

# Beiträge zur Kenntnis des Methämoglobins.

Von

B. v. Reinbold.

---

Mit einer Abbildung im Text.

---

Aus dem physiologisch-chemischen Institut der Universität Kolozsvár.  
(Der Redaktion zugegangen am 26. April 1913.)

---

## Theoretischer Teil.

Unsere Kenntnisse über das Methämoglobin reichen zurzeit nicht hin, um auf Grund derselben eine chemische Erklärung des gewaltigen Unterschiedes im physiologischen Verhalten desselben dem Oxyhämoglobin gegenüber geben zu können. Ganz abgesehen davon, daß die chemische Konstitution des ersteren Körpers ebensowenig erforscht ist, wie die des letzteren, ist auch das Verhältnis beider noch nicht vollkommen aufgeklärt. Der Unterschied in der Konstitution beider Körper dürfte jedoch nicht sehr tiefgreifend sein, da sich bekanntlich aus dem Oxyhämoglobin sehr leicht Methämoglobin bildet und dieses sich durch milde Reduktion und darauf folgendes Einwirken von molekularem Sauerstoff über reduziertem Hämoglobin leicht in Oxyhämoglobin verwandeln läßt. Bei diesen, einander nahestehenden Körpern, welche sich physiologisch in ihrem Verhalten dem Sauerstoff gegenüber unterscheiden, ist die Annahme berechtigt, daß der chemische Unterschied sich nur auf die Oxydationsstufe desselben Kernes, eventuell auf die Art der Bindung des Sauerstoffes erstreckt.

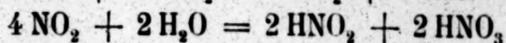
F. Hoppe-Seyler,<sup>1)</sup> der Entdecker des Methämoglobins, nahm auf Grund gewisser Erscheinungen an, daß das Methämoglobin eine niedrigere Oxydationsstufe desselben Radikals darstellt, als das Oxyhämoglobin. Jäderholm<sup>2)</sup> war dagegen

---

<sup>1)</sup> F. Hoppe-Seyler, Centralbl. f. d. med. Wissensch., 1864, Nr. 53. Diese Zeitschrift, Bd. 2, S. 149, 1878; Bd. 6, S. 166, 1882.

<sup>2)</sup> A. Jäderholm, Zeitschr. f. Biol., Bd. 13, S. 193, 1877; Bd 16, S. 1, 1880.

der Meinung, daß das Methämoglobin ein höheres Oxydationsprodukt des Oxyhämoglobins wäre. Die meisten Autoren aber schlossen sich auf Grund von anscheinend überzeugenden Versuchen von Hüfner und Külz<sup>1)</sup> an die Meinung dieser Autoren, daß das Methämoglobin weder mehr, noch weniger, sondern ebensoviel Sauerstoff enthält oder, genauer ausgedrückt, dieselbe Oxydationsstufe desselben Radikals darstellt, als das Oxyhämoglobin. Der Befund, auf welchen sich diese Auffassung stützte, war, daß bei der Einwirkung von Stickoxyd auf eine Lösung von Oxyhämoglobin in Gegenwart von Harnstoff ebensoviel freier Stickstoff entsteht, als bei der Einwirkung desselben Gases auf dieselbe Menge Methämoglobin unter sonst gleichen Bedingungen. Hüfner und Külz gaben diesem Vorgange durch die hypothetischen Gleichungen

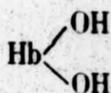


Ausdruck und nahmen dabei an, daß  $\text{HbO}_2$  sowohl Oxyhämoglobin, wie auch Methämoglobin bedeuten kann.

Dieser Auffassung schloß sich unter anderen auch Haldane<sup>2)</sup> an, indem er das Methämoglobin dem Oxyhämoglobin völlig isomer erachtete und diese Hypothese mit der Formel



ausdrückte. R. v. Zeynek<sup>3)</sup> zog die Beobachtung in Erwägung, daß das Methämoglobin sich verdünnten Säuren und Alkalien gegenüber wie ein Indikator verhält, und nahm daher die Anwesenheit von Hydroxylgruppen an der Stelle des lockeren Sauerstoffes des Oxyhämoglobins an. Die von ihm aufgestellte hypothetische Formel



gibt wohl der Auffassung Ausdruck, daß sämtliche Sauerstoffatome des Oxyhämoglobins im Methämoglobin enthalten seien,

<sup>1)</sup> G. Hüfner u. R. Külz, Diese Zeitschrift, Bd. 7, S. 366 (1883).

<sup>2)</sup> Haldane, Journ. of Physiology, Bd. 22, S. 301 (1898).

<sup>3)</sup> R. v. Zeynek, Arch. f. (Anat. u.) Physiol., 1899, S. 460.

sie ist jedoch mit den soeben erwähnten Beobachtungen von Hüfner und Külz nicht in Einklang zu setzen, weil sie eine niedrigere Oxydationsstufe des Radikals Hb ausdrückt, als die für das Oxyhämoglobin festgestellte Formel



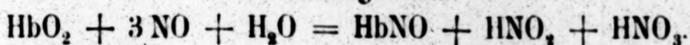
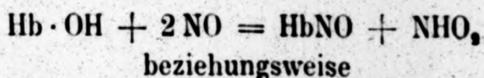
Im Laufe der späteren Untersuchungen sind verschiedene Tatsachen bekannt geworden, welche entgegen der Auffassung von Hüfner und Külz zu beweisen schienen, daß das Methämoglobin nicht nur einer niedrigeren Oxydationsstufe des Radikals Hb entspräche, sondern auch die Zahl der mit dem Radikal Hb verbundenen Sauerstoffatome geringer wäre, als bei dem Oxyhämoglobin. Bei der Behandlung des Methämoglobins mit Blausäure fand v. Zeynek,<sup>1)</sup> daß eine Molekel des Methämoglobins sich mit einer CN-Gruppe zu Cyanhämoglobin verbindet. Dieser Befund wäre am einfachsten im Sinne der Gleichung



mit der Annahme zu erklären, daß die Stelle des lockeren Sauerstoffs des Oxyhämoglobins im Methämoglobin durch eine OH-Gruppe eingenommen wird. Dieser wichtige Befund ließ sich jedoch nicht als vollgültiger Beweis in diesem Sinne verwerten, weil einerseits die Reaktion zwischen Methämoglobin und Cyanwasserstoff auch andere Deutungen zuließ, andererseits aber lieferte das Oxyhämoglobin, welches unzweifelhaft zwei lockere Sauerstoffatome enthält, dasselbe Cyanhämoglobin, wie das Methämoglobin. Der Widerspruch zwischen Zeyneks erwähntem Befunde und der Hüfner-Külzschen Auffassung blieb zunächst unaufgeklärt. Erst unlängst wies Küster<sup>2)</sup> darauf hin, daß die Beweisführung von Hüfner und Külz nicht zwingend ist. Gibt man nämlich dem Methämoglobin die Formel  $\text{Hb} \cdot \text{OH}$  und dem Oxyhämoglobin die Formel  $\text{HbO}_2$ , so wird man sich die Reaktion beider Körper mit Stickoxyd folgendes vorstellen können.

<sup>1)</sup> R. v. Zeynek, Diese Zeitschrift, Bd. 33, S. 426 (1901).

<sup>2)</sup> W. Küster, Diese Zeitschrift, Bd. 66, S. 165 (1910).



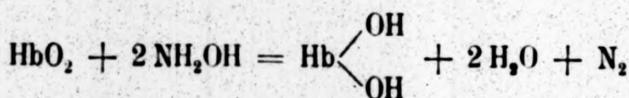
Es ist zu ersehen, daß eine Molekel des Farbstoffes in beiden Fällen die Bildung von einer Molekel salpetriger Säure veranlaßt, welche ihrerseits aus dem der Farbstofflösung zugesetzten Harnstoffe dieselbe Menge Stickstoff befreien würde.

Der Stickoxydverbrauch bei der Bildung von Stickoxydhämoglobin bei direkter Einwirkung von Stickoxyd auf Methämoglobin wurde von Hüfner und Reinbold<sup>1)</sup> auf absorptometrischen Wege bestimmt. Es wurde festgestellt, daß bei der Reaktion durch eine Molekel Methämoglobin zwei Molekeln des Stickoxyds verbraucht werden. Dieser Befund verleiht in Gemeinschaft mit der Tatsache, daß bei der Einwirkung von Methämoglobin auf Stickoxyd salpetrige Säure gebildet wird, der Auffassung Küsters über die Konstitution des Methämoglobins und seiner obigen Gleichung eine ziemlich feste Basis. Die Bestimmung der Menge der salpetrigen Säure im Verhältnis zum angewandten Methämoglobin steht allerdings noch aus.

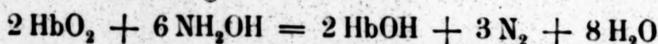
Es fehlt uns aber nicht an neueren Beobachtungen, welche gegen Küsters Auffassung und für die ursprüngliche Zeyneksche Formel mit zwei OH-Gruppen zu sprechen scheinen. Vor kurzem hat Letsche<sup>2)</sup> die Umwandlung des Oxyhämoglobins in Methämoglobin durch Hydroxylamin verfolgt. Seine Versuche erbrachten den direkten Beweis dafür, daß das Methämoglobin einer niedrigeren Oxydationsstufe des Radikals Hb entspricht als das Oxyhämoglobin. Bei der Reaktion wird nämlich Stickstoff und kein Sauerstoff frei, als Beweis dafür, daß das Hydroxylamin bei der Reaktion reduzierend wirkt. Bei der Prüfung der stöchiometrischen Verhältnisse der Reaktion fand Letsche, daß zur Umwandlung einer Molekel des Oxyhämoglobins zwei Molekeln des Hydroxylamins nötig waren. Dieser Befund spricht im Sinne der Gleichung:

<sup>1)</sup> G. Hüfner u. B. Reinbold, Arch. f. (Anat. u.) Physiologie, 1904, Suppl. 391.

<sup>2)</sup> E. Letsche, Diese Zeitschrift, Bd. 80, S. 412, 1912.

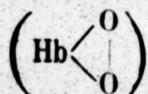


für die Methämoglobinformel  $\text{Hb} \begin{array}{l} \text{OH} \\ \text{OH} \end{array}$  (resp.  $\text{Hb}=\text{O}$ ), da sonst im Sinne der Gleichung

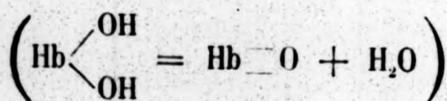


3 Molekel Hydroxylamin mit einer Molekel des Oxyhämoglobins reagieren müßten. Die Versuche, diesen Befund durch die Bestimmung des befreiten Stickstoffs zu bestätigen, schlugen fehl, indem sie zu schwankenden Resultaten führten.

Soviel kann jedenfalls als sichergestellt betrachtet werden, daß das Methämoglobin den Grad der Oxydation des Kernes Hb betreffend eine Mittelstellung zwischen dem Oxyhämoglobin



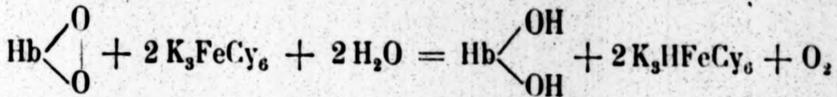
und dem reduzierten Hämoglobin (Hb) einnimmt. Es ist jedoch noch zu entscheiden, ob ihm die Formel von Zeynek



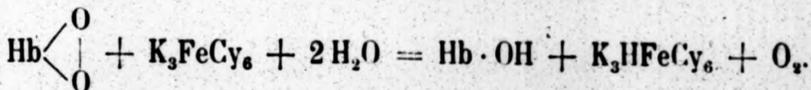
oder die von Küster ( $\text{Hb}-\text{OH}$ ) zuzuschreiben ist.

