

Aus dem Staatlichen Institut für Gerichtliche Chemie  
(Statens Rättskemiska Laboratorium), Stockholm 60, Schweden  
(Direktor: Prof. Dr. R. BONNICHSEN)

## **Analyse von Kohlenoxydvergiftungen**

### **Methodik und Ergebnisse**

Von

**A. C. MAEHLY**

Mit 5 Textabbildungen

*(Eingegangen am 15. Juli 1961)*

Die Bestimmung von Kohlenmonoxyd (CO) im menschlichen Blut ist der Gegenstand zahlreicher Veröffentlichungen gewesen. Dies hat vor allem drei Gründe: CO-Vergiftungen sind nach wie vor sehr zahlreich, die CO-Analyse im Blut ist eine relativ einfache Aufgabe und die Beziehungen zwischen der CO-Sättigung des Blutes und den daraus folgenden Vergiftungserscheinungen sind recht genau quantitativ bekannt.

Eine kritische und gründliche Besprechung verschiedener optischer Methoden zur Bestimmung von Kohlenoxydhämoglobin, unter besonderer Berücksichtigung der Fehlerquellen wurde vor einigen Jahren von KURZ und WALLER veröffentlicht. Da außerdem ein allgemeiner Übersichtsartikel über die analytischen CO-Verfahren im Druck ist (MAEHLY) sollen hier nur eine Diskussion und Beschreibung zweier Bestimmungsmethoden, die sich in unserem Institut bewährt haben, sowie einige statistische Daten folgen.

### **I. Die Wolff-Methode**

Der frühere Vorsteher des hiesigen Institutes, ERIK WOLFF, hat schon im Jahre 1941 eine elegante Methode zur Isolierung von Kohlenoxydhämoglobin (HbCO) aus dem Blut veröffentlicht. Die Methode gründet sich auf die Entdeckung von HARTRIDGE, daß HbCO größere Wärmebeständigkeit aufweist als Oxyhämoglobin (HbO<sub>2</sub>). WOLFF suchte nach den optimalen experimentellen Bedingungen, d. h. solchen bei denen HbCO möglichst unverändert bleibt und gleichzeitig die anderen Hämoglobin-Derivate (vor allem HbO<sub>2</sub>, aber auch Methämoglobin, MetHb) möglichst vollständig denaturiert werden. Er diskutiert die Variation der Versuchsbedingungen nicht, sondern empfiehlt lediglich folgende Bedingungen: Temperatur 55°, Erhitzungsdauer 5,0 min,

pH 5,05 (5 m Acetatpuffer), Blutverdünnung etwa 16fach. Das zu untersuchende Blut wird in zwei Teile geteilt; der eine Teil wird mit CO gesättigt, der andere wird nicht behandelt. Beide Proben werden wärmedenaturiert und die in Lösung gebliebenen Hb-Anteile ( $\approx$  HbCO) quantitativ bestimmt. Diese Gehaltsbestimmung geschah ursprünglich durch visuellen Vergleich mit Farbstofflösungen, später colorimetrisch und wird heutzutage spektrophotometrisch ausgeführt.

Bei der Messung der HbCO-Konzentration ist darauf zu achten, daß andere gefärbte Substanzen, und vor allem Trübungen der Lösungen, nicht auf das Resultat einwirken. Es ist daher am besten, die Differenz zwischen den Absorptionswerten bei 2 Wellenlängen zu messen. Wir wählten 570  $m\mu$ , nahe bei einem Absorptionsmaximum für HbCO, und 630  $m\mu$ , wo HbCO nur wenig Licht absorbiert. Bei 630  $m\mu$  liegt außerdem ein Absorptionsmaximum für MetHb. Wenn MetHb vorhanden ist wird also die Differenzablesung kleiner — eine Korrektur mit dem richtigen Vorzeichen. Der Extinktionskoeffizient  $A = A_{570} - A_{630}$  für millimolare Lösungen ist +13,8 für HbCO und -0,4 für MetHb. Eine Beschreibung der Wolffschen Methode in der von uns gebrauchten Ausführung folgt hier:

#### A. Ausrüstung

1. Thermostat-reguliertes Wasserbad.
2. Zentrifuge für etwa 5000 r. p. m.
3. Spektrophotometer für Wellenlängen von 570—630  $m\mu$ .
4. pH-Meter, der auf 0,02 pH-Einheiten genau anspricht.

#### B. Lösungen und Chemikalien

1. *Acetatpuffer*. 1 Teil Essigsäure (300 g Eisessig, mit Wasser auf 1 Liter aufgefüllt) wird mit 3 Teilen Natriumacetat (408 g  $\text{CH}_3 \cdot \text{COONa} \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ , mit Wasser auf 1 Liter aufgefüllt) vermischt. Das pH wird durch Zugabe der einen oder anderen Lösung auf  $5,05 \pm 0,05$  bei Zimmertemperatur eingestellt.

2. *Schaumhemmer*. DC Corning „Antifoam“ oder ein ähnliches Silikonprodukt wird mit Wasser und Glaskügelchen kräftig geschüttelt und die so erhaltene Suspension sofort verwendet. Der Gebrauch von höheren Alkoholen ist nicht zu empfehlen, da sie das Hämoglobin teilweise denaturieren können.

3. *Bleiacetat*.

4. *Kohlenoxyd*. Aus warmer konzentrierter Ameisensäure durch tropfenweisen Zusatz von konzentrierter Schwefelsäure. Einfacher ist es, Leuchtgas zu verwenden, das aber durch Bleiacetatlösung von Spuren von  $\text{H}_2\text{S}$  befreit werden muß.

*C. Vorbereitung der Blutlösungen*

*Ann.* Alles Mischen wird durch mehrmaliges Kippen der Gefäße ausgeführt, nicht etwa durch Schütteln. Die Lösungen sollen vor grellem Licht geschützt werden.

