

Eine neue Methode zur Carboxyhämoglobinbestimmung in flüssigem und getrocknetem Blut mittels Fourier-Transform-Infrarot-Spektrometrie (FTIR)

H. Kijewski¹, K. P. Seefeld² und K. Pöhlmann¹

¹Institut für Rechtsmedizin der Universität Göttingen, Windausweg 2, D-3400 Göttingen, Bundesrepublik Deutschland

²Nicolet Instrument, Sehnefelderstraße 162, D-6050 Offenbach/Main, Bundesrepublik Deutschland

A New Technique for the Determination of Carboxy-Hemoglobin in Liquid and Dry Blood Using Fourier Transformation Infrared Spectrometry (FTIR)

Summary. A new technique is presented for the fast quantitative determination of carboxy-hemoglobin (CoHb) in liquid blood with the aid of Fourier transformation infrared spectrometry.

The bands at $\tilde{\nu} = 1953$ and 1969 (cm^{-1}), which are characteristic for the CoHb complex, were measured without the blood being prepared. In liquid samples the band at 1953 cm^{-1} is prominent; in dry samples, however, it appears. In moist samples both bands—each to be coordinated with a different CoHb conformer—are observed at about the same intensity. Even with dried blood spots of less than 0.1 mg, quantitative determination of CoHb at $\tilde{\nu} = 1969$ (cm^{-1}) is possible. Systematic investigations of the thermic stability of the CoHb complex were performed.

The typical interference phenomena associated with UV spectrometry were not observed when the above-described method was employed nor are they to be expected.

Even under extreme measuring conditions, as for example when measuring transmission through lab-coat material, different CoHb contents could be determined in traces of dried blood.

Key words: CoHb, determination of – Infrared spectrometry

Zusammenfassung. Es wird eine neue Methode zur schnellen quantitativen Bestimmung von Carboxyhämoglobin (COHb) in flüssigem Blut mittels der FTIR-Technik vorgestellt.

Die für den COHb-Komplex charakteristischen Banden bei $\tilde{\nu} = 1953$ und $1969 \text{ (cm}^{-1}\text{)}$ wurden ohne Präparation des Blutes ausgemessen. In flüssigen Proben tritt die Bande bei 1953 cm^{-1} sehr stark hervor, in trockenen verschwindet sie.

In feuchten Proben können beide, verschiedenen COHb-Konformeren zuzuordnenden Banden, in etwa gleicher Intensität beobachtet werden.

Selbst an minimalen getrockneten Blutspuren mit einer Menge von weniger als $0,1 \text{ mg}$ lassen sich bei $\tilde{\nu} = 1969 \text{ (cm}^{-1}\text{)}$ quantitative COHb-Bestimmungen durchführen.

Es wurden systematische Untersuchungen zur thermischen Beständigkeit des COHb-Komplexes durchgeführt. Die beim Einsatz von UV-spektrophotometrischen Methoden typischerweise auftretenden Störungen wurden hier nicht beobachtet und sind bei der angewandten Methode auch nicht zu erwarten.

Selbst bei außergewöhnlichen Meßbedingungen wie Transmissionsmessung durch Kittelstoff waren in eingetrockneten Blutflecken unterschiedliche COHb-Gehalte nachzuweisen.

Schlüsselwörter: COHb-Bestimmung, IR-Spektrometrie – FTIR-Technik, COHb

Dem Nachweis von Carboxyhämoglobin (COHb) kommt – nicht nur in forensisch-toxikologischem Zusammenhang – große Bedeutung zu. Dementsprechend wurden zahlreiche Methoden und methodische Modifikationen zur COHb-Bestimmung bis in die jüngste Zeit vorgestellt. Eine Übersicht über die Entwicklung der Methodik gaben zum Beispiel Schwerd (1962) und Pankow (1981).

