

# Über die Einwirkung von Hydroxylamin auf den Blutfarbstoff.

(Ein Beitrag zur Kenntnis des Methämoglobins.)

Von

**E. Letsche.**

Mit einer Abbildung im Text.

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

(Der Redaktion zugegangen am 14. August 1912.)

Die Veranlassung zu den im folgenden beschriebenen Versuchen gab der Wunsch, Methämoglobinlösungen auf einem Wege herzustellen, der eine Gewähr dafür bot, daß diese Lösungen außer Methämoglobin keine fremden Stoffe oder wenigstens nur eine ganz geringfügige und dann wenn möglich bekannte Menge enthielten. Am geeignetsten schien für diesen Zweck das von Hoppe-Seyler angegebene Verfahren,<sup>1)</sup> nämlich die Anwendung eines mit Wasserstoff beladenen Palladiumblechs. Entsprechende Versuche belehrten mich aber bald, daß es auf diesem Wege zwar gelingt, in verdünnten Lösungen Oxyhämoglobin in Methämoglobin überzuführen, daß aber in konzentrierten Lösungen, und vor allem, wenn man mit größeren Quantitäten arbeitet, die Methämoglobinbildung unvollständig ist. Unter all den Methämoglobinbildnern, die Dittrich<sup>2)</sup> aufführt, erschien mir schließlich zur Gewinnung einer reinen Methämoglobinlösung das Hydroxylamin, über dessen Wirkung schon Hüfner<sup>3)</sup> und Dittrich (loc. cit.) kurze Angaben gemacht hatten, als der

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 1, S. 397, und Bd. 2, S. 151.

<sup>2)</sup> Archiv für experim. Pathol. u. Pharm., Bd. 29, S. 256.

<sup>3)</sup> Archiv f. [Anat. u.] Physiol., 1899, S. 498.

geeignetste.<sup>1)</sup> Die Beobachtung, daß die Umwandlung von Oxyhämoglobin in Methämoglobin durch Hydroxylamin von einem deutlichen kleinblasigen Schäumen begleitet ist — eine Beobachtung, die, wie ich nachträglich fand, auch Haldane<sup>2)</sup> schon beschrieben hat — ließ mich vermuten, eine Untersuchung des hierbei freiwerdenden Gases könnte vielleicht Aufschluß geben über das Wesen dieses Vorgangs und damit auch über die immer wieder diskutierte Frage der Stellung des Methäoglobins zum Oxy- und reduzierten Hämoglobin.

Hoppe-Seyler, der als erster das Methämoglobin beobachtet hat, stellte fest, daß man außer mit Hilfe anderer Mittel Methämoglobin aus Oxyhämoglobin auch erhält, wenn man ein mit Wasserstoff stark beladenes Palladiumblech in eine verdünnte Oxyhämoglobininlösung eintaucht und gleichzeitig das Zutreten von Sauerstoff von außen dadurch unmöglich macht, daß man die Reaktion in einem Gefäß sich abspielen läßt, das vollkommen mit der Oxyhämoglobininlösung gefüllt ist.<sup>3)</sup> Er zog aus diesem Versuch den Schluß, daß Methämoglobin weniger Sauerstoff enthalte als Oxyhämoglobin.

Im Jahre 1883 veröffentlichten Hüfner und Külz<sup>4)</sup> Versuche, deren Resultat sie mit den Worten zusammenfassen:<sup>5)</sup> «Es widerlegt sowohl die Annahme, daß das Methämoglobin mehr, wie diejenige, wonach es weniger austreibbaren Sauer-

<sup>1)</sup> Bevor ich diesem Mittel endgültig mich zuwandte, hatte ich auch versucht, mit Hilfe von Chinon und Hydrochinon zu reinen Methämoglobininlösungen zu kommen, ohne jedoch das erhoffte Ziel zu erreichen. Meine Lösungen enthielten im besten Falle immer noch etwa 10% Oxyhämoglobin. Herr Professor Dr. W. Heubner-Göttingen hatte die große Liebenswürdigkeit, vor der Veröffentlichung seiner Beobachtungen über die Einwirkung von Chinon usw. auf den Blutfarbstoff mir eingehende Angaben über das von ihm eingeschlagene Verfahren zu machen, und ich verfehle nicht, ihm auch an dieser Stelle nochmals meinen verbindlichsten Dank für seine Freundlichkeit auszusprechen.

<sup>2)</sup> J. of Physiol., Bd. 22, S. 302, sagt Haldane darüber: «Mit einer neutralen Hydroxylaminchloridlösung tritt eine reichliche Entwicklung von Gas, das indeß nicht einfach Sauerstoff ist, ein.»

<sup>3)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 2, S. 149.

<sup>4)</sup> Ibid., Bd. 7, S. 366.

<sup>5)</sup> Ibid., Bd. 7, S. 373.

stoff besitzt wie das Oxyhämoglobin — nur sollte der Sauerstoff im Methämoglobin anders und zwar fester gebunden sein.

Eine Stütze für diesen Satz, dessen Richtigkeit bis jetzt nur wenig bestritten wurde, sah Hüfner in den Versuchen v. Zeyneks. Dieser beobachtete, daß die Methämoglobinbildung aus Oxyhämoglobin unter der Einwirkung von  $\text{Fe}(\text{CN})_6\text{K}_3$  von einer Sauerstoffentwicklung begleitet ist, und stellte fest, daß die Menge des freiwerdenden Gases etwa der Menge Sauerstoff entspricht, die vom Hämoglobin beim Übergang in Oxyhämoglobin gebunden wird. Dabei sollte unter dem Einfluß des  $\text{Fe}(\text{CN})_6\text{K}_3$  das Oxyhämoglobin seinen gesamten Sauerstoff abgeben und an dessen Stelle sollten vielleicht OH-Gruppen treten.<sup>1)</sup> Näher liegend wäre, glaube ich, die Erklärung, daß  $\text{Fe}(\text{CN})_6\text{K}_3$  auf das Oxyhämoglobin ähnlich einwirkt, wie auf Wasserstoffsuperoxyd oder wie  $\text{KMnO}_4$  auf  $\text{H}_2\text{O}_2$ , daß also nur ein Teil des austretenden Sauerstoffs aus dem Oxyhämoglobin, ein anderer aber aus dem  $\text{Fe}(\text{CN})_6\text{K}_3$  stammt.<sup>2)</sup>

