

Державна спеціалізована установа
“Головне бюро судово–медичної експертизи
Міністерства охорони здоров’я України”
Харківська медична академія післядипломної освіти МОЗ України

“ЗАТВЕРДЖЕНО”

Голова методичної ради при

ДСУ “Головне бюро СМЕ МОЗ України”

Т.В. Личман

(Протокол № 2, від 15.02.2022 р.)



**ВИЯВЛЕННЯ ТА ВИЗНАЧЕННЯ КАРБОКСИГЕМОГЛОБІНУ ТА
КАРБОКСИМІОГЛОБІНУ В ТРУПНОМУ МАТЕРІАЛІ
(Керівні вказівки щодо виконання вимірювань)**

Київ – 2022

Установи – розробники: ДСУ “Головне бюро судово–медичної експертизи
Міністерства охорони здоров’я України”.
Харківська медична академія післядипломної
освіти МОЗ України;

Укладачі:

к. фарм. н., Савченко М. А.	(044) 206–73–46
к. фарм. н., доцент Гузенко Н. В.	(057) 711–79–97
к. фарм. н., доцент Чубенко А. В.	(057) 711–79–97

Рецензенти:

Давтян Лена Левонівна – доктор фармацевтичних наук, професор, експерт–токсиколог судовий, завідувач кафедри фармацевтичної технології та біофармації Національного університету охорони здоров’я України імені П.Л. Шупика.

Баюрка Сергій Васильович – доктор фармацевтичних наук, доцент, завідувач кафедри лікарської та аналітичної токсикології Національного фармацевтичного університету.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ.....	4
ВСТУП.....	5
ЯКІСНЕ ВИЯВЛЕННЯ КАРБОКСИГЕМОГЛОБІНУ.....	7
КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ КАРБОКСИГЕМОГЛОБІНУ.....	8
КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ КАРБОКСИМІОГЛОБІНУ.....	17
РЕАКТИВИ ТА ЇХ ПРИГОТУВАННЯ.....	22
ВИСНОВКИ.....	23
ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ.....	24
ДОДАТКИ.....	25

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

Hb	– гемоглобін;
O ₂ Hb	– оксигемоглобін;
HHb	– відновлений гемоглобін;
COHb	– карбоксигемоглобін;
MetHb	– метгемоглобін;
SulfHb	– сульфгемоглобін;
COsulfHb	– карбоксисульфгемоглобін;
Mb	– міоглобін;
O ₂ Mb	– оксиміоглобін;
HHb	– відновлений міоглобін;
COMb	– карбоксиміоглобін;
MetMb	– метміоглобін;
SulfMb	– сульфміоглобін;
COsulfMb	– карбоксисульфміоглобін;
CO	– монооксид вуглецю;
к.т.	– кімнатна температура

ВСТУП

Карбоксигемоглобін та карбоксиміоглобін є патологічними формами транспортуючих вільний кисень гемопротеїдів – гемоглобіну і міоглобіну, які не здатні переносити та віддавати кисень. Накопичення в організмі цих пігментів призводить до розвитку гемічної та м'язової гіпоксії. Основним джерелом утворення карбоксигемоглобіну та карбоксиміоглобіну, в судово–медичній практиці є інгаляторне отруєння монооксидом вуглецю (чадний газ). Спорідненість монооксиду вуглецю до гемоглобіну в 204–290 разів, а міоглобіну в 14–51 разів, більша ніж до кисню, внаслідок чого монооксид вуглецю швидко заміщує кисень з утворенням карбоксигемоглобіну та карбоксиміоглобіну. Значне накопичення, в першу чергу карбоксигемоглобіну, може бути одним з головних чинників в настанні смерті при отруєнні, тому, судово–токсикологічне виявлення та визначення карбоксигемоглобіну (карбоксиміоглобіну) має суттєве діагностичне значення для встановлення факту отруєння монооксидом вуглецю.

Якісне виявлення карбоксигемоглобіну ґрунтується на різній стійкості COHb та O_2Hb до дії різних хімічних реагентів. Зазвичай, забарвлення COHb не змінюється при додаванні реактивів, в той час як забарвлення O_2Hb зазнає суттєвих змін. Кількісне визначення COHb проводиться за модифікованим методом Л. П. Букіної та Л. І. Ушакової [1]. Метод ґрунтується на різниці в спектрах поглинання COHb/COMb та Hb/HMb в діапазоні довжин хвиль 500 – 600 нм (рис. 1), при чому відновлені форми пігментів отримують з відповідних O_2Hb та O_2Mb після додавання відновника. Суттєвою перевагою модифікованого методу перед оригінальним є те, що насичення крові CO здійснюється лише для визначення розрахункових коефіцієнтів, значення яких, в подальшому, лише перевіряють. Головним недоліком вказаного методу визначення COHb/COMb , а також всіх спектрофотометричних методів, є припущення, що досліджуваний розчин є двокомпонентною системою, яка містить лише COHb/Hb або COMb/Hb . Разом з тим, кров і розчин міоглобіну з трупа можуть містити й інші форми гемопротеїдів –

SulfHb/SulfMb, COSulfHb/COSulfMb а також інші заважаючі речовини. З метою оцінки впливу заважаючих компонентів трупної крові на результати кількісного визначення COHb/COMb, застосовується обрахунок з використанням всіх ізобестичних точок та довжин хвиль де спостерігається максимальна різниця в поглинанні COHb/COMb та HHb/HMb [2]. Доповненням, до запропонованого авторами [2] підходу визначення COHb/COMb, яке застосовано в цих керівних вказівках, є визначення максимальної різниці між мінімальним і максимальним показником, з отриманих значень кількості COHb/COMb, та інтерпретація кінцевого результату.

Керівні вказівки розроблені у межах плану роботи відділення судово–медичної токсикології ДСУ «Головне бюро СМЕ МОЗ України» на 2021 рік. За результатами проведених досліджень встановлені та статистично обґрунтовані межі відхилень одиничних результатів кількості COHb/COMb між собою, надано спосіб оцінки отриманих результатів та представлення кінцевого результату. Кінцевим результатом розробки керівних вказівок є впровадження методу виявлення та визначення карбоксигемоглобіну та карбоксиміоглобіну в трупному матеріалі, які відсутні в практиці вітчизняної судово–медичної токсикології.

Керівні вказівки призначені для експертів–токсикологів судових та лікарів судово–медичних експертів–токсикологів бюро судово–медичної експертизи, є обов'язковими до застосування при проведенні експертиз з виявлення і визначення кількості карбоксигемоглобіну (карбоксиміоглобіну).

Будь–які зміни умов викладених в керівних вказівках не гарантують надійність отриманих аналітичних результатів і як наслідок кінцевого результату.

