Ueber die Absorptionsspectra des Blutfarbstoffes.

Von

Inspector und Docent **J. Formánek.**

(Mittheilung aus der k. k. allgem. Untersuchungsanstalt für Lebensmittel in Prag.)
Vorgelegt der böhmischen Akademie der Wissenschaften in Prag am 24. April 1901.

Hierzu Tafel II.

Das Absorptionsspectrum des Blutfarbstoffes, sowie seine Spectralreactionen, welche durch Einwirkung verschiedener Reagentien auf den Blutfarbstoff entstehen, sind bekannt und schon im Jahre 1862 von Hoppe-Seyler¹⁾, der sich um die Untersuchung des Blutfarbstoffes grosse Verdienste erworben hat, publicirt, später auch von vielen anderen Forschern studirt worden.

Doch findet man, dass das Blut, was sein spectroskopisches Verhalten anbelangt, nicht so eingehend durchforscht ist, wie es die Wichtigkeit dieses Gegenstandes erfordern würde. Die Ursache dafür ist wohl darin zu suchen, dass die Physiologen, sowie die Gerichtschemiker, sich bisher damit begnügten, die Absorptionsspectra des Blutfarbstoffes durch blossen Vergleich, oder die Bestimmung ihrer Lage nur annähernd auf Grund der Fraunhofer'schen Hauptlinien festzustellen, die Spectroskopiker haben sich jedoch damit noch nicht eingehend befasst.

Nur hie und da findet man in einigen wissenschaftlichen Werken die Lage der Spectra des Oxyhämoglobins und des Kohlenoxydhämoglobins nach dem einheitlichen Systeme der Wellenlängen an-

¹⁾ Hoppe-Seyler, Virchow's Archiv **23**, 446 (1862); **29**, 233 u. 597 (1864), sowie zahlreiche Abhandlungen in verschiedenen Jahrgängen der Zeitschrift f. physiologische Chemie.

gegeben, jedoch nicht ganz richtig. So gibt zum Beispiel Gamgee in seiner physiologischen Chemie die Lage des Hauptabsorptionsstreifens des Oxyhämoglobins auf λ 579 und die des Nebestreifens auf λ 553,8 an, wogegen nach meinen Messungen die richtige Lage λ 578,1 und λ 541,7 entspricht. Wie der Verfasser zu dem ganz unrichtigen Werthe λ 553,8 gelangt ist, kann ich mir nicht erklären. Verhältnissmässig richtiger ist die Lage des Absorptionsspectrums des Kohlenoxydhämoglobins angegeben.

In einigen Lehrbüchern¹⁾ oder verschiedenen Abhandlungen über den Blutfarbstoff findet man zwar die Lage der Absorptionsspectra des Blutfarbstoffes in Wellenlängen angegeben, diese Angaben beziehen sich aber nur auf seitliche Grenzen der Absorptionsstreifen. Solche Angaben haben jedoch keinen Werth, indem sie sich nur auf eine bestimmte Concentration oder Schichtendicke der beobachteten Lösung beziehen; man kennt ja aber bei der gewöhnlichen spectroscopischen Untersuchung die Concentration der untersuchten Lösung nicht, und wenn auch dieselbe bekannt wäre, wird man doch zur qualitativen spectroscopischen Untersuchung die Lösung auf solche Concentration, auf welche sich die Wellenlängenangaben beziehen, nicht bringen.

Jedem erfahrenen Spectroskopiker ist bekannt, dass die seitlichen Grenzen der Absorptionsstreifen sich durch die Concentration, sowie durch die Schichtendicke der beobachteten Lösung, bedeutend ändern; concentrirte Lösungen oder dicke Schichten der Flüssigkeit liefern breitere Absorptionsstreifen, verdünntere Lösungen oder deren schwache Schichten liefern wieder schmalere Absorptionsstreifen, wodurch die Lage der seitlichen Grenzen sich wesentlich verschiebt; nur das Dunkelheitsmaximum, das heisst die dunkelste Stelle der Streifen, ist von der Concentration, sowie von der Schichtendicke der Lösung, unabhängig und ändert sich nicht.

Ebenso sind die Angaben der Lage der Absorptionsstreifen auf Grund einer willkürlichen Scala für einen anderen Beobachter werthlos.

Oft findet man in den Lehrbüchern ungenau abgebildete Spectra des Blutfarbstoffes, so dass man sich von ihnen keine richtige Vorstellung machen kann. Der Verfasser hat entweder solche Spectra nie gesehen, oder wenn er sie gesehen hat, so hat er sie schlecht gedeutet.

¹⁾ Mac. Kendrick's Physiologie; C. Gänge, Lehrbuch der angewandten Optik.

Es wird zum Beispiel angegeben, dass das alkalische Hämatin nur einen Absorptionsstreifen liefert, selten wird aber dabei bemerkt, dass ein derartiger Streifen sich nach Zusatz von Aethylalkohol bildet, wogegen das alkalische Hämatin in wässriger Lösung zwei Streifen liefert, und erst nach Erwärmen der Flüssigkeit bis zum Sieden ein Absorptionsstreifen entsteht, dessen Charakter und Lage jedoch von dem nach Zusatz von Aethylalkohol gebildeten Streifen verschieden ist. Richtige Angaben fand ich nur vereinzelt.¹⁾

Ob die Lage verschiedener Absorptionsspectra des Blutfarbstoffes unveränderlich ist, unter welchen Umständen sie sich eventuell ändert und ob dieselbe mit den Spectren, die man bei der Untersuchung der alten Blutflecke beobachtet, identisch ist, darüber finde ich in der Litteratur auch keine näheren Angaben.

Da ich diese Frage nicht nur vom wissenschaftlichen Standpunkte, sondern auch vom Standpunkte der gerichtlichen Untersuchung für sehr wichtig halte, stellte ich mir die Aufgabe, die Absorptionsspectra des Blutfarbstoffes von Neuem durchzuarbeiten, ihre Lage möglichst genau zu bestimmen und festzustellen, ob dieselbe constant oder veränderlich ist, und welchen Einflüssen diese Spectra eventuell unterliegen.

