

Joanna Nowicka, Teresa Grabowska, Joanna Kulikowska, Rafał Celiński,  
Małgorzata Korczyńska, Kornelia Drożdżiok

## Metody oznaczania tlenku węgla we krwi sekcyjnej – zalety i ograniczenia

Methods of carbon monoxide determination in postmortem blood –  
advantages and disadvantages

Z Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej i Toksykologii Sądowo-Lekarskiej  
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach  
p.o. Kierownik: dr med. C. Chowaniec

Ze względu na epidemiologię zatruczeń tlenkiem węgla diagnostyka zatruczeń tym ksenobiotykiem jest jednym z podstawowych zadań toksykologii sądowej. W praktyce analitycznej do wykrywania tlenku węgla wykorzystuje się metody kolorymetryczne, spektrofotometryczne i chromatografii gazowej. W pracy, w oparciu o własne doświadczenia oraz dane literaturowe, omówiono najczęściej wykorzystywane metody analityczne do oznaczania tlenku węgla. Wskazano na ich zalety i ograniczenia a także źródła błędów związanych ze specyfiką materiału sekcyjnego.

With respect to epidemiology of carbon monoxide poisonings, the diagnostic management of poisonings caused by this xenobiotic is among the fundamental objectives of forensic toxicology. In forensic practice, to determine carbon monoxide, colorimetric and spectrophotometric methods, as well as gas chromatography are used. Based on literature data and their own experience, the authors discuss analytical methods universally applied in determinations of carbon monoxide in postmortem blood. The advantages and disadvantages, as well as the cause of errors resulting from the specificity of the examined material (postmortem blood) are indicated.

Słowa kluczowe:

karboksyhemoglobina, metody oznaczania,  
krew sekcyjna

Key words:

carboxyhemoglobin, determination methods,  
postmortem blood

### WSTĘP

Diagnostyka zatruczeń tlenkiem węgla (CO) jest jednym z podstawowych zadań toksykologii sądowej i klinicznej. W statystyce Zakładu Toksykologii Sądowo-Lekarskiej Katedry Medycyny Sądowej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach zatrucia śmiertelne tlenkiem węgla zajmują, po alkoholu, ciągle czołową pozycję. Skalę problemu ilustrują dane statystyczne Katedry: w latach 1976-2010 (35 lat) wykonano 4202 analizy na obecność tlenku węgla, z których 2530 (60,2%) dały wynik dodatni. W sprawach, w których zachodzi podejrzenie, iż do zgonu doszło na skutek zatrucia tlenkiem węgla, opinia sądowo-lekarska opiera się na wynikach oględzin i sekcji zwłok oraz na oznaczonej zawartości karboksyhemoglobiny (COHb) we krwi. Powszechnie przyjmuje się, iż stężenie we krwi COHb powyżej 50% jest stężeniem śmiertelnym. Wysycenie krwi CO rzędu 10-50% świadczy o tym, iż doszło do inhalacji gazu zawierającego CO, co mogło doprowadzić do zgonu, ale także należy rozważyć możliwość stosunkowo szybkiego zgonu, do którego doszło w przebiegu pożaru. W takiej sytuacji zgon może mieć również charakter złożony i być związany z działaniem wysokiej temperatury,

\* Poszerzona wersja referatu, przedstawionego podczas XV Zjazdu Naukowego PTMSiK, Gdańsk 16-18.09.2010.

uduszeniem spowodowanym obniżeniem się zawartości tlenu, działaniem innych toksycznych gazów, np. HCN. Stężenia poniżej 10% COHb mogą przemawiać za tym, iż do zgonu doszło bardzo szybko po wznieceniu pożaru, np. na skutek urazu lub zgon nastąpił zanim doszło do pożaru a oznaczony poziom COHb może być związany z nałogowym paleniem papierosów. Interpretując wyniki analizy na obecność karboksyhemoglobiny należy uwzględnić także takie czynniki, jak wiek i stan zdrowia. Osoby starsze, z objawami anemii, ze zmianami chorobowymi dróg oddechowych, serca, układu krążenia, alkoholicy a także niemowlęta i dzieci są bardziej wrażliwe i podatne na zatrucia CO. Stężenie COHb w takich przypadkach może być relatywnie niższe [1, 2].

