

Copyright ©

Es gilt deutsches Urheberrecht.

Die Schrift darf zum eigenen Gebrauch kostenfrei heruntergeladen, konsumiert, gespeichert oder ausgedruckt, aber nicht im Internet bereitgestellt oder an Außenstehende weitergegeben werden ohne die schriftliche Einwilligung des Urheberrechtinhabers. Es ist nicht gestattet, Kopien oder gedruckte Fassungen der freien Onlineversion zu veräußern.

German copyright law applies.

The work or content may be downloaded, consumed, stored or printed for your own use but it may not be distributed via the internet or passed on to external parties without the formal permission of the copyright holders. It is prohibited to take money for copies or printed versions of the free online version.

Die Sauerstoffbestimmung in See- und Süßwasser mit Hilfe der Quecksilbertropfelektrode und ihre Anwendung bei physiologischen Untersuchungen¹⁾

VON HANS-WERNER ROTTHAUWE

Einleitung

Im Jahre 1888 entwickelte WINKLER eine chemische Methode zur quantitativen Bestimmung des im Wasser physikalisch gelösten Sauerstoffs. Dieses Verfahren bewährte sich bei hydrochemischer Feldarbeit und physiologischen Laboruntersuchungen. Die ursprünglich für die Analyse größerer Wassermengen (100 bis 250 ccm) geschaffene Methode wurde später auch für kleinere Volumina modifiziert. Zwar ließ sich gleichzeitig mit der Herabsetzung des Volumens auch die für die Durchführung einer Analyse benötigte Zeit vermindern, für einen ökonomischen Serienbetrieb bei physiologischen Atmungsuntersuchungen blieb auch die KROGHsche Spritzpipettenmethode noch verbesserungsbedürftig. Manometrischen und volumetrischen Mikromethoden, wie sie vor allem bei Blutgasbestimmungen mit Vorteil verwendet werden, haften ähnliche Mängel an.

Einen ganz anderen Weg beschreitet die polarographische Sauerstoffbestimmung. Hier handelt es sich um ein elektrochemisches Verfahren, das die Reduktion des Sauerstoffs an einer tropfenden Quecksilberelektrode zur quantitativen Bestimmung ausnutzt. Bislang befaßten sich nur GIGUERE und LAUCIER (1945) in einer kurzen Untersuchung mit der quantitativen polarographischen Sauerstoffbestimmung in Seewasser. Ziel der vorliegenden Arbeit war daher, die Grundlagen der Sauerstoffbestimmung auf polarographischem Wege in See- und Süßwasser näher zu untersuchen. Vor allem war die Abhängigkeit dieses Verfahrens von verschiedenen physikalischen Faktoren zu klären, wie sie bei physiologischen Untersuchungen u. U. von Bedeutung sein können. Außerdem wurde versucht, die Bestimmung zu vereinfachen und die für die Durchführung einer Analyse benötigte Zeit zu verringern. Schließlich wurde die Brauchbarkeit der Methode für physiologische Untersuchungen an Hand verschiedener Versuchsanordnungen geprüft.

Grundlagen der polarographischen Sauerstoffbestimmung

Die polarographische Methode zur quantitativen und qualitativen Erfassung chemischer Stoffe wurde von HEYROVSKY und seiner Schule entwickelt. Ausführliche Darstellungen geben die Monographien von HEYROVSKY (1941), KOLTHOFF und LINGANE (1946) und VON STACKELBERG (1950).

Prinzip: An eine langsam tropfende Quecksilberelektrode und eine Bezugslektrode, die in die zu analysierende Flüssigkeit tauchen, wird eine Gleichspannung angelegt, die allmählich von Null an zunimmt. Es fließt ein Strom, sobald die Spannung das Abscheidungspotential des umsetzbaren Stoffes erreicht hat und die Substanz an der Quecksilberelektrode reduziert oder oxydiert wird. Mit zunehmender Spannung steigt die Stromstärke zunächst exponentiell an. Kann die Substanz (der sogenannte „Depola-

¹⁾ Die Arbeit stellt einen Teil der 1952 fertiggestellten Dissertation des Verfassers dar, die unter Anleitung des damaligen Abteilungsvorstandes am Institut für Meereskunde, Prof. Dr. H. FRIEDRICH, entstand. Ihm dankt der Verfasser für das so oft bewiesene fördernde Interesse.

risator“) nur durch Diffusion zur Elektrodenoberfläche gelangen, so wirkt die Diffusion von einer bestimmten Spannung an strombegrenzend (Grenz- oder Diffusionsstrom). Die Stärke des Abscheidungsstromes ist jetzt solange konstant, von der angelegten Spannung unabhängig und proportional der Konzentration des Stoffes, bis die Spannung einen Wert erreicht, bei dem eine andere chemische Reaktion an der Elektrode abläuft. Jede Umsetzung ist also durch einen Stromsprung, eine sogenannte Stufe, charakterisiert. Die Stufenhöhe ist ein quantitatives Maß für die Konzentration des umsetzbaren Stoffes. Häufig läßt sich die Aufnahme der gesamten Stromstärke-Spannungskurve (Polarogramm) umgehen, indem man die Stufenhöhe bei einem Einzelpotential bestimmt (polarometrisches Verfahren). Zur qualitativen Kennzeichnung eines Stoffes eignet sich die mittlere Spannung in dem Stromsprung (Halbstufenpotential) besser als das schon erwähnte Abscheidungspotential.

Die Stärke des Diffusionsstromes läßt sich aus einer von ILCOVIC angegebenen Gleichung berechnen. Die mittlere Stromstärke während der Dauer eines Quecksilbertropfens beträgt:

$$i_D = 607 n D^{1/2} C m^{2/3} t^{1/6}$$

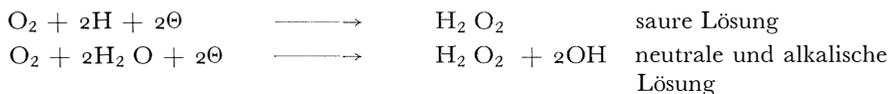
(n = elektrochemische Wertigkeit, D = Diffusionskoeffizient, C = Konzentration des umsetzbaren Stoffes, m = Menge des in einer Sekunde ausfließenden Quecksilbers, t = Tropfzeit).

Neben dem Abscheidungsstrom fließt noch der Kapazitäts- oder Ladungsstrom. Er ist durch die unterschiedlichen Einzelpotentiale von Tropf- und Bezugs elektrode bedingt. Der Ladungsstrom verfälscht die Stärke des Diffusionsstromes, wenn der zu erfassende Stoff in geringer Konzentration vorliegt. Die Stromstärke entspricht dem wahren Diffusionsstrom, wenn die negative Spannung der Tropfelektrode mit dem Potential der Gegenelektrode übereinstimmt.

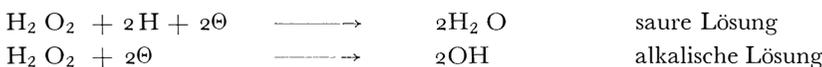
In der Nähe der Tropfelektrode können Strömungen auftreten, die dem Quecksilbertropfen zusätzliche Mengen des Depolarisators zuführen. So wird die Stromstärke über den Diffusionsstrom hinaus erhöht. Einen ausführlichen Überblick über diese Maxima gibt VON STACKELBERG (1951). Maxima erster Art, durch Potentialunterschiede am Quecksilbertropfen bedingt, rufen starke Stromüberhöhungen in einem engen Bezirk der Stromstärke-Spannungskurve hervor und brechen steil ab. Maxima zweiter Art, durch den „Spüleffekt“ hervorgerufen, überhöhen die gesamte Stufe. Begünstigt werden Maxima zweiter Art durch kurze Tropfzeiten und hohe Elektrolytkonzentrationen. Maxima lassen sich durch Zugabe maximadämpfender Stoffe wie Gelatine, Agar, Methylzellulose, Alkaloide u. a. unterdrücken.

Der Sauerstoff wird an der Quecksilbertropfelektrode in zwei Stufen reduziert, für die nach KOLTHOFF und LINGANE (1946) folgende Reaktionen verantwortlich sind:

1. Stufe



2. Stufe



Das Halbstufenpotential der ersten Stufe beträgt $-0,05$ Volt, das der zweiten etwa $-0,9$ Volt. Die erste Stufe hat meist kein gut ausgebildetes Plateau. Sie geht allmählich in die zweite Stufe über, deren Anstieg wesentlich flacher ist. Eisen, Kupfer, Blei und Wismut werden im gleichen Potentialbereich wie der Sauerstoff an der Tropfelektrode umgesetzt und stören die Sauerstoffbestimmung. Da der Sauerstoff ein neutrales Molekül ist, kommt es auch bei einem Potentialabfall in der Lösung zu keinem Wanderungsstrom.

Die Sauerstoffkonzentration wird meist aus der Höhe der ersten Stufe bestimmt. Im allgemeinen begnügt man sich nicht damit, die Stromstärke auf die Nulllage des freien Galvanometers zu beziehen, sondern wendet ein Differenzverfahren an: Die Stufenhöhe wird nach der Grenzstrom-Reststrom-Methode bei Gegenwart und Abwesenheit von Sauerstoff beim gleichen Potential gemessen. Zweckmäßig ist es, die Höhe der ersten Sauerstoffstufe zu benutzen, da hier kein Kapazitätsstrom fließt. Die Stufenhöhe ist ein relatives Maß der Sauerstoffkonzentration. Die absoluten Werte muß man Eichkurven entnehmen, zu deren Aufstellung die Stufenhöhe für mehrere bekannte Sauerstoffkonzentrationen ermittelt wird.

