

## Physiko-chemische Grundlagen und apparative Neuentwicklungen in der quantitativen Ultramikroanalyse\*

Von MANUEL C. SANZ

Zentrallaboratorium des Kantonsspitals, Genf

(Direktor: Dr. M. C. SANZ)

### I. Einleitung

Seit dem Bestehen der Biochemie ist man bestrebt, immer feinere Methoden zu entwickeln, mit dem Zweck, immer kleinere Substanzmengen möglichst genau erfassen zu können. Bei einer Übersicht dieser Entwicklung fällt auf, daß die gravimetrischen Bestimmungsverfahren vollständig verschwunden sind. Ultramikrowaagen, welche Mikrogramme und Bruchteile davon zu wägen gestatten, existieren zwar, doch ist die Wägung relativ sehr schwierig. Die Einwaagen (Probeentnahme von Geweben, Knochen und dergleichen) erfolgen im Milligramm-Maßstab, und meistens genügt eine Halbmikrowaage auf  $1/100$  mg. Mikrogrammproben werden praktisch nie gewogen, so daß ich nicht darauf einzugehen habe. Kolorimetrische, potentiometrische, amperometrische und viele andere physikalisch-chemische Verfahren, oft kombiniert mit Titrimetrie, haben breiteste Verwendung gefunden. Es ist interessant festzustellen, daß die Titrimetrie beim technischen Personal wie auch bei vielen Chemikern seit einigen Jahren in der Praxis leider immer weniger Anklang findet und wo immer möglich durch kolorimetrische Methoden ersetzt wird. Bei sogenannten Collaborative-Tests, d. h. Versuchen in großem Maßstab, bei welchen die gleiche Lösung an eine große Anzahl von Laboratorien zur Analyse versandt wurde, ist festgestellt worden, daß die titrimetrischen Methoden eine bessere Übereinstimmung zeigen als die kolorimetrischen oder spektrophotometrischen. Dies ist aus verschiedenen Gründen verständlich. Bei kolorimetrischen Analysen müssen mindestens drei Größen genau bestimmt werden: Die Probeentnahme, das Endvolumen nach der Farbentwicklung und die Extinktionsmessung, während bei der Titration im günstigsten Falle nur zwei Messungen genau ausgeführt werden: Das Einpipettieren der Probe und die Ermittlung des Titrationsvolumens. Dazu kommt die Tatsache, daß bei titrimetrischen Verfahren genau bekannte stöchiometrische Verhältnisse vorliegen, währenddem bei Farbentwicklungen oft – chemisch meist schlecht definierte – Gleichgewichtsreaktionen benützt werden, welche in den allermeisten Fällen von der Temperatur und vom pH stark abhängig sind.

Bei den titrimetrischen Verfahren ist die Tendenz vorhanden, die Endpunktsanzeige möglichst objektiv zu gestalten, sei es durch Verwendung einer Photozelle mit Anzeigeinstrument für Farbumschläge, sei es durch

potentiometrische, polarographische oder amperometrische Anzeige des Äquivalenzpunktes.

Die Entwicklung von Makro zu Halbmikro und Mikro ist relativ flüssig. Die dabei verwendeten Geräte bleiben sich im Prinzip gleich, werden nur immer schrittweise kleiner. Doch hat die klassische Laboratoriumsausstattung mit gläsernen Pipetten, Büretten, Erlenmeyer und Bechergläsern seine Grenze erreicht und das Arbeiten mit bedeutend kleineren Mengen wird außerordentlich schwierig, wenn nicht völlig unmöglich, mit Instrumenten, die von der klassischen Form abgeleitet sind. Es sind die neuen Kunststoffe, wie Polyäthylen und seine chemisch außerordentlich inerten Derivate, wie Teflon und Kel-F, die die Konstruktion einer neuen Ausrüstung ermöglichten. Es ist selbstverständlich, daß man das Kunststoffmaterial den Anforderungen anpaßt, und wir verwenden nicht nur Polyäthylen und seine Abkömmlinge, sondern auch Polyacryle, Polystyrol, Polyamide und andere hochpolymere Kunststoffe. Verschiedene dieser Kunststoffe weisen wohl chemisch eine genügende Resistenz auf, doch ihr großer Nachteil ist, daß sie einen relativ hohen Ausdehnungskoeffizienten besitzen und daher auf den ersten Blick für genaues Arbeiten nicht in Frage kommen. Die Prinzipien der Analyseverfahren müssen daher dem neuen Material angepaßt werden.

Der Ausdruck «Ultramikroanalyse» will einzig besagen, daß noch kleinere Mengen zur Analyse gelangen als bei den klassischen Mikromethoden. Will man diesen Ausdruck definieren, d. h. ihm eine Größenordnung zuschreiben, so stehen prinzipiell zwei Wege offen: nämlich die Festlegung der zur Bestimmung gelangenden Substanzmengen in ihrer Größenordnung oder die Umschreibung der zur Analyse gelangenden Volumina. Der erste Weg scheint der logischere, doch hat er gegenüber dem zweiten sehr große Nachteile. Da, wie wir gesehen haben, das Arbeiten im Ultramikromaßstab hauptsächlich eine Angelegenheit der Ausrüstung ist und da das Pipettieren in fast 100% der Fälle die erste Operation darstellt, ist es meines Erachtens vernünftig, die zur Analyse gelangenden Volumina festzulegen. Diese betragen größenordnungsmäßig  $1/100$  ml oder 10 Mikroliter ( $\mu$ l).

Als Ultramikromethoden bezeichnen wir also Methoden, die mit 1 bis 50  $\mu$ l Ausgangslösung auskommen. Die Menge der effektiv zu bestimmenden Komponenten ist dabei außerordentlich variabel.

2 Beispiele: Das Jod kommt normalerweise im Serum in einer Konzentration von 4  $\mu$ g je 100 ml vor. Wenn wir also Jod in 50  $\mu$ l bestimmen, so kommt eine Menge von 0,002  $\mu$ g zur An-

\* Vortrag anlässlich der Winterversammlung des Schweizerischen Chemiker-Verbandes am 31. Januar 1959 in Freiburg.

alyse, welche quantitativ erfaßt werden muß. Andererseits enthält Serum etwa 7 g Protein je 100 ml oder 0,35 mg Protein in 5  $\mu$ l, was gewichtsmäßig 175 000mal mehr ist als das Jod, und dies in 10mal weniger Ausgangsvolumen.

Daß bei vielen Operationen im Ultramikromaßstab ein Instrumentarium aus Glas möglichst zu vermeiden ist, wird ohne weiteres klar, wenn wir die physikalischen und physiko-chemischen Grundlagen des Arbeitens mit so kleinen Flüssigkeitsmengen betrachten.

## 2. Physikalische und physiko-chemische Grundlagen

### 2.1. Relative Vergrößerung der Oberfläche

Der einzige eigentliche Unterschied beim Übergang auf kleine Flüssigkeitsmengen besteht darin, daß die Oberfläche relativ zum Volumen sehr stark vergrößert ist.

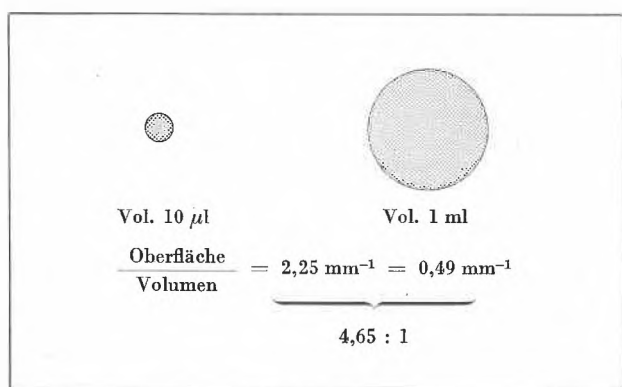


Abb. 1

Schon bei der Kugel, die die relativ kleinste Oberfläche zum Volumen besitzt, stellen wir fest, daß der Quotient Oberfläche zu Volumen bei 1 ml Inhalt 0,49  $\text{mm}^{-1}$  beträgt, während er bei einem Kügelchen von

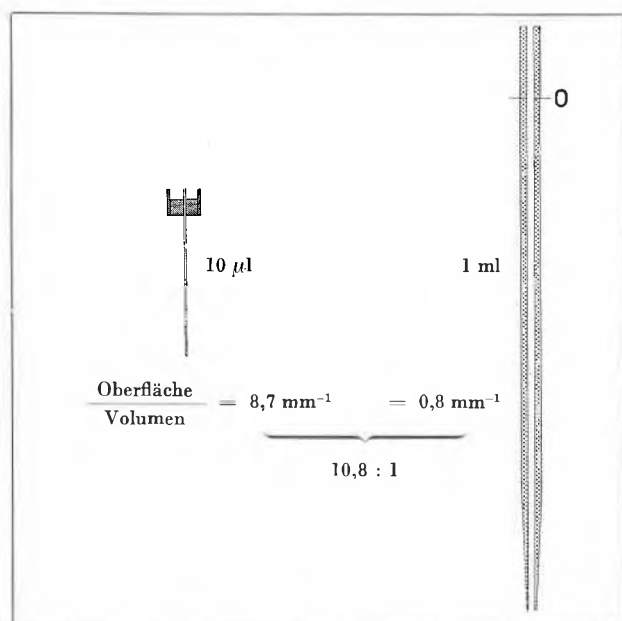


Abb. 2

10  $\mu$ l Volumen 2,25  $\text{mm}^{-1}$  wird. Diese Verhältniszahl ist also bei der kleineren Kugel 4,65mal größer als bei der größeren.

