

## Beiträge zur Kenntnis des Blutfarbstoffs.

Von  
E. Letsche.

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

(Der Redaktion zugegangen am 24. November 1911.)

Vor etwas mehr als Jahresfrist habe ich an dieser Stelle<sup>1)</sup> die Resultate einer Untersuchung über die Veränderung von Hämoglobinlösungen unter dem Einfluß von Hydrazin mitgeteilt. Die für diesen Zweck notwendigen Bestimmungen der Konzentrationen der angewandten Hämoglobinlösungen hatte ich mit Hilfe des Hüfnerschen Spektrophotometers ausgeführt, unter Zugrundelegung des Absorptionsverhältnisses für Oxyhämoglobin, wie es E. E. Butterfield an dem im Tübinger physiologisch-chemischen Institut befindlichen Hüfner-Spektrophotometer festgestellt hatte.<sup>2)</sup>

Das Absorptionsverhältnis ist nach Vierordt<sup>3)</sup> definiert als das Verhältnis von Konzentration ( $c$ ) einer Lösung zu ihrem Extinktionskoeffizienten ( $\epsilon$ ), also  $A = \frac{c}{\epsilon}$ . Der Extinktionskoeffizient einer Lösung ist, abgesehen von der Natur der untersuchten Substanz und der Konzentration, abhängig von der Stärke des auffallenden Lichts und dessen Wellenlänge.<sup>3)</sup>

Bestimmt man die Extinktionskoeffizienten verschieden konzentrierter Lösungen einer Substanz in einem bestimmten Spektralgebiet am gleichen Apparat bei derselben Lichtquelle, dann ist  $\epsilon$  nur abhängig von der Konzentration der Lösung und man wird erwarten dürfen, für eine Lösung bestimmter

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 67, S. 177, 1910.

<sup>2)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 62, S. 194, 1909.

<sup>3)</sup> K. Vierordt, Anwendung des Spektralapparates usw., Tübingen 1873, S. 28 ff.

Konzentration bei wiederholten Bestimmungen stets denselben Extinktionskoeffizienten zu finden. Da  $\epsilon$  im gleichen Sinne sich ändert wie  $c$ , so wird man auch für  $\frac{c}{\epsilon} = A$  unter den oben erwähnten Bedingungen stets den gleichen Wert bekommen müssen. Aus verschiedenen Gründen interessierte mich nun die Frage: Trifft dies auch zu, wenn verschiedene Beobachter einen und denselben Apparat in dem gleichen Wellengebiet und unter sonst gleichen Bedingungen benutzen, und erhält man schließlich mit verschiedenen Hüfner-Spektrophotometern für das Absorptionsverhältnis stets die gleichen Werte — wenigstens innerhalb gewisser enger Grenzen? Oder mit anderen Worten: Ist der Wert für das Absorptionsverhältnis eine Konstante, die unabhängig ist von Apparat und Beobachter, wie Hüfner meinte, oder ist der Wert für jeden Apparat und jeden Beobachter ein anderer?

Für Lösungen von Oxyhämoglobin vom Rind bestimmte Hüfner<sup>1)</sup> an seinem neuen Apparat bei den Wellenlängen 554–565  $\mu\mu$   $A_0$  zu  $2,070 \times 10^{-3}$ .

Bardachzi<sup>2)</sup> fand für Blut von *Thalassochelys corticata* an einem andern Apparat gleicher Konstruktion in genau der gleichen Spektralgegend  $A_0 = 2,094 \times 10^{-3}$ . Die Zahl  $A_0 = 2,15 \times 10^{-3}$ , die de Saint-Martin<sup>3)</sup> für Oxyhämoglobin vom Menschen, Pferd, Hund und Hasen bestimmte, ist mit der Hüfners nicht ohne weiteres vergleichbar, denn sie ist im Wellenlängengebiet 557,2 — 568,3  $\mu\mu$  bestimmt und außerdem fehlen bei de Saint-Martin Angaben über die Breite des Kollimatorspaltes. Von diesen Resultaten, die, trotzdem sie an verschiedenen Apparaten von verschiedenen Beobachtern erhalten wurden, recht gut übereinstimmen, weichen die Resultate von Aron und Müller<sup>4)</sup> mit einer einzigen Ausnahme

<sup>1)</sup> Hüfner, Archiv für Anat. u. Physiol., physiol. Abt., 1894, S. 137.

<sup>2)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 49, S. 465 f., 1906.

<sup>3)</sup> Dosage de l'hémoglobine, Paris 1898.

