,2	0,9999
5. Z.C.	P	3	0,1	0,2	45,0	41,0	0,9268
6. Z.W.	M	3	0,2	0,2	50,0	42,0	0,9978
7. J.S.	M	5	1,4	0,1	5,2	6,3	0,9976
8. B.S.	I	5	0,8	0,2	70,5	57,9	1,0000
Zakres Rangę 1-8		1-5	Średnia Mean 0,7	Średnia Mean 0,2	2,6-70,5	0-57,9	0,9772
r = 0,9721							
9. I.K.	M	7	0,2	0,0	2,9	0,0	0,9611
10. W.B.	P	7	3,1	0,0	6,2	2,4	0,9617
11. P.K.	P	7	0,6	0,0	40,3	36,3	0,9999
12. P.N.	I	7	0,0	3,3	40,7	40,4	0,9999
13. K.K.	P	7	0,1	0,2	51,2	43,4	1,0000
14. J.K.	P	7	0,2	0,8	59,1	63,5	0,9654
15. J.G.	P	7	0,1	0,4 *	59,9	72,3	1,0000

ciąg dalszy tabeli I

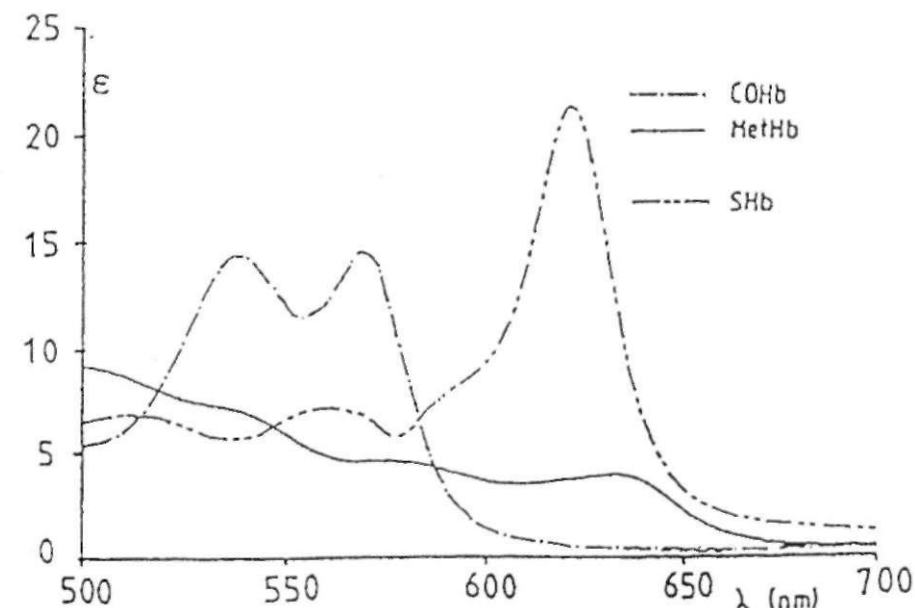
16. S.D.	I	7	0,0	1,2	64,9	64,0	0,9988
17. S.K.	P	7	0,4	0,3	68,9	65,1	0,9979
18. P.C.	M	10	0,2	0,0	73,6	62,2	0,9765
19. S.J.	M	10	0,0	0,0	0,0	0,0	0,9999
20. K.K.	P	10	2,2	0,1	15,9	8,4	0,9956
21. A.L.	M	14	1,4	1,4	1,1	0,0	0,9966
22. J.S.	M	14	0,4	0,0	2,7	0,0	0,9573
23. E.G.	M	14	1,1	0,0	4,5	0,0	0,9989
24. M.M.	M	14	0,3	0,0	60,6	51,2	0,9982
25. R.P.	I	14	0,6	0,2	70,7	62,0	0,9883
26. R.S.	P	14	0,2	0,0	44,5	29,3	0,9999
27. Z.P.	I	14	0,2	1,6	31,2	64,3	0,9617
28. J.Sz.	P	21	0,2	0,1	3,3	0,0	0,9543
29. R.M.	M	21	0,8	0,0	44,8	47,6	0,9543
30. NN-m	P	21	0,4	0,2	52,8	45,1	0,9968
31. R.B.	I	21	0,0	0,6	65,6	62,1	0,9999
32. Z.M.	M	21	0,2	0,4	66,1	54,9	0,9990
33. J.K.	I	21	1,2	0,0	74,8	48,7	0,9999
34. NN-m	P	28	1,4	0,3	26,9	23,6	0,9811
35. S.G.	P	28	16,5	0,0	28,5	19,0	0,9998
36. M.M.	M	28	0,4	0,2	58,3	55,5	1,0000
37. R.R.	P	28	0,2	0,0	67,0	69,5	0,9950
38. T.K.	I	28	0,9	0,0	67,8	78,0	0,9744
Zakres Rangę 9-38		7-28	Średnia Mean 1,1	Średnia Mean 0,4	0 - 74,8	0-78,0	0,9871
					r = 0,8690		
39. E.N.	I	35	0,3	0,6	18,5	19,3	0,9897
40. NN-m	P	42	4,5	1,3	19,8	12,0	0,9999
41. D.D.	M	42	0,0	0,2	52,8	41,8	0,9927
42. G.S.	I	49	0,0	0,8	2,8	0,5	0,9944
43. P.G.	I	49	2,9	0,9	3,2	0,0	0,9996
44. S.K.	M	49	0,0	1,3	3,2	0,8	0,9737
45. J.M.	P	49	0,4	0,2	31,7	27,5	0,8487
46. M.O.	M	56	3,3	1,3	10,9	0,3	0,9991
47. W.G.	P	63	0,7	0,4	54,4	32,0	0,9898
48. R.S.	M	98	0,2	1,2	45,7	31,0	0,9994
49. A.S.	M	140	0,0	0,9	3,4	8,9	0,8889
50. NN-k	P	161	3,9	0,8	30,2	29,28	0,9926
51. NN-m	P	189	1,6	0,6	62,4	75,0	0,9952
52. M.B.	I	203	0,0	1,3	5,4	3,0	0,9999
53. Ł.K.	M	217	4,1	0,8	49,8	36,0	1,0000
54. K.M.	M	217	2,7	0,5	39,6	25,26	0,9459
55. K.A.	M	231	1,3	0,9	25,3	22,0	1,0000
56. R.K.	M	231	0,8	0,2	47,4	49,0	0,9751
57. T.S.	P	245	0,9	0,3	26,6	26	0,9999
58. B.A.	P	245	1,3	0,4	50,1	30,0	0,9894
59. T.K.	M	245	1,4	0,1	51,8	49,9	0,9999
Zakres Rangę 39-59		35-245	Średnia Mean 1,4	Średnia Mean 0,7	2,8-62,4	0-75,0	0,9797
					r = 0,8550		
60. J.S.	1	42	5,6	16,1	29	10,9	0,9934

