

(Aus dem Gerichtsärztlichen Institut der Universität Breslau.
Direktor: Prof. Dr. Karl Reuter.)

Untersuchungen über Kohlenoxyd-Hämochromogene.

Von

Dr. med. habil. et jur. Otto Schmidt,
Dozent.

Mit 7 Textabbildungen.

Noch bis vor wenigen Jahren setzte man das Spektrum der reduzierten Hämine und der reduzierten Hämatine dem Hämochromogenspektrum gleich. Schon *Hoppe-Seyler* hatte erkannt, daß das Spektrum des Hämochromogens bei Reduktion einer reinen Hämatinlösung erst dann entsteht, wenn Eiweißkörper zugegen sind. Seit den Untersuchungen von *Anson* und *Mirsky* wissen wir, daß die Bildung des Hämochromogenspektrums von der Anwesenheit einer stickstoffhaltigen Substanz, sei es Lösungs- oder Reduktionsmittel, abhängt, die mit dem Reduktionsprodukt eine chemische Verbindung eingeht. Die meist benutzten Reduktionsmittel (Hydracinhypat, Hydrazinsulfat, Schwefelammonium) sind stickstoffhaltige Körper. So ist es verständlich, daß man selbst aus rein dargestellten Blutabbauprodukten nach Reduktion das charakteristische Hämochromogenspektrum erhielt. Benutzt man ein stickstofffreies Reduktionsmittel (Natriumhydrosulfit, Natriumstannit usw.), so bleibt das Hämochromogenspektrum aus. Die Lage der Hämochromogenschatten wiederum ist von der Art des benutzten Reduktionsmittels oder stickstoffhaltigen Lösungsmittels abhängig. Es ist also streng zwischen dem Spektrum des reduzierten Hämins, das nach Vorschlag von *Anson* und *Mirsky* auch als Häm bezeichnet wird, und dem Spektrum der an stickstoffhaltige Körper gebundenen Hämochromogene zu unterscheiden.

Untersuchungen über das optische Verhalten der Hämine zu Kohlenoxyd und der Kohlenoxyd-Hämochromogene liegen bisher kaum vor. Lediglich das Spektrum des Kohlenoxyd-Häms ist von *O. Warburg*, *E. Negelein* und *W. Christian* näher untersucht worden. Die Lichtauslöschung des Kohlenoxyd-Hämochromogens ist seit *Hoppe-Seyler* von fast allen Autoren, die sich mit diesem Körper beschäftigt haben, mit dem Spektrum des Kohlenoxyd-Hämoglobins gleich gesetzt worden. Die Untersuchungen beschränken sich auf die Lage der Absorptionsmaxima.

Dem Gerichtsarzt werden nicht selten diese Blutabbauprodukte und ihre Kohlenoxydverbindungen in seiner praktischen Tätigkeit

begegnen. Er findet sie in faulendem Blut Kohlenoxydvergifteter, bei Verbrennungen und ähnlichen Gelegenheiten.

1. Das Verhalten des in $\frac{1}{10}$ -Normal-Natronlauge gelösten Hämins zu Kohlenoxyd.

Die Hämme und Hämatine sind außerordentlich reaktionsfähige Körper. Sie liefern mit fast allen Lösungsmitteln Additionsprodukte. Selbst stickstofffreie Lösungsmittel, wie Alkohol und Aceton können addiert werden und zu einer Änderung des Lichtauslöschungsvermögens führen. *Hamsik* fast zur Erklärung dieser starken Reaktionsfähigkeit das Eisenatom als Koordinationszentrum mit der Koordinationszahl 6 auf, in der eine Stelle, an der die Bindung erfolgt, unbesetzt ist. Bei der großen chemischen Affinität dieser Körper zu den verschiedensten Lösungsmitteln gibt es von diesen Stoffen annähernd so viele Spektren wie Lösungsmittel überhaupt. Die Unklarheit, die in der Literatur über das Lichtauslöschungsvermögen einzelner Hämme und Hämatine herrscht, erklärt sich aus der Verschiedenheit der verwendeten Lösungs- und Reduktionsmittel. Es ist daher, um Irrtümer zu vermeiden, die Art der Herstellung und des verwendeten Lösungsmittels stets genau anzugeben.

Die vorliegenden Untersuchungen wurden an dem nach den Vorschriften von *Mörner* aus Rinderblut dargestellten Häm in vorgenommen. Diese Methode beruht im wesentlichen auf Extraktion des durch Kochen koagulierten Blutfarbstoffes mit angesäuertem Alkohol und Kochen des sauren Extraktes mit HCl, wobei ein Gemisch von Häm in mit seinen Äthylestern entsteht. 0,1 g wurden in 200 ccm $\frac{1}{10}$ -Normal-Natronlauge zu einer Stammlösung gelöst. Aus ihr wurden durch Verdünnen mit Wasser, einem sonstigen Lösungs- oder Reduktionsmittel, die jeweils gewünschten Lösungen hergestellt. Die Lösungen wurden mit Hilfe des Zeiss'schen Gitterspektrographen für Chemiker unter Anwendung eines rotierenden Doppelsektors nach *Gude* und zweier senkrecht übereinander stehender *Buly*-Rohre untersucht, von denen das eine die Blatlösung, das andere das jeweils entsprechende Lösungs- und Reduktionsmittel enthielt.

Die Logarithmen der gefundenen Extinktionswerte des in $\frac{n}{10}$ -NaOH gelösten Häm in 0,005 proz. Verdünnung sind in Abb. 1 in ein Wellenlängensystem eingezeichnet. Die Kurve stellt die „typische Farbkurve“ dieses in NaOH gelösten Körpers dar. Ihre Form ist von Konzentrationsänderungen unabhängig. Es findet sich im Rot bei $610 \text{ m}\mu$ ein Maximum, das *Heilmeyer* bei reinem krystallisiertem Häm in (*Hans Fischer*) in $\frac{n}{10}$ -NaOH an gleicher Stelle gefunden hat. Ein Minimum liegt bei $572 \text{ m}\mu$, bei etwa $450 \text{ m}\mu$ beginnt ein steiler Anstieg zum unsichtbaren Violett. Die Lichtauslöschung ist in geringen Grenzen von der Ionenkonzentration des Lösungsmittels abhängig.

Leitet man in diese Lösung Kohlenoxyd, das aus Oxalsäure und heißer konzentrierter Schwefelsäure unter Anwendung zweier mit Kalilauge gefüllter Waschgefäße gewonnen wurde, ein, so zeigt sich eine

kaum wahrnehmbare Gelbstichigkeit im Farbton. Die spektrographische Untersuchung ergibt eine Änderung der Extinktionskurve (Abb. 1). Die Kurve zeigt einen im sichtbaren Gebiet ziemlich gleichmäßig flach ansteigenden Verlauf, der allmählich in den steileren Violettschatten übergeht. Das Maximum im Rot bei $610\text{ m}\mu$ ist verschwunden. Auch das Minimum bei $572\text{ m}\mu$ findet sich nicht mehr. Der Violettschatten ist in seinem Anstieg weniger steil. In dem gesamten dargestellten Kurvenverlauf von $630\text{ m}\mu$ — $380\text{ m}\mu$ fehlt jedes Maximum. Die Frage, ob es sich bei dem vorliegenden Produkt um die Bildung eines neuen chemischen Körpers handelt, läßt sich aus dem Kurvenverlauf nicht eindeutig entscheiden. Möglich ist, daß teilweise Reduktion der Lösung eingetreten und daß dementsprechend Kohlenoxyd-Häm entstanden ist. Die Deutung der Kurve als ein Mischprodukt aus Hämin und Kohlenoxyd-Häm ist zulässig. Bei gesamter Verschiebung der Kurve nach oben kommt sie mit geringen Fehlern in den Bereich zwischen Hämin und Kohlenoxyd-Häm zu liegen. Das Verschwinden des Maximums im Rot und des erwähnten Minimums läßt sich möglicherweise auf diese Weise erklären.

Die mit Kohlenoxyd behandelte Häminlösung hält das Kohlenoxyd nur locker gebunden. Reduziert man nach dem Durchleiten von Kohlenoxyd mit einigen Kräställchen Natriumhydrosulfit, so entsteht das Spektrum des Kohlenoxyd-Häms. Wird die Lösung einmal kräftig geschüttelt oder kurz zum Sieden erhitzt, oder erst nach 24 Stunden reduziert, so bildet sich das kohlenoxydfreie reduzierte Hämin.

Hildegard Buresch hat in einer Preisaufgabe der Medizinischen Fakultät der hiesigen Universität einen Teil der von mir spektrographisch gemessenen Blutlösungen gasanalytisch untersucht. In $0,4\text{ g}$ nach den Vorschriften von *Mörner* aus Rinderblut dargestellten Hämin, das in $100\text{ ccm } \frac{n}{10}\text{-NaOH}$ gelöst, und von dem die Hälfte $\frac{3}{4}$ Stunden im Kohlenoxydstrom gehalten wurde, fand sie, wenn die Untersuchung unmittelbar nach der Kohlenoxyddurchströmung vorgenommen wurde, positive Werte. Kohlenoxydfreie Lösungen ergaben Werte, die dicht an der oberen Fehlergrenze lagen oder ganz negativ waren. Die angewandte Methodik findet sich in ihrer älteren Ausführung im Archiv für Gewerbeopathologie und Hygiene 2, H. 5 angegeben. Die Beschreibung der grundlegend geänderten Methodik, mit der diese Untersuchungen vorgenommen wurden, findet sich gegenwärtig im Druck. Das Verfahren besteht im wesentlichen darin, daß aus Blutproben die Gase durch Zerstören des Farbstoffes durch Phosphorsäure und Kaliumpermanganat befreit und durch Auswaschen mit Kalilauge von der Kohlensäure gereinigt und im Sauerstoffstrom zu CO_2 verbrannt werden. Die Menge der nunmehr entstandenen Kohlensäure ergibt unter Berücksichtigung eines Fehlerfaktors nach

Reduktion auf Temperatur und Barometerstand die vorhandene CO-Menge.

