

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>

### Schnelldiagnose von "Kohlen-monoxidvergiftungen" und Quantitative Bestimmung von CO-Hb in Blut

W. Pilz<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Institute für Klin. Chem. und Analyt. Chem. Bayer AG, Beyerwerk West, Germany

**To cite this Article** Pilz, W.(1979) 'Schnelldiagnose von "Kohlen-monoxidvergiftungen" und Quantitative Bestimmung von CO-Hb in Blut', International Journal of Environmental Analytical Chemistry, 6: 3, 229 – 244

**To link to this Article:** DOI: 10.1080/03067317908071176

**URL:** <http://dx.doi.org/10.1080/03067317908071176>

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.

# Schnelldiagnose von "Kohlenmonoxidvergiftungen" und Quantitative Bestimmung von CO-Hb in Blut

W. PILZ†

*Institute für Klin. Chem. und Analyt. Chem. Bayer AG, D 5090 Leverkusen 1, Bayerwerk West Germany*

*(Received July 4, 1978)*

A quick diagnosis of carbon monoxide poisoning is a very difficult clinical problem. This paper describes a photometric method which permits a reliable diagnosis in a time of 7 to 10 minutes. Only 0.3 ml whole blood are necessary for the total procedure. Carboxyhemoglobin changes in absorption maximum slightly after reduction, whereas Oxyhemoglobin shows a significant change in extinction. Measurement of the hemolysate at the same wave length before and after alkaline reduction results in large differences in the extinctions (very large for Oxyhemoglobin and very small for Carboxyhemoglobin). Calibration curves are prepared by calibrating rest-extinction defined as:

$$\frac{\text{Extinction (578 nm) after reduction}}{\text{Extinction (578 nm) before reduction}} \cdot 100$$

to percent Carboxyhemoglobin. This curve can also be produced in mathematical way (as control e.g.).

In practice there are the following steps: blood collecting (from fingerpad), hemolysis, first photometric measurement, reduction, second measurement, then reading the result from the calibration curve.

The method can be automated (as demonstrated with the "Gilford System") providing the same results as with the manual method. All steps of quality control are given in full detail; as is the preparation of the hemolysates with various percentages of Carboxyhemoglobin.

**KEY WORDS:** quick diagnosis of Carbon monoxide poisoning, Carboxyhemoglobin determination, combined path-ways, one-wave-length-method, automation, preparation of hemolysates with different percents of Carboxyhemoglobin.

---

†Prof. Dr. W. Pilz, Inst. of Klin. Chem. u. Analyt. Chem., Bayer AG, D 5090 Leverkusen-1.

## 1. ZUSAMMENFASSUNG

Die Methode beruht auf der Tatsache, daß Oxihämoglobin unter definierten Umständen zu Hämochromogen reduziert wird, das ein vom Oxihämoglobin stark abweichendes Absorptionsmaximum hat, während CO-Hb nicht reduziert wird. Bei Messungen bei einer konstanten Wellenlänge von 578 nm wurde für den Ausdruck

$$\frac{\text{Ext.}_{(578 \text{ nm})} \text{ nach Reduktion}}{\text{Ext.}_{(578 \text{ nm})} \text{ vor Reduktion}} \cdot 100$$

der Ausdruck "Restextinktion" festgesetzt. Sie beträgt bei exakter Arbeitsweise für reine Oxihämoglobinlösungen 16.1 %, für 100%ige CO-Hb-Lösungen 98.5 %. Die Bestimmung der Restextinktion erfordert einen Zeitaufwand von 7 bis 10 Min. (einschließlich der Probenahme), das Resultat kann aus einer (leicht gekrümmten) Eichkurve direkt abgelesen werden. Zu einer Bestimmung sind 300  $\mu$ l Vollblut notwendig. Zweckmäßigerweise wird das Blut aus der Fingerbeere entnommen. Die Bestimmung kann jedoch auch im Zitratblut oder in mit EDTA ungerinnbar gemachtem Vollblut vorgenommen werden. Die Aufstellung der Eichkurve kann experimentell mit Hilfe von gleitenden Schichtdicken oder auf rechnerischem Wege erfolgen (völlige Übereinstimmung). Zusätzlich wird die präparative Herstellung von Hämolysaten unterschiedlichen CO-Hb-Gehaltes, wie sie für die Präzisionskontrollen und die Richtigkeitskontrollen benötigt werden, beschrieben.

Empfindlichkeit: †  $V_z = 0.3$  ml Blut

Präzision: Streubereich  $u = 9.74$  %, entsprechend einer Standardabweichung von  $s_{\text{rel}} = 4.87$  % bei  $n = 106$  Bestimmungen

Richtigkeit: Wiederfindungsrate  $r = 98$  %

Nachweisgrenze:  $X^* = 0.78$  % CO-Hb

## 2. GERÄTE, CHEMIKALIEN, LÖSUNGEN

### 2.1 Geräte

Spektralphotometer im sichtbaren Bereich mit Meßmöglichkeit bei 578 nm

2 Küvettensätze mit 1 mm, 5 mm, 10 mm, 20 mm und 50 mm

Schichtdicke

Meßkolben 25 ml und 200 ml

Erlenmeyerkolben 250 ml

†Definition siehe 18.