M - mieszkanie, łazienka  
 M - fiat, bath-room  
 P - pożar  
 p- fire  
 I\_inne (samochód, garaż)  
 I - others (car, garage)  
 CF - współczynnik kalibracji  
 CF - calibration factor

## METODY ANALITYCZNE

### Metoda spektrofotometryczna

Oznaczenia karboksyhemoglobiny, methemoglobiny i sulfhemoglobiny przeprowadzono na aparacie AVL 912 CO-Oxylite (Austria). Pomiar oparty jest na zależności charakterystycznej absorpcji poszczególnych pochodnych hemoglobiny w zależności od długości fali ujętej w prawie Lamberta Beera. Widma absorpcyjne mierzonych pochodnych hemoglobiny w zależności od długości fali przedstawiono na ryc. 1 (25).



Ryc 1 Widma UV wybranych pochodnych hemoglobiny.  
 Fig. 1. Spectra UV for chosen derivatives of hemoglobin.

Wykonanie: Do kuwety o pojemności 0.1 mm wprowadza się krew przy pomocy kapilary (40ul). Analiza jest w pełni zautomatyzowana i pomiaru dokonuje się automatycznie. Obliczenia opierają się na krzywych kalibracyjnych odpowiednich parametrów wykonanych według instrukcji producenta, a wyniki w postaci zawartości COHb, MetHb i SulfHb odczytuje się bezpośrednio na skali aparatu. Jedynym odczynnikiem, jaki jest niezbędny do wykonania analizy jest woda.

