

(Aus dem Institut für gerichtliche und soziale Medizin der Universität Königsberg i. Pr. — Direktor: Professor Dr. Nippe.)

Bemerkenswerte Methämoglobineigenschaften.

I.

Von

Dozent Dr. med. habil. **R. M. Mayer,**

I. Assistent am Institut.

Mit 1 Textabbildung.

I. Spektrale Eigenschaften.

Wenn *Wachholz*¹ und Mitarbeiter vor kurzem, auf die spektroskopischen Eigenschaften des Methämoglobins eingehend, die Behauptung aufstellten, daß das Spektrum des neutralen Met-Hb. nur einbandig ist, gekennzeichnet durch den Absorptionsstreifen von 642 bis 615 m μ , also im Rot, so unterliegen sie einem Irrtum, der geeignet ist, die Verwirrung in der Literatur wieder aufleben zu lassen, die *Jäderholm*² schon 1880 (l. c. weiter unten) mit den Worten gekennzeichnet hat: „Von den früheren Autoren, *Hoppe-Seyler*, *Sorby*, *E. Ray*, *Lankaster* und *Preyer* werden dem Met-Hb. von diesen Streifen bald einer, bald zwei, bald drei, bald alle vier zugeteilt —.“ *Jäderholm* selbst, der dem „neutralen“ Met-Hb. 4 Banden zuschreibt und dem bekannt war, daß die Bande 2 und 3 der *Lage nach* mit den beiden Banden des Oxy-Hämoglobins übereinstimmten, ohne daß er sie damit identifiziert hätte, wurde in der damaligen Zeit von *Hoppe-Seyler*³ als der beste Kenner der spektroskopischen Eigenschaften des Met-Hb. bezeichnet. *Hoppe-Seyler* sagt aber auch an gleicher Stelle, „wie trügerisch die spektroskopischen Erscheinungen sind, wenn nicht gleichzeitig sorgfältige chemische Untersuchungen mit ihrer Beobachtung Hand in Hand gehen, hat sich in zahlreichen Irrungen deutlich erkennen lassen.“ Darin ist meines Erachtens heutzutage kein Wandel eingetreten, wie allein die Geschichte der modernen Porphyrinforschung beweist!

Die möglichen Fehlerquellen bei der Spektroskopie gefärbter Lösungen sind, angefangen vom unterschiedlichen Auflösungsvermögen verschiedener Spektroskope, wie überhaupt der gesamten Qualität der Instrumente, bis zu den Fehlerquellen, die in der spektroskopierten Lösung selbst bedingt sein können, sehr mannigfaltig, und selten läßt sich ein chemischer Körper auch in reiner Lösung durch seine spektralen Eigenschaften allein definieren. In ungereinigter Lösung können spektrale Unterschiede zutage treten, da sich die Versuchsbedingungen nicht konstant halten lassen. Deshalb hat schon die klassische Spektro-

skopie größten Wert auf Reinheit der Farbstofflösungen gelegt, und man hat die Mühe nicht gescheut, erst Farbstoffkristalle darzustellen, bevor man das Spektrum des betreffenden Körpers festlegte.

Auch neuere Autoren arbeiteten entweder an krystallisiertem, dialysiertem oder auf andere Art gereinigtem Ausgangsmaterial, ohne indes zur Einigkeit über die Spektralerscheinungen des Met-Hb. zu kommen. *Heubner*⁴ weist ihm im Grün nur eine Bande zu. *P. Hari*⁵ und seine Schülerin *A. Dénes*⁶, welche an reinem „neutralem“ und soda-alkalischem, gelöstem Met-Hb. spektrophotometrische Messungen vorgenommen haben, wollen nur die Banden im Rot (bei 630 m μ) und im Blau (bei 499 m μ) für das neutrale Spektrum gelten lassen; ebenso *Rost, Franz und Heise*⁷. *Manchoff*⁸ fand nach spurenweisem Zusatz von Natriumhyposulfit zu Met-Hb.-Lösungen nur noch die eine Bande im Rot.

Die gerichtliche Medizin kann als angewandte Naturwissenschaft weder auf die Beschreibung des spektralen Verhaltens gereinigter Farbstofflösungen unter möglichst bekannten, also reproduzierbaren Bedingungen verzichten, noch sich damit begnügen. Es erscheint nämlich fraglich, ob in jedem praktischen Falle überhaupt reine Lösungen von dem zu bestimmenden Met-Hb. möglich sind, ohne es gewaltsam zu verändern.

Wachholz und Mitarbeiter haben ihre Untersuchungen an einer „2 proz. wässrigen Lösung frischen defibrinierten Blutes“ vorgenommen, der sie Ferricyankalium in Substanz zusetzten. Sie gaben an, daß sie stets dann, wenn die Umsetzung quantitativ zur Met-Hb.-Bildung führte, nur den einen Streifen im Rot beobachteten, dessen Maximum nach ihren Angaben im Falle der Symmetrie der Bande bei 628,5 m μ liegen müßte. Bei ungenügendem Ferricyankalizusatz soll daneben noch „die Doppelbande des Oxyhämoglobins“ sichtbar gewesen sein.

