

Zur Bestimmung des Carbonylhämoglobins im Leichenblut

JIŘÍ ERBEN

Institut für gerichtliche Medizin der Karls-Universität in Prag
(Vorstand: Doz. Dr. JAROMÍR TESAŘ, Dr. Sc.)

Eingegangen am 8. Januar 1966

Zu den häufigsten Intoxikationen gehört die Vergiftung mit Kohlenmonoxid, das infolge seiner größeren Affinität zum Hämoglobin Sauerstoff aus der Oxyhämoglobinbindung verdrängt und eine weitaus festere Verbindung bildet — das Carbonylhämoglobin; dadurch wird die Übertragung von Sauerstoff ins Gewebe verhindert und der Tod durch Ersticken herbeigeführt. Obwohl bei diesen tödlichen Vergiftungen der Sektionsbefund in der Regel charakteristisch ist (DALGAARD), muß man ihn in einem jeden Falle nicht nur durch den Nachweis von Carbonylhämoglobin belegen, sondern auch dessen Menge bestimmen.

Der Nachweis von Carbonylhämoglobin wird meistens mit einer der Farbreaktionen direkt im Blut, z. B. mit Tannin, Formaldehyd, Protargol, Zephisol, Ajatin-Lösungen usw. (LAVES, MASSMANN, TESAŘ) oder spektroskopisch erbracht. Bei Farbveränderungen des Bluts kann für den Nachweis und die semiquantitative Bestimmung das Prinzip der chromometrischen Gasanalyse mit Hilfe von Detektionsröhren, die zur Feststellung von Kohlenmonoxid in der Luft dienen, mit Erfolg angewendet werden (SACHS, DRÖGEMEIER; SHEPHERD u. Mitarb.); Kohlenmonoxid wird aus der Carbonylhämoglobinbindung durch Ferricyanid oder verdünnte Schwefelsäure freigesetzt und durch die Prüfröhren geführt, die z. B. mit Palladiumsilicomolybdanat oder Palladiumchlorid, Jodpentoxid (SACHS) u. ä. gefüllt sind. Die durch Reduktion verursachte Farbveränderung der Füllung zeigt die Anwesenheit von Kohlenoxid an, dessen Menge durch Vergleich mit einer Standardskala (SACHS) oder photoelektrisch (COLE u. Mitarb.) annähernd bestimmt werden kann.

Zur Bestimmung des Carbonylhämoglobin gehalts wurde eine Reihe verschiedener Methoden ausgearbeitet, von denen vor allem die klassische gasometrische Methode nach VAN SLYKE zur Bestimmung auch geringfügiger Mengen im Blut erwähnt werden soll, die verschieden modifiziert wurde (VAN SLYKE u. Mitarb.; GANSLER u. Mitarb.); sodann die colorimetrischen bzw. photometrischen Methoden, die überwiegend auf der Reduktion von Palladiumsalzen (BURIANEC, BURIÁNOVÁ; VIGNOLI u. Mitarb.) oder Silbersalzen (KATZ u. Mitarb.) durch Kohlenmonoxid zu Metall beruhen. Dasselbe Prinzip verwendete BERKA nicht nur zur colorimetrischen Bestimmung von Carbonylhämoglobin im mikrodiffrusen Modifi-

kation, sondern auch zur polarographischen Bestimmung. Eine der am häufigsten angewandten Methoden ist die photometrische Methode nach WOLFF, bei der im isoelektrischen Punkt aus der hämolierten Blutlösung Hämoglobin und Oxyhämoglobin ausgefällt werden und im Filtrat das Carbonylhämoglobin bestimmt wird. Die Entfaltung der spektrophotometrischen Methoden brachte auch die Publikation verschiedener Kohlenmonoxidbestimmungen im Blut mit sich, die auf dem Vergleich von Absorptionsspektren beruhen (ENDRES u. Mitarb.; SELLIER), z. B. einer Hämoglobin-, Oxyhämoglobin- und Carbonylhämoglobinlösung, oder nach Zusatz von Natriumdithionit bzw. Natriumhydroxid u. ä. (FRETWURST, MEINECKE). DOMINGUEZ u. Mitarb. bestimmen den Gehalt an Carbonylhämoglobin gaschromatographisch. Verhältnismäßig wenig wird die spektroskopische Methode zur Bestimmung der Carbonylhämoglobinkonzentration angewendet (HARRISON), obgleich diese Weise der Bestimmung gerade für gerichtsmedizinische Praxis besonders geeignet ist, wie im weiteren ausgeführt werden wird.