Wurden die Untersuchungen nicht in unmittelbarem Anschluß an die Kohlenoxyddurchströmung vorgenommen, ergaben sich niedrigere Werte oder ganz negative Zahlen.

Ähnliche Untersuchungsergebnisse wurden bei dem nach den Vorschriften von *Fischer*, *Treibs* und *Zeile* aus Rinderblut dargestellten Chlor-Hämin gewonnen. 0,3 g Chlor-Hämin wurden in 100 ccm NaOH gelöst, 50 ccm der Lösung wurden CO-durchströmt. In der Vorlage fand sich bei der unmittelbar im Anschluß an die Kohlenoxyddurchleitung vorgenommenen Untersuchung 0,854 Vol.-%, in der Chlor-Häminlösung 0,870 Vol.-% und in der CO-vorbehandelten Häminlösung 1,1 Vol.-%.

In dem aus 100 ccm Pferdeblut nach den Vorschriften von *Fischer*, *Treibs* und *Zeile* gewonnenen Brom-Hämin, das in NaOH gelöst und 3 Stunden mit CO behandelt wurde, fanden sich 1,68 Vol.-%. Bei dem aus menschlichen Blut gewonnenen Brom-Hämin 1,4 Vol.-%. Kurzes Schütteln der Lösungen mit Luft genügte, um die Untersuchungsergebnisse negativ zu machen.

2. Die Lichtauslöschung des Kohlenoxyd-Häms.

Wird in NaOH gelöstes Hämin mit einer stickstofffreien Reduktionssubstanz (Natriumhydrosulfit oder Natriumstannit) reduziert, so erhält man das Spektrum des reduzierten Hämins (Häm). In Abb. 1 ist die typische Farbkurve dieses Körpers eingezeichnet. Die charakteristischen Hämochromogenschatten fehlen. Es findet sich ein flaches, plateauartiges Maximum zwischen 580 m μ und 545 m μ . Nach *Heilmeyer* ist der Verlauf der Extinktion im Bereich von p_{H} 8—13 unveränderlich. Das Spektrum des Häms in NaOH ist nicht beständig. Im Verlauf weniger Stunden trübt sich die Lösung. Die Hauptbande verliert sich allmählich.

Das reduzierte Hämin bindet das Kohlenoxyd zu einer besonderen Verbindung. Im Grün finden sich 2 Absorptionsstreifen (Abb. 1). Der erste Schatten liegt bei 564 m μ , der zweite bei 531 m μ . Der erste Schatten ist kräftiger als der zweite, der nur ein geringes Maximum aufweist. Zwischen beiden Schatten liegt ein geringes Minimum bei 545 m μ . Der Anstieg im Rot ist verglichen mit dem Kohlenoxyd-Hämoglobin flacher. Im Violett liegt die Haupt-Absorption bei 406 m μ .

Das Spektrum des Kohlenoxyd-Häms in methylalkoholischer Cysteinpufferlösung ist von *O. Warburg*, *E. Negelein* und *W. Christian* lichtelektrisch gemessen worden. Im sichtbaren Gebiet des Spektrums fanden sie zwei flache Schatten im Grün. Im Violett die Hauptabsorption bei 415 m μ .

Das Kohlenoxyd-Häm ist von kirschroter Farbe. In einem verkorkten Glasgefäß ist die Lösung nicht lange haltbar. Schon nach Verlauf weniger Stunden, ebenso nach kurzem kräftigen Schütteln mit Luft oder kurzem Aufkochen sind die Kohlenoxyd-Häm-Schatten verschwunden.

Im Leichenblut Kohlenoxydvergifteter oder bei Untersuchungen nicht völlig rein dargestellter Blutprodukte wird man das Kohlenoxyd-Häm nicht erwarten dürfen. Die Affinität der Hämine oder Hämatine zu Eiweißkörpern oder stickstoffhaltigen Lösungs- und Reduktionsmitteln ist so groß, daß bei Anwesenheit dieser Stoffe stets das jeweilige Hämochromogenspektrum auftritt.

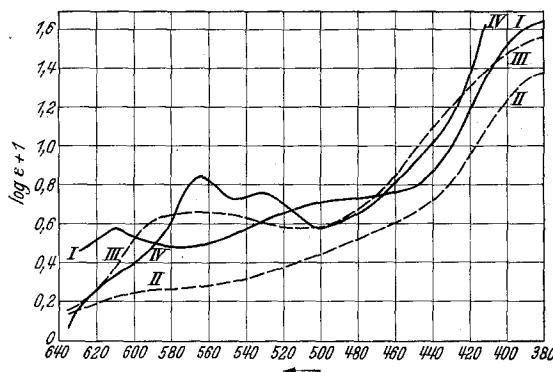


Abb. 1. Typische Farbkurven des Häm (Mörner) in NaOH , 0,005 proz. I = Häm in NaOH ; II = dieselbe Lösung nach Einleiten von CO; III = reduziertes Häm (Häm) (Lösung I nach Reduktion mit einigen Körnchen Natriumhydrosulfit); IV = Kohlenoxyd-Häm, dargestellt durch Einleiten von CO in Lösung III.

3. Das Ammoniak-Häm und sein Verhalten zu Kohlenoxyd.

Durch Verdünnen des in NaOH gelösten Hämins mit $1/4$ Volumen- teil 30 proz. Liqu. ammonii caustici entsteht eine deutlich braunstichige Lösung, die bei spektrographischer Untersuchung einen gleichen Kurvenverlauf aufweist, wie das in NaOH gelöste Häm. Das Maximum im Rot liegt bei $610 \text{ m}\mu$. Ein Minimum bei $582 \text{ m}\mu$.

Wird in die Lösung Kohlenoxyd eingeleitet, tritt keine auffallende Änderung im Farbton ein. Der Extinktionsverlauf zeigt jedoch recht bemerkenswerte Abweichungen. Das Maximum im Rot ist verschwunden. Es zeigt sich ein flaches Maximum bei etwa $567 \text{ m}\mu$ und ein geringes Minimum bei etwa $546 \text{ m}\mu$. Bei $530 \text{ m}\mu$ beginnt ein flacher, ziemlich gradliniger Anstieg zum Violett.

Als ein Mischspektrum von Häm in dem Kohlenoxyd-Ammoniak-Hämochromogen ist der Kurvenverlauf nicht zu deuten. Die Kurve nimmt keineswegs, selbst wenn man sie in ihrer Gesamtheit nach oben oder unten verschiebt, eine befriedigende Mittelstellung zwischen den

beiden Blutspektren ein. Das Maximum bei $567 \text{ m}\mu$ liegt in einem Bereich, in dem weder das Hämin noch das Kohlenoxyd-Ammoniak-Hämochromogen Maxima aufweisen. Auch der Verlauf des Violettanstiegs ist mit den Kurven dieser Blutlösungen als Mischspektrum nicht deutbar. Das Vorliegen eines neuen Kohlenoxydadditionsproduktes ist anzunehmen.

Die Bindung des Kohlenoxyds an das in Ammoniak gelöste Hämin ist eine lockere. Längeres Stehen, kräftiges Schütteln mit Luft oder kurzes Aufkochen entfernt das Kohlenoxyd völlig, so daß nach Reduktion das Kohlenoxyd-Ammoniak-Hämochromogen nicht mehr auftritt.

4. Das Kohlenoxyd-Ammoniak-Hämochromogen.

Durch Reduktion des in Ammoniak gelösten Hämins mit einer stickstofffreien Reduktionssubstanz (Natriumhydrosulfit) erhält man das Ammoniak-Hämochromogen (Abb. 2). Es zeigt im Grün ein zweistreifiges Hämochromogenspektrum. Das Maximum liegt bei $555 \text{ m}\mu$. Der erste Schatten ist kräftiger als der zweite, der bei $525 \text{ m}\mu$ liegt. Das Minimum zwischen beiden findet sich bei $539 \text{ m}\mu$. Ein weiteres Minimum liegt im Violett bei $480 \text{ m}\mu$. Von $465 \text{ m}\mu$ beginnt ein steiler Anstieg in das unsichtbare Violett. Es ist die Ansicht vertreten worden (*Anson, Mirsky, Heilmeyer*), daß das Spektrum der ammoniakalischen Lösung als ein Gemisch aus Häm und Ammoniak-Hämochromogen aufzufassen sei. Dieser Auffassung entspricht die Beobachtung, daß die Stärke der Hämochromogenschatten von der Konzentration des Lösungsmittels an Ammoniak abhängig ist. Wird in NaOH gelöstes Hämin mit Schwefelammonium reduziert, so tritt, sofern genügend Schwefelammonium zugefügt wird, das Spektrum des Ammoniak-Hämochromogens auf.

Reduziert man das mit Kohlenoxyd behandelte Hämin in ammoniakalischer Lösung kurz nach dem Einleiten mit einigen Kräställchen $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ oder leitet man in eine Ammoniak-Hämochromogenlösung Kohlenoxyd ein, so entsteht das Kohlenoxyd-Ammoniak-Hämochromogen (Abb. 2). Der steile Anstieg im Rot reicht von etwa $610 \text{ m}\mu$ bis $585 \text{ m}\mu$. Der erste Schatten liegt im Grüngelb bei $573 \text{ m}\mu$. Der zweite Schatten im Grün bei $245 \text{ m}\mu$. Zwischen beiden findet sich ein flaches Minimum bei $561 \text{ m}\mu$. Ein weiteres Minimum liegt bei $509 \text{ m}\mu$. Das Maximum im Violett bei $414 \text{ m}\mu$.

Von dem Kohlenoxyd-Hämoglobin unterscheidet sich das Kohlenoxyd-Ammoniak-Hämochromogen durch eine erhebliche Verlagerung der Schatten zum langwelligen Teil des Spektrums. Die Absorptionsstreifen des Kohlenoxyd-Ammoniak-Hämochromogens erscheinen bei spektroskopischer Betrachtung weniger scharf konturiert als beim Kohlen-

oxyd-Hämoglobin, eine Erscheinung, die sich aus dem allgemein flacheren Kurvenverlauf des Kohlenoxyd-Hämochromogenspektrums erklärt.