Керівні вказівки видаються вперше в Україні.

I. ЯКІСНЕ ВИЯВЛЕННЯ КАРБОКСИГЕМОГЛОБІНУ.

Проведення якісних реакцій дозволяє попередньо виявити наявність СОНб та оцінити насиченість досліджуваної крові СО.

Всі якісні реакції виконуються паралельно з двома контрольними пробами крові, одна з яких містить близько 100 % СОНб, друга – містить близько 100 % О₂Нб. Отриманий візуальний ефект якісних проб порівнюється з контрольними пробами крові.

При оцінюванні результатів якісних реакцій необхідно враховувати, що кров, яка містить малі кількості СОНб (менше 20–30 %) буде давати такий самий візуальний ефект як і кров, яка не містить СОНб. Серед описаних нижче якісних реакцій, реакція з розчином натрію гідроксиду (проба Гоппе–Зейлера) та реакція з таніном (проба Кункеля–Ветцеля) є найбільш чутливими та дозволяють отримувати позитивний результат при концентрації СОНб 15–20 %.

1. Реакція з розчином натрію гідроксиду (проба Гоппе–Зейлера).

До досліджуваної крові додають подвійний об'єм розчину натрію гідроксиду із масовою часткою лугу 30 % та перемішують.

Кров яка містить СОНб, забарвлення не змінює. Кров в якій відсутній СОНб відразу набуває зелено–чорного або бурого забарвлення.

Кров в стані гнилісних змін, внаслідок утворення лужного гемохромогену, а також кров плода дають хибно позитивний результат при відсутності СОНб.

2. Реакція з таніном (проба Кункеля–Ветцеля).

До розведеної (1:4) дистильованою водою крові додають потрібну кількість свіжовиготовленого розчину таніну із масовою концентрацією речовини 3 %. Суміш ретельно перемішують.

В розчині крові, яка не містить СОНб утворюється сіро–коричневий осад. Забарвлення осаду в розчині крові, яка містить СОНб залишається карміново–червоним.

Найбільш чітка різниця в забарвленні осаду між кров'ю, яка містить СОНб та кров'ю, в якій СОНб відсутній, спостерігається через декілька годин. Тому, результат цієї реакції необхідно враховувати через 24 години.

3. Реакція з розчином формальдегіду (проба Лібмана).

До 1 мл крові додають 1 мл розчину із масовою часткою формальдегіду 37 % та інтенсивно перемішують.

Кров, яка не містить СОНб, в продовж кількох хвилин змінює забарвлення на сіро–чорне. Кров, яка насичена СО забарвлення не змінює.

При використанні розчинів з масовою часткою формальдегіду меншою за 37 %, зміна забарвлення крові, яка не містить СОНб, відбувається значно пізніше, а тому оцінку результату реакції необхідно проводити через годину.

Описану реакцію можна виконувати з плямами крові на фільтрувальному папері, які поміщають в камеру з парами формальдегіду. Різниця в забарвленні крові з'являється впродовж кількох хвилин.

II. КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ КАРБОКСИГЕМОГЛОБІНУ.

Для визначення карбоксигемоглобіну застосовують спектрофотометр із автоматичною реєстрацією (сканування) повного спектру, діапазоном довжин хвиль від, не більше за 300 нм, до, не менше за 800 нм, двопроменевою оптичною схемою та змінною, або фіксованою шириною спектральної щілини. У випадку фіксованого значення ширини спектральної щілини, воно повинно бути не більше за 1.5 нм. Дослідженню підлягає кров без ознак термічної денатурації, вилучена з вен кінцівок або з порожнини серця. Кров вилучена з інших порожнин тіла (крім порожнини серця) є джерелом хибних результатів і не може бути використана [3].

Кількісне визначення карбоксигемоглобіну складається з трьох етапів – визначення розрахункових коефіцієнтів, визначення СОНб в досліджуваній крові із застосуванням цих коефіцієнтів та інтерпретація отриманих результатів.

Сутність розрахункових коефіцієнтів полягає в оцінці співвідношення СОНб/ННб у випадках коли СОНб повністю відсутній та при майже 100 %

насиченні крові СО. Розрахункові коефіцієнти визначаються один раз та в подальшому корегуються двічі на рік або кожен раз після ремонту та налаштування спектрофотометра.

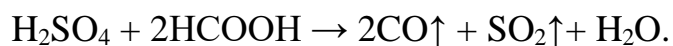
Для визначення розрахункових коефіцієнтів досліджують не менше 10 проб трупної крові осіб різних вікових категорій смерть яких не пов'язана з отруєнням СО та утопленням. Відбір таких проб крові повинен відбуватись не пізніше 2 діб після настання смерті. Відносне стандартне відхилення десяти визначень коефіцієнтів K_1 не повинно перевищувати 3 % (K_2 залежить від значення K_1 , тому відносне стандартне відхилення K_2 не розраховують). Якщо відносне стандартне відхилення K_1 перевищує 3 %, знаходять та вилучають з розрахунку значення коефіцієнту K_1 , яке найбільше відхиляється від середнього значення та розраховують відносне стандартне відхилення для значень коефіцієнтів K_1 , що лишилися. При вилученні промахів, загальна кількість експериментальних значень не повинна бути меншою за 8. У випадку значного зменшення кількості експериментальних значень K_1 , досліджуються додаткові зразки крові.

1. Визначення розрахункових коефіцієнтів.

1.1. Розвести 100 мкл трупної крові в 20 мл розчину амоніаку із об'ємною часткою 0,4 %. Отриманий розчин гемоглобіну центрифугувати 10 хв при 5000 об/хв, розділити на дві частини і позначити як розчин А та розчин В. Розчин А перенести в ємність 5 приладу для насичення розчину крові СО (рис. 1). В колбу 1, приладу, внести 50 мл концентрованої сульфатної кислоти а в крапельну воронку 2, концентровану мурашину кислоту в кількості 10–15 мл. В склянку 3 внести розчин натрію гідроксиду із масовою часткою лугу 10 % а в склянку 4 – дистильовану воду. Кінець газопідвідних трубок, в склянках 3 та 4, повинен бути занурений на ~2 см.

Для генерації СО, з крапельної воронки 2, в шар сульфатної кислоти по краплях додають мурашину кислоту. Швидкість утворення СО регулюють швидкістю додавання мурашиної кислоти. Реакція утворення СО відбувається

внаслідок дегідратації мурашиної кислоти в надлишку концентрованої сульфатної кислоти за рівнянням:



Як видно з рівняння, в процесі хімічної реакції поступово накопичується вода, яка розбавляє надлишок сульфатної кислоти. Тому, з додаванням мурашиної кислоти, реакція утворення СО поступово сповільнюється і в цьому випадку, реакційну суміш в колбі 1 обережно нагрівають.