Um weitere Angaben zur Entscheidung der geschilderten Frage zu gewinnen, hielt ich die quantitative Verfolgung der Reaktion zwischen Oxyhämoglobin und Ferricyankali für geeignet. Über diese Reaktion war bisher soviel bekannt, daß das Oxyhämoglobin durch einen Überschuß von Ferricyankali völlig in Methämoglobin umgewandelt wird und daß bei dieser Reaktion eine dem «lockeren» Sauerstoff des Oxyhämoglobins entsprechende Menge Sauerstoff befreit wird. Das Ferricyankali wird im Laufe der Reaktion zu einem Ferrocyanid reduziert, seine Wirkung ist demnach eine oxydierende. Der Umstand, daß aus Kohlenoxydhämoglobin unter sonst gleichen Verhältnissen CO befreit wird, beweist, daß der befreite Sauerstoff dem «lockeren» Sauerstoff des Oxyhämoglobins nicht nur in seiner Menge gleich ist, sondern daß die lockeren Sauerstoffatome selbst im entweichenden Gase erscheinen. Demnach ist die Annahme berechtigt, daß die Reaktion in zwei Phasen

verläuft. In der ersten Phase wird das Oxyhämoglobin durch Vertreibung des «lockeren» Sauerstoffs in «reduziertes» Hämoglobin umgewandelt, in der zweiten wird dieses durch das Ferricyanid zu Methämoglobin oxydiert.<sup>1)</sup> Die stöchiometrischen Verhältnisse der Reaktion sind im übrigen nicht festgestellt. v. Zeynek<sup>2)</sup> nahm an, daß die Reaktion den Verlauf



hätte. Dieser Annahme liegt die Vorstellung zugrunde, daß das Methämoglobin zwei OH-Gruppen an der Stelle des «lockeren» Sauerstoffs des Oxyhämoglobins enthielte. Nimmt man dagegen Küsters<sup>3)</sup> Formel an, so wird die Gleichung sich folgendermaßen gestalten:



Aus dem Vergleiche beider Gleichungen ist zu ersehen, daß man aus der Bestimmung der an der Reaktion beteiligten Menge des Ferricyanids Schlüsse auf die Konstitution des Methämoglobins gewinnen kann.<sup>4)</sup>

Die im experimentellen Teil dieser Arbeit ausführlich zu beschreibenden spektrophotometrischen und gasometrischen Versuche führten zum Resultate, daß die Reaktion zwischen Oxyhämoglobin und Ferricyankali streng stöchiometrisch verläuft, und daß zur Umwandlung einer Molekel des Oxyhämoglobins beziehungsweise zur Vertreibung einer Molekel des Sauerstoffs aus dem Oxyhämoglobin eine Molekel  $\text{K}_3\text{FeCy}_6$  nötig ist. Dieser Befund deckt sich vollkommen mit der Küsterschen Auffassung, wonach im Methämoglobin das

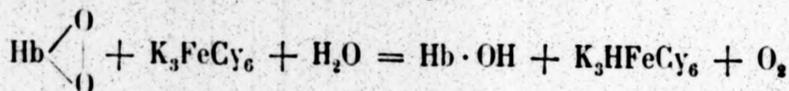
<sup>1)</sup> Bei der Bildung des Methämoglobins aus Oxyhämoglobin durch Hydroxylamin soll die Reduktion ohne Abspaltung des «lockeren» Sauerstoffs unmittelbar durch die reduzierende Wirkung des Hydroxylamins erfolgen.

<sup>2)</sup> R. v. Zeynek, Arch. (Anat. u.) Physiologie, 1899, S. 460.

<sup>3)</sup> a. a. O.

<sup>4)</sup> Die Haldanesche Auffassung: Methämoglobin =  $\text{Hb} \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array}$ , würde die Beteiligung von 4 Molekeln  $\text{K}_3\text{FeCy}_6$  an der Reaktion bei der Umwandlung einer Molekel Oxyhämoglobin in Methämoglobin erfordern.

Radikal Hb nur mit einer OH-Gruppe verbunden ist. Ich glaube dafür mit den vorliegenden Untersuchungen einen wichtigen Beweis gebracht zu haben. Ich glaube auch festgestellt zu haben, daß die Reaktion zwischen Oxyhämoglobin und Ferricyankali im Sinne der Gleichung



verläuft.

Es muß allerdings bemerkt werden, daß die Annahme der Bildung vom Ferrocyanid  $\text{K}_3\text{HFeCy}_6$  nicht auf direkten Beweisen beruht. Die Reduktion des Ferricyanids zu einem Ferrocyanid konnte ich zwar durch den Nachweis eines Ferrocyanids im Dialysat des Reaktionsgemisches stets bestätigen, eine nähere Untersuchung des gebildeten Ferrocyanids steht jedoch noch aus.

Die Frage über die Ursache des Widerspruches zwischen den Befunden von Letsche und den hier mitgeteilten muß offen gelassen werden.

Auch darf es nicht unerwähnt bleiben, daß bei der Umwandlung des Oxyhämoglobins,



in Methämoglobin, welchem also die Formel  $\text{Hb} - \text{OH}$  zugeschrieben werden darf, das zweiwertige Radikal Hb eine seiner Valenzen einbüßt, oder in irgend einer durch die Formel nicht veranschaulichten Weise verwendet.

Die Annahme von Küster,<sup>1)</sup> daß das Eisen des Radikals Hb im «reduzierten» Hämoglobin mit zwei Valenzen, als Ferro-, im Methämoglobin mit drei Valenzen, als Ferriatom vorhanden wäre, im Oxyhämoglobin aber außer diesen noch eine Nebenvalenz erhielte, welche bei der Umwandlung in Methämoglobin verschwindet oder ungesättigt bleibt, mag eine Erklärung dieser Verhältnisse bringen. Diese Auffassung Küsters blieb jedoch nicht unangefochten und bedarf noch weiterer Beweise. Allerdings muß man vorläufig auch der nächstliegenden Möglichkeit, daß nämlich die freigewordenen Valenzen des Radikals Hb sich

<sup>1)</sup> a. a. O.

gegenseitig sättigen, Aufmerksamkeit schenken. In diesem Falle müßte das Methämoglobin die doppelte Molekulargröße des Oxyhämoglobins besitzen. Es ist nicht ohne Interesse hier zu erwähnen, daß Piloty und Funk<sup>1)</sup> dem Hämin das doppelte Molekulargewicht des geringsten Wertes zuschreiben und daraus ein doppeltes Molekulargewicht (ca. 30000) für das Oxyhämoglobin berechnen. Im Sinne der Auffassung von Küster,<sup>2)</sup> wonach das Hämatin (somit auch das Hämin) als eine zum Methämoglobin und nicht zum Oxyhämoglobin gehörende Verbindung zu betrachten ist, wäre diese Berechnung des Molekulargewichtes nur auf das Methämoglobin zu beziehen. Zur Entscheidung der Frage wäre die von Hüfner und Gansser<sup>3)</sup> zur Bestimmung der Molekulargröße des Oxyhämoglobins mit völligem Erfolg gebrauchte osmometrische Methode geeignet. Derartige Versuche sind bereits im Gange.

#### Experimenteller Teil.

Nach dem im vorgehenden Teile dieser Arbeit Gesagten hatte das Experiment zu beweisen, ob bei der Reaktion zwischen Oxyhämoglobin und Ferricyankali zur Umwandlung einer Molekel des ersteren eine oder zwei Molekel des letzteren nötig sind. Ich war bestrebt, die durch eine bestimmte Menge Ferricyankali verursachte Umwandlung des in Überschuß vorhandenen Blutfarbstoffs erstens unmittelbar auf spektrophotometrischem Wege, dann aber auch indirekt auf gasometrischem Wege, durch die Messung des freigewordenen Sauerstoffs, zu bestimmen. Beide Versuchsreihen führten zu brauchbaren und übereinstimmenden Resultaten. Es wurde auch ein dritter Weg eingeschlagen, nämlich die Bestimmung des aus einem Überschuß des Ferricyankalis durch eine bestimmte Menge des Oxyhämoglobins entstehenden Ferrocyanids. Bei einigen Vorversuchen ließ sich jedoch die Isolierung der Salze vom Blutfarbstoff weder durch

<sup>1)</sup> O. Piloty u. H. Funk, Berichte der deutschen chem. Gesellschaft, Bd. 45, S. 2495 (1912).

<sup>2)</sup> W. Küster, Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft, Bd. 43, S. 370 (1910).

<sup>3)</sup> G. Hüfner u. E. Gansser, Arch. f. (Anat. u.) Physiologie, 1907, S. 209.

Dialyse, noch durch Ultrafiltration mit der erforderlichen Genauigkeit ausführen, so daß ich von der weiteren Verfolgung dieser Richtung Abstand nehmen mußte.

### I. Versuche mit Hüfners Spektrophotometer.

Prinzip. Wird eine wässrige oder schwach alkalische Lösung von Oxyhämoglobin mit einer zur völligen Umwandlung desselben in Methämoglobin unzureichenden Menge Ferricyankali behandelt, so werden im resultierenden Reaktionsgemische beide Farbstoffe nebeneinander vorhanden sein. Da wir in der Spektrophotometrie der Blutfarbstoffe eine Methode besitzen, welche die quantitative Bestimmung des Methämoglobins bei gleichzeitig in der Lösung vorhandenem Oxyhämoglobin, sowie auch die Bestimmung des letzteren in Gegenwart von Methämoglobin zuläßt, so kann durch die Spektrophotometrie der ursprünglichen Farbstofflösung und des Reaktionsgemisches der Grad der Umwandlung des Blutfarbstoffs bestimmt und dann mit der Menge des zugesetzten Ferricyankalis verglichen werden.

Bestimmung des Absorptionsverhältnisses. Das Wesen der quantitativen spektrophotometrischen Analyse wird bekanntlich durch die Gleichung

$$c = A\epsilon$$

ausgedrückt, in welcher  $c$  die in einem Kubikzentimeter der Lösung vorhandenen Gramme des Farbstoffes,  $\epsilon$  die an einer bestimmten Stelle des Spektrums bestimmte Extinktion und  $A$  eine Konstante, das sogenannte Absorptionsverhältnis, bedeutet. Diese Konstante, welche von der Konzentration der geprüften Lösung bis zu einem gewissen Grade unabhängig ist, aber von der Art des Farbstoffes und von der Wellenlänge abhängt, wurde von Hüfner und seinen Schülern für die verschiedenen Blutfarbstoffe und für die Spektralregionen  $\lambda = 554\text{--}565$  und  $\lambda = 531,5\text{--}542,2 \mu\mu$  bestimmt.

Da jedoch Butterfield<sup>1)</sup> vor einigen Jahren darauf hingewiesen hat, daß die Konstante  $A$  sich auch je nach dem Apparate und dessen Einstellung ändert, hielt ich es für unerläßlich, den Wert für  $A$  mit dem Apparate des physiologischen

<sup>1)</sup> E. E. Butterfield, Diese Zeitschrift, Bd. 62, S. 173 (1909).

Instituts der Universität Kolozsvár, welcher mir zur Verfügung stand, selbst zu bestimmen.

Zu diesem Zwecke habe ich aus frischen Pferdeblutkörperchen nach dem Hüfnerschen Verfahren<sup>1)</sup> krystallinisches Oxyhämoglobin dargestellt und dasselbe aus gekochtem Wasser unter Anwendung von Alkohol dreimal umkrystallisiert. Zur Bestimmung des Absorptionsverhältnisses wurde je ein entsprechender Teil des Krystallbreies aus der zweiten und dritten Krystallisation, ohne die Mutterlauge vorher genau zu entfernen, in einem vorher gewogenen Trockengefäße, mit möglichst wenig Wasser gemischt, gewogen, auf das sorgfältigste verrührt und je zwei aliquote Teile davon mit allen nötigen Kautelen, um die gleichmäßige Zusammensetzung des Breies nicht zu ändern, entnommen. Die entnommenen Teile, deren Gewicht durch Zurückwägen des Restes bestimmt wurde, löste ich sofort in 15—20 ccm fassenden Maßkolben in 0,1%iger Sodalösung, füllte bis zur Marke auf und machte aus dieser Stammlösung die zur spektrophotometrischen Bestimmung nötigen Verdünnungen. Diese wurden möglichst sofort der spektrophotometrischen Prüfung unterzogen, inzwischen aber in Eiswasser aufbewahrt.