Die Resultate dieses Studiums theile ich im Nachfolgenden mit; zum besseren Verständniss und der Uebersichtlichkeit wegen ist es jedoch nöthig, die Bildung verschiedener Absorptionsspectra des Blutfarbstoffes vorher zu besprechen.

Oxyhämoglobin.

Beobachtet man reines, vom Fibrin durch Quirlen befreites Blut in einer Eprouvette mit dem Spectroskope, dessen Spalt mit einem starken Lampenlichte beleuchtet ist, so findet man, dass es das Spectrum bis auf das Roth absorbirt.

Verdünn't man das Blut allmählich mit Wasser, so beobachtet man im Gelb und Gelbgrün einen breiten dunklen Absorptionsstreifen, der sich durch weiteres Verdünnen mit Wasser in zwei nach rechts verzogene Streifen theilt, und zwar befindet sich der starke Hauptstreifen

¹⁾ Lewin, Die spectroscopische Blutuntersuchung. Archiv der Pharmacie 1897, S. 245; diese Zeitschrift **37**, 469. In dieser Publication findet man richtige und getreu abgebildete Spectra, aber auch nur auf Grund einer willkürlichen Scala gezeichnet.

auf λ 578,1, der schwächere, bedeutend nach rechts verzogene Nebestreifen auf λ 541,7; ausserdem beobachtet man eine einseitige Absorption vom Blau ab, welche sich im Violett bedeutend verstärkt (siehe Tafel II, Fig. 1).

Es ist das Absorptionsspectrum des Oxyhämoglobins; seine Lage ist constant, den Hauptstreifen kann man genau messen, weil derselbe schmal und scharf erscheint, dagegen ist der Nebestreifen breit und sein Dunkelheitsmaximum tritt nicht genügend scharf auf.

Methämoglobin.

Lässt man das theilweise mit Wasser verdünnte Blut einige Tage an Luft und Licht stehen und beobachtet man dann das Absorptionsspectrum der genügend verdünnten Flüssigkeit, so findet man, dass sich die Lage der Oxyhämoglobinstreifen zwar nicht ändert, dass sich aber neben denselben links allmählich ein schwacher Absorptionstreifen im Orange auf λ 634,0 bildet, den man in dickerer Schicht oder concentrirterer Lösung deutlicher beobachten kann. Wie bekannt, verwandelt sich das Oxyhämoglobin in Methämoglobin.

Durch längeres Stehen der Flüssigkeit nimmt die Menge des Methämoglobins zu und die Menge des Oxyhämoglobins ab, wodurch die Intensität der Oxyhämoglobinstreifen abnimmt; man beobachtet dann neben den Oxyhämoglobinstreifen ausser dem schon bezeichneten Methämoglobinstreifen auf λ 634,0 noch im Grün einen schwachen Absorptionstreifen auf λ 500,8, welcher ebenfalls dem Methämoglobin gehört (siehe Tafel II, Fig. 2).

Beobachtet man das Absorptionsspectrum des längere Zeit der Luft ausgesetzten und genügend mit Wasser verdünnten Blutes, so findet man, dass alle vier Absorptionstreifen annähernd gleiche Intensität haben, und misst man ihre Lage, so findet man λ 634,0, λ 578,1, λ 541,7 und λ 500,8; es bleibt daher die Lage des Oxy- und Methämoglobins unverändert.

Setzt man zu einer solchen Lösung einen Tropfen verdünnten Ammoniaks, so verschwindet das Absorptionsspectrum des Methämoglobins, und das Absorptionsspectrum des Oxyhämoglobins verstärkt sich; das Methämoglobin verwandelt sich nämlich in Oxyhämoglobin, wodurch die Verstärkung des Oxyhämoglobinspectrums natürlich erscheint.

Fig 11.

In der Figur 11 (erste Zeile) ist das Absorptionsspectrum des einige Tage alten Blutes abgebildet; in derselben Figur (Zeile 2) findet man das Absorptionsspectrum der Lösung, welche durch Auslaugen des drei Monate alten Blutfleckes mit Wasser erhalten wurde. Dieses Absorptionsspectrum erinnert einigermaassen an das Absorptionsspectrum des Hämatoporphyrins in alkalischer Lösung. Man sieht, dass der Hauptstreifen des Oxyhämoglobins auf λ 578,1 schwächer erscheint als sein Nebestreifen auf λ 541,7. Die Lage der Streifen ist jedoch unverändert.

Lässt man das Blut an Licht und Luft faulen und beobachtet man dann das Absorptionsspectrum der geeignet verdünnten Flüssigkeit, so sieht man anstatt der Oxyhämoglobin- und Methämoglobinstreifen zwei ziemlich undeutliche Absorptionsstreifen, und zwar einen stärkeren Streifen auf λ 540,0 und einen schwächeren Streifen auf λ 577,0, ausserdem eine starke einseitige Absorption im Indigo und Violett.

Hämoglobin.

Setzt man zu dem theilweise mit Wasser verdünnten Blute gelbes Schwefelammonium oder Stoke's Reagens hinzu, so entsteht aus dem Oxyhämoglobin Hämoglobin, welches im Spectrum einen breiteren, nicht scharfen und nach links verzogenen Streifen auf λ 554,7 liefert; das Dunkelheitsmaximum dieses Absorptionsstreifens tritt nicht genügend scharf auf (siehe Tafel II, Fig. 3).

Links von dem Absorptionsstreifen des Hämoglobins bildet sich manchmal ein schwacher Absorptionsstreifen auf λ 619,8, welcher dem Sulfhämoglobin angehört, (siehe Seite 514) und den man in einer dickeren Schicht oder bei concentrirterer Lösung deutlicher beobachtet. Ausserdem sieht man im Indigo und Violett eine einseitige Absorption.

