

## Zur Photometrie des Blutfarbstoffes.

Von  
**E. E. Butterfield.**

(Aus dem Rockefeller-Institute, New York.)

(Der Redaktion zugegangen am 12. Juni 1912.)

Die Anwendung des Spektrophotometers zur Ermittlung der Konzentration eines farbigen Körpers hat bekanntlich beim Arbeiten mit dem Blutfarbstoff den großen Vorteil, daß man die Bestimmung der Hämoglobinkonzentration ebenso gut mit lackfarbenem Blut als mit reinen Hämoglobinlösungen vornehmen kann, nachdem die erforderliche Konstante der Lichtabsorption des reinen Körpers bekannt ist. Bisher wurde so verfahren, daß aus der Lichtabsorption einer ca. 100fach verdünnten Lösung auf die Konzentration der konzentrierten Lösung geschlossen wurde. Dabei mußte die Gültigkeit des Beerschen Gesetzes für große Konzentrationsintervalle vorausgesetzt werden. Dies würde notwendigerweise eine weitere Annahme in sich schließen, nämlich die, daß bei der Verdünnung des Blutfarbstoffs weder konstitutive Änderung noch Dissoziationsvorgänge, welche die Lichtverteilung im Spektrum ändern würden, auftreten. Nun ist gerade in den letzten Jahren die Gültigkeit des Beerschen Gesetzes einerseits angezweifelt worden, und andererseits glaubt Manchot<sup>1)</sup> annehmen zu müssen, daß im unverdünnten Blut bei normalem Luftdruck beträchtliche Mengen ungesättigten Hämoglobins neben Oxyhämoglobin enthalten seien. Die Feststellung der Grenzen, innerhalb deren das Beersche Gesetz gültig ist, würde von praktischer Bedeutung für die Hämoglobinbestimmung sein. Besonders mußte dabei auf die

<sup>1)</sup> Ann. d. Chem., Bd. 370, S. 280 (1909).

Lichtabsorption konzentrierter Lösungen geachtet werden; denn es wäre wünschenswert, bei künftigen Dissoziationsstudien die spektrophotometrischen Messungen direkt an den dazu verwendeten, meist konzentrierten Lösungen vorzunehmen. Ferner würde man Aufschlüsse über die eventuelle Verschiebung des Verhältnisses Hämoglobin zu Oxyhämoglobin erhalten, die bei der Verdünnung des Blutes unter gleichbleibendem Sauerstoffdruck auftritt.

Ich habe es daher unternommen, die Lichtabsorption des Blutfarbstoffs innerhalb sehr weiter Konzentrationsgrenzen zu untersuchen. Es hat sich ohne weiteres herausgestellt, daß das Beersche Gesetz innerhalb der untersuchten Grenzen streng gültig ist. Dieses Ergebnis besagt, daß Änderungen des Verhältnisses Hämoglobin zu Oxyhämoglobin ausgeschlossen sind. Neuerdings haben Heubner und Rosenberg<sup>1)</sup> mittels einer sinnreichen photographisch-photometrischen Methode die Lichtverteilung im Spektrum des 10-, 60- und 220fach verdünnten Kaninchenblutes untersucht. Sie konnten dabei «ein Argument für die Richtigkeit der Ansicht Manchots nicht gewinnen». In der Arbeit Manchots waren jedoch die Unterschiede in der Sauerstoffbindung am ausgeprägtesten zwischen dem unverdünnten und dem 10fach verdünnten Blut. Um die Ergebnisse der spektrophotometrischen Messungen mit denen der gasanalytischen Methoden zu vergleichen, müßte man noch die Messungen der Lichtabsorption an derselben Konzentrationsreihe wie Manchot vornehmen.

