

Über das Verhalten von Hämoglobin gegen Hydrazin und die Frage nach dem Gasbindungsvermögen des Blutfarbstoffs.

Vorläufige Mitteilung.

Von
E. Letsche.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen.)

(Der Redaktion zugegangen am 8. Juni 1910.)

Um Blut oder eine Blutfarbstofflösung vollkommen sauerstofffrei zu bekommen, sind im Laufe der Zeit eine ganze Reihe von Mitteln, die im einzelnen hier nicht aufgeführt zu werden brauchen, angewendet worden. Alle diese verschiedenen Mittel haben ihre Vorzüge und ihre Nachteile, und man wird, je nach dem Zweck, für welchen man eine Lösung reduzierten Hämoglobins herstellt, dieses oder jenes bevorzugen.

Will man die Lösung benützen zur Feststellung der Gas-mengen, die eine Hämoglobinlösung von bestimmter Konzentration aufzunehmen imstande ist, so wird man es vermeiden, ein Reduktionsmittel anzuwenden, das den Absorptionskoeffizienten der Lösung für das betreffende Gas beeinflusst. Ausgeschlossen ist weiter ein Mittel, das mit dem anzuwendenden Gase reagiert, und vollends gar ein solches, das das Hämoglobinmolekül tiefergehend verändert.

Ein Reduktionsmittel, das diesen Anforderungen entsprechen sollte, sah Hüfner¹⁾ in dem von Curtius entdeckten Hydrazin.

Der Entdecker Curtius gibt über die Wirkungsweise der Salze des Hydrazins, soweit sie uns hier interessiert, folgendes an:²⁾ «Die Absorptionsstreifen, welche eine wässrige Blut-

¹⁾ Archiv f. Anat. u. Physiol. (Physiol. Abt.) 1894. S. 156.

²⁾ J. f. prakt. Chem. Bd. XXXIX, S. 27 ff. (43). 1889.

lösung aufweist, verschwinden auf Zusatz einer Hydrazinsalzlösung fast momentan». An Stelle von Hydrazinsalzen verwendet Hufner¹⁾ Hydrazinhydrat in 25%iger Lösung, denn «bei Anwendung eines Salzes würde gleichzeitig die zu fürchtende Säure auftreten».

Nach Hufner¹⁾ bleibt bei Anwendung von annähernd 1 Mol. Hydrazinhydrat auf 1 Mol. Oxyhämoglobin die Wirkung des Hydrazinhydrats bei der Bildung von reduziertem Hämoglobin stehen. Bei Anwendung größerer Mengen des Reduktionsmittels entsteht nach Hufner²⁾ Hämochromogen und nach v. Zeynek³⁾ ist damit die Einwirkung des Hydrazins auf Hämoglobin noch nicht zu Ende, vielmehr werden «diese beiden — Oxy- und Met-Hämoglobin — durch einen Überschuß des Reagens noch weiter zerstört».

Diese Angaben müssen, meine ich, von vorneherein schon das Hydrazinhydrat als ein für den gedachten Zweck nicht besonders geeignetes Reagens erscheinen lassen. Beobachtungen bei Versuchen⁴⁾ zur Feststellung des Gasbindungsvermögens des Blutfarbstoffs schienen diese Vermutung zu bestätigen und ließen es geraten erscheinen, das Hydrazin auf sein Verhalten gegen Hämoglobin nochmals zu prüfen.

Über die Zusammensetzung einer Hämoglobinlösung sowohl nach der qualitativen wie nach der quantitativen Seite gibt bei einiger Übung am raschesten und sichersten das Spektrophotometer Aufschluß und es sei darum, zum leichteren Verständnis der im folgenden aufgeführten Resultate, in aller Kürze an einige Punkte aus der Spektrophotometrie erinnert.⁵⁾

Die Menge des in einer bestimmten Gegend des Spek-

¹⁾ l. c. S. 156.

²⁾ Arch. f. Anat. und Physiol. (Physiol. Abt.), 1899. S. 499.

³⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXV, S. 492.

⁴⁾ Diese Versuche wurden nach dem Erscheinen der Arbeit von Manhot: «Untersuchungen über die Sauerstoffbindung im Blute», Annalen, Bd. CCCLXX, S. 240 ff., unternommen.