Die Lage des Absorptionsstreifens des Hämoglobins ändert sich auch nach längerem Stehen der Lösung nicht.

Das Hämoglobinspectrum bildet sich nur dann, wenn man zur Reaction altes, gelbes Schwefelammonium verwendet oder ein solches, welches durch vollständige Sättigung des Ammoniaks mit Schwefelwasserstoff bereitet wurde. Setzt man nämlich zum verdünnten Blute Schwefelammonium, welches eine grössere Menge freien Ammoniaks enthält, hinzu, so entsteht kein Hämoglobinspectrum, sondern das Absorptionsspectrum des reducirten Hämatins.

Hämatin.

Lässt man auf das Blut verdünnte Mineralsäuren oder Oxalsäure, Essigsäure, Weinsäure wirken, so spaltet sich Oxyhämoglobin in saures Hämatin und Albumin. Die Lösung liefert dann ein Absorptionsspectrum, welches aus einem breiten Absorptionsstreifen im Grün, einem engeren Absorptionsstreifen im Roth auf λ 654,2 und einer einseitigen Absorption im Blau, Indigo und Violett besteht. Verdünnt man die Lösung mit Wasser, so trennt sich der Absorptionsstreifen im Grün in zwei undeutliche Streifen auf λ 554,8 und λ 517,7, wogegen der Absorptionsstreifen auf λ 654,2 verschwindet (siehe Tafel II, Fig. 4).

Nach zwölfstündigem Stehen der Flüssigkeit verschieben sich die Absorptionsstreifen nach links, und zwar der Streifen im Roth auf λ 665,5, die Streifen im Grün auf λ 565,8 und λ 526,7.

Durch Einwirkung von Alkalien auf das Blut, zum Beispiel von concentrirter Kalilauge (verdünnte Alkalien wirken nur allmählich), bildet sich alkalisches Hämatin.

Setzt man zu dem theilweise mit Wasser verdünnten Blute concentrirte Kalilauge in der Kälte zu, so beobachtet man im Spectrum der Flüssigkeit zwei nicht sehr scharfe Absorptionsstreifen auf λ 582,0 und λ 546,5 und eine einseitige Absorption vom Grün in's Violett (siehe Tafel II, Fig. 5).

Erwärmt man die Lösung fast zum Sieden und verdünnt man dann mit Wasser, so beobachtet man nach Abkühlung der Lösung nur einen schwachen, nach links verzogenen Absorptionsstreifen auf λ 580,7, welcher aber bei einer verdünnteren Lösung nicht zum Vorschein kommt (siehe Fig. 12, 3). Verdünnt man das mit Kalilauge erhitzte Blut anstatt mit Wasser mit Aethylalkohol, so erhält man einen

intensiveren und nach rechts verzogenen Absorptionsstreifen regelmässig auf λ 598,8 (siehe Tafel II, Fig. 6). Dieser Absorptionsstreifen hat jedoch keine constante Lage, sondern dieselbe schwankt gewöhnlich zwischen λ 600,2— λ 597,4.

Das einmal gebildete Absorptionsspectrum des alkalischen Hämatins ändert sich auch nach längerem Stehen nicht.

Eine interessante, wohl bekannte, jedoch spectroscopisch nicht eingehend untersuchte Erscheinung ¹⁾ beobachtet man unter folgenden Umständen. Setzt man zu dem theilweise mit Wasser verdünnten Blut in einer Eprouvette eine kleinere Menge concentrirter Kalilauge zu, so liefert die Lösung die zwei schon oben erwähnten Absorptionsstreifen auf λ 582,0 und λ 546,5 (siehe Fig. 12, 1).

Fig 12.

Erwärmt man nun die Lösung vorsichtig bis zu 70 ° C. und beobachtet man dieselbe gleichzeitig mit dem Spectroskope, so sieht man, wie beide Absorptionsstreifen allmählich verschwinden, und sich ein neues intensives Absorptionsspectrum im Grün bildet mit einem scharfen Absorptionsstreifen auf λ 559,1 und einem schwachen, schmalen Absorptionsstreifen auf λ 529,2 (Fig. 12, 2); dieses Absorptionsspectrum

¹⁾ C. Gänge, Lehrbuch der angewandten Optik, S. 390.

stimmt nach seiner Form und Lage vollkommen mit dem Absorptionsspectrum des reducirten Hämatins.

Die Bildung dieses Spectrums erklärt man sich dadurch, dass durch die Einwirkung des Kalihydrates auf das im Blute anwesende Albumin sich aus demselben Schwefel abspaltet, es bildet sich eine geringe Menge Kaliumsulfid, welches das gebildete Hämatin reducirt.

Den Vorgang dieser spectroscopischen Erscheinung beobachtet man bequem, wenn man die Eprouvete mit dem mit Kalilauge versetzten und passend verdünnten Blute vor den Spalt des beleuchteten Spectroskopes stellt, in die Eprouvete ein dünnes Thermometer bringt und dieselbe mit einer kleinen Flamme allmählich erwärmt; zum Schutze der Eprouvete stellt man zwischen dieselbe und die Flamme eine dünne Asbestplatte.

Sobald die Temperatur 60° C. erreicht, tritt sowohl die chemische als auch die spectroscopische Reaction auf und bei 70° C. erscheint das neugebildete Absorptionsspectrum des reducirten Hämatins intensiv. Schüttelt man nun die Flüssigkeit, so verschwindet das Absorptionsspectrum, und es erscheint ein schwacher Absorptionsstreifen des Hämatins auf λ 580,7 (siehe Fig. 12, 3), nämlich derselbe Streifen, welcher sich bildet, wenn man das Blut mit Kalilauge fast zum Sieden erhitzt.

Setzt man zu dieser Lösung Aethylalkohol, so bildet sich der Absorptionsstreifen des Hämatins auf λ 599 (siehe Tafel II, Fig. 6).

Dieselbe spectroscopische Reaction, welche durch gelindes Erwärmen des Blutes mit Kalilauge schnell verläuft, beobachtet man, wenn man das mit Kalilauge versetzte Blut längere Zeit ohne Erwärmen stehen lässt.