Es liegen keine Angaben über die Schichtdicke der untersuchten Lösungen vor, doch beweist die überaus hochliegende Endabsorption bei 590 m μ , daß in viel zu dicker Schicht oder in zu großer Konzentration bzw. mit zu hoher Grundabsorption (Ferricyankali!) untersucht wurde, sonst hätte ihnen die 4. intensive Bande im Blaugrün, deren Maximum nach verschiedenen Angaben älterer Autoren etwa bei 500 m μ liegt und die ich selbst bei 501,5 m μ visuell unter diesen Bedingungen beobachtet habe, nicht entgehen können.

Die Arbeiten von *Conant*⁹ sowie die von *Michaelis* und *Salomon*¹⁰, welche die quantitative Umsetzung zwischen Hb. und Ferricyankalium in einfach molekularem stöchiometrischen Verhältnis in Stickstoffatmosphäre gefunden haben und in sauerstoffhaltiger Luft bei 735 mm Hg keinen besonders großen Überschuß an $K_3Fe(CN)_6$ benötigten, scheinen allgemein nicht bekannt zu sein. Es dauert längere Zeit, bis eine

spontane Regenerierung zu Oxyhämoglobin eintritt, die zwar durch Belichtung katalytisch beschleunigt werden kann, aber längst nicht in dem Maße, daß bei spektroskopischen Untersuchungen, die der Darstellung des Met-Hb. zeitlich unmittelbar folgen, mit einer merkbaren Oxyhämoglobinbildung zu rechnen ist.

Eigene Versuche mit 2proz. und 10proz. Lösung, sowie mit *reinster* Substanz von Ferricyankalium (Fa. Riedel-E. de Haën) führten immer zu einem vierbandigen Spektrum bei *optimaler Schichtdicke*, die im Baly-Gefäß von Millimeter zu Millimeter variiert wurde. Man bemerkt eine starke Linksverschiebung der Endabsorption bei zunehmender Ferricyankalikonzentration.

Der spektrale Typ wird bekanntlich nicht allein durch die Lage der Bandenmaxima bestimmt, sondern auch durch ihre Beziehungen zueinander nach dem Grade der Intensität und schließlich durch die Qualitäten der einzelnen Banden selbst, die scharf oder verwaschen, schmal oder breit, symmetrisch oder asymmetrisch sein können. Die im folgenden beschriebenen Versuche zeigen, daß der spektrale Typ des Met-Hb., mit Ferricyankali dargestellt, unter diesen Versuchsbedingungen *weitgehende Unterschiede aufweisen kann*, je nachdem, ob man hämolytisches Leichenblut oder frisches, defibriniertes Blut in verdünnten Lösungen bzw. gereinigte Blutfarbstoffauszüge verwendet, deren p_H -Zahl man im Experiment durch Zusatz von Pufferlösungen nach Belieben variieren, bei ein und demselben Versuch aber in engen Grenzen konstant halten kann.

*Haurowitz*¹¹ ist der erste gewesen, der systematisch mit Puffergemischen an gereinigten Met-Hb.-Lösungen gearbeitet und gefunden hat, daß sich Met-Hb. wie ein Indicator verhält, der bei p_H 7 das reine Spektrum des sauren Met-Hb. zeigt „ohne Streifen im Gelbgrün und Grün“, in alkalischer Lösung bei p_H 9 das Spektrum des alkalischen Met-Hb. Colorimetrische Bestimmungen führten ihn zu der Auffassung, daß es eine saure (braun gefärbte) und eine alkalische (rot gefärbte) Met-Hb.-Komponente gibt, die sich bei wechselnder Wasserstoffionenkonzentration spektral mischen. Seine spektrophotometrischen Beobachtungen hat er nicht nur tabellarisch, sondern auch graphisch aufgezeichnet. Beide zeigen die starke Abhängigkeit der Extinktionskoeffizienten von der Wasserstoffionenkonzentration.

Die Arbeiten von *Haurowitz* haben in der Gerichtsmedizin noch nicht diejenige Beachtung gefunden, die sie verdienen. Spektrophotometrische Werte sind auch nicht so einfach deutbar wie die spektroskopischen Erscheinungen.

Wenn im folgenden in ganz ähnlicher Weise an gereinigten Blutfarbstofflösungen unter Zusatz von Puffergemischen in höherer Konzentration als dieses *Haurowitz* getan hat, das spektrale Verhalten von

Met-Hb. nachuntersucht wird, so findet die Mitteilung desselben ihre Rechtfertigung auch in einigen Beobachtungen, die geeignet sind, die Arbeit von Haurowitz zu ergänzen. Seine spektrophotometrischen Kurven erfahren im Neutralpunkt des Met-Hb. dadurch auch gewisse Abänderungen.

