

Zeitschrift: Bulletin des Schweizerischen Elektrotechnischen Vereins, des Verbandes Schweizerischer Elektrizitätsunternehmen = Bulletin de l'Association suisse des électriciens, de l'Association des entreprises électriques suisses

Herausgeber: Schweizerischer Elektrotechnischer Verein ; Verband Schweizerischer Elektrizitätsunternehmen

Band: 67 (1976)

Heft: 4

Artikel: Eine neue Methode der Hämoglobinbestimmung

Autor: Frey, R.

DOI: <https://doi.org/10.5169/seals-915123>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. [Siehe Rechtliche Hinweise.](#)

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. [Voir Informations légales.](#)

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. [See Legal notice.](#)

Download PDF: 02.04.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>

Eine neue Methode der Hämoglobinbestimmung

Von R. Frey

681.784.87:612.111.11

Nach einleitenden Erklärungen über Bedeutung und Funktionsweise des Hämoglobins werden die Standardmethode der photometrischen Hämoglobinbestimmung und deren Nachteile bei der Anwendung in schnellen Automaten für die Blutkörperchenzählung beschrieben. Diese Methode wird einem neuen Messverfahren gegenübergestellt, das auf der breitbandigen photometrischen Analyse des Hämoglobins beruht und sich insbesondere für Anwendungen in Blutkörperchen-Zählautomaten eignet.

Après quelques explications sur l'importance et le fonctionnement de l'hémoglobine, l'auteur décrit la méthode classique de détermination photométrique de l'hémoglobine et ses inconvénients d'application à des dispositifs automatiques de comptage des globules sanguins. Cette méthode est comparée à un nouveau procédé de mesure, basé sur l'analyse photométrique à bande large de l'hémoglobine et qui convient notamment au comptage automatique de celles-ci.

1. Das Hämoglobin und seine funktionelle Bedeutung

Hämoglobin, der rote Blutfarbstoff, erfüllt zwei lebenswichtige Funktionen: Einerseits nimmt es in der Lunge Sauerstoff auf, gibt ihn im Gewebe ab und transportiert das Verbrennungsprodukt Kohlendioxyd vom Gewebe in die Lunge zurück. Andererseits übt das Hämoglobin einen stabilisierenden Einfluss auf den pH-Wert des Blutes aus; der hochentwickelte menschliche Organismus erträgt nur geringfügige Schwankungen um den mittleren Wert von pH 7,4.

Das Transportmittel für das Hämoglobin sind die roten Blutkörperchen, die Erythrozyten. Deren mittlere Konzentration im Blut beträgt $5 \cdot 10^6/\mu\text{l}$, volumenmässig machen sie rund 45 % des Blutes aus. Mit den Leukozyten (weisse Blutkörperchen) sind sie die wichtigsten zellulären Bestandteile des Blutes. Die Bestimmung der Konzentration der Erythrozyten und Leukozyten ist mit modernen elektronischen Zählgeräten sehr rasch und genau möglich. Sie sind zusammen mit der Hämoglobinkonzentration die wichtigsten hämatologischen Parameter.

Jeder Erythrozyt enthält im Mittel $2,8 \cdot 10^8$ Hämoglobinmoleküle mit einem Gesamtgewicht von rund $31 \cdot 10^{-12}$ g. Ein Liter Blut vermag etwa 200 ml Sauerstoff zu binden; ohne Hämoglobin wäre die Menge 70mal kleiner. Mit der Aufklärung der Hämoglobinstruktur durch M.F. Perutz im Jahre 1960 wurde das Tor eröffnet, welches schliesslich zum Verständnis der Hämoglobinfunktion auf molekularer Basis führte.

Das Hämoglobin ist ein globuläres Riesenmolekül mit einem mittleren Durchmesser von 56 Å und einem Atomgewicht von nahezu 64500. Der Aufbau des Moleküls ist in Fig. 1 schematisch dargestellt. Ein zweifach ionisiertes Eisenatom ist im Zentrum eines Porphyrinringes gebunden und bildet mit diesem das Häm-Molekül. Das Häm seinerseits, ein planares Gebilde, ist in eine Polypeptidkette eingelagert. Diese Kette, das Globin, ist eine lange Sequenz von Aminosäuren, die sich in einem typischen Wiederholungsmuster aneinanderreihen. Vier solcher Häm-Globin-Einheiten bilden zusammen das Hämoglobinmolekül. Die Polypeptidketten werden dabei in überaus komplizierter, jedoch bedeutungsvoller und in allen Molekülen identischer Weise gefaltet, wodurch die funktionell

wichtigen Abschnitte der Ketten an der Oberfläche der globulären Struktur zu liegen kommen.

