

(Aus dem Gerichtsärztlichen Institut der Jagellonischen Universität Kraków.)

Spektroskopische Studien über einige Hämoglobinderivate.

Von

Prof. Dr. **L. Wachholz** und Assistenten Dr. **W. Baranowski**
und Dr. **H. Kaczyński**.

Mit 1 Textabbildung.

Die Veranlassung zu unseren hier zu besprechenden Untersuchungen bildeten eine Mitteilung *Lagunas*¹, ganz besonders aber einige Behauptungen *Flurys* und *Zanggers*², auf die sich *Laguna* in seinem Aufsatz beruft.

Flury und *Zangger* behaupten, daß „bei neutralem Methämoglobin (Met.-Hb.) der Absorptionsstreifen bei D, also im Rot“ besonders charakteristisch ist. „Außerdem finden sich“ — laut *Flury* und *Zangger* — „2 Streifen zwischen D und E, die wohl vom O-Hb. herrühren und ein weiterer, sehr breiter nach dem Blau zu.“ An einer anderen Stelle³ behaupten *Flury* und *Zangger* wieder: „Das CO-Hb. zersetzt sich bald schnell, bald langsam. Das CO verflüchtigt sich. Met.-Hb.-Streifen werden vom Schwefelammon auch nicht reduziert, so daß bei faulendem Blut öfter als man glauben sollte, die persistierenden, starken Doppelstreifen in der Nähe der D-Linie als Beweis für CO angegeben werden.“ Endlich an einer weiteren Stelle⁴ äußern sich *Flury* und *Zangger* dahin, daß „speziell der spektroskopische Nachweis (des CO) durch die spätere Entstehung von Met.-Hb. sehr erschwert“ wird.

Die hier wörtlich angeführten Behauptungen *Flurys* und *Zanggers* lassen sich nun kurz nachstehend zusammenfassen:

1. Das neutrale Met.-Hb. zeichnet sich spektroskopisch durch ein vierstreifiges Spektrum aus. In diesem Spektrum ist für das neutrale Met.-Hb. der Streifen bei D, also im Rot, besonders charakteristisch.
2. Das Spektrum des neutralen Met.-Hb.s wird vom Schwefelammonium nicht reduziert.
3. Die Entstehung von Met.-Hb. im CO-Blut erschwert sehr den spektroskopischen Nachweis des CO-Hb.s dadurch, daß das Met.-Hb.-Spektrum sich nicht reduzieren läßt, somit daß die persistierenden Doppelstreifen bei D irrtümlich für das CO-Hb.-Spektrum angesehen werden können.

Diese Behauptungen *Flurys* und *Zanggers* stehen in unverkennbarem Widerspruch mit der bisherigen Erfahrung. Was nun zuerst das Spektrum des neutralen Met.-Hb.s anbelangt, so wird es von dessen Entdecker *Hoppe-Seyler*⁵ als nur durch einen Absorptionsstreifen „im Rot zwischen C und D, näher bei C“ charakteristisch bezeichnet. Ähnlich

äußert sich *Hammarsten*⁶, der sich zugleich auf *Hoppe-Seyler*, *Jäderholm* und *Bertin-Sans* beruft. Endlich besteht nach den Untersuchungen *Arakis* und *Dittrichs*⁷ dieses Spektrum, wenn die Lösung frei von O-Hb.-Beimischung ist nur aus einem Streifen im Rot bei C. Was wieder die Nichtreduzierbarkeit des neutralen Met-Hb.-Spektrums anbelangt, so äußert sich *Hoppe-Seyler*⁸ in dieser Hinsicht folgendermaßen: „Durch Fäulnis oder reduzierende Substanzen in alkalischer Lösung, z. B. Schwefelammonium, wird Met-Hb. in Hb. umgewandelt“ und etwas weiter „Met-Hb. läßt sich . . . durch Schwefelammonium in Hb. überführen“. Diese leichte und prompte Reduzierbarkeit des neutralen Met-Hb.s bestätigen *Hammarsten*, *Kobert*⁹ u. a.

Um sich nun zu überzeugen, welche von den sich widersprechenden Behauptungen in bezug auf das Spektumbild und die Reduzierbarkeit des neutralen Met-Hb.s die richtige ist, unternahmen wir unsere Untersuchungen unter Zuhilfenahme des Zeisschen Kleinspektrographs mit Reagensglaskondensator.

