

Ueber den Sauerstoffgehalt des Methämoglobins.

Von

G. Hüfner und **Richard Külz.**

(Der Redaction zugegangen am 28. März 1883.)

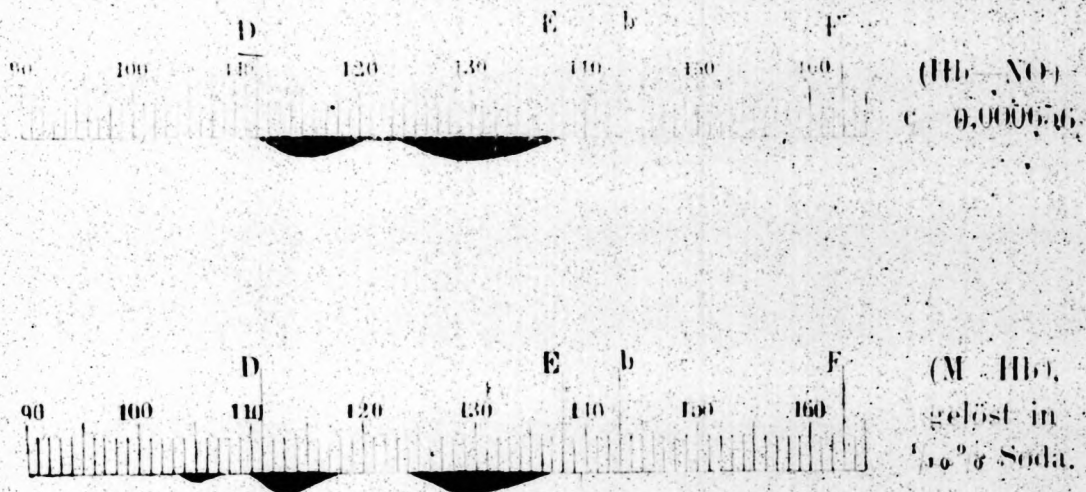
I.

Am Ende einer kurzen Mittheilung über eine einfache Darstellungsweise und die elementare Zusammensetzung des krystallinischen Methämoglobins, die der Eine von uns in Gemeinschaft mit J. Otto in Bd. 7, S. 65—70 dieser Zeitschrift gegeben hat, findet sich neben Andern die Beobachtung erwähnt, dass, während weder das Vacuum noch Kohlenoxydgas verändernd auf Methämoglobinlösungen zu wirken vermöge, doch reines Stickoxyd darin eine auffallende Farbenwandlung hervorzurufen im Stande sei; das eigenthümliche Braun der ursprünglichen, neutralen Lösung gehe sofort in ein prächtiges Roth über und das Spectrum der so roth gefärbten Flüssigkeit stimme vollkommen mit demjenigen alkalischer Lösungen des gleichen Farbstoffs überein.

Wir haben seitdem das Verhalten des Methämoglobins gegen das Stickoxyd einer eingehenderen Prüfung unterworfen, in der sicheren Voraussicht, auf diesem Wege die streitige Frage entscheiden zu können, ob das Methämoglobin eine niedrigere oder eine höhere Oxydationsstufe des Blutfarbstoffs als das Oxyhämoglobin, oder ob es gar am Ende, wie wir vermuthet hatten, mit genau gleichviel Sauerstoff wie letzteres beladen sei, denselben aber fester gebunden enthalte. Dass überhaupt eines der Gase, die sich mit Hämoglobin zu verbinden pflegen, noch eine Veränderung in Methämoglobinlösungen hervorruft, und dass dies gerade das Stickoxyd, also das am stärksten angezogene Gas ist, schien uns von vornherein mehr für die letztere Annahme zu sprechen.

Schüttelt man eine Lösung von Methämoglobin, der man weder ein Alkali, noch das Carbonat einer Erde, wohl aber etwa 1% Harnstoff zugefügt hat, mit einem Ueberschusse von Stickoxydgas, so nimmt der Schaum, wenn die Lösung concentrirt, augenblicklich eine dunkel-purpurrothe, ist sie verdünnter, eine prächtig rosenrothe Färbung an, und, durch das Spectroscop betrachtet, zeigt sie jetzt zwischen den Fraunhofer'schen Linien D und E zwei allerdings sehr deutliche, aber doch nicht so scharf begrenzte Streifen, wie das Oxyhämoglobin oder die Kohlenoxydverbindung: es ist das Spectrum des Stickoxydhämoglobins¹⁾.

