

# Über eine quantitative Methode zur Bestimmung des Bluteisens zu klinischen Zwecken

von

**Dr. Adolf Jolles,**

*Docent am k. k. Technologischen Gewerbemuseum in Wien.*

(Vorgelegt in der Sitzung am 22. October 1896.)

Unter den Bestandtheilen des Blutes, deren genaue quantitative Bestimmung für klinisch-diagnostische Zwecke eine hohe Bedeutung erlangt hat, nimmt das eisenhaltige Hämoglobin eine erste Stelle ein.

Demzufolge ist auch die Zahl der Methoden und Apparate, welche zur Bestimmung des Hämoglobingehaltes des Blutes bekanntgegeben wurden, eine grosse, und einige dieser Methoden und Apparate, wie das Fleischl'sche Hämometer (Wiener medic. Jahrbücher, 425, 1885 und 167, 1886), das Hämoglobinometer von Gowers (Report of the meeting chim. soc. for Decembre 13<sup>th</sup>, 1878), das Hämatoskop von Hénocque (Hénocque, Note sur l'hématoscope, G. Masson, Paris, 1886, und Weiss, Prager medic. Wochenschrift, 13, 117, 1888) haben namentlich wegen der Raschheit, mit der sie die Untersuchung ermöglichen und der geringen Blutmengen, die zu ihrer Ausführung erforderlich sind, bereits Eingang in die klinische Praxis gefunden.

Nichtsdestoweniger lassen diese Methoden hinsichtlich ihrer Genauigkeit Vieles zu wünschen übrig, und wir besitzen thatsächlich gegenwärtig noch keine klinisch brauchbare Methode, welche gestattet, den Hämoglobingehalt des Blutes mit analytischer Genauigkeit festzustellen.

Es ist diese Thatsache umso bemerkenswerther, als ja bekanntlich der Blutfarbstoff eisenhaltig und somit ein ana-

lytischer Weg gegeben ist, den Hämoglobingehalt aus dem Eisengehalte quantitativ zu bestimmen.

Die Ursache, warum die quantitative Eisenbestimmung des Blutes bis jetzt nicht zur exacten Feststellung des Hämoglobingehaltes benützt wurde, ist wohl in dem Mangel einer geeigneten Methode zu suchen, die mit einem geringen Quantum Blutes die Bestimmung des Eisens ermöglicht.

Man ist nur auf jene einzelnen Fälle angewiesen, bei denen durch Venaesection genügend Blut zur Verfügung steht und muss in Folge dieses Umstandes in allen Fällen, wo Prostration oder Anämie eine Venaesection contraindiciren, auf die Bestimmung des Eisengehaltes verzichten, obwohl gerade bei diesen Fällen die genaue Bestimmung des Hämoglobingehaltes von hohem Interesse ist.

Dieser Umstand veranlasste mich, einschlägige Versuche zur Ausarbeitung einer Methode anzustellen, um auch aus minimalen Blutmengen den Eisen-, respective Hämoglobingehalt quantitativ zu bestimmen. Bevor ich jedoch auf diese klinische Methode der Bestimmung des Eisengehaltes in den kleinsten Blutmengen des Näheren eingehe, möchte ich vorerst im Allgemeinen die quantitative Bestimmung des Eisens im Blute besprechen, zumal dieses Gebiet der Forschung in der Literatur nur eine geringe Bearbeitung gefunden hat.

Die Bestimmung des Eisens im Blute bietet aus dem Grunde besondere Schwierigkeiten, weil bei der Veraschung unbedingt ein scharfes Glühen behufs vollständiger Zerstörung der organischen Substanzen nothwendig ist, wobei das im Blute enthaltene Eisen in sehr schwer lösliches Eisenoxyd übergeht.

Dieses Eisenoxyd ist in concentrirter Salzsäure schwer, in Schwefelsäure und Salpetersäure nur unvollständig löslich, aus welchem Grunde alle jene in der Literatur verzeichneten Daten bezüglich des Eisengehaltes des Blutes, bei welchen der Gang der Methode nicht eingehend angegeben ist, einiges Misstrauen herausfordern.

Ich war daher im Verein mit meinem Assistenten Herrn Kosmatsch bemüht, die Bestimmung des Eisens im Blute für theoretisch-wissenschaftliche Zwecke, wo genügende

Quantitäten zur Verfügung stehen, zu einer analytisch exacten, dabei in möglichst kurzer Zeit durchführbaren Methode zu gestalten.

Bei der quantitativen Eisenbestimmung im Blute spielt zunächst die sorgfältige Veraschung des Blutes eine wichtige Rolle.

Nach der üblichen Art der directen Veraschung gelangt man erst nach relativ langer Zeit zu einem vollkommen befriedigenden Resultate; dabei bläht sich bekanntlich das Blut sehr leicht auf, kann über die Tiegelwände hinaustreten, was dann mit Verlusten verbunden ist.

Wir waren daher bemüht, die Veraschung derart durchzuführen, dass sie

1. bei relativ kurzer Zeit eine vollständige wird, und
2. keine etwaigen Verluste durch die starke Aufblähung des Blutes eintreten.

Eine solche Art der Veraschung haben wir durch die Verwendung einer concentrirten Salpetersäure vom specifischen Gewichte 1.53 erzielt, die bekanntlich durch nachstehendes Verfahren gewonnen wird:

Zwei Theile reiner concentrirter Salpetersäure werden mit einem Theil reiner concentrirter Schwefelsäure in einer tubulirten Retorte versetzt und auf dem Sandbade überdestillirt.