Tropftrichter 100 ml  
Waschflaschen 100 ml  
Strichpipette 200 ml  
Reagenzgläser 10 ml–15 ml (verschließbar)  
Stoppuhr

## 2.2 Chemikalien

Natriumdithionit  
Natronkalk  
Schwefelsäure konz. p.a.  
Ameisensäure konz.  
Ammoniak konz.  
Triton X  
Ätznatron

## 2.3 Lösungen

Ammoniaklösung 0.1 %ig  
Natronlauge 30 %ig  
5 %ige wässrige Lösung Triton X  
5 %ige Lösung von Natriumdithionit in 30 %iger Natronlauge (nur für automatische Systeme)

## 3. PROBENAHME UND PROBENAUFBEREITUNG

In einen 25 ml fassenden Meßkolben, der 10 ml Ammoniaklösung enthält, pipettiert man 0.3 ml frisches, noch nicht geronnenes Vollblut (Fingerbeere), setzt einen Tropfen 5 %iges Triton X zu und füllt mit Ammoniaklösung zur Marke auf. Man schüttelt ca. 1 Min. bis zur vollkommenen Hämolyse.

## 4. ANALYTISCHE BESTIMMUNG

Ein Teil des nach 3. erhaltenen Hämolysates wird bei 578 nm und 10 mm Schichtdicke gegen die Ammoniaklösung gemessen (Resultat = A). Anschließend werden 10 ml des Hämolysates in ein Reagenzglas pipettiert, mit einer Spatelspitze (5–10 mg) Natriumdithionit und 200 µl 30 %iger Natronlauge versetzt, verschlossen und gut durchgemischt. Man läßt 5 Min. (Stoppuhr!) bei Zimmertemperatur stehen und mißt die so erhaltene Lösung erneut bei 578 nm gegen den Reagenzienleerwert (10 ml Wasser, 200 µl Natronlauge, 1 Tropfen 5 %iges Triton X, 1 Spatelspitze Natriumdithionit) (Resultat = B).

Zum besseren Verständnis vgl. Abbildung 1 und Abbildung 2

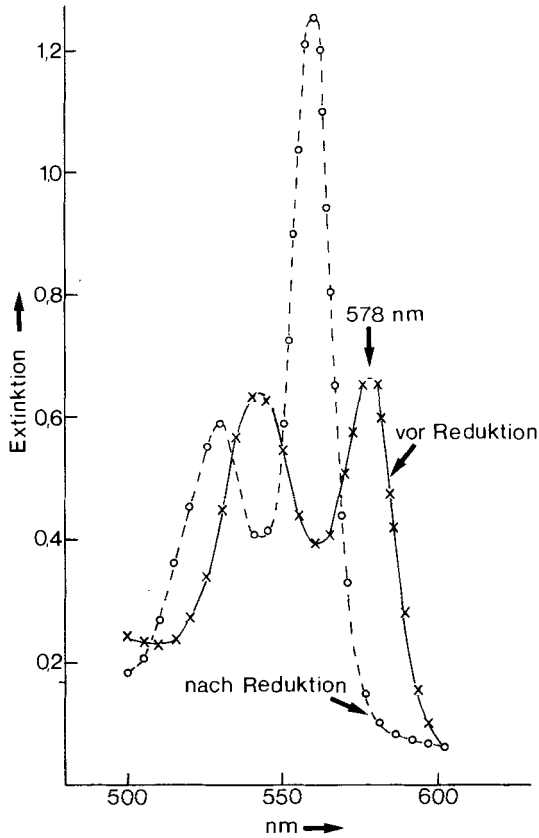


ABBILDUNG 1. Spektrum von Oxi-Hb vor und nach der Reduktion

Abzisse: Wellenlänge in nm

Ordinate: Extinktion

Zur Berechnung bildet man aus den Meßwerten  $A$  und  $B$  die Restextinktion in Prozent:

$$\frac{B}{A} \cdot 100 = \% \text{ Restextinktion}$$

Mit der Restextinktion geht man in die Eichkurve ein und liest den Prozentgehalt an CO-Hb ab.

## 5. EICHUNG

Zur Herstellung von Eichkurven werden in einen 200 ml fassenden Meßkolben, der ca. 150 ml 0.1%ige Ammoniaklösung enthält, 3.0 ml noch

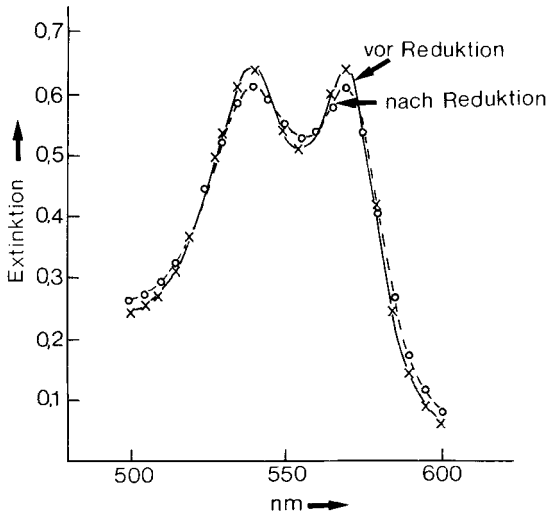


ABBILDUNG 2. Spectrum von 100% CO-Hb vor und nach der Reduktion  
 Abszisse: Wellenlänge in nm  
 Ordinate: Extinktion.

