

Bestimmung des Molekulargewichts vom Schweinehämoglobin durch Verdrängung des Kohlenoxyds seiner Kohlenoxydverbindung mittelst Stickoxyd.

Von

Dr. Richard Kütz.

(Aus dem Laboratorium des Hrn. Professor Hüfner.)
(Der Redaktion zugegangen am 9. April 1883.)

§ 1.

Zur Bestimmung des Molekulargewichts vom Hämoglobin aus der Menge an Kohlenoxyd, welches 1 gr. desselben zu binden vermag, ist von Dr. John Marshall¹⁾ am Hundehämoglobin zum ersten Mal die Methode angewandt worden, aus der Kohlenoxydverbindung das Kohlenoxyd durch Stickoxyd zu verdrängen. Die Vorzüge dieser Methode vor anderen sind von Marshall genügend hervorgehoben worden. Sie forderten dazu auf, das Verfahren auch zur Molekulargewichtsbestimmung anderer Hämoglobine zu verwerthen, da sie die Hoffnung auf Gewinnung schärferer Zahlen als die bisher in der Literatur vorhandenen erweckten. Ich unternahm es daher auf Veranlassung von Hr. Prof. Hüfner den Farbstoff des Schweineblutes daraufhin einer Untersuchung zu unterziehen. Da das Schweineblut ein so leicht und billig in grösseren Mengen zu beschaffendes Material ist, so schien es besonders verdienstlich, zunächst gerade dieses zu wählen.

Bei den Verdrängungsversuchen sollte wie bei Marshall die Feststellung der Concentration der zu verwen-

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. VII, S. 81—91.

denden Lösungen des Kohlenoxydhämoglobins auf spectrophotometrischem Wege geschehen; es musste diesen also eine Bestimmung der dazu nöthigen optischen Constanten vorausgehen. Da letztere wiederum die Anwendung von Lösungen von reinem Kohlenoxydhämoglobin bedingt, so setzte sie die Darstellung dieses Körpers in Krystallen voraus. Es war mithin die nächste Aufgabe krystallinisches Kohlenoxydhämoglobin darzustellen.

§ 2.

Darstellung des Kohlenoxydhämoglobins aus Schweineblut.

Frisches, möglicherweise noch warmes, defibrinirtes Schweineblut wird zur Senkung der Blutkörperchen an einem kühlen Orte mit der etwa 10fachen Menge Kochsalzlösung von bekanntem Gehalt versetzt. Nach gescheneher Senkung löst man die Blutkörperchen in möglichst wenig Wasser bei 40° C. auf, filtrirt, kühlt die Lösung auf 0° ab und sättigt sie sodann unter kräftigem Schütteln vollständig mit Kohlenoxyd. Die erhaltene Lösung des Kohlenoxydhämoglobins bringt man wieder auf 0°, fügt ihr $\frac{1}{4}$ bis $\frac{1}{3}$ ihres Volumens absoluten Alkohol zu, schüttelt um und stellt das Ganze, nachdem man es mit einer Mischung aus Schnee und Kochsalz umgeben, in den Eisschrank. War das Blut ganz frisch gewesen, so ist meist schon nach 12 Stunden eine reichliche Krystallisation erfolgt. War dies nicht der Fall, oder hatte man zur Lösung der Blutkörperchen eine zu grosse Wassermenge angewandt, so erhielt man entweder wesentlich langsamer, oder erst nach allmählichem weiteren Zusatze von Alkohol Krystalle, oder aber sie blieben auch ganz aus. Zur weiteren Reinigung wird das Kohlenoxydhämoglobin im Eisschranke auf einem Faltenfilter abfiltrirt, mit einer kaltgehaltenen Mischung aus 1 Theil Alkohol und 3 Theilen Wasser gewaschen und in wenig Wasser bei 40° C. gelöst. Die von Neuem mit Kohlenoxyd gesättigte und abgekühlte Lösung braucht man jetzt nur mit dem 5. oder 6. Theile absoluten Alkohols zu versetzen, um alsbald, besonders wenn der Alkoholzusatz richtig getroffen war und die Krystallisation

nur langsam vor sich gehen konnte, Krystalle von ausserordentlicher Grösse und Schönheit zu erhalten, die sich auf dem Saugfilter leicht filtriren und durch Auswaschen mit verdünntem Alkohol (1 Alkohol, 3 Wasser) so weit reinigen lassen, dass ein ferneres Umkrystallisiren meist unnöthig ist. Alles jedoch unter der Voraussetzung, dass sämtliche Operationen bei einer möglichst niedrigen Temperatur ausgeführt werden.

