اندازه‌گیری درصد کربوکسی هموگلوبین در خون اجساد به‌روش اسپکتروفتومتری مشتق دوم

دکتر مهشید افشار

دانشیار گروه پزشکی قانونی و طب‌کار دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران

مصطفی شاهی‌نصرت آباد

کارشناس ارشد آزمایشگاه سم‌شناسی پزشکی قانونی

دکتر مرضیه مظلومی‌ابیانه

دکتر داروساز

خلاصه

روش مشتق‌گیری اسپکتروفتومتری به‌علت کاهش همپوشانی باندهای جذبی سایر مشتقات هموگلوبین مانند متهموگلوبین و سولفهموگلوبین با باند جذبی کربوکسی هموگلوبین، روش پیشنهادی برای تعیین مقدار درصد کربوکسی هموگلوبین در خونهای فاسد به‌خصوص در موارد پزشکی قانونی است.

در این بررسی ۱۰ نمونه خون جسد مشکوک به‌مسمومیت با منواکسید کربن ابتدا به روش اسپکتروفتومتری ساده در محدوده طول موج ۵۰۰ـ۶۰۰ nm (روش *Tietz*) مورد آزمایش قرار گرفته و از وجود کربوکسی هموگلوبین در غلظتهای مختلف اطمینان حاصل گردید. سپس نمونه‌ها به‌روش اسپکتروفتومتری مشتق دوم در محدوده ۴۵۰ـ۴۰۰ nm اسکن گردیده و با استفاده از $Ln\frac{418nm}{430}$ درصد کربوکسی هموگلوبین محاسبه گردید. مقدار *CoHb* در نمونه‌های مورد بررسی در دامنه ۱۶/۵ـ۶۸/۵ % تعیین گردیده است.

واژه‌های کلیدی: کربوکسی هموگلوبین *(Carboxyhemoglobin)*، خون *(blood)*، اسپکتروفتومتری مشتق دوم *(Second derivative specterophotometery)*، جسد *(Post-mortem)*.

مقدمه:

تشخیص و اندازه‌گیری کربوکسی هموگلوبین در خون به روشهای مختلفی مانند روش میکرودیفوزیون یا روش (Conway) (۲). روش گاز کروماتوگرافی (GC) (۴،۱۶)، روش الکتروشیمیایی (۳) و روشهای اسپکتروفتومتری ساده (۱۵) و مشتق‌گیری (۱۲ و ۱۳) میسر است.

در روش میکرودیفیوزیون با انتشار جزیی (میکرودیفیوزیون) گاز Co در یک سلول کانوی (Conway) و انجام عمل احیاء می‌توان درصد اشباع CoHb را مشخص نمود. در نمونه‌های خون آلوده به عوامل میکروبی ممکن است ترکیبات احیاءکننده فرّار دیگری در اثر فعالیت باکتریها به‌وجود آید که سبب خطا در نتیجه آزمایش شوند (۲). روش گاز کروماتوگرافی مجهز به دستگاه Head Space توسط Kupferschmidt و Perrigo برای کاربرد در خون فاسد پیشنهاد شده است (۱۶ و ۴). اساس این روش افزودن یک مادهٔ تجزیه‌کننده به نمونه خون و شکستن باند منواکسیدکربن با هموگلوبین می‌باشد. سپس مقدار Co آزادشده اندازه‌گیری می‌گردد. آزمایشات انجام‌شده نشان می‌دهد که برای غلظتهای ۱۰۰-۲۰٪ CoHb روش ارائه‌شده معقول و مناسب است (۱۶). عمده‌ترین اشکال این روش در بررسی خون جسد این است که مقدار گاز منواکسیدکربن که از نمونه آزاد می‌گردد نشاندهندهٔ میزان اشباع خون با کربوکسی هموگلوبین است. در حالی که امروزه معلوم شده که در خون بدن اجساد پس از مدتی گاز منواکسید کربن تولید می‌شود (۸ و ۶).

این مسئله اولین‌بار با مشاهده Co در خون و مایعات حفره‌ای جسد غرق‌شده‌ای که ۴۵ روز در آب راکد غوطه‌ور مانده بود، مد نظر قرار گرفت. Engel اعلام نمود که بعضی باکتریها تحت شرایط بیهوازی منواکسیدکربن را از ترکیبات هِم تولید می‌کنند و طبق بررسیهای etal و Mayashi یک باکتری جداشده از بزاق وقتی در محیط مغذی حاوی هموگلوبین کشت داده شود گاز Co تولید می‌نماید (۸). برای غلبه بر این مشکل پیشنهاد گردید که علاوه بر اندازه‌گیری مقدار Co به روش گاز کروماتوگرافی باید غلظت هموگلوبین تام نمونه خون نیز توسط روش دیگری تعیین گردد که اشکال آن وقت‌گیری و هزینه زیاد آزمایش می‌باشد (۱۳).

