

This article was downloaded by:

On: 19 January 2011

Access details: Access Details: Free Access

Publisher Taylor & Francis

Informa Ltd Registered in England and Wales Registered Number: 1072954 Registered office: Mortimer House, 37-41 Mortimer Street, London W1T 3JH, UK



International Journal of Environmental Analytical Chemistry

Publication details, including instructions for authors and subscription information:

<http://www.informaworld.com/smpp/title~content=t713640455>

Die Bestimmung von Met-Hamoglobin im menschlichen Blut

W. Pilz^a; I. Johann^a; A. T. Boo^a

^a Aus dem Institut für Klinische Chemie und Analytische, Chemie der Ärztlichen Abteilung der Farbenfabriken, Leverkusen-Bayerwerk, Deutschland

To cite this Article Pilz, W. , Johann, I. and Boo, A. T.(1973) 'Die Bestimmung von Met-Hamoglobin im menschlichen Blut', International Journal of Environmental Analytical Chemistry, 2: 3, 179 — 201

To link to this Article: DOI: 10.1080/03067317308076387

URL: <http://dx.doi.org/10.1080/03067317308076387>

PLEASE SCROLL DOWN FOR ARTICLE

Full terms and conditions of use: <http://www.informaworld.com/terms-and-conditions-of-access.pdf>

This article may be used for research, teaching and private study purposes. Any substantial or systematic reproduction, re-distribution, re-selling, loan or sub-licensing, systematic supply or distribution in any form to anyone is expressly forbidden.

The publisher does not give any warranty express or implied or make any representation that the contents will be complete or accurate or up to date. The accuracy of any instructions, formulae and drug doses should be independently verified with primary sources. The publisher shall not be liable for any loss, actions, claims, proceedings, demand or costs or damages whatsoever or howsoever caused arising directly or indirectly in connection with or arising out of the use of this material.

Die Bestimmung von Met-Hämoglobin im menschlichen Blut

W. PILZ, I. JOHANN, und A. T. BOO

*Aus dem Institut für Klinische Chemie und Analytische,
Chemie der Ärztlichen Abteilung der Farbenfabriken,
Bayer AG, Leverkusen-Bayerwerk, Deutschland*

(Received June 1, 1972)

KEY WORDS: Met-Hämoglobin, Blut.

The cyanide and carbon monoxide methods for the quantitative determination of Met-hemoglobin in human blood are evaluated critically and assessed as to their suitability for routine analysis.

The CO method is cumbersome and requires about 120 min for one analysis, with an error up to $\pm 7.5\%$. The cyanide method requires about 30 min and can yield an accuracy of $\pm 2.0\%$ under routine analysis conditions. This method as modified by the authors is capable of an accuracy of $\pm 0.3\%$, with an analysis time of 30 min.

Zur quantitativen Bestimmung der Konzentration von Met-Hb im menschlichen Blut werden die Cyanidmethode und die Kohlenmonoxydmethode experimentell nachgeprüft, die Ergebnisse verglichen und auf ihre Verwendbarkeit als Routinemethode in der klinischen Chemie untersucht.

Die Kohlenmonoxydmethode ist umständlich (Herstellung von reinem CO!) und benötigt einen Zeitaufwand von ca. 120 Min. Im Routinebetrieb fanden wir Fehler bis zu $\pm 7,5\%$ Met-Hb.

Die Cyanidmethode benötigt einen Zeitaufwand von ca. 30 Min. und erreicht unter Bedingungen des Routinebetriebes eine Genauigkeit von $\pm 2,0\%$ Met-Hb. Diese Methode wurde von uns modifiziert und erreicht jetzt bei einem Zeitaufwand von ca. 30 Min. eine Genauigkeit von max. $\pm 0,3\%$. Sie wird daher als Standardmethode für die klinische Chemie empfohlen.

1. ALLGEMEINES

Met-Hb entsteht durch Oxydation des zweiwertigen Eisens zum dreiwertigen Eisen im Häm des Hämoglobins.¹ Durch den Übergang des Eisens in die dreiwertige Form (Bildung von Hämoglobin = Met-Hb) geht die Fähigkeit

zur reversiblen Gasbindung (insbesondere zum Transport von O_2 und CO_2) verloren.

Zur Darstellung von Met-Hb gibt es folgende Möglichkeiten:

1. Einfluß von Oxydationsmitteln.
2. Einbringen von gasförmigem Sauerstoff.
3. Autoxydation.

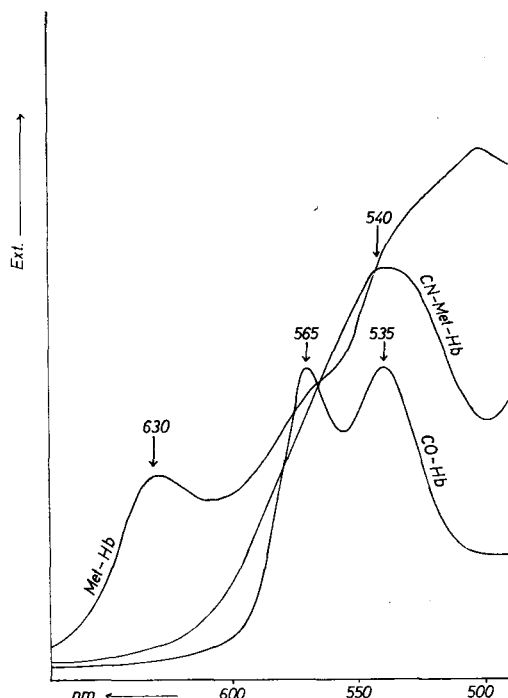


ABBILDUNG 1 Spektrum von saurem Met-Hb, pH 6,8
 Spektrum von Cyan-Met-Hb
 Spektrum von CO-Hb

Die sicherste und rascheste Überführung von Hb in Met-Hb wird durch Umsatz mit Kaliumhexacyanoferrat-(III) erreicht.

Die Verwendung von Nitrit zur Herstellung von Met-Hb-Lösungen ist nicht zu empfehlen, weil durch einen Überschuß an Nitrit aus dem primär gebildeten Met-Hb ein zweites Hämoglobinderivat, das Nitrit-Met-Hb, entsteht.² Met-Hb ist im sauren pH-Bereich grau-braun, im alkalischen rot-braun gefärbt. Der durch die pH-Verschiebung bedingten Farbänderung entspricht eine Veränderung des Spektrums. Die charakteristische Absorptionsbande des sauren Met-Hb liegt bei 630 nm (Abb.1). Durch Zusatz von

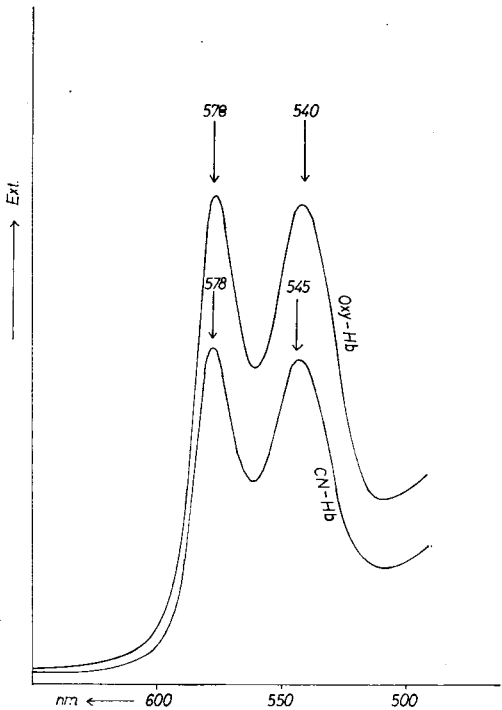


ABBILDUNG 2 Spektrum von Oxy-Hb
 Spektrum von Cyan-Hb

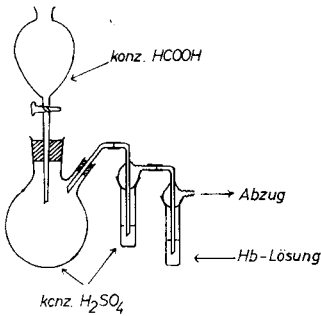


ABBILDUNG 3 Apparat zur Bereitung von reinem Kohlenmonoxyd.