Die spektroskopische Methode beruht auf folgendem Prinzip: Eine Oxyhämoglobin enthaltende hämolierte Blutlösung zeigt im Spektrum zwei Absorptionsbänder im gelben und grünen Gebiet zwischen den Fraunhoferschen Linien D und E. Carbonylhämoglobinhaltiges Blut zeigt im Spektrum gleichfalls zwei Absorptionsbänder, die jedoch gegen den violetten Teil des Spektrums verschoben sind. Enthält die Lösung gleichzeitig Oxyhämoglobin und Carbonylhämoglobin, ist die resultierende Position der Absorptionsbänder vom gegenseitigen Verhältnis dieser Stoffe abhängig; dieser Umstand wird bei der quantitativen Bestimmung des Carbonylhämoglobins mit Hilfe des Hartridge-Reversionsspektroskops ausgenützt.

Die meisten Autoren bestimmen den Carbonylhämoglobingehalt in der Volumeneinheit ohne Rücksicht auf den prozentualen Hämoglobingehalt. Diese Weise ist jedoch nicht richtig, worauf bereits ISHIYAMA hingewiesen hat, denn der Hämoglobingehalt ist im Hinblick auf die biologische Variabilität nicht konstant. Er ist nicht nur vom Geschlecht und Alter der untersuchten Person, sondern auch vom Allgemeinzustand des Organismus abhängig. Bei pathologischen Zuständen, z. B. bei Anämie, bei kachektischen Personen u. ä. ist der Hämoglobingehalt im Blut wesentlich geringer, hingegen kommt es nach dem Tode und bei frischen Verbrennungen zu einer Eindickung des Bluts, und der Hämoglobingehalt pflegt hier erhöht zu sein. Ist jedoch das Leichenblut zum Teil faulig, ist der Hämoglobingehalt vermindert. Wenn man also den Gehalt an Carbonylhämoglobin in der Volumeneinheit bestimmt, begibt man einen Fehler, der um so größer ist, je größer der Unterschied zwischen dem tatsächlichen und dem durchschnittlichen Hämoglobingehalt ist. Daher schlugen BARTHazard und MELISSINOS vor, anstelle des prozentualen Carbonylhämoglobingehalts den sog. Vergiftungskoeffizienten einzuführen, d. h. das Verhältnis des festgestellten Carbonylhämoglobingehalts zur Gesamthämoglobinkonzentration, der das Maß der Anoxie ausdrücken soll.

Die Bestimmung des Hämoglobins im Leichenblut ist jedoch im Hinblick auf die postmortalen biochemischen Veränderungen (ABETA; BERG), die auch den Farbton des Bluts beeinflussen, nicht einfach. Es

ist daher nicht zweckmäßig, für diesen Fall colorimetrische Methoden anzuwenden (SAHLI, BÜRKER, Cyanmethämoglobinmethode u. ä.); nicht einmal aus der Eisenmenge kann in solchen Fällen der Hämoglobin gehalt ermittelt werden, da nach der Zersetzung des Hämoglobinmoleküls das Eisen, als sein anorganischer Teil in unveränderter Menge im Blut erhalten bleibt.

