

Verbesserte Methode der colorimetrischen Bestimmung des Blutfarbstoffgehaltes in Blut und in anderen Flüssigkeiten.

Von

F. Hoppe-Seyler.

Die zahlreichen Vorschläge und in Anwendung gezogenen Methoden zur Bestimmung des Blutfarbstoffgehaltes sind mit Ausnahme der spectrophotometrischen Methoden von Vierordt, Hüfner u. A., welche absolute photometrische Resultate erstreben, mit so grossen Fehlerquellen behaftet, dass sie im besten Falle nur zu einer unsicheren Schätzung führen. Die colorimetrischen Methoden, in welchen Blutlösungen mit rothem Glas oder einer Mischung von Carmin und Pikrinsäure in der Färbung verglichen werden, sind aus dem Grunde zu verwerfen, weil die Farbe des rothen Glases oder des Pikrocarmin mit der der Blutlösung nie genau übereinstimmen. Die Methode, welche ich selbst angegeben und vielfach benutzt habe¹⁾, war von diesem Mangel frei, aber es ist für das Auge schwierig, scharfe Farbenvergleiche auszuführen, wenn die zu vergleichenden Bilder nicht wie im Gesichtsfelde des Soleil'schen Saccharimeter dicht an einander grenzen und nur durch eine scharfe Linie von einander geschieden sind. Im Soleil'schen Saccharimeter ist die Bestimmung so ausserordentlich scharf bei Anwendung von weissem Licht, weil bei nicht vollkommen gleicher Rotation beider Seiten des Gesichtsfeldes nicht allein die Lichtintensität in Summa verschieden ist, sondern auch die Qualität der Farbe, d. h. die

¹⁾ Handbuch der physiol.-chem. Analyse, 5. Auflage, 1883, S. 435.

einzelnen Spectralfarben in ihrer Intensität verschiedene Aenderung erfahren. Man kann sich leicht überzeugen, dass bei Anwendung von Natriumlicht die Bestimmungen mit dem Soleil'schen Apparate an Genauigkeit abnehmen, indem die Erscheinungen dann lediglich die des Halbschattenapparates sind.

1. Die Normallösung von Kohlenoxydhämoglobin.

Zwei- bis dreimal umkrystallisirtes Kohlenoxydhämoglobin aus Hunde- oder Pferdeblut nach dem von mir angegebenen Verfahren dargestellt¹⁾ wird in wenig Wasser gelöst bei Stubentemperatur (die Lösung erhält meist einen Gehalt von 3—4,5% Hämoglobin), einige Minuten lang ein Strom von CO-Gas hindurch geleitet, dann werden mit der filtrirten Lösung Flaschen von 15 bis 30 ccm. Inhalt gefüllt, in jede wenige Sekunden etwas CO-Gas eingeleitet, dann mit gutem Korkstopfen fest verschlossen. Ausserdem werden ein paar Portionen der Lösung von 20 ccm. genau abgemessen in Platinschalen gebracht, verdampft auf dem Wasserbade, der Rückstand bei 120° im Luftbade getrocknet und nach dem Erkalten im Exsiccator gewogen. Die in den Flaschen mit guten Korkstopfen eingeschlossenen Lösungen bleiben in ihrem Gehalte an CO-Hämoglobin viele Jahre unverändert. Verdunstet man einen Theil der Lösung bei niederer Temperatur, so hinterbleiben allein die Krystalle dieser Verbindung, und der Procentgehalt ist unverändert geblieben nach vielen Jahren, auch wenn die Lösung oft dem Sonnenlicht ausgesetzt war und ihre Aufbewahrung im warmen Zimmer geschah. Es ist immerhin zweckmässig, die Flaschen bei ziemlich gleichmässiger Wärme, z. B. im Keller, aufzubewahren. Es können solche Lösungen ohne Zweifel als Handelsartikel für sehr billigen Preis und constantem Gehalt bezogen werden. Bei Luftzutritt werden die Lösungen allmählig zersetzt. Hat man

¹⁾ A. a. O., S. 291. Es ist genau auf die Vorschriften zu achten, um sicher zu sein, dass der Blutfarbstoff frei von Serumeiweissstoffen ist.

eine Flasche geöffnet und einen Theil der Lösung ausgegossen, will aber den Rest in der Flasche weiter aufbewahren, so leitet man CO-Gas im kräftigen Strome ein und schliesst mit dem Kork im Schaume des in die Flüssigkeit eingeleiteten Gases.