5 ml gut gemischtes Blut wird mit 15 ml destilliertem Wasser, etwa 1 ml Schaumhemmersuspension und zwei Tropfen konzentriertem Ammoniumhydroxyd versetzt. Die Lösung wird 20 min stehen gelassen, von etwaigen Klumpen durch Filtrieren durch Glaswolle befreit und in zwei Teile geteilt. Die eine Hälfte der Lösung wird während 30 min mit CO behandelt. Das Gas muß mit Wasser oder Bleiacetatlösung gewaschen werden, so daß sich das Volumen der Blutlösung während des Gaseinleitens nicht verändert.

In vier Zentrifugengläser werden je 4,00 ml Acetatpuffer gegeben. Zwei der Gläser werden mit je 1,00 ml CO-gesättigter Blutlösung, die anderen zwei mit je 1,00 ml unbehandelter Blutlösung versetzt. Die gut gemischten Lösungen werden während 5,0 min (Stoppuhr) auf  $55,0 \pm 0,5^{\circ}$  erwärmt, für 5 min in fließendem Wasser (oder besser Eiswasser) abgekühlt und 5 min bei etwa 5000 r. p. m. zentrifugiert.

*D. Spektrophotometrische Messung*

2,00 ml jeder überstehenden Lösung werden mit 10,0 ml destilliertem Wasser verdünnt, gemischt und die Absorption bei 570 und 630  $m\mu$  gegen destilliertes Wasser abgelesen. Für die erste Messung sollen die Cuvetten trocken sein; die zweite Messung soll ohne Waschen der Cuvetten ausgeführt werden, wobei die entsprechende Doppelprobe in die gleiche Cuvette gefüllt wird.

*E. Berechnung*

Die Differenz der Absorptionswerte ( $A_{570}^0 - A_{630}^0$ ) der unbehandelten Blutlösung wird durch die Differenz der Absorptionswerte ( $A_{570}^g - A_{630}^g$ ) der CO-gesättigten Lösung dividiert. Die CO-Sättigung in Prozent wird nach Gl. (1) erhalten:

$$\% \text{ HbCO} = 100 \frac{A_{570}^0 - A_{630}^0}{A_{570}^g - A_{630}^g} = 100 \frac{\Delta A^0}{\Delta A^g}. \quad (1)$$

*Beispiel:*

$$\left. \begin{array}{l} A_{570}^0 = 0,558 \text{ u. } 0,536 \\ A_{630}^0 = 0,046 \text{ u. } 0,044 \end{array} \right\} \Delta A^0 = 0,512 \text{ u. } 0,492; \text{ Mittelwert } 0,502$$

$$\left. \begin{array}{l} A_{570}^g = 0,734 \text{ u. } 0,730 \\ A_{630}^g = 0,044 \text{ u. } 0,048 \end{array} \right\} \Delta A^g = 0,690 \text{ u. } 0,682; \text{ Mittelwert } 0,686$$

$$\text{Sättigung} = \frac{0,502}{0,686} \times 100 = 73 \% \text{ HbCO.}$$

Trotzdem die Wolffsche Methode in zahlreichen Laboratorien regelmäßig verwendet wird, ist sie selten kritisch überprüft worden (vgl. MAEHLY). Einer gründlichen Kritik wurde sie von EFFENBERGER unterzogen, der die drei Parameter Temperatur, Erhitzungsdauer und pH variierte und fand, daß kleine Abweichungen von den vorgeschriebenen Versuchsbedingungen große, ja untragbare Fehler der Schlußresultate mit sich brachten.

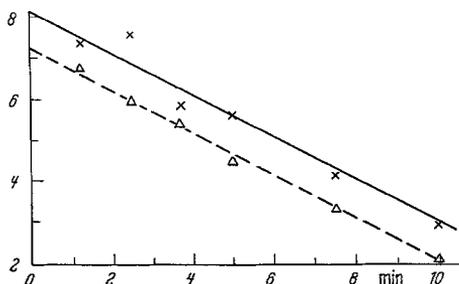


Abb. 1

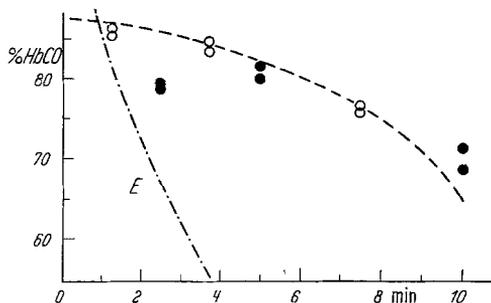


Abb. 2

Abb. 1. Einfluß der Erhitzungsdauer auf die Denaturierung von HbCO nach der Methode von WOLFF. 5 ml Blut mit 82 % HbCO wurde mit 20 ml destilliertem Wasser hämolysiert. Die Hälfte der Lösung wurde mit CO (Leuchtgas) gesättigt. Die unbehandelte und die gesättigte Probe wurden bei pH 5,07 während verschiedener Zeiträume einer Temperatur von  $55 \pm 0,2^\circ \text{C}$  ausgesetzt. Die Lösungen wurden gekühlt, zentrifugiert und spektrophotometrisch gemessen, alles nach dem im Text beschriebenen Verfahren. Abszisse: Erhitzungsdauer in Minuten. Ordinate: Absorptionsdifferenz ( $A_{570} - A_{630}$ ) der klaren zentrifugierten Lösung. Die Ordinate beginnt bei  $A = 0,200$ . — x — x — CO-gesättigte Blutlösung; --- Δ --- Δ --- unbehandelte Blutlösung