Es wurde zuerst eine 2proz. wässrige Lösung frischen, defibrinierten Blutes mit rotem Blutlaugensalz (Ferricyankalium) in Substanz versetzt und nach erfolgtem Auflösen desselben die Lösung durch Umschwänken gut vermischt. Die Blutlösung nahm jetzt eine braungelbe Färbung an, die bei weiterer Verdünnung mit Wasser fast strohgelb erschien. Diese braungelbe Lösung zeigte ein Spektrum, welches nur aus einem Absorptionsband im Rot bei $\lambda = 642 - 615$ bestand, also beinahe 2mal näher an der Linie C lag (bei C $\lambda = 656$) als an der Linie D (bei D $\lambda = 589$). Zugleich muß bemerkt werden, daß ja doch die Fraunhofersche Linie D im Grün und nicht im Rot liegt. Von $\lambda = 590$ war gegen das violette Spektrumende das Licht vollständig absorbiert, wie es am Spektrophotogramm zu ersehen ist. Wir erhielten nur dann ein dreistreifiges (1 Streifen bei C und 2 im Grün zwischen D und E) Spektrum, wenn die 2proz. defibrinierte Blutlösung mit einer nicht ausreichenden Menge Ferricyankalium versetzt worden war, um das ganze in der Lösung befindliche O-Hb. in Met-Hb. überzuführen. Wir hatten in diesem Fall in der untersuchten Lösung und somit auch in deren Spektrum mit einem Gemisch von O-Hb. und neutralem Met-Hb. zu tun. Dies dreistreifige Mischspektrum veränderte sich immer sofort in das einstreifige Spektrum des neutralen Met-Hb., nachdem der untersuchten Lösung die ergänzende Menge Ferricyankalium zugesetzt worden war.

Nachdem wir uns auf diese Weise genügend überzeugt hatten, daß das Spektrum des neutralen Met-Hb. — im vollen Einklang mit den Untersuchungsergebnissen *Arakis*, *Dittrichs* und *Menzies*¹⁰ — nur aus einem Streifen bei C im Rot besteht, unternahmen wir Untersuchungen über die Reduzierbarkeit des neutralen Met-Hb. Nun stellten

wir die schon von *Hoppe-Seyler* nachgewiesene Tatsache fest, daß eine braune Lösung des neutralen Met-Hb. nach Zusatz von irgendeinem reduzierenden Reagens, also z. B. von frisch bereitetem Schwefelammonium, sich sofort rötet und sein Spektrum in das Spektrum des reduzierten Hb. umändert, welches nach Zufuhr von Sauerstoff in das zweistreifige O-Hb.-Spektrum vorübergehend umschlägt.

Jetzt schritten wir an die Lösung der Frage, ob das im CO-Blute etwa entstandene Met-Hb. den spektroskopischen Nachweis des CO-Hb. wirklich, und zwar „sehr“ erschwert.

Einer von uns (*Wachholz*¹¹) hat seinerzeit nachgewiesen, daß das neutrale Met-Hb. sich gegen reines CO-Gas indifferent verhält, d. i. koloristisch und spektroskopisch von ihm unbeeinflußt bleibt. Diesen Umstand einerseits und die prompte Reduzierbarkeit des neutralen Met-Hb. andererseits ausnützend, hat einer von uns (*Wachholz* mit *Sieradzki*¹²) die bekannte, neuerdings von *F. Reuter*¹³ warm empfohlene „modifizierte Tanninprobe“ zum Nachweis des CO im Blut angegeben. Da somit das neutrale Met-Hb. mit dem CO keine Verbindung eingeht, kann es kaum den Nachweis desselben im CO-Blute erschweren. Bei der Ausführung der modifizierten Tanninprobe nach *Wachholz-Sieradzki* wird zu einer auf CO zu untersuchenden Blutlösung Ferricyankalium zugesetzt, um das CO-Hb. in neutrales Met-Hb. überzuführen, sodann wird die eine Hälfte dieser Lösung mit Luft gut geschüttelt, um das jetzt nur mechanisch der Lösung anhaftende CO aus derselben zu vertreiben, die andere Hälfte dagegen in Ruhe gelassen. Dann wird beiden Hälften die gleiche Menge frischen, gut reduzierenden Schwefelammoniums zugesetzt und dadurch ihr neutrales Met-Hb. in Hb. reduziert. In der in Ruhe gelassenen Hälfte, aus welcher das freie CO nicht vertrieben wurde, verbindet sich dieses mit dem aus der Reduktion des neutralen Met-Hb. entstandenem Hb. zu CO-Hb., welches spektroskopisch sofort festgestellt werden kann, während die zweite, vom CO befreite Hälfte nach erfolgter Reduktion das einstreifige Spektrum des reduzierten Hb. zeigt. Um sich nun zweifellos davon zu überzeugen, daß das neutrale Met-Hb. den CO-Nachweis im Blute nicht erschweren kann und nicht erschwert, machten wir nachstehenden Versuch: Wir vermischten 5 cem einer 2proz. Lösung neutralen Met-Hb.s mit 5 cem einer 1proz. Lösung von CO-Hb.-Blut. Die Mischung zeigte ein Mischspektrum des neutralen Met-Hb. (Streifen bei C) und des CO-Hb. (2 Streifen bei D und E). Nach Zusatz von einigen Tropfen frischen Schwefelammoniums verschwand sogleich der Met-Hb.-Streifen bei C wegen erfolgter Reduktion des Met-Hb. zu Hb., während die 2 Streifen des CO-Hb. im Grün unverändert blieben als Beweis, daß die Lösung CO-Hb. enthielt, dessen Spektrum durch Reduktion nicht verändert wird.

