

Ueber die Methode der Blutfarbstoffbestimmung mit Hoppe-Seyler's colorimetrischer Doppelpipette.

Von

Dr. Hugo Winternitz,

Assistenten am hygien. Institut in Berlin

(früherem Assistenten am physiol.-chem. Institut in Strassburg).

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut in Strassburg.)
(Der Redaction zugegangen am 7. Februar 1896.)

Im sechzehnten Band dieser Zeitschrift hat F. Hoppe-Seyler die colorimetrische Doppelpipette und die Blutfarbstoffbestimmung mittelst derselben ausführlich beschrieben¹⁾. Seither hat das Colorimeter eine wesentliche Umgestaltung und, wie ich gleich hinzufügen möchte, auch eine wesentliche Verbesserung durch die Anbringung des Albrecht'schen Glaswürfels erfahren. Bezüglich der ausführlichen Beschreibung des Apparates in dieser Gestalt verweise ich auf die Darstellung Hoppe-Seyler's in seinem Handbuch der physiol.-chemischen Analyse und auf die Beschreibung, welche E. Albrecht²⁾ davon gibt. Hier sei nur hervorgehoben, dass durch den Albrecht'schen Glaswürfel eine noch viel schärfere Vergleichung der beiden Farbstofflösungen ermöglicht wird durch die unmittelbare Zusammenstellung der gleichbelichteten Flächen beider Blutlösungen, welche durch die Combination der Doppelpipette mit dem Albrecht'schen Glaswürfel, Collimator und Fernrohr in sehr vollkommener Weise erreicht wird. Das Fernrohr, mit welchem der Collimator verbunden ist, erhöht die Leistungsfähigkeit durch die Vergrößerung der farbigen Bildflächen und ermöglicht eine scharfe Beobachtung der belichteten Flächen, weil nur diese ins Auge gefasst wer-

¹⁾ Verbesserte Methode der colorimetrischen Bestimmung des Blutfarbstoffgehaltes im Blut und in anderen Flüssigkeiten. Diese Zeitschr., Bd. 16, S. 509.

²⁾ Zeitschrift für Instrumentenkunde 1892, Heft 12.

den, während bei der gewöhnlichen Doppelpipette die beiden Lösungen im diffus auffallenden Tageslicht betrachtet werden.

Zur Erzielung guter Resultate ist es unbedingt notwendig, dass das als Lichtquelle benutzte helle Tageslicht (nicht Sonnenlicht) von einer weissen Wand aus in den Apparat reflectirt werde, wozu sich am besten mattes, weisses Papier eignet, das über einen Holzrahmen aufgespannt ist. Dieser wird unter passendem Winkel und möglichst nahe vor dem Apparat aufgestellt. Auch die Anbringung der Glasröhrchen am Apparat, welche durch Heben und Senken die Aufsaugung der Blutlösung in die Kammern der Doppelpipette ermöglichen und in gleicher Weise die unmittelbare Verdünnung und Mischung derselben mit Wasser gestatten, bedeutet eine Verbesserung, worauf ich später noch zurückkommen werde.

Die Angaben von Hoppe-Seyler über die Genauigkeit der Methode¹⁾ beziehen sich auf Erfahrungen, welche mit dem ursprünglich angegebenen Apparate gewonnen wurden. Um nun für die Untersuchung einer Reihe von Fragen, welche vergleichende Hämoglobinbestimmungen betrafen, eine gesicherte Basis zu gewinnen, mussten zunächst die Fehlergrenzen der Methode bei Verwendung des verbesserten Apparates festgestellt werden. Einige Erfahrungen, welche dabei und bei den späteren Hämoglobinbestimmungen über die zweckmässigste Ausführung der Bestimmung gemacht wurden, sollen gleichzeitig eine Besprechung erfahren²⁾.

Um die möglichen Fehler festzustellen, können verschiedene Wege eingeschlagen werden. Vor Allem könnten die Resultate verglichen werden mit den Resultaten, welche bei Verwendung anderer Methoden erhalten werden. Das setzt aber die absolute Richtigkeit der betreffenden anderen Methoden voraus. Davon kann aber in unserem Fall nicht die Rede sein. Nur die spectrophotometrischen Methoden von Vierordt, Hüfner und Anderen wären für diesen

¹⁾ L. c., S. 512.