Diese concentrirte Normallösung dient zur Blutfarbstoffbestimmung erst nach passender Verdünnung. Soll die colorimetrische Bestimmung in Flüssigkeitsschichten von 5 mm. Dicke ausgeführt werden, so verdünnt man kurz vor der Ausführung wenige genau abgemessene Cubikcentimeter der concentrirten Lösung so weit mit Wasser, dass die Lösung ungefähr 0,200 gr. und zwar mindestens 0,18 und höchstens 0,23 gr. CO-Hämoglobin für 100 cbcm. der Lösung enthält. Der Gehalt muss genau bekannt sein. Es wird dann nach dem Verdünnen nochmals CO-Gas durch die Lösung geleitet, und da man nur wenige Cubikcentimeter derselben für die Bestimmung nöthig hat, die übrige verdünnte Normallösung in Flaschen gebracht, die damit fast gefüllt, mit Korkstopfen gut verschlossen und kühl gestellt werden. Es ist zweckmässig, die angegebene Verdünnung zu wählen, weil ebenso bei grösserer Concentration wie bei noch grösserer Verdünnung die Farbenvergleichung weniger scharfe Resultate liefert. Das Auge besitzt für kleine Unterschiede in der Tiefe der Färbung die grösste Empfindlichkeit nur bei der angegebenen Verdünnung (wenn die Flüssigkeit in 5 mm. dicker Schicht beobachtet wird); ist die Farbe wesentlich dunkler oder blasser, so nimmt diese Empfindlichkeit ab. Von der Richtigkeit dieser Sätze kann man sich mittelst der zu schildernden Bestimmungsmethode selbst am besten überzeugen.

2. Vorbereitung der Blutlösung, in welcher der Blutfarbstoffgehalt bestimmt werden soll.

Das Blut, dessen Gehalt an Farbstoff bestimmt werden soll, wird aufgefangen und dann gewogen in einem cylindrischen, mit Fuss versehenen Glasröhrchen, welches ungefähr 5 cbcm. Inhalt fasst, genau in $\frac{1}{10}$ cbcm. getheilt ist und durch leichten eingeschliffenen Glasstopfen verschlossen wird. Dasselbe wird beim Wägen auf die Wagschale gestellt. Wenige Tropfen

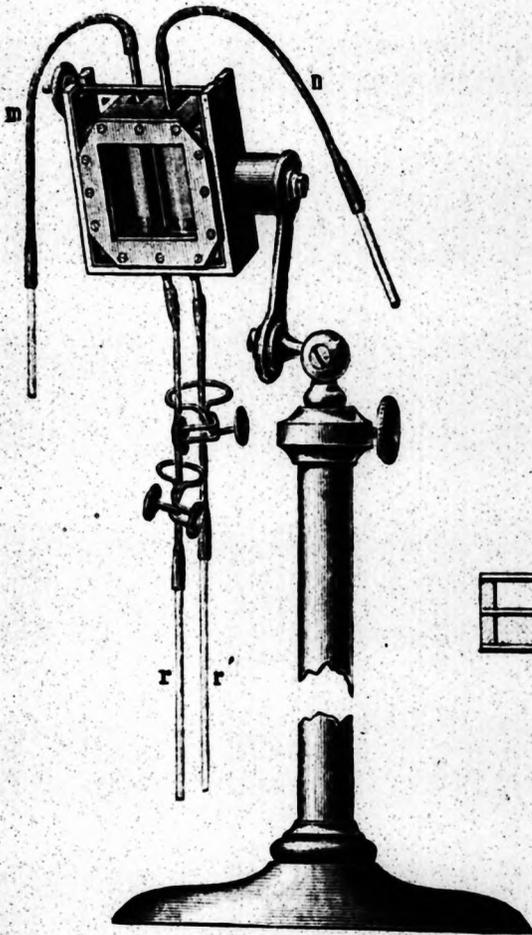
(selbst 1 bis 2 Tropfen) Blut genügen, wenn die nothwendige Verdünnung mit Vorsicht ausgeführt wird. Es ist kaum erforderlich hinzuzufügen, dass wenn nur ein Blutstropfen zu Gebote steht, auch nach der Methode von Vierordt das Blut in ein getheiltes Capillarrohr aufgenommen und die Bestimmung für das Volumen des Blutes ausgeführt werden kann.

