

Aus dem Gerichtsmedizinischen Institut der Universität Tokio
(Direktor: Prof. Dr. SHOKICHI UENO)

Eine Methode der Carboxyhämoglobin-Bestimmung*

Von

IKUO ISHIYAMA

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 28. August 1961)

Einleitung

Wenn man nach den üblichen Methoden (Spektrophotometrie, Stufenphotometrie, colorimetrische Methoden usw.) eine Bestimmung des Kohlenoxydhämoglobingehaltes des Blutes vornimmt, muß man mit einigen Unsicherheiten rechnen, worauf B. MUELLER¹ hingewiesen hat. In neuerer Zeit ist die Volumenanalyse unter Anwendung der Mikrodiffrusionstechnik sehr erleichtert worden; sie hat ihren Platz auch in der Gerichtsmedizin, z. B. beim Nachweis von Kohlenoxyd, Alkohol, Cyan usw. (S. UENO²). Die nachher zu schildernde Untersuchungsmethode stellt eine Modifikation der Bestimmung des Kohlenoxyd-Hämoglobins mit der Mikrodiffrusionstechnik dar; die von mir zu beschreibende Technik verspricht gute Erfolge.

Prinzip und Methodik

Die Bestimmung des CO-Hb nach meiner Methode geht wie folgt vor:

1. Bestimmung des Kohlenoxyds im Blut.
2. Bestimmung der Hb-Konzentration in demselben Blut.
3. Errechnung des Sättigungsgrades des CO-Hb nach den unten angeführten Formeln.

Zu 1. Die Mikrodiffrusion geschah nach dem Verfahren von CONWAY³. Die Bestimmung des überbleibenden Palladiumchlorids erfolgt nach dem colorimetrischen Verfahren von CHRISTIAN und RANDALL⁴.

Zu 2. Die Messung der Konzentration des Hb erfolgt nach dem colorimetrischen Verfahren von DRABKIN und AUSTIN^{5,6}.

Zu 3. Die Errechnung des Sättigungsgrades geschieht nach folgenden Grundsätzen: Das Volumen des Kohlenoxyds in 1 ml Blut, das aus der Extinktionsabnahme des Palladiumchlorids nach der Diffusion berechnet wird, ergibt sich nach der Formel (1).

$$\text{CO (ml/ml Blut)} = \frac{V_M \cdot K_{\text{Pd}}}{a} \cdot \frac{E_{\text{Pd}} - E_{\text{CO}}}{E_{\text{Pd}}} \cdot 10^{-3} \cdot 22,4 \cdot 10^3. \quad (1)$$

* Für die wertvollen Anregungen und Hinweise danke ich Herrn Prof. Dr. SHOKICHI UENO.

V_M = Verdünnung des Materials bei der Diffusion.

K_{Pd} = Konzentration des angewandten Palladiumchloridlösung (Mol/L).

a = ml von Palladiumchloridlösung bei der colorimetrischen Bestimmung.

E_{Pd} = Extinktion der angewandten Palladiumchloridlösung vor der Diffusion.

E_{CO} = Extinktion der angewandten Palladiumchloridlösung nach der Diffusion.

(Die oben dargelegte Beziehung hat zur Voraussetzung, daß die Volumina der Palladiumchloridlösung und des Blutes bei der Diffusion gleich sind.)

$$\text{Deshalb CO (ml/ml Blut)} = \frac{V_M \cdot K_{Pd}}{a} \cdot \frac{E_{Pd} - E_{CO}}{E_{Pd}} \cdot 22,4. \quad (2)$$

Die Hb-Konzentration, die nach (2) bestimmt wird, rechnet man wie folgt in Mol/ml um:

$$\text{Hb (Mol/ml)} = \frac{\text{Hb} \cdot 10}{M} \cdot 10^{-3}. \quad (3)$$

Hb = Hb-Konzentration (g/ml); M = Molekulargewicht des Hb.

Bei vollkommener Sättigung des Hb mit CO [$\text{Hb}_4 + 4 \text{ CO} = \text{Hb}_4(\text{CO})_4$] entspricht ein Molekül Hämoglobin vier Molekülen CO; deshalb ist bei 100% CO-Hb das Volumen von Co (ml/ml):

$$\text{CO}_s = \frac{\text{Hb} \cdot 10}{M} \cdot 10^{-3} \cdot 22,4 \cdot 10^3 \cdot 4. \quad (4)$$