Um dessen vollkommen sicher zu sein, stellten wir uns etwas Stickoxydhämoglobin aus der Kohlenoxydverbindung und zwar aus Schweineblut dar, verdünnten dessen Lösung so weit wie die erst erwähnte und verglichen dann die Spectra der beiden. Jedes derselben lieferte ein etwa dem untenstehenden (I) gleiches Bild²⁾.



¹⁾ Als ich das erste Mal zusammen mit J. Otto die beschriebene Farbenwandlung beobachtete, bedienten wir uns einer Methämoglobinlösung, in welcher zum Zwecke der Zerstörung etwa sich bildender salpetriger Säure etwas frisch gefällter kohlensaurer Kalk suspendirt worden war. Möglich, dass die hierdurch erzeugte Trübung der Lösung die genauere Beobachtung des Spectrums erschwert und die Verwechslung desselben mit dem alkalischen Methämoglobinspectrum verschuldet hatte.

Häfner.

²⁾ Wir haben uns in diesem Bilde darauf beschränkt, nur die beiden auffallenden Absorptionsstreifen zwischen D und E in Bunsen's Manier wiederzugeben. — Zu genauerm Vergleiche wurde das Spectrum

Wir bestimmten und verglichen aber nicht bloss Lage und Breite der einzelnen Streifen, sondern massen und verglichen auch die Lichtintensität gewisser entsprechender Spectralregionen. Häufige Erfahrung hat uns darüber belehrt, wie sehr hierin der blosser Augenschein täuscht und wie wenig oft für die Entscheidung der Frage nach der Identität oder Verschiedenheit zweier Absorptionsspectren die blosser Ortsbestimmung ihrer einzelnen Streifen wiegt, wenn nicht gleichzeitig das Verhältniss der Lichtschwächungscoefficienten in mindestens zwei charakteristischen Regionen gemessen wird.

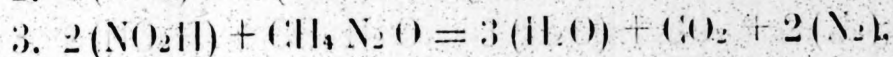
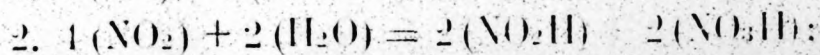
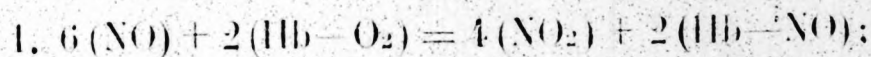
In der That zeigten aber unsere beiden Spectren auch in letzterer Beziehung vollständige Uebereinstimmung. Bezeichnet man nämlich den Extinctionscoefficienten für die Zwischenregion zwischen den zwei Streifen, und zwar für D 32 E — D 53 E (Fraunhofer) mit ε_n , den Extinctionscoefficienten in der Gegend des zweiten Streifens, d. h. von E 63 E — D 84 E, mit ε'_n , so war der Werth von $\frac{\varepsilon'_n}{\varepsilon_n}$ für die aus Methämoglobin gewonnene Verbindung . . . = 1,050, für die aus Kohlenoxydhämoglobin dargestellte . . . = 1,048.

3.

Versuche um den Sauerstoffgehalt zu bestimmen.