Läßt man diese Erklärung gelten, so würde man damit freilich die Auffassung, daß Methämoglobin gleichviel austreibbaren Sauerstoff enthalte wie Oxyhämoglobin, preisgeben. Nun ist aber die von Hüfner und Külz ihren Resultaten gegebene Deutung nicht die einzig mögliche — es hat darauf vor einiger

<sup>1)</sup> Archiv f. [Anat. u.] Physiol., 1899, S. 460. Durch die Versuche v. Zeyneks wurde m. E. nur bewiesen, daß der Sauerstoff aus dem Oxyhämoglobin verdrängt wird — wenn man als richtig gelten lassen will, daß der gesamte freiwerdende Sauerstoff aus dem Oxyhämoglobin stammt; ob dann zur Methämoglobinbildung wieder gerade soviel Sauerstoff gebunden wird, bleibt ungewiß. Die von Zeynek für das Methämoglobin gegebene Formulierung  $\text{Hb} \begin{smallmatrix} \text{—OH} \\ \text{—OH} \end{smallmatrix}$  kann übrigens auch nicht der richtige Ausdruck sein für eine Verbindung, die gleichviel austreibbaren Sauerstoff enthält wie Oxyhämoglobin. Ein Hinweis darauf ist um so eher am Platze, als diese Formulierung mit der gleichzeitigen Angabe, daß Methämoglobin gleichviel austreibbaren Sauerstoff enthalte, auch in die neuere Handbuchliteratur übergegangen ist.

<sup>2)</sup> Haldane, J. of Physiol., Bd. 22, S. 300, hatte wohl eine ähnliche Erklärung im Auge; er hält sie jedoch nicht für brauchbar, da 1. aus Hämoglobin +  $\text{Fe}(\text{CN})_6\text{K}_3$  kein Gas frei wird und 2. weil  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  auch CO aus Kohlenoxydhämoglobin frei macht und diese Reaktion der ersten gleich sei.

Zeit Küster<sup>1)</sup> schon hingewiesen — und es läßt sich das Resultat jener Arbeit recht gut vereinigen mit der Auffassung, daß Methämoglobin weniger austreibbaren Sauerstoff enthält als Oxyhämoglobin. Hüfner hat denn auch in seiner letzten Mitteilung<sup>2)</sup> eine sauerstoffärmere Formel in den Kreis seiner Betrachtungen gezogen. Er sagt dort «um mit ihm (dem 2wertigen Atomkomplex Hb ==) das fester gebaute Oxydationsprodukt  $\text{Hb} = \text{O}$  zu bilden, dessen neutrale oder schwach saure Lösung braun gefärbt ist und das wir eben als Methämoglobin bezeichnen». Die Gründe, welche für die von Hoppe-Seyler einst vertretene Auffassung sprechen, hat Küster schon aufgeführt; ob die von ihm für Methämoglobin gegebene Formulierung  $\text{Hb} - \text{OH}$  wirklich das richtige trifft, muß erst noch weiter geprüft werden, denn die Umsetzungen des Methämoglobins mit HCN und mit NO lassen sich auch unter Zugrundelegung einer Formel  $\text{Hb} \begin{smallmatrix} -\text{OH} \\ -\text{OH} \end{smallmatrix}$  verstehen.

Ein direkter Beweis für die Auffassung, daß Methämoglobin weniger Sauerstoff enthält als Oxyhämoglobin, ist bis jetzt noch nicht erbracht worden; ein solcher ist m. E. durch die im folgenden mitzuteilenden Beobachtungen gegeben.<sup>3)</sup>

Hydroxylamin kann je nach Umständen bald als Reduktionsmittel<sup>4)</sup> bald als Oxydationsmittel<sup>5)</sup> wirken. Bei der Umsetzung mit dem Blutfarbstoff sind beide Möglichkeiten denkbar und auch zur Erklärung der Methämoglobinbildung herangezogen worden. Nach Hüfner<sup>6)</sup> betätigt es sich Oxyhämoglobin gegenüber als Reduktionsmittel, während Küster<sup>7)</sup> das Hydroxylamin zu den Oxydationsmitteln zählt und seine Wirkung sich

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 66, S. 247, 1910.

<sup>2)</sup> Archiv f. [Anat. u.] Physiol., 1907, S. 463.

<sup>3)</sup> Trotz der Lückenhaftigkeit dieser Beobachtungen habe ich nach langem Zögern meine Resultate veröffentlichen zu sollen geglaubt, weil es mir in absehbarer Zeit nicht möglich sein wird, weiter auf diesem Gebiete tätig zu sein.

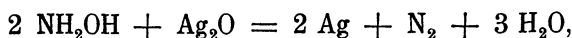
<sup>4)</sup> So z. B. Ag oder Hg"-Salzen gegenüber.

<sup>5)</sup> Siehe z. B. Ber., Bd. 29, S. 2080.

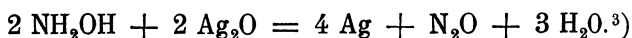
<sup>6)</sup> Archiv f. [Anat. u.] Physiol., 1899, S. 498.

<sup>7)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 66, S. 244 (1910).