²⁾ Die vorliegende Arbeit stellt die « eingehende Beschreibung der Verwendung dieses Colorimeters zur Farbenmessung des Bluts und anderer Flüssigkeiten » dar, auf deren Erscheinen E. Albrecht (l. c. S. 418) verweist.

Zweck in Betracht zu ziehen. Ich habe zunächst die absoluten Fehler, beziehungsweise den Grad der erreichbaren Genauigkeit der Methode dadurch festzustellen gesucht, dass ich Hämoglobinbestimmungen in reinen Lösungen von CO-Hämoglobin ausführte und die durch die colorimetrische Methode gewonnenen Resultate mit den für die betreffenden Lösungen gewichtsanalytisch festgestellten Werthen verglich. Es wurde also im speciellen Fall folgendermaassen verfahren:

Aus 500 ccm. defibrinirten Pferdeblutes wurde im December 1894 reines, krystallisirtes Oxyhämoglobin nach dem von Hoppe-Seyler angegebenen Verfahren dargestellt¹⁾. Die gegebenen Vorschriften wurden genau eingehalten, um den Blutfarbstoff frei von Serumeiweissstoffen zu erhalten. Das zuerst erhaltene krystallinische Product wurde dreimal umkrystallisirt. Das solchergestalt viermal krystallisirte Oxyhämoglobin wurde in Wasser gelöst und bei Stubentemperatur mit CO-Gas gesättigt. Mit der filtrirten Lösung wurden mehrere Flaschen von 100 ccm. Inhalt gefüllt und nach abermaligem Einleiten von CO-Gas gut verschlossen. Der Gehalt dieser Lösung an reinem Hämoglobin wurde gewichtsanalytisch zu 2,232 gr. für 100 ccm. der Lösung ermittelt. Eine für die colorimetrische Vergleichung brauchbare Normallösung wurde durch entsprechende Verdünnung mit Wasser (1 Th. Hämoglobininlösung auf 8 Th. Wasser) und nachheriges Einleiten von CO-Gas hergestellt, sie enthielt 0,248% Hämoglobin. Damit wurden verschieden hergestellte Verdünnungen der ursprünglichen Lösung colorimetrisch verglichen. Eine ganze Reihe von Bestimmungen lehrten, dass die mit dem Colorimeter gefundenen Werthe (unter Zugrundelegung der Normallösung von 0,248% Hgb) mit den für die entsprechenden Verdünnungen berechneten gut übereinstimmten. In drei verschieden hergestellten Verdünnungen wurde colorimetrisch 2,325%, 2,28%, 2,30%, im Mittel 2,305% für die ursprüngliche Lösung gefunden, gewichtsanalytisch 2,232%, die Differenz beträgt also bloss 0,07 des procentischen Hämoglobingehaltes. Ich möchte aber gleich hier betonen, dass dieses

¹⁾ Handbuch der physiol.-chem. Analyse, 6. Aufl., S. 247.

überaus günstige Resultat nur für die Exactheit der Methode im Principe Zeugnis ablegt, denn in Praxi, wo wir es nicht mit reinen Hämoglobinlösungen zu thun haben, sondern mit frischem, gerinnungsfähigen Blut, das oft genug nur in sehr geringer Menge zur Verfügung steht, gestalten sich die Verhältnisse wesentlich anders, wovon noch die Rede sein wird.

Nunmehr wurden vergleichende Bestimmungen mit CO-Hämoglobinlösungen verschiedener Jahrgänge gemacht, nicht nur um an einem grossen Material unter verschiedenen Bedingungen die Fehlergrenzen festzustellen, sondern auch von einem anderen Gesichtspunkt aus. Hoppe-Seyler hat auf Grund vieljähriger Erfahrung feststellen können, dass reine CO-Hämoglobinlösungen den Oxyhämoglobinlösungen gegenüber namentlich den Vorzug ausserordentlicher Haltbarkeit besitzen, so dass sie sich viele Jahre spectroscopisch unverändert erhielten.

