

СПЕКТРОФОТОМЕТРІЯ
И ЕЯ ПРИМѢНЕНІЕ
КЪ ОПРЕДѢЛЕНІЮ СОДЕРЖАНІЯ ГЕМОГЛОБИНА
ВЪ КРОВИ.

Проф. И. Щелкова.



ХАРЬКОВЪ.

Типографія М. Ф. Зильберберга, Рыбная ул., д. № 25-й.
1888.

Опредѣленіе количества гемоглобина въ крови представляетъ важное значеніе какъ для діагноза, нѣкоторыхъ патологическихъ состояній, такъ и для опредѣленія хода болѣзненного процесса — его ослабленія или усиленія; скорый, точный и не требующій особаго навыка способъ количественнаго опредѣленія гемоглобина является поэтому весьма желаннымъ для клинициста. Къ сожалѣнію извѣстные нынѣ способы, которые, по ихъ несложности, могли бы быть употребляемы при клиническомъ изслѣдованіи, далеко не удовлетворяютъ указаннымъ требованіямъ. Самый простой изъ нихъ, по вмѣстѣ съ тѣмъ едва ли не самый точный, способъ Гоппе-Зейлера, основанный на опредѣленіи степени разжиженія крови водою нужной для того, чтобы получить жидкость одинаковаго цвѣта съ заранѣе приготовленнымъ образцомъ. Онъ имѣетъ однако тотъ недостатокъ, что для приготовления образца необходимо имѣть чистый гемоглобинъ, что представляетъ большія затрудненія и, кромѣ того, приготовленный образецъ очень быстро портится. Правда, было предложено замѣнить образцовый растворъ гемоглобина весьма постояннымъ растворомъ пикрокармина, но получить такой растворъ вполне одинаковымъ по цвѣту съ растворомъ крови едва ли возможно.

Другіе способы, какъ наприм. Малассе и Ф. Флейшля, хотя весьма удобны, но результаты ихъ, особенно послѣдняго, не отличаются точностью; тоже слѣдуетъ сказать и о способѣ Прейера.

Въ послѣднее время фізіологія обогатилась новымъ методомъ опредѣленія гемоглобина значительно превосходящимъ всѣ донынѣ употреблявшіеся; методомъ чрезвычайно скорымъ, необыкновенно точнымъ и требующимъ самаго незначительнаго количества крови. Это методъ спектрофотометрическій. Такъ какъ ему несомнѣнно предстоитъ блестящая будущность, то полагаемъ, что нашимъ врачамъ будетъ не безинтересно ознакомиться съ нимъ.

Каждое прозрачное тѣло, плотное или жидкое, поглощаетъ нѣкоторую часть проходящаго чрезъ него свѣта; при этомъ поглощеніе или распредѣляется одинаково на всѣ цвѣтные лучи, входящіе въ составъ смѣшаннаго бѣлаго свѣта, или нѣкоторые изъ нихъ поглощаются въ относительно большемъ количествѣ; въ первомъ случаѣ тѣло представляется безцвѣтнымъ, во второмъ — окрашеннымъ. Большая часть жидкостей организма, съ которыми приходится имѣть дѣло врачу, представляетъ водные растворы, окрашенные въ извѣстный цвѣтъ въ слѣдствіе присутствія въ нихъ того или другаго красящаго вещества; такъ, цвѣтъ крови зависитъ отъ гемоглобина, цвѣтъ жолчи — отъ жолчныхъ пигментовъ и пр.

Поглощеніе свѣта въ такихъ растворахъ зависитъ главнымъ образомъ отъ присутствія пигмента и степень его опредѣляется, — съ одной стороны, содержаніемъ этого послѣдняго, а съ другой толщиной слоя жидкости, чрезъ который свѣтъ долженъ пройти. Такъ какъ поглощеніе свѣта производится частичками красящаго вещества, то оно должно быть пропорціонально количеству послѣднихъ; поэтому количество свѣта, проходящаго извѣстной толщины слой жидкости обратно пропорціонально количеству частичекъ красящаго вещества, то есть, концентраціи раствора.

Съ другой стороны, чѣмъ толще слой жидкости, тѣмъ большая часть свѣта будетъ ею задержана; если наприм. чрезъ какой либо слой жидкости проходитъ $\frac{1}{n}$ -ая часть падающаго на него свѣта, то черезъ слой въ m разъ толще пройдетъ только $\frac{1}{n^m}$ часть.

Такимъ образомъ между количествомъ свѣта, поглощаемымъ слоемъ жидкости опредѣленной толщины, и ея концентраціей существуетъ правильное постоянное отношеніе; однако, чтобы воспользоваться этимъ обстоятельствомъ для практическихъ цѣлей необходимо пріискать какую либо величину для измѣренія свѣтопоглощенія, общую для всѣхъ вообще случаевъ. По предложенію Бунзена и Роское такой величиной служить толщина слоя изслѣдуемой жидкости пропускающаго ровно $\frac{1}{10}$ -ую часть падающаго на него свѣта. Обратная величина такой толщины слоя носитъ названіе

коэффициента свѣтоослабленія; обыкновенно онъ обозначается греческою буквою E .