УВАГА! Всі операції з отримання та використання СО необхідно виконувати виключно у витяжній шафі із увімкнутою тягою вентиляційної системи!

1.2. Розчин А насичують СО впродовж 15 хв (**при інтенсивному току СО можливо утворення значної кількості піни!**). За цей час практично весь O_2Hb перетворюється на COHb . Разом із COHb , в розчині А, можлива присутність MetHb , який не взаємодіє із СО та не перетворюється на COHb . Для переведення MetHb на COHb , через 15 хв насичення СО, до розчину А необхідно додати близько 10 мг натрію дитіоніту, суміш перемішати і насичувати СО ще 5 хв.

1.3. Насичений СО розчин А (містить близько 100 % COHb) та розчин В (містить близько 100 % O_2Hb) далі використовують для отримання спектрів поглинання COHb і Hb в діапазоні довжин хвиль 500 – 600 нм. З метою переведення O_2Hb в Hb , до 5 мл розчину В додають близько 5 мг натрію дитіоніту та ретельно перемішують. Регістрацію спектрів поглинання проводять із швидкістю 100 – 200 нм/хв та дискретністю 0,1 нм, в кюветі з довжиною оптичного шляху 1 см, розчин порівняння – розчину амоніаку із об'ємною часткою 0,4 %, який містить дитіоніт натрію.

1.4. Отримані спектри поглинання COHb і Hb використовують для виявлення п'ятьох базових ділянок в спектрах поглинання COHb і Hb (рис. 2). Дві відповідають довжинам хвиль де спостерігається максимальна різниця в поглинанні між COHb і Hb ($\Delta\lambda_{\text{max}1}$, яка розташована близько 534 нм, та $\Delta\lambda_{\text{max}2}$,

яка розташована близько 570 нм) і три, які відповідають довжинам хвиль в ізобестичних точках (λ_{iso1} , λ_{iso2} та λ_{iso3}).

Увага! Довжини хвиль базових ділянок ($\Delta\lambda_{max1}$, $\Delta\lambda_{max2}$, λ_{iso1} , λ_{iso2} та λ_{iso3}) можуть відрізнятись в залежності від приладу, який використовують. Тому, значення довжин хвиль цих ділянок необхідно визначити саме для свого спектрофотометру. Значення оптичної густини, які відповідають максимумам в спектрах поглинання, СОНб і ННб не повинні виходити за межі значень 0,20 – 0,80. Якщо значення оптичної густини виходять за вказані межі, досліджуваний розчин крові концентрують (шляхом додаванням нових порцій досліджуваної крові) або розводять розчином амоніаку.

Значення оптичної густини на зазначених довжинах хвиль використовуються для розрахунку шести коефіцієнтів K_1 та шести коефіцієнтів K_2 , відповідно до схеми таблиці 1, за наступними формулами:

$$K_1 = \frac{D_{\Delta\lambda_{max}(1,2)}^{ННб}}{D_{iso(1,2,3)}}; \quad K_2 = \frac{D_{\Delta\lambda_{max}(1,2)}^{СОНб}}{D_{iso(1,2,3)}} - K_1,$$

де:

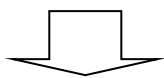
$D_{\Delta\lambda_{max}(1,2)}^{ННб}$ – значення оптичної густини ННб (розчин В) на довжинах хвиль, які відповідають області $\Delta\lambda_{max1}$ та $\Delta\lambda_{max2}$;

$D_{\Delta\lambda_{max}(1,2)}^{СОНб}$ – значення оптичної густини СОНб (розчин А) на довжинах хвиль, які відповідають області $\Delta\lambda_{max1}$ та $\Delta\lambda_{max2}$;

$D_{iso(1,2,3)}$ – значення оптичної густини на довжинах хвиль, які відповідають ізобестичним точкам λ_{iso1} , λ_{iso2} та λ_{iso3} .

Алгоритм визначення коефіцієнтів K_1 та K_2

100 мкл крові розвести в 20 мл
0,4 % розчині амоніаку



1. центрифугувати розчин гемоглобіну 10 хв при 5000 об/хв;
2. розділити розчини гемоглобіну на дві частини (розчини А і В);
3. наситити СО розчин А впродовж 15 хв;
4. додати в розчин А 10 мг $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, перемішати та насичувати СО ще 5 хв;
5. додати в розчин В 5 мг $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, перемішати;
6. записати спектри поглинання COHb і HHb ;
7. знайти точки де спостерігається максимальна різниці в поглинанні між COHb і HHb ($\Delta\lambda_{\text{max}1}$ та $\Delta\lambda_{\text{max}2}$) і три ізобестичні точки ($\lambda_{\text{iso}1}$, $\lambda_{\text{iso}2}$ та $\lambda_{\text{iso}3}$);
8. Розрахувати коефіцієнти K_1 та K_2 ;

2. Визначення карбоксигемоглобіну в досліджуваній крові.

2.1. Розвести 50 мкл трупної крові в 10 мл розчину амоніаку із масовою часткою речовини 0,4 %. Отриманий розчин центрифугувати 10 хв при 5000 об/хв. Прозорий центрифугат перенести в кварцеву кювету, додати близько 5 мг натрій дитіоніту та записати спектр поглинання за описаними в п. 1.3. умовами.

2.2. Отриманий спектр поглинання дослідити на присутність ознак наявності карбоксигемоглобіну.

У випадку присутності COHb , в спектрі поглинання досліджуваної крові спостерігається два максимуми поглинання – близько 543 нм та 564 нм, а також мінімум близько 549 нм.

Увага! Спектр поглинання COHb дуже схожий на спектр поглинання O_2Hb , але відрізняється положенням максимумів, які розташовані близько 541 нм і 576 нм, та мінімуму, який розташовано близько 560 нм (рис. 2). Точне положення максимумів та мінімуму в спектрі поглинання O_2Hb , як зазначено в п. 1.4, необхідно визначити для свого спектрофотометру. Присутність ознак O_2Hb , в спектрі поглинання досліджуваного зразка крові, вказує на втрату натрію дитіонітом своїх відновних властивостей.

Тому, дослідження спектру поглинання досліджуваного зразка крові, також слугує і внутрішнім контролем якості натрію дитіоніту. У випадку, коли кількість СОНб в досліджуваному зразку крові менше 100 % та натрію дитіоніт втратив свої властивості, положення максимумів та мінімумів в досліджуваному спектрі, будуть займати проміжне положення між положенням відповідних максимумів та мінімумів в спектрах СОНб та О₂Нб, але ніколи не вийдуть за їх межі! Чим більше кількість СОНб, тим ближче значення довжин хвиль максимумів і мінімумів в спектрі досліджуваної крові до відповідних значень в спектрі СОНб та навпаки (рис. 3).