## MECHANIZM TOKSYCZNEGO DZIAŁANIA TLENKU WĘGLA

Tlenek węgla jest gazem powodującym największą liczbę zatruc inhalacyjnych, do których dochodzi w czasie pożarów, w mieszkaniach z niesprawną wentylacją urządzeń grzewczych, gdzie źródłem CO są piecyki i kuchenki gazowe, piece węglowe, termy, w czasie narażenia na spaliny silnikowe w zamkniętym garażu, w katastrofach górniczych, w których w wyniku wybuchu pyłu węglowego lub metanu dochodzi do powstania dużej ilości tlenku węgla. Mechanizm toksycznego działania CO związany jest z blokowaniem transportu tlenu przez konkurencyjne wiązanie z atomem żelaza w cząsteczce hemu z utworzeniem karboksyhemoglobiny (COHb). Powinowactwo CO do hemoglobiny, ferrytyny i mioglobiny jest 200-300 razy większe aniżeli powinowactwo tlenu. Oddychanie powietrzem zawierającym CO prowadzi do niedotlenienia anemiczno-cytotoksyczno-zastoinowego. Zwolnieniu ulegają oksydacyjne procesy metaboliczne, w komórkach gromadzą się kwaśne metabolity, zmniejsza się napięcie ścian naczyń mózgowych z następowym rozszerzeniem tętnic. Dochodzi do przekrwienia mózgu, rozwija się ciężka hipoksja tkankowa i kwasica mleczanowa [1, 2].

## METODY OZNACZANIA COHb

W praktyce toksykologii sądowej do wykrywania karboksyhemoglobiny znalazły zastosowanie

proste metody chemiczne, metody kolorymetryczne, spektrofotometryczne i chromatografii gazowej z różnymi systemami detekcji. Należy podkreślić, iż krew sekcyjna jest trudnym materiałem badawczym, często wykazującym cechy fermentacyjno-gnilnego rozkładu z zaznaczonymi przemianami barwnikowymi, w którym spontanicznie powstają methemoglobina i sulfhemoglobina. Ponadto krew pochodząca od ofiar pożarów wykazuje cechy działania wysokiej temperatury z charakterystyczną termokoagulacją, w wyniku której dochodzi do spadku całkowitej, rozpuszczalnej hemoglobiny i pojawienia się methemoglobiny. Obecność innych pochodnych hemoglobiny oraz produktów jej rozkładu może stanowić czynnik zmieniający faktyczną wartość COHb zwłaszcza w oznaczeniach z użyciem metod spektrofotometrycznych [3, 4]. Niektóre zachorowania i zatrucia, powodujące zaburzenia w barwnikach krwi, mogą stwarzać pozory obecności COHb, zwłaszcza gdy do analizy wykorzystuje się metody kolorymetryczne [5].

Specyfika materiału sekcyjnego niesie za sobą ograniczenia a zatem zmusza do wyboru odpowiedniej metody badawczej. Oceniając działania CO na organizm człowieka przede wszystkim przez pryzmat oznaczonej zawartości COHb należy wziąć także pod uwagę rodzaj zastosowanych metod analitycznych.

W tabeli I przedstawiono przegląd metod wykorzystywanych do oznaczania COHb.

Współcześnie, do ilościowego oznaczania karboksyhemoglobiny, wykorzystuje się głównie metody spektrofotometryczne i chromatografii gazowej. Zalety i ograniczenia obydwu metod zebrano i porównano w tabeli II.

## WNIOSKI

1. Metody chromatografii gazowej, kosztowne i wymagające specjalistycznej aparatury i wykwalifikowanego personelu, charakteryzujące się wysoką czułością, precyzją, specyficznością, będą preferowane:

- w badaniach naukowych,
- w seryjnych, rutynowych badaniach osób narażonych na działanie CO, np. w pracy zawodowej (konieczność oznaczenia zmiennych, niskich stężeń CO),
- w badaniach krwi sekcyjnej zmienionej gnilnie.

2. Metody spektrofotometryczne, tańsze, charakteryzujące się prostotą, szybkością wykonania oraz akceptowaną powszechnie, dostateczną czułością, będą preferowane:

- w szybkiej diagnostyce sądowej i klinicznej,
- w badaniach nie zmienionej, świeżej krwi,
- w laboratoriach w których COHb oznacza się sporadycznie, które nie są wyposażone w chromatografy gazowe.

3. Możliwość równoległego zastosowania metody chromatografii gazowej i metody spektrofotometrycznej pozwoliłaby na spełnienie podstawowego wymogu badań toksykologicznych wykonywanych dla potrzeb wymiaru sprawiedliwości, tj. zapewnienia weryfikacji otrzymanych wyników oznaczeń za pomocą dwóch różnych metod.

Tabela 1. Metody oznaczania karboksyhemoglobiny [4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14].