Изъ предъидущаго понятно, что толщина слоя, удовлетворяющаго выше изложенному требованію, должна находиться въ обратномъ отношеніи къ концентраціи; поэтому если обозначить черезъ c и c^1 концентраціи двухъ растворовъ, а черезъ $\frac{1}{E}$ и $\frac{1}{E^1}$ толщины слоевъ ихъ, пропускающихъ $\frac{1}{10}$ -ю долю падающаго свѣта, то получается

$$c : c^1 = \frac{1}{E^1} : \frac{1}{E} \text{ или } c : c^1 = E : E^1$$

то есть: 1-е, концентраціи растворовъ пропорціональны соотвѣствующимъ коэффициентамъ свѣтоослабленія и 2-е, отношеніе между концентраціей и соотвѣствующимъ коэффициентомъ свѣтоослабленія есть величина постоянная; дѣйствительно, изъ вышеприведеннаго слѣдуетъ

$$\frac{c}{E} = \frac{c^1}{E^1}.$$

Еслибы для какой либо концентраціи былъ опредѣленъ предварительными наблюденіями коэффициентъ свѣтоослабленія, то для опредѣленія концентраціи даннаго раствора достаточно было бы узнать соотвѣствующій ему коэффициентъ свѣтоослабленія. Въ самомъ дѣлѣ, изъ приведенныхъ выше выраженій слѣдуетъ:

$$c^1 = E^1 \frac{c}{E}.$$

Постоянное отношеніе $\frac{c}{E}$ названо Фирордтомъ относительнымъ свѣтопоглощеніемъ и обозначается обыкновенно буквою A ; понятно, что оно зависитъ отъ свойства тѣла ¹⁾.

¹⁾ Строго говоря A не есть постоянная величина, а измѣняется съ концентраціей такъ напримѣръ для гемоглобина она тѣмъ болѣе, чѣмъ концентрированнѣе растворъ. Для практическихъ примѣненій это впрочемъ не имѣетъ значенія, если только при анализѣ берется такое разжиженіе крови, которое соотвѣтствуетъ концентраціи гемоглобиноваго раствора, для которой опредѣлена постоянная A .

Изложенное получаетъ весьма важное практическое значеніе въ слѣдствіе того, что въ каждомъ отдѣльномъ случаѣ коэффициентъ свѣтоослабленія E можетъ быть вычисленъ, если будетъ опредѣлена доля свѣта, пропускаемаго слоемъ изслѣдуемаго тѣла известной толщины.

Назовемъ J количество свѣта, проходящаго слой жидкости, толщина котораго равна m и предположимъ, что слой этой жидкости толщиной въ единицу пропускаетъ $\frac{1}{n}$ -ю часть падающаго на него свѣта; въ такомъ случаѣ

$$J = \frac{1}{n^m}$$

отсюда

$$n^m = \frac{1}{J} \quad (1)$$

Логарифмирование этого выраженія даетъ

$$\begin{aligned} m \log n &= -\log J \\ \log n &= -\frac{\log J}{m} \quad (2) \end{aligned}$$

Согласно сказанному выше коэффициентъ свѣтоослабленія есть обратная величина слоя жидкости, пропускающаго $\frac{1}{10}$ -ю часть падающаго свѣта, то есть, если $m = \frac{1}{E}$, то $J = \frac{1}{10}$. Введя эти величины въ выраженіе (1) получимъ

$$n^{\frac{1}{E}} = 10$$

логарифмирование его даетъ

$$\begin{aligned} \frac{1}{E} \log n &= 1 \\ \log n &= E \end{aligned}$$

Подставивъ найденную для $\log n$ величину въ выраженіе (2) получаемъ

$$E = -\frac{\log J}{m}.$$

Такимъ образомъ коэффициентъ свѣтоослабленія равенъ отрицательному логарифму силы свѣта, прошедшаго испытуюмую жидкость, раздѣленному на толщину ея слоя. Если послѣдній равенъ единицѣ, наприм. одному сантиметру, то выраженіе еще болѣе упрощается, такъ какъ означенный коэффициентъ становится прямо равнымъ отрицательному логарифму силы прошедшаго свѣта.

Для примѣненія къ дѣлу этого метода, надо только приискать способъ удобно и точно опредѣлять количество свѣта, проходящаго чрезъ испытующее тѣло. Указаніемъ такого способа наука обязана впервые извѣстному физиологу Фирордту, которому и вообще принадлежитъ честь открытія и разработки этого метода количественнаго анализа.

Большинство тѣлъ, изслѣдуемыхъ по отношенію къ ихъ свѣтопоглощенію, тѣла окрашенныя, слѣдовательно неодинаково поглощающія лучи свѣта различной преломляемости; поэтому Фирордтъ предложилъ опредѣлять свѣтопоглощеніе ихъ не для смѣшаннаго бѣлаго свѣта, а для одного изъ спектральныхъ цвѣтовъ и притомъ того именно, для котораго оно наиболѣе значительно. Цѣль этого предложенія понятна; въ томъ простомъ цвѣтѣ, въ которомъ поглощеніе всего сильнѣе, оно можетъ быть легче и точнѣе опредѣлено, чѣмъ въ свѣтѣ смѣшанномъ.