Der seit lange schon festgestellte Umstand der Persistenz des CO in Blutlösung, somit auch im CO-Blut fauler Leichen, läßt sich, wie dies *Szigei*¹⁴ hervorhob, auch damit erklären, daß das durch Fäulnis in

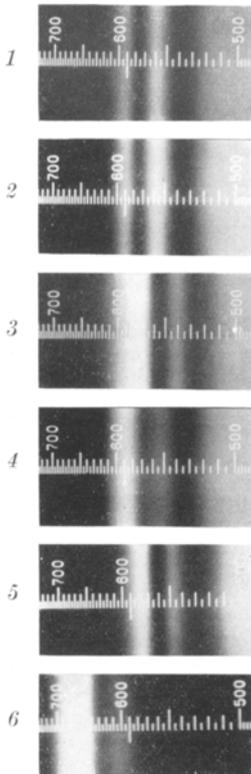


Abb. 1. 1 = Spektrum des O-Hb.; 2 = Spektrum des CO-Hb.; 3 = Spektrum des Hämochromogens; 4 = Spektrum des CO-Hämochromogens; 5 = Spektrum des Cy-Hämochromogens; 6 = Spektrum des neutralen Met-hämoglobins.

fürte Hb. sich mit CO zu dem schon von *Hoppe-Seyler*¹⁵ erwähnten CO-Hämochromogen verbindet. Diese Verbindung ist lange haltbar und zeichnet sich durch ihr zweistreifiges Spektrum aus, welches dem des CO-Hb. gleicht (1. Streifen: $\lambda = 580 - 558$; 2. Streifen: $\lambda = 545 - 520$) und sich von letzterem dadurch unterscheidet, daß es in leicht aufgekochter und nachher abgekühlter Lösung (die alkalisch reagieren muß) in das Spektrum des gewöhnlichen Hämochromogens (1. Streifen: $\lambda = 565 - 545$; 2. Streifen: $\lambda = 537 - 515$) umschlägt.

Die je nach der Konzentration braune bis gelbe Lösung des neutralen Met-Hb. verändert ihre Färbung und ihr Spektrum auch unter der Einwirkung anderer Reagenzien. So nimmt sie nach Zusatz von stark verdünnten Lösungen von Alkalien, wie Ammoniak oder von alkalischen Erden, z. B. Calcium- oder Bariumhydroxyd, sogleich eine mehr carminrote Färbung an und liefert das Spektrum des alkalischen Met-Hb. Dieses Spektrum besteht, wie bekannt, aus 2 Streifen im Gelb-Grün, die sehr unscharf begrenzt sind, besonders der erste, der von der Rotseite einen Vorschlagschatten besitzt. Dieses Spektrum könnte als zweistreifiges mit dem Spektrum des O-Hb. oder CO-Hb., jedoch nur bei flüchtiger Untersuchung, verwechselt werden. Es ist auch wenig beständig, so daß es besonders wegen leichter Zersetzlichkeit, zumal bei Wärme, und wegen unscharfer Konturen seiner Absorptionsstreifen, schwer zu photographieren* ist.

Die Lösungen des neutralen Met-Hb. röten sich weiter nach Zusatz von Cyanverbindungen, wobei sie je nach Menge bzw. Konzentration

* Die hier beigefügten Spekturbilder sind mittels *Lumière's* Lumichrome ultrarapid orthochrom.-Platten erzeugt worden mit Ausnahme des Spektumbildes des neutr. Met-Hb., welches auf Iifords Panchromatic Platte am besten gelang. Das Spektrum des alk. Met-Hb. konnte auf obigen Platten nicht zufriedenstellend aufgenommen werden. Deutsche panchromatische Platten standen uns leider nicht zur Verfügung.

der zugesetzten Cyanverbindungen entweder das Kobertsche Cy-Met-Hb., welches von *v. Zeynek*¹⁶ als Cy-Hb. chemisch richtig erkannt wurde, oder das Szigetische Cy-Hämatin¹⁷ enthalten. Eine Lösung des Cy-Hämatis ergibt nach Reduktion das 2streifige Spektrum des Cy-Hämochromogens, welches zuerst von einem von uns (*Wachholz* mit *Sieradzki*¹⁸) beschrieben wurde. Das Spektrum des Cy-Hämochromogens (1. Streifen: $\lambda = 570 - 552$; 2. Streifen: $\lambda = 542 - 513$) steht, was die Lage seiner Absorptionsstreifen anbelangt, in der Mitte zwischen dem Spektrum des CO-Hb. bzw. des CO-Hämochromogens und des reinen Hämochromogens.