Zur Beseitigung der angeführten Nachteile wird in dieser Arbeit vorgeschlagen, das festgestellte Niveau der Kohlenmonoxidsättigung des Bluts immer auf eine bestimmte Hämoglobinmenge zu beziehen, d. h. auf Standardblut, das in 100 ml 16 g Hämoglobin enthält, denn nur unter diesen Umständen ist es möglich, den Grad der Vergiftung zu beurteilen und die Befunde in den einzelnen Fällen zu vergleichen. Für diesen Zweck erweist sich die spektroskopische Methode mit Hilfe des Hart ridge-Reversionsspektroskops als geeignet. Für die quantitative Bewertung wird eine Kalibrationskurve angefertigt, zu der Standardblut benutzt wird; die Bestimmung der Carbonylhämoglobinkapazität des untersuchten Bluts, d. h. die völlige Sättigung mit Kohlenmonoxid (100% Carbonylhämoglobin), ermöglicht es, die untersuchte Carbonylhämoglobinkonzentration auf einen konstanten Hämoglobin gehalt zu beziehen, ohne Rücksicht auf den tatsächlichen Gesamt gehalt von Hämoglobin im untersuchten Blut; dabei wird eine verschiebbare Wellenlängenskala im Diagramm der Kalibrationskurve verwendet. Auf diese Weise ist es möglich, den Gehalt an Carbonylhämoglobin auch in zum Teil putridischem Blut zu bestimmen.

Methodik

Apparatur: das Reversionsspektroskop nach HARTRIDGE (Hersteller: R. & J. Beck, London).

Der Apparat für die Bestimmung der Carbonylhämoglobinkonzentration im Blut ist so konstruiert, daß das Strahlenbündel einer Wolframdrahtbirne zunächst die Blutlösung, dann den Kondensor passiert und auf einen Spalt fällt. Vom Spalt geht der eine Teil der Lichtstrahlen durch ein planparalleles Prisma, das die Richtung der Strahlen praktisch nicht ändert, der andere Teil durch ein anderes Prisma, das nicht nur das Strahlenbündel seitwärts biegt, sondern auch symmetrisch entlang der einen Prismenwand umdreht. Dadurch wird erzielt, daß beide Strahlenbündel, die aus den Prismen auf ein Dispersionsgitter fallen, im Blickfeld des Okulars zwei Spektren übereinander bilden, von denen das untere beweglich und das obere mit umgekehrter Reihenfolge der Farben praktisch fixiert ist.

Die Messung wird in einem verdunkelten Raum folgendermaßen vorgenommen: durch Drehen eines optischen Prismensystems mit Hilfe einer Trommel mit Mikrometerschraube wird das bewegliche Spektrum so eingestellt, daß die Absorptionsbänder α und α' in Koinzidenz sind

(s. Abb. 1). Die entsprechenden Wellenlängen werden an der Skala der Mikrometerschraube abgelesen. Jede Messung wird mindestens fünfmal durchgeführt und aus den Ergebnissen der arithmetische Durchschnitt errechnet.

Chemikalien: Sauerstoff. Kohlenmonoxid — wird durch Einwirken konzentrierter Schwefelsäure auf Ameisensäure hergestellt (H. GUÉRIN). Ammoniak 0,6%.

Anfertigung der Kalibrationskurve: Frisches Blut, auf den Standardgehalt an Hämoglobin, d.h. 16 g Hämoglobin in 100 ml Blut zubereitet, wird mit 0,6%iger Ammoniaklösung (1 + 150) verdünnt; der eine Teil der Lösung wird mit Sauerstoff gesättigt, damit sich das Blut des Kohlenmonoxids entledigt (0% COHb), der andere Teil wird mit Kohlenmonoxid gesättigt (100% COHb). Die Sättigung geht so vor sich, daß 30 min lang Gas in die Lösung in einem geschlossenen Gefäß eingeführt wird, wobei die Lösung auf dem elektromagnetischen Mischgerät gemischt wird. Die Messung dieser Standardlösungen in 1 cm-Cuvetten ergibt die Werte für 0 und 100% Carboxyhämoglobin; durch zweckentsprechende Kombination der Standardlösungen, die in 0,5 cm-Cuvetten hintereinander untergebracht werden, erhält man die Werte für 25,50 und 75% Carboxyhämoglobin (s. Tabelle). Aus den erhaltenen Wellenlängenwerten wird in ein Koordinatensystem die Kalibrationskurve eingezeichnet, auf der Ordinate werden die Prozente Carboxyhämoglobin aufgetragen, auf der Abszisse die Wellenlängen. Das Diagramm wird oben mit einer beweglichen Wellenlängenskala versehen, mittels der man nach Messung der untersuchten Blutprobe