Устроенный Фирордтомъ аппаратъ состоитъ изъ спектроскопа прямого зрѣнія (*à vision directe*), щель котораго раздѣлена на двѣ половины—верхнюю и нижнюю; каждая можетъ расширяться и суживаться независимо отъ другой помощью микрометрическаго винта точно указывающаго ширину щели. Передъ щелью ставится сосудъ съ параллельными стеклянными стѣнками, содержащій изслѣдуемую жидкость; толщина слоя (разстоянія параллельныхъ стѣнокъ) составляетъ обыкновенно 1 сантиметръ. Устанавливается

сосудъ такъ, чтобы свѣтъ, прошедшій черезъ жидкость, попалъ въ одну половину щели, а въ другую проходилъ свѣтъ, не подвергнувшійся поглощенію въ жидкости. Такимъ образомъ наблюдатель видитъ въ полѣ зрѣнія аппарата, одинъ надъ другимъ, два спектра одинъ, измѣненный поглощеніемъ въ жидкости, другой—нормальный. Для сравненія избираются, какъ выше упомянуто, тѣ части спектра, въ которыхъ поглощеніе всего явственнѣе, остальные же части закрываются. Для этого въ окулярѣ имѣется непрозрачная діафрагма, состоящая изъ двухъ пластинокъ, края которыхъ соприкасаются въ серединѣ поля зрѣнія; пластинки могутъ быть раздвинуты на большее или меньшее разстояніе и такимъ образомъ выдѣляютъ изъ спектра болѣе или менѣе широкую полосу одна половина которой образуется свѣтомъ обыкновеннымъ, а другая—измѣненнымъ вслѣдствіе поглощенія. Понятно, что вторая половина будетъ менѣе свѣтла; чтобы уравнять ихъ свѣтлость надо или расширить часть щели, чрезъ которую проходитъ свѣтъ поглощенный или сѣзуть ту, которая пропускаетъ нормальный. Во всякомъ случаѣ отношеніе ширины обѣихъ половинокъ щели укажетъ на какую часть своей начальной интензивности уменьшился свѣтъ отъ поглощенія въ изслѣдуемой жидкости.

Другой спектрофотометръ устроенъ профессоромъ Гюфнеромъ и по моему мнѣнію заслуживаетъ предпочтенія. Онъ состоитъ также изъ спектроскопа прямого зрѣнія, снабженнаго въ окулярѣ раздвижной діафрагмой для выдѣленія изъ спектра полосы желаемой ширины; существенное отличіе его состоитъ въ способѣ, которымъ достигается уравниеніе свѣтлости обѣихъ половинокъ свѣтлой полосы. Гюфнеръ воспользовался для этого измѣненіемъ силы поляризованнаго свѣта при прохожденіи черезъ Николеву призму. Извѣстно, что она зависитъ отъ угла, который плоскость поляризаціи поляризованнаго луча свѣта образуетъ съ плоскостью поляризаціи Николевой призмы; при углѣ равномъ нулю свѣтъ проходитъ полностью; при увеличеніи угла онъ ослабляется и при углѣ въ 90^0 совершенно исчезаетъ. По изслѣдованіямъ Малуса интензивность свѣта измѣняется при этомъ пропорціонально квадрату косинуса упомянутаго угла. Предположивъ, что этотъ уголъ

равенъ α , что сила, падающаго на Николеву призму (поляризованнаго), свѣта равна единицѣ, а сила прошедшаго черезъ нее J , получимъ:

$$J = \cos^2 \alpha$$

Какъ мы видѣли выше коэффициентъ свѣтоослабленія $E = -\log J$; подставивъ вмѣсто J то, чему оно равно, получимъ

$$E = -2 \log \cos. \alpha.$$

Чтобы воспользоваться этимъ принципомъ, Гюфнеръ ввелъ въ спектроскопъ двѣ Николевы призмы, одна, передняя, неподвижная, поляризуетъ свѣтъ; другая, вращающаяся вокругъ оси, пропускаетъ большую или меньшую долю его, смотря по углу подъ которымъ она установлена.

Расположеніе этихъ призмъ можно видѣть на приложенномъ рисункѣ: передняя, небольшая, a , установлена въ мѣдной трубкѣ передъ щелью спектроскопа, e , и соответствуетъ ея нижней половинѣ; прошедшій черезъ нее, поляризованный свѣтъ встрѣчаетъ стеклянное тѣло, c , плоскости котораго шлифованы такъ, что лучи свѣта, падающіе на его нижнюю половину, попадаютъ въ верхнюю половину щели спектроскопа и наоборотъ, лучи обыкновеннаго свѣта, проходящіе черезъ верхнюю часть его, направляются въ нижнюю часть щели. Границу между этими двумя родами лучей свѣта составляетъ горизонтальное ребро, представляющееся въ полѣ зрѣнія спектроскопа въ видѣ очень тонкой горизонтальной линіи, дѣлящей спектръ на верхнюю и нижнюю половины. Такъ какъ діоптрическій аппаратъ спектроскопа извращаетъ образъ щели, то нижняя часть видимаго наблюдателемъ спектра образуется поляризованнымъ, а верхняя—обыкновеннымъ свѣтомъ. Вслѣдствіе нѣкотораго ослабленія свѣта Николевой призмой, нижняя половина спектра или выдѣленной изъ него полосы должна быть нѣсколько темнѣе верхней; для выравниванія ихъ служить стеклянная пластинка b , установленная предъ верхней половиной щели и состоящая изъ двухъ склеенныхъ, клиновидно отшлифованныхъ половинокъ, одна изъ простаго, другая изъ дымчатаго

стекла. Помощью зубчатки пластинка устанавливается такъ, что свѣтъ, проходитъ большую или меньшую толщину дымчатого стекла и ослабляется на столько, чтобы обѣ половинки полоски были одинаковой свѣтлости.