⁵⁾ Zur genaueren Orientierung über die hierbei in Betracht kommenden Fragen sei auf die Arbeiten von Bunsen und Roscoe, Vierordt, Hufner, Lambling, Cherbuliez, Saint-Martin u. a. hingewiesen.

trums von einer gefärbten Lösung absorbierten Lichts steht in einem konstanten Verhältnis zu der Lichtmenge, die dieselbe Lösung in einer 2. Gegend des Spektrums absorbiert. Hüfner wählte als für die Zwecke der Spektrophotometrie des Blutfarbstoffs am besten geeignet die Gegend zwischen den beiden Absorptionsstreifen des Oxyhämoglobins und die Region des 2. nach dem violetten Ende des Spektrums zu gelegenen Streifens oder in Wellenlängen ausgedrückt das Intervall von $556,5-564,5 \mu\mu$ und dasjenige von $534-542 \mu\mu$.¹⁾ Das Verhältnis der Extinktionskoeffizienten²⁾ einer Oxyhämoglobinlösung in den erwähnten Spektralbezirken ist nach den Untersuchungen Hüfners, die in seinem Institut vielfach bestätigt worden sind $\frac{\epsilon'}{\epsilon} = 1,58$.³⁾ Zuletzt hat E. E. Butterfield⁴⁾ an einer längeren Beobachtungsreihe die Richtigkeit dieser Angabe erwiesen und auch ich habe als Mittel einer Reihe von gegen 100 Versuchen, die ich in den letzten Monaten anstellte, die Zahl 1,58 gefunden.⁵⁾

Jede Veränderung des Blutfarbstoffs ist von einer Änderung der Lichtabsorption seiner Lösung begleitet und diese findet ihren deutlichsten Ausdruck in der Änderung des Verhältnisses der beiden Extinktionskoeffizienten oder kürzer des Quotienten.

Wird eine Blutfarbstofflösung reduziert, so fällt der Quotient von 1,58 auf 0,76; beim Methämoglobin (alkal.) ist das Verhältnis 1,19, beim Hämatin 1,09, beim Hämochromogen 0,50⁶⁾ usw.

1) Hüfner hat die Wellenlängengebiete etwas breiter, ca. $11 \mu\mu$, benützt; doch ist es zweckmäßiger, die Spektralbezirke etwas enger zu nehmen.

2) Definition siehe Bunsen und Roscoe, Photochem. Untersuch., Poggendorfs Annalen der Physik, Bd. CI, S. 237.

3) ϵ' bedeutet den Extinktionskoeffizienten in dem Intervall 534 bis $542 \mu\mu$, ϵ den entsprechenden in der Region $556,5-564,5 \mu\mu$.

4) Diese Zeitschrift, Bd. LXII, S. 188.

5) An dem Hüfnerschen Spektrophotometer, das mir zur Verfügung steht, ist der Rauchglaskeil stets ganz ausgeschaltet. Die Breite des Eintrittsspalttes ist $\frac{1}{40}$ mm, die Okularspaltbreite entspricht $8,5 \mu\mu$.

6) In diesem Falle ist für die Bestimmung des einen Extinktions-

Ist also die Angabe von Hufner, daß Hydrazin in etwa molekularer Menge einer Lösung von Oxyhämoglobin zugesetzt, dieses nur reduziert, richtig, so muß der Quotient von 1,58 auf 0,76 fallen und nach dem Verbrauch des Hydrazins, beim Schütteln der Lösung mit Luft wieder auf 1,58 steigen.

Damit ist der Weg, den die Untersuchung zu nehmen hatte, angedeutet.

Zu meinen Versuchen dienten mir folgende Hydrazinpräparate:

1. Hydrazinhydrat in 50%iger wässriger Lösung von Kahlbaum-Berlin enthielt nach der Analyse in 1 ccm 0,42 g Hydrazinhydrat;¹⁾ nach längerem Stehen war der Gehalt schließlich auf 0,324 g pro Kubikzentimeter gesunken.

2. Hydrazinhydrat von Raschig-Ludwigshafen.²⁾

3. Hydrazinsulfat, ein etwa 8 Jahre altes Präparat von Kahlbaum-Berlin.

4. Hydrazinsulfat von Raschig-Ludwigshafen.

Diese 4 Präparate verhielten sich Hämoglobinlösungen gegenüber vollkommen gleich, und ich beschränke mich daher der Kürze wegen darauf, im wesentlichen nur die bei Anwendung von Hydrazinhydrat-Kahlbaum erhaltenen Resultate anzuführen.