Es resultirt dann eine Säure von dem oben genannten specifischen Gewichte, die durch sehr heftige Oxydationswirkung ausgezeichnet ist. Selbstverständlich muss diese Säure absolut eisenfrei sein. Behufs Veraschung wird zunächst die abgewogene Blutmenge im Trockenschranke getrocknet, hierauf auf eine Asbestplatte gestellt und mit schwacher Bunsenflamme erhitzt. Sobald eine Aufblähung eintritt, lässt man den Tiegel erkalten und setzt dann tropfenweise die Salpetersäure hinzu. Es tritt sofort unter Flammenerscheinung eine heftige Reaction ein, wobei man die Vorsicht zu beachten hat, den Tiegel bedeckt zu halten, um etwaige Verluste durch Verspritzungen zu verhindern. Letzteres tritt überhaupt nicht ein, wenn der Zusatz der Salpetersäure sehr vorsichtig erfolgt und die Flamme entsprechend regulirt wird. Sobald die Salpetersäure abgeraucht ist, wird der Tiegel auf ein Thondreieck gesetzt und mit der

Bunsenflamme, welche allmählig bis zur vollen Stärke gesteigert wird, erhitzt. Nach etwa  $\frac{1}{2}$  stündigem Erhitzen bei voller Bunsenflamme lässt man den Tiegel wieder erkalten, setzt neuerdings mehrere Tropfen der Salpetersäure hinzu, bringt den Tiegel wieder auf eine Asbestplatte, raucht auf derselben die Salpetersäure bei schwacher Bunsenflamme ab und erhitzt schliesslich den Tiegel mit directer Flamme, wie dies oben angegeben wurde. Diese Operation wiederholt man mehrermale, bis der Tiegelinhalt vollkommen verascht ist. Bei Verwendung sehr geringer Blutmengen von  $0.1-0.5 \text{ cm}^3$  Blut ist natürlich die ganze Operation in viel kürzerer Zeit, etwa in 10—20 Minuten vollendet. Nach dem Veraschen wird das Eisen zunächst in Lösung gebracht.

Wir haben uns durch zahlreiche Versuche überzeugt, dass die vollkommene Veraschung des Blutes auch bei Zuhilfenahme von Salpetersäure nur bei hoher Temperatur erfolgt. Hierbei wird aber das im Blute enthaltene Eisen in ein in concentrirten Säuren sehr schwer lösliches Eisenoxyd übergeführt. Allerdings kann man durch längeres und wiederholtes Einwirken von concentrirter Salzsäure die Lösung des Eisenoxyds bewerkstelligen, eine derartige langwierige Operation dürfte aber für unsere Zwecke kaum brauchbar erscheinen. Wir versuchten nun durch Zusatz von viel Salpetersäure die organischen Substanzen zu zerstören und gleichzeitig durch schwaches Glühen die Bildung von Eisenoxyd zu vermeiden, damit nach Befeuchtung mit concentrirter Schwefelsäure und nach erfolgter Verjagung derselben unmittelbar schwefelsaures Eisenoxyd resultiren sollte. Unsere Versuche lehrten jedoch, dass, wie schon erwähnt, die Salpetersäure zwar die Veraschung wesentlich beschleunigt, sie jedoch nur in Verbindung mit starkem Glühen zu einer vollständigen macht. Wir beobachteten nämlich, dass zwar bei Einwirkung der Salpetersäure auf den Abdampfrückstand des Blutes bei circa  $100^\circ \text{ C.}$  eine blassgefärbte Flüssigkeit resultirt; versetzt man jedoch dieselbe mit concentrirter Schwefelsäure, so erhält man eine schwarze Flüssigkeit, deren Veraschung wiederum eine hohe Temperatur erfordert. Wird die vorerwähnte blassgefärbte Flüssigkeit ohne Zusatz von Schwefelsäure schwach erhitzt, dann bläht sich

dieselbe, wenn auch in geringem Grade, auf und lässt noch unzerstörte organische Substanzen erkennen. Als ein einfaches und sicheres Mittel, das geblühte Eisenoxyd des Blutes vollkommen zu lösen, hat sich das vollkommen wasserfreie saure schwefelsaure Kalium erwiesen.

Wasserhaltiges saures schwefelsaures Kalium ist nicht zu verwenden, da sonst in Folge geringerer Aufschliessbarkeit zu niedrige Resultate erhalten werden. Man geht hiebei in der Weise vor, dass man zu der erhaltenen Blutmasse etwas saures schwefelsaures Kali gibt — und zwar genügen für je 1  $cm^3$  Blut circa 1 g saures schwefelsaures Kalium —, den Tiegelinhalt erwärmt und die schmelzende Masse durch Hin- und Herbewegen des Tiegels mit den ringsum haftenden Eisenoxydtheilchen in innige Berührung bringt. Besondere Aufmerksamkeit hat man auf die gute Glasur des zur Verwendung gelangenden Tiegels — am geeignetsten sind Tiegel von Berliner Porzellan — zu lenken, weil sonst das bei dem scharfen Glühen der Blutmasse entstehende Eisenoxyd sich in den Tiegelboden wahrscheinlich unter Bildung von Eisensilicat einfrisst und dann sehr schwer in Lösung zu bringen ist.

Hierauf wird der Tiegel erkaltet gelassen, dann sammt Inhalt in ein Becherglas gegeben, mit heissem destillirten Wasser die Masse herausgelaugt, der Tiegel herausgenommen und vorsichtig abgespült. Der Inhalt des Becherglases wird nun in einen Kolben gebracht, mit verdünnter Schwefelsäure angesäuert, etwas Zink hinzugesetzt, der Kolben mit einem Bunsen-Ventil verschlossen und auf dem Wasserbade erwärmt. Nach dem vollständigen Auflösen des Zinks wird, je nach der zur Veraschung gelangten Blutmenge, mit  $\frac{1}{50}$ — $\frac{1}{100}$  normal Kaliumpermanganat titirt und der Eisengehalt in bekannter Weise festgesetzt. Vorerst muss jedoch der Eisengehalt des Zinks genau festgestellt sein, nachdem selbst das sogenannte chemisch reinste Zink geringe Spuren von Eisen enthält, die für technische Analysen nicht in Betracht kommen, bei der Eisenbestimmung des Blutes jedoch, wo es sich um relativ minimale Eisenmengen handelt, spielen auch die Eisenspuren des Zinks eine Rolle. Von dem von uns verwendeten Zink wurden mehrere Bestimmungen auf den Eisengehalt durch-

geführt und resultirte — auf 1 g Zink berechnet — nachstehender Eisengehalt:

1. 0·00025,
2. 0·00024,
3. 0·00024,
4. 0·00023,
5. 0·00025.