### Metoda chromatografii gazowej

Metodę zastosowano w modyfikacji własnej w stosunku do opisanej wcześniej przez Buszewicza (4).

### Przygotowanie prób

Próba badana: pobrano 1.5 ml próby krwi badanej i rozcieńczono wodą destylowaną do 15 ml. Do każdej próby krwi wykonano krzywą kalibracyjną z czterech punktów.

Krzywa kalibracyjną: Do kolby miarowej odebrano 2.5 ml rozcieńczonej próby (jak wyżej), a następnie nasycano tlenkiem węgla, pochodzącym z butli zawierającej sprężony gaz przez 1 minutę. Założono, że tak nasycona próba zawiera 100% COHb. Następnie tę próbę rozcieńczono wodą do 50% i 25% COHb.

Do czterech fiolek o poj. 8 ml typu *headspace* odmierzono po 2.5 ml roztworów wzorcowych oraz roztworu badanego, zamknięto szczelnie, płukano helem poprzez dwie igły wprowadzone przez teflonowy korek do fiolek.

Do każdej fiolek poprzez igłę wprowadzono po 0.75 ml 20% żelazicyjanku potasu, próbki ponownie przepłukano helem, następnie fiolek inkubowano przez 6 minut w cieplarni w 80°C.

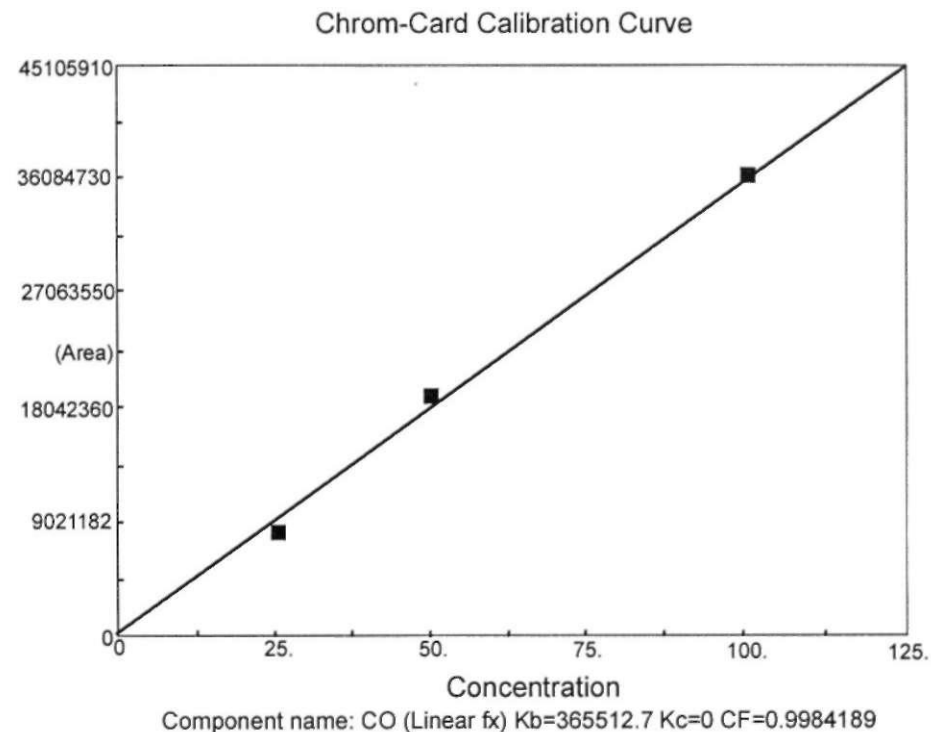
Pobierano po 0.3ml par przy pomocy strzykawki ciśnieniowej typu *headspace* znad roztworu w kolejności 0%, 25%, 50%, 100% oraz próbę badaną i nanoszono kolejno na kolumnę.