При *A*, между щелью и телескопомъ, въ средней части трубки спектроскопа, вращающейся на оси и снабженной на переднемъ концѣ кругомъ, дѣленнымъ на градусы, *BC*, помѣщается, непосредственно за чечевицей, дающей образъ щели, *d*, большая Николева призма, *N*; далѣе между нею и объективомъ телескопа находится система призмъ, *SS*, обыкновенныхъ въ спектроскопахъ прямого зрѣнія. Помощью рукоятокъ, находящихся съ обѣихъ сторонъ круга *BC*, онъ вмѣстѣ съ Николевой призмой можетъ быть поворачиваемъ вокругъ оси, при чемъ уголъ вращенія указывается нониусами, находящимися по обѣимъ сторонамъ круга (ф. 2-я). Весь свѣтъ, попадающій въ щель аппарата, проходитъ чрезъ большую Николеву призму, положеніе которой не имѣетъ вліянія на интенсивность обыкновеннаго свѣта, тогда какъ поляризованный ослабляется болѣе или менѣе въ зависимости отъ угла, образуемаго плоскостями поляризаций обѣихъ Николевыхъ призмъ. Призмы устанавливаются такъ, чтобы ихъ плоскости поляризации совпадали, когда нуль круга совпадаетъ съ нулемъ нониуса.

Такимъ образомъ, если половина наблюдаемой полоски, образуемая обыкновеннымъ свѣтомъ, будетъ представляться темнѣе вслѣдствіе поглощенія свѣта какой либо цвѣтной жидкостью, подвергаемой изслѣдованію, то вращеніемъ описанной призмы можно ослабить свѣтлость другой половины полоски на столько, чтобы она сравнялась съ первой; уголъ, на который поворочена при этомъ призма, даетъ точную мѣру ослабленія свѣта, а слѣдовательно дѣлаетъ возможнымъ опредѣлить величину поглощенія его въ испытуемой жидкости. Какъ и въ аппаратѣ Фирордта, наблюдение совершается надъ болѣе или менѣе узкой полоской, соответствующей точно опредѣленной части спектра. Для изолированія ея служитъ діафрагма (ф. 1-я *ik*), помѣщаемая въ окулярѣ и состоящая изъ двухъ половинокъ, края которыхъ соприкасаются въ вертикальной линіи, лежащей въ серединѣ поля зрѣнія

окуляра; это положеніе обѣихъ половинокъ діафрагмы отмѣчено нулемъ дѣленія, находящагося на краю каждой изъ нихъ и дозволяющаго всегда знать ширину щели, образуемой ихъ краями, обращенными одинъ къ другому.

Установка щели на ту или другую часть спектра дѣлается иначе, чѣмъ въ аппаратѣ Фирордта и гораздо удобнѣе. Съ передней подвижной, какъ обыкновенно, частью трубки спектроскопа, соединенъ указатель f ,двигающійся по горизонтальной дугѣ, g , снабженной дѣленіями, находящейся подъ окуляромъ ¹⁾. Установивъ край одной половинки діафрагмы на серединѣ поля зрѣнія (на нуль дѣленія) и наводя его послѣдовательно на главные фраунгоферовы линіи спектра, можно замѣтить положеніе указателя на нижней дугѣ, соотвѣтствующее каждой изъ означенныхъ линій. вмѣстѣ съ тѣмъ опредѣлится и разстояніе между фраунгоферовыми линіями, выраженное въ дѣленіяхъ этой дуги. Если затѣмъ опредѣлить отношеніе дѣленій діафрагмъ къ дѣленіямъ дуги, то мы будемъ имѣть возможность раздвинуть щель на столько, чтобы изолировать точно опредѣленную по ширинѣ и положенію часть спектра. Возможность такого точнаго ориентированія въ спектрѣ имѣетъ чрезвычайно важное значеніе: для многихъ веществъ поглощеніе свѣта ограничивается преимущественно нѣкоторыми, иногда очень узкими и рѣзко ограниченными мѣстами спектра; примѣромъ можетъ служить оксигемоглобинъ, особенно его первая полоса. Понятно, что въ такихъ случаяхъ даже небольшая погрѣшность въ установкѣ аппарата можетъ весьма сильно повліять на результатъ наблюденія.

Такъ какъ для точности изслѣдованій выгодно, чтобы явленія поглощенія проявлялись возможно явственно, то для каждого вещества берется та часть спектра, въ которой всего сильнѣе производимое имъ поглощеніе. При изслѣдованіи гемоглобина берутъ поэтому тѣ части, которыя соотвѣтствуютъ двумъ полосамъ поглощенія оксигемоглобина, а именно: для первой отъ $D_{32}E$ до $D_{53}E$, а для второй $D_{63}E - D_{84}E$. Чтобы установка была всегда одинакова слѣдуетъ только замѣтить, разъ навсегда, для каждого

¹⁾ Дуга и указатель показаны отдѣльно на фиг. 3-й.

изъ этихъ мѣстъ, положеніе указателя и ширину щели. Такъ для спектрофотометра харьковскаго физиологическаго кабинета указатель долженъ быть установленъ для первой полосы на дѣленіи 47, 9, а для второй на 51, 3, при ширинѣ щели (окулярной) въ 0, 6 мм. ¹⁾.

