

# Bestimmung des Moleculargewichts vom Hundehämoglobin durch Verdrängung des Kohlenoxyds seiner Kohlenoxydverbindung mittelst Stickoxyd.

Von

Dr. John Marshall aus Philadelphia

(Auszug aus der Inaugural-Dissertation des Verfassers: The determination of the spectrophotometric Constants and the molecular weight of Carbonic oxide Hemoglobin. Tübingen 1882).

1. In einer in Kolbe's Journal (Bd. 22, S. 362—388) erschienenen Abhandlung des Herrn Prof. Hüfner, welche den Titel: «Untersuchungen zur physikalischen Chemie des Blutes» führt und wesentlich die Bestimmung des Molekulargewichtes vom Hundehämoglobin nach verschiedenen Methoden zum Gegenstande hat, ist u. A. die Bemerkung<sup>1)</sup> gemacht, dass bei den neuen, nach der Verdrängungsmethode (Sauerstoff durch Kohlenoxyd) ausgeführten, Bestimmungen dieser Art jegliche Annahme über die Menge etwa dem Lösungswasser entstammenden Sauerstoffs absichtlich unterlassen sei. Er glaube durchaus nicht mehr, sagt Prof. Hüfner dort, dass sich durch Schütteln des Blutes mit Kohlenoxyd und nachheriges Auspumpen sämtlicher vorher frei gewordene Sauerstoff auch wirklich gewinnen lasse, vielmehr werde ja nach allen Erfahrungen, die man bis dahin gemacht, gerade durch das längere Schütteln immer auch wieder ein Theil desselben in festere Verbindungen übergeführt, sei es mit den metallischen Verunreinigungen des Quecksilbers, welche jederzeit vorhanden, sei es mit leicht oxydirbaren Stoffen, die den gelösten Blutkörperchen entstammen, sei es auch mit Bestandtheilen des Fettes, mit welchem die Glashähne überzogen sind. In der That wird Jeder, der sich auch nur

<sup>1)</sup> A. a. O., S. 383.

vorübergehend mit ähnlichen Untersuchungen beschäftigt hat, Herrn Prof. Hüfner hierin beipflichten<sup>1)</sup>).

Soll daher die Verdrängungsmethode noch ferner zu Molekulargewichtsbestimmungen von Hämoglobinen verwerthet werden, so dürfte dies eigentlich nur unter Anwendung von Gasen geschehen, die nachweislich mit keinen oder nur mit ganz geringen Affinitäten zu anderen Stoffen, jedenfalls nicht mit den energischen und vielseitigen Affinitäten des Sauerstoffs behaftet sind; vor Allem müsste gerade der auszutreibende, zu verdrängende, Körper ein möglichst indifferent sein.

Auf Veranlassung des Herrn Prof. Hüfner habe ich es unternommen, die zuerst von L. Hermann untersuchte Thatsache, dass sich das Kohlenoxyd aus seiner Verbindung mit dem Hämoglobin durch Stickoxydgas austreiben lässt, zu diesem Zwecke verwerthbar zu machen. Man durfte sich von der Benutzung dieser Thatsache besonders auch deswegen einen guten Erfolg versprechen, weil das Kohlenoxydhämoglobin für eine verhältnissmässig feste Verbindung gilt, die man krystallinisch darstellen und unzersetzt wieder lösen könne, für deren Kohlenoxydgehalt, wenn ihre wässerigen, schwach alkalischen Lösungen dem Versuche unterworfen würden, eine Correctur wegen etwa dem Lösungsmittel entstammenden, also einfach absorbirten, Kohlenoxydgases daher gewiss nicht von Nöthen sei.

Da die einzelnen Versuche im Uebrigen genau nach dem schon früher von Prof. Hüfner geübten Verfahren und mit dem nämlichen Verdrängungsapparate ausgeführt werden sollten, so waren von mir zunächst folgende zwei Voraufgaben zu lösen.

Die eine bestand in der Feststellung derjenigen optischen Constanten des Kohlenoxydhämoglobins, deren Kenntniss für die quantitative Bestimmung dieser Verbindung mit Hülfe

<sup>1)</sup> Auf die grosse Wahrscheinlichkeit, dass die neu entstandene Kohlenoxydverbindung selber von dem wieder und wieder in die Lösung hineingeschüttelten Sauerstoffe behufs der Oxydation des Kohlenoxyds in Anspruch nimmt, muss hier gleichfalls hingedeutet werden.

des Spectrophotometers erste Bedingung ist; die andere in der Auffindung einer raschen und exacten Methode für die Analyse eines Gasgemenges, welches Kohlenoxyd und Stickoxyd neben einander enthält.