ähnlich der des  $\text{Fe}(\text{CN})_6\text{K}_3$  auf Oxyhämoglobin — wobei bekanntlich ebenfalls Methämoglobin entsteht — vorstellt. Dabei könnte aus dem  $\text{NH}_2\text{OH}$  nur  $\text{NH}_3$  entstehen und gleichzeitig müßte aus der Lösung Sauerstoff entweichen. Meine Versuche haben aber ergeben, daß, soweit es sich um die Wirkung Oxyhämoglobin gegenüber handelt, Sauerstoff höchstens in ganz geringfügigen Mengen auftritt, somit erscheint eine Oxydationswirkung ausgeschlossen.<sup>1)</sup> Das nächstliegende war somit die Annahme einer Reduktionswirkung des Hydroxylamins auf Oxyhämoglobin. Nach den Untersuchungen von S. E. Sheppard<sup>2)</sup> reagiert Hydroxylamin mit Silbersalzen in mäßiger Konzentration im Sinne der Gleichung



in sehr verdünnten Lösungen aber nach dem Schema



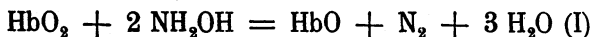
Ob die Umsetzung mit Oxyhämoglobin zur Hauptsache nach dem einen oder nach dem anderen Schema erfolgt, läßt sich unschwer entscheiden, da Stickstoff und Stickoxydul in ihren chemischen Eigenschaften sich ja sehr wesentlich unterscheiden: Aus der Flüssigkeit entweicht ein farbloses, geruch- und geschmackloses Gas, das einen glimmenden Span sofort zum Erlöschen bringt. Nach diesem qualitativen Befund zu schließen, besteht das Gas also, wenn nicht vollständig, so doch jedenfalls zum weitaus größten Teil aus Stickstoff. Die Um-

<sup>1)</sup> Dagegen glaube ich aus einem später mitzuteilenden Versuch, zu dessen weiterer Verfolgung mir leider die Zeit fehlte, schließen zu dürfen, daß reduziertem Hämoglobin gegenüber das Hydroxylamin als Oxydationsmittel wirkt.

<sup>2)</sup> Proceedings Chem. Soc. London, Bd. 22, S. 64 (1906).

<sup>3)</sup> Es mag an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, daß auch  $\text{H}_2\text{O}_2$  mit  $\text{NH}_2\text{OH}$  in zweifacher Weise zu reagieren vermag. Aus einer Lösung von 1 ccm Perhydrol (33%ig) in 600 ccm  $\text{H}_2\text{O}$  entweicht nach Zugabe von  $\text{NH}_2\text{OH}$  in ganz ruhiger und gleichmäßiger Reaktion ein Gas, das zu  $\frac{3}{4}$  aus Stickstoff und  $\frac{1}{4}$  aus Sauerstoff besteht. Läßt man jedoch  $\text{NH}_2\text{OH}$  und  $\text{H}_2\text{O}_2$  in konzentrierteren Lösungen aufeinander einwirken, so tritt unter starker Erwärmung eine allmählich heftiger werdende Reaktion ein, wobei eine stark saure Flüssigkeit resultiert, die anscheinend recht erhebliche Mengen untersalpetrige Säure enthält.

setzung des Hydroxylamins mit Oxyhämoglobin verläuft also vielleicht nach der Formel



oder, wenn man mit Küster das Methämoglobin als  $\text{Hb-OH}$  auffaßt, nach der Gleichung

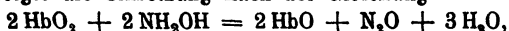


Während die Bildung von elementarem Stickstoff einwandfrei nachgewiesen werden konnte, mußte ich aus äußeren Gründen darauf verzichten, die Reaktion genau quantitativ zu verfolgen; auf diesem Wege ließe sich wohl eine Entscheidung über die Richtigkeit der einen oder andern der beiden Formulierungen treffen. Orientierende Versuche haben mir gezeigt, daß man bei der von mir eingehaltenen Methodik im besten Fall etwas mehr als 40% des nach Gleichung I berechneten Stickstoffs erhält. Das deutet vielleicht darauf hin, daß die Reaktion nicht glatt im Sinne einer der beiden Gleichungen verläuft, sondern daß irgend welche Nebenreaktionen noch mit im Spiele sind.

#### Experimentelles.

Für die im folgenden beschriebenen Versuche wurde z. T. Pferde-, z. T. Rinderblut von gesunden Schlachttieren verwendet. Das defibrierte Blut wurde zentrifugiert, das Serum abgehoben und das Blutkörperchensediment zweimal mit 0,9%iger Kochsalzlösung gewaschen. Schließlich löste ich den Blutkörperchenbrei in dem gleichen Volumen 0,2%iger Soda-

<sup>1)</sup> Erfolgte die Umsetzung nach der Gleichung



würde also auf 2 Mol.  $\text{HbO}_2$  1 Mol.  $\text{N}_2\text{O}$  entstehen, so müßten bei Anwendung von 600 ccm Lösung mit 15 g  $\text{HbO}_2$  in 100 ccm, wie dies bei meinen Hauptversuchen der Fall war, rund 64 ccm  $\text{N}_2\text{O}$  entstehen. Nun ist aber der Absorptionskoeffizient des  $\text{N}_2\text{O}$  für Wasser von 18° 0,709, d. h. in 600 ccm Wasser werden 425 ccm Gas oder bei 730 mm Druck rund 410 ccm Gas gelöst sein können. Zieht man in Erwägung, daß die Umwandlung von Oxyhämoglobin in Methämoglobin von einem kleinblasigen Schäumen begleitet ist, so müßte der Absorptionskoeffizient des  $\text{H}_2\text{O}$  für die Lösung durch das Oxyhämoglobin auf mindestens  $\frac{1}{7}$  des angesetzten Wertes herabgedrückt worden sein — was ohne Beispiel dastünde.

