

Schnellbestimmung von Carboxyhämoglobin in postmortal gewonnenem Blut mittels vollautomatisierter Headspace-Gaschromatographie mit Methanisierung und FID

S.G. Walch¹, D. W. Lachenmeier¹, E.-M. Sohnius¹, B. Madea², F. Mußhoff²

¹ Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt (CVUA) Karlsruhe, Weißenburger Str. 3, D-76187 Karlsruhe, Deutschland

² Institut für Rechtsmedizin der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Stiftsplatz 12, D-53111 Bonn, Deutschland

Abstract

Es wird die Kombination einer vollautomatischen Headspace-Gaschromatographie mit einem Methanizer und einem Flammenionisationsdetektor (FID) als neue Methode für die Bestimmung von Carboxyhämoglobin (COHb) in postmortalen Blutproben vorgestellt. Ein roboterartiger Autosampler wird für das reproduzierbare Mischen und Thermostatisieren (30 min bei 50°C) während der Freisetzung von Kohlenmonoxid (CO) aus COHb eingesetzt. Außer dem Pipettieren der Blutproben und der Freisetzungslösung (Saponin (15 g/l) in 1M Schwefelsäure) werden alle weiteren Schritte vollautomatisch durchgeführt. Nach der Headspace-Injektion und der gaschromatographischen Trennung wird das CO unter Wasserstoffzufuhr durch einen Nickelkatalysator zu Methan reduziert. Dieses wird dann mit Hilfe des FID detektiert. Die Berechnung der COHb-Sättigung der Probe erfolgt durch Bildung des Quotienten zu einer 100% CO-gesättigten Blutprobe:

$$\text{COHb [\%]} = \text{Peakfläche (Originalprobe)} \cdot 100 / \text{Peakfläche (CO gesättigte Probe)}$$

Die Methode ist präzise, die Variationskoeffizienten liegen bei 1,2 - 5,0 % (Intraday) und 3,4 - 11% (Interday). Innerhalb von 2,5 - 100% COHb weist die Methode eine hervorragende Linearität von 0,998 auf. Die Anwendbarkeit der Methode wurde durch die Untersuchung an postmortal entnommenen Blutproben gezeigt. Die erhaltenen Ergebnisse wurden mit denen der photometrischen Standard-Bestimmung verglichen. Die vorgestellte Methode erweist sich insbesondere als vorteilhaft bei der Untersuchung von Blutproben aus fäulnisverändertem Probenmaterial oder Proben, die durch thermischen Stress verändert wurde.

1. Einleitung

Endogenes Kohlenmonoxid wird beim katabolen Abbau von Häm produziert. Dies führt zu einer COHb Untergrundsättigung von 0,4 - 0,7% in gesunden Menschen. CO ist ein ubiquitär vorkommendes Produkt einer unvollständigen Verbrennung von kohlenstoffhaltigen Materialien und häufig Ursache von akzidentellen Vergiftungen bei unsachgemäßen Heizprozessen im Haushalt. Ferner

werden die Abgase von Automobilen, die bis zu 10% Kohlenmonoxid enthalten, häufig und effektiv in suizidaler Absicht eingesetzt [1].

Die Affinität von Kohlenmonoxid zu Hämoglobin ist im Vergleich zu Sauerstoff 220 mal höher. Daher verdrängt es den Sauerstoff aus der Bindung mit Oxyhämoglobin und verändert die allosterische Struktur von Hämoglobin derartig, dass die Affinität der restlichen Bindungsstellen für Sauerstoff verstärkt wird. Daraus resultiert, dass zum einen die Transportkapazität des Blutes für Sauerstoff zurückgeht und zum anderen die Freisetzung von Sauerstoff am Zielgewebe verhindert wird. Insgesamt führt dieser Vorgang zu einer fortschreitenden Hypoxie bzw. Hypoazidose.

In der forensischen Toxikologie wird u.a. regelhaft das Blut von Verbrennungsopfern auf den COHb-Gehalt hin untersucht. Sättigungsgrade von über 50% gelten als Beweis dafür, dass die primäre Todesursache eine Kohlenmonoxidvergiftung ist. Sättigungsgrade zwischen 10 und 50% zeigen, dass Rauch eingeatmet wurde und das Kohlenmonoxid einen Beitrag zur Todesursache leistete und das Opfer beim Ausbruch des Brandes noch am Leben war.

