

Über einige Fragen von prinzipieller Bedeutung für die Spektrophotometrie des Blutes.

Von
weil. G. Hüfner.

(Der Redaktion durch Herrn Professor von Zeynek zugesandt am 28. September 1908.)

Die gleichzeitige quantitative Bestimmung zweier in einerlei Lösung befindlicher verschiedener Farbstoffe mit Hilfe des Spektrophotometers setzt voraus, daß man die Lichtverteilung im Spektrum jedes der beiden genau kennt. Diese Bedingung scheint von vornherein ebenso leicht erfüllbar zu sein, wie sie selbstverständlich ist. Das ist aber hinsichtlich des Oxyhämoglobins durchaus nicht der Fall. Versuche über die Dissoziation dieses Stoffes haben zu der Folgerung geführt¹⁾, daß auch bei noch so hohem Drucke des Sauerstoffs doch niemals alle Hämoglobinmoleküle, die sich in wässriger Lösung darunter befinden, mit Sauerstoff verbunden seien, daß vielmehr stets ein gewisser, wenn auch noch so kleiner Bruchteil der Gesamtmenge derselben sauerstofffrei bleiben werde. So hatte die Rechnung ergeben, daß, um 99% aller vorhandenen Hämoglobinmoleküle an Sauerstoff zu binden, schon ein Sauerstoffdruck von 900 mm Quecksilber, und um 99,99% Oxyhämoglobin zu erhalten, sogar ein solcher von 90900 mm nötig sein würde.

In diesen Zahlen liegt nun ein Widerspruch gegen die Angaben des Spektrophotometers; denn wenn wirklich eine volle Sättigung einer Hämoglobinlösung mit Sauerstoff niemals zu erreichen ist, jedenfalls nur annähernd unter sehr hohen Drucken, so kann es ein reines Oxyhämoglobinspektrum überhaupt gar nicht geben, namentlich nicht unter dem normalen Sauerstoffdrucke unserer Atmosphäre. Das Spektrum einer Blutlösung müßte sich im Gegenteile entsprechend der Zunahme an Oxyhämoglobin fortwährend ändern. Und doch zeigt sich zwischen dem Spektrum einer mit atmosphärischer Luft von gewöhnlichem Drucke und demjenigen einer gleichkonzentrierten,

¹⁾ Archiv f. Anat. u. Physiol., Physiol. Abt., 1901, S. 187 ff.

mit reinem Sauerstoffe von mehr als 700 mm Druck geschüttelten Blutlösung in bezug auf Lichtstärke und Lichtverteilung bei gleicher Schichtendicke kein für unser Auge wahrnehmbarer Unterschied. Vor allem ist — und das ist wesentlich

— der Quotient $\frac{\epsilon'_0}{\epsilon_0}$, d. h. das Verhältnis der Extink-

tionskoeffizienten in zwei bestimmten Regionen des Spektrums, bei beiden Lösungen völlig der gleiche. Gilt ϵ_0 für $\lambda = 554-565 \mu\mu$ und ϵ'_0 für $\lambda = 531,5-542,5 \mu\mu$, so ist nach jahrelang wiederholten Messungen, wie schon oft betont wurde,

der Wert von $\frac{\epsilon'_0}{\epsilon_0}$ für Lösungen frischen, unverdorbenen Oxy-

hämoglobins (nicht bloß von solchen unserer großen Pflanzenfresser, sondern auch von solchen des Menschen oder des Hundes), die mit Luft von gewöhnlichem Drucke geschüttelt worden, durchschnittlich = 1,578.

