

Summary. For identification of the alcohol-soluble haptens of the nervous system, the agar precipitation test was employed. Ethanol extracts and ethanolic solutions of cerebroside, cholesterol, cephalin, lecithin and sphingomyelin were tested, both individually and in different combinations, against EAE* sera. For this test the ethanolic lipid solutions were diluted with distilled water at a ratio 1:4.

A chromatographically homogenous cerebrum or a cerebroside mixture precipitates in diffusion against EAE sera only after addition of cholesterol and lecithin. The optimal molar weight ratio of cerebroside: cholesterol:lecithin is 2:4:1. We also achieved a positive precipitation test with cerebroside-cholesterol-sphingomyelin mixtures. By saturating EAE sera with emulsions of cerebroside-cholesterol-lecithin all antibodies can be adsorbed which react with ethanolic extracts from nerve, brain and spinal cord of various animal species.

Starting with literature studies and own test results, it is discussed whether cholesterol and lecithin are functioning as so-called auxiliary lipids and in what molecular configuration cerebroside, cholesterol and lecithin are present in the particles of the lipid emulsion.

The hapten function of the cerebroside was derived from sensibilization experiments. After injection of cerebrum, bovine serum albumin and adjuvant, rabbits produce anti-sera which behave like EAE sera. These sera precipitate with emulsions from nerve extracts and with cerebroside-cholesterol-lecithin emulsions. Cerebroside becomes serologically inactive by splitting off the sugar group. Analogously, hydrolyzed brain material loses its ability to precipitate.

Nach Abschluß dieser Arbeit erschien eine Veröffentlichung von S. JOFFE, M. M. RAPPORT and L. GRAF: Identification of an organ specific lipid hapten in brain. *Nature* **197**, 60 (1963).

Die drei Autoren bestätigen unsere Befunde. Sie fanden, daß Anti-Gehirnseren mit Galaktocerebroside in Anwesenheit der Hilflipide Cholesterin und Lecithin unter Komplettverbrauch reagieren.

Für gewissenhafte technische Assistenz danken wir Fräulein URSULA KUCK.

Literatur. ¹ NIEDIECK, B., u. K. LANKEN: Zur Serologie der Experimentellen Allergischen Neuritis. Ein Agarpräzipitationstest mit alkoholischen Nervextrakten. *Klin. Wschr.* **39**, 1164 (1961). — ² RUDY, H.: Über die chemische Natur des

* EAE = Experimental allergic encephalomyelitis.

Hirnantigens. *Biochem. Z.* **24**, 426 (1932). — ³ TROPP, C., u. A. BASERGA: Ein Polydiaminophosphatid aus retikuloendothelreichen Organen als Hapten. *Z. Immun.-Forsch.* **83**, 234 (1934). — ⁴ ORNSTEIN, F.: Über das antigene Vermögen der Lipide. *Wien. klin. Wschr.* **39**, 785 (1926). — ⁵ WEISS, B.: Separation of sphingolipids. *J. biol. Chem.* **223**, 523 (1956). — ⁶ KLENK, E.: Über eine vereinfachte Methode zur Darstellung von phosphorfreien Cerebroside und über die als Spaltprodukte auftretenden Fettsäuren. *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* **281**, 208 (1944). — ⁷ KLENK, E.: Über die partiellen Spaltprodukte von Cerebron. *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* **153**, 74 (1926). — ⁸ JATZKEWITZ, H., v. E. MEHL: Zur Dünnschichtchromatographie der Gehirn-Lipide, ihrer Um- und Abbauprodukte. *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* **320**, 251 (1960). — ⁹ WAGNER, H., L. HÖRHAMMER u. P. WOLFF: Dünnschichtchromatographie von Phosphatiden und Glykolipiden. *Biochem. Z.* **334**, 175 (1961). — ¹⁰ WAKSMAN, B. H., H. PORTER, M. D. LEES, R. D. ADAMS and J. FOLCH: A study of the chemical nature of components of bovine white matter effective in producing allergic encephalomyelitis. *J. exp. Med.* **100**, 451 (1954). — ¹¹ LEES, M. B., L. AMADUCCI and B. H. WAKSMAN: Further studies of the properties of the encephalitogenic component (s) of bovine nervous tissue. *J. Neurochem.* **8**, 285 (1961). — ¹² HANAHAN, D. J.: Lipide chemistry. New York u. London: John Wiley and Sons, Inc. 1960. — ¹³ WADSWORTH, A. B.: Standard methods, 3. Aufl. Baltimore 1947. — ¹⁴ MALTANER, E.: *Proc. N. Y. St. Ass. Publ. Health Lab.* **26**, 29 (1946). — ¹⁵ RAPPORT, M. M., N. F. ALANZO, L. GRAF and F. P. SKIPSKI: Immunochemical studies of organ and tumor lipids. *Cancer (Philad.)* **11**, 1125 (1958). — ¹⁶ NIEDIECK, B., u. Ö. PALACIOS: (In Vorbereitung.) — ¹⁷ OUCHTERLONY, Ö.: Progress in allergy, vol. VI. Basel u. New York: S. Karger 1962. — ¹⁸ SACHS, H., u. A. KLOPPSTOCK: Die serologische Differenzierung von Lecithin und Cholesterin. *Biochem. Z.* **159**, 490 (1925). — ¹⁹ LEVENE, P. A., K. LANDSTEINER and J. VAN DER SCHEER: Immunization experiments with lecithin. *J. exp. Med.* **46**, 197 (1927). — ²⁰ WEIL, A. J., u. F. BESSER: Die antigenen Eigenschaften von Cholesterin, Cholesterinderivaten und synthetischem Lecithin. *Klin. Wschr.* **10**, 1941 (1931). — ²¹ BERGER, E., u. H. SCHOLER: Zur Spezifität der Antikörper gegen Substanzen aus der Klasse der Lipide. *Z. Immun.-Forsch.* **76**, 16 (1932). — ²² WEIL, A. J., and L. E. DEN DOOREN DE JONG: Chemo-specific flocculation of sterols by antisterol-sera. *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)* **36**, 283 (1937). — ²³ WEIL, A. J., u. F. BESSER: Zur Kenntnis der antigenen Eigenschaften von Cholesterin und Cholesterinderivaten. *Z. Immun.-Forsch.* **76**, 76 (1932). — ²⁴ GAETANI, G. F.: Über die Rolle des Cholesterins bei der Aktivierung von Lipoidantigenen. *Z. Immun.-Forsch.* **69**, 277 (1930). — ²⁵ WEIL, A. J.: The Wassermann antigen and related "alcoholic soluble" antigens. *Bact. Rev.* **5**, 293 (1941). — ²⁶ Ströss, B.: Papierchromatographische Darstellung von Antigen-Antikörper-Reaktionen. *Zbl. Bakt., I. Abt.* **179**, 72 (1960). — ²⁷ RUDY, H.: Untersuchungen über die Vorgänge bei der Maskierung von Haptenen durch Lipide. *Biochem. Z.* **245**, 431 (1932). — ²⁸ RAPPORT, M. M., L. GRAF and J. YARIV: Immunochemical studies of organ and tumor lipids. *Arch. Biochem.* **92**, 438 (1961). — ²⁹ KISS, J., and T. JURCSIK: Investigation in the sphingosin field, Part. XIV: The structure of sphingoglycosides. *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.* **5**, 477 (1955). — ³⁰ SCHMIDT, H.: Fortschritte der Serologie. Darmstadt: Dr. Dietrich Steinkopff 1955.