Es war nun von Interesse, zu untersuchen, ob in solchen CO-Hämoglobinlösungen verschiedenen Alters der dem Hämoglobingehalt entsprechende Farbentiter — wenn ich mich so ausdrücken darf — mit dem Colorimeter festgestellt werden konnte, unso mehr, als es sich bei meinen späteren Versuchen herausstellte, dass die geringste Aenderung in der Farbe einer Hämoglobinlösung, die spectroscopisch absolut unverändert war, bei Vergleichung mit einer Normallösung von etwa 0,20% Hgb im Colorimeter sich deutlich geltend machte. Es war nun in einem solchen Falle überhaupt nicht möglich, colorimetrisch den Hämoglobingehalt einer derartigen Lösung festzustellen, weil bei näherungsweise Verdünnung eine Aenderung der Farbennuance (ins Braune) im Vergleich zur Normallösung deutlich wurde und eine Uebereinstimmung der Farblösungen überhaupt nicht erreichbar war. Wurde die betreffende Lösung dagegen in den früher von Hoppe-Seyler benutzten Gläsern mit planparallelen Wandungen und 10 mm. lichtem Durchmesser mit der Normallösung verglichen, so wurde gute Farbenübereinstimmung erzielt, weil der Unterscheidung feinsten Qualitätsunterschiede der Färbung bei dieser Methode eine Grenze gesetzt ist.

Für die genannten Bestimmungen hatte mir Herr Professor Hoppe-Seyler CO-Hämoglobinlösungen zur Verfügung gestellt, welche von ihm in den Jahren 1885, 1889, 1890 und 1893 dargestellt und seither wohlverschlossen aufbewahrt worden waren, dazu kamen zwei CO-Hämoglobinlösungen, welche im December-Januar und Februar-März 1895 dargestellt waren. Als Normallösung, welche den Ausgangspunkt für die colorimetrische Bestimmung aller übrigen Hämoglobinlösungen bildete, diente die Hgb-Lösung vom März 1895. Durch Wägung wurde der Gehalt an Hämoglobin hier wie bei den anderen Lösungen derart festgestellt, dass je zwei Portionen zu 25 ccm. aus einer Bürette in Platinschalen mit Deckel eingebracht und genau gewogen wurden. Hierauf wurden die Lösungen auf dem Wasserbad zur Trockne abgedampft, im Luftbad bei 105° anhaltend bis zur Gewichtskonstanz (ca. 20 Stunden) getrocknet, der Rückstand über Schwefelsäure erkalten gelassen und gewogen. Nunmehr wurde der Trockenrückstand verascht und der Glührückstand abermals gewogen. Aus den gewonnenen Daten berechnet sich der Gehalt an reinem aschefreien Hämoglobin, unter Zugrundelegung des für Pferdeblut-Oxyhämoglobin bestimmten Eisengehaltes von 0,4% Fe (Hoppe-Seyler) folgendermaßen. Es sei in einem bestimmten Volumen beziehungsweise Gewicht der betreffenden Hgb-Lösung der feste Rückstand = p, die Asche = a, dann ist:

$$(p - a) \frac{100}{99,43} = \text{Hämoglobin aschefrei}^1).$$

Die gewählte Normallösung enthielt in 100 ccm. 0,30 gr. aschefreies Hämoglobin.

¹⁾ Der Glührückstand enthält nebst Spuren fremder Aschebestandtheile alles Eisenoxyd, dessen Eisen dem Hämoglobin zugehört. 0,4 Eisen entsprechen 0,57 Eisenoxyd. Hundert Theile reines Hämoglobin geben 0,57 Glührückstand (da dieser bei reinem Hämoglobin nur aus Eisenoxyd besteht), also einen Glühverlust von 99,43 Theilen. Da 99,43 Theile Glühverlust 100 Theilen Hämoglobin entsprechen, so entsprechen p-a Theile Glühverlust $(p - a) \frac{100}{99,43}$ Theilen Hämoglobin.

Die nachfolgende Tabelle gibt eine Uebersicht über die für die betreffenden Lösungen gewichtsanalytisch gefundenen Werthe. Die Analyse I der Hämoglobinlösung 1885 wurde vor mehreren Jahren von Herrn Professor Hoppe-Seyler ausgeführt und zum Vergleich mit dem jetzt ermittelten Werthe zusammengestellt.

Tabelle I.