Drei zu verschiedenen Zeiten ausgeführte Versuchsreihen nun, in denen frisches Rinderblut, das vorher mit 0,1%iger Sodalösung 120fach verdünnt worden war, in einem verschlossenen Kölbchen, mit reinem Sauerstoffe von rund 735 mm Druck wiederholt und unter mehrmaliger Erneuerung dieses Gases geschüttelt und unmittelbar nachher in einer gleichfalls verschlossenen Absorptionszelle vor dem Photometer untersucht wurde, lieferten folgende Daten:

Versuch I. (12. Nov. 1904.)	Versuch II. (15. Juli 1905.)	Versuch III. (18. Juli 1905.)
$\epsilon_0 = 0,67118$	$\epsilon_0 = 0,70124$	$\epsilon_0 = 0,70551$
$\epsilon'_0 = 1,05828$	$\epsilon'_0 = 1,10466$	$\epsilon'_0 = 1,11688$
$\frac{\epsilon'_0}{\epsilon_0} = 1,577$	$\frac{\epsilon'_0}{\epsilon_0} = 1,575$	$\frac{\epsilon'_0}{\epsilon_0} = 1,583$

Der Mittelwert für $\frac{\epsilon'_0}{\epsilon_0}$ ist auch hier = 1,578, also genau der gleiche, wie oben. Der mittlere Fehler dieser drei Bestimmungen ist kleiner als 0,2 auf 100.

Der Grund, weshalb in beiden Fällen das Spektrum völlig

das gleiche ist, kann wohl nur darin liegen, daß sich bei Berührung mit Luft sofort sämtlicher Farbstoff der verdünnten Lösung in Oxyhämoglobin unwandelt, gleichgültig ob die Lösung mit reinem Sauerstoffe von 735 mm oder mit Luft, worin der Partiardruck des Sauerstoffs nur 150 mm beträgt, geschüttelt wird. Die Menge des von der Lösung physikalisch absorbierten Sauerstoffs ist allerdings schon im letzten Falle viel mehr als ausreichend, um überhaupt alles vorhandene Hämoglobin in die Sauerstoffverbindung überzuführen.

Um dies zu zeigen, nehmen wir an, es solle frisches gesundes Tierblut, das etwa 14 g Farbstoff in 100 ccm enthält, spektrophotometrisch untersucht werden.

Zu diesem Zwecke sei 1 ccm desselben, enthaltend 0,14 g Hämoglobin, mit einer 0,1 %igen Sodalösung auf 120 ccm verdünnt und diese Lösung bei 154 mm Sauerstoffdruck (dem mittleren Partiardrucke des Sauerstoffs in Tübingen) und der Temperatur $37,5^{\circ}$ nochmals tüchtig mit atmosphärischer Luft geschüttelt worden. Da der Absorptionskoeffizient des Sauerstoffs für die verdünnte Lösung bei $37,5^{\circ}$ kaum kleiner als 0,023 ist, so beträgt die Gesamtmenge des physikalisch absorbierten Sauerstoffs $\frac{154 \cdot 0,023 \cdot 120}{760} = 0,560$ ccm. Nun ist aber die zur Umwandlung von 0,14 g Hämoglobin in Oxyhämoglobin erforderliche Sauerstoffmenge, da 1 g Hämoglobin dazu 1,34 ccm braucht, nicht größer als 0,1876 ccm, folglich ist der physikalisch absorbierte Sauerstoffvorrat im angenommenen Falle allein schon etwa 3mal so groß, wie diese Menge.

Nach dem Schütteln der Lösung mit einem Gase, dessen Sauerstoffdruck etwa 5mal größer ($\frac{735}{154} = 4,8$) ist als in dem eben besprochenen Beispiele, wird demnach die physikalisch absorbierte Sauerstoffmenge sogar 15mal so groß wie die erforderliche sein; und wenn sich das Spektrum trotzdem nachher noch unverändert zeigt, so ist daraus zu schließen, daß die Lösung unter dem gewöhnlichen Sauerstoffdrucke eben auch schon vollständig gesättigt, d. h. daß ihr gesamtes Hämoglobin auch schon unter diesem Drucke vollständig in Oxyhämoglobin verwandelt war. Damit ist denn aber auch bewiesen,

daß die optischen Konstanten, d. h. die Größen A_0 und A'_0 und damit zugleich der Quotient $\frac{A_0}{A'_0} = \frac{\epsilon'_0}{\epsilon_0}$, die seinerzeit¹⁾ an verdünnten Oxyhämoglobinlösungen nach dem Schütteln derselben mit atmosphärischer Luft von gewöhnlichem Drucke festgestellt wurden, in der Tat als die Konstanten einer reinen, von Hämoglobin freien Oxyhämoglobinlösung gelten dürfen.