Das Kohlenoxyd-Ammoniak-Hämochromogen ist von kirschroter Farbe, die einer Kohlenoxyd-Hämoglobinlösung durchaus ähnlich ist. Im offenen Reagensglase wird die Lösung in ihrem oberen, der Luft leichter zugänglichem Bereich schon in den ersten Tagen bräunlich. In den unteren Abschnitten des Glases sind die Kohlenoxydschatten etwa 14 Tage bis 3 Wochen haltbar. Kräftiges mehrfaches Schütteln entfernt das Kohlenoxyd, desgleichen kurzes Aufkochen.

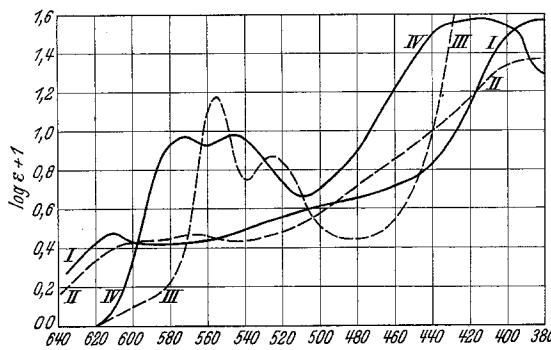


Abb. 2. Typische Farbkurven von Hämin in ammoniakhaltigem Lösungsmittel. **I** = in Natronlauge gelöstes Hämin mit $\frac{1}{4}$ -Volumteil 30 proz. Liqu. ammon. caust.; **II** = dieselbe Lösung nach Einleiten von CO; **III** = Ammoniak-Hämochromogen, dargestellt durch Reduktion der Lösung I mit $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$; **IV** = Kohlenoxyd-Ammoniak-Hämochromogen durch Einleiten von CO in Lösung III hergestellt.

5. Das Kohlenoxyd-Hydrazin-Hämochromogen.

Die Affinität des reduzierten Hämins zum Hydrazinhydrat ist eine außerordentlich große. Pyridin- und Cyanhämochromogen werden durch geringen Zusatz von Hydrazinhydrat in Hydrazin-Hämochromogen überführt. Von dem Ammoniak-Hämochromogen unterscheidet sich das Hydrazin-Hämochromogenspektrum nur unwesentlich. Der erste sehr kräftige Schatten liegt bei $554 \text{ m}\mu$, der zweite im Grün bei $523 \text{ m}\mu$ (Abb. 3).

Das Hydrazin-Hämochromogen bindet sehr leicht das Kohlenoxyd. Nach kurzem Einleiten wird die Lösung gelbrot. Sie ist, verglichen mit Kohlenoxyd-Ammoniak-Hämochromogen gelbstichiger. Es zeigt sich ein zweistufiges Spektrum, das mit dem Kohlenoxyd-Hämoglobin große Ähnlichkeit besitzt. Die Schatten liegen fast an gleicher Stelle. Sie sind in ihrer Intensität jedoch matter und unbestimmter konturiert. Bei einiger Übung lässt sich das Kohlenoxyd-Hämoglobin- und Kohlenoxyd-Hämochromogen-Spektrum schon bei spektroskopischer Betrachtung unterscheiden. Der gesamte flachere Verlauf der Extinktionskurve erklärt die verminderte Schärfe der Kohlenoxyd-Hämochromo-

genschatten. Die Schatten des Kohlenoxyd-Hämochromogens sind im sichtbaren Teil des Spektrums annähernd gleich stark. Verglichen mit dem Kohlenoxyd-Ammoniak-Hämochromogen zeigt sich eine geringe Violettverschiebung. Das erste Maximum liegt bei $567 \text{ m}\mu$, das zweite Maximum im Grün bei $540 \text{ m}\mu$. Das Minimum bei $556 \text{ m}\mu$. Ein weiteres Minimum findet sich im Violett bei $497 \text{ m}\mu$. Das Absorptionsmaximum im unsichtbaren Violett liegt bei $407 \text{ m}\mu$ (Abb. 3).

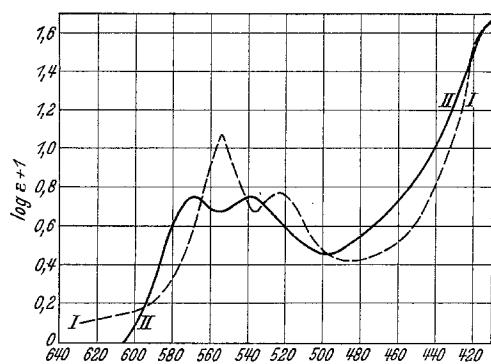


Abb. 3. I = typische Farbkurve von Hydrazin-Hämochromogen; II = Kohlenoxyd-Hydrazin-Hämochromogen.

entfernt die Kohlenoxydschatten. Nach zweitägigem Stehen in offenem Gefäß finden sich nur noch sehr schwache Kohlenoxydschatten, die nach einer Woche völlig verschwunden sind.

H. Buresch fand in 100 ccm einer 0,3 proz. Natronlauge-alkalischen, frisch hergestellten Kohlenoxyd-Hydrazin-Hämochromogen-Lösung 11,57 Vol.-% CO. Nach kurzem Aufkochen war Kohlenoxyd noch reichlich vorhanden.

6. Das Verhalten des Kohlenoxyds zu Pyridin-Hämin.

Versetzt man in Natronlauge gelöstes Hämin mit $\frac{1}{4}$ Volumteil Pyridin, erhält man eine Lichtauslöschung, deren typische Farbkurve in Abb. 4 wiedergegeben ist. Im Rot steigt die Kurve flach an und bildet im Grüngelb bei $563 \text{ m}\mu$ ein flaches Maximum. Das Maximum im Violett liegt bei $396 \text{ m}\mu$. Das Minimum im Grün bei $524 \text{ m}\mu$. Haurowitz erhielt bei dem nach Schalfeijeff aus Oxyhämoglobin dargestellten Chlor-Hämin in wasserhaltigem Pyridin ein zweitstreifiges Absorptionspektrum im Grün.

Wird in die alkalische Pyridin-Hämin-Lösung Kohlenoxyd eingeleitet, so wird das Spektrum zweistreifig. Die Lage der Schatten entspricht dem Kohlenoxyd-Pyridin-Hämochromogen. Die spektrographische Aufnahme ergibt einen Kurvenverlauf, der sich als Mischspektrum zwischen Pyridin-Hämin und Kohlenoxyd-Pyridin-Hämochromogen

deuten läßt. Die Kurve verläuft durch die Schnittpunkte der beiden Extinktionskurven (Abb. 4).

Wird mit einigen Körnchen $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ reduziert, entsteht zunächst vorübergehend das Pyridin-Hämochromogen-Spektrum, bei dem die Kohlenoxyd-Hämochromogenschatten zunehmend deutlicher werden. Nach etwa einer Minute zeigt sich dann das Spektrum des reinen Kohlenoxyd-Pyridin-Hämochromogens. Auch wenn die Reduktion mehrere Stunden nach dem Einleiten von Kohlenoxyd vorgenommen wird, bildet sich reines Kohlenoxyd-Hämochromogen. Nach 4 Tagen entsteht nach Reduktion ein Mischspektrum aus Pyridin-Hämochromogen mit einem kräftigen Vorschlagsschatten im Gelbgrün, der dem Kohlenoxyd-Pyridin-Hämochromogen zuzuschreiben ist. Das Pyridin-Hämin hält also das Kohlenoxyd, auch wenn die Lösung in einem offenen Gefäß steht, recht lange fest. Durch kräftiges Schütteln mit Luft oder durch kurzes Aufkochen wird das Kohlenoxyd aus der Lösung entfernt. Nach Reduktion mit $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ bildet sich nunmehr das reine Pyridin-Hämochromogen.

7. Das Kohlenoxyd-Pyridin-Hämochromogen.

Das Pyridin-Hämochromogen hat im sichtbaren Gebiet 3 Maxima (Abb. 4). Die erste sehr intensive Auslöschung liegt bei $557 \text{ m}\mu$, die zweite bei $524 \text{ m}\mu$. Ein weiteres geringes Maximum findet sich bei

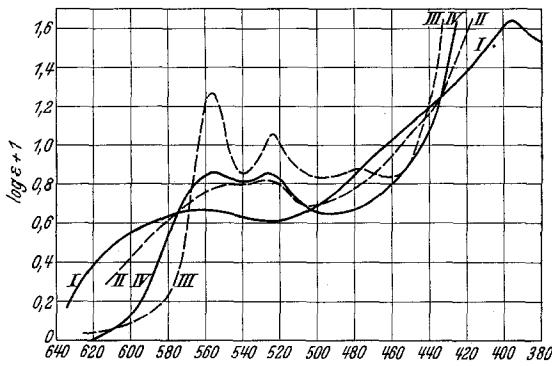


Abb. 4. Typische Farbkurven von Hämin in pyridinhaltigem Lösungsmittel. I = in NaOH gelöstes Hämin mit $\frac{1}{4}$ -Volumen Pyridin; II = dieselbe Lösung nach Einleiten von CO; III = Pyridin-Hämochromogen, dargestellt aus Lösung I durch Reduktion mit einigen Körnchen $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$; IV = Kohlenoxyd-Pyridin-Hämochromogen, aus Lösung III durch Einleiten von CO hergestellt.

$480 \text{ m}\mu$. Die Kurve deckt sich im wesentlichen mit den Messungen von Haurowitz und Treibs, die allerdings das Maximum bei $480 \text{ m}\mu$ nicht erwähnen.

Wird Kohlenoxyd eingeleitet oder wird eine mit Kohlenoxyd vorbehandelte Pyridin-Hämin-Lösung reduziert, bildet sich das Kohlen-

oxyd-Pyridin-Hämochromogen. Verglichen mit dem Pyridin-Hämochromogen ist die Lösung in ihrem Farbton braunstichiger. Bei spektroskopischer Untersuchung zeigen sich zwei gleich starke, aber sehr matt konturierte Kohlenoxydschatten im Grün (Abb. 4). Der Anstieg im Rot verläuft flacher als beim Kohlenoxyd-Hämoglobin. Der erste Schatten liegt bei $556\text{ m}\mu$, ist also, verglichen mit dem Kohlenoxyd-Hydrazin- und Kohlenoxyd-Ammoniak-Hämochromogen erheblich violettwärts verschoben. Der zweite Schatten liegt bei $527\text{ m}\mu$. Das Minimum zwischen beiden ist wie bei allen Kohlenoxyd-Hämochromogenen sehr flach. Es liegt bei $540\text{ m}\mu$.