nicht geronnenes Vollblut eines Nichtraucherers hämolysiert (starkes Durchschütteln) und nach Zusatz einiger Tropfen 5%iger Triton X Lösung mit Ammoniak zur Marke aufgefüllt. Die Lösung wird in etwa gleich große Teile geteilt; in den ersten Teil der Lösung leitet man 20 Min. lang Kohlenmonoxid ein (analog Abschn. 10.2 und Figure 6), wobei Totalsättigung eintritt (das Hämoglobin liegt dann ausschließlich als CO-Hb vor).

Zuerst wird das CO-Hb-freie Hämolysat in 10 mm Küvetten bei 578 nm gegen 0.1%ige Ammoniaklösung als Leerwert gemessen (Resultat =  $V$ ). Anschließend werden 10 ml kohlenmonoxidfreien Lösung nach Abschn. 4. mit Natriumdithionit und 200  $\mu$ l 30%iger Natronlauge 5 Min. (Stoppuhr) reduziert und ebenfalls bei 578 nm gemessen (Resultat =  $X$ ). Mit der Kohlenmonoxid-Hämoglobinlösung wird in gleicher Weise verfahren (Resultate =  $Y$  und  $Z$ ).

Aus den Extinktionen  $V$  und  $X$  sowie  $Y$  und  $Z$  lassen sich, wie in Abschn. 4 beschrieben, die Restextinktionen berechnen. Die Zwischenwerte können durch "optische Mischungen" wie folgt experimentell ermittelt werden (gleitende Schichtdicken): Die Lösungen werden getrennt in verschiedene Küvetten von bekannter Schichtdicke gefüllt, die Küvetten hintereinander geschaltet ("kombinierte Schichtdicken")<sup>1</sup> und weiter wie oben beschrieben verfahren.

Die Lösungen werden deshalb nicht miteinander vermischt, weil eine Kohlenmonoxid-Hämoglobinlösung von 100% noch freies CO enthält, und dieses mit dem Oxihämoglobin reagieren würde. So wird z. B. mit einer 5 mm Küvette mit Oxihämoglobin plus einer dahinter geschalteten 5 mm Küvette mit CO-Hb eine 50%ige Kohlenmonoxid-Hämoglobinlösung simuliert. Es wird gegen 0.1%ige Ammoniaklösung mit derselben Schichtdickenkombination gemessen. Auf diese Weise können die Restextinktionen für eine Reihe von CO-Hb-Konzentrationen bestimmt werden (vgl. Tabelle I).

Zur Kontrolle der Resultate der Zwischenwerte ist es ratsam, einzelne Werte zu berechnen (möglichst zwischen 0 und 100% CO-Hb). Dazu geht man wie folgt vor: Man mißt eine Lösung von 100% Oxihämoglobin und 100% CO-Hb (Herstellung nach Abschn. 4) vor und nach der Reduktion. Man erhält folgende Werte:

100% Oxihämoglobin vor der Reduktion, Meßwert =  $V$

100% Oxihämoglobin nach der Reduktion, Meßwert =  $X$

100% CO-Hämoglobin vor der Reduktion, Meßwert =  $Y$

100% CO-Hämoglobin nach der Reduktion, Meßwert =  $Z$

Zunächst berechnet man nach der Formel

$$\frac{X}{V} \cdot 100$$

die Restextinktion für die Oxihämoglobinlösung und nach der Formel

$$\frac{Z}{Y} \cdot 100$$

die Restextinktion für die CO-Hämoglobinlösung. Bei exaktem Arbeiten findet man als Restextinktion für die Oxihämoglobinlösung  $16.1\% \pm 0.2\%$  Restextinktion; für die CO-Hb-Lösung werden  $98.0\% \pm 0.5\%$  erhalten. Die Berechnung der Zwischenwerte erfolgt analog Tabelle II. Die Rechenoperationen sind sehr einfach durchzuführen (beachte die Kürsiv gesetzten Zahlen!). Wieweit die Übereinstimmung zwischen gemessenen (Tabelle I) und berechneten Werten (Tabelle II) geht, zeigt ein Vergleich dieser Tabellen.

Eichkurven für gemessene Werte sind in Abb. 3, für berechnete Werte in Abb. 4 dargestellt. Zum besseren Vergleich beider Kurven wurden in Abb. 5 sowohl gemessene wie berechnete Werte eingezeichnet.

Es genügt, die Eichkurve nur einmal jährlich zu kontrollieren, sofern stets das gleiche Photometer und dieselben Küvettenätze verwendet werden. Abweichungen treten nur bei Änderungen im optischen und

TABELLE I  
Eichkurve aus experimentell gemessenen Werten (vgl. Figure 3 und 5).