Wir kommen jetzt nochmals zu der Frage, ob die Anwendung ausgekochten, völlig gasfreien Wassers zum Zwecke der notwendigen Verdünnung eines Blutes statthaft ist, wenn die spektrophotometrische Untersuchung der verdünnten Lösung hinterdrein einen genauen Aufschluß über das Mengenverhältnis liefern soll, in welchem beide Farbstoffe im ursprünglichen Blute vorhanden sind.

Versuche hierüber wurden von mir bereits vor 21 Jahren, im Jahre 1886, mitgeteilt. Es geschah dies in einer in dieser Zeitschrift, Bd. X, S. 224, veröffentlichten Abhandlung, die als Überschrift die Frage trägt: «Wirkt ausgekochtes, völlig sauerstofffreies Wasser zersetzend auf Oxyhämoglobin?» Die Frage bezweckte Aufklärung darüber, ob sauerstoffhaltiger Blutfarbstoff bei der Verdünnung seiner Lösung mit gasfreiem Wasser unter Luftabschluß eine spektrophotometrisch nachweisbare Dissoziation erleidet. Die letztere Frage mußte nach dem Ergebnis der angestellten Versuche mit «Nein» beantwortet werden und damit die Frage nach der Statthaftigkeit einer derartigen Verdünnung mit «Ja». ²⁾

¹⁾ Archiv f. Anat. u. Physiol., Physiol. Abt., 1894, S. 130 ff.

²⁾ Vier Jahre später, im Jahre 1890, bin ich in einem kurzen Aufsätze, der im Anschluß an meine im Arch. f. (Anat. u.) Physiol., 1890, S. 1 ff. veröffentlichte erste Arbeit «Über das Gesetz der Dissoziation des Oxyhämoglobins usw.» ebendasselbst S. 28 ff. erschien, nochmals auf die Besprechung der gleichen Frage zurückgekommen. In einem im Zentralblatte f. Physiologie, Bd. XVII, S. 682 ff., im Jahre 1904 veröffentlichten Aufsätze über die «Theoretische Behandlung der quantitativen Verhältnisse bei der Sauerstoffaufnahme des Hämoglobins» sagt nun Herr Bohr: «Es ist daher eine logische Folge der Hüfnerschen Formel, daß sich bei der Verdünnung mit ausgekochtem Wasser das Verhältnis

Es hatte sich nämlich bei den entsprechenden Versuchen herausgestellt, daß, wenn man frisches defibriertes Schweineblut, das etwa eine halbe Stunde zuvor noch einmal mit atmosphärischer Luft geschüttelt worden war, unter Luftabschluß soweit mit völlig luftfreiem Wasser verdünnt, bis die spektrophotometrische Untersuchung desselben möglich ist, nicht etwa, wie man erwarten möchte, das Spektrum eines Gemenges von Oxyhämoglobin mit viel Hämoglobin, sondern lediglich dasjenige des Oxyhämoglobins zu beobachten ist. Die getäuschte Erwartung stützte sich auf die Annahme, daß das ausgekochte, völlig luftleere Wasser selber gewissermaßen als Vakuum wirken müsse, insofern es wegen seines Mangels an allem absorbierten Sauerstoff ein Lösungsmittel vorstelle, über welchem der Partialdruck des Sauerstoffs gleich Null ist. Formell aber war sie durch das sogenannte Verdünnungsgesetz von Ostwald begründet, von dem man annehmen durfte, daß es auch für die Dissoziation gelösten Oxyhämoglobins in Hämoglobin und Sauerstoff gültig sei; hiernach gilt nämlich die Gleichgewichtsformel

$$\frac{C_{ho}}{C_{hr} \cdot C_o} = \kappa, \quad (1)$$

worin C_{ho} die molekulare Konzentration des Oxyhämoglobins, C_{hr} diejenige des reduzierten Hämoglobins, C_o die molekulare Konzentration des gelösten Sauerstoffs — jede Konzentration bezogen auf 1 ccm der Lösung — und κ die Gleichgewichtskonstante bedeutet. Bei Betrachtung dieser Formel leuchtet ohne weiteres ein, daß, wenn man die Lösung der 3 Stoffe auf das n -fache verdünnt, man damit zugleich das Gleichgewicht zwischen den dreien zerstört, insofern dann in der Gleichung

$\frac{C_r}{C_o}$ ändert. Daß Hüfner diesen Umstand übersehen hat, bewirkt usw.»