Das Kohlenoxydhämoglobin aus Schweineblut ist also ein wohl charakterisirter, gut krystallisirender Körper. Die Krystalle aus concentrirteren Lösungen erscheinen dunkler roth gefärbt als die aus verdünnten, was jedenfalls in einem

verschiedenen Krystallwassergehalte seinen Grund hat. Ihrer Form nach sind es grosse Tafeln (siehe Figur a auf beistehender Zeichnung), die bei einem Querdurchmesser von $\frac{1}{2}$ mm. bis zu 5—6 mm. Länge haben können. Es kommen jedoch auch isodiametrische Krystalle vor: knollige, dunkel-rubinrothe, gewöhnlich nur an den Rändern durchsichtige Massen (b), die eine bestimmte Form schwer erkennen lassen, unter denen jedoch einige Male solche von octaedrischen Aussehen (c) wahrgenommen wurden.

Im Vacuum über Phosphorsäureanhydrid getrocknete Krystalle behalten lange ihren Glanz, ihre Farbe und Form.

§ 3.

Bestimmung der photometrischen Constanten des Kohlenoxydhämoglobins.

Von vornherein sei bemerkt, dass die Untersuchungen mit demselben Spectrophotometer ausgeführt wurden, dessen



sich auch von Noorden¹⁾, Otto²⁾ und Marshall³⁾ bedient haben. Die benutzten Spectralregionen waren wieder:

D 32 E — D 53 E und

D 63 E — D 84 E.

Zwei Methoden wurden angewandt:

I. Die eine ist die von v. Noorden⁴⁾ beschriebene und schon mehrfach angewandte, welche im Wesentlichen darin besteht, dass man einen Theil einer Lösung von reinem, krystallisirten Farbstoff, anfangs bei niedriger Temperatur, zuletzt unter einem bis zu 115° erwärmten Wasserstoffstrome eintrocknet und so die Concentration feststellt, während ein anderer Theil weiter verdünnt und von dieser verdünnten Lösung der Extinctioncoefficient bestimmt wird. Dividirt man mit dem Extinctioncoefficienten in die Concentration der verdünnten Lösung (abgeleitet aus der der concentrirten), so ergibt sich die gesuchte Constante.

II. Beim Kohlenoxydhämoglobin ist aber auch eine zweite Methode anwendbar. Bestimmt man nämlich mit Hilfe bereits festgestellter Constanten die Concentration einer Lösung von Oxyhämoglobin und führt diese darauf durch Einleiten von Kohlenoxyd in eine solche von Kohlenoxydhämoglobin über, so erfährt das Gewicht an Farbstoff nur eine so geringfügige Aenderung, dass man die Concentration der Oxyhämoglobinlösung gleich der der Kohlenoxydhämoglobinlösung setzen kann. Aus dieser und dem Extinctioncoefficienten folgt wie oben die Constante.

Das zweite Verfahren ist einfacher und gibt übereinstimmendere Resultate als das erste. Man hat dabei auch nicht nöthig, von reinem Oxyhämoglobin auszugehen, sondern kann einfach Blutlösungen benutzen. Die Anwendung der letzteren setzt aber voraus, dass sie sich optisch ebenso wie reine Oxyhämoglobinlösungen verhalten. Da dieses für das

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. IV, S. 9.

²⁾ Id., Bd. VII, S. 62.

³⁾ A. a. O.

⁴⁾ Diese Zeitschrift, Bd. IV, S. 13.