In Fällen, in denen der Grad der Sättigung unter 10% liegt, wird davon ausgegangen, dass das Opfer beim Ausbruch des Brandes bereits tot war oder kurz nach dem Ausbruch verstorben ist. Diese Information kann sowohl in einem zivil- oder versicherungsrechtlichen Verfahren als auch in kriminalistischen Ermittlungen eine bedeutende Rolle spielen [1].

Als Standardmethode für die COHb Bestimmung hat sich eine spektral-photometrische Bestimmung etabliert, die dazu entwickelt wurde, den prozentualen Gehalt an Hämoglobin zu ermitteln, das sich mit CO zu COHb verbunden hat [2]. Ein großer Nachteil dieser Methode besteht darin, dass sie gerade bei degradierten oder postmortal erhobenen Blutproben ungenau ist, da sich oft bei solchen Proben spontan Methämoglobin oder auch Sulfhämoglobin bildet. Blutproben, die großer Hitze ausgesetzt wurden, können dabei deutliche Veränderungen erfahren, vor allem kann eine Thermo-Koagulation auftreten, die sich in einem signifikanten Abfall der Gesamtkonzentration an löslichem Hämoglobin und Auftreten von Methämoglobin äußert. Die Sicherheit einer Bestimmung kann erheblich beeinträchtigt werden [3,4].

Aus diesem Grund ist es vorteilhafter, Techniken zu benutzen, die das Kohlenmonoxid aus dem Blut freisetzen. So ist es möglich, dass CO selbst mit einer hochselektiven gaschromatographischen Methode zu bestimmen. In dieser Arbeit wurde für die CO Freisetzung die Methode von *Sundin & Larsson* [5] angewandt, bei der Schwefelsäure und Saponin (oberflächenaktiver Stoff, der bereits in geringer Konzentration eine Hämolyse verursacht) eingesetzt werden. Diese wurde zum ersten Mal vollautomatisch mit einem roboterartigen Autosampler durchgeführt. Die gaschromatographische Analyse erfolgte mittels Nickel-Katalysator und FID.

2. Material und Methoden

Probenvorbereitung: Die Vorbereitung der Blutproben erfolgte angelehnt an ein Verfahren von *Sundin & Larsson* [5]. Zur Herstellung der Freisetzungslösung wurden 7,5 g Saponin aus Quillaja-Rinde in 473 ml dest. Wasser und 27 ml Schwefelsäure (95-97%) gelöst. Zur Probenvorbereitung wurden 400 µl Blut in ein 20 mL Headspaceglas pipettiert und das Glas sofort mit einem Silikon/Teflon-Septum und einer magnetischen Bördelecke verschlossen. 2 Kanülen wurden durch das Septum gestochen und 5 min mit Stickstoff gespült. 800 µl Freisetzungslösung wurden mit einer Insulinspritze durch das Septum hinzugegeben.

Zur Berechnung der COHb-Sättigung wurde ein weiteres Proben-Aliquot von 400 µl in ein 20 mL Headspaceglas gegeben. 2 Kanülen wurden durch das Septum gestochen und die Probe 30 min mit Kohlenmonoxid und danach 5 min mit Stickstoff gespült. 800 µl Freisetzungslösung wurden danach mit einer Insulinspritze durch das Septum hinzugegeben. Die Berechnung erfolgte nach der Methode von *van Dam & Daenens* [6] nach folgender Formel: $\text{COHb [\%]} = \frac{\text{Peakfläche (Originalprobe)} \cdot 100}{\text{Peakfläche (CO gesättigte Probe)}}$.

GC/FID-Methode: Für die Analysen wurde ein Agilent 6890 Gaschromatograph verwendet (Agilent, Waldbrunn, Deutschland). Das System war mit einem CTC-Combi-PAL-Autosampler ausgestattet. Die Proben wurden jeweils 30 min im Agitator des Autosamplers zur vollständigen CO-Freisetzung geschüttelt (450 rpm). Danach wurden 400 µl mit einer Headspace-Spritze (beheizt auf 50°C) splitless injiziert (Injektortemperatur 210°C). Die chromatographische Trennung erfolgte an einer 50 m langen PLOT Fused-Silica Säule mit einem Innendurchmesser von 0,53 mm und einer Beschichtung mit Molekularsieb von 5 Å (Varian). Als Trägergas diente Helium mit einem konstanten Volumenstrom von 12 ml/min. Das Temperaturprogramm sah folgendermaßen aus: 80°C für 5 min, 20°C/min bis 300°C für 15 min. Der Nickelkatalysator wurde bei 375°C mit 5 ml/min Wasserstoffzuschlag betrieben. Die FID-Detektortemperatur betrug 320°C.