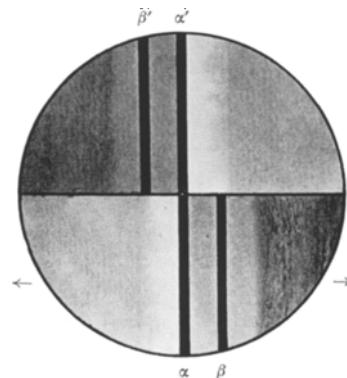


Abb. 1. Blickfeld des Okulars: die Position der Absorptionsbänder beim Ablesen

Tabelle. Die Herstellung der Lösungen für die Anfertigung der Kalibrationskurve

% COHb	Cuvette A		Cuvette B	
	ml Blutlösung (1 + 150) mit CO gesättigt	ml 0,6% NH ₄ OH	ml Blutlösung (1 + 150) mit O ₂ gesättigt	ml 0,6% NH ₄ OH
0	—	—	5	—
25	1	3	3	1
50	2	2	2	2
75	3	1	1	3
100	5	—	—	—

durch Interpolation das Resultat erhält, das auf Standardblut ohne Berücksichtigung des tatsächlichen Hämoglobin gehalts bezogen ist (s. Abb. 2).

Zur Bestimmung des Carbonylhämoglobin in dem zu untersuchenden Blut wird mit Ammoniaklösung verdünnt (1 + 150) und die Lösung in zwei Teile geteilt. Ein Teil wird unter den bereits angeführten Bedin-

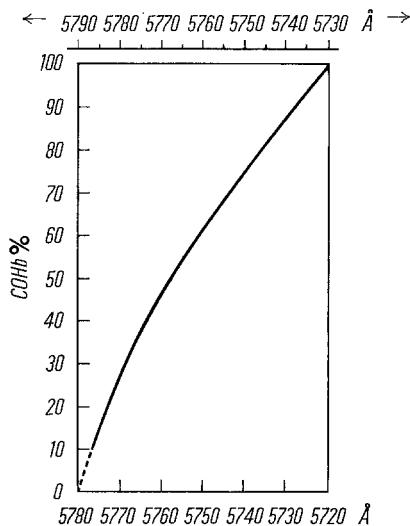


Abb. 2. Kalibrationskurve von Carbonylhämoglobin

gungen mit Kohlenmonoxid gesättigt und gemessen (100% COHb). Auf diese Weise wird die Carbonylhämoglobinkapazität des untersuchten Bluts bestimmt und der entsprechende Wellenlängenwert wird an der verschiebbaren Skala so eingestellt, daß er der 100%igen Sättigung im Diagramm entspricht. Unterscheidet sich die ermittelte Wellenlänge der Carbonylhämoglobinkapazität um mehr als 25% von der der Carbonylhämoglobinkapazität des Standardbluts, wird eine konzentriertere oder verdünntere Blutlösung hergestellt, z. B. wird 1,25 ml Blut von geringem Hämoglobin gehalt mit der Ammoniaklösung auf 150 ml aufgefüllt.

Dann wird die Wellenlänge der Lösung des untersuchten Blutes bestimmt und aus der Kalibrationskurve durch Interpolation mittels der verschiebbaren Wellenlängenskala die Konzentration der Kohlenmonoxidsättigung festgestellt, die solchermaßen auf den Standardhämoglobin gehalt, das ist 16 g Hämoglobin in 100 ml Blut, bezogen ist.