Die vier Häm-Moleküle selbst sind in Taschen der Globinstruktur eingelagert. Wird an eines der vier Häm-Eisen ein Sauerstoffmolekül gebunden, ändert sich die Hämstruktur geringfügig. Über einen komplexen Kopplungsmechanismus ändert sich auch die Struktur des ganzen Hämoglobinmoleküls derart, dass der Zugang von Sauerstoff zu den drei übrigen Häm-Eisen erleichtert wird. Die Sauerstoffaffinität erhöht sich so schrittweise, bis schliesslich das Hämoglobin mit vier Sauerstoffmolekülen gesättigt ist. Umgekehrt werden bei der Sauerstoffabgabe nach Loslösung des ersten Sauerstoffmoleküls alle weiteren mit sukzessiv erhöhter Leichtigkeit abgegeben. Diese Eigenart der Hämoglobine ermöglicht eine rationelle Abgabe des Sauerstoffs im Gewebe.

2. Die quantitative Bestimmung des Hämoglobins

Die rote Farbe des Blutes rührt vom Eisen des Hämoglobins her. Die äussersten Hüllenelektronen, welche das Eisen mit seinen Nachbaratomen teilt, vermögen Licht vornehmlich aus dem grünen Teil des Spektrums zu absorbieren. Dadurch tritt das Blut im weissen Licht in der Komplementärfarbe Rot in Erscheinung. Durch quantitative photometrische Bestimmung des Absorptionsvermögens in einem schmalen Band des grünen Spektrums lässt sich daher die Konzentration des Eisens und damit auch diejenige des Hämoglobins bestimmen. Konzentration und Absorption stehen im folgenden exponentiellen Zusammenhang:

$$1 - A(\lambda) = \frac{I(\lambda)}{I_0(\lambda)} = e^{-\epsilon(\lambda)cd} \quad (1)$$

Es bedeuten:

$A(\lambda)$	die Absorption der Probe in Abhängigkeit von der Wellenlänge λ
$I_0(\lambda), I(\lambda)$	die Intensität des auf die Probe einfallenden bzw. des von ihr durchgelassenen Lichts bei der Wellenlänge λ
$\epsilon(\lambda)$	der Absorptionskoeffizient der Probe bei der Wellenlänge λ
c	die Konzentration der Probe
d	die Dicke der durchstrahlten Probe

Während $A(\lambda)$ bei der Hämoglobinbestimmung gemessen wird, müssen d als Gerätekonstante und der Absorptionskoeffizient als bekannt vorausgesetzt werden, damit die Konzentration bestimmt werden kann.

Eine weitere Bedingung ist präparativer Natur: Die Erythrozyten, Träger des Hämoglobins, verursachen als kleine Partikel eine starke Lichtstreuung, die sich als Trübung in störender Weise der Absorption überlagert. Das Hämoglobin muss daher aus den Erythrozyten freigesetzt werden durch