Bei Pipetten hingegen wird diese Verhältniszahl viel größer. Eine normale Stangenpipette vom 1 ml Inhalt und 20 cm Länge hat ein Verhältnis von Oberfläche zu Volumen von 0,8  $\text{mm}^{-1}$ , während bei einer Kapillarpipette von etwa 60 mm Länge und 10  $\mu$ l Volumen das Verhältnis Oberfläche zu Volumen 8,7  $\text{mm}^{-1}$ , also etwa elfmal größer als bei der 1-ml-Pipette, wird.

Diese außerordentliche Vergrößerung der Oberfläche relativ zum Volumen bewirkt selbstverständlich eine enorme Verstärkung aller Oberflächeneffekte.

Im folgenden sollen die wichtigsten spezifischen Probleme, die beim Arbeiten im Ultramikromaßstab auftreten, behandelt werden. Sie hängen alle mehr oder weniger mit der erwähnten relativen Vergrößerung der Flüssigkeitsoberfläche zusammen.

### 2.2 Denaturierung von Eiweißen an Oberflächen

Wir haben grundsätzlich drei verschiedene Oberflächen zu betrachten. Nämlich: Flüssigkeit gegen die Atmosphäre, gegen benetzbare und unbenetzbare Oberflächen, wobei zwischen den zwei letzteren viele Übergänge möglich sind. Soweit unsere Versuche reichen, verhält sich in bezug auf Eiweißdenaturierung eine Oberfläche gegen Luft gleich wie eine solche gegenüber einer völlig unbenetzbaren Oberfläche. An solchen Oberflächen findet eine relativ geringe, aber trotzdem noch meßbare Eiweißdenaturierung statt. Sie ist aber deutlich schwächer als gegen benetzbare Oberflächen.

Beim Arbeiten mit feinsten Kapillarelektroden zur Messung des Blut-pH sind wir zuerst auf dieses Eiweißdenaturierungsphänomen gestoßen. Nach einigen Messungen erfolgte die Einstellung des pH immer langsamer und wurde zuletzt unmöglich. Alle Reinigungsversuche mit den üblichen Reinigungsmitteln führten nicht zum Ziel. Sogar mit konzentrierter Harnstofflösung, die ein sehr gutes Auflösungsvermögen für Eiweiß haben soll, konnten wir unsere Elektrode nicht vollständig regenerieren.

In Jahre 1954 benutzten wir zum erstenmal Verdauungsfermente zur Entfernung von Eiweißfilmen an Oberflächen. Schon nach der ersten Inkubation von wenigen Minuten mit Pepsin in salzsaurem Lösung wies die Kapillarelektrode ihre ursprüngliche Einstellungsgeschwindigkeit und Meßgenauigkeit wieder auf. Seither ist es ein Standardverfahren geworden, sämtliche Kapillaren, die mit einer Eiweißlösung in Berührung waren, mit Pepsin oder Papain zu reinigen.

Damit war der Beweis erbracht, daß sich native Eiweiße in einer ziemlich festhaftenden Schicht an der Innenwand von Glaskapillaren niederschlagen. Über die von uns entwickelte Kapillarelektrode für genaueste pH-Messungen wird im dritten Teil, bei der Beschreibung der Apparaturen, berichtet.

Eine weitere Beobachtung betreffend Eiweißdenaturierung war folgende: Harnsäure läßt sich durch Einwirkung von Urikase spezifisch bestimmen, indem man die Abnahme des Harnsäureabsorptionsmaximums bei 298  $m\mu$  in einem geeigneten Puffersystem in Gegenwart von Urikase verfolgt.

Diese Harnsäurebestimmung läßt sich im Makromaßstab leicht durchführen. Im Ultramikromaßstab hingegen traten infolge Eiweißdenaturierung an den Oberflächen Trübungen auf. Diese Trübung ist viel stärker, wenn benetzbare optische Küvetten verwendet werden als nach Behandlung derselben mit Silikon. Dieses denaturierte Eiweiß setzt sich nicht an den Glaswänden ab, sondern bildet eine leichte Trübung der ganzen Lösung. Nicht native Eiweiße denaturieren offenbar unter Flockenbildung, ohne sich als Film an der Oberfläche zu deponieren. Auch Pepsin- und Papainlösungen denaturieren unter Flockenbildung und lassen sich leicht auswaschen.

Es ist sehr schwierig, den Unterschied im Eiweißdenaturierungsvermögen von benetzbaren und unbenetzbaren Oberflächen quantitativ festzustellen, weil der Einfluß von Luft vermieden werden muß. Zu diesem Zweck haben wir in feinen, langen Kapillaren aus Glas und Polyäthylen radioaktiv markiertes Eiweiß inkubiert. Die Eiweißlösung wurde ausgestoßen und die Kapillaren nachgewaschen, anschließend wurde die Radioaktivität der Kapillaren gemessen. Diese Untersuchungen werden dadurch erschwert, daß an den Wänden unter Umständen Adsorption des überschüssig vorhandenen Radioisotops stattfindet, welche nichts mit der Eiweißdenaturierung zu tun hat. Die bisherigen Resultate zeigen uns aber, daß die Eiweißdenaturierung an Glasoberflächen ungefähr doppelt bis dreimal so groß ist als an unbenetzbaren Oberflächen.

### 2.3. Fermentinaktivierung

Die Geschwindigkeit der Inaktivierung von Fermenten an Oberflächen hängt wohl sehr stark von der Natur des Apofermentes ab. Um diese Versuche eindeutig zu gestalten, sollten wir Fermente mit einer möglichst labilen Eiweißkomponente untersuchen können. Die alkalische Phosphatase zeigt sehr deutlich stärkere Aktivitätsabnahme in Glasbehältern als bei der Inkubation in unbenetzbaren Gefäßen.

Tab. 1. Fermentinaktivierung an Oberflächen

	Direkt	nach 2 Stunden in Polyäthylen	nach 2 Stunden in Glas
Alkalische Phosphatase Abnahme	5,3 B.E.	5,0 B.E. 0,3 B.E.	4,1 B.E. 1,2 B.E.

### 2.4. Immobilisierung an Oberflächen

An und unterhalb der Flüssigkeitsoberfläche werden die Moleküle sehr stark festgehalten, was enorme Probleme an die Rührung beim Mischen und bei der Titration stellt. Volumina von 10 bis 100  $\mu\text{l}$  sind sehr viel schwieriger zu homogenisieren als größere Flüssigkeitsmengen.

Wir titrieren normalerweise in 50 bis 100  $\mu\text{l}$  und fügen ungefähr 2 bis 5  $\mu\text{l}$  Titrationsflüssigkeit zu, welche wir auf  $1/100 \mu\text{l}$  genau ablesen können. Diese Mengen sind weitaus kleiner als ein Tropfen, und daher muß selbstverständlich die Spitze der Bürette in die zu titrierende Lösung eintauchen. Bei Verwendung einer benetzenden Bürettenspitze (z.B. aus Glas), bildet sich beim Eintauchen in die Flüssigkeit augenblicklich ein Film an der Außenwand der Spitze, der so stark festgehalten wird, daß er auch beim stärksten Rühren der Titration

entgeht. Es ist also wichtig, daß die eintauchende Bürettenspitze außen unbenetzbar ist. Ob sie innen wasserabstoßend oder benetzbar ist, spielt keine Rolle.

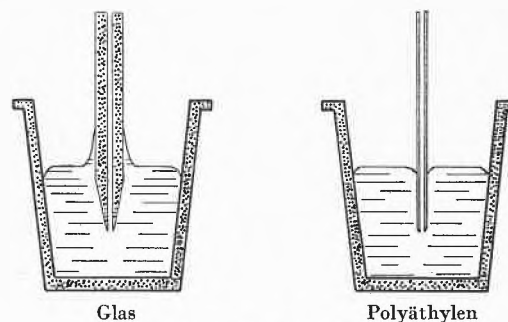


Abb. 3. Bürettenspitze

Die Titrationsgefäße müssen natürlich möglichst hydrophob sein, ebenso in die Flüssigkeit eintauchende Rührer, Elektroden usw.

Zum Mischen von kleinen Flüssigkeitsmengen haben wir eine ganze Reihe von Rührern entwickelt, die uns nicht befriedigten. Bei Verwendung eines Drehrührers muß dieser sehr klein und spiralförmig ausgebildet sein und mit mindestens 800 U/min rotieren. Ein solcher Rührer ist schwierig zu montieren und sehr zerbrechlich. Das Rühren mit einem rotierenden Magnetstab oder durch Rotation des Titrationsbecherrchens ist vollständig ungenügend wie auch das Durchperlen von Gasblasen.

Zum Ziel führten eigentlich nur Vibrationsrührer. Bei solchen kann man zwei Arten unterscheiden, nämlich Vibration des Reaktionsgefäßes (zum Mischen, bei Ausfällungen und Extraktionen) und Vibration der Lösung durch ein eintauchendes sinusoidal-schwingendes Stäbchen (hauptsächlich bei Titrationen verwendet).

