

Dorpat
Dr. ED. v. WAHL

PROF. DER CHIRURGIE

Dorpat.

Chirurgische Klinik
Dorpat.

SEPARATABDRUCK

AUS DER

ZEITSCHRIFT FÜR BIOLOGIE.

BIBLIOTHEKA
E. DE WAHL
DORPATI LIVON.
XVI 21.
№

Universit
Tartuen
1943. 4/13
75

Beobachtungen über die Absorption des Lichtes durch das Oxyhämoglobin.

Von

Dr. med. Friedrich Krüger,

Assistent am physiologischen Institut der Universität zu Dorpat.

Bekanntlich ist das Absorptionsverhältniss (A) gleich der Concentration (c) einer Lösung dividirt durch den Extinctionscoefficienten

$$(\epsilon) \text{ oder } A = \frac{c}{\epsilon}.$$

Je grösser nun c wird, desto grösser muss auch A werden, bei gleichbleibendem ϵ , und umgekehrt.

Man muss nun voraussetzen, dass durch das Umkrystallisiren der zu untersuchenden, färbenden Substanz das Absorptionsverhältniss kleiner werde, da dieselbe dadurch immer mehr von unreinigenden Beimengungen befreit wird, infolgedessen c im Verhältniss zu ϵ kleiner wird.

Merkwürdigerweise fand Kupffer ¹⁾ beim Oxyhämoglobin aber ein anderes Verhalten. — Sowohl das Oxyhämoglobin des Pferde-, als auch das des Hundeblasses zeigten, nach seinen Beobachtungen, nach dreimaliger Krystallisation ein höheres Absorptionsverhältniss, als nach zweimaliger.

Diese Beobachtungen einer weiteren Prüfung zu unterziehen, ist der Zweck meiner Untersuchungen.

Einstellung des Spectrophotometers.

Zu meinen Bestimmungen benutzte ich Hüfner's Spectrophotometer; dieselben wurden zwischen den Fraunhofer'schen Linien D und E ausgeführt.

1) F. Kupffer, Analyse septisch inficirten Hundeblasses. Inaug. Dissert. Dorpat, 1884.

D und *E* wurden durch den Rand des rechten Schiebers bestimmt, indem der Tubus, einmal bei Normalstellung des rechten Schiebers, ein zweites Mal nach Verschiebung desselben um einen Theilstrich der Führungslinie bewegt wurde. Die Verschiebung des Tubus wird bekanntlich durch einen Zeiger auf einer horizontalen Scala markirt.

Die Linie *E* kam auf den Rand des rechten Schiebers in Normalstellung bei

1) 81,7 3) 81,4 5) 82,1

2) 82,0 4) 81,7 6) 81,5

also durchschnittlich bei 81,73 Theilstrichen der horizontalen Scala.

Bei Verschiebung des rechten Schiebers um einen Theilstrich der Führungslinie kam der Rand desselben auf die Linie *E* bei

1) 73,6 3) 73,5 5) 73,5

2) 73,4 4) 73,4 6) 73,5

also durchschnittlich bei 73,48 Theilstrichen der horizontalen Scala.

Daraus folgt, dass ein Theilstrich der Führungslinie = $81,73 - 73,48 = 8,25$ Theilstrichen der horizontalen Scala.

Die Mitte des Linienpaares *D* fiel auf den Rand des rechten Schiebers, in Normalstellung desselben, bei

1) 53,2 3) 53,6 5) 53,5

2) 53,5 4) 53,4 6) 53,6

also durchschnittlich bei 53,46 Theilstrichen der horizontalen Scala.

Auf der horizontalen Scala ist folglich die Entfernung zwischen *D* und *E* = $81,73 - 53,46 = 28,27$, oder 28,27 Theilstriche der horizontalen Scala sind gleich 100 Fraunhofer.

Unsere Spaltbreite entspricht, wenn der linke Schieber in Normalstellung bleibt, der rechte aber um einen Theilstrich der Führungslinie verschoben wird, 8,25 Theilstrichen der horizontalen Scala. Folglich kommen in den Bereich unserer Spaltbreite (nach der Gleichung $28,27 : 100 = 8,25 : x$) 29,18 Fraunhofer.

Das zweite Absorptionsband für Oxyhämoglobin liegt zwischen *D* 54 *E* und *D* 87 *E*. Um dieses Absorptionsband in den Bereich unserer Spalte zu bringen, musste der Tubus so lange verschoben werden, bis der Zeiger der horizontalen Scala auf 68,7 zeigte, wie sich das aus folgender Rechnung ergibt:

$$(81,73 - 53,46) : 100 = (x - 53,46) : 54 \text{ oder}$$

$$x - 53,46 = \frac{1526,58}{100} \text{ oder}$$

$$x = 68,7258$$

Der Zeiger der horizontalen Scala wurde also auf 68,7 bewegt und blieb ein für allemal in dieser Stellung. Da aber unsere Spaltbreite nicht 33 Fraunhofer sondern nur 29,18 umfaßt, so hatten wir nicht den ganzen Bezirk des zweiten Blutbandes vor Augen, sondern nur den Theil von *D 54 E* bis *D 83 E*, statt *D 54 E — D 87 E*, was jedoch die Genauigkeit der Resultate durchaus nicht beeinträchtigt.