CO_s = Volumen von CO bei vollkommener Sättigung, daraus wird die CO-Hb-Konzentration in Prozent nach folgender Formel (5) berechnet;

$$\left. \begin{aligned} \text{CO-Hb \%} &= \frac{(2)}{(4)} \cdot 100 \\ &= \frac{V_M \cdot K_{Pd}}{a} \cdot \frac{E_{Pd} - E_{CO}}{E_{Pd}} \cdot 22,4 \cdot \frac{M \cdot 100}{\text{Hb} \cdot 10 \cdot 4 \cdot 22,4} \\ &= \frac{V_M \cdot K_{Pd}}{a} \cdot \frac{E_{Pd} - E_{CO}}{E_{Pd}} \cdot \frac{M \cdot 2,5}{\text{Hb}} \end{aligned} \right\} \quad (5)$$

Das Molekulargewicht des Menschenhämoglobins beträgt 67 000, eingeführt in (5):

$$\text{CO-Hb \%} = \frac{V_M \cdot K_{Pd}}{a} \cdot \frac{E_{Pd} - E_{CO}}{E_{Pd}} \cdot \frac{167500}{\text{Hb}}. \quad (5a)$$

Resultat

1. Die Untersuchung mit der Palladiumchlorid-Bestimmung. Durch den spektroskopischen Befund von PdCl_2 -KJ-Lösung (mit Hilfe eines „recording photoelectrometer“, Cary's 11, Applied Physics Cooperation, Monrovia, California, USA) wird die Maximalextinktion bei den Wellenlängen 405 und 486 m μ festgestellt. Der Extinktionswert folgt nach dem

Beerschen Gesetz in der Konzentration von 0 bis zu 5×10^{-6} Mol/m, so daß man die Äquivalenz zwischen der Konzentration des Palladiumchlorides und dem Extinktionswert bei dem colorimetrischen Verfahren erhält.

2. Die Bestimmung des CO im Blut. Für die CO-Hb-Bestimmung wurde das Blut eines 2jährigen

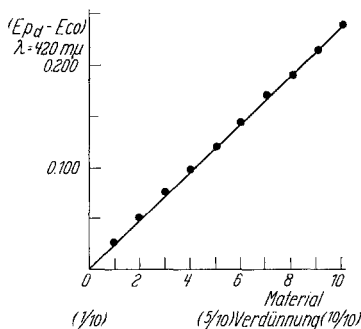


Abb. 1

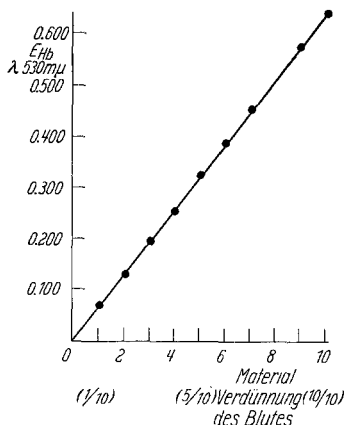


Abb. 2

Abb. 1. Die Beziehung zwischen dem CO-Gehalt und Extinktionsabnahme ($E_{Pd} - E_{CO}$) nach der Mikrodiffusion. (Die genauen Daten werden in der Tabelle gezeigt.) Abszisse: Extinktionsabnahme nach der Mikrodiffusion ($E_{Pd} - E_{CO}$). Ordinate: Material (das stufenweise verdünnte Blut von der CO-Vergiftung). 1. Bedingung von Mikrodiffusion. Mikrodiffusionsgefäß: Conwaysche Standardzelle Nr. 1. Innere Kammer: 2 ml von 1/400 M. $PdCl_2$ in 1/1000 M. HCl und etwa 1/20 M. $MgCl_2$. Äußere Kammer: 2 ml vom Material, das bei der Mikrodiffusion 8fach mit Wasser verdünnt wurde. Diffusionszeit nach dem Zusatz von 5 N- H_2SO_4 (0,5 ml); 2. Std. Temperatur bei der Diffusion; Zimmertemperatur (etwa 20°C). 2. Die colorimetrische Bestimmung von überbleibendem $PdCl_2$. Die folgende Mischlösung wird colorimetrisch gemessen. 1 ml $PdCl_2$ -Lösung aus der inneren Kammer. 5 ml 15 %iger KJ-Lösung (bei der Anwendung hergestellt). 20 ml von destilliertem Wasser. Die Farbenentwicklung ist sehr stabil. Die Dicke der Cuvette: 1 cm. Die Wellenlänge

$$\text{des Filters: } \lambda = 420 \text{ m}\mu. \quad V_M = 8, \quad K_{Pd} = \frac{1}{400}, \quad a = 1$$