При концентрації СОНб на рівні близько 30–40 %, в спектрі поглинання досліджуваного розчину крові спостерігається плато від одного максимуму до іншого без чіткого мінімуму близько 549 нм.

У випадку відсутності або малих кількостей (менше 25–30 %) СОНб, в спектрі поглинання досліджуваного розчині крові, присутній один максимум близько 555 нм, який відповідає максимуму поглинання ННб.

Увага! Діагностичне значення визначення СОНб починається з 10 % його вмісту в крові. Тому, наявність в спектрі поглинання досліджуваного зразка крові одного максимуму близько 555 нм, не є підставою для завершення дослідження і твердження про відсутність в досліджуваному зразку крові СОНб.

2.3. Використовуючи значення оптичної густини (D) на довжинах хвиль, які відповідають точкам $\Delta\lambda_{\max 1}$, $\Delta\lambda_{\max 2}$, $\lambda_{\text{iso}1}$, $\lambda_{\text{iso}2}$ та $\lambda_{\text{iso}3}$, відповідно до схеми таблиці 1, розрахувати шість значень вмісту СОНб, в досліджуваному зразку крові, за формулою:

$$\text{СОНб(\%)}_{(1-6)} = \frac{D_{\Delta\lambda_{\max (1,2)}} \times (D_{\text{iso}(1,2,3)} \times K_{1-(1-6)})}{D_{\text{iso}(1,2,3)} \times K_{2-(1-6)}} \times 100;$$

де:

$\text{COHb}(\%)_{(1-6)}$ – кількість COHb в досліджуваному зразку крові (відповідно шість значень);

$D_{\Delta\lambda_{\max}(1,2)}$ – значення оптичної густини на довжинах хвиль де спостерігається максимальна різниця в світлопоглинанні між COHb і HHb ($\Delta\lambda_{\max1}$ та $\Delta\lambda_{\max2}$);

$D_{\text{iso}(1,2,3)}$ – значення оптичної густини в трьох ізобестичних точках ($\lambda_{\text{iso}1}$, $\lambda_{\text{iso}2}$ та $\lambda_{\text{iso}3}$);

$K_{1-(1-6)}$ – коефіцієнти K_1 (відповідно шість значень);

$K_{2-(1-6)}$ – коефіцієнти K_2 (відповідно шість значень),

та знайти середнє, з шістьох, значення вмісту карбоксигемоглобіну в досліджуваному зразку крові – $\bar{x}_{\text{COHb}(\%)}$.

2.4. Розрахувати абсолютне стандартне відхилення шести значень вмісту COHb в досліджуваному зразку крові, від середнього значення за формулою:

$$S_{\text{абс.}} = \sqrt{\frac{\sum_1^6 (x_{\text{COHb}(\%)_{(1-6)}} - \bar{x}_{\text{COHb}(\%)})^2}{6-1}},$$

де:

$S_{\text{абс.}}$ – стандартне відхилення від середнього значення шести значень вмісту COHb в досліджуваному зразку крові;

$x_{\text{COHb}(\%)_{(1-6)}}$ – одиничне, з шести, значення визначення вмісту COHb в досліджуваному зразку крові;

$\bar{x}_{\text{COHb}(\%)}$ – середнє, з шістьох, значення вмісту карбоксигемоглобіну в досліджуваному зразку крові;

\sum_1^6 – знак суми значень від 1 до 6,

та відносне стандартне відхилення шести значень вмісту СОНЬ в досліджуваному зразку крові, від середнього значення за формулою:

$$S(\%) = \frac{S_{\text{абс.}}}{\bar{X}_{\text{СОНЬ}(\%)}} \times 100,$$

де:

$S(\%)$ – відносне стандартне відхилення шести значень вмісту СОНЬ в досліджуваному зразку крові, від середнього значення;

$S_{\text{абс.}}$ – абсолютне стандартне відхилення шести значень вмісту СОНЬ в досліджуваному зразку крові, від середнього значення;

$\bar{X}_{\text{СОНЬ}(\%)}$ – середнє, з шістьох, значення вмісту карбоксигемоглобіну в досліджуваному зразку крові.

2.5. Розрахувати відносну різницю між максимальним та мінімальним, з шістьох, значень вмісту СОНЬ в досліджуваному зразку крові за формулою:

$$\Delta_{\text{СОНЬ}(\%)} = \frac{(\max_{\text{СОНЬ}(\%)} - \min_{\text{СОНЬ}(\%)})^2}{\max_{\text{СОНЬ}(\%)} + \min_{\text{СОНЬ}(\%)}} \times 100,$$

де:

$\Delta_{\text{СОНЬ}(\%)}$ – відносна різниця між максимальним та мінімальним значеннями вмісту СОНЬ в досліджуваному зразку крові;

$\max_{\text{СОНЬ}(\%)}$ – максимальне значення вмісту СОНЬ в досліджуваному зразку крові з шести визначених;

$\min_{\text{СОНЬ}(\%)}$ – мінімальне значення вмісту СОНЬ в досліджуваному зразку крові з шести визначених.

3. Інтерпретація отриманих результатів.

3.1. Значення відносного стандартного відхилення шістьох результатів від середнього, яке не перевищує 10 %, а значення відносної різниці між

максимальним та мінімальним значенням, яке не перевищує 20 %, вказує на відсутність суттєвого впливу сторонніх форм гемоглобіну та інших пігментів на визначення вмісту СОНб в досліджуваному зразку крові.

В цьому випадку кінцевий результат визначення СОНб в досліджуваному зразку крові розраховується як середнє з шістьох отриманих значень.

3.2. У випадку, якщо значення відносного стандартного відхилення та/або відносна різниця між максимальним та мінімальним результатом перевищують вказані вище значення, присутній істотний вплив сторонніх форм гемоглобіну та інших пігментів на визначення вмісту СОНб.

В цій ситуації, кінцевий результат визначення СОНб в досліджуваному зразку крові подається, як діапазон від мінімального до максимального значення та зазначається, що у зв'язку із впливом сторонніх пігментів, визначити точне значення СОНб методом спектрофотометрії не є можливим.

Альтернативним методом визначення СОНб у випадку істотного впливу сторонніх пігментів може бути метод газорідинної хроматографії.

