

# Über die Lichtextinktion, das Gasbindungsvermögen und den Eisengehalt des menschlichen Blutfarbstoffs in normalen und krankhaften Zuständen.<sup>1)</sup>

Von

**E. E. Butterfield.**

Aus dem physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen und der II. medizinischen Klinik München.)

(Der Redaktion zugegangen am 19. August 1909.)

## Einleitung.

Eine der wichtigsten Fragen für das Verständnis der Blutkrankheiten, Anämie und Polycythämie, ist die nach dem Sauerstoffbindungsvermögen des Blutes. Bevor man jedoch damit beginnt, Versuche über die Gasbindung des pathologischen Blutes anzustellen und aus diesen Versuchen irgend welche Schlüsse zu ziehen, muß man darüber im klaren sein, wie die Verhältnisse bei normalem Blut und bei dem aus normalem Blut dargestellten krystallinischen Farbstoff liegen. Schon hierüber findet man in der Literatur die widersprechendsten Angaben. In einer Reihe von Arbeiten, die sich über einen Zeitraum von 30 Jahren erstrecken, hat Hüfner auf Grund sorgfältiger Versuche den Satz aufgestellt, daß die Lichtextinktion, die Sauerstoffaufnahme und der Eisengehalt des im normalen Blut enthaltenen Hämoglobins zu einander in konstanter Beziehung stehende Größen seien. Den absoluten Wert dieser Größen hat er durch verbesserte Methodik immer genauer zu ermitteln versucht. Gegen diese einfache und wahrscheinliche Anschauung, nach der das Oxyhämoglobin ein einheitliches, scharf charakterisiertes, chemi-

<sup>1)</sup> Die Arbeit wurde mit Unterstützung vom Rockefeller Institute for Medical Research (New-York) ausgeführt.

sches Individuum sei, hat Bohr im Jahre 1891 eine Reihe von Bedenken erhoben. Auf Grund eigener Versuche und unter Heranziehung der älteren einander widersprechenden Angaben über die Menge des von 1 g Hämoglobin gebundenen Sauerstoffs sowie über den Eisengehalt des Hämoglobins, hat Bohr<sup>1)</sup> sich berechtigt gefühlt, «die Aufmerksamkeit auf das Vorkommen verschiedener Modifikationen des Oxyhämoglobins hinzuleiten». Diese Modifikationen sollten sich dadurch charakterisieren, «daß die von ihnen gebundene Sauerstoffmenge für jede von verschiedener Größe ist». Im Gegensatz zu der herrschenden Ansicht über das Hämoglobin weist er nach, «daß das auf gewöhnliche Weise aus dem Blute dargestellte kristallinische Hämoglobin eine Mischung verschiedener einander verwandter Stoffe ist und daß die von demselben per Gramm gebundene Sauerstoffmenge nicht konstant ist». (S. 76.) Über die konstitutiven Unterschiede seiner verschiedenen Hämoglobine sagt Bohr: «Die starken Variationen in dem Eisengehalt und dem Molekulargewicht berühren selbstverständlich nicht notwendig den sauerstoffbindenden, eisenhaltigen, gefärbten Kern des Hämoglobinmoleküls, sondern lassen sich ebensowohl herleiten aus den Variationen des anderen, nicht gefärbten Teiles, des zweiten der beiden Teile, aus denen, wie wir es uns vorstellen, das Hämoglobinmolekül zusammengesetzt ist.» (S. 92.) Bohr geht aber noch viel weiter, indem er, auf eine tabellarische Zusammenstellung seiner Werte der Lichtextinktion, der Sauerstoffaufnahme und des Eisengehaltes verschiedener, durch Zusatz von Äther gewonnenen Hämoglobinpräparate hinweisend, sagt: «Wovon nun die Veränderungen des Eisengehaltes und des Molekulargewichtes herrühren mögen, so geht es ferner aus der Tabelle mit Sicherheit hervor, daß die Zusammensetzung des gefärbten Kernes im Hämoglobin ebensowenig konstant sein kann.» Dieser letzte merkwürdige Schluß steht in schroffstem Widerspruch zu den Untersuchungen von Nencki und seinen Schülern, von Hüfner, Küster und Pregl.

<sup>1)</sup> Die Zitate sind den Arbeiten Bohrs im Skandinavischen Archiv f. Physiologie, Bd. III, 1892, wörtlich entnommen.



Wir wollen uns an dieser Stelle nicht weiter auf den Streit zwischen Hüfner und Bohr einlassen, uns vielmehr darauf beschränken, gegen diesen Satz Bohrs einige neuere Arbeiten aus dem Tübinger Institut anzuführen. Direkte Beweise für die Konstanz des Verhältnisses von Eisengehalt zu Gasbindungsvermögen sind von Hüfner und Küster<sup>1)</sup> und von Pregl<sup>2)</sup> für das Kohlenoxyhämochromogen erbracht worden. Hervorzuheben ist, daß bei diesen Versuchen die in Frage stehende Beziehung durch gravimetrische und volumetrische Methode unter Ausschluß spektrophotometrischer Methoden ermittelt worden ist. Die Resultate dieser Versuche stimmen mit den gasanalytischen Versuchen Hüfners, welchen spektrophotometrische Bestimmungen als Grundlage dienten, vollkommen überein. Damit fällt der von andern öfters erhobene Einwand gegen die quantitative Bestimmung der Hämoglobinderivate mittels des Spektrophotometers.

Die Resultate einer größeren Versuchsreihe über kristallisiertes Hämoglobin faßt Bohr in folgenden Worten zusammen: «Ein aus verschiedenen Blutproben dargestelltes Hämoglobin ist ein Produkt, welches, von der Lage der Absorptionsstreifen abgesehen, in gar keinem wesentlichen Charakterzug konstant ist.» (S. 94.)

Nachdem Bohr den Begriff der Hämoglobine mit verschiedenem Sauerstoffbindungsvermögen aufgestellt hat, läßt er Versuche mit frischem, defibriertem Hundeblood folgen, aus denen er dieselben Schlüsse bezüglich Eisengehalt, Lichtextinktion und Sauerstoffaufnahme zieht, wie er sie schon für den kristallisierten Farbstoff gezogen hat. Diese Schlüsse über «den in den Blutkörperchen noch eingeschlossenen Farbstoff» sind in Bohrs eigenen Worten folgende: «Das Verhältnis zwischen dem Eisengehalt und der Lichtextinktion des Blutes ist in Wirklichkeit kein konstantes» (S. 103), und «die Menge Sauerstoff, welche im Blute einer Einheit absorbierten Lichtes entspricht, ist ganz so veränderlich als die Menge, welche per

<sup>1)</sup> Hüfner und Küster, Arch. f. Anat. u. Physiol., physiol. Abtl., Suppl., 1904, S. 387.

<sup>2)</sup> F. Pregl, Diese Zeitschrift, Bd. XLIV, 1905, S. 173.

Gramm Eisen gebunden ist.» (S. 107.) Diese Zitate lassen, glaube ich, die Ansichten Bohrs über diesen Gegenstand klar erkennen. Ich habe mich mit Absicht auf die diesen Gegenstand berührend experimentellen Arbeiten Bohrs beschränkt, da er sich auf sie in seiner Zusammenstellung, «Blutgase und respiratorischer Stoffwechsel» im Handbuch der Physiologie von Nagel wiederholt beruft, ohne für seine von Hüfner<sup>1)</sup> widerlegten Behauptungen neue Beweise zu bringen.

Diese auf Tierversuche sich stützenden Anschauungen Bohrs sind von mehreren Seiten aufgenommen worden. Die Annahme Bohrs von der Existenz von Hämoglobinen mit verschiedenem Sauerstoffbindungsvermögen bringt es nahe, ähnliche Betrachtungen auf die Menschenpathologie zu übertragen und in der Bildung eines Gemisches von vorwiegend sauerstoffreicheren bzw. sauerstoffärmeren Hämoglobinen bei Anämie und Polycythämie die Möglichkeit eines Kompensationsvorganges zu suchen. Versuche, die dies beweisen sollen, liegen tatsächlich vor. So findet Mohr<sup>2)</sup> bei anämisch gemachten Hunden ein erhöhtes Sauerstoffbindungsvermögen des Blutes und Lommel<sup>3)</sup> ein um fast die Hälfte des normalen Wertes erniedrigtes Sauerstoffbindungsvermögen des Menschenblutes bei Polycythämie. Diesen Arbeiten steht die größere an Menschenblut ausgeführte Untersuchung von Kraus, Kossler und Scholz<sup>4)</sup> gegenüber. Aus ihren Versuchen (Hämoglobin mit dem Glangschen Spektrophotometer, Sauerstoff mit der Blutgaspumpe bestimmt) schließen die genannten Autoren, sie hätten keine Tatsache gefunden, welche den Satz, daß im Blut von gesunden und anämischen Menschen einerlei Hämoglobin vorhanden ist, umstoßen würde. Dieselben Forscher wiesen nach, daß die Sauerstoffkapazität des defibrinierten Blutes anämischer Menschen mit dem auf spektrophotometrischem Wege ermittelten Hämoglobin-

<sup>1)</sup> Hüfner, Arch. f. Anat. u. Physiol., physiol. Abtl., 1894, S. 130.

<sup>2)</sup> Mohr, Zeitschr. f. exp. Pathol. u. Therapie, Bd. II, S. 435.

<sup>3)</sup> Lommel, Deutsch. Arch. f. klin. Med., Bd. LXXXVII, S. 329, Bd. XCII, S. 83.

<sup>4)</sup> Kraus, Kossler und Scholz, Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol., Bd. XLII.

gehalt annähernd parallel abnimmt. Bohr<sup>1)</sup> glaubt die Resultate dieser Autoren anders deuten zu müssen und sieht in den teilweise allerdings ziemlich stark schwankenden Werten nicht etwa methodische Fehler, sondern eine Stütze seiner Anschauungen über die inkonstante Zusammensetzung des Blutfarbstoffs. In neuerer Zeit hat Morawitz<sup>2)</sup> mit der Haldane-Barcroft'schen Ferricyanidmethode der Bestimmung der Sauerstoffkapazität und mit der kolorimetrischen Bestimmung des Hämoglobins eine Parallelität der beiden Werte beim normalen Menschen, bei Anämie und Polycythämie gefunden; die Werte sind indessen keine absoluten.

Die Übersicht über das umfangreiche Versuchsmaterial ist noch weiter erschwert worden durch die neuerdings aufgestellte Behauptung, daß das frische Blut vieler gesunder Tiere methämoglobinartig und daß darin der Grund für die verschiedenen Werte der Sauerstoffbindung zu suchen sei. Durch diese Annahme versucht H. Aron<sup>3)</sup> die Differenzen zwischen den Resultaten Hüfners und Bohrs aufzuklären. Bohr habe keine Konstanz für das Verhältnis zwischen Sauerstoffaufnahme, Lichtextinktion und Eisengehalt gefunden, meint Aron, weil er in einer Gegend des Spektrums gemessen habe, in der das Vorhandensein von Methämoglobin sich am deutlichsten bemerkbar macht, und weil er alle untersuchten Blutproben zur Berechnung des Verhältnisses von Lichtextinktion und Sauerstoffkapazität verwertet habe, während Hüfner sämtliche Blutproben, die nicht seine optische Konstante für Oxyhämoglobin zeigten, zu Gasversuchen nicht verwertet und auf diese Weise Konstanz erreicht habe. Die Behauptung, daß frisches Blut Methämoglobin neben Oxyhämoglobin enthalte, stützt sich hauptsächlich auf eine Reihe von stark schwankenden Messungen mit dem Hüfnerschen Spektrophotometer.

Es sei hier nebenbei bemerkt, daß in Blutproben, die bei richtiger Aufstellung des Hüfnerschen Apparates die gleichen

<sup>1)</sup> Bohr, Nagels Handbuch d. Physiol., Bd. I, S. 98.

<sup>2)</sup> Morawitz und Röhmer, Deutsch. Arch. f. klin. Med., Bd. XCIV, S. 529.

<sup>3)</sup> H. Aron, Biochem. Zeitschr., Bd. III, S. 10.

spektrophotometrischen Werte wie die Aronschen aufweisen, Methämoglobin in Mengen, die sich leicht spektroskopisch nachweisen lassen, vorhanden ist. Bis jetzt hat jedoch noch niemand behauptet, den Methämoglobinstreifen im normalen Blut gesehen zu haben.

Aus diesen sich widerstreitenden Literaturangaben sieht man, wie sehr es nötig ist, darüber Klarheit zu schaffen, wie die Verhältnisse tatsächlich liegen. Bis jetzt liegt weder für normales Blut noch für Blut bei verschiedenen Krankheiten eine größere Untersuchung über Lichtextinktion, Gasbindungsvermögen und Eisengehalt vor. An der Hand einer solchen mit guter Methodik durchgeführten Untersuchung muß es sich leicht entscheiden lassen, ob bestimmte Beziehungen, die auf eine konstante Zusammensetzung des Hämoglobinemoleküls hinweisen, herrschen, oder ob Eisengehalt, Lichtextinktion und Sauerstoffaufnahme in durchaus regelloser Beziehung zu einander stehende Größen sind. Die vorliegende Arbeit gliedert sich daher naturgemäß in drei Teile:

- I. Spektrophotometrischer Teil.
- II. Gasanalytischer Teil.
- III. Eisenbestimmungen.

## I. Spektrophotometrischer Teil.

Geschichtliches und Theoretisches. Die Prinzipien der Spektrophotometrie sind schon von vielen Autoren, namentlich Vierordt, Hüfner, Lambling, Cherbuliez und Saint-Martin, elementar und zusammenfassend dargestellt worden. Trotzdem ist eine kurze Klarlegung der Prinzipien an dieser Stelle notwendig, da neuere Arbeiten<sup>1)</sup> auf diesem Gebiete eine ziemliche Verwirrung in die an sich recht einfachen Ver-

<sup>1)</sup> H. Aron und F. Müller, Arch. f. Anat. u. Physiol., physiol. Abtl., Suppl., S. 109.

H. Aron, Biochem. Zeitschr., Bd. III, S. 1.

F. Müller, Handbuch d. Biochemie, herausgegeben von Oppenheimer, Bd. I, S. 654.

J. Plesch, Hämodynam. Studien, Berlin 1909 (Aug. Hirschwald), S. 53.



hältnisse gebracht haben. Es sei deshalb in aller Kürze an die physikalischen Gesetze der Lichtabsorption und der meßbaren Abschwächung des Lichtes durch Polarisationsvorrichtungen sowie an die Anwendung dieser Gesetze im allgemeinen und im speziellen Fall des Blutfarbstoffs erinnert.

Die Absorption des Lichtes folgt folgenden Gesetzen.

I. Die Menge des durchgelassenen Lichtes ist der des auffallenden proportional.

Hierbei ist von Lichtverlusten durch Reflexion abgesehen. Wenn man sich das auffallende Licht aus parallelen Strahlen homogenen Lichtes denkt, so ist

II. Die Menge des durchgelassenen Lichtes der Schichtdicke des absorbierenden Körpers umgekehrt proportional, oder anders ausgedrückt, gleiche Schichtdicken eines Körpers absorbieren immer den gleichen Bruchteil des auffallenden Lichtes.

Es sei  $J$  die Intensität des auffallenden,  $J'$  die des durchgelassenen Lichtes, dann ist die Proportionalität durch  $\frac{J'}{J} = \alpha$  gegeben, wobei  $\alpha$  eine von der Natur des Körpers und von der Wellenlänge des Lichtes abhängige Konstante ist;  $\alpha$  ist, wie leicht ersichtlich, der Bruch, mit dem man die auffallende Lichtmenge multiplizieren muß, um die Menge des durchgelassenen Lichtes zu erfahren, es ist also  $J' = J\alpha$ . Wenn nun  $\alpha$  der Bruchteil des durchgelassenen Lichtes für eine Einheit der Schichtdicke ist, dann wird  $J'$ , da gleiche Schichtdicken einer Substanz immer gleiche Mengen Licht absorbieren bzw. immer den gleichen Bruchteil hindurchlassen, nach Passieren von 2, 3 oder  $d$  hintereinander stehenden Schichteinheiten  $J\alpha^2, J\alpha^3, \dots, J\alpha^d$  sein.