Die beiden ersten Präparate kamen bald unverdünnt, bald mehr oder weniger stark mit destilliertem Wasser verdünnt zur Anwendung. Die Sulfatpräparate wurden erst wiederholt aus Wasser umkrystallisiert und dann in Wasser unter Zusatz von etwas mehr Soda, als der vorhandenen H_2SO_4 äquivalent war, gelöst.

Das Blut stammte von geschächteten Rindern; es kam

koeffizienten (ϵ) statt des Intervalls von 556,5—564,5 $\mu\mu$ die Region von 554—562 $\mu\mu$ zu wählen. Siehe auch Bürker, Bestimmung des Hämoglobins in Tigerstedts Handbuch der physiol. Methodik, 1910, S. 200.

¹⁾ Außer Spuren von Alkali enthielt das Präparat keine Verunreinigung.

²⁾ 1 ccm enthielt 0,85 g Hydrazinhydrat. (Wegen der Methode siehe Rupp, J. f. pr. Ch., Bd. LXVII, S. 140.)

spätestens $\frac{1}{2}$ Stunde nach der Tötung der Tiere ins Laboratorium und wurde sofort in die Kälte gestellt. Die Versuche wurden stets am selben Tage noch angesetzt; bei keinem Versuche kam Blut, das über Nacht gestanden hatte, zur Anwendung.

Zunächst untersuchte ich die Wirkung von Hydrazin auf Hämoglobin einfach in der Weise, das ich Oxyhämoglobin-

Tabelle 1.

Num- mer des Ver- suchs	g Hämo- globin in 100 ccm	Ange- wandt ccm Hb- Lösung	g Hydrazin- hydrat in 100 ccm	Ange- wandt ccm Hydra- zin- lösung	Mol. Hydra- zin auf 1 Mol. Hb	Quo- tient $\frac{\epsilon'}{\epsilon}$	Bemerkungen
1 a)	0,123	100	0,0225	0	0	1,57	nach 36 Stunden
b)				0,55	0,37	1,49	
c)				1,10	0,74	—	
2 a)	7,5	25	0,0225	0	0	1,58	deutlich braun stärker braun als b
b)				20,0	0,81	—	
c)				40,0	1,62	—	
3 a)	1,80	100	0,4	0	0	1,57	stark braun
b)				1,0	0,76	—	
4 a)	1,79	25	0,45	0	0	1,56	deutlich braun
b)				0,1	0,34	—	
c)				0,2	0,68	1,51	
5 a)	0,80	100	0,225	0	0	1,58	.
b)				0,45	0,43	1,56	
c)				0,88	0,84	1,52	
6 a)	11,60	100	32,4	0	0	1,57	
b)				0,15	1,42	1,47	
7 a)	11,60	100	85,0 ¹⁾	0	0	1,57	
b)				0,03	0,75	1,44	
8 a)	11,60	100	0,5 g ²⁾ Sulfat in 10 ccm	0	0	1,57	
b)				3,6	1,72	1,44	

¹⁾ Hydrazinhydrat von Raschig-Ludwigshafen.

²⁾ Hydrazinsulfat von Raschig-Ludwigshafen, 4 mal umkrystallisiert.

lösungen bekannter Konzentration, ¹⁾ hergestellt durch Auflösen von ausgeschleuderten Blutkörperchen in Wasser unter Zusatz von etwas Soda, mit bekannten Mengen Hydrazinhydratlösung versetzte und den Quotienten der Lösung, nachdem sie über Nacht gestanden hatte und dann mit Luft geschüttelt worden war, feststellte.

Die Resultate dieser Versuche gibt Tabelle 1 wieder.

Die Anordnung dieser Versuche weicht von der Hüfners insofern ab, als über der Hämoglobinlösung eine Sauerstoffatmosphäre sich fand, während Hüfner bei der Einwirkung des Hydrazins die Lösung unter einer Wasserstoffatmosphäre hatte. Ich verfuhr bei den folgenden Versuchen daher so, daß ich mit der Lösung, unmittelbar nachdem ich sie mit Hydrazinhydrat versetzt hatte, einen mit 2 Hähnen versehenen Kugelapparat vollständig anfüllte und dann einen Teil der Lösung durch gereinigten Wasserstoff wieder verdrängte.

Tabelle 2.