Schweineblut noch nicht nachgewiesen, der Nachweis im Interesse dieser Arbeit aber nöthig war, so möge er hier gleich Platz finden. Für Oxyhämoglobin vom Schwein fand Otto¹⁾:

$$A_o = 0,001345$$

$$A'_o = 0,001014$$

$$\frac{A_o}{A'_o} = 1,33.$$

Der Quotient $\frac{A_o}{A'_o}$ ist für das Oxyhämoglobin charakteristisch. Falls Oxyhämoglobin- und Blutlösungen sich optisch gleich verhalten sollten, musste er für beide gleich sein. Folgende Tabelle, welche die Bestimmungen desselben für verschiedene Blutlösungen enthält, bestätigt dies in der That. ϵ_o und ϵ'_o sind darin die den Constanten A_o und A'_o entsprechenden Extinctionscoefficienten:

Nr.	ϵ_o	ϵ'_o	$\frac{A_o}{A'_o}$
1.	0,75518	1,00769	1,334
2.	0,70154	0,93538	1,333
3.	0,72992	0,96306	1,319
4.	0,72780	0,96814	1,330
5.	0,73628	0,97252	1,321

Mittel: 1,327

Die nun folgenden, den beiden erwähnten Methoden entsprechenden Tabellen geben die Resultate der photometrischen Untersuchung des Kohlenoxydhämoglobins vom Schwein. Darin bezeichnen c die Concentration, ϵ_o und ϵ'_o die in den oben genannten Regionen gefundenen Extinctionscoefficienten und A_o und A'_o die bezüglichen photometrischen Constanten.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. VII, S. 62.

I.

Nr.	c	ε_c	ε'_c	A_c	A'_c	$\frac{A_c}{A'_c}$
1.	0,0011890	1,03496	1,16650	0,001149	0,001019	1,128
2.	0,0007942	0,75354	0,84476	0,001054	0,000940	1,121
3.	0,001523	1,23264	1,40194	0,001236	0,001085	1,139
4.	0,001031	0,85348	0,96596	0,001208	0,001067	1,132
5.	0,001264	1,00770	1,13894	0,001254	0,001110	1,130
6.	0,001010	0,86482	0,98284	0,001168	0,001028	1,136
7.	0,0009239	0,84106	0,95230	0,001098	0,000970	1,131
8.	0,001116	0,96668	1,09076	0,001154	0,001023	1,128
9.	0,0007142	0,62386	0,70146	0,001145	0,001018	1,125
10.	0,0007703	0,73628	0,83310	0,001046	0,000924	1,132
			Mittel:	0,001151	0,001018	1,130

II.

Nr.	c	ε_c	ε'_c	A_c	A'_c	$\frac{A_c}{A'_c}$
1.	0,000968	0,86420	0,97546	0,001120	0,000992	1,129
2.	0,000968	0,86482	0,98284	0,001120	0,000985	1,137
3.	0,000968	0,88544	0,99478	0,001093	0,000973	1,123
4.	0,000968	0,86102	0,97106	0,001124	0,000997	1,127
5.	0,000968	0,85912	0,97032	0,001127	0,000998	1,129
6.	0,0010393	0,94378	1,07238	0,001101	0,000969	1,136
7.	0,0010393	0,94590	1,06400	0,001099	0,000977	1,125
8.	0,0010393	0,94238	1,05910	0,001103	0,000981	1,124
9.	0,0010393	0,94378	1,06484	0,001101	0,000976	1,128
10.	0,001047	0,93328	1,05502	0,001122	0,000992	1,131
11.	0,000703	0,62932	0,71064	0,001117	0,000989	1,129
12.	0,000710	0,62932	0,71064	0,001128	0,000999	1,129
			Mittel:	0,001113	0,000986	1,127

Die beiden Versuchsreihen zusammengenommen geben bei Vernachlässigung der letzten Decimale als Mittelwerthe:

$$A_c = 0,00113 \text{ und}$$

$$A'_c = 0,00100,$$

welche den später folgenden Berechnungen zu Grunde gelegt wurden. Es ist ferner:

$$\frac{A_c}{A'_c} = 1,13.$$

In II. diene bei den Versuchen 1–10 Hämoglobin-, bei 11 und 12 Blutlösung als Ausgangsmaterial. Das gleiche Verhalten beider ist leicht zu ersehen.