اسپکتروفتومتری می‌تواند به دو شکل ساده و مشتق‌گیری (Derivative) به‌کار گرفته شود. روش اسپکتروفتومتری ساده و یا روش پیشنهادی Tietz از نظر کمی فقط برای خون تازه کاربرد دارد. در خون جسد در اثر فساد مشتقات دیگر هموگلوبین مانند متهموگلوبین و سولفهموگلوبین تولید می‌شوند و به‌علت تداخل باندهای جذبی آنها با باند جذبی کربوکسی هموگلوبین، تعیین درصد CoHb با خطای بسیاری مواجه است (۱۵). این روش جهت تشخیص کیفی CoHb در نمونه‌های خون

تـازه و فـاسد اجسـاد مـورد اسـتفاده قـرار می‌گیرد.

از روشـهای اسـپکتروفتومتری مـورد اسـتفاده بـه‌کـارگیـری دسـتگـاه اسـپکتروفتومتر دیـفرانسـیلی اتـوماتیک IL-283,Co-oiximeter و اسـپکتروفتومتر اتوماتیک IL-282, Co-oximeter مـی‌باشد. بررسیهای انجام‌شده نشان مـی‌دهد کـه در مورد خون تازه یا خونی کـه تـغییر مـاهیت نـداده بـاشد اسـتفاده از اسـپکتروفتومتر IL-282 بهترین روش برای رسیدن به نـتایج بـاثبات‌تر و دقـیق‌تر در مـقادیر ۱۰۰-۵٪ کـربوکسی هـموگلوبین نسـبت بـه روش اسپکتروفتومتری IL-182 می‌باشد. در مورد خون فاسد نتایج بدست‌آمده توسط این دو دستگاه در مقادیر ۴۵-۱۶٪ CoHb موجود در نمونه خون مطابق با نتایج حاصل از دیگر روشهاست. درباره سایر مـقادیر کـربوکسی هموگلوبین نمونه خون فاسد نتایج حاصل از دسـتگاه IL-282 تـقریباً بـا مـیزان واقـعی مطابقت دارد ولی با دستگاه IL-182 نتیجه کاملاً متفاوتی بدست می‌آید (۴).

به‌هر حال اندازه‌گیری میزان کـربوکسی هموگلوبین در خون فاسد توسط هر یک از روشهای اسپکتروفتومتری ساده با خـط در نتایج حاصله همراه می‌باشد.

با استناد به نـظریه O'Hover کـه اعـلام نـمود روش اسـپکتروفتومتری مشـتق‌گیری بـرای کـاهش هـمپوشانی بـاندهای جـذبی ترکیبات مختلف متناسب است. استفاده از ایـن روش جـهت تـعیین مـقدار کـربوکسی هموگلوبین در نمونه‌های خون فاسد، کدر و دناتورشده (بـه‌خصوص در خـون قـربانیان آتش‌سـوزی) مـورد تـوجه سـم‌شناسان، پزشکی قانونی قرار گرفت (۱۲).

در این روش از جـذب یک نـمونه (A) نسبت به طول موج (λ) مشتقات اول و دوم و بالاتر گرفته می‌شود روش مشتق‌گیری سبب حـذف تـداخـلات طـیفی دیگـر تـرکیبات مـی‌شود. مشکـل دیگـر در روشـهای اسپکتروفتومتری سـاده تـفرق نـور بـه‌دلیل کدورت مـحلول مـورد آزمـایش یـا وجـود حبابهای هـوا در آن و یـا اثـر انگشت روی سـلها (cuvette) است. روش مشـتق‌گیری همچنین سبب حذف این اثرات مـی‌شود و حساسیت زیاد برای نشـان‌دادن اخـتلافات جزئی طیفهای شبیه به هم دارد (۱۰). لذا با تـوجه بـه‌مراتب فـوق ایـن روش مـی‌توانـد جهت تعیین مقدار کربوکسی هموگلوبین در نمونه‌های خون فاسد و کدر مورد اسـتفاده قـرار گـیرد. طـبق بـررسیهای انجام‌شده اسـتفاده از مشـتقات زوج دوم و چـهارم توصیه شده است (۱۲ و ۱۱).