Die Beschreibung der verwendeten Rührer erfolgt im Abschnitt 3.5.

### 2.5. Anreicherung an Oberflächen von oberflächenaktiven Substanzen

Dieses Problem hängt praktisch gesehen sehr eng mit demjenigen der Immobilisierung an Oberflächen zusammen. Für uns ist es wichtig, daß wir eine möglichst vollständige Homogenisierung durch die ganze Flüssigkeitsmenge hindurch erhalten. Die Substanzen, die sich hauptsächlich an der Oberfläche anreichern, sind Gallensäure, Gallenfarbstoffe und Steroidhormone, die ja nicht titrimetrisch bestimmt werden.

Aber bei der Ausführung von Farbreaktionen ist es wichtig, daß diese Substanzen im Moment der Reagenszugabe gut verteilt sind.

### 2.6. Volumenverminderung durch Verdampfen

Es ist erstaunlich, festzustellen, daß beim Arbeiten mit wasserabstoßenden Gefäßen die Verdampfung außerordentlich gering ist. Die Gewichtsabnahme bei 25°C von 20  $\mu\text{l}$  Wasser auf einer unbenetzbaren Unterlage, in

einem Röhrchen aus Polyäthylen und aus Glas von je 2,5 mm Durchmesser ist aus der Abbildung 4 ersichtlich.

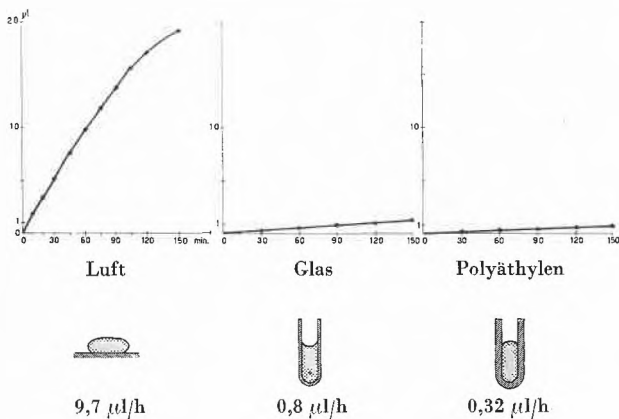


Abb. 4. Verdampfungsgeschwindigkeit von 20 µl H<sub>2</sub>O bei 25 °C

Die durchschnittliche Volumenverminderung bei 25 °C je Minute beträgt an der Luft 0,17 µl, in Polyäthylen 0,004 µl, in Glas 0,012 µl. Die Volumenverminderung in Gefäßen ist unabhängig vom Totalvolumen, sie wird einzig vom Durchmesser des Gefäßes und von der Höhe der Gefäßwand über dem Flüssigkeitsspiegel bestimmt. Demnach können bei Zimmertemperatur Fehler infolge Verdampfung vernachlässigt werden, wenn die Röhrchen nicht länger als 30 Minuten offen stehen gelassen werden.

Beim Zentrifugieren ist die Verdampfung viel stärker. Im Ultramikromaßstab muß jedes längere Zentrifugieren offener Röhrchen vermieden werden. Wir benutzen Zentrifugen mit sehr hohen Tourenzahlen, wobei nur eine halbe bis eine Minute lang zentrifugiert wird. Diese Mikrozentrifugen sind relativ billig und können in großer Zahl verwendet werden.

Bei der Inkubation der Proben in Wasserbädern bis zu 100 °C stellen sich die Verdampfungsprobleme in stark erhöhtem Maße. Die Röhrchen werden bei jeder Inkubation normalerweise mit Silikonstopfen verschlossen.

Abgesehen von reinen Oberflächenphänomenen, stellen sich weitere grundsätzliche Probleme beim Arbeiten im Ultramikromaßstab.

### 2.7. Reinheit der Geräte

Entgegengesetzt der üblichen Auffassung gehen unsere Erfahrungen dahin, daß an die Reinheit der Oberflächen nur wenig größere Ansprüche gestellt werden müssen als beim Arbeiten in Mikro- oder Makromaßstab.

Chromschwefelsäure kommt für Reinigungszwecke überhaupt nie zur Anwendung, da sie an Glaswänden sehr stark adsorbiert wird und besonders aus feinen Glaskapillaren außerordentlich schwierig auszuwaschen ist. Wir verwenden oberflächenaktive Putzmittel, wie Alconox oder Vel, in seltenen Fällen Salzsäure, und spülen mit heißem destilliertem Wasser nach. Wenn

irgendwie möglich, sollte jedes Trocknen an der Luft vermieden werden. Das Trocknen der Oberflächen geschieht am besten durch Abtupfen oder Reiben mit Cellulosepapier. Dies gilt sowohl für Glasgegenstände wie auch für Gefäße und Instrumente aus Plastik. Für Titrationsbecher genügt ein einmaliges Ausspülen derselben mit nachfolgendem Ausreiben mit Cellulosepapier, um eine völlig genügende Reinheit der Oberflächen zu erzielen. Sämtliche Oberflächen, die mit einer proteinhaltigen Lösung in Kontakt waren, sollten nach vorangehender Spülung während etwa zehn Minuten mit einer Pepsinlösung in Berührung gebracht werden.

Die optischen Flächen von Ultramikroküvetten, durch welche ein sehr feiner Lichtstrahl geleitet wird, müssen möglichst rein sein. Die Anforderungen an die Reinheit von solchen Oberflächen sind viel größer als bei Makroküvetten.

### 2.8. Verunreinigungen aus der Luft

Neben Staub, welcher verdünnte Oxydationsmittel reduzieren kann, wirken besonders Natrium, Kalium und Ammoniak schädlich. Diese Verunreinigungen wirken sich stärker aus als im Mikro- oder Makromaßstab und müssen sorgfältig vermieden werden. Keine Lüftung ist besser als eine Luftumwälzung, die nicht mit ganz hervorragenden Filtern ausgerüstet ist. In einem sogenannten klimatisierten Laboratorium wird hauptsächlich der Staub in ständiger Bewegung gehalten.

### 2.9. Filtration

Jede Filtration muß vermieden werden. Bei so kleinen Flüssigkeitsmengen sind die Verluste infolge Adsorption und durch die Verunreinigungen, die aus dem Filter herausgelöst werden, viel zu groß. Doch kann man die Filtration in jedem Fall vorteilhaft durch die Zentrifugation ersetzen. Eine Ausnahme bildet natürlich die Ultrafiltration unter erhöhtem Druck durch feste Membranen, die Kolloide und Eiweiße zurückzuhalten vermögen. Die Ultrafiltration läßt sich im Ultramikromaßstab sehr leicht durchführen.

## 3. Apparative Ausrüstung

### 3.1. Allgemeines

Die Ultramikroausrüstung wurde wohl für das klinisch-chemische Laboratorium entwickelt, eignet sich aber für alle analytischen Arbeiten. Um eine genügende Präzision bei der Abmessung der Volumina zu haben, müssen alle verwendeten Pipetten automatisch funktionieren, d.h. weitgehend unabhängig sein vom jeweiligen Experimentator. Verfügt man einmal über automatische Ultramikropipetten, so wird die Arbeit viel leichter, schneller und genauer als mit den bisherigen Methoden.

Da alle verwendeten Volumina 20- bis 100 mal kleiner sind (bei Titrationslösungen fast 1000 mal kleiner), werden die Methoden sehr viel billiger, und alle zur Anwen-

ding gelangenden Geräte sind viel kleiner als üblich. Die Raumbedürfnisse werden dadurch stark vermindert. Alle Arbeitsplätze sollten für sitzende Arbeit eingerichtet sein. Jede Methode wird am besten als kompakte Einheit mit allen dazugehörenden Instrumenten, Reagenzien usw. aufgebaut, so daß die betreffende Analyse jederzeit als Einzelanalyse oder in Serie ausgeführt werden kann.

Sorgfältige Bewegungsstudien führten uns zu der Entwicklung eines Standardarbeitsplatzes, der sich gegenwärtig im Studium befindet.

Die bisher von uns entwickelte Ausrüstung umfaßt neben den Pipetten eine Titrationseinheit mit Ultramikrobürette, Rührer und beweglichem Titrationstisch, eine neue einstufige Zentrifuge mit 14000 U/min, ein kleines Spektrophotometer mit stationärer Küvette für 0,2 ml Meßvolumen und automatischer Absaugvorrichtung, eine thermostabilisierte Glaselektrode für rasche Blut-pH-Messungen, Ultramikromeß- und -referenzelektroden, Zentrifugen-, Reagens- und Titrationsröhrchen aus Plastik, Vibrationsrührer, Wasserbäder, Diffusionseinheiten, ein Ultrafilter usw.\*

Es ist wohl das erstmal in der Geschichte der analytischen Chemie, daß eine vollständige, neue Ausrüstung zur Ausführung einer Großzahl verschiedener Methoden und Operationen geschaffen wurde, bei der alle einzelnen Bestandteile aufeinander abgestimmt sind.