<sup>4)</sup> Arch. für (Anat. u.) Physiol., 1906, Suppl., S. 126. Die Unterschiede zwischen den hier aufgeführten Werten für  $A_0$  verschiedener Blutarten finden ihre Erklärung nach meiner Ansicht nicht in der ver-

recht erheblich ab. Diese bestimmten ebenfalls an einem Hufner-Spektrophotometer, so ziemlich in der gleichen Gegend wie de Saint-Martin — nämlich bei 557—569  $\mu\mu$  für Blut vom

Kaninchen	$A_0$	zu	$1,906 \times 10^{-3}$
Rind	$A_0$	»	$1,897 \times 10^{-3}$
Hund	$A_0$	»	$1,877 \times 10^{-3}$
Pferd	$A_0$	»	$2,001 \times 10^{-3}$
» <sup>1)</sup>	$A_0$	»	$1,946 \times 10^{-3}$
»	$A_0$	»	$2,082 \times 10^{-3}$

Von der Zahl  $2,07 \times 10^{-3}$ , die Hufner für die richtige ansah und vom Jahre 1894 an allen seinen Bestimmungen auf diesem Gebiet zugrunde gelegt hat, weichen auch die Resultate, die Hufner selbst und seine Schüler an Apparaten älterer Konstruktion erhalten haben, recht erheblich ab. Auch andere, Hufner fernstehende Beobachter haben z. T. recht abweichende Resultate erhalten.<sup>2)</sup>

Eine Durchsicht all der Resultate verschiedener Beobachter konnte die Vermutung nahelegen, daß die an verschiedenen Apparaten bestimmten Werte für das Absorptionsverhältnis wohl zufällig gleich sein können, aber es nicht notwendig sein müssen. Die Untersuchungen von Butterfield, der seine Bestimmungen an einem nicht allzu lange vor Hufners Tod aufgestellten Apparat, den Hufner zu eingehenden Untersuchungen nicht mehr hatte benutzen können, ausgeführt hat, schienen diese Vermutung zu bestätigen. Er fand nämlich für Oxyhämoglobin vom Rind, Schwein und Menschen in der Gegend 556,1—564,6  $\mu\mu$   $A_0 = 1,87 \times 10^{-3}$ , ein Wert, der vom Hufnerschen um rund 10% abweicht. Von der Voraussetzung ausgehend, daß die oben angedeutete Vermutung zutreffe, habe ich diese Zahl meinen vorjährigen Versuchen, bei denen ich mich

schiedenen Lichtabsorption der «Hämoglobine» dieser Tierarten. Nach den übereinstimmenden Angaben Hufners, de Saint-Martins, Butterfields u. a. und auch meinen eigenen Erfahrungen ist die Lichtabsorption des Hämoglobins der verschiedenen Tierarten dieselbe. Siehe dagegen Aron und Müller, Biochem. Zeitschrift, Bd. 3, S. 1 (1907).

<sup>1)</sup> Lösung von Hämoglobinkrystallen.

<sup>2)</sup> Vgl. z. B. Krüger, Zeitschrift f. Biologie, Bd. 24, S. 47 ff., 1888.

desselben Apparats unter genau den gleichen Bedingungen wie Butterfield bedient hatte, vorläufig zugrunde gelegt<sup>1)</sup> mit der Absicht, diesen Wert möglichst bald durch eigene Versuche zu kontrollieren und zu sichern.<sup>2)</sup> Es erschien dies um so notwendiger, als ich schon während Butterfields Versuchen im Tübinger physiologisch-chemischen Institut die Beobachtung gemacht hatte, daß die von mir bestimmten Extinktionskoeffizienten von Oxyhämoglobinslösungen, die auch Butterfield untersucht hatte, nicht unerheblich von denen Butterfields abwichen.

Meine hier mitzuteilenden Versuche ergaben denn auch, um das Resultat hier vorwegzunehmen, einen Wert, der recht erheblich von dem Butterfields abweicht, den älteren Bestimmungen Hüfners aber außerordentlich nahe kommt, nämlich  $A_0 = 2,081 \times 10^{-3}$ .

Es dürfte allerdings etwas verfrüht sein, aus diesem Resultat bindende Schlüsse zu ziehen, solange nicht noch weitere derartige Bestimmungen an Apparaten gleicher Konstruktion auch von anderer Seite vorliegen. Zieht man aber in Erwägung, daß ein Resultat, das ebenfalls nur ganz wenig von dem Hüfners abweicht, auch Bardachzi bekommen hat und daß auch Aron und Müller in einem Falle das Absorptionsverhältnis zu  $2,08 \times 10^{-3}$  gefunden haben, so muß die Annahme, daß diese Übereinstimmung zufällig sei, doch etwas unwahrschein-

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 67, S. 182, 1910.