Die Beziehung

$$J' = J\alpha^d$$

ist der einfachste Ausdruck der Absorptionsgesetze. Die Gleichung macht die Proportionalität der durchgelassenen und der auffallenden Lichtmenge und das geometrische Verhältnis der Lichtschwächung zu der Schichtdicke anschaulich.  $\alpha$  ist ein Zahlenfaktor, der für jeden absorbierenden Körper charakte-

ristisch ist und dessen Wert sich mit der Wellenlänge ändert. Man rechnet in der Photometrie farbiger Substanzen nicht direkt mit der Menge des absorbierten Lichtes, sondern mit einem Koeffizienten, wie  $\alpha$ , der angibt, den wievielten Teil der auffallenden Lichtmenge die absorbierende Substanz noch durchläßt. Im folgenden haben wir es ausschließlich mit Körpern zu tun, bei denen eine auswählende Absorption stattfindet, d. h. mit Körpern, die bei einzelnen Wellenlängen viel stärker absorbieren als bei den übrigen, und die daher farbig erscheinen. Die Anwendung der eben besprochenen Prinzipien zur quantitativen Bestimmungsmethode für farbige Substanzen ergibt sich von selbst. Man kann sich eine beliebig dicke Schicht einer Lösung eines farbigen Körpers aus vielen kleineren gleichgroßen hintereinander stehenden Schichten zusammengesetzt denken. In einem homogenen System sind gleichviel Moleküle in gleichdicken Schichten enthalten. Je mehr absorbierende Moleküle sich dem Gang der Lichtstrahlen in den Weg stellen, desto größer wird, *ceteris paribus*, der Lichtverlust sein. Ob eine ganz bestimmte Anzahl Moleküle auf einer dünneren oder dickeren Schicht verteilt ist, ist für den Effekt — die Größe der Absorption — ganz gleichgültig und deshalb können Schichtdicke und Konzentration miteinander vertauscht werden. Das Absorptionsvermögen eines Körpers ist also der Konzentration bzw. Schichtdicke proportional. Der Beweis hierfür ist zuerst von Beer<sup>1)</sup> erbracht worden.

In der Spektrophotometrie wird  $\alpha$  als Maß der Lichtextinktion nur selten gebraucht. Man bedient sich einer anderen durch Bünsen und Roscoe eingeführten und jetzt fast allgemein eingebürgerten Einheit als Maß der Lichtschwächung. Diese Einheit, der Extinktionskoeffizient, ist lediglich aus rech-

---

<sup>1)</sup> Beer, Poggendorffs Annalen d. Physik, Bd. LXXXVI, S. 78, 1852.

Siehe ferner: Vierordt, Die Anwendung des Spektralapparates usw., Tübingen 1873; E. Müller, Drudes Annalen d. Physik, Bd. XII, S. 767, und F. Grünbaum, ebendas., S. 1004, 1903; Hantzsch und Glover, Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXIX, 4153, 1906; Hantzsch, Ber., Bd. XL, 1556, 1907, und Bd. XLI, 213 und 217, 1908; Hantzsch, Zeitschr. f. physikal. Chemie, 1908.

nerischen Gründen gewählt worden. Die Proportionalität der durchgelassenen Lichtmenge zu der auffallenden ist durch das Experiment für endliche Schichtdicken streng gültig gefunden worden. Man darf annehmen, daß die Proportionalität auch für unendlich kleine Schichtdicken gilt. Geht man von dieser Annahme aus und nennt man  $J$  die Lichtintensität vor der Durchstrahlung,  $J'$  die Lichtintensität nach Durchstrahlung einer Körperschicht von der Dicke  $d$ , und nennt man endlich  $\frac{1}{\epsilon}$  die Dicke der Körperschicht, nach deren Durchstrahlung die Intensität der einfallenden Strahlen auf  $1/10$  herabgesunken ist, so hat man zwischen der durchgelassenen Lichtmenge  $J$  und der Dicke der durchstrahlten Schicht die Gleichung:

$$J' = J \cdot 10^{-\epsilon d}$$

und daraus

$$\epsilon = \frac{1}{d} \log \left( \frac{J}{J'} \right) \text{, } ^1)$$

Wir werden von jetzt ab nur  $\epsilon$  als Maß der Lichtschwächung gebrauchen.

Drücken wir die Lichtextinktion mit  $\epsilon$  aus, dann läßt sich die Proportionalität zwischen dem Lichtextinktionsvermögen eines Körpers und der Konzentration auf die folgende Form bringen:

$$\epsilon_1 : c_1 = \epsilon_2 : c_2 \quad \text{oder}$$

$$\frac{\epsilon_1}{c_1} = \frac{\epsilon_2}{c_2} = \frac{\epsilon_3}{c_3} = \dots = \text{konst.}$$

wobei  $\epsilon_1$ ,  $\epsilon_2$  und  $\epsilon_3$  die zu den Konzentrationen  $c_1$ ,  $c_2$  und  $c_3$  zugehörigen Extinktionskoeffizienten bedeuten. Drücken wir die Konzentration als Grammoleküle im Liter aus, dann erhalten wir das spezifische Lichtextinktionsvermögen eines Körpers. Dieses wird als Molekularextinktion,  $E$ , bezeichnet und ist bei gegebener Wellenlänge eine spezifische Eigenschaft des betreffenden Körpers.

Die Proportionalität kann wiederum ebensogut durch

<sup>1)</sup> Bunsen und Roscoe, Photochemische Untersuchungen, Pogg. Annalen d. Physik, Bd. CI, S. 237.

$$\frac{c_1}{\epsilon_1} = \frac{c_2}{\epsilon_2} = \frac{c_3}{\epsilon_3} = \dots = \text{konst.}$$

zum Ausdruck gebracht werden, nur hat hier natürlich die Konstante einen anderen Zahlenwert. Diese Konstante wird nach Vierordt das Absorptionsverhältnis,  $A$ , bezeichnet.

Die letztere Form,

$$\frac{c_1}{\epsilon_1} = \frac{c_2}{\epsilon_2} = \dots = A,$$

ist die Form, in der das Beersche Absorptionsgesetz am meisten angegeben wird. Wenn man das Absorptionsverhältnis einer Lösung eines farbigen Körpers ermittelt hat, so kann man aus dem Extinktionskoeffizienten die Konzentration anderer Lösungen desselben Körpers berechnen; denn da  $\frac{c}{\epsilon} = A$  ist, so ist  $c = \epsilon A$ . In diesem Fall bedeutet  $c$  immer die Bruttokonzentration.

Messung des Extinktionskoeffizienten. Aus der Beziehung  $\epsilon = \frac{1}{d} \log \frac{J}{J'}$  ersieht man, daß es zur Berechnung des Extinktionskoeffizienten nur nötig ist, das Verhältnis von  $J$  zu  $J'$  zu ermitteln, da die Schichtdicke der Lösung,  $d$ , sich sehr leicht direkt messen läßt. Die Messung des Verhältnisses der beiden Lichtintensitäten kann auf verschiedene Weise vorgenommen werden. Meistens benützt man Licht von nur einer Lichtquelle, um mittels Linsen und Prismen zwei neben- oder übereinander liegende Gesichtsfelder gleichmäßig zu beleuchten. Der Gang der Strahlen wird so angeordnet, daß in den einen Strahlengang die absorbierende Lösung gebracht werden kann, während in dem anderen irgend eine Vorrichtung zur meßbaren Abschwächung des Lichtes sich findet. Im folgenden werden wir es nur mit der Lichtschwächung durch eine Polarisationsvorrichtung zu tun haben. Fällt linear polarisiertes Licht, von der Schwingungsrichtung  $OC$  und der Amplitude  $Oc$  (Fig. 1) auf ein Nicolsches Prisma, dessen Hauptschnitt  $OA$  mit  $OC$  einen Winkel  $\alpha$  bildet, dann wird das Licht in zwei Komponenten  $Oa$  und  $Ob$  zerlegt, von denen nur die im Hauptschnitt schwingende  $Oa$  durchgelassen wird.



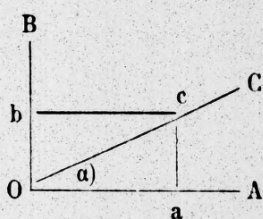


Fig. 1.

Da die Intensität gleich dem Quadrat der Amplitude ist, so ist die Intensität des durchgelassenen Strahles gleich  $\cos^2\alpha$ . Sind OC und OA parallel, so geht alles Licht durch; steht OC senkrecht auf OA, dann geht kein Licht durch. Wenn man zwei Nicols anwendet, so kann man mit dem einen linear polarisiertes Licht erzeugen und mit dem anderen das polarisierte Licht meßbar schwächen. Man trifft die Anordnung so, daß in dem einen Strahlengang die absorbierende Lösung und in dem anderen der polarisierende Nicol sich finden und daß beide Strahlengänge dann den zweiten Nicol durchsetzen; durch Drehung dieses letzteren stellt man auf gleiche Helligkeit der beiden Gesichtsfelder ein. Man dreht von der Stellung aus, bei der die Hauptschnitte der beiden Nicols einander parallel sind, d. h., in der Stellung, wo alles Licht von dem ersten Nicol durch den zweiten ungeschwächt hindurchgeht. Sind in dieser Stellung der Nicolschen Prismen beide Gesichtsfelder vor Einschaltung der absorbierenden Lösung gleich, dann ist nach Einschalten der Lösung die Intensität des durchgelassenen Lichtes gleich  $\cos^2$  desjenigen Winkels, um welchen man die Hauptschnitte der beiden Nicols gegeneinander drehen mußte, um gleiche Helligkeit der beiden Gesichtsfelder zu erzielen. Nehmen wir die auffallende Lichtintensität zu 1 an und arbeiten wir ausschließlich mit einer Schichtdicke von 1 cm (wie es bei dem Hüfnerschen Apparat üblich ist), so erhält die Definitionsgleichung des Extinktionskoeffizienten die folgende einfache Form,

$$\epsilon = -\log \cos^2\alpha = -2 \log \cos\alpha.$$

Andere Vorrichtungen zur meßbaren Schwächung des Lichtes außer den Polarisationsvorrichtungen sind laterale Spaltverengung oder die quadratische Blende und der rotierende Sektor.

Die Absorptionsgesetze gelten nur für homogenes Licht. Um dieses zu erzeugen, wird das Licht durch ein dispergierendes Prisma zerlegt und die Extinktion bei bestimmten Wellenlängen gemessen.

### Anwendung auf das Blut.

1. Quantitative Bestimmung des Oxyhämoglobins im Blut. Da der Extinktionskoeffizient sich auf 1% Genauigkeit mit einem guten Spektrophotometer bestimmen läßt, und da die Herstellung einer Lösung von bekanntem Gehalt an mehrmals umkrystallisiertem Hämoglobin keine allzugroße Schwierigkeit bietet,<sup>1)</sup> kann man das Absorptionsverhältnis  $A$  für den betreffenden Apparat bei gegebener Wellenlänge endgültig bestimmen. Bei den Bestimmungen des Oxyhämoglobingehaltes des Blutes ist es nur nötig, den Extinktionskoeffizienten  $\epsilon$  einer genau verdünnten Lösung mit  $A$  zu multiplizieren, um gemäß der Beziehung,  $c = \epsilon \cdot A$ , natürlich unter Berücksichtigung der Verdünnung die Konzentration zu erfahren. Das Absorptionsverhältnis wird nach Hüfner an zwei Stellen im Spektrum des Oxyhämoglobins bestimmt; bei dem Minimum der Absorption im Gelb, einer mittleren Wellenlänge von  $560 \mu\mu$  entsprechend, und in der Mitte des zweiten Streifens im Grün bei  $538 \mu\mu$ . Mit einem richtig aufgestellten Hüfnerschen Apparat läßt sich das Oxyhämoglobin im Blut auf 2,5% Genauigkeit bestimmen.

2. Charakterisierung eines Körpers. Mit Rücksicht auf das große Molekulargewicht des Hämoglobins und die damit verbundene Unsicherheit bei seiner Bestimmung hat man bis jetzt die Molekularextinktion nicht als spezifische Eigenschaft des Blutfarbstoffs herangezogen. Vielmehr hat Hüfner zur

---

<sup>1)</sup> Man ist allerdings gezwungen, zur Herstellung der Lösung einen Umweg einzuschlagen. Da das Oxyhämoglobin nicht vollständig getrocknet werden kann, ohne sich teilweise in Methämoglobin umzuwandeln, stellt man die Lösung in der Weise dar, daß man den feuchten Krystallbrei nach möglichst vollständiger Befreiung von der Mutterlauge durch Zentrifugieren in Wasser löst und in einem Teil der Lösung den Trockenrückstand bestimmt.

Charakterisierung des Hämoglobins von einem anderen sehr einfachen optischen Verfahren Gebrauch gemacht. Wie oben erwähnt wurde, wird das Absorptionsverhältnis für das Oxyhämoglobin immer für zwei Regionen im Spektrum ermittelt. Jedes dieser Absorptionsverhältnisse stellt eine Konstante dar, und die Konzentrationsberechnung muß gleich ausfallen, gleichgültig welches A und der dazugehörige Extinktionskoeffizient der Berechnung zugrunde gelegt werden. Es ist also,

$$c = A\epsilon = A'\epsilon',$$

wobei im speziellen Fall der Blutfarbstoffe A das Absorptionsverhältnis für die Region  $554 \mu\mu - 565 \mu\mu$  und  $\epsilon$  der in dieser Gegend gemessene Extinktionskoeffizient sind, und A' das Absorptionsverhältnis für  $531,5 \mu\mu - 542 \mu\mu$  und  $\epsilon'$  der Extinktionskoeffizient in dieser Region. Daraus erhalten wir  $\frac{A}{A'} = \frac{\epsilon'}{\epsilon}$ .

Für eine beliebige andere Konzentration  $c_2$  haben wir ebenfalls  $A\epsilon_2 = A'\epsilon'_2 = c_2$  und wieder daraus  $\frac{A}{A'} = \frac{\epsilon'_2}{\epsilon_2}$ ; folglich

ist  $\frac{\epsilon'}{\epsilon} = \frac{\epsilon'_2}{\epsilon_2}$ . Man ersieht hieraus, daß der Quotient zweier

an verschiedenen Stellen im Spektrum gemessenen Extinktionskoeffizienten eine Konstante ist, die unabhängig von der Konzentration und charakteristisch für den betreffenden Farbstoff ist. Für die verschiedenen Blutfarbstoffe ist der Zahlenwert des Quotienten verschieden und eben deshalb ein sehr wichtiges Hilfsmittel zu ihrer Identifizierung. Unter den Hüfnerschen Versuchsbedingungen (Breite des Eintrittsspalt  $1/40$  mm, Spektralgegend wie oben angegeben, Rauchglaskeil auf 0,5) ist der Wert des Quotienten z. B. für Oxyhämoglobin 1,58, für Methämoglobin 1,19, Kohlenoxydhämoglobin 1,10 und für das reduzierte Hämoglobin 0,76.

3. Gleichzeitige quantitative Bestimmung zweier Farbstoffe im Blut. Das Prinzip beruht darauf, daß, wenn man zwei Farbstofflösungen, die nicht chemisch miteinander reagieren, mischt, die Extinktion des Gemisches die algebraische Summe der Extinktionen der Komponenten darstellt. Wenn man bei 2 verschiedenen Wellenlängen mißt, am besten dort,

wo die Extinktionen der beiden Farbstoffe möglichst voneinander verschieden sind, kann man nach Vierordt aus den Extinktionskoeffizienten des Gemisches und den Absorptionsverhältnissen beider Farbstoffe zwei Gleichungen mit zwei Unbekannten aufstellen, und nach der einen oder der anderen Unbekannten auflösen. Damit ist die Möglichkeit gegeben, aus einer Lichtextinktionsmessung in zwei Regionen im Spektrum den absoluten Gehalt einer Lösung an zwei Farbstoffen zu berechnen. Voraussetzung dabei ist die Kenntnis von den vier Absorptionsverhältnissen.

Bei physiologischen Arbeiten kommt es nicht so häufig darauf an, die absolute Menge der beiden Farbstoffe als vielmehr den prozentualen Gehalt der Lösung an beiden Körpern zu erfahren. Für die Hämoglobinderivate hat Hüfner das Mischungsverhältnis zwischen 2 Derivaten aus Änderung des Quotienten  $\frac{\epsilon'}{\epsilon}$  abgeleitet. Hat man, beispielsweise, ein Gemisch von Oxyhämoglobin,  $\frac{\epsilon'}{\epsilon} = 1,58$ , und reduziertem Hämoglobin,  $\frac{\epsilon'}{\epsilon} = 0,76$ , dann muß der Quotient des Gemisches einen Wert haben, der zwischen diesen beiden Zahlen liegt. Man kann mit Hilfe einer Interpolationsformel die Prozente Oxyhämoglobin oder Hämoglobin für alle zwischenliegende Werte von  $\frac{\epsilon'}{\epsilon}$  berechnen. Tabellen mit diesen Werten für Gemische von Oxyhämoglobin und reduziertem Hämoglobin, Oxyhämoglobin und Kohlenoxydhämoglobin und Oxyhämoglobin und Methämoglobin sind schon von Hüfner<sup>1)</sup> angegeben worden.