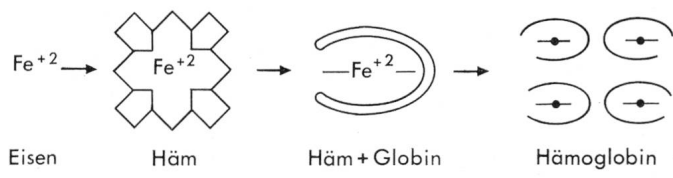


Fig. 1 Schematischer Aufbau des Hämoglobinmoleküls

Auflösen der Zellmembran. Ferner muss das Blut in geeigneter Weise verdünnt werden, da Vollblut zu stark absorbierend wirkt. Bei der Freisetzung des Hämoglobins liegt nun dieses nicht in einer einheitlichen chemischen Konfiguration vor. Der Grossteil besteht aus Oxy-Hämoglobin HbO_2 (mit Sauerstoff gesättigtes Hämoglobin), ein gewisser Anteil – bis 15 % bei starken Rauchern – liegt als Carboxy-Hämoglobin $HbCO$ (mit Kohlenmonoxyd gesättigtes Hämoglobin) vor; ein geringer Teil mag auch als reduziertes Hämoglobin Hb vorliegen. Diese drei Derivate des Hämoglobins weisen unterschiedliche Absorptionsspektren auf, wie aus Fig. 2 ersichtlich ist. Schliesslich kann ein variabler Anteil des Hämoglobins in Form des physiologisch inaktiven Methämoglobins auftreten. Das Absorptionsspektrum dieses Derivats ist veränderlich und vom pH-Wert der Lösung abhängig. Die Messung der Absorption bei einer bestimmten Wellenlänge liefert wegen der variablen relativen Konzentration der verschiedenen Hämoglobinderivate kein zuverlässiges Mass für die interessierende totale Hämoglobinkonzentration.

Heute werden durch Zugabe von cyanhaltigen Reagenzien alle Derivate mehr oder weniger rasch in eine einheitliche Form übergeführt, indem an alle Eisenatome eine Kohlenstoff-Stickstoff-Gruppe gebunden wird. Diese 1966 standardisierte Methode hat jedoch nicht zu übersehende Nachteile, z. B. den Umgang mit cyanalihaligen Reagenzien, vor allem aber die relativ langsam verlaufende Umwandlungsreaktion, die eine Wartezeit von minimal drei Minuten vor der Messung bedingt. Dieser Umstand hat dazu geführt, dass insbesondere für Automaten modifizierte Reagenzien entwickelt wurden, welche eine schnelle Hämoglobinbestimmung erlauben sollen. Solcherart durchgeführte Bestimmungen weichen in unspezifischer Weise vom Standardverfahren ab. Dadurch müssen die Geräte eigens auf die verwendete Methode eingeeicht werden. Entsprechend schlecht fallen jeweils auch die Korrelationen zwischen verschiedenen Methoden aus. Angesichts der grossen Bedeutung des Hämoglobingehalts als klinischer Parameter ist eine genaue und zuverlässige Bestimmung unerlässlich.

3. Die breitbandige photometrische Messmethode

Als Ergänzung zu bereits in der Praxis im Einsatz stehenden automatischen Blutkörperchenzählgeräten sowie als integrierender Bestandteil eines in Entwicklung stehenden Blutkörperchenzählgerätes wurde eine Hämoglobinbestimmungsmethode benötigt, welche die genannten Nachteile der Standardmethode nicht aufweist, sondern bei grösserer Einfachheit und Schnelligkeit genaue Bestimmungen zulässt und zudem eine simultane Leukozytenzählung ermöglicht. Ein neues chemisches Verfahren mit einem modifizierten Reagenz erwies sich als unfruchtbar, da neben der mehr oder weniger komplizierten Zusammensetzung des Reagenzes einerseits vor der photometrischen Bestimmung stets eine Reaktionszeit abgewartet werden musste und andererseits das Reagenz die Leukozyten schädigte und deren Zählung erschwerte.

Der Schlüssel zu einer eleganten sowie einfachen Lösung ergab sich schliesslich aus der Analyse der Absorptionsspektren der häufigsten Hämoglobinderivate. Integriert man nämlich die Absorptionsspektren der in Fig. 2 gezeigten Derivate in geeigneten Grenzen, so ist das Integral für alle drei Derivate nahezu gleich gross. Dies ist in Fig. 2 anhand der schraffierten Flächen im Wellenlängenbereich von 500 bis 600 nm angedeutet. Misst man also integral die Absorption eines Gemisches