Алгоритм визначення кількості СОНб

50 мкл крові розвести в 10 мл
0,4 % розчині амоніаку



1. центрифугувати розчин досліджуваної крові 10 хв при 5000 об/хв;
2. перенести прозорий центрифугат в кварцеву кювету спектрофотомера;
3. додати до центрифугату в кюветі близько 5 мг $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, перемішати;
4. записати спектр поглинання розчину досліджуваної крові в діапазоні довжин хвиль 500–600 нм;
5. дослідити отриманий спектр поглинання на ознаки присутності СОНб;
6. розрахувати шість значень вмісту СОНб в досліджуваному розчині крові;
7. розрахувати середнє, з шести отриманих значень, абсолютне та відносне стандартне відхилення отриманих результатів від середнього значення;
8. розрахувати відносну різницю між максимальним та мінімальним значеннями вмісту СОНб в досліджуваному розчині крові, серед шести отриманих;
9. виконати інтерпретацію отриманих результатів та надати кінцевий результат.

III. КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ КАРБОКСИМІОГЛОБІНУ.

Визначення СОМб проводиться аналогічно тому, як це описано для визначення СОНб і складається з трьох етапів – визначення розрахункових коефіцієнтів, визначення СОМб із застосуванням цих коефіцієнтів та інтерпретація отриманих результатів.

Істотною відмінністю від визначення СОНб є спосіб приготування розчину міоглобіну, який засновано на його екстракції з подрібненого м'язу холодним розчином амоніаку із об'ємною часткою 2,0 %. Для визначення СОМб використовують м'язи без ознак термічної денатурації та гниття.

1. Приготування розчину міоглобіну.

1.1. 10 г м'язу максимально звільненого від жирової та сполучної тканини ретельно подрібнити ножицями, додати 50 мл 2 % холодного (!) розчину амоніаку і настоювати в холодильнику, при періодичному перемішуванні, впродовж 30 хв.

1.2. Після настоювання, м'язовий гомогенат центрифугувати 10 хв при 5000 об/хв. Надосадну рідину (~30 мл) процідити крізь чотири шари марлі на скляній воронці, та зібрати в колбу (флакон).

1.3. До 10 мл розчину міоглобіну додати 0,4 мл насиченого розчину алюмоамонійних галунів та відразу перемішати, витримати 10 хв, додати 0,5 мл розчину калійамонійфосфату, перемішати та центрифугувати при 4000 об/хв впродовж 10 хв. Отриманий прозорий розчин міоглобіну використовують для визначення розрахункових коефіцієнтів або вмісту СОМб.

2. Отримання розчину А (близько 100 % СОМб).

5 мл розчину міоглобіну наситити СО аналогічно тому, як описано для крові (п. 1.2. Розділ II).

3. Отримання розчину В (близько 100 % НМб).

5 мл розчину міоглобіну перенести в кювету спектрофотометра, додати 5 мг натрію дитіоніту, перемішати та зняти спектр поглинання.

4. Визначення розрахункових коефіцієнтів.

Для визначення розрахункових коефіцієнтів достатньо 5 проб м'язів від осіб різних вікових категорій смерть яких не пов'язана з отруєнням СО та утопленням. Відбір проб повинен відбутись не пізніше 2 діб після настання смерті. Відносне стандартне відхилення п'яти визначень коефіцієнтів K_1 не повинно перевищувати 5 % (K_2 залежить від значення K_1 , тому відносне стандартне відхилення K_2 не розраховують). Якщо відносне стандартне відхилення K_1 перевищує 5 %, знаходять та вилучають з розрахунку значення коефіцієнту K_1 , яке найбільше відхиляється від середнього значення та досліджують додаткову пробу м'яза. Загальна кількість експериментальних значень не повинна бути меншою за 5.

Отримані розчини А та В використовують для отримання спектрів поглинання СОМб та НМб в діапазоні довжин хвиль 500 – 600 нм, як описано в п. 1.3. розділу II та виявлення п'ятох базових ділянок спектру (рис. 3) аналогічних тим, які описані в спектрах поглинання СОНб і ННб (п. 1.4. розділ II). Максимальна різниця в спектрах поглинання СОМб та НМб ($\Delta\lambda_{\max 1}$ та $\Delta\lambda_{\max 2}$) спостерігається на довжинах хвиль близько 537 та 577 нм.

Значення оптичної густини на довжинах хвиль, які відповідають базовим ділянкам спектрів СОМб та НМб використовують для розрахунку відповідно шести коефіцієнтів K_1 та шести коефіцієнтів K_2 аналогічно тому, як це розраховується для крові, за наступними формулами:

$$K_1 = \frac{D_{\Delta\lambda_{\max(1,2)}^{\text{НМб}}}}{D_{\text{iso}(1,2,3)}}; \quad K_2 = \frac{D_{\Delta\lambda_{\max(1,2)}^{\text{СОМб}}}}{D_{\text{iso}(1,2,3)}} - K_1,$$

де:

$D_{\Delta\lambda_{\max(1,2)}^{\text{НМб}}}$ – значення оптичної густини НМб на довжинах хвиль, які відповідають області $\Delta\lambda_{\max 1}$ та $\Delta\lambda_{\max 2}$;

$D_{\Delta\lambda_{\max(1,2)}^{\text{СОМб}}}$ – значення оптичної густини СОМб на довжинах хвиль, які відповідають області $\Delta\lambda_{\max 1}$ та $\Delta\lambda_{\max 2}$;

$D_{\text{iso}(1,2,3)}$ – значення оптичної густини на довжинах хвиль, які відповідають ізобестичним точкам $\lambda_{\text{iso}1}$, $\lambda_{\text{iso}2}$ та $\lambda_{\text{iso}3}$.

**Алгоритм визначення коефіцієнтів K_1 та K_2
при дослідженні м'язу**

10 г подрібненого ножицями м'язу
30 хв екстрагувати 50 мл
2 % холодного розчину амоніаку



1. центрифугувати гомогенат м'язу 10 хв при 5000 об/хв та профільтрувати центрифугат крізь шар марлі на скляній воронці;
2. до 10 мл фільтрату додати 0,4 мл нас. розчину $(\text{NH}_4)\text{Al}(\text{SO}_4)_2$, витримати 10 хв додати 0,4 мл 10 % розчину $\text{K}_2(\text{NH}_4)\text{PO}_4$, центрифугувати 10 хв при 5000 об/хв;
3. розділити розчини міоглобіну на дві частини (розчини А і В);
4. наситити СО розчин А впродовж 15 хв;
5. додати в розчин А 10 мг $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, перемішати та насичувати СО ще 5 хв;
6. додати в розчин В 5 мг $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, перемішати;
7. записати спектри поглинання СОМб і НМб ;
8. знайти точки де спостерігається максимальна різниці в поглинанні між СОМб і НМб ($\Delta\lambda_{\text{max}1}$ та $\Delta\lambda_{\text{max}2}$) і три ізобестичні точки ($\lambda_{\text{iso}1}$, $\lambda_{\text{iso}2}$ та $\lambda_{\text{iso}3}$);
9. Розрахувати коефіцієнти K_1 та K_2 ;

5. Визначення СОМб в досліджуваному м'язі.