Endlich rötet sich die braune bis gelbe Lösung des neutralen Met-Hb. nach Zusatz von salpetersaurem Kalium oder Natrium, jedoch ohne ihr Spektrum zu verändern.

Auf Grund obiger Untersuchungen gelangen wir nun zu nachstehenden Schlüssen:

1. Das Spektrum einer Lösung, die nur aus neutralem Met-Hb. besteht, zeigt einen Absorptionsstreifen ($\lambda = 642 - 615$) im Rot nah an der Fraunhoferschen Linie C und nicht bei der Linie D, deren Lage im Grün ist.

2. Ein mehrstreifiges Spektrum einer Blutfarbstofflösung, welches außer dem für das neutrale Met-Hb. charakteristischen Streifen bei C noch 2 Streifen im Grün zwischen D und E enthält, ist ein Mischspektrum von neutralem Met-Hb. und von O-Hb. bzw. CO-Hb. Wenn nach Zusatz von frischem Schwefelammon nicht nur der Streifen bei C verschwindet, sondern auch die beiden zwischen D und E, an deren Stelle der unscharf begrenzte, breite Hb.-Streifen auftritt, so enthielt die untersuchte Lösung neben neutralem Met-Hb. noch O-Hb. Bleiben aber nach Zusatz von Schwefelammon beide Streifen zwischen D und E erhalten, während der Streifen bei C verschwindet, so enthielt die untersuchte Lösung außer neutralem Met-Hb. noch CO-Hb., welches durch Schwefelammonium spektroskopisch unverändert bleibt.

3. Neutrales Met-Hb. in Lösung wird durch reduzierende Reagenzien prompt zu sauerstofffreiem Hb. reduziert unter gleichzeitiger Änderung seiner braunen bis gelben in eine rote Farbe.

4. Die Rötung der braunen bis gelben Lösung des neutralen Met-Hb. erfolgt außerdem nach Zusatz von stark verdünnten Alkalien und alkalischen Erden, von CyH-Lösungen, endlich von salpetersaurem Kalium oder Natrium. Im ersten Falle entsteht alkalisches Met-Hb., im zweiten Cy-Hb. oder Cy-Hämatin, welches letzteres durch Reduktion in Cy-Hämochromogen umschlägt. Alle diese Derivate zeichnen sich so gleich durch ihre charakteristischen Spektren aus. Die durch Kalium oder Natriumsalpeter geröteten Lösungen des neutralen Met-Hb. behalten ihr unverändertes Spektrum.

5. Neutrales Met-Hb., welches sich teilweise, z. B. durch Fäulnis, im CO-Blute gebildet hat, ist nicht imstande den CO-Nachweis in diesem Blute zu erschweren, solange nur dies Blut CO-Hb. oder CO-Hämochromogen enthält, welche durch Reduktion ihre 2streifigen Spektra nicht einbüßen, trotzdem dabei der Met-Hb.-Streifen bei C verschwindet.

Literaturverzeichnis.

¹ Dtsch. Z. gerichtl. Med. **21**, H. 6. — ² Lehrbuch der Toxikologie. Berlin **1928**, 85. — ³ Ebenda S. 232. — ⁴ Ebenda S. 235. — ⁵ Handbuch der physiologisch-pathologisch-chemischen Analyse. Berlin **1883**, 297. — ⁶ Lehrbuch der physiologischen Chemie. Wiesbaden **1899**, 145. — ⁷ Arch. f. exper. Path. **1892**. — ⁸ Handbuch der physiologisch-pathologisch-chemischen Analyse. Berlin **1883**, 297. — ⁹ Über Cyanmethämoglobin. Stuttgart **1891**, 20—23. — ¹⁰ Lehrbuch der physiologischen Chemie. Wiesbaden **1899**, 145. — ¹¹ Z. Med.beamte **1896**, H. 14. — ¹² Ärztl. Sachverst.ztg **1907**. — ¹³ Lehrbuch der gerichtl. Medizin **1933**, 568. — ¹⁴ Wien. klin. Wschr. **1893**, Nr 17. — ¹⁵ Handbuch der physiologisch-pathologisch-chemischen Analyse. Berlin **1883**, 215. — ¹⁶ Hoppe-Seylers Z. **33** (1901). — ¹⁷ Vjschr. gerichtl. Med. **6** (1893). — ¹⁸ Ärztl. Sachverst.ztg **1907**; vgl. auch *Ziemke* u. *F. Müller*, Arch. f. Anat. **1901** u. Festchr. f. Professor Wachholz, Now. lek. **1926**.