Nach ein- bis zweistündigem Stehen der Lösung verschwinden die Streifen auf λ 582,0 und 546,5, und es erscheint das Absorptionsspectrum des reducirten Hämatins mit dem Hauptstreifen auf λ 559,1 und dem Nebestreifen auf λ 529,2; oft bemerkt man neben den genannten Streifen auch noch links einen schwachen Absorptionsstreifen auf λ 583,5 (siehe Fig. 12, 4).

Schüttelt man die Lösung, so verschwinden die eben bezeichneten Absorptionsstreifen und es erscheinen wieder die ursprünglichen Absorptionsstreifen auf 582,0 und 546,5 (Fig. 12, 1), manchmal auch nur der Absorptionsstreifen auf λ 580,7 (Fig. 12, 3).

Hämochromogen.

Setzt man zur Lösung des sauren oder alkalischen Hämatins Schwefelammonium, so erhält man in beiden Fällen reducirtes Hämatin (Hämochromogen), welches ein Absorptionsspectrum liefert, das aus einem scharfen Hauptstreifen auf λ 559,1 und einem schmalen, nach rechts verzogenen Nebenstreifen auf λ 529,2 besteht; ausserdem beobachtet man eine einseitige Absorption vom Blau in's Violett (siehe Tafel II, Fig. 7).

In stark verdünnten Lösungen beobachtet man jedoch nur den Hauptstreifen auf λ 559,1.

Nach einige Stunden dauerndem Stehen der Flüssigkeit verschieben sich die Absorptionsstreifen allmählich nach rechts, bis sie endlich nach zwölf Stunden ihre constante Lage erreichen und sich weiter nicht mehr ändern; dann findet man den Hauptstreifen auf λ 554,7 und den Nebenstreifen auf λ 525,8.

Der Hauptstreifen ist schmal und scharf, so dass man ihn genau messen kann, wogegen der Nebenstreifen bedeutend schwächer erscheint.

Hämatoporphyrin.

Setzt man zum Blute concentrirte Schwefelsäure und erwärmt man vorsichtig kurze Zeit, so bildet sich aus dem Oxyhämoglobin unter gleichzeitiger Abspaltung des Eisens Hämatoporphyrin, welches, wie bekannt, ein anderes Absorptionsspectrum in saurer und ein anderes Absorptionsspectrum in alkalischer Lösung liefert.

Verdünt man nun diese Lösung mit Wasser (Verdünnung mit concentrirter Schwefelsäure bietet keinen Vortheil) und beobachtet man sie mit dem Spectroskope, so sieht man im Gelb einen scharfen Absorptionsstreifen, neben diesem links einen schwachen Absorptionsstreifen und eine einseitige Absorption vom Blau in's Violett (siehe Tafel II, Fig. 8).

Bei Beobachtung einer concentrirteren Lösung oder einer dickeren Schicht erscheinen beide Streifen zu einem Streifen zusammengefloßen.

Die Lage der Absorptionsstreifen des Hämatoporphyrins ist jedoch nicht constant, sondern von der Temperatur, bei welcher das Hämatoporphyrin bereitet wurde, von dem verwendeten Materiale (frisches Blut, präparirtes Hämoglobin, altes Blut), sowie von der Zeitdauer, während welcher die Schwefelsäure eingewirkt hat, abhängig. Es schwankt

nämlich der Hauptstreifen zwischen λ 558—553, der Nebenstreifen zwischen λ 604,5—599,0. Je höher bis zu einer bestimmten Grenze das Blut mit Schwefelsäure erwärmt wird, desto mehr ist das Absorptionsspectrum des Hämatoporphyrins in den angegebenen Grenzen gegen Roth verschoben.

Setzt man nun zur sauren Lösung des Hämatoporphyrins einen kleinen Ueberschuss von Kalilauge und beobachtet man dann die Lösung mit dem Spectroskope, so sieht man ein neues Absorptionsspectrum, welches aus vier verschiedenen, intensiven Absorptionsstreifen besteht; ihre Lage ist jedoch auch nicht constant, sondern sie variirt, und zwar die des intensivsten Absorptionsstreifens zwischen λ 511—505,0, die der übrigen schwächeren Streifen zwischen λ 544,5—538,0, λ 577,0—570,5, λ 626—620,5 (siehe Tafel II, Fig. 9).

Sulfhämoglobin.

Leitet man in das mit Wasser verdünnte Blut gleichzeitig Schwefelwasserstoff und Luft ein, so färbt sich das Blut grünlich, und es bildet sich Sulfhämoglobin. Beobachtet man diese geeignet verdünnte Flüssigkeit mit dem Spectroskope, so sieht man neben dem schwachen Absorptionsspectrum des Oxyhämoglobins einen schärferen, schmalen Absorptionsstreifen auf λ 619,8 (siehe Tafel II, Fig. 10).

Dieser Absorptionsstreifen ist identisch mit dem Absorptionsstreifen, welcher sich nach Zusatz von Schwefelammonium zum Blute neben dem Absorptionsspectrum des Hämoglobins bildet.

Einige der eben beschriebenen spectroscopischen Reactionen des Blutfarbstoffes verwendet man, wie bekannt, zum Nachweise des Blutes auf verschiedenen Stoffen, und zwar ist es in erster Reihe das Absorptionsspectrum des Blutes selbst; noch besser eignet sich aber zum Nachweise des Blutes die spectroscopische Reaction auf reducirtes Hämatin und Hämatoporphyrin in saurer Lösung: beide spectroscopischen Reactionen sind nämlich weit empfindlicher als die spectroscopische Reaction des Blutes selbst. Man verwendet diese Reactionen vorzugsweise in den Fällen, wo es sich um altes Blut handelt oder wo man nur eine geringe Menge Material zur Verfügung hat.

