

Aus dem Institut für gerichtliche Medizin der Universität Heidelberg
(Vorstand: Prof. Dr. BERTHOLD MUELLER).

Zur Frage der quantitativen Kohlenoxydbestimmung im Blute.

Von

P. SEIFERT und L. SCHMIEDER.

Die Empfindlichkeit der optischen Nachweismethoden für CO-Hämoglobin, der Spektroskopie im sichtbaren Teil des Spektrums nach Reduktion des störenden Oxyhämoglobins, der Spektrographie im Violettbereich des Spektrums, der Infrarot-Spektrophotographie¹, sowie der stufenphotometrischen Methoden², ist im allgemeinen nicht sehr groß. Ihre Durchführung ist an kostspielige Apparaturen gebunden, die nicht überall verfügbar sind. Die empfindlichste optische Methode ist zweifellos die spektrophotometrische, mit der sich besonders HEILMEYER³ beschäftigt hat und die von BREITENECKER⁴ und FRANKE⁵ für ihre Untersuchungen über die CO-Vergiftung verwendet wurde. Sie läßt noch kleine Mengen CO (unter 5% CO-Hb) im Blute erkennen. Da sie jedoch auch an eine kostspielige Apparatur gebunden ist, die außerdem kompliziert ist, hat sie keine allgemeine Einführung in das toxikologische Laboratorium gefunden. Nach den in unserem Institut gemachten Erfahrungen ist als Routinemethode von den optischen Verfahren überall dort, wo ein Stufenphotometer nach PULFRICH verfügbar ist, am ehesten die OETTELsche Methode zur quantitativen CO-Bestimmung zu empfehlen. Nach den Erfahrungen von OBERSTEG und KANTER¹⁶ ist auch die Methode nach JONSSON sehr gut brauchbar.

Während die optische Methodik den Begriff des prozentualen Sättigungsgrades (Vollsättigung des Blutes = 100% CO-Hb) schuf, wurden mit Aufkommen der gasanalytischen Verfahren der Laboratoriumstechnik Methoden an die Hand gegeben, die dem ihnen zugrunde liegenden Prinzip entsprechend eine direkte Bestimmung der CO-Gasmenge im Blute erlaubte. Mit den gasanalytischen Verfahren von NICLOUX⁶, VAN SLYKE⁷ und O. SCHMIDT⁸ bestimmt man den CO-Gasgehalt in Kubikzentimeter je 100 cm³ Blut, d. h. in Volumenprozent. Durch In-Beziehung-Setzen mit dem Molgewicht des CO-Gases läßt sich der CO-Gehalt außerdem in Gewichtsprozenten ausdrücken. Nach Untersuchungen von O. SCHMIDT⁸ muß der CO-Gehalt in Volumenprozent mit ungefähr 6 multipliziert werden, um den prozentualen Sättigungsgrad (% CO-Hb) zu ergeben. Die Sättigungskapazität entspricht demnach ungefähr dem mittleren Hb-Gehalt von 16,6% des normalen Blutes, d. h. 1 g Hb nimmt etwa 1 cm³ CO-Gas maximal auf. Die Empfindlichkeit der gasanalytischen Verfahren ist sehr viel größer als die der optischen Verfahren. Sie erlauben noch Bruchteile von 1% CO-Hb zu bestimmen.