Man sieht aus dem Angeführten, daß von uns beiden nicht ich es gewesen bin, der hier etwas übersehen hat: Im Gegenteile war die Frage schon 18 Jahre, bevor Herr Bohr seinen Vorwurf — den Vorwurf eines groben Rechenfehlers! — gegen mich erhob, experimentell von mir entschieden, und zwar in dem Sinne, daß ich darauf mit gutem Rechte eine Methode für die gleichzeitige Bestimmung des Hämoglobins und Oxyhämoglobins im Blute gründen konnte.

$$\frac{\frac{C_{ho}}{n}}{\frac{C_{hr}}{n} \cdot \frac{C_o}{n}} = \kappa' \quad (2)$$

κ' einen n -fach höheren Wert annehmen würde, als κ , was der Voraussetzung, daß es eine Gleichgewichtskonstante für den Vorgang gibt, widerspräche. Wenn es nun aber doch eine solche gibt, so muß die Verdünnung mit dem gasfreien Wasser in der Tat einen teilweisen Zerfall des Oxyhämoglobins und damit eine Vermehrung des Hämoglobins und des freien, gelösten Sauerstoffs zur Folge haben.

Zu besserer Veranschaulichung möge wieder ein numerisches Beispiel dienen, und zwar wollen wir bei der Annahme bleiben, daß das zu untersuchende Blut in 100 ccm 14 g Farbstoff enthalte und daß es vor der Verdünnung nochmals bei $37,5^\circ$ mit Luft, deren Sauerstoffdruck, $p_1 = 160$ mm betragen soll, geschüttelt worden sei.

Um die molekulare Konzentration der einzelnen in Lösung befindlichen Stoffe angeben zu können, hätte man das in der Volumeinheit vorhandene Gewicht derselben durch ihr Molekulargewicht zu dividieren. Da nun das Molekulargewicht des Hämoglobins ohne merklichen Fehler dem des Oxyhämoglobins gleichgesetzt werden darf und da ferner das Molekulargewicht des Sauerstoffs in beiden Gleichungen als Divisor wiederkehrt, so dürfen alle diese Divisionen in der nachfolgenden Rechnung füglich unterbleiben und an Stelle der Sauerstoffgewichte mögen auch die äquivalenten Sauerstoffvolumina genommen werden.

Wenn wir uns nun erinnern, daß von dem vorhandenen Oxyhämoglobin unter dem angenommenen Drucke und bei der angenommenen Temperatur 5,6 % dissoziiert sein sollen,¹⁾ so besitzt das Zeichen C_{ho} in unserem Falle vor der Verdünnung den Wert 0,1322 und das Zeichen C_{hr} den Wert 0,0078; und wenn wir für das Zeichen C_o den Ausdruck $\frac{\alpha p}{760}$ einführen und den Absorptionskoeffizienten α des Sauerstoffs für das Blut bei

¹⁾ Archiv f. Anat. u. Physiol., Physiol. Abt., 1901, S. 212 ff.

der Temperatur $37,5^{\circ}$ zu 0,023 (wahrscheinlich etwas zu hoch) ansetzen, so wird

$$C_0 = \frac{0,023 \cdot 160}{760} = 0,00484;$$

sodaß nun Gleichung (1) in Zahlen ausgedrückt folgendermaßen lautet:

$$\frac{0,1322}{0,0078 \cdot 0,00484} = 3502. \quad (3)$$

Wird nun 1 ccm dieses Blutes 100fach mit ausgekochtem Wasser verdünnt, so muß, falls die rechts vom Gleichheitszeichen stehende Zahl dieselbe bleiben soll, mit den 3 Zahlen des Bruchs eine derartige Änderung vor sich gehen, daß sowohl der Zähler wie das den Nenner bildende Produkt kleiner wird, und zwar wird die Gleichung alsdann folgende Form annehmen:

$$\frac{0,001322 - x}{(0,000078 + x) \cdot (0,0000484 + 1,34 x)^1} = 3502. \quad (4)$$