Schichtdicke ( $a = \text{Oxi-Hb}$ ) ( $b = \text{CO-Hb}$ )	% CO-Hb	Ext. 578 nm vor Reduktion		Ext. 578 nm nach Reduktion		Rest- extinktion†
		Ext. bei benutzter Schichtdicke	Ext. umge- rechnet auf 10 mm Schicht- dicke	Ext. bei benutzter Schichtdicke	Ext. umge- rechnet auf 10 mm Schicht- dicke	
10 mm $a$	0 %	0,920	0,920	0,148	0,148	16,1 %
10 mm $b$	100 %	0,650	0,650	0,640	0,640	98,5 %
6 mm (5 mm $a + 1$ mm $b$ )	16,7 %	0,528	0,880	0,130	0,217	24,7 %
20 mm (15 mm $a + 5$ mm $b$ )	25,0 %	1,700	0,850	0,530	0,265	31,2 %
10 mm (5 mm $a + 5$ mm $b$ )	50,0 %	0,780	0,780	0,390	0,390	50,0 %
20 mm (15 mm $b + 5$ mm $a$ )	75,0 %	1,420	0,710	1,020	0,510	71,8 %
6 mm (5 mm $b + 1$ mm $a$ )	83,5 %	0,420	0,700	0,320	0,533	76,2 %

†Anmerkung: Restextinktion =  $\frac{B}{A} \cdot 100$  (vgl. Kap. 1).



TABELLE II

Berechnung der Werte für die Eichkurve zur CO-Hb-Bestimmung (vgl. Fig. 4 und 5).

% CO-Hb	578 nm Ext. vor Reduktion 10 mm	578 nm Ext. nach Reduktion 10 mm	Restextinktion
0.0 %	0.920 (V) \(\searrow\) = Extinktionsdifferenz 0.650 (Y) \(\swarrow\) 0.270 entsprechend der Differenz von 0-100% CO-Hb	0.148 (X) \(\searrow\) = 0.492 entsprechend der Differenz von 0-100% CO-Hb	16.1 % 98.5 %
16.7 %	$0.920 - \left( \frac{0.270 \cdot 16.7}{100} \right) = 0.876$	$0.148 + \left( \frac{16.7 \cdot 0.492}{100} \right) = 0.230$	26.6 %
25.0 %	$0.920 - \left( \frac{0.270 \cdot 25.0}{100} \right) = 0.853$	$0.148 + \left( \frac{25.0 \cdot 0.492}{100} \right) = 0.271$	31.8 %
50.0 %	$0.920 - \left( \frac{0.270 \cdot 50.0}{100} \right) = 0.785$	$0.148 + \left( \frac{50.0 \cdot 0.492}{100} \right) = 0.394$	50.5 %
75.0 %	$0.920 - \left( \frac{0.270 \cdot 75.0}{100} \right) = 0.718$	$0.148 + \left( \frac{75.0 \cdot 0.492}{100} \right) = 0.517$	72.2 %
83.5 %	$0.920 - \left( \frac{0.270 \cdot 83.5}{100} \right) = 0.694$	$0.148 + \left( \frac{83.5 \cdot 0.492}{100} \right) = 0.560$	80.7 %

†Anmerkung: Restextinktion =  $\frac{B}{A} \cdot 100$  (vgl. Kap. 1).

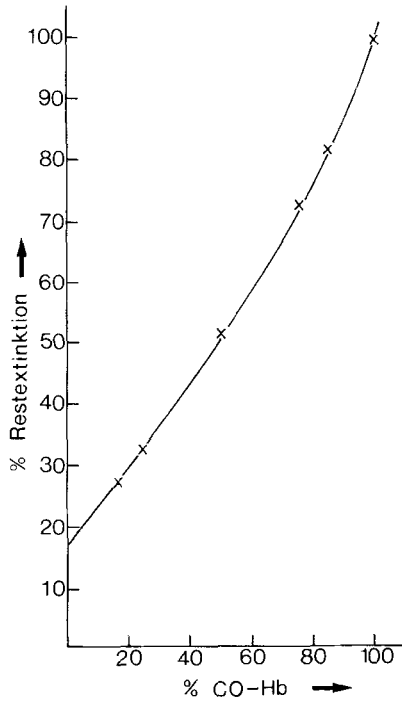


ABBILDUNG 3. Gemessene Werte für die Restextinktion

Abszisse: % CO-Hb

Ordinate: Restextinktion (%)

elektronischen Teil des Photometers auf, sowie bei Beschädigung der Küvetten (unreine Küvetten, Proteinbelag an den optischen Flächen).

Wie aus Tabelle I hervorgeht, kann man die Konzentration an CO-Hb durch die Methode der gleitenden Schichtdicken festlegen und daraus für verschiedene Konzentrationen an CO-Hb die entsprechenden Restextinktionen berechnen. Zur Erstellung der Eichkurve werden die Restextinktionen gegen den Prozentgehalt an CO-Hb aufgetragen. Die Eichkurve ist leicht gekrümmt und geht nicht durch den Koordinatenursprung.