Der im Trockengefäß verbliebene Rest des Krystallbreies wurde in trockenem H<sub>2</sub>-Strome zunächst bei niedriger Temperatur, schließlich bei der Temperatur des siedenden Toluols bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Um mich zu überzeugen, ob die zwei- bis dreimalige Umkrystallisierung des Präparates genügend reines Oxyhämoglobin lieferte, und daß das Gewicht des Trockenrückstandes mit Recht dem des im Krystallbrei vorhandenen Oxyhämoglobins gleichgestellt werden kann, bestimmte ich in zwei Fällen den Eisengehalt der aus den zweimal respektive dreimal umkrystallisierten Präparaten gewonnenen Trockenrückstände nach Neumann. Dieser wurde beim zweimal umkrystallisierten Präparate 0,339%, beim dreimal umkrystallisierten Präparate 0,331%, im Mittel 0,335% gefunden. Ich war demnach berechtigt, das Gewicht des

<sup>1)</sup> K. Bürker, Tigerstedts Handbuch der physiolog. Methodik, Leipzig, 1910, Bd. 2, S. 93.

Trockenrückstandes für den Oxyhämoglobingehalt des Breies einzusetzen und daraus den Wert für  $c$  Oxyhämoglobingehalt eines Kubikzentimeters der spektrophotometrisch geprüften verdünnten Lösung zu berechnen.

Die spektrophotometrische Prüfung dieser verdünnten Lösungen in den beiden Hüfnerschen Spektralregionen lieferte die noch nötigen Werte von  $\epsilon$  und  $\epsilon'$ , um aus den Gleichungen

$$\frac{c}{\epsilon} = A \text{ und } \frac{c}{\epsilon'} = A'.$$

das Absorptionsverhältnis des Oxyhämoglobins für beide Regionen zu erkennen.

Zur Bestimmung dieser Werte stellte ich zweimal aus frischen Pferdeblutkörperchen frische Oxyhämoglobinkristalle dar (Darstellung A und B), diese wurden dreimal umkrystallisiert und je ein Teil des zweimal umkrystallisierten Farbstoffes (I) und des dreimal umkrystallisierten Farbstoffes (II) auf die soeben geschilderte Weise aufgearbeitet. Aus dem Krystallbrei wurden jedesmal aliquote Teile (1—2)<sup>1)</sup> entnommen und gelöst, schließlich aus jeder dieser Lösungen je zwei Verdünnungen (a—b) zur spektrophotometrischen Untersuchung bereitet. Die Extinktion wurde in jedem Falle in beiden Hüfnerschen Regionen durch je 10 Ablesungen am Spektrophotometer (5 links, 5 rechts) bestimmt.

Die Zahlen dieser Versuchsreihe sind aus der folgenden Tabelle zu ersehen.

Die Zahlen dieser Tabelle konnten nicht alle verwertet werden. Durch die zahlreichen Bestimmungen von Hüfner und seiner Schule wurde das Extinktionsverhältnis des Oxyhämoglobins  $\left(\frac{\epsilon'}{\epsilon}\right)$  zu 1,578 festgestellt. Bedeutende Abweichungen von dieser Zahl weisen stets auf eine Verunreinigung des Oxyhämoglobins oder auf Versuchsfehler hin. Aus den Angaben der obigen Tabelle sind demnach diejenigen, bei welchen diese

<sup>1)</sup> Der eine der aus dem dreimal umkrystallisierten Krystallbrei der ersten Darstellung entnommenen Teile ging verloren, aus dem parallel entnommenen zweiten Teile wurde nur eine Verdünnung bereitet.

Einstellung des Spektrophotometers: Kollimatorschlitz 0,02 mm. Rauchglas völlig auf die Seite geschoben. I. Spektralregion  $\lambda$  553,0—565,0  $\mu$ . II. Spektralregion  $\lambda = 532,0 - 542,5 \mu$ .<sup>1)</sup>

	Kr	Tr	s	g	n	v	$\epsilon$	$\epsilon'$	$\frac{\epsilon'}{\epsilon}$	$A_0$	$A'_0$
A. I. 1a)	10,1936	2,1138	0,6641	0,1374	7/1	20	0,466	0,730	1,567	0,002111	0,001347
b)	—	—	—	—	6,5/1	—	(0,486)	(0,754)	(1,551)	(0,002179)	(0,001405)
2a)	—	—	0,8612	0,1782	8/1	20	(0,544)	(0,865)	(1,665)	(0,002052)	(0,001290)
b)	—	—	—	—	8,5/1	—	(0,505)	(0,813)	(1,686)	(0,002080)	(0,001292)
II. 2a)	10,8111	2,0336	0,7804	0,1468	6/1	20	0,593	0,935	1,577	0,002063	0,001308
B. I. 1a)	3,3430	1,1030	0,2591	0,0857	6/1	15	0,440	0,707	1,570	0,002158	0,001343
		Fe-Gehalt									
b)	—	—	—	—	5/1	—	0,530	0,827	1,560	0,002150	0,001378
2a)	—	—	0,1410	0,0465	4/2	20	0,554	0,875	1,579	0,002099	0,001329
b)	—	—	—	—	3,5/2	—	(0,665)	(1,027)	(1,544)	(0,001995)	(0,001294)
II. 1a)	16,9498	2,8346	1,3346	0,2232	11/1	15	0,636	1,003	1,577	0,002127	0,001349
		Fe-Gehalt									
b)	—	—	—	—	10/1	—	(0,707)	(1,130)	(1,598)	(0,002105)	(0,001317)
2a)	—	—	1,9934	0,3334	11/1	20	0,748	1,192	1,594	0,002026	0,001271
b)	—	—	—	—	12/1	—	0,687	1,086	1,581	0,002022	0,001282

Erklärung: Kr = Gewicht des zur Bestimmung des Trockenrückstandes bestimmten Kristallbreies.  
 Tr = Trockengewicht von Kr.  
 s = Gewicht des zur spektrophotometrischen Prüfung bestimmten Kristallbreies.  
 $g = \frac{s \times Tr}{Kr}$   
 v = Volumen der Lösung vom s.  
 n = Verdünnung der Lösung v zur spektrophotometrischen Prüfung.  
 $\epsilon =$  Beobachteter Extinktionskoeffizient in der I. Hüfnerschen Spektralgegend.  
 $\epsilon' =$  Beobachteter Extinktionskoeffizient in der II. Hüfnerschen Spektralgegend.  
 $A_0 =$  Absorptionsverhältnis für Oxyhämoglobin in der ersten Spektralgegend  $= \frac{g}{nve} = \frac{Kr \times n \times v \times \epsilon}{s \times Tr}$   
 $A'_0 =$  dasselbe in der zweiten Spektralgegend  $= \frac{g}{nve'} = \frac{Kr \times n \times v \times \epsilon'}{s \times Tr}$

<sup>1)</sup> Bei allen spektrophotometrischen Bestimmungen dieser Arbeit wurde dieselbe Einstellung des Apparates beibehalten.

Zahl vom angegebenen Werte stärker abweicht, als aus irgend welchem Grunde fehlerhafte auszuschließen.

Diese eingeklammerten Zahlen der Tabelle wurden bei der Berechnung der Mittelwerte für  $A_0$  und  $A'_0$  nicht verwertet. Die verbleibenden Bestimmungen ergeben die Mittelwerte:

$$A_0 = 0,002095 \text{ und } A'_0 = 0,001326.$$

Da das Verhältnis beider Zahlen nicht genau dem von Hüfner angegebenen Extinktionsverhältnis

$$\left( \frac{A_0}{A'_0} = 1,578 \right)$$

entspricht, die Abweichung aber innerhalb der Fehlergrenzen liegt, so habe ich zur Korrektur auf Grund der Gleichung

$$\frac{A'_0}{A_0} = 1,578$$

aus dem gefundenen Werte für  $A_0$  den diesem genau entsprechenden Wert für  $A'_0$  und umgekehrt aus dem gefundenen Werte für  $A'_0$  den diesem genau entsprechenden Wert für  $A_0$  berechnet, und das Mittel der gefundenen und so berechneten Werte als die Konstanten des Apparates betrachtet.

$A_0$	$A_0$	$A'_0$
Gefunden . . . . .	0,002095	0,001326
Gegenseitig berechnet . . . . .	0,002092	0,001327
Mittelwert . . . . .	0,002094	0,001328

Diese Korrektur hielt ich um so mehr statthaft, da sich die meisten Autoren mit der Bestimmung von  $A'_0$  begnügten und aus diesem den Wert für  $A_0$  berechneten.

Aus den Gleichungen

$$\frac{A_0^H}{A_m^Z} = \frac{A_0^R}{A_m^R} \text{ und } \frac{A_m^Z}{A_m^Z} = \frac{A_m^R}{A_m^R} \quad ^1)$$

<sup>1)</sup>  $A_0^H$  = Absorptionsverhältnis des Oxyhämoglobins in der I. Region nach Hüfner.

$A_m^Z$  = Absorptionsverhältnis des Methämoglobins in der I. Region nach v. Zeynek.

$A_m^Z$  = Absorptionsverhältnis des Methämoglobins in der II. Region nach v. Zeynek.

ergaben sich für das Methämoglobin die folgenden Absorptionsverhältnisse:

$$A_m = 0,002101 \text{ (= num. } 0,32245 - 3)$$

$$A'_m = 0,001774 \text{ (= num. } 0,24904 - 3)$$

Zum Vergleich sollen die von verschiedenen Autoren für ihre Apparate bestimmten Absorptionsverhältnisse hier stehen.

	$A_o$	$A'_o$	$A_m$	$A'_m$
Hüfner resp. Zeynek	0,002070	0,001312	0,002077	0,001754
Butterfield . . . . .	0,00187	0,00118	0,001876	0,001585
Letsche . . . . .	0,002081	0,001325	—	—
Verfasser . . . . .	0,002094	0,001327	0,002101	0,001774

Orientierende Versuche über die Verlässlichkeit des geplanten Verfahrens.

Die Genauigkeit der spektrophotometrischen Bestimmung des Blutfarbstoffes in reinen Lösungen auf Grund der Gleichungen  $A_o\epsilon = c$  und  $A'_o\epsilon' = c$  wurde von verschiedenen Autoren schon öfters geprüft, sie brauchte demnach keiner weiteren Kontrolle unterzogen werden. Über die experimentelle Verwendbarkeit der von Vierordt und Hüfner empfohlenen Methode zur Bestimmung zweier Farbstoffe nebeneinander liegen jedoch in der Literatur keine genügenden Angaben vor. Es mußte demnach zuerst festgestellt werden, ob die erreichbare Genauigkeit dem vorliegenden Zwecke entspricht. Die absolute Menge des in einem Kubikzentimeter der Lösung neben Oxyhämoglobin vorhandenen Methämoglobins wird nach Vierordt<sup>1)</sup> durch die folgende Gleichung gegeben.

$$Hb_m = \frac{A'_m A'_m (\epsilon' A'_o - \epsilon A_o)}{A'_o A_m - A_o A'_m}$$

$A_o^R$  = Absorptionsverhältnis des Oxyhämoglobins in der I. Region nach Verf.

$A_m^R$  = Absorptionsverhältnis des Methämoglobins in der I. Region nach Verf.

$A'_m^R$  = Absorptionsverhältnis des Methämoglobins in der II. Region nach Verf.

<sup>1)</sup> C. Vierordt, Die Anwendung des Spektralapparates zur Photometrie der Absorptionsspektren und zur quantitativen chemischen Analyse. Tübingen 1873, S. 51 ff.