Weite Verbreitung haben UV-spektrophotometrische Methoden zum COHb-Nachweis gefunden, die allerdings, worauf schon Schwerd und Schwemmer (1957) hingewiesen haben, durch Alterung massiv gestört werden können.

Insbesondere bei der spektrophotometrischen COHb-Bestimmung in Blutproben von Brandleichen wurden nicht selten sehr große Differenzen zwischen den COHb-Werten der reduzierten und nicht reduzierten Proben beobachtet. Wir haben deshalb in solchen Fällen seit längerem eine nach Seifert und Schmieder modifizierte Methode routinemäßig eingesetzt.

Mit dem Ziel der Entwicklung einer weiteren, wenig störanfälligen, schnellen und empfindlichen quantitativen Bestimmungsmethode für Carboxyhämoglobin erprobten wir nun die Fourier-Transform-Infrarot-Spektrometrie (FTIR), was anscheinend bis heute noch nicht versucht wurde.

Material und Methoden

Kohlenmonoxid (CO) wurde bis zur Sättigung durch Vollblut geleitet und überschüssiges CO durch Einleiten von Stickstoff entfernt. Durch Zugabe von Blut ohne CO-Zusatz wurden Lösungen mit unterschiedlichen COHb-Konzentrationen hergestellt. Die Methode von Gettler und Freimuth (1940) bzw. Seifert und Schmieder (1952) wurde zum Vergleich mit der UV-

spektrophotometrischen Methode in der von Berg und Döring (1977) gegebenen Weise modifiziert und routinemäßig eingesetzt. Dazu wurde CO aus COHb-haltigen Blutproben freigesetzt und mittels „Drägerröhrchen“ mit Jodpentoxyd nachgewiesen. Statt der Mariottischen Flasche verwendeten wir eine Membranpumpe mit variabler Saugleistung. Die Länge der Verfärbung wurde gemessen und zur Erstellung einer „Eichkurve“ gegen vorgegebene COHb-Konzentrationen aufgetragen.

Zur COHb-Bestimmung mittels FTIR diente eine zerlegbare Flüssigkeitsküvette aus KSR5-Fenstermaterial (TlJ, Br-Kristall). Zur Distanzhaltung wurde eine 50 µm dicke Polyethylenfolie mit ausgestanztem Fenster verwendet. Ein Tropfen Vollblut wurde auf eine der Küvetten-scheiben gegeben und die Polyethylenfolie und das Gegenfenster unter Vermeidung von Gasblasenbildung so aufgelegt, daß überschüssiges Blut verdrängt wurde. Die Küvette wurde dann zur Messung in Transmission in den Strahlengang des FTIR-Gerätes gebracht.

Mit CO abgesättigtes Vollblut wurde auf einen plangeschliffenen Meßkristall aufgebracht und im Luftstrom ($T < 30^{\circ}\text{C}$) getrocknet. Die Probe wurde in Transmission gemessen, im Luftstrom schärfer getrocknet, gemessen, 40 Stunden bei 80°C gelagert und erneut gemessen.

Weitere Blutproben wurden aufgetrocknet und bei verschiedenen Temperaturen unterschiedlich lange (z. B. 10 min bei 120°C und 150°C) gelagert und anschließend bezüglich ihrer COHb-Gehalte gemessen. Weiterhin wurden Kleenx-Tücher und schließlich Stücke von einem Laborkittel mit COHb-haltigem Blut unterschiedlicher COHb-Konzentration getränkt, getrocknet und in Transmission mittels FTIR gemessen.

Die FTIR-Messungen wurden mit einem 5 DXB Fourier-Transform-Spektrometer der Firma Nicolet durchgeführt. Diese Konfiguration enthält ein Michelson-Interferometer mit luftgekühlter Strahlungsquelle und Raumtemperaturdetektor, 20/40 Bit-Rechner, Speichermöglichkeit auf einer 1,2M Byte „floppy diskette“, Meßeinheit, Farbdisplay, Bedienungstastenfeld (ASCii) und Mehrfarbenplotter.

