

Aus dem Institut für gerichtliche Medizin der Medizinischen Akademie Düsseldorf
(Direktor: Prof. Dr. R. MANZ)

Zur Methodik spektralphotometrischer COHb-Bestimmungen *

Von

P. ENDRES, R. MANZ und H. J. WULF

(Eingegangen am 14. Juni 1963)

Wir verwenden seit einigen Jahren für unsere spektralphotometrischen COHb-Bestimmungen neben dem klassischen Hüfner-Heilmeyer-Verfahren (Differenzspektrometrie bei zwei Wellenlängen mittels eines isosbestischen Punktes) meistens die von FRETWURST und MEINECKE (1959) ausgearbeitete, auf Anregungen von OTTO SCHMIDT (1937) zurückgehende Hämochromogenmethode.

Beobachtungen über Differenzen des COHb-Gehaltes der Blutverdünnungen je nach der Bearbeitungsart (zentrifugiert, filtriert oder gar nicht vorbehandelt) und je nach den verwendeten Aufbewahrungsgefäßen regten uns zu einer empirischen Untersuchung über den zeitlichen Verlauf des COHb-Abfalles an.

Nimmt man die beiden Teilreaktionen



zur Grundlage, so resultiert wegen

$$k_1/k_2 = K = \frac{[\text{HbCO}] \cdot [\text{O}_2]}{[\text{HbO}_2] \cdot [\text{CO}]}$$

eine bimolekulare Reaktion, die kinetisch nach der zweiten Ordnung verlaufen sollte ($1/c_t - 1/c_0 = k_R \cdot t$).

Zahlreiche Komplikationsmöglichkeiten machen jedoch eine so einfache Beziehung zweifelhaft: Wegen der Beteiligung einer Phasengrenzfläche ist eine — u. U. nur partielle — Entartung zur nullten Ordnung möglich, d.h. die Reaktionsgeschwindigkeit wäre praktisch unabhängig von der Konzentration der beteiligten Stoffe.

Auch ein Verlauf nach einem Reaktionsschema erster Ordnung ist theoretisch in Erwägung zu ziehen, da die Konzentration eines Teilnehmers (O_2) so groß sein kann, daß sie in die Konstante einzubeziehen ist. Ferner kann diese Deformation von der zweiten zur ersten Ordnung bekanntlich immer dann eintreten, wenn die Reaktion über Zwischenstufen verläuft, was in unserem Falle nicht ausgeschlossen werden kann. Schließlich ist durch Kombination der eben erwähnten Möglichkeiten auch das Vorliegen von komplizierten Mechanismen „gebrochener Ordnung“ möglich.

* In memoriam OTTO SCHMIDT.

Da derartige speziell-kinetische Untersuchungen nicht in unser engeres Arbeitsgebiet fallen, haben wir die theoretische Seite der Angelegenheit nicht weiter verfolgt, sondern nur eine empirische Beziehung gesucht zwischen den uns praktisch interessierenden Parametern Zeit, Oberfläche, Volumen und COHb-Konzentration. Eine solche Beziehung konnte gefunden werden.

Methodik

Das Vollblut mit oder ohne Citratzusatz wurde mit Ammoniakwasser (0,5 ml konz. $\text{NH}_3, \text{H}_2\text{O} + 100 \text{ ml Wasser}$) auf eine Extinktion von etwa 0,5—0,8 verdünnt (Schichtdicke 1 cm). Zur vollständigen Hämolyse wurde 1 min gewartet, dann entweder filtriert (S. u. S. 595 1/2) oder zentrifugiert (5 min, 3000 U/min) oder ohne Vorbehandlung direkt photometriert.

Die Messungen erfolgten parallel an drei verschiedenen Photometern: CF 4 Optica-Gitterspektrometer, M 4 Q-Zeiss-Prismenspektrometer und Elco Zeiss mit Filter S 57. Wesentliche Unterschiede hinsichtlich der Genauigkeit der COHb-Bestimmung waren zwischen den drei Geräten nicht festzustellen.