<sup>2)</sup> Eine Reihe anderer notwendiger Arbeiten hatten es mir damals unmöglich gemacht, diese Arbeit gleich in Angriff zu nehmen. Meine Absicht, die Angaben über die Größe des Gasbindungsvermögens von Hämoglobin nachzuprüfen, machte es mir zur Aufgabe, erst den spektrophotometrischen Teil der geplanten Arbeit in Angriff zu nehmen; darüber fand ich zur Ausführung der gasometrischen Versuche im vergangenen Winter — nur diese Zeit gestattete mir bei den mir zur Verfügung stehenden Mitteln die Ausführung dieser Versuche ohne allzugroße Schwierigkeiten — keine Zeit. Da ich infolge einer Änderung in meinen äußeren Verhältnissen in absehbarer Zeit wohl kaum Gelegenheit finden werde, mich mit diesen Fragen weiter zu beschäftigen, sehe ich mich genötigt, die vorbereitenden Versuche, die auch für sich allein einiges Interesse beanspruchen dürften, hier mitzuteilen.

lich anmuten. Viel eher möchte ich glauben, daß in Fällen, wo für  $A_0$  eine Zahl, die von der Hüfners wesentlich abweicht, gefunden wurde, irgend ein vielleicht ganz geringfügiger Fehler die Ursache der mangelnden Übereinstimmung ist und der Grund also nicht am Apparat zu suchen ist. Vorausgesetzt ist natürlich, daß die Aufstellung des Apparates genau dieselbe ist, wie sie von Hüfner bei den Versuchen zur Feststellung der in Rede stehenden Größe benützt worden ist.<sup>1)</sup>

Leider ist es mir nicht möglich gewesen, verschiedene Hüfner-Apparate für meine Versuche zu verwenden. Man hätte dann durch Parallelversuche wenigstens die eine Frage sicher entscheiden können, ob ein und derselbe Beobachter an verschiedenen Apparaten die gleichen Werte für das Absorptionsverhältnis bekommt.

Auf welche Ursachen der Unterschied zwischen Butterfields Wert für das Absorptionsverhältnis und dem meinigen zurückzuführen ist, vermag ich nicht zu entscheiden. Wie weit bei diesen spektrophotometrischen Beobachtungen vielleicht sinnesphysiologische Qualitäten der einzelnen Beobachter eine Rolle spielen, das zu beurteilen muß ich Berufeneren überlassen.

Da ich das von Butterfield bestimmte Absorptionsverhältnis seinerzeit für die Konzentrationsbestimmung meiner Lösungen zugrunde gelegt habe, ist es notwendig, hier in aller Kürze auf die damals erhaltenen Resultate einzugehen und die dort gezogenen Schlüsse zu prüfen.

Absorptionsverhältnis, Extinktionskoeffizient und Konzentration einer Lösung stehen wie mehrfach erwähnt zu einander in der durch die Gleichung  $\epsilon \cdot A = c$  ausgedrückten Beziehung.  $\epsilon$  war am Apparat bestimmt worden; für  $A$  war die Größe  $1,87 \times 10^{-3}$  zugrunde gelegt an Stelle der Zahl  $2,08 \times 10^{-3}$ ; daraus ergibt sich, daß der Gehalt aller damals von mir unter-

---

<sup>1)</sup> Auf alle Fälle aber wird jeder, der mit Fragen wie den hier behandelten, sich beschäftigt, gut tun, den Wert von  $A_0$  für sich neu zu bestimmen; auch dann, wenn von anderer Seite schon am gleichen Apparat unter gleichen Bedingungen ausgeführte Bestimmungen vorliegen. — Über den Einfluß verschiedener Lichtquellen, von welchen das Resultat sehr wesentlich abhängt, sind eingehendere Versuche noch anzustellen.

suchten Lösungen niedriger gefunden wurde, als er tatsächlich war. Das Resultat des ersten Teils meiner früheren Versuche wird dadurch nicht nur nicht geändert, sondern es wird sogar noch deutlicher hervorgehoben. Das mag die aus meiner früheren Arbeit entnommene Tabelle<sup>1)</sup> dartun, die zeigen sollte, daß selbst recht geringfügige Mengen Hydrazinhydrat das Hämoglobinmolekül tiefergehend verändern.

Num- mer der Lösung	Angewandt ccm Hb- Lösung	Angewandt ccm Hydrazin- hydrat- lösung	Mol. Hydrazinhydrat auf 1 Mol. Hb		Quo- tient nach 12 Stun- den	
			$A_0 = 1,87 \times 10^{-3}$	$A_0 = 2,08 \times 10^{-3}$		
0	—	—	—	—	1,56	
1	200	0,2	0,170	0,145	1,53	
2	250	0,5	0,33	0,290	1,52	
3	200	0,6	0,50	0,435	1,48 <sup>1)</sup>	<sup>1)</sup> Diese Be- stimmung ist unsicher
4	250	1,0	0,67	0,580	1,49	

Unter Zugrundelegung von  $A_0 = 1,87 \times 10^{-3}$  waren in 100 ccm Lösung 13,2 g Hämoglobin gefunden worden; mit  $A_0 = 2,08 \times 10^{-3}$  wurden 14,81 g in 100 ccm erhalten.