Der Quotient $\frac{A_c}{A_e}$ ist für das Kohlenoxydhämoglobin von praktischer Bedeutung¹⁾. Mit ihm hängt die aus der Beobachtung der Lichtabsorption in zwei verschiedenen Spectralregionen sich ergebende Winkeldifferenz zusammen. Diese beträgt hier etwa 2°45', was mit den Angaben Marshall's für das Kohlenoxydhämoglobin vom Hund übereinstimmt. Gleich wie dieser fand ich aber auch, dass diese Differenz oft schon in kurzer Zeit sich änderte und je länger die Lösung stand, grösser und grösser wurde. Die Aenderung trat bald früher, bald später ein; manchmal erst nach einem Tage, ein anderes Mal nach 5 Stunden, zuweilen aber auch schon in 15 Minuten. Dass diese Erscheinung nicht blos einer Dissociation, sondern möglicherweise einer Oxydation des Kohlenoxyds zuzuschreiben sei, darauf hat Marshall²⁾ bereits hingewiesen, und ich meinerseits kann ihm darin nur beipflichten. Kälte und ein geringer Gehalt an Soda verlangsamen die Zersetzung. Will man daher vor Irthümern bei Concentrationsbestimmungen von Kohlenoxydhämoglobinlösungen möglichst gesichert sein, so mache man die Lösungen mit Soda schwach alkalisch³⁾, führe die Untersuchung möglichst schnell und in einem geschlossenen Kästchen aus und begnüge sich nie mit einer einzigen Bestimmung.

§ 4.

Vergleicht man die eben gefundenen Constanten mit denen, welche Marshall⁴⁾ für das Kohlenoxydhämoglobin

1) Diese Zeitschrift, Bd. IV, S. 31 und Bd. VII, S. 84; ferner Jahresberichte über die Fortschritte der Thierchemie, Bd. 10, S. 161.

2) A. a. O., S. 84 und 85.

3) Die für die photometrische Untersuchung nöthigen Verdünnungen wurden auf Vorschlag von Prof. Hüfner jedesmal mit einer 1/10 procentigen Sodalösung ausgefüllt.

4) A. a. O., S. 83.

vom Hund erhielt, so zeigt sich, dass letztere wesentlich höhere Werthe darstellen. Da von Otto¹⁾ für das Oxyhämoglobin des Schweins die ungefähre Gleichheit seiner bezüglichen Constanten mit denen des Oxyhämoglobins vom Hunde nachgewiesen war, so musste das ungleiche Verhalten der Kohlenoxydverbindung auffallen. Es konnte dies seinen Grund nicht in einer falschen Beobachtung mit dem Spectrophotometer haben, denn dagegen spricht, dass der Quotient $\frac{A_c}{A'_c}$ bei Marshall fast derselbe ist wie bei mir; bei ihm ist er 1,142, bei mir 1,13. Es musste also der Fehler in der Bestimmung der Concentration gelegen haben. Marshall hatte dieselbe nach der ersten der oben erwähnten Methoden ausgeführt, bei welcher allerdings weit leichter als bei der anderen Fehler gemacht werden können.

Es wurde daher für das Kohlenoxydhämoglobin vom Hund eine Nachprüfung der optischen Constanten nach der zweiten Methode unternommen. Die Resultate derselben finden sich in der folgenden Tabelle.

Nr.	c	ε_c	ε'_c	A_c	A'_c	$\frac{A_c}{A'_c}$
1.	0,0008976	0,78822	0,89464	0,001139	0,001003	1,135
2.	0,0008976	0,80384	0,90596	0,001117	0,000991	1,127
			Mittel:	0,001128	0,000997	1,131

Berücksichtigt man nur fünf Decimalen, so ist auch:

$$A_c = 0,0113 \text{ und}$$

$$A'_c = 0,00100.$$

Die optischen Constanten des Kohlenoxydhämoglobins vom Hund und Schwein sind also identisch zu setzen.