Da die Rechnung für x den Wert 0,0003892 liefert, so erhalten wir am Ende für das neue Gleichgewicht folgende Zahlengleichung:

$$\frac{0,001322 - 0,0003892}{(0,000078 + 0,0003892) \cdot (0,0000484 + 0,0005215)} = 3502 \quad (5)$$

oder

$$\text{oder} \quad \frac{0,0009328}{0,0004672 \cdot 0,0005699} = 3502. \quad (6)$$

In dem hier durchgeführten Beispiele müßte also die gesamte in 1 ccm vorhandene Farbstoffmenge nach 100facher Verdünnung mit gasfreiem Wasser zu fast genau einem Drittel $\left(\frac{0,0004672}{0,0014000}\right)$ aus reduziertem Hämoglobin bestehen und damit die Farbe der Lösung ebenso wie ihr Spektrum auffällig verändert sein. Der oben erwähnte photometrische Quotient $\frac{\epsilon'}{\epsilon}$ dürfte dann höchstens noch 1,23 anstatt 1,578 betragen.²⁾

Das alles tritt aber eben, wie die photometrische Untersuchung des Spektrums lehrt, tatsächlich durchaus nicht ein. Weshalb wohl nicht?

¹⁾ Der Summand $1,34 x$ drückt aus, daß 1 g Hämoglobin $1,34$ ccm Sauerstoff lose zu binden vermag.

²⁾ Vgl. Archiv f. Anat. u. Physiol., Physiol. Abt., 1899, S. 39 ff.

Jedenfalls liegt der Hauptgrund der unerwarteten Erscheinung, wie ich schon früher¹⁾ betonte, in dem Umstande, daß die Verdünnung des Blutes mit dem ausgekochten Wasser in einem sorgfältig von der freien Atmosphäre abgesperrten, ganz mit Flüssigkeit erfüllten Raum vor sich geht, daß ein Luftraum über der Lösung, geschweige ein Vakuum gar nicht vorhanden, daß also auch ein Entweichen von Gas aus der Lösung gar nicht möglich ist.

Ich habe schon mehrere Male darauf hingewiesen, daß der Gleichgewichtszustand, der eintritt, wenn eine Oxyhämoglobinlösung mit Stickstoff geschüttelt wird, nicht von einfacher Art ist; denn es besteht zuletzt Gleichgewicht 1. zwischen der Konzentration der noch unzersetzten Substanz und dem Produkte der Konzentrationen der beiden Zersetzungsprodukte, Hämoglobin und Sauerstoff, soweit der letztere noch in der Lösung geblieben ist, und 2. zwischen der Konzentration des gelösten und derjenigen des in der darüberstehenden Atmosphäre befindlichen Sauerstoffs. Letzteres Gleichgewicht ist durch das Absorptionsgesetz der Gase geregelt.²⁾

Die Störung des einen Gleichgewichts muß auch eine Störung des anderen zur Folge haben. In unserem Falle nun, wo eine Oxyhämoglobinlösung mit gasfreiem Wasser verdünnt wird in einem Raume, der vollständig mit Flüssigkeit erfüllt ist, fällt das 2. Gleichgewicht ganz hinweg und damit also auch die Möglichkeit einer Störung desselben.