Nachdem der Apparat diese Einstellung erhalten hatte, die er für die Zukunft behalten sollte, begann ich zunächst mein Auge in der Wahrnehmung möglichst kleiner Intensitätsunterschiede zu üben. Zu diesen Vorübungen benutzte ich Lösungen von Chromalaun, deren Concentrationen bekannt waren, und erfreute mich sehr bald äusserst befriedigender Resultate.

Die Tabelle einer dieser Beobachtungsreihen will ich hier zur Bestätigung des soeben Gesagten mittheilen.

Bestimmung des Absorptionsverhältnisses für Chromalaun.

	Lösung I	Lösung II
<i>φ</i>	1. 71° 48'	1. 67° 48'
	2. 72° 48'	2. 68° 00'
	3. 72° 00'	3. 67° 30'
	4. 72° 30'	4. 68° 00'
	5. 72° 48'	5. 67° 24'
	6. 72° 48'	6. 67° 18'
	7. 72° 30'	7. 68° 12'
	8. 72° 00'	8. 66° 48'
	9. 72° 48'	9. 67° 48'
	10. 71° 48'	10. 67° 12'
Mittelwerth für <i>φ</i>	72° 24'	67° 36'
<i>ε</i>	1,03892	0,83798
Concentration	4,7441 %	3,8269 %
$A = \frac{\epsilon}{c}$	4,5664	4,5668
Mittelwerth für <i>A</i>	4,5666	

Darstellung der Hämoglobinkrystalle.

Hämoglobinkrystalle stellte ich mir dar aus Hundeblut und aus Pferdeblut.

Das Pferdeblut wurde in gekühlten Vorlagen aufgefangen und kalt gehalten, bis sich die rothen Blutkörperchen gehörig gesenkt hatten; alsdann wurde das Plasma abgehoben und nun ein Theil des Bluts sofort in weiter unten angegebener Weise zur Krystallisation bearbeitet (ungeronnenes Blut), ein anderer Theil aber bei Zimmertemperatur der Gerinnung überlassen, und wenn nun das Blut geronnen war, wurde der Blutkuchen durch Leinwand gepresst (defibrinirtes Blut).

Das Hundeblut wurde sofort bei Zimmertemperatur sich selbst überlassen und dann, nachdem es vollkommen geronnen, die Placenta sanguinis ebenfalls durch Leinwand gepresst.

Die weitere Bearbeitung war, unabhängig von den vorangegangenen Behandlungen, stets dieselbe.

Das Blut wurde mit dem vier- bis fünffachen Volum destillirten Wassers versetzt und dann, nach Angabe Al. Schmidt's, eine sehr kleine Menge einer verdünnten, titrirten Ammoniaklösung hinzugefügt, um die Stromata nach Möglichkeit zu zerstören, resp. beim Umkrystallisiren die Lösung der Hämoglobinkrystalle zu begünstigen. Zu demselben Zweck wurde die Lösung nach Zusatz von Ammoniak noch auf dem Dampfbade bis auf 35—36° C. erwärmt, dann vom Dampfbade entfernt und einige Minuten stehen gelassen. Alsdann wurde mit einer entsprechend verdünnten, titrirten Salzsäurelösung neutralisirt, $\frac{1}{5}$ — $\frac{1}{4}$ Volum 96% Alkohol unter beständigem Umrühren hinzugefügt und die Lösung einer Temperatur von 0° C. ausgesetzt.

Nach 24—48 Stunden war in der Regel die ganze Masse zu einem steifen Krystallbrei erstarrt. Dieser Krystallbrei wurde auf Leinwand gebracht, abgewartet bis die Mutterlauge möglichst abgetropft war, dann mit eiskaltem Wasser unter Verlust nachgewaschen.

Nachdem auch dieses Waschwasser abgetropft, wurde der auf der Leinwand verbleibende Krystallbrei in Centrifugengläser übergeführt, dreimal mit ungefähr dem gleichen Volum eiskalten Wassers

auf einer kleinen Handcentrifuge, die in der Minute 5—600 Umdrehungen ausführte, ausgewaschen. Das jedesmalige Centrifugiren wurde nie länger als 10 Minuten, in der Regel sogar nur 3—5 Minuten fortgesetzt, denn ich vermied es, grosse Verluste nicht scheuend, das Centrifugiren so lange fortzuführen, bis die überstehende Flüssigkeit klar war. Ich betone das ausdrücklich, weil ein derartiges Vorgehen am besten eine möglichst vollständige Trennung von den Stromata und anderen leichteren Beimengungen garantirt.