Table 1. Methods of carboxyhemoglobin determination.

Lp. No	Metoda Method	Granica oznaczalności Detection limit [% COHb]	Dane źródłowe Literature data
1	<b>Spektroskopowa (spektroskop ręczny z redukcją)</b> Spectroscopic test (manual spectroscope with reduction)	15-30	May 1937 Skramovsky 1947
2	<b>Taninowa (1% tanina)</b> Tannin test (1% tannin)	4-20	May 1937 Skramovsky 1937
3	<b>Taninowa (3% tanina)</b> Tannin test (3% tannin)	8-12	May 1937 Wikoff-Carson 1948
4	<b>Taninowa Wachholza-Sieradzkiego</b> Wachholz-Sieradzki's tannin test	4-7	Wachholz-Sieradzki
5	<b>Z kwasem pirogalusowym</b> Pyrogallic acid test	12-15	Krauland 1940
6	<b>Wolffa (w połączeniu z badaniem spektrofotometrycznym)</b> Wolff's test (combined with spectrophotometric analysis)	2-3	Wolff 1941 Rejsek-Skramovsky 1947
7	<b>Spektroskopia rewersyjna</b> Reversion spectroscopy	3	Harrison 1947
8	<b>Spektrofotometryczna Fretwursta-Meinecke</b> Fretwurst-Meinecke's spectrophotometric test		Fretwurst 1959
9	<b>CO-oksymetry</b> CO-oximetry	1	Katsumata 1981 Mahoney 1993
10	<b>Chromatografia gazowa z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym GC/FID</b> Gas chromatography - flame ionization detector GC/FID	0,1	Guillot 1981 Buszewicz 1997 Klys 2000
11	<b>Chromatografia gazowa z detektorem przewodnictwa cieplnego GC/TCD</b> Gas chromatography - thermal conductivity detector GC/TCD	0,02	Goldbaum 1986, Wachowiak 1997 Lewis 2004
12	<b>Chromatografia gazowa ze spektrometrią mas GC/MS</b> Gas chromatography - mass spectrometry GC/MS	0,005	Oritani 2000 Walch 2010

Tabela II. Porównanie metod spektrofotometrycznych i chromatografii gazowej [4, 7, 9, 15].  
Table II. Comparison of spectrophotometric methods and gas chromatography.

Metody spektrofotometryczne Spectrophotometric methods	Chromatografia gazowa Gas chromatography
<b>Zalety</b> Advantages	
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. <b>Łatwe i szybkie przygotowanie próby do analizy</b> Easy and fast sample preparation for analysis</li> <li>2. <b>Krótki czas analizy</b> Short analysis time</li> <li>3. <b>Akceptowana dla potrzeb toksykologii sądowej czułość (granica wykrywalności 1%)</b> Sensitivity acceptable for forensic toxicology purposes (detection limit 1%)</li> <li>4. <b>Dają możliwość równoległego pomiaru innych pochodnych hemoglobiny</b> Possible simultaneous measurement of various hemoglobin derivatives</li> <li>5. <b>Pomiar może być zautomatyzowany</b> Possible automatic measurement</li> <li>6. <b>Niski koszt analizy</b> Low cost</li> <li>7. <b>Mogą być użyte do innych analiz</b> Can be used for other analyses</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. <b>Specyficzna dla CO</b> Specific for CO</li> <li>2. <b>Nieczuła na chemiczne i spektralne interferencje</b> Non-sensitive to chemical and spectral interference</li> <li>3. <b>Precyzyjna i bardzo czuła (granica wykrywalności 0,005%)</b> Precise and very sensitive (detection limit 0.005%)</li> <li>4. <b>Mała objętość próbki</b> Small sample volume</li> <li>5. <b>Dokładna w całym zakresie oznaczanych stężeń</b> Accurate within all concentration ranges</li> <li>6. <b>Pomiar może być zautomatyzowany</b> Possible automatic measurement</li> <li>7. <b>Może być wykorzystana do innych analiz</b> Can be used for other analyses</li> </ol>
<b>Ograniczenia</b> Disadvantages	
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. <b>Czułe na spektralne i chemiczne interferencje</b> Sensitive to chemical and spectral interference</li> <li>2. <b>Mało dokładne w przypadku niskich stężeń (&lt; 5% COHb)</b> Not precise for low COHb concentrations</li> <li>3. <b>Stężenia &gt;30% COHb mogą być zawyżone</b> Concentrations &gt;30% COHb can be overestimated</li> <li>4. <b>Preferowane dla czystej, świeżej krwi</b> Preferable for use with clean and fresh blood</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. <b>Wymaga uważnego i bardzo dokładnego przygotowania próbki</b> Requires careful and precision sample preparation</li> <li>2. <b>Długi czas analizy</b> Long analysis time</li> <li>3. <b>Wymaga specjalistycznej, wykwalifikowanej obsługi</b> Requires specialized and qualified operators</li> <li>4. <b>Znacznie wyższy koszt analizy</b> – mało przydatna do rutynowych, szybkich analiz Significantly higher cost of analysis – low usefulness in routine and quick analyses</li> <li>5. <b>Inne pochodne hemoglobiny trzeba oznaczyć przy użyciu innych metod</b> Other hemoglobin derivatives should be determined using other methods</li> </ol>