Num- mer des Ver- suchs	g Hämo- globin in 100 ccm	Ange- wandt ccm Hb- Lösung	g Hydrazin- hydrat in 100 ccm	Ange- wandt ccm Hydra- zin- lösung	Mol. Hydra- zin auf 1 Mol. Hb	Quo- tient $\frac{\epsilon'}{\epsilon}$	Bemerkungen
9 a)	1,80	100	0,204	0	0	1,56	stärker braun als b
b)				1,0	0,34	1,52	
c)				2,0	0,68	—	
10 a)	15,5	500	42,0	0	0	1,58	
b)				0,5	0,95	1,50	
11 a)	14,9	600	42,0	0	0	1,58	
b)				0,4	0,64	1,53	
12 a)	1,19	550	42,0	0	0	1,58	
b)				0,06	1,10	1,52	

¹⁾ Die Konzentrationsbestimmung geschah mittels des Hüfnerschen Spektrophotometers unter vorläufiger Zugrundelegung der von E. E. Butterfield im hiesigen Institut an diesem Apparat ermittelten Absorptionsverhältnisse.

Außerdem erhöhte ich die Konzentration der Oxyhämoglobinlösung, um das Verhältnis von physikalisch absorbiertem und chemisch gebundenem Sauerstoff in der Lösung zugunsten des letzteren zu verschieben.

Das Ergebnis dieser Versuche zeigt Tabelle 2.

Schließlich wurden die folgenden Versuche in der Weise angestellt, daß nach der Einwirkung des Hydrazinhydrats unter einer Wasserstoffatmosphäre die Lösung zur spektrophotometrischen Bestimmung unter Luftabschluß mit ausgekochtem destilliertem Wasser verdünnt und in die Absorptionszelle des Spektrophotometers ebenfalls unter Verwendung von Luftzutritt übergefüllt wurde. Ein Teil der verdünnten Lösung wird mit Luft geschüttelt wie bei den vorhergehenden Versuchen.

Die Resultate finden sich in der

Tabelle 3.

Nummer des Versuchs	g Hämoglobin in 100 ccm	Angewandt ccm Hb-Lösung	g Hydrazinhydrat in 100 ccm	Angewandt ccm Hydrazinlösung	Mol. Hydrazin auf 1 Mol. Hb	Quotient $\frac{\epsilon'}{\epsilon}$		Bemerkungen
						mit Luft	ohne Luft	
13 a)	14,0	220	42,0	0	0	1,56	—	nach 12 Stunden , 36 ,
b)				0,08	0,37	1,48	1,02	
c)				0,16	0,74	1,42	0,93	
14 a)	13,3	250	42,0	0	0	1,58	1,54	
b)				0,18	0,77	1,53	1,13	
15 a)	0,204	100	0,15	0	0	1,58	—	
b)				0,35	1,3	1,55	1,46	

Ein Blick auf die in den 3 Tabellen zusammengestellten Versuche zeigt, daß alle Lösungen, die mit Hydrazinhydrat versetzt wurden, eine Erniedrigung des Quotienten gegenüber den Lösungen ohne Zusatz aufweisen. Diese Erniedrigung ist zwar in einzelnen Fällen ziemlich klein, — ja sie würde in einem Falle (Tabelle 3, 15 b) sogar innerhalb der Fehlergrenzen

der Methode liegen, wenn man diese mit Hühner zu 2,5 % annimmt¹⁾ —, aber ihr konstantes Auftreten läßt erkennen, daß es sich nicht um eine zufällige Erscheinung handelt, und läßt vermuten, daß die Ursache in der Anwendung des Hydrazins liegt.

Dies wird durch das Folgende bestätigt. Betrachtet man die in den 3 Tabellen aufgeführten Zahlen unter dem Gesichtspunkt des Zusammenhangs von Hydrazinhydratmenge (in Mol. auf 1 Mol. Hämoglobin) und Wert des Quotienten, so scheint ein solcher Zusammenhang zu fehlen. So entspricht z. B. bei Versuch 1 b 0,37 Mol. Hydrazinhydrat der Quotient 1,49, bei Versuch 5 b dagegen 0,43 Mol. Hydrazin 1,56.

