

Messung des Hämoglobingehalts von frischem Blut durch atomabsorptionsspektralphotometrische Eisenbestimmung

J. Lötterle

Institut für Rechtsmedizin der Universität Erlangen-Nürnberg, Universitätsstraße 22, D-8520 Erlangen, Bundesrepublik Deutschland

Measurement of the Hemoglobin Content of Fresh Blood by Atomic-absorption-spectrophotometric Iron Determination

Summary. Description of an atomic-absorption-spectrophotometric iron determination in whole blood for the measurement of hemoglobin content. Its use is recommended for Hb determination in decayed blood because in such cases the photometric Cyan-Met-Hb method is not always reliable. To 5 ml aqueous Triton-X-100 solution (0.5%) 0.1 ml blood are added. Measuring is done after hemolysis has occurred. The calibration of the atomic-absorption spectrophotometer is performed with a standard of 10 µg Fe/ml H₂O. Samples with a Fe-content from 1 µg to 20 µg/ml H₂O (1.6 g–32 g Hb/100 ml) are in the linear range of the apparatus. There is a linear correlation between the results of this and the photometric method.

Key words: Hemoglobin-iron determination, atomic-absorption-spectrophotometry – Atomic absorption spectrophotometry, hemoglobin-iron determination

Zusammenfassung. Es wird eine atomabsorptionsspektralphotometrische Eisenbestimmung in Vollblut zur Messung des Hb-Gehalts beschrieben. Ihre Anwendung wird für die Hb-Bestimmung von faulen Blutproben empfohlen, da hier die photometrische Cyan-Met-Hb-Methode nicht immer zuverlässig ist. Für den Probenansatz werden zu 5 ml 0,5%iger wäßriger Triton-X-100-Lösung 0,1 ml Blut pipettiert; nach erfolgter Hämolyse kann die Probe vermessen werden. Die Eichung des Atomabsorptionsspektralphotometers erfolgt mit einem Standard von 10 µg Fe/ml H₂O. Proben mit einem Fe-Gehalt von 1 µg bis 20 µg/ml H₂O (1,6 g–32 g Hb/100ml) liegen im linearen Meßbereich des Gerätes. Die atomabsorptionsspektralphotometrische Methode wird mit der photometrischen Messung verglichen; zwischen den Meßergebnissen besteht ein linearer Zusammenhang.

Schlüsselwörter: Hämoglobin-Eisenbestimmung, Atomabsorptionsspektralphotometrie – Atomabsorptionsspektralphotometrie, Hämoglobin-Eisenbestimmung in faulem Blut

Seit 20 Jahren hat sich die photometrische Cyan-Met-Hämoglobin-Messung als Methode der Wahl zur Bestimmung des Hämoglobingehalts in frischem Blut eingebürgert. Die Messung ist praktikabel und für den Routinebetrieb sehr geeignet. Alle wichtigen Hb-Derivate des frischen Blutes (O_2 -Hb, Met-Hb und CO-Hb) werden durch Kaliumferricyanid in Cyan-Met-Hb überführt und dann bei 540 nm photometrisch vermessen; wesentliche Störfaktoren sind, wenn frisches Blut verwendet wird, weitgehend ausgeschlossen (Remmer 1960).

Für den rechtsmedizinischen Bereich ist dagegen häufig die Hb-Messung von faulem Blut von Interesse. Dabei geht es im allgemeinen nicht um die Frage, welcher Hb-Gehalt zum Todeszeitpunkt vorgelegen hat, vielmehr wird der Hb-Wert als Bezugsparameter zu toxikologisch wichtigen Substanzen — vor allem zu Kohlenmonoxid — benötigt.

Bei faulen Blutproben ergibt die photometrische Cyan-Met-Hb-Messung keine verlässlichen Werte mehr, da verschiedene Hb-Abbauprodukte mit Kaliumferricyanid nicht mehr reagieren, und somit kein einheitliches Hb-Derivat zur Messung vorliegt (Schwerd 1962).

Ausgehend von diesen Überlegungen haben in den letzten Jahren Blackmore (1970) und Iffland und Sticht (1972) für rechtsmedizinische Fragestellungen versucht, den Fe-Gehalt der Erythrocyten, der in festem stöchiometrischen Verhältnis zu Hämoglobin steht, zu benutzen, um dann auf den Hb-Gehalt rückzuschließen. Das im Blut miterfaßte Serumeisen, welches selbst bei hämolytischen Anämien weniger als 1% des Hb-Eisens beträgt, kann dabei vernachlässigt werden.