Cyanid bildet sich aus Met-Hb das Cyan-Met-Hb, welches bei 630 nm fast nicht absorbiert (Abb. 1). Auch andere Hb-Derivate, wie z.B. CO-Hämoglobin (Abb. 1), Oxyhämoglobin (Abb. 2) sowie Cyan-Hämoglobin (Abb. 2) absorbieren bei 630 nm nicht.

Met-Hb ist in kleinen Konzentrationen ein physiologischer Bestandteil des Blutes. Wie hoch die physiologische Konzentration von Met-Hb ist, steht derzeit zur Diskussion. Die Normalwerte liegen nach Heubner *et al.*³ und Betke⁴ unter 1% Met-Hb. Höhere Werte von Met-Hb sind entweder auf Einwirkung von exogenen Noxen oder auf eine Störung des Reduktionssystems in den Erythrocyten zurückzuführen.² Das erste ist bei Vergiftung mit Met-Hb-Bildnern (z.B. Kaliumchlorat, Nitrite, Nitrose-Gase, aromatische Nitro- und Aminverbindungen) der Fall, das zweite z.B. bei familiärer Met-Hämoglobinämie. Die Erythrocyten bleiben bei reiner Met-Hämoglobinämie intakt. Patienten mit höherem Met-Hb Gehalt (ab etwa 10% Met-Hb) weisen eine grau getönte Cyanose auf, die auf die dunkle Farbe des Met-Hb zurückzuführen ist. Das Vorhandensein von Met-Hb bedeutet nicht nur einen Ausfall von funktionsfähigem Blutfarbstoff, sondern erschwert auch den Sauerstofftransport durch das noch intakte Hämoglobin (Hawlett-Effekt).

Bis zu 30% Met-Hb (bei familiärer Met-Hämoglobinämie bis zu 50%) können ohne schwere Symptome vertragen werden. Kopfschmerzen, Tachikardi und Kurzatmigkeit sind die wesentlichsten Folgen einer Met-Hämoglobinämie. Dazu kommt aber noch bei Vergiftungen die jeweilige toxische oder pharmakologische Wirkung der aufgenommenen Noxen.⁵ Die tödliche Met-Hb-Konzentration dürfte oberhalb von 70–80% Met-Hb liegen (bezogen auf das Gesamt-Hb)⁶.

Zur quantitativen Bestimmung von Met-Hb im menschlichen Blut wurden verschiedene Methoden angegeben. Nach eingehendem Studium der Literatur entschlossen wir uns, die älteren halbquantitativen Verfahren nicht zu berücksichtigen, weil zwei quantitative, als modern zu bezeichnende Methoden bekannt sind, zu deren Ausführung allerdings ein gutes Spektralphotometer notwendig ist (Filtergeräte genügen nicht). Es handelt sich um die auf Evelyn und Malloy⁷ zurückgehende und später von mehreren Autoren (vgl. Kap. 2) modifizierte Cyanidmethode, sowie die von Kiese⁸ angegebene und ebenfalls später modifizierte Kohlenmonoxydmethode (vgl. Kap. 3). Beide Methoden wurden nachgearbeitet, kritisch geprüft und im Hinblick auf ihre Verwendbarkeit in der klinischen Chemie miteinander verglichen. Dabei erbrachte die Cyanidmethode besser reproduzierbare Resultate.

Die Cyanidmethode war jedoch wegen ihrer manchmal ungenauen Aussagen, insbesondere im Bereich niedriger Met-Hb-Konzentrationen mit einer Fehlerbreite von $\pm 2\%$ noch immer zu ungenau (vgl. insbesondere die Diskussion über die physiologische Konzentration von Met-Hb bei

Gesunden). Wir haben deshalb die Cyanidmethode weiter modifiziert und erreichen jetzt unter Routinebedingungen eine Genauigkeit von $\pm 0,3\%$ Met-Hb (vgl. Kap. 5).

2. DIE BESTIMMUNG VON MET-Hb NACH DER CYANIDMETHODE

Diese Methode wurde zuerst von Evelyn und Malloy⁷ angegeben und von Havemann *et al.*,⁹ Leahy und Smith,¹⁰ Fleisch¹¹ und anderen modifiziert. Eine sehr praktische Arbeitsvorschrift stammt von Marti.¹²

A. Prinzip der Methode

Met-Hb besitzt in neutraler bis leicht saurer Lösung bei 630 nm eine charakteristische Absorptionsbande, die durch Zugabe von Cyanid fast vollkommen verschwindet (Umwandlung von Met-Hb in Cyan-Met-Hb). Die Änderung der Lichtdurchlässigkeit ist der Met-Hb-Konzentration direkt proportional.

Die Extinktion des Hämolysates (Probe) wird bei 630 nm gemessen (Absorptionsbande von Met-Hb) anschließend wird allfälliges Met-Hb in Cyan-Met-Hb überführt, das bei 630 nm praktisch nicht absorbiert. Zur quantitativen Bestimmung der Met-Hb-Konzentration der Probe sind Bezugsmessungen desselben Hämolysates als 100% Met-Hb [Zusatz von Kaliumhexacyanoferrat-(III)] und als 100% Cyan-Met-Hb [Zusatz von Kaliumhexacyanoferrat-(III) und Kaliumcyanid] erforderlich.

B. Arbeitsvorschrift (entsprechend l.c.¹²)

a. Reagenzien und Lösungen

- i Phosphatpuffer: 1M, pH 6,8 (Stammpuffer); (vor Gebrauch im Verhältnis 1:10 verdünnen): 36,4 g KH_2PO_4 und 45,24 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ werden in Wasser gelöst und zu 500 ml aufgefüllt.
- ii $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ -Lösung: 5%ige Lösung in 0,5%iger Na_2CO_3 -Lösung.
- iii KCN-Lösung: 5%ige wäßrige Lösung.

b. Arbeitsweise

0,2 ml frisches Vollblut (Fingerbeere) werden mit etwa 10 ml 0,9% iger NaCl-Lösung geschüttelt und zentrifugiert; der Überstand wird möglichst vollständig abgezogen (Spritze) und verworfen. Die so gewaschenen Erythrocyten werden durch Zugabe von 6,0 ml Wasser hämolysiert und mit Luft kräftig durchgeschüttelt, wodurch eventuell vorhandenes Hämoglobin in Oxyhämoglobin überführt wird. Dem Hämolysat setzt man 4,0 ml 0,1M Phosphatpuffer pH 6,8 (Stammpuffer 1:10 verdünnt) zu. Die Stromata werden durch Zentrifugieren (15 Min. bei 3000 g) sedimentiert. Mit dem

überstehenden Hämolysat (=Probe) werden zwei Küvetten von 5 mm Schichtdicke gefüllt. Die erste Küvette bleibt ohne Zusatz und wird als Probe 1 bezeichnet. Die 2. Küvette (Probe 2) wird mit einem Tropfen 5%iger Kaliumhexacyanoferrat-(III)-Lösung versetzt und 10 Min. bei Zimmertemperatur stehen gelassen. (Umwandlung von Hb in Met-Hb.) Die Proben 1 und 2 werden bei 630 nm gegen einen Leerwert (4 ml Phosphatpuffer 0,1 M, mit 6 ml Wasser verdünnt) wie folgt gemessen:

Messung 1: Probe 1 (x% Met-Hb).