Von den also behandelten Hämoglobinkrystallen wurde nun eine kleine Portion zur spectrophotometrischen Bestimmung abgenommen, zwischen Filtrirpapier ausgepresst, die auf dem Papier verbleibende, zäh-feste, teigige Krystallmasse wieder in dem gleichen Volum Wasser vertheilt, abermals centrifugirt, die oben stehende Flüssigkeit abgegossen und nun die so gereinigten Hämoglobinkrystalle in vorher ausgekochtem und auf ca. 25° C. abgekühltem Wasser gelöst, und zwar so, dass womöglich Krystalle im Ueberschuss waren.

Die andere, grössere Portion wurde behufs weiterer Krystallisation wieder gelöst, durch Leinwand filtrirt und ganz ebenso behandelt. In dieser Weise setzte ich das Krystallisiren zwei-, drei- bis viermal fort.

Etwas abweichend von dem eben beschriebenen Gang verfuhr ich in der ersten Versuchsreihe, indem hier die Centrifuge noch nicht in Anwendung gebracht worden war.

Hier nahm ich die Reinigung der Krystalle vor, indem ich die auf der Leinwand befindliche Krystallmasse erst mehrfach mit eiskaltem, etwas Alkohol enthaltendem (1%) Wasser nachwusch, dieselbe, nachdem das Waschwasser abgetropft, in Maasscylinder brachte, gehörig mit 1—2 Volum kalten, alkoholhaltigem Wasser durchmischte und decantirte.

Bestimmung des Absorptionsverhältnisses.

Wie ich schon einmal bemerkt habe, wurde von jeder Krystallisation eine gewisse Menge des Krystallbreies zwischen Fliesspapier ausgepresst, wieder mit Wasser verrührt, centrifugirt und nun endlich in Wasser gebracht und 1—2 Stunden der Lösung über-

lassen, dann durch Filtrirpapier filtrirt. Das Filtrat war stets viel zu concentrirt zu den spectrophotometrischen Bestimmungen.

Durch vielfache Vorversuche war ich zu dem Resultat gekommen, dass die passendste Concentration für mich diejenige sei, deren Extinctionscoëfficient einem Winkel entspricht, welcher zwischen 64 und 74° liegt — dieses waren aber auch die äussersten Grenzen. Je weiter nach oben oder nach unten sich die Grösse des Winkels von diesen Grenzen entfernte, um so unempfindlicher wurde mein Auge gegen Intensitätsunterschiede, um so ungenauer wurden die Resultate.

Bevor zu einer sorgfältigen Wägung geschritten wurde, bestimmte ich daher volumetrisch die passende Verdünnung. Zur Verdünnung wurde nicht etwa destillirtes Wasser sondern nach Hüfner's Vorgang $0,1\%$ Sodalösung benutzt.

War die Verdünnung auf diese Art ungefähr bestimmt, so wurden dementsprechend mehrere Präparate innerhalb der angegebenen Winkelgrenzen hergestellt und zwar folgendermaassen:

Angenommen, es wäre durch den Vorversuch bestimmt worden, dass die ursprüngliche Krystalllösung im Verhältniss von $1:10$ verdünnt werden müsse, um am Spectrophotometer den oberen Grenzwinkel anzugeben, so wurden erst mit einer Pipette 10 ccm der Na_2CO_3 lösung abgemessen, in einen kleinen, mit geschliffenen Glasplättchen bedeckten Ballon, dessen Gewicht vorher bestimmt worden war, gethan und abgewogen, darauf mit einer Pipette von 1 ccm Inhalt, die in 100 Theile getheilt war, 1 ccm von der Krystalllösung hinzugefügt und nun wieder gewogen. Da die Präparate in abnehmender Concentration hergestellt werden sollten, so wurden immer 10 ccm der Salzlösung abgemessen und gewogen und zu jedem folgenden Präparat je 10 Theilstriche (ca.) weniger von der ursprünglichen Krystalllösung hinzugefügt als zum vorhergehenden, und dann gewogen. Es ist klar, dass sich auf diese Weise jedes Mal der procent. Gehalt der Gesamtlösung an ursprünglicher Krystalllösung mit grösster Genauigkeit berechnen liess und zwar nach Gewicht.

Die Wägungen hatte Herr Prof. Al. Schmidt die Freundlichkeit, während ich am Spectrophotometer beschäftigt war, auszuführen.

Zur Bestimmung des Gehalts der ursprünglichen Krystalllösung an Hämoglobin, wurde eine abgewogene Quantität derselben 3 mal 24 Stunden unter der Luftpumpe über Schwefelsäure getrocknet und dann das Trocknen im Trockenofen bei einer Temperatur von 110—115° C. bis zur Gewichtsconstanz fortgesetzt.

Da nun der procent. Gehalt an Krystalllösung in jedem Präparat bekannt war, so war es natürlich eine Kleinigkeit, auch den Gehalt an Hämoglobin zu berechnen und das Absorptionsverhältniss festzustellen.

Bevor ich nun meine Versuchsprotokolle hier wiedergebe, will ich noch bemerken, dass der Winkel φ stets das Resultat aus zehn Einzelbestimmungen darstellt.