Ist das Gewicht ermittelt, so werden 3 bis 4 ccm. Wasser hinzugefügt, mit einem Glasstäbchen gut umgerührt und ein Tropfen nicht zu concentrirter Sodalösung hinzugefügt. Es ist Sorge zu tragen, dass beim Umrühren die Zertheilung des Fibrincoagulum eine vollständige sei; dieselbe gelingt bei wenigen Tropfen Blut ohne Schwierigkeit. Der Zusatz von ein wenig Soda oder einer Spur sehr verdünnter Natronlauge ist stets erforderlich, um klare Lösung zu erhalten und alle Blutkörperchen zu lösen, besonders dringend nöthig ist dieser Zusatz für Blut mit kernhaltigen Blutkörperchen (Vögel, Amphibien, Fische), weil ohne denselben sich bald blutfarbstoffhaltige Niederschläge bilden. Es ist auch erforderlich, dass die angegebene Behandlung des Blutes mit Wasser etc. recht bald geschieht, damit das Fibrin nicht Blutfarbstoff festhält. Mit der Spritzflasche spült man dann mit einigen Tropfen Wasser das Glasstäbchen ab, verdünnt die Lösung bis auf genau 5 ccm., leitet einen langsamen Strom von CO-Gas durch ein fein ausgezogenes Glasröhrchen ein, unterhält ihn (mit Unterbrechungen, um Verlust zu vermeiden) für 1 bis 2 Minuten und filtrirt dann durch ein kleines Filter in ein anderes in $\frac{1}{10}$ ccm. getheiltes Glasröhrchen mit Fuss, bis dasselbe genau 4 ccm. enthält, und schreitet nun zur Bestimmung des Blutfarbstoffgehaltes in dieser Flüssigkeitsquantität.

3. Die colorimetrische Doppelpipette.

Die Farbenvergleichung wird ausgeführt in einem Apparate, der in Fig. 1 etwas von der Seite, in Fig. 2 gerade von vorn dargestellt ist. Die zwischen beiden Figuren gegebene Skizze gibt die Ansicht eines ideellen horizontalen Durchschnitte der Doppelpipette.

In der Messingfassung festgehalten durch zwei in Fig. 2 sichtbare Schraubenmuttern befinden sich zwei Messingrahmen von 5 mm. Durchmesser, plan abgeschliffen. Die Hälfte der Rahmenöffnung ist erfüllt bei beiden mit einem planparallel abgeschliffenen und polirten Glaskörper von 5 mm. Durchmesser. Diese Messingrahmen sind in der Weise zusammengelegt, dass jedem von ihnen nach aussen eine genau eben geschliffene und polierte Glasplatte dicht anliegt, während sie



W. MARKWORTH & A. STRATTON, BOSTON.

Fig. 1.

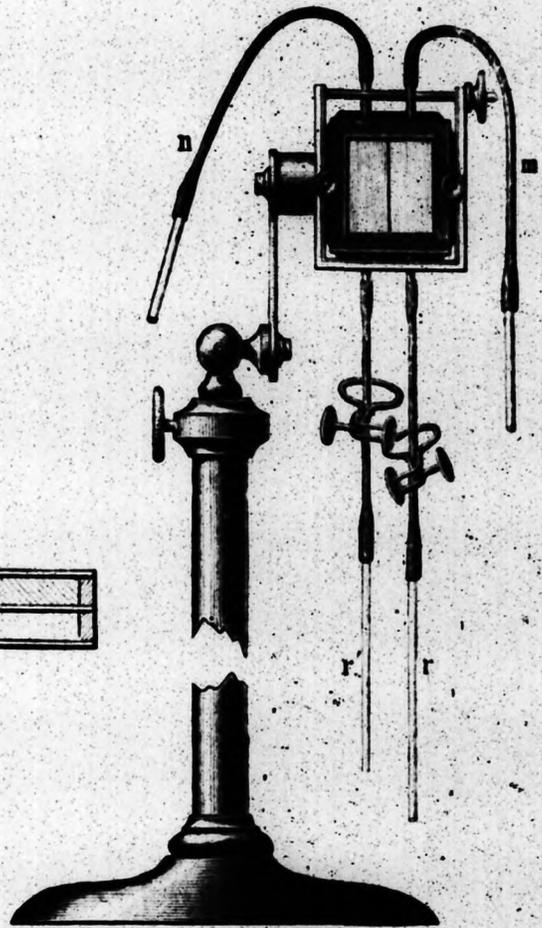


Fig. 2.