Es sei hier darauf hingewiesen dass A'_o und A'_c denselben Werth haben. Es folgt daraus, dass Oxyhämoglobin- und Kohlenoxydhämoglobininlösungen in der Spectralregion D63E — D84E gleich viel Licht absorbiren.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd VII, S. 62.

§ 5.

Befinden sich in einer Lösung die beiden Farbstoffe, Oxyhämoglobin und Kohlenoxydhämoglobin, gleichzeitig neben einander, so ist bekanntlich, wenn die optischen Constanten beider ermittelt sind, die Mengenbestimmung beider durch einen Versuch möglich. Die Gleichungen, welche zur Berechnung der Mengen zweier in einer Lösung sich findenden Farbstoffe dienen, sind schon von Vierordt entwickelt und werden hier als bekannt vorausgesetzt. Dieselben sind für unseren Fall, wenn E und E' die beobachteten gemeinsamen Extinctionscoefficienten und h_o und h_c den Gehalt an Oxyhämoglobin-, bezw. Kohlenoxydhämoglobin bedeuten:

$$1. \dots h_o = \frac{\Lambda_o \Lambda'_c (E \Lambda_c - E' \Lambda'_o)}{\Lambda'_o \Lambda_c - \Lambda_o \Lambda'_c}$$

$$2. \dots h_c = \frac{\Lambda_c \Lambda'_o (E' \Lambda'_o - E \Lambda_o)}{\Lambda'_o \Lambda_c - \Lambda_o \Lambda'_c}$$

Bestimmt man den Gehalt einer Oxyhämoglobinlösung H_o , sättigt sie theilweise mit Kohlenoxyd und bezeichnet dann die Menge des Kohlenoxydhämoglobins mit h_c und die des noch vorhandenen Oxyhämoglobins mit h_o , so muss stets annähernd

$$H_o = h_o + h_c \text{ sein.}$$

Es kann dies als Controlle für die richtige Bestimmung der Constanten dienen. Folgende Tabelle enthält einige daraufhin angestellte Versuche. In derselben sind H_o , h_o und h_c die in einem Volumen von 64 cc. enthaltenen Farbstoffmengen. †

Nr.	H_o	E	E'	h_o	h_c	$h_o + h_c$
1.	0,06925	0,92636	1,09076	0,01807	0,05110	0,06917
2.	0,05146	0,69238	0,81150	0,01238	0,03955	0,05193
3.	0,05344	0,63390	0,83372	0,04997	0,00339	0,05336

§ 6.

Verdrängungsversuche.

Die Lösungen des zu den folgenden Verdrängungsversuchen angewandten Kohlenoxydhämoglobins wurden theils aus Krystallen, theils auch aus verdünntem, frischem Schweineblute durch Schütteln mit Kohlenoxyd hergestellt. Wie sie nun aber auch dargestellt sein mochten, jedesmal wurden sie vor dem Versuche noch einige Zeit tüchtig mit atmosphärischer Luft geschüttelt. Dadurch sollte zunächst jede Spur von mechanisch absorbirtem Kohlenoxyd entfernt, ja sogar eine theilweise Zersetzung herbeigeführt werden, dann aber sollte auch die Gewissheit gegeben werden, dass, wenn eine Zersetzung eingetreten, neben Kohlenoxydhämoglobin nur Oxyhämoglobin vorhanden war, dass man dann also mit vollem Recht die in § 5 angeführte Gleichung 2 zur Berechnung des Kohlenoxydhämoglobingehaltes anwenden durfte, — was in der That in allen Versuchen geschehen ist. Das Kohlenoxyd sollte durch Stickoxyd verdrängt werden. Neben Kohlenoxyd war aber nach dem Gesagten immer auch etwas Sauerstoff vorhanden. Da dieser letztere voraussichtlich die Bildung von salpetriger Säure bewirken musste, so wurde, um diese unschädlich zu machen, den Lösungen etwas Soda zugefügt. Das Volum der in jedem Versuche angewandten Farbstofflösung betrug 158,25 cc.