Da es nicht unwahrscheinlich ist, dass sich beim ersten Zusammentreffen des Stickoxyds mit dem Methämoglobin auf Kosten von des letzteren Sauerstoff zunächst Stickstoffbioxyd bildet, dieses aber bei Berührung mit Wasser sogleich zerfällt und theils Salpetersäure, theils salpetrige Säure liefert, so lag der Gedanke nahe, die Menge des vom Methämoglobin abgegebenen Sauerstoffs aus der Menge der salpetrigen Säure zu bestimmen, die bei diesem Prozesse auftritt. Auch darüber konnte kein Zweifel sein, dass zur annähernden Bestimmung der letzteren am zweckmässigsten die gegenseitige Zersetzung von salpetriger Säure und Harnstoff zu wählen sei, und dass zwar nicht etwa die geringe Differenz zwischen der ursprünglich vorhandenen und der am Ende wieder zu des alkalischen Methämoglobins (II) in gleicher Manier darunter gezeichnet.

findenden Harnstoffmenge, sondern vielmehr das Volum des freigewordenen Stickgases als Mass für den Umfang der stattgehabten Zersetzung und in letzter Linie für die Menge des zur Bildung der salpetrigen Säure verbrauchten Sauerstoffs zu dienen habe. Im Falle z. B. die erwartete Reaction nach einander in folgenden Phasen verlief:



würde je ein Molekül freigewordenen Stickgases einem Moleküle am Hämoglobin haftenden Sauerstoffs entsprechen.

Da man indessen über die Weise, in welcher die einzelnen Moleküle in der Flüssigkeit auf einander wirken, zunächst gar nichts weiss, namentlich nichts darüber, ob sich nicht doch vielleicht während des Durcheinanderschüttelns der verschiedenen Moleküle eine grössere Menge salpetriger Säure, als oben angenommen, und in Folge davon auch mehr freies Stickgas bildet, — und da ferner bekannt ist, dass die Reaction zwischen salpetriger Säure und Harnstoff in der Kälte durchaus nicht in der glatten Weise verläuft, die man gewöhnlich voraussetzt¹⁾, so haben wir ein für alle Male auf eine direkte Bestimmung der fraglichen Sauerstoffmenge verzichtet und dafür einen Vergleich der Stickgasmengen gewählt, welche von gleich concentrirten Lösungen von Oxyhämoglobin und von Methämoglobin beim Schütteln mit Harnstoff und Stickoxyd entbunden werden.

Wir haben uns also nicht mehr die Aufgabe gestellt, direct und unmittelbar durch den Versuch zu erfahren, wie viel Cubiccentimeter Sauerstoff (reducirt auf 0° und 1 M. Druck) in einem Gramm Methämoglobin im Zustande loserer Bindung enthalten sind, sondern zunächst nur, ob 1 Gramm Methämoglobin genau ebenso viel oder ob es mehr oder

¹⁾ A. Claus: Zur Kenntniss der Reaction zwischen Harnstoff und salpetriger Säure in wässriger Lösung. Berliner chemische Berichte 1871, S. 140—143

weniger Sauerstoff abgeben kann, als 1 Gramm Oxyhämoglobin. Eine solche Aufgabe lässt sich lösen, auch wenn die angewandte Methode nicht die absoluten Mengen zu finden erlaubt, welche vorhanden sind, — wenn sie dafür nur unter möglichst gleichgehaltenen Bedingungen möglichst übereinstimmende Resultate gibt, und wenn ferner durch anderweitige Versuche erwiesen ist, dass mit zunehmender Menge von austreibbarem Sauerstoffe überhaupt die Menge des Stickgases wächst, welches in Folge der benutzten Reaktion frei wird.

4.

Erste Bedingung des Gelingens war die Herstellung zweier Lösungen, deren eine wenigstens annähernd gleich viel Methämoglobin enthält, wie die andere Oxyhämoglobin. Die Bestimmung der Concentration geschah auf photometrischem Wege und zwar für die Methämoglobinlösung mit Hilfe zweier photometrischer Constanten, die nur für das Spectrum alkalischer Lösungen dieses Farbstoffs gültig sind, sich aber auf die gleichen Spectralregionen beziehen, die wir für die quantitative Bestimmung des Oxyhämoglobins zu benutzen pflegen. Die eine dieser Constanten A_{am} , hatten wir für unser Photometer, im Mittel aus mehreren Versuchsergebnissen, $= 0,001654$, die andere, $A_{am} = 0,001412$ gefunden¹⁾.