## 6. QUALITÄTSSICHERUNG

Zur Sicherung der Qualität wird wie in den speziellen Vorbemerkungen und in den Richtlinien der Bundesärztekammer beschrieben<sup>2,3</sup> verfahren.

Zur Kontrolle der Präzision wird bei jeder Analysenserie eine Probe bekannten CO-Hb-Gehaltes mitanalysiert. Nach jeder fünften

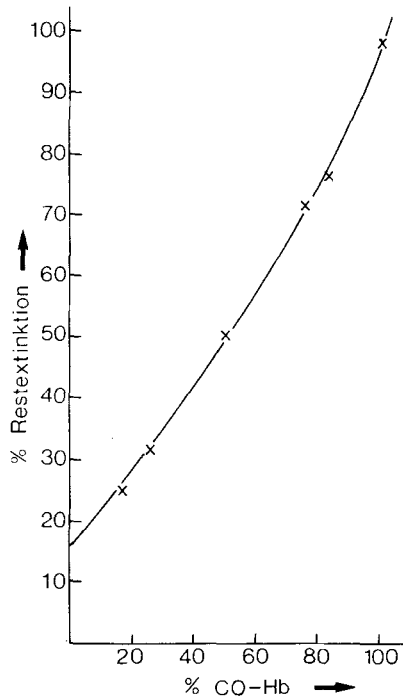


ABBILDUNG 4. Berechnete Werte für die Restextinktion

Abszisse: % CO-Hb

Ordinate: Restextinktion (%).

Analysenserie wird zusätzlich die Richtigkeit der Methode überprüft, indem man zwei Blutproben unterschiedlichen aber bekannten CO-Hb-Gehaltes mitanalysiert. Die Ergebnisse für die Richtigkeitskontrolle werden dokumentiert.

Es empfiehlt sich, die CO-Hb-Lösungen für die Präzisionskontrolle in größerem Maßstab herzustellen, in 2 ml Polyäthylenfläschchen abzufüllen und einen Jahresbedarf in der Tiefkühltruhe einzufrieren. So behandelte Lösungen, deren Herstellung weiter hinten beschrieben wird, sind mindestens 1 Jahr im tiefgefrorenem Zustand haltbar. Wesentlich ist jedoch, daß das Auftauen in kaltem Wasser (Temperatur des Leitungswassers) erfolgt und nicht (wie häufig beschrieben) in warmem Wasser.

## 7. DISKUSSION

Das vorgestellte Verfahren ist eine Verbesserung von früher publizierten spektralphotometrischen Methoden.<sup>7,8</sup> Mängel dieser Methoden konnten durch eine Reihe von Optimierungsschritten vermieden werden.

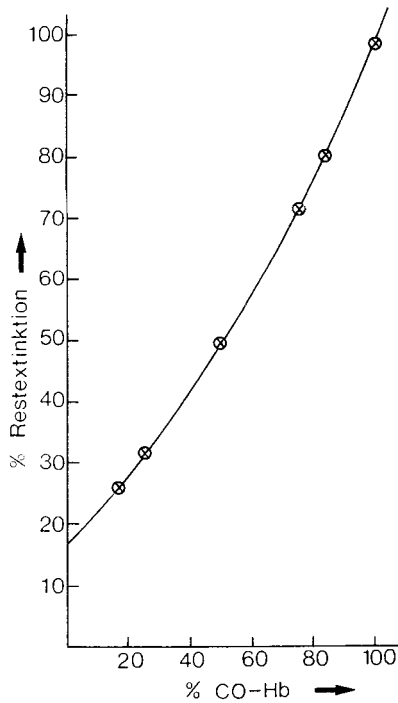


ABBILDUNG 5. Gemessene (x) und berechnete (o) Werte für die Restextinktion (zusammengestellt)

Abszisse: % CO-Hb

Ordinate: Restextinktion (%)

Außer photometrischen Methoden sind in der Literatur noch gaschromatographische Methoden zur Bestimmung von CO-Hb beschrieben.<sup>9-11</sup> Die Nachteile der erwähnten gaschromatographischen CO-Analysen wurden ebenfalls beschrieben.<sup>11-13</sup> Das einzige gaschromatographische Verfahren, das alle in der Literatur beschriebenen Nachteile umgeht, stammt von Angerer und Zorn.<sup>14</sup>

Die hier vorgestellte Methode weist eine Reihe von Vorteilen auf:

- 1) Es wird nur bei einer Wellenlänge gemessen;
- 2) Die Extinctionsänderungen sind schon bei geringen Gehalten von CO-Hb relativ groß;
- 3) Gleichzeitig ist eine sichere und schnelle Diagnose von CO-Hb Vergiftungen möglich, da von allen Hb-Derivaten nur CO-Hb unter den Bedingungen der Methode nahezu keine Extinctionsänderung zeigt.

Beträgt die Restextinktion mehr als 25% kann die Diagnose CO-Hb-Intoxikation mit Sicherheit gestellt werden. Dabei ist berücksichtigt, daß bei starken Rauchern ein hoher CO-Hb-Gehalt bis ca. 20% und mehr (mit hoher individueller Schwankungsbreite) gefunden wird. Nichtraucher in der Landbevölkerung, die auch sonst nicht exponiert sind, haben einen physiologischen CO-Hb-Gehalt von 0.5 bis 1% (Haldane-Effekt).