Abb. 2. Die colorimetrische Bestimmung des Cyan-Met-Hämoglobins. Die angewandten Lösungen sind folgende: 1. Das Material (das stufenweise verdünnte Blut). 2. Die Lösung, bei der Kalium ferricyanatum (0,7 g) und Cyankali (0,1 g) mit dem Wasser bis 1 Liter aufgelöst werden. (Die Lösung wird in der braunen Flasche aufbewahrt.) Nach der Mischung der beiden Lösungen (1. 1 ml, 2. 199 ml, deshalb $V_{Hb} = 200 \times$) wird sie zentrifugiert. (Zeit: 10 min, etwa 2000 g.) Die zentrifugierte Oberschicht wird colorimetrisch gemessen. Die Farbenentwicklung ist sehr stabil. Die Dicke der Cuvette: 1 cm. Die Wellenlänge der Filter: $\lambda = 530 \text{ m}\mu$

Mädchens benutzt, das an Kohlenoxydvergiftung starb. Die Volumenanalyse von CO im stufenweise verdünnten Blut (Material) zeigt, daß die Diffusion des CO aus dem CO-Hb (Diffusion: 2 Std bei Zimmertemperatur nach Zusatz von Säure) ausreichend ist (Abb. 1).

Obwohl 1 ml einer 1/400 M. $PdCl_2$ -Lösung das Kohlenoxyd, das in 1 ml von 4fach verdünntem Blut von 100% CO-Hb enthalten ist, vollkommen oxydieren kann, tritt ein ausgeprägtes Hindernis bei der Diffusion wegen der zu dicken Bedeckung durch den Palladiumspiegel auf der oberen Fläche der inneren Kammer auf. Es ist empfehlenswert, die

Hinweise von CONWAY³ über die Verdünnung des Blutes bei der Diffusion zu berücksichtigen. Die Linearität, die man bei der Diffusion des 4fach verdünnten Blutes (1 ml gegen 1 ml) erhalten kann, liegt im Bereich von 60—70% CO-Hb-Sättigung. Deshalb ist es bei der Bestimmung vom hochprozentigen CO-Hb (über 60%) — diese Konzentration wird häufig bei der Begutachtung von den CO-Vergiftungen angetroffen — zweckmäßig, die Diffusion mit 8facher Blutverdünnung ausführen zu lassen.

3. Colorimetrische Bestimmung der Hämoglobin-Konzentration. Wie man in Abb. 2 sieht, wird die Konzentration des Hb ganz einfach durch das colorimetrische Verfahren gemessen. Eine Beeinflussung durch das CO-Hb bei der Hb-Bestimmung wird nicht bemerkt. Ferner wird die postmortale Veränderung des Hb gegen die Extinktion berücksichtigt. Beim Stehenlassen des frischen Menschenblutes im Brutschrank (24 Std bei 37°C) steigert sich die Extinktion um etwa 3%. Die Steigerung wird durch genügende Zentrifugierung einigermaßen herabgesetzt.

Die Beziehung zwischen der Hb-Konzentration und der Extinktion ergibt sich nach folgender Formel:

$$\text{Hb} = E_{\text{Hb}} \cdot V_{\text{Hb}} \cdot A. \quad (6)$$

Hb = Konzentration des Hämoglobins (g/dl).

E_{Hb} = Extinktion des Cyan-Met-Hb bei der Hb-Bestimmung.

V_{Hb} = Verdünnungsgrad des Blutes bei der Hb-Bestimmung.

A = Multiplikator (0,145⁷ beim Japaner).

Ins Hb von Formel (5) wird (6) eingeführt:

$$\text{CO-Hb \%} = \frac{V_M \cdot K_{\text{Pd}}}{a} \cdot \frac{E_{\text{Pd}} - E_{\text{CO}}}{E_{\text{Pd}}} \cdot 167500 \cdot \frac{1}{0,145 \cdot E_{\text{Hb}} \cdot V_{\text{Hb}}}. \quad (7)$$

4. Die Konzentration des CO im Serum bei der CO-Vergiftung. Um den CO-Gehalt im Serum zu bestimmen, wird das Serum einer Ratte

Tabelle. CO- und CO-Hb%, die nach den Formeln (2) und (7) gerechnet werden.

Alle Ziffern, ausschließlich den CO- und CO-Hb-%, sind die praktisch gemessenen Werte.

Mate- rial	Verdün- nung des Blutes	E_{CO}	$E_{\text{Pd}} - E_{\text{CO}}$	CO- %	E_{Hb}	CO- Hb %
Nr. 0	(0/10)	0,680	0,000	0,00	0,000	0,0
Nr. 1	(1/10)	0,655	0,025	1,65	0,068	62,5
Nr. 2	(2/10)	0,630	0,050	3,30	0,130	65,4
Nr. 3	(3/10)	0,605	0,075	4,95	0,195	65,4
Nr. 4	(4/10)	0,582	0,098	6,50	0,254	65,6
Nr. 5	(5/10)	0,560	0,120	7,92	0,325	62,8
Nr. 6	(6/10)	0,537	0,143	9,40	0,390	62,3
Nr. 7	(7/10)	0,510	0,170	11,22	0,452	63,9
Nr. 8	(8/10)	0,490	0,190	12,54	0,510	63,3
Nr. 9	(9/10)	0,465	0,215	14,19	0,589	62,1
Nr. 10	(10/10)	0,440	0,240	15,84	0,640	63,8

$$V_M = 8, K_{\text{Pd}} = 1/400, a = 1, V_{\text{Hb}} = 200$$

in Formeln (2) und (7).