Direkte spektrophotometrische Bestimmung des Gesamtbilirubins im Plasma von Neugeborenen

IX. Mitteilung über Ultramikromethoden im klinischen Laboratorium

Von

R. RICHTERICH

Technische Assistenz: L. BRAUN

Aus dem Medizinisch-Chemischen Institut (Direktor: Prof. Dr. med. H. AEBI) und der Kinderklinik (Direktor: Prof. Dr. med. E. ROSSI) der Universität Bern

Zusammenfassung

Die spektrophotometrische Methode von WHITE, HAIDAR und REINHOLD zur Bestimmung des Plasma-Bilirubins von Neugeborenen wurde für Spektrallinien-Photometer mit den Filtern 436 nm und 578 nm adaptiert. Bei einer Verwendung von 20 µl Plasma und

1 ml Tris-Puffer gilt folgende empirisch ermittelte Formel:

$$\text{mg Bilirubin/100 ml} = (87 \cdot E_{436 \text{ nm}}) - (197 \cdot E_{578 \text{ nm}}).$$

Bestimmungen des Gesamt-Bilirubins bei 25 Neugeborenen als Azobilirubin und mit der physikalischen

Methode ergaben eine gute Übereinstimmung der Resultate ($r = 0,988$).

Summary

The spectrophotometric method of WHITE, HAIDAR and REINHOLD for the determination of plasma bilirubin in the newborn has been adapted to photometers using filters at 436 nm and 578 nm (mercury lines). If 20 μ l plasma and 1,0 ml Tris-buffer are used, the following empirical formula was obtained:

$$\text{mg bilirubin/100 ml} = (87 \cdot E_{436 \text{ nm}}) - (197 \cdot E_{578 \text{ nm}}).$$

Results obtained from 25 sera of newborn infants by this method and by an azobilirubin method agreed well ($r = 0,988$).

Die Bestimmung des Bilirubins gilt als eine der unzuverlässigsten Methoden im klinischen Laboratorium^{1,2}. Die von Labor zu Labor abweichenden Resultate wirken sich besonders bei der Beurteilung des Neugeborenen-Ikterus aus. Bei diesem Symptom gilt — je nach Klinik — ein Bilirubin zwischen 14 und 30 mg/100 ml als Indikation zur Austausch-Transfusion. Die Unstimmigkeiten in bezug auf den indikationsstellenden Bilirubinwert und den Nutzen der Austausch-Transfusion sind zu einem großen Teil eine Folge der von Labor zu Labor differierenden Resultate. Dies geht aus folgendem Beispiel deutlich hervor³:

In zwei Kliniken in Vermont (USA) mit gleichem Ärzte- und Schwestern-Staff, gleichem Bilirubin-Grenzwert als Austausch-Indikation, gleicher Methode zur Bestimmung des Bilirubins, aber zwei verschiedenen Laboratorien, wurden im einen Spital während desselben Zeitraumes 43 von 160 Neugeborenen (27%) und in der anderen Klinik 4 von 156 Neugeborenen (2,6%) ausgetauscht. Diese Diskrepanz war in erster Linie auf Unterschiede in den Resultaten der Bilirubin-Bestimmung zurückzuführen. Die Hauptquelle der Divergenzen lag in den verschieden bereiteten Standard-Lösungen.

Es besteht somit die Notwendigkeit einer raschen und zuverlässigen Methode zur Bestimmung des Bilirubins im Plasma von Neugeborenen. Der optimale Meßbereich soll zwischen 5 und 30 mg/100 ml liegen. Die Bestimmung soll durch die Anwesenheit von Hämoglobin (hämolytische Erkrankung, Hämolyse bei der Blutentnahme) nicht verfälscht werden. Es sollen nicht mehr als 20 μ l Serum oder Plasma benötigt werden (Entnahme von der Ferse). Andererseits kann auf eine Differenzierung zwischen indirekt- und direkt-reagierendem Bilirubin verzichtet werden, da dies für die Indikationsstellung zur Austauschtransfusion von nebensächlicher Bedeutung ist.

Die auffallende physikalische Eigenschaft des Bilirubins ist seine intensive Gelbfärbung. Schon früh wurde versucht, durch Messung der Farb-Intensität des Plasmas die Bilirubin-Konzentration zu ermitteln.

MEULENGRACHT⁴ führte 1920 den Ikterus-Index in das klinische Laboratorium ein, und HEILMEYER und WAPPLER⁵ veröffentlichten einige Jahre später die ersten photometrischen Untersuchungen über die Eigenfarbe des Plasmas. In neuerer Zeit gelang es, durch Messung bei zwei oder mehr Wellenlängen die beiden Hauptfehlerquellen der physikalischen Bilirubin-Bestimmung, die Trübung⁶ und die Hämolyse⁷, zu eliminieren. Dennoch geben diese Methoden beim Erwachsenen keine befriedigenden Resultate, da sowohl beim Gesunden wie auch beim Ikterischen nur etwa 70% der Gelbfärbung des Plasmas durch die Bilirubine verursacht wird. Unter den übrigen Lipochromen sind vor allem die Carotine zu erwähnen, die gegen 20% der Gelbfärbung ausmachen. Im Gegensatz zum Erwachsenen fehlen beim Neugeborenen in der ersten Lebenswoche die Carotine im Plasma⁸ oder kommen nur in Mengen vor, deren Farbintensität weniger als 0,1 Bilirubin/100 ml

entspricht^{9,10}. Beim Neugeborenen beruht eine Gelbfärbung des Plasmas daher fast ausschließlich auf der Anwesenheit von Bilirubinen.