در ایـن بـررسی در نـظر داریـم بـرای اولیـن‌بار در ایـران بـا اسـتفاده از روش مشتق‌گیری دوم، روش پیشنهادی Park et al (۱۱) با اصلاحی در محاسبات طـبق روش Buther et al (۱) بـه تـعیین مـقدار درصـد کربوکسی هـموگلوبین در نـمونه‌های خـون اجساد بپردازیم.

روش بررسی

۱- انتخاب نمونه:

۱۰ نمونه خون جسد مشکوک به مسمومیت با منواکسید کربن ابتدا با روش اسپکتروفتومتری ساده در محدوده طول موج ۶۰۰nm-۵۰۰ (روش Tietz) به وسیلهٔ اسپکتروفتومتری (UV-Vis Spectrophotometery Cary-14) مورد آزمایش کیفی قرار گرفت. بدین صورت که در دو سل (cuvette) شاهد و نمونه دستگاه ۴ میلی‌لیتر آمونیاک ۰/۴٪ و ۱۰ میلی‌گرم سدیم دی‌تیونیت (Na2S2O4) و به سل نمونه ۵۰ میکرولیتر از نمونه خون اضافه نموده و آنگاه طیف جذبی در محدوده طول موجهای ۶۰۰nm-۵۰۰ اندازه‌گیری گردید. نمونه‌هایی که دارای یک طیف جذبی با دو ماکزیمم در طول موجهای ۵۷۲-۵۶۷ و ۵۴۰-۵۳۸ بود مثبت تلقی شد و آنهایی که دارای یک طیف جذبی با یک ماکزیمم در ناحیه ۵۵۵ بودند منفی در نظر گرفته شدند، طیفهای حاصله از نمونه‌های منفی و مثبت در شکل (۱) ارائه شده است.

۸ نمونه مثبت و ۲ نمونه مثبت ضعیف تشخیص داده شد سپس با استفاده از روش مشتق‌گیری دوم مقدار درصد کربوکسی هموگلوبین در نمونه‌های فوق مورد بررسی مجدد قرار گرفتند.

۲- طرز تهیه محلولهای استاندارد:

برای ساختن محلولهای از خون تازه هپارینه که از یک فرد سالم غیرسیگاری گرفته شده بود استفاده گردید. ۱۰۰cc از این خون را به دو قسمت مساوی تقسیم کرده و یک قسمت را در ظرف شیشه‌ای با دهانهٔ تنگ ریخته سپس ۵۰ میلی‌لیتر ماده ضدکف اکتانول به آن اضافه گردید و دهانه ظرف با چند لایه پارافیلم پوشانده شد تا با هوا کمتر تماس داشته باشد. برای تهیه استاندارد ۱۰۰٪ اشباع CoHb از طریق یک شیلنگ لاستیکی کپسول گاز Co را به یک پی‌پت وصل کرده و این پی‌پت از لایه پارافیلم درون نمونه خون قرار داده شد. یک پی‌پت پاستور دیگر هم به‌منظور خروج حبابهای اضافی گاز از لایه پارافیلم عبور داده به‌طوری که در بالای سطح نمونه قرار گیرد. ظروف حاوی نمونه روی همزن برقی قرار گرفت تا نمونه خون ضمن اشباع‌شدن با گاز Co به آرامی مخلوط شود. برای این منظور از کپسول گاز Co با خلوص ۲۸۲ppm و حدود ۶ ساعت عمل اشباع‌سازی طول کشید.

نمونه ۵۰ میلی‌لیتر دیگر به‌مدت ۳۰ دقیقه با گاز اکسیژن خالص با سرعت 5L/min اشباع گردید. این نمونه به‌عنوان استاندارد فاقد کربوکسی هموگلوبین در نظر گرفته شد. برای ساختن محلولهای استاندارد دیگر با استفاده از این دو نمونه، لازم بود که درصد دقیق CoHb در هر کدام از نمونه‌هایی را به‌درستی بدانیم، بنابراین از فرمول روش پیشنهادی Butler et al (۱۲ و ۱) استفاده گردید به‌این ترتیب که جذب ساده آنها را در دو طول موج ۴۲۰ و ۴۳۲

نانومتر اندازه‌گیری کرده و نسبت آنها (Ar) محاسبه گردید. سپس با بهره‌گیری از فرمول

$$\%CoHb = ۱۰۰ \times \frac{۱-(Ar \times F_1)}{[(ArF_2 - F_1) - F_3] + ۱}$$

F۱=۱/۳۳ F۲=۱/۴۷۸۷ F۳=۱/۹۹۳۹

درصد اشباع CoHb هر یک از محلولها محاسبه گردید.

