

Aus dem Institut für gerichtliche Medizin der Universität Erlangen-Nürnberg  
(Direktor: Prof. Dr. Dr. E. WEINIG)

## Fehlerquellen bei der Methämoglobinbestimmung und ihre Ausschaltung\*

I. Mitteilung

Von

**W. SCHWERD**

Mit 6 Textabbildungen

(Eingegangen am 14. Januar 1961)

Methämoglobin ist bekanntlich ein Oxydationsprodukt des Blutfarbstoffs mit dreiwertigem Eisen. Es wird deshalb in Anlehnung an die sonstige chemische Nomenklatur auch Ferrihämoglobin oder einfach Hämoglobin genannt.

Der Sauerstoff ist im Methämoglobin so stark gebunden, daß es zum Sauerstofftransport nicht mehr geeignet ist. Schon normalerweise enthält das Blut etwas Methämoglobin, jedoch nur in der sehr geringen Menge von etwa 1% (HEUBNER, KIESE, STUHLMANN und SCHWARTZKOPFF-JUNG). Außer bei der seltenen familiären Methämoglobinämie tritt es in vermehrter Menge bei Vergiftungen mit sog. Methämoglobinbildern auf. Solche Vergiftungen sind nicht mehr so häufig wie früher, kommen aber immer noch vor, man denke nur an die gehäuften Nitritvergiftungen in den letzten Jahren. Neuerdings wurde auch mehrfach von Methämoglobinämien bei medikamentösen Intoxikationen, besonders mit phenacetinhaltigen Schmerzmitteln berichtet. Solche Patienten können Blutschädigungen aufweisen, auch Leber- und Nierenveränderungen werden darauf zurückgeführt. Bei Säuglingen wird wegen der leichteren Oxydierbarkeit des fetalen Hämoglobins sogar schon vor der Verabreichung therapeutischer Mengen phenacetinhaltiger Präparate gewarnt (CERNY, WESTHAUS u. a.). Wir fanden jedoch bei der Untersuchung von über 100 Blutproben von Säuglingen und Kleinkindern, die (phenacetinhaltige) Treupel-Zäpfchen in therapeutischen Mengen erhielten und die uns von der Kinderabteilung der Chirurgischen Universitätsklinik Erlangen und den Städt. Kinderkliniken Nürnberg und Fürth dankenswerterweise zur Verfügung gestellt wurden, keinen nennenswerten Anstieg des Methämoglobin Gehalts.

\* Vorgetragen auf der Tagung der Deutschen Gesellschaft für gerichtliche und soziale Medizin vom 12.—15. Oktober 1960 in Graz.

Im *toxikologischen Laboratorium* war die Methämoglobinbestimmung bisher von fraglichem Wert. Dies hatte mehrere Gründe:

1. Methämoglobin ist wegen seines wenig charakteristischen Spektrums schwer von anderen Blutfarbstoffderivaten abzugrenzen und auch sonst nicht besonders gut zu erfassen,
2. es bildet sich *in vitro*, unter Umständen auch postmortal in der Leiche und
3. kommt es zu allem Überfluß beim *primären* Vorhandensein von Methämoglobin im Blut zu einer schnellen Rückbildung dieses Farbstoffs. Deshalb kann oft schon nach Stunden nur noch ein Bruchteil

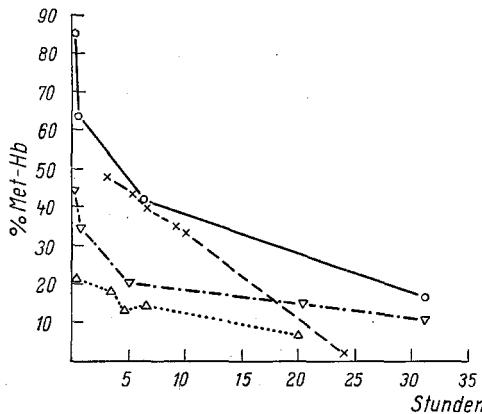


Abb. 1: Met-Hb-Rückbildung  
nach Nitritzusatz zu Frischblut

oder kein Methämoglobin mehr nachgewiesen werden. Hierauf haben LAVES u. a. schon vor mehr als 30 Jahren hingewiesen.