Исследуемая жидкость наливается въ стеклянный сосудъ съ параллельными стѣнками, разстояніе между которыми равно одному сантиметру. Сосудъ устанавливается такъ, чтобы на половину щели падалъ свѣтъ прошедшій жидкость, а на другую — не подвергшійся ея вліянію. Въ настоящее время употребляются впрочемъ сосуды инаго устройства, придуманные Шульцомъ: стеклянная рамка въ видѣ буквы П отшлифована такъ, что толщина ея равна 11 миллиметрамъ; поэтому, когда на нее, съ обѣихъ сторонъ, будутъ наложены шлифованныя стекляныя пластинки, то между ними образуется пространство въ 11 милл. шириной. Вънутрь сосуда вкладывается стеклянный параллелипипедъ, занимающій половину его высоты, шириною же ровно въ 10 милл.; стороны его, обращенныя къ стекляннымъ пластинкамъ, отполированы. Если такой сосудъ наполненъ жидкостью, то получается два слоя ея, верхній, толщиной въ 11 миллиметровъ и нижній — въ 1 миллиметръ; разница свѣтопоглощенія этихъ двухъ слоевъ соответствуетъ дѣйствию слоя жидкости въ 10 миллиметровъ.

Обыкновенно употребляется слой толщиной въ 1 сантиметръ, въ нѣкоторыхъ однако случаяхъ берутъ слой на половину тоньше, въ $\frac{1}{2}$ сантиметра; въ этомъ случаѣ сосudeцъ имѣетъ толщину рамки въ 6 милл., а параллелипипеда въ 5 милл.

Что касается освѣщенія, то всего удобнѣе употреблять керосиновую лампу съ круглымъ фитилемъ, дающую свѣтлое и высокое пламя. Поверхъ стекла, вмѣсто колпака или шара, устанавли-

¹⁾ Чтобы точно опредѣлить положеніе какого либо мѣста спектра, предполагаютъ, что разстояніе между сосѣдними фраунгоферовыми линіями раздѣлено на 100 частей и указываютъ какимъ изъ этихъ дѣленій соответствуетъ данное мѣсто. Такимъ образомъ выраженіе $D_{32}E - D_{53}E$ значитъ, что это мѣсто лежитъ между линіями D и E ; начинается съ 32-го и простирается до 53-го дѣленія, а каждое дѣленіе равно $\frac{1}{100}$ всего разстоянія между D и E .

ливается непрозрачный цилиндръ изъ желѣза или, какъ теперь дѣлаютъ изъ фарфора, покрытаго снаружи чернымъ асфальтовымъ лакомъ (его дѣлаютъ изъ фарфорового цилиндра, употребляемаго для гальваническихъ элементовъ). Въ стѣнку этаго цилиндра, на высотѣ пламени лампы, вдѣлана металлическая трубка, на концѣ которой вставлено двояко выпуклое стекло, въ фокусъ котораго должно находиться пламя. Вслѣдствіе этого лучи выходятъ изъ стекла параллельными и все отверстіе его представляется ярко и равномерно освѣщеннымъ; на него и направляется спектроскопъ. Передняя щель его должна быть сѣужена на столько, чтобы получался достаточно ясный и свѣтлый спектръ; опытъ показалъ, что при указанномъ освѣщеніи ширина щели должна быть около 0,2 миллиметра. Установка щели производится помощью микрометрическихъ винтовъ, головки которыхъ снабжены дѣленіями.

Познакомившись со способомъ спектро-фотометрическаго изслѣдованія вообще, обратимся къ специально интересующему насъ вопросу — къ изслѣдованію крови.

Такъ какъ кровь въ натуральномъ видѣ совершенно непрозрачна, то ее необходимо развести; съ этой цѣлью она смѣшивается съ дистиллированной водою или, что лучше, съ слабымъ (0,1%) растворомъ углекислаго натра, который легче и лучше растворяетъ кровяныя тѣла и даетъ болѣе прозрачный растворъ. Степень разбавленія крови зависитъ, конечно, отъ содержанія въ ней гемоглобина, вообще же можно сказать, что при толщинѣ слоя въ 10 миллим. растворъ долженъ содержать отъ 0,8 до 1,5% крови; при употребленіи сосуда съ слоемъ въ 5 миллим., растворъ долженъ быть вдвое концентрированнѣе.

Изслѣдованіе такихъ слабыхъ растворовъ крови имѣетъ неудобство, что при окончательномъ вычисленіи процентнаго содержанія гемоглобина въ крови, приходится найденное наблюденіемъ число умножать на значительную цифру тѣмъ болшую, чѣмъ болѣе разбавлена кровь; при этомъ умножаются конечно и ошибки. Поэтому при приготовленіи кровянаго раствора надо соблюдать возможно боль-

шую точность. Если дано достаточное количество крови, то приготовление требуемой смѣси, при должномъ вниманіи, не представляетъ затрудненій, надо только имѣть въ виду, что употребляемые пипеты и бюреты должны быть напередъ вывѣрены, такъ какъ находящіеся въ продажѣ рѣдко бываютъ совершенно вѣрны. Больше затрудненій представляетъ изслѣдованіе крови живыхъ людей; здѣсь приходится ограничиваться очень небольшимъ количествомъ крови, одной каплей и чтобы, не смотря на то, приготовить точно опредѣленную смѣсь, необходимы особые приемы. Всего лучше было бы воспользоваться смѣсителемъ Потена, употребляемымъ при разбавленіи крови для счета тѣлецъ и при опредѣленіи гемоглобина по способу Малассе; къ сожалѣнію смѣсители этихъ аппаратовъ слишкомъ малы. Проще всего сдѣлать себѣ двѣ пипетки изъ стеклянныхъ трубочекъ; одна изъ нихъ, очень маленькая, должна вмѣщать около капли крови ¹⁾; другая, большая, около 1¹/₂ куб. сантим. Вмѣстимость пипетокъ опредѣляется повтореннымъ нѣсколько разъ взвѣшиваніемъ ртути, нужной для ихъ наполненія. Капли крови полученной изъ укола пальца или ладони, достаточно, чтобы наполнить маленькую пипетку, которая затѣмъ выпораживается въ небольшой сосудъ, куда предварительно отмѣренъ помощью большой пипетки растворъ углекислаго натра въ 0,1⁰/₀. Чтобы кровь не оставалась въ пипеткѣ, растворъ втягивается въ нее 2—3 раза и такимъ образомъ кровь смывается съ ея стѣнокъ и равномерно перемѣшивается съ разжижающею жидкостью. Приготовленнаго такимъ способомъ раствора крови совершенно достаточно для наполненія меньшаго Шultzовскаго сосуда, доставляющаго слой въ 5 миллим. ²⁾.