مقدار درصد اشباع در نمونه استاندارد با حداقل ۳ درصد و حداکثر ۷ درصد اشباع CoHb تعیین گردید و با استفاده از درصد مختلف در نمونه فوق ۷۰ نمونه استاندارد ۷۰٪، ۵۷٪، ۴۳٪، ۳۶٪، ۳۰٪، ۲۳٪ و ۱۶٪ تهیه گردید.

۳- طرز تهیه محلول رقیق‌کننده:

برای رقیق‌سازی نمونه‌ها و استانداردها، محلول ۱۰mmol/lit ترانس‌آمینومتان (THAM) مناسب است. ۰/۶ گرم پودر ترانس آمینومتان را وزن کرده و در ۵۰۰cc آب‌مقطر حل نموده سپس ۲/۵mg/ml سدیم دی‌تیونیت (۱/۲۵ گرم) به‌عنوان احیاءکننده به آن افزوده شد. این محلول باید تازه تهیه شود.

۴- مشخصات دستگاه:

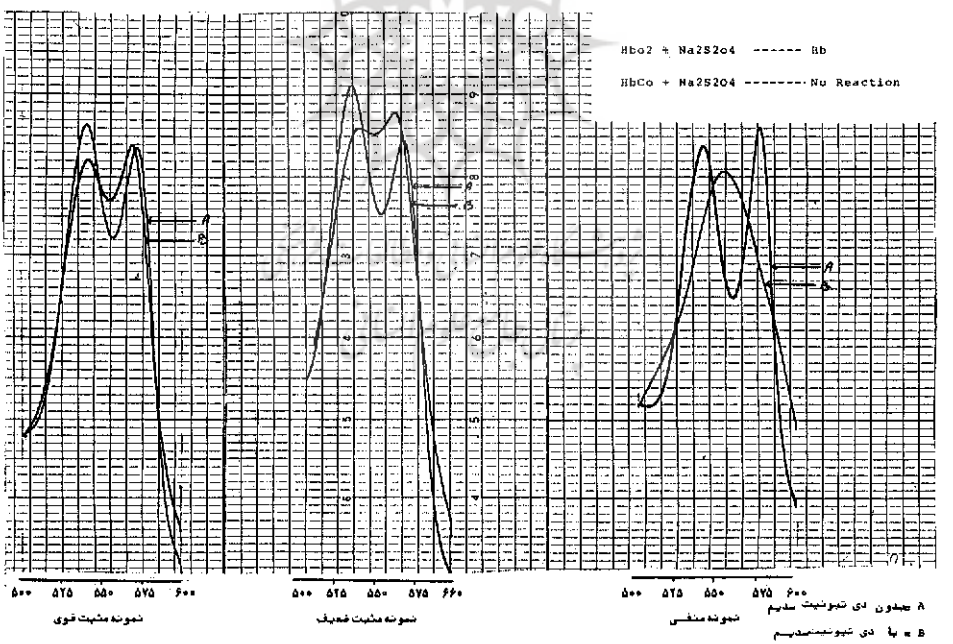
دستگاه اسپکتروفتومتری مجهز به سیستم مشتق‌گیری مدل Cary-1 ساخت کارخانه Varian مجهز به سیستم کامپیوتر Computer Epson EL2 و چاپگر Printer Epson LX-400 استفاده کردیم.

۵- تهیه منحنی کالیبراسیون:

۰/۱ میلی‌لیتر از نمونه استاندارد را به ۲۰ میلی‌لیتر محلول رقیق‌کننده افزوده و پس از مدت ۳ دقیقه مخلوط در سل نمونه دستگاه ریخته شد، در سل شاهد محلول رقیق‌کننده اضافه کرده و سپس مشتق دوم جذب هر یک از استانداردها در محدوده ۴۰۰-۴۵۰nm تعیین گردید. منحنی مشتق دوم در شکل شماره ۲ و مشخصات رسم آن در ذیل مشخص شده است.

جدول ۱ : مقادیر عددی جذب در ۴۳۰ و ۴۱۸ نانومتر و $Ln\frac{A}{B}$ مربوط به هر استاندارد را نشان می‌دهد.