Die ganze Ausrüstung ist praktisch unzerbrechlich, und fast jede Reinigung wird dadurch vermieden, daß alle Pipetten vom Selbstreinigungstyp sind und daß die verwendeten Behälter, wie Titrationsbecher und Zentrifugen- und Reagensröhrchen, nach einmaliger Verwendung weggeworfen werden können, da die Preise für diese Gegenstände zwischen zwei und vier Rappen liegen.

### 3.2. Das Prinzip der Reproduzierbarkeit

Da ja ausnahmslos alle Analysenresultate in bezug auf eine Eichkurve oder eine Testlösung ausgedrückt werden, handelt es sich darum, die Reaktionsbedingungen in allen Fällen genau zu reproduzieren. Wird für die Erstellung der Eichkurve sowie zum Einpipettieren der Testlösung und der zu analysierenden Lösungen stets dieselbe Pipette verwendet, so braucht das genaue Volumen derselben überhaupt nicht bekannt zu sein, wichtig ist nur, daß diese Pipette ihr Volumen möglichst genau reproduziert. Dasselbe gilt für die optischen Küvetten bei kolorimetrischen und spektrophotometrischen Analysen. Eine stationäre optische Küvette hat den großen Vorteil der absoluten Reproduktion der Versuchsbedingungen. Auch hier braucht die optische Weglänge der stationären Küvette nicht bekannt zu sein, da ja die Eichkurven und die Testlösungen ebenfalls mit der gleichen Küvette gemessen werden. Bei Verwendung einer einzigen Pipette zum Einpipettieren, wie auch bei der optischen Küvette, muß aber die Be-

dingung erfüllt sein, daß von der vorhergehenden Lösung nur vernachlässigbare Mengen darin zurückbleiben. In diesem Falle kann man beide ohne Zwischenreinigung benützen.

Für Reagenslösungen haben wir das Problem der Wiederholung des Volumens so gelöst, daß auf jeder Reagensflasche die dazugehörige automatische Pipette aufmontiert ist. Ein Reagens kann also nicht anders als im vorgeschriebenen Volumen auspipettiert werden.

Für die Bürette gilt das Prinzip der Reproduzierbarkeit in leicht abgeänderter Form; es muß nämlich ein möglichst konstantes Verhältnis zwischen der Skalenablesung und dem ausgelieferten Volumen bestehen. Ob das Verhältnis genau bekannt ist oder nicht, spielt keine Rolle.

Das Prinzip der Reproduzierung der Versuchsbedingungen gilt nicht nur für die apparative Seite, sondern ebenso für die chemischen Versuchsbedingungen, d. h. daß alle möglichen Störsubstanzen, die in einer Analysenlösung vorhanden sein können, auch beim Aufstellen der Eichkurve und in der Testlösung anwesend sein sollten. Diese Bedingung ist nicht immer leicht zu verwirklichen.

In der klinischen Chemie, d. h. bei Serumanalysen, kann folgendermaßen vorgegangen werden.

A. Eichkurve: Herstellung einer wässrigen Verdünnungsreihe der reinen Komponente die 10mal konzentrierter ist als dem physio-pathologischen Meßbereich entspricht. Jede Lösung der Verdünnungsreihe wird im Verhältnis 1 + 9 mit Normalserum gemischt. Als Normalserum kann man eine Mischung von etwa 10 Normalseren oder das schweizerische Testserum verwenden. Als «Nullwert» dient 1 Teil Wasser + 9 Teile Normalserum. Nach erfolgter Analyse dieser Verdünnungsreihe wird der «Nullwert» von den übrigen Werten abgezogen und die Eichkurve von Null aus aufgestellt. Diese Eichkurve sollte alle paar Monate wiederholt werden.

B. Testlösung: Täglich aber und mit jeder Serie wird eine Testlösung mitlaufen gelassen. Als solche dient uns für sämtliche Komponenten des Serums das schweizerische Standardserum, das vom Zentrallaboratorium des Schweizerischen Roten Kreuzes in Bern hergestellt und vertrieben wird.

Prinzip des internen Standards: Bei Lösungen unbekannter Zusammensetzung und bei stark pathologisch veränderten Sera kann so vorgegangen werden, daß in einer ersten Analyse die Konzentration der zu bestimmenden Komponente ermittelt wird (*A*). Anschließend wird die gleiche Lösung zu 9 Teilen mit 1 Teil einer etwa zehnmals konzentrierteren Lösung der betreffenden Komponente, von genau bekannter Konzentration *C*, gemischt und analysiert. Das Resultat sei die Konzentration *B* (mindestens in Doppel- oder mehrfach wiederholten Analysen). Der effektive Gehalt wird  $= \frac{0,1 C}{B - 0,9 A} \cdot A$

Das Prinzip der Reproduzierbarkeit der Versuchsbedingungen wird so konsequent wie möglich angewandt. Dazu verwenden wir immer dieselbe Probepipette je Analyse (z. B. gibt es eine Chlorpipette, eine Harnstoffpipette, eine Phosphatpipette, eine Zuckerpipette usw.); auf jede Reagensflasche ist eine automatische Reagenspipette montiert; wir verwenden stationäre optische Küvetten, Wasserbäder im Prinzip immer auf Siedetemperatur, und wir reproduzieren auch wenn irgend

\* Die Großzahl der erwähnten Apparate wird demnächst von der Firma Beckman, Spinco Division, Palo Alto, Kalifornien, in den Handel gebracht.

möglich die chemischen Bedingungen der Analyse (Gegenwart von Eiweiß und anderen eventuellen Störfaktoren).

### 3.3. Pipetten

Nur automatisch funktionierende Pipetten können den Anforderungen an rasches, leichtes und präzises Arbeiten genügen. Die von uns entwickelten Pipetten sind aus wasserabstoßendem, unzerbrechlichem Material hergestellt (Polyäthylen oder Kel-F) und sind als Überlaufpipetten konstruiert. Die Präzision, mit welcher solche Pipetten ein bestimmtes Volumen reproduzieren, hängt davon ab, mit welcher Präzision sich die Flüssigkeitsmeniski an beiden Enden der Kapillare einstellen. Diese Meniski stellen sich an wasserabstoßendem Material viel genauer ein als an benetzenden Oberflächen. Die Entleerung der Pipetten muß langsam erfolgen. Eventuell darin zurückbleibende Tröpfchen sind auf Oberflächenfehler des Materials zurückzuführen. Sie reproduzieren sich aber in erstaunlichem Maße immer an derselben Stelle. Das Volumen dieser Tröpfchen stellt nur einen kleinen Bruchteil des in einer Glaskapillare verbleibenden, unsichtbaren Flüssigkeitsfilmes, der nie vollständig reproduziert werden kann, dar. Die mit diesen Pipetten titrierbaren Volumina erstrecken sich von etwa 0,5  $\mu\text{l}$  bis etwa 250  $\mu\text{l}$ .

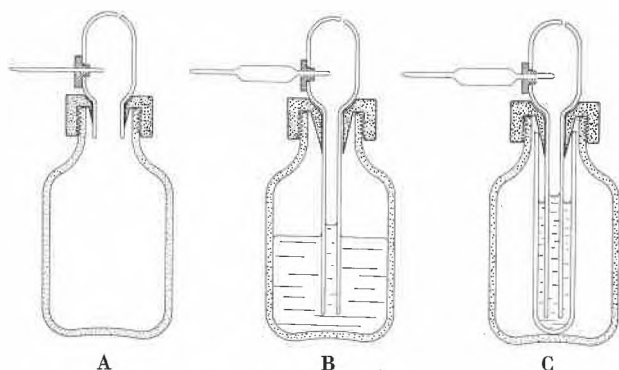


Abb. 5. Pipetten

#### 3.3.1. Probepipette (siehe Abbildung 5 A)

Nach Zusammendrücken der Polyäthylenflasche wird die Öffnung oben in der Glasglocke mit dem Finger verschlossen und die Lösung durch die Kapillare aufgesaugt, bis sie als kleiner Tropfen beim oberen Ende der Kapillare austritt und überfließt. In diesem Augenblick wird die Öffnung freigegeben und der Druck auf die Flasche aufgehoben. Zum Auspipettieren der Flüssigkeit wird zuerst die obere Öffnung mit dem Zeigefinger verschlossen und dann durch Zusammenpressen des Polyäthylenkörpers die Flüssigkeit langsam in das zu titrierende Gefäß ausgestoßen.

Der Überlauf wird in der Polyäthylenflasche gesammelt, welche mit Watte und einem Desinfiziens beschickt werden kann. Alle weiteren Proben werden hintereinander pipettiert, ohne daß zwischendurch die Pipette gespült wird.