Der Grund für dieses Mißverhältnis liegt darin, daß die verschiedenen Versuche nicht unter vergleichbaren Bedingungen ausgeführt worden sind. Temperatur, Konzentration der Hämoglobinlösung und Dauer des Stehens der Lösung vom Zusetzen der Hydrazinlösung an bis zur Ausführung der spektrophotometrischen Bestimmung waren bei allen Versuchen verschieden, und zweifellos sind alle diese Faktoren von Einfluß auf den Wert des Quotienten. Die Abhängigkeit des Quotienten von der Dauer des Stehens der mit Hydrazin versetzten Hämoglobinlösung und von der Menge des zugesetzten Hydrazinhydrats geht aus den folgenden Zahlen mit Deutlichkeit hervor.

Ausgeschleuderte Blutkörperchen werden wie bei den vorhergehenden Versuchen in Wasser unter Zusatz von wenig Soda gelöst. Aliquote Teile der Lösung werden mit steigenden Mengen Hydrazinhydratlösung versetzt und zusammen mit einer Probe ohne Zusatz in Eis aufbewahrt. Die Hämoglobinlösung enthielt 13,2 g in 100 ccm; die Konzentration der Hydrazinlösung betrug 0,065 g in 1 ccm. Die Resultate der nach 12, 36 und 132 Stunden ausgeführten spektrophotometrischen Bestimmungen sind aufgeführt in

¹⁾ Bei einer in der Zeit vom 12. I. bis 10. III. 1910 ausgeführten Reihe von 50 Bestimmungen des Quotienten an 36 frischen Rinderblutproben erreichte der Fehler diese Grenze nur ein einziges Mal; bei den übrigen Bestimmungen war die Abweichung meist sogar kleiner als 1,5 %, und nur zweimal betrug der Fehler 2 %.

Tabelle 4.

Nummer der Lösung	Angewandt ccm Hämoglobin- lösung	Angewandt ccm Hydrazin- lösung	Mol. Hydrazin auf 1 Mol. Hämoglobin	Quotient nach		
				12 Stunden	36 Stunden	132 Stunden
0	—	—	—	1,56	1,56	1,56
1	200	0,2	0,17	1,53	1,51	—
2	250	0,5	0,33	1,52	1,50	1,43
3	200	0,6	0,50	1,48*)	1,48	—
4	250	1,0	0,67	1,49	1,47	1,35

*) Diese Bestimmung ist unsicher.

Über den Lösungen fand sich bei dieser Versuchsreihe Luft; um mich zu vergewissern, daß dieser Umstand für den Ausfall des Versuchs nicht von Bedeutung sei, habe ich Teile der Lösungen 2 und 4 nach der bei Tabelle 3 gegebenen Anordnung behandelt und erhielt nach 12stündigem Stehen

für Lösung 2 den Quotienten 1,51,

» » 4 » » 1,50,

Zahlen, die von den direkt erhaltenen so gut wie gar nicht abweichen.

Die Abhängigkeit des Quotienten von der Menge des angewandten Hydrazinhydrats, wie sie bei den in Tabelle 4 aufgeführten Versuchen zum Ausdruck kommt, wird auch zu beobachten sein, wenn die beobachtete Wirkung nicht auf das Hydrazinhydrat selbst, sondern auf eine beigemengte Verunreinigung zurückzuführen ist. Ich habe deshalb die Hydrazinpräparate verschiedener Herkunft und vermutlich auch verschiedenen Reinheitsgrades hinsichtlich ihrer Wirkung mit einander verglichen. Zu dem Zweck wurden je 200 ccm Hämoglobinlösung (11,6 g Oxyhämoglobin in 100 ccm) mit der auf 1 Molekül berechneten Menge Hydrazinhydrat = 0,0634 g versetzt.

Nach der Analyse¹⁾ enthält

von Präparat 1²⁾: 1 ccm 0,324 g Hydrat

» » 2 : 1 » 0,852 » »

¹⁾ Cfr. J. f. pr. Ch., Bd. LXVII, S. 140.

²⁾ Siehe S. 180.

Somit sind von Präparat 1 nötig 0,21 ccm

» 2 » 0,08 ccm.

Von dem Präparat 4 entsprechen, da es nach der Analyse 83,7 % Hydrazinsulfat enthält, 0,212 g 0,0634 g Hydrazinhydrat. Das Hydrazinsulfat wurde in der eben nötigen Menge Soda gelöst.

Nach dem Zugeben des Hydrazins zu den Oxyhämoglobinlösungen kamen diese über Nacht in Eis.