Man kann somit den Eisengehalt des Zinks als constant ansehen, und es ist nur bei der Reduction des Zinks erforderlich, mit einer genau gewogenen Zinkmenge zu arbeiten, deren Oxydationswerth bekannt ist. Wir haben zur Reduction des Eisens von je 1—2  $cm^3$  Blut circa 1 g Zink verwendet und die entsprechenden Daten in Abzug gebracht.

Zur quantitativen Eisenbestimmung nach obiger Methode haben wir Schweineblut unmittelbar nach dem Schlachten in vorher gewogenen Tiegeln entnommen, dieselben neuerdings in den Exsiccator gebracht, im Laboratorium wiederum gewogen und hierauf verascht.

Von den zahlreichen durchgeführten Eisenbestimmungen seien nachstehende angeführt:

#### Schweineblut.

Laufende Nummer	Gewicht des Blutes in Gramm	Anzahl der Cubikcentimeter	Gefundene Eisenmenge	In 1000 g Blut
1	1·057	1	0·00072	0·671
2	2·124	2	0·00146	0·687
3	3·158	3	0·00212	0·671
4	4·219	4	0·00284	0·673
5	4·216	4	0·00281	0·666
6	5·272	5	0·00352	0·667
7	6·336	6	0·00428	0·675
8	6·331	6	0·00423	0·668
9	8·443	8	0·00561	0·668
10	8·428	8	0·00558	0·662

Die obigen, aus verschiedenen Mengen eines und desselben Schweineblutes gewonnenen Resultate zeigen unter einander eine derartige Übereinstimmung, dass man die Eisenbestimmung im Blute durch Aufschliessen mit saurem schwefelsaurem Kalium als eine analytisch genaue Methode wohl bezeichnen kann.

Von grosser Wichtigkeit ist allerdings die Beschaffung möglichst frischen Blutes, d. h. unmittelbar nach der Schlachtung, da sonst das Blut schon nach relativ kurzer Zeit keine gleichmässige Zusammensetzung zeigt und die Resultate bei verschiedenen Blutmengen mehr oder weniger grosse Differenzen zeigen.

Der Eisengehalt des Schweineblutes ist nicht constant, sondern mannigfachen Schwankungen unterworfen.

Das Blut von acht verschiedenen Schweinen zeigte — auf 1000 g Blut berechnet — nachstehenden Eisengehalt:

**Eisengehalt in 1000 Gramm Schweineblut.**

Schweineblut I . . . . .	0·674 g
» II . . . . .	0·698
» III . . . . .	0·948
» IV . . . . .	0·832
» V . . . . .	0·676
» VI . . . . .	0·549
» VII . . . . .	0·948
» VIII . . . . .	0·832

Um die Genauigkeit der Eisenbestimmung durch Aufschliessen mit saurem schwefelsaurem Kali gegenüber den üblichen Methoden durch Aufschliessen mit Säuren darzulegen, lasse ich in nachstehender Tabelle die Resultate, welche bei der Bestimmung des Eisens im Blute von drei verschiedenen Schweinen — bezeichnet mit *A*, *B* und *C* — erhalten wurden, folgen:

Eisengehalt in je einem Gramm Schweineblut nach den Methoden *a*, *b* und *c*.

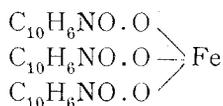
Schweineblut, bezeichnet mit	<i>a</i>		<i>b</i>		<i>c</i>	
	Aufschliessung des Eisens mit saurem schwefelsaurem Kali und nachheriger Titration mit Kaliumpermanganat		Aufschliessung des Eisens mit Schwefelsäure und nachheriger Titration mit Permanganat		Aufschliessung des Eisens mit conc. Salzsäure	
					<i>α</i>	<i>β</i>
			bei einmaliger Lösung	bei erschöpfender Lösung		
A	0·000651	0·000482	0·000516	0·000648		
B	0·000586	0·000413	0·000472	0·000569		
C	0·000866	0·000617	0·000693	0·000805		

Vorstehende Resultate zeigen, dass die Aufschliessung mit Schwefelsäure ebenso wie die Aufschliessung mit concentrirter Salzsäure bei einmaliger Extraction eine unvollständige ist.

Die Aufschliessung mit HCl gibt nur dann verlässliche Resultate, wenn die Extraction entsprechend der in Arbeit genommenen Blutmengen bis zur Erschöpfung wiederholt wird, worauf nicht immer Rücksicht genommen zu sein scheint nachdem die in der Literatur bezüglich des Eisengehaltes des Blutes verzeichneten Daten relativ erhebliche Differenzen aufweisen. Die Aufschliessung mittelst saurem schwefelsaurem Kali ist, wie die Analysen zeigen, eine durchaus vollkommene und kann diese Methode, welche gegenüber der Salzsäureextraction erheblich weniger Zeit beansprucht und sich durch Einfachheit und Sicherheit in der Ausführung auszeichnet, zur Bestimmung des Eisens im Blute wohl empfohlen werden.