$Ln\frac{A}{B}$	مقدار جذب در ۴۳۰nm	مقدار جذب در ۴۱۸nm	درصد اشباع با CoHb	استانداردها
۳/۱۵۶	-۰/۰۰۱۲	-۰/۰۲۸۳	۷۰	۱
۲/۴۲۳	-۰/۰۰۱۵	-۰/۰۱۶۵	۵۷	۲
۱/۷۸۱	-۰/۰۰۲۲	-۰/۰۱۳۲	۵۰	۳
۱/۳۸۳	-۰/۰۰۲۹	-۰/۰۱۱۵	۴۳	۴
۱/۰۹۸	-۰/۰۰۵۰	-۰/۰۱۵۰	۳۶	۵
۰/۵۱۳	-۰/۰۰۷۶	-۰/۰۱۲۷	۳۰	۶
۰/۳۳۰	-۰/۰۰۷۴	-۰/۰۱۰۳	۲۳	۷
۰/۳۳۵	-۰/۰۰۴۹	-۰/۰۰۳۵	۱۶	۸
۱/۲۴۱	-۰/۰۰۴۲	-۰/۰۰۱۲	۳	۹

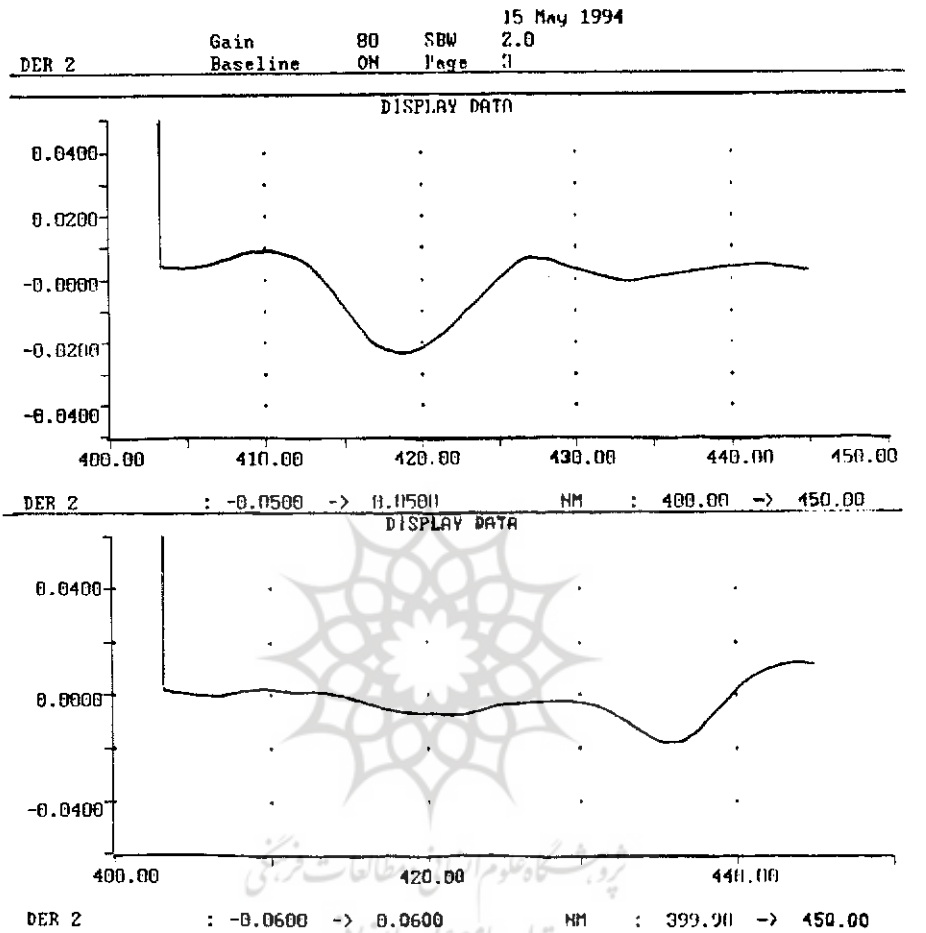


منحنی شماره ۱ : جذب ساده سه نمونه مثبت قوی، مثبت ضعیف و منفی قبل و بعد از احیاء، با دستگاه اسپکتروفتومتری

جدول ۲ : مقادیر عددی جذب در ۴۳۰ و ۴۱۸ نانومتر و $Ln\frac{A}{B}$ مربوط به هر نمونه را نشان می‌دهد.

نمونه‌ها	مقدار جذب در ۴۱۸	مقدار جذب در ۴۳۰	$Ln\frac{A}{B}$
۱	-۰/۰۱۷۰	-۰/۰۰۰۹	۲/۹۳۹
۲	-۰/۰۱۳۸	-۰/۰۰۴۱	۱/۲۱۴
۳	-۰/۰۱۴۱	-۰/۰۰۳۴	۱/۴۲۲
۴	-۰/۰۰۰۶۵	-۰/۰۰۲۴	۰/۹۹۶
۵	-۰/۰۰۴۴	-۰/۰۰۶۰	-۰/۳۱۰
۶	-۰/۰۰۹۹	-۰/۰۰۱۲	۲/۱۱۰
۷	-۰/۰۲۳۲	-۰/۰۰۱۸	۱/۲۵۳
۸	-۰/۰۲۳۲	-۰/۰۰۱۱	۳/۰۴۷
۹	-۰/۰۱۷۲	-۰/۰۰۰۸	۳/۰۶۸
۱۰	-۰/۰۲۴۱	-۰/۰۰۱۲	۳/۰۰۱