Nach 14 Stunden wurden die Quotienten bestimmt und dabei erhalten für die Lösung, die einen Zusatz erhalten hatte von

Präparat 1: 1,50

» 2: 1,51

» 4: 1,51.

Der Quotient der entsprechenden Oxyhämoglobinlösung ohne Zusatz unter sonst gleichen Bedingungen war 1,57.

Die Wirkung der 3 Hydrazinpräparate entspricht somit ihrem Hydrazingehalt und sie ist somit sicher auf das Hydrazin selbst zurückzuführen.

Die Veränderung des Hämoglobins, die im Sinken des Quotienten zum Ausdruck kommt, ist schon mit bloßem Auge zu erkennen. Die mit Hydrazin versetzten Lösungen zeigen eventuell schon nach 2—3 Stunden einen deutlichen Stich nach Braun. Diese bräunliche Färbung, die am besten beim Schütteln zu beobachten ist, ließ mich das Vorhandensein von Methämoglobin vermuten. Gegen diese Vermutung spricht aber das Resultat der Untersuchung der Lösung mit dem Spektrophotometer, wobei keine Andeutung eines gegen Rot zu liegenden Absorptionsstreifens, wie ihn eine alkalische Methämoglobinlösung zeigt, zu erkennen war. Weiter ergibt aber folgender Versuch, daß auch Methämoglobin durch Hydrazin verändert wird.

Fügt man zu einer Oxyhämoglobinlösung (11,2 g in 100 ccm) ein wenig Hydroxylamin¹⁾ (aus dem Chlorhydrat durch Sodazusatz bis zur alkalischen Reaktion erhalten), so enthält diese Lösung nach einigem Stehen reichliche Mengen Methämoglobin: nach 12 Stunden ist der Quotient der Lösung 1,26 (1,25); für eine reine Methämoglobinlösung wäre er nach Hüfner 1,19.

¹⁾ 1 Mol. auf 1 Mol. Hb.

Gab man zu 50 ccm dieser Lösung 1,45 ccm Hydrazinhydratlösung (0,162 g in 10 ccm) entsprechend 1,4 Mol., so war der Quotient dieser Lösung nach etwa 24 Stunden 1,35, während die Kontrollprobe noch den Quotienten 1,26 zeigte. Das Steigen des Quotienten in diesem Falle ist wohl so zu erklären, daß neben anderen Reaktionen auch Reduktion eines Teils des Methämoglobins zu Hämoglobin eintrat und dies beim Schütteln mit Luft in Oxyhämoglobin überging. Denn daß die Wirkung des Hydrazins auf Lösungen von Oxy- und Methämoglobin jedenfalls zum Teil in einer Reduktion besteht, ist sicher; daneben setzen aber sofort noch andere Veränderungen ein.

Diese weitergehenden Veränderungen habe ich zunächst nicht näher untersucht; zur Prüfung der in der Einleitung angeführten Angaben habe ich nur folgenden Versuch ausgeführt.

Zu 10 ccm Oxyhämoglobinlösung (1 ccm enthält 0,00149 g) fügte ich 0,1 ccm Hydrazinhydratlösung entsprechend 0,037 g Hydrat; die Lösung blieb in einer Reagieröhre ruhig stehen; die beobachteten Veränderungen sind in der folgenden Tabelle 5 aufgeführt.

Zum Vergleich wurden 10 ccm Häminlösung (0,0006 g, entsprechend 0,0149 g Hämoglobin, in Soda gelöst) ebenfalls mit 0,1 ccm Hydrazinhydratlösung versetzt und ebenfalls stehen gelassen; das Ergebnis findet sich in Tabelle 5.

Tabelle 5.

	Zeit	Farbe	Quotient ¹⁾
Oxyhämoglobin	sofort	kirschrot	0,80
	1 Stunde	violett	0,85
	14 Stunden	grünlichgelb	1,17
Hämin	sofort	kirschrot	0,51
	1 Stunde		—
	14 Stunden		0,59

Die grünlichgelbe, aus Oxyhämoglobin erhaltene Lösung

¹⁾ Bezüglich der Bestimmung des Quotienten siehe die Bemerkung 6 auf S. 179.

enthält nicht etwa Hämatin — denn ein weiterer Zusatz von Hydrazin verändert an dem Aussehen der Lösung nichts mehr.