Etwas umständlich erscheint uns überdies bei der Methodik der Eisenbestimmung im Blute die Titration mit Permanganat, indem, wie schon erwähnt, auch der Eisengehalt des Zinks auf das Sorgfältigste berücksichtigt werden muss. Andererseits aber erfordert die Bestimmung des Eisens auf gewichtsanalytischem Wege im Interesse der Genauigkeit die Verarbeitung relativ grösserer Blutmengen, wie solche nicht immer zur Verfügung stehen. Letzterer Umstand veranlasste mich einschlägige Versuche in der Richtung anzustellen, das Eisen durch ein geeignetes Reagens auch aus geringen Blutmengen auf gewichtsanalytischem Wege bestimmen zu können.

Aus den Versuchen resultirte, dass das von G. v. Knorre (Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft, 20, 283 und Zeitschrift für analytische Chemie, Bd. XXVIII, S. 234) empfohlene Nitroso- $\beta$ -Naphthol als ein für unsere Zwecke sehr geeignetes Reagens anzusehen ist. Das Eisen wird aus salzsaurer Lösung durch eine concentrirte Nitroso- $\beta$ -Naphthol-lösung in 50—52procentiger Essigsäure als Ferrinitronaphthol ( $C_{10}H_6O.NO)_3Fe$  abgeschieden. Der Niederschlag ist sehr voluminös, weshalb das Reagens speciell bei Blut, wo es sich um die Bestimmung minimaler Eisenmengen handelt, sehr gute Dienste leistet. Der in 50—52procentiger Essigsäure unlösliche Niederschlag fällt rasch zu Boden und kann in relativ kurzer Zeit quantitativ bestimmt werden. Die Analyse des Niederschlages ergab, dass derselbe aus reinem Ferrinitronaphthol besteht. Es entsprechen — da 1 Fe 3 Moleküle Nitroso- $\beta$ -Naphthol bindet,



516 Nitroso- $\beta$ -Naphthol 56 Theilen Eisen, respective 80 Theilen Eisenoxyd.<sup>1</sup>

### Bereitung der Lösungen.

#### a) Nitroso- $\beta$ -Naphthol.

1.2 g Nitroso- $\beta$ -Naphthol crystallisatum purissimum werden in 100  $cm^3$  50procentiger Essigsäure unter Erwärmen auf circa 90° C. gelöst; die Lösung erfolgt rasch und ohne Rückstand. Von einem eventuell auftretenden minimalen Rückstande wird abfiltrirt und das Filtrat verwendet.

#### b) Essigsäure.

250  $cm^3$  des reinen Eisessigs werden mit 150  $cm^3$  destillirten Wassers vermischt. Die erhaltene Solation hat eine Dichte von 1.0631, respective 9° B.

<sup>1</sup> Das nicht krystallisirte Nitroso- $\beta$ -Naphthol, welches ein grünes Pulver darstellt, ist für obige Zwecke unbrauchbar, denn es hat einen Aschengehalt von 3.3%, welcher im Wesentlichen aus Eisen und Kalk, von der Fabricationsweise herrührend, besteht. Der Aschengehalt des krystallisirten Nitroso- $\beta$ -Naphthols beträgt nur 0.1%, welcher bei der Analyse vernachlässigt werden kann.

### Gewichtsanalytische Bestimmung des Eisens.

Das Eisen wird aus salzsäurehaltiger Lösung durch Nitroso- $\beta$ -Naphthol als Nitroso- $\beta$ -Naphtoleisen von constanter Zusammensetzung gefällt. Dieser Niederschlag ist in 50—52procentiger Essigsäure unlöslich und kann deshalb nach erfolgter Filtration mit dieser Lösung ausgewaschen werden.

Nach erfolgtem Trocknen bei 100° C., was sehr schnell vor sich geht, wird der Niederschlag sammt Filter in einen Platintiegel gebracht, zuerst vorsichtig mit einer kleinen Flamme erhitzt, worauf man die Temperatur bis zur Rothglut steigert und nach der Veraschung das gebildete Eisenoxyd wägt.

### Specielle Bestimmung des Eisens im Blute.

Circa 3—5 g Blut werden vorsichtig in einem grösseren Platintiegel erst auf dem Wasserbade eingedampft, dann zuerst am Bunsenbrenner, hierauf vollkommen auf dem Gebläse verascht. Die Asche wird mit etwa 5  $cm^3$  concentrirter Salzsäure — welche sich am zweckmässigsten erwies — aufgenommen, 5 Minuten in der Kälte einwirken gelassen, dann mit etwa 2—3  $cm^3$  destillirten Wassers versetzt und am Wasserbade zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wird zwei-, eventuell noch dreimal wie oben mit concentrirter Salzsäure befruchtet, zur Trockene eingedampft, mit einigen Tropfen heissen destillirten Wassers aufgenommen und dann das Reagens in der Kälte zugesetzt. Bezüglich der Menge des Nitroso- $\beta$ -Naphthols haben die Versuche ergeben, dass für 3 g 5  $cm^3$ , für circa 6 g Blut 10  $cm^3$  der Nitroso- $\beta$ -Naphthollösung von angegebener Concentration erforderlich sind. Nach erfolgter Fällung wird 5 Minuten mit einem Glasstabe gerührt, dann circa 5 Minuten der Niederschlag absetzen gelassen, hierauf auf ein mit 50procentiger Essigsäure befeuchtetes Filter gebracht und mit dieser Essigsäure der Niederschlag ausgewaschen, bis die ablaufenden Tropfen schwach gelb gefärbt erscheinen. In der Regel beträgt dann das Filtrat bei Verwendung von circa 3—5 g Blut nicht mehr als 30  $cm^3$ .

Die Methode ist, wie nachstehende Controlanalysen beweisen, analytisch genau, nur erfordert sie die Einhaltung

oberer Bedingungen, nämlich die Verarbeitung relativ geringer Blutmengen, deren Eisengehalt approximativ bekannt ist, damit das Reagens in entsprechendem Überschusse zugesetzt<sup>1</sup> und auch der Niederschlag nicht übermässig mit 50procentiger Essigsäure ausgewaschen wird.