Nach den Untersuchungen, welche ich ausgeführt habe, ist die spectroscopische Reaction des reducirten Hämatins die empfindlichste und zum Nachweise des Blutes geeignetste, besonders, wenn man

die Lage der Absorptionsstreifen, welche sich genau messen lassen, feststellt.

Um mich zu überzeugen, ob die Lage der Absorptionsstreifen verschiedener Absorptionsspectra des Blutfarbstoffes unverändert bleibt, wenn man ältere Blutflecke untersucht, bespritzte ich einen Baumwollstoff und ein Messer mit Blut, liess es an der Luft eintrocknen und untersuchte die Blutflecken in Zwischenräumen von je einer Woche.

Zu dem Zwecke wurde der Blutfleck mit Wasser ausgelaut, und die Lösung direct spectroscopisch untersucht; zu einem Theile der Lösung wurde etwas Kalilauge und dann Schwefelammonium zugesetzt, und die Lage des gebildeten Absorptionsspectrums des Hämochromogens gemessen; ein anderer Theil der wässerigen Lösung wurde in einer Porzellanschale auf dem Wasserbade abgedampft, zum Rückstande concentrirte Schwefelsäure zugesetzt und entweder auf dem Wasserbade oder direct mit einer kleinen Flamme erwärmt, bis die Flüssigkeit im reflectirten Lichte grünlich erschien. Dann wurde die Flüssigkeit abgekühlt und in eine kleine Menge kalten Wassers gegossen. Die Lösung wurde spectroscopisch untersucht und die Lage der Absorptionsstreifen gemessen.

Die durch Auslaugen des einige Tage alten Blutfleckes mit Wasser erhaltene Lösung lieferte neben dem Absorptionsspectrum des Oxyhämoglobins auch schwache Absorptionsstreifen des Methämoglobins.

Mit der Zeit nahm das Methämoglobin zu und das Oxyhämoglobin ab, so dass nach Auslaugen des drei Monate alten Blutfleckes die Lösung vier fast gleich intensive Absorptionsstreifen lieferte (siehe Fig. 11, 2). Die durch Auslaugen des vier Monate alten Blutfleckes erhaltene wässerige Lösung lieferte intensive Absorptionsstreifen des Methämoglobins, wogegen die Absorptionsstreifen des Oxyhämoglobins nur schwach erschienen. Die Messung der Lage der Absorptionsstreifen ergab λ 634,4, λ 578,1, λ 541,7 und λ 500,8, also eine vollkommene Uebereinstimmung mit der Lage des Absorptionsspectrums des Oxy- und Methämoglobins.

Das Absorptionsspectrum des reducirten Hämatins, welches sich nach Zusatz des Schwefelammoniums zu der durch Auslaugen des eine Woche bis sechs Monate alten Blutfleckes erhaltenen Lösung gebildet hatte, blieb in seiner Lage immer unverändert, jedesmal wurde der Hauptstreifen auf λ 559,1, der Nebenstreifen auf λ 529,2 gefunden.

Untersucht man mehr als sechs Monate alte Blutflecke, so bemerkt man nach Zusatz von Alkali und Schwefelammonium zur Blutlösung regelmässig neben den Absorptionsstreifen des Hämochromogens auch noch links einen schwachen Absorptionsstreifen auf λ 583,5, welcher jedoch in kurzer Zeit verschwindet (siehe Fig. 12, 4).

Aehnlich war es mit der Probe auf Hämatoporphyrin in saurer Lösung; das Absorptionsspectrum war scharf, seine Lage variirte auch in den bei Hämatoporphyrin bezeichneten Grenzen (siehe Seite 514).

Diese übereinstimmenden Resultate sind wieder ein Beweis, dass man Blut in älteren Blutflecken sicher nachweisen kann, wozu das Absorptionsspectrum des reducirten Hämatins das geeignetste ist.

Es ist bekannt, dass in alten Blutflecken oder in einigen Fällen sich das Hämoglobin so ändert, dass es unlöslich wird, und dass man das Blut nicht so leicht spectroscopisch nachweisen kann. In diesen Fällen wird nach Hoffmann ein solcher Blutfleck, welcher unlöslich geworden ist, mit concentrirter Kaliumcyanidlösung behandelt, wodurch sich aus Hämoglobin Hämatin bildet, welches sich löst. Setzt man nachher zu einer solchen Lösung Schwefelammonium, so bildet sich reducirtes Hämatin mit bekanntem Absorptionsspectrum.

Um festzustellen, ob die Lage dieses Absorptionsspectrums mit dem Absorptionsspectrum des reducirten Hämatins, welches nach Zusatz von Kalilauge und Schwefelammonium zum Blut entsteht, übereinstimmt, behandelte ich einen alten Blutfleck mit Kaliumcyanidlösung. Die erhaltene, braungelbe, mit Wasser genügend verdünnte Lösung, lieferte im gelben Felde des Spectrums einen breiteren, intensiven Absorptionsstreifen auf λ 550 und eine einseitige Absorption im Blau und Violett (siehe Fig. 13).

Fig. 13.

Wurde nun zu einer solchen Lösung eine kleine Menge Schwefelammonium zugesetzt, so bildete sich das Absorptionsspectrum des reducirten Hämatins; die Messung der Lage der Absorptionsstreifen ergab jedoch, dass anfangs die Streifen mit der normalen Lage der

Streifen des reducirten Hämatins nicht übereinstimmen, sondern mehr nach links verschoben erschienen, und zwar der Hauptstreifen auf λ 567,5, der Nebestreifen auf λ 537,5; bald aber rückte das Absorptionsspectrum allmählich nach rechts und erreichte je nach der Menge des zugesetzten Schwefelammoniums in 15—30 Minuten die Lage des normalen Spectrums des reducirten Hämatins.