Abb. 2. Einfluß der Erhitzungsdauer auf die berechneten HbCO-Sättigungswerte nach der Methode von WOLFF. Die aus den Meßpunkten einerseits und aus den Geraden der Abb. 1 andererseits mit Hilfe von Gl. (1) berechneten Kohlenoxyd-Sättigungswerte. Abszisse: Erhitzungsdauer in Minuten. Ordinate: Kohlenoxydsättigung des Blutes in % HbCO, beginnend bei 55 % HbCO. ○ und ● Meßpunkte zweier Versuchsreihen (Doppelwerte); ----- aus den Geraden der Abb. 1 erhaltene Kurve; --- E --- mit E bezeichnet: Die von EFFENBERGER in seiner Abb. 34 gezeichnete Kurve, maßstäblich aufgetragen. Die Blutprobe enthielt hier 45 % HbCO

Wir haben einige der Angaben EFFENBERGERS überprüft und sind zu interessanten Resultaten gekommen, die ein weiteres Studium der Wärmeinaktivierung lohnend erscheinen lassen. Die ersten, vorläufigen Resultate weichen teilweise von denen EFFENBERGERS ab. Die große Empfindlichkeit der Wolffschen Methode für kleine Änderungen des pH-Wertes hat sich freilich bestätigt. Dies hat mit der starken Variation der Koagulationstemperatur gerade im Bereich von pH 5 zu tun, die von HAVEMANN und MAHLING für HbCO und MetHb gefunden wurde. Die Denaturierungstemperatur kann ohne allzu große Fehler (+5% HbCO) von 55 auf 50° gesenkt werden (EFFENBERGER fand +20% HbCO für 50°), während eine Erhöhung um wenige Grade hohe Fehler mit sich bringt. Die größten Abweichungen von EFFENBERGERS Angaben betreffen den Einfluß der Erwärmungszeit. Abb. 1 zeigt die vor-

läufigen Ergebnisse unserer Versuche. Die HbCO-Konzentration (gemessen als  $\Delta A$ ) nimmt linear mit der Zeit ab, folgt also einer Reaktionskurve 0. Ordnung. Offenbar wird bei 55° und in 5 m Acetatpuffer von  $p_H$  5,07 das HbO<sub>2</sub> sehr schnell (< 1 min) denaturiert, während die Denaturierung (und Fällung) des HbCO mehrere Minuten in Anspruch nimmt. Der berechnete Sättigungsgrad, also der Quotient der HbCO-Konzentrationen des unbehandelten und des CO-gesättigten Blutes, muß entsprechend absinken. In Abb. 2 sind die aus den Geraden der Abb. 1 berechneten Sättigungswerte und die Meßpunkte eingetragen. Zum Vergleich ist ein Teil der in EFFENBERGERS Abb. 34 wiedergegebenen Kurve eingezeichnet.

Eine systematische Untersuchung der kinetischen Verhältnisse der Hb-Wärmedenaturierung ist im Gang. In der Zwischenzeit müssen wir uns damit begnügen die ursprünglichen Bedingungen der Wolff-Methode genau einzuhalten, da es sich rein pragmatisch gezeigt hat, daß die Methode gute und reproduzierbare Resultate liefert.

Die Wolff-Methode hat einige Nachteile. So gibt sie für faulendes oder sonstwie verändertes Blut erratische Werte. Dies hängt wohl teilweise mit dem Auftreten von zusätzlichen Hb-Derivaten, wie Sulfhämoglobin (HbSH) und Methämoglobin (MetHb), in größeren Mengen zusammen. Außerdem treten aber auch falsche (zu hohe) Werte auf, wenn das Hb nicht mehr im Stande ist sich mit CO zu sättigen, so daß die Vergleichsprobe nicht „100% HbCO“ darstellt. Eine zweite Schwäche der Wolffschen Methode sind die Fehler, die bei niedrigen HbCO-Gehalten, etwa weniger als 20%, auftreten. Die Fällung von denaturiertem HbO<sub>2</sub> ist in diesen Fällen so kräftig, daß gelöstes HbCO mitgerissen wird. Die Werte werden somit zu niedrig.

## II. Spektrophotometrische Bestimmungsmethoden

Eine kritische Besprechung der zahlreichen direkten spektrophotometrischen Bestimmungsmethoden für den Gehalt des Gesamt-Hb an HbCO findet sich in dem oben erwähnten Übersichtsartikel (MAEHLY). Alle Methoden dieser Art bestechen durch die Schnelligkeit und Einfachheit der Ausführung, sie sind jedoch auch mit mehreren prinzipiellen Mängeln behaftet, von denen hier nur zwei erwähnt werden sollen:

1. Alle Methoden setzen voraus, daß nur zwei, höchstens aber drei Hb-Derivate im zu untersuchenden Blute vorhanden sind, nämlich HbO<sub>2</sub>, HbCO und evtl. MetHb. Der störende Einfluß von anderen Derivaten, vor allem HbSH, wird vernachlässigt.

2. Für alle spektrophotometrischen Analysen von HbCO müssen die Blutproben verdünnt werden. An sich wären Messungen im Violetten (Soretband) günstig, aber bei der hierfür notwendigen Verdünnung würde ein großer Teil des HbCO in HbO<sub>2</sub> übergehen. Im Ultrarot ist

die notwendige Verdünnung unbedeutend, aber es treten fast immer störende Trübungen auf, deren relativer Anteil an der Absorption der Lösung groß ist. Im „sichtbaren“ Spektralbereich muß entweder stark verdünnt werden (etwa 100mal für Cuvetten mit 1 cm Schichtdicke) oder es müssen, bei geringerer Verdünnung, Spezialcuvetten mit sehr kurzem Lichtweg verwendet werden. Solche Cuvetten sind z.B. von BUTTERFIELD, PAUL und THEORELL, sowie ZIJLSTRA und MULLER beschrieben und verwendet worden.