Messung 2: Probe 2 (100% Met-Hb).

Messung 3: Probe 1 + 1 Tr. 5%ige KCN-Lösung (allfälliges Met-Hb wird zu Cyan-Met-Hb umgesetzt).

Messung 4: Probe 2 + 1 Tr. 5%ige KCN-Lösung (100% Cyan-Met-Hb).

Man erhält vier Extinktionswerte entsprechend den Messungen 1–4. Stimmen die Meßwerte 1 und 3 überein, ist kein Met-Hb nachweisbar. Zur quantitativen Berechnung werden folgende Extinktionsdifferenzen gebildet: $E_1 - E_3$ ist die Extinktionsdifferenz, die durch die Umwandlung von vorhandenem Met-Hb in Cyan-Met-Hb hervorgerufen wird. Diese Differenz ist der Met-Hb-Konzentration direkt proportional. $E_2 - E_4$ ist die Extinktionsdifferenz, die durch die Umwandlung von 100%igem Met-Hb in 100%iges CN-Met-Hb entsteht. Aus den beiden Extinktionsdifferenzen $E_1 - E_3$ und $E_2 - E_4$ kann somit durch folgende Formel die Met-Hb-Konzentration in der Probe quantitativ berechnet werden.

$$\frac{E_1 - E_3}{E_2 - E_4} \cdot 100 = \% \text{ Met-Hb} \quad 1$$

Zum besseren Überblick wird die Arbeitsweise schematisch dargestellt. Das Hämolysat wird in zwei Küvetten von 5 mm Schichtdicke gefüllt. Der weitere Fortgang der Arbeitsweise ist in Tab. I wiedergegeben.

C. Nachprüfung der Methode

a. Absorptionsspektren

Die Absorptionsspektren von Met-Hb, Cyan-Met-Hb, Oxy-Hb und Cyan-Hb wurden vermessen und sind in den Abb. 1, und 2 wiedergegeben. Die Lage der Absorptionsmaxima stimmt mit den Angaben der neueren Literatur überein. Geringfügige Abweichungen (zwischen 2 und 4 nm) sind vermutlich auf die Genauigkeit des verwendeten Photometers (Unicam SP 1800 B) zurückzuführen. Die zur Vermessung gelangenden Lösungen wurden

TABELLE I
Schematische Darstellung der Arbeitsweise^a

Küvette	Messung Nr.	Zusätze	Küvetteninhalt	Resultat Ext. $\frac{630}{5}$
1	1	keine	(x % Met-Hb)	E_1
2	2	1 Tropfen	$K_3[Fe(CN)_6]$ (Messung nach 10 Min.) (100 % Met-Hb)	E_2
1	3	1 Tropfen	KCN (Met-Hb \rightarrow CN-Met-Hb)	E_3
2	4	1 Tropfen	KCN (100 % CN-Met-Hb)	E_4

^a Berechnung siehe Formel I.

nach Kap. 2Bb hergestellt, jedoch hatten nicht alle Lösungen die gleiche Hb-Konzentration. Es zeigt sich, daß saures Met-Hb bei 630 nm ein ausgeprägtes Absorptions-maximum besitzt, während alle anderen Hb-Derivate bei dieser Wellenlänge fast nicht absorbieren. Bei den in Frage kommenden Konzentrationen beträgt die Absorption praktisch Null. Außerdem wird durch die Art der Berechnung (Differenzbildung zwischen den Extinktionen E_1 und E_3 bzw. E_2 und E_4) diese minimale Absorption der anderen Hb-Derivate mathematisch eliminiert.

b. Messung von Hb-Lösungen bekannter Konzentration

Zur Durchführung dieser Versuche wurde ein Hämolysat (analog 2 Bb) wie folgt hergestellt: 0,5 ml gewaschene Erythrocyten wurden mit 15 ml aqua dest. hämolysiert und 10 ml 0,1 m Phosphatpuffer pH 6,8 zugesetzt. Nach dem Sedimentieren der Stromata wurde das Hämolysat auf 4 Zentrifugenröhrchen verteilt und folgende Hämoglobin-Derivate hergestellt. (Zur Berechnung des theoretischen Prozentgehaltes an Met-Hb wurde vorausgesetzt, daß das verwendete Blut frei von Met-Hb war. Es stammte von einer 16-jährigen gesunden Patientin.)

Hb-Lösung 1: Ohne Zusatz (100 % Oxy-Hb).

Hb-Lösung 2: Zusatz von Kaliumhexacyanoferrat-(III) (100 % Met-Hb).
Messung nach 10 Min.

Hb-Lösung 3: Zusatz von Kaliumcyanid (100 % Cyan-Hb bzw. 0 % Cyan-Met-Hb).

Hb-Lösung 4: Zusatz von Kaliumhexacyanoferrat-(III) und Kaliumcyanid.
(100 % Cyan-Met-Hb).

Zur Herstellung von Met-Hb-Lösungen bekannter Konzentration wurden die Lösungen getrennt in verschiedene Küvetten bekannter Schichtdicke gefüllt und die Küvetten hintereinander geschaltet. Die Lösungen dürfen nicht miteinander vermischt werden, weil die zugesetzten Reagenzien in unkontrollierbarer Weise weiter reagieren. So simuliert man durch Hintereinanderschaltung z.B. einer 5 mm Küvette mit Oxy-Hb-Lösung und einer 5 mm Küvette mit Met-Hb-Lösung eine 50%ige Met-Hb-Lösung. Durch Kombination einer 5 mm Küvette mit Oxy-Hb-Lösung und einer 1 mm Küvette mit Met-Hb-Lösung simuliert man z.B. eine 16,7%ige Met-Hb-Lösung.

Diese Küvettenkombinationen wurden gegen Phosphatpuffer (als Leerwert) in Küvetten mit analogen Schichtdickenkombinationen bei 630 nm gemessen. Aus den erhaltenen Extinktionswerten der durch diese Simulation

TABELLE II
Resultate der Nachprüfung der Cyanidmethode von Marti¹²

Met-Hb-gegeben (simuliert)(%)	Met-Hb gefunden (%)	Abweichung (% Met-Hb)
100	95,6	-4,4
0	3,2	+3,2
50	53,5	+3,5
16,7	14,2	-2,5
28,6	32,2	+3,2
71,5	75,1	+4,0
83,5	77,6	-6,1

hergestellten Met-Hb-Lösungen bekannten Gehaltes (Messung E_1 , vgl. Tab. I) und der aus den gleichen Met-Hb-Lösungen erhaltenen Cyan-Met-Hb-Lösungen (entsprechend Messung 3 vgl. Tab. I) wurde die Differenz $E_1 - E_3$ gebildet. In analoger Weise wurde aus den Messungen E_2 (100% Met-Hb) und E_4 (100% Cyan-Met-Hb vgl. Tab. I) die Differenz $E_2 - E_4$ gebildet. Sämtliche Meßwerte wurden auf eine Schichtdicke von 10 mm umgerechnet. Daraus ergibt sich aus Formel 1 der prozentuale Gehalt der experimentell gefundenen und der durch Rechnung ermittelten Met-Hb-Konzentration der Probe.