Limitierende Faktoren bei der Untersuchung dieser Autoren war der hohe methodische Arbeitsaufwand (nasse Veraschung bei Iffland und Sticht 1972) und eine relativ große Streubreite der Meßwerte (atomabsorptionsspektralphotometrische Fe-Messung bei Blackmore 1970).

Mit den seit einiger Zeit erhältlichen, technisch ausgereiften Atomabsorptionsspektralphotometern konnte eine einfache Routinemethode für die Fe-Messung von frischem und auch gefaultem Blut entwickelt werden, welche anschließend beschrieben wird. Dann wird über Voruntersuchungen sowie die Überprüfung und Eichung der atomabsorptionsspektralphotometrischen Fe-Messung anhand der photometrischen Cyan-Met-Hb-Messung von frischem Vollblut berichtet.

Arbeitsvorschrift für die atomabsorptionsspektralphotometrische Fe-Bestimmung in Vollblut zur Ermittlung des Hb-Gehaltes

Geräte: Atomabsorptionsspektralphotometer mit Fe-Hohlkathodenlampe; Spannungskonstanthalter; 0,1-ml-Pipetten (Blutzuckerpipetten); 5-ml-Vollpipetten; 100-ml-Meßkolben, 1000 ml-Meßkolben; PVC-Röhrchen mit Kappe, 12 ml Inhalt.

Chemikalien: Fe-Standard-Lösung (Titrisol, Firma Merck); Triton-X-100.

Gase: Synthetische Luft; Acetylen.

Fe-Standardlösung: Aus einer Fe-Lösung (Titrisol) wird durch Verdünnen mit aqua dest. eine Standardlösung mit einer Konzentration von 10 mg Fe/l (17,9 μ mol Fe/l) hergestellt.

Probennahme

Beim Lebenden erfolgt die Blutentnahme aus einer Unterarmvene. Zur Gerinnungshemmung wird vorher in die Spritze Liquemin (200 E/10 ml Blut) gegeben. Leichenblut wird aus der Femoralvene ohne Zusatz gewonnen. Stehen zur Untersuchung nur Blutgerinnsel zur Verfügung, so werden diese homogenisiert, indem man sie z. B. mit einem Glasstab durch ein feinmaschiges Perlongewebe (Mondur 31)¹ preßt, welches wie ein Filterpapier in einen Trichter eingelegt wurde.

Probenansatz

In ein Reagenzglas pipettiert man zu 5 ml wässriger 0,5%iger Triton-X-100-Lösung 0,1 ml Blut mit einer Blutzuckerpipette. Die Pipette wird anschließend mehrmals mit dem Reagenzglasinhalt durch Aufziehen bis knapp oberhalb der Marke gespült. Das Reagenzglas wird leicht geschüttelt. Sobald das Blut gleichmäßig verteilt ist, kann die Probe vermessen werden.

Atomabsorptionsspektralphotometrische Arbeitsbedingungen

Es wurde ein Atomabsorptionsspektralphotometer der Firma Perkin Elmer, Modell 403, verwendet. Zur Erzielung einer gleichmäßigen Spannung wurde dem Gerät ein Spannungskonstanthalter vorgeschaltet. Die Lichtquelle war eine Fe-Hohlkathodenlampe der Firma Perkin-Elmer, Stromstärke 30 mA. Es wurde bei einer Wellenlänge von 248,3 nm gemessen, die Spaltbreite betrug 0,3 mm. Als Brenngas wurde Acetylen, als Oxydant synthetische Luft verwendet. Es wurde ein 10 cm breiter Standard-Brennkopf benutzt.

Durchführung der Messung

Es wird eine Eisen-Konzentrationsmessung vorgenommen, wobei zunächst der Fe-Standard von 10 mg Fe/l (17,9 µmol Fe/l) auf ein Fe-Signal von 15,8 abgeglichen wird. Die Blutlösung sollte nie länger als 20 s angesaugt werden, um Verschmutzungseffekte im Ansaug- und Zerstäubersystem zu vermeiden. Nach jeder Messung einer Blutlösung saugt man so lange destilliertes Wasser an, bis das Fe-Signal wieder den Wert 0 anzeigt.

Wegen der Gefahr des Driftens muß das Fe-Standard-Signal nach jeder Blutprobenmessung kontrolliert und, wenn erforderlich, neu einjustiert werden. Eine Reihe von Blutproben wird dann in dieser Folge gemessen:

aqua dest. — Fe-Standard — Probe 1 —
aqua dest. — Fe-Standard — Probe 2 — usw.