#### Experimentelles.

Nach den Absorptionsgesetzen stellt der Quotient  $\frac{\epsilon'}{\epsilon}$  für chemisch einheitliche Stoffe eine Konstante dar. Er ist daher für das Studium des Blutfarbstoffes außerordentlich wichtig. Wenn das normale mit Sauerstoff gesättigte Blut nur einen

<sup>1)</sup> Hüfner, Arch. f. Anat. u. Physiol., physiol. Abtl., 1899, S. 39.



Farbstoff enthält und dieser eine einheitliche Zusammensetzung hat, dann muß  $\frac{\epsilon'}{\epsilon}$  bei gleich bleibenden Versuchsbedingungen immer denselben Wert haben, und zwar sowohl für das frische Blut, als auch für das aus dem Blut krystallinisch dargestellte Oxyhämoglobin. Konstanz der Beziehung  $\frac{\epsilon'}{\epsilon}$  für das krystallinische Oxyhämoglobin wie auch für das Blut verschiedener Tiere ist von Hüfner und seinen Schülern, von Lambling, Cherbuliez und Saint-Martin, gefunden worden. Dagegen ist von Bohr und seinen Mitarbeitern eine Inkonstanz des Lichtextinktionsvermögens des Blutfarbstoffes behauptet worden. Ferner haben die Untersucher im Zuntz'schen Laboratorium, insbesondere H. Aron, F. Müller und J. Plesch, nicht nur Inkonstanz für  $\frac{\epsilon'}{\epsilon}$  gefunden, sondern sie haben auch eine wesentlich niedrige Zahl als Durchschnittswert dieses Quotienten angegeben, als Hüfner und andere ihn gefunden haben. Ohne zunächst auf eine Erklärung dieser widersprechenden Resultate einzugehen, möge zuerst eine Reihe von eigenen Bestimmungen des Wertes für  $\frac{\epsilon'}{\epsilon}$  an normalem Blut verschiedener Tiere und an Lösungen von Oxyhämoglobin, das aus einigen dieser Blutproben dargestellt wurde, sowie einige Bestimmungen an normalem und pathologischem Menschenblut und Menschenhämoglobin angeführt werden. Hier sei ausdrücklich betont, daß die Zahlen keine ausgesuchten sind, sondern daß sie die laufenden täglichen Untersuchungen von Blutproben, die nachher zu Gasversuchen, Hämoglobindarstellung usw. verwendet wurden, darstellen. (Tab. I.)

Aus dieser Tabelle geht mit Sicherheit hervor, daß der Wert von  $\frac{\epsilon'}{\epsilon}$  bei gleich gehaltenen Versuchsbedingungen ein durchaus konstanter ist. Diese Konstanz gilt nicht nur für das frische normale Blut vom Menschen und von Tieren, sondern auch für das Menschenblut bei den wichtigsten Blutkrankheiten, wie Polycythämie, Chlorose, perniziöse Anämie und Skorbut.

Tabelle I.

$\varphi$  und  $\varphi'$  bedeuten die Drehungswinkel des analysierenden Nicols in den Regionen  $564,6 \mu\mu$  —  $556,1 \mu\mu$  und  $542 \mu\mu$  —  $533,5 \mu\mu$ ;  $\epsilon$  und  $\epsilon'$  sind die daraus berechneten Extinktionskoeffizienten.

## Rinderblut.

$\epsilon$	$\epsilon'$	$\frac{\epsilon'}{\epsilon}$	$\varphi$ Grad	$\varphi'$ Grad
0,563	0,883	1,57	58,45	68,80
0,943	1,51	1,60	70,27	79,83
0,642	1,04	1,62	61,49	72,40
0,848	1,33	1,57	67,49	77,48
0,587	0,931	1,59	59,41	69,99
0,673	1,07	1,59	62,55	73,08
0,607	0,974	1,60	60,17	70,98
0,737	1,17	1,59	64,64	74,99
0,498	0,783	1,57	55,69	66,05
0,522	0,827	1,58	56,76	67,30
0,403	0,642	1,59	51,06	61,47
0,560	0,884	1,58	58,33	68,82
0,622	0,988	1,59	60,75	71,29
0,655	1,04	1,59	61,95	72,39
0,685	1,07	1,56	62,97	73,11
0,527	0,833	1,58	56,96	67,47
0,549	0,860	1,57	57,90	68,19
0,587	0,920	1,57	59,43	69,72
0,469	0,741	1,58	54,35	64,78
0,506	0,795	1,57	56,04	66,39
0,493	0,782	1,59	55,47	66,02
0,589	0,928	1,58	59,51	69,90
0,619	0,980	1,58	60,65	71,13
0,680	1,07	1,57	62,80	72,93
0,429	0,682	1,59	52,40	62,86
0,488	0,772	1,58	55,26	65,71
0,709	1,12	1,58	63,77	73,95
0,731	1,14	1,56	64,47	74,44
0,465	0,732	1,57	54,17	64,51
0,627	0,999	1,59	60,94	71,55

Tabelle I.  
Rinderblut.

Fortsetzung.

$\epsilon$	$\epsilon'$	$\frac{\epsilon'}{\epsilon}$	$\varphi$ Grad	$\varphi'$ Grad
0,509	0,802	1,58	56,17	66,60
0,633	0,996	1,57	61,16	71,48
0,607	0,948	1,56	60,18	70,39
0,550	0,865	1,57	57,95	68,33
0,737	1,17	1,59	64,67	74,87
0,514	0,807	1,57	56,41	66,74
0,671	1,06	1,58	62,49	72,81
0,576	0,901	1,56	58,98	69,25
0,596	0,937	1,57	59,76	70,11
0,444	0,701	1,58	53,13	63,49
0,640	0,990	1,55	61,41	71,35
0,625	0,992	1,59	60,84	71,38
0,697	1,10	1,58	63,38	73,70
0,663	1,05	1,58	62,20	72,64

	$\epsilon$	$\epsilon'$	$\frac{\epsilon'}{\epsilon}$	$\varphi$ Grad	$\varphi$ Grad
--	------------	-------------	------------------------------	-------------------	-------------------

## Blut von verschiedenen Tieren.

Huhn . . . . .	0,569	0,918	1,61	58,72	69,67
Ratte . . . . .	0,888	1,45	1,63	68,92	79,09
Kaninchen . . . . .	0,481	0,759	1,57	54,91	65,36
Pferd . . . . .	0,637	1,00	1,57	61,28	71,64

## Blut von gesunden und kranken Menschen.

Gesunder . . . . .	0,805	1,25	1,55	66,68	76,34
	0,885	1,38	1,56	68,84	78,17
Gicht . . . . .	0,560	0,887	1,58	58,36	68,88
Nephritis . . . . .	0,645	1,02	1,58	61,58	72,00
	0,764	1,22	1,59	65,48	75,82
Herzklappenfehler . . . . .	0,697	1,08	1,55	63,38	73,20
	0,479	0,759	1,58	54,80	65,32
Hemiplegie . . . . .	0,655	1,03	1,57	61,92	72,16
	0,761	1,19	1,56	65,40	75,20

Tabelle I.

Fortsetzung.

	$\epsilon$	$\epsilon'$	$\frac{\epsilon'}{\epsilon}$	$\Phi$ Grad	$\Phi$ Grad
<b>Blut von gesunden und kranken Menschen.</b>					
Polycythämie I. . . . .	0,639	1,01	1,58	61,36	71,88
	0,770	1,23	1,60	65,66	76,00
Polycythämie II. . . . .	0,617	0,974	1,58	60,56	70,98
	0,702	1,12	1,59	63,54	73,96
Polycythämie III. . . . .	0,644	1,01	1,57	61,56	71,84
	0,708	1,13	1,60	63,74	74,10
Polycythämie IV. . . . .	0,605	0,952	1,57	60,12	70,48
	0,696	1,11	1,59	63,32	73,82
Chlorose I. . . . .	0,489	0,773	1,58	55,30	65,74
	0,767	1,22	1,59	65,56	75,80
Chlorose II. . . . .	0,930	1,49	1,60	69,96	79,60
	0,721	1,13	1,57	64,14	74,10
Chlorose III. . . . .	0,897	1,43	1,59	69,14	78,90
	0,608	0,945	1,56	60,18	70,32
Perniciöse Anämie (H) . .	0,802	1,27	1,58	66,60	76,56
	0,705	1,11	1,57	63,64	73,80
Perniciöse Anämie (M) . .	0,884	1,40	1,58	68,80	78,44
	0,647	1,01	1,56	61,64	71,84
Skorbut . . . . .	0,787	1,26	1,60	66,16	76,50
	0,697	1,12	1,59	63,38	73,94
Pseudoleukämie . . . . .	0,867	1,36	1,57	68,36	77,96
	<b>Krystallisiertes Oxyhämoglobin.</b>				
Aus Rinderblut I. . . . .	0,640	1,01	1,58	61,37	71,69
	0,797	1,27	1,59	66,45	76,59
Aus Rinderblut II. . . . .	0,442	0,700	1,58	53,04	63,48
	0,521	0,818	1,57	56,70	67,05
Aus Rinderblut III . . . .	0,654	1,05	1,61	61,90	72,52
	0,908	1,41	1,55	69,42	78,68
Aus Pferdeblut . . . . .	0,620	0,968	1,56	60,66	70,84
	0,718	1,13	1,57	64,06	74,17
Aus Menschenblut . . . . .	0,553	0,863	1,56	58,06	68,26
	0,630	0,995	1,58	61,05	71,45
	0,758	1,18	1,56	65,30	75,16
	0,806	1,25	1,55	66,72	76,30



Abgerundete Mittelwerte für  $\frac{\epsilon'}{\epsilon}$  bei verschiedenen Blut- und Hämoglobinarten.

Rinderblut (25 Tiere)	1,58
Menschenblut (16 Fälle)	1,58
Rinderhämoglobin (3 Darstellungen)	1,58
Menschenhämoglobulin (1 Darstellung)	1,56
Pferdehämoglobin (1 Darstellung)	1,57
Sonstige einzelne Bestimmungen:	
Hühnerblut	1,61
Rattenblut	1,63
Kaninchenblut	1,57
Pferdeblut	1,57

Gesamtmittel . . . . 1,58

(Aus 88 Bestimmungen an 50 Blut- und Hämoglobinproben.)

Noch einmal sei betont, daß die Rinderblutproben 25 konsequente Lieferungen vom Tübinger Schlachthof sind; die Werte stellen daher keine Auslese dar.

Der Zahlenwert von  $\frac{\epsilon'}{\epsilon}$  bei der genannten Versuchsanordnung

(Breite des Eintrittspaltes  $\frac{1}{40}$  mm, Rauchglaskeil auf 0,0, herausgeschnittenes Spektralgebiet  $564,6 \mu\mu$ — $556,1 \mu\mu$  und  $542 \mu\mu$ — $533,5 \mu\mu$  ist für Blut von verschiedenen Tieren, für normales und pathologisches Menschenblut sowie auch für krystallisiertes Menschen-, Pferde- und Rinderoxyhämoglobin 1,58.

Erst nachdem man sich überzeugt hatte, daß das Oxyhämoglobin sich jedenfalls seinem Spektralverhalten nach als ein einheitlicher Körper verhält, hatte es einen Sinn, seine quantitative Bestimmung auf optischem Weg vorzunehmen. Hierzu brauchten wir noch die Kenntnis des Absorptionsverhältnisses A. Obwohl diese Größe schon von Hüfner und anderen mehrmals bestimmt worden ist, war es aus zwei Gründen trotzdem notwendig, dieses Verhältnis von neuem zu bestimmen.

1. Das Absorptionsverhältnis ist von dem relativen Wert von  $\epsilon$  abhängig; der relative Wert von  $\epsilon$  hängt wiederum von dem Lichtverlust im Apparat ab, da  $\epsilon$  durch das Verhältnis  $J/J'$  bestimmt ist. Es ist deshalb möglich, daß man mit zwei verschiedenen Apparaten an ein und derselben Lösung verschiedene Werte für  $\epsilon$  finden kann. Auch A muß in diesem

Fall für die beiden Apparate verschiedene Werte haben. So erklärt es sich, daß man mit verschiedenen Apparaten übereinstimmende Resultate bei quantitativen Bestimmungen erhält, während A nicht notwendig den gleichen Wert bei jedem Apparat zu haben braucht.

So fand v. Noorden<sup>1)</sup> mit dem ersten Hüfnerschen Spektrophotometer das Absorptionsverhältnis des Hundehämoglobins bei einem Spektralbezirk von  $569,4 \mu\mu$ — $556,3 \mu\mu$  zu  $132 \cdot 10^{-5}$ ; Otto<sup>2)</sup> mit demselben Apparat in Tübingen das Absorptionsverhältnis des Schweinehämoglobins im gleichen Spektralgebiet  $135 \cdot 10^{-5}$ , in Christiania<sup>3)</sup> aber mit einem anderen Hüfnerschen Apparat das Absorptionsverhältnis des Hundehämoglobins ebenfalls bei  $569,4 \mu\mu$ — $556,3 \mu\mu$  zu  $188 \cdot 10^{-5}$  und mit dem Vierordtschen Spektrophotometer zu  $144 \cdot 10^{-5}$ . Hüfner<sup>4)</sup> selber hat das Absorptionsverhältnis mit seinem ersten Apparat im genannten Spektralgebiet zu  $147 \cdot 10^{-5}$  und mit seinem neuen Apparat in einem etwas engeren Spektralgebiet zu  $207 \cdot 10^{-5}$  bestimmt. Mit Ausnahme des letzteren Wertes sind alle anderen Werte ohne Angabe über die Breite des Eintrittsspaltens und den Stand des Rauchglaskeiles mitgeteilt. Wie wir sehen werden, sind diese zwei Faktoren von großem Einfluß auf den Wert des Extinktionskoeffizienten und somit auch auf A.

2. Da unsere Versuche zum Endziel hatten, das Blut gesunder und kranker Menschen zu untersuchen, so brauchten wir natürlich das Absorptionsverhältnis für menschliches Oxyhämoglobin. Dieses war bisher nicht bekannt, mußte aber, wenn wir absolute Hämoglobinbestimmungen im Menschenblut machen wollten, bestimmt werden.

Tabelle II gibt die mit dem neuesten Hüfnerschen Spektrophotometer (1907) — dieses unterscheidet sich von den anderen Hüfnerschen Apparaten bloß dadurch, daß die Nicolschen

<sup>1)</sup> v. Noorden, Diese Zeitschrift, Bd. IV.

<sup>2)</sup> J. Otto, Diese Zeitschrift, Bd. VII.

<sup>3)</sup> J. Otto, Pflügers Archiv, Bd. XXXVI, S. 18 und 23.

<sup>4)</sup> G. Hüfner, Diese Zeitschrift, Bd. III, und Arch. f. Anat. u. Physiol., physiol. Abtl., 1894.

Prismen und die Ausführung der mechanischen Teile besser sind — bei unserer Versuchsanordnung gewonnenen Zahlen für das Absorptionsverhältnis von Menschen- und Rinderhämoglobin. Als Anhang dazu geben wir noch das Resultat einer Bestimmung des Absorptionsverhältnisses von Methämoglobin in alkalischer Lösung bei einer mittleren Wellenlänge von  $560 \mu\mu$ , in der Region, wo Methämoglobin die gleiche Lichtextinktion wie Oxyhämoglobin zeigt.

Über die Ausführung der Bestimmung ist folgendes zu bemerken. Das Rinderhämoglobin wurde im wesentlichen nach dem Verfahren von Hoppe-Seyler dargestellt; das Menschenhämoglobin wurde aus gesundem Menschenblut durch Ausfällen mit Ammoniumsulfat krystallinisch gewonnen.