Fehler im Bereich von $\pm 0,5\%$ sind auf Meßungenauigkeiten, insbesondere auf Streulichteefekte an den hintereinander geschalteten Küvettenfenstern zurückzuführen. Für die praktische Durchführung der Met-Hb-Bestimmung nach dieser Methode fallen die durch Streulichteefekte ($\pm 0,5\%$ Met-Hb) verursachten Fehler zwar weg, doch ist der experimentelle Fehler noch zu groß, weshalb wir die Methode modifiziert haben (vgl. Kap. 5). Die einzelnen Werte sind in Tab. II wiedergegeben.

Bei dieser Methode ist besonders auffällig, daß im Bereich von sehr kleinen Met-Hb-Konzentrationen Überwerte, bei sehr hohen Met-Hb-Konzentrationen dagegen Unterwerte gefunden werden. Die Abweichungen sind relativ groß und bewegen sich in einer Größenordnung von 3–4% Met-Hb. Da Überwerte, die besonders bei geringen Met-Hb-Konzentrationen auftreten, eine Methämoglobinämie vortäuschen können (besonders bei der Diagnose entstehender Met-Hämoglobinämien durch exogene Noxen), war die Genauigkeit der Methode für uns nicht ausreichend. Wir überprüften deshalb die Kohlenmonoxydmethode, um festzustellen, ob dabei die Fehlergrenze kleiner ist.

3. DIE BESTIMMUNG VON MET-Hb NACH DER KOHLENMONOXYDMETHODE

Eine andere, als zuverlässig beschriebene Methode (vgl. Marti^{1,2}) zur Bestimmung der Met-Hb-Konzentration im Vollblut ist die Kohlenmonoxydmethode, die von Kiese⁸ entwickelt und von Schwerd² modifiziert wurde.

A. Prinzip der Methode

Met-Hb reagiert nicht mit Kohlenmonoxyd zu CO-Hb,¹³ kann aber leicht zu Hb reduziert werden, das seinerseits mit Kohlenmonoxyd CO-Hb bildet. (Benutztes Absorptionsmaximum 578 nm.) Ein Met-Hb enthaltendes Hämolsat, das mit Kohlenmonoxyd gesättigt ist, zeigt nach Zugabe eines Reduktionsmittels eine Extinktionszunahme bei 578 nm, die der Met-Hb-Konzentration proportional ist. Als Parameter zur quantitativen Bestimmung dienen Hämolsate gleichen Hb-Gehaltes als 100% Met-Hb und 100% CO-Hb.

B. Arbeitsvorschrift

a. Reagenzien und Lösungen

- i Phosphatpuffer 1M pH 6,8 (Stammpuffer)
Herstellung siehe Kap. 2B. Der Stammpuffer wird vor dem Gebrauch im Verhältnis 1:5 mit Wasser verdünnt (=0,2 M).
- ii Natriumthionit und Kaliumhexacyanoferrat-(III) werden als feste Substanzen verwendet.
- iii Reines Kohlenmonoxyd wird aus konzentrierter Ameisensäure und konzentrierter Schwefelsäure unter Verwendung der in Abb. 3 angegebenen Apparatur gewonnen.

b. Arbeitsweise

Frisches Vollblut (0,2 ml) werden mit 15 ml Wasser hämolysiert und 5 ml Phosphatpuffer zugesetzt. Unmittelbar danach wird CO durchgeleitet, um den Sauerstoff zu entfernen und eine spontane Met-Hb-Bildung zu verhindern. (In der Praxis hat sich erwiesen, daß das Durchleiten von CO mindestens 15 Min. lang erfolgen muß, um quantitativen Umsatz zu erreichen.) Die Stromata werden durch Zentrifugieren bei 3000 g sedimentiert und zur Analyse der Überstand verwendet. Dieser wird in vier bis fünf Küvetten von 10 mm Schichtdicke gefüllt und luftdicht verschlossen. Man mißt die gefüllten Küvetten gegeneinander bei 578 nm und verwendet davon zwei möglichst extinktionsgleiche Küvetten zur Bestimmung.

Es wird eine Justierküvette (Küvette 1) benutzt und die andere mit ca. 10 mg Natriumdithionit (Küvette 2) beschickt, verschlossen, gut durchgemischt und nach ca. 1 Min. die Extinktionsdifferenz gemessen (E_1). Danach wird die Justierküvette (Küvette 1) mit ca. 5 mg Kaliumhexacyanoferrat-(III) versetzt, gut gemischt und beide Küvetten mindestens 90 Min. im Dunkeln aufbewahrt. Dann mißt man Küvette 2 gegen Küvette 1 bei 578 nm (E_2).

Das Verhältnis der Extinktionsdifferenzen zwischen der ersten Messung (E_1 = Differenz zwischen x% Met-Hb und 100% CO-Hb) und der zweiten Messung (E_2 = Differenz zwischen 100% Met-Hb und 100% CO-Hb) ist dem Met-Hb-Gehalt proportional. Der Met-Hb-Gehalt errechnet sich nach folgender Formel:

$$\frac{E_1}{E_2} \cdot 100 = \% \text{ Met-Hb} \quad 2$$

C. Nachprüfung der Methode

Frisches Vollblut (0,5 ml) wurde mit 30 ml Wasser hämolysiert und 20 ml 0,2 m Phosphatpuffer zugesetzt. Danach wurde CO eingeleitet (ca. 30 Min.) und nach dem Zentrifugieren das Hämolsat auf zwei Röhrchen verteilt.

Lösung 1: Zusatz von Natriumdithionit (100% CO-Hb).

Lösung 2: Zusatz von Kaliumhexacyanoferrat-(III) (100% Met-Hb).

Für die Prüfung wurde vorausgesetzt, daß das Blut frei von Met-Hb war. Alle Messungen erfolgten bei 578 nm. Durch Hintereinanderschalten von Küvetten bekannter Schichtdicken, die mit den beiden Lösungen gefüllt waren, simulierten wir Lösungen mit bekannten Met-Hb-Konzentrationen. Die CO-Hb-Lösung (1) wurde gegen die bekannte Mischung gemessen. Die gemessene Extinktion ist gleichzeitig die Extinktionsdifferenz zwischen 100%iger CO-Hb-Lösung und der simulierten Probe (x% Met-Hb). Diese Extinktionsdifferenz wurde auf 10 mm Schichtdicke umgerechnet und daraus

der Met-Hb-Gehalt ermittelt, wobei die 100%ige Met-Hb-Lösung als Bezugswert diene. Zur Reduktion der Met-Hb-Lösung mit Natriumdithionit und deren Umwandlung in CO-Hb durch vorhandenes CO wurde aus Gründen der Sicherheit 120 Min. im Dunkeln stehen gelassen.

Ein Teil der Ergebnisse ist in Tab. III zusammengestellt. Es ist ersichtlich, daß die gefundenen Werte mit den theoretischen nur mäßig übereinstimmen. Die Kohlenmonoxydmethode zeigt größere Abweichungen als die Cyanidmethode nach Marti.¹² Die Abweichungen werden hier nur durch methodische Fehler verursacht, während bei der Cyanidmethode die Fehler auch durch Spuren von vorhandenem Met-Hb im Blut hervorgerufen werden können.