Das Kohlenoxyd-Pyridin-Hämochromogen-Spektrum bleibt bei mehrfachem kräftigen Schütteln mit Luft erhalten. Nach längerem Schütteln zeigt sich eine geringe Abschwächung der Kohlenoxydschatten. Ein einmaliges kurzes Aufkochen wird ohne wesentliche Abschwächung der Kohlenoxydschatten vertragen. Eine Trübung der Kohlenoxyd-Hämochromogenlösungen tritt beim Kochen nicht ein. Zweimaliges kurzes Aufkochen führt zu einem Mischspektrum von Pyridin-Hämochromogen mit deutlichem Kohlenoxydvorschlagschatten. Mehrfaches kurzes Aufkochen lässt reines Pyridin-Hämochromogen entstehen. Nach mehrstündigem Stehen in offenem Gefäß verblassen die Kohlenoxydschatten allmählich. Nach 12 Stunden liegt reines Pyridin-Hämin vor.

8. Das Verhalten von Kohlenoxyd zu Cyan-Hämin.

Das Cyan-Hämin wurde durch Zugabe von $\frac{1}{4}$ Volumteil 10 proz. wässriger Cyankaliumlösung zur alkalischen Ausgangslösung erhalten. Es findet sich ein breites hohes Absorptionsband mit einem Maximum bei etwa $545\text{ m}\mu$. Im Violett liegt das Maximum bei $420\text{ m}\mu$ (Abb. 5). Nach mehrstündigem Einleiten von Kohlenoxyd zeigt sich bei spektrographischer Untersuchung der Lösung keine Änderung im Extinktionsverlauf. Fügt man einige Krystallchen von $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ hinzu, entsteht das reine Spektrum des Kohlenoxyd-Cyan-Hämochromogens. Das Cyan-Hämin hält, obgleich ein neuer optischer Körper nicht entstanden ist, das Kohlenoxyd recht fest gebunden. Kurzes kräftiges Schütteln führt bei nachträglicher Reduktion zu einem Mischblut, bei dem die Cyan-Hämochromogenschatten jedoch nur eben angedeutet vorliegen. Durch mehrfaches längeres kräftiges Schütteln ist das Kohlenoxyd aus der Cyan-Häminlösung nicht restlos zu entfernen. Wird die Lösung, nachdem sie in offenem Glasgefäß 4 Tage gestanden hat, reduziert, so liegt neben dem Cyan-Hämochromogen noch ein sehr kräftiges Kohlenoxyd-Hämochromogenspektrum vor. Durch kurzes Aufkochen wird das Kohlenoxyd aus der Cyan-Häminlösung restlos entfernt.

9. Das Kohlenoxyd-Cyan-Hämochromogen.

Das Kohlenoxyd-Cyan-Hämochromogen hat im Gegensatz zu den bisher erwähnten Kohlenoxyd-Hämochromogenen im sichtbaren Gebiet ein dreistreifiges Absorptionsspektrum. Neben dem charakteristischen Kohlenoxydschatten im Grün tritt eine Verschattung im Rot bei $614 \text{ m}\mu$ auf. Die Schatten im Grün liegen bei $558 \text{ m}\mu$ und $528 \text{ m}\mu$. Sie entsprechen in ihrer Lage also annähernd dem Kohlenoxyd-Pyridin-Hämochromogen. Das Maximum im Violett liegt bei $403 \text{ m}\mu$ (Abb. 5).

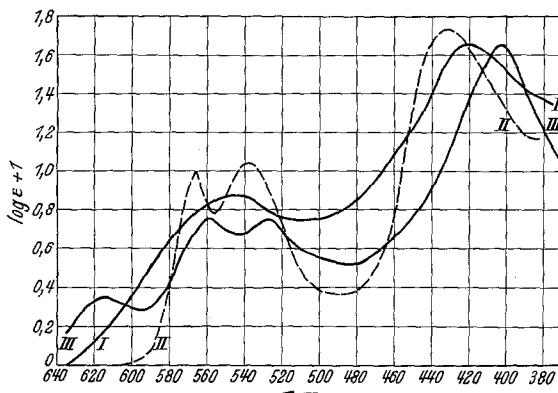


Abb. 5. Typische Farbkurven von Häm in cyanhaltigem Lösungsmittel. I = in NaOH gelöstes Häm mit $\frac{1}{4}$ -Volumen 10 proz. Cyanalkaliumlösung (Cyan-Häm). Nach Einleiten von CO zeigt sich keine Änderung im Extinktionsverlauf; II = Cyan-Hämochromogen, durch Reduktion der Lösung I mit $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ erhalten; III = Kohlenoxyd-Cyan-Hämochromogen, durch Einleiten von CO in Lösung II hergestellt.

Das Kohlenoxyd-Cyan-Hämochromogen ist keine haltbare Verbindung. Es gibt das Kohlenoxyd leichter ab als das mit Kohlenoxyd vorbehandelte, in seinem optischen Verhalten nicht veränderte Cyan-Häm. Es ist nicht kochfest. Es ist durch einmaliges Schütteln mit Luft leicht in Cyan-Häm zu überführen. Nach Verlauf weniger Stunden geht es spontan in Cyan-Häm über.

10. Das Verhalten von Kohlenoxyd zu Häm in eiweißhaltigem Lösungsmittel.

Heilmeyer hat festgestellt, daß im Blutserum gelöstes krystallisiertes Häm (Hans Fischer) einen anderen Extinktionsverlauf aufweist, als das in $n/10$ -NaOH gelöste Produkt. Einige Milligramm Häm wurden in 3 Tropfen Lauge gelöst und tropfenweise dem Serum zugefügt. Das Absorptionsmaximum im Rot war im ganzen niedriger und um $10 \text{ m}\mu$ nach dem langwelligen Gebiet verschoben. Die Absorption im Grün hob sich in Form eines doppelköpfigen Maximums bei $535 \text{ m}\mu$ und $495 \text{ m}\mu$ viel deutlicher heraus als in $n/10$ -Lauge. In Serum gelöstes Hämatin gab einen gleichen Kurvenverlauf. Es zeigte sich im Gegensatz zu dem

in $n/10$ -NaOH gelösten Hämin und Hämatin eine Unabhängigkeit vom p_H -Wert des Lösungsmittels von p_H 8 bis p_H 13. Nur wenn stark konzentrierte Lauge im Überschuß zugegeben wurde, wurde das Serum-Spektrum in das Spektrum des alkalischen Hämatins überführt. *Heilmeyer* nimmt an, daß eine Serum-Eiweißkörper-Bindung vorliegt, die durch Zusatz konzentrierter Lauge im Überschuß gelöst wird.

Einen mit dem Spektrum des alkalischen Hämatins identischen Kurvenverlauf erhält man, wenn das in $n/10$ -NaOH gelöste Hämin 5fach mit Wasser verdünnt und $1/4$ Volumteil in $n/10$ -NaOH zuvor gekochte 10proz. Blutserumlösung zufügt. Der Kurvenverlauf ist in Abb. 6 in seinen logarithmischen Werten eingezeichnet. Die Kurve steigt im Rot flach an. Sie hat von Rotgelb bis Grün einen ziemlich flachen Verlauf. Das Maximum im Violett liegt bei $391 \text{ m}\mu$.

Leitet man in diese Lösung Kohlenoxyd ein, erhält man ein Mischspektrum mit Kohlenoxyd-Eiweiß-Hämochromogen. Die rotbraune Lösung zeigt im sichtbaren Gebiet an entsprechender Stelle zwei matte Kohlenoxyd-Hämochromogenschatten. Nach Reduktion mit einigen Körnchen Natriumhydrosulfit bildet sich ein reines Kohlenoxyd-Eiweiß-Hämochromogenspektrum. Selbst wenn die Lösung erst nach einer Stunde reduziert wird, entsteht in gleicher Stärke reines Kohlenoxyd-Hämochromogen. Nach einmaligem kräftigen Schütteln und nachträglicher Reduktion tritt neben den Kohlenoxyd-Hämochromogenschatten das Eiweiß-Hämochromogen in Erscheinung. Durch einmaliges kurzes Aufkochen sind die Kohlenoxyd-Hämochromogenschatten nicht vollends zu entfernen. Nach erneutem kurzen Aufkochen entsteht reines Eiweiß-Hämochromogen.

11. Das Kohlenoxyd-Eiweiß-Hämochromogen, dargestellt aus Hämin.

Die Darstellung des Eiweiß-Hämochromogens aus Natronlauge-alkalischer Häminlösung unter Verwendung eines stickstofffreien Reduktionsmittels gelingt am leichtesten, wenn der Häminlösung in $n/10$ -NaOH gekochtes Blutserum zugeführt wird. Wird in reichlichem Überschuß Reduktionssubstanz zugesetzt, zeigt sich ein langsames Ablassen der Hämochromogenschatten. Es entsteht vorübergehend ein Mischspektrum aus Eiweiß-Hämochromogen und eiweißfreiem reduzierten Hämin, das sich nicht lange hält. Wird ungekochtes, sei es menschliches oder tierisches Blutserum verwendet, oder wird in NaOH gekochtes Serum der bereits reduzierten Häminlösung zugefügt, bilden sich die Hämochromogenschatten nur schwach aus und sind durch geringen Überschuß an Reduktionssubstanz in kurzer Zeit zum Verschwinden zu bringen. Nach Schütteln mit Luft bildet sich das Eiweiß-Hämochromogen nicht mehr neu. Die Bildung des Eiweiß-Hämochromogens aus Hämin in blutserumhaltigem Lösungsmittel ist demnach nicht

nur von der Beschaffenheit des Serums, sondern auch von der Menge des verwendeten Reduktionsmittels abhängig. Reichlicher Überschuss von Reduktionssubstanz verhindert die Bildung von Eiweiß-Hämochromogen oder lässt die Hämochromogenstreifen sehr bald verschwinden. Es entsteht vorübergehend reduziertes Hämin. Die Veränderung, die der Farbstoff durch intensive Reduktion erfährt, ist eine bleibende.