Zusammenfassung

Bei der vorgeschlagenen Methodik mit dem Reversionsspektroskop nach HARTRIDGE ist es möglich, im Leichenblut, das auch teilweise faul

sein kann, den Grad der Sättigung mit Kohlenmonoxid mit einer Genauigkeit von etwa 10% spezifisch zu bestimmen. Die vollständige Sättigung eines Teiles des zu untersuchenden Blutes mit Kohlenmonoxid ermöglicht die Kohlenoxidhämoglobinkapazität zu bestimmen und den betreffenden Wert der Wellenlänge auf der verschiebbaren Skala des Eichdiagramms so anzusetzen, daß er der 100%igen Sättigung an Kohlenoxidhämoglobin entspricht. Nach der Messung der untersuchten Blutprobe bestimmt man durch Interpolation mittels der verschiebbaren Skala der Wellenlängen den Gehalt der Sättigung mit Kohlenmonoxid, und zwar korrigiert auf den Standardgehalt an Hämoglobin mit 16 g in 100 ml Blut. Unter diesen Bedingungen ist es möglich, den Grad der Vergiftung zu beurteilen und auch die Ergebnisse aus anderen Fällen zu vergleichen, selbst wenn die Blutprobe teilweise putrid ist oder wenn der Hämoglobin gehalt durch bestimmte pathologische Zustände quantitativ verändert war. Die Messung ist spezifisch und leicht und schnell durchführbar. Sie hat sich in der Praxis bewährt, und die erhaltenen Ergebnisse sind in guter Übereinstimmung mit den Sektionsbefunden.

Summary

The autor is recommending a technique of estimation of carbon monoxide in cadaverons blood — even partly putrid — with Hartridge reversion spectroscope with the accuracy of 10% COHb or more, which is acceptable in forensic cases. A small part of the blood sample is saturated with carbon monoxide and the so called carboxyhemoglobine capacity is obtained, the aspective wave length is corrected on a movable scale of the graph in such a way that it corresponds to a 100% saturated COHb. After the investigated blood sample is being measured the percentage carbon monoxide saturation is extrapolated on a movable wavelength scale, corrected to a standard content of hemoglobin (16 grams of hemoglobin in 100 ml of blood); it should be noted that the degree of the intoxication may be estimated and the results of different cases may be correlated only when the blood hemoglobin is corrected to the value of 16 grams in 100 ml of blood. Then the measurement is precise even in such cases, in which blood is partly putrefied or if the hemoglobin content is altered due the various pathologic process. The measurement is specific and easy and quickly to be made. It has a practical value, it proved true in the practise very often and the obtained results are up to the necropsy findings.

Literatur

- ABETA, T.: Studies on the fluid blood in the cadaver. Jap. J. Leg. Med. **12**, 554 (1958). Ref. Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. **43**, 177 (1954).
- BANGSGAARD, A., and J. B. DALGAARD: New simple carbon monoxide detector. Acta path. mikrobiol. scand. Suppl. **154**, 357 (1962).