von einander getrennt sind durch eine dritte solche Glasplatte, welche mit der einen Seite dem einen, mit der anderen dem anderen Rahmen anliegt; dabei liegt der Glaskörper in dem einen Rahmen nach links, im anderen nach rechts. Diese Stellung wird durch die Skizze des Durchschnitts erläutert. Die Durchschnitte der Messingrahmen sind in dieser Skizze feiner, die der Glaskörper lichter schattirt. Die übrig bleibenden Hohlräume in den Pipetten von 5 mm. Durchmesser sind nicht schattirt. Beide Rahmen sind unten und oben durchbohrt

und tragen an den Bohrungen Röhrchen zum Ansatz von Kautschukschläuchen. Werden die Glasröhrchen r und r' in die Lösungen eingestellt, oben an n oder m angesaugt, so füllen sich bei Oeffnung der Quetschhähne die Hohlräume im einen und im anderen Rahmen mit den Flüssigkeiten. Sieht man dann gerade von vorn, wie in Fig. 2, auf den Apparat, so fallen die Begrenzungsflächen der Flüssigkeiten an den Glaskörpern in eine feine mittlere verticale Linie zusammen, so dass man beide Flüssigkeiten bei gleicher Lichtintensität unmittelbar neben einander sieht, nur durch eine Linie von einander getrennt. Zur Belichtung benutzt man zweckmässig eine weisse, nicht glänzende Papierfläche bei Tageslicht oder weisse Wolken am Himmel.

4. Ausführung der Bestimmung.

Man setzt das Röhrchen r' Fig. 2 in die verdünnte Normallösung, saugt bei n , öffnet den Quetschhahn, bis der linksseitige Hohlraum mit der Lösung gefüllt ist, setzt dann das Röhrchen r in die Blutlösung, saugt an m , öffnet den Quetschhahn, bis der rechtsseitige Hohlraum gefüllt ist, und vergleicht die Färbung beider Flüssigkeiten entweder mit unbewaffnetem Auge oder durch ein kurzes Fernrohr. Ist die Blutlösung dunkler als die Normallösung (so soll es sein), so lässt man sie zurückfliessen, fügt aus einer Bürette Wasser in kleiner gemessener Menge hinzu, welches vorher in einer Flasche mit CO -Gas geschüttelt ist, rührt mit dem Röhrchen r um, füllt die rechte Seite der Pipette wieder mit der Mischung, lässt ablaufen und füllt sie wieder und vergleicht jetzt die Farbe mit der der Normallösung. Man lässt dann, wenn sie noch immer zu dunkel ist, wieder ablaufen, fügt eine gemessene Menge Wasser hinzu, rührt um, saugt in die Pipette wieder auf und vergleicht die Färbung mit der der anderen Seite. In dieser Weise fährt man mit dem Hinzumischen von Wasser so lange fort, bis die Färbung der weiter und weiter verdünnten Blutlösung gleich geworden ist derjenigen der verdünnten Normallösung. Dann wird abgelesen und notirt, wie viel Wasser zu den 4 ccm. der verdünnten Blutlösung hinzugefügt ist,

um dies Ziel zu erreichen. Schliesslich ist es zweckmässig, mit dem Verdünnen noch weiter fortzufahren und zu ermitteln, wie viel Wasser zugesetzt werden muss, um die Blutlösung deutlich erkennbar heller erscheinen zu lassen, als die verdünnte Normallösung.

Die Berechnung des Resultates ergibt sich aus dem geschilderten Verfahren sehr einfach. Ist die Färbung der verdünnten Blutlösung durch Wasserzusatz gleich derjenigen der verdünnten Normallösung geworden, so enthalten beide Flüssigkeiten gleichviel Hämoglobin. Das Volumen, welches die verdünnte Blutlösung durch den Wasserzusatz erreicht hat, in Cubikcentimetern multiplicirt mit dem Hämoglobingehalt in 1 cbcm. gibt den Hämoglobingehalt in der abgewogenen Blutmenge. Es sei z. B. 0,450 gr. Blut abgewogen, mit Wasser zu 5 cbcm. verdünnt, filtrirt, mit CO behandelt und vom Filtrat 4 cbcm. zur Bestimmung in der Doppelpipette verwendet. Nach Hinzufügen von 18 cbcm. Wasser sei die Färbung der Mischung gleich befunden einer verdünnten CO-Hämoglobin-Normallösung von 2,25 Milligr. des Farbstoffs in 1 cbcm. Die 4 cbcm. Blutlösung werden dann verdünnt sein auf $4 + 18 = 22$ cbcm. Da aber das abgewogene Blut nicht 4, sondern 5 cbcm. dieser ersten Verdünnung gegeben hatte, würden diese zu 27,5 cbcm. zu verdünnen gewesen sein, um den Gehalt der verdünnten Normallösung an Hämoglobin zu erhalten. Die abgewogenen 0,450 gr. Blut enthalten sonach $27,5 \times 2,25 = 61,875$ Milligr. oder 13,75% Blutfarbstoff.