2. Die Bestimmung der photometrischen Constanten des Kohlenoxydhämoglobins geschah nach bereits früher angewandten und namentlich in der Abhandlung von Noorden's<sup>1)</sup> genau beschriebenen Methoden, so dass hier eine abermalige Beschreibung des ganzen Verfahrens überflüssig erscheint. Ich will nur anführen, dass ich mich für die Feststellung der Concentration einer Normlösung sogar der gleichen Gefässe wie von Noorden bedient und dass ich ferner mit ganz dem gleichen Spectrophotometer wie jener gearbeitet habe. Die benutzten Spectralregionen waren abermals dieselben wie früher, nämlich die Gegenden:

D 32 E — D 53 E, und D 63 E — D 84 E.

In der folgenden Tabelle bezeichnen  $c$  die Concentration,  $\epsilon_c$  und  $\epsilon'_c$  die in den obengenannten Regionen gefundenen Extinctionscoëfficienten,  $A_c$  und  $A'_c$  die bezüglichen photometrischen Constanten.

Tabelle I.

Vers.- Nr.	$c$	$\epsilon_c$	$\epsilon'_c$	$A_c$	$A'_c$	$\frac{A_c}{A'_c}$	
1	0,00078361	0,69590	0,78764	0,001126	0,000995	1,131	
2	0,00082676	0,72152	0,81208	0,001272	0,001018	1,249	
3	0,00089324	0,70246	0,79454	0,001272	0,001124	1,131	
4	0,00123690	0,94378	1,07062	0,001281	0,001129	1,134	
5	0,00123300	0,94662	1,07144	0,001302	0,001177	1,106	
6	0,00114110	0,86738	0,97840	0,001317	0,001167	1,128	
7	0,00127660	0,76400	0,86610	0,001320	0,001164	1,134	
8	0,00101250	0,75628	0,85410	0,001339	0,001158	1,156	
9	0,00110140	0,80152	0,90866	0,001343	0,001185	1,133	
10	0,00163310	0,17496	1,35010	0,001390	0,001238	1,122	
11	0,00139770	1,00312	1,14712	0,001393	0,001218	1,143	
12	0,00159810	1,13176	1,30132	0,001412	0,001228	1,149	
				Mittel	<b>0,001314</b>	<b>0,001150</b>	<b>1,142</b>

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. IV, S. 9—35.

Also ist  $A_c = 0,001314$ ,

$A'_c = 0,001150$ ;

der Mittelwerth für den Quotienten aber,  $\frac{A_c}{A'_c} = 1,142$ .

Dieser Werth des Quotienten  $\frac{A_c}{A'_c}$  ist, wie früher <sup>1)</sup> schon in Betreff der Werthe von  $\frac{A_o}{A'_o}$  und  $\frac{A_r}{A'_r}$  von v. Noorden hervorgehoben ward, von wesentlicher praktischer Bedeutung. Man kann nämlich aus dem Grade der Uebereinstimmung, die zwischen dem aus den jeweiligen Beobachtungen berechneten Quotienten und dieser Zahl besteht, entnehmen, ob man im gegebenen Falle nur eine Lösung von reinem und unzersetzten Kohlenoxydhämoglobin vor sich hat, oder ein Gemenge verschiedener Verbindungen des Blutfarbstoffs. Man erkennt die Abweichung sofort an der Grösse der Differenz der Drehungswinkel, die man erhält, wenn man die Lichtabsorption einmal in der einen, das 2. Mal in der anderen der oben bezeichneten Spectralregionen zu messen sucht. Für frische und reine, zum Zwecke der Aufhellung und Klärung nur schwach alkalisch gemachte, Lösungen von Kohlenoxydhämoglobin beträgt die Grösse dieser Winkeldifferenz an dem von mir benutzten Instrumente etwa  $2^{\circ}45'$ , während sie für reine Oxyhämoglobininlösungen in den gleichen Spectralregionen im Mittel  $6^{\circ}30'$  ausmacht<sup>2)</sup>. Nun habe ich sehr häufig die Beobachtung gemacht, dass eine Lösung von reinem Kohlenoxydhämoglobin wohl im Anfange der Untersuchung vor dem Spectralapparate jene normale Differenz von  $2^{\circ}45'$  ergab, aber bereits im Laufe der Untersuchung, nach Verfluss von einigen Minuten schon, sich derart veränderte, dass jene Differenz immer kleiner und kleiner und damit die ganze Bestimmung illusorisch ward. In der That hatte auch die Lösung nachher nicht mehr den bekannten rosenrothen Farbenton, sondern viel eher den

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. IV, S. 33; ferner Jahresbericht über die Fortschritte der Thierchemie, Bd. 10, S. 161.