Die Interferogramme wurden mit 16000 Datenpunkten aufgenommen und mit dem „HEPP-Genzel-FFT-Algorithmus“ in übliche Spektren (Transmission, Extinktion) transformiert.

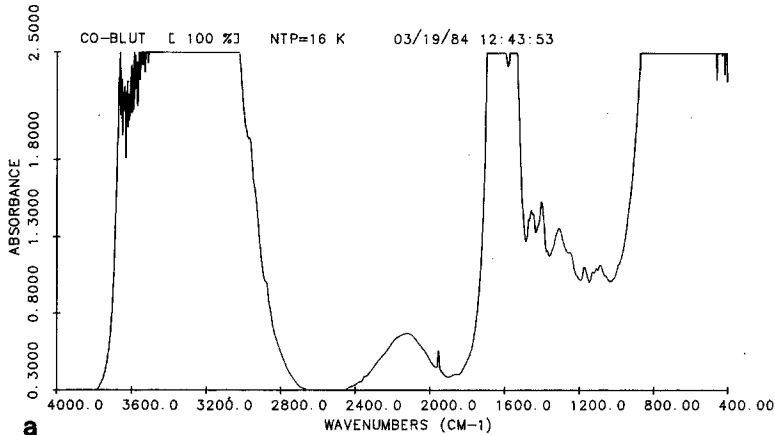
Für die quantitative COHb-Bestimmung wurde eine Normierung durch Superposition der Spektren mit Anpassung im Bereich zwischen $\tilde{\nu} = 1100$ und 1500 (cm^{-1}) durchgeführt, anschließend wurde die Peakfläche $\Delta E \cdot \Delta \tilde{\nu}$ zwischen $\tilde{\nu} 1963$ und 1940 (cm^{-1}) bestimmt und $\Delta E \Delta \tilde{\nu}$ gegen die vorgegebenen COHb-Konzentrationen aufgetragen.

Ergebnisse

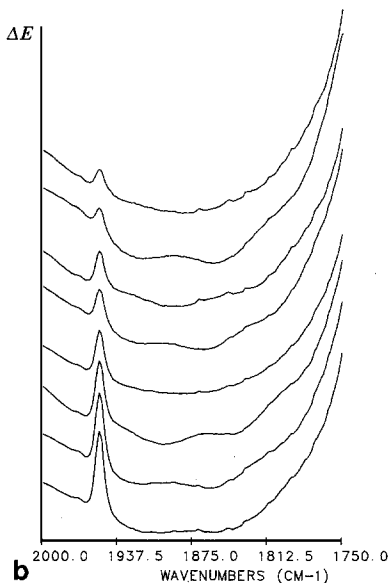
Bei der Messung von COHb-haltigem flüssigen Blut mittels FTIR wurde eine Bande mit einem Maximum bei einer Wellenzahl $\tilde{\nu} = 1953$ (cm^{-1}) beobachtet, die in COHb-freiem Blut nicht auftrat (Abb. 1a). Die Abhängigkeit der Intensität dieser Bande von der COHb-Konzentration ist in Abb. 1b dargestellt. Hier ist auch eine Bande bei 1969 (cm^{-1}) angedeutet zu erkennen.

Die Peakflächen ($\Delta \tilde{\nu} \Delta E$) wurden nach Normierung durch Superposition der Spektren im Bereich zwischen $\tilde{\nu} = 1100$ und 1500 (cm^{-1}) in Abb. 2 gegen die COHb-Konzentrationen aufgetragen. Offenbar besteht ein enger Zusammenhang zwischen den genannten Peakflächen und den COHb-Konzentrationen. Die Konzentrationen werden in % COHb-Sättigung angegeben. Eine Veränderung der spezifischen Dichte des Blutes durch CO-Beladung ist zu vernachlässigen. Zum Vergleich sind typische Ergebnisse mit der von Berg und Döring (1977) modifizierten Methode nach Seifert und Schmieder (1952) aufgetragen.