Eine Änderung erfahren natürlich auch die etwas später<sup>2)</sup> angeführten Zahlen, die angeben, wieviel Kubikzentimeter CO von 1 g Hämoglobin gebunden werden. Unter Zugrundelegung des neuen Absorptionsverhältnisses wurden bei den mit Hydrazin reduzierten Lösungen erhalten 1,18; 0,95; 1,02; 1,14 ccm CO-Gas (0°, 760 mm) auf 1 g Blutfarbstoff.

In Lösungen, die ohne Hydrazin, nur unter Anwendung einer vorzüglich wirkenden Körttingschen Pumpe und elementarem Wasserstoff reduziert worden waren, wurden pro Gramm Hämoglobin gebunden 1,34; 1,38; 1,30; 1,41 ccm Gas.

Das Mittel dieser Zahlen — 1,36 ccm — liegt der von Hüfner gefundenen und von Butterfield bestätigten Zahl 1,34 ccm außerordentlich nahe und darf vielleicht als eine Bestätigung für die Richtigkeit jener Zahl gelten. Hüfner sah eine Stütze für die Richtigkeit der Zahl 1,34 ccm u. a. auch darin, daß man

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 67, S. 185.

<sup>2)</sup> loc. cit. S. 189.

bei der Berechnung des Molekulargewichts des Hämoglobins nahezu die gleichen Werte erhält, gleichgültig ob man dieser Berechnung den Prozentgehalt des Hämoglobins an Eisen oder die pro Gramm gebundene CO-Gasmenge zugrunde legt.<sup>1)</sup> Will man die Annahme, daß Kohlenoxyd mit Hämoglobin nach stöchiometrischen Gesetzen reagiert, nicht aufgeben, so ergibt sich bei einem Eisengehalt von 0,335% die pro Gramm Hämoglobin gebundene Gasmenge in der Tat zu 1,34 ccm.

Aus dem eben Gesagten und einem Vergleich meiner Zahlen für die von der Gewichtseinheit gebundene CO-Gasmenge mit der Zahl Hüfners und Butterfields läßt sich nun aber folgendes schließen. Entweder müssen diese beiden unter Bedingungen gearbeitet haben, welche die Wirkung des Hydrazins nicht haben zur Geltung kommen lassen — festzustellen, ob eine solche Möglichkeit vorliegt, dazu bin ich aus dem oben angeführten Grunde leider nicht mehr gekommen —, oder aber muß man annehmen, daß der gesuchte Wert bei dem von ihnen angewandten Reduktionsverfahren mit Hydrazin eben doch etwas niedriger ausfällt, wenn einmal der Wert für den Absorptionskoeffizienten des Kohlenoxyds in Hämoglobinlösungen sicher feststeht. Die CO-Gasmenge, die eine Hämoglobinlösung von bestimmtem Gehalt aufzunehmen vermag, bestimmt man bekanntlich in der Weise, daß man die völlig gasfreie Lösung mit einem genau gemessenen Kohlenoxydvolumen schüttelt, bis vollständige Sättigung erreicht ist. Zieht man das nach dieser Manipulation übrigbleibende Kohlenoxydvolumen vom ursprünglichen Volumen ab, so erfährt man die gesamte in der Hämoglobinlösung physikalisch absorbierte und chemisch gebundene Gasmenge. Um aber das für uns wichtige eine Glied dieser Summe, die vom Hämoglobin chemisch gebundene Gasmenge, zu erfahren, ist es notwendig zu wissen, wie groß der nur physikalisch absorbierte Teil ist, und über dessen Größe herrscht bis jetzt noch keine Klarheit.<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> Dabei ging Hüfner von der wohl ziemlich allgemein anerkannten Voraussetzung aus, daß im Hb-Molekül 1 Eisenatom enthalten ist und von 1 Mol. Hb 1 Mol. Gas (CO, O<sub>2</sub>) gebunden wird.

<sup>2)</sup> Über die Versuche, diese Größe zu bestimmen, siehe die Arbeit

### Experimenteller Teil.

Für meine Versuche diente mir mehrmals umkrystallisiertes Oxyhämoglobin aus Pferdeblut, das ich mir in folgender Weise herstellte.

