**МИНИСТЕРСТВО ЮСТИЦИИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН**

**ЦЕНТР СУДЕБНОЙ МЕДИЦИНЫ**

**Стандартные операционные процедуры**

**Методика экспертного исследования по определению карбоксигемоглобина в крови**

СОСТАВИТЕЛЬ: Жуматаева Г. С. РГКП «Центр судебной медицины МЮ РК», судебно-медицинский эксперт высшей категории

Астана, 2016 год

ПАСПОРТ МЕТОДИКИ

|  |  |
| --- | --- |
| 1. Наименование методики | Методика экспертного исследования по определению карбоксигемоглобина в крови. |
| 2.Шифр специальности методики | 27.1 |
| 3. Информация об авторе (ах) (составителе (ях)) методики | Составитель: Жуматаева Г.С. |
| 4. Сущность методики | Описанные [химические](http://www.xumuk.ru/encyklopedia/2/4812.html) методы обнаружения [оксида углерода](http://www.xumuk.ru/encyklopedia/2/4638.html) (II) в крови основаны на сравнении окрасок в крови, содержащей и крови, не содержащей карбоксигемоглобин, которые возникают после прибавления соответствующих реактивов. |
| 4.1 Экспертные задачи, решаемые методикой | Установление наличия и концентрации карбоксигемоглобина в крови |
| 4.2 0бъекты исследования | Образец жидкой крови |
| 4.3 Методы исследования | Химические и спектральные методы. |
| 4.4 Краткое поэтапное описание методики | [Химические](http://www.xumuk.ru/encyklopedia/2/4812.html) методы обнаружения [оксида углерода](http://www.xumuk.ru/encyklopedia/2/4638.html) (II) в крови.  Оценка результатов химических методов обнаружения  Количественное спектрофотометрическое определения карбоксигемоглобина.  Судебно-медицинская оценка результатов количественного определения карбоксигемоглобина в крови |
| 5. Дата одобрения методики Ученым Советом ЦСМ МЮ РК | Протокол № 1 от 07 «ноября» 2016г. |
| 6. Информация о лице составившим паспорт методики | Составитель: Жуматаева Г.С. РГКП «Центр судебной медицины МЮ РК», судебно-медицинский эксперт высшей категории |

СОДЕРЖАНИЕ

Введение

Область применения

Термины и обозначения

Основная часть

Заключение

Список использованных источников

Введение

Оксид углерода (II) образуется при неполном сгорании углеводородов, дерева, каменного угля и многих других горючих материалов Оксид углерода (II) (угарный газ) содержится в выхлопных газах автомобилей, в max, образующихся при неполном сгорании горючих материалов в неисправных печах на кухнях и г. д. Оксид углерода (II) в больших количествах образуется при пожарах, взрывах и т. д. Отмечены случаи отравлений оксидом углерода (И) в плохо вентилируемых жилых помещениях с печным отоплением, на пожарах и т. д. Оксид углерода (И) проникает в кровь через дыхательные пути, а затем с гемоглобином крови образует довольно прочное соединение — карбоксигемоглобин (СОНЬ).Средство оксида углерода (II) к гемоглобину в

300 раз **бол**ьше**,** чем **сре**дст**во** кисл**ород**а к указанному оксиду**.**

В крови лиц, отравленных оксидом углерода (II), содержится гемоглобин и его соединения, к числу которых относятся: гемоглобин, не связанный с кислородом и оксидом углерода (II), или так называемый дез оке и гемоглобин (НЬ), оксигемоглобин (ОНЪ) — гемоглобин, связанный с кислородом и карбоксигемоглобин (СОНЬ) — гемоглобин, связанный с оксидом углерода (II). Кроме того, в крови может содержаться некоторое количество метгемоглобина (MtHb). При отравлениях метгемоглобин не связывается с оксидом углерода.

В тканях мышц лиц, отравленных оксидом углерода (II), содержится дезоксимиоглобин (МНЬ), оксимиоглобин (ОМНЬ) и карбоксимиоглобин (СОМНЬ).

Область применения.

Используется при направленном анализе на наличие карбоксигемоглобина и определения его концентрации, а также в случаях направления образцов крови на неизвестное вещество.

Обнаружение карбоксигемоглобина в крови является доказательством отравления оксидом углерода (II). Спектрофотометрическии метод применяется главным образом для количественного определениякарбоксигемоглобина в крови.

Термины и обозначения.

ОНЬ - окси гемоглобин —гемоглобин, связанный с кислородом

НЬ - дезоксигемоглобин - гемоглобин, не связанный с кислородом и оксидом

углерода (II);

ОНЬ - оксигемоглобин — гемоглобин, связанный с кислородом,

СФ- спектрофотометрия СОМНЬ- карбоксимиоглобин;

СФ - спекторофотометрия.