Der typische Extinktionsverlauf des Eiweiß-Hämochromogens aus Hämin in gekochter natronlaugealkalischer Blutserumlösung und nachfolgender Réduktion durch einige Körnchen $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ist in Abb. 6 eingezeichnet. Die Kurve unterscheidet sich nur unwesentlich vom Hydrazin- und Ammoniak-Hämochromogen. Das erste intensive Maximum im Grün liegt bei $557 \text{ m}\mu$. Der zweite Schatten bei $526,5 \text{ m}\mu$.

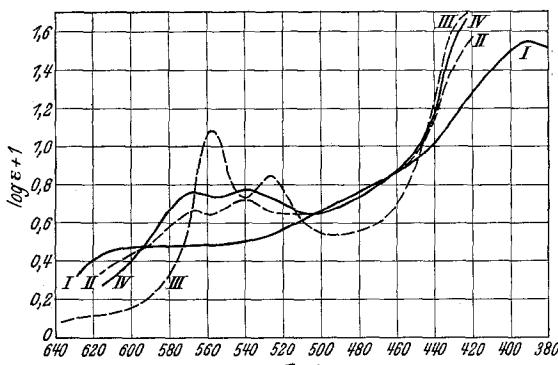


Abb. 6. Typische Farbkurve von Hämin in eiweißhaltigem Lösungsmittel. I = in NaOH gelöstes Hämin mit $1/4$ -Volumteil in $1/10$ -NaOH gekochten Blutserums (10proz.); II = dieselbe Lösung nach Einleiten von CO; III = Eiweiß-Hämochromogen, aus Lösung I durch Reduktion mit einigen Körnchen $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ hergestellt; IV = Kohlenoxyd-Eiweiß-Hämochromogen aus Lösung III durch Einleiten von CO.

Wird Kohlenoxyd eingeleitet, entsteht eine helle, braunrote Flüssigkeit, die zwei matt konturierte Absorptionsschatten im Gelbgrün und Grün aufweist. Der gesamte Kurvenverlauf ist, verglichen mit Kohlenoxyd-Hämoglobin flacher. Der erste Schatten liegt bei $567,5 \text{ m}\mu$ der zweite bei $539 \text{ m}\mu$. Zwischen beiden findet sich ein flaches Minimum bei $554,5 \text{ m}\mu$. Ein weiteres Minimum liegt bei $503 \text{ m}\mu$. Der Anstieg in den unsichtbaren Teil des Violetts ist ein verhältnismäßig steiler. Die Lage der Maxima entspricht am meisten der des Kohlenoxyd-Hydrazin-Hämochromogens. Die Kohlenoxyd-Ammoniak-Hämochromogenschatten liegen mehr rotwärts. Kohlenoxyd-Pyridin- und Kohlenoxyd-Cyan-Hämochromogen sind um ein beträchtliches mehr violettwärts gelagert.

Durch kräftiges Schütteln sind die Kohlenoxyd-Hämochromogenschatten nicht völlig zum Verschwinden zu bringen. Durch einmaliges

kurzes Aufkochen tritt keine wesentliche Änderung in der Lichtabsorption ein. Durch mehrmaliges kurzes Aufkochen wird das Kohlenoxyd aus seiner Bindung entfernt. Es entsteht reines Eiweiß-Hämochromogen. In offenem Gefäß ist die Lösung einige Wochen haltbar.

12. Das Kohlenoxyd-Eiweiß-Hämochromogen aus Blutlösungen.

Die Umwandlung von Oxyhämoglobin in alkalisches Hämatin ist, außer von der Ionenkonzentration des Lösungsmittels und seiner zeitlichen Einwirkung, von Temperatur und Konzentration der Blutlösung abhängig. Das Verhalten von Oxy- und Kohlenoxyd-Hämoglobin in alkalischen Puffergemischen habe ich gemeinsam mit K. Feise untersucht, der in einer Dissertation über dieses Thema die ausführlichen Versuchsprotokolle wiedergibt.

Durch Venenpunktion mit Natriumcitrat gewonnenes Blut einer erwachsenen Versuchsperson wurde durch Zentrifugieren und mehrfaches Auswaschen mit Kochsalzlösung vom Citrat und Serum möglichst befreit. Lösungen verschiedenen Blutgehaltes wurden zu gleichen Teilen mit Glykokoll-Natronlauge-Puffergemischen nach Sörensen (bezogen von Schering-Kahlbaum, A.-G. Berlin) versetzt und die Umwandlung in alkalisches Hämatin spektroskopisch verfolgt und in Abständen spektrographisch untersucht.

Eine 2proz. Oxyhämoglobinlösung wird durch ein Puffergemisch von p_H 13,066 ($n/10$ -NaOH) schon nach 1 Minute braun verfärbt. Die Oxyhämoglobinstreifen blassen nach wenigen Minuten ab. Nach 15 Minuten sind die Oxyhämoglobinschatten nicht mehr erkennbar. Eine weitere Veränderung der Lösung tritt nicht mehr auf. Die spektrographische Untersuchung, die nach 36 Stunden vorgenommen wurde, ergab den Extinktionsverlauf des reinen alkalischen Hämatins. Bei p_H 12,972 sind die Oxystreifen nach 15 Minuten eben noch erkennbar. Nach 25 Minuten sind sie verschwunden. Die Pufferlösung vom p_H -Wert 12,399 zeigt nach 30 Minuten noch matte Zweistufigkeit. Nach 12 Stunden findet sich bei der spektrographischen Aufnahme reines alkalisches Hämatin. Ein Puffergemisch von p_H 11,315 verwandelt eine 2proz. Oxyhämoglobinlösung nicht mehr vollständig in alkalisches Hämatin. Die Untersuchung nach 48 Stunden ergibt die Kurve eines Mischblutes, deren Oxyhämoglobinanteil rechnerisch 75,3% ausmacht. Der Pufferwert von p_H 10,140 führt in gleicher Weise nur eine teilweise Umwandlung herbei. Nach 50 Stunden beträgt der Oxyhämoglobinanteil noch 55,2%. Ein Puffergemisch von p_H 9,714 greift eine 2proz. Oxyhämoglobinlösung bei Eisschranktemperatur nach 48 Stunden nicht mehr in spektrographisch meßbarem Grade an.

Höhere Blutkonzentrationen erfordern zu ihrer Umwandlung einen höheren Grad von Alkaliescenz. Eine 2,5proz. Oxyhämoglobinlösung

wird beispielsweise durch das Puffergemisch p_H 12,399 nach 24 Stunden nur teilweise umgewandelt. Eine 10proz. Blutlösung ergibt eine so geringe Umwandlung, die sich nur spektrographisch nachweisen läßt. Wird ein 5proz. Blutlösung mit dem Pufferwert 12,399 jedoch langsam erhitzt, geht sie vollständig in alkalisches Hämatin über. Geringere Grade von Alkalescenz bringen konzentriertere Blutlösungen durch Aufkochen zur Koagulation.

Bei einem Puffergemisch von p_H 13,066 und 12,97 hat das alkalische Hämatin von 600—540 m μ einen ziemlich horizontal liegenden Extinktionsverlauf, der sich mit dem in Eiweiß gelösten natronlaugealkalischen Hämin deckt (Abb. 6). Bei p_H 12,672 und p_H 12,399 steigt die Kurve im gesamten Verlauf des sichtbaren Gebietes gleichmäßig flach an.

Leitet man in die alkalische Hämatinlösung Kohlenoxyd ein, erfährt die Lichtauslöschung keine Änderung. Wird nachträglich reduziert, bildet sich Kohlenoxyd-Hämochromogen. Das Kohlenoxyd hält sich in der alkalischen Hämatinlösung selbst in offenem Gefäß viele Stunden. Es kann durch einmaliges kräftiges Schütteln oder durch einmaliges kurzes Aufkochen leicht entfernt werden. Nach Reduktion mit einigen Körnchen $Na_2S_2O_4$ bildet sich dann das kohlenoxydfreie Eiweiß-Hämochromogen.

Das aus Blutlösungen durch Versetzen mit NaOH und Hydrazinsulfat nach Einleiten von CO erhaltene Kohlenoxyd-Eiweiß-Hämochromogen hat seine beiden Maxima im sichtbaren Gebiet bei 567,5 m μ und 539 m μ (Abb. 7). Die Maxima entsprechen also genau der Lage des aus Hämin in Eiweißlösung hergestellten Kohlenoxyd-Eiweiß-Hämochromogens. Die Maxima decken sich mit dem Kohlenoxyd-Hämaglobin fast genau. *Heilmeyer* bestimmte die Lage der ersten Kohlenoxyd-Hämoglobinschatten bei 568 m μ und 539 m μ . Die gleiche Lage der Maxima im sichtbaren Teil des Spektrums ist offenbar der Grund, weshalb das Spektrum des Kohlenoxyd-Hämochromogens, das aus Blutlösungen gewonnen wurde, seit der Entdeckung durch *Hoppe-Seyler* im Jahre 1889 von fast allen Autoren mit der Lichtauslöschung des Kohlenoxyd-Hämoglobins gleichgesetzt wurde. *Hoffmann* und *Schwarzacher* fanden bei Verwenden von Schwefelammonium als Reduktionssubstanz den ersten Absorptionsstreifen bei 572,0 m μ , den zweiten bei 536,1 m μ . *Hoppe-Seyler* sah die Hauptabsorption des ersten Schattens bei 582,5—561,6 m μ , des zweiten bei 550,0—522,2 m μ . *Schumm* bestimmte die Lage des ersten Schattens von 581,0—560,0 m μ , des zweiten von 549—522 m μ , *Dilling* (zitiert nach *Hoffmann* und *Schwarzacher*) gibt die Wellenlänge 583,5—564,0 m μ für das erste Maximum und 546,5—527 m μ für das zweite Maximum an. Der Unterschied in dem Lichtauslöschungsvermögen dieser beiden Körper liegt darin, daß das Kohlenoxyd-Hämochromogen im ganzen einen viel

flacheren Extinktionsverlauf aufweist. In Abb. 7 sind die logarithmischen Werte der Extinktion beider Stoffe eingezeichnet. Beim Kohlenoxyd-Hämoglobin ist das Minimum im sichtbaren Gebiet erheblich tiefer. Die Kohlenoxyd-Hämoglobinschatten erscheinen deshalb bei spektroskopischer Betrachtung härter und schärfer konturiert als die Schatten des Kohlenoxyd-Hämochromogens. Im Rot zeigt das Kohlenoxyd-Hämochromogen eine wesentlich stärkere Lichtabsorption. Für quantitative spektrophotometrische oder spektrographische Kohlenoxydbestimmungen ist es demnach keineswegs gleichgültig, ob das CO als Hämoglobin- oder Hämochromogenverbindung vorliegt.