Auf Grund dieser Beobachtungen entwickelten WHITE, HAIDAR und REINHOLD¹⁰ 1958 eine Methode zur direkten spektrophotometrischen Bestimmung des Gesamt-Bilirubins beim Neugeborenen. Plasma wird mit Phosphat-Puffer verdünnt und die Extinktion bei 453 nm und 575 nm gemessen. Bei 453 nm absorbieren Hämoglobin und Bilirubin, bei 575 nm ausschließlich Hämoglobin. Da die Extinktions-Koeffizienten dieser Stoffe bekannt sind, kann aus der Differenz der Extinktionen die Bilirubin-Konzentration errechnet werden. Diese Technik, die in den USA eine weite Verbreitung gefunden hat, darf als einfachste und zuverlässigste Methode zur Erfassung des Gesamt-Bilirubins beim Neugeborenen gelten.

Voraussetzung für die Durchführung dieser Methode ist ein gutes Spektral-Photometer mit schmalen Bandbreiten bei 453 nm und 575 nm (z. B. Beckman DB, Beckman DU, Zeiss PMQ II). Mit einfacheren Spektral-Photometern (z. B. Coleman, Lumetron, Beckman Spinco) werden unzuverlässige Resultate erhalten, da die Monochromasie dieser Geräte ungenügend ist. Bei den in Europa verbreiteten äußerst exakt messenden Spektrallinien-Photometern (Eppendorf, Zeiss Elko II) konnte die Methode bisher nicht verwendet werden, da keine Meßlinien bei 453 nm und 575 nm zur Verfügung stehen. Dies ist bedauernd, da diese Geräte zu Absolut-Messungen dank ihrer Monochromasie und Stabilität besonders geeignet sind.

Wir beschreiben in der vorliegenden Arbeit eine Methode zur direkten photometrischen Bestimmung des Gesamt-Bilirubins unter Verwendung der Quecksilberlinien 436 nm und 578 nm. Eine ähnliche Technik zur Messung mittels eines selbstgebauten Photometers wurde kürzlich von JACKSON¹¹ angegeben.

A. Arbeitsvorschrift

Prinzip. Die Blutentnahme erfolgt mittels heparinisierten Glas-Capillaren*. Nach der Zentrifugation wird das Plasma mit Tris-Puffer verdünnt und die Extinktion bei 436 nm und 578 nm gemessen. Mit Hilfe einer experimentell ermittelten Konstante wird aus der Extinktion bei 436 nm die Summe der Bilirubin- + Oxyhämoglobin-Konzentration berechnet. Die auf Grund der Extinktion bei 578 nm ermittelte Konzentration des Oxyhämoglobins wird anschließend von diesem Wert subtrahiert.

Apparate. Spektral-Photometer oder Spektrallinien-Photometer mit Filtern bei 436 nm und 578 nm und Halbmikro-Auslauf-Cuvetten¹² (Vol. = 1,0 ml, $d = 1,0$ cm).

Labor-Zentrifuge oder Ultrazentrifuge mit Spezialkopf (z. B. Ecco-Quick*).

Geräte. 1 Voll-Pipette oder automatische Bürette, 1,0 ml. 1 Mikro-Pipette, 0,02 ml (absolut geeicht, mit schlanker Spitze, z. B. DB-Pipette, Skovskellet 21, Holte, Dänemark*). Caraway-Capillaren, heparinisiert¹³, zur Blutentnahme, mit Kunststoff-Stopfen und Plastiocillin.

Reagenz: Tris-Puffer, 50 mM, pH 7,4**. 24,3 g Tris-hydroxymethyl-aminomethan werden mit destilliertem Wasser auf 1000 ml gelöst. 25 ml dieser Lösung zu 40 ml einer 0,1 N Salz-

* Bezugsquelle: Dr. Vaudaux & Co., Binningen (Basel-Land), Schweiz.

** Bezugsquelle: Chemische Fabrik Schweizerhall AG, Schweizerhalle (Baselland), Schweiz.

säure geben und mit destilliertem Wasser auf 1000 ml auffüllen. pH eventuell auf 7,4 einstellen. Bei Zimmertemperatur mindestens 3 Monate haltbar.

Blutentnahme. Wir führen die Blutentnahme mit Caraway-Capillaren¹³ durch*. Nach Einstich in die Ferse wird die Spitze der Capillare in den sich bildenden Blutstropfen gesetzt und durch Heben und Senken gefüllt. Sie wird dann an beiden Enden mit Plastizillin oder Kunststoff-Stopfen verschlossen und zentrifugiert (gewöhnliche Laborzentrifuge: Capillaren in Zentrifugenglas stellen; oder Ultrazentrifuge Ecco-Quick mit Spezialkopf)**.

Messung. 1,0 ml Tris-Puffer in die Photometer-Cuvette geben. 20 µl Plasma mit einer absolut geeichten Pipette aus der Caraway-Capillare zum Puffer geben und gut mischen. Extinktion bei 436 nm und 578 nm gegen Tris-Puffer ablesen.

Berechnung

(1)

$$\text{mg Bilirubin/100 ml} = (87 \cdot E_{436 \text{ nm}}) - (197 \cdot E_{578 \text{ nm}}).$$

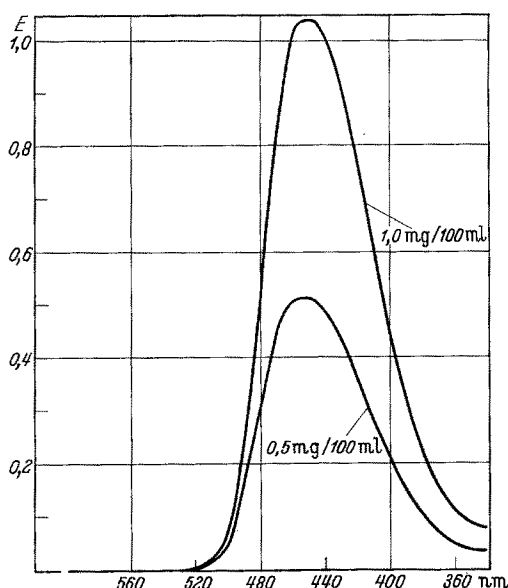


Abb. 1. Absorptionsspektrum eines reinen Bilirubin-Präparates in Chloroform. Bilirubin in CHCl_3 , $E_{453} = 60\,800$, $E_{436} = 56\,800$, $MG = 584,65$

B. Dokumentation

1. **Methoden.** Die Bestimmung des Hämoglobins erfolgt sowohl durch Messung als Oxyhämoglobin bei 578 nm unter Annahme eines molaren Extinktions-Koeffizienten von $15\,400^{14}$ als auch durch Messung als Hämiglobincyanid bei 546 nm unter Annahme eines molaren Extinktions-Koeffizienten von $11\,000^{15}$. Das Gesamt-Bilirubin wurde als Azo-Bilirubin in einer Ultramikro-Modifikation bestimmt¹⁶.