Tab. 2. Pipettenkalibrierung mit menschlichem Serum bei 25°C

5 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{l}$	20 $\mu\text{l}$
5,150 mg 6	10,28 mg 1	20,34 mg -1
5,138 - 6	10,32 5	20,36 1
5,146 2	10,28 1	20,30 -5
5,128 -16	10,29 2	20,38 3
5,135 - 9	10,28 1	20,36 1
5,156 12	10,27	20,33 -2
5,158 14	10,25 -2	20,30 -5
5,127 -17	10,27	20,40 5
5,140 - 4	10,24 -3	20,38 3
5,160 16	10,26 -1	20,40 5
	10,25 -2	20,32 -3
	10,27	20,34 -1
	10,24 -3	20,38 3
	10,28 1	20,32 -3
	10,30 3	20,38 3
	10,25 -2	20,39 4
	10,30 3	20,30 -5
	10,27	20,31 -4
	10,28 1	20,34 -1
	10,28 1	20,33 -2
$\bar{x} = 5,144 \text{ mg}$	$\bar{x} = 10,27 \text{ mg}$	$\bar{x} = 20,35 \text{ mg}$
$s = \pm \sqrt{\frac{\sum(\bar{x} - x_i)^2}{n - 1}}$		
$s = \pm 0,233\%$	$s = \pm 0,20\%$	$s = \pm 0,17\%$

Reproduzierbarkeit der Reagenspipetten:

20- $\mu\text{l}$ -Pipette: 20,21 mg,  $s = \pm 0,124\%$  ( $n = 20$ )

2,5- $\mu\text{l}$ -Pipette: 2,51 mg,  $s = \pm 0,128\%$  ( $n = 10$ ) (photometrisch geeicht)

Da die Strömung in diesen Kapillaren laminar ist, werden die eventuell an den Wänden hängenden Tröpfchen im ersten Anteil der aufgesaugten Probe gesammelt und beim Überlauf des ersten Tropfens entfernt. Dieser Überlauf hat also zwei Funktionen. Erstens sichert er die genaue Lokalisierung des Flüssigkeitsmeniskus am oberen Ende der Kapillare und zweitens dient er zum Auswaschen der Pipette. Mit radiojod-markierter Eiweißlösung wurde festgestellt, daß weniger als  $1/10\,000$  der vorhergehenden in der darauffolgenden Probe wiederzufinden ist. Am Ende jedes Arbeitstages wird die Pipette mit Wasser gespült und über Nacht gefüllt stehen gelassen.

Nach Pipettieren von eiweißhaltigen Lösungen wird die Pipette abends mit einer Pepsinlösung (etwa 1% Pepsin in HCl N/10, täglich frisch herzustellen) gefüllt, wodurch ein eventuell gebildeter Eiweißfilm entfernt wird. Am darauffolgenden Morgen wird die Pipette mit Wasser gut durchgespült und ist für den weiteren Gebrauch betriebsbereit. Es ist außerordentlich wichtig, daß nach jeder Serie von Serumproben die Pipette mit physiologischer Kochsalzlösung oder mit Wasser gespült wird, da jede Koagulation in der Pipette vermieden werden muß.

Falls die Pipette einmal verstopft wird (Koagulation von Serum, Plasma oder Blut usw.), so wird vorerst einmal an der

oberen Öffnung ein Wasserstrahlvakuum angelegt und versucht Pepsinlösung durch die Pipette zu ziehen. Gelingt dies nicht, so wird die Pipette mitsamt dem Silikongummistopfen von der Glasglocke entfernt und in ein mit frischer Pepsinlösung gefülltes, unten zugeschmolzenes Glasrohr gebracht. Dieses wird mehrere Male evakuiert und dann eine bis zwei Stunden stehen gelassen (eventuell bei 37 °C). Nie aber verwende man Draht oder sonst etwas, was die Innenwand der Pipette beschädigen könnte. Auch soll die Pipette nie zwischen den Fingern zerquetscht werden.

Eine sorgfältig behandelte Pipette kann monate-, ja jahrelang ohne Veränderung ihres Volumens in Gebrauch gehalten werden. Die Pipette muß vor direkter Sonnenbestrahlung geschützt und darf nie über 40 °C erwärmt werden.

### 3.3.2. Reagenspipette (Abbildung 5 B + C)

Die in der Polyäthylenflasche befindliche Reagenslösung wird durch Druck auf die Flasche in den oberen Behälter gedrückt, bis sich das Flüssigkeitsniveau über der Mündung der Pipette befindet. In diesem Moment wird mit dem Zeigefinger die obere Öffnung unter Aufrechterhaltung des Druckes verschlossen, dadurch wird die Kapillarpipette gefüllt. Sobald die Pipette voll ist, wird zuerst die oben befindliche Öffnung freigegeben und dann durch Verminderung des Druckes die Lösung in die Flasche zurückfließen gelassen. Nach Abwischen von eventuell übergelaufener Reagenslösung wird die Pipette nach Verschluss der oberen Öffnung durch Druck auf die Flasche langsam entleert. Die Reagenspipette wird nie gereinigt und ist immer betriebsbereit. Die in der Glasglocke befindliche obere Öffnung ist außerordentlich klein, auch wirkt die Glasglocke selbst als Kondensator, so daß praktisch keine Verdampfung der Reagenslösung stattfindet, da ja nur die kleine Oberfläche, die sich im Steigrohr befindet, der Atmosphäre ausgesetzt ist. Bei flüchtigen Lösungsmitteln kann man bei Nichtgebrauch die obere Öffnung mit einer Gummikappe abschließen. Das Material des flexiblen Behälters ist gehärtetes Polyäthylen, das den meisten Chemikalien widersteht und völlig gasundurchlässig ist.

Für Lösungen, die nicht in Polyäthylen aufbewahrt werden können, benützen wir einen Einsatz aus Glas (Abbildung 5 C). Dieser Einsatz kommuniziert oben mit dem Gasraum innerhalb der Polyäthylenflasche, so daß, wenn diese zusammengedrückt wird, die Funktion genau die gleiche ist wie beim Modell B. Für lichtempfindliche Substanzen kann man schwarze Polyäthylenflaschen verwenden. Wir verwenden die beschriebenen Reagensflaschen in zwei Größen, nämlich zu 30 und zu 100 ml, wobei diese Volumen für 500 bis 1000 Analysen genügen.

### 3.4. Bürette

Durch Drehen der Mikrometerschraube wird der Zeiger auf dem Zifferblatt in Rotation versetzt, und gleichzeitig wird ein Zylinder von höchster Präzision (Toleranz auf dem Durchmesser  $\pm 2 \mu$ ) durch eine Teflondichtung hindurch in die Glasspitze hineingedrückt,

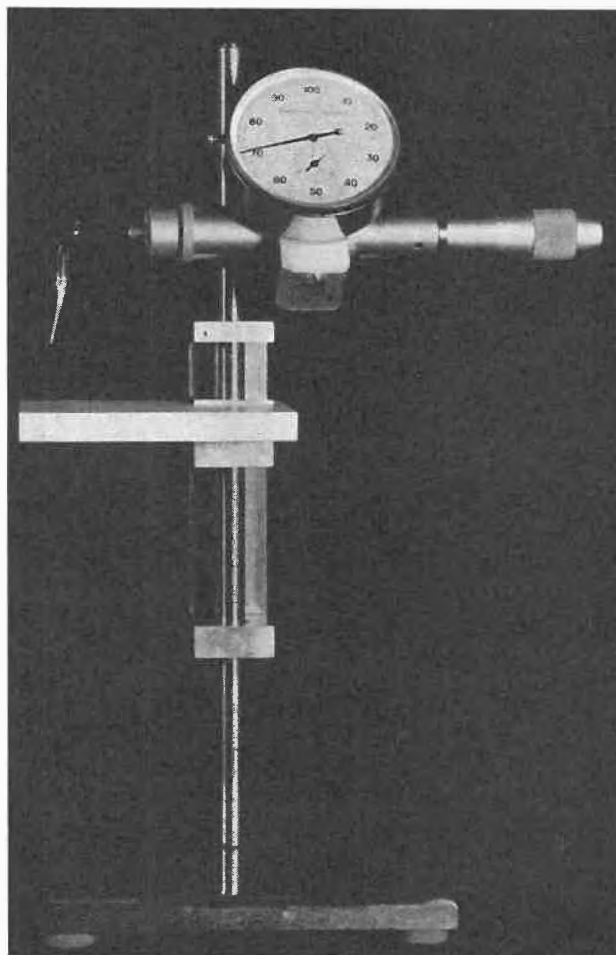


Abb. 6

die die Titrationslösung enthält. Die Glasspitze mündet in eine feine Polyäthylenkapillare, welche bei der Titration in die Lösung eintaucht. Der innere Durchmesser dieser Kapillare ist derart fein (0,2 mm Durchmesser), daß auch bei längerem Stehen kein Flüssigkeitsaustausch durch Diffusion auftritt. Der kleine Zeiger gibt die Anzahl der Umdrehungen (bis 30) des großen Zeigers an. Beide Zeiger können durch Druck auf den seitlichen Knopf auf Null gebracht werden. Das Zifferblatt ist in 200 Teile unterteilt und auf 100 numeriert. Da eine Umdrehung des großen Zeigers 2,00  $\mu$ l entspricht, kann also das Volumen auf  $1/100 \mu$ l abgelesen werden.

Die Bürette weist über den ganzen Meßbereich eine Genauigkeit von  $\pm 1/100 \mu$ l auf und die Reproduzierbarkeit des Volumens ist von der gleichen Größenordnung. Sie ist von außerordentlich robuster Bauart und praktisch unzerbrechlich. Der in die Flüssigkeit eintauchende Zylinder ist aus Kel-F und hat einen ähnlichen Ausdehnungskoeffizienten wie Wasser. Da der Zylinder die Glaswand der Spitze nicht berührt, spielt sie nur die Rolle eines Flüssigkeitsbehälters und kann daher leicht ersetzt und ausgewechselt werden. Durch Drehen der Spitze und des Zifferblattes um 180° wird eine Rechtsbürette ohne weiteres in eine Linksbürette verwandelt.