### Beleganalysen.

#### a) Eisenlösungen von bestimmtem Gehalt.

Von einer Eisenlösung, deren Eisengehalt titrimetrisch und gewichtsanalytisch genau bestimmt wurde, sind verschiedene Anzahlen Cubikcentimeter entnommen und deren Eisengehalt mit Nitroso- $\beta$ -Naphtol bestimmt worden.

Laufende Nummer	Eisen vorhanden	Eisen gefunden	Differenz
I	0·0025	0·00245	0·00005
II	0·0025	0·0025	0
III	0·0050	0·00504	0·00005
IV	0·0050	0·0053	0·00007
V	0·00125	0·00125	0
VI	0·00125	0·0012	0·00005

#### b) Mit Blut.

In frisch entnommenem Schweineblut und Rinderblut wurde einerseits der Gehalt an Eisen durch Aufschliessung mit saurem schwefelsaurem Kalium und Titration mit Kaliumpermanganat, andererseits mit Nitroso- $\beta$ -Naphtol bestimmt.

Laufende Nummer	Eisen nach der Methode: saures schwefels. Kalium, auf 1000 g Blut berechnet	Eisen nach der Methode: Nitroso- $\beta$ -Naphtol, auf 1000 g Blut berechnet
I Schweineblut . . . . .	0·698	0·697
II »	0·674	0·675
III »	0·832	0·841
IV »	0·832	0·836
V Rinderblut . . . . .	0·500	0·500
VI »	0·531	0·518
VII »	0·497	0·502

<sup>1</sup> Nach meinen Versuchen ist es vorthailhaft, auf circa 0·005 g Eisen circa 0·12 g festes Nitroso- $\beta$ -Naphtol, entsprechend 10 *cm*<sup>3</sup> der angegebenen Lösung zu verwenden, was nach der chemischen Umsetzung zwischen Nitroso- $\beta$ -Naphtol und Eisen einen kleinen Überschuss an Fällungsmittel bedeutet.

Die gewichtsanalytische Bestimmung des Eisens in der Blutäsche ist in circa 45 Minuten sehr wohl durchführbar und erscheint daher diese analytisch vollkommen genaue und verlässliche Methode für die Eisenbestimmung im Blute sehr geeignet.

### **Einfache Methode zur quantitativen Bestimmung des Eisens im Blute für klinisch-diagnostische Zwecke.**

Alle bisher bekannten Methoden zur quantitativen Untersuchung des frischen Blutes für die gewöhnlichen klinisch-diagnostischen Zwecke haben als grundlegende Voraussetzung die Verwendung einer sehr geringen Blutmenge. Wir haben es uns daher zur Aufgabe gemacht, eine wenig zeitraubende Methode auszuarbeiten, welche die exacte Bestimmung des Eisens in geringen Blutmengen gestattet. Das Princip der Methode beruht darauf, dass  $0.05\text{ cm}^3$  Blut, welche minimale Blutmenge mittelst Einstiches einer Nadel in die Fingerbeere austritt oder leicht herausgedrückt wird, im Porzellan- oder Platintiegel mit Hilfe einer Bunsenflamme verascht und das beim Veraschen zurückbleibende rothe Eisenoxyd mit  $0.1\text{ g}$  wasserfreien sauren schwefelsauren Kalium in Lösung gebracht wird. Der Gehalt der Lösung an Eisen wird auf colorimetrischem Wege bestimmt.

Ich habe bereits im Jahre 1888 im hiesigen hygienischen Universitätsinstitute eine colorimetrische Bestimmung von Eisen im Wasser ausgearbeitet,<sup>1</sup> die sich auf die Farbennuance gründet, welche das Rhodanammonium in Lösungen, welche nur minimale Spuren von Eisenoxydsalzen enthalten, hervorbringt. Man vergleicht die Färbungen, welche durch gleiche Mengen einer Lösung von Rhodanammonium in einem abgemessenen Volumen der Wasserprobe und in gleichen Volumen verdünnter Ferrisalzlösungen von verschiedenem, aber bekanntem Gehalt an Eisen hervorgerufen werden, dann ergibt sich aus einer dabei beobachteten Gleichfärbung der Wasserprobe und einer der Versuchsflüssigkeiten unmittelbar der Gehalt des geprüften Wassers

---

<sup>1</sup> Colorimetrische Bestimmung von Eisen in Mineral-, Brunnen-, Quell- und Flusswasser, von Dr. Adolf Jolles, Archiv für Hygiene, VIII, 402 (1888).

an Eisen. Diese Methode, welche in den meisten einschlägigen Handbüchern für die Eisenbestimmung im Wasser empfohlen wird, musste jedoch für Blut mannigfachen Modificationen unterworfen werden; denn im Wasser ist die Bestimmung solch minimaler Eisenmengen, wie sie in  $0.05 \text{ cm}^3$  Blut vorkommen, durch Eindampfen, respective Concentration des Wassers leicht durchzuführen, während bei Blut die Quantität eine constante Grösse darstellt. Beim Wasser kommen ferner keine die Reaction störenden Einflüsse in Betracht, während die Blutasche direct mit saurem schwefelsaurem Kalium aufgeschlossen wird, welcher Körper auf die Intensität der Färbung des Rhodaneisens und Rhodankalis<sup>1</sup> einen störenden Einfluss ausübt, dessen vollständige Eliminirung uns nach zahlreichen Versuchen gelungen ist. Endlich mussten wir im Interesse der klinischen Verwerthung der Methode darauf bedacht sein, Raschheit in der Ausführung und trotzdem Genauigkeit zu vereinigen, aus welchem Grunde wir die quantitative Bestimmung nur in zwei entsprechend construirten Cylindern, analog dem von O. Hehner (Chemical News, 23, 184, 1876) für colorimetrische Bestimmungen gemachten Vorschlage, durchzuführen bestrebt waren.