Wurde aber zu der durch Auslaugen des Blutfleckes mit Kaliumcyanidlösung erhaltenen Lösung Schwefelammonium im Ueberschuss gesetzt, so bildete sich das Absorptionsspectrum des reducirten Hämatins sofort in normaler Lage. Es empfiehlt sich daher zu einer solchen Lösung, welche wir derartig spectroscopisch auf Blut untersuchen, einen Ueberschuss von Schwefelammoniumlösung zuzusetzen oder die früher mit etwas Wasser verdünnte Lösung direct mit Schwefelammonium weiter zu verdünnen.

Wie aus den eben angeführten Versuchen hervorgeht, ist nur die Lage des Absorptionsspectrums des Oxyhämoglobins und unter Umständen auch das Absorptionsspectrum des reducirten Hämatins constant, die übrigen Absorptionsspectra des Blutfarbstoffes variiren jedoch mehr oder weniger in ihrer Lage.

Kohlenoxydhämoglobin.

Hoppe-Seyler und L. Mayer haben nachgewiesen, dass sich Kohlenoxyd mit dem Hämoglobin zu Kohlenoxydhämoglobin verbindet, wodurch das Blut die Fähigkeit verliert, den Sauerstoff zu übertragen und die zum Leben nöthige Auswechslung der Gase zu vermitteln.

Wie bekannt, ist das Absorptionsspectrum des Blutes, auf welches Kohlenoxydgas eingewirkt hat, mehr nach rechts verschoben als das Absorptionsspectrum des reinen Oxyhämoglobins und man kann auf Grund dieser Erscheinung die Blutvergiftung mit Kohlenoxydgas nachweisen.

In welcher Art diese Verschiebung des Absorptionsspectrums stattfindet, wurde auf Grund der genauen spectroscopischen Messung noch nicht festgestellt. Ich habe mich daher mit der Einwirkung des Kohlenoxydgases auf das Blut näher beschäftigt und auf Grund der spectroscopischen Messungen einige neue interessante Erscheinungen beobachtet.

Leitet man in theilweise mit Wasser verdünntes Blut Kohlenoxydgas in bestimmten Zeitintervallen ein und beobachtet man die Ab-

sorptionsspectra der einzelnen Phasen, so bemerkt man, dass sich zwar die Form des Absorptionsspectrums im Ganzen nicht ändert, dass sich aber die Absorptionsstreifen nach rechts verschieben, anfangs schnell, und zwar der Hauptstreifen von λ 578,1 auf 575,7, dann langsamer auf λ 572,0, sodann nur allmählich nach längerem Einleiten des Kohlenoxydgases auf λ 571,0; gleichzeitig verschiebt sich der Nebestreifen bis auf λ 537,5 (siehe Tafel II, Fig. 11).

Die zuletzt bezeichnete Lage erreicht das Absorptionsspectrum nur dann, wenn das Oxyhämoglobin vollständig in Kohlenoxydhämoglobin umgewandelt wurde. Lässt man eine solche Lösung längere Zeit stehen, so verschiebt sich das Absorptionsspectrum wieder etwas zurück, und dann findet man den Hauptstreifen auf λ 572,0, den Nebestreifen auf λ 538,1.

Setzt man zu dieser Lösung des Kohlenoxydhämoglobins Schwefelammonium, so ändert sich weder die Form noch die Lage der Absorptionsstreifen, zum Unterschiede von dem Absorptionsspectrum des Oxyhämoglobins, welches nach Zusatz von Schwefelammonium in Hämoglobin umgewandelt wird und nur einen Absorptionsstreifen auf λ 554,7 liefert.

Setzt man aber Schwefelammonium zu Blut, auf welches Kohlenoxydgas nur theilweise eingewirkt hat, so verschiebt sich das Absorptionsspectrum ohne Aenderung der Form um so mehr nach rechts, je kürzere Zeit das Kohlenoxydgas auf das Blut eingewirkt hat.

Es steht also die durch den Einfluss des Schwefelammoniums hervorgerufene Verschiebung der Absorptionsstreifen des Oxyhämoglobins, auf welches Kohlenoxydgas verschiedene Zeit eingewirkt hat, im umgekehrten Verhältnisse zu der Zeitdauer, in welcher das Kohlenoxydgas auf das Blut einwirkte.

Wie schon erwähnt, ändert sich die Lage der Kohlenoxydhämoglobinstreifen nach Zusatz des Schwefelammoniums nur dann nicht, wenn das Oxyhämoglobin vollständig zu Kohlenoxydhämoglobin umgewandelt wurde; dieser Umstand kommt aber, wie bekannt, bei der Blutvergiftung mit Kohlenoxydgas nicht vor.

Die Absorptionsstreifen des Kohlenoxydhämoglobins fließen aber nach Zusatz von Schwefelammonium nicht zusammen, wenn auch das Kohlenoxydgas nur kurze Zeit auf das Blut einwirkte.

Um festzustellen, welche spectroscopischen Aenderungen des Absorptionsspectrums beim Einflusse des Kohlenoxydgases auf das Blut im

lebenden Thiere vorkommen, habe ich die Versuche mit Meerschweinchen vorgenommen.

Zu diesem Zwecke wurde das Versuchsthier unter eine geräumige Glasglocke, welche unten mit einer Platte verschlossen war, gebracht. Die in dem oberen Theile der Glasglocke befindliche Oeffnung wurde mit einem Kautschukstöpsel verschlossen; der Stöpsel wurde mit zwei Röhrchen zum Ein- und Ableiten der Luft versehen. In die Glocke wurde nun die Luft, welche rund 10 % Kohlenoxydgas enthielt, eingeleitet. Sobald sich bei dem Thiere die Krampfsymptome zeigten, was nach Verlauf von einigen Minuten eintrat, wurde das Thier schnell aus der Glocke gebracht, demselben unter Beobachtung der nöthigen Vorsichtsmaassregeln eine geringe Menge Blut entnommen und dasselbe sofort spectroscopisch untersucht.

Das Versuchsthier wurde wieder unter die Glocke gebracht und die kohlenoxydhaltige Luft wieder eingeleitet. Nach fünfzehn Minuten war das Thier todt. Das vergiftete Thier wurde aus der Glocke gebracht, demselben das Blut aus dem Herzen entnommen und spectroscopisch untersucht.