Наполненный сосудъ ставится передъ щелью спектрофотометра, а передъ нимъ, на разстояніи около 10 сантиметровъ, лампа.

¹⁾ Наименьшая изъ моихъ пипетокъ имѣла вмѣстимость въ 0,0275 куб. сантим., наибольшая въ 0,0556 куб. сантим.; объемъ капли крови составляетъ отъ 0,03 до 0,07 к. сантим.

²⁾ При дѣланіи укола не слѣдуетъ быть слишкомъ боязливымъ; уколъ или разрѣзъ долженъ быть такой глубины, чтобы свободно выступило достаточное количество крови. При слишкомъ маломъ уколѣ приходится выдавливать кровь, а это не только отнимаетъ время, но и ведетъ опасность измѣненія состава крови примѣсью къ ней паренхиматозной жидкости.

Хотя небольшія измѣненія разстоянія лампы отъ щели, при достаточномъ освѣщеніи, не имѣютъ особеннаго вліянія на результаты наблюденія; однако, для устраненія по возможности условій, могущихъ вліять на точность изслѣдованія, слѣдуетъ стараться, чтобы это разстояніе не измѣнялось. Само собой понятно, что лампа должна быть всегда въ порядкѣ, такъ какъ отъ этого очень много зависитъ сила доставляемаго ею свѣта.

Затѣмъ слѣдуетъ самое наблюденіе. Имѣемъ ли мы дѣло съ спектрофотометромъ Фирордта или Гюфнера, во всякомъ случаѣ прежде всего должна быть установлена передняя трубка спектроскопа и окулярная діафрагма такъ, чтобы въ полѣ зрѣнія видѣлась только та часть спектра, которая подвергается наблюденію. Выше было указано, что для опредѣленія гемоглобина изслѣдуются два мѣста спектра: положеніе перваго, соответствующаго первой полосѣ оксигемоглобина, — $D_{32}E - D_{53}E$, а втораго, отвѣчающаго второй полосѣ, $D_{63}E - D_{84}E$. Какимъ образомъ производится эта установка въ аппаратѣ Гюфнера, упомянуто выше; въ аппаратѣ же Фирордта для этого служить обыкновенная скала, отношеніе которой къ спектру опредѣлено предварительнымъ наблюденіемъ.

Когда эта установка сдѣлана и спектроскопъ будетъ направленъ на свѣтъ, то при одинаковой ширинѣ обѣихъ половинокъ щели въ аппаратѣ Фирордта въ полѣ зрѣнія будетъ видѣться цѣльная вертикальная полоска одинаковаго зеленовато-желтаго или зеленого цвѣта, смотря по тому, на какое изъ вышеуказанныхъ мѣстъ спектра направленъ аппаратъ. Въ аппаратѣ Гюфнера видимая вертикальная полоска раздѣлена на двѣ половины, верхнюю и нижнюю, тонкой поперечной линіей; одна изъ нихъ, верхняя, образуется обыкновеннымъ свѣтомъ, другая, нижняя, поляризованнымъ. Такъ какъ Николева призма задерживаетъ нѣкоторую часть падающаго на нее свѣта, то нижняя половина полоски нѣсколько темнѣе верхней; необходимо поэтому, уравнивать ихъ свѣтлость при помощи пластинки дымчатаго стекла, о которой было сказано выше. Надо, кромѣ того, провѣрить, правильно ли установлена передняя Николева призма, то есть со-

впадаетъ ли плоскость поляризаціи ея съ плоскостью поляризаціи большой вращающейся призмы, когда ноніусъ круга указываетъ нуль дѣленій. Правильность установки удостовѣряется тѣмъ, что повороту круга на извѣстный уголъ въ ту и другую сторону соотвѣтствуетъ одинаковая степень ослабленія свѣтлости нижней половины полосы. Если этого нѣтъ и для одинаковаго затемнѣнія надо повернуть кругъ въ одну сторону на больший уголъ, чѣмъ въ другую, то это указываетъ на неправильность установки передней призмы, для устраненія которой ее слѣдуетъ нѣсколько повернуть въ противоположную сторону. Впрочемъ, если разница не велика, то предпочтительнѣе не трогать призмы, а дѣлать каждый разъ двойное отчитываніе, поворачивая кругъ въ ту и въ другую сторону; среднее изъ обоихъ наблюденій будетъ свободно отъ ошибки, зависящей отъ указанной неправильности положенія передней призмы.