Über die Wirkung der Verdünnung auf die gemessene Kohlenoxydsättigung liegen verschiedene, sich widersprechende Angaben vor. Bei Ausführung von Verdünnungsversuchen muß man sich darüber klar sein, daß das physikalisch gelöste CO eine große Rolle spielt. Unverdünntes, mit CO-Gas gesättigtes Blut enthält etwa 9 mM CO gebunden an Hb. CO-gesättigtes Wasser hat eine Konzentration von etwa 1,5 mM physikalisch gelöstes CO, Blutlösungen wohl etwas weniger. Wenn daher Blut mit CO gesättigt wird ist eine bedeutende Reserve an physikalisch gelöstem CO vorhanden. Wird das Blut vor der Sättigung nur 10mal verdünnt, so ist die Konzentration des physikalisch gelösten CO schon größer als die des chemisch gebundenen. Verdünnt man solche Lösungen weiter, werden also zu hohe CO-Sättigungen erhalten. Diesem Fehler sind offenbar KURZ und WALLER verfallen, vielleicht auch PAUL und THEORELL, bei denen jedoch das experimentelle Verfahren nicht in allen Einzelheiten beschrieben ist. Besser ist es, Blut von CO-Vergifteten für Verdünnungsversuche zu verwenden. VAN KAMPEN u. Mitarb. haben Blut mit 34% HbCO bis zu 200mal verdünnt, wobei die Werte auf 29 $\frac{1}{2}$ % HbCO absanken.

Wir haben ähnliche Versuche mit Blut von 24 $\frac{1}{2}$ %, 67%, 71 $\frac{1}{2}$ % und 80% HbCO ausgeführt. Die Verdünnungen waren 10mal, 50mal, 100mal, 200mal und 500mal und die entsprechenden Schichtdicken der Cuvetten betragen 0,10, 0,50, 1,0, 2,0 und 5,0 cm. Die Lösungen wurden mit 12,5 mM Boratpuffer von pH 9,0 verdünnt. In diesem pH-Bereich wird bei Zusatz von Natriumdithionit (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) kein kolloidaler Schwefel gebildet. Die Meßergebnisse sind in Abb. 3 als Flächen eingezeichnet, welche die Fehlerbreiten andeuten sollen. Die Fehlerbreite in %-HbCO ist in Wirklichkeit etwa  $\pm 2\%$ , also doppelt so groß wie in der Abbildung angedeutet. Es zeigt sich, daß die Verdrängung des CO durch O<sub>2</sub> zu beträchtlichen Fehlern führt, die um so größer sind, je höher die ursprüngliche CO-Sättigung ist. Unsere Resultate werden in Abb. 4 mit den Angaben anderer Autoren verglichen. Es zeigt sich, daß die Resultate von VAN KAMPEN u. Mitarb. ausgezeichnet in unsere Versuchsserie passen. Die Werte von PAUL und THEORELL wurden durch Umrechnung aus einer Abbildung dieser Autoren erhalten und sind daher nicht exakt. Immerhin sieht man, daß die Daten sehr von den unsrigen abweichen.

Die oben erwähnten, mit experimentellen Fehlern behafteten Resultate von KURZ und WALLER sind ebenfalls eingezeichnet.

Der im folgenden zu beschreibenden neuen spektrophotometrischen Methode liegen zwei Gedanken zugrunde: Erstens werden Messungen der gleichen Blutlösung vor und nach Reduktion mit  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  ausgeführt, woraus der relative Anteil der reduzierbaren Hb-Derivate ( $\text{HbO}_2$  und MetHb) am Gesamt-Hb bestimmt wird. Zweitens wird die Einhaltung bestimmter, festgelegter Wellenlängen vermieden, außer bei einer Messung bei  $600\text{ m}\mu$ , wo die Spektren der Hb-Derivate einen flachen Verlauf und niedrige Extinktionswerte aufweisen. Eine ausführliche Diskussion der Vor- und Nachteile der Methode findet sich an anderer Stelle (MAEHLY).

Für die erste Bestimmung wird unbehandelte Blutlösung gegen Puffer als Vergleichslösung gemessen. Dies ergibt ein Maß für die Gesamtkonzentration an  $\text{HbO}_2 + \text{HbCO}$ . Für die zweite Bestimmung wird Blutlösung in zwei Cuvetten gefüllt und eine der Lösungen mit  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  reduziert. Die Differenz der Absorption zwischen der unbehandelten und der reduzierten Blutlösung ist ein Maß für den Anteil der reduzierbaren Hb-Derivate (praktisch =  $\text{HbO}_2$ ) im Originalblut, oder genauer in der unbehandelten Blutlösung.

Um den Einfluß von fremden Pigmenten und vor allem von Trübungen auf ein Minimum zu senken, werden für beide Bestimmungen Differenzen zwischen den Absorptionen bei zwei nicht zu weit voneinander entfernten Wellenlängen gemessen.

Die Ausführung der Methode ist wie folgt:

#### A. Messung

Gut gemischtes Blut (mindestens  $0,05\text{ ml}$ , aber besser  $1\text{ ml}$ ) werden mit seinem zehnfachen Volumen destilliertem Wasser und einem Tropfen  $0,5\text{ N}$  Ammoniumhydroxyd hämolysiert und nach  $10\text{ min}$  durch ein schnellaufendes Filterchen filtriert. Das Filtrat wird mit einer  $0,5\%$  Boraxlösung ( $2,5\text{ g Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{ H}_2\text{O}$  mit destilliertem Wasser auf  $500\text{ ml}$  aufgefüllt) verdünnt, bis die Lichtabsorption bei  $540\text{ m}\mu$  etwa  $0,5-0,8$  beträgt. Hierzu sind per  $\text{ml}$  hämolysierten Blutes etwa  $10$  bis  $20\text{ ml}$  Puffer notwendig. Zwei trockene Cuvetten ( $1\text{ cm}$  Lichtweg) werden mit der Blutlösung gefüllt, eine dritte mit dem Puffer.