Wenn man das digital angezeigte Signal des Atomabsorptionsspektralphotometers so abgleicht, daß bei Messung des Standards der Wert 158 angezeigt wird, dann vor die letzte Ziffer der Digitalanzeige ein Komma setzt, so daß der Wert 15,8 angegeben wird, ist das Gerät so eingestellt, daß es den Hb-Gehalt einer Blutprobe in g/100 ml angibt (zur Eichung siehe unten).

Voruntersuchungen und Eichkurven

Mittels verschiedener Verdünnungsreihen einer Fe-Stammlösung war zunächst der geeignete Konzentrationsbereich für die Messung ermittelt worden. Es zeigte sich, daß bis zu Konzentrationen von ca. 20 mg Fe/l (35,8 µmol Fe/l) das Fe-Absorptionssignal direkt proportional zur Fe-Konzentration war. Bei höheren Fe-Konzentrationen bestand keine lineare Beziehung mehr. Bei einer Konzentration von unter 1 mg Fe/l (1,79 µmol Fe/l) begannen die Meßwerte relativ stark zu streuen. Fe-Konzentrationen zwischen 1 mg Fe/l und 20 mg Fe/l lagen also im für die Methode optimalen Meßbereich. Bei der Messung von neun verschiedenen wässrigen Lösungen mit einem Fe-Gehalt zwischen 1 mg Fe/l und 20 mg Fe/l konnte der lineare Zusammen-

¹ Mondur 31, ein Perlongewebe mit Fadendurchmesser 38 µ, Maschenweite 31 µ. Vertriebt durch Vereinigte Seidenwebereien AG, Abt. Müllergaze und technische Gewebe, Krefeld

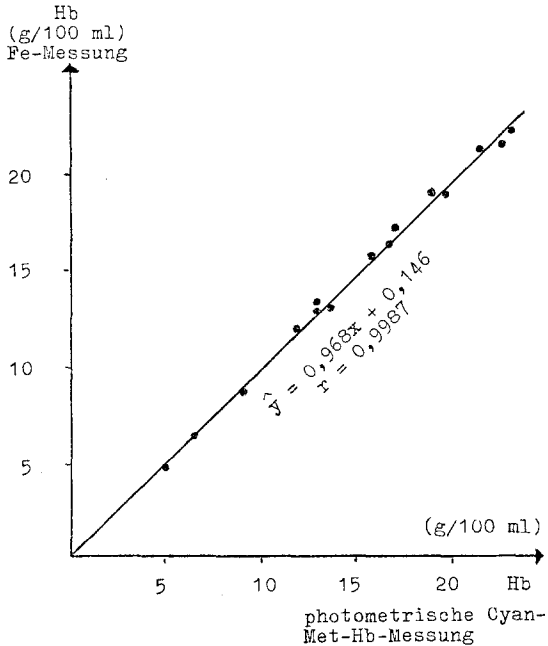


Abb. 1. Vergleich zwischen der photometrischen Cyan-Met-Hb-Messung und der Hb-Bestimmung durch Fe-Messung mittels Atomabsorptionsspektralphotometrie

hang zwischen Fe-Signal des Geräts und der Fe-Konzentration der Lösung gezeigt werden. Die Regressionsgerade war $y = 140,1 x + 11,7$, der Korrelationskoeffizient betrug $r = 0,9995$. Der Fe-Standard von 10 mg Fe/l war auf ein Signal von 154 abgeglichen worden.

Bei Blutproben mit Hämoglobinwerten im Normbereich mußte deshalb entsprechend dem oben angegebenen Konzentrationsbereich die günstigste Blutverdünnung für die Fe-Messung zwischen 1:25 und 1:250 liegen. Zur Aufstellung einer Eichkurve wurden neun verschiedene Verdünnungen von Blut mit 0,5%iger wässriger Triton-X-100-Lösung im Bereich von 1:25 bis 1:250 hergestellt und vermessen. Das 1:25 verdünnte Blut diente als Standard, er wurde auf ein Fe-Signal von 170 abgeglichen. Der lineare Zusammenhang zwischen den Fe-Signalen und den entsprechenden Konzentrationen der Blutlösungen wurde durch die Regressionsgerade $y = 267,5 x + 3,77$ beschrieben, der Korrelationskoeffizient betrug $r = 0,9998$.

Bei Messung einer Serie von 50 Ansätzen derselben Blutprobe, 1:51 mit 0,5%iger wässriger Triton-X-100-Lösung verdünnt, betrug der Variationskoeffizient $V = 2,38\%$.