Zu diesen Versuchen wurde der große Zeiss'sche Analysengitterspektrograph für Chemiker nach Löwe mit symmetrischem Spalt, eine Punkt-Lichtlampe der Firma Leitz als Lichtquelle und das Balygefäß zur Aufnahme der Lösungen verwandt. Spaltbreite, wenn nicht im einzelnen besonders angegeben, 0,02 mm. Schichtdicke der fertigen, 2 proz. Lösung im allgemeinen 15 mm. In der Tabelle charakterisiert die Bandenintensität die Anzahl der Striche unter der Wellenlängenzahl. Die Bandenbreite ist durch eine kleine zweistellige Zahl im linken oberen Eck des betreffenden Feldes ersichtlich. Bandenasymmetrie ist besonders angegeben.

Das zu diesen Versuchen verwandte Blut war sowohl Eigenblut wie Kaninchenblut, welches nach der Entnahme sofort defibriniert, dann durch Zentrifugieren und mehrmaliges Waschen mit 0,85 proz. NaCl-Lösung von den Bestandteilen des Serums gereinigt und schließlich durch Verdünnen mit Aqua dest. hämolysiert wurde. Vom Stroma der Blutkörperchen wurde der Blutfarbstoff wiederum durch scharfes Zentrifugieren weitgehend getrennt. Diese Blutlösung wurde auf 4% der ursprünglichen Konzentration gebracht und immer mit gleichen Teilen eines Phosphat- oder Citratpuffergemisches nach Sörensen versetzt. Pufferkonzentration in der zum Spektroskopieren fertigen Lösung bei Phosphatpufferung ein DreiBigstel molar, bei Citratpufferung ein Zwanzigstel molar.

Tabelle.

pH	Band I	Band II a	Band II	Band III	Band IV	End-absorpt.	Bemerkungen
Citrat 4,65 . .	¹⁵ <u>638,1</u>	—	[etwa 579]	¹⁶ <u>542</u>	³⁰ <u>499</u>	465	Ausfällung in wenigen Min. Schichtdicke 15 mm
„ 5,11 . .	¹⁶ <u>638</u>	—	[„ , 578]	¹³ <u>541</u>	<u>501</u>	468	Schichtdicke 15 mm
„ 5,31 . .	¹⁶ <u>638</u>	—	[„ , 578,6]	¹³ <u>541,6</u>	¹⁶ <u>502</u>	465	desgl.
„ 5,96 . .	<u>637,3</u>	—	[„ , 579]	<u>541,5</u>	<u>501</u>	463	desgl.
„ 6,33 . .	^{13,5} <u>637</u>	—	¹⁵ <u>579</u>	^{14,5} <u>542</u>	<u>501,5</u>	467	desgl.
„ 6,68 . .	¹⁵ <u>637</u>	—	^{13,3} <u>578</u>	^{14,3} <u>541,9</u>	²² <u>501</u>	467	desgl.
Phosphat 6,81 .	<u>636,5</u>	—	578	<u>541,5</u>	<u>502</u>	467	desgl.
„ 7,38 .	^{12,2} <u>636,5</u>	—	^{13,4} <u>579</u>	^{11,6} <u>542</u>	²² <u>502</u>	469	desgl.
„ 8,04 .	¹⁵ <u>635,9</u>	—	¹⁶ <u>579</u>	¹³ <u>542</u>	²² <u>502</u>	469	desgl.
„ 8,33 .	^{11,9} <u>635,5</u>	[etwa 604]	^{11,8} <u>578,4</u>	^{13,6} <u>541,5</u>	¹⁹ <u>502</u>	469	Schichtdicke 20 mm
„ 8,68 .	^{11,9} <u>636</u>	^{5,7} <u>605</u>	^{15,4} <u>579</u>	^{17,6} <u>542</u>	^{20,8} <u>502</u>	469	desgl.
Citrat 12,07 . .	—	^{10,2} <u>602,5</u>	^{10,6} <u>578</u>	^{14,1} <u>541,3</u>	—	465	Schichtdicke 10 mm
Citrat + wenig Pyridin . .	—	—	<u>578</u>	<u>542</u>	—	467	—

Die Darstellung von Met-Hb. erfolgte mit frischer 10proz., reinster Ferricyankalilösung, von welcher 0,4 ccm zu 5 ccm der gepufferten 2proz. Oxyhämoglobinlösung zugesetzt wurden. Die Konzentration an Ferricyanionen in der 2proz. Lösung ist also ebenfalls ungefähr ein Dreißigstel molar und steht damit in beträchtlichem Überschuß zu Met-Hb.

Aus diesen, in vorstehender Tabelle zusammengefaßten Versuchen ist ersichtlich, daß zwischen p_H 5 und p_H 8 immer ein vierbandiges Met-Hb.-Spektrum zu beobachten ist. Die Banden II und III bei 578,5 m μ und 542 m μ nehmen mit steigender Wasserstoffionenkonzentration an Intensität ab, gleichzeitig nimmt Bande I bei 636,5 m μ an Intensität stark zu, während Bande IV bei 501,5 m μ visuell gemessen in diesem p_H -Bereich keine Intensitätsschwankungen für das Auge erkennen läßt.