In chloridhaltigen Lösungen wird aus Quecksilber und Chlorid unter Sauerstoffverbrauch Kalomel gebildet (Formulierung dieser Reaktion für saure Lösungen bei FURMAN und MURRAY 1936, für alkalisches Blutplasma bei WIESINGER 1950). Dieser Sauerstoffschwund infolge Kalomelbildung stört vor allem die fortlaufende Sauerstoffbestimmung in kleinen Flüssigkeitsmengen.

Die Meßeinrichtung

Die Untersuchungen wurden mit einer aus Institutsmitteln zusammengestellten Anordnung durchgeführt, deren Schaltung in Abb. 1 wiedergegeben ist.

1. Das elektrische System

Als Spannungsquelle dient ein 4 Volt-Akkumulator, der mit zwei regulierbaren Widerständen in Serie verbunden ist. Mit Hilfe der Radiopotentiometer R_1 und R_2 (50 und 1000 Ohm) wird die von dem Voltmeter V (Multavi 1) angezeigte Spannung reguliert. Die Spannung kann über das in Serie geschaltete Galvanometer G und den Widerstand R_3 an den Sechsfach-Doppelpol-Serienschalter S_1 angelegt werden oder dient als Eingangsspannung für die Brücke B. Von der Meßbrücke lassen sich genau bekannte Spannungen abgreifen und über das Galvanometer an S_3 bringen. Der Serienschalter erlaubt wahlweise Verbindung mit:

1. Elektrolyseneinrichtung EE
2. Vorschaltwiderstand R_4 (50 Kilo-Ohm, Radiopotentiometer-Typ) bei Verwendung des Galvanometers als Spannungsmeßgerät
3. Weston-Normal-Element StE, Vorschaltwiderstand R_5 (10 Kilo-Ohm, Radiopotentiometer-Typ) und Drucktaste S_2 zum Abgleichen der Brücke
4. Präzisionswiderstand R_6 (Stöpselrheostat) zur amperometrischen Galvanometer-eichung und zur Überprüfung des elektrischen Systems

Das Galvanometer G ist ein Multiflex-Spiegelgalvanometer MG 2 der Firma B. Lange (Berlin) mit einer Maximalempfindlichkeit von etwa $4,9 \times 10^{-3}$ Ampere pro Skalenteil. Die Empfindlichkeit läßt sich durch den Widerstand R_3 kontinuierlich und durch eine Vorrichtung im Galvanometer in bestimmten Stufen verändern. R_3 wird so gewählt,

daß das Galvanometer leicht überdämpft ist. Dadurch werden die durch die Tropfenbildung verursachten Schwankungen der Stromstärke vermindert. Das Galvanometer brauchte bei unseren Untersuchungen nur bei der Bestimmung des Diffusionskoeffizienten in Absolutwerten geeicht zu werden. Zur Eichung als Spannungsmeßgerät wird eine bekannte Spannung von der Meßbrücke abgegriffen und R_4 solange verändert, bis der Spannung der gewünschte Ausschlag auf dem Galvanometer entspricht.

Für normale Serienuntersuchungen kann das elektrische System weitgehend vereinfacht werden. Die von dem Akkumulator mit Hilfe der Widerstände R_1 und R_2 abgegriffene Spannung wird dann über das parallelgeschaltete Galvanometer unmittelbar an die Elektrolyseanordnung gebracht.

2. Die Elektrolyseanordnung¹⁾

Sie besteht aus der Tropfelektrode TE, dem Analysengefäß A, dem Zwischengefäß Zw und der Kalomelektrode KE (Abb. 2). Der Quecksilberbehälter der Tropfelektrode läuft nach unten in ein Glasrohr aus. Dieses trägt ein seitliches Ansatzstück mit dem Platinkontakt P und führt über den ungefetteten Glasschliffhahn H_1 (zum An- und Abstellen des Quecksilberflusses) an einen Schliffkern, der die Tropfkapillare T aufnimmt. Als Tropfkapillaren dienen Thermometerkapillaren (SCHOTT und Genossen, Jena) von 6 mm äußerem und 0,07 bis 0,08 mm innerem Durchmesser. Die Höhe des Quecksilberspiegels kann in dem mit einer Zentimetereinteilung unterlegten Steigrohr St, das dem Reservoir eingeschmolzen ist, durch das Gummigebläse G und den Schwanzschliffhahn H beliebig von 20 bis 50 cm verändert werden. Die Feinregulierung gestattet ein Druckregulator D, der aus einer Klemmschraube besteht, die einen Gummischlauch am Hahn H umgreift. Die Tropfelektrode wird von einer in der Abbildung nicht wiedergegebenen Vorrichtung gehalten, die eine Schwenkung in der horizontalen und eine Verschiebung in der vertikalen Ebene gestattet. Der kritische Quecksilberdruck, bei dem kein Quecksilber mehr abtropft, liegt bei den verwendeten Kapillargrößen bei 14 bis 16 cm Quecksilber. Das Gewicht eines Einzeltropfens beträgt 7,5 bis 9,8 mg. Bei der üblichen Tropfzeit von 3 sec beträgt der stündliche Quecksilberverbrauch 9 bis 12 g. Da bei normalen Serienbestimmungen eine Veränderung des Quecksilberdruckes nicht notwendig ist, gibt man in diesem Falle der Tropfelektrode zweckmäßig eine konstante Niveauhöhe von etwa 20 cm. Gummigebläse und Steigrohr fallen fort.

Die Bezugs- oder Referenzelektrode ist eine gesättigte Kalomelektrode KE. Ihr Seitenarm taucht in ein mit gesättigter KCl-Lösung gefülltes Zwischengefäß Zw, von dem eine Agarbrücke B (3%iger Agar in gesättigter KCl-Lösung) die Verbindung zum Analysengefäß A herstellt. Das Analysengefäß ist ein einseitig verschlossenes Glasrohr mit einem Durchmesser von 1 cm und einem Fassungsvermögen von etwa 5 ccm. Die kleinste von uns untersuchte Wassermenge betrug etwas weniger als 1 ccm. Eine Abnahme der Sauerstoffkonzentration durch Kalomelbildung und Umsatz an der Elektrode tritt auch in geringen Flüssigkeitsmengen während der kurzen Dauer einer Messung nicht ein.

3. Nebeneinrichtungen

Da das polarographische Verfahren temperaturabhängig ist, muß in der zu analysierenden Flüssigkeit die Temperatur weitgehend konstant gehalten werden. Zu diesem Zweck wird das Analysengefäß in ein Glasaquarium von etwa 15 l Fassungsvermögen eingehängt, in dem mit Hilfe von Kontaktthermometer, elektrischem Heizer, Relais und

¹⁾ Die Glasbläserarbeiten wurden von Herrn Glasbläsermeister BURGER in der Firma GOHLA/Kiel ausgeführt.

Röhreinrichtung die Temperatur auf $0,05^{\circ}\text{C}$ konstant gehalten werden kann. Da die Temperatur das Potential der Kalomelektrode nur gering beeinflusst, ist es nicht erforderlich, auch die Bezugselektrode im Thermostaten unterzubringen. In dem Thermostaten wird in Ein-Liter-Glasflaschen auch das Versuchswasser aufbewahrt. Verschiedene Sauerstoffkonzentrationen werden durch Einleiten von Luft bzw. Bombenstickstoff hergestellt. Die Gase passieren vor Eintritt in das Versuchswasser ein Natron-Kalk-Röhrchen, eine Vorwärmspirale und eine im Thermostaten befestigte Gaswaschflasche, die mit Versuchswasser gefüllt ist.

4. Durchführung einer normalen Analyse

Durch den Serienschalter wird die Verbindung zur Elektrolyseneinrichtung und durch den Schalter S_1 die Verbindung zur Stromquelle hergestellt. R_1 und R_2 werden so eingestellt, daß an der Tropfelektrode eine Spannung von $-0,55$ Volt anliegt. Diese Spannung entspricht, wie später gezeigt wird, dem elektrokapillaren Nullpotential und liegt innerhalb des Plateaus der ersten Sauerstoffstufe. Die Lichtmarke des Galvanometers wird sorgfältig auf den Skalennullpunkt eingestellt. Anschließend wird durch Öffnen des Hahnes H_2 der Tropfvorgang in Gang gebracht.

Die Analysenflüssigkeit wird aus den Versuchswasser-Vorratsflaschen mit einem Heber, aus den Atmungsgefäßen mit einer medizinischen Vollgasspritze in das Analysengefäß gefüllt. Die kurzfristige Berührung der Untersuchungsflüssigkeit mit der Außenluft verfälscht auch bei Druckunterschieden von mehr als 100 mm Quecksilber den Sauerstoffwert nicht (BARTELS und BRECHT 1951, BARTELS, MAYER und MORITZEN 1952). Das Analysengefäß wird in einen Halter im Thermostaten eingehängt und die Tropfkapillare so in das Analysengefäß eingetaucht, daß das freie Kapillarende etwa 1 cm unterhalb des Flüssigkeitsspiegels steht. Durch die Agarbrücke wird der Stromkreis geschlossen und aus den Stromstärkeschwankungen der mittlere Galvanometerausschlag bestimmt. Von diesem Galvanometerwert wird noch der Reststrom abgezogen. Dieser ist für jedes Versuchswasser nur einmal zu ermitteln. Die dem Galvanometerausschlag entsprechende Sauerstoffkonzentration wird einer Eichkurve entnommen, zu deren Aufstellung die absoluten Sauerstoffkonzentrationen mit Hilfe der WINKLER-Methode bestimmt werden. Bei Serienmessungen kann anschließend ohne Unterbrechung des Tropfvorganges die nächste Wasserprobe analysiert werden. Der Quecksilberfluß darf nur dann unterbrochen werden, wenn die mit destilliertem Wasser abgespülte und dann äußerlich abgetrocknete Kapillare in Luft tropft.