Die Stellung der Diagnose CO-Hb-Intoxikation ist klinisch nur schwer möglich und vor allem zeitraubend. Sie kann nur aus der besonders bei Unfällen schwer zu rekonstruierenden Anamnese mit mehr oder weniger großer Sicherheit gemutmaßt werden. Mit Hilfe der vorliegenden Methode kann die Diagnose CO-Hb-Intoxikation innerhalb von 10 Min. qualitativ und quantitativ mit absoluter Sicherheit gestellt werden.

## 8. AUTOMATION

Versuche, die Methode zu automatisieren, wurden mit dem Gilford-system (sonst für Enzymbestimmungen verwendet) durchgeführt. Dabei wurde folgende Arbeitsweise angewandt: 2.5 ml des nach Abschn. 3 hergestellten Hämolysates wurden in eine Küvette pipettiert, die Extinktion bei 578 nm gemessen und dann mittels des Dispersers 0.1 ml der 5%igen Natriumdithionitlösung in 30%iger Natronlauge (vgl. 2.3) zugesetzt. Bedingt durch das Gilfordprogramm wurde nach genau 3.17 Min. die Messung der Extinktion der reduzierten Probe vorgenommen.

Zum Vergleich mit der manuellen Methode wurde aus einer identischen Blutprobe, die 17.8% CO-Hb enthielt, der Mittelwert, die relative Standardabweichung und der Streubereich bei  $n=148$  Einzelbestimmungen mit der automatisierten Methode (Reduktionszeit 3.17 Min.) und mit der manuellen Methode (Reduktionszeit 5.0 Min.) bestimmt.

Die Resultate waren für beide Arbeitsweisen gleich und entsprachen den in Abschn. 9 wiedergegebenen Daten. Nur bei Leichenblut (mit häufig niedrigem Hämoglobingehalt) war der Trend bei der automatischen Methode zu leicht erhöhten CO-Hb-Werten stärker ausgeprägt, als bei der manuellen Methode, besonders wenn der aktuelle CO-Hb-Gehalt, gemessen nach Angerer und Zorn<sup>14</sup> kleiner als 2% war. In solchen Fällen werden (je nach Hämoglobingehalt) zwischen 400  $\mu$ l und 600  $\mu$ l Blut zur Bereitung des Ausgangshämolysates (25 ml) eingesetzt. Beträgt die Extinktion der nicht reduzierten Probe 0.8 Extinktionseinheiten oder mehr, treten keine Fehler auf.

## 9. BEURTEILUNG DES VERFAHRENS

### 9.1 Präzision

Zur Bestimmung der Qualitätskriterien wurde ein CO-Hb-Hämolysat von

22% CO-Hb verwendet (Herstellung durch Mischen von CO-Hb-Hämolyt (mit Helium gesättigt!) mit Oxihämoglobin-hämolyt (vgl. Abschn. 10). Dieses Hämolyt wies außerdem einen Met-Hb-Gehalt von 0,98% und eine Gesamthämoglobinkonzentration von 12,6 g% auf.

Bei wiederholten Analysen dieses Hämolytes wurde eine Standardabweichung von  $s_{\text{rel}} = \pm 4,87\%$  bei  $n = 106$  Bestimmungen gefunden. Daraus errechnet sich ein Streubereich von  $u = \pm 9,74\%$ .

## 9.2 Richtigkeit

Es wurden zwei Hämolyte nach Abschn. 10.1. bzw. 10.2 hergestellt. Die Analyse zeigte für das Hämolyt 1:

Gesamt-Hb:	13,45 g%
Met-Hb:	1,12%
CO-Hb:	82,20%

Das Hämolyt 2 zeigte bei der Analyse:

Gesamt-Hb:	12,6 g%
Met-Hb:	0,98%
CO-Hb:	1,2%

Aus diesen beiden Hämolyten, die kein freies CO mehr enthielten, wurden 50 Mischungen unterschiedlicher Konzentration an CO-Hb hergestellt und analysiert. Die Wiederfindungsrate an CO-Hb betrug  $98\% \pm 0,8\%$ , sofern die Hämolyte kalt gemischt und pipettiert wurden.

Als Hinweis für die Richtigkeit können auch die in Tabelle I durchgeführten Untersuchungen gelten. Dabei ist zu bedenken, daß bei diesen Versuchen sicher Streulichteffekte an den Grenzflächen der Küvetten aufgetreten sind und kleine Fehler verursacht haben.

Es liegen keine umfangreichen Untersuchungen an Leichenblut vor, mit Ausnahme einiger letal verlaufenen frischen CO-Hb-Intoxikationen und einer Reihe von Analysen von Leichenblut 5 bis 10 Tage post portem. Es ist jedoch damit zu rechnen, daß der CO-Hb-Gehalt im Leichenblut in Abhängigkeit von der Lagerdauer bei Zimmertemperatur langsam ansteigt und leicht überhöhte Werte anzeigt (häufig zu niedriger Hämoglobingehalt).