Um einen Maassstab für die Genauigkeit der spectrophotometrischen Bestimmung zu haben, wurde jedes Mal sofort das Verhältniss des Gehaltes der einzelnen Präparate an Krystalllösung zu einander berechnet, sowohl aus den Ergebnissen der Wägung, (in den Tabellen mit *B W* bezeichnet), als auch aus den entsprechenden Extinctionscoëfficienten (*B ε*). Dabei wurde der Gehalt des ersten Präparates an Krystalllösung, wie auch der zugehörige Extinctionscoëfficient = 100 gesetzt. Die Resultate beider Rechnungen mussten gleich sein, da die Extinctionscoëfficienten und Concentrationen in geradem Verhältniss zu einander stehen.

Unmittelbar vor der spectrophotometrischen Bestimmung wurden die Lösungen gehörig mit Luft geschüttelt.

Versuche.

A. Pferdeblut.

I. Reihe.

Defibrinirtes Blut.

1. Zweite Krystallisation.

Zur spectrophotometrischen Bestimmung wurden vier Präparate in abnehmender Concentration nach früher beschriebener Methode angefertigt.

Zur Bestimmung des Trockenrückstandes sind von der Krystalllösung abgewogen worden 15,3308 g; nach dem Trocknen verblieb

ein Rückstand von 0,1789 g, mithin betrug der procent. Trockenrückstand 1,1669%.

Präparat	Procent. Gehalt an Krystalllösung	φ	ε	$B W$	$B \varepsilon$
I	10,2624	69° 42'	0,91950	100,00	100,00
II	9,5288	67° 48'	0,84538	92,85	91,94
III	8,5808	65° 48'	0,77460	83,61	84,24
IV	7,8056	63° 54'	0,71332	76,06	77,55

Da nun der procent. Trockenrückstand der ursprünglichen Krystalllösung einerseits, der Gehalt der einzelnen Präparate an dieser Krystalllösung andererseits bekannt ist, so kann daraus natürlich die Concentration (c) der einzelnen Präparate berechnet werden. Alsdann wird sich ferner, da auch der Extinctionscoefficient ε ermittelt ist, das Absorptionsverhältniss $A = \frac{c}{\varepsilon}$ durch Rechnung ergeben.

Berechnung des Absorptionsverhältnisses.

Präparat	c	ε	A
I	0,1198%	0,91950	0,1303
II	0,1112%	0,84538	0,1315
III	0,1001%	0,77460	0,1292
IV	0,0911%	0,71332	0,1277

Mittelwerth für $A = 0,1297$.

2. Dritte Krystallisation.

Es wurden zur spectrophotometrischen Bestimmung vier Präparate hergestellt.

Präparat	Procent. Gehalt an Krystalllösung	φ	ε	$B W$	$B \varepsilon$
I	20,6276	71° 6'	0,97914	100,00	100,00
II	18,7690	69° 24'	0,90730	90,99	92,66
III	16,3427	65° 36'	0,76788	79,22	78,42
IV	15,1292	64° 24'	0,72886	73,34	74,44

Zur Bestimmung des Trockenrückstandes wurden von der Krystalllösung 23,9604 g abgewogen; nach dem Trocknen verblieb ein Rückstand von 0,1570 g, mithin betrug der procent. Trockenrückstand 0,6552 %.

Berechnung des Absorptionsverhältnisses.

Präparat	<i>c</i>	ϵ	<i>A</i>
I	0,1352 %	0,97914	0,1381
II	0,1230 %	0,90730	0,1356
III	0,1071 %	0,76788	0,1382
IV	0,0991 %	0,72886	0,1360

Mittelwerth für *A* = 0,1372.

Es waren also *A*: 1. nach zweimaliger Krystallisation = 0,1297
2. nach dreimaliger Krystallisation = 0,1372.

II. Reihe.

a) Defibrinirtes Blut.

1. Erste Krystallisation.

Es wurden zur spectrophotometrischen Bestimmung zwei Präparate hergestellt.

Präparat	Procent. Gehalt an Krystalllösung	φ	ϵ	<i>B W</i>	<i>B</i> ϵ
I	10,8783	67° 48'	0,84538	100,00	100,00
II	9,3109	63° 48'	0,71012	85,59	84,00

Zur Bestimmung des Trockenrückstandes wurden von der Krystalllösung 10,4974 g abgewogen; nach dem Trocknen verblieb ein Rückstand von 0,1023 g, mithin betrug der procent. Trockenrückstand 0,9747 %.

Berechnung des Absorptionsverhältnisses.

Präparat	<i>c</i>	ϵ	<i>A</i>
I	0,1060 %	0,84538	0,1254
II	0,0907 %	0,71012	0,1277

Mittelwerth für *A* = 0,1266.

2. Zweite Krystallisation.

Es wurden zur spectrophotometrischen Bestimmung drei Präparate hergestellt.