lösung. Es kamen für diese Versuche nur Lösungen zur Verwendung, die frei von Methämoglobin waren. Die Prüfung, ob dies der Fall und ob nach Zusatz von Hydroxylamin die erwartete Veränderung eingetreten war, geschah mit Hilfe des Hüfnerschen Spektrophotometers. Eine reine Oxyhämoglobinlösung muß bei der Untersuchung an diesem Apparat unter den von mir eingehaltenen Bedingungen<sup>1)</sup> den Quotienten 1,58 liefern. Eine reine Methämoglobinlösung zeigt unter den gleichen Bedingungen den Quotienten 1,186<sup>2)</sup>. Der Hüfnersche Apparat diente mir natürlich auch dazu, die Konzentration der angewandten Hämoglobinlösungen festzustellen, nach der Gleichung  $c = A \cdot \epsilon$ , wobei für A die Zahl  $2,081 \times 10^{-3}$  eingesetzt wurde.<sup>3)</sup> Das Hydroxylamin kam in der Form des krystallisierten Chlorhydrats zur Verwendung. Das Chlorhydrat wurde in Wasser gelöst, die Lösung auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllt und ein aliquoter Teil von ihr titriert.<sup>4)</sup> Ein Teil dieser Lösung wird unmittelbar vor der Verwendung mit der aus der Titration berechneten Menge Soda versetzt und von dieser Lösung werden alsdann bekannte Mengen der zu untersuchenden Lösung zugefügt. Zunächst prüfte ich, ob ein Zusatz von Hydroxylamin den Quotienten der untersuchten Lösung von 1,58 auf 1,186 erniedrigt. Für diesen Zweck wurde zunächst der Gehalt der zu verwendenden Lösung an Oxyhämoglobin und (mit 2 Ausnahmen) auch ihr Quotient festgestellt. Dann wurde einem bestimmten Volumen der Hämoglobinlösung eine bekannte Menge Hydroxylaminlösung von bekanntem Gehalt zugesetzt, die Mischung umgeschüttelt und einige Zeit sich selbst überlassen. In geeigneter Verdünnung wird dann der Quotient dieser Lösung festgestellt.<sup>5)</sup> Die Resultate finden sich in der folgenden Tabelle, die keiner weiteren Erläuterung bedarf.

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 76, S. 243.

<sup>2)</sup> Siehe nächste Seite.

<sup>3)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 76, S. 246.

<sup>4)</sup> Der Gehalt der Hydroxylaminchlorhydratlösungen wurde durch Titration mit  $\frac{n}{10}$ -NaOH unter Verwendung von Phenolphthalein als Indikator bestimmt. (Siehe Treadwell, Lehrb. d. analyt. Chemie, 1907, Bd. 2, S. 453.)

<sup>5)</sup>  $\epsilon$  wurde bei 556,1–564,6  $\mu\mu$ ,  $\epsilon'$  bei 553,5–542  $\mu\mu$  bestimmt.

Nummer	Datum 1911	g Oxyhämoglobin in 100 ccm der Stammlösung	Quotient vor   nach Zusatz von Hydroxylamin		Anzahl Mole NH <sub>2</sub> OH auf 1 Mol. Oxyhämoglobin
			$\frac{\epsilon'_o}{\epsilon_o}$	$\frac{\epsilon'_m}{\epsilon_m}$	
1	18./1.	10,6	1,565	1,196 <sup>1)</sup> 1,190	2 Mol.
2	8./2.	11,91	1,574	1,180	2 „
3	9./2.	5,75	1,590	1,213	1 „
4	9./3.	14,3	1,580	1,173 1,195	1 „
5	14./3.	1,20	1,565	1,195 1,170	2 „
6	14./3.	1,40	1,569	1,208	2 „
7	15./3.	0,83	—	1,202 1,196	2 „
8	21./3.	13,0	1,540	1,155	1 „
9	23./3.	0,78	—	1,192 1,183	2 „
10	4./7.	14,0	1,578	1,166	2 „
11	11./7.	16,4	1,588	1,180 1,170	2 „
Mittel . . .			1,572	1,186	

Als Mittel einer Reihe von Bestimmungen, zu welchen Methämoglobin, das mit Hilfe von  $\text{Fe}(\text{CN})_6\text{K}_3$  hergestellt worden war, gedient hatte, hat v. Zeynek 1,185 gefunden.<sup>2)</sup> Ich selbst erhielt mit Hilfe von  $\text{Fe}(\text{CN})_6\text{K}_3$  die in folgender kleinen Tabelle aufgeführten Zahlen, deren Mittel 1,199 nur wenig von dem oben angegebenen Wert abweicht.

Datum	g Oxyhämoglobin in 100 ccm	$\frac{\epsilon'_o}{\epsilon_o}$	$\frac{\epsilon'_m}{\epsilon_m}$
31./3. 10	14,2	1,586	1,189 1,186
9./2. 11	5,75	1,575	1,209
9./2. 11	5,93	1,590	1,210
21./3. 11	13,0	1,540	1,205

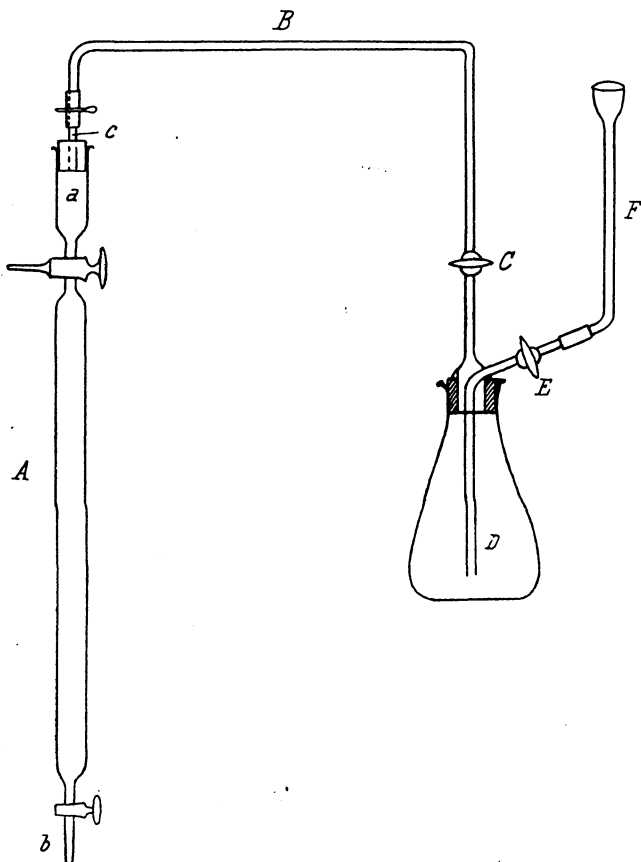
<sup>1)</sup> In den meisten Fällen wurden aus einer Stammlösung 2 verschiedene Verdünnungen für die Untersuchung am Spektrophotometer hergestellt.

<sup>2)</sup> Archiv f. [Anat. u.] Physiol. 1899, S. 460.