Die wichtigste Fehlerquelle bei Methämoglobinbestimmungen ist zweifellos die *Methämoglobinrückbildung*. Unseres Wissens sind über die Frage, wie die Rückbildung verhindert werden kann, noch keine erfolgreichen systematischen Untersuchungen gemacht worden, obwohl die Grundlagen dafür bekannt sind. Vor einigen Jahren befaßten sich OLLIVIER u. Mitarb. mit dieser Frage und empfahlen, die Blutproben eisgekühlt aufzubewahren. Wir kennen aber alle die praktische Schwierigkeit einer solchen Maßnahme und überdies ist die dadurch erzielte Verzögerung der Methämoglobinrückbildung unbedeutend. Außerdem, so meinen die Autoren, könnte man die Methämoglobinrückbildung durch Zusatz kleinerer Mengen von Natriumnitrit bremsen. Doch scheint uns die Verhinderung der *Methämoglobinrückbildung* durch Zusatz eines Methämoglobinbildners schon deswegen bedenklich, weil die Methämoglobinrückbildungsquote offensichtlich variabel ist.

Dank der eingehenden Untersuchungen vor allem der Heubnerschen Schule wissen wir, daß die Methämoglobinrückbildung *fermentativ* gesteuert wird. Eine wichtige Rolle spielt dabei die von KIESE u. Mitarb. entdeckte und eingehend untersuchte *Hämoglobinreduktase*.

Eine *spontane Methämoglobinbildung* ist auf das Fehlen oder Versagen der reduzierenden Fermente zurückzuführen. Da diese Fermente nach der Blutentnahme *in vitro* sowie in der Leiche noch einige Zeit wirksam sind, herrscht zunächst die Methämoglobinrückbildung vor (Abb. 1). Bei experimentellem Nitritzusatz zu menschlichem Blut *in vitro* sehen die Verhältnisse so aus, wie es die Abb. 1 zeigt. Der

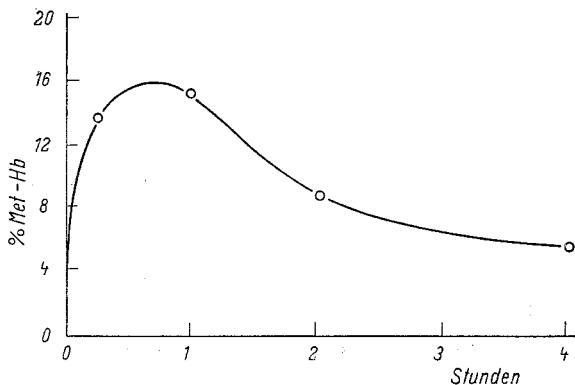


Abb. 2. Met-Hb-Bildung und -Rückbildung nach intravenöser Seifenwasserinjektion beim Kaninchen

Maximalwert war meist innerhalb der ersten Stunde erreicht, dann sank der Methämoglobininhalt stets wieder ab. Die Abbildung zeigt, daß bereits am zweiten Tag auch bei hohen Ausgangswerten die Aussichten auf einen positiven Nachweis gering sind. In vivo verläuft die Methämoglobinrückbildung (wenigstens im Tierversuch) noch wesentlich schneller (Abb. 2). Methämoglobin war nur wenige Stunden lang nachweisbar.

Um die Methämoglobinrückbildung auszuschalten, muß man also die reduzierenden Fermente hemmen. Dies gelingt in ganz einfacher Weise auf zwei Wegen: Einmal dadurch, daß man das Blut mit Wasser verdünnt. Nach der Hämolyse verlieren die Reduktionssysteme beträchtlich an Wirksamkeit (HEUBNER, ZIPF). Wir fanden allerdings erst von einem Verdünnungsgrad von 1:5 bis 1:6 an eine ausreichende Hemmung der Reduktion. Eine stärkere Verdünnung haben wir vermieden, weil uns aus Untersuchungen von ZIPF bekannt war, daß in Blutlösungen mit weniger als 2 g-% Hämoglobin die spontane Hämoglobinbildung zunehmend stark in Erscheinung tritt. Das Ausmaß der spontanen

Methämoglobinbildung in einer zur spektrophotometrischen Untersuchung meßfertigen Blutlösung (Verdünnung etwa 1:100) zeigt die Abb. 3. Auch bei primärem Vorhandensein von Methämoglobin steigt der Methämoglobingehalt an (Abb. 3, gestrichelte Linie).