4. DISKUSSION

Bei den geprüften Methoden ist keine genau definierte Blutmenge notwendig, da die Met-Hb-Konzentration in % angegeben wird. Bei der Cyanidmethode stören andere Hb-Derivate, z.B. CO-Hb, die durch Zusatz von Kaliumcyanid unverändert bleiben, nicht. Zur Berechnung der Met-Hb Konzentration in einem Hämolystat sind nur Bezugsmessungen desselben Hämolystates als 100% Met-Hb und 100% Cyan-Met-Hb erforderlich. Die Kritik von Schwerd² an der Cyanidmethode konnte damit widerlegt werden. Er behauptet, die Bezugswerte müßten aus der Extinktionsdifferenz zwischen einer Met-Hb freien und einer oxydierten Blutlösung gleicher Hb-Konzentration ermittelt werden. Deshalb sei diese Methode umständlicher als das Kohlenmonoxydverfahren, bei dem ohne Schwierigkeiten für jeden Einzelversuch die Bezugswerte ermittelt werden können, weil durch den Zusatz des Reduktionsmittels in einer Küvette reines CO-Hb und in der anderen nach der Oxydation reines Met-Hb vorliegt. Ein Vergleich der Resultate zeigt deutlich den Unterschied in der Genauigkeit und Sicherheit beider Methoden. Die Cyanidmethode ist genauer als die Kohlenmonoxydmethode. (Vgl. Tab. II.)

Für die Diagnose geringfügiger Methämoglobinämien und für die Klinische Chemie generell ist jedoch eine Methode zur Bestimmung von Met-Hb erforderlich, die eine Genauigkeit von mindestens $\pm 0,3\%$ Met-Hb hat. Wir stellten uns daher die Aufgabe, eine derartige Methode zu entwickeln, bzw. eine bekannte Methode zu modifizieren.

5. MODIFIKATION DER CYANIDMETHODE

Es ist verständlich, daß wir uns zunächst der Cyanidmethode zuwandten, da sie einen wesentlich geringeren Zeitaufwand benötigt (maximal 30 Min.) und außerdem das Herstellen und Einleiten von reinem Kohlenmonoxyd wegfällt. Die früher oft geübte Praxis, Leuchtgas zur Umwandlung von Hb in CO-Hb

TABELLE III
Met-Hb-Bestimmung mit der CO-Methode (Beispiele)

Schichtdicken, Kombinationen und Simulation der Meßlösungen	% Met-Hb (theoretisch)	ΔE bei benutzter Schichtdicke	ΔE auf 10 mm Schichtdicke umgerechnet	% Met-Hb gefunden	Abweichungen in % Met-Hb
5 mm (5 mm Lös. 2 + 0 mm Lös. 1) gegen 5 mm Lös. 1	100	0,481	0,962 (ΔE_2)	100	
5 mm (5 mm Lös. 1 + 0 mm Lös. 2) gegen 5 mm Lös. 1	0	0,025	0,050 (ΔE_1)	5,19	+ 5,19
10 mm (5 mm Lös. 2 + 5 mm Lös. 1) gegen 10 mm Lös. 1 (5 + 5)	50	0,530	0,530 (ΔE_1)	55,1	+ 5,1
6 mm (1 mm Lös. 2 + 5 mm Lös. 1) gegen 6 mm Lös. 1 (1 + 5)	16,7	0,060	0,100 (ΔE_1)	10,39	- 6,31
7 mm (2 mm Lös. 2 + 5 mm Lös. 1) gegen 7 mm Lös. 1 (2 + 5)	28,6	0,230	0,329 (ΔE_1)	34,2	+ 5,6
7 mm (5 mm Lös. 2 + 2 mm Lös. 1) gegen 7 mm Lös. 1 (2 + 5)	71,5	0,430	0,614 (ΔE_1)	63,8	- 7,7
6 mm (5 mm Lös. 2 + 1 mm Lös. 1) gegen 6 mm Lös. 1 (5 + 1)	83,5	0,440	0,733 (ΔE_1)	76,2	- 7,3

zu verwenden, ist heute nicht mehr durchführbar, da der größte Anteil der früher mit CO-reichem Leuchtgas gefüllten Stadtgasleitungen auf Erdgas umgestellt wurden oder werden, das nur noch einen geringen Anteil an CO enthält. Zur Durchführung der Kohlenmonoxydmethode ist daher ein stets betriebsbereiter CO-Generator unumgänglich erforderlich. Da die Kohlenmonoxydmethode außer diesen Nachteilen auch noch bei der Nachprüfung eine wesentlich kleinere Genauigkeit ergab, entschlossen wir uns, die Cyanidmethode zu modifizieren, wozu wir zunächst die Fehler dieses Verfahrens methodisch untersuchten.

A. Fehlerquellen

Ein Hauptfehler der Cyanidmethode ist die Tatsache, daß die Zugabe der Reagenzien in die Küvetten (deren Füllung außerdem nicht genau definiert ist) in "Tropfen" angegeben wird. Wir haben eine Untersuchung durchgeführt, wie hoch das Gewicht eines Tropfens unter sonst konstant gehaltenen Bedingungen (Herstellung des Tropfens stets mit derselben Pipette) sein kann. Das Tropfengewicht kann zwischen 30,2 mg und 244,2 mg schwanken.

Wir haben 10 Quarzküvetten von 5 mm Schichtdicke leer und nach Füllung mit genau 1,5 ml Hämolyt gewogen. Daraus ließ sich das Gewicht der Füllmenge errechnen. Es lag zwischen 1,4321 g und 1,6010 g. Zu unserer großen Überraschung schwankte die Extinktion des Hämolytates bei einer Schichtdicke von 5 mm (es wurde stets dasselbe Hämolyt verwendet) zwischen 0,180 und 0,260, obwohl fabrikneue und nach einem Spezialverfahren gereinigte Quarzküvetten verwendet wurden. Anschließend setzten wir aus stets derselben Blutzuckerpipette jeweils einen Tropfen Wasser zu. Das Tropfengewicht betrug auch bei genauestem Arbeiten zwischen 30,2 mg und 244,2 mg. Bei dem je mit einem Tropfen Wasser versetzten Hämolyt wurden Extinktionen zwischen 0,155 und 0,230 Extinktionseinheiten gemessen. Die durch die Verdünnung bewirkte Extinktionsabnahme in dem Kollektiv von 10 Küvetten betrug zwischen 22,42 % und 9,43 %, das Gewicht der Küvettenfüllung schwankte zwischen 17,03 % und 1,99 %. Jede einzelne Küvette war während aller Versuchsschritte und Messungen luftdicht verschlossen. Einzelheiten dieses Versuches gehen aus Tab. IV hervor.

Es war uns klar, daß die Fehler, die durch die Toleranzen in den Schichtdicken der einzelnen Küvetten (es handelte sich um Qualitätsfabrikate) gegeben waren, nicht eliminiert werden konnten. Folgende methodische Fehler können jedoch vermieden werden durch:

- i Standardisierung der Füllmenge der Küvette.
- ii Standardisierung des Tropfenvolumens.
- iii Zugabe der gleichen Anzahl Tropfen in alle Küvetten.

Aus Tab. IV ist ersichtlich, wie groß die dadurch entstehenden Fehler, insbesondere bei kleinen Met-Hb-Konzentrationen werden können.