Außer auf optischem und gasanalytischem Wege kann das CO auch auf chemischem Wege bestimmt werden, und zwar sowohl titrimetrisch⁹ als auch gravimetrisch. Die gravimetrische Methode geht auf v. FODOR¹⁰ zurück. Nach dieser Methode wird das Palladium zur Wägung gebracht, das bei der Reduktion durch CO aus einer Lösung von Palladiumchlorür entsteht. Sie ist zweifellos äußerst exakt und empfindlich. Sie läßt noch 0,005% CO erkennen. Die Durchführung ist jedoch langwierig und umständlich. Fußend auf dem Prinzip der PdCl₂-Reduktion durch CO, das auch für den qualitativen CO-Nachweis in zahlreichen Modifikationen bereits Verwendung gefunden hat, haben GETTLER und FREIMUTH¹¹ eine Methode entwickelt, mit der sie den prozentualen Sättigungsgrad des Hämoglobins mit CO bestimmen. Es handelt sich dabei um eine Testfleckenmethode, deren Prinzip in folgendem besteht: Man saugt einen Luftstrom durch eine Palladiumchlorürlösung, in der störendes CO der Außenluft gebunden wird. Dann streicht die Luft durch das zu untersuchende Blut, aus dem das CO-Gas unter der Wirkung von K-Ferricyanid und Milchsäure freigemacht wird. Die nunmehr CO-haltige Luft geht dann durch eine Lösung von Bleiacetat, wo eventuell aus dem Blut stammendes bzw. durch die Außenluft hereingebrachtes H₂S zurückgehalten wird. Endlich passiert die Luft ein mit PdCl₂ befeuchtetes Testpapier, auf dem sich je nach dem CO-Gehalt des Blutes ein mehr oder minder schwarzer Fleck von metallischem Pd bildet. Der dazu erforderliche Unterdruck, der den Luftstrom durch das System leitet, wird von einer MARIOTTESchen Flasche geliefert, die sich langsam entleert. Die Intensität des Flecks ist dem CO-Gehalt des Blutes direkt proportional. Durch Vergleich mit einer Reihe von Standardtestflecken bekannter CO-Mengen kann die CO-Konzentration direkt abgelesen werden.

Die Bestimmung wird in einer Apparatur durchgeführt, wie sie in dieser Zeitschrift bereits früher gezeigt wurde¹⁷. A, B, C sind 3 weitlumige Reagentgläser von 50 cm³ Fassungsvermögen. A enthält neben einer 3 cm hohen Schicht von Glasperlen Palladiumchlorürlösung. B enthält das zu untersuchende Blut, K₃[Fe(CN)₆] und Saponinlösung, C neben Glasperlen die Bleiacetatlösung. D ist die eigentliche „Seele“ der Apparatur, aufeinander eingeschliffene Glasflanschen, die das Testpapier zwischen sich aufnehmen. Daran schließt sich die MARIOTTESche Flasche, deren Abfluß durch Quetschhahn reguliert werden kann, an. Eine gewöhnliche Flasche mit 2fach durchbohrtem Gummistopfen tut die gleichen Dienste.

Genauere Vorschrift.

Reagentien: 1. PdCl₂-Lösung: 0,5 g PdCl₂ und 0,5 cm³ konz. HCl auf 50; 2. K₃[Fe(CN)₆]-Saponinlösung: 3,2 g K₃[Fe(CN)₆], 0,8 g Saponin auf 100; 3. Milchsäurelösung: 0,8 cm³ Milchsäure (spez. Gewicht 1,20) auf 100; 4. Bleiacetatlösung: 10 g Pb(C₂H₃O₂)₂ · 3H₂O auf 100; 5. Capryl- oder Octylalkohol.

Reagensgefäß A wird mit 5 cm³ von Lösung 1 beschickt (sie muß alle 3—4 Monate erneuert werden). In B werden 2 cm³ des zu untersuchenden Blutes mit 4 cm³ von Lösung 2, 2 Tropfen Capryl- oder Octylalkohol und 2 cm³ von Lösung 3 versetzt. C enthält 5 cm³ von Lösung 4. Letztere wird erst nach Auftreten einer stärkeren Trübung erneuert. In D wird ein mit Lösung 1 schwach befeuchtetes Testpapier eingelegt. Papier Nr. 1575 der Firma Schleicher & Schüll hat sich gut bewährt. Zu stark befeuchtetes Papier wird zwischen 2 Löschblättern abgepreßt. Zwei Tropfen aus einer Capillare genügen. Nach Sicherung der Flanschen mit Gummibändchen oder Spiralen reguliert man den Abfluß der MARIOTTESchen Flasche so ein, daß in 15 min 400 cm³ Wasser abfließen. Das erzeugt ein langsames Durchperlen der Luftblasen durch die einzelnen Reaktionslösungen. Der Versuch geht über 30 min. Nach dieser Zeit wird das Testpapier herausgenommen und so lange in destilliertem Wasser gewaschen, bis alles PdCl₂ entfernt ist, was einige Minuten in Anspruch nimmt. In allen positiven Fällen erhält man einen schwach grauen bis tiefschwarzen Fleck auf dem Testpapier, der nach dem Trocknen an der Luft mit einer Reihe von Standardtestflecken verglichen wird.