Bei der FTIR-Messung einer auf einem Meßkristall vorsichtig aufgetrockneten, mit CO gesättigten Blutprobe, fanden sich gegenüber einer COHb-freien Probe zusätzliche Extinktionsmaxima bei $\tilde{\nu} 1953$ und 1969 (cm^{-1}), bei schärferem Trocknen verschwand das Maximum bei 1953 (cm^{-1}) (Abb. 3).



a



b

Abb. 1. a FTIR-Spektrum des CO-Hämoglobins in einer Vollblutprobe. COHb-Bande bei einer Wellenzahl $\tilde{\nu} = 1953 \text{ cm}^{-1}$; spektrale Auflösung der Meßanordnung $\Delta\tilde{\nu} \approx (1 \text{ cm}^{-1})$. **b** FTIR-Spektren bei abgestuften COHb-Konzentrationen von unten beginnend: (flüssige Vollblutproben): mit CO gesättigt, mit (90%, 72%, 54%, 45%, 36%, 23%, 18% und 9%) COHb; COHb-Bande bei $\tilde{\nu} = 1953 \text{ cm}^{-1}$, Bande bei $\tilde{\nu} = 1969 \text{ cm}^{-1}$ nur angedeutet zu erkennen

Während sich die Peakfläche nach einer Trocknungszeit von 40 h nur mäßig verminderte (Abb. 4), verkleinerte sich die Bande bei einer Temperatur von 140°C bereits nach 10 min sehr stark.

Parallel zu dieser Verminderung der genannten Peakflächen schrumpfte die breite Bande mit einem Extinktionsmaximum bei ca. 2125 cm^{-1} , die dem Wassergehalt zuzuordnen ist.

Die Zugabe einer Spatelspitze NaNO_2 zu der zu messenden Blutprobe führte nicht zu Störungen. Nach Zugabe von KCN wurde das Auftreten einer vergleichsweise sehr schwachen Hb-CN-Bande beobachtet.

Für die Messungen an COHb-haltigen Blutflecken auf Papier und Kittelstoff in Transmission ohne jede Präparation sind deutliche Unterschiede bezüglich

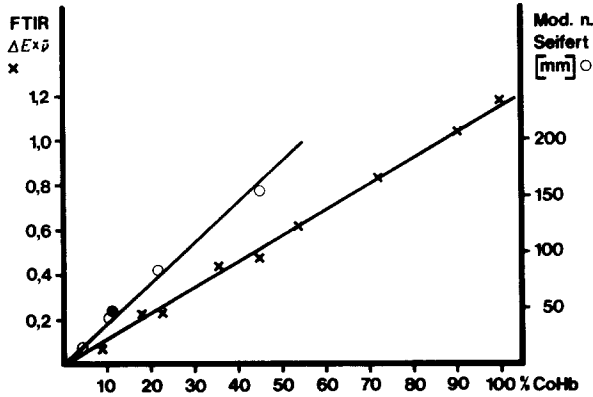


Abb. 2. Auftragungen zweier Meßgrößen gegen verschiedene COHb-Konzentrationen; links Y-Achse $\triangle X$; Messungen mittels FTIR als Maß der COHb-Konzentration; rechts Y-Achse $\triangle O$; Messungen mit dem nach Seifert und Schmieder modifizierten Verfahren; Länge der verfärbten Zone (mm) als Funktion der COHb-Konzentration