Der Verdrängungsapparat, dessen ich mich bediente, ist von Herrn Prof. Hüfner¹⁾ schon mehrfach beschrieben und erst neuerdings wieder von Marshall benutzt worden. Seine Handhabung ist aus jenen Beschreibungen zu erschen, braucht also hier nicht wiederholt zu werden. Die Lösung des Kohlenoxydhämoglobins wurde mit Stickoxyd in der durch Hähne verschlossenen grösseren Kugel eine halbe Stunde lang geschüttelt, darauf die Kugel mit der Hüfner'schen Quecksilberpumpe verbunden und das Gas in einem Glasgefässe derselben Art aufgefangen, dessen sich schon Mar-

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

shall bedient hatte. Nach Entfernung des Stickoxyds durch einen Ueberschuss von Sauerstoff und durch Natronlauge wurde das nun aus Kohlenoxyd, Sauerstoff und etwas Stickstoff (letzterer war gleich im Anfang durch das Schütteln mit atmosphärischer Luft in die Lösung gelangt) bestehende Gas in ein Eudiometer übergeführt, das Volum gemessen, Knallgas zugefügt und verpufft. Die Menge des Kohlenoxyds wurde entweder aus der nach der Verbrennung von Kohlenoxyd zu Kohlensäure oder aus der nach der Absorption der Kohlensäure eingetretenen Contraction abgeleitet. Das erste geschah nur dann, wenn das Gas vorher noch mit atmosphärischer Luft verdünnt worden war; eine solche Verdünnung war aber bisweilen nöthig, weil sonst eine theilweise Verbrennung von Stickstoff eintreten und die Contraction zu gross erscheinen lassen konnte.

Es folgen nun die einzelnen Versuche. Sie enthalten die Angabe der Mengen des angewandten Kohlenoxydhämoglobins = h_c in Grammen und die gasanalytischen Daten. Die Gasanalysen wurden in zwei Eudiometern (IV und V) ausgeführt. Für Eudiometer IV sind 38,41, für Eudiometer V 33,1 Theilstriche = 7,431 cc.

1. $h_c = 5,68$, Eudiometer IV.

	Vol.	Druck	Temp.	Vol. bei 0° u. 1 ^m Dr.
Nach Ueberführung in's Eudiometer	379,1	0,6079	3,8	227,3
Nach der Verpuffung.	359,3	0,5897	3,7	209,1
CO = 36,4, entspr. 7,402 cc.				

2. $h_c = 2,35$, Eudiometer IV.

Nach Ueberführung in's Eudiometer	287,9	0,5361	9,2	149,3
Nach der Verpuffung.	280,4	0,5223	9,1	141,7
CO = 15,2, entspr. 2,941 cc.				

3. $h_c = 5,99$, Eudiometer IV.

Nach Ueberführung in's Eudiometer	211,6	0,4642	9,3	94,99
Nach der Verpuffung.	180,1	0,4331	9,3	75,43
CO = 39,12, entspr. 7,568 cc.				

4. $h_c = 5,48$, Eudiometer IV.

Nach Ueberführung in's Eudiometer	195,0	0,4521	8,4	85,53
Nach der Verpuffung.	164,7	0,4223	8,0	67,57
CO = 35,92, entspr. 6,949 cc.				

5. $h_c = 5,22$, Eudiometer IV.

	Vol.	Druck	Temp.	Vol. bei 0° u. 1m Dr.
Nach Uebersührung in's Eudiometer	337,2	0,6059	3,5	201,7
Nach der Verpuffung	317,6	0,5872	3,0	184,5
CO = 31,4, entspr. 6,655 cc.				

6. $h_c = 4,68$, Eudiometer V.