Die auf die gesamte Menge des Farbstoffes bezogene relative Menge des Methämoglobins geht aus der Dreser-Hüfnerschen Gleichung

$$X = \frac{157,8 - 100 \frac{\epsilon'}{\epsilon}}{0,393}$$

hervor. Sie ist übrigens aus einer Tabelle Hüfners<sup>1)</sup> unmittelbar abzulesen. Aus diesem relativen Werte läßt sich der absolute Wert des Oxyhämoglobins leicht berechnen.

Die Prüfung der Verwendbarkeit des Verfahrens wurde durch die spektrophotometrische Untersuchung von Blutfarbstoffgemischen bekannter Zusammensetzung ausgeführt. Solche Gemische wurden aus frischem Blute und einer Lösung von einem alten, aus Pferdeblut bereiteten Methämoglobinpräparate bereitet.

### I. Vorversuch.

Bereitung und Zusammensetzung des Gemisches

a) Verdünnte Lösung einiger Tropfen des eigenen Blutes.

$$\frac{\epsilon'}{\epsilon} = 1,582. \text{ Hb}_o^{100} \text{ (Oxyhämoglobingehalt von 100 ccm der Lösung) : } 0,1487 \text{ g.}$$

b) Methämoglobinlösung.

$$\frac{\epsilon'}{\epsilon} = 1,190. \text{ Hb}_m^{100} \text{ (Methämoglobingehalt von 100 ccm der Lösung) : } 0,1672 \text{ g.}$$

c) Gemisch.

$$\text{Aus der Lösung a) } 2 \text{ ccm} = 0,002974 \text{ g Hb}_o$$

$$\text{„ „ „ b) } 4 \text{ „} = 0,006688 \text{ „ Hb}_m$$

$$\text{Zusammen } 6 \text{ ccm} = 0,009662 \text{ g Hb}_{o+m}$$

Jedes Kubikzentimeter des Gemisches enthielt demnach 0,000496 g Hb<sub>o</sub>  
und 0,001114 „ Hb<sub>m</sub>.

$$\text{Zusammen } 0,001610 \text{ g Hb}_{o+m}$$

Spektrophotometrische Untersuchung des Gemisches.

$$\begin{aligned} \epsilon &= 0,748. & \frac{\epsilon'}{\epsilon} &= 1,324 \quad \% m \text{ (auf die Gesamtmenge des Blutfarbstoffes bezogene Menge des Methämoglobins) } = 64,65. \\ \epsilon' &= 0,999. \end{aligned}$$

<sup>1)</sup> G. Hüfner, Arch. f. (Anat. u.) Physiol., 1900, Bd. 39.

Daraus

$$C_o = 0,000554 \quad (= C_{o+m} - C_m)$$

$$C_m = 0,001012 \quad (\text{nach der Vierordtschen Formel berechnet})$$

$$C_{o+m} = 0,001566 \quad \left( = \frac{100 \times C_m}{\% m} \right)$$

Vergleichung des gefundenen Resultates mit der berechneten Zusammensetzung.

Berechnet	Gefunden	Fehler
$C_o = 0,000496$	0,000554	+ 0,000058 = + 11,69%
$C_m = 0,001114$	0,001012	- 0,000102 = - 9,15%
$C_{o+m} = 0,001610$	0,001566	- 0,000044 = - 2,73%

## II. Vorversuch.

Bereitung und Zusammensetzung des Gemisches.

### a) Frische Rinderblutlösung.

$$\frac{\epsilon'}{\epsilon} = 1,586.$$

$$C_o = 0,001348.$$

### b) Methämoglobinlösung.

$$\frac{\epsilon'}{\epsilon} = 1,181.$$

$$C_m = 0,001750.$$

### c) Gemisch.

Aus der Lösung a) 53,4 ccm = 0,07198 g Hb<sub>o</sub> (= 53,4 × 0,001348)

» » » b) 35,5 » = 0,06213 » Hb<sub>m</sub> (= 35,5 × 0,001750)

0,1 % ige Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>- » 11,1 »  
 100,0 ccm

Der Farbstoffgehalt der mit dem Spektrophotometer untersuchten Lösung war demnach der folgende:

$$C_o = 0,0007198$$

$$C_m = 0,0006213$$

$$C_{o+m} = 0,0013411.$$

Angenommen, daß die Lösung zur spektrophotometrischen Untersuchung auf das 40fache verdünnt wurde, der Farbstoffgehalt von 500 ccm der konzentrierten Lösung berechnet sich zu

$$Hb_o^{500} = 14,40 \text{ g}$$

$$Hb_m^{500} = 12,43 \text{ »}$$

$$Hb_{o+m}^{500} = 26,83 \text{ g.}$$

Angenommen ferner, daß ursprünglich die ganze Menge (26,83 g) des Blutfarbstoffs als Oxyhämoglobin vorhanden war und dieses sich durch eine bestimmte Menge von  $K_3FeCy_6$  in dem durch die obigen Zahlen ausgedrückten Grade veränderte, so kann der Unterschied zwischen der supponierten unveränderten Oxyhämoglobinlösung und dem untersuchten Gemische durch die folgenden Zahlen ausgedrückt werden

$$+ \text{Hb}_m \text{ (Zunahme an Methämoglobin)} = 12,43 \text{ g}$$

$$- \text{Hb}_o \text{ (Abnahme an Oxyhämoglobin)} = 12,43 \text{ g}$$

Sollte eine solche Umwandlung des Oxyhämoglobins in Methämoglobin durch 0,2474 g  $K_3FeCy_6$  bewirkt werden, so würde man daraus berechnen können, daß 1 Molekül d. i. 329,21 g Ferricyankali 16600 d. i. 1 Molekül Oxyhämoglobin in Methämoglobin verwandeln würde. Hätte man dagegen zur Umwandlung von 12,43 g Oxyhämoglobin 0,4948  $K_3FeCy_6$  notwendig gehabt, so würde man daraus schließen, daß 1 Molekül  $K_3FeCy_6$  nur  $\frac{1}{2}$  Molekül  $Hb_o$  in  $Hb_m$  überführen kann.

#### Spektrophotometrische Prüfung des Gemisches.

$$\begin{array}{ll} \epsilon = 0,621. & \epsilon = 1,404. \\ \epsilon' = 0,872. & \epsilon' = 1,404. \end{array} \quad \% m \text{ (aus Hüfners Tabelle)} = 44,28.$$

Daraus

$$C_o = 0,0007229 \quad \text{Hb}_o^{500} = 14,46 \text{ g}$$

$$C_m = 0,0005745 \quad \text{ferner } \text{Hb}_m^{500} = 11,49 \text{ g}$$

$$C_{o+m} = 0,0012974 \quad \text{Hb}_{o+m}^{500} = 25,95 \text{ g}$$

Nehmen wir nun wie früher an, daß das Gemisch aus 500 ccm einer reinen Lösung von 26,83 g Oxyhämoglobin durch die Einwirkung von Ferricyankali entstand, und bezeichnen wir den Unterschied der supponierten reinen Oxyhämoglobinlösung gegenüber durch

$$+ \text{Hb}_m = 11,49 \text{ g}$$

$$- \text{Hb}_o = 12,37 \text{ g}$$

Da diese 2 Ausdrücke für die Umwandlung des Oxyhämoglobins in Methämoglobin nicht völlig übereinstimmen, einander jedoch ziemlich nahe liegen, so kann ihr Mittelwert

$$\left( \frac{\text{Hb}_m^+ + \text{Hb}_o^-}{2} = 11,93 \right)$$

als Maß der Methämoglobinbildung betrachtet werden. Würde diese Umwandlung des Oxyhämoglobins auf Zusatz von 0,2474 g  $\text{K}_3\text{FeCy}_6$  erfolgen, so würde 1 Molekel dieses Körpers 0,86 Molekel  $\text{Hb}_o$  — in  $\text{Hb}_m$  umwandeln. (Oben 1,00 Mol. berechnet). Nimmt man aber an, daß zur Umwandlung 0,4958 g  $\text{K}_3\text{FeCy}_6$  nötig waren, so würde sich das Verhältnis 1 Mol. Ferricyankali: 0,43 Mol.  $\text{Hb}_o$  berechnen. (Oben 0,50 Mol. berechnet).

Die Vorversuche zeigen, daß man vom Verfahren keine absolut genauen Resultate erwarten kann. Sie ermunterten jedoch zur Ausführung der Versuche, da die erreichbare Genauigkeit zur Entscheidung der Frage, ob zur Umwandlung einer Molekel Oxyhämoglobin 1 oder 2 Molekel Ferricyankali nötig sind, genügend erschien.

### Versuche zur Feststellung der Wirkung des Ferricyankalis.

Um die Versuche möglichst einfach zu gestalten, war ich genötigt, anstatt reiner Lösungen von krystallinischem Oxyhämoglobin mit 0,1%iger Sodalösung bereitete möglichst konzentrierte Lösungen von frischem Blut zu verwenden.<sup>1)</sup> Sämtliche Versuche dieser Gruppe wurden nach demselben Schema durchgeführt. Den Gang der Versuche und die Berechnung der Resultate soll der beispielsweise hier ausführlich mitgeteilte I. Versuch bekannt machen.

#### I. Versuch.

##### Versuchsmaterial:

Mit  $1\frac{1}{2}$  Vol. 0,1%iger  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung hämolysiertes frisches Schweineblut.

<sup>1)</sup> Die Reindarstellung der nötigen größeren Menge von Oxyhämoglobin wäre in Ermangelung einer entsprechenden großen Zentrifuge nicht nur viel zu umständlich gewesen, sondern man hätte auch kaum methämoglobinfreie Präparate erhalten können.

## Erste spektrophotometrische Untersuchung.

Kollimatorschlitz 0,2 mm; Rauchglas beiseite geschoben.

a) 2,00 ccm der obigen Blutlösung wurden mit der Pipette abgemessen und in einem Meßkolben mit 0,1%iger  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung auf 100 ccm verdünnt:

$$n = \frac{100}{2}.$$

$$\epsilon = 0,609$$

$$\frac{\epsilon'}{\epsilon} = 1,634.$$

$$\epsilon' = 0,995$$

$$\text{Hb}_0^{500} \text{ (Oxyhämoglobingehalt von 500 ccm der unverdünnten Blutlösung)} \\ = \frac{(\epsilon \times A_0 \times n \times 500) + (\epsilon' \times A_0' \times n \times 500)}{2} = 32,45 \text{ g.}$$

b) 2,20 ccm derselben unverdünnten Blutlösung wurden mit der Sodalösung in einem Meßkolben auf 100,0 ccm verdünnt:

$$n = \frac{100}{2,2}.$$

$$\epsilon = 0,650$$

$$\frac{\epsilon'}{\epsilon} = 1,68.$$

$$\epsilon' = 1,065$$

$$\text{Hb}_0^{500} = 31,53.$$

c) 2,00 ccm der Blutlösung wurden mit der Pipette abgemessen und in einem Meßkolben mit der Sodalösung auf 80,0 ccm verdünnt:

$$n = \frac{80}{2}.$$

$$\epsilon = 0,729$$

$$\frac{\epsilon'}{\epsilon} = 1,582.$$

$$\epsilon' = 1,153$$

$$\text{Hb}_0^{500} = 30,56.$$

$$\text{Mittelwert aus a, b und c: } \text{Hb}_0^{500} = 31,31.$$

## Behandlung der Blutlösung mit Ferricyankali.

Mit der unverdünnten Blutlösung wurde ein Meßkolben von 500 ccm bis zur Marke gefüllt, und der Lösung im Meßkolben mit einer Pipette 5,00—7,00 ccm einer Ferricyankalilösung von bekanntem Gehalte zugefügt. Diese wurde aus reinem, frisch umkrystallisiertem und getrocknetem Ferricyankali bereitet und enthielt im Kubikzentimeter 0,0881 g, d. i. 0,000268 Mol.  $\text{K}_3\text{FeCy}_6$ .