Den fertigen Lösungen wurde dann so viel reiner Harnstoff zugefügt, dass beide davon etwa 1% enthielten; und endlich noch wurden beide Flüssigkeiten durch Schütteln bei gleicher Temperatur vollständig mit atmosphärischer Luft gesättigt, ehe sie mit Stickoxydgas in Berührung kamen.

Der Apparat, in welchem das Schütteln der Lösungen mit Stickoxydgas geschah, war der von dem Einen von uns schon mehrfach²⁾ beschriebene Verdrängungsapparat; das anzuwendende Stickoxydgas wurde mit Kupferspähen aus Salpetersäure bereitet, nach Bunsen's Vorschrift gereinigt

¹⁾ Das a im Index von A_{am} soll andeuten, dass diese Constante nur für alkalische Methämoglobinlösungen Geltung hat.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. I, S. 313 ff. und Kolbe's Journal, Bd. 22, S. 283.

und in einem Quecksilbergasometer in solchem Vorrathe aufbewahrt, dass derselbe stets für mehrere Vergleichsversuche ausreichte. Das Volumen der Farbstofflösung betrug jedesmal 158,3 cc., dasjenige des damit zu schüttelnden Stickoxydgases etwa 25—30 cc. (reducirt auf 0° und 1 M. Druck).

Nach etwa 20 Minuten lang bei einer Temperatur von 18—20° fortgesetztem Schütteln wurde das Gas mit der Quecksilberpumpe aus dem Apparate herausgeholt und in einem Ueberfüllungsapparate aufgefangen, dergleichen John Marshall vor Kurzem in dieser Zeitschrift (Bd. VII, S. 89) beschrieben hat. Dort wurde zuerst nach der von Marshall erprobten Methode das noch übrige Stickoxydgas entfernt, alsdann von da der Rest des Gases in ein Eudiometer übergeführt und mit Wasserstoff verpufft.

Folgende kleine Tabelle gibt zunächst eine Uebersicht über die Resultate einer kurzen Reihe von Parallelversuchen, von denen jedesmal zwei, der eine ein Oxyhämoglobin-, der andere ein Methämoglobinversuch, mit Stickoxydgas, das dem nämlichen Gasometer entnommen war, ausgeführt wurden.

In dieser Tabelle bedeuten h_o und h_m die angewandten Oxyhämoglobin-, bezw. Methämoglobinmengen, in Grammen, V das jedesmal gefundene Stickgasvolumen, reducirt auf 0° und 1 M. Druck. Die Versuchsdaten je zweier zusammengehöriger Parallelversuche stehen in einer Horizontalreihe.

Vers.- Nr.	Oxyhämoglobin		Methämoglobin	
	h_o	V	h_m	V
1.	4,05	8,526	5,756	10,08
2.	4,19	7,708	4,020	7,45
3.)	4,31	9,871	3,950	10,41
4.)	4,31	9,805	3,920	10,78

1) Erst nach Beendigung des letzten Versuchs stellte es sich heraus, dass in den Versuchen Nr. 3 und 4 ein Hahn der Pumpe nicht luftdicht geschlossen hatte. Daher hier das auffallende Plus gegenüber den vorhergehenden Versuchsdaten.

Wie man sieht, sind die Schwankungen um einen Mittelwerth auch in den beiden ersten Doppelversuchen noch ziemlich bedeutend. Indessen, wenn man erwägt, aus wie verschiedenen Componenten sich die am Ende getundene Stickgasmenge zusammensetzt; dass namentlich ein nicht unbedeutlicher Theil derselben unmittelbar in die Lösung hineingeschüttelt, dass zweitens ein anderer auf Rechnung des hineingeschüttelten Sauerstoffs und erst ein dritter auf Rechnung des vom Hämoglobin abgegebenen Sauerstoffs zu setzen ist, und wenn man ferner bedenkt, dass jede einzelne dieser drei Componenten ihren besonderen Schwankungen unterworfen ist, so begreift man vielmehr die Unwahrscheinlichkeit genau übereinstimmender Schlussergebnisse. Trotzdem spricht, wie sich aus dem Folgenden ergeben wird, dieses erste Resultat schon sehr für die Gleichheit des Sauerstoffgehaltes in beiden Hämoglobinverbindungen.