Da die Titrationsvolumina auf  $1/100 \mu\text{l}$  abgelesen und reproduziert werden können, benötigen wir für eine Titration nicht mehr als 2 bis  $5 \mu\text{l}$ . Es können daher 10- bis 20mal konzentriertere Lösungen als bei den gewöhnlichen Mikroanalysen benutzt werden, was zur Folge hat, daß die Titer viel stabiler bleiben und daß der Äquivalenzpunkt bei potentiometrischen Ablesungen oder bei Verwendung von Farbindikatoren viel schärfer erkannt werden kann.

Die Kapazität der Bürette beträgt  $200 \mu\text{l}$ , es können also 40 bis 80 Analysen ohne Nachfüllung durchgeführt werden. Verbunden mit der automatischen Nullrückstellung der Zeiger bedeutet das eine sehr rasche und leichte Arbeitsweise. Zum Nachfüllen mit derselben Titrierlösung wird diese einfach von der Spitze her durch Linksdrehen der Mikrometerschraube aufgesaugt. Das Auswechseln der Titrationslösungen erfolgt in einfacher Weise dadurch, daß die Glasspitze entfernt wird und durch eine andere, mit der neuen Lösung gefüllte Glasspitze, ersetzt wird. Dazwischen braucht der Zylinder nur mit Cellulosepapier abgerieben zu werden.

Dadurch, daß die Spitze der Bürette ständig in die zu titrierende Lösung eintaucht, lassen sich ganz neuartige und außerordentlich praktische Elektrodensysteme für die potentiometrische Endpunktsanzeige verwenden, indem metallische Bezugs Elektroden benutzt werden können, die in die Bürettenspitze eingebaut werden.

Zum Beispiel kann die potentiometrische Titration von Chlor mit Silbernitrat mit zwei Silberelektroden ausgeführt werden. Die eine taucht in die zu titrierende Lösung ein, wo sie gleichzeitig als Vibrationsrührer wirkt, und die zweite wird in die Bürettenspritze eingebaut. In diesem Fall wirkt die Silbernitratlösung mit der Silberlektrode als Halbzelle mit konstantem Potential, wobei überdies noch der große Vorteil der ständigen Erneuerung der Kontaktlösung an der Bürettenspitze besteht.

### 3.5. Rührer

Wie unter 2.4. erwähnt, benutzen wir ausschließlich Vibrationsrührer. Wir unterscheiden zwei Arten von Rührern: Rührung von außen und Rührung von innen.

#### 3.5.1. Die Rührung von außen

Die Rührung von außen erfolgt durch Anlegen des Reaktionsgefäßes an einen rasch rotierenden Exzenter. Als solcher eignet sich sehr gut ein großer, vorne vierkant zugeschnittener Stopfen, der auf der Achse eines mit etwa 1400 U/min rotierenden Motors befestigt wird. Noch besser eignet sich ein Zylinder aus Nylon von ungefähr 35 mm Länge und etwa 20 mm Durchmesser, welcher derart durchbohrt ist, daß sich am inneren Ende die Achse des Motors konzentrisch, am äußeren Ende aber um 5 bis 6 mm exzentrisch befindet. Der Vorteil dieser beiden Rührer liegt darin, daß man die Rührung beliebig stark regulieren kann, je nachdem man das Röhrchen am Stopfen innen, wo er rund läuft, oder außen an die abgeschnittenen Flächen bzw. an den exzentrischen Teil des Zylinders anlegt. Diese Rührung ist außerordentlich wirksam, und Extraktionen, die auf

einer Schüttelmaschine 15 bis 30 Minuten benötigen, können in 30 bis 60 Sekunden durchgeführt werden.

#### 3.5.2. Eintauchende Vibrationsrührer

Bei der Rührung durch einen in die Lösung eintauchenden schwingenden Rührer, der hauptsächlich bei Titrationsen verwendet wird, stellt sich das Problem des Herausspritzens von ganz kleinen Tröpfchen aus der Flüssigkeit, welche dadurch der Titration entgehen. Um dieses Herausspritzen zu vermeiden, muß die Bewegung des Titrationsrührers sinusoidal sein. Es ist relativ schwierig, mit einfachen Mitteln eine zuverlässige und regulierbare sinusoidale Schwingung zu erzielen. Der Rührer muß überdies in seiner Position leicht regulierbar sein und möglichst wenig Platz über dem Titrationstisch einnehmen. Da sich die Frequenz des Wechselstromes von 50 Perioden in der Sekunde als sehr günstig erwiesen hat, benutzten wir zur Konstruktion unserer Rührer elektromagnetische Aquariumpumpen, welche außerordentlich robust gebaut sind. Es wurde ein mechanisch (Abb. 7 A) und pneumatisch (Abb. 7 B) betriebener Rührer entwickelt.

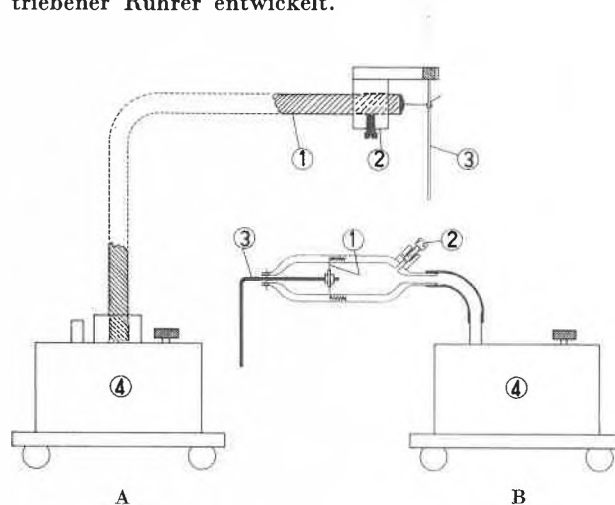


Abb. 7. A: Mechanischer Rührer: 1 Flexibles Bohrrohr, Träger des am magnetischen Vibrator befestigten Vibrationsdrahtes, 2 Verstellbarer Halter, 3 Rührer, 4 Aquariumpumpe. – B: Pneumatischer Rührer: 1 Gummimembran, 2 regulierbares Überdruckventil, 3 Rührer, 4 Aquariumpumpe

Durch ein halbsteifes Bohrrohr kann der Rührer in jeder beliebigen Lage festgehalten werden. Als Rührer verwenden wir mit Vorteil Zahnstocher aus Kunststoff wie auch Metallelektroden bei potentiometrischen Titrationsen.

#### 3.6. Titrationstisch

Ein neuartiger Titrationstisch aus Polyvinylchlorid, der sich leicht auf- und abwärts bewegen läßt und automatisch in jeder beliebigen Höhe festgehalten wird, vervollständigt die Titrationsausrüstung. Diese soll demnächst als kompakte Einheit, umfassend die Bürette, den Vibrationsrührer und den beweglichen Titrationstisch, in den Handel gebracht werden.

### 3.7. Ultramikrophotometer

Dieses ist mit einer stationären Küvette ausgerüstet, welche sich durch Druck auf einen Knopf automatisch entleert. Die optische Weglänge ist 10,00 mm bei einem Volumen von 0,15 bis 0,20 ml. Die Lösung wird von oben eingeführt und mit Hilfe einer Aquariumpumpe in eine Flasche abgesaugt. Das direktanzeigende Ableselinstrument erlaubt Ablesungen in Extinktions- und Transparenzwerten. An Stelle von Filtern wird ein Interferenzverlauffilter verwendet, welches die direkte Einstellung der Wellenlängen zwischen 400 und 600 m $\mu$  erlaubt. Das Licht wird durch eine elektronisch stabilisierte Glühlampe erzeugt und fällt in feinem Strahl durch die Lösung und auf das Filter auf eine Vakuumphotozelle (siehe Abb. 8).