Präparat	Procent. Gehalt an Krystalllösung	φ	ε	$B W$	$B \varepsilon$
I	8,2102	70° 24'	0,94874	100,00	100,00
II	7,4848	68° 30'	0,87188	91,16	91,90
III	6,9603	67° 00'	0,81624	84,78	86,03

Zur Bestimmung des Trockenrückstandes wurden von der Krystalllösung 12,2608 g abgewogen; nach dem Trocknen verblieb ein Rückstand von 0,1885 g, mithin betrug der procent. Trockenrückstand 1,5374 %.

Berechnung des Absorptionsverhältnisses.

Präparat	c	ε	A
I	0,1262 %	0,94874	0,1330
II	0,1151 %	0,87188	0,1321
III	0,1070 %	0,81624	0,1311

Mittelwerth für $A = 0,1321$.

3. Dritte Krystallisation.

Es wurden zur spectrophotometrischen Bestimmung drei Präparate angefertigt.

Präparat	Procent. Gehalt an Krystalllösung	φ	ε	$B W$	$B \varepsilon$
I	16,4181	70° 18'	0,94450	100,00	100,00
II	14,9139	68° 18'	0,86420	90,84	91,50
III	13,9077	66° 30'	0,79860	84,10	84,55

Zur Bestimmung des Trockenrückstandes wurden von der Krystalllösung 11,3101 g abgewogen, nach dem Trocknen verblieb ein Rückstand von 0,0894 g, mithin betrug der procent. Trockenrückstand 0,7904 %.

Berechnung des Absorptionsverhältnisses.

Präparat	c	ε	A
I	0,1298 ‰	0,94450	0,1375
II	0,1179 ‰	0,86420	0,1364
III	0,1099 ‰	0,79860	0,1376

Mittelwerth für $A = 0,1372$.

- Es war also A :
1. nach einmaliger Krystallisation = 0,1266
 2. nach zweimaliger " = 0,1321
 3. nach dreimaliger " = 0,1372.

b) Ungeronnenes Blut.

1. Zweite Krystallisation.

Es wurden zur spectrophotometrischen Bestimmung drei Präparate angefertigt.

Präparat	Procent. Gehalt an Krystalllösung	φ	ε	$B W$	$B \varepsilon$
I	66,2691	70° 30'	0,95300	100,00	100,00
II	61,2096	68° 36'	0,87570	92,35	91,89
III	57,8064	67° 12'	0,82282	87,23	86,55

Zur Bestimmung des Trockenrückstandes wurden von der Krystalllösung 17,8290 g abgewogen; nach dem Trocknen verblieb ein Rückstand von 0,0324 g, somit betrug der procent. Trockenrückstand 0,1802 ‰.

Berechnung des Absorptionsverhältnisses.

Präparat	c	ε	A
I	0,1194 ‰	0,95300	0,1253
II	0,1103 ‰	0,87570	0,1258
III	0,1042 ‰	0,82282	0,1266

Mittelwerth für $A = 0,1259$.

2. Dritte Krystallisation.

Es wurden zur spectrophotometrischen Bestimmung zwei Präparate angefertigt.

Präparat	Procent. Gehalt an Krystalllösung	φ	ϵ	$B W$	$B \epsilon$
I	18,5384	70° 6'	0,93606	100,00	100,00
II	16,7790	68° 6'	0,85662	90,51	91,51

Zur Bestimmung des Trockenrückstandes wurden von der Krystalllösung 12,1537 g abgewogen. Nach dem Trocknen verblieb ein Rückstand von 0,0812 g, mithin betrug der procent. Trockenrückstand 0,6681 %.

Berechnung des Absorptionsverhältnisses.

Präparat	c	ϵ	A
I	0,1239 %	0,93606	0,1324
II	0,1121 %	0,85662	0,1309

Mittelwerth für $A = 0,1317$.

Es war also A : 1. nach zweimaliger Krystallisation = 0,1259
2. nach dreimaliger „ = 0,1317

B. Hundeblood.

Als ich mit dieser Versuchsreihe beginnen wollte, kam mir Hüfner's Arbeit „Beitrag zur Lehre vom Blutfarbstoffe¹⁾“ zu Gesicht, in der er die Vermuthung ausspricht, Zinoffsky²⁾ habe in Bezug auf die Zusammensetzung des Hämoglobinmoleküls aus dem Grunde andere Resultate erzielt als die übrigen Forscher, weil er bei der Darstellung der Hämoglobinkrystalle das Ammoniak anwandte. Es konnte natürlich, angenommen Hüfner habe Recht, der Gedanke nicht fern liegen, dass auch bei unserer auffallenden Erscheinung möglicherweise die Zuhilfenahme des Ammoniak von wesentlicher Bedeutung sei, und ich wollte es daher nicht unterlassen, zu prüfen, ob bei Darstellung der Blutkrystalle ohne Ammoniak und mehrfachem Umkrystallisiren sich dasselbe Phänomen zeigen würde oder nicht.

1) Beiträge zur Physiologie. Carl Ludwig gewidmet 1887.

2) O. Zinoffsky, Ueber die Grösse des Hämoglobinmoleküls. Inaug.-Dissert., Dorpat 1885.

