

# Quantitative Bestimmungsmethode geringer Bilirubinmengen.

Von

**E. Herzfeld.**

(Aus dem chem. Laboratorium der mediz. Universitätsklinik Zürich.

Direktor: Prof. Dr. H. Eichhorst.)

(Der Redaktion zugegangen am 1. März 1912.)

Über die quantitativen Verhältnisse der im Körper unter normalen und pathologischen Bedingungen vorkommenden Bilirubinmengen liegen nur spärliche, wenig übereinstimmende Resultate vor. Unter den bekannten Methoden versagten einzelne in vielen Fällen, namentlich wenn es sich um den Nachweis geringer Bilirubinmengen handelte. So die Methode von A. Jolles, die auf Titration mit einer  $n/10$ -Jodlösung, bis die ursprünglich braune Farbe ins Grüne umschlägt, beruht, konnte z. B. beim Blutserum nicht angewandt werden. Gilbert, M. Herscher und S. Posternack wollen durch geeignete Verdünnung des Serums die Grenze der Empfindlichkeit der Gmelinschen Reaktion erreichen und daraus die Bilirubinmenge berechnen. Für die quantitative Bestimmung von Bilirubin im Harn hat Bouma die kolorimetrische Bestimmung des grünen Farbstoffes vorgeschlagen, welcher durch alkoholische Eisenchloridsalzsäure gebildet wird. Auch bei der Anwendung dieser Methode konnten keine einheitlichen Resultate erzielt werden.

Verfasser hat beobachtet, daß eine alkoholische Bilirubinlösung, mit einigen Tropfen Ehrlichscher p-Dimethylaminobenzaldehydlösung<sup>1)</sup> schwach erwärmt, eine ziemlich beständige grüne Lösung gibt, die zu spektrophotometrischen Untersuchungen besonders geeignet schien. Zwar entsteht in einer alkoholischen

<sup>1)</sup> Nach Pröscher p-Dimethylaminobenzaldehyd 20 g, HCl $\bar{u}$  500 ccm. H $_2$ O 500 ccm.

Bilirubinlösung auch auf Zusatz einiger Tropfen HCl eine Grünfärbung, doch erwies sich diese als weniger beständig.

Mit Urobilin und einigen Lipochromen fiel die Reaktion negativ aus, sie scheint also für Bilirubin charakteristisch zu sein. Ob aber die Reaktion sich quantitativ vollzieht, sollte in dem folgenden festgestellt werden. Zu diesem Zwecke mußte von reinem Bilirubin ausgegangen werden, welches auch nach den Angaben von H. Fischer dargestellt werden konnte. 250 g Gallensteine ergaben eine Ausbeute von 0,0835 g reinem Bilirubin. Davon wurden 0,0132 g in wenig warmem absoluten Alkohol gelöst und bis 100 ccm aufgefüllt. Es enthielten also:

100 ccm abs. Alkohol	0,0132	g	Bilirubin
10 » » »	0,00132	»	»
1 » » »	0,000132	»	»

Setzt man nun zu 1 ccm obiger Lösung 1 ccm Ehrlichs Reagens hinzu und erwärmt schwach, so tritt nach einigen Minuten eine deutliche grüne Farbe auf, die auch beim Auffüllen bis 100 ccm erkennbar ist. Dies scheint die Grenze zu sein; es entspricht einer Konzentration von etwa 1 : 750000.

Die Untersuchungen wurden mit dem Königschen Spektralphotometer nach den Angaben von F. F. Martens und F. Grünbaum ausgeführt. In bezug auf die Methodik sei folgendes erwähnt. Ist «d» die Dicke einer planparallelen, senkrecht durchstrahlten, absorbierenden Schicht, «J» die eintretende, «J<sub>1</sub>» die austretende Lichtintensität, dann ist die durch Absorption erzielte Lichtschwächung durch eine Konstante, den Extinktionskoeffizienten, bestimmt.

$$J_1 = J \cdot 10^{-\epsilon \cdot d}$$

« $\epsilon$ » läßt sich aus dem gemessenen Schwächungsverhältnis  $J_1 : J$  bzw. den tg der abgelesenen Winkel berechnen. Ist « $\epsilon$ » der Extinktionskoeffizient der Lösung, « $\epsilon_0$ » der des Lösungsmittels, so kann man folgende Gleichung schreiben:

$$\frac{10^{-\epsilon \cdot d}}{10^{-\epsilon_0 \cdot d}} = \frac{\text{tg } \alpha_2}{\text{tg } \alpha_1}$$

$$\epsilon - \epsilon_0 = \frac{\log \text{tg } \alpha_1 - \log \text{tg } \alpha_2}{d}$$

Zahlreiche Bestimmungen bestätigen, daß der Extinktionskoeffizient der Bilirubinmenge proportional ist. Es seien als Beispiel folgende erwähnt.

Versuch I. 1 ccm alkoholische Bilirubinlösung, enthaltend 0,000132 g Bilirubin + 1 ccm Reagens, schwach erwärmt, nach dem Abkühlen mit absolutem Alkohol auf 100 ccm aufgefüllt. Die Röhrenlänge betrug 5 cm.

1. Rechts Lösung.		Links Alkohol.	
43,2 +	137,3 -	223,7 +	318,2 -
180 +	223,2 +	180 +	403,7 +
223,2	85,9	403,7	85,5
	$85,7 : 2 = 42,85$		$\alpha_2 = 42^\circ 51'$

2. Rechts Alkohol.		Links Lösung.	
42,8	136,8	221,9	315,0
180	222,8	180	401,9
222,8	86,0	401,9	86,9
	$86,45 : 2 = 43,225$		$\alpha_1 = 43^\circ 14'$
	$\log \operatorname{tg} 43^\circ 14' = 0,97320 - 1$		
	$\log \operatorname{tg} 42^\circ 51' = 0,96712 - 1$		
	$\epsilon \cdot d = 0,00608$		$\epsilon = 0,00121$

Versuch II. 10 ccm enthaltend 0,00132 g Bilirubin + 1 ccm Reagens, erwärmen, auffüllen bis 100 ccm.