Um indessen einen entscheidenderen Beweis beizubringen, stellten wir ein *experimentum crucis* an. In einer zweiten, längeren Versuchsreihe, die abermals mit beiden Hämoglobinarten ausgeführt und in welcher das Stickoxyd für sämtliche (sieben) Einzelversuche von einem und demselben, über Quecksilber abgesperrten, Vorrathe entnommen wurde, veränderten wir die Menge des angewandten Oxyhämoglobins bei gleichbleibendem Flüssigkeitsvolumen so bedeutend, dass die dadurch hervorgerufene Aenderung im Gesammtresultat an Stickstoff diese oben constatirten Schwankungen beträchtlich übertreffen musste. Besitzt, so sagten wir uns, das Methämoglobin nur halb so viel austreibbaren Sauerstoff wie das Oxyhämoglobin, so werden 2 gr. Oxyhämoglobin unter sonst gleichen Versuchsbedingungen nothwendig ebenso viel freien Stickstoff liefern müssen, als 4 gr. Methämoglobin.

Folgende Tabelle enthält das Ergebnis dieser neuen Versuchsreihe.

Vers.- Nr.	Oxyhämoglobin		Methämoglobin	
	h_o	V	h_m	V
I.	4.31	8.94	3.77	8.78
II.	4.29	7.90	4.04	7.47
3.	2.01	4.26	—	—
4.	2.13	4.25	—	—
5.	2.19	4.47	—	—

Dieses neue Resultat ist in der That evident und schlagend. Es widerlegt sowohl die Annahme, dass das Methämoglobin mehr, wie diejenige, wonach es weniger austreibbaren Sauerstoff besitzt, wie das Oxyhämoglobin.

Addirt man die einzelnen Werthe für h_o aus den zwei brauchbaren Versuchen Nr. I und 2 der ersten zu denjenigen von I. und II. der zweiten Reihe, so erhält man als Mittel die Zahl 4,21. Das Mittel aus den entsprechenden V-Werthen ist 8,27.

Das Mittel der Werthe von h_m aus Versuch 2 der ersten und Nr. I und II der zweiten Reihe ist 3,944, dasjenige der entsprechenden V-Werthe 7,902. Es liefern also 4 gr. Oxyhämoglobin etwa ebenso viel Stickgas wie 4 gr. Methämoglobin; 2 gr. Oxyhämoglobin dagegen nur wenig mehr als die Hälfte.

5.

Um die allerdings schon von vornherein wenig wahrscheinliche Vermuthung zu widerlegen, die eben gefundene grosse Differenz der Stickgasvolumina möchte vielleicht nur insoferne von der Concentration der Hämoglobinlösung abhängig sein, als mit dem Wachsthum der ersteren auch die absorbirte Menge des atmosphärischen Stickstoffs zunähme, haben wir noch zwei Absorptionsversuche mit zwei verschieden concentrirten (2,5% und 1,2%) Methämoglobinlösungen,

die gleichzeitig 1% Harnstoff enthielten, und mit atmosphärischer Luft angestellt. Dieselben zeigten, dass die Absorptionscoefficienten der beiden Componenten unserer Atmosphäre für solche Lösungen vom Procentgehalte an Farbstoff so gut wie unabhängig sind. Aus 158,3 cc. der 2,5procentigen, bei 15° und 725 mm. Barometerstand mit Luft geschüttelten, Lösung gewannen wir durch Auspumpen:

Stickgas . 1,787 cc. (reducirt auf 0° und 1 M. Druck),
Sauerstoff 0,758 cc. id.

Aus dergleichen Menge ebenso behandelter 1,2procentiger Lösung:

Stickgas . . 1,888 cc.
Sauerstoff . 0,733 cc.

Durch vorstehende Untersuchung dürfte somit die Frage nach dem Gehalte des Methämoglobins an lockerem Sauerstoffe endgültig erledigt sein; auch dass dieser Antheil im Methämoglobin fester gebunden ist als im Oxyhämoglobin, ist sicher gestellt; wie wir uns freilich diese festere Bindung zu denken haben, bleibt auch für ferner noch eine offene Frage.

Tübingen, im März 1883.