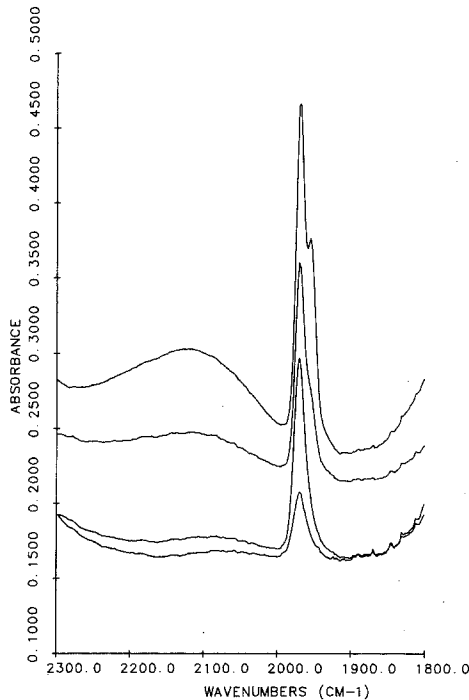


Abb. 3. Veränderungen der COHb-Spektren nach Trocknen und Erhitzen von oben beginnend: mit CO gesättigte Blutprobe, im Luftstrom ($T < 30^\circ\text{C}$) getrocknet; darunter, etwas schärfer getrocknete Blutprobe $30^\circ\text{C} < T < 50^\circ\text{C}$; darunter, 10 min bei 120°C gelagerte, vorher getrocknete Blutprobe; ganz unten, 10 min bei 150°C gelagerte, vorher getrocknete Blutprobe. Die Y-Achse gilt für das unterste Spektrum, die anderen Spektren wurden parallel verschoben

der verschiedenen COHb-Konzentrationen zu erkennen (Abb. 5). Nach Abzug des Untergrundes und des Spektrums eines COHb-freien Vergleichsblutes mittels Rechner ließ sich die COHb-Bande mit einem Extinktionsmaximum bei $1969\text{ (cm}^{-1}\text{)}$ isoliert darstellen.

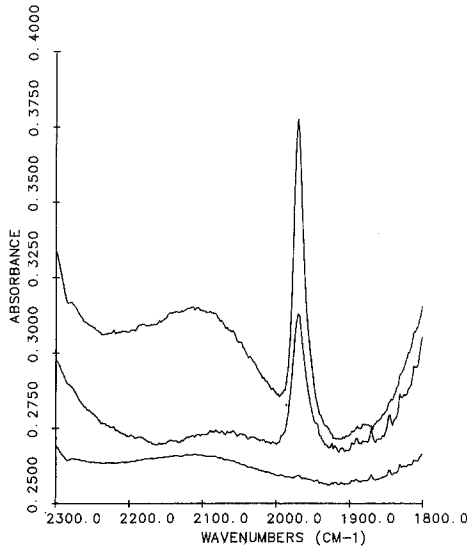


Abb. 4. Veränderungen der COHb-Spektren nach Erhitzen von getrockneten Blutproben von oben beginnend: mit CO gesättigte Blutprobe wurde vorsichtig aufgetrocknet und 40 h bei 80°C gelagert; darunter: mit CO gesättigte, aufgetrocknete Blutprobe wurde 10 min bei 140°C gelagert; ganz unten: aufgetrocknete Blutprobe von einem Nichtraucher, keine CO-Behandlung

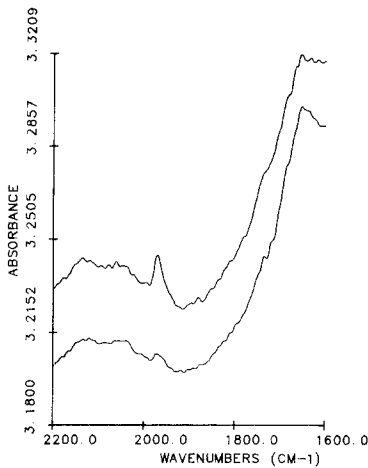


Abb. 5. FTIR-Transmissionsmessungen an Kittelstoff; oberes Spektrum: Blutfleck auf Kittelstoff aufgetrocknet, COHb-Gehalt der flüssigen Blutprobe 90%; unteres Spektrum: Blutfleck auf Kittelstoff, COHb-Gehalt der flüssigen Blutprobe 10%

Diskussion

Zur COHb-Bestimmung in Frischblutproben haben sich die UV-(VIS)-spektrophotometrischen Methoden, die bis in die jüngste Zeit (Siek und Rieders 1984; Parks und Worth 1985) laufend modifiziert wurden, durchaus bewährt. Zur Durchführung solcher Untersuchungen ist auch die hier vorgestellte Methode, die bei entsprechend vorbereitetem Gerät quantitative Messungen an Frischblutproben in weniger als 2 min ermöglicht, gut geeignet.