Когда между лампой и щелью спектроסקопа установленъ сосудъ съ растворомъ крови, то одна половина полосы становится темнѣе другой и наблюдатель долженъ сдѣлать ихъ снова одинаковой свѣтлости. Въ аппаратѣ Фирордта для этого суживается половина щели, черезъ которую проходитъ обыкновенный свѣтъ или, при употребленіи сосудовъ Шульца, та которая соотвѣтствуетъ болѣе тонкому слою кровянаго раствора; отношеніе ширины щели, при которой это наступитъ, къ первоначальной покажетъ какая доля свѣта проходитъ черезъ растворъ крови. Бываютъ однако случаи, когда однимъ суженіемъ щели нельзя достигнуть одинаковой свѣтлости половинокъ; тогда Фирордтъ ставитъ передъ половиной щели, соотвѣтствующей болѣе свѣтлой части полосы, пластинку дымчатаго стекла, свѣтопоглощеніе которой предварительно опредѣлено. Такимъ образомъ опредѣляется количество свѣта J , пропускаемое изслѣдуемымъ растворомъ, а слѣдовательно и его коэффициентъ свѣтоослабленія E , такъ какъ послѣдній выражается отрицательнымъ логарифмомъ этого количества.

Въ аппаратѣ Гюфнера уравниваніе свѣтлости обѣихъ половинокъ достигается вращеніемъ извѣстнаго намъ круга; по мѣрѣ того какъ увеличивается уголъ, на который онъ повероченъ, ниж-

ная половина полосы становится все темнѣе, пока не сравняется съ верхнею. Для возможно точнаго опредѣленія угла слѣдуетъ, какъ уже сказано выше, опредѣлять его поворотомъ круга въ обѣ стороны и, кромѣ того, повторить такое опредѣленіе два, три раза. Вся операція требуетъ такъ мало времени, что повтореніе ея не можетъ затруднить изслѣдователя, а между тѣмъ этимъ избѣгаются возможные случайныя погрѣшности и найденная средняя величина получаетъ большую вѣроятность.

Указанное опредѣленіе дѣлается послѣдовательно для обѣихъ полюсовъ оксигемоглобина, устанавливая указатель на соотвѣтствующія мѣста нижней дуги. Найденные при этомъ углы даютъ возможность вычислить для обоихъ мѣстъ величину коэффициента свѣтоослабленія E , такъ какъ она равна отрицательному удвоенному логарифму косинуса найденнаго угла.

Величина E измѣняется прямо пропорціонально концентраціи раствора; по этому, если требуется только сравнительное опредѣленіе гемоглобина въ крови, то достаточно знать эту величину для крови здороваго человѣка и крови изслѣдуемой. Иное дѣло, если требуется опредѣлить числовую величину для процентнаго содержанія гемоглобина въ данной крови; въ этомъ случаѣ надо знать, для обоихъ мѣстъ спектра, числовую величину отношенія $\frac{C}{E}$, которую мы называли выше буквою A . Опредѣленіе этихъ постоянныхъ представляетъ своеобразныя трудности, вслѣдствіе быстрой разлагаемости растворовъ гемоглобина, вызывающей необходимость особыхъ приѣмовъ для точнаго опредѣленія ихъ концентраціи ¹⁾.

Опредѣленіе постоянныхъ должно быть сдѣлано особо для каждаго инструмента, такъ какъ каждый изъ нихъ, по крайней мѣрѣ изъ спектрофотометровъ Гюфнера, имѣетъ свои особыя постоянныя. Не входя въ подробности самаго опредѣленія, такъ какъ во всякомъ случаѣ оно можетъ быть сдѣлано только въ лабораторіи, укажу для желающихъ познакомиться съ нимъ на статьи

¹⁾ Концентраціей раствора, C , называютъ въ этомъ случаѣ, по примѣру Фирордта, содержаніе гемоглобина въ граммахъ, приходящееся на одинъ кубич. сантиметръ раствора.

Гюфнера ¹⁾, Отто ²⁾ и Ф. Нордена ³⁾. Впрочемъ, если имѣется возможность сравнить инструментъ съ другимъ, постоянныя величины котораго уже опредѣлены, то можно избѣжать сложную и длинную процедуру, связанную съ самостоятельнымъ опредѣленіемъ постоянныхъ.

Чтобы дать понятіе о томъ, какъ велики разницы постоянныхъ у отдѣльныхъ спектрофотометровъ Гюфнера, приведу слѣдующіе примѣры: по опредѣленію Гюфнера, они для его аппарата имѣютъ величины: $A = 0,001330$ и $A^1 = 0,001000$ ⁴⁾; для аппарата, съ которымъ работалъ Отто, онѣ: $A = 0,001880$ и $A^1 = 0,001403$; наконецъ для аппарата, принадлежащаго физиологическому кабинету Харьковскаго университета тѣже величины равны: $A = 0,001504$ и $A^1 = 0,001125$. Что такія разницы не зависятъ отъ случайныхъ ошибокъ, видно изъ того, что, не смотря на измѣняющіяся величины для A и A^1 , отношеніе между ними остается одно и тоже; для чиселъ Гюфнера оно 1.330, для Отто—1.340, а для моихъ 1.336.

Понятно, что для опредѣленія, сколько именно содержится гемоглобина въ данной крови, необходимо знать постоянныя того аппарата, которымъ производится изслѣдованіе, иначе можно получить число, далеко отходящее отъ истиннаго. Такъ если бы, принявъ въ основаніе постоянныя Гюфнера, мы нашли въ крови 10% гемоглобина, то при постоянныхъ Отто мы бы получили 14%, а при постоянныхъ харьковскаго аппарата 13%.