1. Rechts Lösung.		Links Alkohol.	
39,6	140,9	219,1	321,1
180	219,6	180	399,1
219,6	78,7	399,1	78,0
	$78,35 : 2 = 39,17$		$\alpha_2 = 39^\circ 10'$

2. Rechts Alkohol.		Links Lösung.	
46,6	135,1	225,9	314,6
180	226,6	180	405,9
226,6	91,5	405,9	91,3
	$91,4 : 2 = 45,7$		$\alpha_1 = 45^\circ 42'$
	$\log \operatorname{tg} 45^\circ 41' = 0,01036$		
	$\log \operatorname{tg} 39^\circ 10' = 0,91095 - 1$		
	$\epsilon \cdot d = 0,09941$		$\epsilon = 0,0198$

Versuch III. 20 ccm enthaltend 0,00264 g Bilirubin + 1 ccm Reagens, erwärmen, auffüllen bis 100 ccm.

1. Rechts Lösung.		Links Alkohol.	
39,8	141,7	218,8	320,5
180	219,8	180	398,8
219,8	78,1	398,8	78,3
	$78,2 : 2 = 39,1$		$\alpha_1 = 39^\circ 6'$

2. Rechts Alkohol.		Links Lösung.	
51,5	128,7	231,9	309,1
180	231,5	180	411,0
<u>231,5</u>	102,8	411,9	102,8
	102,8 : 2 = 51,4	$\alpha_1 = 51^\circ 24'$	
	log tg $51^\circ 24' = 0,09784$		
	log tg $39^\circ 6' = 0,90992 - 1$		
	$\epsilon \cdot d = 0,18792$	$\epsilon = 0,03758$	

Versuch IV. 30 ccm enthaltend 0,00396 g Bilirubin + 1 ccm Reagens. erwärmen, auffüllen bis 100 ccm.

1. Rechts Lösung.		Links Alkohol.	
36,5	144,1	216,2	323,6
180	216,5	180	396,2
<u>216,5</u>	72,4	396,2	72,6
	72,5 : 2 = 36,25	$\alpha_2 = 36^\circ 15'$	

2. Rechts Alkohol.		Links Lösung.	
54,8	125,5	234,5	305,5
180	234,8	180	414,5
<u>234,8</u>	109,3	414,5	109,0
	109,15 : 2 = 54,57	$\alpha_1 = 54,34'$	
	log tg $54^\circ 34' = 0,14780$		
	log tg $36^\circ 15' = 0,86524 - 1$		
	$\epsilon \cdot d = 0,28256$	$\epsilon = 0,05651$	

Bei Versuch I, wie aus obigem ersichtlich, wurde der  $\frac{1}{10}$ -Teil der bei Versuch II angewandten Bilirubinmenge bestimmt und sollte daher für « $\epsilon$ » den zehnten Teil ergeben, jedoch ist eine Differenz von 0,0007 gefunden worden, was mit der überaus großen Verdünnung zu erklären ist. Die übrigen Werte für « $\epsilon$ » stimmen fast genau; auf 10 ccm wurde erhalten  $\epsilon$ , auf 20 ccm  $2\epsilon$  und auf 30 ccm  $3\epsilon$ .

Was nun die Anwendung dieser Methode anbelangt, so wurden zunächst Versuche mit Blut ausgeführt und wie folgt verfahren. Etwa 20 ccm Blut werden in ein Reagenzglas gelassen, das obere Niveau mit einem Fettstift genau bezeichnet und dann in eine Reibschale gegossen. Das Reagenzglas wird mit absolutem Alkohol gut ausgewaschen und das Volumen bis zur angebrachten Marke ausgemessen. Hierauf wird das Blut in der Reibschale mit absolutem Alkohol gut verrieben, dann in einen 100 ccm-Meßkolben filtriert, mit absolutem Alkohol nachgewaschen, bis der Kolben etwa  $\frac{3}{4}$  gefüllt ist. Zum klaren, gelblichen Filtrat werden 1—2 ccm Ehrlichs Reagens hinzu-

gefügt, schwach erwärmt (Wasserbad), bis eine bleibende Grünfärbung entstanden ist, dann nach dem Abkühlen bis zur Marke mit absolutem Alkohol aufgefüllt. Diese Lösung kann dann spektrophotometrisch untersucht werden. Angenommen, es wäre für diese Lösung ein Extinktionskoeffizient  $\epsilon_x$  gefunden worden, so kann die Menge des Bilirubins wie folgt berechnet werden.

$$\begin{aligned} \epsilon : 0,00132 &= \epsilon_x : X \\ X &= \frac{0,00132 \cdot \epsilon_x}{\epsilon} \end{aligned}$$

Die bisherigen Bestimmungen ergaben gute, übereinstimmende Resultate. Weitere Versuche sind noch im Gange.

#### Literatur.

- A. Jolles, Journ. f. prakt. Chem., Bd. 61, S. 568 (1900).  
 A. Gilbert, M. Herscher u. S. Posternak, Compt. rend. de la Soc. de Biol., Bd. 55, S. 530, 1587 (1903).  
 J. Bouma, Deutsch. med. Wochenschr., 1904, S. 881.  
 H. Fischer, Diese Zeitschrift, Bd. 73, Heft 3 u. 4 (1911).  
 F. F. Martens u. F. Grünbaum, Ann. d. Physik, IV., Bd. 12, S. 997 (1903).