Der Versuch zeigt, daß man, entgegen der Angabe von Hüfner,¹⁾ aus Hämoglobin reines Hämochromogen, wie man es — ausgehend von Hämin in alkalischer Lösung — gewinnen kann, nicht erhält. Dies liegt sicher nicht daran, daß der Versuch im offenen Reagenzglas ausgeführt wurde; denn wenn dieser Umstand von Einfluß gewesen wäre, so hätte die ganz gleich behandelte Häminlösung auch kein Hämochromogen liefern können.

Erwähnt sei noch, daß auch die aus Hämin erhaltene Hämochromogenlösung beim Stehen an der Luft — aber erst innerhalb 10—12 Tagen — (ob im Licht oder im Dunkeln scheint gleichgültig) allmählich die kirschrote Farbe verliert und eine bräunliche Färbung annimmt, die durch Zusatz von neuem Hydrazin nicht mehr verändert wird.

Diese Verschiedenheit in dem Verhalten von Hämoglobinlösungen und Häminlösungen gegen Hydrazin läßt mich vermuten, daß es bei eingehenderen Untersuchungen unter Benützung dieser Beobachtung gelingen könnte, Aufschluß über die Bindung von Globin und Fe-haltiger Komponente im Hämoglobin zu erhalten. —

Die Bedeutung der Tatsache, daß das Hämoglobinmolekül durch Hydrazin angegriffen und tiefergehend verändert wird, liegt darin, daß, wie eingangs erwähnt, mit Hydrazin «reduzierte» Hämoglobinlösungen zur Bestimmung der Größe des Gasbindungsvermögens des Blutfarbstoffs auf absorptiometrischem Wege Verwendung gefunden haben. Inwieweit die für diese Größe von Hüfner gefundene Zahl — 1,34 ccm Gas (O₂, CO) pro 1 g Hämoglobin — durch die Verwendung von Hydrazin beeinflusst wird,²⁾ darüber möchte ich ein abschließendes Urteil heute noch nicht abgeben. Immerhin mögen vorläufig folgende Beobachtungen angeführt sein.

Bei Absorptionsversuchen nach der von Hüfner ange-

¹⁾ Arch. f. Anat. u. Phys., 1899, S. 499.

²⁾ Hüfner selbst hat, darauf sei nur kurz hingewiesen, vor der Verwendung von Hydrazin durchweg höhere Zahlen erhalten.

gegebenen Anordnung²⁾ erhielt ich in einer Reihe von Bestimmungen, bei denen Hydrazin als Reduktionsmittel gedient hatte, folgende Werte für die pro 1 g gebundene Kohlenoxydgasmenge in ccm:

1,26; 1,06; 1,13; 1,27.

Als ich die Reduktion ohne Hydrazinzusatz einfach durch etwa 4stündiges Auspumpen mit einer sehr kräftig wirkenden Körtingschen Pumpe ausführte, erhielt ich die folgenden Zahlen:

1,49; 1,54; 1,45; 1,57.

Eine Undichtigkeit des Absorptiometers würde eine Vergrößerung der aufgenommenen Gasmenge vortäuschen; eine solche ist bei der Zahl 1,54 nicht mit Sicherheit auszuschließen, bestimmt aber bei den drei andern Zahlen; denn ich habe in diesen Fällen den Apparat jedesmal vor und nach dem Versuch auf Dichtigkeit geprüft und dicht befunden.

Man könnte weiter noch einwenden, daß Unterschiede in der Konzentration der Hämoglobinlösungen, Unterschiede in der Temperatur und im Druck, bei dem der Absorptionsversuch vorgenommen wurde, von Einfluß auf den Ausfall der beiden Reihen gewesen seien.

Bezüglich der Temperatur sei bemerkt, daß alle Versuche, mit Ausnahme desjenigen, der die Zahl 1,06 ergab und bei 5° ausgeführt wurde, bei Temperaturen ausgeführt worden sind, die, wenn überhaupt, nur wenige Zehntelgrade von 15° differierten.

Daß die Konzentration der Hämoglobinlösung einen sicher feststellbaren Einfluß nicht ausübt, das zeigen meines Erachtens die unter 2 und 3 der untenstehenden Tabelle 6 aufgeführten Versuche.

Tabelle 6.

	ccm CO pro 1 g Hb	Druck	Temperatur	g Hb in 100 ccm	Bemerkungen
1	1,57	774,3	15,4°	1,37	ohne Hydrazin
2	1,13	686,9	15,7°	1,50	mit . . .
3	1,27	691,0	15,9°	11,51	. . .
4	1,06	701,1	4,9°	1,33	. . .