Spektralphotometrische Methode: Zur Validierung der GC-Methode wurden alle Proben auch mittels einer spektralphotometrischen Standardmethode auf ihren COHb-Gehalt untersucht. Verwendet wurde die Zweiwellenlängenmethode für Spektralphotometer ohne isosbestische Wellenlänge in Anlehnung an *Hüfner, Heilmeyer, Schwerd* und *Schwemmer* [2]. Vergleichend analysiert wurden 20 Proben von forensischen Fällen, in denen aufgrund eines entsprechenden Verdacht postmortal Blut für eine CO-Hb-Bestimmung asserviert worden waren. Diese Proben wurden aktuell, d.h. nach einer Lagerung bei 4°C nochmals spektralphotometrisch untersucht, bevor eine gaschromatographische Analyse erfolgte.

3. Ergebnisse und Diskussion

Die oben angegebenen CO-Freisetzungsbedingungen wurden durch Optimierung der Temperatur des Agitators, sowie der benötigten Freisetzungszeit ermittelt. Die Freisetzungszeit wurde zwischen 5 und 80 min variiert. Keine signifikanten Unterschiede der CO-Ausbeute oder ein Trend konnten ermittelt werden. Offensichtlich wird das Kohlenmonoxid schon nach kurzer Einwirkungszeit der Saponin-Schwefelsäure vollständig freigesetzt. Der Einfluß der Freisetzungstemperatur wurde zwischen 40 und 70°C untersucht. Auch hier konnte kein signifikanter Einfluß auf die CO-Ausbeute ermittelt werden. In der von *Sundin & Larsson* vorgeschlagenen Probenvorbereitung wird keine Temperierung während der Freisetzung vorgeschlagen, womit eine längere Freisetzungszeit nötig war [5]. Um

eine sichere Freisetzung bei guter Reproduzierbarkeit zu gewährleisten, wurde eine Freisetzungszeit von 30 min bei einer Temperatur von 50°C gewählt.

Typische Chromatogramme von authentischen postmortal gewonnenen Blutproben sind in Abb. 1 und Abb. 2 dargestellt. Der CO-Peak ist deutlich ausgeprägt. Peaks von Verunreinigungen sind nicht zu erkennen. Der Peak von reinem Methangas kann anhand der unterschiedlichen Retentionszeit deutlich von dem methanisierten CO-Peak unterschieden werden. Weder O₂, noch N₂ erzeugen ein Signal im Detektor bei den gewählten chromatographischen Bedingungen. Peakreinheit und Selektivität sind damit sichergestellt.