Größer noch sind die Unterschiede im Extinktionsverlauf im Bereich des unsichtbaren Violetts. Das Maximum des Violettschattens des Kohlenoxyd-Hämoglobins fanden Warburg bei $420 \text{ m}\mu$, Heilmeyer bei $419,3 \text{ m}\mu$, Newcomer bei $419 \text{ m}\mu$, Berg und Schwarzacher bei $418 \text{ m}\mu$. Das Maximum des Kohlenoxyd-Eiweiß-Hämochromogens liegt bei $412 \text{ m}\mu$. Der Violettschatten des Kohlenoxyd-Hämochromogens steigt flacher an. Er schneidet die typische Farbkurve des Kohlenoxyd-hämoglobins bei $425 \text{ m}\mu$. Die Maxima sind annähernd gleich hoch. Die absteigenden Schenkel verlaufen vom Scheitelpunkt bis 370 annähernd parallel.

Die logarithmischen Werte der Extinktion der Violettschatten einer 0,25 proz. Kohlenoxyd-Hämoglobin- und Kohlenoxyd-Eiweiß-Hämochromogenlösung ergeben sich aus nachstehender Tabelle, die, um Ungenauigkeiten im Abgreifen der Schicht möglichst auszugleichen, an je 3 Lösungen verschiedener Konzentration gewonnen wurden. Hoffmann und Schwarzacher fanden die Hauptabsorption im Violett bei

Log $\cdot \epsilon + 1$	Kohlenoxyd-Hämoglobin bei Wellenlänge in $\text{m}\mu$	Kohlenoxyd-Eiweiß-Hämochromogen bei Wellenlänge in $\text{m}\mu$
1,6	—	—
1,5	—	—
1,4	(419,5)	(412)
1,3	422,5	415
1,2	425	412
1,1	425,5	409
1,0	427,5	404
0,9	429	399
0,8	431	395
0,7	433	390
0,6	434	386
0,5	436	378
0,4	439	—
0,3	444	454
0,2	452	463
0,1	464	477
0,0	476	—

$419 \text{ m}\mu$, Schumm bei $450 \text{ m}\mu$ und Dilling (zitiert nach Hoffmann und Schwarzacher) bei $430\text{--}406,5 \text{ m}\mu$.

Das aus Blutlösungen dargestellte Kohlenoxyd-Hämochromogen ist in offenem Gefäß bei Eisschranktemperatur einige Monate haltbar. Durch mehrfaches kräftiges Schütteln mit Luft läßt sich das Kohlenoxyd nur langsam austreiben. Das Kohlenoxyd-Hämochromogen verträgt ein einmaliges kurzes Aufkochen. Durch mehrfaches kurzes Aufkochen läßt sich das Kohlenoxyd in kurzer Zeit restlos entfernen. Pregl hat in einem besonders konstruierten Apparat das Kohlenoxyd-Hämochromogen rein dargestellt. Er erhielt es als dunkelblauviolettes an Kaliumpermanganat erinnerndes Pulver, das, völlig getrocknet, an der Luft beständig ist.

13. Der spektroskopische Nachweis von Kohlenoxyd im Blut als Kohlenoxyd-Hämochromogen.

Das Kohlenoxyd-Hämoglobin ist gegenüber der Einwirkung von Lauge wesentlich widerstandsfähiger als Oxyhämoglobin. Eine 2proz. Kohlenoxyd-Hämoglobinlösung, die zu gleichen Teilen mit $n/10\text{-NaOH}$ (p_H 13,066) versetzt wird, zeigt sich nach 15 Minuten noch deutlich zweistreifig. Nach etwa 45 Minuten sind die Kohlenoxydschatten verschwunden. Bei einem p_H -Wert von 12,972 trat nach 40 Minuten eine deutliche Teilumwandlung ein, 10proz. Natronlauge zerstört das Kohlenoxyd-Hämoglobin nach etwa $1/2$ Stunde. Ein Glykokoll-Natronlauge-Puffergemisch vom p_H -Wert 12,399 greift eine experimentell dargestellte 1- und 2proz. Kohlenoxyd-Hämoglobinlösung im Gegensatz zu Oxy-Hämoglobin nur außerordentlich wenig an. In einigen Fällen konnte selbst nach 72 Stunden keine Teilumwandlung in alkalisches Hämatin spektrographisch festgestellt werden. Bei Leichenblut und experimentell dargestellten Mischblutlösungen wurde neben dem Oxyhämoglobin auch der Kohlenoxydanteil des Blutes in einigen Fällen in geringem Grade angegriffen. Die Verschiedenheit des Extinktionsverlaufs dieser beiden Blutfarbstoffderivate würde den Nachweis von Kohlenoxyd im Mischblut durch alkalische Puffergemische besonders günstig gestalten. Solange man aber nicht in der Lage ist, eine exakte Trennung der beiden Anteile vorzunehmen, ist diese Methode für den Kohlenoxydnachweis nicht geeignet.

Fügt man einem kohlenoxydhaltigem Mischblut in geeigneter Stärke Natronlauge und Reduktionssubstanz zu, wird das Oxyhämoglobin in Hämochromogen, der Kohlenoxydanteil in Kohlenoxyd-Hämochromogen umgewandelt. Die ersten Maxima dieser beiden Körper liegen soweit voneinander entfernt, daß ihre Anwesenheit sich bei spektroskopischer Betrachtung mit gradsichtigem Handspektroskop leicht feststellen läßt. Vor der Reduktion läßt sich, wenn die Lösung

geteilt wird, der eine Teil der Lösung durch kräftiges Schütteln und leichtes Erwärmen leicht vom Kohlenoxyd befreien. Nach Reduktion erhält man in dem einen Teil der Lösung das Eiweiß-Hämochromogen, in dem anderen Teil das Mischblutspektrum gleicher Gesamtkonzentration.

Die spektroskopische Untersuchung wird in der Weise ausgeführt, daß man das zu untersuchende Blut soweit mit Wasser verdünnt, bis bei spektroskopischer Betrachtung im Reagensglase die beiden Maxima im sichtbaren Gebiet als ein einheitlicher kräftiger Schatten vorliegen. Die Blutlösung wird filtriert. 20 ccm werden mit der gleichen Menge 10 proz. Natronlauge versetzt. Die eine Hälfte der Lösung wird kräftig geschüttelt, ganz leicht erwärmt, erneut geschüttelt und nach dem Erkalten mit 5 ccm 10 proz. Hydrazinsulfatlösung reduziert. Der andere Teil wird sofort mit der gleichen Menge Hydrazinsulfatlösung versetzt. Nach etwa 45 Minuten ist das Kohlenoxyd-Hämoglobin durch die Natronlauge zerstört und das Kohlenoxyd als Kohlenoxyd-Hämochromogen gebunden. Vergleicht man nach etwa 1—3 Stunden die beiden Lösungen miteinander, so erkennt man in der einen ein kohlenoxydfreies Hämochromogen, in der anderen neben Hämochromogen eine, dem Kohlenoxydgehalt entsprechende Verschattung im Gelbgrün, die dem Kohlenoxyd-Hämochromogen zuzuschreiben ist.

Beträgt der Kohlenoxydanteil etwa 60—70%, wird das Minimum zwischen den beiden sichtbaren Kohlenoxyd-Hämochromogenschatten durch das Eiweiß-Hämochromogen soweit ausgefüllt, daß die beiden Schatten bei entsprechender Verdünnung gleich stark erscheinen und dementsprechend eine fast gleichmäßige Verschattung von Gelbgrün bis Mittelgrün vorliegt. Bei 50 proz. Kohlenoxydmischblut ist der erste Hämochromogenschatten intensiver als das Kohlenoxyd-Hämochromogen. Das Kohlenoxyd-Hämoglobin mit seinem intensiveren Minimum zeigt darin ein anderes Verhalten, auf das ich seiner Zeit hingewiesen habe. Auf diese Weise läßt sich noch ein 5 proz. Kohlenoxydanteil in einem Mischblut bei vergleichender Untersuchung als Vorschlagschatten vor dem Hämochromogen erkennen. Nach längerem, mehrstündigen Abwarten nehmen die Eiweiß-Hämochromogenschatten langsam an Intensität zu.

14. Quantitative Bestimmung des Kohlenoxyd-Hämoglobinanteils in einem Mischblut als Kohlenoxyd-Hämochromogen mit Hilfe der typischen Farbkurven.

Vierordt hat eine Berechnung angegeben, die es gestattet, die Konzentration zweier oder mehrerer Farbstoffe, die gleichzeitig in einem Lösungsmittel vorhanden sind, und sich nicht gegenseitig optisch beeinflussen, spektrophotometrisch nach der Formel:

$$x = \frac{A \cdot a (E_1 \cdot B - E_2 \cdot b)}{B \cdot a - A \cdot b},$$

$$y = \frac{B \cdot b (E_2 \cdot a - E_1 \cdot A)}{B \cdot a - A \cdot b}$$

zu bestimmen, wobei A , a , B , b die vier bekannten Absorptionsverhältnisse der beiden in Lösung befindlichen reinen Farbstoffe für zwei verschiedene Spektralabschnitte bedeuten und E_1 und E_2 die gemessene Gesamtextinktion der Mischlösung bei den gleichen Spektralgebieten.