Das Rinderblut wurde durch Schlagen defibriniert, koliert und bei 2000 bis 2400 Umdrehungen in der Minute zentrifugiert. Das Serum und die Leukocyten-schicht wurden von dem Blutkörperchenbrei abgehebert. Der Brei von roten Blutkörperchen wurde in möglichst wenig ausgekochtem Wasser (ev. bei  $30^{\circ}$ ) gelöst. Das lackfarben gemachte Blut wurde nach Abkühlung auf  $0^{\circ}$  mit  $\frac{1}{2}$  Volumen Äther in einem Scheidetrichter kräftig geschüttelt. Nach Trennung der Schichten wurde die wässrige Blutlösung abgelassen und durch einen Strom gewaschener Luft vom Äther befreit. Zu der wässrigen Blutlösung wurden dann wieder nach Abkühlung auf  $0^{\circ}$   $\frac{1}{4}$  Volumen abgekühlten Alkohols unter fortwährendem Umschütteln gegeben. Das ganze Gemisch wurde dann in eine Kältemischung gestellt, bis die Oxyhämoglobinkrystalle sich abgeschieden hatten. Nach vollständiger Ausscheidung der Krystalle wurden sie von der Mutterlauge durch Zentrifugieren getrennt, der Krystallbrei in möglichst wenig Wasser gelöst und durch Alkoholzusatz und Abkühlen wieder zum Krystallisieren gebracht. In dieser Weise wurde das Oxyhämoglobin mehrmals umkrystallisiert.

Beim Menschenblut gelang es nicht, das Hämoglobin durch Alkoholzusatz und Abkühlen zum Krystallisieren zu bringen, wohl aber durch Ausfällen mit Ammoniumsulfat. Das auf diese Weise erhaltene Menschenhämoglobin wurde auf dem Filter mit kaltem Wasser gewaschen und wieder gelöst. Von der

Lösung des einmal krystallisierten Oxyhämoglobins wurden in aliquoten Teilen die Lichtextinktion, der Trockenrückstand und der  $\text{SO}_4$ -Gehalt bestimmt. Nach Abzug des prozentischen  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Gehaltes von dem Trockenrückstand erhält man die Hämoglobinkonzentration der Lösung; es wurde selbstverständlich bei dieser Bestimmung nur bei Zimmertemperatur über Schwefelsäure im Vakuum getrocknet.

Tabelle II.

Das Absorptionsverhältnis von verschiedenen Hämoglobinpräparaten.

Art des Hämoglobins	Konzentration in 1 ccm	Extinktionskoeffizient bei $564,6 \mu\mu$ — $556,1 \mu\mu$	Absorptionsverhältnis	Mittelwert des Absorptionsverhältnisses
Oxyhämoglobin aus Rinderblut, einmal umkrystallisiert	$0,8164 \cdot 10^{-3}$	0,442	$1,85 \cdot 10^{-3}$	$1,87 \cdot 10^{-3}$
	$0,9716 \cdot 10^{-3}$	0,521	$1,87 \cdot 10^{-3}$	
	$1,447 \cdot 10^{-3}$	0,767	$1,90 \cdot 10^{-3}$	
Oxyhämoglobin aus Rinderblut, zweimal umkrystallisiert	$0,8648 \cdot 10^{-3}$	0,455	$1,90 \cdot 10^{-3}$	$1,87 \cdot 10^{-3}$
	$1,081 \cdot 10^{-3}$	0,590	$1,83 \cdot 10^{-3}$	
	$1,235 \cdot 10^{-3}$	0,669	$1,85 \cdot 10^{-3}$	
	$1,729 \cdot 10^{-3}$	0,908	$1,91 \cdot 10^{-3}$	
Oxyhämoglobin aus Menschenblut, erste Krystallisation	$1,055 \cdot 10^{-3}$	0,553	$1,91 \cdot 10^{-3}$	$1,89 \cdot 10^{-3}$
	$1,51 \cdot 10^{-3}$	0,806	$1,87 \cdot 10^{-3}$	
Methämoglobin aus Oxyhämoglobin vom Schwein	$1,44 \cdot 10^{-3}$	0,773	$1,86 \cdot 10^{-3}$	$1,86 \cdot 10^{-3}$

Die Extinktionskoeffizienten bei  $542 \mu\mu$ — $533,5 \mu\mu$  und das Absorptionsverhältnis für diese Region sind nicht besonders angeführt, da das letztere sich aus der Tabelle des Quotienten für die Hämoglobinpräparate und aus dem Absorptionsverhältnis für die Region  $564,6 \mu\mu$ — $556,1 \mu\mu$  ergibt. Um das Absorptionsverhältnis bei  $542 \mu\mu$ — $533,5 \mu\mu$  zu erhalten, braucht man nur das Absorptionsverhältnis für die andere Region durch



den Wert des Quotienten  $\frac{\epsilon'}{\epsilon}$  für das betreffende Präparat zu dividieren. Es ist im Mittel  $1,18 \cdot 10^{-3}$ .

Die Trockenbestimmungen wurden in Drechselschen Enten gemacht. Die Lösungen wurden zuerst im Vakuumexsikkator über Schwefelsäure bis zur Trockene eingengt und dann bis zur Gewichtskonstanz in einer Wasserstoffatmosphäre bei  $110^\circ$  getrocknet.<sup>1)</sup>

Vergleichen wir nun unsere konstanten Werte für  $\frac{\epsilon'}{\epsilon}$  bei Blut- und Hämoglobinlösungen und die übereinstimmenden Werte des Absorptionsverhältnisses von Rinderhämoglobin verschiedener Darstellungen und von Menschenhämoglobin mit den inkonstanten Zahlen anderer, so drängt sich uns die Frage auf: Wie sind diese Verschiedenheiten zu erklären? Wir wollen zuerst alle Faktoren, die auf den Wert der beiden Extinktionskoeffizienten von Einfluß sein könnten, näher betrachten. Zunächst sei an die Konstruktion des Hüfnerschen Spektrophotometers<sup>2)</sup> kurz erinnert.

Der Apparat hat die äußere Form eines großen Spektralapparates und besteht, wie dieser, aus einem Kollimatorrohr und einem um das Dispersionsprisma um eine vertikale Achse

<sup>1)</sup> Hierbei stellte es sich im Gegensatz zu H. Aron und F. Müller (loc. cit., S. 121) heraus, daß es gleichgültig ist, ob man nur bei Zimmertemperatur über Schwefelsäure oder bei  $110^\circ$  im Wasserstoffstrom trocknet. 1,9899 g feuchten Krystallbreies wogen bis zur Gewichtskonstanz im Vakuumexsikkator über Schwefelsäure getrocknet 0,9790 g, nach 4stündigem Erhitzen in einer Wasserstoffatmosphäre bei  $110^\circ$  0,9780 g, nach 7stündigem Erhitzen 0,9764 g und nach 11 Stunden 0,9764 g. Ein Verlust von 0,3% nach 11 Stunden im Toluolbad; auf den Trockengehalt des Krystallbreies berechnet, erhält man statt 49,21% 49,08%. Ferner gaben 25 ccm einer Hämoglobinlösung bis zum konstanten Gewicht im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet einen Rückstand von 1,3750 g, nach 4stündigem Erhitzen im Wasserstoffstrom bei  $110^\circ$  ein Gewicht von 1,3753 g. Das rückständige Hämoglobin war in feinen Bröckelchen über eine größere Glasfläche verteilt und nach dem Erreichen des konstanten Gewichtes über Schwefelsäure (einige Wochen) verlor es auch bei höherer Temperatur nichts mehr an Gewicht.

<sup>2)</sup> Hüfner, Zeitschr. f. physikal. Chem., Bd. III, S. 562, 1889.

drehbaren Fernrohr. An einem Sektor eines Teilkreises kann der Stand des Fernrohres in seiner Beziehung zum Prisma abgelesen werden. Die Beleuchtungsvorrichtung ist eine Auerlampe, die von einem geschwärzten Tonzylinder, die gegen den Apparat zu eine runde Öffnung trägt, umgeben ist. Eine Sammellinse ist in einem Metallansatz vor der Öffnung des Tonzylinders so angebracht, daß die am stärksten glühende Partie des Strumpfes in ihrem Brennpunkt steht. Das Ganze ist auf einer optischen Bank befestigt.

Außerdem ist vor dem Eintritts- (Kollimator-)spalt der sogenannte Albrechtsche Körper angebracht. Dieser ist ein Glashombus, der als brechendes Prisma wirkt und die Vergleichsfelder im Apparat erzeugt. Der Rhombus ist so gestellt, daß eine durch zwei seiner gegenüberliegenden horizontalen Kanten gedachte Ebene senkrecht auf dem Eintrittsspalt steht und diesen in zwei übereinander stehende Spalthälften trennt. Vor der unteren brechenden Fläche des Rhombus steht ein Nicolsches Prisma; vor der oberen brechenden Fläche ein verstellbarer Rauchglaskeil. Das Absorptionsgefäß ist in einem Stativ, das zwischen der Lampe und dem Apparat auf der optischen Bank verstellbar ist, eingesetzt. Das Gefäß hat planparallele Glaswände, die 11 mm von einander stehen. In das Gefäß wird ein Glasblock von 10 mm Dicke und mit planparallelen Seiten gebracht. Das Stativ für das Absorptionsgefäß ist auch in vertikaler Richtung verstellbar und wird bei der Absorptionsmessung so gestellt, daß die 1 mm-Schicht der absorbierenden Flüssigkeit und der Schulzsche Körper (das planparallele Glasblock) vor dem Nicolschen Prisma und der unteren brechenden Fläche des Glashombus zu stehen kommen, während eine 11 m Schicht der absorbierenden Flüssigkeit vor dem Rauchglaskeil und der oberen brechenden Fläche des Rhombus steht. Bei dieser Stellung fällt der obere Rand des Schulzschen Körpers und die vordere Kante des Glashombus in eine Ebene zusammen.

Im Fernrohr ist ein zweiter, in einem Teilkreis drehbarer Nicol. Zu betonen ist, daß das Licht von beiden Strahlengängen, d. h. das aus dem ersten Nicol austretende polari-

sierte Bündel sowie das durch den Rauchglaskeil und die obere Fläche des Glasrhombus kommende Bündel natürlichen Lichtes auf den zweiten Nicol fällt.

Der Kollimator-(Eintritts-)spalt und der Okular-(Fernrohr-)spalt sind beide mit Mikrometerschrauben versehen.

Bei unserem Apparat war:

Die Breite des Eintrittsspalt  $\frac{1}{40}$  mm.

Der Stand des Rauchglaskeiles 0,0.

Die Breite des Okularspaltes entsprach einer Breite des entworfenen Spektrumbildes von  $8,5 \mu\mu$ .

Die Kurve für die Umwertung der Skalenteilen des Kreis-sektors in Wellenlängen wurde aus den Fraunhoferschen Linien im Sonnenspektrum von Hüfner entworfen. Die Strecke zwischen D und E wurde von einem Mathematiker geradlinig interpoliert. Die Kurve haben wir mit den Flammenspektren von Natrium, Lithium und Thallium wiederholt kontrolliert und richtig gefunden. Beleg: D-Linie der Spektralkurve  $589,3 \mu\mu$  entspricht Teilstrich 15,5 der Sektorskala; die Linie der Natriumflamme fällt ebenfalls mit 15,5 zusammen. Die Thalliumlinie 535 entspricht 21,0—21,7 oder 21,2—21,4 Skalenteilen am Sektor, im Mittel 21,3; auf der Kurve entspricht 535  $\mu\mu$  der Skalenteilung 21,3. Die bei  $570,8 \mu\mu$  liegende Lithiumlinie entspricht 9,7—10,1 Skalenteilen, Mitte 9,9; auf der Kurve fällt  $570,0 \mu\mu$  mit 9,9 der Skalenteilung zusammen. Die nahezu vollkommene Übereinstimmung ist für zwei Punkte in der interpolierten Strecke, D—E, gefunden worden, sowie für einen Punkt, der nahe der direkt bestimmten C-Linie liegt. Es war zu erwarten, daß die Übereinstimmung für die nicht interpolierten Strecken, d. h. für die Strecken, in denen der Abstand zweier Fraunhoferschen Linien durch eine gerade Linie dargestellt wird, und ganz besonders, wenn der zu kontrollierende Punkt sich nicht in der Nähe einer der direkt bestimmten Fraunhoferschen Linie befindet, nicht mehr gelten würde. So finden wir, daß die bei  $460,8 \mu\mu$  liegende Sr-Linie der Skalenteilung 33,5 entspricht, auf der Kurve aber fallen 33,5 und  $467,0 \mu\mu$  zusammen.

Zum richtigen Gebrauch des Hüfnerschen Spektrophoto-

meters sind außer dem Strahlengang noch folgende Punkte bei der Aufstellung zu berücksichtigen.

1. Die Breite des Okularspaltes und somit die Breite des ausgeschnittenen Spektralgebietes.
2. Die Breite des Eintrittsspalt.
3. Der Stand des Rauchglaskeiles.
4. Die Position der Beleuchtungsvorrichtung.

Wir wollen zunächst sehen, in wie weit der Extinktionskoeffizient durch eine Änderung in diesen 4 Punkten beeinflusst wird.

1. Einfluß der Okularspaltbreite auf den Wert des Extinktionskoeffizienten. Bei sämtlichen bis jetzt über die Lichtextinktion des Blutes angestellten Arbeiten sind die Werte in einem Spektralgebiet von mehreren Wellenlängen bestimmt worden, sie gelten also nicht für absolut homogenes Licht. Da die Lichtextinktion eines Körpers sich mit der Wellenlänge ändert, ist es klar, daß der Wert von  $\epsilon$ , der sich aus den verschiedenen großen Extinktionen der einzelnen Wellenlängen zusammensetzt, auch mit der Breite des herausgeschnittenen Spektralgebietes sich ändern muß. Beim Oxyhämoglobin nimmt man nun die Messung bei einem Maximum und Minimum der Extinktionen vor. Wenn man eine kurvenmäßige Darstellung der Lichtextinktion des Oxyhämoglobins — wie sie bei Cherbuliez<sup>1)</sup> oder Saint-Martin<sup>2)</sup> zu finden ist — betrachtet, so findet man zwischen den beiden Extinktionsmaxima (den beiden Streifen des Oxyhämoglobins) ein Extinktionsminimum bei  $560 \mu\mu$ ; von diesem nimmt die Extinktion ziemlich symmetrisch und steil nach beiden Seiten zu. Von dem Extinktionsmaximum bei  $542 \mu\mu$  nimmt die Extinktion auch ziemlich gleichmäßig nach beiden Seiten ab. Es ist deshalb klar, was geschieht, wenn man mit einer Spaltbreite, die mehreren Wellenlängen entspricht, bei einer mittleren Wellenlänge von  $560 \mu\mu$  und  $542 \mu\mu$  die Lichtextinktion mißt. Man mißt nicht genau die maximale und minimale Extinktion in diesen Regionen,

<sup>1)</sup> Cherbuliez, Étude spectrophotométrique du sang oxycarboné. Paris 1890.

<sup>2)</sup> Saint-Martin, Spectrophotométrie du sang. Paris 1898, S. 59.



sondern ein von beiden Seiten mit schwächeren Extinktionen begrenztes Maximum und ein Minimum mit daneben liegenden stärkeren Extinktionen. Je breiter das herausgeschnittene Spektralgebiet, desto mehr kommen die schwächeren Extinktionen zur Geltung und drücken den Wert der gesamten Extinktion in der Region des Maximums herab, und dasselbe gilt natürlich in umgekehrtem Sinne für den Wert in der Region des Minimums. Die Folge davon ist selbstverständlich, daß mit wachsender Breite des Okularspaltes  $\epsilon$  zunimmt, während  $\epsilon'$  abnimmt und  $\frac{\epsilon'}{\epsilon}$  dementsprechend kleiner wird. Folgende Messungen mit dem Spektrophotometer von König, Martens und Grünbaum illustrieren die mit wachsender Okularspaltbreite verbundene Abnahme von  $\frac{\epsilon'}{\epsilon}$ . Mit der engsten Spaltbreite,

die noch Messungen gestattet, war das Verhältnis des Extinktionskoeffizienten bei der maximalen Absorption im Grün zu dem der minimalen Absorption im Gelb, 1,68, bei einem etwas breiteren Okularspalt 1,62 und bei noch weiterem Spalt 1,56.

Es ist ferner klar, daß, wenn man nicht genau bei den mittleren Wellenlängen der maximalen und minimalen Extinktionen, sondern etwas seitwärts von diesen mißt, daß dann der Wert für  $\epsilon$  größer werden muß und der für  $\epsilon'$  kleiner. Der Einfluß der Messung auf den Wert von  $\frac{\epsilon'}{\epsilon}$ , an Stellen, die seitwärts von der maximalen oder minimalen Extinktion liegen, läßt sich aus folgender kleiner Zusammenstellung der Resultate von Cherbuliez, Hüfner und Saint-Martin ersehen.