Es mag hervorgehoben werden, daß die Werte vom 31. 3. 10 an einer Lösung erhalten wurden, die nach der Einwirkung des  $\text{Fe}(\text{CN})_6\text{K}_3$  dialysiert worden war, während die 3 anderen Lösungen nach einigem Stehen ohne weiteres untersucht worden waren. Doch sind an den Abweichungen dieser 3 letzten Bestimmungen vielleicht auch kleine Beobachtungsfehler mitschuldig.

Um das bei der Umsetzung von  $\text{NH}_2\text{OH}$  mit Oxyhämoglobin freiwerdende Gas möglichst frei von Luft und — so gut es bei der einfachen Anordnung ging — möglichst vollständig zu erhalten, bediente ich mich des im folgenden abgebildeten und beschriebenen Apparates.



A ist eine Buntebürette, deren unteres Ende b durch einen etwa 1,5 m langen Druckschlauch mit einem Niveaugefäß verbunden ist. In das obere, in Kubikzentimeter ausgewertete Gefäß a ist ein gut schließender Kautschukstopfen mit einer kurzen Kapillare c eingesetzt. Die letztere ist durch einen dickwandigen Kautschukschlauch mit der 2mal rechtwinklig umgebogenen Kapillare B, die bei C einen Dreiweghahn trägt, verbunden. Etwas unterhalb dieses Hahns ist an die Kapillare eine Erweiterung angeschmolzen, in welche seitlich eine innerhalb der Erweiterung in die Achse der Kapillare umbiegende, ziemlich enge Röhre D mit Hahn E eingeschmolzen ist. An dieser Röhre ist mittels Kautschukschlauchs die Trichterröhre F angebracht. Zur Aufnahme der Oxyhämoglobinlösung dient ein dickwandiger Erlenmeyer-Kolben, auf den die ganze oben beschriebene Vorrichtung mittels eines luftdicht schließenden Kautschukstopfens aufgesetzt wird. Die Ausführung eines Versuchs gestaltet sich folgendermaßen:

Man füllt vom Niveaugefäß aus Schlauch und Buntebürette mit Wasser, wobei man darauf achtet, aus beiden Bohrungen des oberen Hahns der Bürette — die mit der Außenluft kommunizierende Bohrung trägt einen Schlauch mit Quetschhahn — die Luft zu verdrängen; dann läßt man das Wasser durch A in B eintreten und zwar soweit, daß auch die Kapillare unterhalb Hahn C bis zur Erweiterung mit Wasser gefüllt ist. Man schließt den unteren Hahn der Buntebürette und setzt den ganzen Apparat auf den Erlenmeyer-Kolben, der mit einer gemessenen Oxyhämoglobinlösung von bekanntem Gehalt soweit gefüllt ist, daß beim Einpressen des Stopfens zwischen diesem und der Lösung ein Luftraum von nur etwa 3—4 ccm bleibt; dabei ist natürlich der Hahn E geöffnet und es wird ein Teil der Hämoglobinlösung nach F gedrückt. Man schließt E, wenn der Stopfen fest sitzt, und stellt Hahn C so, daß der Inhalt des Erlenmeyers mit der Außenluft kommuniziert; dann gibt man die für das angewandte Oxyhämoglobin nötige Menge  $\text{NH}_2\text{OH}$  in den Trichter F, öffnet Hahn E und spült den Trichter mit ausgekochtem Wasser nach, bis eben der erste Tropfen Oxyhämoglobinlösung in den Hahn C eintritt. Man schließt E,

stellt Hahn C so, daß der Erlenmeyer durch die Kapillare mit A verbunden ist, öffnet den unteren Hahn der Buntebürette und überläßt die ganze Anordnung bei tiefstehendem Niveaugefäß sich selbst. Die Gasentwicklung beginnt sofort und dauert mehrere Stunden.<sup>1)</sup> Nimmt das Gasvolumen nicht mehr zu, dann füllt man den Trichter F mit Wasser, öffnet E und treibt durch das Wasser alles Gas in die Bürette. Dann entfernt man die Kapillare B etwas von c und klemmt den Kautschukschlauch ab, um jetzt die ganze Bürette zu entfernen. Das Gas wurde erst gemessen und dann in der bei Anwendung der Buntebürette üblichen Weise analysiert und zwar wurde eventuell vorhandenes CO<sub>2</sub> durch KOH und O<sub>2</sub> durch alkalische Hydrosulfitlösung entfernt.

Als Beispiel sei ein Versuch vom 8. 7. 11 angeführt.

Angewandt: Pferdeoxyhämoglobin (aus 2 mal mit 0,9%iger NaCl-Lösung gewaschenen Körperchen, die in ausgekochtem Wasser gelöst wurden).

$$\frac{\epsilon'_0}{\epsilon_0} = 1,588;$$

Volumen der Lösung 600 ccm mit 98,4 g Oxyhämoglobin  
Angewandt 0,835 g NH<sub>2</sub>OH · HCl (mit Soda neutralisiert). Erhalten 46,5 ccm Gas (0°, 760 mm); durch alkalische Hydrosulfitlösung wurden absorbiert 0,9 ccm; somit bleiben 45,6 ccm O<sub>2</sub>- und CO<sub>2</sub>-freies Gas. Da beim Schütteln des Gases mit reinem Wasser (50 ccm) bei Zimmertemperatur nur Bruchteile eines Kubikzentimeters aufgenommen werden und ein glimmender Span beim Einführen in das Gas augenblicklich erlischt, sind irgendwie erhebliche Mengen N<sub>2</sub>O in dem Gas sicher nicht vorhanden.<sup>2)</sup> Verläuft die Umsetzung zwischen NH<sub>2</sub>OH und

<sup>1)</sup> Es ist unvermeidlich, daß während der Einwirkung des NH<sub>2</sub>OH auf die Lösung durch die Gasblasen etwas Hämoglobininlösung in die Bürette gedrückt wird.

<sup>2)</sup> Die ganze Anordnung gestattet wohl eine qualitative Untersuchung des Gases, aber keine einigermaßen sichere Feststellung der Menge des bei der Reaktion freiwerdenden Gases; schon deshalb nicht, weil wir nicht wissen, wie viel von dem Gas in der Lösung physikalisch absorbiert bleibt. Zum Ziel wird man kommen, wenn man die Ausführung des Versuchs so gestaltet, daß man die Lösung auspumpen und das entweichende Gas auffangen kann.