Hämoglobinlösung dargestellt.	Trockenrückstand in 100 cbcm.	Asche in 100 cbcm.	Hämoglobin aschefrei in 100 cbcm.
März 1895. . . .	1,8070 gr.	0,0112 gr.	1,8060 gr.
Januar 1895 . . .	2,2302 »	0,0102 »	2,2327 »
December 1893 . .	2,5322 »	0,0184 »	2,5282 »
Juli 1890	4,4820 »	0,0482 »	4,4592 »
Februar 1889 . . .	2,7108 »	0,0258 »	2,7003 »
Januar 1885 . . .	I. 1,5728 »	0,0080 »	1,5737 »
	II. 1,5738 »	0,0092 »	1,5735 »

Die folgende Tabelle (Tab. II) setzt die mit der Doppelpipette ermittelten Werthe in Vergleich zu den gewichtsanalytisch erhaltenen Zahlen. Für diese colorimetrischen Bestimmungen diene, wie oben angegeben, die Hämoglobinlösung vom März 1895 als Normallösung, nachdem sie im Verhältniss 1:5 verdünnt worden war und demnach 0,3% Hämoglobin enthielt.

Tabelle II.

I. Hämoglobinlösung dargestellt.	II. Hämoglobin aschefrei in 100 cbcm. durch Wägung gef.	III. colorimetrisch gef.	III. Differenz.	Bemerkungen.
März 1895. . .	1,8070	1,8109	+ 0,0039	
Januar 1895 . .	2,2302	2,2322	— 0,0020	
December 1893	2,5322	2,5622	+ 0,0300	
Juli 1890 . . .	4,4820	4,4669	— 0,0151	
Februar 1889 .	2,7108	2,8140	+ 0,1040	Keine absolute Farbenübereinstimmung erreichbar.
Januar 1885 . .	1,5738	—	—	Enthält Methämoglobin.

Die in Columne III aufgeführten Zahlen geben das Mittel aus drei unter verschiedenen Bedingungen ausgeführten Be-

stimmungen. Es wurden z. B. von der Hgb.-Lösung 1893 je 5 ccm. mit verschiedenen Wassermengen verdünnt (5:10, 5:18, 5:23). Mit jeder Verdünnung wurde nunmehr die Bestimmung ausgeführt u. zw. erhielt ich die Werthe: 2,568%, 2,562%, 2,557% für die unverdünnte Lösung berechnet, dieselben differiren also im Maximum um 0,027. (Verschiedene Bestimmungen derselben Lösung weichen natürlich noch viel weniger von einander ab.) Der durch Wägung gefundene Hämoglobingehalt der Lösung 1893 betrug 2,5322%. Die Differenz zwischen der gewichtsanalytischen und der colorimetrischen Bestimmung ist also 0,030 vom procentischen Hämoglobingehalte. In denselben Grenzen bewegen sich die Differenzen bei den übrigen Lösungen, ausgenommen die beiden letzten vom Jahre 1889 und 1885. Es wurden somit durch diese vergleichenden Bestimmungen Werthe gefunden, welche beweisen, dass die Hämoglobinlösungen der Jahre 1890—1895 absolut unverändert geblieben waren und welche für die außerordentliche Exactheit der Methode bei Verwendung reiner Hämoglobinlösungen sprechen, so zwar, dass man, ohne einen nennenswerthen Fehler zu begehen, die Bestimmung des Hämoglobin-Gehaltes einer reinen Oxyhämoglobinlösung recht wohl mit dem Colorimeter vornehmen könnte, was natürlich im Vergleich zur Gewichtsbestimmung des Hämoglobins sehr rasch ausgeführt ist. Wenn die colorimetrischen Bestimmungen reiner Hämoglobinlösungen so gut stimmende Resultate ergeben, so liegt dies daran, dass die zu vergleichenden Lösungen absolut klar sind und sich exact abmessen lassen.

Die Hämoglobinlösung Februar 1889 ergab durch Wägung 2,7108 gr. Hämoglobin in 100 ccm., übereinstimmend mit einer Bestimmung, die Herr Prof. Hoppe-Seyler im Jahre 1889 ausgeführt hatte¹⁾. Durch Vergleich mit der Normallösung wurde ein Hämoglobingehalt von 2,8148% festgestellt, also eine recht erhebliche Differenz. Spectroskopisch war die Lösung absolut unverändert, trotzdem konnte keine vollkommene Farbenübereinstimmung mit der Normallösung

¹⁾ Die genauen Zahlenangaben dafür kann ich nicht beibringen, da die betreffende Tabelle in Verlust gerathen ist.