Bei Mehrfachbestimmungen luftgesättigter Lösungen differierten die Galvanometerausschläge maximal um $\pm 0,5$ mm. Bei einem Galvanometergesamtausschlag von 180 bis 190 mm beträgt somit die Genauigkeit der Einzelanalyse $0,5\%$. Auch Lösungen, die nicht luftgesättigt sind, lassen sich mit etwa der gleichen Genauigkeit analysieren, wenn die Galvanometerempfindlichkeit entsprechend vergrößert ist.

5. Zusätzliche Arbeitsgänge

a) Reinigung des Quecksilbers

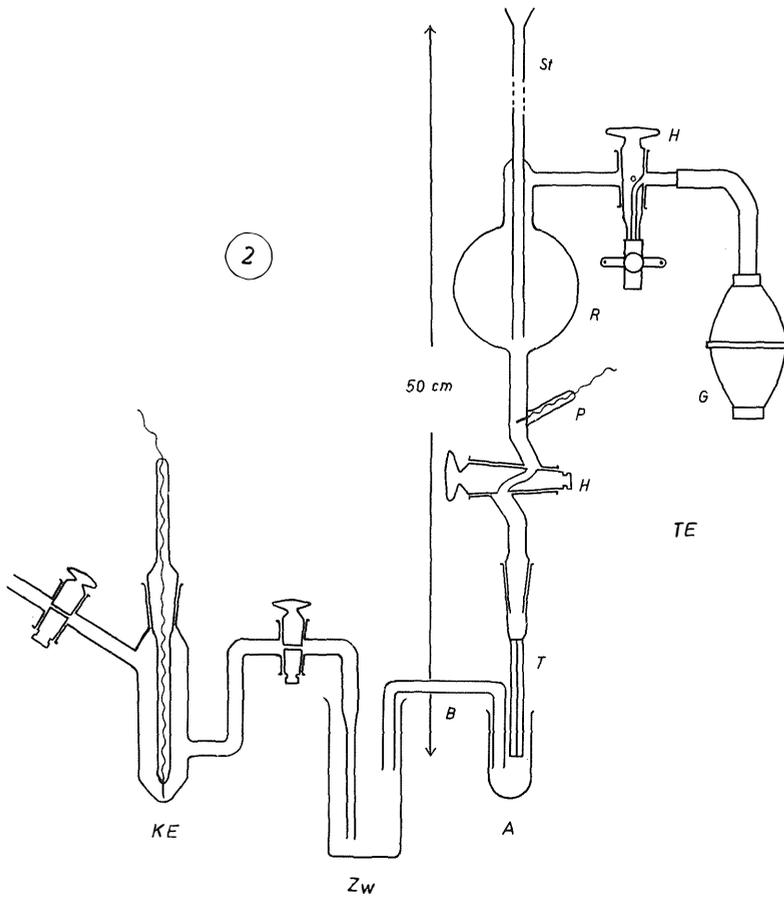
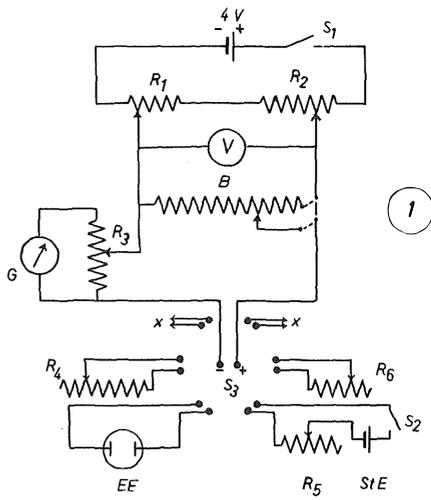
Das Quecksilber muß vor seiner Verwendung in der Tropfelektrode gründlich gesäubert werden. Wir empfehlen, die Reinigung folgendermaßen durchzuführen:

1. Grobreinigung durch Filtrieren durch ein Papierfilter, das an seiner Spitze mit einer feinen Nadel durchstochen wurde

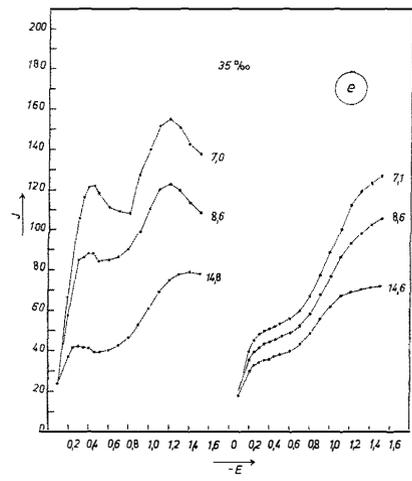
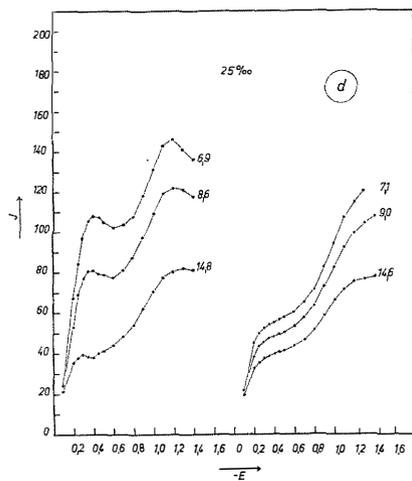
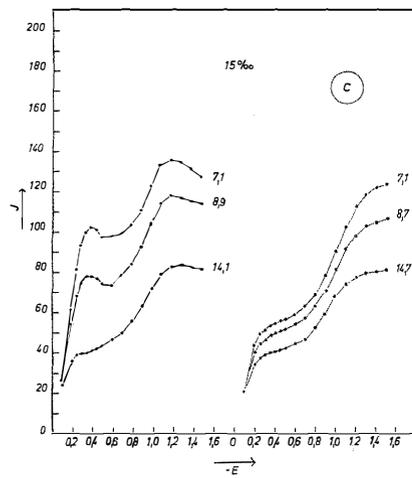
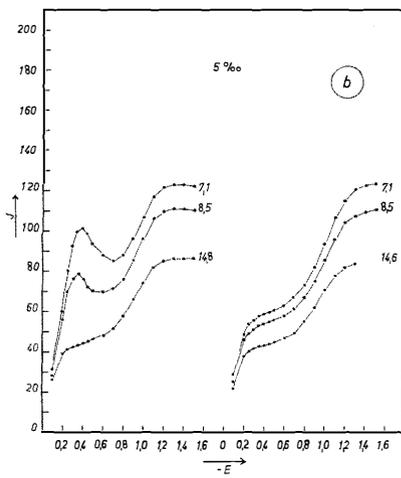
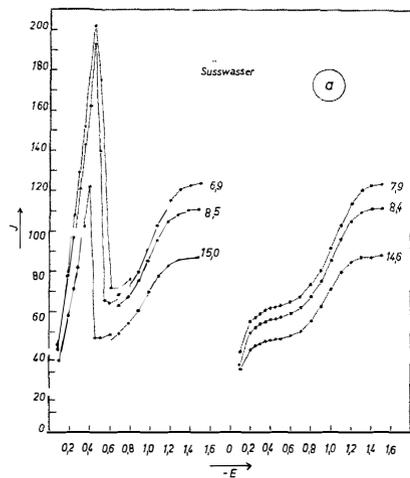
Legende zu den nebenstehenden Abbildungen (Tafel 12)

Abb. 1 Schaltung des elektrischen Systems. Erklärungen im Text.

Abb. 2 Elektrolyseneinrichtung. Erklärungen im Text.



Tafel 12



2. Durchsaugen eines Luftstromes mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe und einer Schott G₂-Fritte
3. Filtrieren durch Schott G₃-Fritte
4. Türmen in 1 n HNO₃
5. Türmen in destilliertem Wasser
6. Türmen in 10%iger KOH
7. Filtrieren durch Wildleder
8. Türmen in destilliertem Wasser
9. Doppelte Vakuumdestillation

Falls erforderlich werden noch Reinigungsgänge mit Benzin, Äthanol oder Permanganat eingeschoben.

d) Reinigung der Kapillaren

Verschmutzte Kapillaren (Verschmutzungen äußern sich in Tropfunregelmäßigkeiten) werden durch Durchsaugen von heißer Salpetersäure oder heißem Königswasser, destilliertem Wasser und schließlich Luft gereinigt. Ist lediglich das Kapillarende verschmutzt, so genügt häufig kurzes Eintauchen des Kapillarendes in konzentrierte Salpetersäure und gründliches Abspülen mit Wasser.

c) Vorbehandlung des Versuchswassers zur Maximaunterdrückung s. S. 54

b) Sauerstoffentfernung zur Bestimmung des Reststromes

Der Sauerstoff wird durch Zugabe von Na₂SO₃ (1%) entfernt. Na₂SO₃ wirkt in alkalischer Lösung als Reduktionsmittel, verhält sich aber an der Tropfelektrode indifferent. Nach Entfernung der sulfithaltigen Lösung müssen äußere Tropfkapillare und Analysengefäß gründlich mit verdünnter Salpetersäure und destilliertem Wasser gereinigt werden.

e) Sauerstoffbestimmung nach WINKLER

Die Doppel- oder Dreifachbestimmungen zur Aufstellung von Eichkurven werden mit Wassermengen von 50 ccm durchgeführt. Zu den Wasserproben werden jeweils 1 ccm MnCl₂-Lösung (40 g MnCl₂ auf 100 ccm Lösung) und 1 ccm NaOH-KJ-Lösung (32 g NaOH und 10 g KJ auf 100 ccm Lösung) zugesetzt. Nach Zugabe von 2 ccm konzentrierter HCl wird mit n/50 Na₂S₂O₃-Lösung aus einer 10 ccm-Bürette (in 0,02 ccm geteilt) titriert (Indikator: 1%ige Stärkelösung mit gesättigter NaCl-Lösung hergestellt).