### Pomiar

Aparat: Chromatograf FISIONS-INSTRUMENTS wyposażony w injector zawierający katalizator *metanizer* w postaci niklowego drutu 50 x 0.8 mm (THERMOO.UEST - CE INSTRUMENTS), kolumnę chromatograficzną typu Molisieve 5A fused silica 30MX 0.53 MMID, DF=15UM (Chrompack, The Netherlands) oraz detektor płomieniowo - jonizacyjny (FID). Warunki pracy aparatu: przepływ gazu nośnego helu 5 ml/min, temp. pieca 60°C, temp. detektora 340°C, temp. injectora (*metanizera*) 240°C, przepływ powietrza 320 ml/min, przepływ wodoru 25 ml/min. Chromatograf jest obsługiwany przez program komputerowy Chrom- Card for Windows 95 Wersja 1.21, 1999 (THERMOOUEST - CE INSTRUMENTS).

Wyniki w postaci zależności sygnału chromatograficznego wytworzonego w reakcji metanu od zawartości CO, uwolnionego z kompleksu COHb

w testowanych próbach odczytywano względem każdorazowo (do każdej próbki) sporządzanych krzywych kalibracyjnych. Krzywe kalibracyjne sporządzane na bazie macierzystej próbki krwi uwzględniają indywidualny charakter każdej próbki. Przykładową krzywą kalibracyjną przedstawiono na ryc. 2.



Ryc. 2. Krzywa kalibracyjną otrzymana metodą chromatografii gazowej (GC/FID) z metanizerem (przykładowa).

Fig. 2. Calibration curve obtained by means of gas chromatography (GC/FID) with metanizer (an example).

## WYNIKI I DYSKUSJA

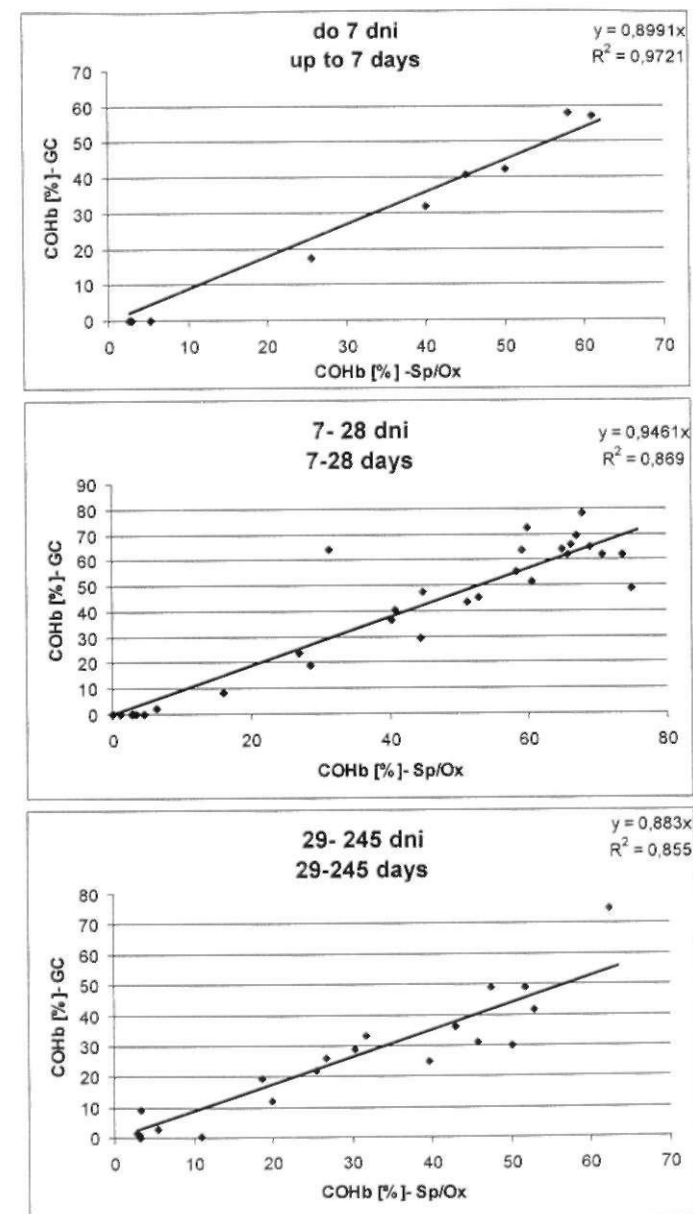
Otrzymane wyniki zamieszczono w Tabeli I oraz opracowano graficznie na rycinie 3 a, b, i c. Analizując zawartości karboksyhemoglobiny we krwi sekcyjnej postawiono do rozważenia problem korelacji wyników zastosowanymi metodami analitycznymi. W dalszej kolejności rozważano wpływ czasu przechowywania próbek związanego z przekształceniami gnilnymi materiału biologicznego na ową korelację. Za miarę tych przekształceń uznano zawartość methemoglobiny i sulfhemoglobiny, pochodnych hemoglobiny pojawiających się w wyniku jej przekształceń strukturalnych, w toku procesów tanochemicznych.