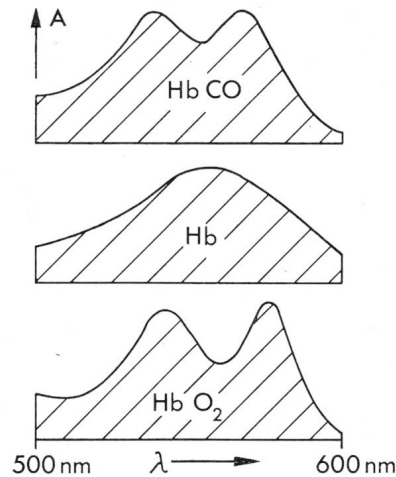


Fig. 2 Absorptionskurven A von Hämoglobinderivaten in Funktion der Wellenlänge λ

$HbCO$ Carboxy-Hämoglobin
 Hb Reduziertes Hämoglobin
 HbO_2 Oxy-Hämoglobin

dieser drei Derivate in diesem Wellenlängenbereich, so ist die gemessene Absorption ein Mass für die totale Hämoglobinkonzentration und unabhängig von der relativen Zusammensetzung des Gemisches. Eine chemische Umsetzung des Gemisches erübrigt sich damit. Unmittelbar nach dem in bekannter Weise erfolgten Freisetzen des Hämoglobins aus den Erythrozyten durch Auflösung der Zellmembran kann die Hämoglobinbestimmung durchgeführt werden. Durch das Fehlen zusätzlicher Chemikalien bleiben dabei die Leukozyten über längere Zeit für die Zählung intakt.

4. Ein neues Hämoglobinmeter

Ein auf dem beschriebenen integralen Messprinzip beruhendes Hämoglobinmeter erfordert die Lösung der folgenden zwei Probleme: Einerseits die Realisierung einer Empfindlichkeitscharakteristik des Photometers, durch welche die häufigsten Hämoglobinderivate quantitativ gleich erfasst werden, andererseits die Linearisierung der Beziehung zwischen Konzentration und Absorption nach Gl. (1), damit das Ausgangssignal des Gerätes digital weiterverarbeitet werden kann.

Die spektrale Empfindlichkeitskurve des Photometers ist das Produkt aus der Emissionscharakteristik der Lichtquelle, der Empfindlichkeitskurve des Detektors und der Transmissionscharakteristiken der verwendeten Filter. Eine Empfindlichkeitskurve mit dem Wert 1 innerhalb eines gewissen Bereichs (z. B. 500...600 nm) und 0 ausserhalb dieses Bereichs wäre weder optimal noch praktisch zu realisieren. Unter Berücksichtigung von Gl. (1) ergibt sich die optimale Empfindlichkeitskurve aus der Gleichung

$$\frac{1}{\lambda_2 - \lambda_1} \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} E(\lambda) e^{-dc \epsilon_i(\lambda)} d\lambda = \text{const.} \quad (2)$$

$E(\lambda)$ ist die spektrale Empfindlichkeit des Photometers und $\epsilon_i(\lambda)$ der Absorptionskoeffizient des i -ten Hämoglobinderivats. Die Gleichung fordert, dass bei geeigneten Integrationsgrenzen λ_1 und λ_2 die linke Seite unabhängig vom Index i ist. Eine approximative Lösung von Gl. (2) für λ_1 , λ_2 und $E(\lambda)$ ergibt eine Empfindlichkeitscharakteristik mit maximalem Wert im Bereich von 540...570 nm, wo die Derivate die wichtigsten

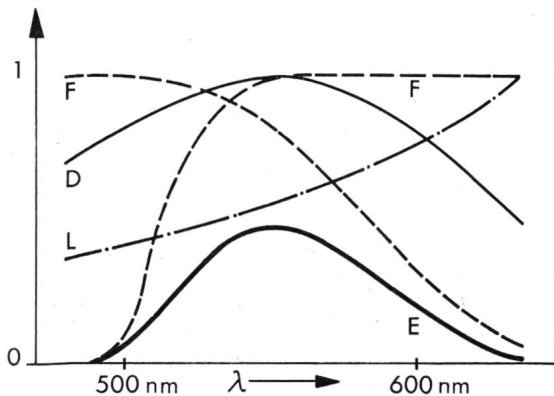


Fig. 3 Spektrale Charakteristiken der Elemente des Photometers
 F Durchlässigkeit der Farbfilter
 D Detektorempfindlichkeit
 L Spektrale Emission der Lichtquelle
 E Resultierende spektrale Empfindlichkeit des Photometers

Absorptionen aufweisen. Ausserhalb dieses Bereichs, wo die spektrale Information der Hämoglobinderivate geringer ist, fällt die Empfindlichkeitskurve gegen Null. Die approximative Realisation einer idealen Empfindlichkeitscharakteristik ist in Fig. 3 dargestellt. Die Kombination einer Wolframlühlampe als Lichtquelle, eines CdS-Photowiderstandes als Detektor und einer Gelb-Blau-Filterkombination ergibt eine weitgehend ideale Empfindlichkeitscharakteristik des Photometers.