Blutkörperchen werden mit Hilfe der Zentrifuge vom Serum getrennt und wiederholt (mindestens 2mal) mit 0,9%iger Kochsalzlösung gewaschen. Den gewaschenen Blutkörperchenbrei versetzte ich mit etwa dem gleichen Volumen ausgekochten Wassers von etwa 40°, brachte die Mischung ebenfalls auf etwa 35—40° und trennte die Lösung von den ungelösten Körperchen, deren Menge nicht mehr allzugroß ist, und dem Stroma durch Ausschleudern. Die abgehobene Lösung kühlte ich dann auf 0° ab und ließ ihr auf je 4 Volumina 1 Volumen ebenfalls gekühlten absoluten Alkohol in dünnem Strahl und unter beständigem Umschütteln zufließen. Diese Mischung kommt dann auf zirka 12 Stunden in Eis und ist nach dieser Zeit zu einem Krystallbrei erstarrt. Die Krystalle werden von der Mutterlauge durch Ausschleudern getrennt. Diese ersten mit Hilfe von Alkohol gewonnenen Krystalle werden mit soviel ausgekochtem Wasser von 40° übergossen, daß ein Teil auch beim Erwärmen der Mischung auf 30—35° noch ungelöst bleibt. Lösung und Ungelöstes werden wieder mit Hilfe der Zentrifuge getrennt und die Lösung wieder in Eis gestellt. Nach etwa 12 Stunden haben sich wieder reichliche Mengen Krystalle abgeschieden, die in gleicher Weise noch ein 2. und 3. Mal umkrystallisiert werden. Dieses 3mal umkrystallisierte Oxyhämoglobin enthält spektrophotometrisch nachweisbare Mengen von Methämoglobin nicht. So gaben z. B. eine Lösung vom 11. II. 11. von 2mal umkrystallisiertem Oxyhämoglobin den Quotienten  $\frac{\epsilon'}{\epsilon} = 1,561$ , von 3mal umkrystallisiertem  $\frac{\epsilon'}{\epsilon} = 1,575$ . Reines

von Butterfield, Diese Zeitschrift, Bd. 62, S. 208. Am meisten Aussicht bietet meines Erachtens der dort erwähnte Versuch Hüfners, vom Methämoglobin aus das gewünschte Ziel zu erreichen. Über Versuche, für diesen Zweck geeignete Methämoglobininlösungen zu gewinnen, werde ich demnächst berichten.



Oxyhämoglobin zeigt nach den vielfach bestätigten Bestimmungen Hüfners den Quotienten  $\frac{\epsilon'}{\epsilon} = 1,578$ .

Die in verschiedenen Zentrifugengläsern befindlichen Krystallsedimente werden vereinigt und in der Kälte mit Hilfe eines Glasstabes gut durchgemischt. Von diesem Krystallbrei brachte ich möglichst rasch nacheinander in 3 tarierte, mit eingeriebenen Stopfen versehene Wägegläschen<sup>1)</sup> je eine ausreichende Menge, verschloß die Gläschen sofort und wog sie samt Inhalt wieder. Der Inhalt von zweien dieser Gläschen dient zur Bestimmung des Trockengewichts des Krystallbreis und der in der Gewichtseinheit Trockensubstanz enthaltenen Eisenmenge; der Inhalt des 3. Gläschens wird möglichst bald nach entsprechender Verdünnung zur spektrophotometrischen Untersuchung verwendet.

Tabelle 1.

Num- mer	Datum	Gewicht des Krystall- kuchens		Trocken- rückstand in % des feuchten Kuchens	Gewicht des für die photom. Bestimm. verwend. Kuchens	Aus Trocken- substanz- bestimmung berechneter Gehalt an Oxy-Hb	Volu- men der Lösung ccm	
		feucht	trocken					
1	3./12. 1910	4,2415	1,9133	45,11	45,17	7,8359	3,5395	250
		4,5916	2,0765	45,23				
2	6./2. 1911	6,4763	1,2883	19,89	19,93	4,2954	0,8559	200
		6,6644	1,3303	19,96				
3	11./2. 1911	7,5273	1,6029	21,29	21,30	4,5093	0,9605	500
		7,9112	1,6858	21,31				
4	21./2. 1911	7,4652	2,2595	30,27	30,33	10,2832	3,1188	500
		10,1435	3,0757	30,39				
5	22./2. 1911	5,9348	1,4627	24,65	24,50	6,9813	1,7102	200
		6,5429	1,5931	24,35				
6	14./3. 1911	8,1270	2,3395	28,79	28,86	9,0806	2,6207	175
		8,3769	2,4240	28,94				
7	14./3. 1911	8,7008	2,0310	23,34	23,37	9,8795	2,3087	175
		10,4880	2,4535	23,39				

<sup>1)</sup> Von möglichst weiter, aber niedriger Form.