### Ausführung des Verfahrens.

Mit einer Capillarpipette entnimmt man der Fingerkuppe durch Ansaugen genau  $0.05 \text{ cm}^3 = 50 \text{ mm}^2$  Blut, wobei der Eintritt von kleinen Luftblasen zu vermeiden ist. Die Füllung des Capillarrohres muss rasch und dabei tadellos complet gemacht werden. Jede Spur Blutes, welche der Capillarpipette aussen etwa anhaftet, muss sorgfältigst mit Filtrirpapier entfernt werden und man trachtet allen Blutfarbstoff aus ihr herauszuspülen.

Am besten lässt man den Blutstropfen vorsichtig auf den Boden eines Porzellan- oder Platintiegels<sup>2</sup> fließen, spült hierauf

<sup>1</sup> Kriss und Moraht (Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft, Bd. 22, S. 2061) haben nachgewiesen, dass in der Lösung eine Doppelverbindung von Rhodankali und Rhodaneisen anzunehmen sei.

<sup>2</sup> Die Verwendung des Platintiegels ist aus dem Grunde vorzuziehen, weil der Porzellantiegel öfters erneuert werden muss, indem sich das gelöste Eisen-

die Capillare mit einigen Tropfen destillirten Wassers aus und erhält so die gesammten  $0.05 \text{ cm}^3$  Blut in den Tiegel.

Die Capillarpipette stellt ein dünnwandiges Glasröhrchen von  $14 \text{ cm}$  Länge und  $2 \text{ mm}$  Weite dar, welches an dem oberen Ende sich etwas trichterförmig erweitert. Die Marke befindet sich im oberen Drittel der Röhre. Nach jeder Benützung wird die Pipette zur Reinigung mit verdünnter Schwefelsäure gefüllt, dann mit verdünnter Kalilauge, Alkohol und Äther gereinigt. Der mit  $0.05 \text{ cm}^3$  Blut versetzte Tiegel wird dann auf eine Asbestplatte gestellt und das Blut zuerst mit kleiner, dann mit grösserer Flamme zur Trockene eingedampft. Hierauf wird der Tiegel direct über einer zuerst kleinen Flamme erhitzt, und zuletzt lässt man die Veraschung bei voller Bunsenflamme vor sich gehen. In circa 5—8 Minuten ist die Veraschung der minimalen Blutmenge erreicht. Nunmehr setzt man genau  $0.1 \text{ g}$  gepulvertes, wasserfreies saures schwefelsaures Kalium hinzu, bringt das Pulver zum Schmelzen und sucht durch Hin- und Herneigen des Tiegels über der Bunsenflamme die Schmelze mit dem Aschenrückstande, respective dem Eisenoxyd in innige Berührung zu bringen. Hierauf lässt man erkalten und spült dann die Schmelze mit heissem destillirten Wasser in ein Glasgefäss über, das ich vorläufig mit I bezeichnen will. In einem zweiten Glasgefässe, bezeichnet mit II, befindet sich die Vergleichsflüssigkeit mit genau bekanntem Eisengehalt. Um die colorimetrische Bestimmung nur mit zwei Glasgefässen — wie schon angegeben — quantitativ durchführen zu können, ist es Grundbedingung, dass die in den verdünnten Lösungen hervorgerufenen Farbenercheinungen ausschliesslich durch verschiedene Grade, nicht aber durch verschiedene Nuancen der Färbung sich von einander unterscheiden. Zu diesem Zwecke muss, wie eingehende Versuche gelehrt haben, die Vergleichsflüssigkeit das Eisen in genau derselben Form enthalten, wie es aus dem Blute gewonnen wird, d. h. durch Aufschliessung mit bestimmten Mengen saurem schwefelsaurem Kali, und zwar ist es am geeignetsten, wenn die Vergleichsflüssigkeit

---

oxyd in den Boden einfrisst und dann auch mit saurem schwefelsaurem Kali nicht entfernt werden kann.

pro Cubikcentimeter 0·00005 g Eisen und 0·1 g wasserfreies asures schwefelsaures Kali enthält.

### Darstellung der Vergleichsflüssigkeit.

0·0358 g chemisch reines Eisenoxyd = 0·025 g Eisen werden mit 50 g wasserfreiem Kalium hydrosulfuricum abgeschlossen. Das Aufschliessen geschieht in der Weise, dass zuerst etwa 10 g von der abgewogenen  $\text{KHSO}_4$ -Menge in einer Platinschale geschmolzen und dann zunächst eine kleine Menge der abgewogenen Eisenoxydmenge eingetragen wird. Hierauf wird die Platinschale bis zur Rothglut erhitzt, wobei die jetzt syrupdick fliessende Schmelze in Folge der Entweichung von Schwefelsäure zu rauchen und gleichzeitig das Eisenoxyd langsam unter Rothfärbung der Solution sich zu lösen beginnt. Nach vollständiger Lösung der beigefügten Eisenoxydmenge lässt man die Platinschale zunächst etwas abkühlen und spült die Schmelze vorsichtig in einen  $\frac{1}{2}$  Liter-Kolben. Hierauf wird wieder eine grössere Portion von Kalihydrosulfat, sowie Eisenoxyd in minimalen Quantitäten in die Platinschale gebracht und der Lösungsprocess in obiger Weise wiederholt etc. Zur vollständigen Auflösung der abgewogenen 0·0358 g  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  haben wir 28 g  $\text{KHSO}_4$  verbraucht, mit den restlichen 12 g  $\text{KHSO}_4$  wurde die Schale in analoger Weise ausgeschmolzen, bis zur Rothglut erhitzt, abkühlen gelassen und dann die Schmelze mit warmem Wasser aufgenommen, in den  $\frac{1}{2}$  Liter-Kolben gebracht, letzterer auf 500  $\text{cm}^3$  aufgefüllt und filtrirt. Die sorgfältige Herstellung dieser — allerdings in relativ grossen Quantitäten hergestellten — Lösung beansprucht circa eine Stunde. Zur Controle wurde der Eisengehalt der Lösung auch gewichtsanalytisch, und zwar durch Fällung mit Ammoniak in 50  $\text{cm}^3$  der Eisenlösung bestimmt. Nachdem 0·0358 g Eisenoxyd, entsprechend 0·025 g Eisen, in der gesammten Lösung, d. h. in 500  $\text{cm}^3$ , enthalten sind, so müssen in 50  $\text{cm}^3$  der Lösung 0·0025 g Eisen vorhanden sein. Die quantitative Bestimmung ergab:

- a) 0·0026 g Fe in 50  $\text{cm}^3$  der Lösung,
- b) 0·00265 g Fe in 50  $\text{cm}^3$  der Lösung.

Die etwas höheren Resultate — welche übrigens für je  $1\text{ cm}^3$  der Lösung gar nicht in Betracht kommen — sind wohl nur darauf zurückzuführen, dass die Vergleichsflüssigkeit im Verhältniss zum Eisengehalte bedeutende Mengen von saurem schwefelsaurem Kalium enthält und Spuren dieses Salzes von dem Eisenoxydhydratniederschlag hartnäckig zurückgehalten werden.

#### Ausführung des colorimetrischen Verfahrens.

Die zur colorimetrischen Bestimmung erforderlichen beiden Glasylinder stellen zwei regelmässige Glasylinder I und II von genau gleicher Höhe ( $12\cdot5\text{ cm}$ ) und gleichem Durchmesser ( $1\cdot5\text{ cm}$ ) dar, welche bis zu  $15\text{ cm}$  calibriert und die Zahlen 1,  $1\cdot5$ , 2,  $2\cdot5$ , 3,  $3\cdot5$ , 4 etc. fortschreitend von unten nach oben aufgetragen haben. Auf den beiden Cylindern befinden sich zwei einander entsprechende Theilstriche, z. B. die Theilstriche 10 genau in gleichen Abständen von den Böden. Jeder der beiden Cylinder ist in geringer Entfernung von dem Boden mit dem Abflusshahn versehen, die Böden sind möglichst glatt geschliffen und die Cylinder passen in mit Blei beschwerte hölzerne Fussgestelle, die so eingerichtet sind, dass die Cylinder je nach Bedarf leicht herausgenommen, beziehungsweise eingesetzt werden können. Zur quantitativen Bestimmung des Eisens im Blute geht man in der Weise vor, dass man die nach dem Aufschliessen mit saurem schwefelsaurem Kalium erhaltene Schmelze mit heissem destillirtem Wasser in den Cylinder I durch einen kleinen Trichter spült und genau bis zur Marke 10 auffüllt. In den Cylinder II bringt man genau einen Cubikcentimeter der Vergleichsflüssigkeit und füllt ebenfalls bis zur Marke 10 mit heissem destillirtem Wasser auf. Hierauf fügt man zu jedem der beiden Cylinder  $1\text{ cm}^3$  verdünnter Salzsäure (1:3) und dann genau  $4\text{ cm}^3$  Rhodan ammoniumlösung ( $7\cdot5\text{ g}$  Rhodan ammonium zu  $1\text{ l}$  gelöst). Nunmehr nimmt man die beiden Cylinder aus den Fussgestellen, schüttelt sorgfältig um und sieht bei gleichartiger Belichtung durch die hohen Flüssigkeitssäulen auf eine darunter befindliche weisse Fläche und lässt von der stärker gefärbten Lösung ausfliessen, bis die nunmehr verschieden hohen Flüssigkeitssäulen genau gleich intensiv gefärbt erscheinen. Aus dem dabei

zurückbleibenden Volum der bekannten Lösung ergibt sich der Eisengehalt des Blutes. Die Bestimmung wird am besten bei Tageslicht ausgeführt. Die Resultate geben natürlich nur den Eisengehalt in Volumprocenten an; um auch die Gewichtsprocente zu erhalten, ist noch die Bestimmung des specifischen Gewichtes des Blutes erforderlich. Dieselbe kann schnell und exact nach der bekannten Methode von Hammerschlag,<sup>1</sup> welche ja nur einen einzigen Blutstropfen benöthigt, erfolgen. Ich glaube an dieser Stelle der Hoffnung Raum geben zu können, dass, sobald ein genügendes klinisches Analysenmaterial vorliegen wird, die Volumprocente als relative Zahlen sich für diagnostische Zwecke genügend verwendbar erweisen und daher die jeweilige Bestimmung der specifischen Gewichte sich als überflüssig erweisen dürfte. Um die Genauigkeit der obigen Methode darzulegen, habe ich in frischem Schweine-, respective Rinderblut gewichtsanalytische und gleichzeitig mit  $0.05 \text{ cm}^3$  Blut colorimetrische Eisenbestimmungen durchgeführt. Die mit der Capillarpipette entnommenen  $0.05 \text{ cm}^3$  Blut wurden in einen vorher gewogenen Platintiegel gebracht, hierauf die Wägung wiederholt und auf diese Weise das genaue Gewicht der minimalen Blutmenge bestimmt.