im Colorimeter erzielt werden, was die Bestimmung unsicher machte und die grössere Abweichung erklärt. Die Bestimmung des Gehaltes der Lösung vom Jahre 1885 durch Wägung ergab keine nennenswerthe Differenz gegenüber dem vor mehreren Jahren gleicher Weise festgestellten Werth (Tab. I). Colorimetrisch hingegen war jede Hämoglobinbestimmung unmöglich, denn es war Methämoglobinbildung eingetreten, die sich übrigens in dicker Schichte auch spectroscopisch nachweisen liess. (Wahrscheinlich war der Verschluss der Flasche nicht dicht.) Durch Zusatz von einigen Stückchen faulenden Pankreas trat nach mehreren Wochen Reduction ein und die filtrirte Lösung zeigte keine Spur von Methämoglobin mehr, hatte aber natürlich durch den Zusatz von Pankreas mit Wasser ihren Concentrationsgrad geändert.

Aus einer grossen Zahl von Bestimmungen, welche ich zur zahlenmässigen Feststellung der Fehlergrenzen der Methode mit defibrinirtem Rindsblut angestellt habe, bringe ich in der nachfolgenden Tabelle (Tab. III) einige Angaben. Frisches defibrinirtes Rindsblut wurde mit Wasser in verschiedenen Verhältnissen verdünnt (Columnne I). Columnne II enthält die mit der colorimetrischen Doppelpipette für jede Verdünnung ermittelten Werthe des procentischen Hämoglobingehaltes. Mit diesen Werthen sind in Columnne III die für die Verdünnungen berechneten Werthe in Vergleich gestellt, wenn man der Berechnung den für das unverdünnte Blut ermittelten Hämoglobingehalt von 15,82% zu Grunde legt.

Tabelle III.

I.	II.	III.	IV.
Blutlösung.	°/o Hgb-Gehalt colorimetr. festgestellt.	°/o Hgb-Gehalt auf Grund der Verdünnung berechnet.	Differenz.
Unverdünntes Blut	15,82	—	—
11,5 ccm. Blut und 5 ccm. Wasser	11,18	11,05	0,13
10 ccm. Blut und 1 ccm. Wasser	14,63	14,41	0,22
6 ccm. Blut und 5 ccm. Wasser	8,78	8,65	0,13
6 ccm. Blut und 2 ccm. Wasser	11,94	11,89	0,05

Handelt es sich um die Bestimmung des Hämoglobingehaltes in frischem Blut, namentlich dann, wenn nur wenige Tropfen zur Verfügung stehen, so wird im Wesentlichen der Gang eingehalten, den Hoppe-Seyler dafür angegeben hat. Dass bei dem neuen Apparat das Aufsaugen der verdünnten Blutlösung in die Kammern nicht mehr durch Saugen an den angesetzten Gummischläuchen geschieht, sondern durch Heben und Senken kleiner gläserner Behälter, welche mit kurzen Ansatzröhren der Kammern durch enge Gummischläuche verbunden und neben dem Apparat passend angebracht sind, wurde schon hervorgehoben. Durch Heben und Senken derselben wird die Füllung und Entleerung der Doppelpipette unter Wirbelbildung bewirkt, wodurch eine durchaus vollkommene und gleichmässige Mischung der betreffenden Blutlösung mit dem zugesetzten Wasser erreicht wird.

Zur Aufnahme des Blutes, dessen Hämoglobingehalt bestimmt werden soll, werden entweder die von Hoppe-Seyler angegebenen Cylinder-Glasröhrchen mit Fuss und eingeriebenem Stopfen, welche in $\frac{1}{10}$ cbcm. getheilt sind, verwendet oder auch ganz zweckmässig kleine Messkölbchen mit eingeriebenem Stopfen und Marke am Hals für 10 cbcm. (Steht mehr Blut, etwa 1 cbcm. zur Verfügung, so werden Kölbchen von 20 bis 30 cbcm. Inhalt verwendet.) Es hat sich als vorthellhaft erwiesen, diese Kölbchen von Anfang an mit etwa 1 bis 5 cbcm. (je nach der verwendeten Blutmenge) einer Ammoniumoxalatlösung, der eine Spur Natronlauge zugesetzt ist, zu beschicken; solchergestalt wird jede Gerinnung vermieden und durch den Zusatz von Alkali das Auftreten von Trübungen verhindert, welche durch einen erst später bewirkten Alkalizusatz nicht immer zu beseitigen sind. Statt der Ammoniumoxalatlösung, welche bei längerem Stehen der Proben Trübungen und Niederschläge in den Blutlösungen durch Kalkfällung hervorruft, kann man auch Ammoniumsulfat, Magnesiumsulfat oder Chlornatrium in etwa 5procentiger Lösung verwenden, der man für 100 cbcm. etwa 5 Tropfen einer $\frac{1}{10}$ Normalnatronlauge zugesetzt hat. Man beschickt also das 10 cbcm. fassende Wägekölbchen mit 1—2 cbcm. der schwach