Experimentelle Untersuchungen

Maxima erster und zweiter Art in See- und Süßwasser

In Abb. 3 sind Stromstärke-Spannungskurven wiedergegeben, die in Leitungswasser und Seewasser von 5, 15, 25 und 35‰ bei verschiedenen Tropfzeiten aufgenommen wurden. Die einzelnen Seewasserkonzentrationen wurden aus einheitlichem Seewasser von S = 35‰ durch Verdünnen mit Leitungswasser hergestellt. Der Sauerstoffgehalt der Lösungen entspricht der Konzentration bei Sättigung mit Zimmerluft. Ein noch

Legende zu der nebenstehenden Abbildung (Tafel 13) Abb. 3

Polarogramme in Leitungswasser und Seewasser (S = 5, 15, 25 und 35‰) bei verschiedenen Tropfzeiten. Lösungen luftgesättigt, Temp. 20°C. Abszisse: Klemmenspannung (Volt), Ordinate: Stromstärke (Galvanometereinheiten). Neben den Kurven ist die Zeitdauer für fünf Tropfen in sec angegeben. Die in den Abbildungen links gezeichneten Kurven wurden nach Maximaunterdrückung erhalten

verhältnismäßig typisches Maximum erster Art tritt nur in Leitungswasser auf. Das spitze Maximum erreicht bei etwa $-0,4$ Volt seinen Höhepunkt. Nach negativeren Potentialen bricht es relativ steil ab. Durch schnellere Tropfenfolge wird das Maximum wesentlich stärker gesteigert als der reine Diffusionsstrom, der bei Potentialen von etwa $-0,5$ bis $-0,6$ Volt an fließt. Außerdem verursacht die kurze Tropfzeit Abrundung und flacheren Abbruch des Maximums sowie Ausdehnung zu negativeren Potentialen. Die starke Unregelmäßigkeit der Stromstärke im Bereich des Maximums erster Art verhindert genaue Galvanometerablesungen.

Der Gehalt des Kieler Leitungswassers an Elektrolyten ist vermutlich dafür verantwortlich, daß die Stromstärke beim Maximum steil ansteigt und weniger steil als in destilliertem Wasser abfällt, wo nach einem flacheren Anstieg das Maximum plötzlich abbricht. Außerdem sind hier durch den hohen Widerstand der Flüssigkeit die Sauerstoffstufen zu negativeren Potentialen verschoben.

Bei der üblichen Tropfzeit von etwa 3 sec ist ein Maximum erster Art in Seewasser von $S = 5$ und 15‰ nicht vorhanden. Bei Salzgehalten von 25 und 35‰ ist es stark abgeflacht und abgerundet. Schnellere Tropfenfolge steigert das abgerundete Maximum und läßt es auch in niederen Elektrolytkonzentrationen auftreten. Da gleichzeitig die kürzere Tropfzeit nichtabbruchende Maxima hervorruft, die die beiden Sauerstoffstufen in ihrer Gesamtheit überhöhen, überlagern sich die beiden Maxima. Das abgerundete Maximum sitzt den überhöhten Stufen buckelförmig auf. Das nichtabbruchende Maximum nimmt mit steigender Elektrolytkonzentration zu. Es erreicht seinen Höhepunkt in Form eines zweiten Buckels bei einer Spannung von etwa $-1,2$ Volt.

Das Auftreten von Maxima führt zu inkonstanten Veränderungen des Diffusionsstromes. Es muß daher bei der quantitativen Sauerstoffbestimmung verhindert werden. Besonders gefährlich sind die nichtabbruchenden Maxima. Sie können leicht übersehen werden, wenn die Stufenhöhe nach dem polarometrischen Verfahren bei einem Einzelpotential bestimmt wird. Bei mittleren Elektrolytkonzentrationen und Tropfzeiten vermögen die Substanzmengen, die bei Filtration durch ein weiches Faltenfilter an die Lösung abgegeben werden, die Maxima zu unterdrücken. Bei höheren und geringeren Elektrolytkonzentrationen dagegen kann diese Vorbehandlung des Versuchswassers die Maximausbildung nicht vollständig verhindern. Der sonst übliche Zusatz von Alkaloiden oder organischen Farbstoffen kommt bei physiologischen Versuchen im allgemeinen nicht in Betracht. Gelatinezugabe ($0,02\%$) stört die Sauerstoffbestimmung nach WINKLER und ruft bei Luftdurchperlen lästiges Schäumen hervor. Unsere Erfahrungen zeigten, daß durch das folgende Verfahren auch in Süßwasser und Seewasser von 35‰ bei mittleren Tropfzeiten die Maxima vollständig unterdrückt werden können: Aus zerschnittenem ungebleichten Zellstoff wird durch kurzes Aufkochen ein Zellstoffbrei hergestellt, der mit dem Versuchswasser kurze Zeit in einer großen Flasche geschüttelt wird. Anschließend wird die Aufschwemmung durch Filtrieren durch ein Faltenfilter wieder aus dem Wasser entfernt.

Nichtabbruchende Maxima werden durch zu schnelle Tropfenfolge verursacht. Hohe Elektrolytkonzentrationen begünstigen ihr Auftreten. Es ist daher zu erwarten, daß die kritische Tropfzeit, unterhalb der es zu den Stromüberhöhungen kommt, in höheren Salzkonzentrationen zunimmt. Treten nichtabbruchende Maxima auf, so ist die Stromstärke nicht mehr durch die ILCOVIC-Gleichung gegeben, nach der das Verhältnis von Stromstärke zur Kapillarkonstanten $m^2/3 \cdot t^{1/6}$ angibt, wieweit die Stromstärke von der Tropfzeit, unabhängig ist. Dieses Verhältnis ist im allgemeinen über weite Tropfzeitenspannen konstant und steigt nur zu sehr großen und sehr kleinen Tropfzeiten an. Der Anstieg bei langen Tropfzeiten ist durch den Näherungscharakter der ILCOVIC-Gleichung bedingt. Die Veränderungen bei schneller Tropfenfolge werden durch den Spüleffekt hervorgerufen. Wie Abb. 4 zeigt, treten nichtabbruchende Maxima in Seewasser von 16‰ , das nicht zur Maximaunterdrückung vorbehandelt war, erst bei

Tropfzeiten von 2,0 bis 2,4 sec auf. In Seewasser von 35⁰/₀₀ dagegen ist dieses Maximum schon bei einer Tropfzeit von 3,4 sec vorhanden. Ist aber das Versuchswasser in der angegebenen Weise vorbehandelt, so treten in Seewasser von 16⁰/₀₀ überhaupt keine Maxima auf, in Seewasser von 35⁰/₀₀ ist die Stromstärke erst bei Tropfzeiten unter 2 sec über den reinen Diffusionsstrom erhöht.

Einfluß der Elektrolytkonzentration auf den Diffusionsstrom

Nach der ILCOVIC-Gleichung ist eine Abhängigkeit des Diffusionsstromes von der Elektrolytkonzentration über eine Beeinflussung der Ausflußmenge, des Diffusionskoeffizienten und der Tropfzeit möglich. Die Ausflußmenge bestimmten wir gravimetrisch. Sie erwies sich als praktisch unabhängig von der Natur des Mediums und von der angelegten Spannung. Die Tropfzeit ist der Oberflächenspannung des Quecksilbers proportional. Diese hängt vom Potential des Quecksilbers und von der Art der Lösung ab, in der die Tropfen gebildet werden. In Abb 5. ist die Tropfzeit als relatives Maß der Oberflächenspannung in Leitungswasser und in Seewasser von 16 und 35⁰/₀₀ gegen die Klemmenspannung aufgetragen. Eine eindeutiger Abhängigkeit der Tropfzeit von der Elektrolytkonzentration besteht nicht. Die Unterschiede liegen innerhalb der Fehlerbreite der Tropfzeitbestimmung. Das elektrochemische Nullpotential liegt in allen drei Medien einheitlich bei -0,55 Volt.

Da der Diffusionskoeffizient von der Viskosität der Lösung abhängt, muß er mit steigender Elektrolytkonzentration abnehmen. Der Diffusionskoeffizient läßt sich aus der ILCOVIC-Gleichung bestimmen, wenn alle übrigen Faktoren bekannt sind. Die Stufenhöhe ermittelten wir in diesem Fall so, daß der Teil der ersten Stufe, der Abszisse weitgehend parallel verläuft, gegen den Reststrom vermessen wurde. Die Ausflußmenge wurde aus der innerhalb fünf Minuten abgetropften Quecksilbermenge, die Tropfzeit aus der Zeitdauer für 10 Tropfen berechnet. Nach der Reaktionsgleichung beträgt die elektrochemische Wertigkeit des Sauerstoffs 2. Die Bestimmung der absoluten Sauerstoffkonzentration erfolgte nach der WINKLER-Methode. Wir fanden folgende Sauerstoff-Diffusionskoeffizienten (Mittelwerte aus drei oder vier Einzelbestimmungen):

Süßwasser (Leitungswasser)	$2,92 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 / \text{sec}$
Seewasser (S = 16 ⁰ / ₀₀)	$2,80 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 / \text{sec}$
Seewasser (S = 35 ⁰ / ₀₀)	$2,72 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 / \text{sec}$

Die Unterschiede der Diffusionskoeffizienten sind im Hinblick auf praktische Belange nur gering, zumal der Diffusionskoeffizient nur mit der sechsten Wurzel den Diffusionsstrom beeinflusst. Bei Bestimmung der absoluten Sauerstoffkonzentration genügt es daher zumeist, eine Eichkurve nur in einem Salzgehalt aufzunehmen. Bei Relativmessungen können die Galvanometerablesungen ohne Korrektur für den Salzgehalt als Maß der Sauerstoffkonzentration angegeben werden.