Ist schon bei p_H = 8,0 die Intensität der Banden II und III ebenso groß wie die von Bande I, so kommt man bei weiterem Sinken der Wasserstoffionenkonzentration allmählich in die Neutralzone des Met-Hb. Bei p_H 8,33 ist bereits durch Hinzutreten einer neuen zarten schmalen Bande IIa ein fünfbandiges Zwitterspektrum zu beobachten, das bei p_H = 8,68 am deutlichsten ist. Man mißt hier die Bande IIa bei 605 m μ . Bei p_H = 12,0 liegt ein rein alkalisches Met-Hb.-Spektrum vor.

Die zu beobachtende geringfügige Verschiebung des Säurebandes von 636,5 nach 638 m μ hat keine Realität, wie überhaupt die visuelle Beobachtung spektraler Erscheinungen nicht unbedingt dem wahren optischen Verhalten entsprechen muß.

Weigert¹² hat gezeigt, daß derartige „Empfindungsspektren“ manchmal mit den Extinktionskurven derselben Lösung wenig übereinstimmen. Wenn bei wachsender Schichtdicke zwei Banden miteinander zu verschmelzen scheinen, oder sich ein Maximum verschiebt, so ist das ein Widerspruch zu dem Gesetz von der Konstanz der Banden. Es gibt sogar scheinbare Banden (Weigert führt das Beispiel einer Permanganatlösung mit fünf sichtbaren Banden an, denen nur ein wahres Maximum entspricht), die er als „Kontrast- oder physiologische Banden“ bezeichnet. Die Lichtempfindung, die das Auge bei Beobachtung spektraler Erscheinungen erhält, setzt sich aus drei Komponenten zusammen: Der Energie der Lichtquelle, der relativen Helligkeitsempfindung des Auges und der Durchlässigkeit der Lösung. Die genaue Lage wahrer Banden wird demnach festgelegt durch spektrographische Untersuchungen zusammen mit spektrophotometrischen Bestimmungen, die ihrerseits wieder Fehlermöglichkeiten in sich schließen, die man kennen muß.

Es erscheint also durchaus verständlich, wenn bei hoher Grundabsorption manche Banden völlig übersehen werden. Daß aber die Banden II und III des Met-Hb. mit den Oxy-Hb.-Banden gar nichts zu tun haben, ergibt die Unempfindlichkeit des Oxy-Hb.-Spektrums gegen die Wasserstoffionenkonzentration in diesem p_H -Bereich.

Eingehende photographische Untersuchungen, die noch durch spektrophotometrische Untersuchungen der Ergänzung bedürfen, haben mich einstweilen zu der Auffassung geführt, daß die *Bande IIa in der neutralen Zone* keine Kontrastbande ist, sondern, daß sie einem wahren Maximum entspricht, während es sich beim alkalischen Spektraltyp vermutlich um eine Kontrastbande handelt, die man deshalb schon früher zweckmäßig als Vorschlagschatten bezeichnet hat.

Mit gewisser Zurückhaltung ist zu verzeichnen, daß einmal das Säureband bei ungereinigtem Leichenblut bei $628 \text{ m}\mu$ zu beobachten war.

II. Pyridinverbindungen des Met-Hb. und Hämoglobins.

Versuch: Die in üblicher Weise bereitete, auf $p_{\text{H}} = 7,3$ gepufferte Met-Hb.-Lösung wird tropfenweise durch eine Tauchcapillare, die während der Beobachtung im Balygefäß eingeführt wird, mit Pyridin versetzt. Es erscheint zuerst die Bande IIa, dann verschwindet Bande IV, gleichzeitig werden Bande II bei $578,5 \text{ m}\mu$ und Bande III bei $542 \text{ m}\mu$ besonders intensiv unter Verschwinden der Bande I und bei allmählichem Überschuß von Pyridin wandern diese beiden grünen Banden nach $564 \text{ m}\mu$ und $529 \text{ m}\mu$. Dieses zweibandige Spektrum hat durchaus nicht Hämochromogencharakter, da die erste Bande nicht ganz so intensiv wie die zweite Bande ist. Nach 12 Stunden ist das Spektrum unverändert, langsamer Zusatz von Essigsäure läßt jedoch die sauren Banden des Met-Hb. nicht mehr in Erscheinung treten, sondern schwächt nur die Bande bei $564 \text{ m}\mu$ etwas ab.

Durch überschüssiges Pyridin erfolgt also Denaturierung, und zwar läßt sich an Hand des spektralen Typs nachweisen, daß es sich um eine Häminverbindung im Sinne der neuen Nomenklatur¹³ handelt. In Häminen ist das Porphyrineisen dreiwertig zum Unterschied von den instabilen Hämen mit zweiwertigem Komplexeisen, deren bekannte Pyridinverbindungen die Hämochromogene sind. Während letztere durch die besondere Intensität ihrer ersten Bande ausgezeichnet sind, ist diese bei dem beschriebenen Methämin-Pyridin viel geringer als die der zweiten Bande. Außerdem fehlt die sehr schwache, breite Bande bei $485 \text{ m}\mu$, die ich bei Hämochromogen in gereinigter Lösung immer gefunden habe.