G. Hünfer hat die Formel zur gleichzeitigen Bestimmung des prozentualen Anteils zweier in Lösung befindlicher Farbstoffe umgewertet. Hat das Extinktionskoeffizientenverhältnis für 2 Wellenlängenbezirke für den einen Farbstoff den Wert a , das Extinktionskoeffizientenverhältnis in dem gleichen Wellenlängenbezirk für den anderen Farbstoff den Wert b , so wird das Extinktionskoeffizientenverhältnis der Mischung beider Farbstoffe alle Werte zwischen a und b besitzen. Die Werte werden um so näher an a liegen, je mehr von dem ersten Farbstoff in der Lösung vorhanden ist und näher an b kommen, je mehr die Lösung von dem zweiten Farbstoff enthält. Die *Hünfersche* Gleichung lautet:

$$x = \frac{\frac{100}{B} \left(\frac{1}{E_1} - \frac{1}{E_2} \cdot \frac{1}{b} \right)}{\frac{E_1}{E_2} \cdot \frac{1}{a} - \frac{1}{A} + \frac{1}{B} - \frac{E_1}{E_2} \cdot \frac{1}{b}};$$

x bedeutet den prozentualen Kohlenoxyd-Hämoglobinanteil des Mischblutes. E_1 und E_2 die Werte für die Gesamtextinktion bei Wellenlänge 1 und 2. A und B die Absorptionsverhältnisse der beiden in Lösung befindlichen Farbstoffe bei Wellenlänge 1. a und b die Absorptionsverhältnisse der beiden Farbstoffe bei Wellenlänge 2. *Hünfer* hat für alle Werte von Mischungen aus Kohlenoxyd- und Oxyhämoglobin für zwei charakteristische Wellenlängengebiete die prozentualen Anteile ausgerechnet und dafür Tabellen aufgestellt, die es ermöglichen, sofort alle Werte abzugreifen. Für spektrophotometrische Untersuchungen ist die Messung in einem ganz bestimmten Wellenlängenbereich, der für die jeweils ausgearbeitete Berechnung Geltung hat, ohne Schwierigkeiten möglich. Die *Hünfersche* Berechnung ist deshalb von allen Untersuchern, die spektrophotometrisch arbeiten, angewendet worden. Für spektrographische Untersuchungen ist dieses Verfahren nicht ohne weiteres anwendbar. Die spektrographische Untersuchung gestattet es nicht von vornherein, die Extinktion in einem bestimmten Wellenlängenbereich auszumessen. Die Stellen gleicher Schwärzung der photographischen Platte, die für die Berechnung ausschlaggebend sind, lassen sich nicht willkürlich abgreifen. Die Absorptionsmaxima und -minima, für die die *Hünferschen* Zahlen meist ausgearbeitet sind, lassen

sich bei dem spektrographischen Verfahren überhaupt nicht genauer festlegen. Selbst wenn man in möglichst kleinen Schichtdifferenzen die Untersuchungen vornimmt, bleibt die Auswertung der Maxima und Minima ungenau. Wenn man die kurvenmäßige Darstellung der Extinktion für die in Frage kommenden Wellenlängenbereiche möglichst vollständig durchgeführt, wird man zu Resultaten gelangen, die sich für die *Hüfnersche* Berechnung mit gewissen Fehlern verwerten lassen. Diesen Weg hatten *Gorancy* und *Urban* für die Bestimmung des Kohlenoxyd-Hämoglobinanteils in einem Mischblut für den violetten Teil des Spektrums eingeschlagen.

Recht einfach gestaltet sich die Auswertung spektrophotographischer Aufnahmen, wenn man der Berechnung die typischen Farbkurven der in Betracht kommenden Farbstoffe und Mischungen zugrunde legt. Wählt man für die kurvenmäßige Darstellung des Extinktionsverlaufes eines Farbstoffes als Ordinate den Logarithmus der Extinktion, so ist die Form der Kurve von der Konzentration unabhängig. Farbstofflösungen, die sich nur durch die Verschiedenheit ihrer Konzentration voneinander unterscheiden, laufen parallel. Sie sind lediglich um den logarithmischen Wert des Konzentrationsverhältnisses gegeneinander parallel verschoben.

In Abb. 7 ist der Extinktionsverlauf des Eiweiß-Hämochromogens und Kohlenoxyd-Eiweiß-Hämochromogens als typische Farbkurve eingezeichnet. Die Kurven schneiden sich bei Wellenlänge 563,5 m μ . Durch diesen Schnittpunkt verlaufen sämtliche Mischblutlösungen, sofern ihre Gesamtkonzentration an Farbstoff unverändert geblieben ist. Die Kurve irgendeines Mischblutes beliebigen Gesamtblutgehaltes läßt sich durch Parallelverschiebung in diesen Schnittpunkt hineinverlegen. Damit wird der rechnerische Gesamtblutgehalt der Lösung, ohne daß dadurch eine Mischungsänderung eintrate, gleich der Konzentration der reinen Lösungen.

Wenn in einer Farbstofflösung mehrere Stoffe enthalten sind, sie sich nicht gegenseitig optisch beeinflussen, so ist die Gesamttextinktion gleich der Summe der Einzelextinktionen. Für das Mischblut ist die Gesamttextinktion bei 575 m μ also gleich der Summe der Extinktion des Kohlenoxyd-Hämochromogen- und Eiweiß-Hämochromogenanteils. Die Konzentration des Kohlenoxyd-Hämochromogens sei gleich x , dann ist der Hämochromogenanteil gleich $100 - x$.

$$E_M \text{ bei } 575 \text{ m}\mu = E_{\text{CO-Hchr. } x} + E_{\text{Hchr. } (100-x)}.$$

Zwischen den Extinktionswerten E_1 und E_2 zweier Lösungen des gleichen Stoffes bei gleicher Schicht mit den Konzentrationen c_1 und c_2 besteht nach dem *Beerschen* Gesetz die Beziehung:

$$\frac{E_1}{E_2} = \frac{c_1}{c_2};$$

$E_{\text{CO-Hchr. } x}$ berechnet sich folgendermaßen:

$$\frac{E_{\text{CO-Hchr. } x}}{E_{\text{CO-Hchr. } 100\%}} = \frac{x}{100};$$

$$E_{\text{CO-Hchr. } x} = \frac{E_{\text{CO-Hchr. } 100\%} \cdot x}{100}.$$

Entsprechendes gilt für den Eiweiß-Hämochromogenanteil:

$$E_{\text{Hchr. } (100 - x)} = \frac{E_{\text{Hchr. } 100\%} \cdot (100 - x)}{100};$$

$$E_M \text{ bei } 575 \text{ m}\mu = \frac{E_{\text{CO-Hchr. } 100\%} \cdot x}{100} + \frac{100 E_{\text{Hchr. } 100\%} - E_{\text{Hchr. } 100\%} \cdot x}{100},$$

$$x = \frac{100 \cdot (E_M \text{ bei } 575 \text{ m}\mu - E_{\text{Hchr. } 100\%} \text{ bei } 575 \text{ m}\mu)}{E_{\text{CO-Hchr. } 100\%} \text{ bei } 575 \text{ m}\mu - E_{\text{Hchr. } 100\%} \text{ bei } 575 \text{ m}\mu}.$$

In dieser Gleichung sind die logarithmischen Werte der Extinktionen des Eiweiß-Hämochromogens und Kohlenoxyd-Eiweiß-Hämochromogens für jede Wellenlänge aus der kurvenmäßigen Darstellung zu entnehmen. Die entsprechenden numerischen Werte lassen sich aus einer Logarithmentafel ablesen. Der logarithmische Wert der Extinktion für das untersuchte Blut läßt sich nach Verlegung der Kurve durch den Schnittpunkt bei 563,5 auf der Ordinate ebenfalls leicht ablesen. Die entsprechenden Numeri werden, wie die Formel es angibt, subtrahiert, der Zähler mit 100 multipliziert und durch die Differenz des Extinktionswertes des Kohlenoxyd-Hämochromogens und Eiweiß-Hämochromogens dividiert.

Liegt reines Kohlenoxydblut vor, folgt die Kurve des Mischblutes dem Verlauf des Kohlenoxyd-Eiweiß-Hämochromogens. In der Gleichung läßt sich E_M durch $E_{\text{CO-Hchr.}}$ ersetzen. Damit wird $x = 100$. Enthält das Mischblut kein Kohlenoxyd-Hämoglobin, deckt sich die Kurve mit der des Eiweiß-Hämochromogens. Damit wird $x = 0$. Aus der Gleichung ergibt sich im weiteren die einfache Beziehung, daß 1% Kohlenoxydgehalt $\frac{1}{100}$ der Differenz zwischen $E_{\text{CO-Hchr.}}$ und $E_{\text{Hchr.}}$ ausmacht. Die Berechnung gestaltet sich also für jedes beliebige Wellenlängengebiet sehr einfach. Zu ihrer Durchführung genügt die Berechnung in einem einzigen Wellenlängenbereich. Die Berechnung gewinnt an Genauigkeit, wenn sie an zwei und mehr Wellenlängengebiete durchgeführt wird. Um die Ungenauigkeit, die sich bei der Verschiebung der typischen Farbkurve des Mischblutes durch den Schnittpunkt bei 563,5 m μ ergibt, möglichst auszugleichen, bezieht man zweckmäßig Wellenlängenbezirke, die rechts und links vom Schnittpunkt der Kurven liegen und möglichst große Differenz in der Absorptionsgröße aufweisen,

in die Berechnung ein. Für die Wellenlängen $575 \text{ m}\mu$ und $560 \text{ m}\mu$ ergibt sich für x :

$$x = \frac{100(E_M \text{ bei } 575 \text{ m}\mu - E_{\text{Hchr. 100\% bei } 575 \text{ m}\mu} + E_{\text{Hchr. 100\% bei } 560 \text{ m}\mu} - E_M \text{ bei } 560 \text{ m}\mu)}{E_{\text{CO-Hchr. 100\% bei } 575 \text{ m}\mu} - E_{\text{Hchr. 100\% bei } 575 \text{ m}\mu} + E_{\text{Hchr. 100\% bei } 560 \text{ m}\mu} - E_{\text{CO-Hchr. 100\% bei } 560 \text{ m}\mu}}$$

Für die Berechnung sind die Bezirke zwischen 570—580 und um $560 \text{ m}\mu$ die günstigsten. Das Mischblut wird in der angegebenen Weise mit Wasser und Natronlauge verdünnt. Gleich nach erfolgter Reduktion wird die Lösung in das Balyrohr überführt. Die Aufnahme wird nach etwa 2—3 Stunden vorgenommen. Sie erfolgt am zweckmäßigsten bei 4 und mehr verschiedenen Schichtdicken. Stellen gleicher Schwärzung in den angegebenen Wellenlängenbereichen werden der Berechnung zugrunde gelegt. In Abb. 7 sind die gefundenen Extinktionswerte eines 10, 5 und 2% kohlenoxydhaltigen Mischblutes eingezeichnet.