Die Literaturangaben über den polarographisch bestimmten Sauerstoff-Diffusionskoeffizienten schwanken. KOLTHOFF und MILLER (1941) berechnen den Diffusionskoeffizient zu $2,6 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 / \text{sec}$. DIRSCHERL und BERGMAYER (1950) fanden in Ringerlösung bei 37°C einen Koeffizienten von $3,33 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 / \text{sec}$. Mit der Abhängigkeit der Höhe der Sauerstoffstufe von der Elektrolytkonzentration beschäftigten sich GIGUERE und LAUCIER (1945). Sie fanden keinen Einfluß der Elektrolytkonzentration auf die Stufenhöhe. Der Widerspruch zu unseren Ergebnissen dürfte sich dadurch erklären, daß die Unterschiede innerhalb der Fehlerbreite der Meßmethode der genannten Autoren liegen.

Die Elektrolytkonzentration beeinflusst nicht nur die Stärke des Diffusionsstromes. Sie kann auch die Lage der Stromstärke-Spannungskurve verändern, da für die Reduktion des Sauerstoffs an der Kathode das Kathodenpotential maßgebend ist. Jeder Änderung

der Klemmenspannung entspricht aber nur dann die gleiche Änderung des Kathodenpotentials, wenn der Spannungsabfall in der Lösung vernachlässigt werden kann. In sehr elektrolytarmem Wasser werden die Polarogramme in Richtung der Abszisse in die Länge gezogen, wenn man die Klemmenspannung auf dieser Achse aufträgt. Eichkurven in destilliertem Wasser sind daher in ihrem unteren Anteil keine Geraden mehr, da bei konstanter Klemmenspannung die Galvanometerwerte für niedrige Sauerstoffkonzentrationen zu hoch ausfallen. In destilliertem Wasser wirkt sich auch über Veränderung des Widerstandes der Abstand der Tropfkapillare von der Agarbrücke auf den Wert des Diffusionsstromes aus.

Einwirkung der Temperatur auf den Diffusionsstrom

Die Temperatur beeinflusst alle Faktoren der ILCOVIC-Gleichung mit Ausnahme der elektrochemischen Wertigkeit und der FARADAY-Konstanten. Ins Gewicht fallen vor allem die Veränderung der Tropfzeit und des Diffusionskoeffizienten. Wir untersuchten den Einfluß der Temperatur auf die Stufenhöhe, indem wir Seewasser von 16‰ (Maxima unterdrückt) bei Temperaturen zwischen 10 und 21°C mit Luft sättigten und den Diffusionsstrom maßen, ohne die Tropfzeit nachzuregulieren. Gleichzeitig bestimmten wir die absolute Sauerstoffkonzentration nach WINKLER. Die Veränderung des Verhältnisses zwischen Diffusionsstrom und Sauerstoffkonzentration ist ein Maß für die Temperaturabhängigkeit der Stufenhöhe (Abb. 6). Diese Methode hat den Nachteil, daß die Sauerstoffkonzentration bei den verschiedenen Temperaturen unterschiedlich ist. Der durch die Ausgleichsgerade wiedergegebene Temperaturkoeffizient gilt also für die mittlere Sauerstoffkonzentration. Bei unserem Vorgehen erübrigt es sich aber, Korrekturen für die zeitliche Stromabnahme infolge Kalombildung anzubringen, wie es bei langdauernden Versuchen notwendig ist, bei denen bei annähernd konstanter Sauerstoffkonzentration gemessen wurde (z. B. WANNER 1945, WIESINGER 1950).

Aus unseren Messungen ergibt sich eine Steigerung des Diffusionsstromes um 1,5% pro Grad Celsius (auf den Diffusionsstrom bei 20°C bezogen). Nach WANNER (1945) beträgt der Temperaturgradient in einer Nährsalzlösung bei einer Sauerstoffkonzentration von 9,8 mg pro Liter 0,8% je Grad Celsius (auf den Diffusionsstrom bei 37°C bezogen). BERGGREN (1942) findet in Blutplasma einen Temperaturkoeffizienten von 1,3% pro Grad Celsius, während WIESINGER (1951) den Koeffizienten in bei 20°C luftgesättigter Ringerlösung zu 0,88% und in luftgesättigtem Plasma zu 1,2% pro

Legende zu den nebenstehenden Abbildungen (Tafel 14)

Abb. 4

Kritische Tropfzeit in Seewasser von 16 und 35‰ vor und nach Maximaunterdrückung. Lösungen luftgesättigt, Temp. 20°C. Links vor, rechts nach Maximaunterdrückung erhaltene Werte. Abszisse: Tropfzeit (sec), Ordinate: Quotient aus Stufenhöhe (Galvanometereinheiten) und Kapillarkonstante (mg × sec).

Abb. 5:

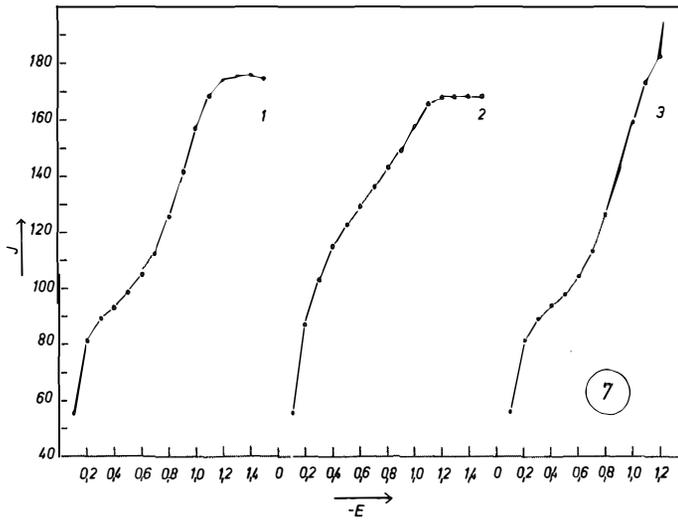
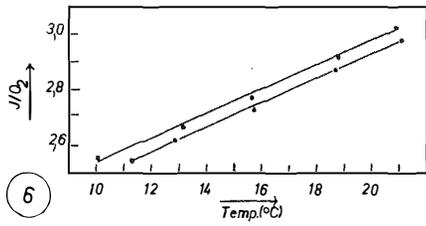
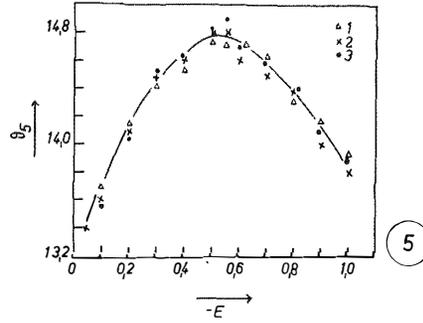
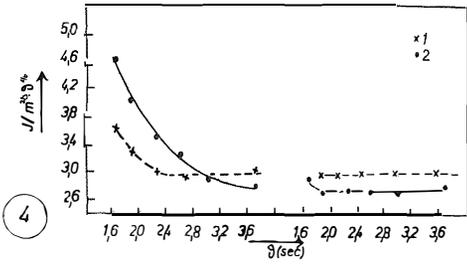
Elektrokapillarkurve in Leitungswasser und Seewasser (S = 16 und 35‰). Lösungen luftgesättigt, Temp. 20°C, Maxima unterdrückt. Abszisse: Klemmenspannung (Volt), Ordinate: Zeitdauer für fünf Tropfen (sec).

Abb. 6:

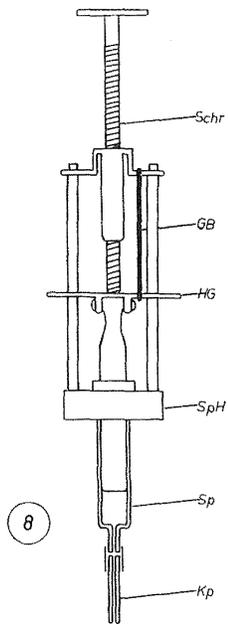
Einwirkung der Temperatur auf den Diffusionsstrom in luftgesättigtem 16‰ Seewasser, Maxima unterdrückt. Mittlere Tropfzeit 3 sec. Die beiden Geraden entsprechen den mit zwei verschiedenen Kapillaren erhaltenen Werten. Abszisse: Temperatur (°C), Ordinate: Quotient aus Stromstärke und Sauerstoffkonzentration.

Abb. 7:

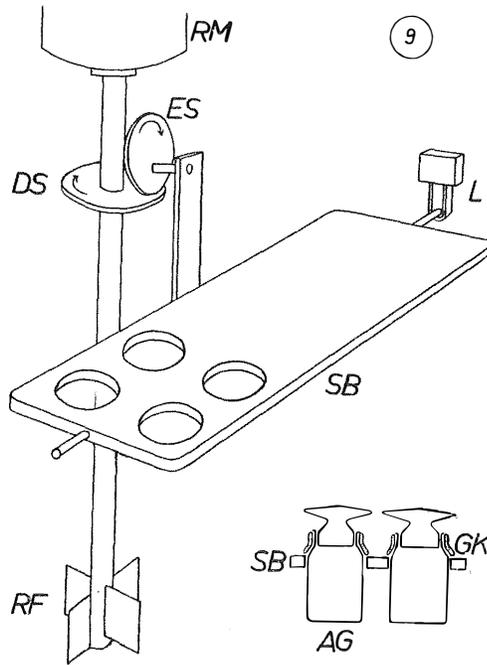
Einwirkung der Wasserstoffionen-Konzentration auf die Stromstärke-Spannungskurve. 16‰ Seewasser, luftgesättigt, Maxima unterdrückt, Temp. 20°C. Abszisse: Klemmenspannung (Volt), Ordinate: Stromstärke (Galvanometereinheiten).