Dieser Fehler kann vermieden werden, wenn bei der Bereitung des Ausgangshämolytes (25 ml) an Stelle von 300  $\mu\text{l}$  Blut, 400  $\mu\text{l}$  bis 600  $\mu\text{l}$  Blut eingesetzt werden. Wenn die Extinktion des Ausgangshämolytes vor der Reduktion 0,8 Extinktionseinheiten oder mehr beträgt, tritt kein Fehler mehr auf (vgl. auch Abschn. 8).

Eine auf experimentellen Daten beruhende Erklärung für dieses Phänomen konnte bisher nicht gefunden werden. Der auftretende Fehler dürfte aber auf das im Leichenblut oft schon zersetzte oder denaturierte Hämoglobin zurückzuführen sein, zumal der Fehler umso größer wird, je mehr Zeit post mortem verstrichen ist. Über eine derzeit laufende Untersuchung, die der Aufklärung dieses Problems dient, wird zu gegebener Zeit berichtet.

Im allgemeinen treten derartige Fehler (ohne die oben angegebene Korrekturmöglichkeit) erst bei CO-Hb-Konzentrationen unter 2% auf und betragen selten mehr als 1.5% bis 2%, verglichen mit der Methode von Angerer und Zorn.<sup>14</sup>

### 9.3 Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze, definiert durch die dreifache Standardabweichung der Leerwerte beträgt 0.78% CO-Hb.

## 10. HERSTELLUNG VON HÄMOLYSATEN

### 10.1 Oxihämoglobin

Blutkuchen, die in einem klinisch-chemischen Laboratorium bei Serumuntersuchungen anfielen, wurden so frisch wie möglich mit dem gleichen Volumen Wasser in einem Mixer gebracht, durch starkes Mixen hämolysiert und Sauerstoff während einer Stunde eingeleitet. Anschließend leitet man 15 Min. Helium durch das trübe Hämolysat. Dann wird das Hämolysat in 15 ml Zentrifugenröhrchen abgefüllt, jedes einzelne Röhrchen mit 2 bis 3 Tropfen Tetrachlorkohlenstoff versetzt, verschlossen, gut durchgemischt und bei 10.000 g zentrifugiert. Die Stromata sammeln sich als Sediment.

Das überstehende Hämolysat ist nicht mehr getrübt. Nun vereinigt man die überstehenden Hämolysate wieder, leitet erneut eine Stunde Sauerstoff und anschließend 15 Min. Helium durch und erhält so eine Lösung von Oxihämoglobin. Das Hämolysat wird analysiert: Bestimmung von Gesamt-Hb nach,<sup>15</sup> Bestimmung von Met-Hb nach<sup>16,17</sup> und CO-Hb nach.<sup>14</sup> CO-Hb kann auch nach der hier vorgestellten Methode bestimmt werden.

Im allgemeinen werden Hämolysate erhalten, die zwischen 10 und 15 g% Gesamt-Hb, 1 bis 2% Met-Hb und 0.5 bis 3% CO-Hb enthalten. Ein Teil des Hämolysates (man bereitet am besten eine größere Menge) füllt man in kleine Polyäthylenfläschchen von 2 ml Inhalt ab, und bewahrt die Hämolysate in der Tiefkühltruhe auf; sie sind mindestens 1 Jahr haltbar.

## 10.2 Herstellung von CO-Hb-Hämolysaten

Ein nach 10.1 hergestelltes Hämolysat wird in der in Abb. 6 dargestellten Apparatur mindestens 15 Min. mit Kohlenmonoxid gesättigt. Anschließend wird 10 Min. Helium durchgeleitet. Das fertige Hämolysat wird wie bei 10.1 angegeben analysiert. Im allgemeinen erhält man Werte, für Gesamt-Hb um 10 bis 14 g %, für Met-Hb um 1 % und für CO-Hb um 99 %. Mit den CO-Hb-Hämolysaten wird zur Aufbewahrung wie für Oxihämoglobin beschrieben verfahren.

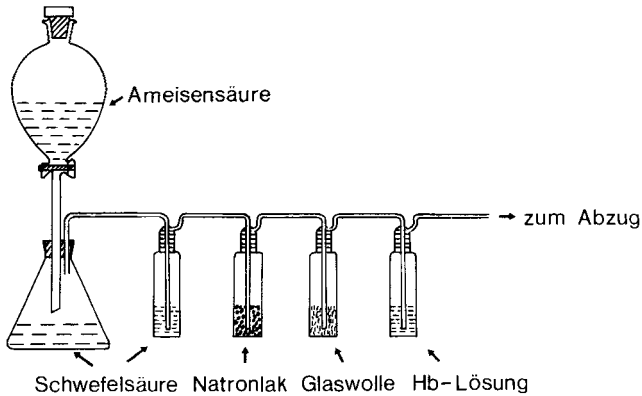


ABBILDUNG 6. Apparatur zur Herstellung von Kohlenmonoxid im Laboratoriumsmaßstab.