W związku z powyższym, analizowane próby podzielono na trzy części: pierwszą grupę stanowiły próbki krwi, analizowane do tygodnia (1-5 dni) przechowywania (ryc. 3a), drugą grupę stanowiły próbki przechowywane 1-4 tygodni (7-28 dni) (ryc. 3b) oraz trzecią - próbki przechowywane 5-35 tygodni (35-245 dni) (ryc. 3c). Obliczono współczynniki korelacji pomiędzy metodami SP/Ox i GC/FID w poszczególnych grupach. W pierwszej grupie próbek współczynnik korelacji był wysoki (0.9721), wskazując na dużą zgodność otrzymanych wyników obiema metodami. Wyniki otrzymane w drugiej grupie próbek wykazywały już większy rozrzut, a więc wyraźnie mniejszy współczynnik korelacji (0.9690). Współczynnik nachylenia prostej  $y=ax$  w tej grupie wykazywał nieznaczne przesunięcie krzywej w kierunku wartości wyższych dla metody spektrofotometrycznej. Trzecia grupa wyników utrzymuje tę tendencję, wykazując dalsze obniżenie korelacji ( $r=0.8550$ ) oraz mocniejsze nachylenie krzywej w kierunku wartości wyższych, otrzymanych metodą spektrofotometryczną.

Porównując wyniki otrzymane przy pomocy obu metod można zatem zauważyć tendencję do zawyżania wyników otrzymywanych metodą spektrofotometryczną zwłaszcza na niskim poziomie zawartości hemoglobiny tlenkowej. Istnieje bowiem możliwość nakładania się absorpcji różnych pochodnych hemoglobiny w chwili dokonywania pomiaru intensywności absorpcji COHb. O takiej możliwości informuje ryc. 1 na której przedstawiono widma COHb, MetHb i SulfHb. Spostrzeżenie to potwierdzają wcześniejsze obserwacje, dotyczące otrzymywania wyników tą metodą jako przypuszczalnie nieco zawyżonych w przypadkach zgniętych prób wskutek nakładania się absorpcji różnych pochodnych hemoglobiny. Jest to widoczne zwłaszcza przy zerowych zawartościach COHb (Tabela I) otrzymanych metodą chromatografii gazowej, COHb wyznaczona spektrofotometrycznie wykazuje wyższe wartości (próby 2, 3, 7, 14, 23, 43).

Równolegle z pomiarem COHb dwiema metodami dokonano oznaczenia spektrofotometrycznego methemoglobiny i sulfhemoglobiny, tych postaci hemoglobiny, które mogą się wytworzyć w gnijących próbach krwi z udziałem bakterii. Methemoglobina powstaje zarówno w toku przemian gnilnych hemoglobiny i karboksyhemoglobiny, jak również możliwe jest jej wytworzenie w wyniku ogrzewania krwi ofiary w czasie pożaru (2, 3). Z drugiej strony, methemoglobina we krwi z czasem zanika (2, 24).

Wyniki w postaci wartości methemoglobiny i sulfhemoglobiny zamieszczono w Tabeli I, a średnie wartości policzone w trzech grupach próbek przedstawiono na ryc. 4. Wskazują one jednoznacznie na występowanie wyższych wartości zarówno methemoglobiny jak i sulfhemoglobiny w miarę wydłużania się czasu przechowywania próbek, zwłaszcza jest to widoczne dla próbek przechowywanych powyżej sześciu tygodni. Jedną z próbek tj próba nr 60 wykazującą szczególne gnicie, występujące już w chwili pobierania materiału ze zwłok, będących w stanie kompletnego przeobrażenia, została oddzielona od pozostałych z uwagi na ową odmienną materiał biologicznego w stosunku do pozostałych próbek. Próbką nr 60 stanowi przykład występowania zawansowanego gnicia, manifestującego się, między innymi, ekstremalnie wysokimi wartościami methemoglobiny (5,6%) i sulfhemoglobiny (16,1%).