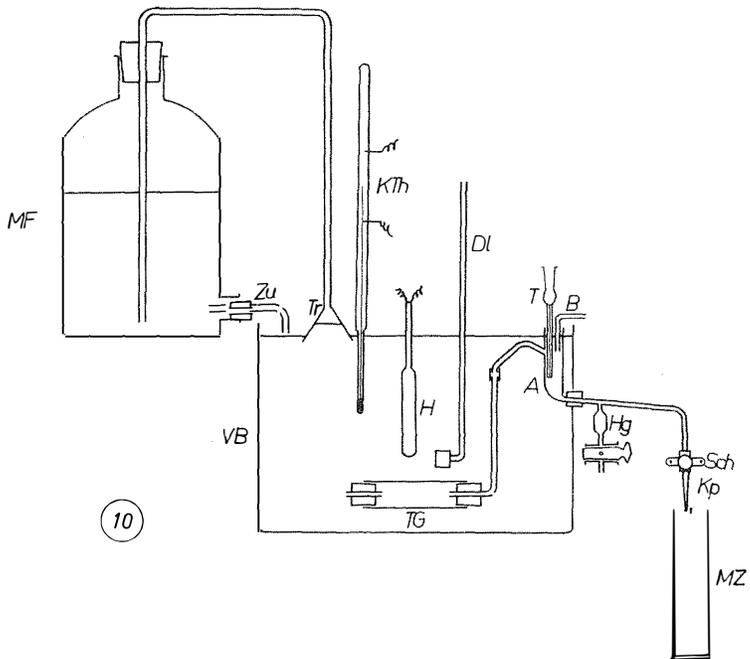
Tafel 14



8



9



10

Tafel 15

Grad Celsius ermittelt (stets auf die Stufenhöhe bei 37°C bezogen). Nach DIRSCHERL (1948) soll der Temperaturkoeffizient von der Sauerstoffkonzentration abhängen. WIESINGER (1951) dagegen findet keine signifikante Differenz der Gradienten in Plasma, das einmal mit 140 mm und das andere Mal mit 88 mm Hg pO₂ in Gleichgewicht gebracht worden war. WANNER (1945) ermittelte sogar in Nährsalzlösungen den höheren Gradienten bei niedrigeren Sauerstoffkonzentrationen. Legen wir nach unseren Messungen einen Temperaturgradienten von 1,5% je Grad zugrunde, so muß die Temperatur der zu analysierenden Flüssigkeit auf etwa ±0,5°C konstant gehalten werden, damit die Stufenhöhe um nicht mehr als 1 bis 2% beeinflusst wird.

Einfluß der Wasserstoffionen-Konzentration auf den Diffusionsstrom

Die Abhängigkeit der Höhe der Sauerstoffstufe von dem pH-Wert der Lösung prüften wir in Seewasser von 16‰ (Maxima unterdrückt, luftgesättigt), dessen natürliches pH von 8,2 durch Zugabe von HCl oder NaOH verändert worden war. Abb. 7 gibt Polarogramme wieder, die bei pH 8,2; 5 und 4 aufgenommen wurden. Bei pH 5 ist die Stromstärke beträchtlich erhöht. Weitere nicht wiedergegebene Versuche mit differenzierten Abstufungen zeigten, daß unter unseren Versuchsbedingungen diese Stromerhöhung sich etwa 0,5 pH-Einheiten unterhalb des normalen Wertes bemerkbar macht. Sie nimmt bis zu einem pH von etwa 4,0 ständig zu. Bei weiterer HCl-Zugabe fällt die Stromstärke plötzlich wieder auf den Normalwert ab. Eine zweite Sauerstoffstufe bildet sich dann nicht mehr aus, da bei etwa -1,0 Volt die Wasserstoffstufe einsetzt. Die Stromstärkenenerhöhung durch die HCl-Zugabe erstreckt sich über einen Spannungsbereich von -0,15 bis -1,0 Volt und ist bei -0,5 bis -0,6 Volt am stärksten. Die Stromstärke in diesem Bereich ist inkonstant. Sie nimmt mit der Meßdauer kontinuierlich ab. Zugabe von NaOH zu dem Versuchswasser verändert die Stromstärke-Spannungskurve nicht.

In der Literatur fanden wir keinen Hinweis auf Ursachen, die innerhalb eines bestimmten pH-Bereiches den Sauerstoff-Diffusionsstrom erhöhen können. KOLTHOFF und MILLER (1941) sahen bei ihren Untersuchungen nur eine geringe und ungesetzmäßige Abhängigkeit des Halbstufenpotentials vom pH der Lösung. Nach BARTELS und BRECHT (1952) soll der Diffusionsstrom durch Schwankungen des pH-Wertes, die weit über das physiologisch Mögliche hinausgehen, nicht beeinflusst werden.

Polarometrisches Meßverfahren zur direkten Ablesung der absoluten Sauerstoffkonzentration an der Galvanometerskala

Automatische und von Hand betriebene polarographische Einrichtungen liefern zunächst nur Angaben über die Höhe des Diffusionsstromes in relativen Galvanometer-

Legende zu den nebenstehenden Abbildungen (Tafel 15)

Abb. 8: Vollglasspritze zur Entnahme von Analysenproben, Erklärungen im Text.

Abb. 9: Schüttelvorrichtung für Atmungsgefäße:

SB = Schüttelbrett, ES = Exzentrerscheibe, DS = Drehscheibe, RM = Rührmotor, RF = Rührflügel, AG = Atmungsgefäß, GK = Gummikragen, L = Lager für Zapfen des Schüttelbrettes (an den beiden Längsseiten des Aquarium-Thermostaten angebracht). Es sind nur vier der insgesamt zwölf Aussparungen gezeichnet, in die die Atmungsgefäße eingehängt werden können.

Abb. 10: Vorrichtung zur Bestimmung des Sauerstoffverbrauches in fließendem Wasser

MF = Mariottesche Flasche, Zu = Zulauf, Tr = Trichter, VB = Versuchsbecken, KTh = Kontaktthermometer, H = Heizer, Dl = Durchlüftung, TG = Tiergefäß, A = Analysengefäß, T = Tropfkapillare, B = Agarbrücke, Hg = Quecksilberauffang, Sch = Schraubklemme, Kp = Glaskapillare, MZ = Meßzylinder.

oder absoluten Stromstärkeeinheiten. Die absolute Konzentration des bestimmten Stoffes muß man einer Eichkurve entnehmen. Es schien daher wünschenswert, eine Methode zu entwickeln, die es gestattet, die absolute Sauerstoffkonzentration direkt an der Galvanometerskala abzulesen. Wir ersetzten zu diesem Zweck die Galvanometerskala durch einen selbstgefertigten Maßstab, auf dem der Anzeigebereich des Galvanometers in 7 ccm Sauerstoff eingeteilt war. Ein Teilstrich entsprach 0,04 ccm. Gewisse Schwierigkeiten bereitete die Herstellung einer Eichlösung mit definiertem in absoluter Höhe bekanntem Sauerstoffgehalt. Wir verwendeten Leitungswasser (Maxima unterdrückt), das bei 20°C mit atmosphärischer Luft gesättigt war. In mehreren Ansätzen bestimmten wir mit Hilfe der WINKLER-Methode den Sauerstoffgehalt zu $6,58 \pm 0,02$ ccm pro Liter.

Die Eichung des Galvanometermaßstabes wird folgendermaßen vorgenommen: Zunächst stellt man die Lichtmarke des Galvanometers sorgfältig auf den Skalennullpunkt ein (= 0,00 ccm). Anschließend wird das luftgesättigte Leitungswasser bei einer Klemmspannung von $-0,55$ Volt analysiert und durch Verändern der Galvanometerempfindlichkeit (mit Hilfe des Widerstandes R_3 in Abb. 1) der Galvanometerausschlag so einreguliert, daß ihm auf der Anzeigeskala 6,58 ccm entsprechen. Von diesem Ausschlag ist noch der Reststromwert abzuziehen. Zu diesem Zweck wird mit Na_2SO_3 sauerstofffrei gemachtes Leitungswasser analysiert und mit der Rändelschraube des Galvanometers die Lage des Lichtzeigers so verändert, daß dem Galvanometerausschlag beim Reststrom die Sauerstoffkonzentration 0,00 ccm auf der Skala entspricht. Anschließend wird noch einmal die luftgesättigte Eichlösung polarometriert und durch geringe Nachregulierung der Galvanometerempfindlichkeit der Ausschlag mit der Konzentrationsangabe von 6,58 ccm wieder in Übereinstimmung gebracht. Diese Nachregulierung ist so gering, daß sie sich auf den Reststrom nicht meßbar auswirkt. Die Eichung muß im allgemeinen täglich einmal vorgenommen werden.

Über die Zuverlässigkeit dieses Verfahrens gibt die folgende Zusammenstellung Auskunft. In ihr sind den an der Skala abgelesenen Werten die nach WINKLER bestimmten Konzentrationen gegenübergestellt.

