

ZUR CAROTINBESTIMMUNG IN KLEINSTEN BLUTMENGEN.

Von

WILHELM HALDEN und GÜNTHER KARL UNGER.

Aus dem Medizinisch-chemischen Institut der Universität Graz,
Vorstand: Prof. Dr. HANS LIEB.

(Eingelangt am 20. Oktober 1936.)

Die Entdeckung, daß der menschliche Organismus seinen Bedarf an Vitamin A zum größten Teil aus dessen Provitamin Carotin deckt, brachte es mit sich, daß man sich für die Carotinkonzentration des normalen und pathologischen Blutes zu interessieren begann. Die bisher angegebenen Methoden entsprechen jedoch nicht immer den Anforderungen, die der Kliniker an sie stellen muß. Diesem Mangel soll die von uns bereits seit längerer Zeit verwendete Methode abhelfen, die in ihrer Einfachheit, Genauigkeit und vor allem den geringen Blutmengen, die zu ihrer Durchführung benötigt werden, den Ansprüchen des Chemikers und Klinikers Genüge leistet.

Zu einer Bestimmung des Carotins stehen prinzipiell drei Möglichkeiten zur Verfügung: 1. die kolorimetrische Bestimmung nach seiner Eigenfarbe, 2. die kolorimetrische Bestimmung mit Hilfe der Antimontrichloridreaktion, 3. die spektrophotometrische Bestimmung.

Die kolorimetrische Bestimmung des Carotins nach der Gelbfärbung, die es organischen Lösungsmitteln verleiht, ist wohl die einfachste, älteste und auch am häufigsten gehandhabte. Schon HIJMANS VAN DEN BERGH¹ gibt eine Methode an, die später auch von CONNOR² und anderen Autoren angewandt wurde und die auch wir für unsere Zwecke modifizierten. Unterschiede zeigen sich nur in den verwendeten Vergleichslösungen und Meßapparaten. So arbeiteten R. KUHN und BROCKMANN³ am Mikro-Hellige-Kolorimeter mit einer Vergleichslösung von Azobenzol, VAN DEN BERGH (l. c.) und CONNOR (l. c.), sowie in jüngerer Zeit KAUFFMANN und DRIGALSKI⁴ verglichen gegen Kalium-

¹ Biochem. Ztschr. **108**, 279 (1920).

² J. biol. Chem. **77**, 619 (1928).

³ Ztschr. physiol. Chem. **206**, 41 (1932).

⁴ Klin. Wochenschr. **12**, 306 (1933).

bichromatlösungen; WENDT⁵, bzw. SCHNEIDER und WIDMANN⁶ verwendeten das Lovibond-Tintometer. Diese Methoden sind nicht sehr empfindlich und haben ein begrenztes Anwendungsbereich, weil sie niedrige Carotinkonzentrationen, wie sie in normalen und pathologischen Fällen ohne weiteres auftreten können, nicht zu erfassen vermögen. Auf die Nachteile, die durch Verwendung einer Vergleichslösung entstehen, braucht nicht besonders hingewiesen zu werden.

Die Reaktion mit Antimonchlorid nach CARR und PRICE, die an Carotinoiden von B. v. EULER und KARRER⁷ untersucht wurde, ist zu Bestimmungen des Carotins im Blut nicht geeignet.

Die sicherlich genaueste Methode, die spektrophotometrische (GILLAM und SHAFIK EL RIDI⁸, VERZÁR c. s.⁹), ist zu kompliziert für eine Anwendung auf der Klinik und benötigt zu große Blutmengen.

All diesen Schwierigkeiten suchten wir durch die Verwendung eines genauen Mikrokolorimeters mit Spektralfilterung^{9a} zu begegnen. Wir wählten hiezu das Zeiß-Pulfrichsche Stufenphotometer mit Mikro-Adaption.

Methodik.