Zur Herstellung der Standardtestflecken sättigt man 50 cm³ durch Aderlaß gewonnenes und mit festem Ammonoxalat ungerinnbar gemachtes Blut mit CO, indem man Leuchtgas in flottem Strome 1 Std lang einleitet. Der Hb-Gehalt des Blutes soll möglichst 100% betragen. Durch Verdünnen des so erhaltenen, voll mit CO gesättigten Blutes mit Normalblut kann man Blute beliebiger CO-Hb-Konzentration herstellen, deren unter konstant gehaltenen Bedingungen gewonnene Testflecken als Vergleichsflecken dienen können. Da beim Einleiten des Leuchtgases starke Schaumbildung auftritt, empfiehlt es sich, 1—2 Tropfen Capryl- oder Octylalkohol zuzugeben.

GETTLER und FREIMUTH geben als niedrigsten Wert 5% CO-Hb an. Unter den Bedingungen der gegebenen Vorschrift lassen sich Werte bis zu 10% CO-Hb innerhalb einer Fehlerbreite von 2% bestimmen. Oberhalb von etwa 25% läßt sich eine Unterscheidung nur noch bei Differenzen von rund 5% treffen. Will man Werte über 20% genauer bestimmen, so kann man anstatt 2 cm³ I oder nur 1/2 cm³ des zu untersuchenden Blutes in B einfüllen und den aus dem resultierenden Testfleck sich ergebenden CO-Wert mit 2 bzw. 4 multiplizieren. Die Flecken über 60% CO-Hb zeigen beim Vorgehen nach der gegebenen Vorschrift, d. h. ohne Reduzierung der Ausgangsmenge des Blutes keine Intensitätsunterschiede mehr an. Sie sind gleich stark schwarz gefärbt. Eine Anwendung kleiner Blutmengen können aber auch in diesem Bereich noch genauere Differenzierungen erbringen. Die Empfindlichkeit der Methode für Werte unter 5% CO-Hb läßt sich noch um ein Erhebliches erhöhen, wenn 1. Flanschen zur Anwendung gelangen, die ein engeres Lumen haben, wobei unter Reduzierung des Flanschendurchmessers

um die Hälfte gleiche Pd-Mengen auf $\frac{1}{4}$ der Fläche auf dem Testpapier konzentriert werden, und wenn 2. nicht 2 cm³ Blut, sondern größere Mengen, nämlich 4, 6 bis maximal 10 cm³ zur Untersuchung verwandt werden. Dadurch läßt sich die Empfindlichkeit derartig steigern, daß im Bereich von 0—5% CO-Hb die Werte innerhalb einer Fehlerbreite von 0,5% erfaßt werden. Bei Reduzierung des Flanschdurchmessers auf die Hälfte (5 mm) und Erhöhung der Blutmenge auf 5 cm³ lassen sich selbst Werte von 0,1 und 0,2% CO-Hb differenzieren.

Tabelle 1. Vergleich der CO-Hb-Werte nach der Testfleckenmethode mit denen nach OETTEL stufenphotometrisch ermittelten Werten.

Vorgelegte Konzentration in % CO-Hb		% CO-Hb nach GETTLER und FREYMUTH	% CO-Hb nach OETTEL
50	Menschenblut	45—50	48
20	Menschenblut	18—22	32
50	Tierblut	45—50	34
60	Tierblut	55—60	50
25	Tierblut	23—27	7
10	Tierblut	9—11	0
50	Menschenblut	45—50	44
40	Menschenblut	35—40	29
30	Menschenblut	28—32	23
15	Menschenblut	14—16	0
10	Menschenblut	9—11	0

Die mit der Testfleckenmethode nach der gegebenen Vorschrift gefundenen Werte wurden mit denen nach der OETTELschen Methode bestimmten einer vergleichenden Untersuchung unterzogen. Dazu wurde CO-Blut bekannter Konzentrationen mit beiden Methoden gleichzeitig untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Die Tabelle läßt erkennen, daß die Werte über 20% CO-Hb, die mit

der Testfleckenmethode ermittelt wurden, im Bereich der genannten Fehlerbreiten wesentlich genauer festgelegt werden konnten. Werte unter 15% wurden mit der stufenphotometrischen Methode überhaupt nicht mehr oder nur sehr fehlerhaft erfaßt, während die Testfleckenmethode gerade unterhalb dieser CO-Hb-Menge die besten Ergebnisse liefert. Die in der Tabelle aufgeführten Testfleckenwerte wurden nach der gegebenen Vorschrift, d. h. ohne Berücksichtigung der früher diskutierten Möglichkeiten zur Erhöhung der Empfindlichkeit, gewonnen.

