

KARBONMONOKSİT'E (CO) AKUT VE KRONİK MARUZİYETİN SPEKTROFOTOMETRİK YÖNTEMLERLE TAYİNİ *

Determination of Acute and Chronic Exposure to Carbon Monoxide by Spectrophotometric Methods

Nevin VURAL **, Cem YÜCESOY ***, Rukiye DOĞANYİĞİT (Kahraman) ****

Vural N, Yücesoy C, Doğanyığıt KR. Karbonmonoksit'e (CO) Akut ve Kronik Maruziyetin Spektrofotometrik Yöntemlerle Tayini, Adli Tıp Bülteni, 1996;1(3): 112-5.

ÖZET

CO zehirlenmesi sonucu ölen kişilerin (n: 18) ve CO'e kronik maruz kalan kişilerin (sigara içenler n: 100, içmeyenler n: 44) kanlarında karboksihemoglobin (COHb) düzeyleri spektrofotometrik yöntemlerle ölçülmüştür. Postmortem kan örneklerinde COHb tayininde, Dubowski ve Buchwald'ın modifiye mikro spektrofotometrik yöntemlerinden yararlanılmıştır. Sigara içenlerin kan örneklerinde COHb tayininde ise türev (derivative) UV spektrofotometresinden yararlanılmış ve yöntemlerin karşılaştırılması yapılmıştır.

Postmortem kan örneklerinde COHb düzeyi % 63 - 88 arasında (ortalama % 73.11 (6.90) bulunmuştur. Sigara içenlerde COHb düzeyleri ise, günde 1 - 9 tane içenlerde (n: 44) % 1.94 (0.11 COHb, 10-20 tane içenlerde (n: 23) % 3.25 (0.19 COHb ve > 20 tane içenlerde ise (n: 31) % 4.36 (0.14 COHb belirlenmiştir. COHb düzeyi sigara içen tüm gruplarda içmeyenlere göre (% 0.86 (0.05) anlamlı yüksek bulunmuştur.

Dubowski yöntemi, CO ile akut zehirlenmelerin kantitatif tayininde, kullandığımız diğer spektrofotometrik yöntemlere göre ekonomik ve duyarlı bir yöntem olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca kısa zamanda sonuç vermesi açısından da Adli Tıp laboratuvarında uygulanabilirliği bu çalışmada gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Karbonmonoksit, Karboksihemoglobin, Akut Zehirlenme, Kronik Zehirlenme, UV Spektrofotometre, Türev (derivative) UV Spektrofotometre.

SUMMARY

COHb levels in the blood samples of victims of suspected CO poisoning (n: 18) and subjects exposed to low CO (smokers n: 100, nonsmokers n: 44) were measured by spectrophotometric methods.

Derivative UV-spectrophotometric method was also used for the determination of COHb in the blood of smokers. The sensitivity and reliability of these methods were compared.

COHb levels of postmortem blood samples were found to be between 63.00 (88.00 % (mean 73.11 % (6.90). COHb levels of 1-9 cigarettes smokers daily (n=44) were found to be 1.94 (0.11 % COHb; 3.25 (0.19 % COHb in smokers (10-20 cigarettes daily, n=23). COHb level in all smokers (4.36 (0.14 %) were found significantly higher than the nonsmokers (p<0.01, p<0.05). Dubowski's method for the quantitative estimation of the CO poisoning was evaluated as a sensitive and economic method among the spectrophotometric methods.

Also it was shown that this method can be used easily in Forensic Medicine Laboratories as well as the procedure takes a short time.

Key words: Carbon Monoxide, Carboxyhemoglobin, Acute Poisoning, Chronic Poisoning, UV Spectrophotometry, Derivative UV Spectrophotometry.

* Bu çalışma 13-16 Mayıs 1996 tarihinde Bursa'da düzenlenen II. Adli Bilimler Kongresinde poster olarak sunulmuştur.

** Prof.Dr., Ankara Üniv. Eczacılık Fak. Farmasotik Toksikoloji Anabilim Dalı

*** Doç.Dr., Ankara Üniv. Eczacılık Fak. Analitik Kimya Anabilim Dalı

**** Uzm.Kim., Ankara Üniv. Adli Tıp Enstitüsü Fen Bilimleri Anabilim Dalı

Geliş Tarihi: 18.05.1996 Düzeltme tarihi: 24.09.1996 Kabul Tarihi: 15.10.1996

GİRİŞ

Karbonmonoksit (CO) ile akut ve kronik zehirlenmelerin tanısında karboksihemoglobin (COHb) tayini Adli Toksikoloji açısından son derece önemlidir.