	Am Galvanometer abgelesene Sauerstoffkonzentration (ccm/l)	Sauerstoffkonzentration nach WINKLER (ccm/l)	Differenz (ccm/l)
Leitungswasser	6,58 6,30 2,28 1,56	6,58 6,25 2,20 1,65	— 0,05 0,08 0,09
Seewasser, S = 8‰	6,12 2,84 2,00	6,02 2,81 2,07	0,10 0,03 0,07
Seewasser, S = 16‰	6,20 4,32	6,25 4,23	0,05 0,09
Seewasser, S = 35‰	5,80 5,15 4,05 3,25 2,35	5,74 5,20 4,00 3,18 2,33	0,06 0,05 0,05 0,07 0,02

Die mittlere Differenz zwischen der an der Skala abgelesenen und der nach WINKLER bestimmten Sauerstoffkonzentration beträgt 0,06 ccm pro Liter. Die Genauigkeit liegt bei etwa 1,5‰.

Potentiometrische Sauerstoffbestimmung

LAITINEN und Mitarbeiter (1948) sowie BARTELS (1951) entwickelten ein Verfahren, um den Sauerstoffgehalt in Flüssigkeiten mit Hilfe der Quecksilbertropfelektrode auf potentiometrischem Wege zu bestimmen. Einzelheiten über die theoretischen Grundlagen finden sich in den beiden genannten Arbeiten. Wie dort gezeigt wird, ist eine Abhängigkeit der Sauerstoffkonzentration von dem Potential des Stromdurchganges durch die Galvanometernulllinie zu erwarten.

Die Versuchsanordnung war weitgehend die gleiche wie bei den schon geschilderten Untersuchungen. Das Galvanometer diente als Nullinstrument und zur Spannungsmessung. Durch die Potentiometer R_1 und R_2 wurde das Potential der Tropfelektrode so verändert, daß der mittlere Galvanometerausschlag bei der Analyse einer Wasserprobe mit dem Skalennullpunkt zusammenfiel. Im Anschluß an die Verwendung als Nullinstrument wurde das Galvanometer nach Vorschalten des Widerstandes R_4 als Spannungsmeßgerät benutzt. Unsere Untersuchungen zeigten, daß die theoretisch zu erwartende und von BARTELS für Blut schon bestätigte logarithmische Beziehung zwischen Sauerstoffkonzentration und dem Potential des Stromdurchganges durch die Galvanometernulllinie auch im Seewasser vorhanden ist. Das potentiometrische Verfahren weist aber im Seewasser im Gegensatz zu den Verhältnissen im Blut bei den üblichen Sauerstoffkonzentrationen keine Vorteile auf. Es ist wesentlich unempfindlicher als das amperometrische Verfahren, mit einem größeren Aufwand verbunden und zeigt starke Abhängigkeit von der Elektrolytkonzentration.

Anwendung der polarometrischen Sauerstoffbestimmung bei physiologischen Untersuchungen

Die Untersuchungen über die Grundlagen der Sauerstoffbestimmung mit Hilfe der Quecksilbertropfelektrode in See- und Leitungswasser haben gezeigt, daß diese Methode offensichtlich günstige Voraussetzungen für Serienanalysen bietet, wie sie bei physiologischen Untersuchungen über die Sauerstoffaufnahme wasserlebender Organismen erforderlich sind. Die polarometrische Methode arbeitet schnell und genau. Vor allem in der Analyse kleiner Wassermengen ist sie der Methode nach WINKLER überlegen. Da für viele Untersuchungen Relativmessungen ausreichen, läßt sich das Verfahren durch Fortfall der Eichkurven weiter vereinfachen.

An Hand einiger Beispiele soll nun gezeigt werden, wie sich die Methode bei physiologischen Atmungsuntersuchungen verwenden läßt. Es bestehen zwei Möglichkeiten:

1. Der Sauerstoffverbrauch eines biologischen Objektes wird in einer abgeschlossenen Wassermenge bestimmt. Der Sauerstoffgehalt des Wassers wird entweder fortlaufend gemessen, oder aber es werden vor und nach dem Versuch Wasserproben zur Analyse aus dem Atmungsgefäß entnommen.
2. Das biologische Objekt befindet sich in strömendem Wasser. Der Sauerstoffverbrauch wird aus der Differenz der Sauerstoffkonzentrationen vor und nach Passieren des Atmungsgefäßes und aus der durchflossenen Wassermenge ermittelt.

1. Die Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs in einer abgeschlossenen Wassermenge

Diese Methode hat den Nachteil, daß die Sauerstoffkonzentration im Atmungsgefäß während der Versuchsdauer stärker abnimmt. Dadurch werden die Versuchsergebnisse verfälscht, wenn die Atmung der Tiere von der Sauerstoffkonzentration im Außenmedium abhängt. Die fortlaufende Sauerstoffbestimmung im abgeschlossenen Atmungsgefäß kämpft mit verschiedenen Schwierigkeiten. In erster Linie erschwert der durch Kalomelbildung und Umsatz an der Tropfelektrode bedingte Sauerstoffschwund eine

genaue Messung. Ferner ist es schwierig, das Flüssigkeitsvolumen in den Atmungsgefäßen konstant zu halten und eine Berührung des biologischen Objektes mit dem abgetropften Quecksilber zu vermeiden. Aus diesen Gründen zogen wir es vor, nach dem Prinzip der Einzelanalysen zu arbeiten und den Atmungsgefäßen vor und nach dem Versuch Analysenproben zu entnehmen.

Um beispielsweise die Abhängigkeit des Sauerstoffverbrauches der Muschel *Mytilus edulis* von der Sauerstoffkonzentration des Atmungswassers zu untersuchen, brachten wir Einzeltiere in Weithalsglasschliff-Flaschen von etwa 250 ccm Inhalt. Diese Atmungsgefäße standen in einem Aquariumthermostaten, dessen Temperatur auf $\pm 0,05^{\circ}\text{C}$ konstant gehalten wurde. Die Gefäße wurden mit Versuchswasser gefüllt, das ebenfalls im Thermostaten aufbewahrt wurde und in dem durch Einleiten von Zimmerluft oder Bombenstickstoff verschiedene Sauerstoffspannungen hergestellt werden konnten. Im allgemeinen bestimmten wir den Sauerstoffverbrauch während einstündiger Versuchsdauer. Der Eigenverbrauch des Seewassers während dieser Zeit erwies sich in Blindversuchen als vernachlässigbar. Den Atmungsgefäßen wurden vor und nach dem Versuch mit einer Vollglasspritze (Abb. 7) Wasserproben zur Analyse entnommen. Zunächst ermittelten wir für jedes Tier in zwei oder drei Versuchen den Sauerstoffverbrauch bei Luftsättigung des Versuchswassers in Galvanometereinheiten pro Stunde. Dann stellten wir in demselben Atmungsgefäß die Sauerstoffaufnahme bei herabgesetzter Sauerstoffspannung fest und bezogen die so gewonnenen Werte auf die gleich 100% gesetzte „Normalatmung“. So ist es möglich, mit Relativwerten auszukommen. Es ist nicht erforderlich, das Volumen des Atmungsgefäßes und des Tieres und eine Bezugsgröße wie Frisch- oder Trockengewicht zu kennen.

Die in Abb. 8 wiedergegebene Vollglasspritze von 2 ccm Inhalt besitzt eine Vorrichtung, bei der ein Gummibandzug eine langsame und gleichmäßige Bewegung des Spritzenstempels ermöglicht. Der Spritzenstempel ist über das Gummiband GB elastisch mit dem Schraubenhalter verbunden. So folgt einerseits der Stempel den Bewegungen der Schraube Schr, andererseits ist aber auch eine von der Schraubenbewegung unabhängige schnellere Betätigung des Stempels mittels des Handgriffes HG möglich. — Diese Spritze benutzten wir auch, um die Sauerstoffausnutzung der Muschel *Mytilus edulis* zu bestimmen. Zu diesem Zweck führten wir die der Spritze aufgesetzte Glaskapillare vorsichtig möglichst tief in die Egestionsöffnung einer Muschel ein, die sich in einem großen flachen gut durchlüfteten Glasaquarium angespannen hatte. Dann zogen wir in 1 1/2 Minuten 1 ccm Wasser in die Spritze auf. Nach Analyse dieser Wasserprobe gewannen wir eine Probe Inspirationswasser unmittelbar vor der Ingestionsöffnung. Aus den beiden Sauerstoffwerten (in Galvanometereinheiten) läßt sich die Sauerstoffausnutzung leicht berechnen.

Auch bei Untersuchungen über den Sauerstoffverbrauch isolierten Gewebes bedienten wir uns wie schon BARTELS, MAYER und MORITZEN (1952) des Prinzips der Einzelanalysen. Die klassische Methode zur Messung der Gewebeatmung ist die manometrische Methode nach BARCROFT-WARBURG. Sie erfordert im allgemeinen die Durchführung von Parallelbestimmungen, wenn man die Einwirkung verschiedener Medien auf die Sauerstoffaufnahme prüfen will. Die Atmung verschiedener Gewebestücke gleicher Herkunft wird in den verschiedenen Lösungen nebeneinander untersucht und die einzelnen Atmungsgrößen werden miteinander verglichen. Ein solcher Vergleich ist aber nur dann möglich, wenn man die absoluten Atmungsbeträge kennt. Die Sauerstoffbestimmung mit Hilfe der Quecksilbertropfelektrode dagegen ermöglicht es, den Sauerstoffverbrauch in zwei verschiedenen Medien am gleichen Gewebestück zu untersuchen, indem man unmittelbar hintereinander die Sauerstoffaufnahme in den verschiedenen Lösungen ermittelt. Die Wirkung verschiedener Medien kommt dann in dem Verhältnis

der relativen Atmungswerte zueinander zum Ausdruck. Bei diesem Verfahren brauchen weder eine Bezugsgröße wie Frisch- oder Trockengewicht noch das Volumen des Atmungsgefäßes bekannt zu sein. Da die polarographische Methode nicht durch Kohlendioxid beeinflusst wird, sind auch keine besonderen Absorptionsmittel erforderlich. Außerdem ist die Temperaturempfindlichkeit geringer als die der manometrischen Methode. Da der Sauerstoffgehalt von Flüssigkeiten bestimmt wird, sind auch keine absolut gasdichten Verschlüsse wie bei der WARBURG-Methode notwendig.