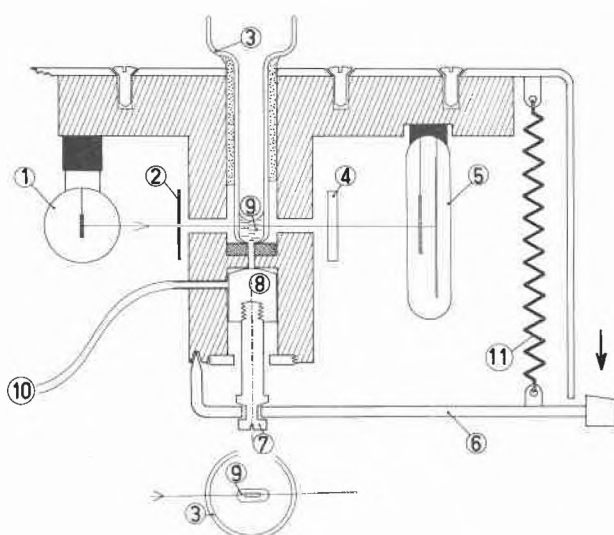


Abb. 8. Stationäre Ultramikrophotometerküvette. 1 Lampe, 2 Punktblende, 3 Glasküvette (in der unteren Abbildung in Aufsicht dargestellt), 4 Filter, 5 Photozelle, 6 Entleerungshebel, der vermittels 7 den Stöpsel 8 betätigt. Bei Druck auf den Hebel 6 wird die Flüssigkeit 9 durch den Entleerungsschlauch 10 abgesaugt. 11 Spiralfeder

Im Gegensatz zu den meisten anderen Geräten muß die Oberfläche der stationären Küvette möglichst benetzend sein. Maximale Benetzung gewährleistet einen zusammenhängenden Film, der viel besser abgesaugt wird als isolierte Tröpfchen an einer Wand, und andererseits wird die Bildung von Luftblasen mit Sicherheit vermieden. Zur Erzielung einer guten Benetzbarkeit wird die Küvette nach jeder Serie mit einer Reinigungslösung (0,7% Alkonox in Wasser) und mit einer 0,5-prozentigen N-Octylalkohol-Lösung in Aceton behandelt. Bei Nichtgebrauch muß die Küvette immer mit Wasser gefüllt bleiben. Die Außenfläche der Küvette wird nie gereinigt, da diese hermetisch im Apparat eingeschlossen ist.

Die zu messenden Proben werden hintereinander eingefüllt und nach erfolgter Ablesung abgesaugt. Nur nach einem außerordentlich hohen Extinktionswert wird mit einigen Tropfen Lösungsmittel nachgespült. Das Vo-

lumen, das nach etwa fünf Sekunden Absaugen noch in der Küvette verbleibt, beträgt etwa 1  $\mu$ l bei Verwendung von 100 bis 200  $\mu$ l Meßlösung, das macht 0,5 bis 1% aus; aber in einer Reihe, wo die Extinktionswerte um den Normalwert herum liegen, wird der Fehler der Ablesung außerordentlich viel kleiner. Dieses Photometer erlaubt ein bestechend rasches und präzises Arbeiten.

### 3.8. Zentrifuge

Eine neuartige Zentrifuge befindet sich in Entwicklung. Bisher benützten wir käufliche Mikrozentrifugen, die sich recht gut für Ultramikroarbeiten eignen. Wir verwenden hauptsächlich eine kleine deutsche Zentrifuge, die von Webeke gebaut wird und welche mit etwa 12000 U/min dreht. Runne (Deutschland) hat eben eine neue Mikrozentrifuge herausgebracht. Micro Chemical Specialities in Berkeley, Kalifornien, baut eine ausgezeichnete, aber recht teure Zentrifuge mit einer maximalen Tourenzahl von 24000 U/min.

### 3.9. Titrierbecher, Zentrifugen- und Reagensröhrchen

Am besten haben sich konische Titrierbecher mit flachem Boden bewährt (Innendurchmesser unten 5 mm, oben 10 mm, Innenhöhe 12 mm). Es können darin Volumina von 20 bis etwa 400  $\mu$ l titriert werden. Das Material muß glasklar und chemisch resistent sein. Wir haben uns diese Becherchen bisher selbst aus Plexiglas gedreht, doch werden wir in nächster Zukunft über im Spritzguß hergestellte Titrationsbecher aus reinstem Polystyrol verfügen.

Zum Zentrifugieren und als Reagensröhrchen benützten wir bisher meist Geräte aus Glas, die aber vorteilhaft durch Kunststoffröhrchen ersetzt werden.

Zur Beobachtung von Farbreaktionen und Farbumschlägen kommt auch hier nur ein durchsichtiges Material in Frage, wie Polystyrol, Nylon und Kel-F (Trifluoromonochloropolyäthylen), das leider relativ teuer ist. Die Versuche über die chemische Resistenz bei erhöhter Temperatur sind noch nicht abgeschlossen.

Mit zwei Modellen kommen wir in allen bisher begegneten Fällen aus, wobei beide als Zentrifugen- und Reagensröhrchen gebraucht werden können. Die Form ist diejenige eines kleinen Reagensglases, oben mit einem relativ dicken Rand versehen. Die Innenhöhe ist bei beiden 35 mm und der Durchmesser 4,5 mm (Inhalt 500  $\mu$ l) und 2,5 mm (Inhalt 150  $\mu$ l).

3.10. Röhrchenhalter, Wasserbäder, kleine Silikonstopfen, verschiedene Elektroden (kleine Napf-Glaselektroden, kapillarförmige Bezugselektroden usw.) vervollständigen die Ausrüstung.

### 3.11. Blut-pH-Elektrode

Die Anforderungen, die an die Meßanordnung (Glaselektrode, Abschirmung, Meßgerät) für die Bestimmung des Blut-pH gestellt werden müssen, sind außerordentlich hoch, da die pH-Werte infolge der geringen physio-

logischen und pathologischen Schwankungsbreite sicher auf 0,01 Einheiten genau gemessen werden müssen. Da eine direkte Messung im Blutstrom in feinen Blutgefäßen noch unmöglich und wegen der Strömungspotentiale und der pH-Beeinflussung durch verletztes Gewebe wahrscheinlich nicht erstrebenswert ist, müssen wir den idealen Meßbedingungen möglichst nahekommen.

Diese werden mit der von uns vorgeschlagenen Elektrode beinahe erreicht. Die Messung erfolgt am Krankenbett innerhalb weniger Sekunden, ohne jede Temperaturveränderung des Blutes, ohne Anticoagulans (welche fast ausnahmslos das Blut-pH beeinflussen) und anaerob. Wir können jedoch nicht beim Blutdruck des Patienten messen und kennen auch die Abhängigkeit des pH vom Blutdruck nicht.

Das außerordentlich schwierige Problem der Abschirmung gegen elektrostatische Einflüsse ist dadurch gelöst, daß das durch Elektrolytzusatz leitend gemachte Thermostatenwasser geerdet wird. Die Abschirmung des Panzerkabels wird ebenfalls geerdet, so daß die gesamte Ableitung lückenlos abgeschirmt ist. Die Meßelektrode (Abb. 9) ist unzerbrechlich, da die Glaskapillare in einem Plexiglaskörper eingebaut ist und ihre herausragenden Enden (3 und 4) aus Polyäthylen bestehen, welches das Auftreten von Kriechströmen völlig verhindert. Die untere Polyäthylenkapillare (3) ist auswechselbar, um bei der Entnahme von Kapillarblut (Fingerbeere, Ohrläppchen usw.) die Übertragung von Infektionen zu verhindern. Die seitliche Öffnung (5) ist über ein Auffanggefäß mit einer kleinen Vakuumpumpe verbunden. Bei Verschuß der oberen Öffnung (6) mit der Fingerspitze wird die zu messende Flüssigkeit in die Kapillare aufgesaugt und fließt bei (4) über. Bei Durchsaugen von Luft wird die Kapillare entleert und die Flüssigkeit sam-

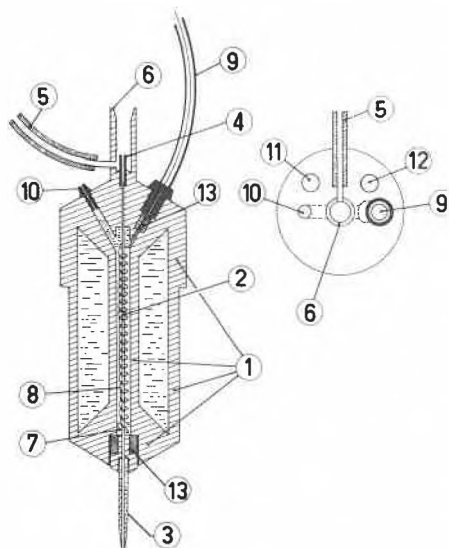


Abb. 9. Ultramikroglaselektrode

1 Elektrodenkörper aus Plexiglas, 2 Meßkapillare, 3 auswechselbare Polyäthylenkapillare, 4 Polyäthylenkapillare, dient als Überlauf, 5 Anschluß an schwache Vakuumpumpe (abgeänderte Aquariumpumpe), 6 Öffnung mit Konus für Mundstück einer Injektionsspritze, 7 Elektrodenableitflüssigkeit, 8 chlorierter Silberdraht, spiralförmig um Kapillare angeordnet, 9 Ableitung via hochisoliertes Panzerkabel, 10 Einfüllöffnung für Elektrodenableitflüssigkeit mit Kapillarstopfen aus Polyäthylen für Druckausgleich, 11 und 12 Ein- und Ausfuhrstutzen für Thermostatenflüssigkeit, 13 Elastische hochisolierende Dichtung

melt sich im Auffanggefäß an. Wird die Öffnung (6) bei gefüllter Kapillare freigegeben, so bleibt diese gefüllt und das pH kann nach Einsetzen der Meßelektrode in den Meßblock (siehe Abb. 10) sofort gemessen werden. Für genaueste Messungen ist der Druckausgleich bei (10) notwendig, da infolge der großen Temperaturunterschiede (Zimmertemperatur bis Meßtemperatur) beachtliche Druckschwankungen auf die Außenwand der Meßkapillare ausgeübt werden. Längenunterschiede zufolge verschiedenartiger Temperaturkoeffizienten von Glas und Plexiglas werden durch die elastische Silikondichtung in (13) ausgeglichen.