CO, karbonlu bileşiklerin tam yanmaması sonucu oluştuğu için günlük yaşantıda yakın çevrede (egzos gazı, sigara dumanı) ve endüstride işyeri havasında yaygın olarak bulunur.

Evlerde kullanılan ısınma araçları, çekimi iyi olmayan sobalar CO kaynaklarını oluşturmaktadır. Özellikle kış döneminde, baca içi ve baca ağzının tıkanmasıyla oluşmaktadır (1).

1991 (Ocak)- 1996 (Nisan) tarihlerinde Ankara bölgesi Adli Tıp kayıtlarına göre, CO zehirlenmesi sonucu (şofben, tüpgaz, soba) toplam 63 kişi hayatını kaybetmiştir. Ancak otopsi yapılmak amacıyla Adli Tıp Kurumuna gönderilmeden direkt defnedilen CO zehirlenmesi sonucu ölüm olayları günlük gazetelerde özellikle kış aylarında yer almaktadır.

Ayrıca, Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkez Başkanlığı Zehir Danışma Merkezine 1992 yılında CO zehirlenmesi sonucu toplam 29 vakanın müracaat ettiği tespit edilmiştir.

CO zehirlenmesinde, kriter olarak kanda karboksihemoglobin (COHb) belirlenmesi önemlidir. Bu amaçla en çok kullanılan gazometrik, kolorimetrik, infrared, spektrofotometrik ve gaz kromatografisi gibi yöntemler kullanılmaktadır.

Diğer hemoglobin (Hb) türevleri yanında COHb'nin absorpsiyon spektrumuna dayanan miktarının saptanması 1900 yılından beri kullanılmaktadır. Spektrofotometrik yöntemlerin prensibi, COHb'nin soiret bandında (410 nm'de) ve görünür alanda (538 - 540 ve 568 - 572 nm'de) maksimum absorpsiyon gösterme özelliğine dayanır. Bu amaçla, çok çeşitli spektrofotometrik yöntemler geliştirilmiştir (2,5,6).

Son yıllarda, COHb tayininde türev (derivative) UV spektrofotometresi de kullanılmaktadır. Bunun nedeni, COHb'nin verdiği türev spektrumlarının, diğer hemoglobin bileşiklerinin türev spektrumlarından etkilenmeden kesin ve duyarlı olarak ölçülebilmesidir (7,8).

Bu çalışmada, akut ve kronik CO zehirlenmelerinde COHb tayini için çabuk, güvenli ve hassas yöntem araştırılması yapılmıştır. Bu amaçla Dubowski (10), Buchwald (11) ve türev (derivative) UV spektrofotometresi yöntemleri karşılaştırılmış ve daha önceki bu konuda yaptığımız çalışmalarda değerlendirilmeye alınmıştır (2,7,9). Ayrıca kullandığımız Dubowski ve Buchwald yöntemleri karşılaştırılmış ve daha önceki bu konuda yaptığımız çalışmalarda değerlendirilmeye alınmıştır (2,7,9). Ayrıca kullandığımız Dubowski ve Buchwald yöntemleri, COHb zehirlenme şüphesi olan kan örneklerine uygulanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

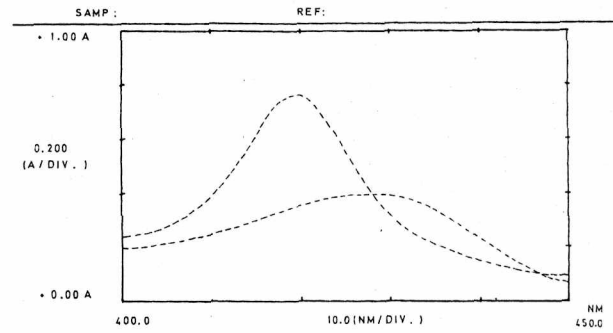
Kan örneklerinden 5'er ml cam kapaklı ve heparinli pyrex tüplere alınmış ve ağızları sıkıca kapatılarak analize kadar 4°C'de muhafaza edilmiştir.

Kan örneklerinde COHb tayininde, Dubowski ve Buchwald tarafından geliştirilen iki yöntem duyarlılık ve verimlilik açısından karşılaştırılmıştır.

Dubowski Yönteminin Prensibi: 0.05 ml kan örneğinin, % 0.4' lük amonyum hidroksit (NH₄OH) ile 10 ml'ye seyreltilmesinden sonra, küçük bir miktar (yaklaşık 10 mg) sodyum ditiyonit (Na₂S₂O₄) ilave edilmiş ve UV spektrofotometresinde 555 ve 480 nm dalga boylarındaki absorpsiyonlarının ölçülmesinden sonra, sonuçlar kalibrasyon eğrisiyle değerlendirilmiştir (10).