<sup>2)</sup> Der Winkel ist in beiden Fällen grösser, wenn man in der Region D63 E — D84 E untersucht.

hellrothen einer Oxyhämoglobinlösung. Dass das Kohlenoxydhämoglobin nicht eine derartig feste Verbindung ist, wie man eine Zeitlang geglaubt haben mag, ist schon seit Jahren bekannt. Man weiss, dass nicht nur das Vacuum, sondern auch das Durchleiten anderer Gase, besonders des Sauerstoffs, durch seine Lösungen auf die Verbindung langsam zerstörend wirkt; und so darf es denn nicht Wunder nehmen, dass solche Lösungen schon beim blossen Stehen an freier Luft — die angewandten Absorptionszellen waren offen — allmählig verändert werden. Muss doch die ganze kohlenoxydfreie Atmosphäre auf sie zunächst wie ein Vacuum wirken; aber dann muss auch der Sauerstoff der Luft alsbald seine Wirkung geltend machen; und so bleibt denn nur die Beobachtung bemerkenswerth, die ich mehrfach gemacht habe, dass die besprochene Zersetzung während der kurzen Untersuchung vor dem Spectralapparate besonders bei nasskaltem, stürmischem Wetter eintrat, dagegen nicht bei heiterem, klarem Himmel. Sollte diese Erscheinung vielleicht mit dem wechselnden Ozongehalte der Luft zusammenhängen?

In solchem Falle müsste man annehmen, dass nicht die Dissociation, sondern eine Oxydation des Kohlenoxyds der primäre und entscheidende Vorgang sei. Aehnliche Beobachtungen wie diese hat übrigens Dybkowsky schon vor einer Reihe von Jahren in Hoppe-Seyler's Laboratorium gemacht<sup>1)</sup>. Dass die Schuld in meinen Fällen nicht an einer zu grossen Concentration der untersuchten Lösungen liegen konnte, geht aus der obigen Tabelle hervor. Die Concentration war, wie man sieht, in allen Fällen eine äusserst geringe.

Das zu allen diesen Versuchen benutzte Kohlenoxydhämoglobin, war aus krystallinischem Oxyhämoglobin in bekannter Weise dargestellt, 1mal umkrystallisirt und mit einer Mischung aus einem Theile Alkohol und drei Theilen Wasser gewaschen, auch war die Lösung der erstmals erhal-

<sup>1)</sup> Hoppe-Seyler's medicinisch-chemische Untersuchungen, Bd. 1, S. 122.

tenen Krystalle vor dem erneuten Zusatze von Alkohol Vorsichtshalber noch einmal tüchtig mit Kohlenoxyd geschüttelt und in einem verstopften Cylinder in die Kälte gestellt worden.

### 3. Methode zur genauen Analyse eines Gasgemenges, welches Kohlenoxyd und Stickoxyd neben einander enthält.

Da in den auszuführenden Verdrängungsversuchen eine Austreibung des Kohlenoxyds durch Stickoxyd beabsichtigt und folglich mit Sicherheit zu erwarten war, dass das am Schlusse eines jeden Verdrängungsversuches aufgesammelte Gasvolumen neben dem ausgetriebenen Kohlenoxyd auch noch reichliche Mengen des im Ueberschusse angewandten Stickoxyds enthalten würde, so galt es zuvor ein Verfahren auszuprobiren, nach welchem es möglich würde, grosse Mengen Kohlenoxyds neben vielleicht noch grösseren Mengen Stickoxyds mit möglichster Schärfe zu bestimmen.

Von dem Versuche einer genauen und raschen Bestimmung des einen oder des anderen der beiden Gase durch mit geeigneten Absorptionsmitteln getränkte Papiermachékugeln musste bei der grossen Menge, in welcher beide Gase voraussichtlich jedesmal vorhanden waren, bald Abstand genommen werden. Kohlenoxyd lässt sich aber mit Stickoxyd und auf Kosten desselben nicht verbrennen: so blieb mir denn nichts anderes übrig, als dem Rathe des Herrn Prof. Hüfner folgend zunächst das Stickoxyd bei Gegenwart von Natronlauge (enthaltend 7% Natronhydrat, nach Bunsen, Gasometrische Methoden, 2. Aufl., S. 102) durch zugefügten Sauerstoff in salpetrige Säure zu verwandeln und nach deren Absorption das Kohlenoxyd für sich zu bestimmen.