Für die allgemeine Anwendbarkeit einer klinisch brauchbaren Carotinbestimmungsmethode ist es unerlässlich, auch bei kleinsten Blutmengen (1—1½ ccm) das bei der Gerinnung entstehende Blutserum möglichst quantitativ in den Arbeitsgang überzuführen. Wir verfahren in folgender Weise: das Blut wird sofort nach der Entnahme in ein eigens hiefür konstruiertes Reagenrohr gefüllt, das am Boden eine kreisförmige Öffnung mit einem Durchmesser von ca. 1½ mm besitzt. Rund um diese Öffnung befindet sich ein kurzes Abflußrohr; ein dicht in das Rohr passender Gummistopfen verschließt die Öffnung vollkommen. Nach der Gerinnung wird der Stopfen vorsichtig entfernt und das Serum zum Ausfließen

⁵ Klin. Wochenschr. 14, 9 (1935).

⁶ Klin. Wochenschr. 14, 670 (1935).

⁷ Helv. Chim. Acta 15, 496 (1932).

⁸ Biochem. Journal 29, 2465 (1935).

⁹ VERZÁR, SÜLLMANN und VISCHER, Biochem. Ztschr. 274, 7 (1934).

^{9a} Hierdurch werden störende Färbungen, die z. B. durch gelbgefärbte Phosphatid-Umwandlungsprodukte hervorgerufen werden können, ausgeschaltet. Den Hinweis auf die Möglichkeit der Behebung dieser Fehlerquelle bei Verwendung des Farbfilters S 47 ($\lambda = 463 \text{ m}\mu$) verdanken wir einer mündlichen Mitteilung von Herrn Dr. O. BRUNNER am I. Chemischen Institut der Universität Wien; s. a. BRUNNER, BARONI und KLEINAU, Ztschr. physiol. Chem. 236, 257 (1935) und Mh. Chemie 68, 244, 261, bzw. 264 (1936).

gebracht. Sammelt sich das Serum oberhalb des Koagulates an, so erlaubt die durch das enge Lumen des Gefäßes hervorgerufene hohe Serumschicht auch hier ein vorsichtiges Abgießen oder Abhebern. In komplizierteren Fällen ist die Anwendung eines Kapillarhebers zu empfehlen.

Normalerweise gewannen wir das Serum durch 24stündiges Stehenlassen des Blutes in der Kälte unter Verschuß mit Gummistopfen. Hierauf wurde es nach den oben beschriebenen Maßnahmen in eine kleine Ausflußmensur mit Hahn gebracht, die verwendete Serummenge (s) bestimmt und dieser entsprechend die Menge der Reagentien gewählt. Aus der Mensur wurde das Serum quantitativ in einen kleinen Schütteltrichter abgelassen, dort mit der gleichen Menge (s) Alkohol abs. koaguliert, mit der doppelten¹⁰ Menge (2s) Petroläther (50—70° siedend) versetzt und solange umgeschwenkt, bis sich eine dickflüssige Emulsion gebildet hatte, die einige Sekunden stabil blieb. Sobald die Trennung begann, wurde sie durch Zusatz von dest. Wasser (2s) vervollständigt, die Alkoholphase verworfen und die gelbe Petrolätherschicht in ein schmales Zentrifugenröhrchen abgelassen, das mit einem Gummistopfen bis zur Vornahme der Messung dicht verschlossen blieb.

Zu unseren Bestimmungen eignete sich am besten die Mikroküvette mit der Schichtdicke 5 cm und einem Fassungsraum von 1 ccm. Hieraus läßt sich leicht errechnen, daß — bei Verwendung der doppelten Petroläthermenge — theoretisch $\frac{1}{2}$ ccm Serum, resp. 1 ccm Blut genügen würde; praktisch wird diese Menge durch unvermeidliche Verluste etwas erhöht werden.