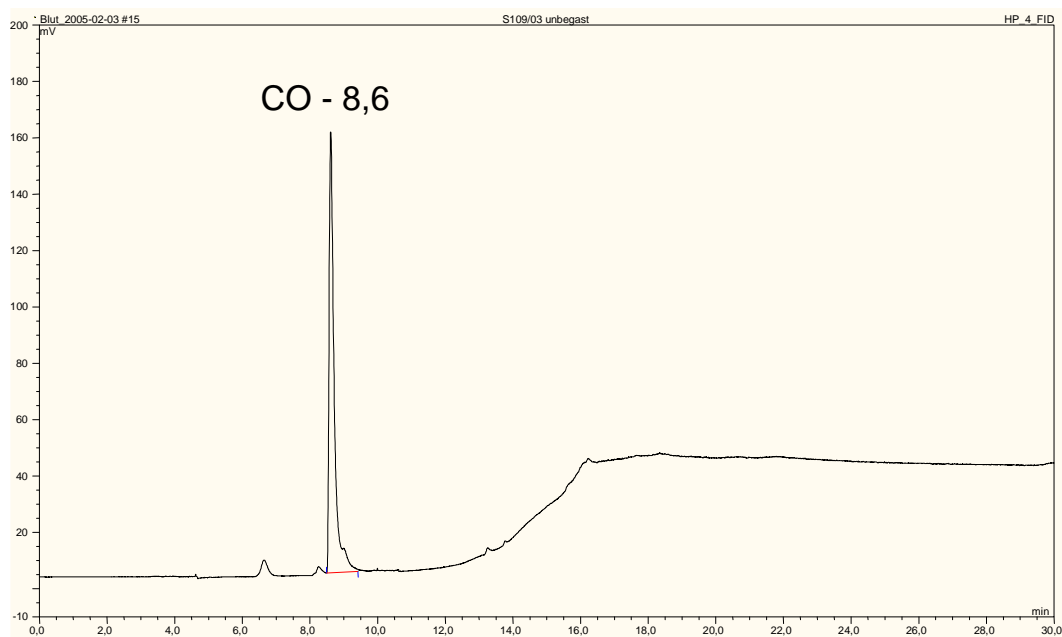


Abb. 1: Chromatogramm einer authentischen Postmortem-Blutprobe mit einem COHB-Gehalt von 2,0%

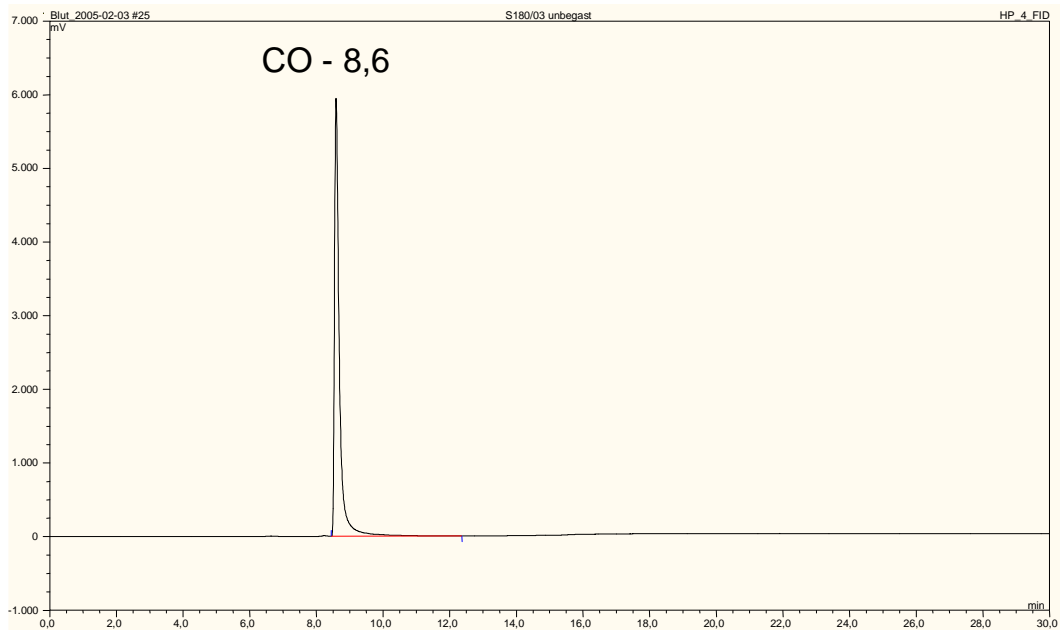


Abb. 2: Chromatogramm einer authentischen Postmortem-Blutprobe mit einem COHb-Gehalt von 90,6%

Wegen der hohen Sensitivität des Nickel-Katalysators war es möglich, auch niedrige Gehalte von CO mit guter Genauigkeit zu bestimmen. Die Variationskoeffizienten liegen bei 1,2 - 5,0% (Intraday) und 3,4 - 11% (Interday), so dass die Methode als außerordentlich präzise gelten kann (Tabelle 1). Die Linearität der Methode wurde durch die Untersuchung von Blutverdünnungen mit variierendem COHb-Gehalt (2,5 - 100%) gezeigt. Dabei wurde eine hervorragende Korrelation von 0,998 festgestellt. Die Validierungsdaten beweisen die Empfindlichkeit, Selektivität und Reproduzierbarkeit des Verfahrens.