5.1. 5 мл розчину міоглобіну перенести в кювету спектрофотометра, додати 5мг натрію дитіоніту, перемішати та зняти спектр поглинання, як описано в п. 1.3. розділу II.

5.2. Отриманий спектр поглинання досліджують на присутність ознак наявності карбоксиміоглобіну із врахуванням всіх застережень описаних при дослідженні спектрів поглинання розчинів крові п. 2.2. розділ II.

У випадку присутності СОНб , в спектрі поглинання досліджуваного розчину спостерігається два максимуми поглинання – близько 540 нм та 570 нм, а також мінімум близько 557 нм (рис. 3). Спектр поглинання $\text{O}_2\text{Мб}$ має два максимуми поглинання – близько 542 нм та 581 нм та мінімум близько 564 нм. В спектрі поглинання НМб присутній один максимум близько 557 нм.

5.3. Використовуючи значення оптичної густини (D) на довжинах хвиль, які відповідають точкам $\Delta\lambda_{\max 1}$, $\Delta\lambda_{\max 2}$, $\lambda_{\text{iso}1}$, $\lambda_{\text{iso}2}$ та $\lambda_{\text{iso}3}$, аналогічно тому, як це описано при дослідженні крові (п. 2.3. – 2.5, розділ II) розрахувати шість значень вмісту карбоксиміоглобіну ($\text{COMb}(\%)_{(1-6)}$), середнє з шістьох значень ($\bar{X}_{\text{COMb}(\%)}$), стандартне відхилення шести значень вмісту COMb в досліджуваному зразку від середнього значення (S_{abc}), відносне стандартне відхилення ($S(\%)$) та відносну різницю між максимальним та мінімальним, з шістьох, значень вмісту COMb ($\Delta_{\text{COMb}(\%)}$).

6. Інтерпретація отриманих результатів.

6.1. Значення відносного стандартного відхилення шістьох результатів від середнього, яке не перевищує 20 %, а значення відносної різниці між максимальним та мінімальним значенням, яке не перевищує 25 %, вказує на відсутність суттєвого впливу сторонніх форм міоглобіну та інших пігментів на визначення вмісту COMb в досліджуваному зразку.

В цьому випадку кінцевий результат визначення COMb в досліджуваному зразку крові розраховується як середнє з шістьох отриманих значень.

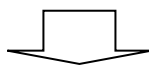
6.2. У випадку, якщо значення відносного стандартного відхилення та/або відносна різниця між максимальним та мінімальним результатом перевищують вказані вище значення, присутній істотний вплив на визначення вмісту COMb сторонніх форм міоглобіну або продуктів його термічної денатурації.

В цій ситуації, кінцевий результат визначення COMb в досліджуваному зразку м'язу подається, як діапазон від мінімального до максимального значення і зазначається, що у зв'язку із впливом сторонніх пігментів (та /або продуктів термічної денатурації м'язу), визначити точне значення COMb методом спектрофотометрії не є можливим.

Альтернативним методом визначення COMb у випадку істотного впливу сторонніх речовин може бути метод газорідинної хроматографії.

Алгоритм визначення кількості СОМб

10 г подрібненого ножицями м'язу
30 хв екстрагувати 50 мл
2 % холодного розчину амоніаку



1. центрифугувати гомогенат м'язу 10 хв при 5000 об/хв та рофільтрувати центрифугат крізь шар марлі на скляній воронці;
2. до 10 мл фільтрату додати 0,4 мл нас. розчину $(\text{NH}_4)\text{Al}(\text{SO}_4)_2$, витримати 10 хв;
3. додати 0,5 мл 10 % розчину $\text{K}_2(\text{NH}_4)\text{PO}_4$, центрифугувати 10 хв при 5000 об/хв;
4. перенести прозорий центрифугат в кварцеву кювету спектрофотомера;
5. додати до центрифугату в кюветі близько 5 мг $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, перемішати;
6. записати спектр поглинання розчину досліджуваного міоглобіну в діапазоні довжин хвиль 500–600 нм;
7. дослідити отриманий спектр поглинання на ознаки присутності СОМб;
8. розрахувати шість значень вмісту СОМб в досліджуваному розчині міоглобіну;
9. розрахувати середнє, з шести отриманих значень, абсолютне та відносне стандартне відхилення отриманих результатів від середнього значення;
10. розрахувати відносну різницю між максимальним та мінімальним значеннями вмісту СОМб в досліджуваному розчині міоглобіну, серед шести отриманих;
11. виконати інтерпретацію отриманих результатів та надати кінцевий результат.

РЕАКТИВИ ТА ЇХ ПРИГОТУВАННЯ

1. Кислота сульфатна концентрована (CAS № 7664-93-9, H₂SO₄).

Кваліфікація не нижче «ч.д.а.».

2. Кислота мурашина концентрована (CAS № 64–18–6, CH₂O₂).

Кваліфікація не нижче «ч.д.а.».

3. Натрію дитіоніт (CAS № 7775–14–16, Na₂S₂O₄).

Кваліфікації «тех.» або вище.

4. Розчин формаліну із масовою часткою формальдегіду 37 %.

Кваліфікації «фарм.» або вище.

5. Розчин таніну із масовою часткою таніну 3 %.

1,5 г таніну (CAS № 1401–55–4, син. галлотанін, танінова кислота, C₇₆H₅₂O₄₆), кваліфікації не нижче «фарм.» розчиняють в 47 мл дистильованої води. Використовують свіжовиготовлений розчин.

6. Розчин натрію гідроксиду із масовою часткою лугу 10 %.

10 г натрію гідроксиду (CAS № 1310–73–2, NaOH) кваліфікація не нижче «ч.д.а.», розчиняють в 90 мл дистильованої води та охолоджують. Увага! При розчиненні розчин нагрівається. Розчин зберігають в скляному посуді (к.т.). Термін придатності один рік.

7. Насичений розчин алюмоамонійних галунів.

1,0 г алюмоамонійних галунів (CAS № 1310–73–2, (NH₄)Al(SO₄)₂) кваліфікація не нижче «ч.д.а.», розчиняють при інтенсивному перемішуванні в 9 мл дистильованої води. Після розчинення повинно залишитись невелика кількість нерозчиненої солі. Розчин зберігають в скляному посуді (к.т.). Термін придатності один місяць.

8. Розчин калійамонійфосфату із масовою часткою солі 10 %.