Ich möchte bei dieser Gelegenheit zu der Arbeit von Heubner und Rosenberg bemerken, daß überall dort, wo unsere Beobachtungen zusammenfallen, die erfreulichste Übereinstimmung zu konstatieren ist. Besonders gilt dies für ihre Werte für  $\frac{\epsilon \text{ max. Grün}}{\epsilon \text{ min. Gelb}}$ . In einer früheren Untersuchung<sup>2)</sup> habe ich eine Erklärung dafür gegeben, warum der Quotient  $\frac{\epsilon'}{\epsilon}$  von Hüfner keine absolute Konstante sein konnte. Der Wert des Quotienten nämlich ist bei den bisherigen Versuchen von der Reinheit des Spektrums, von der Breite des herausgeschnittenen Spektralgebietes,

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschrift, Bd. 38, S. 345 (1912).

<sup>2)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 62, S. 198—204 (1909).

sowie auch von wohl unvermeidlichen Fehlern in der Konstruktion des Apparates abhängig. Der Quotient wird erst dann einen konstanten Wert annehmen, wenn die Absorption bei einer einzelnen Wellenlänge mit fehlerfreiem Apparat gemessen wird. Da nun der Quotient  $\frac{\epsilon'}{\epsilon}$  das Verhältnis der durchschnittlichen Absorption im Bereich eines Maximums zu der eines Minimums darstellt, so ist es ohne weiteres klar, daß der höchste Zahlenwert des Verhältnisses erreicht wird, wenn genau bei der Wellenlänge des Maximums, sowie genau bei der des Minimums gemessen wird. Deshalb habe ich früher mit dem Apparat von Martens und Grünbaum die Lage des Maximums und des Minimums photometrisch bestimmt und das Verhältnis  $\frac{\epsilon \text{ max. Grün}}{\epsilon \text{ min. Gelb}}$  bei möglichst kleinen Kollimator- und Okularspaltbreiten gemessen. Bei Rinderhämoglobin und Menschenblut erhielt ich den Wert 1,67. <sup>1)</sup> Nun haben Heubner und Rosenberg den gleichen Wert für  $\frac{\epsilon \text{ max. Grün}}{\epsilon \text{ min. Gelb}}$  auf photographischem Weg erhalten.

Bei der vorliegenden Untersuchung wurden die Messungen mit dem Apparat von König, Martens und Grünbaum an Lösungen von Oxyhämoglobin, sowie auch an lackfarbenem Blut bei Zimmertemperatur gemacht. Als Beleuchtungsquelle diente meist die Cooper-Hewittsche Quecksilberlampe, seltener die Na-Flamme. Kleine Schichtdicken wurden dadurch erreicht, daß man dünne Metallringe (0,018 cm bis 0,117 cm) zwischen die planparallelen Glasplatten brachte und das Ganze in der Fassung des 2 cm langen Absorptionsrohres fest einschraubte. Die Reflexionen wurden mit einer gleich dicken Schicht Wasser zwischen Glasplatten kompensiert.

Es darf nicht verschwiegen werden, daß die Justierung des Apparates besonders wegen der Beleuchtungsvorrichtung ungemeine Sorgfalt erfordert. Bei den kaum zu vermeidenden Fehlern wird, obwohl alle Vorsichtsmaßregeln, wie Kontrollierung des Strahlenganges, Eliminierung von Asymmetrien, Kompensation der Reflexionen usw., getroffen wurden, kein Anspruch auf absolute Zahlen erhoben. Es genügt vielmehr für den Zweck dieser Arbeit, daß die Extinktionskoeffizienten verschieden konzentrierter Lösungen desselben Präparates unter sich vergleichbar sind. Deshalb wurde bei einem gegebenen Blut- oder Hämoglobinpräparat die Reihe von Messungen bei unveränderter Justierung des Apparates, der

<sup>1)</sup> Butterfield, l. c., S. 201.

<sup>2)</sup> Heubner und Rosenberg, l. c., S. 375.

Beleuchtungsvorrichtung und Lichtquelle vorgenommen und ohne Unterbrechung durchgeführt.