1. *Bestimmung* (Blutlösung/Puffer). Die Lage des Absorptionsminimums im Bereich von  $553-560\text{ m}\mu$  wird gesucht und die Absorption beim Minimum ( $A_{\text{min}}^0$ ) gemessen. Dann wird die Absorption bei  $600\text{ m}\mu$  ( $A_{600}^0$ ) bestimmt. Die Differenz ( $A_{\text{min}}^0 - A_{600}^0$ ) wird im folgenden  $A^0$  genannt.

2. *Bestimmung* (Blutlösung/reduzierte Blutlösung). Eine der beiden Blutlösungen wird durch Zusatz von etwas festem  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  reduziert.

Die Differenz der Absorptionswerte zwischen den beiden Lösungen wird bei zwei Wellenlängen des größten Unterschieds bestimmt. Mit anderen Worten, es wird ein Minimum und ein Maximum des Differenzspektrums gemessen. Die Wellenlängen liegen bei etwa 557 und 575  $m\mu$ . Der absolute Absorptionswert dieser beiden Messungen (der eine ist positiv, der andere negativ) wird addiert und  $\Delta A$  genannt.

Man sieht aus der Beschreibung, daß die vier Meßpunkte an solchen Stellen der Spektren bzw. Differenzspektren liegen, an denen die Absorption nicht steil ansteigt. Die differenzierten Werte würden mit anderen Worten nahe Null liegen.

### B. Berechnung

Für die Berechnung wird angenommen, daß nur  $\text{HbO}_2$  und  $\text{HbCO}$  im Blute vorliegen.

Das Verhältnis der beiden Differenzablesungen gibt den Faktor  $f$ , der eine Funktion des  $\text{HbCO}$ -Gehaltes ist:

$$f = \frac{A^0}{\Delta A}. \quad (2)$$

Um die Beziehung von  $f$  zum relativen Gehalt an Kohlenoxydhämoglobin (%- $\text{HbCO}$ ) berechnen zu können, wird ein und dieselbe Lösung von normalem Blut teils mit  $\text{O}_2$  und teils mit  $\text{CO}$  (oder Leuchtgas) gesättigt und an diesen Lösungen ( $\text{HbO}_2$  bzw.  $\text{HbCO}$ ) bei festgelegten Bedingungen (Lichtquelle, Spaltbreite, Detektor, Empfindlichkeit) die oben angegebenen Messungen ausgeführt. Die so erhaltenen Werte sind in Tabelle 1 angeführt und mit Symbolen bezeichnet.

Tabelle 1. Meßwerte, die für sauerstoffgesättigtes und kohlenoxydgesättigtes Blut erhalten werden

Blutlösung	x=% HbCO	$A^0 = A_{\text{min}}^0 - A_{600}^0$	$\Delta A$
$\text{HbO}_2$	0	a	b
$\text{HbCO}$	100	c	0

$\Delta A$  steigt von Null (für  $\text{HbCO}$ ) auf einen Maximalwert (für  $\text{HbO}_2$ ) an, gleichzeitig fällt  $A^0$  von  $c$  auf  $a$  ab, da das Absorptionsminimum für  $\text{HbO}_2$  tiefer liegt als das für  $\text{HbCO}$ . Der Faktor  $f$  (Gl. 2) steigt also mit zunehmendem  $\text{HbCO}$ -Gehalt zuerst flach, dann immer steiler an. Algebraisch steht die  $\text{HbCO}$ -Sättigung  $x$  in folgender Beziehung zu  $\Delta A$  und  $A^0$ :

$$x = 100 - \Delta A \cdot k_1, \quad (3)$$

$$x = (A^0 - a) k_2, \quad (4)$$

wo  $k_1$  und  $k_2$  Konstanten sind. Werden Gl. (3) und (4) für  $\Delta A$  bzw.  $A^0$  gelöst und in Gl. (2) eingesetzt, erhält man:

$$f = \frac{x/k_2 + a}{(100 - x)/k_1} \quad (5)$$

oder, für  $x$  gelöst:

$$x = \frac{100f - ak_1}{f + (k_1/k_2)}. \quad (5a)$$

Es bleibt uns noch übrig die Konstanten  $k_1$  und  $k_2$  zu berechnen. Für  $\text{HbO}_2$  ist  $A^0 = a$  und  $x = 0$  (vgl. Tabelle 1). In Gl. (5a) eingesetzt erhält man:

$$100f - A^0 k_1 = 0 \quad (6)$$

und durch Substitution von  $f$  nach Gl. (2):

$$100 \frac{A^0}{\Delta A} - A^0 k_1 = 0$$

oder

$$k_1 = \frac{100}{\Delta A} = \frac{100}{b}. \quad (7)$$

Für  $\text{HbCO}$  ist  $A^0 = c$  und  $x = 100$ , und Gl. (4) wird

$$100 = (c - a) k_2 \quad \text{oder, gelöst für } k_2:$$

$$k_2 = \frac{100}{c - a}. \quad (8)$$

Bei Messungen im registrierenden Beckman-Instrument DK-2 erhielten wir z. B. bei Einstellung der Empfindlichkeit auf 0,1 und des Multiplikators auf  $\times 1$ , folgende Werte:

$$\begin{aligned} \text{für HbO}_2 (x = 0): a &= 82; b = 100 \text{ und} \\ \text{für HbCO } (x = 100): c &= 113. \end{aligned}$$

Diese Werte wurden durch Multiplikation der wahren Meßwerte mit einem Faktor erhalten, der so bemessen wurde, daß  $b = 100$  wurde.