Nach dem Verlauf der Reaktion zwischen Ferricyankali und Oxyhämoglobin, welche bloß einiger Minuten bedarf und

von der Bildung eines kleinblasigen Schaumes begleitet ist, wurden aus dem Gemische ohne Verzögerung die Verdünnungen zur zweiten spektrophotometrischen Untersuchung vorbereitet. Diese letztere wurde möglichst sofort ausgeführt, die verdünnten Lösungen wurden auch inzwischen durch Einlegung in Eiswasser vor der weiteren Zersetzung geschützt.

Zweite spektrophotometrische Untersuchung.

Kollimatorschlitz und Rauchglaskeil wie früher.

$$a) n = \frac{80}{2}$$

$$\epsilon = 0,671$$

$$\epsilon' = 0,884$$

$$\frac{\epsilon'}{\epsilon} = 1,317.$$

% m (Prozent des Methämoglobins, auf die ganze vorhandene Blutfarbstoffmenge bezogen, aus Hüfners Tabelle) = 66,34.

$Hb_m^{505}$  [Methämoglobingehalt von 500 ccm Blutlösung + 5,00 ccm Ferricyankalilösung

$$= 505 n \frac{A_m A'_m (\epsilon' A'_o - \epsilon A_o)}{A'_o A_m - A_o A'_m} = 505 n (\epsilon' A'_o - \epsilon A_o \times -4,017)] = 18,82.$$

$Hb_{m+o}$  (Gesamtfarbstoffgehalt von 500 ccm Blutlösung + 5,00 ccm Ferricyankalilösung =  $\frac{Hb_m^{505} \times 100}{66,34} = 28,38.$

$Hb_o^{505}$  (Oxyhämoglobingehalt von 500 ccm Blutlösung + 5,00 ccm Ferricyankalilösung =  $Hb_{m+o}^{505} - Hb_m^{505} = 9,56.$

$$b) n = \frac{80}{1,8}$$

$$\epsilon = 0,629$$

$$\epsilon' = 0,859$$

$$\frac{\epsilon'}{\epsilon} = 1,366$$

$$c) n = \frac{80}{2}$$

$$\epsilon = 0,718$$

$$\epsilon' = 0,972$$

$$\frac{\epsilon'}{\epsilon} = 1,354$$

$$Hb_m^{505} = 15,96$$

$$Hb_{m+o}^{505} = 29,57$$

$$Hb_o^{505} = 13,61.$$

$$Hb_m^{505} = 17,37$$

$$Hb_{m+o}^{505} = 30,40$$

$$Hb_o^{505} = 13,09.$$

Mittelwerte aus den Untersuchungen a, b und c.

$$Hb_m^{505} = 17,38 \text{ g}$$

$$Hb_{m+o}^{505} = 29,47 \text{ „}$$

$$Hb_o^{505} = 12,09 \text{ „}$$

Vergleich der Zusammensetzung der Blutlösung vor und nach der Behandlung mit Ferricyankali.

	Hb <sub>o</sub>	Hb <sub>m</sub>
Vor der Behandlung . . . . .	31,31	—
Nach der Behandlung . . . . .	12,09	17,38.
Hb <sub>o</sub> (Abnahme an Oxyhämoglobin) .	19,22	—
+ Hb <sub>m</sub> (Zunahme an Methämoglobin) .	—	17,38.

Da sowohl  $\overset{-}{\text{Hb}}_o$  als  $\overset{+}{\text{Hb}}_m$  die Umwandlung des Oxyhämoglobins in Methämoglobin ausdrücken, so wird der Mittelwert beider als Maß derselben betrachtet:

$$\frac{\overset{-}{\text{Hb}}_o + \overset{+}{\text{Hb}}_m}{2} = 18,30 \text{ g.}$$

Resultat des I. Versuches.

Da 0,00134 Mol.  $\text{K}_3\text{FeCy}_6$  18,30 g Oxyhämoglobin in Methämoglobin überführen, so wird durch 1 Mol.  $\text{K}_3\text{FeCy}_6$  13660 g, resp. das Molekulargewicht des Oxyhämoglobins 16600 gesetzt, 0,83 Mol. Oxyhämoglobin in Methämoglobin umgewandelt.

Die zu dieser Versuchreihe gehörenden Zahlen sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

Die Angaben der beiden vorletzten Kolumnen der Tabelle zeigen, daß eine Molekel Ferricyankali mehr als 0,5 Molekel Oxyhämoglobin in Methämoglobin umwandelt. Da es nach dem im theoretischen Teile Gesagten nur fraglich ist, ob durch eine Molekel  $\text{K}_3\text{FeCy}_6$  0,5 oder 1,0 Mol. Oxyhämoglobin in Methämoglobin übergeführt wird, so könnte man diese Angaben schon als hinreichend betrachten, um die letztere Annahme zu beweisen.

Die Abweichungen einzelner Werte vom theoretischen sind jedoch zu groß, um sich mit der Genauigkeit der Angaben begnügen zu können. Es bestand demnach die Notwendigkeit, die auf spektrophotometrischem Wege erhaltenen Resultate auch von einer anderen Seite zu unterstützen.

## II. Gasometrische Versuche.

Frisches defibriniertes Rinderblut wurde mit dem gleichen Volumen sehr verdünnten (etwa 0,015 normalen) Ammoniaks hämolysiert und die Blutlösung bei 2 Atmosphären mit Sauerstoff gesättigt. 500 ccm dieser Lösung wurden in eine Flasche von ungefähr 1 Liter Inhalt übergossen. Die Flasche wurde mit einem zweimal durchbohrten Gummistopfen, welcher zwei Röhren mit Glashahnen trug, verschlossen, mit einem Stück Vacuumschlauch an die Gasbürette geschlossen und in ein Wasserbad von Zimmertemperatur getaucht. Die Zusammenstellung des Apparates ist aus der nebenstehenden Figur leicht zu verstehen.

Nun wurde die Luft aus dem Gasraum der Flasche A, bei offenstehenden Hähnen a, b, c, d durch Sauerstoff aus einer Bombe verdrängt und dabei durch entsprechendes Heben und Senken der Niveaugugel der Bürette Sorge getragen, daß auch in der Bürette und den Verbindungsröhren keine Luft zurückbleibe. Nach dem Abstellen des Sauerstoffstromes und Abschließen des Hahnes a wurde die Quecksilberoberfläche hochgestellt und mit dem

Kathetometer abgelesen. Nach Schließen der Hähne b und c hob ich die Flasche aus dem Wasserbade und schüttelte dieselbe einige Minuten energisch, um den überschüssigen Sauerstoff aus der Lösung zu entfernen, und senkte sie wieder in das Wasserbad. Beim

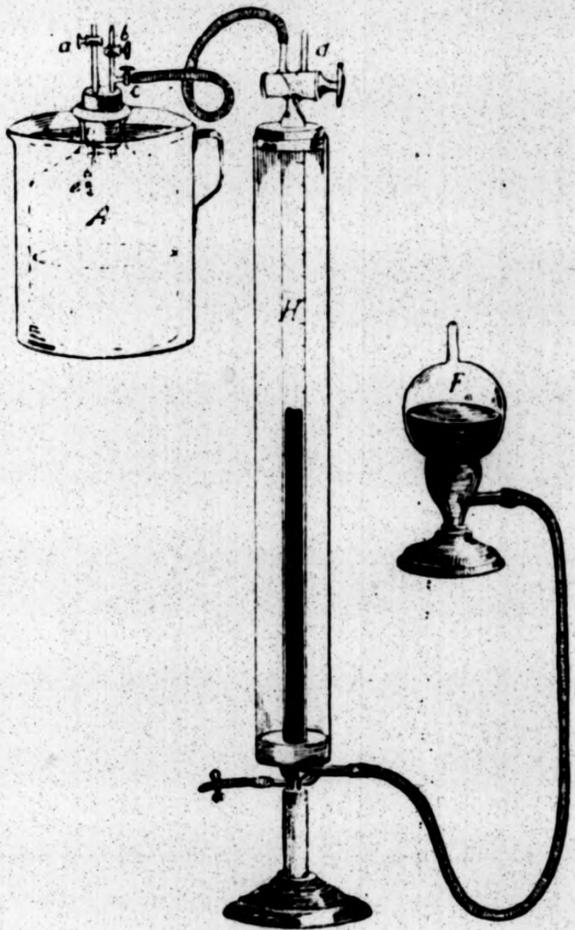


Fig. 1.

Versuchsmaterial	Spektrophotometrische Prüfung der Lösung vor dem $K_3FeCy_6$ -Zusatz					Behandlung mit Ferricyankalium			Spektrophotometrische Prüfung nach				
	n	$\epsilon$	$\epsilon'$	$\frac{\epsilon'}{\epsilon}$	Hb <sub>o</sub> <sup>500</sup>	Vol. der Blutlösung in ccm	Vol. der $K_3FeCy_6$ -Lösung in ccm (= v <sup>1)</sup> )	Menge des $K_3FeCy_6$ in Mol.	n	$\epsilon$	$\epsilon'$		
I. Defibriniertes Schweinsblut + 1 1/2 Vol. 0,1%iger $Na_2CO_3$ -Lösung	a	100/2	0,609	0,995	1,634	32,45	—	—	—	a	80/2	0,671	0,884
	b	100/2,2	0,650	1,065	1,638	31,53	—	—	—	b	80/1,8	0,629	0,859
	c	80/2	0,759	1,153	1,582	30,56	—	—	—	c	80/2	0,718	0,972
	Mittelwert . . . . .					31,31	500	5	0,00134	Mittelwert . . . . .			
II. Dieselbe Blutlösung	—	—	—	—	—	—	—	—	—	a	80/2	0,702	0,948
	—	—	—	—	—	—	—	—	—	b	80/2	0,714	0,909
	Mittelwert . . . . .					—	500	5	0,00134	Mittelwert . . . . .			
III. Defibriniertes Schweinsblut + 1 1/2 Vol. 0,1%iger $Na_2CO_3$ -Lösung	a	100/2	0,633	1,007	1,591	33,27	—	—	—	a	80/1,6	0,554	0,742
	b	100/1,8	0,559	0,892	1,596	32,69	—	—	—	b	100/2	0,589	0,794
	Mittelwert . . . . .					32,98	500	6	0,00161	Mittelwert . . . . .			
IV. Dieselbe Blutlösung	—	—	—	—	—	—	—	—	—	a	80/2	0,802	1,006
	—	—	—	—	—	—	—	—	—	b	80/1,8	0,715	0,965
	Mittelwert . . . . .					—	499,2 <sup>2)</sup>	6	0,00161	Mittelwert . . . . .			
V. Defibriniertes Schweinsblut + 1 1/2 Vol. 0,1%iger $Na_2CO_3$ -Lösung	a	100/2	0,774	1,211	1,565	40,35	—	—	—	a	100/2	0,737	0,971
	b	80/1,5	0,678	1,063	1,637	37,74	—	—	—	b	80/1,9	0,665	0,895
	Mittelwert . . . . .					39,05	500	6	0,00161	Mittelwert . . . . .			
VI. Dieselbe Blutlösung	—	—	—	—	—	—	—	—	—	a	80,2/1,5	0,628	0,841
	—	—	—	—	—	—	—	—	—	b	80/1,6	0,674	0,890
	Mittelwert . . . . .					—	500	7	0,00188	Mittelwert . . . . .			
VII. Defibriniertes Rinderblut + 1 1/2 Vol. 0,1%iger $Na_2CO_3$ -Lösung	a	80/2	0,640	1,015	1,586	26,87	—	—	—	a	100,2/2,5	0,642	0,877
	b	> <sup>3)</sup>	0,616	0,873	—	—	—	—	—	b	> <sup>3)</sup>	0,616	0,873
	Mittelwert . . . . .					—	500	5	0,00134	Mittelwert . . . . .			
VIII. Defibriniertes Rinderblut + 1 1/2 Vol. 0,1%iger $Na_2CO_3$ -Lösung	a	80/1,7	0,532	0,890	1,673	27,00	—	—	—	a	80/2	0,567	0,748
	b	> <sup>4)</sup>	0,548	0,875	1,597	27,16	—	—	—	b	> <sup>4)</sup>	0,627	0,847
	Mittelwert . . . . .					27,08	500	5	0,00134	Mittelwert . . . . .			
IX. Eine am vorigen Tage aus defibriniertem Rinderblut mit der gleichen Menge sehr verdünnten Ammoniaks bereite Lösung	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	100/3	0,936	1,465	1,565	31,30	500	5	0,00134	100/3	0,882	1,174	—	—
X. Frisch.defibriniertes <sup>6)</sup> Rinderblut + 1 Vol. sehr verdünntes Ammoniak	a	100/2	0,613	0,965	1,574	32,01	—	—	—	a	100/3	0,905	1,222
	b	> <sup>7)</sup>	0,612	0,965	1,574	32,02	—	—	—	b	> <sup>7)</sup>	0,897	1,189
	Mittelwert . . . . .					32,02	500	5	0,00134	Mittelwert . . . . .			