Besonders bei der Bearbeitung von rechtsmedizinischen Fragestellungen ist mit Veränderungen des Materials durch Alterung, Hitze, Fäulnis und Chemikalieneinwirkung zu rechnen, die die UV-spektrophotometrischen Bestimmungen empfindlich stören können [1, 2, 4, 5, 7, 9, 12, 13, 14]. Eine Methode zur indi-

rekten COHb-Bestimmung nach Freisetzung von CO mit Hilfe der Infrarotspektrophotometrie stellte Feldstein (1964) vor.

Das von Berg und Döring (1977) nach Seifert und Schmieder (1952) bzw. Gettler und Freimuth (1940) modifizierte Verfahren hat sich bei der Bearbeitung von „Problemfällen“ bewährt, wenn ausreichend Material (ca. 1 ml) zur Verfügung stand.

Die FTIR-Methode ermöglicht die direkte Untersuchung von auf den Meßkristall aufgetragenen Blutropfen mit einem Volumen von weniger als einem Mikroliter. Bei Anwendung von Mikrotechniken gestattet die FTIR-Methode sogar die Messung noch wesentlich kleinerer Blutmengen.

Die FTIR-Technik ist offenbar hervorragend geeignet, forensisch relevante Fragestellungen wie die der thermischen Stabilität des COHb-Komplexes zu bearbeiten. Wie aus Abb. 3 und 4 hervorgeht, führt auch die Lagerung eines aufgetrockneten Blutropfens für 40 h bei 80°C nicht zum Auftreten von Störungen.

Die Beständigkeit des trockenen COHb-Komplexes ist nach unseren Untersuchungen stark temperaturabhängig.

Die relative Abnahme der Peakfläche $\Delta E \Delta \tilde{\nu}$ ist nach 40 h Lagerung bei 80°C ungefähr so groß wie nach 10-minütiger Lagerung bei 120°C. Eine Extrapolation zu niedrigeren Temperaturen hin spricht dafür, daß beim Eintrocknen eines Blutropfens bei Zimmertemperatur kaum Verluste bezüglich einer Messung bei $\tilde{\nu} 1969 \text{ (cm}^{-1}\text{)}$ auftreten. Die Bande bei $\tilde{\nu} = 1953 \text{ cm}^{-1}$ kann auch bei vorsichtigem Trocknen fast vollständig verschwinden (Abb. 3). Das Auftreten zweier COHb-Banden ist bei quantitativen Messungen an feuchten Proben zu berücksichtigen. Ein Nachweis von CO kann mit außerordentlich hoher Empfindlichkeit auch mittels der FTIR-Technik geführt werden.

Während die FTIR-Methode u. w. noch nicht zur Messung des COHb-Komplexes eingesetzt worden war, wurde die IR-Spektroskopie von Choc und Caughey (1981) nach aufwendiger Isolierung des Hämoglobins zur Ausmessung der IR-Banden des COHb (A) und COHb (Zürich), nicht aber zur quantitativen CO-Hb-Bestimmung eingesetzt.

Hierbei wurden praktisch in Übereinstimmung mit unserer Arbeit COHb A- und COHb Zürich-Banden bei $\tilde{\nu}_{\text{CO}} = 1968$ und $1951 \text{ (cm}^{-1}\text{)}$ festgestellt. Zusätzlich fand sich bei COHb (Zürich) eine Bande bei $\tilde{\nu} = 1958 \text{ (cm}^{-1}\text{)}$.