Изъ вышесказаннаго видно, что при каждомъ изслѣдованіи крови помощію спектрофотометра получаютъ коэффициенты свѣтослабленія для обоихъ изслѣдуемыхъ мѣстъ спектра; затѣмъ при помощи соотвѣтствующей постоянной опредѣляется содержаніе гемоглобина. Такимъ образомъ одновременно ведется два анализа крови, контролирующіе одинъ другой, что составляетъ большое достоинство этого метода. При тщательномъ выполненіи разница обѣ-

¹⁾ Zeitschr. f. physiol. Chemie I Bd. S. 320.

²⁾ Archiv f. d. ges. Physiologie. Bd. XXXVI. S. 243.

³⁾ Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. IV. S. 8.

⁴⁾ Буквою A означаетъ постоянная для первой, буквою A^1 —для второй полосы оксигемоглобина.

ихъ полученныхъ чиселъ для процентнаго содержанія гемоглобина не должна превышать полупроцента, обыкновенно же она составляетъ одну или двѣ десятыя процента.

Въ крови гемоглобинъ находится частью въ соединеніи съ кислородомъ, какъ оксигемоглобинъ, частью въ разкисленномъ состояніи; количество того и другого не одинаково, смотря по роду крови. Обыкновенно употребляемые способы опредѣленія гемоглобина не могутъ указать относительнаго количества того и другого вида его; спектрофотометрія однако и въ этомъ случаѣ превосходить всѣ иные методы изслѣдованія. Если извѣстны постоянныя величины не только для оксигемоглобина [A^0 и A_1^0], но и для гемоглобина несодержащаго кислорода [A^r и A_1^r], то достаточно опредѣлить коэффициенты свѣтоослабленія кровяного раствора обыкновеннымъ способомъ, чтобы узнать содержаніе въ немъ какъ чистаго гемоглобина, такъ и кислороднаго его соединенія.

Положимъ, что найденные коэффициенты свѣтоослабленія будутъ E и E' ; такъ какъ кровь содержитъ оба вида гемоглобина, то каждый изъ нихъ будетъ принимать участіе въ поглощеніи свѣта; назовемъ E^0 и E_1^0 коэффициенты свѣтоослабленія оксигемоглобина, а E^r и E_1^r — разкисленнаго гемоглобина; получимъ

$$E = E^0 + E^r \quad \text{и} \quad E_1 = E_1^0 + E_1^r$$

припомнимъ, что $E = \frac{c}{A}$ и подставивъ вмѣсто величинъ E то, чему онѣ равны получимъ

$$E = \frac{c^r}{A^r} + \frac{c^0}{A^0} \quad \text{и} \quad E_1 = \frac{c^0}{A_1^0} + \frac{c^r}{A_1^r}$$

буквы c^0 и c^r означаютъ содержаніе въ крови оксигемоглобина и разкисленнаго гемоглобина.

Опредѣливъ c^r изъ втораго уравненія и вставивъ найденную величину въ первое, получимъ

$$c^0 = \frac{A^0 A_1^0 [E A^r + E_1 A_1^r]}{A_1^0 A^r - A^0 A_1^r}$$

подобнымъ же образомъ опредѣлится

$$c^r = \frac{A^r A_1^r [E_1 A_1^0 - E A^0]}{A_1^0 A^r - A^0 A_1^r}$$

Понятно, что такого рода изслѣдованіе требуетъ особыхъ предосторожностей, устраняющихъ возожность соприкосновенія изслѣдуемой крови съ воздухомъ.

Въ заключеніе приведу нѣсколько наблюденій надъ содержаніемъ гемоглобина въ крови здоровыхъ и больныхъ субъектовъ, сдѣланныхъ мною въ прошедшемъ академическомъ году. Въ нижеслѣдующей таблицѣ подѣ буквами α и β стоятъ цифры, полученные на основаніи наблюденій въ первомъ и во второмъ мѣстѣ спектра. Онѣ приводятся для того, чтобы читатель могъ судить о степени точности результатовъ доставляемыхъ этимъ методомъ.

	α	β	Среднее.
	Въ процентахъ.		
1. Студентъ Г. 23 лѣтъ	17,9	17,7	17,8
2. " В. 22 "	15,0	14,7	14,85
3. " Св. 23 "	16,0	15,8	15,9
4. " С. 21 "	16,8	16,6	16,7
5. Лекаръ Прот. 29 лѣтъ	15,1	14,7	14,9
6. Профессоръ К: 33 лѣтъ	16,8	16,7	16,75
7. " А. Д.	12,8	12,7	12,75
8. " Щ. 55 лѣтъ	14,9	15,0	14,95
9. К., больной изъ терап. госп. клин.	18,8	17,4	18,1
10. К., тоже. 54 л., anaemia post haemorrh ex intestino recto	11,2	11,2	11,2
11. Дм., больной изъ фак. терап. клиники, 18 лѣтъ, anaemia ex malaria	5,8	5,9	5,85
12. Ал., больной изъ той же клиники, 24 лѣтъ, catarrh. ventriculi	11,8	11,5	11,65
13. Вовч., тоже, 29 лѣтъ, insuff. valv. mitral. et anaemia secundaria post haemorrhagiam	8,2	7,7	7,95
14. Бѣл., больной изъ фак. хирургич. клиники, 19 лѣтъ, hypertrophia lienis et leukaemia	10,5	9,9	10,2
15. Цех., больной изъ терап. факульт. клиники, 32 лѣтъ, cirrhosis hepatis atrophica	14,0	14,0	14,0