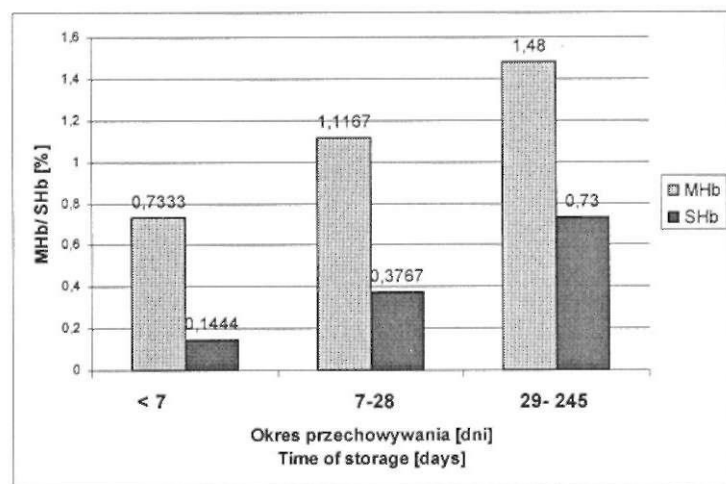


Ryc. 3. Porównanie wyników COHb otrzymanych metodami chromatografii gazowej (GC/FID) z metanizerem i spektrofotometryczną (SP/Ox) w trzech grupach testowanych próbek krwi.

Fig. 3. Comparison of the results obtained by means of gas chromatography (GC/FID) with metanizer and spectrophotometry (SP/Ox) for three groups of tested blood samples.

Wytworzenie się produktów gnilnych we krwi jest niewątpliwie czynnikiem wpływającym negatywnie na dokładność oznaczeń analitycznych pochodnych hemoglobiny. Twierdzenie to dotyczy w znacznej mierze oznaczeń COHb. I tak np. w przypadku próbki nr 60 wynik oznaczenia spektrofotometrycznego COHb w wysokości 29% można uznać za zawyżony w stosunku do faktycznej zawartości COHb. Z drugiej strony jednak wartość 10.9% COHb otrzymana metodą chromatografii gazowej może przemawiać za wytworzeniem się w procesie gnicia pewnego (nieznanego) stężenia tlenku węgla. Wytwarzania się hemoglobiny tlenowęglowej w toku procesów tanatochemicznych dowodziło wielu badaczy (14, 17), chociaż inni twierdzą że zanik COHb wskutek uwalniania się CO z kompleksu z hemoglobiną jest jeszcze bardziej prawdopodobny (24). Jest to złożony problem, który w dobie obecnej, wobec możliwości stosowania bardziej specyficznych metod w odniesieniu do pochodnych hemoglobiny wymaga weryfikacji. Na tym stopniu ogólności jednakże wydaje się, że ocena wytworzonego COHb w toku przekształceń gnilnych jest problemem przede wszystkim doboru właściwej metody badawczej.

Obserwacja narastania methemoglobiny i sulfhemoglobiny w gniących próbkach krwi jest mierzalnym dowodem przekształceń w niej zachodzących. Wyniki te wprawdzie nie mają charakteru systematycznej zależności w czasie, wskazują jednak na zarysowujący się dość wyraźny trend. Biorąc pod uwagę średnie zawartości tych pochodnych hemoglobiny, jak wykazano na ryc. 4, można zauważyć szybsze narastanie sulfhemoglobiny w stosunku do methemoglobiny w czasie. Być może decydującym czynnikiem jest w tym przypadku obok tworzenia się równoczesne zanikanie methemoglobiny.



Ryc. 4. Obserwowane zawartości methemoglobiny (MetHb) i sulfhemoglobiny (SulfHb) wytworzonych w czasie przechowywania próbek krwi.

Fig. 4. Methemoglobin (MetHb) and sulfhemoglobin (SulfHb) in the blood samples generated in the course of the storage.