Einige Controlversuche, welche die Exaktheit der Methode beweisen können, mögen hier Platz finden. Vorher möge nur noch bemerkt werden, dass das zu diesen, wie zu den eigentlichen, Verdrängungsversuchen benutzte Stickoxydgas aus verdünnter Salpetersäure und Kupfer bereitet und nach

Bunsen's Vorschrift mit Eisenvitriollösung gereinigt wurde; dass ferner das Kohlenoxydgas aus ameisensaurem Natrium mit concentrirter Schwefelsäure dargestellt und zu mehrerer Sicherheit durch ein mit Kalistückchen erfülltes Röhrchen unmittelbar aus dem Entwicklungskölbchen in das Absorptionsrohr, in welchem der Probeversuch stattfinden sollte, überleitet ward.

### Analyse I.

	Vol.	Druck	Temp.	Vol. bei 0° u. 1 <sup>m</sup> Dr.
Angewandtes Kohlenoxyd . . . . .	42,82	0,5854	17,8	23,53
Nach Zufügung von Stickoxyd, Natron- lauge und Sauerstoff und nach Ab- sorption der salpetrigen Säure . . .	121,90	0,6653	18,0	76,08
Nach Ueberführung in's Eudiometer	249,86	0,4898	17,8	114,90
Nach der Verpuffung . . . . .	221,32	0,4668	17,5	97,09
Nach Absorption mit Lauge . . . . .	155,07	0,4219	17,0	61,59

Aus der Proportion:

$$76,08 : 23,53 = 114,90 : x$$

ergibt sich:

$$x = 35,53.$$

Aus der Contraction:

$$97,09 - 61,59 = 35,50.$$

### Analyse II.

	Vol.	Druck	Temp.	Vol. bei 0° u. 1 <sup>m</sup> Dr.
Angewandtes Kohlenoxyd . . . . .	46,15	0,5874	18,0	25,45
Nach Zufügung von Stickoxyd, Natron- lauge, Sauerstoff und nach erfolgter Absorption . . . . .	149,11	0,6947	19,0	96,85
Nach Ueberführung in's Eudiometer	271,70	0,5046	18,8	128,24
Nach der Verpuffung . . . . .	246,51	0,4832	19,2	111,36
Nach Absorption mit Lauge . . . . .	186,36	0,4450	18,2	77,75

Aus der Proportion:

$$96,85 : 25,45 = 128,24 : x$$

ergibt sich:

$$x = 33,69.$$

Aus der Contraction:

$$111,36 - 77,75 = 33,61.$$

## Analyse III.

	Vol.	Druck	Temp.	Vol. bei 0° u. 1 <sup>m</sup> Dr.
Angewandtes Kohlenoxyd . . . .	48,00	0,5849	16,8	26,44
Nach Zufügung von Stickoxyd, Natron- lauge, Sauerstoff und nach Absorp- tion der salpetrigen Säure . . .	135,30	0,6773	17,0	86,27
Nach Ueberleitung in's Endiometer .	208,60	0,4448	17,0	87,25
Nach der Verpuffung . . . . .	185,31	0,4244	17,8	73,84
Nach Absorption mit Lauge . . . .	130,73	0,3839	17,3	47,19

Die Proportion :

$$86,27 : 26,44 \quad 87,25 : x$$

ergibt :

$$x = 26,74.$$

Die Contraction :