Gewissermassen als Zugabe dieser breitbandigen Messmethode ergibt sich eine grosse Lichtleistung am Detektor. Auch bei Verwendung von Mikroglühlampen von geringer Leistungsaufnahme sind keinerlei optisch aktive Elemente wie Sammel- und Abbildungslinsen erforderlich. Dies ermöglicht eine sehr kompakte Bauweise der Optik. Der Messdetektor erzeugt ein genügend starkes Signal, mit dem ohne Verstärkung eine Anzeige direkt angesteuert werden kann.

Die experimentelle Verifikation der neuen Messmethode zeigte, dass bei der vollständigen Substitution eines beliebigen Derivates durch ein anderes die Absorption sich nur wenig ändert. Unter Berücksichtigung des physiologisch möglichen Variationsbereiches der relativen Konzentrationen der wichtigsten Hämoglobinderivate ist der maximale Fehler in der Konzentrationsbestimmung in jedem Fall kleiner als 1%. Bemerkenswert ist auch die zeitliche Stabilität des Messwertes; nach einer 24stündigen Inkubation einer Probe bei 37 °C änderte sich der Messwert nur um 1%, obwohl sich in dieser Zeit ein beachtlicher Anteil der Derivate in Methämoglobin umgewandelt hat.

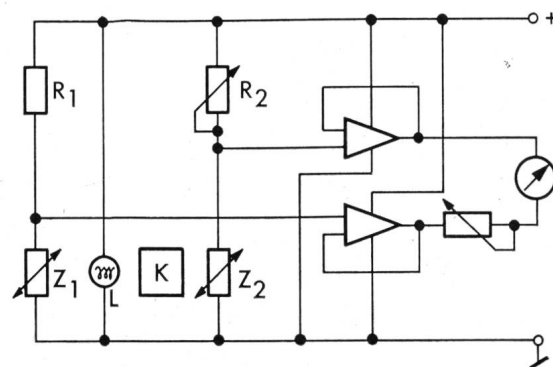


Fig. 4 Linearisierungsbrücke für direkte Konzentrationsbestimmung
 R_1, R_2 Vorwiderstände
 Z_1, Z_2 Photowiderstände
 L Lichtquelle
 K Küvette mit Probe

In einer grossen Anzahl von Vergleichsmessungen mit der Standardmethode an Patientenblut hat sich die Richtigkeit und Zuverlässigkeit des neuen Messprinzips bestätigt, in gewissen pathologischen Fällen hat sie sich als der Standardmethode überlegen erwiesen.

Eine äusserst einfache Linearisierung der Beziehung zwischen Konzentration und Absorption schliesslich ergab sich aus der Verwendung von Photowiderständen. Werden gemäss Fig. 4 zwei Photowiderstände als Referenz- und als Messdetektor in einer Brückenschaltung angeordnet, so ist die Brückenquerspannung proportional zur Konzentration des absorbierenden Farbstoffes in der Küvette, falls das Teilerverhältnis R_1/Z_1 in gewissen Grenzen liegt. Durch diese Anordnung der Detektoren werden auch temperaturbedingte Drifts weitgehend kompensiert.

Abschliessend seien stichwortartig die besonderen Eigenschaften der beschriebenen Hämoglobinmessmethode zusammengestellt:

- hohe Geschwindigkeit, da keine chemische Reaktion nötig ist
- einfache Zusammensetzung des Reagenzes
- bezüglich Richtigkeit ist die Methode der Standardmethode ebenbürtig
- hohe zeitliche Stabilität der Messwerte durch integrale Erfassung der Hämoglobinderivate
- die breitbandige Messmethode erlaubt einen äusserst einfachen optischen und elektronischen Aufbau

Adresse des Autors
 Dr. Raymond Frey, Contraves AG, Schaffhauserstrasse 580, 8052 Zürich.