B. Probennahme

Als Probengut hat sich am besten Citratblut (Punktion der Vena cubitalis, 2 ml 3,8% Natriumcitricum + 8 ml Vollblut) erwiesen. Bei allen anderen Arten der Probenahme, auch bei Einsatz von Vacutainern tritt in unkontrollierbarem Maß Autoxydation und Bildung von Met-Hb auf.

C. Beleganalysen

Es wurden Hämolysate enthaltend 100% Met-Hb und 100% Cyan-Met-Hb hergestellt. Durch Hintereinanderschalten von Küvetten, die Met-Hb und Cyan-Met-Hb enthielten, konnten beliebige Konzentrationen an Met-Hb simuliert werden (analog der Prüfung der Kohlenmonoxydmethode, vgl. Kap. 3). Dabei stellte sich heraus, daß bei Beachtung der in Kap. 6 wiederzugebenden Arbeitsvorschrift (bzw. analogem Vorgehen) die Fehlergrenze bei $\pm 0,3\%$ Met-Hb liegt. Einige Beispiele aus diesen Untersuchungen sind in Tab. V wiedergegeben. Dabei wurde die Extinktionsdifferenz $E_2 - E_4$ für alle anderen simulierten Schichtdicken analog beibehalten (es handelte sich stets um dieselben Küvetten mit demselben Küvetteninhalt). Das Hämolysat zu diesen Untersuchungen wurde aus Citratblut gewonnen, die Erythrocyten wurden drei mal gewaschen. Die gewaschenen Erythrocyten dürfen niemals unbedeckt von Flüssigkeit an der Luft stehen, da sonst durch Autoxydation Met-Hb gebildet wird.

Die Fehlergrenze von $\pm 0,3\%$ Met-Hb bei der Bestimmung von Met-Hb im Vollblut ist das Optimum des unter den gegebenen Umständen erreichbaren.

D. Anwendungsbeispiele

- i Bestimmung von zwei aus der Anamnese gesicherten, klinisch jedoch nicht diagnostizierbaren Methämoglobinämien. Die Resultate, einschließlich der Berechnung sind in den Tab. VI und VII zusammengefaßt. Beide Versuchspersonen hatten vier Tage später Met-Hb Werte unterhalb von 0,1%.
- ii Ein Beispiel einer Bestimmung von Met-Hb bei einer gewerblichen Methämoglobinämie ist in Tab. VIII wiedergegeben. Die klinische Diagnose war gesichert, es lag eine klare Anamnese vor. Alle Analysenwerte wurden aus derselben Blutprobe (Citratblut) gewonnen.

TABELLE IV

Fehler, verursacht durch nicht genau definierte Zusätze (Meßgeräte: Halbmikrowaage von Sartorius, Spektralphotometer PMQ II von Zeiss. Durchführung der Versuche siehe Text)

Versuch Nr.	Küvette ^a (leer) (g)	Küvette ^b (gefüllt) (g)	Füllung ^a (g)	Ext. 630 nm 5 mm	Füllung + 1 Tropfen ^c	Tropfen- gewicht ^a (mg)	Ext. 630 nm ^d 5 mm	-ΔE 630 nm ^e 5 mm in Ext.-Einh in %	+ Gewicht der Küvetten.- füllung ^f (%)
1	4,5186	6,1253	1,5073	0,200	1,5678	60,5	0,176	0,024	12,0
2	4,5023	6,0124	1,5101	0,180	1,5521	42,0	0,163	0,017	9,43
3	4,5956	6,1186	1,5230	0,186	1,5532	30,2	0,165	0,021	11,28
4	4,4966	6,9955	1,4989	0,260	1,5627	63,8	0,230	0,030	11,54
5	5,0106	6,5116	1,5010	0,200	1,5378	36,8	0,180	0,020	10,00
6	4,8324	6,3332	1,5008	0,215	1,5351	34,3	0,194	0,021	9,86
7	4,6293	6,2303	1,6010	0,196	1,7115	106,5	0,155	0,041	20,92
8	5,0108	6,4429	1,4321	0,223	1,6763	244,2	0,173	0,050	22,42
9	5,1126	6,6117	1,4991	0,200	1,5701	71,0	0,179	0,021	10,51
10	4,4831	5,9852	1,5021	0,190	1,5554	53,3	0,160	0,031	16,85

^a Gewicht.

^b Füllung: 1,5 ml Hämolystat nach Vorschrift (Kap. 5).

^c Wie b + 1 Tropfen Wasser (in allen Ansätzen dieselbe Blutzuckerpipette zur Tropfenerzeugung verwendet).

^d Photometrische Messung nach Durchmischen mit Kunststoffspatel.

^e Bezogen auf Extinktion derselben Küvette vor Tropfenzusatz.

^f Bezogen auf Gewicht der Küvettenfüllung vor Tropfenzusatz; alle Messungen gegen Leerwert.

TABELLE V
Met-Hb-Bestimmung mit der modifizierten Cyanidmethode (Beispiele)

Schichtdicken, Kombinationen und Simulation der Meßlösungen	Met-Hb (theoretisch)	Ext. bei be- nutzter Schichtdicke	ΔE bei benutzten Schichtdicken	ΔE auf 10 mm Schichtdicke umgerechnet	% Met-Hb Abweichungen gefunden in % Met-Hb
5 mm (0 mm Lös. 1 + 5 mm Lös. 2)	100% Met-Hb	0,348	0,267	0,534 ($E_2 - E_4$)	100
5 mm (0 mm Lös. 1 + 5 mm Lös. 4)	100% CN-Met-Hb	0,081			
5 mm (0 mm Lös. 2 + 5 mm Lös. 1)	0% Met-Hb	0,435	0,000	0,000 ($E_1 - E_3$)	0
5 mm (0 mm Lös. 4 + 5 mm Lös. 3)	0% CN-Met-Hb	0,435			
10 mm (5 mm Lös. 2 + 5 mm Lös. 1)	50,0% Met-Hb	0,405	0,268	0,268 ($E_1 - E_3$)	50,18
10 mm (5 mm Lös. 4 + 5 mm Lös. 1)	50,0% CN-Met-Hb	0,137			
6 mm (1 mm Lös. 2 + 5 mm Lös. 1)	16,7% Met-Hb	0,113	0,053	0,088 ($E_1 - E_3$)	16,47
6 mm (1 mm Lös. 4 + 5 mm Lös. 1)	16,7% CN-Met-Hb	0,060			
7 mm (2 mm Lös. 2 + 5 mm Lös. 1)	28,6% Met-Hb	0,181	0,107	0,153 ($E_1 - E_3$)	28,65
7 mm (2 mm Lös. 4 + 5 mm Lös. 1)	28,6% CN-Met-Hb	0,074			
7 mm (5 mm Lös. 2 + 2 mm Lös. 1)	71,5% Met-Hb	0,353	0,268	0,383 ($E_1 - E_3$)	71,72
7 mm (5 mm Lös. 4 + 2 mm Lös. 1)	71,5% CN-Met-Hb	0,085			
6 mm (5 mm Lös. 2 + 1 mm Lös. 1)	83,5% Met-Hb	0,345	0,268	0,446 ($E_1 - E_3$)	83,52
6 mm (5 mm Lös. 4 + 1 mm Lös. 1)	83,5% CN-Met-Hb	0,077			

TABELLE VI

Bestimmung von Met-Hb bei geringer Met-Hämoglobinämie
(aus Anamnese gesichert, klinisch nicht zu stellende Diagnose)