Wie die Abb. 4 zeigt, gelingt es, durch Verdünnung des Blutes mit Wasser (1:6) den Methämoglobingehalt über eine Zeitspanne von 48 Std

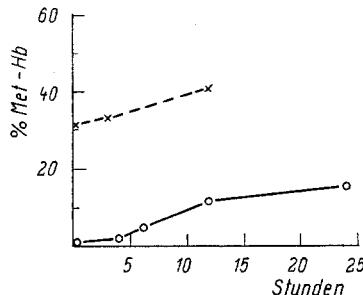


Abb. 3. Spontane Met-Hb-Bildung in wässriger Blutlösung (1:100)

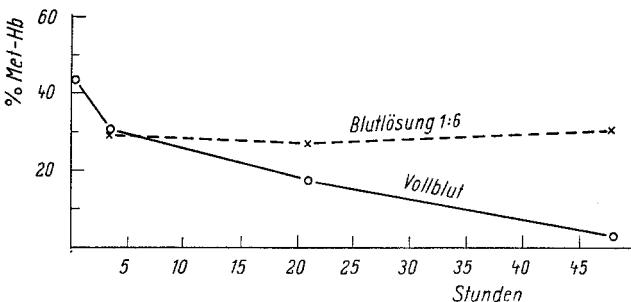


Abb. 4. Einfluß der Blutverdünnung auf die Met-Hb-Rückbildung

praktisch konstant zu halten, während er im gleichen Zeitraum im Vollblut fast auf Null sinkt.

Mit einer leichten Änderung des Methämoglobingehalts zwischen Blutentnahme und Untersuchung ist wegen der spontanen Methämoglobinbildung schon nach Stunden zu rechnen. Wenn es daher entweder um sehr exakte Werte geht oder wenn eine längere Zeitspanne bis zur Untersuchung verstreicht, dann empfiehlt es sich, das Hämolsat nach dem Vorschlag von KIESE zusätzlich mit Kohlenoxyd zu sättigen. Das intakte Hämoglobin geht dabei in das relativ widerstandsfähige CO-Hämoglobin über, während Methämoglobin kein CO aufnimmt<sup>1</sup>. Die

<sup>1</sup> Anmerkung: Nach Untersuchungen, die nach Abschluß des Manuskripts durchgeführt wurden, ist die Resistenz des CO-Hb gegen oxydative Einflüsse nicht so groß, wie bisher angenommen wurde. Falls eine längere Aufbewahrung nicht zu umgehen ist, sollte man die Blutlösung zur Einschränkung einer stärkeren Met-Hb-Bildung mit CO sättigen und kühl stellen.

Methämoglobinrückbildung kann man indessen, wie wir bei orientierenden Versuchen feststellten, allein durch CO-Sättigung überhaupt nicht bremsen. Dies gilt auch für Vollblut.

Die zweite Möglichkeit zur Verhinderung der Methämoglobinrückbildung besteht im Zusatz von Natriumfluorid zu Vollblut. Zwei Messerspitzen voll NaF (etwa 100 mg) auf ein Venüengläschen mit Blut genügen. Hierdurch erzielt man eine tagelang anhaltende Konstanz der Methämoglobinwerte (Abb. 5).

Bei unseren Tierversuchen mit Methämoglobinbildnern machten wir mit der Blutprobe eines mit Anilin vergifteten Meerschweinchens folgende interessante Beobachtung: Der Methämoglobin gehalt stieg nach dem Tode des Tieres sowohl in der mit Citrat, besonders stark aber in der mit Fluorid versetzten Probe an. Während nun im Citratblut vom 2. Tage an die Reduktionswirkung überwog und deshalb der Methämoglobin gehalt wieder absank, war durch die Ausschaltung der reduzierenden Fermentsysteme im Fluoridblut bis zum 5. Tage eine weitere Zunahme der Methämoglobinkonzentration zu verzeichnen (Abb. 6). Hier hielt also die methämoglobinbildende Anilinwirkung bzw. diejenige seiner Oxydationsprodukte Phenylhydroxylamin und Nitrosobenzol weiter an. Dieser Versuch zeigt, daß das Fluorid am Fermentsystem angreift und nicht etwa über die Bildung von Fluormethämoglobin wirksam wird. Fluormethämoglobin ist nämlich — ebenso wie das Methämoglobin selbst — leicht reduzierbar.