Die Absorptions-Spektren wurden mit dem Beckman DB-Spektral-Photometer mit Varicord-Direktschreiber aufgenommen. Die Extinktions-Messungen erfolgten entweder mit dem Beckman DU- oder dem Eppendorf-Photometer.

Der molare Extinktions-Koeffizient (ϵ) ist definiert als die Extinktion einer molaren Lösung unter festgelegten Meßbedingungen (Lösungsmittel, Wellenlänge, Monochromasie, $d = 1,0$ cm).

Die Absorptions-Konstante (A) ist definiert als die Extinktion (E) einer Lösung, die 1 mg Substanz pro 100 ml Lösungsmittel enthält, unter festgelegten Meßbedingungen (Lösungsmittel, Wellenlänge, Monochromasie, $d = 1,0$ cm, Verdünnung = End-Volumen/Analysen-Volumen).

* Bezugsquelle: Chemische Fabrik Schweizerhall AG., Schweizerhalle (Baselland), Schweiz.

** Bezugsquelle: Dr. Vaudaux & Cie., Binningen (Basel-land), Schweiz.

Es sind

E die Meß-Extinktion (gegen das Lösungsmittel),
 MG das Molekulargewicht,
 AV das Analysen-Volumen,
 EV das End-Volumen,
 C die Konzentration in mg/100 ml,
 d die Schichtdicke (1 cm).

Dann sind

$$\epsilon = \frac{E \cdot MG \cdot 1000}{C \cdot 10 \cdot d} \cdot \frac{EV}{AV} \quad (2)$$

$$A = \frac{E}{C \cdot d} \quad (3)$$

$$\epsilon = A \cdot MG \cdot 100 \frac{EV}{AV} \quad (4)$$

2. **Prüfung der Reinheit des Bilirubins.** Die Reinheit der Bilirubin-Handelspräparate schwankt zwischen 70 und 100%. Es ist daher nicht zulässig eine Standard-Lösung durch Einwägen herzustellen, wie dies auch heute noch oft empfohlen wird¹⁷. Als erstes muß vielmehr bei jedem neuen Präparat und jeder neuen Charge die Reinheit bestimmt werden. Leider fehlen noch immer einwandfreie Kriterien für die Reinheit der Präparate. Am häufigsten wird der molare Extinktions-Koeffizient in Chloroform verwendet, für den in der Literatur die folgenden Werte angegeben werden: 55 000—56 000¹⁸, 53 200—56 600¹⁹, 58 700²⁰, 59 800²¹, 60 000²², 60 100²³ und 60 400²⁴. Je nach Wahl des Extinktions-Koeffizienten resultieren hier bereits Divergenzen bis zu 10%. HENRY et al.²³ haben kürzlich auf Grund eingehender Untersuchungen an kommerziellen und gereinigten Bilirubin-Präparaten vorgeschlagen, bei einem Molekulargewicht von 584 den molaren Extinktions-Koeffizienten auf 60 100 festzulegen und ein Präparat, das diese Bedingung erfüllt, als rein zu bezeichnen. Wenn sich gegen ein solches Vorgehen auch einwenden läßt, daß gewisse Bilirubine schlecht chloroformlöslich sind und der Chloroform-Standard äußerst labil ist²⁵, so glauben wir doch, daß mit dieser Festlegung bereits ein wichtiger Schritt zur Standardisierung der Bilirubin-Methoden getan wurde. Wir beschreiben im folgenden eine einfache Methode zur Bestimmung der Reinheit von Bilirubin durch Messung des molaren Extinktions-Koeffizienten in Chloroform.

Reinheitsprüfung von Bilirubin. Alle Bilirubin-Präparate sind im Exsiccator bei 4°C unter Lichtabschluß aufzubewahren. Der Feuchtigkeitsgrad von nicht trocken aufbewahrten Substanzen kann bis zu 3% betragen. 10 mg Bilirubin werden im Halbdunkel rasch abgewogen und mit Chloroform pro anal. (z. B. Merck, Art.-Nr. 2445) auf 100,0 ml gelöst. 10,0 ml dieser Lösung werden nochmals mit Chloroform auf 100,0 ml verdünnt. Sofort nach der Herstellung der Lösung werden die Extinktionen bei 453 nm oder 436 nm gemessen. Falls möglich, wird ein Spektrum im sichtbaren Bereich geschrieben. Die Lösung ist höchstens 1 Std stabil und ist während dieser Zeit vor Licht zu schützen.

Absorptions-Spektren von Bilirubin in Chloroform sind in Abb. 1 dargestellt. Sie zeigen das typische Extinktions-Maximum bei 453 nm. Es seien

MG	das Molekulargewicht	= 584,65
C	die Konzentration	= 1,0 mg/100 ml
$\epsilon_{453 \text{ nm}}^b$ (CHCl_3)	(der molare Extinktions-Koeffizient)	= 60 100
EV/AV	die Verdünnung	= 1,0.

Dann läßt sich die erwartete Extinktion (E^{exp}) durch Einsetzen in Gl. 2 berechnen. Sie beträgt 1,030.

Die Reinheit des Bilirubins kann nun mit Hilfe der beobachteten Extinktion (E^{obs}) berechnet werden:

$$\text{Reinheit in \%} = \frac{E^{obs} \cdot 100}{E^{exp}} = E_{453 \text{ nm}}^{obs} \cdot 97. \quad (5)$$

Steht nur ein Spektrallinien-Photometer zur Verfügung, so kann die Reinheit auch mit Hilfe der Quecksilberlinie 436 nm gemessen werden. Eigene Bestimmungen (Tabelle 1) ergaben für diese Wellenlänge einen molaren Extinktions-Koeffizienten von 56800.