	Spektralgebiete	Mittlere Wellenlänge	$\frac{\epsilon'}{\epsilon}$
Cherbuliez .	541 $\mu\mu$ — 536 $\mu\mu$	538,5 $\mu\mu$	1,54
	558 $\mu\mu$ — 553 $\mu\mu$	555,5 $\mu\mu$	
Hüfner . . .	542,5 $\mu\mu$ — 531,5 $\mu\mu$	537,0 $\mu\mu$	1,58
	565 $\mu\mu$ — 554 $\mu\mu$	559,5 $\mu\mu$	
Saint Martin .	549 $\mu\mu$ — 538 $\mu\mu$	543,5 $\mu\mu$	1,62
	568,3 $\mu\mu$ — 557,2 $\mu\mu$	562,5 $\mu\mu$	

2. Einfluß des Eintrittsspaltcs. Um den Einfluß der Breite des Eintrittsspaltcs auf den Extinktionskoeffizienten zu verstehen, muß man sich an die ersten Begriffe der Dispersion erinnern. Lassen wir homogenes Licht durch einen Spalt auf ein Prisma fallen, so erhalten wir hinter dem Prisma ein abgelenktes Spaltbild. Der Grad der Ablenkung hängt von der Art des Lichtes ab, er ist am geringsten für rote Strahlen und am stärksten für violette Strahlen. Lassen wir nun weißes Licht auf den Spalt fallen, dann entsteht eine kontinuierliche Reihe von nebeneinanderliegenden Spaltbildern in allen Farben von Rot bis ins Violett. Hätte der Spalt eine genügend kleine Breite, dann würde jeder Punkt des entworfenen Bildes einem Spaltbild einer einzigen Art homogenen Lichtes entsprechen. Da aber der Spalt immer eine endliche Breite hat, so greifen die Bilder übereinander. Das Spektrum wird um so unreiner, je breiter der Spalt ist. Ähnlich ist es auch mit der Abbildung des Absorptionsspektrums. Es kommt im Falle des Oxyhämoglobins mit wachsender Spaltbreite zu der maximalen Absorption bei  $542 \mu\mu$  eine Reihe von angrenzenden schwächeren Absorptionen hinzu, die infolge ihres niedrigen Extinktionsvermögens den Wert für  $\epsilon'$  herabdrücken. Bei der minimalen Absorption bei  $560 \mu\mu$  machen sich die angrenzenden stärkeren Absorptionen mit Erweiterung des Eintrittsspaltcs geltend und der Wert für  $\epsilon$  steigt. Demnach sinkt der Wert von  $\frac{\epsilon'}{\epsilon}$  mit wachsender Breite des Eintrittsspaltcs, wie es auch der Fall war bei wachsender Breite des Okularspaltcs. Die folgenden Werte machen den Einfluß des Eintrittsspaltcs auf den Wert von  $\epsilon$  und  $\epsilon'$  anschaulich. Es wurden wieder bei der maximalen Extinktion im Grün und bei der minimalen im Gelb mit dem Apparat von König, Martens und Grünbaum gemessen. Die Breite des Okularspaltcs war möglichst klein gewählt und blieb konstant bei allen Messungen. Eine Blutlösung und eine Lösung von frisch dargestelltem Rinderhämoglobin wurden innerhalb zwei Stunden durchgemessen.

	Breite des Eintrittsspalt			
	0,13 mm	0,25 mm	0,50 mm	1,00 mm
I. Lösung von Menschenblut	$\epsilon'$ 0,589	0,586	0,571	0,520
	$\epsilon$ 0,352	0,352	0,373	0,408
	$\frac{\epsilon'}{\epsilon}$ 1,67	1,67	1,54	1,27
II. Lösung von Rinder- hämoglobin	$\epsilon'$ 0,561	0,559	0,546	0,501
	$\epsilon$ 0,332	0,335	0,350	0,391
	$\frac{\epsilon'}{\epsilon}$ 1,68	1,67	1,56	1,28

Grünbaum<sup>1)</sup> hat auch auf die Abhängigkeit des Wertes des Extinktionskoeffizienten von der Spaltbreite beim Arbeiten mit weißem Licht als Beleuchtungsquelle aufmerksam gemacht.

3. Einfluß des Standes des Rauchglaskeiles. Da im unteren Strahlengang des Hüfnerschen Spektrophotometers zwei Nicols sind, während in dem oberen bloß einer, der analysierende ist, hat Hüfner, um etwaige Lichtverluste im unteren Strahlengang auszugleichen, einen verschiebbaren Rauchglaskeil vor der oberen Hälfte des Eintrittsspalt angebracht. Dieses Verfahren hat aber sehr wenig Berechtigung. Wir wissen, daß von einem Nicolschen Prisma immer die Hälfte des auffallenden natürlichen Lichtes durchgelassen wird. Ferner, daß das einem Nicol austretende linear polarisierte Licht von einem zweiten Nicol ungeschwächt durchgelassen wird, wenn die Hauptschnitte der beiden Prismen einander parallel sind. Bei dieser Stellung der Nicolschen Prismen im Hüfnerschen Apparat kommen demnach bloß zwei Reflexionen mehr für den unteren Strahlengang als weitere Quelle von Lichtverlusten in Betracht. Besteht das auffallende Licht aus annähernd parallelen Strahlen, so wird der Lichtverlust äußerst gering sein. Nun gerade in der Nähe dieser Nullstellung des Apparates (Parallelität der Hauptschnitte der beiden Nicols), ist die Beurteilung geringer Intensitätsunterschiede außerordentlich schwer, ihre ge-

<sup>1)</sup> F. Grünbaum, Inaug.-Diss., Berlin 1902, und Drudes Annalen d. Physik, Bd. XII, S. 993, 1903.

naue Messung unmöglich. Deshalb wird eine bei dieser Stellung der Nicolschen Prismen gemachte Kompensation einer etwaigen Ungleichheit in den Intensitäten der beiden Gesichtsfelder für die empfindlichere Stellung der Nicols (Hauptschnitte einen Winkel von  $55^\circ$  oder mehr miteinander bildend) nicht mehr gelten können. Ferner sind alle Rauchgläser mehr oder weniger gefärbt und absorbieren verschiedene Lichtmengen bei verschiedenen Wellenlängen.<sup>1)</sup> Speziell für die Regionen, wo wir die Extinktionskoeffizienten des Oxyhämoglobins gewöhnlich messen, ist das Lichtextinktionsvermögen von Rauchgläsern verschieden. So fanden wir mit dem Apparat von König und Martens für 2 aneinander gekittete Rauchgläser bei einer mittleren Wellenlänge von  $538 \mu\mu$   $J' = 0,113$  und bei  $560 \mu\mu$ ,  $J' = 0,144$ . Bei dem Hüfnerschen Spektrophotometer kann das Lichtextinktionsvermögen des Rauchglaskeiles nicht direkt am Apparat gemessen werden, weil die Extinktion zu gering ist. Man kann es aber indirekt ermitteln, indem man eine stark absorbierende Lösung (z. B. Hämoglobin) vorschaltet und die Änderungen des Wertes von  $\epsilon$  bei verschiedenen Stellungen des Keiles auch bei verschiedenen Wellenlängen verfolgt. Die folgende kleine Tabelle gibt die Werte des Extinktionskoeffizienten bei unserer gewöhnlichen Versuchsanordnung, zuerst mit vollkommen ausgeschaltetem Keil und dann bei fortschreitenden Dicken des Keiles, den Keilskalenteilen 0,5 und 0,8 entsprechend.

Diese geringen Verschiebungen des Keiles, die in der sogenannten Nullstellung des Apparates einen kaum wahrnehmbaren Unterschied in den Intensitäten der beiden Gesichtsfelder hervorrufen, haben einen sehr großen Einfluß auf den Wert des Extinktionskoeffizienten, da man diesen in einer Stellung der Nicols mißt, in der der Apparat für kleine Intensitätsunterschiede sehr empfindlich ist. Das Rauchglas scheint ziemlich achromatisch zu sein; wenigstens lassen sich keine großen Unterschiede in der relativen Zunahme des Extinktionskoeffizienten für die beiden Spektralgegenden erkennen, was sofort eine

<sup>1)</sup> Vgl. Vierordt, Die Anwendung des Spektralapparates usw., Tübingen 1873, S. 12.



Änderung des Wertes  $\frac{\epsilon'}{\epsilon}$  zufolge haben würde. Die Werte für  $\frac{\epsilon'}{\epsilon}$  schwanken bloß innerhalb der Fehlergrenzen.

Einfluß des Rauchglaskeiles auf den Extinktionskoeffizienten.

Lösung	Stand des Keiles	$\epsilon$	$\epsilon'$	$\frac{\epsilon'}{\epsilon}$
I.	0,0	0,598	0,948	1,59
	0,5	0,666	1,03	1,55
	0,8	0,680	1,07	1,57
II.	0,0	0,591	0,934	1,57
	0,5	0,649	1,02	1,57
	0,8	0,672	1,04	1,55
III.	0,0	0,510	0,802	1,57
	0,5	0,564	0,883	1,57
	0,8	0,576	0,895	1,56

$\epsilon$  wurde bei der mittleren Wellenlänge von  $560 \mu\mu$  und  $\epsilon'$  bei  $538 \mu\mu$ ; Okularspaltbreite entspricht  $8,5 \mu\mu$ ; Eintrittsspalt  $\frac{1}{40}$  mm.

Aus diesen Gründen haben wir immer mit dem vollkommen ausgeschalteten Rauchglaskeil gearbeitet.

4. Beleuchtungsvorrichtung. Bei der Messung mit dem Hüfnerschen Apparat geht man von einer Stellung aus, in der die Intensitäten der beiden Gesichtsfelder gleich sind. Da diese Gleichheit nicht etwa durch eine Kompensation mittels der optischen Teile des Apparates erreicht werden darf, so ist für alle genauen Messungen unerläßliche Voraussetzung, daß die beiden Spalthälften gleichmäßig beleuchtet werden. Dies ist streng genommen mit der primitiven Beleuchtungsvorrichtung am Hüfnerschen Apparat nicht möglich. Denn der Eintrittsspalt wird immer von einem umgekehrten mehr oder weniger zerstreuten Bild des Strumpfes der Auerlampe beleuchtet, und der Strumpf glüht nicht in allen seinen Teilen gleichmäßig. Dies wird besonders auffallend und störend, wenn die Lampe nicht zentriert ist oder wenn die Gaszufuhr starken Schwankungen unterliegt. Eine vorgeschaltete Mattglasplatte hebt die

kleinen bei zentrierter Lampe und stark glühendem Strumpf vorkommenden Unregelmäßigkeiten auf.<sup>1)</sup>

Aus dem Gesagten ergibt sich, daß der relative Wert von  $\epsilon$  sehr von der Versuchsanordnung abhängig ist. Im speziellen Fall des Oxyhämoglobins ruft eine Änderung in der Breite des Eintritts- oder Okularspaltes eine ungleichsinnige Änderung in den Werten von  $\epsilon$  und  $\epsilon'$  hervor. Das hängt damit zusammen, daß  $\epsilon$  eine Anzahl von symmetrisch um ein Minimum zunehmenden einzelnen Extinktionen darstellt, während  $\epsilon'$  einer Anzahl ziemlich gleichmäßig von beiden Seiten eines Maximums abnehmender Extinktionen entspricht. Je mehr die Versuchsbedingungen sich den theoretisch verlangten (Messung bei einer einzelnen Wellenlänge) nähern, um so höher wird der Wert von  $\epsilon'$ , um so niedriger  $\epsilon$  und folglich um so höher  $\frac{\epsilon'}{\epsilon}$ . Spektrophotometrische Werte ohne Angaben über die Konstruktion des Apparates, die Eichung des Prismas in Wellenlängen, über etwaige Kompensationsvorrichtungen und über die Breite des Eintrittsspalt und der Okularblende sind, insofern sie mit anderen spektrophotometrischen Werten verglichen werden sollen, vollkommen wertlos.

## II. Gasometrischer Teil.

Bei den Versuchen, welche den Zweck hatten, das Volumen Sauerstoff, das von der Gewichtseinheit Hämoglobin gebunden wird, zu bestimmen, kam es hauptsächlich darauf an, eine zuverlässige und handliche Methode zu benützen. Es kamen in Betracht 1. die Blutgaspumpe, 2. die Sauerstoff austreibung mittels Ferricyankalium nach Haldane bzw. die Kohlenoxyd austreibung nach Haldane und Hüfner. Die Auspumpungs-

<sup>1)</sup> Die primitive Beleuchtungsvorrichtung, die geringe zulässige Größe der Vergleichsfelder, die unpassende Form des Absorptionsgefäßes sowie die erheblichen Schwierigkeiten bei der raschen und sicheren Einstellung auf gleiche Helligkeit der beiden Gesichtsfelder haben uns dazu geführt, Abstand von dem Gebrauch des Hüfnerschen Spektrophotometers zu nehmen und weitere Versuche nur noch mit dem Apparat von König, Martens und Grünbaum anzustellen.

methode mit der Blutgaspumpe gehört sicher nicht zu den handlichsten Methoden und erfordert eine vollständige Gasanalyse. Ferner war an die Möglichkeit eines Sauerstoffverlustes während des Auspumpens durch Verbrauch für leicht oxydable Substanzen im Serum und in Blutlösungen zu denken. Schließlich muß man sich eines nicht direkt bestimmbareren Absorptionskoeffizienten für Sauerstoff in Blut bedienen. Aus diesen Gründen konnten wir nicht erwarten, richtige Zahlen für die absolute Menge des vom Hämoglobin allein gebundenen Sauerstoffs zu bekommen. Mit der Ferricyanidmethode nach Haldane haben Hüfner und v. Zeynek<sup>1)</sup> sogar bei Anwendung größerer Mengen Blutes bzw. Hämoglobins, als die sind, mit denen Haldane gearbeitet hat, keine übereinstimmenden Zahlen bekommen können. Die Kohlenoxydaustreibungsmethode mit Ferricyanid in der von Hüfner<sup>2)</sup> angegebenen Versuchsanordnung wäre die einfachste Methode; denn hier ist die Gefahr einer Sauerstoffzehrung durch die Anwendung des indifferenten Kohlenoxyds beseitigt; die Absorptionskoeffizienten fallen weg, da man Blutlösung und Ferricyankaliumlösung unter gleichem Druck mit Kohlenoxyd sättigt und nach Austreibung des Kohlenoxyds aus dem CO-Hämoglobin durch Zusammenbringen der beiden Lösungen das rückständige Kohlenoxyd unter dem Anfangsdruck messen kann. Mit dieser Methode erhielten wir konstante Werte bei Lösungen vom Rinderblut, nicht aber beim Menschenblut. Der Grund lag daran, daß, obwohl es allem Anschein nach gelang, das Menschenblut durch  $\frac{1}{10}$  %ige Sodalösung vollständig lackfarben zu machen, jedesmal im Augenblick des Zusammenbringens der konzentrierten Blut- und Ferricyankaliumlösung das Stroma der roten Blutkörperchen in Massen wieder ausfiel. Man erhält dann ein fast opakes, schokoladenfarbiges Gemisch. Es ist klar, daß mit dem Stroma sehr viel Hämoglobin mitgerissen wird und daß dieses nicht in Lösung befindliche Kohlenoxydhämoglobin von Ferricyankalium nicht mehr angegriffen wird. Wir erhielten

<sup>1)</sup> R. v. Zeynek, Arch. f. Anat. u. Physiol., physiol. Abtl., 1899. Hüfner, ebenda.

<sup>2)</sup> Hüfner, Arch. f. Anat. u. Physiol., physiol. Abtl., 1903.

immer viel niedrigere Werte als für Rinderblut.<sup>1)</sup> So fanden wir beim normalen Menschenblut eine Kohlenoxydabgabe von 1,17 ccm pro Gramm Hämoglobin und bei Polycythämie bloß 0,66 ccm CO pro Gramm Hämoglobin,<sup>2)</sup> während beide Blutarten nach der absorptiometrischen Kohlenoxydmethode Werte in der Nähe von 1,34 ccm CO pro Gramm Hämoglobin gaben (normales Blut 1,33 ccm und Polycythämie 1,32 ccm). Wie schon erwähnt, erhielten wir beim Rinderblut nach der Kohlenoxydaustreibungsmethode durch Ferricyankalium gute Werte — in einer Serie von 4 Versuchen Werte zwischen 1,32 ccm und 1,35 ccm für die Kohlenoxydabgabe.