6,5 г тригідрата (або 8,1 г гексагідрату) калія гідрофосфату (CAS № 7758–11–4, K₂HPO₄) розчинити в 43 мл розчину амоніаку із об'ємною часткою 2 %. Розчин зберігають в скляному посуді (к.т.). Розчин придатний для використання до появи осаду або каламуті.

9. Розчин амоніаку із об'ємною часткою речовини 0,4 %.

0,4 мл розчину амоніаку із масовою часткою 25 % перенести в мірну колбу об'ємом 100 мл і довести загальний об'єм до мітки. Використовують свіжовиготовлений розчин.

10. Розчин амоніаку із об'ємною часткою речовини 2 %.

2 мл розчину амоніаку із масовою часткою 25 % перенести в мірну колбу об'ємом 100 мл і довести загальний об'єм до мітки. Використовують свіжовиготовлений розчин.

В И С Н О В К И

Запропоновано схему спектрофотометричного визначення карбоксигемоглобіну та карбоксиміоглобіну, яка не потребує насичення досліджуваних зразків монооксидом вуглецю та включає оцінку впливу заважаючих пігментів на результат визначення. Включення етапу метрологічної оцінки отриманого результату дозволяє отримати більш надійні дані, що використовуються при складанні висновків в межах виконання судово–медичних експертиз пов'язаних із отруєнням чадним газом.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Букина Л. П. Спектрофотометрическое определение карбоксигемоглобина / Л. П. Букина, Л. И. Ушакова // Судебно–медицинская экспертиза. – 1979. – Т. XXII. – № 2. – С. 39–42.

2. Актуальные вопросы судебно–медицины и экспертной практики / под ред. В. П. Новоселова, С. А. Саркисяна, В. Э. Янковского – Новосибирск-Красноярск: Межрегиональная ассоциация «Судебные медики Сибири», 2007. Вып. 12.– Ч.2, С. 60–64.

3. Kojima T. Production of carbon monoxide in cadavers / T Kojima, I Okamoto, M Yashiki, T Miyazaki, F Chikasue, K Degawa, S Oshida, K Sagisaka // Forensic Science International. – 1986. – V.32. – № 2. – P. 67–77.

ДОДАТКИ

Таблиця 1

Схема зв'язку коефіцієнтів K_1 і K_2 , результатів визначення вмісту СОНЬ(СОМЬ) в досліджуваному зразку із базовими ділянками спектрів поглинання СОНЬ і ННЬ (СОМЬ і НМЬ).

<p>Оптична густини на довжинах хвиль де спостерігається максимальна різниця в спектрах поглинанні між СОНЬ і ННЬ (СОМЬ і НМЬ) $D_{\Delta\lambda_{max}(1, 2)}$</p>	<p>Оптична густина в ізобестичних точках $D_{\lambda_{iso}(1, 2, 3)}$</p>	<p>Коефіцієнти $K_{1-(1-6)}$</p>	<p>Коефіцієнти $K_{2-(1-6)}$</p>	<p>Результати визначення вмісту СОНЬ(СОМЬ) в досліджуваному зразку. СОНЬ(%)₍₁₋₆₎ (СОМЬ(%)₍₁₋₆₎)</p>
<p>$D_{\Delta\lambda_{max1}}$</p>	<p>$D_{\lambda_{iso1}}$</p>	<p>K_{1-1}</p>	<p>K_{2-1}</p>	<p>СОНЬ(%)₁ (СОМЬ(%)₁)</p>
	<p>$D_{\lambda_{iso2}}$</p>	<p>K_{1-2}</p>	<p>K_{2-2}</p>	<p>СОНЬ(%)₂ (СОМЬ(%)₂)</p>
	<p>$D_{\lambda_{iso3}}$</p>	<p>K_{1-3}</p>	<p>K_{2-3}</p>	<p>СОНЬ(%)₃ (СОМЬ(%)₃)</p>
<p>$D_{\Delta\lambda_{max2}}$</p>	<p>$D_{\lambda_{iso1}}$</p>	<p>K_{1-4}</p>	<p>K_{2-4}</p>	<p>СОНЬ(%)₄ (СОМЬ(%)₄)</p>
	<p>$D_{\lambda_{iso2}}$</p>	<p>K_{1-5}</p>	<p>K_{2-5}</p>	<p>СОНЬ(%)₅ (СОМЬ(%)₅)</p>
	<p>$D_{\lambda_{iso3}}$</p>	<p>K_{1-6}</p>	<p>K_{2-6}</p>	<p>СОНЬ(%)₆ (СОМЬ(%)₆)</p>

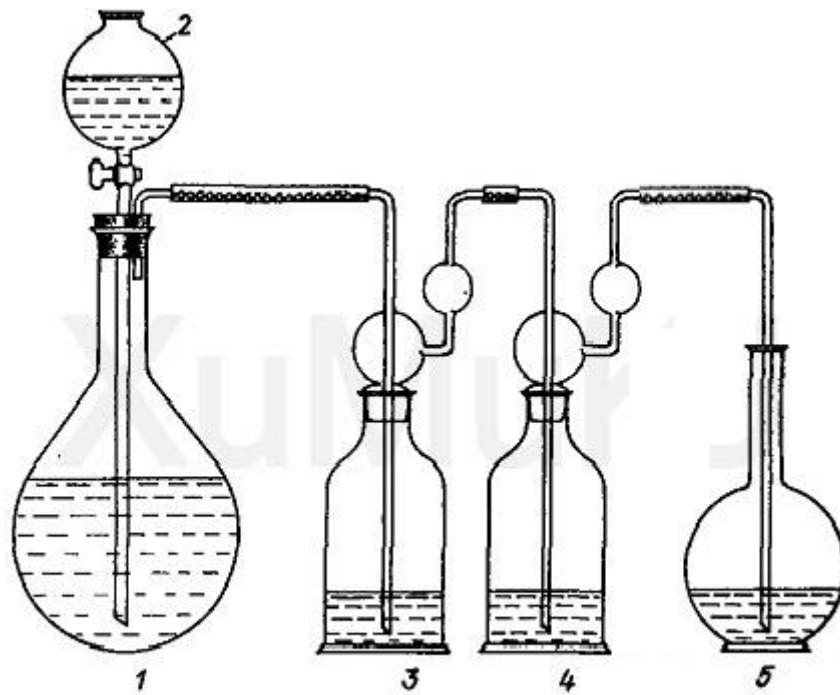


Рис. 1. Схема приладу для насичення розчинів крові та міоглобіну CO.