Die FTIR-Technik erlaubt die Bearbeitung solcher und ähnlicher Fragestellungen mit minimalem präparatorischen Aufwand selbst mit geringsten Blutmengen. Danach dürfte der Nachweis der genannten Hämoglobinanomalie selbst in Blutspuren möglich sein.

Trotz der Bedenken gegenüber der für diese Meßtechnik unkonventionellen Bedingungen wurde eine Blutprobe in Transmission durch einen Laborkittel hindurch gemessen. Überraschenderweise ließ sich die COHb-Bande bei $1969 \text{ (cm}^{-1}\text{)}$ nach Matrixsubstration mittels Rechner isoliert darstellen. In Abb. 5 sind die Unterschiede der COHb-Banden bei verschiedenen COHb-Konzentrationen deutlich zu erkennen.

Im Vergleich zu den herkömmlichen photometrischen Verfahren demonstriert gerade das letztgenannte Beispiel die Leistungsfähigkeit der FTIR-Methodik, die ihr ganz neue Einsatzmöglichkeiten erschließen dürfte.

Literatur

1. Berg S, Döring G (1977) Bestimmung und Interpretation von CO- und Alkoholwerten in hitzecoaguliertem Blut. *Archiv Kriminol* 160: 1–19
2. Blackmore DJ (1970) The determination of carbon monoxide in blood and tissue. *Analyst* 95: 439–458
3. Choc MG, Caughey WS (1981) Evidence from infrared and ¹³C-NMR spectra for discrete rapidly interconverting conformers at ten carbon monoxid binding sites of hemoglobine A and Zürich. *J Biol Chem* 256: 1831–1838
4. Dominguez AM, Christensen HE, Goldbaum LR, Stenbridge VA (1964) The effect of postmortem changes on carboxyhemoglobin results. *J Forens Sci* 9: 330–341
5. Ekblom-Lindholm K (1968) Effect of heating of blood on the quantitative determination of carbon monoxide haemoglobin. *Dtsch Z Gerichtl Med* 63: 114–117
6. Gettler AO, Freimuth HC (1940) The carbon monoxide content of the blood under various conditions. *Amer J Clin Pathol* 10: 603–616
7. Falconer B, Möller M (1971) The determination of carbon monoxide in blood treated with formaldehyde. *Z Rechtsmed* 68: 17–19
8. Feldstein M (1964) The determination of blood carbon monoxide by infrared spectrophotometry. (16. Ann Meet, Amer Acad of Forensic Sci, Chicago, 29. II. 1964.) *J Forensic Sci* 10: 43–51
9. Im Obersteg J, Kanter M (1951) Quantitative Kohlenbestimmung in Blutspuren. *Dtsch Z Ges Gerichtl Med* 40: 283–297
10. Pankow D (1981) *Toxikologie des Kohlenmonoxids. Volk und Gesundheit*, Berlin
11. Parks J, Worth HGJ (1985) Carboxyhemoglobin determination by second-derivative spectroscopy. *Clin Chem* 31: 279–281
12. Schwerd W (1955) Kohlenoxydbestimmung im Leichenblut. *Dtsch Z Gerichtl Med* 44: 249–258
13. Schwerd W (1962) *Der rote Blutfarbstoff. Schmidt-Römhild, Lübeck*
14. Schwerd W, Schwemmer G (1957) Der Einfluß der Alterung von Blutproben auf das Ergebnis der spektrophotometrischen Kohlenoxydbestimmung. *Arch Toxikol* 16: 393–400
15. Seifert P, Schmieder L (1952) Zur Frage der quantitativen Kohlenoxydbestimmung im Blute. *Dtsch Z Gerichtl Med* 41: 435–440
16. Siek TJ, Rieders F (1984) Determination of carboxyhemoglobin in the presence of other blood hemoglobin pigments by visible spectrophotometry. *J Forensic Sci* 29: 39–54

Eingegangen am 26. April 1985