Oxyhämoglobin glatt nach der Gleichung  $2\text{NH}_2\text{OH} + \text{HbO}_2 = \text{N}_2 + \text{HbO} + 3\text{H}_2\text{O}$ , so müßten 133 ccm Gas gebildet worden sein. Die von mir aufgefangene Menge entspricht nur rund 34% und eine Reihe ähnlicher Versuche sind nicht viel befriedigender ausgefallen. Daß bei dem von mir angewandten Verfahren ein nicht unbeträchtlicher Teil des gebildeten Gases der Messung sich entzog, ist natürlich; geeignete Vorrichtungen, die Größe dieses Anteils zu bestimmen, standen mir nicht zur Verfügung. — Der Unterschied zwischen der theoretisch berechneten und der tatsächlich gefundenen Gasmenge war mir aber doch zu groß, als daß ich die Sache ohne weiteres auf sich hätte beruhen lassen mögen.

Zunächst konnte man daran denken, die große Differenz durch die Annahme zu erklären, daß die Bildung von elementarem Stickstoff nicht in direkter Beziehung zur Methämoglobimbildung stehe, und daß der Stickstoff einfach nur von der spontanen Zersetzung des  $\text{NH}_2\text{OH}$  herrühre, das in wässriger Lösung bekanntlich nach der Gleichung  $3\text{NH}_2\text{OH} = \text{NH}_3 + 3\text{H}_2\text{O} + \text{N}_2$  zerfällt. Dahingehende Versuche haben die Unhaltbarkeit dieser Annahme erwiesen. In dem oben beschriebenen Apparat wird ein Versuch mit destilliertem Wasser und  $\text{NH}_2\text{OH}$  aus  $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl} + \text{Na}_2\text{CO}_3$  — in genau gleicher Weise, wie bei den Hämoglobinversuchen — angestellt; aus der angewandten Menge  $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$  — 0,4 g — hätten nach obiger Gleichung rund 43 ccm  $\text{N}_2$  (0°, 760 mm) entstehen müssen: Trotz 24 Stunden langen Stehens unter genau gleichen Bedingungen, wie bei den Hämoglobinversuchen, war keine Spur einer Gasentwicklung zu beobachten.<sup>1)</sup>

Weiter waren noch folgende beiden Möglichkeiten der Erklärung der Stickstoffbildung denkbar: 1. könnte das Oxyhämoglobin als Katalysator die Zersetzung des  $\text{NH}_2\text{OH}$  nach obiger Gleichung beschleunigen;

2. könnte irgend eine sekundäre Reaktion, die mit der

<sup>1)</sup> Ich habe mich durch spezielle Versuche überzeugt, daß auch aus reinen Oxyhämoglobininlösungen unter den gleichen Bedingungen wie bei den beschriebenen Versuchen keine meßbaren Gasmengen entweichen.

Hämoglobinbildung direkt nichts zu tun hat, die Stickstoffbildung veranlassen.

Im letzteren Falle muß bei quantitativer Methämoglobinbildung das Verhältnis von Oxyhämoglobin :  $\text{NH}_2\text{OH}$  nicht notwendig 1 : 2 (oder 1 : 3) entsprechend den auf Seite 417 aufgeführten Gleichungen sein. Oder mit anderen Worten: Eine glatte und rasche Erniedrigung des Quotienten von 1,58 auf 1,18 müßte nicht notwendig gerade dann eintreten, wenn auf 1 Mol. Oxyhämoglobin 2 (oder 3) Mol.  $\text{NH}_2\text{OH}$  angewandt werden, sondern könnte ebenso rasch und leicht auch erfolgen bei Anwendung von weniger  $\text{NH}_2\text{OH}$ . In der Tabelle auf Seite 419 finden sich einige Versuche aufgeführt (Nummer 3, 4 u. 8), bei welchen in der Tat quantitative Methämoglobinbildung bei Anwendung von weniger als 2 Mol.  $\text{NH}_2\text{OH}$  eingetreten ist. Ich möchte aber, besonders mit Rücksicht auf die Resultate von direkten Versuchen (siehe unten) glauben, daß in diesen Fällen irgendwelche Nebenumstände die Wirkung des Hydroxylamins bei der Methämoglobinbildung unterstützt haben. Denn es ist ja bekannt, daß eine ganze Reihe von chemischen und physikalischen Einflüssen Methämoglobinbildung veranlassen können.<sup>1)</sup>

Den Einfluß verschiedener  $\text{NH}_2\text{OH}$ -Mengen auf die Methämoglobinbildung in einer Oxyhämoglobinlösung zeigen folgende Versuche.

Zur Untersuchung diente eine Lösung von wiederholt mit 0,9% iger NaCl-Lösung gewaschenen Blutkörperchen (Rind) in ausgekochtem destilliertem Wasser. Bei der spektrophotometrischen Untersuchung wurde für diese Stammlösung gefunden  $\frac{\epsilon'}{\epsilon} = 1,579$ ; in 100 ccm 13,12 g Oxyhämoglobin.

Von dieser Lösung wurden 3 Verdünnungen mit 0,1% iger Soda angesetzt und zugleich soviel  $\text{NH}_2\text{OH}$  zugegeben, daß das Verhältnis von Oxyhämoglobin :  $\text{NH}_2\text{OH}$  war wie 1 : 0,5 bzw. 1 : 1 bzw. 1 : 2. Bei der spektrophotometrischen Untersuchung wurden folgende Zahlen erhalten:

<sup>1)</sup> Siehe die Arbeit von Dittrich, Archiv f. exp. Path. u. Pharm., Bd. 29, S. 256 ff.

Verdünnung	$\varphi'$	$\varphi$	$\frac{\epsilon'}{\epsilon}$	HbO <sub>2</sub> : NH <sub>2</sub> OH
2,5 : 175	75,86°	68,46°	1,408	1 : 0,5
3,0 : 250	70,16°	63,92°	1,314	1 : 1
2,5 : 175	71,40°	68,02°	1,162	1 : 2

Bei einem 2. Versuch wurden die Körperchen nach Abtrennung des Serums nur einmal mit 0,9%iger NaCl-Lösung ausgeschleudert und dann behandelt wie oben.