Nach der Verpuffung	265,1	0,5040	4,4	131,5
Nach Absorption von CO ²	221,6	0,4797	4,4	104,6
CO = 26,9, entspr. 6,039 cc.				

7. $h_c = 3,66$, Eudiometer V.

Nach der Verpuffung	244,6	0,4838	4,4	116,5
Nach Absorption von CO ²	205,9	0,4698	3,8	95,4
CO = 21,1, entspr. 4,736 cc.				

8. $h_c = 2,66$, Eudiometer IV.

Nach der Verpuffung	220,0	0,4896	4,6	105,9
Nach Absorption von CO ²	189,9	0,4746	5,0	88,5
CO = 17,4, entspr. 3,366 cc.				

9. $h_c = 2,70$, Eudiometer IV.

Nach der Verpuffung	304,9	0,5728	4,6	171,8
Nach Absorption von CO ²	278,0	0,5653	4,4	154,6
CO = 17,2, entspr. 3,328 cc.				

10. $h_c = 5,32$, Eudiometer V.

Nach der Verpuffung	277,4	0,5122	5,4	139,3
Nach Absorption von CO ²	232,1	0,4849	5,3	110,4
CO = 28,9, entspr. 6,488 cc.				

11. $h_c = 2,94$, Eudiometer V.

Nach der Verpuffung	271,5	0,5054	4,6	134,9
Nach Absorption von CO ²	244,5	0,4947	4,5	119,0
CO = 15,9, entspr. 3,570 cc.				

12. $h_c = 2,95$, Eudiometer IV.

Nach der Verpuffung	273,5	0,5343	4,3	143,9
Nach Absorption von CO ²	242,8	0,5201	4,2	124,4
CO = 19,5, entspr. 3,773 cc.				

13. $h_c = 5,01$, Eudiometer V.

Nach der Verpuffung	322,8	0,5644	3,7	179,8
Nach Absorption von CO ²	284,9	0,5439	3,5	152,9
CO = 26,9, entspr. 6,039 cc.				

Bezeichnet man das h_c entsprechende Volumen an Kohlenoxyd mit V , so gibt der Quotient $\frac{V}{h_c}$ diejenige Menge von

Kohlenoxyd in Cubiccentimetern, reducirt auf 0° und 1 Meter Druck, an, welche 1 gr. Hämoglobin locker chemisch zu binden im Stande ist. Die aus den eben mitgetheilten Versuchen sich ergebenden Werthe desselben sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt:

Nr.	hc	V	V hc
1.	5,68	7,402	1,240
2.	2,35	2,941	1,251
3.	5,99	7,568	1,263
4.	5,18	6,949	1,268
5.	5,22	6,655	1,275
6.	4,68	6,039	1,290
7.	3,66	4,736	1,294
8.	2,66	3,366	1,266
9.	2,70	3,328	1,233
10.	5,32	6,488	1,220
11.	2,94	3,570	1,214
12.	2,95	3,773	1,279
13.	5,01	6,039	1,205

Mittel: 1,254

In Nr. 1—6 wurden Lösungen von Krystallen, in 7—13 Kohlenoxydblut angewandt; ein Unterschied in den Resultaten lässt sich kaum wahrnehmen, höchstens der, dass bei 1—6 die Werthe für V:hc weniger von einander abweichen.

Ich benutzte einige Male Krystalllösungen, die längere Zeit gestanden und schon einen fauligen Geruch angenommen hatten. Der Quotient schwankte in diesen Fällen weiter hin und her und gab stets zu hohe Werthe (von 1,4—2,0). Wahrscheinlich rührte diese Unsicherheit von verbrennlichen Zersetzungsgasen her, welche das Resultat der Gasanalyse beeinträchtigten. Ich betone daher nochmals, wie wichtig es ist, dass man bei diesen Versuchen von frisch bereiteten Lösungen ausgeht. Auch muss man sich stets von der Abwesenheit des Methämoglobins überzeugen.