Tabelle.

metrische Prüfung der Lösung dem $K_3FeCy_6$ -Zusatz				Vergleichung der Resultate beider spektrophotometrischen Prüfungen			Umwandlung des Blutfarbstoffs durch 1 Mol. $K_3FeCy_6$		Bemerkung	
$\frac{\epsilon}{\epsilon}$	$\frac{0}{0m}$	Hb <sub>m</sub> <sup>500+v</sup> <sup>1)</sup>	Hb <sub>m+0</sub> <sup>500+v</sup> <sup>1)</sup>	Hb <sub>0</sub> <sup>500+v</sup> <sup>1)</sup>	$\frac{+}{Hb_m}$	$\frac{-}{Hb_0}$	$\frac{+}{Hb_0+Hb_m}$	$\frac{g}{Hb}$		$\frac{Mol.}{Hb}$
1.317	66,34	18,82	28,38	9,56	—	—	—	—	—	1) v : die Anzahl der zu 500 ccm der Blutlösung zugesetzten Kubikzentimeter der Ferricyankalilösung.
1.366	53,97	15,96	29,57	13,61	—	—	—	—	—	
1.354	57,01	17,37	30,46	13,09	—	—	—	—	—	
...	...	17,38	29,47	12,09	17,38	19,22	18,30	13660	0,82	
1.350	58,04	17,20	29,64	12,44	—	—	—	—	—	2) Die Blutlösung wurde vor dem Ferricyankalilösungszusatz auf 0° abgekühlt. Ihr Volumen veränderte sich dabei von 500 auf 499,2 ccm. Bei der Berechnung der Resultate der spektrophotometr. Prüfungen des Reaktionsgemisches wurde dieser Kontraktion Rechnung getragen.
1.273	77,64	23,45	30,21	6,76	—	—	—	—	—	
...	...	20,32	29,92	9,60	20,32	21,71	21,01	15680	0,94	
1.339	60,85	17,83	29,31	11,48	—	—	—	—	—	2) Die Blutlösung wurde vor dem Ferricyankalilösungszusatz auf 0° abgekühlt. Ihr Volumen veränderte sich dabei von 500 auf 499,2 ccm. Bei der Berechnung der Resultate der spektrophotometr. Prüfungen des Reaktionsgemisches wurde dieser Kontraktion Rechnung getragen.
1.348	58,55	18,17	31,04	12,87	—	—	—	—	—	
1.354	56,81	17,48	30,77	13,29	—	—	—	—	—	
...	...	17,82	30,37	12,55	18,82	20,40	19,11	11870	0,71	
1.254	82,47	27,93	33,86	5,93	—	—	—	—	—	2) Die Blutlösung wurde vor dem Ferricyankalilösungszusatz auf 0° abgekühlt. Ihr Volumen veränderte sich dabei von 500 auf 499,2 ccm. Bei der Berechnung der Resultate der spektrophotometr. Prüfungen des Reaktionsgemisches wurde dieser Kontraktion Rechnung getragen.
1.336	61,01	20,75	33,67	12,92	—	—	—	—	—	
...	...	24,34	33,76	9,42	24,34	23,56	23,95	14880	0,90	
1.317	66,44	25,92	39,01	13,09	—	—	—	—	—	2) Die Blutlösung wurde vor dem Ferricyankalilösungszusatz auf 0° abgekühlt. Ihr Volumen veränderte sich dabei von 500 auf 499,2 ccm. Bei der Berechnung der Resultate der spektrophotometr. Prüfungen des Reaktionsgemisches wurde dieser Kontraktion Rechnung getragen.
1.346	59,06	21,94	37,14	15,20	—	—	—	—	—	
...	...	23,93	38,07	14,14	23,93	24,91	24,42	15170	0,91	
1.339	60,83	21,60	35,61	13,94	—	—	—	—	—	2) Die Blutlösung wurde vor dem Ferricyankalilösungszusatz auf 0° abgekühlt. Ihr Volumen veränderte sich dabei von 500 auf 499,2 ccm. Bei der Berechnung der Resultate der spektrophotometr. Prüfungen des Reaktionsgemisches wurde dieser Kontraktion Rechnung getragen.
1.321	65,42	23,42	35,81	12,35	—	—	—	—	—	
...	...	22,54	35,71	13,17	22,54	25,89	24,22	12880	0,78	
1.366	53,97	14,61	27,07	12,46	—	—	—	—	—	3) Zweite Prüfung der Verdünnung a.
1.417	40,98	10,71	26,14	15,43	—	—	—	—	—	
...	...	12,66	26,60	13,94	12,66	12,93	17,79	12020	0,72	
1.319	65,93	15,81	23,98	8,17	—	—	—	—	—	4) Zweite Prüfung der Verdünnung a.
1.351	57,79	15,34	26,54	11,20	—	—	—	—	—	
...	...	15,57	25,26	9,69	15,57	17,39	16,48	12300	0,74	
1.331	67,88	19,54	31,09	11,55	18,47	19,75	19,11	14280	0,86	5) Die Lösung wurde am vorigen Tage bereitet und enthielt eine kleine Menge Methämoglobin. Dies. Versuch wurde dem IX. gasometrisch. Versuche angeschlossen.
1.353	57,27	18,45	32,34	13,79	—	—	—	—	—	6) Dies. Versuch wurde d. X. gasometrisch. Versuche angeschlossen.
1.326	64,15	20,29	31,62	11,37	—	—	—	—	—	
...	...	19,39	31,93	12,56	19,37	19,46	19,42	14490	0,87	7) Zweite Prüfung der Verdünnung a.

darauffolgenden Öffnen des Hahnes c sank die Oberfläche des Quecksilbers in der Gasbürette beträchtlich, als Zeichen dafür, daß der im Überschuß absorbierte Sauerstoff, dessen größter Teil sich schon beim Übergießen der Blutlösung entfernte, aus der Lösung in den Gasraum der Flasche gelangte. Der Sauerstoff des Gasraumes wurde durch Senkung der Niveaueugel unter Kontrolle des Kathetometers auf Atmosphärendruck gestellt, die Stellung der Oberfläche des Quecksilbers am Kathetometer abgelesen, und der Versuch solange wiederholt, bis eine Zunahme des Gasvolumens nach weiterem Schütteln nicht mehr zu beobachten war.<sup>1)</sup> Der Zunahme des Gasvolumens folgte meistens in einiger Zeit infolge der «Sauerstoffzehrung» eine langsame Abnahme desselben.

Sobald das Gleichgewicht zwischen dem absorbierten und nicht absorbierten Anteil des Sauerstoffs sich einstellte, wurde der Hahn c geschlossen, die Flasche durch Ausheben des Gummistopfens geöffnet und in den Gasraum der Flasche ein kleines zylindrisches Gefäß (e) mit einer genau abgemessenen Menge der auch bei den spektrophotometrischen Versuchen gebrauchten Ferricyankalilösung mittels eines Filtrierpapierstreifens eingehängt. Nach sorgfältigem Schließen des Gefäßes A und Öffnen der Hähne a, b, c vertrieb ich die Luft, welche während der soeben beschriebenen Manipulation in den Gasraum gelangen konnte, durch einen Sauerstoffstrom, wie vorher.

Die Hähne a und b wurden bei hoher Stellung der Niveaueugel geschlossen, das Gas nach einigem Warten zur Ausgleichung etwaiger Temperaturdifferenzen durch entsprechende Einstellung der Niveaueugel genau auf Atmosphärendruck gebracht und die Stellung der Quecksilberoberfläche am Kathetometer abgelesen.

Das Glasgefäß wurde nun aus dem Wasserbade herausgenommen und kräftig durchgeschüttelt. Das Ferricyankaligefäß wurde dadurch vom Filtrierpapierstreifen losgerissen,

<sup>1)</sup> Bei einigen Versuchen verzichtete ich auf die zahlenmäßige Kontrolle der Abgabe des Sauerstoffüberschusses und begnügte mich mit der Feststellung des eingetretenen Gleichgewichtes durch die Beobachtung eines entsprechend montierten einfachen Wassermanometers.

das Reagens vermischte sich mit der Blutlösung und befreite eine bestimmte Menge Sauerstoff aus derselben. Die Flüssigkeit wurde solange weiter geschüttelt, bis die Zunahme des Gasvolumens nicht mehr beträchtlich erschien. Das Gefäß wurde dann in das Wasserbad gesenkt, das Gas durch genaue Einstellung der Niveaueugel auf Atmosphärendruck gebracht und die Stellung der Quecksilberoberfläche am Kathetometer abgelesen. Dieses Verfahren wurde solange wiederholt, bis eine weitere Zunahme des Gasvolumens auch mit dem Kathetometer nicht mehr festzustellen war, resp. bis eine langsame Abnahme desselben begann.

Dem Unterschiede zwischen der ersten und der letzten Ablesung am Kathetometer entsprechendes Gasvolumen, welche man aus der Kalibriertabelle der Gasbürette entnehmen konnte, entsprach dem durch Ferricyankali befreiten Sauerstoff.

Aus dem auf 0° und 760 mm Hg-Druck reduzierten Volumen dieser Zunahme ließ sich die Zahl der durch eine Molekel des Ferricyankalis freigemachten Molekeln Sauerstoffs aus der Gleichung  $X = \frac{V}{a + 22394}$  berechnen.<sup>1)</sup>

Am Schlusse jedes Versuches überzeugte ich mich, daß Oxyhämoglobin in Überschuß vorhanden war. Dies geschah zum Teil durch die spektrophotometrische Bestimmung des Extinktionsverhältnisses, zum Teil in der Weise, daß einige Kubikzentimeter der Lösung nach starker Verdünnung in zwei ungefähr gleiche Teile geteilt und der eine derselben mit einer Spur Ferricyankali versetzt wurde.

Der Farbenumschlag zeigte die Anwesenheit von Oxyhämoglobin immer an. Der Unterschied in der Farbe beider Hälften der verdünnten Probe war besonders auffallend, wenn man diese mit sehr verdünnter Essigsäure ansäuerte.

Bei diesen Versuchen hatte ich hauptsächlich mit zwei

<sup>1)</sup> V = reduziertes Volumen der Sauerstoffabgabe, a = die Menge des verwandten Ferricyankalis in Molen, 22394 = das Molekularvolumen der Gase nach W. Ostwald, Grundriß d. allg. Chemie, III. Aufl., S. 711.

Fehlerquellen zu rechnen. Die eine derselben geht aus der «Sauerstoffzehrung» der Blutlösungen hervor, infolge deren die absorbierte und demnach auch die freie Sauerstoffmenge eine langsame, aber doch ziemlich beträchtliche Abnahme erleidet. Um die leicht oxydablen Stoffe des Blutes zu oxydieren, ließ ich die Blutlösungen vor dem eigentlichen Versuche mit reinem Sauerstoff von ca. 2 Atmosphären Druck längere Zeit stehen.