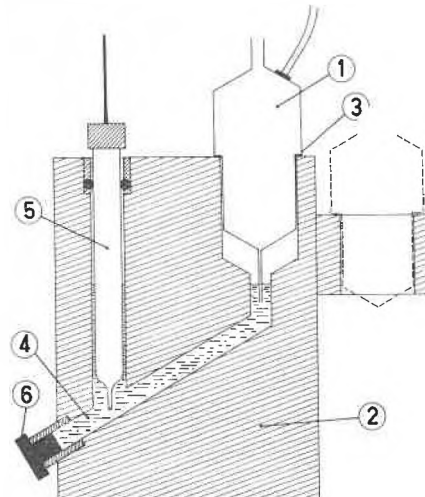


Abb. 10. Elektrodenanordnung

1 Glaselektrode, 2 Meßblock, 3 Schulter, 4 KCl-Brücke, 5 Bezugs-elektrode (Kalomelektrode oder besser Silberchloridelektrode), 6 Auslaß für Reinigung usw.

Sobald die zu messende Flüssigkeit aufgesaugt ist, wird die Glaselektrode in den Meßblock eingeführt, wo sie lose auf der Schulter (3) hängt. Die Polyäthylenkapillare taucht hierbei in die gesättigte KCl-Lösung (4) ein, wodurch der Kontakt mit der Bezugslektrode hergestellt wird. Die Diffusionspotentiale an der Kontaktstelle Polyäthylenspitze-KCl-Lösung, sind außerordentlich reproduzierbar.

Die ganze Meßanordnung ist auf einen speziell abgedeckten Rolltisch aufgebaut und besteht aus einem Präzisionskompensator, der eine Ablesung auf mindestens 0,01 pH-Einheiten gestattet, der Elektrodenanordnung, die über einen flexiblen Arm erstens mit dem Kompensator, zweitens via Auffanggefäß mit der Vakuumpumpe und drittens mit einem Präzisionsthermostaten verbunden ist (siehe Abb. 11).

Der Rolltisch sowie sämtliche metallischen Bestandteile müssen sorgfältig geerdet werden.

Die pH-Messung erfolgt am Krankenbett, nachdem der Patient mindestens 15 min ruhig gelegen ist. Husten, heftige Bewegungen, Aufregung und Bronchienreinigung bei tracheotomisierten Patienten können sofortige, oft tiefgreifende Veränderungen des Blut-pH bewirken.

Die Glaselektrode wird auf 0,1° genau auf die Temperatur des Patienten eingestellt, und zwar auf die Hauttemperatur bei Messung von Kapillarblut und auf die Rectaltemperatur bei Messung mit venösem oder arteriellem Blut, welches direkt aus der eingestochenen Nadel entnommen wird.

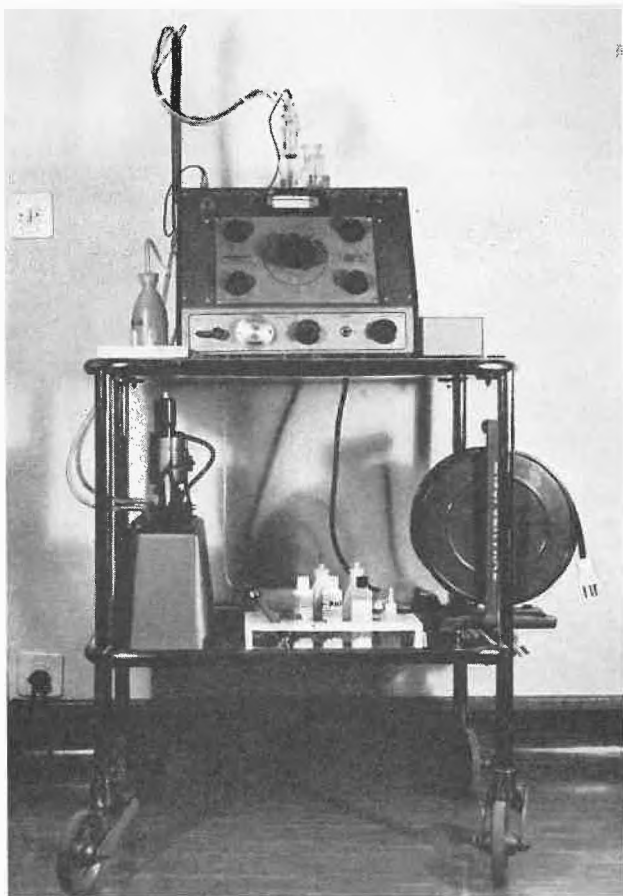


Abb. 11. Blut-pH-Einheit

Das Instrument wird mit 2 Standardpuffern (Paranitrophenol von pH 6,97 und Standardacetat pH 4,65 bei 37°C, Metrohm AG, Herisau) geeicht. Die Sollwerte müssen innerhalb  $\pm 0,01$  pH reproduzierbar sein. Durch tiefen Einstich in die Fingerbeere (nach warmem Handbad), oder in das Ohrfläppchen werden die ersten 2 bis 3 Tropfen Blut mit trockener Watte abgewischt, anschließend wird ein großer Tropfen gebildet, aus dessen Basis das Blut in die Kapillare aufgesaugt und das pH schnell gemessen wird. Sofort wird das Blut in das Auffanggefäß abgesaugt und eine zweite, eventuell dritte Messung durchgeführt. Das zur Messung benötigte Volumen beträgt etwa 20  $\mu\text{l}$ , also nur einen Bruchteil des aufgelaufenen Blutstropfens, wodurch die gemessene Probe zu keinem Zeitpunkt mit Luft in Berührung kommt oder die Temperatur verändert. Bei Verstopfung der Kapillare (durch koaguliertes Blut usw.) wird auf die Öffnung (6) eine 20-ml-Injektionspritze aufgesetzt und nach Verschluss des Absaugschlauches (5) durch kräftige Druck- und Saugwirkung die Kapillare wieder durchgängig gemacht.

Unmittelbar nach der Blut-pH-Messung erfolgt eine Kontrollmessung mit dem Puffer von pH 6,97. Anschließend wird die Elektrode mit physiologischer Kochsalzlösung gespült und mit einer etwa 1 prozentigen Pepsinlösung in HCl N/10 gefüllt, wodurch abgelagertes Protein entfernt wird. Nach einigen Mi-

nuten wird die Elektrode mit NaCl oder Pufferlösung gespült und ist für die nächste Blut-pH-Messung wieder verwendbar, wobei für jeden Patient eine neue Polyäthylenkapillare eingesetzt wird.

Die beschriebene unzerbrechliche Elektrode ist im Handel noch nicht erhältlich. Eine Ganzglasausführung, ohne Druckausgleich und auswechselbare Spitze, wird von der Firma Metrohm AG, Herisau, und eine ebenfalls auf den beschriebenen Prinzipien aufgebaute Modifikation mit auswechselbarer Spitze von Radiometer, Kopenhagen, hergestellt.

#### 4. Zusammenfassung und Ausblick

Die Probleme, die sich beim Arbeiten im Ultramikromaßstab stellen, werden eingehend diskutiert, und es wird eine neue Grundausrüstung beschrieben, die ein leichtes, rasches und genaues Arbeiten mit Ausgangsvolumina von einigen Mikrolitern ( $\mu\text{l} = 0,001$  ml) gestattet. Die ganze Ausrüstung ist praktisch unzerbrechlich, da weitgehend Kunststoffe zur Anwendung gelangen. Das Reinigen der Geräte wird fast vollständig vermieden, indem die Pipetten und Küvetten ohne Zwischenreinigung verwendet werden können und das übrige Material, wie Reagensröhrchen, Zentrifugenröhrchen und Titrationsbecher, nach Gebrauch verworfen wird.

Da 20- bis 100mal weniger Reagenslösung benötigt wird als bei den bekannten Mikromethoden, werden die Methoden viel billiger und das Nachschubproblem ist stark vereinfacht.

Mit vollständig ungelerntem Personal lassen sich in kürzester Zeit ganz ausgezeichnete Resultate erzielen, da alle Volumenabmessungen automatisch erfolgen.

Aus diesen verschiedenen Gründen haben sowohl die vorgeschlagene Ausrüstung als auch die Methoden in klinisch-chemischen, biochemischen und Isotopenlaboratorien nicht nur in den USA und Europa großes Interesse gefunden, sondern ebensolches, oder noch stärkeres, in Afrika, im Nahen und Fernen Orient.

In verschiedenen Ländern sind gegenwärtig Entwicklungs- und Ausbildungszentren für Ultramikrochemie im Aufbau begriffen, wovon eines an der Genfer Universität, welches Ende dieses Jahres in Betrieb genommen werden soll.

Es ist anzunehmen, daß nach dem beschriebenen ersten Anfang die apparative Entwicklung im Ultramikrogebiet rasch weiterschreiten wird, wobei sich jetzt schon zwei Richtungen abzeichnen, nämlich zu noch wesentlich feineren Methoden mit dem Ziel der quantitativen Histochemie unter dem Mikroskop und in Richtung der Automation.

Literatur: M. C. SANZ: Ultramicromethods and Standardization of Equipment, *Clin. Chem.* 3 (1957) 406.