²⁾ Arch. f. Anat. u. Phys. (Physiol. Teil), 1894, S. 155 ff.

Die Resultate dieser beiden Versuche weichen allerdings erheblich voneinander ab; immerhin ist die Differenz entfernt nicht so groß wie diejenige zwischen den Versuchen 1 und 2, die hinsichtlich Konzentration und Temperatur sich ohne weiteres vergleichen lassen (bezüglich des Druckes sei auf das Folgende verwiesen).

Ein Teil der Differenz ist sicher auf folgenden Umstand zurückzuführen.

Die von einer Hämoglobinlösung aufgenommene Gasmenge setzt sich bekanntlich aus 2 Teilen zusammen: der eine Teil wird dem Henryschen Gesetz entsprechend von der Lösung physikalisch absorbiert, der andere wird chemisch gebunden.¹⁾ Einer direkten Bestimmung ist nur die Summe dieser beiden Teile zugänglich und eine Feststellung der von 1 g Hämoglobin chemisch gebundenen Gasmenge kann deshalb nur unter Zugrundelegung mehr oder weniger willkürlicher Annahmen über die Größe des physikalisch absorbierten Teils geschehen.

Die für meine Versuche verwendeten Hämoglobinlösungen enthielten rund 0,9% NaCl. Nach vorläufigen Versuchen ist der Absorptionskoeffizient einer 0,9%igen NaCl-Lösung für Kohlenoxyd bei 15,3° $\alpha_{15,3} = 0,023$ und diese Zahl ist der Berechnung der Versuche mit etwa 1,5—2% Hämoglobin zugrunde gelegt. Bei Versuch 3 wurde der höheren Hämoglobinkonzentration wegen statt 0,023 die Zahl 0,020 und bei 4 wegen der um 10° niedrigeren Temperatur die Zahl 0,025 eingesetzt.

Noch ein Wort über den Einfluß des Druckes. Die beiden unter 1 und 2 der Tabelle 6 aufgeführten Versuche sind trotz der etwa 90 mm betragenden Druckdifferenz sehr wohl vergleichbar. Kohlenoxydhämoglobin ist bekanntlich eine ziemlich feste Verbindung, deren Bestand von dem über der Lösung herrschenden Kohlenoxyddruck nur wenig abhängig ist, wenn nur dafür gesorgt ist, daß überhaupt Kohlenoxyd in der Atmosphäre über der Lösung sich findet, wie die einer Arbeit von Hüfner²⁾ entnommene Tabelle zeigt:

¹⁾ Auch dieser Teil ist abhängig von dem Partiardruck, unter dem das mit Hämoglobin reagierende Gas über der Lösung steht.

²⁾ Arch. f. Anat. u. Phys. (Physiol. Abt.). 1895, S. 222.

p_c mm	x	100—x
0,5	12,9	87,1
1,0	6,9	93,1
2,5	2,9	97,1
5,0	1,4	98,6
10,0	0,7	99,3
30,0	0,2	99,8
50,0	0,15	99,85
100,0	0,07	99,93

In dieser Tabelle bedeutet p_c den Druck des CO-Gases in der Atmosphäre über der Lösung, x die Prozente Hämoglobin, 100—x die Prozente Kohlenoxydhämoglobin. Aus der Tabelle ergibt sich, daß bei Drucken, unter denen ich meine Versuche anstellte, eine selbst recht große Differenz in den Drucken zweier Versuche von nachweisbarem Einfluß auf die chemisch gebundenen Kohlenoxydmengen nicht sein kann. Die Differenz in den Resultaten der Versuche 1 und 2 (Tabelle 6) und der auf Seite 189 aufgeführten beiden Reihen ist somit zweifellos auf die Wirkung des Hydrazins zurückzuführen.

Sobald die Jahreszeit es gestattet, denke ich auf die Absorptionsversuche wieder zurückzukommen und werde zunächst versuchen, die Frage nach der Größe der von Hämoglobinlösungen verschiedener Konzentration physikalisch absorbierten Gasmengen auf eine sichere Basis zu stellen. Erst wenn diese Aufgabe befriedigend gelöst ist, kann die Frage nach der Größe der von 1 g Hämoglobin chemisch gebundenen Gasmenge definitiv gelöst werden.

Tübingen, Anfang Juni 1910.