alkalisch reagirenden Salzlösung und ermittelt das genaue Gewicht, dann setzt man, am besten mit einer Pipette, mehrere Tropfen des betreffenden Blutes zu, verschliesst mit dem Stopfen und mischt gut durch leichtes Schwenken des Kölbchens, was hier viel leichter als bei den Cylindergläschen ohne Benetzung des Halses und Stopfens gelingt. Dann wägt man abermals und erfährt so das Gewicht des zugesetzten Blutes. Füllt man nun mittelst einer Pipette die Blutlösung bis zur Marke mit destillirtem Wasser auf, so hat man in 10 cbcm. Lösung die gewogene Blutmenge, man kann dann gut mischen, CO-Gas einleiten und filtriren (was für exacte Bestimmungen durchaus nothwendig ist), ohne irgend kleine Verluste beachten zu müssen. Mit einer Pipette entnimmt man nun der Lösung 2 cbcm., bringt sie in eines der Gläschen am Apparat und durch dessen Hebung in die Kammer (in die andere Kammer bringt man die Normallösung). Aus einer in $\frac{1}{10}$ cbcm. getheilten Quetschhahnbürette fügt man nun tropfenweise mit CO-Gas gesättigtes Wasser zu, bis Gleichheit der Färbung erreicht ist. Glaubt man diese Grenze erreicht zu haben, so thut man gut, durch Zusatz von 1—2 weiteren Wassertropfen dieselbe nach der anderen Richtung zu überschreiten und durch Eintritt einer neuerlichen Differenz in der Intensität der Färbung beider Lösungen die Richtigkeit der Beobachtung zu controliren. Dass bei jedem Wasserzusatz durch oftmaliges Heben und Senken des Röhrchens vollkommene und gleichmässige Mischung, deren Eintritt leicht zu constatiren ist, bewirkt werden muss, braucht kaum hervorgehoben zu werden. Man hat bei Verwendung des 10 cbcm.-Kölbchens, auch wenn kleine Verluste durch das Einleiten von CO-Gas, Filtriren etc. entstanden sind, eine genügende Menge der Lösung, um vier verschiedene Bestimmungen auszuführen. Bei einiger Uebung werden zwei Bestimmungen ausreichend sein.

Bei einer Blutfarbstoffbestimmung kämen also folgende Punkte in Betracht, die ich an einem speciellen Beispiel zusammenstellen will:

1. Gewicht des Mischkölbchens + Ammonoxalatlösung von 4° = 12,0929 gr.

2. Gewicht nach Zusatz mehrerer Tropfen Blut aus der Carotis eines Kaninchens = 12,6229, mit destillirtem Wasser bis zur Marke i. e. zum Volumen von 10 cbcm. aufgefüllt.
3. Durch enges Röhrchen wird CO-Gas 1—2 Minuten lang eingeleitet, nach Aufsetzen des Stopfens gut geschüttelt, bei nicht vollständiger Klarheit filtrirt.
4. Mit einer Pipette füllt man 2 cbcm. in das Gefässchen des Colorimeters.
5. In das andere Gefässchen bringt man die verdünnte, mit CO-Gas gesättigte Normallösung ein (in unserem Falle 0,30% Hgb. enthaltend).
6. Vergleichung der Farben; Ist die Farbe der Mischung dunkler, so lässt man aus der Quetschhahnbürette wenige Tropfen des mit CO gesättigten Wassers zufließen, mischt durch Heben und Senken des Gefässchens und vergleicht u. s. f., wie oben angegeben. In unserem Falle mussten zu 2 cbcm. der Mischung bis zur Uebereinstimmung mit der verdünnten Normallösung noch 2,7 cbcm. Aqu hinzugefügt werden.
7. Berechnung: Zu 2 cbcm. hinzugefügt 2,7 cbcm. Aqu, zu 10 cbcm. wären also 13,5 cbcm. Aqu hinzuzusetzen = 23,5 cbcm. einer Lösung (enthaltend 0,5300 gr. Blut), welche gleichen Hämoglobingehalt hat wie die verdünnte Normallösung (von 0,3% Hgb). Die abgewogenen 0,53 gr. Blut enthalten sonach $23,5 \times 3 = 70,5$ Milligr. oder 13,30% Blutfarbstoff.