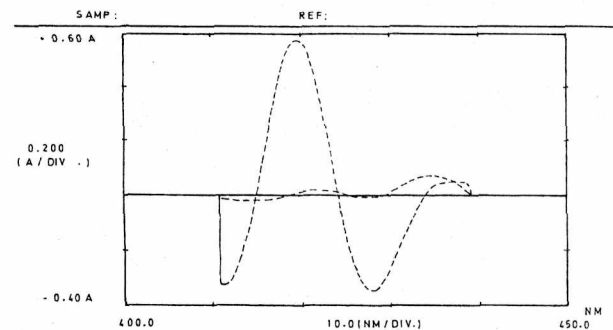
Kalibrasyon Eğrisinin Çizilmesi:

a. Heparinize kan örnekleri, son zamanlarda CO'e maruz kalmamış, sigara içmeyen kişilerden sağlanmıştır.



Şekil 1: %0 COHb ve %100 COHb Spektrumları

b. İki adet, cam kapaklı pyrex tüpünün her birine 1 ml kan konulmuş ve birinci tüp içerisinden 3 dakika % 99.9 saflıkta karbonmonoksit gazı (LB, % 99.9), diğerinden ise 3 dakika % 99.9 saflıkta Oksijen gazı (LB, % 99.9) geçirilmiş ve tüplerin ağızı iyice kapatılıp parafinlenmiştir.



Şekil 2: %0 COHb ve %100 COHb 4. türev Spektrumları

c. Hazırlanan bu standartlardan NH₄OH çözeltisiyle seyreltilerek çeşitli konsantrasyonlarda standartlar hazırlanmış ve örneklerin COHb yüzdeleri A555/A480 oranından hesaplanmıştır.

Buchwald Yönteminin Prensibi: 0.02 ml kan örneğinin seyreltik amonyak çözeltisi ile 26 ml'ye tamamlanmasından sonra seyreltik çözeltiden karbonmonoksit ve oksijen gazı geçirilmiş ve UV spektrofotometresinde 414, 421 ve 428 nm dalga boylarında ölçüm yapılmıştır. Sonuçlar formülle hesaplanmıştır (11).

TARTIŞMA

CO ile zehirlenme sonucu meydana gelen kronik maruziyet ve ölüm olaylarının değerlendirilmesinde kanda COHb tayini önemli bir kriterdir. Bu amaçla COHb tayininde kullandığımız spektrofotometrik yöntemlerin (Dubowski, Buchwald ve türev spektrofotometresi) karşılaştırılması tablo 1, 2 ve 3'de gösterilmiştir. Bu yöntemler arasında anlamlı bir fark olmadığı (student-t testi ile) gözlenmiştir (p> 0.05).

Tablo 1. CO zehirlenmesi sonucu meydana gelen ölüm olaylarında postmortem kan örneklerinde Dubowski ve Buchwald yöntemleriyle belirlenen COHb düzeyleri

No	Yaş	Cinsiyet	Ölüm nedeni	% COHb Dubowski Yöntemi*	% COHb Buchwald Yöntemi*
1	35	E	Şofben zehirlenmesi	74	64
2	44	K	"	68	72
3	28	K	"	77	74
4	42	K	"	82	80
5	37	E	"	88	82
6	32	K	"	67	72
7	38	E	"	65	60
8	25	K	"	80	78
9	24	K	"	63	58
10	44	E	"	80	84
11	48	E	Katalitik Soba zehirlenmesi	74	77
12	35	E	"	68	64
13	37	E	"	78	72
14	22	K	"	75	77
15	19	E	"	77	79
16	28	E	"	65	60
17	30	E	Egzos gazı zehirlenmesi	71	75
18	32	K	"	64	66
				Sınır : 63-88	Sınır : 60-84
Ara : 19-48				Ort : 73.11±1.68	Ort : 71.88±1.84
Ort : 32.2				S.D : 7.13	S.D : 7.83

(* P>0,05)

CO tayininde çabuk sonuç vermesi açısından Adli Toksikoloji Laboratuvarlarında spektrofotometrik prensibe dayanan Co-Oximeter gibi otomatik yöntemler veya polarografik oksijen analizörü gibi yöntemler kullanılabilir. Ancak otomatik yöntemler pahalı cihazları gerektirmektedir. Bu nedenle bu çalışmada her toksikoloji laboratuvarında bulunması gereken spektrofotometreyle rutin olarak uygulanabilecek yöntemlerden ikisi analitik olarak incelenmiştir. Ayrıca yöntemlerin kalibrasyonunda COHb standartları için kullanılan karbonmonoksit tüpleri (10) yerine daha ucuz ve pratik olarak karbonmonoksitin basit laboratuvar yöntemleriyle elde edilebileceği ve kullanılabilirliği daha önceki çalışmalarımızda gösterilmiştir (2).