Die E^{exp} beträgt dann 0,972 und die Reinheit in Prozent berechnet sich wie folgt:

$$\text{Reinheit in \%} = E_{436 \text{ nm}}^{obs} \cdot 103. \quad (6)$$

In Tabelle 1 sind die Meßwerte für die Bestimmung der Reinheit von zwei kommerziellen Bilirubin-Präparaten angeführt. Beim Bilirubin „Fluka“ lag die Reinheit zwischen 100 und 101%, beim Präparat der Eastman-Kodak zwischen 88 und 91%. Die molare Extinktion bei 453 nm betrug beim reineren Präparat 60800, diejenige bei 436 nm 56800.

HENRY et al.²³ machten darauf aufmerksam, daß die Fähigkeit des Bilirubins, einen Azofarbstoff zu bilden, nicht abhängig von der Reinheit des Präparates ist. Es gibt Bilirubine, deren Azofarbstoff-Bildung

Tabelle 1. Reinheitsprüfung von zwei kommerziellen Bilirubin-Präparaten

$C = 1,0 \text{ mg/100 ml}$. Lösungsmittel Chloroform.

	Fluka	Eastman-Kodak
I. Messung im Beckman-DU-Spektral-Photometer		
453 nm E^{obs}	1,040	0,930
E^{exp}	1,026	1,026
Reinheit in Prozent	101	91
Extinktions-Koeffizient	60800	54300
436 nm E^{obs}	0,972	0,852
$E_{436 \text{ nm}}/E_{453 \text{ nm}}$	0,935	0,916
II. Messung im Eppendorf-Spektrallinien-Photometer		
436 nm E^{obs}	0,975	0,860
E^{exp}	0,970	0,970
Reinheit in Prozent	100	88
Extinktions-Koeffizient	56800	50200

schwächer als erwartet sein kann. Sie empfehlen in diesen Fällen entweder das Bilirubin weiter zu reinigen (Extraktion als Natrium-Bilirubin und Kristallisation in Chloroform) oder aber eine Eichung mit Hilfe eines Faktors auf Grund der Azofarbstoff-Bildung vorzunehmen. Wir kommen in der folgenden Arbeit nochmals auf diese Frage zurück¹⁶.

3. *Spektrale Eigenschaften von Bilirubin in Human-Plasma.* Zur Festlegung der Berechnungsfaktoren für die direkte spektrophotometrische Bestimmung des Bilirubins im Plasma ist es notwendig, die Absorptions-Konstanten von Bilirubin in Plasma zu kennen. Resultate der Untersuchung in Chloroform können nicht verwendet werden, da das Extinktions-Maximum im Plasma gegen den langwelligen Bereich verschoben ist und die molaren Extinktions-Koeffizienten niedriger liegen. Es sei vorweggenommen, daß die spektralen Eigenschaften von Bilirubin in Plasma, Serum und Albumin-Lösungen¹⁰ identisch sind.

Herstellung einer Bilirubin-Standard-Lösung (20 mg/100 ml).* Als Lösungsmittel können verwendet werden: 1. eine Lösung von Human-Albumin¹⁰, 2. ein kommerzielles Standard-Serum, das bilirubinfrei ist**, 3. bilirubinfreies Serum (Herstellung durch Sonnenlicht-Exposition). 40 mg Bilirubin werden im Dunkeln unter möglichst wenig Schütteln (keine Schaumbildung) mit 20,0 ml 0,1 N Natrium-Carbonat-Lösung gelöst. 1,0 ml dieser Lösung werden zu 8,0 Lösungsmittel gegeben und mit 1,0 ml 0,1 N Essigsäure auf 10,0 ml aufgefüllt. Wir verwendeten als Lösungsmittel bilirubinfreies Standard-Serum der Chemischen Fabrik Schweizerhall.

Mit Hilfe dieses Bilirubin-Standards werden mit bilirubinfreiem Serum Verdünnungen hergestellt, so daß End-Konzentrationen von 20, 16, 12, 8, 4 und 0 mg Bilirubin/100 ml vorliegen. Von jeder dieser Verdünnungen wurden 20 μ l zu 1,0 ml Tris-Puffer gegeben und die Spektren im sichtbaren Bereich geschrieben sowie die Extinktionen bei 463 nm, 453 nm, 436 nm und 578 nm im Beckman DU und bei 436 nm und

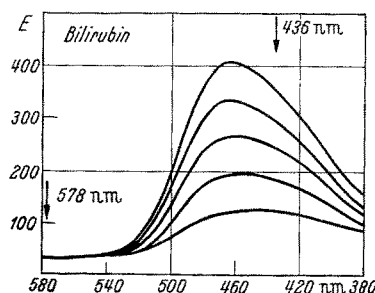


Abb. 2. Absorptionsspektren von Bilirubin in Serum. 20 μ l der Standard-Lösungen enthaltend 20, 16, 12, 8 und 4 mg Bilirubin pro 100 ml wurden mit 1,0 ml Tris-Puffer verdünnt

578 nm im Eppendorf-Photometer gemessen. Als Kontrolle wurden die Bilirubin-Konzentrationen mit einer Azomethode¹⁶ bestimmt. Aus der Darstellung der

Tabelle 2. Absorptions-Konstanten und molare Extinktions-Koeffizienten von Bilirubin und Oxyhämoglobin im Serum DU (Beckman DU-Spektral-Photometer), EPP (Eppendorf-Spektrallinien-Photometer).

λ	Gerät	$\frac{A}{E \cdot c \cdot d}$	$\frac{e}{A \cdot M.G. \cdot V}$
I. Bilirubin im Serum:			
Direkte Photometrie			
463 nm	DU	0,0150	44700
453 nm	DU	0,0146	43500
436 nm	DU	0,0122	36400
	EPP	0,0116	34600
575 nm	DU	< 0,0005	0
578 nm	DU	< 0,0005	0
	EPP	< 0,0005	0
II. Oxyhämoglobin im Serum:			
Direkte Photometrie			
436 nm	DU	0,000423	35100
	EPP	0,000425	35200
578 nm	DU	0,000170	14100
	EPP	0,000187	15500

Spektren in Abb. 2 geht hervor, daß das Absorptions-Maximum nicht mehr bei 453 nm liegt, wie in Chloroform, sondern bei 463 nm. Diese Verschiebung in Anwesenheit von Serum ist seit längerem bekannt⁷. Weiterhin ist aus Tabelle 2 ersichtlich, daß der molare

* Eine gebrauchsfertige und geeichte Bilirubin-Standard-Lösung erscheint demnächst im Handel (Test-Packung „Bilirubin-Standard“ der chemischen Fabrik Schweizerhall AG, Schweizerhalle [Baselland], Schweiz).