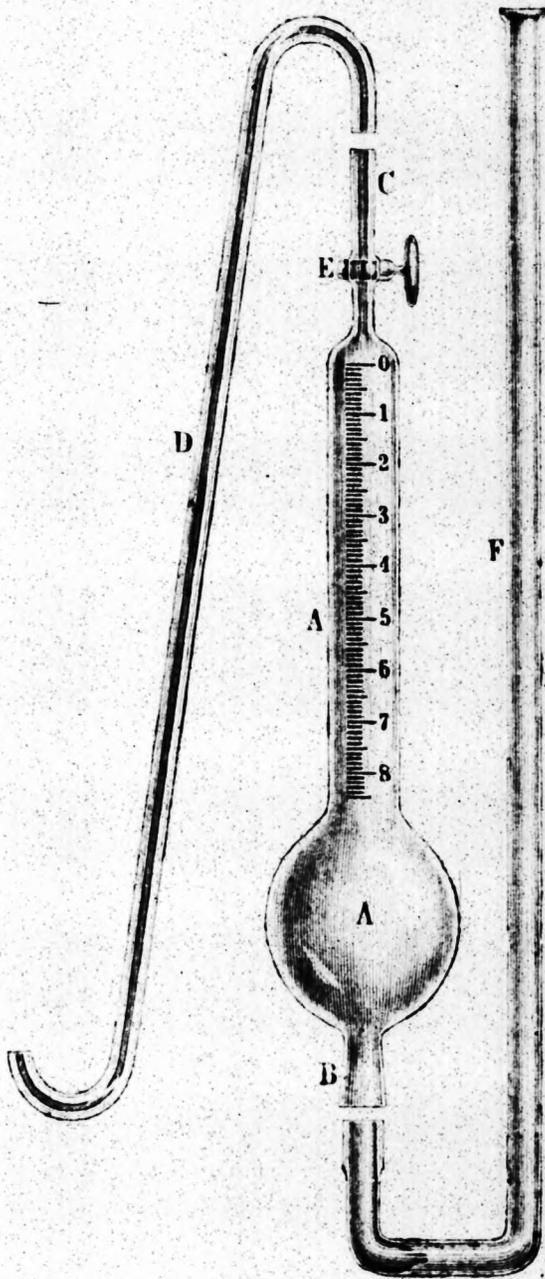
$$73,84 - 47,19 = 26,65.$$

## 4. Eigentliche Verdrängungsversuche.

Wie bereits oben bemerkt, wurden die Verdrängungsversuche mit den nämlichen Apparaten und ganz in der gleichen Weise ausgeführt, die Herr Prof. Hüfner schon 2mal beschrieben hat<sup>1)</sup>. Wegen der Einzelheiten der Ausführung verweise ich daher auf jene Beschreibungen. Statt des Kohlenoxyds wurde also in meinen Versuchen Stickoxyd in die grössere Kugel (207 ccm) gefüllt, und zwar blieben darin nach der Verdünnung etwa 40 ccm. dieses Gases zurück. Das Schütteln desselben mit der Lösung des Kohlenoxydhämoglobins geschah etwa eine Stunde lang. Nach dieser Zeit wurde das restirende Gasmengenge unter Vermittelung von Hüfner's Quecksilberpumpe in einem Glasgefässe aufgefangen, das in beistehender Figur I (A. A.) gezeichnet ist: Die kugelförmige Erweiterung des letzteren, die ungefähr 100 ccm. fassen kann, hat den Zweck, nach Aufsammeln des Schüttelgases erst noch etwa 10 ccm. der 7-procentigen Natronlauge, hernach aber einen grossen Ueberschuss von Sauerstoff aufzunehmen, welcher zunächst das noch vorhandene Stickoxyd in die leicht absorbirbare salpetrige Säure

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift Bd. I, S. 313 ff; und Journal für praktische Chemie, Bd. 22, S. 383.

verwandeln soll. Ist die Bildung der letzteren sowie ihre Absorption beendigt, so wird der Rest des Gases in ein Eudiometer übergefüllt, gemessen und verpufft und das Volumen,  $V$ , des vorhanden gewesenen Kohlenoxyds, wie oben, aus dem Volumen der gebildeten Kohlensäure abgeleitet.



Von der Lösung des Kohlenoxydhämoglobins wurden in jedem Verdrängungsversuche 158,25 ccm. verwandt. Die Concentration dieser Lösung, beispielsweise die jedesmal angewandte Menge der Kohlenoxydverbindung, ausgedrückt in Grammen, wurde photometrisch bestimmt, und zwar unter Benutzung der oben festgestellten photometrischen Constanten und unter Anwendung der Formeln:

$$h = A_c \varepsilon_c n U \text{ und}$$

$$h = A'_c \varepsilon'_c n U;$$

worin  $h$  die Gewichtsmenge des Kohlenoxydhämoglobins in Grammen,  $n$  den Grad der für die photometrische Untersuchung hergestellten Verdünnung (1 bis  $n$ ), und  $U$  das Volumen der angewandten Lösung bedeutet. Dabei wurde das Mittel aus den nahe übereinstimmenden Resultaten je zwei solcher Bestimmungen als richtig angenommen.