Werden diese Werte in Gl. (7) und (8) eingesetzt, erhält man  $k_1 = 1$  und  $k_2 = 3,22$ . Gl. (5a) wird dann zu

$$x = \frac{100f - 82}{f + 0,31}. \quad (9)$$

Solange ein und dasselbe Spektrophotometer unter den gleichen Bedingungen benützt wird, brauchen diese Konstanten nur ab und zu kontrolliert werden. Der  $\text{HbCO}$ -Gehalt kann natürlich auch aus einer  $f/x$ -Kurve graphisch ermittelt werden.

Da die Verdünnung des Blutes bei hohen HbCO-Gehalten viel zu niedrigere Meßwerte gibt (vgl. Abb. 4) verwenden wir die spektrophotometrische Methode in der Regel nur bei HbCO-Gehalten von weniger als 30%.

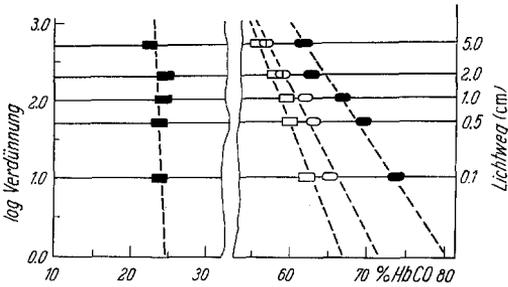


Abb. 3. Verdünnungsversuche mit kohlenoxydhaltigem Blut. Blutproben von Kohlenoxydvergifteten mit 24<sup>1</sup>/<sub>2</sub>, 67, 71<sup>1</sup>/<sub>2</sub> und 80% HbCO wurden mit destilliertem Wasser hämolysiert und mit 12,5 mM Boratpuffer von p<sub>H</sub> 9,0 verdünnt. Die verdünnten Lösungen wurden in Cuvetten verschiedener Schichtdicken gefüllt und die im Text beschriebenen spektrophotometrischen Messungen ausgeführt. Abszisse: Die nach Gl. (9) berechnete CO-Sättigung in % HbCO. Ordinaten: Da die Versuchsbedingungen so gewählt wurden, daß der Quotient  $\frac{\text{Lichtweg (cm)}}{\text{Verdünnung}}$

konstant gehalten wurde, sind beide diese Größen in logarithmischer Skala auf den Ordinaten aufgetragen. Die „Meßflächen“ geben die ungefähren Fehlerbreiten der Messungen an. Die wahre Fehlerbreite ist etwa ± 2% HbCO; eingezeichnet ist nur die halbe Fehlerbreite, damit die Abbildung an Klarheit gewinnt

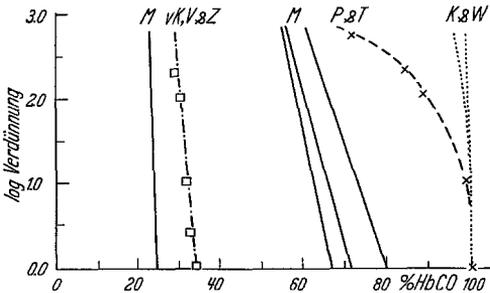


Abb. 4. Einfluß der Blutverdünnung auf die Resultate verschiedener spektrophotometrischer Bestimmungsmethoden. Die Daten von Abb. 3 werden hier mit von anderen Autoren veröffentlichten Resultaten verglichen. Abszisse: Kohlenoxydsättigung in % HbCO. Ordinate: Logarithmus der Verdünnung. Symbole: M MAEHLY; vK, V & Z VAN KAMPEN, VOLGER and ZIJLSTRA; P & T PAUL and THEORELL; K & W KURZ und WALLER

Die Abschätzung des HbCO-Gehaltes geschieht mit Hilfe des Handspektroskopes und bildet zugleich eine Kontrolle des quantitativer gehaltenen Sättigungswertes.

Der störende Einfluß der Verdünnung kann durch besondere Maßnahmen vermindert oder aber in Rechnung gezogen werden. Vermindert wird er durch Verwendung dünnschichtiger Cuvetten. Die von der Firma Beckman erhältlichen Quarzeinsätze für 1 cm-Cuvetten reduzieren den effektiven Lichtweg auf 0,10 cm. Noch kleinere Lichtwege erreicht man mit Hilfe der Spezialcuvetten nach PAUL und THEORELL, die 0,01 cm Lichtweg aufweisen, oder der von ZIJLSTRA und MULLER beschriebenen Cuvetten von 0,013 cm Schichtdicke. Die Füllung solcher Cuvetten erfordert freilich einige Übung. Wenn die gleiche Blutprobe bei mehreren Verdünnungen untersucht wird (z. B. 10mal, 100mal und 500mal in 0,1, 1,0 und 5,0 cm-Cuvetten) kann der

Wert für das unverdünnte Blut mit recht guter Genauigkeit durch Interpolation erhalten werden. Die in Abb. 3 und 4 eingezeichneten geraden Linien sind nur rein empirisch erhalten worden, die Änderung

des Sättigungsgrades erscheint freilich in erster Näherung eine Exponential-Funktion der Verdünnung zu sein.

Bei systematischer Messung des gesamten Spektrums der Blutlösungen von 500—700  $m\mu$  (am besten durch Verwendung eines registrierenden Instruments) können neben  $HbO_2$  und  $HbCO$  die am häufigsten anzutreffenden übrigen  $Hb$ -Derivate, nämlich  $MetHb$  und  $HbSH$  erkannt und deren relative Konzentration abgeschätzt werden.  $MetHb$  hat bei  $p_H$  9 ein Absorptionsmaximum bei 630  $m\mu$ . Nach Zugabe von  $Na_2S_2O_4$  zur Blutlösung verschwindet dieses Maximum, da  $MetHb$  zu  $Hb^+$  reduziert wird.  $HbSH$  hat eine Absorptionsbande bei 635  $m\mu$ , also ganz in der Nähe von der des  $MetHb$ . Da aber  $HbSH$  schon zweiwertiges Eisen enthält, bleibt das Maximum bei 635  $m\mu$  nach Zugabe von Dithionit bestehen.