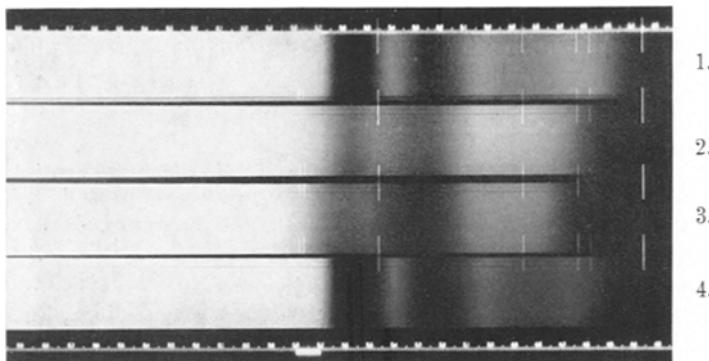
Versetzt man in gleicher Weise eine 4proz. Oxy-Hb.-Lösung mit gleichen Teilen Pyridin, so tritt zunächst *Hämochromogenbildung ein** (s. Abbildung). Die Bande I bei $557 \text{ m}\mu$ ist besonders intensiv, die Bande II bei $526 \text{ m}\mu$ breiter, verwaschener, schwächer und asymmetrisch. Im Photogramm sieht man auch sehr gut die zarte Bande bei $485 \text{ m}\mu$. *Doch ist das Hämochromogen unter solchen Umständen instabil und schon nach einer Stunde kehrt sich das Intensitätsverhältnis ohne Verschiebung der Banden im Grün um.* Die Bande bei $485 \text{ m}\mu$ ver-

* Heilmeyer¹⁸ erkennt diese Hämochromogenbildung zwar nicht an, nach seiner Beschreibung muß ihm aber die Hämochromogenstufe entgangen sein. Er hat nur die Banden des stabilisierten Hämins beobachtet.

schwindet. Die Spektralerscheinungen dieses Pyridinkörpers^{11b} sind identisch mit dem aus Hämin-Moerner (Merck) dargestellten Pyridin-Hämin.

Setzt man jetzt Ferricyankali zu, so wandert die erste dieser beiden Banden nach $564\text{ m}\mu$, so daß man auch auf diesem Wege zum Methäminpyridin gelangt, das sich also deutlich vom Pyridin-Hämin aus Hb. unterscheidet.

Das grundsätzlich verschiedene Verhalten des Oxy-Hb. und Met-Hb. erfährt also dadurch eine besondere Beleuchtung, daß nur bei ersterem Hämochromogen als instabile Zwischenstufe erscheint. *Die Rolle des Reduktionsmittels (Hydrazinsulfates) in der üblichen Darstellungsweise ist also nur eine stabilisierende.*



Hämochromogen- und Häminspektren. Ausgangslösung: 4 proz. gereinigte Blutlösung, Schichtdicke bei 1. und 4. 8 cm, bei 2. und 3. 10 cm, Analysengitterspektrograph: Spalt 0,025. Spektral-Rapid-Total-Platten (Fa. I. G. Farbenindustrie), Belichtung: 1. und 4. 45 Sek., 2. und 3. 90 Sek. Hg-H₂ = Linien, 1. Hämochromogen aus 2 Teilen Oxy-Hb. + 3 Teilen Pyridin, 2. Spontane Umwandlung in Pyridin-Hämin (Aufnahme 30 Min. später), 3. Methäminpyridin aus Met-Hb. 4. Hämochromogen aus Met-Hb.

Man kann auch bei vorsichtigem, tropfenweisen Zusatz von Pyridin zu Oxy-Hb.-Lösungen zeigen, daß diese zunächst in das einbandige Spektrum des Hämoglobins ($\lambda = 555\text{ m}\mu$) übergehen, und wenn man allmählich — nicht plötzlich — den Pyridinzusatz vermehrt, erkennt man die Hämochromogenstufe überhaupt nicht, es bildet sich vielmehr gleich das stabilere Pyridin-Hämin.

III. Verhalten gegen Reduktionsmittel.

Wachholz und Mitarbeiter (l. c.) haben einen in die Fachliteratur eingeschlichenen Irrtum damit richtig gestellt, daß sie auf die leichte Reduzierbarkeit des Met-Hb. wieder aufmerksam gemacht haben, die schon in den 70er Jahren von *Hoppe-Seyler*¹⁴, *Jäderholm* (l. c.) und *Preyer*¹⁵ sichergestellt war. Wichtig für die forensische Praxis ist

dabei die ebenfalls seit *Hoppe-Seyler* bekannte Tatsache der spontanen Reduktion des Met-Hb. bei natürlicher Fäulnis dieses Blutfarbstoffes und bei aseptischer Autolyse. Demzufolge besteht schließlich kein spektraler Unterschied mehr gegenüber Hämoglobin (*Hoppe-Seyler* I. c.). Erst recht besteht leichte Reduzierbarkeit *in vitro* z. B. mit Ammonsulfid. *Preyer* (I. c.) schreibt darüber S. 193: „Beim Behandeln mit Ammonsulfid verschwindet auch bei Anwendung ganz konz. Lösung das Met-Hb.-Band (im Rot) augenblicklich.“

Die meistens zur gelinden Reduktion von Oxyhämoglobin verwandte 5proz. Lösung von Ammonsulfid ist aus verschiedenen Gründen zur Beobachtung des spektralen Ablaufes der Reduktionsvorgänge wenig geeignet. Ältere Beobachter erwähnen, indem sie auf die besonders leichte Reduzierbarkeit von Met-Hb. hinweisen, daß dabei vorübergehend das Oxyhämoglobin, dann erst das Spektrum des reduzierten Hämoglobins eintreten soll. Diese Auffassung ist irrtümlich und erklärt sich aus einer *Verwechslung des zweibandigen alkalischen Methämoglobinspektrums mit dem des Oxyhämoglobins*.