Wir kehrten deshalb zu der im Jahre 1894 von Hüfner<sup>3)</sup> angegebenen absorptiometrischen Methode zurück. Das Prinzip der Methode ist folgendes. Eine vollständig reduzierte und entgaste Blut- oder Hämoglobinlösung wird mit einem bekannten Volumen Kohlenoxyd geschüttelt. Der Unterschied zwischen dem vor und nach dem Schütteln vorhandenen Gasvolumen stellt die von der Lösung aufgenommene Menge Kohlenoxyd dar; diese besteht aus zwei Teilen, aus einem in der Flüssigkeitsmenge dem Druck proportional einfach gelösten Teil und einem meist größeren Teil, der innerhalb gewisser Grenzen vom Druck unabhängig und von dem Hämoglobin als chemisch gebunden anzusehen ist. Um die Methode anwenden zu können, mußten wir Kenntnis davon haben, in welchen

<sup>1)</sup> Das Verfahren von Haldane, wobei das Blut durch Ammoniak lackfarben gemacht wird, konnten wir nicht anwenden, da wir dann mit dem unbekanntem Dampfdruck des Ammoniaks zu rechnen hätten. Barcroft will diesen Nachteil überwunden haben, indem er eine zweite Bestimmung mit Wasser und Ammoniak allein in einem zweiten Apparat gleichzeitig mit der eigentlichen Blutgasbestimmung ansetzt und diesen zweiten Apparat als Thermobarometer dienen läßt. Es ist aber durchaus nicht bewiesen, ist vielmehr sehr unwahrscheinlich, daß der Dampfdruck des Ammoniaks im Wassermanometer und im Blutmanometer der gleiche ist.

<sup>2)</sup> Anmerkung bei der Korrektur: In noch nicht veröffentlichten Versuchen hat G. B. Gruber an unserer Klinik bei einigen Polycythämikern eine erhöhte Resistenz der Erythrocyten gefunden; da unsere Versuche mit sehr konzentrierten Lösungen angestellt wurden, könnte es danach doch möglich sein, daß ein geringer Teil des Hämoglobins ungelöst blieb.

<sup>3)</sup> Hüfner, Arch. f. Anat. u. Physiol., physiol. Abtl., 1894.



Mengen Kohlenoxyd von einer Blut- oder Hämoglobinlösung einfach gelöst wird. Ganz allgemein weiß man, daß die Löslichkeit von Gasen in Wasser durch das Vorhandensein gelöster Substanzen erniedrigt wird.<sup>1)</sup> Die am meisten gebrauchte Einheit für die Löslichkeit von Gasen ist der Bunsensche Absorptionskoeffizient. Man versteht darunter das auf 0° und 760 mm Quecksilberdruck reduzierte Gasvolumen, das von der Volumeneinheit der Flüssigkeit unter einem Druck von 760 mm aufgenommen wird. Um die absolute Menge des vom Hämoglobin chemisch gebundenen Kohlenoxyds bestimmen zu können, mußten wir den Wert des Absorptionskoeffizienten,  $\alpha$ , bei der Versuchstemperatur und für die angewandte Hämoglobinkonzentration der Lösung kennen.

Die Bestimmung der Löslichkeit von Kohlenoxyd oder Sauerstoff in Lösungen von Hämoglobin stößt aber auf ganz besondere Schwierigkeiten. Da das Hämoglobin mit dem Kohlenoxyd bezw. Sauerstoff in eine lockere chemische Verbindung eingeht, so ist eine direkte Bestimmung des Absorptionskoeffizienten von vornherein ausgeschlossen; man kann sie nur auf indirektem Wege vornehmen. Hüfner hat in seiner Arbeit von 1894 versucht, den Absorptionskoeffizienten dadurch zu ermitteln, daß er oberhalb des Druckes, bei dem nahezu alles Hämoglobin mit CO verbunden ist, die Drucke des Gases über die Lösung änderte und aus den Volumenänderungen des Gases den Absorptionskoeffizienten berechnete. Hierbei ist zu bemerken, daß man mit außerordentlich kleinen Differenzen arbeitet und die Fehler dadurch sehr groß werden; es entspricht z. B. eine Druckdifferenz von 100 mm im Hüfnerschen Absorptiometer (größere Druckdifferenzen sind schwer zu erhalten) bei Anwendung von 205,62 ccm Blutlösung einer Volumenänderung von höchstens 0,50 ccm Kohlenoxyd. Nun geht die Genauigkeit der Messung mit dem Hüfnerschen Apparat nur bis in die zweite Dezimale. Fehler von 0,05 ccm sind zwar noch zulässig, der Fehler ist jedoch meistens größer; ein Fehler aber von 0,05 ccm bei der Volumenmessung hat schon eine Änderung von 6% in dem Wert des berechneten Absorptionskoeffizienten zur

<sup>1)</sup> J. J. Mackenzie, Wiedemanns Annalen der Physik, Bd. I, 1877.

Folge. Dadurch allein lassen sich die bis etwa 12<sup>o</sup>/<sub>o</sub> betragenden Schwankungen bei den Hufnerschen Werten für  $\alpha$  erklären.

Hüfner<sup>1)</sup> hat auch die Löslichkeit von Kohlenoxyd in Methämoglobinlösungen bestimmt. Hier sind die Versuchsbedingungen viel günstiger. Kohlenoxyd und Sauerstoff werden von Methämoglobin nicht gebunden, das Molekulargewicht des Methämoglobins ist praktisch dasselbe wie das des Oxyhämoglobins, und die zu messenden Gasmengen bei der Bestimmung des Absorptionskoeffizienten in Methämoglobinlösungen sind nur einige Prozente kleiner, als die von reinem Wasser aufgenommenen Gasmengen. Praktisch aber hat diese Methode auch ihre Schwierigkeiten. Hüfner hat das Methämoglobin in der Weise hergestellt, daß er Stickoxyd in eine frische Lösung von ausgeschleuderten Blutkörperchen im offenen Gefäß eingeleitet hat, bis die Lösung braun geworden war. Bei dieser Reaktion wird auch  $\text{HNO}_3$  gebildet, und es besteht immer die Gefahr, daß das Methämoglobin weiter gespalten wird; natürlich wird auch die gebildete  $\text{HNO}_3$  den Absorptionskoeffizienten auch wieder beeinflussen. Wir haben versucht, auch unter spektrophotometrischer Kontrolle Methämoglobin auf diese Weise herzustellen und sind immer auf Schwierigkeiten gestoßen. Denn manchmal geht die Reaktion zu weit und es fällt Globin aus der Lösung heraus, und ein andermal ist die Methämoglobinbildung nicht vollständig. Wir haben schließlich die Erkennung des Endpunktes der Reaktion selbst unter Anwendung des Spektrophotometers so schwer gefunden, daß wir die Herstellung des Methämoglobins nach dieser Methode haben aufgeben müssen. Wir haben versucht, das Methämoglobin durch Einwirkung von Ferricyankalium zu erzeugen und dann die Lösung von Ferricyankalium durch Dialyse zu trennen. Die Dialyse aber nimmt einige Tage in Anspruch und es ist schwer, die Lösungen so lange, selbst bei niedriger Temperatur, bakterienfrei zu halten. Durch bakterielle Reduktion des Methämoglobins entsteht aber wieder Hämoglobin, und man bekommt darum bei der Bestimmung des Absorptionskoeffizienten zu hohe Werte.

---

<sup>1)</sup> Hüfner, Arch. f. Anat. u. Physiol., physiol. Abtl., 1895, S. 209.

Bohr<sup>1)</sup> umgeht alle diese Schwierigkeiten, indem er die Löslichkeit eines für Hämoglobin indifferenten Gases in Hämoglobinlösungen direkt bestimmt und hieraus sowie aus dem bekannten Absorptionskoeffizienten desselben Gases in reinem Wasser die prozentische Erniedrigung in Hämoglobinlösungen berechnet. Er erhält dann den gesuchten Absorptionskoeffizienten von Sauerstoff oder Kohlenoxyd, indem er stillschweigend annimmt, daß die Absorptionskoeffizienten aller Gase für reines Wasser die gleiche prozentische Erniedrigung durch das Hämoglobin erfahren und indem er den Absorptionskoeffizienten des betreffenden Gases für Wasser um den gleichen Bruchteil reduziert, um den der Absorptionskoeffizient des indifferenten Gases in Wasser durch das Hämoglobin erniedrigt wurde. Dieses Verfahren wäre dann berechtigt, wenn es sicher wäre, daß alle Gase die gleiche prozentische Erniedrigung ihrer Löslichkeit durch gleiche Mengen des betreffenden festen Körpers erfahren. Daß das aber nicht der Fall ist, geht mit Deutlichkeit aus einer Untersuchung von Hüfner<sup>2)</sup> über die Löslichkeit von Wasserstoff und Stickstoff in äquimolekularen Lösungen von Glukose, Alanin, Glykokoll, Acetamid und Harnstoff hervor.

	Löslichkeit von			
	Stickstoff in Wasser $\alpha = 0,0156$		Wasserstoff in Wasser $\alpha = 0,0181$	
		Prozentische Erniedrigung von $\alpha$ .		Prozentische Erniedrigung von $\alpha$ .
Glukose, 90 g in Liter	$\alpha = 0,0138$	11,5	$\alpha = 0,0166$	8,5
Alanin, äquimol. Lösung	$\alpha = 0,0121$	22,5	$\alpha = 0,0156$	13,5
Glykokoll, „ „	$\alpha = 0,0121$	22,5	$\alpha = 0,0158$	12,5
Acetamid, „ „	$\alpha = 0,0148$	5,0	$\alpha = 0,0180$	0,5
Harnstoff, „ „	$\alpha = 0,0148$	5,0	$\alpha = 0,0170$	6,0

Bei der Deutung der Bohrschen Versuche darf also nicht vergessen werden, daß ein auf diese Weise erhaltener Absorptionskoeffizient in der Berechnung seiner Versuche eingesetzt wurde.

<sup>1)</sup> Bohr, Nagels Handbuch und Skand. Archiv, 1905.

<sup>2)</sup> Hüfner, Zeitschr. f. physikal. Chemie, Bd. LVII, S. 611, 1907.

Bei der Berechnung unserer Versuche haben wir Absorptionskoeffizienten gebraucht, die auf ähnliche Weise wie die ersten Hufnerschen, d. h., durch Volumendifferenzmessungen nach Änderung des Druckes des Kohlenoxyds in einer Blutlösung, erhalten worden sind. Obwohl wir größere Flüssigkeitsmengen (410 ccm) und die höchsten Druckdifferenzen, die mit dem Hufnerschen Absorptionsmeter erreichbar sind, angewandt haben, sind doch die Volumendifferenzen immer noch zu klein und die einzelnen Resultate mit ziemlich großen Fehlern behaftet. Die angeführten Absorptionskoeffizienten sind Mittelwerte aus einer größeren Versuchsreihe (25); die Schwankungen der einzelnen Werte sind manchmal so groß, daß wir die Werte nicht als endgültig betrachten; wir behalten uns daher vor, die Löslichkeit von Kohlenoxyd in Blutlösungen mit einem Apparat besonderer Konstruktion zu bestimmen. Die jetzt angeführten Absorptionskoeffizienten sind für Lösungen von ausgeschleuderten roten Blutkörperchen in ausgekochtem Wasser bei 20° bestimmt. Zuerst haben wir zwei Versuche über den Absorptionskoeffizienten von Kohlenoxyd in reinem Wasser bei 20° mit unserem Apparat angestellt. Den Absorptionskoeffizienten für Kohlenoxyd in Wasser bei 20° fanden wir übereinstimmend in beiden Versuchen zu 0,0235; diese Zahl weicht nur 1% von der Winklerschen ab. Für Lösungen von ausgeschleuderten roten Blutkörperchen in ausgekochtem Wasser fanden wir bei einem Hämoglobingehalt von 1% den Absorptionskoeffizienten 0,0230; bei einem Hämoglobingehalt von 3,8% 0,0219 und bei einem 5,5%igen Hämoglobingehalt 0,0208.

Zum Verständnis der Resultate möge eine kurze Beschreibung der angewandten Apparate gestattet sein.

Das Absorptiometer<sup>1)</sup> besteht aus einem zweischenkeligen im großen Wasserständer montierten Manometer. Ein Schenkel ist oben durch einen Nickelaufsatz verschließbar; der andere bleibt in Kommunikation mit der Außenluft; beide kommunizieren unten miteinander und die Kommunikation kann durch einen Hahn unterbrochen und hergestellt werden. Das Schüttel-

<sup>1)</sup> Hufner, Arch. f. Anat. u. Physiol., physiol. Abtl., 1894.



gefäß für das Blut- und Kohlenoxydgemisch besteht aus zwei Kugeln, von denen die eine mit Glasansatzrohr und verschließbarem Nickelaufsatz versehene Kugel als Behälter des Gases dient, während die andere der Blutbehälter ist. Durch die zwei Nickelaufsätze kann die Gaskugel in luftdichte Verbindung mit dem Manometer gebracht werden. Die zwei Kugeln sind durch einen Glashahn verbunden; durch einen zweiten Hahn kann die Blutkugel von der Außenluft abgeschlossen werden. Der geschlossene Manometerschenkel, die Nickelaufsätze, die Kugeln und Hahnbohrungen sind von Hüfner durch zweimaliges Auswägen mit Quecksilber kalibriert worden; diese Apparate sowie neue Kugelapparate wurden auch von uns durch doppelte Auswägungen mit Quecksilber noch einmal kalibriert.

Der Gang eines Versuches war folgender: Das defibrinierte Blut wurde 2 Stunden zentrifugiert, das Serum abgehebert und der Blutkörperchenbrei in ausgekochtem Wasser gelöst. Die wässrige Blutkörperchenlösung wurde in einen großen, dickwandigen Glasbehälter über Quecksilber eingefüllt; hier wurden 0,2—0,5 ccm einer 50%igen Lösung Hydrazinhydrat zugegeben und unter Nachströmen von Wasserstoff das Quecksilber bis auf einen kleinen Rest aus dem Behälter abgelassen. Die Blutlösung steht in dieser Weise über Quecksilber in einer Wasserstoffatmosphäre, bis das Oxyhämoglobin vollständig zum Hämoglobin reduziert ist (einige Stunden). Dann wurde das Ganze mit der Wasserstrahlpumpe verbunden und ausgepumpt, bis die Lösung beim heftigen Schütteln nicht mehr schäumt. Der evakuierte Blutbehälter und die Blutlösung wurden dann durch einen Hahn von der Außenluft abgeschlossen, die Pumpe unterbrochen und der Zweikugelapparat auf dem Blutbehälter aufgesetzt, verbunden und wiederholt mit Wasserstoff ausgewaschen und evakuiert. Schließlich wurde die Blutlösung unter Quecksilberdruck in die untere Kugel des evakuierten Zweikugelapparates übergefüllt und hier abgesperrt. Der Zweikugelapparat wurde dann von dem Blutbehälter getrennt und seine obere Kugel 3 mal alternierend evakuiert und mit Kohlenoxyd ausgewaschen und schließlich mit Kohlenoxyd gefüllt. Das Volumen des Kohlenoxyds wurde nach Aufsetzen des Apparates

auf das Manometer und Herstellung der richtigen Verbindungen an der Manometerteilung mit dem Staudingerschen Kathetometer abgelesen. Hiernach wurden alle Verbindungen wieder geschlossen, der Zweikugelapparat vom Manometer getrennt, der Verbindungshahn zwischen Blut- und Gaskugel geöffnet und das Gemisch so lange geschüttelt, bis das Volumen des Kohlenoxyds — nach wiederholtem Aufsetzen und Ablesung am Manometer beurteilt — konstant blieb. Aus dem Unterschied in dem Volumen des Kohlenoxyds vor und nach dem Schütteln mit der Blutlösung läßt sich das Volumen des von der Blutlösung aufgenommenen Kohlenoxyds unter Berücksichtigung der herrschenden Druck- und Temperaturverhältnisse leicht berechnen. Nach Abzug des einfach gelösten Kohlenoxyds von der Gesamtmenge erhält man das Volumen Kohlenoxyd, das von dem vorhandenen Hämoglobin chemisch gebunden ist.