** Standard-Serum der Chemischen Fabrik Schweizerhall AG, Schweizerhalle (Baselland), Schweiz.

Extinktions-Koeffizient bei 453 nm und 463 nm deutlich niedriger ist als bei Lösungen in Chloroform. Nach Angaben in der Literatur soll er um 80 % desjenigen in Chloroform betragen (gemessen in Albumin-Lösung¹⁰). Bei unseren Versuchen betrug er 97 %. Entgegen den Angaben anderer Autoren fanden wir bei den untersuchten Bilirubin-Konzentrationen unter 20 mg/100

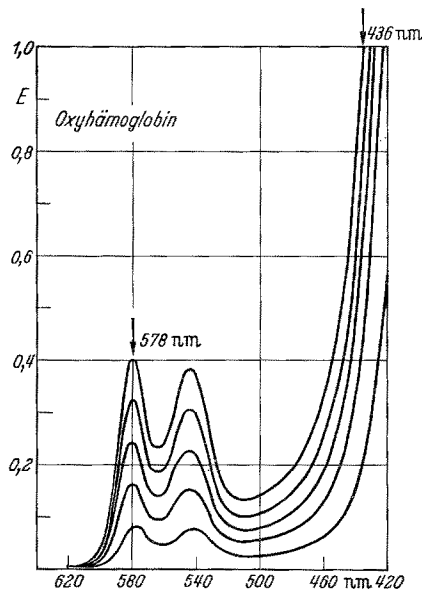


Abb. 3. Absorptionsspektren von Oxyhämoglobin in Serum. 20 µl der Standard-Lösungen wurden mit 1,0 ml Tris-Puffer verdünnt

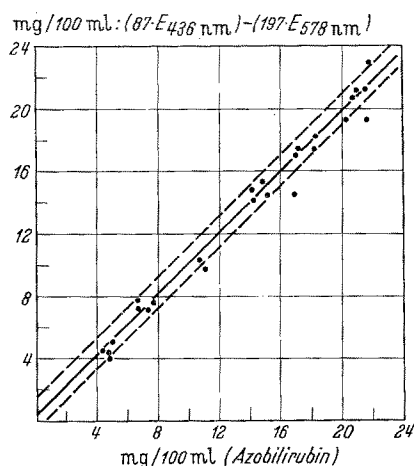


Abb. 4. Vergleichsbestimmungen des Gesamt-Bilirubins bei 25 Neugeborenen. Abszisse: Bestimmung als Azobilirubin, Ordinate: Bestimmung mit der spektrophotometrischen Methode. $Y_c = 0,25 + 0,97 X$, $S_{xy} = 0,90$, $r = 0,988$

keine Extinktion bei den Wellenlängen 575 nm und 578 nm. Schließlich sei erwähnt, daß über den ganzen Meßbereich bei allen untersuchten Wellenlängen eine strenge Proportionalität zwischen Bilirubin-Konzentration und Extinktion vorlag.

4. Spektrale Eigenschaften von Oxyhämoglobin in Serum. Einer der Vorteile der hier beschriebenen Methode liegt darin, daß die Resultate für eventuell vorliegendes Hämoglobin korrigiert werden. Bei der Entnahme von Capillar-Plasma liegt, wie aus Literatur-Angaben¹⁰ und eigenen Beobachtungen hervorgeht fast nur Oxyhämoglobin vor. Bei der Untersuchung von Venenblut ist mit anderen Derivaten zu rechnen, so daß die Methode nicht ohne weiteres angewendet werden darf. Zur Korrektur der Bilirubinwerte benötigen

wir die Absorptions-Konstanten von Oxyhämoglobin in Serum oder Plasma.

Herstellung einer Oxyhämoglobin-Standard-Lösung (etwa 500 mg/100 ml). Blut wird in ACD-Röhrchen* entnommen, zentrifugiert, das Plasma verworfen und die Zellen dreimal mit 0,85 % Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Mit destilliertem Wasser auf das ursprüngliche Volumen auffüllen, gut mischen und gefrieren. Nach dem Auftauen 3 min bei 20000 rpm (13000 g) zentrifugieren (Ecco-Quick, Winkelpf) und 1 ml des Überstandes mit bilirubinfreiem Serum auf 20,0 ml verdünnen.

Die Hämoglobin-Konzentration dieser Standard-Lösung wurde mit der Oxyhämoglobin- und der Hämioglobincyanid-Methode bestimmt. Die Resultate waren identisch. Nun wurden Verdünnungen dieser Standard-Lösung mit Standard-Serum (5,0:0,0; 4,0:1,0; 3,0:2,0 usw.) hergestellt und die Hämoglobin-Konzentration nochmals bestimmt. 20 µl dieser Verdünnungen wurden zu 1,0 ml Tris-Puffer gegeben und die Spektren im Beckman DB geschrieben sowie die Extinktionen bei 436 nm und 578 nm im Beckman DU und Eppendorf-Photometer gemessen. Die Spektren sind in Abb. 3 dargestellt und zeigen die typischen Maxima bei der Soret-Bande, bei 546 nm und bei 578 nm. Die Meß-Resultate sind in Tabelle 2 angeführt. Der molare Extinktions-Koeffizient wurde unter der Annahme eines Molekulargewichtes von 16250 berechnet. Die Werte bei 578 nm liegen zwischen 14100 und 15500. Als Vergleich sei erwähnt, daß KUBOWITZ mit reinem Oxyhämoglobin einen molaren Extinktions-Koeffizienten von 15400 erhielt¹⁴. Auch für das Oxyhämoglobin gilt über den ganzen Meßbereich das Lambert-Beersche Gesetz.