Verwendet man statt Ammonsulfid Hydrazinhydrat, so kann man je nach Reaktion des Lösungsmittels die Umwandlung mehr oder weniger intensiv gestalten. So führt es in 10proz. wässriger Lösung das Oxyhämoglobin in Hämoglobin über, in Pyridin gelöst, erfolgt Umbau zu Hämochromogen unter Abspaltung des Globins, an dessen Stelle das Pyridin in den Komplex eintritt, das Porphyrineisen ist dabei zweiseitig. In Eisessig bewirkt Hydrazinhydrat Umwandlung des Blutfarbstoffes zu Protoporphyrin.

Überschichtet man Oxyhämoglobin mit Äther, um allzu reichlichen Luftsauerstoffzutritt zu vermeiden, und fügt zu 5ccm der 2proz. Oxyhämoglobinklösung 0,5ccm einer frisch bereiteten 10proz. Hydrazinhydratlösung, so kann man die Umwandlung in Hämoglobin gewissermaßen unter der Zeitlupe betrachten. Es erscheint zunächst ein Vorschlagschatten der Bande II (Maximum etwa 541,5 m μ), dann die Hämoglobinbande bei 555 m μ (so daß vorübergehend ein dreibandiges Spektrum vorhanden ist). Mit zunehmender Intensität dieser Bande verschwinden die Oxyhämoglobinbanden.

Ganz anders Methämoglobin: Unter gleichen Verhältnissen verschwinden nach Hydrazinhydratzusatz zwar Bande I und IV schlagartig, doch erkennt man eine zarte Bande bei etwa 601 m μ (Bande IIa = „Vorschlagschatten“ des alkalischen Methämoglobins!). Bande II und III werden ganz intensiv, wobei Bande II keineswegs die schmälere ist wie beim Oxyhämoglobinspektrum. Nach wenigen Sekunden verschwinden die Banden des alkalischen Met-Hb., und es erscheint die Bande des Hämoglobins. Es ist dabei gleichgültig, ob die Met-Hb.-Lösung vorher auf $p_{\text{H}} = 5,0$ oder $p_{\text{H}} = 8$ gepuffert war. Das Auftreten

der Bande IIa des alkalischen Met-Hb. kann bei Verwendung von Ammonsulfid wegen Verwechslungsgefahr mit dem Sulfhämoglobinstreifen leicht übersehen werden, auch ist die Grundabsorption größer und der Reduktionsprozeß verläuft stürmischer.

Die Hämochromogenstufe zeigt in den bekannten Banden im Grün keinen Unterschied, doch ist zu bemerken, daß sich im Blau etwa bei $485 \text{ m}\mu$ eine breite zarte Bande in nicht zu dünner Schicht beobachten läßt. Diese ist bei den mit Ferricyankali dargestellten Met-Hb.-Lösungen als Ausgangsprodukt besonders deutlich, wenn man in derselben Schichtdicke und Konzentration untersucht, wie die Met-Hb.-Lösungen selbst. Sie findet sich aber auch bei Oxy-Hb. als Muttersubstanz angedeutet, ebenso wie bei Met-Hb.-Lösungen, die durch Dialyse von überschüssigem Ferricyankali gereinigt wurden*.

IV. Ausflockung von Ferricyankali-Methämoglobin und chemische Untersuchung.

Setzt man zu 4 proz. Met-Hb.-Lösungen, die auf 5 ccm der Lösung 0,4 ccm 10 proz. Ferricyankalilösung enthalten, die gleiche Menge eines Phosphat- oder Citratpuffers unter $p_{\text{H}} 5,3$ zu, so flocken sie aus, und zwar um so schneller, je größer die Wasserstoffionenkonzentration wird. Ferrizyankalium ist in Lösung nachweisbar.

Oxy- und CO-Hämoglobinlösungen bleiben unter gleichen Umständen klar.

Diese Methämoglobinflocken lösen sich gut gewaschen ohne Rückstand in Pyridin, wenn man dieses sofort zugibt. Setzt man es jedoch erst nach einigen Tagen zu, so bleibt ein weißflockiger Eiweißrückstand. In der Pyridinlösung zeigen sich die beiden Banden im Grün, welche dem Methämin-Pyridin entsprechen, und diese gehen bei Zusatz von Hydrazinhydrat in das Hämochromogenspektrum über.