Biorąc pod uwagę przytoczone obserwacje zmian w zawartości wybranych pochodnych hemoglobiny nasuwa się twierdzenie, że przechowywana próbka krwi jest układem chemicznym dynamicznym, w którym występują przeobrażenia kształtowane czynnikami zewnętrznymi (bakterie, temperatura), a których kierunek można jedynie przewidzieć w zarysie. Pochodzenie materiału z różnych zwłok sugeruje znaczną jego niejednorodność, nadając mu w znacznej mierze indywidualny charakter.

Wykazanie wyższych wartości methemoglobiny i sulfhemoglobiny w próbach po wielotygodniowym przechowywaniu tłumaczy niższą korelację COHb określoną badanymi metodami, wykazaną w powyższych rozważaniach. Obecność innych postaci hemoglobiny oraz innych produktów rozkładu może zatem stanowić czynnik zmieniający bezwzględną i faktyczną wartość COHb w oznaczeniach spektrofotometrycznych.

Charakteryzując zatem metodę chromatografii gazowej oznaczania COHb należy podkreślić jej przydatność w badaniach materiału sekcyjnego, zwłaszcza dotkniętego procesem gnicia. Metoda wymaga jednak przestrzegania dyscypliny w stosowaniu warunków analizy w zakresie zarówno przygotowywania prób jak i samego pomiaru chromatograficznego. Dotyczy to zwłaszcza tak newralgicznych punktów metody jak nasycanie prób krwi do kalibracji jak i pobierania par o określonej objętości metodą *headspace*. Przeprowadzone badania wskazują na to, że lepsze wyniki osiąga się przy nasycaniu prób krwi do krzywej kalibracyjnej, pobierając bezpośrednio sprężony tlenek węgla z butli niż nasycając tlenkiem węgla wytwarzanym bezpośrednio w reakcji chemicznej pomiędzy kwasem siarkowym i mrówkowym, jak czyniono to poprzednio (4). Dokładność oznaczeń zaś tkwi także w podawaniu na kolumnę chromatograficzną określonej, zawsze podobnej objętości próbki par przy pomocy specjalnie służącej do tego celu strzykawki ciśnieniowej do analizy *headspace*. Innym czynnikiem ograniczającym metodę jest katalizator - metanizer, którego czas pracy jest limitowany zwykle do 100 analiz. Metoda ta w ściśle przestrzeganych warunkach charakteryzuje się precyzją w granicach 10 %. Współczynniki korelacji dla krzywych kalibracyjnych (CF) dla poszczególnych prób przedstawione w Tabeli I wykonane przy każdej próbie, wykazujące wartości (0.8487 - 1.0000) gwarantują także zadowalającą dokładność metody.

Ocena metody chromatograficznej w odniesieniu do innych metod analizy COHb, zwłaszcza spektrofotometrycznych była w przeszłości podejmowana przez różnych autorów (3, 4, 24, 15, 18). Wnioski w cytowanych pracach są zgodne przede wszystkim w odniesieniu do rekomendacji chromatografii gazowej, jako najbardziej właściwej metody do oznaczeń COHb w próbkach krwi sekcyjnej, przekształconej gnilnie.

## PIŚMIENNICTWO

1. Aisworth C. A Schoegel E. L Domański T. J. Goldbaum L. R.: A gaschromatographic procedure for the determination of carboxyhemoglobin in postmortem samples, J. Forens. Sci., 1967, 12, 529-537. - 2. Birky M., Małek