Mit Ausnahme der Weglassung des Ammoniak, und infolgedessen natürlich auch der Salzsäure, war die Darstellungsweise der Blutkrystalle nicht verschieden von der oben beschriebenen, nur war eine grössere Menge Wasser zur Lösung des Hämoglobin nothwendig.

Es wurden also mit dem Hundeblood zwei Parallelversuche ausgeführt.

Das Blut gewann ich, indem ich einen grossen Hund aus der Carotis verbluten liess. Nachdem das Blut geronnen war, wurde die Placenta sanguinis durch Leinwand gepresst und das so gewonnene Blut in zwei, annähernd gleiche, Theile getheilt. Die eine Portion wurde unter Anwendung von Ammoniak krystallisirt und umkrystallisirt, die andere ohne Zusatz von Ammoniak der Krystallisation unterworfen.

III. Reihe.

a) Krystalle ohne Ammoniak dargestellt.

1. Erste Krystallisation.

Es wurden zur spectrophotometrischen Bestimmung drei Präparate angefertigt.

Präparate	Procent. Gehalt an Krystalllösung	φ	ε	$B W$	$B \varepsilon$
I	5,6218	71° 12'	0,98358	100,00	100,00
II	5,0813	69° 00'	0,89134	90,39	90,62
III	4,6763	67° 6'	0,81982	83,18	83,35

Zur Bestimmung des Trockenrückstandes wurden von der Krystalllösung 13,3013 g abgewogen; nach dem Trocknen verblieb ein Rückstand von 0,3117 g, mithin betrug der procent. Trockenrückstand 2,3434 %.

Berechnung des Absorptionsverhältnisses.

Präparat	c	ε	A
I	0,1317 %	0,98358	0,1339
II	0,1191 %	0,89134	0,1336
III	0,1096 %	0,81982	0,1337

Mittelwerth für $A = 0,1337$.

2. Zweite Krystallisation.

Es wurden zur spectrophotometrischen Bestimmung drei Präparate angefertigt.

Präparat	Procent. Gehalt an Krystalllösung	φ	ε	$B W$	$B \varepsilon$
I	5,3872	71° 12'	0,98358	100,00	100,00
II	4,8139	68° 48'	0,88348	89,36	89,80
III	4,5676	67° 12'	0,82342	84,79	83,70

Zur Bestimmung des Trockenrückstandes wurden von der Krystalllösung 14,6223 g abgewogen; nach dem Trocknen verblieb ein Rückstand von 0,3773 g, mithin betrug der procent. Trockenrückstand 2,5803 %.

Berechnung des Absorptionsverhältnisses.

Präparat	c	ε	A
I	0,1390 %	0,98358	0,1413
II	0,1242 %	0,88348	0,1406
III	0,1178 %	0,82342	0,1432

Mittelwerth für $A = 0,1417$.

3. Dritte Krystallisation.

Es wurden zur spectrophotometrischen Bestimmung drei Präparate angefertigt.

Präparat	Procent. Gehalt an Krystalllösung	φ	ε	$B W$	$B \varepsilon$
I	5,6798	70° 30'	0,95300	100,00	100,00
II	5,4058	69° 12'	0,89868	95,25	94,29
III	5,1035	68° 6'	0,85662	89,85	89,89

Zur Bestimmung des Trockenrückstandes wurden von der Krystalllösung 7,3140 g abgewogen; nach dem Trocknen verblieb ein Rückstand von 0,1756 g, mithin betrug der procent. Trockenrückstand 2,4009 %.

Bestimmung des Absorptionsverhältnisses.

Präparat	c	ε	A
I	0,1364 %	0,95300	0,1430
II	0,1298 %	0,89868	0,1444
III	0,1225 %	0,85662	0,1430

Mittelwerth für $A = 0,1435$.

4. Vierte Krystallisation.

Es wurden zur spectrophotometrischen Bestimmung drei Präparate angefertigt.

Präparat	Procent. Gehalt an Krystalllösung	φ	ε	$B W$	$B \varepsilon$
I	6,8708	70° 54'	0,97032	100,00	100,00
II	6,4154	69° 36'	0,91542	93,37	94,33
III	5,9548	68° 00'	0,85284	86,67	87,89

Zur Bestimmung des Trockenrückstandes wurden von der Krystalllösung 12,2470 g abgewogen; nach dem Trocknen verblieb ein Rückstand von 0,2612 g; mithin betrug der procent. Trockenrückstand 2,1328 %.

Berechnung des Absorptionsverhältnisses.

Präparat	c	ε	A
I	0,1465 %	0,97032	0,1510
II	0,1368 %	0,91542	0,1494
III	0,1270 %	0,85284	0,1489

Mittelwerth für $A = 0,1498$.

- Es war also A :
1. nach einmaliger Krystallisation = 0,1337
 2. nach zweimaliger „ = 0,1417
 3. nach dreimaliger „ = 0,1435
 4. nach viermaliger „ = 0,1498.

b) Krystalle mit Ammoniak dargestellt.

1. Erste Krystallisation.

Es wurden zur spectrophotometrischen Bestimmung drei Präparate hergestellt.