Untersucht man aber die oftmals ausgewaschenen Methämoglobinflocken auf die Cyangruppe, so findet man, daß sie mit 2 n H_2SO_4 erwärmt, sehr viel Blausäure entwickeln. Diese setzt sich mit dem Schwefel von Polysulfid, mit welchem man ein Filterchen getränkt und während des Erwärmens das Reaktionsgefäß bedeckt hat, in Rhodanwasserstoffsäure um und ist als $\text{Fe}(\text{CNS})_3$ nachweisbar.

Ganz anders verhalten sich Blutfarbstofflösungen, die nur zum Teil zu Methämoglobin umgesetzt sind.

50 ccm einer 10 proz. gereinigten Oxyhämoglobinlösung geben einen Farbumschlag in Braun, wenn man einen Tropfen einer 10 proz. Ferricyankalilösung zusetzt. Aber auch nach Zusatz von 5 Tropfen bewirkt primäres Phosphat keine Fällung nach mehrstündigem Stehen bei $+5^\circ\text{C}$.

* Die Lösung wurde liebenswürdigerweise von Herrn Prof. Haurowitz zur Verfügung gestellt.

Man kann die Ausfällung derartiger Lösungen durch Alkoholzusatz erzwingen. Der flockige Niederschlag ist aber hellrot und zeigt das Oxyhämoglobinspektrum. Trennt man die Lösung vom Niederschlag, so ist erstere, auch wenn man nur einen Tropfen Ferricyankalilösung zugesetzt hat, immer ferricyankalihaltig. In das dritte Waschwasser geht kein Ferricyankali mehr; trotzdem entwickelt der 4mal durch Waschen und Zentrifugieren gereinigte Niederschlag noch erkennbare Mengen Blausäure, auch wenn man ursprünglich nur einen Tropfen Ferricyankali zur Blutlösung zugesetzt hatte*. Die Schwefelsäurelösung enthält in letzterem Falle Ferri-Ionen und Ferricyan-Ionen. Hatte man ursprünglich 5 Tropfen Ferricyankali zugesetzt, so bildet sich außerdem in der Schwefelsäure beim Erwärmen Turnbullblau.

Die mir liebenswürdigerweise von Prof. Haurowitz zur Verfügung gestellte, durch tagelange Dialyse gereinigte Met-Hb.-Lösung aus Pferdeblut flockt mit steigender Wasserstoffionenkonzentration nicht mehr aus, doch läßt sich selbst hier noch nach dem oben beschriebenen Verfahren Blausäure aus dem Alkoholniederschlag entwickeln.

Schlußfolgerungen.

a) Theoretische Erwägungen: Met-Hb. zeichnet sich vor anderen Hämoglobinverbindungen durch auffällige spektrale Empfindlichkeit gegen Schwankungen der Wasserstoffionenkonzentration aus. Es gibt eine Neutralzone, in der man ein fünfbandiges Spektrum beobachten kann. Bei der Reduktion geht es zunächst in das Hämoglobin und weiterhin in Hämochromogen über. Mit Pyridin erhält man ein Hämin, das spektrale Unterschiede gegenüber Oxy-Hb. nach Pyridinzusatz insofern erkennen läßt, als die Zwischenstufe des Hämoglobins und Hämochromogens nicht in Erscheinung tritt. Nach Stabilisierung der Banden zeigen beide Pyridinhämine ebenfalls spektrale Unterschiede.

Mit überschüssigem Ferricyankali tritt eine Ausflockung von Met-Hb. ein, die bei Gegenwart überschüssigen Oxy-Hb. aber auch bei dialysierten Met-Hb.-Lösungen unterbleibt. Man wird also die beobachtete Ausflockung wohl auf die eiweißfällende Wirkung des bei der Umsetzung gebildeten Ferrocyanikalis zurückführen müssen.

Wäre die Annahme richtig, daß nur unterschiedlicher Sauerstoffgehalt das Met-Hb. vom Oxy-Hb. und Hb. unterscheidet, so wären seine genannten Eigenschaften unverständlich. Sein spektrales Verhalten zwingt vielmehr zu Analogien zum Hämatin, von welchem ein saures und alkalisches Spektrum bekannt ist. Die noch vielfach vertretene Annahme, daß Oxy-Hb. nur durch Reduktionsmittel Häm-

* Möglicherweise aus Hämoglobin bei der Einwirkung von H_2SO_4 auf normalen Blutfarbstoff in Form von rotem Blutlaugensalz gebildet.

globin und dieses ebenfalls nur so in Hämochromogen übergehen könne, ist durch vorliegende Versuche widerlegt. In den genannten Blutfarbstoffverbindungen hat vielmehr das Porphyrineisen gleiche Wertigkeit, eine Auffassung, die durch Conants elektrometrische Titration auf ganz anderer Grundlage gestützt wird, und die zuerst Küster geäußert hat. Es zeigt sich, daß der zweiwertige Eisenkomplex zwar in der Globinverbindung, nicht aber in der Pyridinverbindung stabil ist.