Der Versuch wurde viermal wiederholt; im vierten Falle wurde das Thier direct mit kohlenoxydgashaltiger Luft vergiftet ohne vorherige Entnahme des Blutes im Stadium der Krämpfe, und das todtete Thier wurde sechs Stunden liegen gelassen. Nach Verlauf dieser Zeit wurde dem Thiere das Blut aus dem Herzen entnommen und spectroscopisch untersucht.

In allen Fällen wurde eine interessante Uebereinstimmung der Lage der Absorptionsstreifen gefunden, und zwar ergab die Messung der Verschiebung des Hauptstreifens λ 578,1 und des Nebenstreifens λ 541,7 folgende Resultate:

im Stadium der Krämpfe:		nach dem Tode:		
	Hauptstreifen	Nebenstreifen	Hauptstreifen	Nebenstreifen
1)	λ 576,0	λ 540,0	λ 572,5	λ 538,3
2)	λ 576,0	λ 540,0	λ 572,7	λ 538,5
3)	λ 576,0	λ 540,0	λ 573,0	λ 538,7
4)	—	—	λ 572,7	λ 538,5

Aus diesen Versuchen geht hervor, dass bei dem Meerschweinchen das Absorptionsspectrum des Blutes in diesen zwei Stadien immer eine bestimmte Lage aufweist, und dass die Rückverschiebung des Absorptions-

spectrums auch nach längerem Liegen der Leiche, wie es der vierte Versuch zeigt, nicht stattfindet.

Diese Versuche bestätigen auch die bekannte Thatsache, dass bei Thieren der Tod eher eintritt, als alles Oxyhämoglobin zu Kohlenoxydhämoglobin umgewandelt werden kann; denn wie schon gezeigt wurde, rückt der Hauptstreifen des Oxyhämoglobins nach vollständiger Umwandlung zu Kohlenoxydhämoglobin bis auf λ 571,0, wogegen der Tod schon bei Verschiebung des Hauptstreifens auf λ 572,5 eintritt.

Während sich die Lage des Absorptionsspectrums des reinen Kohlenoxydhämoglobins nach Zusatz von Schwefelammonium nicht ändert, verschiebt sich das Absorptionsspectrum der Lösung, welche ein Gemisch von Kohlenoxydhämoglobin und Oxyhämoglobin enthält, nach Zusatz von Schwefelammonium um so mehr nach rechts, je mehr Oxyhämoglobin die Lösung enthält, und umgekehrt ist diese Verschiebung geringer, je mehr Kohlenoxydhämoglobin die Lösung enthält.

Wurde nun zu dem im Krampfstadium des Thieres entnommenen Blute Schwefelammonium zugesetzt, so rückte der Hauptstreifen von λ 576,0 auf λ 569,5 der Nebestreifen von λ 540,0 auf λ 537,0.

Wurde zum Blute des mit Kohlenoxydgas vergifteten Thieres Schwefelammonium zugesetzt, so rückte der Hauptstreifen von λ 572,5 auf λ 570,7, der Nebestreifen von λ 538,3 auf λ 537,5, also weniger nach rechts als im ersten Falle, da das Blut längere Zeit der Einwirkung des Kohlenoxydgases ausgesetzt wurde.

Im ersten Falle beträgt die Verschiebung 6,5 Wellenlänge, im zweiten Falle nur 1,8 Wellenlänge.

Diese Erscheinung kann man sich auf Grund der gegenseitigen Wirkung von zwei Absorptionsspectren erklären.

Je nach der Einwirkung des Kohlenoxydgases auf Blut enthält dasselbe verschiedene Mengen des Kohlenoxydhämoglobins und des Oxyhämoglobins. Das Absorptionsspectrum, welches die Lösung eines solchen Gemisches liefert, ist ein gemischtes Spectrum. Man sollte eigentlich zwei Absorptionsspectra sehen, das Absorptionsspectrum des Kohlenoxydhämoglobins und das des Oxyhämoglobins; beide Spectren fließen jedoch zusammen, wie es oft bei den Spectren organischer Farbstoffe

mit einander nahe liegenden Absorptionsstreifen und gleichem Chromophor der Fall ist.¹⁾

Die Lage eines solchen Absorptionsspectrums ist als Resultat der gegenseitigen Wirkung beider Stoffe, respective beider Absorptionsspectra, zu betrachten. Das Absorptionsspectrum eines solchen Gemisches verschiebt sich zur Lage des Spectrums des Stoffes hin, welcher in der Lösung obwaltet.

Setzt man zu einer solchen Lösung, welche ein Gemisch von Kohlenoxydhämoglobin und Oxyhämoglobin enthält, Schwefelammonium, so bleibt zwar das Kohlenoxydhämoglobin unverändert, aber das in der Lösung vorhandene Oxyhämoglobin wird durch Schwefelammonium reducirt, und es sollte der Absorptionsstreifen des Hämoglobins auf λ 554,7, daher von der Lage des Kohlenoxydhämoglobinspectrums bedeutend rechts zum Vorschein kommen.

In diesem Falle findet aber wieder die gegenseitige Wirkung beider Spectra auf einander statt, es bilden sich jedoch nicht beide Absorptionsspectra neben einander, sondern das gebildete Hämoglobin bringt das Absorptionsspectrum des Kohlenoxydhämoglobins aus seiner Lage und trachtet, dasselbe in die Lage des Absorptionsstreifens des Hämoglobins λ 554,7 zu verschieben; diese Verschiebung des Absorptionsspectrums des Kohlenoxydhämoglobins ist natürlich dann um so grösser, je mehr Hämoglobin die Lösung enthält und umgekehrt.

Die Absorptionsstreifen des Kohlenoxydhämoglobins fliessen jedoch nach Zusatz von Schwefelammonium nicht zusammen, wenn auch das Kohlenoxydgas auf das Blut nur kurze Zeit einwirkt, da das Schwefelammonium auf das gebildete Kohlenoxydhämoglobin keinen Einfluss ausübt.