Vergleich der atomabsorptionsspektralphotometrischen Fe-Messung zur Bestimmung des Hb-Gehalts mit der Cyan-Met-Hb-Messung

Bei 15 heparinisierten frischen Blutproben wurde durch Hinzufügen oder Abpipettieren von Serum der Hb-Gehalt verändert, so daß eine Reihe von Blutproben mit einem nach der photometrischen Cyan-Met-Hb-Methode gemessenem Hb-Gehalt zwischen 4,9 g/100 ml und 23,0 g/100 ml resultierte. Für jede Konzentration wurden je 5 atomabsorptionsspektralphotometrische Hb-Messungen nach der eben beschriebenen Methode und 5 photometrische Cyan-Met-Hb-Messungen (Zijlstra und van Kampen 1960) durchgeführt. Die Fe-Werte wurden in Hb-Werte umgerechnet. Es wurde jeweils der Mittelwert berechnet. Die lineare Beziehung zwischen den nach beiden Methoden gewonnenen Meßwerten zeigt Abb. 1.

Die durch die Fe-Messung ermittelten Hb-Werte lagen fast alle etwas niedriger als die durch die Cyan-Met-Hb-Messung bestimmten Werte.

Angleichung der atomabsorptionsspektralphotometrischen Fe-Messung an die photometrische Cyan-Met-Hb-Messung

Die Abgleichung des Fe-Signals bei der Atomabsorptionsspektralphotometrie wurde nach folgenden Überlegungen vorgenommen:

Bei den Umrechnungen muß für das Molekulargewicht von Hb derselbe Wert zugrundegelegt werden, der bei der Eichung der photometrischen Cyan-Met-Hb-Methode verwendet worden war, um eine Vergleichbarkeit der beiden Methoden zu gewährleisten. Bei der Festlegung des viertelmillimolaren Extinktionskoeffizienten für Cyan-Met-Hb bei 540 nm von 11,0 war ein Äquivalentgewicht für Hb von 16520 angesetzt worden (Zijlstra und van Kampen 1960).

Die Beziehung zwischen Hb-Gehalt der Blutprobe und dem diesem Hb-Gehalt entsprechenden Fe-Gehalt errechnet sich dann:

$$\begin{aligned} 4 \text{ Mol Fe} &\triangleq 1 \text{ Mol Hb} \\ 223,2 \text{ g Fe} &\triangleq 66080 \text{ g Hb} \\ 1 \text{ mg Fe} &\triangleq 296,1 \text{ mg Hb} \end{aligned}$$

Zur Erstellung geeigneter Meßbedingungen am Atomabsorptionsspektralphotometer wurde ein Fe-Standard von 10 mg Fe/l (17,9 $\mu\text{mol Fe/l}$) verwendet. Die Fe-Konzentration des Standards entspricht dann der einer 51fach verdünnten Blutprobe mit einem Hb-Gehalt von $51 \cdot 296,1 \text{ mg/100 ml} = 15,1 \text{ g/100 ml}$.

Aus der Gleichung der Regressionsgerade der Abb. 1 ist ersichtlich, daß die nach den beiden Methoden erhaltenen Meßwerte für die Hb-Konzentrationen der jeweiligen Blutprobe nicht identisch sind. Berechnungen zeigten, daß die über die Fe-Bestimmung ermittelten Hb-Werte in allen Konzentrationsbereichen um durchschnittlich 4,35% niedriger lagen.²

Ohne jedoch die beiden Methoden mit einer definitiven Methode vergleichen zu können (eine solche besteht bislang für die Bestimmung der Hb-Konzentration des Blutes nicht zur Verfügung) kann keine Aussage darüber gemacht werden, welches der beiden Verfahren die größere Richtigkeit aufweist. Da sich für die Bestimmung frischer Blutproben die photometrische Cyan-Met-Hb-Bestimmung eingeführt hat, sollte darauf Bezug genommen werden, um eine bessere Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Dazu war es nötig, alle über die Fe-Bestimmung ermittelten Hb-Werte mit 1,0435 zu multiplizieren.

Bei Routinemessungen empfiehlt sich nun eine Einstellung des Atomabsorptionsspektralphotometers nach folgenden Überlegungen: Der verwendete Fe-Standard von 10 mg Fe/l (17,9 $\mu\text{mol/l}$) entspricht einem Hb-Gehalt von 15,1 g/100 ml; bei Korrektur einem Hb-Gehalt von $1,0435 \cdot 15,1 \text{ g/100 ml} = 15,8 \text{ g/100 ml}$. Gleicht man nun bei der Eichung des Gerätes das Fe-Standard-Signal auf 15,8 ab, kann der Hb-Gehalt einer Blutprobe direkt in g/100 ml abgelesen werden.