Met-Hb. erhält man aus Oxy- wie aus Hämoglobin nur durch einen Oxydationsvorgang unter ev. Entbindung des *locker* (d. h. nicht durch eine Hauptvalenz am Porphyrineisen) gebundenen O₂. Reduktionsmittel führen bekanntlich *in vitro* am reinen Blutfarbstoff nicht unmittelbar zu Met-Hb., sondern nur *in vivo*, sofern sie einen geeigneten Oxydationsvorgang auslösen, der seinerseits Met-Hb.-Bildung bewirkt (Heubner).

An der Dreiwertigkeit des Porphyrineisens im Met-Hb. kann nach den eingehenden Untersuchungen, die sich in der Literatur finden (Küster¹⁶ u. a.), kein Zweifel sein. Sein spektrales Verhalten gegen Pyridin bestätigt dieses. Damit haben auch jene recht, die behaupten, Sauerstoff sei im Met-Hb. „fester“ gebunden als im Oxy-Hb., da in ersterem eine freie Hauptvalenz des Ferrieisens zur Verfügung steht, der *Molekularsauerstoff* des letzteren aber höchstens durch Kovalenzen an Ferrieisen gebunden sein kann. Der Grad mehr oder weniger leichter „Reduzierbarkeit“ ist davon unabhängig.

Das hartnäckige Haften des Fe(CN)₆-Komplexes am Met-Hb. wird meist als Einschluß angesehen, doch wäre wohl auch eine Additionsverbindung mit Ferrocyanalkali denkbar. Dieses zu entscheiden ist Sache der Chemie, doch kommt diesem Umstand wahrscheinlich erhebliche praktische Bedeutung zu.

b) Praktische Erwägungen: Es kann nahezu als sicher gelten, daß die zahlreichen Met-Hb.-Bildner im intermediären Stoffwechsel des Körpers auf ganz anderem Wege zu Met-Hb. führen als im Reagensglas. Schon Heubner (l. c.) kannte die verschiedene Empfindlichkeit verschiedener Spezies gegen sie und führt sie mindestens zum Teil auf verschiedenartige Verarbeitung im Stoffwechsel zurück. Die meisten Met-Hb.-Bildner führen *in vitro* nicht zur selben Umwandlung des Blutfarbstoffes wie *in vivo*.

Daher können aus den beschriebenen Laboratoriumsversuchen keine direkten Schlüsse auf das im Leben entstandene Met-Hb. gezogen werden.

Es wird sich erweisen, ob auch im Organismus ein ebenso zähes Haften des Met-Hb.-*Bildners* an diesem stattfindet wie *in vitro*. Dann besteht nicht nur die Möglichkeit, den *Met-Hb.-Nachweis* auf eine neue, chemische Grundlage, die sich auch beim CO-Hb. als wertvoll

erwiesen hat, zu stellen, sondern auch das *bildende Agens selbst* chemisch am Ort seiner Anreicherung zu erfassen.

Die Ausführungen von *Laves*¹⁷ über das Verhalten von Met-Hb. in der Leiche geben einen Fingerzeig, in welcher Richtung weiter zu arbeiten sein wird. Man wird dabei der variablen Wasserstoffionenkonzentration ebenso Rechnung tragen müssen wie den Oxydo-Reduktionsprozessen in der Leiche.

Literaturverzeichnis.

- ¹ *Wachholz, Baranowski u. Kusynski*, Dtsch. Z. gerichtl. Med. **23**, 83 (1934). —
- ² *Jäderholm*, Z. Biol. **16**, 1 (1880). — ³ *Hoppe-Seyler*, Hoppe-Seylers Z. **6**, 172 (1882). — ⁴ *Heubner*, Arch. exper. Path. **72**, 239 (1913). — ⁵ *Hari, P.*, Biochem. Z. **103**, 271 (1920). — ⁶ *Dénes, A.*, Biochem. Z. **223**, 481 (1930). — ⁷ *Rost, Franz u. Heise*, Arb. Kaiserl. Gesdh. amt **23**, H. 2. — ⁸ *Manchot*, Hoppe-Seylers Z. **70** (1910). — ⁹ *Conant*, J. of biol. Chem. **62**, 595 (1925). — ¹⁰ *Michaelis u. Solomon*, Biochem. Z. **234**, 107 (1931). — ^{11a} *Hauroowitz*, Hoppe-Seylers Z. **138**, 62 (1924). — ^{11b} *Hauroowitz*, Hoppe-Seylers Z. **169**, 239. — ¹² *Weigert*, Ber. dtsch. chem. Ges. **49**, I, 1496 (1916). — ¹³ *Treibs, A.*, Blutfarbstoff und Chlorophyll. In Fortschritte der physiologischen Chemie 1929—1934 (Auszüge aus der „Angewandten Chemie“ 1934). Berlin: Chemie-Verlag. — ¹⁴ *Hoppe-Seyler*, Hoppe-Seylers Z. **2**, 149 (1878/1879). — ¹⁵ *Preyer*, Die Blutkrystalle. Jena 1871. — ¹⁶ *Küster*, Hoppe-Seylers Z. **66**, 195 (1910). — ¹⁷ *Laves*, Dtsch. Z. gerichtl. Med. **12**, 549 (1928). — ¹⁸ *Heilmeyer*, Medizinische Spektrophotometrie. S. 132. Jena: Verlag Gustav Fischer 1933.