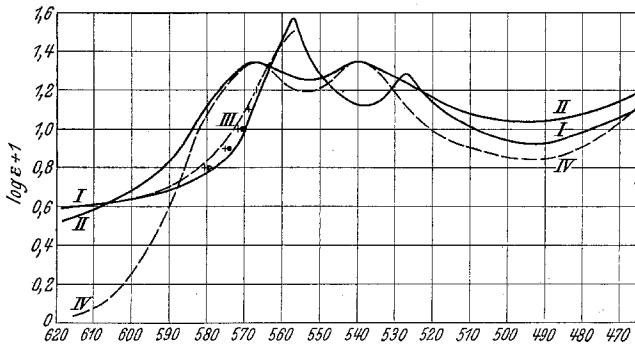


Abb. 7. Typische Farbkurven von: I = Eiweiß-Hämochromogen, dargestellt aus menschlichem Blut durch Verdünnen mit Wasser und $\frac{1}{2}$ -Volumenanteil 10proz. Natronlauge. 20 ccm dieser Lösung sind durch 5 ccm 10proz. Hydrazinsulfatlösung reduziert. Messung 2—3 Stunden nach der Reduktion; II = Kohlenoxyd-Eiweiß-Hämochromogen, dargestellt wie unter I aus Kohlenoxyd-Hämaglobinlösung; III = Extinktionsverlauf eines 10-, 5- und 2proz. CO-haltigen Mischblutes; IV = Kohlenoxyd-Hämaglobin gleicher Konzentration.

15. Über die Bildung und das Vorkommen von Kohlenoxyd-Hämochromogen im Blut.

Mit einsetzender Fäulnis, die mit zunehmender Alkalescenz einhergeht, wird in einem Mischblut zunächst der Oxy-Hämaglobinanteil in alkalisches Hämatin und Hämochromogen überführt. Es wäre denkbar, daß, falls die Affinität des Hämochromogens zu Kohlenoxyd größer wäre als die des Hämaglobins, das Kohlenoxyd nunmehr vom Hämochromogen gebunden würde. In einem Mischblut könnte auf diese Weise das Kohlenoxyd-Hämaglobin schon bei einem geringeren Grade von Alkalescenz, der lediglich das Oxy-Hämaglobulin angreift, in Kohlenoxyd-Hämochromogen überführt werden.

Über die Affinität des Hämochromogens und Hämaglobins zu Kohlenoxyd unterrichtet folgender Versuch: Eine 4proz. Blutlösung einer

Kohlenoxydvergiftung, in der sich 45% Kohlenoxyd-Hämoglobin vorgenommen, wurde zu gleichen Teilen mit einem Puffergemisch vom p_{H} -Wert 12,399 versetzt und mit einigen Körnchen $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ reduziert. Bei diesem Pufferwert wird im wesentlichen nur der Oxy-Hämoglobinanteil der Blutlösung in alkalisches Hämatin und Hämochromogen überführt. Nach 36 Stunden wurde die Lösung spektrographiert. Die Auswertung der Platte ergab einen Kurvenverlauf, der sich als Mischblut aus Kohlenoxyd-Hämoglobin und Eiweiß-Hämochromogen darstellte. Die Kohlenoxydschatten verschwanden bei langsamem Erwärmten. Der Gehalt an Kohlenoxyd-Hämoglobin war unverändert geblieben. In der Leiche und bei faulendem Mischblut ist demnach die Bildung des Kohlenoxyd-Hämochromogens erst dann zu erwarten, wenn das Blut einen höheren Grad von Alkalescenz erreicht hat, der das Kohlenoxyd-Hämoglobin in alkalisches Hämatin und Kohlenoxyd-Hämochromogen zu überführen in der Lage ist.

Im faulenden Blut einer Kohlenoxydvergiftung, das im Eisschrank aufbewahrt wurde, entstand Kohlenoxyd-Hämochromogen erst nach etwa 3 Monaten. Die untersuchte Blutlösung war stinkend faul und reagierte gegen Lackmus deutlich alkalisch. Nach 2 Monaten fanden sich in einem 40% CO-haltigem Leichenblut nur Spuren von CO-Hämochromogen. Das Blut war weniger faul.

Der Nachweis von Kohlenoxyd-Hämochromogen neben Oxy- und Kohlenoxyd-Hämoglobin kann in einfachster Weise durch Pufferung der Blutlösung mit gleichen Teilen 10proz. Natronlauge vorgenommen werden. Zeigt sich neben alkalischem Hämatin ein bleibendes Kohlenoxydspektrum, liegt Kohlenoxyd-Hämochromogen vor. Das Auftreten von Eiweiß-Hämochromogen lässt sich durch gelegentliches vorsichtiges Schütteln mit Luft verhindern. Das Kohlenoxyd-Hämochromogen bietet im weiteren die Möglichkeit, Kohlenoxyd im Blut verbrannter Leichen oder in gekochtem Blut nachzuweisen. Eine wässrige neutrale Kohlenoxydblutlösung erscheint nach einmaligem kurzen Aufkochen rotstichiger als Oxy-Hämoglobin. Löst man die koagulierten Massen in 10proz. Natronlauge und reduziert mit einigen Körnchen Natriumhydrosulfit, so wird das noch verhandene Kohlenoxyd als Kohlenoxyd-Hämochromogen gebunden. Der Verlust, den eine CO-Hämoglobinlösung durch ein einmaliges kurzes Aufkochen an Kohlenoxyd erfährt, ist ein beträchtlicher. In verdünntem Leichenblut, in dem 40% Kohlenoxyd-Hämoglobin vorhanden waren, betrug der Kohlenoxydgehalt nach einmaligem schnellem Aufkochen nur noch etwa 7,5%. Wird die Blutlösung dreimal ganz kurz zum Sieden erhitzt, hat das Blut seine Rotstichigkeit verloren. Kohlenoxyd lässt sich dann nicht mehr nachweisen.

Wir untersuchten vor einiger Zeit drei Flugzeugverunglückte, die nach dem Absturz des Flugzeuges in dem brennenden Betriebsstoff

ums Leben kamen. Die Leichen waren bis zur Unkenntlichkeit verkohlt. In den Weichteilen waren geschmolzene Metallteile eingelagert. Die Brust- und Bauchhöhlen waren zum Teil stark verkohlt, aber nicht eröffnet. Die Teilsektion einer Leiche konnte durchgeführt werden. In dem Herzblut war Kohlenoxyd-Hämochromogen nicht nachzuweisen. Dagegen fand sich bei spektroskopischer Untersuchung in geringer Menge Kohlenoxyd-Hämoglobin. Die gekochten und zum Teil verkohlten Weichteile wurden in Natronlauge gelöst. In der filtrierten Lösung ließ sich neben Hämochromogen Kohlenoxyd-Hämochromogen als deutlich erkennbarer Vorschlagsschatten erkennen. Die spontane Bildung von CO-Hämochromogen in der Leiche sahen Hoffmann und Schwarzacher bei den Bergwerksverunglückten in Buggingen. Die Leichen hatten 4 Wochen lang bei etwa 60° in einer Kohlenoxydatmosphäre gelegen. Unter annähernd gleichen Bedingungen gelang es CO-Hämochromogen in faulenden Muskelstücken künstlich zu erzeugen.

Literaturverzeichnis.

- ¹ Anson u. Mirsky, J. of Physiol. **60**, 50 (1925). — ² Barcroft, Die Atmungsfunktion des Blutes. Berlin: Julius Springer 1929. — ³ Berg u. Schwarzacher, Hoppe-Seylers Z. **190**, 184 (1930). — ⁴ Haurowitz, Hoppe-Seylers Z. **169**, 235 (1927). — ⁵ Heilmeyer, Medizinische Spektrophotometrie. Jena 1933. — ⁶ Hoffmann u. Schwarzacher, Hoppe-Seylers Z. **232/233**, 199 (1935). — ⁷ Hoppe-Seyler, Hoppe-Seylers Z. **13**, 477 (1889). — ⁸ Hüfner, Engelmanns Archiv für Anatomie u. Physiologie, physiologische Abteilung **1900**, 393. — ⁹ Mörner, Hoppe-Seylers Z. **41**, 542 (1904) u. Nord. med. Arkiv Fest-Bd. I ö. **26** (1897). — ¹⁰ Newcomer, J. of biol. Chem. **37**, 465 (1919). — ¹¹ Pregel, Hoppe-Seylers Z. **44**, 173 (1905). — ¹² Schmidt, O., Dtsch. Z. gerichtl. Med. **19**, H. 6 u. **22**, H. 4 u. 5. — ¹³ Sörensen, Biochem. Z. **21** (1919). — ¹⁴ Schumm, Spektrochemische Analyse. Jena: G. Fischer 1927. — ¹⁵ Treibs, Hoppe-Seylers Z. **168**, 68 (1927). — ¹⁶ Warburg, Biochem. Z. **214**, 26 (1929). — ¹⁷ Warburg, O., E. Negelein u. W. Christian, Biochem. Z. **214**, 26 u. 64 (1929).