Bu çalışmada COHb tayininde türev (derivative) spektrofotometresi yöntemine de yer verilmiştir.

Tablo 2. Kronik olarak CO'e maruz kalan kişilerin (sigara içenler) kan örneklerinde Dubowski ve Buchwald yöntemleriyle belirlenen COHb düzeyleri

İçilen Sigara Sayısı	Cinsiyet (n)	%COHb ± S.D. (Aralık)	
		Dubowski Yöntemi	Buchwald Yöntemi
Sigara içmeyen (n : 44)	E-15	0,83 ± 0,06a (0,50-1,42)	0,86 ± 0,05b (0,55-1,20)
	K-29	0,88 ± 0,04a (0,50-1,26)	0,86 ± 0,04b (0,44-1,28)
1-9 adet (n : 44)	E-17	2,23 ± 0,19 (0,98-3,44)	2,10 ± 0,19 (0,74-3,28)
	K-27	1,87 ± 0,17 (0,52-3,72)	1,96 ± 0,17 (0,66-3,88)
10-20 adet (n : 23)	E-15	3,15 ± 0,15 (2,18-3,88)	3,14 ± 0,13 (2,24-3,98)
	K-8	3,36 ± 0,24 (2,74-3,94)	3,39 ± 0,16 (2,44-3,94)
> 20 adet (n : 31)	E-21	4,24 ± 0,13 (3,38-4,98)	4,34 ± 0,08 (3,78-4,98)
	K-10	4,49 ± 0,15 (3,64-4,94)	4,27 ± 0,08 (3,88-4,78)

a. İki cinsiyet arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. (P>0,05)

b. İki yöntem arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. (P>0,05)

COHb'nin normal ve türev spektrofotometresinde verdiği absorpsiyon spektrumları şekil 1 ve 2'de gösterilmiştir. COHb tayininde 1900 yılındanberi spektrofotometrik yöntemler kullanılmaktadır. Bu amaçla birçok yöntemler geliştirilmiştir. Zamanımızda ise düşük konsantrasyonda COHb tayini ve COHb'nin methemoglobin (MetHb), siyanmethemoglobin (CNMetHb) ve sulfhemoglobin (SHb) gibi diğer Hb bileşiklerinden ayrılması ile ilgili çalışmalara zamanımızda da raslanmaktadır (4,5,12).

Tablo 3. Sigara içenlerde UV spektrofotometresi ve türev (derivative) UV spektrofotometresi ile belirlenen %COHb seviyeleri

No	% COHb (Dubowski Yöntemi)	
	UV	Türev (derivative)
1	4.6	5.1
2	2.8	3.6
3	4.1	3.9
4	1	0.6
5	4.6	5.2
6	5.9	6.4
7	5.5	6.2
8	3.7	4.5
9	5.4	6.6
10	2.9	2.3
Sınır : 1.0-5.9		Sınır : 0.6 - 6.6
Ort : 4.05 ± 0.08		Ort : 4.44 ± 0.09
S.D : 1.42		S.D : 1.82

(*P>0,05)

Yukarda açıklanan yöntemlerle postmortem kanda saptanan COHb düzeyleri Tablo 1'de gösterilmiştir. İncelenen 18 postmortem kan örneğinde COHb düzeyi ortalama % 73.11 (6.90 olarak saptanmıştır. Genel olarak CO zehirlenmesinin neden olduğu ölümlerde kanda COHb düzeyi % 60 ve üstüne çıkmaktadır. Elde ettiğimiz bulgular bu konuda diğer araştırmacıların bulgularını desteklemektedir (9,13,14). Kanlarında COHb saptanan 18 ölüm olayında, ölüm nedeni ola-

rak şofben (tüp gazla çalışan) zehirlenmesi (n: 10), katalitik soba zehirlenmesi (n: 6) ve eksoz gazı (n: 2) zehirlenmesi olarak bildirilmiştir. Genel olarak karbonmonoksitle zehirlenme ve ölüm nedenleri arasında yangın dumanına (3), eksoz gazına maruz kalma (14) ve ülkemizde ise soba ve şofben zehirlenmesi nedeni ile raslanmaktadır (13). Diğer taraftan ülkemizde soba ve gaz dumanına maruz kalma sonucu oluşan ölümler normal kabul edilip Adli Tıp raporlarına geçmediği için CO ile zehirlenme ve ölümler hakkında istatistikler yeterli değildir.