Dagegen ist aber die Möglichkeit nicht ausgeschlossen,

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. X, S. 224, 1886. Dort heißt es: «Wenn nun aber, wie in unserem Verdünnungsapparate, das Verdünnungswasser gar keine Atmosphäre über sich hat, wohin soll der vom Hämoglobin losgelöste Sauerstoff entweichen? — Er kann dem Hämoglobin gar nicht entrinnen; jeden Augenblick muß er ihm, weil noch in der Lösung enthalten, wieder begegnen; und was ist da wohl bei der Anziehung, die ja stets zwischen beiden herrscht, natürlicher, als daß die Sauerstoffverbindung sich zurückbildet, vorausgesetzt, daß sie sich unter dem Einflusse sauerstofffreien Wassers allein überhaupt zersetzt hatte.»

²⁾ Im Blute selbst ist der Gleichgewichtszustand ein noch komplizierterer. Denn hier kommt noch als Drittes hinzu das Gleichgewicht zwischen dem Sauerstoffgehalte des Plasmas und demjenigen der in den Blutkörperchen eingeschlossenen wässerigen Lösung.

daß durch die bloße Verdünnung einer Oxyhämoglobinlösung ein Zustand geschaffen wird, der demjenigen der Dissoziation gelöster Elektrolyte gleicht. Wir können uns denken, daß die beiden Zerfallsprodukte, Hämoglobin- und Sauerstoffmoleküle, sich nur verschieben und nebeneinander vorbei bewegen, oder daß die einzelnen Hämoglobinmoleküle ihre Sauerstoffmoleküle fortwährend untereinander austauschen. Nur müßte — der spektralen Erscheinung gemäß — die Wirkung so dissoziierter Moleküle auf das Licht immer noch dieselbe sein, wie diejenige undissoziierter Moleküle.

Voraussetzung und wesentliche Bedingung für das Bestehenbleiben des reinen Oxyhämoglobinspektrums auch im Falle der Dissoziation würde natürlich der Umstand bleiben, daß von beiden Teilmolekülen äquivalente Mengen nebeneinander in Lösung sind, d. h. also, daß soviel Sauerstoffmoleküle zugegen sind, wie die vorhandenen Hämoglobinmoleküle zur Bildung ganzer Oxyhämoglobinmoleküle bedürfen. Trifft diese Voraussetzung nicht mehr zu — entweder weil etwas Sauerstoff schon vor der Verdünnung in einen über der Lösung befindlichen sauerstofffreien oder sauerstoffarmen Gasraum entwichen, oder auch weil etwas davon chemisch verbraucht ist —, dann, aber auch erst dann, tritt neben dem Spektrum des Oxyhämoglobins noch dasjenige des reduzierten Farbstoffs auf. Also wird durch das Spektrum nicht der Zustand der Dissoziation als solcher, sondern nur der Verlust von gasförmigen Teilmolekülen angezeigt, und die Größe dieses Verlustes wird durch die photometrische Bestimmung des Hämoglobins neben dem Oxyhämoglobin gemessen.

Zum Schlusse seien hier die Resultate einiger Beobachtungen mitgeteilt, die gelegentlich in den letzten Jahren an verschiedenen Blutproben, nach Verdünnung derselben teils mit einer ausgekochten, teils mit einer unausgekochten Lösung von 0,1 % Soda, mit dem Spektrophotometer gemacht worden sind. Sie geben jederzeit direkten Aufschluß über das in jenen Proben bestehende Verhältnis zwischen Hämoglobin und Oxyhämoglobin und bestätigen von neuem die bekannte Erfahrung, wonach 1. das frisch aus der Arterie des lebenden gesunden Tieres entnommene Blut keineswegs mit

Sauerstoff vollkommen gesättigt ist¹⁾ und wonach 2. in jedem außerhalb des Organismus, selbst bei kühler Temperatur, aufbewahrten Blute sich chemische Prozesse abspielen, die mit einem steten Verbrauch von Sauerstoff verknüpft sind. Daß die in den einzelnen Fällen beobachtete Abnahme des Quotienten $\frac{\epsilon'}{\epsilon}$ nicht etwa durch eine Bildung von Methämoglobin bedingt war, geht daraus hervor, daß die betreffenden Proben nach dem Schütteln mit Luft für diesen Quotienten jedesmal Werte ergaben, die mit dem bekannten Quotienten des Oxyhämoglobins, $\frac{\epsilon'_0}{\epsilon_0} = 1,578$, ganz oder nahezu identisch sind.