Die typische Farbkurve ließ uns das Filter S 47 wählen, an dem wir auch mit Hilfe einer Carotin-Petrolätherlösung unsere Eich-

¹⁰ Die meisten Autoren vor uns haben sich der $1\frac{1}{2}$ fachen Petroläthermenge bedient. Drei Gründe bewogen uns zu einer Abweichung:

1. fallen bei einer höheren Konzentration die meisten Werte wegen ihres intensiven Farbtones in ein ungünstiges Meßbereich,
2. wird bei unserer Arbeitsweise die minimale, zur Bestimmung nötige Serummenge auf (theoretisch) $\frac{1}{2}$ ccm herabgesetzt, und
3. gibt die Verwendung einer größeren Petroläthermenge größere Sicherheit für eine quantitative Extraktion allen Carotins.

kurve herstellten¹¹. Hierbei stellten wir fest, daß die Lösung des Carotins in Petroläther zum Unterschied von der in Chloroform eine außerordentliche Haltbarkeit zeigt¹². Lösungen in Chloroform ergaben am Stufenphotometer die aus Tabelle I ersichtlichen Werte.

Tabelle I.

Carotin in Chloroform (Filter S 47)			
Makroküvette: Schichtdicke 2 cm $c = 0,2368 \text{ mg } \%$		Mikroküvette: Schichtdicke 5 cm $c = 0,04736 \text{ mg } \%$	
Zeit	D %	Zeit	D %
11 h 45	59	11 h 30	75,5
12 h 45	62	13 h 00	81
17 h 00	67	17 h 00	94
Tags darauf		Tags darauf	
10 h 30	74	10 h 45	nicht meßbar

Die Lösungen standen in der Zeit von der ersten bis zur letzten Messung in einem verdunkelten Raum, in Kölbchen mit eingeschliffenem Glasstopfen.

Carotin hingegen, das in Petroläther (50—70°) gelöst war, ergab die aus Tabelle II hervorgehenden Werte.

Tabelle II.

Carotin in Petroläther (Filter S 50)			
Makroküvette: Schichtdicke 2 cm $c = 0,25 \text{ mg } \%$		Makroküvette: Schichtdicke 2 cm $c = 0,50 \text{ mg } \%$	
Datum	D %	Datum	D %
20. V. 36	58	20. V. 36	37
28. V. 36	57	28. V. 36	37

Die Lösung ist also nach acht Tagen optisch noch unverändert.

Unsere Verdünnungsreihe für die Eichkurve, Carotin in Petroläther, ergab die in Tabelle III zusammengestellten Werte.

¹¹ Wir möchten der Firma E. MERCK auch an dieser Stelle für die freundliche Überlassung des hiezu nötigen reinsten Carotins bestens danken.

¹² Vgl. hiezu die Angaben von BAUMANN und STEENBOCK, J. biol. Chem. 101, 561 (1932).

Tabelle III.

Carotin in Petroläther Konzentration in mg %	Lichtdurchlässigkeit D %	Extinktions- Koeffizient
0,0874	11	0,959
0,0546	25,7	0,590
0,0349	42,5	0,372
0,0218	60	0,222
0,0175	67	0,174
0,0087	82,5	0,084

Schichtdicke 5 cm

Filter S 47

Die darnach gezeichnete Kurve ergab eine Gerade, wodurch die Gültigkeit des BEER-LAMBERT'schen Gesetzes für Carotininlösungen in Petroläther erwiesen ist (vgl. Diagramm).

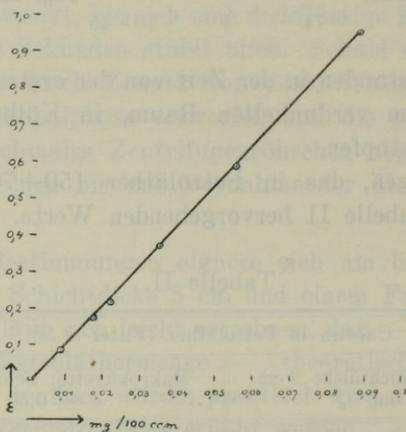


Abb. 1.