Die Trocknung geschah im Wasserstoffstrom zunächst bei etwa 60—80°, schließlich bei 110° bis zu konstantem Gewicht, das je nach der angewandten Menge in 30—40 Stunden erreicht war. Tabelle 1 gibt in den vorderen Spalten eine Zusammenstellung über den Gehalt der für meine Versuche verwendeten Hämoglobinkrystallpräparate an Trockensubstanz. In den 3 letzten Spalten finden sich die Angaben über das Gewicht der für die spektrophotometrischen Bestimmungen angewandten feuchten Krystallkuchen, ihren absoluten Gehalt an Oxyhämoglobin berechnet nach dem Mittel der beiden getrockneten Proben und das Volumen, auf welches die feuchten Krystalle gelöst wurden.

In der folgenden Tabelle 2 sind die für die spektrophotometrische Untersuchung der Hämoglobininlösungen<sup>1)</sup> nötigen Daten, die Resultate dieser Bestimmungen und die aus  $\epsilon$  und  $c$

Tabelle 2.

Num- mer des Ver- suchs Tab. 1 entspr.	Verdünnung der Stammlösung	g Oxy-Hb in 1 ccm unter- suchter Lösung	$\varphi$	$\epsilon$	$A_0 = \frac{c}{\epsilon}$	$\frac{\epsilon'}{\epsilon}$	$A'_0 = \frac{c}{\epsilon'}$
			bei 556,1—564,6 $\mu\mu$	bei			
1	15 auf 175	$1,213 \times 10^{-3}$	59,90°	0,599	$2,02 \times 10^{-3}$	1,55	$1,30 \times 10^{-3}$
	*20 » 200	$1,415 \times 10^{-3}$	62,01°	0,657	$2,16 \times 10^{-3}$	1,52	$1,42 \times 10^{-3}$
2	20 » 50	$1,712 \times 10^{-3}$	66,45°	0,797	$2,15 \times 10^{-3}$	1,59	$1,35 \times 10^{-3}$
3	Stammlösung	$1,920 \times 10^{-3}$	70,28°	0,944	$2,04 \times 10^{-3}$	1,58	$1,29 \times 10^{-3}$
	40 auf 50	$1,537 \times 10^{-3}$	65,26°	0,757	$2,03 \times 10^{-3}$	1,58	$1,29 \times 10^{-3}$
4	15 » 50	$1,871 \times 10^{-3}$	69,57°	0,914	$2,05 \times 10^{-3}$	1,56	$1,31 \times 10^{-3}$
	50 » 200	$1,559 \times 10^{-3}$	64,79°	0,741	$2,10 \times 10^{-3}$	1,56	$1,35 \times 10^{-3}$
5	10 » 50	$1,710 \times 10^{-3}$	66,95°	0,814	$2,10 \times 10^{-3}$	1,58	$1,33 \times 10^{-3}$
	30 » 125	$2,052 \times 10^{-3}$	71,79°	1,010	$2,03 \times 10^{-3}$	1,56	$1,30 \times 10^{-3}$
6	10 » 100	$1,500 \times 10^{-3}$	63,50°	0,701	$2,14 \times 10^{-3}$	1,57	$1,36 \times 10^{-3}$
7	10 » 100	$1,320 \times 10^{-3}$	60,48°	0,615	$2,15 \times 10^{-3}$	1,57	$1,37 \times 10^{-3}$
Mittel . . . . .					$2,081 \times 10^{-3}$		$1,325 \times 10^{-3}$

<sup>1)</sup> Die Lösungen enthielten alle 0,1% Soda.

nach der Gleichung  $A_0 = \frac{c}{\epsilon}$  berechneten Werte für  $A_0$  zusammengestellt.

In dieser Tabelle sind alle Lösungen, die von mir zur Feststellung des Absorptionsverhältnisses untersucht worden sind, enthalten. Bei der Berechnung des Mittelwertes für  $A_0$  zu  $2,081 \times 10^{-3}$  habe ich jedoch die mit \* versehene Reihe ausgeschaltet. Die zu diesen Bestimmungen verwendete Lösung hatte vor der spektrophotometrischen Untersuchung versehentlich 2 Tage gestanden; dadurch erklärt sich der niedrige Quotient 1,52. Der Wert  $2,15 \times 10^{-3}$  für das Absorptionsverhältnis ist zwar kaum höher als das Resultat der Reihen 2, 6 und 7, doch ist in diesem Fall der Grund zweifellos in einer durch das längere Stehen der Lösung verursachten Beimengung von Methämoglobin zu suchen, die sich bekanntlich in der Erniedrigung des Quotienten zu erkennen gibt. In der letzten Spalte von Tabelle 2 finden sich schließlich noch die Werte für das Absorptionsverhältnis von Oxyhämoglobin in der Gegend 533,5 bis 542  $\mu\mu$ ; das Mittel dieser Einzelwerte ist  $1,325 \times 10^{-3}$ , die entsprechenden Werte von Hüfner und Butterfield sind  $1,312 \times 10^{-3}$  bzw.  $1,18 \times 10^{-3}$ .