Die von uns mit der Testfleckenmethode gemachten Erfahrungen können dahingehend zusammengefaßt werden, daß es sich um eine zuverlässige, schnell und einfach durchführbare Methode der spezifischen CO-Bestimmung handelt, die eine sofortige Diagnose der Vergiftung, des Grades der Vergiftung und die wiederholte Kontrolle der Therapie einer solchen ermöglicht. Da sie besonders mit einem Minimum an apparativem Aufwand und auch von wenig geschultem Personal nach kürzester Zeit durchgeführt werden kann, dürfte sie am ehesten Aussicht haben, als Routinemethode sowohl in das toxikologische als auch klinische Laboratorium Eingang zu finden. Ihre Empfindlichkeit ist für die Praxis durchaus befriedigend. Wie wir uns überzeugen konnten,

ist sie einer weiteren Verfeinerung zugänglich, so daß sie auch für die Ermittlung der kleinsten CO-Mengen, wie sie physiologisch im Blute vorkommen, bei Rauchern entsprechend erhöht sind, geeignet ist, und somit auch für Untersuchungen beruflicher CO-Inhalation und der chronischen Vergiftung Verwendung finden kann. Von der Brauchbarkeit der Methode für die Ermittlung der kleinsten, bereits bei normalen Personen vorgefundenen CO-Mengen konnten wir uns durch einige Untersuchungen überzeugen, wobei wir wiederum nur nach der gegebenen Vorschrift ohne Berücksichtigung einer Erhöhung der Empfindlichkeit durch Flanschen geringeren Lumendurchmessers lediglich durch Erhöhung der Ausgangsmenge an Blut voringen. Wir konnten so bei Nichtrauchern, bei Rauchern im Anschluß an das Rauchen von Zigaretten und Zigarren deutliche Pd-Flecke erhalten. Das Blut wurde der Cubitalvene entnommen und durch Zusatz von festem Ammonoxalat ungerinnbar gemacht. Bei Nichtrauchern, die im Laboratorium tätig waren, wurden durchschnittlich Werte zwischen 0,5 und 1,0% CO-Hb gefunden. Unmittelbar nach dem Rauchen von 2 Zigarren wurden bei Personen, die durchschnittlich 8 Zigarren im Tage rauchen, bis 5 und 6% CO-Hb gefunden. Sicher ist die CO-Gas-Aufnahme ins Blut weitgehend von der Art des Rauchens (Inhalieren oder Nichtinhalieren) abhängig, worauf von anderen Autoren, besonders O. SCHMIDT, des öfteren bereits hingewiesen wurde.

Bei der Herstellung der Standardtestflecken, die, da von jeder Konzentration eine ganze Reihe von Flecken gewonnen werden müssen, über mehrere Tage an Arbeit in Anspruch nimmt, interessierte noch die Frage der Haltbarkeit des CO-Blutes. Zur Klärung der Frage, ob und in welchem Ausmaß CO sich aus dem CO-Blut verflüchtigt, haben wir 50%iges CO-Hb-Blut in einem Reagensglas offen stehen gelassen. Täglich wurde mit dem Blut eine CO-Bestimmung durchgeführt. Ein Verlust an CO konnte in den ersten Tagen nicht beobachtet werden. Erst nach einem Zeitraum von etwa 14 Tagen war eine Abnahme des CO-Gehaltes um 15—20% eingetreten. Nach HALDANE¹² soll das Licht die Dissoziation des CO-Hb beschleunigen. In gut verschlossenen Gefäßen kann man, sofern für eine Verhinderung der Fäulnis Sorge getragen wird, im Leichenblut noch nach Jahren das CO-Blut nachweisen, wie GREIFF¹³ bereits 1890 mitteilen konnte (s. auch WIETHOLD¹⁴ und WEIMANN¹⁵). Bei der Herstellung der Testflecken für die Standardreihe ist demnach die Verflüchtigung des CO-Gases aus dem Blute zu vernachlässigen. Das gilt auch insbesondere für das von der Klinik meist erst mehrere Stunden nach der Entnahme zur Untersuchung gelangende Blut, wo, sofern nach der Testfleckenmethodik untersucht wird, mehr Gewicht auf den Zusatz gerinnungshemmender Zusätze als eine Übersichtung mit Paraffinum liquidum gelegt werden sollte, das bei der praktisch fehlenden Verflüchtigung nur störend wirkt. Der geringen