In fünf Versuchen gelang es nicht, sämtliches Kohlenoxyd zu gewinnen. Die Werthe für V : hc waren in ihnen wesentlich niedriger und wurden deswegen nicht mit in

Rechnung gezogen; sie lauteten 1,141; 1,165; 1,160; 1,047; 1,119.

Da in meinen Versuchen die Gegenwart von physikalisch absorbiertem Kohlenoxyd ausgeschlossen war, so werden im Allgemeinen die Werthe von $V : h_c$ zu niedrig ausgefallen sein. Etwas höhere als der wahre können sich allerdings auch darunter befinden, und zwar werden sie sich dann ergeben haben, wenn h_c zu klein gefunden würde. Die Bestimmung auf spectrophotometrischem Wege ist zwar genauer als jede andere analytische Methode, doch müssen auch bei ihr Fehler vorkommen, namentlich dann, wenn, wie in den vorstehenden Versuchen, in die Berechnung eines h_c -Werthes gleichzeitig zwei Extinctionscoefficienten und vier Constanten eingehen. Der durch die Constanten bedingte Fehler fällt allerdings sehr wenig in's Gewicht, dafür spricht am Besten die in § 5 angeführte Tabelle; eher müssen sich Fehler bei den Werthen von E und E' geltend machen, besonders da hier die mögliche Zersetzung des Farbstoffs die blossen Beobachtungsfehler verstärken kann. Letzterer Umstand macht es wahrscheinlich, dass, wenn solche Fehler auftreten, diese den Werth von h_c eher etwas zu klein erscheinen lassen werden.

Nach alledem wird der Mittelwerth 1,254 dem wirklichen Werthe von $V : h_c$ ziemlich nahe kommen. Wahrscheinlich ist er etwas zu klein. Otto bestimmte den Eisengehalt des Oxyhämoglobins vom Schwein zu 0,426%. Nimmt man diese Zahl als vollkommen richtig an und benutzt die übrigen analytischen Angaben Otto's¹⁾, so würde das Molekulargewicht der entsprechenden Kohlenoxydverbindung 13207 und $\frac{V}{h_c} = 1,287$ sein, eine Zahl, die von meinen höchsten Werthen erreicht wird. Sieht man von dieser Annahme ab — wozu man wohl das Recht hat, da die Eisenbestimmungen ebenfalls mit Fehlern behaftet sind — und legt dagegen $V : h_c = 1,254$ zu Grunde, so berechnet

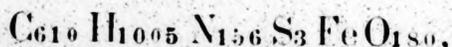
¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. VII, S. 61.

sich unter Zuhilfenahme des specifischen Gewichtes vom Kohlenoxyd¹⁾ das Molekulargewicht des Kohlenoxydhämoglobins aus der Proportion:

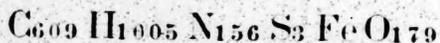
$$28 : 2,064975 = m : 1000$$

$$m = 13559.$$

Wollte man mit dieser Zahl und unter Benutzung der erwähnten analytischen Daten Otto's für das Kohlenoxydhämoglobin des Schweins eine empirische Formel aufstellen, so würde diese sein:



das fragliche Molekulargewicht also 13541 betragen; ihm würde ein Hämoglobin vom Molekulargewichte 13513 und der empirischen Formel



entsprechen.

Können diese Formeln zwar keinen Anspruch darauf erheben, die thatsächlichen Molekulargewichte auszudrücken, so weisen sie bei einem Vergleiche mit denen, welche Hüfner²⁾ und Marshall³⁾ für die korrespondirenden Verbindungen aus Hundeblood festgestellt haben, wenigstens mit Sicherheit darauf hin, dass dem Hämoglobin des Hundes ein etwas höheres Molekulargewicht als dem des Schweines zukommt.

¹⁾ 1 cc. wiegt bei 0° und 760 mm. Druck 0,0012515 gr., folglich 1,254 cc. bei 0° und 1 M. Druck 0,002064975 gr.

²⁾ Journal für praktische Chemie, Bd. 22, S. 385.

³⁾ A. a. O., S. 91.

Tübingen, im April 1883.