$$\text{Hb-CO \%} = 115,5 \cdot \frac{E_{\text{Pd}} - E_{\text{oe}}}{E_{\text{Pd}}} \cdot \frac{1}{E_{\text{Hb}}}.$$

angewandt, die durch perakute CO-Vergiftung getötet wurde. Das Serum-CO beträgt unter 0,1 %, so daß man bei der praktischen Anwendung das Vollblut als Material benutzen kann.

5. Die Berechnung der CO-Hb. Die Tabelle umfaßt die ausführlichen Daten der Abb. 1 und 2. Die Abweichungen der errechneten CO-Hb-Prozente im stufenweise verdünnten Material beruht bestimmt auf ungenauer Pippetierung und auf Ablesedifferenzen beim colorimetrischen Verfahren.

Besprechung

Die Unsicherheit der CO-Hb-Bestimmung läßt sich durch die exakten Volumenanalysen des Kohlenoxyds vermeiden, das man durch das colorimetrische Verfahren ohne mühsame Technik einfach bestimmen kann. Die Methode des CO-Hb-Prozentsatzes bei der Anwendung der Mikrodiffrusionstechnik wird auch berücksichtigt. Die Methode von CONWAY³, die auf dem Prozentsatz des Kohlenoxyds in 1 ml Blut beruht, ergibt manchmal Nachteile: so ist z. B. der Sättigungsgrad bei Anämiker immer niedriger als beim normalen Menschen, wenn bei beiden die CO-Hb-Prozentwerte gleich sind. Weiterhin, was praktisch noch wichtiger ist, ergibt das Blut, das in der Leiche lange Zeit stillsteht und deshalb eine etwaige Hämokonzentration zeigt, einen wahrscheinlich zu hohen CO-Hb-Prozentsatz. Um diesen Einfluß zu vermeiden, ist es zweckmäßig, den CO-Gehalt im Blut mit dem darin enthaltenen Hb zu bestimmen. Aus diesem Grunde kann man mit Berechtigung sagen, daß meine Methode, die den Sättigungsgrad des Hb im Zusammenhang mit dem vollkommenen Bindungsvermögen desselben Hb mit CO berücksichtigt, einen exakten Befund ergibt. Bei Tierexperimenten ist es angebracht, wenn man das genaue Molekulargewicht des eigenen Hb und den Multiplikator A bei der Bestimmung der Hb-Konzentration einführt. Für den Gebrauch in der gerichtsmmedizinischen Vergiftungslehre ist es ausreichend, mit dem obenerwähnten Verfahren zu messen. Es ist auch möglich, die kleinere Zelle anstatt der Diffusionszelle Nr. 1 von CONWAY zu verwenden, so daß man die feineren CO-Hb-Prozentgehalte feststellen kann.

Zusammenfassung

Eine modifizierte Methode des Carboxyhämoglobins mit der Anwendung von Mikrodiffrusionstechnik wurde beschrieben.

Literatur

- ¹ MUELLER, B.: Gerichtliche Medizin. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1953.
- ² UENO, S.: Shin-hoigaku. [Japanisch.] (Neue Gerichtliche Medizin.) Tokio: Nanzandō-Verlag 1958.
- ³ CONWAY, E. J.: Mikrodiffrusion analysis and volumetric error. London: Crosby Lockwood & Son 1950.

- ⁴ CHRISTIAN, E. L., and E. L. RANDALL: A convenient and accurate method for the determination and detection of carbon monoxide in blood. *J. biol. Chem.* **102**, 595—609 (1933).
- ⁵ DRABKIN, D. L., and J. H. AUSTIN: Spectrophotometric studies. II. Preparations from washing blood cells; nitric oxide hemoglobin and sulphemoglobin. *J. biol. Chem.* **112**, 51—65 (1935/36).
- ⁶ AUSTIN, J. H., and D. L. DRABKIN: Spectrophotometric studies. III. Metohemoglobin. *J. biol. Chem.* **112**, 67—88 (1935/36).
- ⁷ YANAGISAWA, F.: Die praktische Anwendung der elektrischen Photometrie. [Japanisch.] Tokio: Kyōritsu-shuppan-Verlag 1955.

Dr. IKUO ISHIYAMA,
Gerichtsmedizinisches Institut der Universität Tokio (Japan),
Hongo, Bunkyo-Ku