Die Bestimmungen nach der Hämochromogenmethode führten wir — wie bei FRETWURST und MEINECKE (1959) angegeben — bei 578 $m\mu$ (bzw. Filter S 57) durch. Nach Reduktion mit Dithionit und Zusatz von Natronlauge erfolgten die weiteren Extinktionsmessungen nach den unten angegebenen Zeiten. Aus den Extinktionsdifferenzen wurden die COHb-Werte anhand einer Eichkurve ermittelt. Die Bestimmungen nach HEILMEYER erfolgten wie üblich bei 576 und 560 $m\mu$. Die ermittelten Quotienten wurden mit denen einer Eichkurve verglichen.

Wegen der Temperaturabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten gemäß $\log k \sim 1/T$ haben wir uns um möglichst geringe Temperaturschwankungen bemüht.

Die *Ergebnisse*¹ lassen sich in folgenden Punkten zusammenfassen:

1. Der absolute Abfall des COHb-Gehaltes betrug bei 110 Bestimmungen nach dem Hämochromogenverfahren durchschnittlich 3% pro Stunde (in Cuvetten).

2. Es hatte auf den Betrag des durchschnittlichen Abfalles keinen Einfluß, ob die Blutverdünnungen zentrifugiert, filtriert oder gar nicht vorbehandelt wurden. Die Streuung des Abfalles war jedoch bei filtrierten Bluten deutlich kleiner (93% lagen im Bereich von 2—4% COHb).

3. Es war ohne Einfluß auf den Betrag des stündlichen Abfalles, ob es sich um Blute von Brandleichen oder um mit CO-Gas künstlich aufgeladene Blutverdünnungen oder um Blute CO-Vergifteter mit oder ohne tödlichen Ausgang handelte.

4. Bei den filtrierten Blutverdünnungen verlief der Abfall vom Beginn der Messung an regelmäßig. Bei den zentrifugierten und unbehandelten Blutverdünnungen zeigte sich in 20 Fällen eine nicht reproduzierbare Störung in Form eines kurzzeitigen, steilen (scheinbaren) Anstieges der COHb-Konzentration. Nach 1—7 min erfolgte ein ebenso steiler

¹ Genauere Einzelheiten können der Dissertation PETER ENDRES (Düsseldorf 1963) entnommen werden.

Abfall auf die normalen Werte. Die Störung trat frühestens 5 min, spätestens 17 min nach der Reduktion auf.

5. Wie entsprechende Versuche zeigten, ist die unter Ziffer 4 beschriebene Störung, die sich — wie gesagt — durch Filtration vermeiden läßt, *nicht* zurückzuführen auf folgende möglichen Faktoren:

Äußere Benetzung der Cuvetten mit Blutverdünnung, Vermehrung oder Verminderung von Dithionit, Vermehrung oder Verminderung von Natronlauge, kombinierte Vermehrung bzw. Verminderung von Dithionit bzw. Natronlauge, mechanische Unruhe (Schütteln der Cuvetten).

6. Der stündliche COHb-Abfall der Blutverdünnungen ist abhängig von der Größe der Flüssigkeitsoberfläche. Nur bei kleinen Oberflächen wird die Größenordnung von 3% eingehalten (ausreichende Volumina vorausgesetzt).

Es besteht eine etwa lineare Proportionalität zwischen Oberfläche und stündlichem Abfall. Beispiel: je 10 ml Blutverdünnung von 29 Fällen mit COHb-Werten zwischen 60 und 80%.

Fälle	Oberfläche in cm ²	Abfall/Std in % COHb
10	1,5	4
4	5	5
5	10	12
5	15	16
4	28	33
1	45	45

7. Der Abfall ist ebenfalls abhängig vom Volumen der Blutverdünnung (bei gleichen Oberflächen). Beispiel: Oberfläche 10 cm², COHb-Werte zwischen 60 und 80%.

Fälle	Volumen in ml	Abfall/Std in % COHb
2	5	25
5	10	16
5	15	12
1	25	8
1	30	10

8. Der Abfall ist ferner abhängig von der COHb-Konzentration der Blutverdünnungen (bei gleichem Volumen und gleicher Oberfläche). Es ist jedoch bei genügend kleinen Oberflächen ein nur sehr schwach hyperbolisch verlaufender Abfall beobachtet worden (quasi-linear).