Nummer der Versuchsreihe	Zustand des Verdünnungsmittels	Verdünnungsgrad	ϵ	ϵ'	$\frac{\epsilon'}{\epsilon}$	Bemerkungen
I.	1. ausgekocht	99,15	0,65508	1,00754	1,538	Blut direkt aus der Carotis eines schwach narkotisierten Kaninchens in den Verdünnungsapparat eingeleitet.
	2. —	120,60	0,52754	0,81126	1,538	
	3. mit Luft geschüttelt	—	0,52616	0,83212	1,581	
II.	1. ausgekocht	120,0	0,71260	1,11826	1,569	Frisches Rinderblut aus dem Schlachthause.
	2. mit Luft geschüttelt	—	0,70766	1,11826	1,580	
	3. ausgekocht	—	0,71106	1,11564	1,569	
	4. mit Luft geschüttelt	—	0,71384	1,12836	1,580	
III.	1. ausgekocht	120,6	0,68740	1,01260	1,473	Rinderblut, 2 Tage lang im Eisschranke gehalten.
	2. mit Luft geschüttelt	—	0,65110	1,02942	1,581	
IV.	1. ausgekocht	120,6	0,72696	0,93608	1,288	Rinderblut, 3 Tage lang im Eisschranke gehalten.
	2. frisch, luft-haltig	—	0,64464	1,02004	1,582	

¹⁾ Sehr schöne Beweise hierfür hat schon vor längerer Zeit Jac. G. Otto in Christiania gleichfalls durch Versuche mit dem Spektrophotometer erbracht. Vgl. Pflügers Archiv, Bd. XXXVI, S. 36 ff., 1885.

In allen bisherigen Versuchen wurde das Blut zuerst mit einer gasfreien wässrigen Sodalösung von 0,1 % verdünnt, die nicht mehr als Zimmertemperatur (18—20°) besaß. Bei dem fördernden Einflusse, den die Zunahme der Temperatur auf die Dissoziation ausübt, konnte der Verdacht aufsteigen, daß die Verdünnung mit der ausgekochten Lösung bisher deshalb keinen merklichen Zerfall des Oxyhämoglobins, besonders kein merkliches Auftreten von Hämoglobin, zur Folge gehabt habe, weil die Temperatur hierzu nicht genügend hoch gewählt war.

Um diesen Verdacht auf seine Berechtigung zu prüfen, nahm ich in den folgenden Versuchen diese Verdünnung mit Proben desselben Blutes bei je 2 weit voneinander verschiedenen Temperaturen vor.

Num- mer der Ver- suchs- reihe	Tem- peratur der gas- freien Lösung	Ver- dün- nungs- grad	ϵ	ϵ'	$\frac{\epsilon'}{\epsilon}$	Bemerkungen	
V. {	1.	37°	120,0	0,68294	0,99478	1,457	Rinderblut, 1 Nacht im Eisschranke.
	2.	—	—	0,62476	0,98804	1,581	Die warme Lösung mit Luft geschüttelt.
	3.	8°	—	0,68472	0,99434	1,452	Vom gleichen Blute, wie in V, 1.
VI. {	1.	36°	120,6	0,72696	0,93608	1,288	Rinderblut, 3 Tage im Eisschranke.
	2.	—	—	0,64464	1,02004	1,582	Warme Lösung mit Luft geschüttelt.
	3.	7°	—	0,72476	0,93482	1,290	Vom gleichen Blute, wie in VI, 1.

Wie die Werte des Quotienten $\frac{\epsilon'}{\epsilon}$ zeigen — man vergleiche die Quotienten von V,1 und VI,1 mit denen von V,3 und VI,3 —, übt eine höhere Temperatur den vermuteten Einfluß auf den vermeintlichen Vorgang nicht aus; wie denn von dem bekannten Einflusse wachsender Temperatur auf die Lichtverteilung in den Absorptionsspektren im vorliegenden Falle gleichfalls nichts zu bemerken ist.