Steht nur sehr wenig Blut zur Disposition und ist dasselbe sehr arm an rothen Blutkörperchen, so kann der Fall eintreten, dass die Verdünnung auf 5 cbcm. Flüssigkeit eine Lösung liefert, welche weniger Blutfarbstoff enthält als die verdünnte Normallösung. Fürchtet man dies, so kann das Blut auf 3 cbcm. verdünnt und vom Filtrat 2,5 cbcm. zur weiteren Verdünnung und Farbenvergleichung genommen werden. Ist die Verdünnung der Blutlösung aber zu stark geworden, so füllt man mit derselben die eine Seite der Doppelpipette, misst 4 cbcm. der verdünnten Normallösung

ab und verdünnt sie mit Wasser in gemessenen Mengen, bis die Färbung beider Seiten gleich geworden ist. Man berechnet dann den Gehalt der weiter verdünnten Normallösung an Blutfarbstoff und hieraus den der Blutlösung.

Nach den Ergebnissen einer grösseren Zahl von Bestimmungen, welche ich im Laufe von 4 Jahren mit dieser colorimetrischen Doppelpipette unter verschiedenen Verhältnissen besonders mit reinen Lösungen von CO-Hämoglobin ausgeführt habe, hat sich als möglicher Fehler unter nicht ganz günstigen Verhältnissen 4% des Hämoglobingehaltes ergeben. Der Fehler hat jedoch in Wirklichkeit selten 2% desselben überstiegen, und ist in nicht geringerer Zahl von Bestimmungen verschwindend gering gewesen. Die Genauigkeit erwies sich als mehr als doppelt so gross als nach meinem älteren Verfahren in getrennten Gefässen mit planparallelen Glaswandungen von gleichem Innendurchmesser.

Diese Doppelpipette kann man natürlich auch vor dem Spalt des Spectralapparates so aufstellen, dass die obere Hälfte des Spaltes das Licht durch die eine, und die untere durch die andere Flüssigkeit erhält. Bei richtiger Einstellung werden auch hier beide Spectra nur durch eine feine Linie von einander getrennt. Eine grössere Genauigkeit habe ich gegenüber der einfachen colorimetrischen Prüfung ohne prismatische Zerlegung der Lichtstrahlen nicht gefunden, weder bei Anwendung directen Sonnenlichtes noch bei Lampenlicht, mit sehr engem oder weiterem Spalt. Die Dunkelheit der Absorptionsstreifen sowie ihre Breite zeigte keine erkennbaren Differenzen, wenn bei einfacher Belichtung durch weisses Papier und Beobachtung mit unbewaffnetem Auge oder Fernrohr Gleichheit der Färbung beider Flüssigkeiten gefunden war.

Diese spectroscopische Vergleichung mittelst der Doppelpipette lässt aber noch Bestimmungen von Blutfarbstoff ausführen in solchen Flüssigkeiten, welche ausser Blutfarbstoff noch andere Farbstoffe enthalten, die an der Stelle der Absorptionsstreifen des CO-Hämoglobins keine Absorptionen von Licht veranlassen. Man kann natürlich jedes Spectroskop hierzu verwenden. Das Stativ der Doppelpipette gestattet die

Stellung derselben für diese Untersuchung so zu verändern, dass die Grenzlinie zwischen den beiden Flüssigkeiten in der Doppelpipette eine horizontale Lage erhält. Es ist selbstverständlich, dass auch mit den Spectrophotometern die Prüfung vorgenommen werden kann, ob die eine oder die andere der beiden zu vergleichenden Flüssigkeiten in der Doppelpipette eine dunklere Färbung besitzt.

Wenn die Bestimmung beendet ist, werden beide Seiten des Apparates nach Ablassung der Farbstofflösungen und Entfernung der Quetschhähne durch mehrmaliges Aufsaugen von destillirtem Wasser und Ausblasen desselben gereinigt. Wird der Apparat länger als einen Tag nicht wieder benutzt, so wird derselbe nach Abschrauben der in Fig. 2 beiderseits sichtbaren Schraubenmuttern aus einander genommen, die Gläser sorgfältig mit Wasser gereinigt, abgetrocknet und wieder zusammengefügt.

Die colorimetrische Doppelpipette ist nach der von mir gegebenen principiellen Anordnung entworfen und in vorzüglicher Weise ausgeführt von Herrn Universitätsmechanikus E. Albrecht in Tübingen und die Glastheile derselben aus der berühmten Werkstätte von Steinheil in München. Der Apparat ist nur brauchbar bei sehr exacter Anfertigung; die Gläser müssen genau plan geschliffen sein und ohne Anwendung von Fett und anderen Flüssigkeiten wasserdicht an einander und an den Flächen der Messingrahmen anliegen.

Strassburg, März 1892.