Nimmt man umgekehrt die Oberflächen und Volumina sehr hoch, damit die für die Messungen benötigten Mengen keine wesentlichen Änderungen verursachen, ergeben sich starke Korrelationen zwischen Abfall und COHb-Konzentration.

Beispiel a: Oberfläche 253 cm², Volumen 120 ml

Zeit in min	COHb- Konzentration in %
0	82
30	60
60	47
90	40
120	30
150	21

Beispiel b: Oberfläche 10 cm², Volumen 25 ml

Zeit in min	COHb- Konzentration in %
0	62
60	54
120	48
360	24

(quasi-lineare Abhängigkeit).

9. Eine mit Stickstoff zerstäubte Verdünnungsflüssigkeit wurde mit Stickstoff überschichtet und das Gefäß mit einem Gummistopfen verschlossen: es zeigte sich keinerlei Abfall der COHb-Werte.

Ebenso zeigten entsprechend behandelte Blutverdünnungen, die mit Paraffin. liquidum überschichtet wurden, keinerlei Abfall.

10. Eine Blutverdünnung, die anstelle von Luft mit reinem Sauerstoff überschichtet wurde, ergab einen merklichen stärkeren Abfall. In einem Versuch, in dem die Versuchsbedingungen so gewählt wurden, daß normalerweise ein Abfall von 15% resultieren würde (wie Kontrolluntersuchungen bestätigten), zeigte sich bei Sauerstoffüberschichtung ein solcher von 24%.

11. Die in Ziffer 1—10 beschriebenen Beobachtungen lassen sich für Messungen bei Zimmertemperatur in folgender empirischer Beziehung zusammenfassen:

$$A = \frac{F \cdot t}{k \cdot V} (\sqrt{\text{COHb} + 1} - 1)$$

A = Abfall in % COHb

F = Oberfläche in cm²

t = Zeit in min seit der Hämolyse

V = Volumen im Bereich 20—40 ml

COHb = gemessene COHb-Konzentration in %

k = Konstante = 30

Näherungsformel!

Gibt nur ungefähre

Abfallwerte

Bei kleineren Volumina als 20 ml ist der Abfall größer als nach der Formel errechnet, bei Volumina über 40 ml ist er geringer als errechnet.

Beispiel a: gemessene Konzentration 70% COHb, Volumen 20 ml, Oberfläche 28 cm² (Erlenmeyerkolben mit 6 cm Durchmesser), Zeit zwischen Hämolyse und Messung 15 min.

$$\text{Abfall} = \frac{28 \cdot 15}{30 \cdot 20} (\sqrt{70+1} - 1) = 5\%.$$

Der wahre COHb-Gehalt ist $70 + 5 = 75\%$ COHb.

Beispiel b: gemessene Konzentration 50% COHb, Volumen 20 ml, Oberfläche 28 cm², Zeit zwischen Hämolyse und Messung 60 min.

$$\text{Abfall} = \frac{28 \cdot 60}{30 \cdot 20} (\sqrt{50+1} - 1) = 17\%,$$

d.h. der wahre Wert betrug $50 + 17 = 67\%$ COHb.

Beispiel c: gemessene Konzentration 50% COHb, Volumen 20 ml, Oberfläche 2,3 cm² (Reagensglas), Zeit zwischen Hämolyse und Messung 60 min.

$$\text{Abfall} = \frac{2,3 \cdot 60}{30 \cdot 20} (\sqrt{50+1} - 1) = 1,4\%,$$

d.h. der wahre Wert betrug $50 + 1,4 = 51,4\%$ COHb.

12. Statistische Auswertung:

Die Standardabweichung der 110 Messungen nach der Hämochromogenmethode errechnet sich gemäß

$$s = \pm \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{N-1}} \text{ zu } s = \pm 1,24\% \text{ COHb}$$

(x_i sind die Meßwerte, \bar{x} die arithmetischen Mittelwerte, N = die Anzahl der Messungen).

Auftragen der Summenhäufigkeitsprozente gegen die Meßwerte im Wahrscheinlichkeitsnetz (lineare Merkmalsteilung) ergab einen genau linearen Verlauf. Daraus kann auf eine gute (lineare) Normalverteilung ohne systematische Fehler geschlossen werden.