Diese Verschiebung des Blutabsorptionsspectrums durch Kohlenoxydgas kann man nicht nur zur Feststellung des Grades der Vergiftung benutzen, sondern auch, wie bekannt, zum Nachweise des Kohlenoxydgases in der Luft verwenden. Mischt man bestimmte Mengen von Blut bestimmte Zeit mit einem bestimmten Volumen der kohlenoxydgashaltigen Luft, so kann man nach der Grösse der Verschiebung

¹⁾ Siehe „Nachweis der Metallsalze mittelst der Absorptionsspectralanalyse unter Verwendung von Alkanna“, diese Zeitschrift **39**, 424.

Auf diese Erscheinung komme ich noch in einer separaten Abhandlung zurück.

des Blutspectrums (eventuell unter Zusatz von Schwefelammonium) feststellen, ob die Luft wenig oder viel Kohlenoxydgas enthält.

Die neuesten Spectroskope, wohl auch die Handspectroskope, sind anstatt mit einer gewöhnlichen photographirten Scala mit einer Wellenlängenscala versehen, und man kann daher die Lage der Absorptionsspectra direct in Wellenlängen feststellen und die Resultate mit der angegebenen Lage der Absorptionsspectra des Blutfarbstoffes direct ohne jede Umrechnung vergleichen. Es ist also zur annähernden Bestimmung der Lage des Spectrums in Wellenlängen nicht nöthig, einen grossen Apparat oder ein Spectrometer zu besitzen.

Auf einen Umstand muss ich jedoch aufmerksam machen. Die hellen Striche der Scala sind in dem mittleren hellen Theile des Spectrums nicht gut sichtbar und man kann auch die Lage eines Absorptionsstreifens auf einer solchen Scala nicht direct genau ablesen. Zur genauen Messung der Lage des Dunkelheitsmaximums eines Absorptionsstreifens ist ein Fadenkreuz im Fernrohre nöthig.

In diesem Falle misst man die Lage der Streifen mittelst der Wellenlängenscala auf folgende Weise. Ohne die Scala vorher zu beleuchten, stellt man das Fadenkreuz genau auf die dunkelste Stelle des Absorptionsstreifens durch Drehung des Fernrohres mittelst der entsprechenden Schraube; dann dreht man die Lampe, welche den Spalt des Spectroskopes beleuchtet, seitlich, damit das Spectrum des Lampenlichtes aus dem Felde des Fernrohres verschwindet, beleuchtet die Wellenlängenscala im Scalenrohre und bestimmt die Lage des Fadenkreuzes in Bezug auf die Wellenlängenscala. Auf diese Weise erhält man viel genauere Resultate als durch directes blosses Abschätzen der Lage des Absorptionsstreifens auf der Scala, vorausgesetzt, dass diese richtig ist.

Ich betrachte die Messung der Lage der Absorptionsspectra des Blutfarbstoffes auf Grund des einheitlichen Systems der Wellenlängen als sehr wichtig und, wie wir gesehen haben, bei der Untersuchung des Kohlenoxydhämoglobinspectrums als von Vortheil.

Die Stoffe, welche auf Blut untersucht werden, sind grösstentheils mit künstlichen Farbstoffen gefärbt, und es kann geschehen, dass durch Auslaugen des betreffenden Stoffes mit Wasser oder einem Lösungsmittel ein Theil des Farbstoffes in die Lösung übergeht und derselbe ein blutähnliches Absorptionsspectrum liefern kann. Während ich bei

meinem Studium der Spectra organischer Farbstoffe fast alle bekannten Farbstoffe untersuchte, fand ich bisher kein einziges (!) Absorptionsspectrum, welches nach seiner Lage einem der bekannten Absorptionsspectra des Blutfarbstoffes entsprechen würde.

Ich bin auch der Ansicht, dass es besser wäre, sämtliche Resultate bei der Untersuchung des Blutes überhaupt auf Grund der Wellenlängen anzugeben, wie es die moderne und wissenschaftliche spectroscopische Untersuchung erfordert, und nicht nach der veralteten Gewohnheit auf Grund der Linienlage der Fraunhofer'schen Hauptlinien.

Ich theile die Resultate meines Studiums in der Hoffnung mit, dass diese Arbeit einen Anlass zum weiteren Studium dieser wichtigen und interessanten Materie gibt.

Bestimmung der in natürlichen Wassern gelösten Gase.

Von

L. W. Winkler.

(Mittheilung aus dem Universitäts-Laboratorium des Herrn Prof. C. v. Than, Budapest.)

Die in Mineralwassern enthaltene Gesamt-Kohlensäure kann nach dem folgenden gasometrischen Verfahren genau bestimmt werden:

In einen Kolben von circa 250 cc Inhalt, an welchen ein Rohr von 5—6 mm Durchmesser angeschmolzen ist, gibt man einige Platinschnitzel und 50 cc verdünnte Salzsäure. Auf die dünne Röhre des Kolbens wird nun ein Stückchen schwarzen Kautschuk-Schlauches gezogen und, nachdem die Salzsäure einige Minuten lebhaft im Sieden erhalten wurde, der Kautschuk-Schlauch mit einem Bunsen'schen Quetschhahn abgesperrt. Nachdem man das im offenen Theile des Kautschuk-Schlauchs haftende Wasser mit Löschpapier entfernt hat, bestimmt man nach vollständigem Abkühlen das Gewicht des Kolbens. Der so adjustirte Kolben wird zur Mineral-Quelle mitgenommen. Dort steckt man in das Kautschuk-Röhrchen eine dickwandige, jedoch enge, 1—2 mm weite, gebogene Glasröhre, welche bis zu gehöriger Tiefe in die Mineral-Quelle eingetaucht wird (Figur 14). Beim behutsamen Oeffnen des Quetschhahnes dringt das Mineral-Wasser rasch in den fast