## PIŚMIENNICTWO

1. Seńczuk W. (red.): Toksykologia współczesna. PZWL, Warszawa 2006.
2. Kołaciński Z. (red.): Ostre zatrucia cz. I. Zatrucia gazami. IMP, Łódź 1996.
3. Kała M., Chudzikiewicz E.: The influence of post-mortem changes in biological material on interpretation of toxicological analysis results. *Problems of Forensic Science*. 2003, 54: 132-144.
4. Kłys M., Klementowicz W., Gomułka E., Opidowicz A., Kurowska W.: Badania nad przydatnością metod spektrofotometrycznej i chromatografii gazowej (GC/FID) z metanizerem do oznaczeń tlenku węgla we krwi sekcyjnej. *Arch. Med. Sąd. Kryminol.* 2000, 50: 235-247.
5. Jerzykowski T., Jóźkiewicz S., Spett K.: Metody oznaczania tlenku węgla we krwi dla użytku lekarskich pracowni analitycznych. *Arch. Med. Sąd. Kryminol.* 1957, 9: 73-81.
6. Katsumata Y., Aoki M., Sato K., Oya M., Yada S., Suzuki O.: A simple spectrophotometric method for the determination of carboxyhemoglobin in blood. *Forensic Sci Int.* 1981, 18: 175-179.
7. Mahoney J. J., Vreman H. J., Stevenson D. K., van Kessel A. L.: Measurement of carboxyhemoglobin and total hemoglobin by five specialized spectrophotometers (CO-oximeters) in comparison with reference methods. *Clin Chem.* 1993, 39: 1693-1700.
8. Guillot J. G., Weber J. P., Savoie Y.: Quantitative determination of carbon monoxide in blood by head space gas chromatography. *J Anal Toxicol.* 1981, 5: 264-266.
9. Buszewicz G., Mądro R.: Chromatographic determination of carbon monoxide and carboxyhemoglobin by the head-space technique using a catalytic microreactor with FID detector. *Problems of Forensic Science*. 1997, 36: 132-144.
10. Goldbaum L. R., Chace D. H., Lappa N. T.: Determination of carbon monoxide in blood by gas chromatography using a thermal conductivity detector. *J Forensic Sci.* 1986, 31: 133-142.
11. Wachowiak R., Tobolski J.: Wykorzystanie chromatografii gazowej w toksykologicznej analizie lotnych związków nieorganicznych w materiale biologicznym. *Arch. Med. Sąd. Kryminol.* 1997, 47: 237-243.
12. Lewis R. J., Johnson R. D., Canfield D.V.: An accurate method for determination of carboxyhemoglobin in postmortem blood using GC-TCD. *Journal of Analytical Toxicology*. 2004, 28: 59-62.
13. Oritani S., Zhu B. L., Ishida K., Shimotouge K., Quan L., Fujita M.Q., Maeda H.: Automated determination of carboxyhemoglobin contents in autopsy material using head-space gas chromatography/mass spectrometry. *Forensic Sci Int.* 2000, 113: 375-379.
14. Walch S. G., Lachenmeier D. W., Sohnius E. M., Madea B., Musshoff F.: Rapid determination of carboxyhemoglobin in postmortem blood using fully-automated headspace gas chromatography with methaniser and FID. *The Open Toxicology Journal*. 2010, 4: 21-25.
15. Boumba V. A., Vougiouklakis T.: Evaluation of the methods used for carboxyhemoglobin analysis in postmortem blood. *International Journal of Toxicology*. 2005, 24: 275-281.

Adres do korespondencji:

Joanna Nowicka  
Katedra i Zakład Medycyny Sądowej  
i Toksykologii Sądowo-Lekarskiej  
ul. Medyków 18  
40-752 Katowice  
e-mail: joanna\_nowicka@poczta.onet.pl