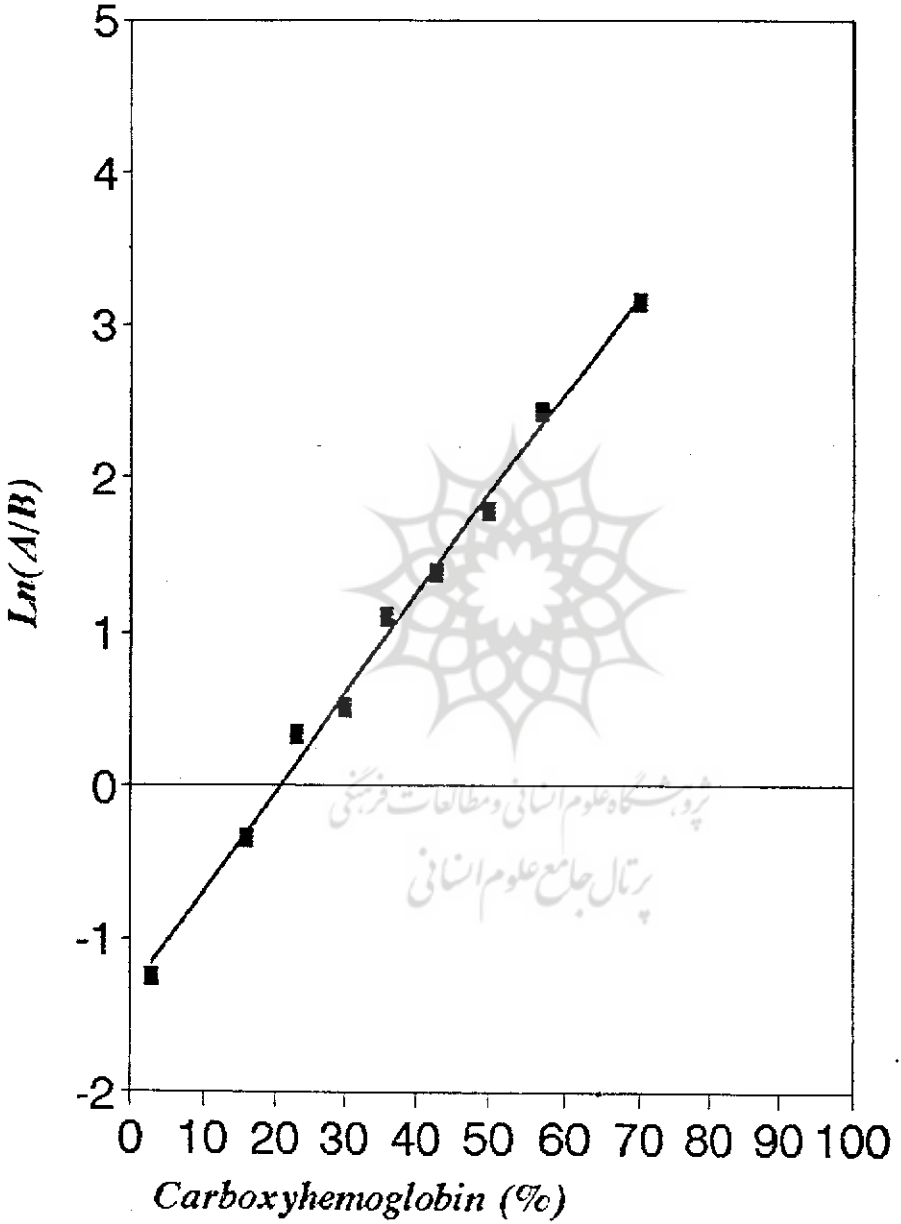
با استفاده از منحنی‌های مشتق دوم مقادیر مطلق جذب در طول موجهای ۴۱۸nm (A) و ۴۳۰nm (B) و $Ln\frac{A}{B}$ محاسبه شد (جدول شماره ۱). آنگاه منحنی‌کالیبراسیون رسم گردید (منحنی شماره ۳)، که رابطه درصد CoHb استانداردها با $Ln\frac{A}{B}$ را نشان می‌دهد. با بهره‌گیری از کامپیوتر بهترین خط راست (منحنی کالیبراسیون) از بین نقاط پس از محاسبه ضریب رگرسیون (regression coefficient) رسم شده جداول زیر نمایانگر مختصات و مشخصات منحنی فوق می‌باشد.