Bestimmung Nr.	Ext. $\frac{630 \text{ nm}}{5 \text{ mm}}$	Berechnung	Resultat (% Met-Hb)
1	E_1 0,052	$\frac{0,052 - 0,047}{0,640 - 0,116} = \frac{0,005}{0,524}$	0,953
	E_2 0,640		
	E_3 0,047		
	E_4 0,116		
2	E_1 0,052	$\frac{0,052 - 0,046}{0,650 - 0,113} = \frac{0,006}{0,537}$	1,12
	E_2 0,650		
	E_3 0,046		
	E_4 0,113		
3	E_1 0,053	$\frac{0,053 - 0,048}{0,650 - 0,114} = \frac{0,005}{0,536}$	0,934
	E_2 0,650		
	E_3 0,048		
	E_4 0,114		
4	E_1 0,052	$\frac{0,052 - 0,045}{0,665 - 0,113} = \frac{0,007}{0,552}$	1,27
	E_2 0,665		
	E_3 0,045		
	E_4 0,113		

TABELLE VII

Bestimmung von Met-Hb bei geringer Met-Hämoglobinämie
(aus Anamnese gesichert, klinisch nicht zu stellende Diagnose)

Bestimmung Nr.	Ext. $\frac{630 \text{ nm}}{5 \text{ mm}}$	Berechnung	Resultat (% Met-Hb)
1	1. 0,040	$\frac{0,040 - 0,035}{0,466 - 0,100} = \frac{0,005}{0,366}$	1,37
	2. 0,465		
	3. 0,035		
	4. 0,100		
2	1. 0,041	$\frac{0,041 - 0,035}{0,490 - 0,095} = \frac{0,006}{0,395}$	1,52
	2. 0,490		
	3. 0,035		
	4. 0,095		
3	1. 0,027	$\frac{0,027 - 0,022}{0,440 - 0,085} = \frac{0,005}{0,355}$	1,41
	2. 0,440		
	3. 0,022		
	4. 0,085		

- iii Bei unseren Bemühungen, den physiologischen Prozentsatz von Met-Hb am Gesamt-Hb beim erwachsenen Menschen festzustellen (was uns wegen der Vieldeutigkeit der Resultate nicht gelang) stießen wir auf die Tatsache, daß feuchte, gewaschene, an der Luft stehende Erythrocyten sehr rasch einer Autoxydation unterliegen. Deshalb war eine exakte Aussage über den physiologischen Prozentsatz des Met-Hb bei erwachsenen Menschen nicht zu gewinnen; er liegt sicher unter 0,5%.

Ein Beispiel des Verlaufes einer Autoxydation ist in Tab. IX wiedergegeben. Unter definierten Verhältnissen verläuft die Zunahme an Met-Hb linear mit der Zeit.

E. Vergleich der Kohlenmonoxydmethode mit der modifizierten Cyanidmethode

Wir haben nach beiden Methoden jeweils 100 Bestimmungen in Hämolysaten mit simulierten Met-Hb-Konzentrationen durchgeführt. Wir sind daher in der Lage, beide Methoden sehr gut zu beurteilen. Der Methodenvergleich ist in Tab. X dargestellt. Es ist deutlich ersichtlich, daß mit der modifizierten Cyanidmethode eine Genauigkeit von $\pm 0,3\%$ Met-Hb erreicht werden kann, der eine Fehlergrenze von $\pm 7,5\%$ Met-Hb nach der Kohlenmonoxydmethode gegenübersteht. Die Kohlenmonoxydmethode erfordert außerdem einen wesentlich größeren apparativen und zeitlichen Aufwand.

6. ZUSAMMENFASSENDE DARSTELLUNG DER ARBEITSVORSCHRIFT (MODIFIZIERTE CYANIDMETHODE)

a. Reagenzien und Lösungen

- i Phosphatpuffer: 1M, pH 6,8 (Stammpuffer), 36,4 g KH_2PO_4 + 45,24 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ werden in aqua dest. zu 500 ml gelöst. Vor der Verwendung muß der Puffer im Verhältnis 1 : 10 verdünnt werden.
- ii $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ -Lösung: 5 g $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ + 500 mg Na_2CO_3 (wasserfrei) werden zu 100 ml mit aqua dest. gelöst.
- iii Cyanidlösung: 5 g KCN werden mit Wasser zu 100 ml gelöst.
- iv Tetrachlorkohlenstoff: Es wird dringend geraten, ein analysenreines Produkt zu verwenden und es vor Gebrauch noch zweimal zu destillieren. Tetrachlorkohlenstoff (auch analysenrein) enthält oft geringe Mengen von Substanzen, die die Entstehung von Met-Hb bewirken.

TABELLE VIII

Bestimmung von Met-Hb bei einer gewerblichen Met-Hämoglobinämie (deutliche Cyanose);
klinische Diagnose gesichert; alle Analysen aus derselben Blutprobe (Citratblut)

Bestimmung Nr.	Ext.	630 nm 5 mm	Berechnung	Resultat (% Met-Hb)
1	E_1	0,179		
	E_2	0,600	$\frac{0,179 - 0,054}{0,600 - 0,112} = \frac{0,125}{0,488}$	25,6
	E_3	0,054		
	E_4	0,112		
2	E_1	0,182		
	E_2	0,585	$\frac{0,182 - 0,061}{0,585 - 0,116} = \frac{0,121}{0,469}$	25,8
	E_3	0,061		
	E_4	0,116		
3	E_1	0,184		
	E_2	0,620	$\frac{0,184 - 0,055}{0,620 - 0,112} = \frac{0,129}{0,508}$	25,4
	E_3	0,055		
	E_4	0,112		
4	E_1	0,185		
	E_2	0,630	$\frac{0,185 - 0,052}{0,630 - 0,110} = \frac{0,133}{0,520}$	25,6
	E_3	0,052		
	E_4	0,110		
5	E_1	0,180		
	E_2	0,626	$\frac{0,180 - 0,050}{0,626 - 0,114} = \frac{0,130}{0,512}$	25,4
	E_3	0,050		
	E_4	0,114		
6	E_1	0,183		
	E_2	0,611	$\frac{0,183 - 0,055}{0,611 - 0,112} = \frac{0,128}{0,499}$	25,7
	E_3	0,055		
	E_4	0,112		

TABELLE IX

Autoxydation von Hämoglobin in feuchten, frei an der
Luft stehenden Erythrocyten

Stehzeit an der Luft (Min.)	% Met-Hb
0	0,02
15	0,29
30	0,63
60	1,24
90	1,16
120	2,51
150	3,18
180	3,76

TABELLE X
Methodenvergleich: Kohlenmonoxymethode und modifizierte Cyanidmethode

	modifizierte Cyanidmethode	Kohlenmonoxymethode
Verwendete Wellenlänge	630 nm	578 nm
Photometer	Spektralphotometer wünschenswert ^a	Spektralphotometer unbedingt erforderlich
Empfohlene Blutmenge	0,2 ml gewaschene Erythrocyten aus Citratblut	0,2 ml Vollblut
Anzahl der Einzelmessungen je Bestimmung	4	3
Zeitbedarf zwischen Probenahme u. Resultat	ca. 30 Min.	ca. 120 Min.
Verwendung bzw. Herstellung von reinem Kohlenmonoxydgas ^b	nicht erforderlich	unbedingt erforderlich
Eichkurve	nicht erforderlich	nicht erforderlich
Genauigkeit im Routinebetrieb ^c	± 0,3 % Met-Hb	± 7,5 % Met-Hb
Arbeitsaufwand	gering	mittel, unangenehm

^a Bei einer geringen Einbusse an Genauigkeit (ca. ± 1,5% Met-Hb) kann mit Filterphotometern (Filter für 640 nm) gearbeitet werden.¹⁴

^b Die in älteren Arbeiten häufig empfohlene Verwendung von Leuchtgas ist unzulässig, da im Leuchtgas häufig Met-Hb bildende Verbindungen enthalten sind, die unkontrollierbare Blindwerte bis zu ca. 10% Met-Hb verursachen. Erdgas ist nicht verwendbar.