Die Bezeichnungsweise ist die übliche.<sup>1)</sup>  $\alpha_2$  = Stellung des Nicols bei gleicher Helligkeit der Felder, absorbierende Lösung rechts, Wasser links;  $\alpha_1$  = Ablesung nach Vertausch der Absorptionsröhre.  $c$  = Konzentration (meist relativ ausgedrückt),  $d$  = Schichtdicke,  $\epsilon$  = Extinktionskoeffizient.

Tabelle I.

Oxyhämoglobin vom Rind.

Konzentration der Stammlösung = 9,96 g in 100 ccm Wasser.

Beleuchtung mit Na-Flamme.

Wellenlänge $\mu\mu$	Konzentration relativ $c$	Schichtdicke cm	$\alpha_2$ Grad	$\alpha_1$ Grad	Extinktionskoeffizient $\epsilon$
589	1	0,049	9,17	65,18	23,0
589	$\frac{1}{40}$	2,00	9,13	65,60	22,7
589	$\frac{1}{30}$	2,00	16,71	47,99	22,7

Tabelle II.

Lösung gewaschener Blutkörperchen vom Schaf.

Stammlösung = 1 Volumenteil Blutkörperchenmasse +  $1\frac{1}{2}$  Volumenteile Wasser. Beleuchtung: Hg-Lampe.

Wellenlänge $\mu\mu$	Konzentration relativ $c$	Schichtdicke cm	$\alpha_2$ Grad	$\alpha_1$ Grad	Extinktionskoeffizient $\epsilon$
546	1	0,047	4,82	84,08	43,8
546	$\frac{1}{40}$	2,00	4,20	84,96	43,8
577 ) 579 )	1	0,047	3,74	85,72	49,2
577 ) 579 )	$\frac{1}{40}$	2,00	3,30	86,28	48,5

$c$   $\frac{\epsilon_{577, 579}}{\epsilon_{546}}$   
 1 1,12  
 $\frac{1}{40}$  1,11

<sup>1)</sup> Martens u. Grünbaum, Ann. d. Physik, 4. Folge, Bd. 12, S. 984.

Aus diesen Zahlen geht deutlich hervor, daß das Beersche Gesetz innerhalb des untersuchten Konzentrationsgebietes auch bei verschiedenen Wellenlängen streng gültig ist. Es ist ohne weiteres klar, daß der Quotient irgend eines Paares dieser Extinktionskoeffizienten bei den untersuchten Konzentrationen konstant ist; wahrscheinlich ist dies der Fall bei allen zwischenliegenden Konzentrationen. Die untersuchten Konzentrationen entsprechen einem Oxyhämoglobingehalt von ca.  $\frac{1}{2}$ — $\frac{1}{80}$  bzw.  $\frac{1}{160}$  des nativen Blutes.<sup>1)</sup> Mit Rücksicht auf die Arbeit von Manchot mußte besonders auf die Konzentrationen im Bereiche einer 10fachen Verdünnung des nativen Blutes geachtet werden, eine Konzentration, die bei den oben angeführten Messungen übersprungen wurde. Bei 10facher Verdünnung tritt nämlich nach Manchot ein Maximum der Sauerstoffbindung des Blutes auf. Die Zunahme des gebundenen Sauerstoffs ist bei dem 10fach verdünnten Blut (bei 0° und Atmosphärendruck) ca. 50% des Anfangwertes des unverdünnten Blutes. Bei 36,5° geht die Zunahme auf 20% zurück. Wenn dieses Phänomen tatsächlich von beträchtlichen Mengen ungebundenen Hämoglobins neben Oxyhämoglobin im nativen Blut herrührt, so müßte man die Menge des noch ungebundenen Hämoglobins mit dem Spektrophotometer bestimmen können; denn die Lichtverteilung im Spektrum der beiden Farbstoffe ist hinreichend verschieden, um die Feststellung der prozentischen Zusammensetzung eines Gemisches durch photometrische Messungen bei passend gewählten Wellenlängen zu ermöglichen. Der Quotient  $\frac{\epsilon_{577,579}}{\epsilon_{546}}$