1. Операционные процедуры.
   1. ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОБНАРУЖЕНИЯ ОКСИДА УГЛЕРОДА (II) В КРОВИ

Описанные до настоящего времени химические методы обнаружения оксида углерода (II) в крови основаны на сравнении окрасок в крови, содержащей и крови, не содержащей карбоксигемоглобин, которые возникают после прибавления соответствующих реактивов.

Кровь, содержащая карбоксигемоглобин, от прибавления перечисленных ниже реактивов не изменяет или только незначительно изменяет свою окраску, а нормальная кровь, не содержащая карбоксигемоглобина, под влиянием этих реактивов значительно изменяет свою окраску.

При выполнении всех описанных ниже реакций на наличие карбоксигемоглобина параллельно проводят два опыта. Для выполнения первого опыта берут кровь, не содержащую карбоксигемоглобин, для второго— кровь отравленных оксидом углерода (II). К пробам крови, не содержащей карбоксигемоглобина и крови, содержащей карбоксигемоглобин, прибавляют одинаковые объемы реактивов и наблюдают изменения, которые произошли в обеих пробах под влиянием реактивов,

* + 1. Реакция с раствором гидроксида натрия (проба Гоппе— Зейлера). К определенному объему крови прибавляют равный или двойной объем 30 % раствора гид роке и да натрия.

Оценка результата. Кровь, содержащая карбоксигемоглобин, остается розово­красной, а кровь, не содержащая карбоксигемоглобин изменяет цвет на зеленовато-желтый.

Гнилостно измененная кровь под влиянием щелочи может приобретать ярко­красную окраску и в отсутствие карбоксигемоглобина за счет образования гемохромогена.

* + 1. Реакция с сульфидом аммония (проба Сальковского — Катаяма). К10 мл дистиллированной воды прибавляют 5 капель крови и 5 капель свежеприготовленного раствора сульфида аммония. Смесь осторожно взбалтывают, прибавляют 30 % раствор уксусной кислоты до слабо к и слой реакции и слегка взбалтывают.

Оценка результата. Кровь, содержащая карбоксигемоглобин, имеет малиново­красную окраску, а кровь, не содержащая карбоксигемоглобина, становится серо-зеле ной.

* + 1. Реакция с хинином и сульфидом аммония (проба Хорошкевича — Маркса). К 2 мл крови прибавляют 4 мл 8 % раствора гидрохлорида хинина и смесь кипятят непродолжительное время. После охлаждения смеси прибавляют 2—-3 капли свежеприготовленного раствора сульфида аммония и сильно взбалтывают.

Оценка результата. Кровь, содержащая карбоксигемоглобин, имеет светло­красную окраску, а кровь, не содержащая карбоксигемоглобина, приобретает грязноватую красно-бурую окраску.

* + 1. Реакция с гексацианоферратом (III) калия (проба Бюр-кера). К 5 мл крови прибавляют воду до 500 мл и взбалтывают. К 5—10 мл полученного раствора крови прибавляют 5 капель 1 % раствора гексацианоферрата (Ш) калия К *у* [Fe(CN) *ь* ]' Оценка результата. Кровь, в которой содержится карбоксигемоглобин, остается красной, а кровь, не содержащая карбоксигемоглобина, становится желтоватой.
    2. Реакций с гексацианоферратом (III) калия и дихроматом калия (проба Сидорова). 1 мл крови разбавляют водой до 10 мл. К 2 мл полученного раствора крови прибавляют 3—5 капель 20 %-го раствора гексацианоферрата (Ш) калия и такой же объем 0,01 %-го раствора дихромата калия. Смесь крови и реактивов слегка взбалтывают. Оценка результата. Кровь, содержащая карбоксигемоглобин, становится карминово-красной, а кровь, не содержащая

карбоксигемоглобинa, приобретает коричневато-зеленую окраску.

* + 1. Реакция с гексацианоферратом (III) калия и уксусной кислотой (проба Ветцеля). К 10 мл крови прибавляют 90 мл воды. К 10 мл полученного раствора прибавляют 5 мл 20 % раствора гексацианоферрата (III) калия и 1 мл ледяной уксусной кислоты,

Оценка результата. Из крови, содержащей карбоксигемоглобин, выпадает вишнево-красный осадок, а из крови, не содержащей карбоксигемоглобина, — серовато- коричневый осадок,

* + 1. Реакция с танином (проба Кункеля — Ветцеля). Кровь разбавляют пятикратным объемом дистиллированной воды. В пробирку вносят 5 мл этого раствора крови, прибавляют 15 мл 3 % водного раствора танина, а затем содержимое пробирки хорошо взбалтывают.