Tab. 1: Validierungsergebnisse

COHb-Sättigung	2,5%	10%	40%	100%
Intraday-Präzision [%]	1,2	4,5	5,0	2,3
Interday-Präzision [%]	3,4	7,9	7,0	11,0

Die Anwendbarkeit der Methode wurde durch die Untersuchung an postmortal entnommenen Blutproben belegt. Die erhaltenen Ergebnisse wurden mit denen der photometrischen Standard-Bestimmung verglichen. Eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse mit einer Korrelation von $R=0,917$ wurde erzielt (Abbildung 3).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sich die vorgestellte Methode insbesondere bei Blutproben aus bereits in Zersetzung befindlichem Probenmate-

rial oder Proben, deren Hämoglobinzusammensetzung durch thermische Einwirkung verändert wurden, als vorteilhaft erweist.

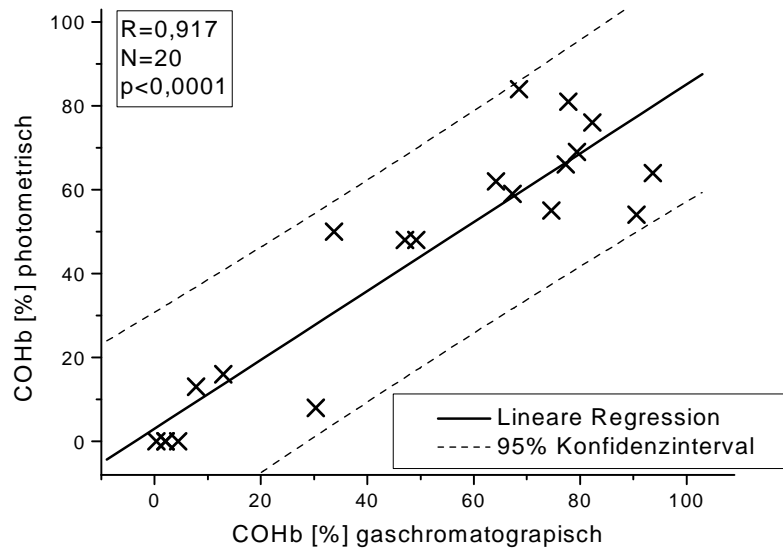


Abb. 3: Korrelation der gaschromatographischen und spektralphotometrischen Ergebnisse von 20 Postmortem-Blutproben

4. Danksagung

Die Autoren danken Herrn W. Cammann (CVUA Karlsruhe) für sein Engagement bei der Etablierung der Methode. Frau A. Stumpf und Frau L. Knippenberg (Institut für Rechtsmedizin Bonn) wird für die sorgfältigen spektralphotometrischen Messungen gedankt.

5. Literatur

- [1] Widdop B (2002) Analysis of carbon monoxide. *Ann. Clin. Biochem.* 39: 378-391
- [2] Schütz H, Machbert G (1988) Photometrische Bestimmung von Carboxy-Hämoglobin (COHb) im Blut, Mitteilung VIII der Senatskommission der Deutschen Forschungsgemeinschaft für Klinisch-toxikologische Analytik. VCH-Verlagsgesellschaft, Weinheim.
- [3] Klöppel A, Weiler G (1986) Fäulnisbedingte Konzentrationsänderungen und zeitliche Nachweisbarkeit von Kohlenmonoxid in Leichenblutproben. *Z. Rechtsmed.* 97: 75-81
- [4] Iffland R, Madea B, Balling P (1988) Diagnose Kohlenmonoxidvergiftung nach Einbalsamierung und Exhumierung. *Arch. Kriminol.* 182: 101-106

- [5] Sundin A M, Larsson J E (2002) Rapid and sensitive method for the analysis of carbon monoxide in blood using gas chromatography with flame ionisation detection. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 766: 115-121
- [6] Van Dam J, Daenens P (1994) Microanalysis of carbon monoxide in blood by head-space capillary gas chromatography. *J. Forensic Sci.* 39: 473-478

6. Anschrift der Autoren

Stephan G. Walch
Dr. rer. nat. Dirk W. Lachenmeier
Eva-Maria Sohnus
Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt (CVUA) Karlsruhe
Weißburger Str. 3
D-76187 Karlsruhe
E-Mail: Lachenmeier@web.de

Prof. Dr. med. Burkhard Madea
Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Frank Mußhoff
Institut für Rechtsmedizin
Rheinische-Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
Stiftsplatz 12
D-53111 Bonn