Die Richtigkeit des Wertes  $2,081 \times 10^{-3}$  für das Absorptionsverhältnis  $A_0$  (556,1—564,6  $\mu\mu$ ) des Oxyhämoglobins läßt sich auf Grund folgender Überlegung kontrollieren.

Der Eisengehalt des Rinderhämoglobins ist von verschiedenen Autoren zu 0,335% gefunden worden. Bestimmt man den Gehalt einer Rinderoxyhämoglobinlösung an Oxyhämoglobin einerseits auf spektrophotometrischem Wege unter Zugrundelegung des von mir bestimmten Absorptionsverhältnisses und anderseits auf Grund einer Eisenbestimmung, so müssen, wenn die Zahl  $2,081 \times 10^{-3}$  richtig ist, beide Wege das gleiche Resultat ergeben.

Ausgeschleuderte Rinderblutkörperchen werden wiederholt mit 0,9%iger Kochsalzlösung gewaschen und dann in ausgekochtem Wasser gelöst. Von dieser Lösung werden zwei für die Untersuchung am Spektrophotometer geeignete Verdünnungen hergestellt und zwar werden verdünnt

Lösung 1: 3,0 ccm Stammlösung auf 200 ccm

» 2: 2,5 » » » 200 »

Die spektrophotometrische Untersuchung ergab für

$$\text{Lösung 1: } \epsilon = 1,016; \frac{\epsilon'}{\epsilon} = 1,56$$

$$\text{» 2: } \epsilon = 0,841; \frac{\epsilon'}{\epsilon} = 1,57.$$

Somit sind enthalten in 1 ccm

$$\text{von Lösung 1: } 1,016 \times 2,08 \times 10^{-3} = 2,113 \times 10^{-3} \text{ g,}$$

$$\text{» » 2: } 0,841 \times 2,08 \times 10^{-3} = 1,748 \times 10^{-3} \text{ »}$$

Hämoglobin; in 100 ccm der Stammlösung sind somit nach dem Resultat

an Lösung 1: 14,10 g

» » 2: 13,99 » Oxyhämoglobin

enthalten. Mittel 14,05 g.

Zur Eisenbestimmung werden zweimal je 20 ccm der Stammlösung verwendet und das Eisen in der nachher anzu-  
deutenden Weise bestimmt. Zur Titration des Eisens in diesen  
beiden Proben von je 20 ccm werden verbraucht 19,50 und  
19,58 ccm  $\text{KMnO}_4$  (1 ccm = 0,878 ccm  $n_{/100}\text{-KMnO}_4$ ).

Somit sind in 20 ccm der Stammlösung 0,0096 g Fe, in  
100 ccm 0,0480 g.

Bei einem Gehalt des Oxyhämoglobins an Eisen von 0,335%  
entsprechen 0,0480 g Fe 14,30 g Hämoglobin in 100 ccm. Die  
Konzentrationsbestimmung liefert also auf beiden Wegen Werte,  
die recht befriedigend übereinstimmen. Damit ist der Beweis  
für die Richtigkeit — jedoch nur relative, nicht absolute —  
meines Absorptionsverhältnisses erbracht.

Von den im Wasserstoffstrom bei 110° getrockneten Rück-  
ständen, die zur Trockensubstanzbestimmung der feuchten Kry-  
stallkuchen gedient hatten, wurden einzelne zur Bestimmung  
des Eisengehalts des Pferdeoxyhämoglobins verwendet.

Neue Bestimmungen dieser Größe schienen mir vor allem  
auch deshalb von einigem Wert, weil die über den Eisengehalt  
des Pferdehämoglobins in der Literatur überhaupt sich findenden  
Angaben schwanken zwischen 0,47% und 0,34% und weil

auch die neueren mit besserer Methodik erhaltenen Zahlen nicht die wünschenswerte Übereinstimmung zeigen.<sup>1)</sup>

Das Verfahren, das sich nach Versuchen, die schon vor einiger Zeit im physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen auf meine Veranlassung hin angestellt wurden, für diesen Zweck am besten eignet, hat Butterfield<sup>2)</sup> ausführlich beschrieben; es mag deshalb hier ein Hinweis auf das dort angegebene genügen.<sup>3)</sup>

Die Resultate aller von mir ausgeführten Bestimmungen finden sich in Tabelle 3 aufgeführt; 3 weiter noch angesetzte Bestimmungen gingen infolge Bruchs des Veraschungskolbens leider verloren.