Es wurden gefunden:

$$\frac{\epsilon'}{\epsilon} = 1,565; \text{ in } 100 \text{ ccm } 10,6 \text{ g Oxyhämoglobin.}$$

4 Verdünnungen mit 0,1% Soda und NH<sub>2</sub>OH-Zusatz gaben folgende Werte:

Verdünnung	$\varphi'$	$\varphi$	$\frac{\epsilon'}{\epsilon}$	HbO <sub>2</sub> : NH <sub>2</sub> OH
2,5 : 200	65,31°	61,10°	1,196	1 : 2
2,75 : 200	66,10°	62,06°	1,190	1 : 2
2,75 : 200	67,94°	62,18°	1,285	1 : 1
2,5 : 200	67,18°	61,38°	1,286	1 : 1

Die beiden letzten Verdünnungen hatten, damit das NH<sub>2</sub>OH genügend Zeit zur Einwirkung haben sollte, 15 Stunden in der Kälte gestanden.

Aus beiden Versuchen ergibt sich mit aller Deutlichkeit, daß die Methämoglobinbildung erst dann vollständig ist, wenn auf 1 Mol. Oxyhämoglobin 2 Mol. NH<sub>2</sub>OH angewandt werden. Die oben angedeutete Erklärung ist also nicht zutreffend.

Daß auch der erste Erklärungsversuch (s. S. 423), wonach Oxyhämoglobin als Katalysator die Zersetzung des NH<sub>2</sub>OH unter N<sub>2</sub>-Bildung beschleunigen sollte, das Richtige nicht trifft, ergibt sich aus folgendem. Trotz der niedrigen Konzentration des NH<sub>2</sub>OH in den Versuchslösungen ist zu erwarten, daß die Zersetzung des NH<sub>2</sub>OH, wenn sie einmal begonnen hat, wenigstens annähernd vollständig ist. In dem oben aufgeführten Versuch hätten dabei rund 90 ccm N<sub>2</sub> gebildet werden sollen; tatsäch-

lich erhalten wurden nur 46,5 ccm, somit müßten rund 44 ccm in 600 ccm Hämoglobinlösung absorbiert gewesen sein. Da der Absorptionskoeffizient des Stickstoffs für Wasser rund 0,015 (bei 14°) beträgt, so müßte der Absorptionskoeffizient des  $N_2$  für diese Lösung rund 5 mal größer sein, während im allgemeinen bekanntlich die Absorptionskoeffizienten von Lösungen kleiner sind als die der Lösungsmittel.

Ferner müßte bei einer katalytischen Zersetzung des  $NH_2OH$  die gebildete  $N_2$ -Menge im wesentlichen von der Menge Hydroxylamin abhängig, dagegen, jedenfalls innerhalb weiterer Grenzen, unabhängig sein von der Oxyhämoglobinmenge. Eine Reihe Versuche haben mir aber gezeigt, daß die gebildete  $N_2$ -Menge steigt oder fällt, je nachdem die Blutfarbstoffkonzentration größer oder kleiner ist. So wurden z. B. erhalten aus 600 ccm einer Lösung mit 15,6 g Oxyhämoglobin in 100 ccm und 0,4 g  $NH_2OH \cdot HCl$  25,5 ccm  $N_2$ ; aus einer solchen mit 14,0 g und 100 ccm ebenfalls 0,4 g  $NH_2OH \cdot HCl$  16,5 ccm  $N_2$ . Ähnlich sind eine Anzahl weiterer Versuche ausgefallen, die einzeln aufzuführen überflüssig erscheint. —

Die Beobachtung, daß Oxyhämoglobin mit Hilfe von  $NH_2OH$  sich leicht in Methämoglobin überführen läßt, gab mir Veranlassung, einzelne dieser mit Hilfe von  $NH_2OH$  gewonnenen Lösungen zur Kontrolle der spektrophotometrischen Konstanten des Methämoglobins zu benutzen.

Der Weg, den ich bei dieser Kontrolle einschlug, entspricht dem, den ich bei der Feststellung der entsprechenden Konstanten des Oxyhämoglobins<sup>1)</sup> eingehalten habe. Ich ging wie dort vom Oxyhämoglobin aus und bestimmte in einer Probe den Trockenrückstand; eine 2. Probe von Krystallen wird auf ein bestimmtes Volumen mit 0,1%iger Soda gelöst. Von dieser Lösung wird ein Teil zur Bestimmung des Oxyhämoglobingehalts verwendet, ein anderer Teil wird in Methämoglobin übergeführt und am Spektrophotometer untersucht. Die für  $\epsilon$  experimentell gefundenen Zahlen und die aus  $\epsilon$  und  $c$  berechneten Werte für  $A$  finden sich in der folgenden Tabelle.

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 76, S. 243 ff., 1912.

Num- mer	Datum 1911	Gewicht des feuch-   trocke- ten   nen Oxyhäm- oglobinkuchens		% Oxy- häm- oglobin im feuchten Kuchen	Volu- men der Ur- lösung ccm	Ver- dün- nung	g Met- häm- oglobin in 1 ccm = c	$\varphi$ (556,1—564,6 $\mu\mu$ )	$\epsilon$	$A = \frac{c}{\epsilon}$
1 a	12./3.	8,7008	2,0310	23,34						
1 b		9,8795	2,306 <sup>1)</sup>		175	25:100	3,294 $\times 10^{-3}$	80,84°	1,596	2,061
2 a	14./3.	8,3769	2,4240	28,94						
2 b		9,0806	2,628 <sup>1)</sup>		175	35:250	2,0914 $\times 10^{-3}$	71,44°	0,994	2,105
3 a	14./3.	8,1270	2,3395	28,79						
3 b		9,0806	2,614 <sup>1)</sup>		175	30:200	2,2408 $\times 10^{-3}$	72,76°	1,056	2,120
4 a	22./3.	1,0235	0,8939	87,34						
4 b		0,8874	0,775 <sup>1)</sup>		200	25:40	2,422 $\times 10^{-3}$	74,36°	1,139	2,127
Mittel . .										2,103

Die Abweichung des Mittels von der Zahl, die v. Zeynek gefunden hat — 2,077 —, ist nur unbedeutend; immerhin ist sie mit rund 1% etwas größer als die Abweichung meiner Zahl für Oxyhämoglobin — 2,081 — von der, die Hüfner gefunden hat, nämlich 2,070. Der Grund für diese Abweichung liegt zweifellos an den spektrophotometrischen Bestimmungen, bei welchen ich besser etwas verdünntere Lösungen angewandt hätte; denn es ist bekannt, daß gerade am Hüfner-Spektrophotometer die Ablesungen unsicher werden, sowohl bei zu niedrigen als auch bei zu hohen Drehungswinkeln.