^c Mittel aus jeweils 100 Bestimmungen in Hämolyisaten mit simulierten Met-Hb-Konzentrationen.

b. Probenahme

- i Citratblut: Man entnimmt aus der Vena cubitalis Citratblut (2 ml Natriumcitricum, 3,8 %ig + 8 ml Vollblut) und schüttelt nach der Probenahme gleich um.
- ii Die Bestimmung kann auch mit Vollblut (Entnahme aus der Fingerbeere) durchgeführt werden, jedoch raten wir davon ab, da die Fingerbeere, besonders bei gewerblichen Methämoglobinämien nur sehr schwierig ganz von Met-Hb-Bildnern zu reinigen ist und die Gefahr besteht, daß eine nachträgliche Bildung von Met-Hb erfolgt.
- iii Entnahme mit Vacutainern, denen EDTA zugesetzt ist. Diese Methode ist nur durchführbar, wenn unmittelbar nach der Blutentnahme die Aufarbeitung erfolgen kann; Aufarbeitung wie bei Citratblut. Citratblut (gegebenenfalls wird aus dem mit Vacutainern entnommenen Blut Citratblut hergestellt) zentrifugiert man sofort, wäscht 1–2 mal mit der 10-fachen Menge physiol. Kochsalzlösung und zieht den Überstand so weit wie möglich ab. Die verbleibenden Erythrocyten (feuchter Rückstand) werden zur Analyse eingesetzt.

c. Bereitung des Hämolsates

0,2 ml gewaschene Erythrocyten werden in einem Zentrifugenröhrchen mit 6 ml dest. Wasser kräftig geschüttelt. Anschließend setzt man 4 ml 0,1 m Phosphatpuffer (Stammpuffer 1:10 verdünnt) und aus einem Tropfäschchen ca. 1 ml Tetrachlorkohlenstoff zu. Es wird nochmals kräftig geschüttelt und 10 Min. bei 3000 g zentrifugiert. Der Überstand muß vollkommen klar sein und darf keine Trübung mehr aufweisen.

d. Geräte

Zur exakten Bestimmung von Met-Hb im menschlichen Blut ist ein Spektralphotometer notwendig. Alle Messungen werden bei einer Wellenlänge von 630 nm durchgeführt. Man verwendet Glasküvetten von 5 mm Schichtdicke. Je nach zu erwartendem Probenanfall sucht man 15–20 Küvetten aus, die optisch zueinander passen (Füllung der Küvetten mit Wasser und Messung der Küvetten gegeneinander) (vgl. dazu die großen Abweichungen der Schichtdickentoleranzen in Tab. IV). Diese Küvetten sollten stets für die Bestimmung von Met-Hb bereitstehen und nicht für andere Zwecke verwendet werden.

e. Arbeitsweise

Je Bestimmung werden fünf Küvetten von 5 mm Schichtdicke, die optisch zueinander passen, benötigt. Der Analysengang ist in Tab. XI schematisch dargestellt.

TABELLE XI
Schematische Darstellung der Arbeitsweise der von uns modifizierten Cyanidmethode^a

Küvette Nr. (5mm Schichtdicke)	Hämolysat (ml)	Wasser (mcl)	KCN-Lösung (mcl)	K ₃ [Fe(CN) ₆] (mcl)	Wartezeit nach Reagenzienzugabe (Min.)	Ergebnis $\left(\text{Ext.} \frac{630 \text{ nm}}{5 \text{ mm}} \right)$
1	1,0	100	—	—	10	E ₂
2	1,0	50	—	50	10	E ₃
3	1,0	50	50	—	10	E ₃
4	1,0	—	50	50	10	E ₄

^a Alle Messungen gegen einen gemeinsamen Leerwert: 6 ml Wasser + 4 ml 0,1M Phosphatpuffer. Berechnung siehe Formel I.

Das Hämolysat wird in alle vier Küvetten mit derselben Volilpipette pipetiert, alle Zusätze werden mit Marburg-Pipetten dosiert; nach erfolgtem Zusatz wird mit einem Kunststoffstab gemischt.

Bemerkung:

In verschiedenen Vorschriften wird das fünf- bis sechsmalige Auswaschen der Erythrocyten verlangt. Nach unseren Erfahrungen stören kleine Mengen von Serumproteinen die Bestimmung nicht, wohl aber besteht bei zu häufigem Auswaschen die Gefahr einer Autoxydation von Hb zu Met-Hb.

Der Stammpuffer ist relativ gut haltbar, sofern er unter sterilen Bedingungen aufbewahrt wird. Im allgemeinen ist Kühlschrank temperatur vorzuziehen. Sobald sich eine geringe Trübung zeigt, meistens Bakterien, ist er zu verwerfen und zu erneuern.

Die $K_3[Fe(CN)_6]$ -Lösung ist nur etwa eine Woche haltbar; sobald sich ein Niederschlag am Boden des Gefäßes absetzt, ist sie ebenfalls zu verwerfen und zu erneuern.

Literatur

1. W. Küster, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **66**, 165 (1910).
2. W. Schwerd, Der rote Blutfarbstoff und seine wichtigsten Derivate. *Arbeitsmethoden der medizinischen und naturwissenschaftlichen Kriminalistik*, Bd. I (Max-Schmidt-Römhild, Lübeck, 1962), S. 121.
3. W. Heubner, M. Kiese, M. Stuhlmann, und W. Schwartzkopff-Jung, *Arch. Exp. Path. Pharmacol.* **204**, 313 (1945).
4. K. Betke und H. Rau, *Arch. Kinderheilk.* **145**, 195 (1952).
5. K. Plötnner und K. Betke, Pathologie des Hämoglobins und verwandter Stoffe. *Handbuch Allg. Pathologie*, Bd. IV/2 (Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1957), S. 245.
6. C. A. Finch, *N. Eng. J. Med.* **239**, 470 (1948).
7. K. A. Evelyn und H. T. Malloy, *J. Biol. Chem.* **126**, 655 (1938).
8. M. Kiese, *Arch. Exp. Path. Pharmacol.* **204**, 190 (1947).
9. R. Havemann, F. Jung, und B. V. Issekutz, jun., *Biochem. Z.* **331**, 116 (1939).
10. T. Leahy und R. Smith, *Clin. Chem.* **6**, 148 (1960).
11. H. Fleisch, *Helv. Physiol. Pharmacol. Acta* **17**, 318 (1959).
12. H. R. Marti, *Normale und anomale menschliche Hämoglobine* (Springer-Verlag, Berlin Göttingen-Heidelberg, 1963), S. 49.
13. H. Bertin-Sans und J. Moitesser, *Compt. Rend.* **113**, 210 (1891).
14. W. Pilz und Mitarbeiter, in Vorbereitung.