Diskussion

Die dargestellte Methode der atomabsorptionsspektralphotometrischen Fe-Messung zur Bestimmung des Hb-Gehaltes steht hinsichtlich ihrer Praktikabilität, des Arbeitsaufwandes und der Präzision der photometrischen Cyan-Met-Hb-Mes-

² Herrn Priv.-Doz. Dr. Hommel sei an dieser Stelle herzlich für die Durchführung der statistischen Berechnungen gedankt

sung nicht nach. Eine Eichkurve ist wegen des zur Fe-Konzentration direkt proportionalen Signals bei der beschriebenen Methode nicht notwendig. Damit fällt die sehr zeitaufwendige Abgleichung des Atomabsorptionsspektralphotometers mit 5 oder mehr Fe-Standard-Lösungen unterschiedlicher Konzentration vor jeder Meßreihe für die Routinemessung weg. Frühere Untersucher dagegen (Zettner und Mensch 1967, 1968; Van Assendelft et al. 1968) hatten für ihre Untersuchungen Eichkurven benötigt. Die Ergebnisse von Zettner und Mensch (1967, 1968) sind hinsichtlich der Präzision (Variationskoeffizient $V=0,8\%$) hervorragend, jedoch fehlen Angaben darüber, wieviele Messungen durchgeführt wurden. Blackmore (1970) beschrieb bei seinen Versuchen eine sehr große Streubreite der Meßwerte bei der atomabsorptionsspektralphotometrischen Fe-Messung (Variationskoeffizient je nach Meßreihe zwischen $V=5\%$ und $V=30\%$), wobei Geschicklichkeit und Erfahrung des Untersuchers eine wesentliche Rolle spielten.

Auf die Interferenz von Chemikalien bei der atomabsorptionsspektralphotometrischen Fe-Messung wiesen Van Assendelft et al. (1968) hin. Bei der Testung von verschiedenen Atomabsorptionsspektralphotometer-Modellen kamen sie zu unterschiedlich guten Ergebnissen. Bei einem Gerät der Firma Perkin-Elmer, Modell 303, beobachteten sie keine solchen Interferenzen, was nach Ansicht der Autoren durch bessere technische Ausstattung des Geräts zu erklären ist.

Ob in den vorliegenden Untersuchungen die unterschiedlichen Meßergebnisse der beiden Methoden auf solche Interferenzen bei der atomabsorptionsspektralphotometrischen Fe-Messung zurückzuführen sind, war experimentell nicht zu klären. Da eine Angleichung der atomabsorptionsspektralphotometrischen Fe-Messung an eine definitive Methode, wie oben angeführt, nicht möglich ist, wurde die aufgetretene, statistisch signifikante systematische Abweichung gegenüber der photometrischen Cyan-Met-Hb-Methode entsprechend korrigiert.

Der Vorteil, auch bei faulen Blutproben ein Meßverfahren zur Hb-Bestimmung zur Verfügung zu haben, ist hervorzuheben.

Literatur

- Blackmore DJ (1970) The determination of carbon monoxide in blood and tissue. *Analyst* 95:439
- Iffland R, Sticht G (1972) Gaschromatographisches Verfahren zur Bestimmung des Kohlenmonoxidgehaltes im Blut. *Arch Toxikol* 29:325
- Lötterle J (1977) Zur Problematik der CO-Hb-Bestimmung in faulem Blut. Inaug Diss Erlangen
- Remmer H (1960) Kritische Wertung der Hämoglobinbestimmungsmethoden. *Internist* 1:232
- Schwerd W (1962) Der rote Blutfarbstoff und seine wichtigsten Derivate. Schmidt-Römhild, Lübeck
- Van Assendelft OW, Zijlstra WG, Buursma A, Van Kampen EJ, Hoek W (1968) The use of atomic absorption spectrophotometry for the measurement of haemoglobin-iron, with special reference to the determination of $\epsilon_{\text{HiCN}}^{540}$. *Clin Chim Acta* 22:281
- Van Kampen EJ, Zijlstra WG (1961) Standardization of hemoglobinometry. II. The hemoglobinocyanide method. *Clin Chim Acta* 6:538
- Zettner A, Mensch AH (1967; 1968) The use of atomic absorption spectroscopy in hemoglobinometry. *Am J Clin Pathol* 48:225; *Am J Clin Pathol* 49:196
- Zijlstra WG, Van Kampen EJ (1960) Standardization of hemoglobinometry. I. The extinction coefficient of hemoglobinocyanide at $\lambda = 540 \text{ m}\mu$: $\epsilon_{\text{HiCN}}^{540}$. *Clin Chim Acta* 5:719