منحنی شماره ۲: منحنی بالا مربوط به مشتق دوم جذب استاندارد ۷۰٪ و منحنی پایین مربوط به مشتق دوم جذب استاندارد ۳٪ در محدوده ۴۵۰ـ۴۰۰ نانومتر می‌باشد.

یافته‌ها

۱۰ نمونه خون جسد که قبلاً وجود کربوکسی هموگلوبین در آنها مورد شناسایی قرار گرفته بود. مطابق نمونه‌های استاندارد $Ln\frac{A}{B}$ مربوط به هرکدام محاسبه (جدول شماره ۲) و سپس با استفاده از آن مقدار درصد اشباع CoHb هر نمونه از روی منحنی کالیبراسیون محاسبه گردید (جدول شماره ۳).



پژوهشگاه علوم انسانی و مطالعات فرهنگی
پرتال جامع علوم انسانی

منحنی شماره ۳ : منحنی کالیبراسیون تعیین مقدار کربوکسی هموگلوبین خون

بحث و نتیجه‌گیری

در سالهای اخیر، مشتق‌گیری از طیف کربوکسی هموگلوبین به‌عنوان تنها روش اسپکتروفتومتری عملی و قابل اعتماد در تعیین مقدار CoHb اشباع در نمونه‌های خون اجساد پیشنهاد گردیده است. به‌طورکلی روش مشتق‌گیری که سبب کاهش اثر کدورت نمونه مورد آزمایش و کاهش اثر تداخلات طیفی مشتقات دیگر خون شده که مهمترین مشکل روش تجزیه‌ای اسپکتروفتومتری می‌باشد، به‌روش اسپکتروفتومتری ساده ارجحیت دارد (۱۰). از جمله می‌تواند جهت تعیین منواکسید کربن در خون جسد که حاوی مخلوطی از انواع دیگر مشتقات هموگلوبین بوده و به‌همین دلیل از کدورت بالایی برخوردار است، به‌کار رود و در آزمایشگاههای سم‌شناسی پزشکی قانونی بسیار مفید و کارآمد باشد. از طرف دیگر در مراکز پزشکی قانونی چون در بررسی خون اجساد قربانیان آتش‌سوزیها با مشکل تغییر ماهیت (دناتوره‌شدن) هموگلوبین و همچنین انعقاد خون در اثر گرمای آتش روبرو هستیم روش فوق یک روش عملی و قابل اعتماد است.

جهت تهیه استاندارد ۱۰۰ درصد اشباع CoHb به گاز منواکسید کربن خالص نیاز است که از هیچ طریق تهیه آن ممکن نشد و این یکی از مهمترین مشکلات ما در کار عملی بود. البته در صورت داشتن گاز Co خالص هم تهیه محلول ۱۰۰ درصد CoHb با اشکالاتی همراه می‌باشد. این مشکلی است که در اکثر منابع علمی به آن اشاره گردیده (۶ و ۵) و برای غلبه بر آن روش محاسبه تئوری مورد استفاده در این بررسی را پیشنهاد کرده‌اند. با توجه به مطلب فوق نقطه ۱۰۰ درصد کربوکسی هموگلوبین را محاسبه و منحنی دیگر با درنظرگرفتن این نقطه رسم نمودیم، ولی چون درصد اشباع هموگلوبین نمونه‌های خون مورد مطالعه کمتر از ۷ درصد می‌باشند از منحنی کالیبراسیون اولیه (منحنی شماره ۳) استفاده گردید.

امروزه دستگاههای اسپکتروفتومتر در ساختمان خود به سیستم مشتق‌گیری به‌صورت یک برنامه کامپیوتری مجهز بوده و به‌راحتی می‌توان به اندازه‌گیری مشتق طیفها پرداخت.

علت مرگ در نمونه‌های شماره ۱ و ۶ و ۸ و ۹ و ۱۰ خفگی در حمام گزارش شده است با مراجعه به جدول شماره ۳ روشن می‌گردد که مقدار درصد CoHb پنج نمونه ذکرشده در دامنه ۶۸/۵-۵۳٪ و میانگین ۶/۵±۶۳/۶٪ درصد بود که این مقادیر با نتایج بسیاری از بررسیها قابل مقایسه است (۱۴).