D., and Paabo M.: Study of biological samples obtained from victims of MGM Grand Hotel Fire, *J. Anal. Toxicol.*, 1983, 7, 265-268. - 3. Blackmore D.J.: The determination of carbon monoxide in blood and tissue, *Analyst*, 1970, 95, 439-458. - 4. Buszewicz G. Mądro R.: Chromatographic determination of carbon monoxide and carboxyhemoglobin by the head-space technique using a catalytic microreactor with FID detector, *Z Zagadnień Nauk Sądowych*, 1997, 36, 132-140. - 5. Costa C, Trend G., Moincault B., Gostin J.L.: Assesment of the thermal and toxic effects of chemical and pesticide pool fires based on experimental data obtained using the TEWARDSON APPARATUS, *Process and Inviromental Protection*, 1999, 77, 154-164. - 6. Fretwurst F. und Meinecke K.H.: Eine neue Methode zur quantitativen Bestimmung des Kohlenoxydhamoglobins im Blut. *Arch. Toxicol.* , 1959, 17, 273-283. - 7. Fukui M.: Carbon Monoxide, In M. Fukui et al.(eds), *Saiban Kagaku*, 2<sup>nd</sup> ed. Hirokawa, Tokyo, 1972, 239-246. - 8. Harrison G.A.: *Chemical Methods in Clinical Medicine - their application and interpretation with techniques of simple tests*, J.&A. Churchill Ltd. London, 1947. - 9. Hessel D., Modglin F.R.: The determination of carbon monoxide in blood by gas solid chromatography, *J. Forens. Sci.*, 1972, 2, 123-130. - 10. Inffland R., Sticht G.: Gaschromatographisches Verfahren zur Bestimmung des Kohlenoxidhaltes in Blut. *Arch. Toxicol.*, 1972, 29, 325 - 330.

11. Katsumata Y., Aoki M., Sato K., Oya M., Yada S., and Suzuki O.: A simple spectrophotometric method for the determination of carboxyhemoglobin in blood. *Forensic Sci. Int.*, 1981, 18, 175-179. - 12. Kłysz M., Baran E.: Zatrucie śmiertelne w materiale Zakładu Medycyny Sądowej w Krakowie w latach 1946 - 1995, *Arch. Med. Sąd. i Krym.*, 1996, 46/4, 277-287. - 13. Kojima T., Yashiki M., Une I.: Selection of specimen in the determination of carboxyhemoglobin saturation by spectrophotometry, *Hiroshima Journal of Medical Sciences*, 1983, 32, 87-91. - 14. Kojima T., Okamoto M., Yashiki T., Miyazaki F., Chikasue K., Degawa S., Ishida and Sagisaka K.: Production of carbon monoxide in cadavers, *Forensic, Sci Internat.*, 1986, 32, 67-77. - 15. Levine B., D'Nicuola J., Kunsman G. Smith M, Stahl C: Methodologic considerations in the interpretation of postmortem carboxyhemoglobin concentrations, *Toxicology*, 1996, 115, 129-34. - 16. Maehly A.C.: Quantitative detrmination of carbon monoxide. *Methods of Forensic Science*, F. Lundquist, Ed., Vol.1. Interscience, New York, 1962, 566-569 and 539-592. - 17. Markiewicz J.: *Ekspertyza Sądowa*, Wyd Prawnicze, Kraków, 1981. - 18. Perrigo B.J. and Joynt B.P.: Evaluation of current derivative spectrophotometric methodology for the determination of percent carboxyhemoglobin saturation in postmortem blood samples, *J. Anal. Toxicol.*, 1989, 13, 37-46. - 19. Sakai K., and Kojima T.: Comparison of three spectrophotometric methods for the determination of carbon monoxide hemoglobin in blood. *Jpn. J. Legal Med.*, 1978., 32, 1-6. - 20. Sakata M., Haga M.: Determination of carbon monoxide in blood by headspace analysis *J. Toxicol. Sci.* 1980, 5, 35-43. -

21. Sakata M. Haga M.: Rapid determination of carboxyhemoglobin by absorbance difference between double wave length, *J. Toxicol. Sci.* , 1980, 5, 113-121. - 22. Siek T.J., Rieders F.: Determination of carboxyhemoglobin in the presence of other blood hemoglobin pigments by visible spectrophotometry, *J. Forensic. Sci.*, 1984, 29, 39-54. - 23. Wigfield D.C. , Hollebhone B.R., MacKeen

J.E. and Selwin J.C.: Assessment of the methods available for the determination of carbon monoxide in blod, *J. Anal. Toxicol.*, 1981, 5, 122-125. - 24. Winek Ch.L. and Prex D.M.: A comparative study of analytical methods to determine postmortem changes in carbon monoxide concentration, *Forensic Sci. Internat.*, 1981, 18, 181-187. - 25 *Opis Metody - Instrukcja producenta AVL 912 CO - Oxylite (Austria).*

Adres pierwszego autora:  
Katedra Medycyny Sądowej CM UJ  
31-531 Kraków  
ul. Grzegorzeczka 16.