Die von Küster ausgesprochene Vermutung, daß  $\text{NH}_2\text{OH}$  dem Blutfarbstoff gegenüber auch als Oxydationsmittel wirken könne, wird, wie ich glaube, durch die im folgenden angeführte Beobachtung gestützt.

Eine Pferdeoxyhämoglobininlösung mit dem Quotienten 1,588, in 100 ccm 16,4 g Oxyhämoglobin enthaltend, wird mit Hilfe einer Körttingschen Pumpe vollkommen entgast. Ein Teil dieser Lösung, die jetzt das Spektrum von reinem reduziertem Hämoglobin zeigt, wird mit  $\text{NH}_2\text{OH}$  (auf 1 Mol. Oxyhämoglobin 2 Mol.

<sup>1)</sup> Diese Zahlen sind durch Rechnung erhalten, unter Zugrundelegung der in den Versuchen 1 a, 2 a, 3 a, 4 a direkt ermittelten Prozentzahlen.



$\text{NH}_2\text{OH}$ ) versetzt und dann bis zu einem für die spektrophotometrische Bestimmung geeigneten Grade mit ausgekochtem Wasser verdünnt, wobei durch eine passende Anordnung das Zutreten von Luft unmöglich gemacht wird.

2 Stunden nach dem  $\text{NH}_2\text{OH}$ -Zusatz wird die spektrophotometrische Bestimmung unter Verwendung der von Hüfner für solche Zwecke beschriebenen Absorptionströgdchen vorgenommen.

Bei einer 1. Verdünnung wurden folgende Zahlen erhalten:

$$\begin{aligned}\varphi' &= 81,06^\circ & \varphi &= 80,72^\circ \\ \epsilon' &= 1,617 & \epsilon &= 1,585 \\ \frac{\epsilon'}{\epsilon} &= 1,021.\end{aligned}$$

Eine 2. Verdünnung ergab folgende Zahlen:

$$\begin{aligned}\varphi' &= 65,46^\circ & \varphi &= 63,68^\circ \\ \epsilon' &= 0,7632 & \epsilon &= 0,7064 \\ \frac{\epsilon'}{\epsilon} &= 1,078.\end{aligned}$$

Der Quotient einer reinen Hämoglobinlösung ist nach den Bestimmungen Hüfners 0,762,<sup>1)</sup> es ist also in den oben angeführten Versuchen zweifellos ein Teil des Hämoglobins zu Methämoglobin oxydiert worden.

Die Lösung 1 blieb nach der spektrophotometrischen Bestimmung an der Luft stehen und gab nach etwa 16 Stunden (nach wiederholtem Umschütteln) folgende Zahlen:

$$\begin{aligned}\varphi' &= 80,06^\circ & \varphi &= 76,94^\circ \\ \epsilon' &= 1,526 & \epsilon &= 1,292 \\ \frac{\epsilon'}{\epsilon} &= 1,18.\end{aligned}$$

Eine Probe derselben Oxyhämoglobinlösung ergab auf Zusatz von  $\text{NH}_2\text{OH}$  ohne vorherige Reduktion den Quotienten:

$$\begin{aligned}\frac{\epsilon'}{\epsilon} &= 1,17. \\ (\varphi' &= 77,66^\circ & \varphi &= 74,52^\circ \\ \epsilon' &= 1,340 & \epsilon &= 1,147.)\end{aligned}$$

<sup>1)</sup> Archiv für [Anatomie u.] Physiol., 1894, S. 130 ff.

### Zusammenfassung.

1. Bei der Einwirkung von  $\text{NH}_2\text{OH}$  auf Oxyhämoglobin geht dieses quantitativ in Methämoglobin über, dessen spektrophotometrischer Quotient übereinstimmend mit v. Zeynek zu  $1,186^\circ$  bestimmt wurde. Dabei entweicht aus der Lösung elementarer Stickstoff, dessen Bildung nur verständlich ist unter der Annahme, daß das Oxyhämoglobin das  $\text{NH}_2\text{OH}$  zu  $\text{N}_2$  oxydiert. Damit ist ein direkter Beweis für die schon von Küster ausgesprochene Vermutung, daß Methämoglobin sauerstoffärmer sei als Oxyhämoglobin, geliefert. Ob dem Methämoglobin eine Formel wie  $\text{Hb} = \text{O} \left( \text{Hb} \begin{array}{c} -\text{OH} \\ -\text{OH} \end{array} \right)$  oder  $\text{Hb} - \text{OH}$  zukommt, ist noch weiter zu prüfen; die glatte Bildung von Methämoglobin bei der Einwirkung von 2 Mol.  $\text{NH}_2\text{OH}$  auf 1 Mol. Oxyhämoglobin scheint mir für die erstere Formel zu sprechen, wenn auch die gefundene  $\text{N}_2$ -Menge die wünschenswerte Übereinstimmung mit der berechneten Menge vermissen läßt.

2. Das Absorptionsverhältnis für Methämoglobin in der Spektralgegend  $556,1\text{—}564,6 \mu\mu$  ist zu  $2,103 \times 10^{-3}$  bestimmt worden (v. Zeynek fand  $2,077 \times 10^{-3}$ ).

3. Reduziertem Hämoglobin gegenüber scheint  $\text{NH}_2\text{OH}$  als Oxydationsmittel zu wirken.

Darmstadt, Anfang Juli 1912.