نمونه‌های شماره ۳ و ۷ به‌ترتیب مربوط به جسد دختر ۱۲ ساله و پیرمرد ۷۳ ساله

جدول ۳: درصد *CoHb* مربوط به ۱۰ نمونه مجهول مورد آزمایش

نمونه‌ها	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰
درصد	۶۶/۵	۴۲	۴۴	۳۶	۱۶/۵	۵۳	۴۳	۶۸	۶۸/۵	۶۷

است که میزان CoHb ۴۴٪ و ۴۳٪ می‌باشد. این میزان اگرچه پایین‌تر از غلظت کشندگی منواکسیدکربن است ولی به‌علت تنفس سریع در سنین پایین و نیز احتمال وجود نارساییهای قلبی و تنفسی در افراد مسن می‌تواند موجب مرگ گردد (۷).

مرگ در نمونه‌های شماره ۴ و ۵ به‌ترتیب با ۳۶٪ و ۱۶/۵٪ اشباع با منواکسید کربن به‌علت آتش‌سوزی اعلام گردیده است در این‌گونه حوادث به‌علت مشارکت گازها و غبارات سمی ناشی از احتراق مواد و وسایل مختلف، همچنین سوختگی و شوک حرارتی، مرگ با مقادیر کمتر از غلظت کشنده منواکسید کربن نیز محتمل است (۹). در ضمن مقادیر کمتر از حد کشندگی CoHb اگرچه ممکن است در حوادث آتش‌سوزی علت اصلی مرگ تلقی نگردد ولی تعیین مقدار آن به‌علت دلالت بر حیات شخص در زمان حادثه از نظر پزشکی قانونی حائزاهمیت است.

در مورد نمونه شماره ۲ که مربوط به جسد مرد ۲۷ ساله‌ای می‌باشد مقدار CoHb ۴۲ درصد تعیین گردید که به‌علت عدم اطلاع از علت مسمومیت و وضعیت سلامتی متوفی و دیگر اطلاعات مورد نیاز، تفسیر علت مرگ مقدور نمی‌باشد.

با توجه به مطالب فوق استفاده از مشتق دوم اسپکتروفتومتری دارای سرعت، سهولت و دقت قابل توجهی بوده و به‌ویژه می‌تواند در آزمایشگاههای سم‌شناسی پزشکی قانونی مورد استفاده قرارگیرد.

منابع:

1. Beutler E. and West C., "Simplified determination of carboxyhemoglobin" clin chem. 30(6): 871-74. 1984.
2. Blackmore D.J. "The determination of Carbon monoxide in Blood and Tissue", Analyst, 95: 439-458 1970.
3. Bogusz M., Aderjan R. and Bosche J., "The determination of Carbon monixide in blood by means of electrochemical Packet gas meter",

J. anal. Toxico. 12: 225-228 (1988).

4. Con stantion A., Park J., and Caplan y., "Carbon monoxide analysis: A comparsion of two co-oximeters and head space chromatography" J. anal toxicology 10: 190-93 (1986).
5. Fu Kui, Y. and etal "Determination of carboxyhemoglobin in heated blood, sources error and utility of derivative spectrophotometery" J. anal. Toxicol, 9(2): 81-84, 1983.
6. Fu Kui Y. and etal "A study of derivative spectrophotometery for determination of carboxyhemoglobin in blood", J. Anal. Toxicol, 8(6): 277-81, 1984.
7. Jain K.K., "Carbon monoxide poisoning" warren H. Green, inc, 1990.
8. Kojima, T. and etal, "Production of carbon monoxide in cadavers" Forensic sci. Int., 32: 67-77, 1986.
9. Nelson G.L., "regulatory aspects of fire Toxicology" Toxicology, 97, 181-199, 1987.
10. O, Haver, T.C. "Potential application of derivative and wavelength modulation spectrometry" clin-chem. 25(9): 153-158, 1979.
11. Parks J. and worth H.G., "Carboxyhemoglobin determination by second derivative spectroscopy" clin-chem. 31(2): 279-81, 1985.
12. Perrigo B.J., yoynt B.P. "Evaluation of current derivative spectro photometric methodology for the determination of percent carboxyhemoglobin saturation of carbon monoxide in blood", J. anal. Toxicol. 5: 122-125, 1981.
13. Sato K. and etal "Determination of total hemoglobin in forensic blood samples with special reference to carboxyhemoglobin analysis" Forensic Sci-Int, 48: 89-96, 1990.
14. Sick T.J. and Rieders F., "Determination of carboxyhemoglobin in the presence of other blood hemoglobin pigments by visible spectrophotometery" J. Forensic sci, 29(1): 39-54, 1984.
15. Tietz W., "Fundamental of clinical chemistry" W.H. saunders, Co., 1987.
16. Wigfield, and etal, "Assessment of the methods available for the determination of carbon monoxide in blood, J. anal. Toxicol, 5: 122-125, 1981.