Präparat	Procent. Gehalt an Krystalllösung	φ	ε	$W B$	$B \varepsilon$
I	8,3617	71° 42'	1,00616	100,00	100,00
II	7,5328	69° 12'	0,89928	90,09	89,38
III	6,7155	66° 54'	0,81268	80,32	80,78

Zur Bestimmung des Trockenrückstandes wurden von der Krystalllösung 12,8013 g abgewogen; nach dem Trocknen verblieb ein Rückstand von 0,2157 g; mithin betrug der procent. Trockenrückstand 1,6850 %.

Berechnung des Absorptionsverhältnisses.

Präparat	c	ε	A
I	0,1409 %	1,00616	0,1400
II	0,1269 %	0,89928	0,1412
III	0,1131 %	0,81268	0,1392

Mittelwerth für $A = 0,1401$.

2. Zweite Krystallisation.

Es wurden zur spectrophotometrischen Bestimmung zwei Präparate angefertigt.

Präparat	Procent. Gehalt an Krystalllösung	φ	ε	$W B$	$B \varepsilon$
I	3,3671	71° 48'	1,01076	100,00	100,00
II	3,0037	69° 30'	0,91542	89,21	90,57

Zur Bestimmung des Trockenrückstandes wurden von der Krystalllösung 11,4727 g abgewogen; nach dem Trocknen verblieb ein Rückstand von 0,4957 g; mithin betrug der procent. Trockenrückstand 4,3206 %.

Berechnung des Absorptionsverhältnisses.

Präparat	c	ε	A
I	0,1455 %	1,01076	0,1439
II	0,1298 %	0,91542	0,1418

Mittelwerth für $A = 0,1429$.

3. Dritte Krystallisation.

Es wurden zur spectrophotometrischen Bestimmung drei Präparate angefertigt.

Präparat	Procent. Gehalt an Krystalllösung	φ	ε	$B W$	$B \varepsilon$
I	3,3498	72° 18'	1,03416	100,00	100,00
II	2,9658	70° 00'	0,93190	88,54	90,11
III	2,7854	68° 24'	0,86802	83,15	83,85

Zur Bestimmung des Trockenrückstandes wurden von der Krystalllösung 8,7933 g abgewogen; nach dem Trocknen verblieb ein Rückstand von 0,3976 g, mithin betrug der procent. Trockenrückstand 4,5216 %.

Berechnung des Absorptionsverhältnisses.

Präparat	c	ε	A
I	0,1515 %	1,03416	0,1456
II	0,1345 %	0,93190	0,1443
III	0,1259 %	0,86802	0,1450

Mittelwerth für $A = 0,1453$.

4. Vierte Krystallisation.

Es wurden zur spectrophotometrischen Bestimmung drei Präparate angefertigt.

Präparat	Procent. Gehalt an Krystalllösung	φ	ε	$B W$	$B \varepsilon$
I	6,5188	72° 6'	1,02472	100,00	100,00
II	5,8709	69° 48'	0,92362	90,06	90,13
III	5,3189	67° 36'	0,83798	81,59	81,73

Zur Bestimmung des Trockenrückstandes wurden von der Krystalllösung 9,3972 g abgewogen; nach dem Trocknen verblieb ein Rückstand von 0,2147 g, mithin betrug der procent. Trockenrückstand 2,2847 %.

Berechnung des Absorptionsverhältnisses.

Präparat	c	ε	A
I	0,1489 %	1,02472	0,1453
II	0,1341 %	0,92362	0,1452
III	0,1215 %	0,83798	0,1450

Mittelwerth für $A = 0,1452$.

Es war also A : 1. nach einmaliger Krystallisation = 0,1401
 2. nach zweimaliger „ = 0,1429
 3. nach dreimaliger „ = 0,1453
 4. nach viermaliger „ = 0,1452.

Schluss.

Wenn man diese Versuche durchmustert, so erscheint es als feststehende Thatsache, dass das Absorptionsverhältniss von Krystallisation zu Krystallisation zunimmt.

Ich will hier aus den Resultaten meiner Versuche eine Tabelle zusammenstellen, in der eine Uebersicht der gewonnenen Absorptionsverhältnisse gegeben werden soll. Die römischen Zahlen über jedem verticalen Tabellenstab geben an, zu welcher Krystallisation die betreffenden Absorptionsverhältnisse gehören.