5. Berechnung der Eichfaktoren. Die Extinktionen eines 51mal ($AV = 0,02$ ml, $EV = 1,02$ ml) verdünnten Plasmas bei 436 nm und 578 nm mit unbekanntem Gehalt an Oxyhämoglobin und Bilirubin setzen sich zusammen aus:

$$E_{436 \text{ nm}} = (A_{436 \text{ nm}}^b \cdot C^b) + (A_{436 \text{ nm}}^{hb} \cdot C^{hb}) \quad (7)$$

$$E_{578 \text{ nm}} = (A_{578 \text{ nm}}^b \cdot C^b) + (A_{578 \text{ nm}}^{hb} \cdot C^{hb}). \quad (8)$$

Diese beiden Gleichungen enthalten zwei unbekannte C^b und C^{hb} . Gl. 8 wird nach C^{hb} aufgelöst und in Gl. 7 eingesetzt. Gl. 7 wird nach C^b aufgelöst:

$$C^b = \frac{(E_{436 \text{ nm}} \cdot A_{578 \text{ nm}}^{hb}) - (E_{578 \text{ nm}} \cdot A_{436 \text{ nm}}^{hb})}{(A_{436 \text{ nm}}^b \cdot A_{578 \text{ nm}}^{hb}) - (A_{436 \text{ nm}}^{hb} \cdot A_{578 \text{ nm}}^b)} \quad (9)$$

Da $A_{578 \text{ nm}}^b$ gleich Null ist, vereinfacht sich die Gleichung im Nenner. Werden die experimentell ermittelten Werte eingesetzt, so erhalten wir:

$$C^b = \frac{(E_{436 \text{ nm}} \cdot 0,000187) - (E_{578 \text{ nm}} \cdot 0,000425)}{0,0116 \cdot 0,000187} \quad (10)$$

$$C^b = (87,0 \cdot E_{436 \text{ nm}}) - (197 \cdot E_{578 \text{ nm}}) \text{ mg/100 ml.} \quad (11)$$

Dies ist die Formel, die zur Berechnung der Bilirubin-Konzentration in der Arbeitsvorschrift enthalten ist (S. 779).

6. Richtigkeit der Methode. Zur Prüfung der Richtigkeit der Methode²⁶ wurden bei 25 Seren von Neugeborenen in den ersten Lebenstagen Vergleichs-Bestimmungen mit der spektrophotometrischen Methode

* Leit Röhrchen des Zentrallaboratoriums des Blutspendedienstes des Schweizerischen Roten Kreuzes, Wankdorfstr. 10, Bern (Schweiz).

und einer Azobilirubin-Methode durchgeführt. Die Resultate dieser Bestimmungen sind in Abb. 4 dargestellt. Wie daraus hervorgeht, herrscht eine ausgezeichnete Übereinstimmung der mit den beiden Methoden erhaltenen Resultate (Korrelations-Koeffizient $r=0,988$).

Herr Dr. R. RICHTER von der Frauenklinik der Universität Bern (Direktor: Prof. Dr. med. W. NEUWEILER) stellte uns freundlicherweise die Seren der Neugeborenen zur Verfügung. Die Vergleichs-Bestimmungen wurden zum Teil von Dr. LOPEZ und Dr. DIOGURDAS (Universitäts-Kinderklinik) durchgeführt.

Literatur. ¹ MATHER, A.: Reliability of bilirubin determinations in icterus of the newborn infant. *Pediatrics* **26**, 350 (1960). — ² WESTPHAL, M., E. VIERGIVER and R. ROTH: Analysis of a bilirubin survey. *Pediatrics* **30**, 12 (1962). — ³ LUCEY, J. F., C. L. PHILLIPS, J. G. UTTERBACK and R. J. MCKAY: A difference in the incidence of hyperbilirubinemia among premature infants in two hospitals. *Pediatrics* **30**, 3 (1962). — ⁴ MEULENGRACHT, E.: Die klinische Bedeutung der Untersuchung auf Gallenfarbstoff im Blutserum. *Dtsch. Arch. klin. Med.* **132**, 285 (1920). — ⁵ HEILMEYER, L., u. B. WAPPLER: Klinische Farbmessungen. VI. Die normale Serumfarbe. *Z. ges. inn. Med.* **63**, 630 (1928). — ⁶ SHINOWARA, G. I.: Spectrophotometric studies on blood serum and plasma. The physical determination of hemoglobin and bilirubin. *Amer. J. clin. Path.* **24**, 696 (1954). — ⁷ Fog, J.: Icterus index determined with the spectrophotometer corrected for turbidity and hemoglobin. *Scand. J. clin. Lab. Invest.* **10**, 246 (1958). — ⁸ MERTZ, J. E., and C. D. WEST: Rapid micro method for determination of indirect bilirubin. *Amer. J. Dis. Child.* **91**, 19 (1956). — ⁹ WATSON, D.: Analytic methods for bilirubin in blood plasma. *Clin. Chem.* **7**, 603 (1961). — ¹⁰ WHITE, D., G. A. HAIDAR and J. G. REINHOLD: Spectrophotometric measurement of bilirubin concentrations in the serum of the newborn by use of a micro-capillary method. *Clin. Chem.* **4**, 211, (1958). — ¹¹ JACKSON, S.