Es resultirten folgende Ergebnisse:

Laufende Nummer	Eisengehalt für je 1g Blut erhalten nach den Methoden		
	a) Durch Aufschliessen mit saurem schwefel- saurem Kalium	b) Durch Fällung mit Nitroso- $\beta$ -Naphtol	c) Colorimetrisch
<b>Schweineblut</b>			
1	0.000698	0.000697	0.000672
2	0.000674	0.000675	0.000678
3	0.000832	0.000841	0.000836
5	0.000832	0.000836	0.000820
<b>Rinderblut</b>			
5	0.000500	0.000500	0.000514
6	0.000531	0.000518	0.000526
7	0.000512	0.000490	0.000500
8	0.000497	0.000502	0.000488

<sup>1</sup> Wiener klinische Wochenschrift, 3, 1018, 1890 und Zeitschrift für klinische Medicin, 20, 244—256.

Aus den angeführten Zahlen geht hervor, dass der relative Fehler der Methode ein derart geringer ist, dass die analytische Exactheit der colorimetrischen Methode nicht bezweifelt werden kann. Allerdings muss man, um mit der colorimetrischen Methode genaue Resultate zu erzielen, die angeführten Cautelen genau beobachten.

Die Bestimmungen des Eisens im Blute menschlicher Individuen wurde — da unserem Institute ein klinisches Material nicht zur Verfügung steht — nur bei 10 gesunden, sowie 2 chlorotischen Individuen durchgeführt und sind nachstehend die diesbezüglichen Untersuchungsergebnisse angeführt. Die Berechnung des Hämoglobingehaltes aus dem Eisengehalte in Procenten geschah nach der bekannten Formel  $\frac{100 \cdot m}{0 \cdot 42}$ , wobei  $m$  die Gewichtsmenge des gefundenen metallischen Eisens in Procenten bedeutet.

## Erwachsene.

Laufende Nummer	Name	Alter	Geschlecht	Specificsches Gewicht	Eisen in Gewichtsprocenten	Hb aus dem Fe-Gehalt	Hb nach Fleischi absolut	Hb nach Fleischi in Procenten	Zahl der rothen Blutzellen im Cubikcentimeter
<b>a) Gesunde Individuen</b>									
1	J—s.	33 $\frac{1}{2}$	männl.	1·0620	0·681	16·21	105	14·7	5,950.000
2	K—n.	28	»	1·0550	0·562	13·38	90	12·6	nicht bestimmt
3	M—r.	22	»	1·0560	0·578	13·76	90	12·6	»
4	S.	34	»	1·0600	0·641	15·26	95	13·3	5,800.000
5	L—b.	26	»	1·0590	0·633	15·07	90	12·6	nicht bestimmt
6	K—r.	23	»	1·0520	0·526	12·52	80	11·2	4,870.000
7	G—v.	36	»	1·0590	0·608	14·47	92	12·8	5,520.000
8	W—sch.	35	»	1·0590	0·544	13·66	85	11·9	5,200.000
9	W—r.	38	»	1·0660	0·720	17·14	105	14·7	nicht bestimmt
10	L. N.	27	»	1·0640	0·682	16·23	98	13·7	6,120.000
<b>b) Anämische</b>									
11	F.	?	weibl.	1·0498	0·433	10·3	65	9·1	3,500.000
12	O—r.	28	männl.	1·0510	0·441	10·5	65	9·1	3,750.000

Die gleichzeitige gewichtsanalytische und colorimetrische Eisenbestimmung im Rinder- und Schweineblute haben wohl zur Genüge die Exactheit der nach der colorimetrischen Methode erhaltenen Resultate ergeben, und gestützt auf diese Thatsache dürfen wir mit Sicherheit annehmen, dass auch die in obiger Tabelle angeführten Eisenbestimmungen analytische Genauigkeit besitzen. Aus diesen Resultaten ergibt sich zunächst, dass der Eisen-, respective Hämoglobingehalt im Blute gesunder Individuen auch höhere Zahlen erreichen kann, als in der Regel angenommen wird.

Nach Preyer (Zeitschrift für Biologie, S. 72, XXXIII) schwankt der Hämoglobingehalt des Blutes beim Manne zwischen  $12.09$  und  $15.07$  in  $100$  g Blut, Hoppe Seyler<sup>1</sup> erhielt als Mittel die Zahl  $14.08\%$  Hb; es wird jedenfalls noch der Verarbeitung eines grösseren klinischen Materials erfordern, um hinsichtlich des Eisengehaltes des Blutes unter normalen und pathologischen Verhältnissen exacten Aufschluss zu erhalten, zu welchem Zwecke die beschriebene colorimetrische Methode besonders geeignet erscheint.

Die Methode erfordert zu ihrer Ausführung  $10-15$  Minuten, vorausgesetzt, dass alle Lösungen bei der Hand sind. Ich gedenke, um der Methode speciell an Kliniken Eingang zu verschaffen, einen Apparat zusammenzustellen, welcher nachstehende Utensilien und Lösungen in unmittelbar gebrauchsfähigem Zustande enthält:

- Eine Capillarpipette von  $0.05$   $cm^3$  Inhalt;
- einen Platintiegel oder eventuell mehrere Porzellantiegel von Berliner Porzellan mit entsprechendem Deckel;
- eine Asbestplatte;
- zwei entsprechende Cylinder zur colorimetrischen Bestimmung;
- eine kleine Spritzflasche;
- eine weisse Porzellanplatte;
- $250$   $cm^3$  der Vergleichsflüssigkeit mit einer Pipette von  $1$   $cm^3$  Inhalt;

<sup>1</sup> Zeitschrift für physiologische Chemie, XXI, S. 466.

500  $cm^3$  verdünnte Salzsäure HCl (1:3) mit einer Pipette von 1  $cm^3$  Inhalt;

1 l Rhodanammonium (7·5 g pro Liter) mit einer Pipette von 4  $cm^3$  Inhalt;

50 oder mehr Pulver, enthaltend per Stück genau 0·1 g wasserfreies saures schwefelsaures Kali und einen kleinen Pinsel.