Оценка результата. Из крови, содержащей карбоксигемоглобин, выпадает светлый карминово-красный осадок, а из крови, не содержащей карбоксигемоглобина, выпадает серовато-коричневый осадок.

При выполнении этой реакции по Брюкеру кровь разбавляют водой в 100 раз и прибавляют 5 капель 3 % водного раствора танина. ^

* + 1. Реакция с формальдегидом (проба Либмана). К 5 мл неразбапленной крови прибавляют 5 мл формалина (40 *%* раствор формальдегида) и сильно взбалтывают. Оценка результата. Кровь, содержащая карбоксигемоглобин, сохраняет красную окраску, а кровь, не содержащая карбоксигемоглобина, **через** несколько минут становится коричневато-черной**.**

Если для выполнения реакции применить 20 % раствор формальдегида, то изменение окраски происходит через 40— 60 мин.

* + 1. Реакция с ацетатом свинца (проба Рубнера), К 5 мл неразбавленной крови прибавляют 20 мл 5 % раствора основного ацетата свинца и в течение I мин сильно взбалтывают.

Оценка результата. Кровь, содержащая карбоксигемоглобин, сохраняет красную окраску, а кровь, не содержащая карбоксигемоглобина, становится

коричневатой.

Реакция с сульфатом меди (проба Залесского). К 1 мл крови прибавляют воду до 100 мл и хорошо взбалтывают. К 5 мл полученного раствора крови прибавляют 5 капель 10 %-го раствора сульфата меди. Смесь хорошо взбалтывают- Оценка результата. Кровь, содержащая карбоксигемоглобин, становится пурпурно-красной, а кровь, не содержащая карбоксигемоглобина, приобретает зеленоватую окраску.

Оценка результатов химических методов обнаружения.

Заключение о наличии карбоксигемоглобина в крови не должно базироваться на результате только одной из перечисленных выше реакций О наличии карбоксигемоглобина в крови можно делать вывод только на основании результатов не менее 3-4 реакций.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОКСИДА УГЛЕРОДА (II) В КРОВИ

Сущность метода. Все вышеуказанные соединения гемоглобина можно обнаружить по их спектрам поглощения в видимой области от 500 до 600 нм. Спектры поглощения оксигемоглобина и карбоксигемоглобина очень похожи по форме и положению обоих максимумов: они сдвинуты у обоих соединений не более, чем на 1-2 нм и лежат при длине волны ( Jравной 540-541 нм и при 1. 570-571 нм. Спектр поглощения дезоксигемоглобина имеет один максимум поглощения при длине волны 557 нм. При наложении спектральных кривых карбоксигемоглобина и дезоксигемоглобина на одном графике часто наблюдается пересечение кривых в трех изобестических точках при 550, 565 и 579 нм. Изобестические точки - это точки пересечения спектральных кривых, где оптические плотности растворов карбоксигемоглобина, оксигемоглобина и дезоксигемоглобина одинаковы. Изобестические точки удобно использовать *в* качестве своеобразных «геодезических знаков» по отношению, к которым ведется последующий количественный расчет карбоксигемоглобина.

Теоретически нет разницы, какую из трех изобестических точек использовать в расчетных формулах. В данной методике, для расчетов используется первая изобестическая точка при длине волны 550 нм, как более стабильная.

Для количественного спектрофотометрического определения карбоксигемоглобина необходимо устранить «спектральные помехи» от оксигемоглобина, т.е. убрать его вклад в суммарную оптическую плотность исследуемого раствора крови. Это достигается добавлением в измерительную кювету 4-5 мг сильнейшего восстановителя - гидросульфита (дитионита) натрия. При этом оке и гемоглобин и метгемоглобин восстанавливается до дезоксигемоглобина, а карбоксигемоглобин с дитионитом натрия не реагирует.

При количественном определении карбоксигемоглобина, как и при любых других спектрофотометрических определениях, для минимизации ошибок желательно, чтобы оптические плотности исследуемых растворов крови лежали в диапазоне 0.2-0.9,

Особые указания.

Для уменьшения погрешности надо готовить исходный раствор крови для записи спектра такой концентрации, чтобы его оптическая плотность в первой изобсстической точке при 1=550 нм была не менее 0.5, а в максимуме при и =540 нм - не более 0.9 - 1,0. На практике при недостатке визуального опыта готовят 0,5% раствор исследуемой крови в 0,1% растворе аммиака.