Als Atmungsgefäße dienten kleine Glasflaschen von 6 bis 7 ccm Inhalt (Penicillin-Ampullen) mit eingeschlifftem Stopfen. Diese Gefäße wurden in der auf Abb. 9 dargestellten Vorrichtung in einem Thermostaten geschüttelt. Dabei wurden die Atmungsgefäße durch die Gummikragen lose in den Aussparungen des Schüttelbrettes gehalten, dessen Bewegung durch den Lauf der Exzentrerscheibe auf der an der Rührerachse horizontal angebrachten Scheibe zustande kam. Die Atmungsgefäße ließen sich einzeln ohne Unterbrechung des Schüttelvorganges aus dem Schüttelbrett herausnehmen. Das Versuchswasser wurde im gleichen Thermostaten in Ein-Liter-Glasflaschen mit Zimmerluft bzw. Bombenstickstoff durchperlt. Aus dem Vorratsgefäß wurden die Atmungsgefäße mit einem Heber unter zwei- bis dreifachem Überlauf gefüllt. Bei den verwendeten Gefäßvolumina und Gewebemengen erwies es sich als zweckmäßig, den Sauerstoffverbrauch in Versuchen von 20 Minuten Dauer zu bestimmen. In dieser Zeit sank die Sauerstoffkonzentration um 10 bis 15%. Bei diesen kurzfristigen Experimenten muß sehr zeitgenau gearbeitet werden. Als Beginn des Versuches galt das Einsetzen des Glasschliffstopfens. Beendet wurde der Versuch mit der Aufnahme einer Wasserprobe in die Analysenspritze. Die Anfangskonzentration gaben zeitlich gleichlaufende Blindversuche (Versuchswasser ohne Gewebe) an.

Bei der Durchführung von Relativmessungen wurde so vorgegangen, daß nach Abklingen des Operationsschockes zunächst in zwei oder drei Versuchen der Sauerstoffverbrauch einer Gewebeportion im Ausgangsmedium und bei 100% Luftsättigung bestimmt wurde (= „Normalatmung“). Dann wurde das Gewebe in Lösungen anderer Zusammensetzung bzw. anderer Sauerstoffspannung gebracht und die Atmung in diesen Medien 20, 40 und 60 Minuten nach Überführung bestimmt. Gleichzeitig wurde in Kontrollversuchen die Atmung im Ausgangsmedium weiter verfolgt.

2. Bestimmung der Sauerstoffaufnahme in fließendem Wasser

Unsere Versuchsanordnung gibt Abb. 10 wieder. Das Tiergefäß TG befindet sich in einem etwa 15 l fassenden Glasaquarium VB, dessen Inhalt durch kräftiges Einleiten von Zimmerluft mittels der Durchlüftung DI auf konstantem Sauerstoffgehalt gehalten wurde. Eine der üblichen elektrischen Einrichtungen hielt die Temperatur des Versuchswassers konstant. Aus dem Behälter VB wurde das Wasser durch das Tiergefäß TG, das Analysengefäß A und die Kapillare Kp in den Meßzylinder MZ abgehebert. Die Geschwindigkeit des Wasserstromes konnte mit Hilfe der Schraubklemme Sch so groß gehalten werden, daß die durch die Atmung des Tieres bedingte Abnahme der Sauerstoffspannung etwa 10% betrug.

Für konstante Höhe des Wasserspiegels in VB sorgte die aus einer etwa 12 Liter fassenden Mariotteschen Flasche konstruierte Anlage. Ein Zufluß von Wasser aus MF durch Zu in das Becken VB erfolgt nur solange, als die Höhe des Wasserspiegels in VB unter der breiten Öffnung des Trichters Tr liegt. Der Zustrom stoppt, sobald die Wasseroberfläche den Trichterrand erreicht. Auf diese Weise kann der Wasserstand auf etwa 2 bis 3 mm konstant gehalten werden.

Zur polarometrischen Sauerstoffbestimmung werden durch die obere Öffnung des Analysengefäßes A die Tropfkapillare T und die Agarbrücke B so in das Analysengefäß eingeführt, daß das freie Kapillarende sich etwa 3 cm unterhalb der seitlichen Ein-

mündung befindet. Der Ansatz Hg dient zum Auffangen und Ablassen des abgetropften Quecksilbers. Da besonders bei höheren Geschwindigkeiten die Wasserströmung zu einer Erhöhung des Diffusionsstromes führen kann, wird während der Messung der Wasserstrom durch einen in der Abbildung nicht wiedergegebenen Quetschhahn oberhalb der Schraubklemme Sch kurzfristig unterbunden. Versuche mit angefärbtem Wasser zeigten, daß die Flüssigkeit oberhalb des seitlichen Ansatzes im Analysengefäß nicht erneuert wird. Beim Eintauchen der Kapillare und des Agarhebers vermischt sich diese Deckschicht mit Wasser aus dem Tiergefäß. Es muß daher vom Zeitpunkt des Einführens der Kapillare und des Agarhebers bis zum Augenblick der Messung eine ausreichende Wassermenge das Analysengefäß durchflossen haben, damit das Kapillarende ausschließlich mit Wasser in Berührung kommt, das aus dem Tiergefäß stammt.

An der Schmalseite des Behälters VB waren drei Analysengefäße so nebeneinander angebracht, daß mit der schwenkbar angebrachten und vertikal verschiebbaren Tropfelektrode und einem Agarheber nacheinander in den drei Gefäßen gemessen werden konnte. Zwei der Gefäße dienten zu Tierversuchen. Mit Hilfe des dritten wurde im Leerversuch die Sauerstoffkonzentration des Wassers vor Eintritt in das Tiergefäß bestimmt. Der Sauerstoffverbrauch wird berechnet aus der Differenz der Sauerstoffkonzentrationen vor und nach Passieren des Tiergefäßes und der durchgeflossenen Wassermenge.

Zusammenfassung

Nach einer Übersicht über die Grundlagen der polarographischen Sauerstoffbestimmung werden der Aufbau und die Handhabung einer Analyseneinrichtung beschrieben, die für Sauerstoff-Serienbestimmungen in See- und Süßwasser geeignet ist. Die Genauigkeit bei der Analyse luftgesättigter Lösungen beträgt etwa 0,5%.

Die Abhängigkeit der polarographischen Methode von verschiedenen Faktoren wird untersucht. Maxima erster Art entstehen vornehmlich bei niedrigen, Maxima zweiter Art vorwiegend bei höheren Elektrolytkonzentrationen. Es wird eine auch für physiologische Untersuchungen unbedenkliche Vorbehandlung des Versuchswassers angegeben, die das Auftreten von Maxima verhindert.

Das elektrokapillare Nullpotential liegt in den untersuchten Elektrolytkonzentrationen einheitlich bei $-0,55$ Volt. Die geringe Abhängigkeit der Stufenhöhe von der Elektrolytkonzentration beruht auf der Veränderung des Sauerstoff-Diffusionskoeffizienten mit der Elektrolytkonzentration. Der Diffusionskoeffizient beträgt bei 20°C und Luftsättigung in Leitungswasser $2,92$, in 16‰ Seewasser $2,80$ und in 35‰ Seewasser $2,72$ cm^2 mal $10^{-5}\text{cm}^2/\text{sec}$. Der Temperaturkoeffizient der Stufenhöhe wird zu $1,5\%$ (bezogen auf den Diffusionsstrom bei 20°C) bestimmt.

Es wird ein Verfahren beschrieben, das die direkte Ablesung der absoluten Sauerstoffkonzentration an der Galvanometerskala gestattet.

Es werden Versuchsanordnungen angegeben, um den Sauerstoffverbrauch wasserlebender Tiere in einer abgeschlossenen Wassermenge und in fließendem Wasser zu bestimmen. Ferner wird eine Methode beschrieben, die zur Bestimmung des Sauerstoffverbrauches isolierten Gewebes geeignet ist.

Literaturverzeichnis

BARTELS, H., 1951: Pflüg. Arch. 254, 107. — BARTELS, H. und BRECHT, K., 1952: Pflüg. Arch. 254, 498. — BARTELS, H., MAYER, H. und MORITZEN, J., 1952: Pflüg. Arch. 255, 294. — BERGGREN, S. M., 1942: Physiol. Scand. 4, Suppl. XI. — DIRSCHERL, W. und BERGMAYER, H. U., 1950: Bioch. Zschr. 321, 68. — FURMAN, N. H. und MURRAY, W. M. jun., 1936: J. Amer. Chem. Soc. 58, 429. — GIGUERE, P. A. und LAUCIER, L., 1945: Canad. J. Res. B 23, 223. — HEYROVSKY, J., 1941: Springer Verlag Wien. — KOLTHORF, J. M. und MILLER, C. S., 1941: J. Amer. Chem. Soc. 63, 1013. — KOLTHOFF, J. M. und Lingane, J. J., 1946: New York. — LAITINEN, H. A., HIGUCHI, T. und CZUHA, M., 1948: J. Amer. Chem. Soc. 70, 561. — STACKELBERG, M. VON, 1950: Berlin. — STACKELBERG, M. VON, 1951: Fschr. chem. Forsch. 2. — WANNER, H., 1945: Helv. Chim. Acta 28, 23. — WIESINGER, K., 1950: Dissertation Zürich. — WINKLER, L. W., 1888: Ber. dtsh. chem. Ges. 21.