Als zweckmässigste Concentration der Normallösung empfiehlt sich nach Hoppe-Seyler 0,25—0,32 CO-Hämoglobin in 100 cbcm. Lösung. Man wird übrigens unbeschadet der Genauigkeit auch unter diese Grenze herabgehen können (was oft genug nöthig ist, wenn die erhaltene Blutlösung heller ist als die Normallösung, in welchem Falle dann die Normallösung mit gemessenen Mengen Wasser verdünnt werden muss, um die Bestimmung auszuführen). Doch hängt dies naturgemäss von der Rothempfindlichkeit des beobachtenden Auges ab.

Die Resultate, welche bei Hämoglobinbestimmungen mit frischem Blut erhalten werden, sind durchaus befriedigende. In einer nicht geringen Zahl von Bestimmungen waren die Fehler 0,1% bis 0,2% und darunter, d. h. wenn in verschiedene Wägegläschen verschiedene Blutmengen eingebracht, zu verschiedenen Volumen verdünnt und zur Hämoglobinbestimmung verwendet wurden, so betrug die Differenzen 0,1—0,2 vom

procentischen Hämoglobingehalt. (Die Fehler der Hämoglobinbestimmungen ein und derselben Lösung sind verschwindend gering). Doch kommen Fehler von 0,5% häufig genug vor, was indess noch immer als ein brauchbares Resultat angesehen werden darf. Ich habe bei meinen späteren Bestimmungen Differenzen bis zu $\frac{3}{4}$ % als zulässig angesehen. (Es wurde immer das Mittel aus mindestens zwei verschiedenen Bestimmungen gezogen.) Die Grösse des Fehlers ist von der Menge des Hämoglobins in der betreffenden Lösung durchaus unabhängig ist, was ich besonders betonen möchte.

Bei der so vielfach geübten Methode der Hämoglobinbestimmungen mit dem Fleischl'schen Hämometer gehören Fehler von 2—3% zur Regel. Dass die Fehler bei der Bestimmung des Hämoglobingehaltes im frischen gerinnungsfähigen Blut, von dem zudem oft nur wenige Tropfen zur Verfügung stehen, grösser sind als bei Verwendung reiner Hämoglobinlösungen oder defibrinirten Blutes, ist leicht verständlich. Die Abwägung des Blutes, die Verdünnung und die Ablesung des zugesetzten Wasservolumens, leichte Trübungen im Vergleich zur Normallösung bedingen diese Fehler, welche demnach nicht so sehr der Methode als solcher als den vorbereitenden Operationen zur Last fallen und mindestens in gleicher Weise auch anderen colorimetrischen Methoden anhaften. « Der vom Auge begangene Fehler ist verschwindend klein im Verhältniss zu den unvermeidlichen und nicht unbedeutenden Fehlern, welche bei der Abmessung des Blutes und der Wasservolumina begangen werden », sagt Leichtenstern¹⁾ rücksichtlich der Vierordt'schen Methode und ich kann nur hinzufügen, dass dies in gleicher Weise von der colorimetrischen Methode Hoppe-Seyler's gilt.

Grössere Abweichungen verschiedener Hämoglobinbestimmungen sind bedingt durch Gerinnungen und stärkere Trübungen, für deren Aufhellung übrigens der Alkalizusatz²⁾ gute

¹⁾ « Untersuchungen über den Hämoglobingehalt des Blutes in gesunden und kranken Zuständen », v. O. Leichtenstern, Leipzig 1878.

²⁾ Vergl. Korniloff, Zeitschr. f. Biologie. Bd. XII, S. 522.

Dienste leistet. Dass trübe Lösungen eine viel grössere Lichtabsorption bewirken, als der gesuchten Hämoglobinmenge entspricht, ist natürlich. Man wird, wenn es irgend angeht, zwei verschiedene Bestimmungen machen und aus der genügenden Uebereinstimmung beider die Beruhigung schöpfen, dass der erhaltene Mittelwerth zuverlässig ist.