<sup>1)</sup> Es wurden bis jetzt keine Messungen bei einer Konzentration, welche mit dem Hämoglobingehalt des unverdünnten Blutes gleich wäre, vorgenommen, obwohl dies keine Schwierigkeiten macht. Es gelingt sehr leicht, auf folgende Weise klare konzentrierte Lösungen, welche mit Dunkel-feldbeleuchtung optisch leer sind, herzustellen. Man versetzt 1 Volumenteil gewaschener Blutkörperchen mit 1 Volumenteil destillierten Wassers, kühlt auf 0° ab und schüttelt mit Äther aus. Nach einiger Zeit setzt sich eine klare wässrige Lösung von Oxyhämoglobin ab. Der Äther kann von der wässrigen Lösung durch einen Strom gewaschener Luft entfernt werden. Nach diesem Verfahren ist es möglich, klare Lösungen zu gewinnen, welche oft 20 g Oxyhämoglobin in 100 ccm enthalten.

ist beispielsweise 0,776 für sauerstofffreies Hämoglobin vom Hunde, während dasselbe Hämoglobin mit Sauerstoff gesättigt einen Quotient  $\frac{\epsilon_{577, 579}}{\epsilon_{546}}$  von 1,10 aufweist. Der Quotient von Gemischen der beiden Farbstoffe hat bekanntlich dazwischen liegende Werte.

Es seien zunächst die Messungen bei einer ziemlich vollständigen Verdünnungsreihe wiedergegeben.

Tabelle III.

Hundeblut.

Verdünnungsmittel: Wasser. Beleuchtungsquelle: Hg-Lampe.

Verdünnung	Schichtdicke cm	$\frac{\epsilon_{577, 579}}{\epsilon_{546}}$
2,0	0,018	1,10
2,5	0,018	1,10
3,75	0,033	1,10
5,0	0,058	1,10
7,5	0,072	1,10
10,0	0,094	1,10
12,5	0,094	1,10
15,0	0,117	1,10
200,0	2,00	1,10

Mit krystallisiertem Oxyhämoglobin aus Hundeblut erhielt ich gleiche Resultate.

Schließlich seien einige Bestimmungen an Kaninchenblut angeführt. Der Wert des Quotienten  $\frac{\epsilon_{577, 579}}{\epsilon_{546}}$  für sauerstofffreies Hämoglobin war bei diesem Blut 0,780.

Tabelle IV.

Kaninchenblut.

Verdünnungsmittel: Wasser. Beleuchtungsquelle: Hg-Lampe.

Verdünnung	Schichtdicke cm	$\frac{\epsilon_{577, 579}}{\epsilon_{546}}$
10,0	0,072	1,12
12,5	0,094	1,12
15,0	0,117	1,12
200,0	2,00	1,13

Es könnten noch andere Bestimmungen an Lösungen von Rinderblut, sowie an Blut oder Oxyhämoglobin des Pferdes angeführt werden. Ich glaube jedoch, daß das Resultat der schon angeführten Bestimmungen zur Genüge eindeutig und hinreichend allgemein gültig ist, um theoretische Einwände gegen die spektrophotometrische Hämoglobinbestimmung zu widerlegen. Die Unveränderlichkeit des Spektrums des Oxyhämoglobins bei der Verdünnung mit Wasser, welches mit Luft bei Atmosphärendruck gesättigt ist, schließt eine Verschiebung des Verhältnisses  $\frac{\text{C-Hämoglobin}}{\text{C-Oxyhämoglobin}}$  unter diesen Versuchsbedingungen aus. Dies war wohl nach dem Massenwirkungsgesetz unter Annahme einer einfachen Beziehung, wie 1 Mol. Hämoglobin + n Mol. Sauerstoff = 1 Mol. Oxyhämoglobin, vorauszusagen. Es müßte allerdings noch die weitere Annahme gemacht werden, daß die Löslichkeit des Sauerstoffs durch die Konzentration des Blutfarbstoffes nicht wesentlich geändert wird.