Auf methodische Fragen kann aus Platzmangelgründen nicht eingegangen werden. Wir wandten vor allem die Quotientenmethode von HEILMEYER an, für die wir neue Eichkurven mit dem Zeißschen Spektralphotometer ausgearbeitet haben, die wir in einer weiteren Mitteilung veröffentlichen werden. Wenn CO-Hämoglobin im Blut enthalten ist, so empfiehlt sich die Methode von KIESE, bei der aus der Veränderung der Licht-Absorption einer mit CO gesättigten Blutprobe vor und nach

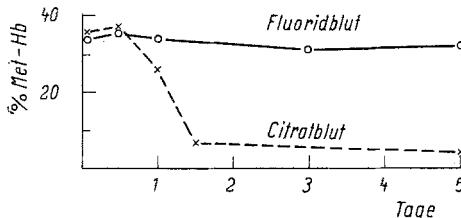


Abb. 5. Einfluß von Natriumfluorid auf die Met-Hb-Rückbildung

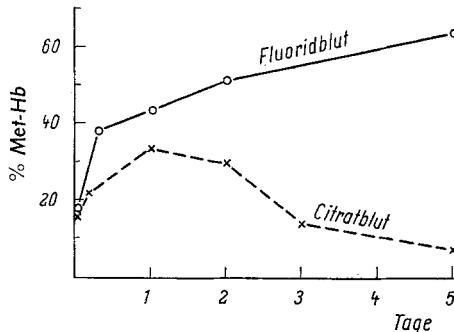


Abb. 6. Anstieg der Met-Hb-Konzentration in der Blutprobe eines anilinvergifteten Kaninchens nach Ausschaltung der reduzierenden Fermente durch Natriumfluorid. Im Citratblut überwiegt die Met-Hb-Rückbildung

Reduktion bei 568 m $\mu$  der Methämoglobinengehalt bestimmt wird. Methämoglobin wird durch Natriumdithionit zum Hämoglobin reduziert und dieses geht durch das von vorheriger Kohlenoxyddurchleitung noch vorhandene überschüssige Kohlenoxyd ins CO-Hämoglobin über.

### Zusammenfassung

Die wichtigste Fehlerquelle bei der Methämoglobin(Hämiglobin)-bestimmung ist die Methämoglobinrückbildung. Sie ist fermentativ bedingt. Durch Hämolyse und Verdünnung des Blutes mit Wasser kann die Rückbildung praktisch vollständig ausgeschaltet werden, ebenso durch Zusatz von Na-Fluorid zum Blut. Bei längerer Aufbewahrung des Blutes oder der Blutlösung stört die spontane Methämoglobinbildung. Sie kann durch CO-Sättigung eingeschränkt werden.

### Literatur

- CERNY, M.: Über Gefahren der Phenacetinmedikation im Säuglingsalter. Praxis **39**, 634 (1950).
- HEILMEYER, L.: Medizinische Spektrophotometrie. Jena 1933.
- HEUBNER, W.: Wesensart und Eigenschaften des Methämoglobins. Ergeb. Physiol. **43**, 9 (1940).
- M. KIESE, M. STUHLMANN u. W. SCHWARTZKOPF-JUNG: Der Hämoglobinengehalt normalen Blutes. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **204**, 213 (1945).
- KIESE, M.: Empfindliche photometrische Verfahren zur Bestimmung von Hämoglobin und Hämoglobin. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **204**, 190 (1947).
- C. SCHNEIDER u. H. D. WALLER: Hämoglobinreduktase. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **231**, 158 (1957).
- LAVES, W.: Über das Vorkommen und das Verhalten des Methämoglobins in der Leiche. Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. **12**, 549 (1928).
- OLLIVIER, M. H., et J. QUICKE: Contribution à l'étude des intoxications par le nitrite de sodium. III. Ann. Méd. lég. **35**, 214 (1955).
- WESTHAUS, H.: Akute Phenacetinvergiftung im Säuglingsalter. Kinderärztl. Praxis **21**, 9 (1953).
- ZIRP, H. F.: Über die Wirkung von Plasma, Serum und Mellanby-Thrombin auf die Hämoglobinbildung nach Hämolyse. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **206**, 225 (1946).

Priv.-Doz. Dr. WOLFGANG SCHWERD,  
z. Z. Institut für gerichtliche und soziale Medizin  
der Universität Würzburg