Für den Streubereich $Dx = \pm k(P) \cdot s$ ergibt sich bei einer statistischen Sicherheit $P=95\%$ ein Wert von $\pm 2,43\%$ COHb (Faktor $k(P)$ aus „Wissenschaftliche Tabellen Geigy“ entnommen).

Die vorliegenden Untersuchungen wurden nicht darauf angelegt, das Hämochromogenverfahren mit dem differenzspektrometrischen von HEILMEYER bezüglich der Signifikanz exakt zu vergleichen. Eine genau parallele Versuchsreihe hinsichtlich aller Varianten erfolgte aus Zeitgründen nicht. Wenn man trotzdem — mit einer gewissen Einschränkung also — eine F -Prüfung vornimmt, ergibt sich nach einer wie eben beschriebenen Errechnung der Standardabweichung für 31 Messungen nach HEILMEYER mit $s = \pm 1,97\%$ (Streubereich $\Delta x = \pm 3,85\%$ bei $P=95\%$) folgende Beziehung:

$$1,97^2 : 1,24^2 = 3,87 : 1,53 = 2,53.$$

Für $N_1 = 110$ und $N_2 = 31$ Freiheitsgrade lauten die Tabellenwerte („Geigy“) bei einer statistischen Sicherheit von 95% 1,5 und bei einer solchen von 99% 1,9. Da beide Werte kleiner sind als 2,53, darf man — mit den oben beschriebenen Einschränkungen — auf eine signifikante Überlegenheit des Hämochromogenverfahrens über das differenzspektrometrische schließen.

Da der Zeitaufwand nicht größer ist und einfache Filterphotometer (wie Elco) mit genau reproduzierbaren Wellenlängenverhältnissen verwendet werden können, ist das Hämochromogenverfahren zur COHb-Bestimmung nicht verfaulten Blute sehr zu empfehlen.

13. Es wird folgende Methodik vorgeschlagen:

Die Blutverdünnung wird nach kurzer Hämolyse (1 min) durch ein Faltenfilter (S. u. S. 595 1/2) in ein Reagensglas von etwa 17 mm Durchmesser filtriert. Das Glas sollte mindestens zu drei Vierteln gefüllt werden. Bei diesem Vorgehen sind auch nach einer Aufbewahrungszeit von 1 Std die COHb-Abfälle so klein, daß sie innerhalb der Fehlergrenze bleiben.

Nach längeren Aufbewahrungszeiten kann der Abfall nach der oben angegebenen empirischen Formel berechnet werden. Da die Formel nur Näherungswerte gibt, sollte man aber möglichst bald messen.

Zusammenfassung

Es wurden Untersuchungen durchgeführt über die Haltbarkeit verdünnter Blute von CO-Vergifteten.

Dabei zeigten sich Abhängigkeiten des zeitlichen Abfalles der COHb-Konzentrationen von der Oberfläche, dem Volumen und der absoluten Größe des COHb-Wertes.

Durch geeignete Versuchsbedingungen kann man erreichen, daß die CO-Verluste auch bei längeren Aufbewahrungszeiten innerhalb der Fehlergrenze bleiben.

Von den verschiedenen spektralphotometrischen Bestimmungsmethoden hat sich uns die Hämochromogenmethode nach FRETWURST und MEINECKE (1959) am besten bewährt.

Literatur

- FRETWURST, F., u. K. H. MEINECKE: Eine neue Methode zur quantitativen Bestimmung des Kohlenoxydhämoglobins im Blut. Arch. Toxikol. **17**, 273 (1959).
SCHMIDT, OTTO: Untersuchungen über Kohlenoxyd-Hämochromogene. Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. **27**, 81 (1937).
SCHWERD, WOLFGANG: Der rote Blutfarbstoff und seine wichtigsten Derivate. Lübeck: Schmidt-Römhild 1962.
Ausführliches Literaturregister über COHb bei W. SCHWERD (S. 136—146).

Prof. Dr. MANZ,
Institut für gerichtliche Medizin der Medizinischen Akademie,
4 Düsseldorf, Moorenstr. 5