Die Sauerstoffzehrung ließ sich durch diesen Griff ziemlich einschränken, jedoch leider nicht immer völlig beseitigen. Die beobachtete Zunahme des Gasvolumens war demnach meistens ein Resultant der Sauerstoffabgabe und der Sauerstoffzehrung. Um den Einfluß der letzteren noch weiter einzuschränken, war ich bestrebt, die Versuche möglichst rasch zu Ende zu führen, und die Wahl der verwandten Menge der Ferricyankalilösung so zu treffen, daß die befreite Sauerstoffmenge möglichst groß sei, resp. daß ein möglichst geringer Teil des Oxyhämoglobins übrig bleibe.

Einen weiteren und zwar sehr schwer abschätzbaren Fehler verursacht der Umstand, daß die Blutlösung beim Schütteln beinahe den ganzen Gasraum des Schüttelgefäßes mit mehrweniger feinblasigem Schaum erfüllt. Infolge der Oberflächenspannung der Lösung ist der Sauerstoff im Innern der Bläschen unter größerem Druck als außerhalb derselben, also auch in der Gasbürette. Der Druckunterschied hängt von der Größe der Oberflächenspannung der Lösung und dem Durchmesser der Bläschen ab und wird durch  $\frac{4\sigma}{r}$  ausgedrückt, wenn  $\sigma$  die Oberflächenspannung und  $r$  den Radius der kugelförmig gedachten Bläschen bedeutet.

Die Oberflächenspannung einer Blutlösung habe ich mit der Kapillarmethode annähernd bestimmt und 5,6 mm W. gefunden. Bei Blasen von 2 mm Durchmesser würde demnach der Unterschied 22,52 mm Wassersäule resp. 1,66 mm Hg betragen. Es ist jedoch klar, daß der Unterschied, wenn die Blasen kleiner sind, bedeutend größer sein kann. Der Einfluß, den dieser Unterschied auf das beobachtete Resultat ausübt,

hängt außerdem noch von der relativen Größe des vom Schaume eingenommenen Teiles des Gasraumes ab. Er wird zum Teil durch den Umstand kompensiert, daß der Gasraum schon bei der Feststellung des Anfangsvolumens infolge der Entfernung des überschüssigen Sauerstoffs Schaum enthält. Ganz aufgehoben wird die Fehlerquelle dadurch nicht, weil der Schaum bei der Einwirkung des Ferricyankalis und dem darauffolgenden Schütteln sich vermehrt und kleinblasiger wird.

Zur Beseitigung der aus dieser Quelle herstammenden Fehler konnten außer dem tüchtigen Schütteln der Lösung vor der Einsetzung des Ferricyankaligefäßes und rascher Ablesung des Gasvolumens nach dem Eintreten desselben, um möglichst ausgiebige Schaumbildung hervorzurufen und dem Schaume keine Zeit zum Vergehen zu lassen, keine Maßregeln gefunden werden. Da es aber klar wurde, daß aus dieser Quelle Fehler in der Bestimmung des Druckes bis oder eventuell über 1 mm Hg entstehen können, so brauchte die Genauigkeit bei der Ablesung des Barometerstandes nicht bis an die Bruchteile des Millimeters zu reichen.

### I. Versuch.

#### Versuchsmaterial:

500 ccm einer Blutlösung, welche am vorigen Tage aus frischem Rinderblut mit der gleichen Menge sehr verdünnten Ammoniaks bereitet wurde, über die Nacht unter Sauerstoff von 2 Atm. Druck stand und mit diesem öfters durchgeschüttelt wurde. Die Blutlösung wurde vor dem eigentlichen Versuche mit reinem Sauerstoff bei Atmosphärendruck solange geschüttelt, bis der angeschlossene Wassermanometer keine Abgabe von Gasen mehr anzeigte.

#### O<sub>2</sub>-Befreiung mit Ferricyankali:

Ablesungen am  
Kathetometer

Nach dem Einsetzen des Ferricyankaligefäßes vor dem Schütteln	= 448,1
Nach dem Zusammenschütteln mit 5,00 ccm = 0,00134 Mol. K <sub>3</sub> FeCy <sub>6</sub>	= 306,9
Nach weiterem Schütteln . . . . .	= 305,5
„ „ „ . . . . .	= 305,5

Tl <sup>1)</sup> = 17° C.	B <sub>17</sub> = 732	log 1 + α 17 = 0,02621
T <sub>wb</sub> = 16,5° C.	B <sub>0</sub> = 730	V <sub>bt</sub> = 32,57
T <sub>wm</sub> = 17° C.	b <sub>17</sub> = 14	V <sub>0.760</sub> = 28,86
	28,86	
	$\frac{28,86}{0,00134 \times 22394} = 0,96.$	

Durch 1 Mol. K<sub>3</sub>FeCy<sub>6</sub> wurden 0,96 Mol. O<sub>2</sub> in Freiheit gesetzt.

## II. Versuch.

### Versuchsmaterial:

500 ccm einer Blutlösung, welche aus frischem Rinderblut mit dem gleichen Volumen sehr verdünnten Ammoniaks bereitet wurde und mit Sauerstoff etwa 2 Stunden unter häufigem Durchschütteln bei 2 Atmosphären Druck stand.

Entfernung des überschüssigen Sauerstoffes.

### Ablesungen am Kathetometer

Vor dem Schütteln . . . . .	403,8
Nach dem Schütteln . . . . .	399,6
» weiterem Schütteln . . . . .	387,2
» » » . . . . .	387,2
» » » . . . . .	387,2

O<sub>2</sub>-Befreiung mit Ferricyankali.

### Ablesungen am Kathetometer

Vor dem Schütteln . . . . .	287,2	
Nach dem Schütteln mit 2,50 ccm = 0,00134 Mol. K <sub>3</sub> FeCy <sub>6</sub>	246,5	
» weiterem Schütteln . . . . .	242,3	
» » » . . . . .	241,1	
» » » . . . . .	240,6	
» » » . . . . .	240,6	
Tl = 18° C.	B <sub>18</sub> = 732	log 1 + α 17,5 = 0,02696
T <sub>wb</sub> = 17° C.	B <sub>0</sub> = 730	V <sub>bt</sub> = 33,51
T <sub>wm</sub> = 17,5° C.	b <sub>17,5</sub> = 15	V <sub>0.760</sub> = 29,63
	29,63	
	$\frac{29,63}{0,00134 \times 22394} = 0,99.$	

Durch 1 Mol. K<sub>3</sub>FeCy<sub>6</sub> wurden 0,99 Mol. O<sub>2</sub> in Freiheit gesetzt.

<sup>1)</sup> Tl = Temperatur der Luft im Versuchsraume. — T<sub>wb</sub> = Temperatur des Wasserbades. — T<sub>wm</sub> = Temperatur des Wassermantels der Bürette. — B<sub>17</sub> = bei Zimmertemperatur abgelesener Barometerstand. — B<sub>0</sub> = auf 0 reduzierter Barometerstand. — b = Wasserdampftension. — V<sub>bt</sub> = Zunahme des Gasvolumens, abgelesen von der Kalibriertabelle der Gasbürette. — V<sub>0.760</sub> = auf 0° und 760 mm reduzierte Zunahme des Gasvolumens.

## III. Versuch.

## Versuchsmaterial:

500 ccm einer Blutlösung, welche aus frischem Rinderblut mit dem gleichen Volumen sehr verdünnten Ammoniaks bereitet wurde und etwa 2 Stunden unter häufigem Umschütteln mit Sauerstoff bei 2 Atmosphären Druck stand.

## Entfernung des überschüssigen Sauerstoffs.

	Zeit	Ablesungen am Kathetometer
Vor dem Schütteln . . . .	4 Uhr 40 Min.	398,0
Nach dem Schütteln . . . .	4 > 45 >	382,6
> weiterem Schütteln . . . .	4 > 50 >	382,6
> > > . . . .	4 > 55 >	385,6
> > > . . . .	5 > 5 >	385,6

O<sub>2</sub>-Befreiung mit Ferricyankali.

	Zeit	Ablesungen am Kathetometer
Vor dem Schütteln . . . . .	5 Uhr 15 Min.	448,7
Nach dem Schütteln mit 5,50 ccm = 0,00147 Mol. K <sub>3</sub> FeCy <sub>6</sub> . . . .	5 > 21 >	341,7
Nach weiterem Schütteln . . . .	5 > 26 >	291,8
> > > . . . .	5 > 30 >	280,6
> > > . . . .	5 > 40 >	276,4
> > > . . . .	5 > 44 >	276,0
> > > . . . .	5 > 50 >	276,0
> > > . . . .	5 > 55 >	276,0

$$T_1 = 18^\circ \text{ C.} \quad B_{18} = 736 \quad \log 1 + \alpha 18 = 0,02771$$

$$T_{wb} = 17,5^\circ \text{ C.} \quad B_0 = 734 \quad V_{bt} = 39,28$$

$$T_{wm} = 18^\circ \text{ C.} \quad b_{17,5} = 15 \quad V_{0,760} = 34,86$$

$$\frac{34,86}{0,00147 \times 22394} = 1,06.$$

Durch 1 Mol. K<sub>3</sub>FeCy<sub>6</sub> wurden 1,06 Mol. O<sub>2</sub> in Freiheit gesetzt.

## IV. Versuch.

## Versuchsmaterial:

500 ccm derselben Blutlösung, welche am vorigen Tage beim III. Versuch gebraucht wurde. Die Lösung stand über die Nacht mit Sauerstoff unter 2 Atmosphären Druck und wurde damit öfters durchgeschüttelt.

## Entfernung des überschüssigen Sauerstoffs.

	Zeit	Ablesungen am Kathetometer
Vor dem Schütteln . . . . .	9 Uhr 15 Min.	439,7
Nach dem Schütteln . . . . .	9 > 20 >	422,3
> weiterem Schütteln . . . . .	9 > 25 >	422,3
> > > . . . . .	9 > 33 >	425,1
> > > . . . . .	9 > 40 >	426,7
> > > . . . . .	9 > 43 >	426,7
> > > . . . . .	9 > 46 >	426,7

O<sub>2</sub>-Befreiung mit Ferricyankali.

	Zeit	Ablesungen am Kathetometer
Vor dem Schütteln . . . . .	10 Uhr 0 Min.	424,2
Nach dem Schütteln mit 4,50 ccm = 0,00121 Mol. K <sub>3</sub> FeCy <sub>6</sub> . . . . .	10 > 6 >	295,4
Nach weiterem Schütteln . . . . .	10 > 14 >	286,8
> > > . . . . .	10 > 17 >	286,8
> > > . . . . .	10 > 30 >	286,8

Tl = 18° C.	B <sub>18</sub> = 737	log 1 + α 17,5 = 0,02696
Twb = 17° C.	B <sub>0</sub> = 735	V <sub>bt</sub> = 31,47
Twm = 17,5° C.	b <sub>17,5</sub> = 15	V <sub>0,760</sub> = 28,02

$$\frac{28,02}{0,00121 \times 22394} = 1,01.$$

Durch 1 Mol. K<sub>3</sub>FeCy<sub>6</sub> wurden 1,01 Mol. O<sub>2</sub> in Freiheit gesetzt.

## V. Versuch.

## Versuchsmaterial:

500 ccm derselben Blutlösung, welche auch im IV. Versuch verwendet wurde.

## Entfernung des überschüssigen Sauerstoffs.

	Zeit	Ablesungen am Kathetometer
Vor dem Schütteln . . . . .	11 Uhr 15 Min.	433,4
Nach dem Schütteln . . . . .	11 > 17 >	399,7
> weiterem Schütteln . . . . .	11 > 27 >	394,9
Wiederholte Ablesung ohne Schütteln . . . . .	11 > 32 >	394,9
Nach 10 Min. Schütteln, 5 Min. Warten . . . . .	11 > 47 >	405,5
> 8 > > 5 > > . . . . .	12 > 0 >	410,4

$O_2$ -Befreiung mit Ferricyankali.