Der Quotient  $\frac{V}{h}$  gibt nun an, wie viel Kohlenoxyd. ausgedrückt in ccm. und gemessen bei  $0^\circ$  und 1 m Druck. von 1 gr. Hämoglobin locker gebunden wird.

Folgende Tabelle enthält die Resultate von 10 solchen Verdrängungsversuchen:

Tabelle II.

Vers.- Nr.	$h$	$V$	$\frac{V}{h}$
1	4,718	5,328	1,129
2	2,610	3,172	1,215
3	2,610	3,081	1,180
4	2,610	3,018	1,156
5	2,610	3,174	1,216
6	4,015	4,830	1,202
7	4,015	4,857	1,209
8	4,015	5,243	1,305
9	3,118	3,816	1,223
10	3,118	3,802	1,219

Mittel 1,205

Wie im Anfange erwähnt, war ich bei Beginn vorstehender Untersuchungen von der Voraussetzung ausgegangen, dass die Anwendung von Kohlenoxyd als zu verdrängenden Gases jegliche Correctur von  $V$  unnöthig machen würde. Ich nahm an, dass die Kohlenoxydverbindung des Blutfarbstoffs so beständig sei, dass ihre Krystalle sich unzersetzt in Wasser lösen und dass auch diese Lösung längere Zeit, wenigstens mehrere Tage, hindurch in einem verschlossenen Cylinder sich unzersetzt erhalten würde, dass folglich auch eine Sättigung

des Lösungsmittels mit absorbirtem Kohlenoxyd unnöthig sei. Bei Gelegenheit der Feststellung der photometrischen Constanten wurde nun aber die Erfahrung gemacht, dass dem nicht so ist, dass vielmehr, wenn auch sehr langsam, eine fortwährende Dissociation stattfindet, ja dass vielleicht der Sauerstoff der Luft unter gewissen Umständen eine hauptsächlichliche Rolle dabei spielt. In der That, wenn dies der Fall, so erklärt es sich, warum in einigen der ersten Versuche der Werth des Quotienten  $\frac{V}{h}$  zu klein ausfiel. In diesen Versuchen wurde nämlich die wässrige Lösung des Kohlenoxydhämoglobins ohne Weiteres, sowie sie erhalten worden, mit Stickoxyd geschüttelt. In der Folge aber wurde durch solche Lösungen erst noch einmal ein 4—5 Minuten langer Strom von Kohlenoxyd geleitet, der wohl hinreichen mochte, einige durch Dissociation oder Oxydation kohlenoxydfrei gewordene Moleküle wieder in die ursprüngliche Verbindung zurück zu verwandeln, aber durchaus nicht, um auch das Lösungsmittel vollständig mit diesem Gase zu sättigen. So erklärt es sich, dass die späteren Versuche meist etwas grössere Werthe für den Quotienten liefern, als die Mittelzahl angibt.

5. Dass nun aber gerade die gefundene Mittelzahl den wahrscheinlichen Werth für die gesuchte Grösse darstellt, dafür spricht gewiss nicht am wenigsten der Umstand, dass diese Zahl mit der von Prof. Hüfner auf anderem Wege festgestellten so gut wie vollständig übereinstimmt.

Prof. Hüfner fand<sup>1)</sup>, dass 1 gr. Hämoglobin 1,202 ccm. (bei 0° und 1 m Druck) Sauerstoff aufnimmt; ich selber, dass 1 gr. Hämoglobin 1,205 ccm. (bei 0° und 1 m Druck) Kohlenoxyd festhält.

Mit Hülfe dieser Zahl und des bekannten specifischen Gewichtes vom Kohlenoxyd<sup>2)</sup> berechnet sich das Molekulargewicht des Hämoglobins,  $m$ , aus der Proportion:

$$28 : 1,982 = m : 1000$$

$$m = 14127.$$

<sup>1)</sup> Journal für praktische Chemie, Bd. 22, S. 385.

<sup>2)</sup> 1 ccm. wiegt bei 0° und 760 mm. Druck 0,0012515 gr.

Professor Hüfner rechnete aus seinen Versuchen unter Zuhülfenahme einer einfachen Interpolation für  $m$  den Werth 14129 heraus. Nehmen wir letzteren Werth als richtig an, so ergibt sich das Molekulargewicht des Kohlenoxydhämoglobins = 14157, und seine empirische Formel wäre:



Tübingen, im September 1882.