- BARTHAZARD et MÉLISSINOS: L'intoxication oxycarbonée valeur du coefficient d'empoisonnement. Ann. Méd. lég. **14**, 1 (1934).
- BERG, S. P.: Das postmortale Verhalten des Blutes. Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. **40**, 1 (1950).
- BERKA, I.: The mikro-method for the estimation of carbon monoxide in blood. Acta med. scand. **152**, 485 (1955).
- BURIANEC, Z., u. J. BURIANOVÁ: Neue Methode zur Kohlenmonoxydbestimmung. Collection Czechoslov. Chem. Commun. **28**, 2895 (1963).
- COLE, J. W., J. SALISBURY, and J. H. JOE: Photoelectric detection and estimation of carbon monoxide with granules coates with palladous silicomolybdate. Anal. chim. Acta **2**, 115 (1948).
- DALGAARD, J. B.: Post mortem findings in carbon monoxide deaths. Acta path. mikrobiol. scand., Suppl. **154**, 186 (1962).
- DOMINGUEZ, A. M., H. E. CHRISTENSEN, L. R. GOLDBAUM, and V. A. STEMBRIDGE: A sensitive procedure for determining carbon monoxide in blood or tissue utilizing gas-solid chromatography. Toxicol. appl. Pharmacol. **1**, 135 (1959).
- ENDRES, P., R. MANZ u. H. J. WULFF: Zur Methodik spektralphotometrischer COHb-Bestimmungen. Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. **54**, 320 (1963).
- FRETWURST, F., u. K. H. MEINECKE: Eine neue Methode zur quantitativen Bestimmung des Kohlenoxydhämoglobins im Blut. Arch. Toxikol. **17**, 273 (1959).
- GAESNLER, E. A., J. B. CADIGAN, M. F. ELLICOT, R. H. JONES, and A. MARKS: A new method for rapid precise determination of carbon monoxide in blood. J. Lab. clin. Med. **49**, 945 (1957).
- GUÉRIN: Traité de manipulation et d'analyse des gas. Paris: Masson & Cie. 1952.
- HARRISON, G. A.: Chemical methods in clinical medicine. London: J. & A. Churchill, Lim. 1957.
- ISHIYAMA, I.: Eine Methode der Carbonalhämoglobin-Bestimmung. Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. **53**, 12 (1962).
- KATZ, M., R. RIBERDY, and G. A. GRANT: The oxidation of carbon monoxide by solid silver permanganate reagents. Canad. J. Chem. **34**, 1719 (1956).
- LAVES, W.: Kohlenoxydhämoglobin-Nachweis mit Hilfe oberflächenaktiver Verbindungen. Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. **45**, 532 (1956).
- MASSMANN, W.: Einige qualitative Kohlenoxydbestimmungen im Blut. Dtsch. med. Wschr. **79**, 1140 (1954).
- SACHS, V.: Der Kohlenoxydnachweis mit den Mitteln der chromometrischen Gasanalyse. Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. **45**, 68 (1956).
- Eine einfache Methode zur schnellen Bestimmung des Kohlenoxydgehaltes im Blut. Dräger-Hefte **235**, 5142 (1959).
- , u. D. DRÖGEMEIER: Chromometrische Kohlenoxydbestimmungen in faulem Blut. Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. **51**, 627 (1961).
- SELLIER, K.: Der Nachweis kleinster CO-Mengen in Körperflüssigkeiten. Köln u. Opladen: Westdeutscher Verlag 1958.
- SHEPHERD, M.: Rapid determination of small amounts of carbon monoxide. Anal. Chem. **19**, 77 (1947).
- S. SCHUHMAN, and K. V. KILDAY: Determination of carbon monoxide in air pollution studies. Anal. Chem. **27**, 380 (1955).
- SLYKE, D. D. VAN, A. HILLER, J. R. WEISINGER, and W. O. CRUZ: Determination of carbon monoxide in blood and of total and active hemoglobin and methemoglobin contents of normal human blood. J. biol. Chem. **166**, 121 (1946).
- , and H. A. SALVESSEN: The determination of carbon monoxide in blood. J. biol. Chem. **40**, 103 (1919).

TESAŘ, J.: Důkaz kysličníku uhelnatého v krvi Ajatinem. Prakt. Lék. (Praha) **38**, 177 (1958).

VIGNOLI, L., B. CRISTAN, J. P. DEFRETEIN et R. VIGNOLI: Microdosage photocolorimétrique de l'oxyde de carbon dans le sang par le chlorure de palladium et réactif phosphomolybdotungstique de Folin et Ciocalteu. Arch. Mal. prof. **21**, 432 (1960).

WOLFF, E.: En enkel och känslig metod för pavisande av sma mängder koloxid i blod. Svenska Läk.-Tidn. **9**, 492 (1941).

Dr. Jiří ERBEN

Institut für gerichtliche Medizin der Karls-Universität
Prag 2, Studničkova 2