Krystalle, von welchem Blut und wie behandelt?	I	II	III	IV
Defibrin. Pferdeblut Krystallisation mit NH_3	—	0,1297	0,1372	—
Defibrin. Pferdeblut Krystallisation mit NH_3	} 0,1266	0,1321	0,1372	—
Ungeronn. Pferdeblut Krystallisation mit NH_3		—	0,1259	0,1317
Hundeblut Krystallisation ohne NH_3	} 0,1337	0,1417	0,1435	0,1498
Hundeblut Krystallisation mit NH_3		0,1401	0,1429	0,1453

Aus dem Gesagten geht hervor, dass, wenn die absolute Hämoglobinmenge eines Blutes bestimmt werden soll, vor mehrfachem

Umkrystallisiren der Blutkrystalle, behufs Bestimmung des Absorptionsverhältnisses des Oxyhämoglobin, gewarnt werden muss, wenn man nicht viel zu hohe Werthe erhalten will. Auf den ersten Blick erscheinen diese Unterschiede der Absorptionsverhältnisse gar nicht so gross; führt man aber eine quantitative Blutanalyse aus und nimmt zur Berechnung des Hämoglobin im Blute das Absorptionsverhältniss der zweiten oder dritten Krystallisation, wie es bisher geschehen, so erlangt man Resultate, die eine unmögliche Zusammensetzung des Blutkörperchenrückstandes erheischen, wie das schon von Kupffer bemerkt worden ist; man kann z. B. die Hämoglobinmenge grösser finden, als der Rückstand der Blutkörper es ist. Und wo bleibt dann noch das Stroma? Für dieses fällt der Werth negativ aus!

Am nächsten wird man der Wahrheit kommen, wenn man das Blut nur einmal der Krystallisation unterwirft, die gewonnenen Krystalle mit eiskaltem Wasser aufrührt, kurze Zeit centrifugirt, die obere noch nicht klare und durchsichtige Flüssigkeitsschicht abgiesst und dieselbe Prozedur noch einige Male wiederholt. Selbstredend darf man dabei grosse Verluste nicht scheuen.

Dadurch, dass man das Centrifugiren nicht so lange fortsetzt, bis die obenstehende Flüssigkeit klar wird, wird eine ziemlich grosse Sicherheit dafür geboten, dass alle leichteren, aufgeschwemmten Körper (Stromata) entfernt werden.

Ich sagte vorhin ausdrücklich, man komme auf diese Art der Wahrheit am nächsten, d. h. man wird auf diese Art einen möglichst kleinen Fehler machen, dass aber die nach dieser Methode gewonnenen Zahlen absolut richtig seien, will ich durchaus nicht behaupten, denn es ist sehr wahrscheinlich, dass dieselben immer noch zu hoch ausfallen werden, da es sehr leicht möglich ist, dass schon ein einmaliges Krystallisiren ein zu hohes Absorptionsverhältniss bedingt.

Die Anwendung des Ammoniak zeigte in meiner Versuchsreihe für die zweite und dritte Krystallisation keinen wesentlichen Einfluss; bei der ersten Krystallisation war jedoch das Absorptionsverhältniss bedeutend höher, bei der vierten hingegen viel niedriger als in der entsprechenden Parallelreihe, in der die Blutkrystalle ohne Ammoniak

dargestellt worden waren. Was die Ursache für diese Verschiedenheit ist, ist mir unbekannt.

Hervorheben will ich noch, dass in der Reihe, in der das Ammoniak zur Darstellung der Blutkrystalle angewandt wurde, das Absorptionsverhältniss nicht so stark nach jeder Krystallisation anwuchs, wie in der Reihe, in der von der Anwendung des Ammoniak abgesehen wurde; bei der vierten Krystallisation war das Absorptionsverhältniss sogar gar nicht mehr gestiegen, es war dem der dritten Krystallisation gleich geblieben.

Ferner sei hier noch erwähnt, dass ich in Betreff der Löslichkeit einen Unterschied zwischen den mit und ohne Ammoniak dargestellten Blutkrystallen beobachtet habe, wobei ich daran erinnern muss, dass das zugesetzte Ammoniak jedes Mal wieder mit Salzsäure neutralisirt worden war, und ausserdem die Krystalle von der Mutterlauge durch mehrfaches Auswaschen mit Wasser auf der Centrifuge getrennt worden waren. Dieser Unterschied war ein sehr bedeutender, wenigstens in den Fällen, die ich einer genaueren diesbezüglichen Beobachtung unterzog und in denen ich sicher war, dass die Lösungen gesättigt waren. Diese Fälle gehören zur zweiten und dritten Krystallisation des Hundebbluts. Man ersieht die Unterschiede aus dem Vergleich der procent. Trockenrückstände der betreffenden Lösungen. Ich fand die Rückstände der Lösungen der mit Ammoniak dargestellten Krystalle = 4,3206 % und 4,5216 %, für die Lösungen der ohne Ammoniak dargestellten Blutkrystalle = 2,5803 % und 2,4009 %, also beinahe im Verhältniss von 2 : 1 zu einander stehend. — Aus diesen wenigen Beobachtungen über die Löslichkeitsverschiedenheit der nach diesen beiden Methoden (mit und ohne Anwendung von Ammoniak) dargestellten Blutkrystalle lässt sich natürlich kein Gesetz aufstellen, jedoch verdienen dieselben Interesse, und deswegen wollte ich es nicht unterlassen, auf dieses Verhalten aufmerksam zu machen.

Zum Schluss sei es mir gestattet, meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Al. Schmidt für seine liebenswürdige und unermüdliche Unterstützung bei der Ausführung dieser Arbeit meinen wärmsten Dank auszusprechen.