Измеряют его оптическую плотность при U=550 нм. Если она менее 0 5, то добавляют несколько капель исходной крови к полученному раствору (если надо, то несколько раз), пока оптическая плотность крови при --550 нм не

станет близкой к 0.5.

Уделить максимум внимания чистоте спеісгрофотометричееких кювет и

рук оператора. Лучше работать в резиновых напальчниках, т.к, потожнровые

выделения от рук на рабочих поверхностях кювет могут дать увеличение

оптической плотности на 0,009.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ КАРБОКСИГЕМОГЛОБИНА (без насыщения)

Готовят 0,5% раствор исследуемой крови в 0,1% растворе аммиака, полученную смесь фильтруют через складчатый фильтр и снимают спектр в интервале от 500нм до бООнм на спектрофотометре, в кювете толщи ной слоя 1 см, раствор сравнения 0,1 % раствор аммиака. Записывают спектр поглощения раствора испытуемой крови. Затем в измерительную и сравнительную кюветы добавляют по 4 мг дитиоиита натрия, осторожно перемешивают и снова записывают при тех же длинах волн оптические плотности.

Оценка результата. Сохранение двух максимумов при втором измерении, после добавления дитиоиита натрия, является качественной характеристикой наличия в исследуемой пробе карбоксигемоглобина. \_

Содержание **карбоксигемоглобина** в % вычисляется по значениям оптическои плотности раствора крови после добавления дитионита натрия в максимуме при 540 нм -D1 и при 550 нм -D2. Коэффициенты К 1=0,77 и К2-0.37.

(D1 - D2\*K1)\*100

%СОНЬ =

(D2+K2)

Примечание:

Расчет коэффициентов К1 и К2 находили по результатам !0 модельных определений. При этом образцы крови насыщают кислородом и окисью

углерода. Коэффициенты рассчитывают по формуле:

\* K2=(Dз-Оо)/Ог и K1=Do/D2 ,

где: Do - оптическая плотность обработанного дитионитом натрия раствора крови, содержащего дезокс и гемоглобин и не содержащего

карбоксигемоглобин при аналитической длине волны;

D2 - оптическая плотность раствора крови, обработанного дитионитом натрия при длине волны в пзобеетической точке;

D3 - оптическая плотность раствора крови дополнительно насыщенного окисью углерода при выбранной «аналитической» длине волны.

Насыщение образцов крови кислородом производят, пропуская кислород через раствор крови в течение 10 минут. При этом кровь освобождается от метгемоглобина и остаточного карбоксигемоглобина.

Методика насыщения Іфови СО (II). Насыщенный оксидом углерода (II)

раствор крови получают в специальном ириборе, который состоит из колбы, закрытой пробкой, снабженной капельной воронкой и отводной стеклянной трубкой для выхода оксида углерода (II) из колбы, четырех склянок Дрекселя и отводной трубки. Колбу и склянки Дрекселя соединяют между собой раиновыми трубками. При отсутствии склянок Дрекселя их можно заменить колбами вместимостью 50 мл, отверстия которых закрыты пробками, снабженными двумя стеклянными трубками.

В первую колбу вносят 50 мл концентрированной серной кислоты, а в капельную воронку — 10 мл муравьиной кислоты. В 1-ю склянку Дрекселя вносят 10 %-й раствор гидроксида натрия, во 2-ю и 3-ю склянки ^ дистиллированную воду, а в 4-ю склянку — 1/= часть раствора иселедуемои крови в 0,1% растворе аммиака, предварительно насыщенной кислородом, склянки вносят столько жидкости, чтобы трубки погружались на см в жидкость.

Из капельной воронки в подогретую колбу / по каплям приливают муравьиную кислоту Интенсивность выделения оксида углерода (И) регулируют скоростью прилипания муравьиной кислоты. По мере расходования муравьннои кислоты выделение газа замедляется. В начале опыта для увеличения скорости выделения оксида углерода (II) колбу осторожно нагревают на небольшом пламени газовой горелки.

Учитывая высокую токсичность оксида углерода (II), при работе с ним необходимо соблюдать осторожность. Получение оксида углерода и насыщение крови этим газом должно производиться в вытяжном шкафу с хорошей тягой.

Оксид углерода (11) из колбы пропускают через склянки Дрекселя в течение 15 мин. За это время окси гемоглобин крови полностью превращается в карбоксигемоглобин. Однако при этом а растворе может оставаться некоторое количество метгемоглобина, который необходимо перевести в дезоксигемоглобин, а затем в карбоксигемоглобин. С указанной целью после пятиминутного пропускания оксида углерода (II) от прибора отсоединяют склянку с раствором исследуемой крови, в которую вносят *5-7* мг дитионита натрия, и жидкость хорошо взбалтывают. (Осторожно! Не вдыхать оксид углерода (11)1). Затем склянку 4 присоединяют **к** прибору и в течение 5 мин пропускают оксид углерода (11). После насыщения оксидом углерода (II) раствор крови, содержащий карбоксигемоглобин, должен быть прозрачным.