Einige der Vor- und Nachteile der Bestimmungsmethode nach WOLFF und der neuen spektrophotometrischen Methode sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

Tabelle 2. Vergleich der Methode nach WOLFF mit der spektrophotometrischen Methode

	Methode nach WOLFF	Spektrophotometrische Methode
Minimale benötigte Blutmenge . .	etwa 1 ml	etwa 0,05 ml
Optimales Meßgebiet . . . . .	20—90% $HbCO$	5—30% $HbCO$
Zeitaufwand für eine Bestimmung	etwa 1 Std	etwa 20 min
Genauigkeit . . . . .	etwa $\pm 3\%$ $HbCO$	etwa $\pm 3\%$ $HbCO$
Benötigte Apparatur . . . . .	Thermostat, Zentrifuge, Photometer (besser Spektrophotometer)	Zentrifuge, Spektrophotometer (besser registrierendes Spektrophotometer)
Einfluß von Verwesung des Blutes	stört	stört, kann aber teilweise korrigiert werden
Entdeckung von $MetHb$ und $HbSH$	nicht möglich	semiquantitativ

### III. Auswertung der Ergebnisse von 331 Analysen letaler Kohlenoxydvergiftungen

Seit 1958 sind am hiesigen Institut über 400 Blutproben auf ihren  $HbCO$ -Gehalt hin untersucht worden. 331 Fälle wiesen Sättigungswerte von über 30% auf. In Abb. 5 und in den Tabellen 3 und 4 sind einige Angaben über die Ursachen der  $CO$ -Vergiftungen und über die Analyseergebnisse zusammengestellt. Da es sich um hohe  $HbCO$ -Werte handelt, wurde in der Regel die Analysenmethode nach WOLFF verwendet.

Aus Tabelle 3 ist ersichtlich, daß die Zahl der  $CO$ -Vergiftungen im Zunehmen begriffen ist. Das Stadtgas ist noch immer die Hauptquelle

Tabelle 3. Einteilung von 306 lethalen CO-Vergiftungen der Jahre 1958—1960 nach Ursache des Todes und nach Herkunft des Gases (Schweden)

	Jahr			Total	%
	1958	1959	1960		
1. Selbstmorde . . . . .	58	57	66	181	59
a) Stadtgas . . . . .	50	42	56	148	—
b) Brände . . . . .	1	0	1	2	—
c) Auspuffgase . . . . .	5	15	8	28	—
d) Ofenabgase . . . . .	2	0	1	3	—
2. Unglücksfälle . . . . .	26	42	42	110	36
a) Stadtgas . . . . .	6	6	6	18	—
b) Brände . . . . .	17	30	28	75	—
c) Auspuffgase . . . . .	1	3	0	4	—
d) Ofenabgase . . . . .	2	3	8	13	—
3. Mord oder Totschlag . . . . .	0	2	1	3	1
4. Nicht mit Sicherheit bestimmt . . . . .	2	0	10	12	4
Total	86	101	119	306	100
A. Stadtgas . . . . .	56	50	65	171	56
B. Brände . . . . .	18	30	29	77	25
C. Auspuffgase . . . . .	6	18	10	34	11
D. Ofenabgase . . . . .	4	3	9	16	5
E. Andere oder unbekannte Herkunft des Kohlenoxyds . . . . .	2	0	6	8	3

Tabelle 4. Durchschnittswerte von Alter und von HbCO-Sättigungswerten bei lethalen Vergiftungen mit Kohlenoxyd verschiedener Herkunft

Herkunft des CO	CO-Sättigung (Durchschnittswerte)		Durchschnittsalter	
	Anzahl der Fälle	% HbCO	Anzahl der Fälle	Alter in Jahren
Stadtgas . . . . .	164	70,4	164	49,6
Brände . . . . .	67	65,3	81	54,6
Motorabgase . . . . .	34	77,2	32	39,4
Übriges . . . . .	14	70,0	17	52,9
Total	279	69,0	294	50,1

des CO, doch scheinen Vergiftungen durch Auspuffgase von Verbrennungsmotoren zuzunehmen. Abb. 5 zeigt die in 331 letalen Vergiftungen erhaltenen Sättigungswerte. In 50% der Fälle liegt die Sättigung zwischen 63,5 und 79,3% HbCO, der Mittelwert ist 69,8% HbCO. Geschlecht und Alter haben nur sehr geringen Einfluß auf die letale HbCO-Konzentration. Lediglich Personen über 70 Jahre zeigen eine deutlich herabgesetzte Widerstandsfähigkeit. Bei Vergiftungen mit Auspuffgasen (meist von Kraftfahrzeugen, aber auch von Motorbooten) werden relativ hohe HbCO-Werte gefunden, während die Werte bei

Opfern von Bränden relativ niedrig liegen. Das letztere ist verständlich, da andere Ursachen, wie Sauerstoffmangel oder hochgradige Verbrennungen beitragende Todesursachen sein können.

Das Durchschnittsalter der CO-Vergifteten ist etwa 50 Jahre. Es hängt nicht sehr von der Quelle des Gases ab. Das Durchschnittsalter der in Dänemark durch Leuchtgas Vergifteten wurde von DALGAARD zu 48 Jahren gefunden. Bei Brandopfern findet man, wie zu erwarten, eine relativ große Zahl von Kleinkindern und alten Leuten; trotz der relativ großen Zahl von Kindern ist das Durchschnittsalter hier höher als bei den anderen Gruppen. Umgekehrt kommen Selbstmorde durch Automobilauspuffgase meist bei jüngeren Leuten vor.