Da durch die Extraktion mit 2 s Petroläther im Stufenphotometer tatsächlich nur die halbe Serumkonzentration gemessen wird, ergibt selbstverständlich die errechnete Petrolätherkonzentration, mit 2 multipliziert, erst die Konzentration des Serums. Sollte der Fall eintreten, daß sich Ungenauigkeiten bei der Zummessung des Petroläthers ergeben¹³, daß also nicht die vorgeschriebene Menge von 2 s verwendet wird, so erlaubt die Formel

$$C = \frac{c \cdot p}{s}$$

¹³ Bei Alkohol und Wasser sind kleine Differenzen gegenüber den angegebenen Mengen nicht von Belang.

worin C die gesuchte Serumkonzentration, c die Petrolätherkonzentration, p die verwendete Petroläthermenge und s die Serummenge bedeuten, mühelos eine Korrektur des Fehlers. Im Normalfalle verhält sich nämlich $p:s$ wie $2:1$, weshalb wir dann für $p/s = 2$ einsetzen können.

Sollten bei Untersuchungen von Seren Werte unter 10 oder über 85% D am Stufenphotometer abgelesen werden, d. h. die Carotinkonzentration zu hoch oder zu niedrig sein, so empfiehlt es sich, die Petroläthermenge zweckmäßig zu verändern, die Lösung also zu verdünnen oder einzudampfen¹⁴. Auch in solchen Fällen ist die obige Formel anzuwenden.

Mit Hilfe dieser Kurve ermittelten wir an einer Reihe von Seren die Carotinkonzentration, wobei wir Werte von 0,02 bis 0,09 mg% erhielten. Die Blutproben stammten von Patienten, bei denen von vornherein eine pathologische Veränderung der Carotinkonzentration des Blutes nicht anzunehmen war.

Veränderungen der Carotinwerte durch das 24stündige Stehen (kontrolliert durch Messungen eines und desselben Blutes sofort nach Gerinnung und 24 Stunden später) beobachteten wir nicht; auch war es nicht möglich, durch wiederholte Extraktionen mit Petroläther aus der hypophasischen Schicht noch meßbare Gelbfärbungen zu erhalten. Der grundsätzliche Vorwurf, den WILLSTÄDT und LINDQVIST¹⁵ gegen diese Art der Extraktion erheben, daß sich nämlich im Petrolätherextrakt auch Lycopin vorfinden kann, dürfte für den Kliniker praktisch bedeutungslos sein, da ein eventueller Lycopingehalt des Blutes, der, wie sie selbst und DANIEL und SCHEFF¹⁶ angeben, selten genug vorkommt, stets anamnestisch festgestellt werden kann.

Z u s a m m e n f a s s u n g.

1. Nach einer kurzen Übersicht über die bisher angegebenen Verfahren zur Carotinbestimmung im Blut wird eine Methode dargestellt, bei der durch besondere Maßnahmen auch bei Blutmengen von $1-1\frac{1}{2}$ ccm das Serum möglichst quantitativ verarbeitet werden kann. Die Extraktion und Messung des Carotins, sowie die Auswertung der Ablesungen werden beschrieben.

¹⁴ Ein eventuelles Eindampfen der Lösung ist in einer Stickstoffatmosphäre bei Temperaturen, die sich unter 100° bewegen müssen, vorzunehmen.

¹⁵ Ztschr. physiol. Chem. **240**, 10 (1936).

¹⁶ Proc. soc. exp. biol. med. **33**, 26 (1935).

2. Die Lösung des Carotins in Petroläther erscheint wesentlich stabiler als die in Chloroform.

Wir danken auch an dieser Stelle Herrn Prof. HANS LIEB für sein Interesse an unseren Arbeiten. Ferner sind wir der Grazer Augenklinik, der Gynäkologischen Klinik, der Kinderklinik und der I. Mediz. Klinik für die Überlassung zahlreicher Blutproben zu bestem Dank verpflichtet.