Postmortem kan örnekleri için kullanılan bu iki yöntemin, daha düşük konsantrasyonda kronik CO'e maruz kalan kişilerin (sigara içenler) kanlarında COHb tayini için uygulanabilirliği gösterilmiştir. Sigara içmeyenlerde COHb düzeyi ortalama % 0.80 (0.05), sigara içenlerde (1 paket civarında) ortalama % 4.36 (14 tespit edilmiştir. İstatistiksel değerlendirmeler sonucu (student-t testi), COHb düzeyi sigara içmeyenlere göre sigara içenlerde daha yüksek bulunmuştur ($p<0.01$, $p<0.05$). Ancak COHb düzeyi cinsiyete göre anlamlı bir farklılık göstermemiştir ($p>0.05$, Tablo 2). Akut karbonmonoksit zehirlenmesinin semptomları COHb düzeyi % 10 üstüne çıktığında anlaşılabilir. Devamlı ve düşük düzeyde CO'e maruz kalma ile kanda COHb düzeyi % 7 - 8'e kadar ulaşabilir. Bu durumda akut semptomlar yerine psikometrik deneylerle gösterilebilen psikonörolojik semptomlar belirir (11). Sigara içenlerde COHb düzeyi içilen sigara sayısına bağlı olarak % 5 ve daha üstüne çıkabilir. Bulgularımız bu araştırmaları desteklemektedir (9).

KAYNAKLAR

1. Vural N. Toksikoloji. Ankara: A.Ü. Basımevi, A.Ü. Ecz. Fak. Yayınları, No:73, 1996: 413-420.
2. Vural, N., Motacedded.: COHb tayininde kullanılan mikrodifüzyon ve değiştirilmiş Wolf yöntemlerinin karşılaştırılması,
3. Gormsen H, Jeppsen N, Lund A. The Causes of Death in Fire Victims. *Forensic Sci Int* 1984;24: 107-111
4. Lewin BC, Rechani PR, Guman JL. Analysis of Car-

boxyhemoglobin and Cyanide in Blood From Victims of the Dupont Plaza Hotel Fire in Puerto Rico. *J Forensic Sci* 1990;35(1):151-168.

5. Panzali A, Signorini C, Albertini A. Improvement in Lower Carboxyhemoglobin Range Determination by Second-Derivate Spectroscopy. *Clin Chem* 1987;33 (1):2311-2312.

6. Vreman HJ, Mahoney JJ, Kessel AL, Stevenson DK. Carboxyhemoglobin as Measured by Gas Chromatography and with IL 282 and 482 Co-Oximeters. *Clin Chem* 1988;34 (12):2562-2566.

7. Weiser, W.E., Parduce, H.L.: Evaluation of Multi-Wavelength Derivate Spectra for Quantitative Applications in Clinical Chemistry. *Clin. Chem.* 1983; 29 (9): 1673-1677.

8. Park J, Worth HG. Carboxyhemoglobin Determination by Second-Derivate Spectroscopy. *Clin Chem* 1985;31(2):279-281.

9. Vural N, Kahraman R. Karbonmonoksit (CO) Zehirlenmesi ile Ölenlerde ve Sigara İçenlerde Karboksihemoglobin (COHb) ve Methemoglobin (MetHb) Düzeyleri. *A.Ü. Ecz Fak Derg* 1994;23(12):11-19.

10. Bauer JD. Carboxyhemoglobin, Methemoglobin and Sulfhemoglobin. *Clinical Laboratory Methods and Diagnosis, Volume 1, London: Saint Louis The C.V. Mosby Company, 1970:397-405.*

11. Vural N, Motacedded Z. Standardization of Carboxyhemoglobin by Microspectrophotometric Method and Application of the Method to Workers Occupationally Exposed to Carbon Monoxide. *A.Ü. Ecz Fak Mec* 1978;8(1):55-68.

12. Siek OJ, Riedors F. Determination of Carboxyhemoglobin in the Presence of Other Blood Hemoglobin Pigments by Visible Spectrophotometry. *J Forensic Sci* 1984;29(1):39-54.

13. Vural N, Kahraman R. Factors Affecting The Postmortem Carbon Monoxide and Methemoglobin Concentrations. *Forensic Chem* 1994;5:93-96.

14. Reys LL, Santos JC. Importance of Information in Forensic Toxicology. *Am J Forensic Med Path* 1992;13(1):33-36.

Yazışma adresi:

Prof. Dr. Nevin VURAL
Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmasotik Toksikoloji Anabilim Dalı
06100 Tandoğan / Ankara