Значение коэффициентов К1 и К2 рекомендуется проверять не реже 1 раза в

год.

Судебно-медицинская оценка результатов количественного определения карбоксигемоглобина в крови содержание карбоксигемоглобина в крови зависит, прежде всего, от концентрации оксида углерода (И) во вдыхаемом воздухе и времени его воздействия. Концентрация карбоксигемоглобина в крови тем выше, чем выше парциальное давление оксида углерода (11) в альвеолярном воздухе по сравнению с парциальным давлением кислорода.

За один и тот же промежуток времени при прочих равных условиях в организм поступает оксида углерода (II) тем больше, чем больше минутный объем дыхания. Симптомы, обусловленные разной концентрацией карбоксигемоглобина в крови, тяжесть и исход отравления предсіавлены ниже. Эти данные имеют ориентировочное значение.

|  |  |
| --- | --- |
| %СОПЬ к обшему количеству ИҺ | Сим иточ ы пт]> еі и.че гш я |
| о—to | ІІлкякнх симптомов. |
| 10— 20 | Qiuvmemie давлении uo ,i6v. hoact быть тинас літкіи ги.іоыіап расширение кожных кровеносных сосудов. |
| 20—30 | Голосніа>і Ouju., ощущение пульса в иисках. |
| 30— 4 0 | С ильм а л голодная боль, LviaCotn\*. голопсіхруженн\*. rvMHii ін.‘і>ел гляиіми, тишпита и риота, KV-'uisiiit, |
| -10 -50 | Те же симптом и, иолгтапе более вероятен, упущение  ДЫ\Й1||1Я II пульса. |
| JtO—GO | Уинтение лъіхмпии и пульса, кома, [іциііыи.іом и мгнлмн с у л [>[>ога м м, чщ'шстоксипское дыхание. |
| OU -70 | Tt> же; ослаблени£ дыхании н сердечной лічіі ильностп, может наступить сліерчь. |
| 70—80 | Слабый пульс, замедление дыхании, остановка, диха- нин и смерти |

Однако наблюдения и специальные исследования показывают, что соответствие между концентрацией карбоксигемоглобина и тяжестью отравления имеется не всегда. Это особенно отчетливо проявляется при групповых отравлениях.

Смертельная концентрация карбоксигемоглобина в крови составляет в среднем около 60 %, но может колебаться от 40 до 80 % и более. Это колебание обусловлено как влиянием внешних условий, так и особенностями организма.

Заключение.

Перечисленные реактивы дают реакции с кровью, не содержащей карбоксигемоглобин. Кровь, содержащая карбоксигемоглобин, почти не изменяется под влиянием этих реактивов. При легкой степени отравления оксидом углерода (II) в крови содержится незначительное количество карбоксигемоглобина. Относительно большее количество гемоглобина у таких лиц не связано с оксидом углерода (II). Поэтому кровь, содержащая малые количества карбоксигемоглобина, с перечисленными реактивами будет давать такие же реакции, которые дает кровь, не содержащая карбоксигемоглобина.

В связи с этим описанные реакции малопригодны для обнаружения малых количеств карбоксигемоглобина в крови.

Кровь на исследование должна быть доставлена в возможно короткие сроки в пенициллиновом флаконе или другом узкогорлом флаконе (для минимизации площади мениска), заполненном доверху и герметически укупоренном, чтобы уменьшить объём газовой фазы над кровью и саму возможность газообмена крови с внешней средой за счёт процессов конвекции и диффузии.

Обнаружение карбоксигемоглобина в крови является доказательством отравления оксидом углерода (И). Для обнаружения и количественного определения карбоксигемоглобина используются: спектроскопические,

спектрофотометраческие, ф**ото** колориметрические, газохроматографические, химические и другие методы.

При отсутствии крови на химико-токсикологический анализ может быть направлено не менее 50,Or ткани из глубоких слоев мышц (обычно из внутренней части бедра, в наименьшей степени подвергшаяся воздействию высокой температуры и пламени).

Список использованных источников.

1. Крамаренко В. Ф, Химико-токсикологический анализ. Кг **Вища шк.** Головное изд-во, 1982 г,;

2. Г.Н.Кондауров, Л.Н.Холодкова. МУ судебно-химическое определение карбоксигемоглобина, Алматы 2000г.