Unter der Voraussetzung, daß im Molekül des Hämoglobins nur ein Eisenatom enthalten ist, berechnet sich aus einem Eisengehalt von 0,364% das Molekulargewicht des Pferdehämoglobins zu etwa 15 400. In gleicher Weise erhält man für Rinderhämoglobin, für das von verschiedenen Seiten ein Eisengehalt von 0,335% gefunden wurde, rund 16 700. Recht gut stimmen diese Zahlen zu den Werten, die Hüfner und

---

<sup>1)</sup> Eine Zusammenstellung der bisher gefundenen Werte für den Prozentgehalt des Pferdehämoglobins an Fe findet sich in «Tigerstedts Handbuch der physiolog. Methodik, 2. Band, bei Bürker, Gewinnung, qualitative und quantitative Bestimmung des Hämoglobins, S. 69, 1910» und weiter in «Abderhaldens Biochemisches Handlexikon, Bd. 6, S. 188, 1911 bei Reinbold, Tierische Farbstoffe».

<sup>2)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 62, S. 219, 1909.

<sup>3)</sup> Das Ferrisalz wird in einer mit Uhrglas bedeckten geräumigen Platinschale mit Hilfe von eisenfreiem Zink (Kahlbaum) reduziert; die Lösung wird durch ein Wattebüschchen in eine Porzellanschale filtriert und mit ca.  $\frac{n}{100}$ -KMnO<sub>4</sub>-Lösung titriert; daß während des Filtrierens eine Oxydation nicht eintritt, ist leicht mittels CNSK festzustellen. Übrigens sind in letzter Zeit nähere Angaben über die Haltbarkeit von Ferrosalzlösungen eben mit Beziehung auf die Titration mit KMnO<sub>4</sub> von Baskerville und Stevenson, Journ. Amer. Chem. Soc., Bd. 33, S. 1104/6, 1911, gemacht worden, die meine Beobachtung bestätigen.

Die Einstellung meiner KMnO<sub>4</sub>-Lösung geschah über Thiosulfatlösung, die auf  $\frac{n}{100}$ -H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> eingestellt war.

Gansser<sup>1)</sup> auf osmotischem Wege für Pferde- und Rinderhämo-  
globins gefunden haben.

Tabelle 3.

Versuch Nr.	Datum 1911	g Hämo- globin	Verbrauch an ccm KMnO <sub>4</sub>	Gefunden Fe	
				mg	%
2	6./2.	1,3303	5,10 = 8,59 n/100	4,80	0,361
3	11./2.	1,6029	12,05 = 10,51 »	5,89	0,367
		1,6858	12,60 = 11,00 »	6,16	0,365
5	22./2.	1,5931	11,90 = 10,38 »	5,81	0,365
6	14./3.	2,4240	17,50 = 15,80 »	8,84	0,364
		2,3395	16,80 = 15,32 »	8,46	0,361
7	14./3.	2,0310	15,04 = 13,20 »	7,39	0,363
Mittel . . . . .					0,364

Als Mittel geben sie an für Pferdehämoglobin rund 15100, für Rinderhämoglobin rund 16300. Da die Werte für das Eisen im Pferdeblut und die weiter oben angegebene, mit Hilfe von Rinderhämoglobin ausgeführte Kontrolle meines Absorptionsverhältnisses unter Zugrundelegung eines Prozentgehalts von 0,335 Fe in genau gleicher Weise gewonnen sind, sind die Werte 0,364% für Pferde- und 0,335% für Rinderhämoglobin direkt vergleichbar. Sie geben, wie ich glaube, eine gute Stütze ab für die von Hüfner und Gansser für Pferde- und Rinderhämoglobin angegebenen Molekulargewichte. Der am Schlusse der Arbeit von Hüfner und Gansser ausgesprochene Zweifel, «ob die Molekulargewichte des Pferde- und Rinderhämoglobins wirklich in dem oben gefundenen Maße verschieden sind», dürfte somit wohl gegenstandslos sein. Berechtigt war er sicherlich, wenn man berücksichtigt, daß von den 4 Werten, aus welchen das Mittel 15100 für Pferdehämoglobin berechnet wurde, der eine (15850) nur 2,5% von dem Mittel für Rinderhämoglobin abweicht, während die größten Abweichungen der Einzelwerte für Rinderhämoglobin vom Mittel nach oben und

<sup>1)</sup> Archiv f. Anat. u. Physiol., Physiol. Abt., 1907, S. 209.

unten 10 bzw. 5% betragen und es wäre, glaube ich, auch jetzt noch eine ganz dankbare Aufgabe, zu untersuchen, ob diese Schwankungen innerhalb der Fehlergrenze der Methode liegen oder ob sie vielleicht durch irgend welche Verunreinigungen des Hämoglobins verursacht sind; es könnte eine solche Untersuchung wohl auch dazu beitragen, das von Hüfner und Gansser benützte Verfahren auch für andere hochmolekulare Substanzen brauchbar zu machen.

Darmstadt im November 1911.

---