Das Manometer wurde reichlich mit Wasser befeuchtet und die Tension des Wasserdampfes bei der Versuchstemperatur in der Berechnung eingesetzt. Sämtliche Versuche wurden in der Nähe von  $20^{\circ}$  angestellt. Es wurde immer 15—20 Minuten auf den Ausgleich der Temperatur nach jedem neuen Einsetzen des Zweikugelapparates gewartet; hierbei waren die Änderungen des Quecksilbermeniscus am Kathetometer abgelesen maßgebend. Während der Versuche war eine auf- und abgehende Rührvorrichtung, die von einem kleinen Motor getrieben wurde, am Wasserständer angebracht. Mittels dieser Vorrichtung gelang es, eine bestimmte Temperatur stundenlang ohne größere Schwankungen als  $0,2^{\circ}$  einzuhalten. Am Anfang und zwischen jedem dritten bis vierten Versuch wurde das Manometer mit aufgesetztem Zweikugelapparat unter Unterdruck und Überdruck gesetzt und dadurch auf Dichtigkeit geprüft.

Größere Vorräte von Kohlenoxyd wurden aus ameisen-saurem Natrium und  $H_2SO_4$  dargestellt, mit KOH gewaschen und über KOH in gläsernen Gasometer aufbewahrt. Etwas Pyrogallol wurde zu der unterstehenden KOH unter Luftabschluß gegeben; dabei trat nie eine Bräunung ein. Das Gas wurde in Stichproben analysiert und chemisch rein gefunden.

Um den Gang des Versuches zu verdeutlichen, sei ein vollständiges Versuchsprotokoll vom 15. VII. 08 angeführt.

### Versuchsprotokoll von 15. VII. 1908.

#### Rinderblut.

Volumen des Kohlenoxyds vor dem Schütteln mit der Blutlösung.	
Temperatur des Wassers im großen Wasserständer . . . . .	$t = 20,6^{\circ}$
Barometerstand . . . . .	$B = 736,0 \text{ mm}$
Temperatur am Barometer . . . . .	$T = 22,9^{\circ}$
Barometerstand, reduziert auf $0^{\circ}$ . . . . .	$B_0 = 733,11 \text{ mm}$
Quecksilbermeniscus, rechts (geschlossener Manometerschenkel) . . . . .	$r = 959,70 \text{ } \rangle$
Quecksilbermeniscus, links (offener Manometerschenkel) . . . . .	$l = 959,70 \text{ } \rangle$
Unterschied der beiden, $(r-l)$ . . . . .	$b' = 0,00$
Derselbe, reduziert auf $0^{\circ}$ . . . . .	$b'_0 = 0,00$
Quecksilbermeniscus, rechts (auf Manometerskala abgelesen) . . . . .	$m = 118,00 \text{ mm}$
Wasserdampftension bei der Versuchstemperatur . . . . .	$b'' = 18,05 \text{ } \rangle$
Druck des Gases . . . . .	$p = 715,06 \text{ } \rangle$
Abgelesenes Volumen, nach den Kalibriertabellen . . . . .	$v = 241,91 \text{ ccm}$
Volumen des Gases auf $0^{\circ}$ und 760 mm Quecksilberdruck reduziert . . . . .	$v_0 = 211,65 \text{ ccm}$

#### Nach dem Schütteln mit der Blutlösung.

	geschüttelt	
	1000 mal	1500 mal
Temperatur des Wassers im Ständer . . . . .	$t = 20,8^{\circ}$	$20,7^{\circ}$
Barometerstand . . . . .	$B = 736,0 \text{ mm}$	$736,4 \text{ mm}$
Temperatur am Barometer . . . . .	$T = 22,6^{\circ}$	$21,9^{\circ}$
Barometerstand, auf $0^{\circ}$ reduziert . . . . .	$B_0 = 733,16 \text{ mm}$	$733,63 \text{ mm}$
Quecksilbermeniscus, rechts (am Katheter abgelesen) . . . . .	$r = 983,15 \text{ } \rangle$	$960,05 \text{ } \rangle$
Quecksilbermeniscus, links (am Katheter abgelesen) . . . . .	$l = 937,20 \text{ } \rangle$	$902,20 \text{ } \rangle$
Unterschied der beiden $(r-l)$ . . . . .	$b' = 45,95 \text{ } \rangle$	$57,85 \text{ } \rangle$
Derselbe, auf $0^{\circ}$ reduziert . . . . .	$b'_0 = 45,79 \text{ } \rangle$	$57,65 \text{ } \rangle$
Quecksilbermeniscus, rechts (auf Manometerskala) . . . . .	$m = 94,63 \text{ } \rangle$	$117,60 \text{ } \rangle$
Wasserdampftension bei der Versuchstemperatur . . . . .	$b'' = 18,27 \text{ } \rangle$	$18,16 \text{ } \rangle$
Druck des Gases $(B_0 - b'_0 - b'')$ . . . . .	$p = 669,10 \text{ } \rangle$	$657,82 \text{ } \rangle$
Abgelesenes Volumen, nach Kalibriertabellen . . . . .	$v = 237,93 \text{ ccm}$	$241,84 \text{ ccm}$
Volumen des Gases auf $0^{\circ}$ und 760 mm Druck reduziert . . . . .	$v_0 = 194,65 \text{ } \rangle$	$194,54 \text{ } \rangle$

Bei der Hämoglobinbestimmung wurde in einer 25fach verdünnten Lösung der Extinktionskoeffizient zu 1,04 ( $\varphi = 72,50^\circ$ ) und in einer 37,5fach verdünnten Lösung zu 0,697 ( $\varphi = 63,38^\circ$ ) gefunden. Das Volumen der Lösung betrug 205,62 ccm; das Absorptionsverhältnis des Oxyhämoglobins in der untersuchten Spektralgegend ist 0,00187. Hieraus berechnet sich die Hämoglobinmenge nach der ersten Bestimmung zu 10,00 g und nach der zweiten Bestimmung zu 10,05 g, im Mittel 10,03 g. Der prozentische Hämoglobingehalt der Lösung ist 4,9%.

Das Volumen des von der Lösung aufgenommenen Kohlenoxyds ist 211,65 ccm — 194,54 ccm = 17,11 ccm; von diesem

sind gemäß der Gleichung,  $V = \frac{\alpha h p}{760}$ , 3,77 ccm Kohlenoxyd

physikalisch gelöst ( $\alpha = 0,0212$  für eine 5%ige Hämoglobinlösung bei  $20^\circ$ ,  $h$  bedeutet das Volumen der Blutlösung und  $p$  der Druck des Gases). Das Volumen des von 10,03 g Hämoglobin gebundenen Kohlenoxyds ist demnach 13,34 ccm:

1 g Hämoglobin bindet  $\frac{13,34}{10,03} = 1,33$  ccm Kohlenoxyd.

Eine Portion des zum Versuch verwendeten Kohlenoxyds wurde vor und nach dem Versuch analysiert.

	Volumen	Druck mm	Temperatur Grad	Reduziertes Volumen
Angewandtes Gas . . . . .	90,05	313,94	18,9	34,78
Nach Zusatz von $O_2$ . . . . .	202,23	425,96	18,3	106,22
Nach Verpuffung . . . . .	178,71	402,03	18,6	88,57
Nach Absorption der $CO_2$ (Kalikugel) . . . . .	122,79	358,55	20,4	53,91

Angewandt = 34,78 Volumenteile.

Gefunden 88,57 — 53,91 = 34,66 Volumenteile.

Nach vollendetem absorptiometrischen Versuch wurde das Gas von dem Manometer des großen Absorptiometers in ein Bunsensches Absorptionsrohr übergefüllt und analysiert.



	Volumen	Druck mm	Tempe- ratur Grad	Redu- ziertes Volumen
Angewandtes Gas . . . . .	110,27	588,67	19,7	79,5
Nach dem Stehen über Nacht mit einer Kalikugel . . .	108,26	597,04	20,1	79,5

Das Gas enthält somit keine Kohlensäure. Es wurde jetzt in ein Eudiometer übergefüllt, gemessen und mit Sauerstoff verpufft. Die gebildete Kohlensäure wurde mit einer Kalikugel absorbiert.

Angewandt wurde 60,25 Volumteile.

Gefunden 60,18 Volumteile.

Nach dem soeben als Schema wiedergegebenen Versuchsprotokoll sind die folgenden Werte gewonnen (Tab. III). Das Hämoglobin wurde jedesmal in zwei oder mehr Verdünnungen bestimmt.

Aus diesen Zahlen geht hervor, daß die Kohlenoxydaufnahme pro Gramm Hämoglobin erstens für Menschenblut und Rinderblut dieselbe ist und auch für pathologische Fälle, namentlich Polycythämie und Anämie bloß innerhalb der methodischen Fehlergrenzen, von 1,30—1,35 ccm, schwankt.

### III. Eisenbestimmungen.

Wir sind an die Eisenbestimmungen mit großer Vorsicht herangetreten, denn die Geschichte des Eisengehaltes des Hämoglobins ist sehr merkwürdig. Der Eisengehalt ist im Laufe von 30 Jahren von 0,47 auf 0,34% gesunken, ein Unterschied von rund 28%! Dieser Unterschied erklärt sich zum Teil wohl dadurch, daß Hämoglobin von verschiedenen Darstellungsverfahren und Reinheitsgrad in viel zu kleinen Mengen analysiert wurde; nahe liegt es auch, eine mangelhafte technische Ausführung der Bestimmung selbst anzunehmen. Denn in einigen Fällen wurde das Eisen in salzsaurer Lösung mit Permanganat titriert,<sup>1)</sup> und andere Untersucher hielten es für über-

<sup>1)</sup> Selbst Hüfner, Diese Zeitschrift, Bd. VII, S. 68, ist es damals

Tabelle III.

Versuch	Ver- suchs- tempe- ratur Grad	Kohlenoxyd- druck, bei dem die Blut- lösung ge- sättigt wurde mm	Vo- lumen der Blut- lösung ccm	Hämo- globin- gehalt der Lösung g	Volumen des aufge- nommenen Kohlen- oxyds ccm	Volumen des physikalisch ge- lösten Kohlen- oxyds ccm	Volumen des chemisch ge- bundenen Kohlenoxyds ccm	Kohlen- oxyd- aufnahme pro Gramm Hämoglobin ccm
Rinderblut, 20. V. 08 . . . . .	20,60	599,05	409,66	18,69	31,84	6,94 ( $\alpha = 0,0215$ )	24,90	1,32
„ 26. V. 08 . . . . .	20,40	654,32	409,66	14,69	27,12	7,76 ( $\alpha = 0,0220$ )	19,36	1,33
„ 15. VII. 08 . . . . .	20,70	657,81	205,62	10,03	17,11	3,77 ( $\alpha = 0,0212$ )	13,34	1,33
Menschenblut vom Gesunden	20,00	670,36	205,62	9,2	16,09	3,86 ( $\alpha = 0,0213$ )	12,23	1,33
Herzkranker (R.) . . . . .	19,90	678,47	205,62	8,77	15,82	3,97 ( $\alpha = 0,0216$ )	11,85	1,35
Hemiplegie (Sch.) . . . . .	20,00	682,57	205,62	6,65	13,11	4,10 ( $\alpha = 0,0222$ )	9,01	1,35
Polycythämie I (Ulber) . . . . .	20,40	669,67	205,62	6,11	12,31	4,05 ( $\alpha = 0,0223$ )	8,26	1,35
„ II (Hilbringer) . . . . .	20,35	668,07	205,62	5,91	11,85	4,03 ( $\alpha = 0,0223$ )	7,82	1,32
„ III (Ziller) . . . . .	20,00	678,64	205,62	3,51	8,94	4,19 ( $\alpha = 0,0228$ )	4,75	1,35
„ IV (Kapfer) . . . . .	20,03	650,82	77,55	2,70	5,06	1,46 ( $\alpha = 0,0220$ )	3,60	1,33
Perniciöse Anämie (M.) . . . . .	20,10	702,58	77,55	3,21	5,85	1,56 ( $\alpha = 0,0218$ )	4,29	1,34
Chlorose II (B.) . . . . .	20,00	616,49	205,62	11,10	17,96	3,47 ( $\alpha = 0,0208$ )	14,49	1,31
„ III (E.) . . . . .	20,00	678,62	205,62	8,60	15,18	3,98 ( $\alpha = 0,0216$ )	11,20	1,30
Skorbut . . . . .	19,90	681,93	205,62	7,73	14,41	4,04 ( $\alpha = 0,0219$ )	10,37	1,34
Pseudoleukämie . . . . .	20,30	703,09	77,55	3,20	5,82	1,56 ( $\alpha = 0,0216$ )	4,26	1,33

flüssig, Doppelbestimmungen zu machen. So schreibt Bohr:<sup>1)</sup> «Die Eisenmenge ist nur in gewissen Fällen zweimal in jeder Blutprobe bestimmt worden, nämlich in einigen Fällen, in welchen die Resultate auffielen». Ferner kommt die Schwierigkeit, eisenfreie Reagenzien, insbesondere eisenfreies Zink<sup>2)</sup> zu erhalten, in Betracht. Spurenweise vorhandene Verunreinigungen, die bei gewöhnlichen Eisenbestimmungen vielfach ohne Belang sind, geben bei der Bestimmung der minimalen Eisenmengen des Hämoglobins einen sehr großen Ausschlag. Schließlich ist ein kleinerer Teil der Arbeiten über den Eisengehalt des Blutes mit dem Jollesschen «Ferrometer» gemacht worden. Diesen Arbeiten ist jeder Wert abzusprechen, nachdem Krüss<sup>3)</sup> gezeigt hat, daß bei der Rhodaneisenreaktion ein leicht zersetzliches Doppelsalz gebildet wird, dessen Farbe von dem Dissoziationsgrad abhängig ist.

Die sorgfältigsten Eisenbestimmungen verdanken wir Zinnoffsky<sup>4)</sup> im Bungeschen Laboratorium. Zinnoffsky war der erste, der mit größeren Mengen (bis 60 g) von wiederholt umkrystallisiertem Hämoglobin gearbeitet hat. Er hat sich nicht auf eine einzige Darstellungsweise beschränkt, sondern hat verschiedene Darstellungen angewandt, hat ferner das Eisen sowohl gravimetrisch wie auch volumetrisch (mit  $\text{KMnO}_4$ ) bestimmt und ist nach beiden Methoden zu gleichen Resultaten gekommen. Im Bungeschen Laboratorium wurde von Zinnoffsky und Jaquet der Eisengehalt des Hämoglobins vom Pferd, Rind, Hund und Huhn übereinstimmend zu 0,34% gefunden.

Da wir den größten Teil unserer Untersuchungen an

---

entgangen, daß bei der Reaktion ein Mehrverbrauch von  $\text{KMnO}_4$  stattfindet und Chlor frei wird.

<sup>1)</sup> Bohr, Skand. Archiv f. Physiol., Bd. III, S. 102.

<sup>2)</sup> 4 g eines Präparates von einer bekannten Firma, «Metallisches Zink, puriss., chem. rein granuliert, pro analysi», in eisenfreier Schwefelsäure gelöst, verbraucht 2,95 ccm Permanganat (Titer, 0,591 g Fe im Liter); 0,0017 g Fe in 4,0 g Zink = 0,04% Fe. Die Lösung gab eine intensive Rotfärbung mit Rhodankalium.

<sup>3)</sup> G. und H. Krüss, Kolorimetrie und quantitative Spektralanalyse, 1891, S. 174—183.

<sup>4)</sup> Zinnoffsky, Diese Zeitschrift, Bd. X.