## 10.3 Herstellung von Kohlenmonoxid im Laboratoriumsmaßstab

Kohlenmonoxid wird durch Auftropfenlassen von konz. Ameisensäure auf konz. Schwefelsäure hergestellt. Das Gas wird zunächst durch eine Waschflasche mit konz. Schwefelsäure, eine zweite Waschflasche mit Glaswolle, eine dritte Waschflasche mit Natronkalk geleitet und erst dann in die letzte Waschflasche bzw. in den letzten Kolben eingeleitet, der das Oxihämoglobin-Hämolysat enthält. Die dazugehörige Apparatur ist in Abb. 6 dargestellt. Anschließend wird 10 Min. Helium durch das Hämolysat geleitet um überschüssiges CO zu entfernen.

## 11. CO-Hb

CO-Hb bildet sich in vivo nach Einatmen von Kohlenmonoxid ( $MG = 28$ ). Es hat sich im Verlauf von umfangreichen Untersuchungen immer deutlicher herausgestellt, daß eine Bestimmung von CO-Hb beim Menschen ein besserer Parameter für die Beurteilung der Luftkonzentration an CO darstellt, als es durch Luftmessungen erreichbar wäre, da der individuelle Faktor, die Atemfrequenz, das Atemvolumen usw. mit in das Resultat



eingehen und damit ein realistischeres Bild von der Belastung der Einzelperson ergeben. Die Toxizität des Kohlenmonoxids beruht auf seiner im Vergleich zum Sauerstoff 200 bis 500 mal höheren Affinität zum Hämoglobin des Blutes unter Bildung von CO-Hb. CO-Hb ist nicht mehr in der Lage, Sauerstoff zu transportieren.

Luftkonzentrationen zwischen 1.000 und 10.000 ppm führen rasch zu Bewußtlosigkeit und Tod. Die maximale Arbeitsplatzkonzentration (MAK, 1975) von 50 ppm erzeugt einen durchschnittlichen CO-Hb-Gehalt von 7%.<sup>4</sup> Eigene Messungen an einem größeren Kollektiv ( $n=180$ ) mit einer Luftkonzentration von 50 ppm erzeugten bei den Probanden CO-Hb-Konzentrationen zwischen 6 und 14% CO-Hb.<sup>5</sup> Es traten allgemein Kopfschmerzen und bei einigen Probanden leichte Schwindelgefühle auf. Der CO-Hb-Gehalt von Nichtrauchern (und auch sonst nicht exponierten Personen) liegt bei etwa 1% (Haldane-Effekt), während die CO-Hb-Konzentration bei Rauchern zwischen 5 und 25% gemessen wurde,<sup>6</sup> je nach Rauchgewohnheit; starke Zigarettenraucher haben im Vergleich zu starken Zigarrenrauchern einen deutlich höheren CO-Hb-Gehalt.<sup>6</sup>

## Literatur

1. W. Pilz, Publikation in Vorbereitung.
2. Richtlinien der Bundesärztekammer zur Durchführung von Maßnahmen der statistischen Qualitätskontrolle und von Ringversuchen in der Heilkunde, *Deutsches Ärzteblatt*, **68.**, 2228 (1971).
3. G. Lehnert und D. Szadkowski, *Die Berufsgenossenschaft*, **26**, 422 (1974).
4. L. Hallmann, *Klinische Chemie und Mikroskopie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1966, S. 591.
5. W. Pilz, unpublizierte Ergebnisse.
6. W. Pilz und I. Johann, *Dtsch. Med. Wschr.*, im Druck.
7. K. Fretwurst und K. H. Meinecke, *Arch. Toxikol.*, **17**, 273 (1959).
8. W. Schwerd, Kohlenmonoxidhämoglobin, in: *Der rote Blutfarbstoff und seine wichtigsten Derivate*, E. Weinig und S. Berg (Herausg.), Schmidt-Römhild, Lübeck 1961.
9. U. Schwenk, H. Hachenberg und M. Förderreuther, *Brennstoff-Chem.*, **42**, 259 (1961).
10. K. Porter und D. H. Volman, *Anal. Chem.*, **34**, 748 (1962).
11. H. A. Collison, F. L. Rodkey und J. D. O'Neil, *Clin. Chem.*, **14**, 162 (1968).
12. H. Bober, *Z. anal. Chem.*, **234**, 314 (1968).
13. R. M. McCredie und A. D. Jose, *J. Appl. Physiol.*, **4**, 863 (1967).
14. J. Angerer und H. Zorn, *Analytische Methoden zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe*, D. Henschler (Herausg.), Verlag Chemie, Weinheim, Bergstraße, Band 2 (1976).
15. W. Pilz, I. Johann und E. Stelzl, *Z. analyt. Chem.*, **215**, 260 (1966).
16. W. Pilz, I. Johann und A. T. Boo, *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, **2**, 179 (1973).
17. W. Arnold und W. Pilz, *Analytische Methoden zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe*, D. Henschler (Herausg.), Verlag Chemie, Weinheim, Bergstraße, Band 2 (1976).
18. W. Pilz, Allgemeine Vorbemerkungen. kap. 2., zu *Analytische Methoden zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe*, D. Henschler (Herausg.), Verlag Chemie, Weinheim, Bergstraße, Band 1 (1976).