Das große Problem der Prophylaxe kann im Rahmen dieser kurzen Arbeit nicht berührt werden. Die Entgiftung des Stadtgases, wie sie z. B. seit einigen Jahren in Basel durchgeführt wird (JORDI) ist bestimmt eine der dringlichsten Aufgaben in diesem Gebiet. Eine Diskussion dieser und ähnlicher Fragen findet sich in den Arbeiten von DALGAARD.

### Zusammenfassung

Zwei Methoden zur Bestimmung von Kohlenoxydhämoglobin im Blute werden beschrieben. Eine dieser Methoden geht auf WOLFF zurück und gründet sich auf die Isolierung von Kohlenoxydhämoglobin durch thermische Denaturierung des Oxyhämoglobins. Sie ist für die Messung von Sättigungswerten von etwa 20–95% zu empfehlen. Preliminäre Untersuchungen der Kinetik der thermischen Denaturierung werden beschrieben. Die andere Methode ist eine neue Variante der spektrophotometrischen Bestimmungsweisen von Kohlenoxydhämoglobin. Der Einfluß der Blutverdünnung auf die spektrophotometrisch erhaltenen Meßergebnisse wird diskutiert. Die Methode eignet sich zur Messung von Kohlenoxydsättigungswerten von etwa 5–30% HbCO.

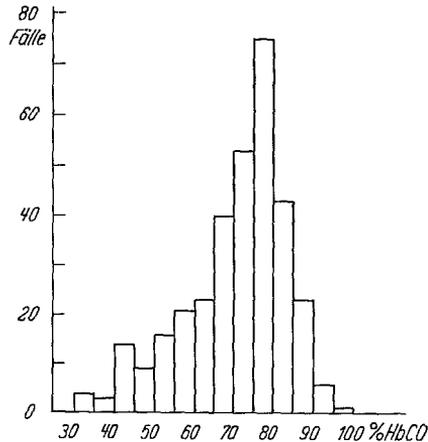


Abb. 5. Die Kohlenoxydsättigung im Blute in 331 Fällen von letalen Kohlenoxydvergiftungen. Abszisse: Kohlenoxydsättigung in % HbCO. Ordinate: Anzahl der Fälle. Bei 50 % der Fälle liegen die Sättigungswerte zwischen 63,5 und 79,3 % HbCO. 25 % aller Fälle hatten niedrigere Werte, von denen diejenigen unter 45–50 % meist auf sekundären Todesursachen beruhen. 25 % aller Fälle wiesen mehr als 79,3 % HbCO auf. Die höchsten Werte werden in faulendem oder teilweise koaguliertem Blut gefunden und entsprechen nicht den Sättigungswerten im Augenblick des Todes

Abschließend folgen in tabellarischer Form einige Angaben über Art und Ursache von Kohlenoxydvergiftungen und über die in Schweden unter verschiedenen Umständen gefundenen Kohlenoxydsättigungswerte im Blute tödlich Vergifteter.

### Literatur

- BUTTERFIELD, E. E.: Zur Photometrie des Blutfarbstoffs. *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* **79**, 439—445 (1912).
- DALGAARD, J. B.: Kuliltedødsfald. *Ugeskr. Laeg.* **123**, 469—473 (1961), sowie *Acta jutlandia, Medicinsk Serie* **11**, 1—142 (1961).
- EFFENBERGER, E.: Das Kohlenoxyd und dessen Bedeutung in der Hygiene. *Med. Meteorol. H. Nr 12* (1957), 128 S. *Ref. Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med.* **46**, 647 (1957).
- HARTRIDGE, H.: Heat Coagulation of Haemoglobin Compounds. *J. Physiol. (Lond.)* **44**, 34—42 (1912).
- HAVEMANN, R., u. A. MAHLING: Die Koagulationstemperaturen einiger Hämoglobinverbindungen. *Z. physik. Chem.* **207**, 86—90 (1957).
- JORDI, F.: Ein Jahr Erfahrung mit der Gasentgiftung. *Monatsbull. schweiz. Ver. Gas- u. Wasserfachm.* Nr 11, 1—11, (1959).
- KAMPEN, E. J. VAN, H. C. VOLGER and W. G. ZIJLSTRA: Spectrophotometric determination of carboxyhemoglobin in human blood and the application of this method to the estimation of carbon monoxide in gasmixtures. *Koninkl. Ned. Akad. Wetenschap. Proc., Ser. C* **57**, 320—331 (1954).
- KURZ, H., u. H. D. WALLER: Die Genauigkeit der optischen Bestimmung von Kohlenoxydhämoglobin im Blut. *Arch. Toxikol.* **15**, 291—305 (1955).
- MAEHLY, A. C.: Quantitative determination of carbon monoxide. *Methods of Forensic Science*, vol. I. New York and London: F. Lundquist 1962 (im Druck).
- PAUL, K. G., and H. THEORELL: A colorimetric carbon-monoxide-hemoglobin method of determination for clinical use. *Acta physiol. scand.* **4**, 285—292 (1942).
- WOLFF, E.: En enkel och känslig metod för påvisande av små mängder koloxid i blod. *Svenska Läk.-Tidn.* **38**, 492—496 (1941).
- Une méthode très simple pour la détermination de petites quantités d'oxyde de carbone dans le sang. *Ann. Méd. lég.* **27**, 221—222 (1947).
- ZIJLSTRA, W. G., and C. J. MULLER: Spectrophotometry of solutions containing three components, with special reference to the simultaneous determination of carboxyhemoglobin and methemoglobin in human blood. *Clin. chim. Acta* **2**, 237—245 (1957).

Dr. ANDREAS C. MAEHLY, Staatl. Institut f. gerichtl. Chemie  
Stockholm 60/Schweden