Menschenblut anstellen wollten, das wir manchmal nur in kleinen Mengen bekommen konnten, kam es darauf an, eine Methode zu gebrauchen, mit der man auch bei kleinen Eisenmengen genaue Bestimmungen ausführen kann. Für die Bestimmung kleiner Eisenmengen im Blut wäre die von Neumann<sup>1)</sup> 1903 angegebene Methode ein sehr großer Fortschritt, wenn sie immer zuverlässige Resultate geben würde. Aber gegen die jodometrische Bestimmung des Eisens lassen sich viele Bedenken geltend machen. Die Reaktion, die der Methode zugrunde liegt, ist umkehrbar und man ist genötigt, ganz genau die Bedingungen einzuhalten, bei denen die Reaktion nach der einen Seite vollständig verläuft. Die Resultate sind nämlich in hohem Grad von der Acidität der Lösung und der Temperatur sowie von der Art der Titration des Endpunktes abhängig. Man braucht sich darum auch nicht zu wundern, wenn man nach den abweichenden Vorschriften von F. Mohr,<sup>2)</sup> Treadwell<sup>3)</sup> und Neumann verschiedene Resultate erhält. Nach zahlreichen Vorversuchen haben wir die Reaktion so sehr von der Temperatur und dem Salzäuregehalt der Lösung abhängig gefunden, daß wir die jodometrische Bestimmung des Eisens mit  $\frac{1}{250}$ -N-Thiosulfat ganz aufgegeben haben. Dagegen ist der Vorschlag von Neumann, die Veraschung auf nassem Weg vorzunehmen, sehr wertvoll. Die Methode ist sehr bequem und rasch ausführbar. Weiter bewirkt die Erzeugung eines Niederschlages von Zinkammoniumphosphat in der ammoniakalisch gemachten Aschenlösung eine große technische Erleichterung bei der quantitativen Ausfällung des Eisens. Denn die quantitative Ausfällung des Eisens mit Ammoniak allein geht schwer und der dabei entstehende leicht flockige Niederschlag läßt sich seiner geringen Menge wegen nicht gut weiter verarbeiten. Durch Zusatz des Neumannschen Reagens und Kochen der ammoniakalisch gemachten Aschenlösung wird das Eisen in kurzer Zeit vollständig mitgefällt; der schwere Niederschlag läßt sich leicht auswaschen und weiter verarbeiten; das Filtrat gibt nach An-

<sup>1)</sup> A. Neumann, Diese Zeitschrift, Bd. XXXVII.

<sup>2)</sup> F. Mohr, Titriermethoden, 5. Aufl., 1877, S. 290.

<sup>3)</sup> Treadwell, Lehrb. d. analyt. Chemie, Bd. II, S. 521, 4. Aufl., 1907.



säuren mit HCl keine Rotfärbung mit Rhodankalium. Wir haben uns dieser zwei Vorzüge der Neumannschen Methode bedient und sind nur in der Behandlung des Niederschlages von Eisenhydroxyd und Zinkammoniumphosphat von Neumanns Vorschriften abgewichen, indem wir ihn in  $\text{H}_2\text{SO}_4$  gelöst, die Lösung mit Zink reduziert und endlich mit  $\frac{1}{100}$ -n- $\text{KMnO}_4$  titriert haben.

Das Verfahren war folgendes.

Das Hämoglobin, Blut oder eine Blutlösung wurde in einem Gemisch von konzentrierter  $\text{H}_2\text{SO}_4$  und  $\text{HNO}_3$  zu gleichen Volumenteilen nach der Neumannschen Vorschrift verascht. Die saure Aschelösung wurde verdünnt und die überschüssige Salpetrigsäure verjagt; nach dem Abkühlen wurde die verdünnte Aschelösung mit dem Zinkreagens versetzt, mit Ammoniak neutralisiert und der entstandene Niederschlag in einem kleinen Überschuß von Ammoniak gerade gelöst. Zu der Lösung wurden einige Platintetraeder, um gleichmäßiges Sieden zu erreichen, gegeben. Die Lösung wurde dann langsam bis zum Sieden erhitzt und eine halbe Stunde, eventuell länger in flottem Sieden gehalten. Die Platintetraeder verhindern gänzlich das Stoßen und Hochschleudern der Flüssigkeit, das sonst nach der Abscheidung des krystallinischen Zinkammoniumphosphats häufig auftritt. Die überstehende Flüssigkeit wurde, während sie noch heiß war, von dem Niederschlag abfiltriert und der Niederschlag 3 mal mit heißem Wasser gewaschen. Hierbei darf das Filtrat nach dem Ansäuern mit HCl keine Rhodanreaktion geben. Der Niederschlag wurde dann in verdünnter  $\text{H}_2\text{SO}_4$  gelöst, in eine große Platinschale übergeführt und mit Zink reduziert. Die vollständige Reduktion von 10 mg Eisen nimmt selbst bei Anwendung von chemisch reinem Zink, das von verdünnter  $\text{H}_2\text{SO}_4$  allein so gut wie gar nicht angegriffen wurde, in der Platinschale bloß 3 Stunden in Anspruch. Die reduzierte Lösung wurde dann durch Glaswolle, die mit  $\text{H}_2\text{SO}_4$  gewaschen war, in ein Becherglas filtriert und mit etwa  $\frac{1}{100}$ -n-Permanganat aus einer Gay-Lussacschen Bürette titriert. Das Permanganat wurde von jeder Titration gegen Thiosulfat von bekanntem Titer eingestellt. Der Titer des Thiosulfats wurde wiederholt mit  $\frac{1}{100}$ -n-Kaliumbichromat kontrolliert. Das

Kaliumbichromat war ein 3 mal umkrystallisiertes Präparat, das durch Erhitzen auf eine Temperatur, die einige Grade unter dem Schmelzpunkt lag, getrocknet worden war. (Ausführliches über die Anwendung von Kaliumbichromat als Ur-titersubstanz, Zuverlässigkeit der Methode, Fehlergröße (1 pro Mille) usw., siehe Julius Wagner, Maßanalytische Studien, Habilitationsschrift, Leipzig 1898.)

Bei Vorversuchen mit Zusatz des Neumannschen Reagens zu bekannten Eisenmengen stellte es sich heraus, daß das Reagens keinen Einfluß auf die Titration mit Permanganat hat; auch eine blinde Probe mit Neumannschem Reagens und wie oben weiter verarbeitet, reduziert kein Permanganat. Sämtliche angewandten Reagenzien waren eisenfrei; das Zink, das für uns von Kahlbaum hergestellt wurde, gab nach Lösung in  $H_2SO_4$  und nach langem Stehen keine Rhodanreaktion; eine Lösung von 10 g in  $H_2SO_4$  blieb nach Zusatz von 2 Tropfen  $1/100$ -n-Permanganat rot gefärbt.

Mit dieser Methode erhielt ich folgende Resultate.

### I. Hämoglobinpräparate.

1,4920 g trockenes feingepulvertes Rinderhämoglobin — Rückstand von der ersten Bestimmung des Absorptionsverhältnisses — verbrauchten 8,45 ccm Permanganatlösung (Titer 0,594 g Fe in Liter).

Fe-Gehalt des Präparates 5,02 mg = 0,336 %.

Hämoglobin, das zur zweiten Bestimmung des Absorptionsverhältnisses verwendet wurde.

Portion I 2,5594 g.

Portion II 2,8022 g.

Die Trockenbestimmung ergab einen Gehalt an trockenem Hämoglobin von 92,69 % (I. 0,3625 g blieb mit 0,3360 g konstant, II. 0,4827 g wurde mit 0,4474 g konstant). Portion I, 2,3723 g trockenes Hämoglobin verbraucht 13,6 ccm Permanganatlösung (Titer, 0,586 g Fe in Liter), Portion II, 2,5973 g verbraucht 14,7 ccm Permanganat. Daraus berechnet sich:

Fe-Gehalt Portion I = 0,336 %.

Fe-Gehalt Portion II = 0,332 %.

Mittlerer Fe-Gehalt des Präparates = 0,334 %.

Menschenhämoglobin, vollständig getrockneter Rückstand aus der Konstantebestimmung wog 3,3267 g, davon 6,99%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 = 0,2320$  g. 3,0947 g Menschenhämoglobin verbraucht 17,2 ccm Permanganat (Titer, 0,591 g Fe im Liter). Fe im Präparat = 10,24 mg.

Fe-Gehalt des Hämoglobins = 0,331%.

## II. Blut und Blutlösungen.

Lösung von ausgeschleuderten roten Blutkörperchen vom Gasversuch «Rinderblut, 15. VII. 08». Zwei 50 ccm-Portionen verascht. Portion I verbraucht 14,0 ccm Permanganat (Titer, 0,595 g Fe in Liter), entsprechend 8,33 mg Fe; Portion II verbraucht 14,1 ccm Permanganat = 8,68 mg Fe. Hämoglobingehalt der Lösung (spektrophotometrisch bestimmt) 4,89%.

Fe-Gehalt des Hämoglobins aus Portion I berechnet = 0,340%.

Fe-Gehalt des Hämoglobins aus Portion II berechnet = 0,342%.

Mittlerer Fe-Gehalt des Hämoglobins = 0,342%.

Rinderblut. 2 Portionen von 50 ccm. Portion I verbraucht 30,1 ccm Permanganat (Titer, 0,595 g Fe im Liter), Portion II verbraucht 30,0 ccm. Hämoglobingehalt 10,53%.

Fe-Gehalt Portion I, 17,91 mg = 0,340% Fe im Hämoglobin.

Fe-Gehalt Portion II, 17,75 mg = 0,337% Fe im Hämoglobin.

Mittlerer Fe-Gehalt des Hämoglobins = 0,339%.

## Menschenblut.

Blut von Gesunden. Portion I, 10 ccm verbraucht 7,7 ccm Permanganat (Titer, 0,595 g Fe in Liter); Portion II, 20 ccm verbraucht 15,6 ccm Permanganat. Hämoglobingehalt des Blutes 13,8%.

Fe-Gehalt Portion I, 4,58 mg = 0,332% Fe im Hämoglobin.

Fe-Gehalt Portion II, 9,28 mg = 0,336% Fe im Hämoglobin.

Mittlerer Fe-Gehalt des Hämoglobins = 0,334%.

Herzklappenfehler (R). Portion I, 20 ccm konzentrierter Lösung von ausgeschleuderten roten Blutkörperchen, 14,6 ccm Permanganat (Titer, 0,595 g Fe in Liter), Portion II, 20 ccm verbraucht 14,5 ccm. Hämoglobingehalt der Lösung 13,2%.

Fe-Gehalt Portion I, 8,69 mg = 0,329% Fe im Hämoglobin.

Fe-Gehalt Portion II, 8,63 mg = 0,327% Fe im Hämoglobin.

Mittlerer Fe-Gehalt des Hämoglobins = 0,328%.

Hemiplegie (S.). Portion I, 50 ccm konzentrierter Lösung von ausgeschleuderten roten Blutkörperchen, verbraucht 31,0 ccm Permanganat (Titer, 0,595 g in Liter). Portion II verloren. Hämoglobingehalt der Lösung 11,07%.

Fe-Gehalt Portion I, 18,46 mg = 0,334% Fe im Hämoglobin.

Polycythämie I. (U.). Portion I, 100 ccm Lösung von ausgeschleuderten roten Blutkörperchen, verbraucht 16,9 ccm Permanganat (Titer, 0,595 g Fe in Liter), Portion II, 100 ccm verbraucht 16,85 ccm Permanganat. Hämoglobingehalt der Lösung 3,0%.

Fe-Gehalt Portion I, 10,06 mg = 0,335% Fe im Hämoglobin.

Fe-Gehalt Portion II, 10,03 mg = 0,334% Fe im Hämoglobin.

Mittlerer Fe-Gehalt des Hämoglobins = 0,335%.

Polycythämie II. (H.). Portion I, 100 ccm verbraucht 16,10 ccm Permanganat (Titer, 0,595 g Fe in Liter), Portion II, 100 ccm verbraucht 16,25 ccm Permanganat. Hämoglobingehalt der Blutlösung 2,88%.

Fe-Gehalt Portion I, 9,56 mg = 0,332% Fe im Hämoglobin.

Fe-Gehalt Portion II, 9,67 mg = 0,336% Fe im Hämoglobin.

Mittlerer Fe-Gehalt des Hämoglobins = 0,334%.

Polycythämie III. (Z.). Portion I, 100 ccm Blutlösung verbraucht 10,3 ccm Permanganat (Titer, 0,595 g Fe in Liter), Portion II, 100 ccm verbraucht 10,2 ccm Permanganat. Hämoglobingehalt der Lösung 1,81%.



Fe-Gehalt Portion I, 6,13 mg = 0,338% Fe im Hämoglobin.

Fe-Gehalt Portion II, 6,07 mg = 0,335% Fe im Hämoglobin.

Mittlerer Fe-Gehalt des Hämoglobins 0,337%.

Chlorose II. Portion I, 50 ccm einer Lösung von ausgeschleuderten Blutkörperchen, verbraucht 15,5 ccm Permanganat (Titer, 0,595 g in Liter), Portion II, 50 ccm verbraucht 15,35 ccm Permanganat. Hämoglobingehalt der Blutlösung 5,41%.

Fe-Gehalt Portion I, 9,22 mg = 0,340% Fe im Hämoglobin.

Fe-Gehalt Portion II, 9,13 mg = 0,337% Fe im Hämoglobin.

Mittlerer Fe-Gehalt des Hämoglobins = 0,339%.

Chlorose III. Portion I, 100 ccm einer Lösung von ausgeschleuderten roten Blutkörperchen, verbraucht 22,9 ccm Permanganat (Titer, 0,595 im Liter), Portion II, 100 ccm verbraucht 23,0 ccm Permanganat. Hämoglobingehalt der Lösung 4,2%.

Fe-Gehalt Portion I, 13,63 mg = 0,325% Fe im Hämoglobin.

Fe-Gehalt Portion II, 13,69 mg = 0,326% Fe im Hämoglobin.

Mittlerer Fe-Gehalt des Hämoglobins = 0,326%.

Perniziöse Anämie (M). 50 ccm einer Lösung von ausgeschleuderten roten Blutkörperchen verbraucht 11,9 ccm Permanganat (Titer 0,595 g Fe im Liter). Hämoglobingehalt der Lösung 4,15%.

Fe-Gehalt der Lösung 7,08 mg = 0,342% Fe im Hämoglobin.

Skorbut (M). Portion I, 100 ccm verbraucht 20,55 ccm Permanganat (Titer, 0,595 g Fe in Liter), Portion II, 100 ccm verbraucht 20,50 ccm. Hämoglobingehalt der Blutlösung 3,76%.

Fe-Gehalt Portion I, 12,20 mg = 0,324% Fe im Hämoglobin.

Fe-Gehalt Portion II, 12,17 mg = 0,324% Fe im Hämoglobin.

Mittlerer Fe-Gehalt des Hämoglobins = 0,324%.

Pseudoleukämie. 50 ccm einer Lösung von ausgeschleuderten roten Blutkörperchen verbrauchten 11,75 ccm Permanganat (Titer, 0,595 g Fe in Liter). Hämoglobingehalt der Lösung 4,08%.

Fe-Gehalt der Lösung 6,99 mg = 0,341% Fe im Hämoglobin.

Gesamtmittel aus 16 Bestimmungen 0,335%, abgerundet = 0,34%.

### Zusammenfassung.

Wir stellen nun zum Schluß die Werte für  $\frac{\epsilon'}{\epsilon}$ , den Eisengehalt und die Gasaufnahme des Hämoglobins bei sämtlichen Versuchen an Menschenblut in übersichtlicher Weise zusammen.

Fall	$\frac{\epsilon'}{\epsilon}$	Eisengehalt des Hämoglobins %	Kohlenoxydauf- nahme pro Gramm Hämoglobin ccm
Gesunder . . . . .	1,56	0,34	1,33
Herzkranker (R.) . . .	1,57	0,33	1,35
Hemiplegie (S.) . . .	1,57	0,33	1,35
Polycythämie I . . .	1,59	0,34	1,35
"    II . . .	1,59	0,33	1,32
"    III . . .	1,59	0,34	1,35
"    IV . . .	1,58	—	1,33
Perniciöse Anämie . .	1,58	0,34	1,34
Chlorose II . . . . .	1,60	0,34	1,31
"    III . . . . .	1,58	0,33	1,30
Skorbut . . . . .	1,58	0,32	1,34
Pseudoleukämie . . .	1,58	0,34	1,33

Aus diesen Zahlen geht mit Deutlichkeit hervor, daß die Lichtextinktion, der Eisengehalt und das Gasbindungsvermögen des Menschenhämoglobins innerhalb der methodischen Fehlergrenzen konstante

Größen sind. Diese Konstanz gilt nicht nur für das Hämoglobin des normalen Menschenblutes, sondern auch für das Menschenhämoglobin bei Polycythämien, bei perniziöser Anämie, Chlorose, Skorbut und Pseudoleukämie.

Schließlich sei es mir gestattet, Herrn Prof. Friedrich Müller für seine bereitwillige Unterstützung und sein stets entgegengebrachtes Interesse bestens zu danken. Meinem Freund, Erich Meyer, verdanke ich die Anregung zu der Arbeit und die Besorgung der Blutproben. Es ist mir eine angenehme Pflicht, Herrn Dr. E. Letsche, der nach dem Tode von Herrn Prof. Hüfner die Leitung des physiologisch-chemischen Instituts in Tübingen pro tempore übernahm, für sein Entgegenkommen, seine zahlreichen Ratschläge sowie die Anleitung und persönliche Beihilfe bei vielen Versuchen meinen verbindlichsten Dank auszusprechen.

---