H.: A simple, stable instrument for determination of bilirubin by direct spectrophotometry. *Clin. Chem.* **7**, 512 (1961). — ¹² RICHTERICH, R.: Ultramikromethoden für das klinisch-medizinische Laboratorium. VI. Konstruktion einer stationären Glas-Auslauf-Küvette für photometrische Messungen. *Ärzt. Lab.* **8**, 121 (1962). — ¹³ CARAWAY, W. T.: Microchemical methods for blood analysis, p. 18. Springfield, Ill.: Thomas 1960. — ¹⁴ KUBOWITZ, F.: Kristallisiertes Hämoglobin des Menschen. *Folia haemat. (Lpz.)* **71**, 582 (1953). — ¹⁵ ZIJLSTRA, W. G., and E. J. VAN KAMPEN: Standardization of hemoglobino-metry. I. The extinction coefficient of hemiglobincyanide at $\lambda=540$ nm. *Clin. chim. Acta* **5**, 719 (1960). — ¹⁶ RICHTERICH, R.: Bestimmung des Bilirubins als Azobilirubin. X. Mitt. über Ultramikromethoden im klinischen Laboratorium. *Klin. Wschr. (in Vorbereitung)*. — ¹⁷ SCHELLONG, G., u. U. WENDE: Technik für die Eichung von Methoden zur Serum-Bilirubin-Bestimmung. *Klin. Wschr.* **38**, 703 (1960). — ¹⁸ LEMBERG, R., and J. W. LEGGE: Hematin compounds and bile pigments. New York: Interscience 1949. — ¹⁹ HEILMEYER, L.: Spectrophotometry in medicine. London: Hilger 1943. — ²⁰ COLE, P. G., G. H. LATHE and B. H. BILLING: Separation of the bile pigments of serum, bile and urine. *Biochem. J.* **57**, 514 (1954). — ²¹ O'HAGAN, J. E., T. HAMILTON, E. G. LEBRETON and A. E. SHAW: Human serum bilirubin. An immediate method of determination and its application to the establishment of normal values. *Clin. Chem.* **3**, 609 (1957). — ²² HENRY, R. J., O. J. GOLUB, S. BERKMAN and M. SEGALOVE: Critic on the icterus index determination. *Amer. J. clin. Path.* **23**, 841 (1953). — ²³ HENRY, R. J., S. L. JACOBS and N. CHIAMORI: Studies on the determination of bile pigments. I. Standard of purity for bilirubin. *Clin. Chem.* **6**, 529 (1960). — ²⁴ NOSSLIN, B.: The direct diazo reaction of bile pigments in serum. *Scand. J. clin. Lab. Invest.* **12**, Suppl. 49 (1960). — ²⁵ MICHAELSON, M.: Bilirubin determinations in serum and urine. *Scand. J. clin. Lab. Invest., Suppl.* **56** (1961). — ²⁶ RICHTERICH, R., u. J. P. COLOMBO: Ultramikromethoden im klinischen Laboratorium. II. Die Bestimmung der Zuverlässigkeit von Laboratoriums-Methoden. *Klin. Wschr.* **40**, 529 (1962).

KURZE WISSENSCHAFTLICHE MITTEILUNGEN

Über das Vorkommen von 3,7,11,15-Tetramethyl-Hexadecansäure im Blutserum bei Refsum-Syndrom

Von
W. KAHLKE

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Köln
(Direktor: Prof. Dr. Dr. E. KLENK)

(Eingegangen am 10. Mai 1963)

Vor kurzem konnten KLENK und KAHLKE¹ aus Organmaterial eines an Refsum-Syndrom² — Heredopathia atactica polyneuritiformis — verstorbenen Kindes relativ große Mengen einer beim Menschen bisher nicht beobachteten verzweigten Fettsäure isolieren und als 3,7,11,15-Tetramethyl-Hexadecansäure identifizieren. Ihr Anteil an den Gesamtfettsäuren der Leber betrug 56%, an denen der Niere 47%. Dieser Befund sowie das klinische Bild³ des Refsum-Syndroms gestatten dessen Zuordnung zu den Lipidosen.

Die differentialdiagnostische Abgrenzung dieser Krankheit gegenüber Lipidosen mit zum Teil ähnlichen Symptomen (Retinitis pigmentosa mit konzentrischer Einengung des Gesichtsfeldes, Ataxie, Oligophrenie) bereitet oft Schwierigkeiten, so daß die Sicherung der Diagnose durch chemisch-analytische Methoden erstrebenswert erscheint. Da im normalen menschlichen Organismus die einzelnen Fettsäuren der Organlipide zwar in unterschiedlichen Konzentrationen vorliegen, qualitativ jedoch nicht von denen der Plasmalipide abweichen, erschien die Vermutung berechtigt, jene abnorme Fettsäure ebenfalls im Serum eines an Refsum-Syndrom erkrankten Patienten nachweisen zu können.

Von zwei weiblichen Patienten, deren klinisches Krankheitsbild als Refsum-Syndrom imponierte^{4,5}, wurde Serum* mit heißem Chloroform-Methanolgemisch extrahiert; in einem Falle nach vorheriger Acetonextraktion, im anderen durch Extraktion des gefriergetrockneten Materials. Aus den beiden

so erhaltenen Gesamtlipoidextrakten wurden durch alkalisches Verseifen die Fettsäuren dargestellt und in ihre Methylester überführt. Die gas-chromatographische Analyse zeigte neben den üblichen C₁₆- und C₁₈-Fettsäuren eine Komponente mit einer Retentionszeit für eine Kohlenstoffzahl⁶ von 16,9, die

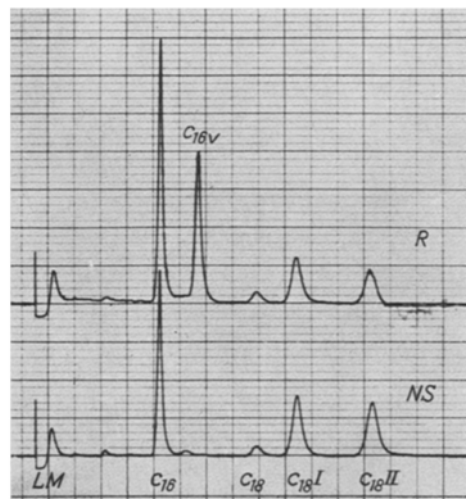


Abb. 1. Gas-Chromatogramme der Fettsäurengemische aus den Serumlipiden eines Gesunden (NS) und eines Falles von Refsum-Syndrom (R). (LM = Lösungsmittel, C₁₆ = Palmitinsäure, C_{16v} = 3,7,11,15-Tetramethyl-Hexadecansäure, C₁₈ = Stearinsäure, C₁₈I = Ölsäure, C₁₈II = Linolsäure.) Ausgeführt mit dem Gerät der Fa. Barber-Colman, Rockford, Illinois, USA. Säulenfüllung: Bernsteinsäure-Äthylenglykol-Polyester; Säulenmaße: 200 × 0,4 cm; Säulentemperatur: 185° C; Zellenspannung: 1250 V; Trägergas: Argon

* Das Material wurde freundlicherweise übersandt von Dr. DIECKMANN, Hamburg, Neurologische Universitätsklinik und Poliklinik (Direktor: Prof. Dr. Dr. R. JANZEN) und Dr. D. TOUSSAINT, Brüssel, Hôpital Universitaire St. Pierre.

der der 3,7,11,15-Tetramethyl-Hexadecansäure entspricht (vgl. Abb. 1). Fügt man einer Probe des Fettsäuremethylester-gemisches synthetisch dargestellte oder aus oben erwähntem Organmaterial isolierte 3,7,11,15-Tetramethyl-Hexadecansäure