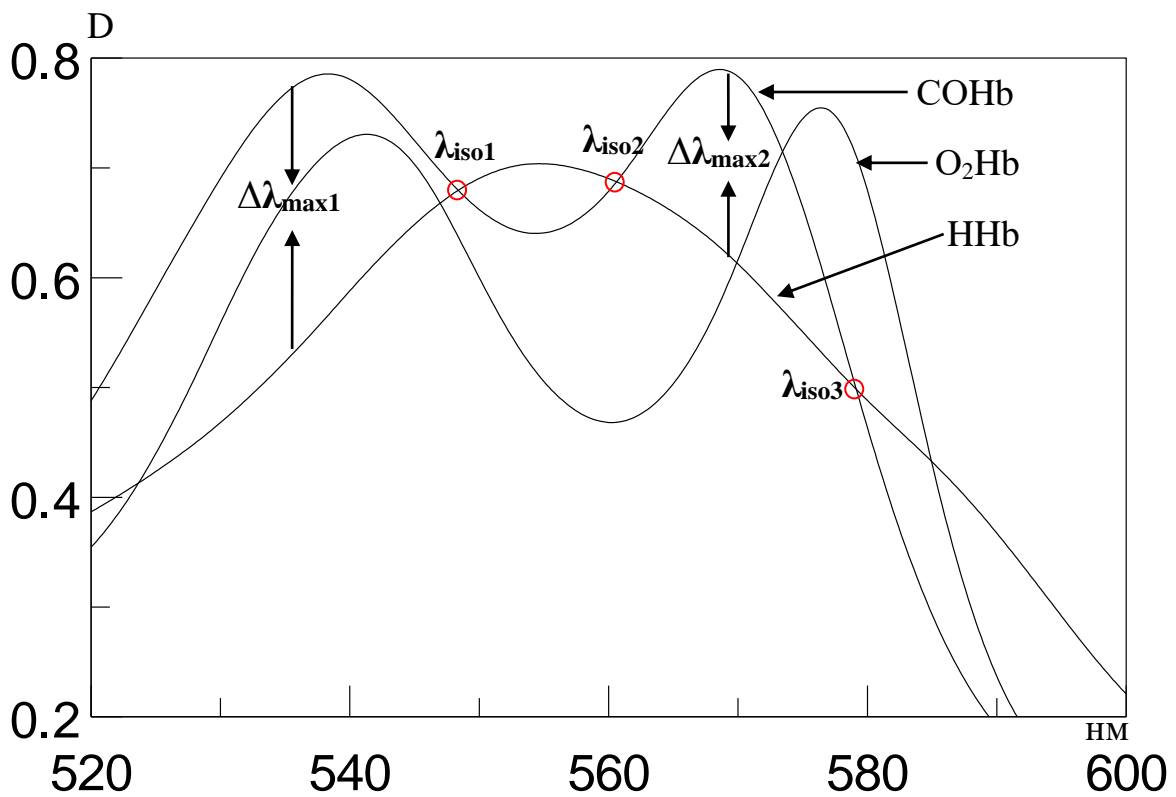


Рис. 2. Спектри поглинання відновленого гемоглобіну (HHb), карбоксигемоглобіну (COHb) та оксигемоглобіну (O₂Hb).

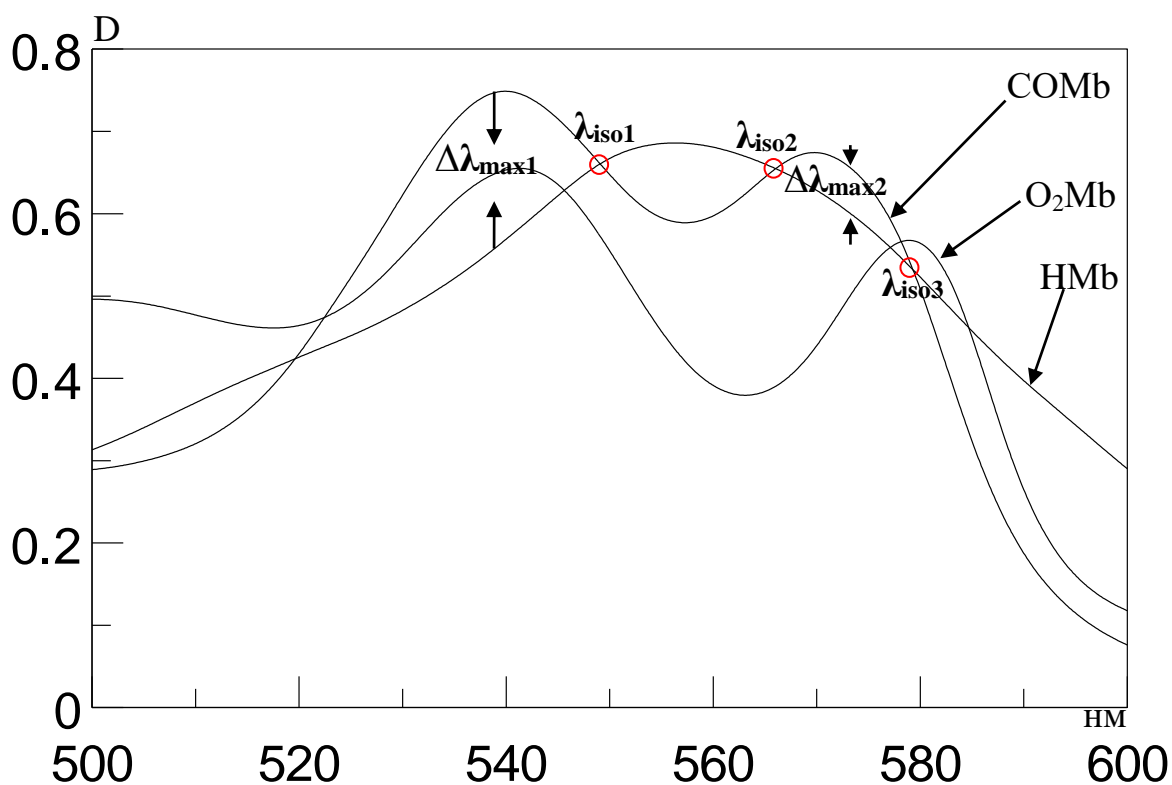


Рис. 3. Спектри поглинання відновленого міоглобіну (Hb), карбоксиміоглобіну (COMb) та оксиміоглобіну (O₂Mb).

Таблиця 2

Витрати засобів та матеріалів які використовуються згідно цих керівних вказівок для дослідження одного об'єкту.

Назва	Кількість
Калій гідрофосфат	0,6 г
Алюмоамонійні галуни	0.2 г
Натрію дитіоніт	20 мг
Кислота мурашина	15 мл (18 г)
Амоніаку 25 % розчин	3,5 мл
Натрію гідроксид	6,0 г
Танін	1,5 г
Розчин формаліну	3 мл (3,2 г)
Прекурсори	
Сульфатна кислота	50 мл (або 90 г)