	Zeit	Ableseungen am Kathetometer
Vor dem Schütteln . . . . .	12 Uhr 15 Min.	404,3
Nach dem Schütteln mit 4,50 ccm = 0,00121 Mol. $K_3FeCy_6$ . . . . .	12 > 20 >	291,0
Nach weiterem Schütteln (5 Min. Warten)	12 > 32 >	269,8
> > > (5 > > )	12 > 40 >	268,5
> > > (5 > > )	12 > 50 >	269,4
$Tl = 18^\circ C.$ $B_{18} = 737$ $\log 1 + a 17,5 = 0,02696$		
$Twb = 17,5^\circ C.$ $B_0 = 735$ $V_{bt} = 30,92$		
$Twm = 17,5^\circ C.$ $b = 15$ $V_{0.700} = 27,53$		
	$\frac{27,53}{0,00121 \times 22394} = 1,02.$	

Durch 1 Mol.  $K_3FeCy_6$  wurden 1,02 Mol.  $O_2$  in Freiheit gesetzt.

Der Apparat blieb 2 Stunden nach Abschluß des Versuches zusammengestellt. Nach Ablauf dieser Zeit wurde die Flasche wieder geschüttelt, und das Gasvolumen auf die übliche Weise bestimmt. Es zeigte sich eine Abnahme desselben um 17,42 ccm.

## VI. Versuch.

## Versuchsmaterial:

500 ccm derselben Blutlösung, welche auch beim V. Versuche verwendet wurde. Die Lösung stand einige Stunden unter 2 Atm. Sauerstoffdruck.

## Entfernung des überschüssigen Sauerstoffs.

	Zeit	Ableseungen am Kathetometer
Vor dem Schütteln . . . . .	4 Uhr 15 Min.	431,3
Nach dem Schütteln . . . . .	4 > 20 >	415,3
> weiterem Schütteln . . . . .	4 > 25 >	414,4
> > > . . . . .	4 > 30 >	414,4
> > > . . . . .	4 > 40 >	415,1

 $O_2$ -Befreiung mit Ferricyankali.

	Zeit	Ableseungen am Kathetometer
Vor dem Schütteln . . . . .	4 Uhr 58 Min.	415,3
Nach dem Schütteln mit 5,50 ccm = 0,00147 Mol. $K_3FeCy_6$ . . . . .	5 > 10 >	280,6
Nach 5 Min. Schütteln, 5 Min. Warten . . . . .	5 > 20 >	274,2
> 5 > > 5 > > . . . . .	5 > 30 >	274,2

$$\begin{array}{lll}
 Tl = 18,5^\circ \text{ C.} & B_{18,5} = 736 & V_{bt} = 32,29 \\
 Twb = 18^\circ \text{ C.} & B_0 = 15 & V_{0,760} = 28,66 \\
 Twm = 18^\circ \text{ C.} & \log 1 + \alpha 18 = 0,02771 & \\
 & 28,66 & \\
 & \hline
 & 0,00147 \times 22394 = 0,87. & 
 \end{array}$$

Durch 1 Mol.  $K_3FeCy_6$  wurden 0,87 Mol.  $O_2$  in Freiheit gesetzt.

### VII. Versuch.

Dieselbe Blutlösung, welche am vorigen Tage zu den beiden vorigen Versuchen verwendet wurde. Die Lösung stand über die Nacht unter Sauerstoff von 2 Atm. Druck und wurde mit demselben öfters geschüttelt.

Entfernung des überschüssigen Sauerstoffs.

	Zeit	Ablesungen am Kathetometer
Vor dem Schütteln . . . . .	9 Uhr 20 Min.	429,7
Nach dem Schütteln . . . . .	9 » 30 »	426,7
» weiterem Schütteln u. 3 Min. Warten	9 » 40 »	426,7
» 5 Min. Schütteln, 8 Min. Warten . . .	9 » 53 »	429,2

$O_2$ -Befreiung mit Ferricyankali.

	Zeit	Ablesungen am Kathetometer
Vor dem Schütteln . . . . .	10 Uhr 10 Min.	427,0
Nach dem Schütteln mit 5,00 ccm = 0,00134 Mol. $K_3FeCy_6$ u. 5 Min. Warten	10 » 21 »	301,2
Nach 6 Min. Schütteln, 6 Min. Warten . . .	10 » 33 »	302,1
$Tl = 17,5^\circ \text{ C.}$	$B_{17,5} = 734$	$\log 1 + \alpha 16,75 = 0,02583$
$Twb = 16,75^\circ \text{ C.}$	$B_0 = 732$	$V_{bt} = 28,67$
$Twm = 16,75^\circ \text{ C.}$	$b_{16,75} = 14$	$V_{0,760} = 25,52$
	25,52	
	$\hline$	$0,00134 \times 22394 = 0,85.$

Durch 1 Mol.  $K_3FeCy_6$  wurden 0,85 Mol.  $O_2$  in Freiheit gesetzt.

### VIII. Versuch.

Versuchsmaterial:

500 ccm einer Blutlösung, welche aus frischem Rinderblut mit der gleichen Menge verdünnten Ammoniaks bereitet wurde und einige Stunden unter Sauerstoff von 2 Atmosphären Druck stand und damit häufig geschüttelt wurde.

Entfernung des überschüssigen Sauerstoffs.

	Zeit	Ablesungen am Kathetometer
Vor dem Schütteln . . . . .	4 Uhr 40 Min.	431,2
Nach dem Schütteln . . . . .	4 > 45 >	387,0
> > > . . . . .	4 > 51 >	386,3
> > > . . . . .	4 > 55 >	386,3

O<sub>2</sub>-Befreiung mit Ferricyankali.

	Zeit	Ablesung am Kathetometer
Vor dem Schütteln . . . . .	5 Uhr 12 Min.	407,4
Nach dem Schütteln mit 5,00 ccm = 0,00134 Mol.		
(12 Min. Schütteln, 8 Min. Warten) . . . . .	5 > 32 >	272,2
Nach weiterem 5 Min. Schütteln 7 Min. Warten	5 > 44 >	272,2
Tl = 18° C.	B <sub>18</sub> = 734	log 1 + α 17,5 = 0,02696
Twb = 17,5° C.	B <sub>0</sub> = 732	V <sub>bt</sub> = 30,94
Twm = 17,5° C.	b <sub>17,5</sub> = 15	V <sub>0.760</sub> = 27,43
	27,43	
	<u>0,00134 × 22394</u>	= 0,91.

Durch 1 Mol. K<sub>3</sub>FeCy<sub>6</sub> wurden 0,91 Mol. O<sub>2</sub> in Freiheit gesetzt.

Das Instrument blieb bis zum nächsten Morgen zusammengestellt. Die wiederholte Bestimmung des Gasvolumens zeigte eine Abnahme desselben um 19,88 ccm.

IX. Versuch.

Versuchsmaterial:

500,0 ccm (mit der Pipette gemessen) derselben Blutlösung, welche am vorigen Tage zum vorigen Versuche verwendet wurde. Ein Teil derselben Lösung wurde zur spektrophotometrischen Prüfung im Eiswasser aufgehoben.

Die Entfernung des überschüssigen Sauerstoffs erfolgte in der üblichen Weise.

O<sub>2</sub>-Befreiung mit Ferricyankali.

	Zeit	Ablesung am Kathetometer
Vor dem Schütteln . . . . .	9 Uhr 15 Min.	448,2
Nach dem Schütteln mit 5,00 ccm		
= 0,00134 Mol. K <sub>3</sub> FeCy <sub>6</sub> . . . . .	9 > 28 >	314,5
Nach weiterem Schütteln . . . . .	9 > 33 >	318,7
Tl = 17,75° C.	B <sub>17,75</sub> = 737	log 1 + α 17,25 = 0,02659
Twb = 17,25° C.	B <sub>0</sub> = 735	V <sub>bt</sub> = 30,56
Twm = 17,25° C.	b <sub>17,75</sub> = 15	V <sub>0.760</sub> = 27,23
	27,23	
	<u>0,00134 × 22394</u>	= 0,91.

Durch 1 Mol. K<sub>3</sub>FeCy<sub>6</sub> wurden 0,91 Mol. O<sub>2</sub> in Freiheit gesetzt.

Ein Teil der mit Ferricyankali behandelten Blutlösung wurde dem Gefäße entnommen und nach entsprechender Verdünnung mit dem Spektrophotometer geprüft. Die Angaben der spektrophotometrischen Untersuchung sind in der 9. Zeile der II. Tabelle zu sehen.

### X. Versuch.

#### Versuchsmaterial:

500,0 ccm (mit der Pipette gemessen) einer aus frischem Rinderblut mit der gleichen Menge verdünnten Ammoniaks bereiteten Lösung, welche bei 2 Atmosphären Druck mit Sauerstoff übersättigt wurde. Ein Teil derselben Lösung wurde im Eiswasser für die spektrophotometrische Untersuchung aufgehoben.

Entfernung des überschüssigen Sauerstoffs durch Schütteln mit reinem Sauerstoff bei Atmosphärendruck, bis keine Gasabgabe mehr festzustellen war.

#### $O_2$ -Befreiung mit Ferricyankali.

	Zeit	Ablesung am Kathetometer
Vor dem Schütteln . . . . .	12 Uhr 23 Min.	437,6
Nach dem Schütteln mit 5,00 ccm		
0,00134 Mol. $K_3FeCy_6$ . .	12 „ 32 „	318,5
Nach weiterem Schütteln . .	12 „ 41 „	304,4
„ „ „ . .	12 „ 47 „	304,4
Tl = 17,75° C.	$B_{17,75} = 737$	$V_{bt} = 30,50$
Twb = 17,25° C.	$B_0 = 735$	$V_{0.760} = 27,18$
Twm = 17,25° C.	$b_{17,25} = 15$	
	27,18	
	$\frac{0,00134 \times 22394}{\phantom{0,00134 \times 22394}} = 0,91.$	

Durch 1 Mol.  $K_3FeCy_6$  wurden 0,91 Mol.  $O_2$  in Freiheit gesetzt.

Ein Teil der mit Ferricyankali behandelten Lösung wurde dem Gefäße entnommen und nach entsprechender Verdünnung mit dem Spektrophotometer geprüft. Die Angaben über die spektrophotometrische Untersuchung sind in der 10. Zeile der II. Tabelle zu sehen.

### III. Zusammenfassung der Resultate beider Versuchsreihen.

Da aus einer Molekel Oxyhämoglobin durch Ferricyankali eine Molekel Sauerstoff freigemacht wird, so können für die

bei den gasometrischen Versuchen gefundenen molekularen Mengen des Sauerstoffs stets die reagierenden molekularen Mengen des Oxyhämoglobins gesetzt, und die Resultate beider Versuchsreihen unmittelbar verglichen werden.

Es wurde also gefunden, daß in den beschriebenen Versuchen die folgenden Mengen des Oxyhämoglobins mit 1 Mol.  $K_3FeCy_6$  reagierten:

Spektrophotometrische Versuche		Gasometrische Versuche	
I.	0,74 Mol.	I.	0,96 Mol.
II.	0,90 >	II.	0,99 >
III.	0,83 >	III.	1,06 >
IV.	0,95 >	IV.	1,01 >
V.	0,91 >	V.	1,02 >
VI.	0,78 >	VI.	0,87 >
VII.	0,72 >	VII.	0,85 >
VIII.	0,74 >	VIII.	0,91 >
IX.	0,86 >	IX.	0,91 >
X.	0,87 >	Y.	0,91 >

Die Resultate beider Versuchsreihen unterstützen sich gegenseitig, so daß es wohl keinem Zweifel unterliegt, daß eine Molekel Ferricyankali mit einer Molekel Oxyhämoglobin reagiert. Die Schlüsse, welche aus diesem Befunde gezogen werden können, wurden im theoretischen Teil dieser Arbeit bereits erörtert.