Flüchtigkeit des CO-Gases aus dem CO-Blut in vitro steht die Tatsache gegenüber, daß in vivo der Organismus beim Überstehen der Vergiftung das CO-Gas bereits in relativ kurzer Zeit (nach BREITENECKER⁴ 3—4 Std nach Verbringen in eine CO-freie Atmosphäre) zum größten Teil auszuscheiden vermag. Wahrscheinlich existiert neben der einfachen Substitution durch den Sauerstoff, der nur eine etwa 300mal geringere Affinität zum Hämoglobin besitzt, noch ein aktiver Entgiftungsmechanismus im Organismus (Begünstigung der CO-Hb-Dissoziation durch Änderung des Säuren-Basengleichgewichtes oder teilweise Oxydation des CO zu CO₂?).

Zusammenfassung.

1. Es wird eine von GETTLER und FRELMUTH angegebene Testfleckenmethode zur Bestimmung des CO-Hb-Sättigungsgrades nach dem Prinzip der PdCl₂-Reduktion beschrieben, die spezifisch auf CO ist.

2. Eigene Erfahrungen mit der Methode gehen dahin, dieselbe als eine einfache, schnell und mit einem Minimum an apparativem Aufwand ausführbare Routinemethode sowohl für das toxikologische als auch klinische Laboratorium zur schnellen Diagnose der Vergiftung und ihres Grades, sowie zur laufenden Kontrolle der Therapie zu empfehlen.

3. Der Vergleich mit den nach OETTEL stufenphotometrisch ermittelten Werten ergab eine leidliche Übereinstimmung zwischen 20 und 50%, während die beschriebene Methode gerade die Werte unter 20% bis zu Bruchteilen von 1% CO-Hb besonders gut zu ermitteln erlaubt.

4. Bei Nichtrauchern wurden mit der Methode CO-Hb-Werte zwischen 0,5 und 1,0%, bei Rauchern bis zu 6% gefunden. Mit der Methode angestellte Untersuchungen über die Verflüchtigung des CO-Gases aus dem CO-Blut ergab, daß dieselbe so gering ist, daß sie praktisch zu vernachlässigen ist.

Literatur.

- ¹ MERKELBACH: Schweiz. med. Wschr. 1935 II, 1142. — ² OETTEL: Klin. Wschr. 1938, 1019. — ³ HELMEYER: Medizinische Spektrophotometrie. Jena 1933. — ⁴ BREITENECKER: Beitr. gerichtl. Med. 14, 98 (1938). — ⁵ FRANKE: Beitr. gerichtl. Med. 18, 80 (1949). — ⁶ NICLOUX: Bull. Soc. chim. France 13, 947. Zit. nach REUTER. — ⁷ SLYKE, VAN: Quantitative clinical chemistry. Baltimore 1931. — ⁸ SCHMIDT, O.: Z. klin. Med. 136, 151 (1939). Dtsch. Z. gerichtl. Med. 32, 404 (1939). — ⁹ FISCHINGER: Abh. Hyg. 22, 131 (1936). — ¹⁰ FODOR, v.: Zit. nach ZIEMKE, In ABDERHALDENS Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden, Abt. IV, Teil 12, 1. Hälfte, Bd. 1. Berlin-Wien 1938. — ¹¹ GETTLER and FRELMUTH: Amer. J. Clin. Path. 13, H. 9 (1943). — ¹² HALDANE: J. of Physiol. 20, 521. Zit. nach LEWIN. — ¹³ GREIFF: Vjschr. gericht. Med. 52, 362 (1890). — ¹⁴ WIETHOLD: Dtsch. Z. gerichtl. Med. 14, 135 (1930). — ¹⁵ WEIMANN: Dtsch. Z. gerichtl. Med. 17, 48 (1931). — ¹⁶ OBERSTEG u. KANTER: Dtsch. Z. gerichtl. Med. 40, 283 (1951). — ¹⁷ SEIFERT, P.: Dtsch. Z. gerichtl. Med. 41, 243 (1952).

Dr. Dr. P. SEIFERT, Heidelberg,
Institut für gerichtliche Medizin der Universität.