

Die Dissoziationskonstanten von Hämoglobin und Hämatin und die Pufferkapazität des Blutes

S. KILPI

Chemisches Institut der Universität Helsinki, Finland

Die Säure-Basen-Titrationskurve von Hämoglobin hat zwei deutliche Inflexionspunkte mit Pufferkapazitätsminima¹, nämlich bei $p(aH) = 5,8$ und bei $p(aH) = 8,7$. Die zwischen diesen Inflexionspunkten wirkenden Dissoziationskonstanten sind leichter bestimmbar als die übrigen, weil die betreffenden Äquivalentpunkte durch die Inflexionspunkte gegeben sind. Diese Konstanten sind auch die in physiologischer Hinsicht wichtigsten, weil beim $p(aH)$ des Blutes (7,3) die Pufferwirkung hauptsächlich von ihnen abhängt. Die Bestimmung der anderen Dissoziationskonstanten ist unsicherer, da nicht nur die betreffenden Inflexionspunkte fehlen, sondern auch in sauren bzw. alkalischen Lösungen Hydrolyse stattfindet, und weil sich in den ersteren bisweilen die Messungen erschwerende Fällungen bilden. Dies war der Fall insbesondere beim Untersuchen von gefällttem, fabrikmässig hergestelltem Hämoglobin². Die nachstehend mitgeteilten Messungsergebnisse sind mit nativem Hämoglobin erhalten worden. Ausserdem wurden die Säure-Basen-Dissoziationskonstanten von Hämin gemessen, weil es von Interesse war, diese Konstanten mit denen des Hämoglobins zu vergleichen.

DIE BEREITUNG DER HÄMOGLOBINLÖSUNG

Die Hämoglobinlösungen wurden aus Menschen-, Pferde- und Rinderblut bereitet. Das frische Blut wurde unmittelbar durch kräftiges Schütteln defibriert. Darauf wurde das Hämoglobin durch Einleiten von CO in das eiskühle Blut in CO-Hämoglobin übergeführt, die Serumlösung nach Zentrifugieren von den roten Blutkörperchen abgesaugt und das Sediment mit 0,1 N Natriumchloridlösung dreimal durch Zentrifugieren gewaschen. Das Sediment wurde dann in destilliertes Wasser gebracht, um die Zellwände

zu zerstören. Nach Zentrifugieren erhielt man so eine weinrote, klare Hämoglobinlösung. Die in bezug auf NaCl etwa 0,1 normal gemachten Hämoglobinlösungen wurden bei 0—5° C aufbewahrt.

Zur Bestimmung der NaCl-Konzentration wurde aus 50 ml Lösung das Hämoglobin durch Koagulieren ausgefällt. Nach Verdünnen des Filtrats auf 200 cm³ wurde in 50 ml das Chlor gravimetrisch bestimmt.

Zur Bestimmung der Konzentration des Hämoglobins in den in obiger Weise bereiteten Hämoglobinlösungen wurden 50 ml der Lösung auf dem Wasserbad eingedampft, bis das Hämoglobin vollständig koaguliert war. Die Lösung wurde von dem ausgefallenen Hämoglobin durch einen Filtertiegel abfiltriert und die Fällung mit warmem Wasser gewaschen. Sie wurde bei 100—102° C bzw. im Vakuumexsikkator getrocknet und gewogen. Vergleichsweise wurden 50 ml der Hämoglobinlösung auf dem Wasserbad bis zur Trockne eingedampft und bei 100—102° C getrocknet. Von der gewogenen Menge wurde dabei die bekannte NaCl-Menge abgezogen. Die verschiedenen Bestimmungen gaben miteinander übereinstimmende Werte für den Hämoglobin-gehalt.

Der Stickstoffgehalt des getrockneten Hämoglobins wurde durch Verbrennungsanalyse ermittelt.

Die Analysenresultate sind in Tabelle 1 wiedergegeben.

Tabelle 1.

Ursprung des Hämoglobins	Hämogl.-% der Lösung	% N im Hämoglobin	NaCl-Konz. Mol/l.
Menschenblut	1,176	16,20	0,1016
Pferdeblut	0,828	16,28	0,1019
Rinderblut	0,520	16,16	0,1006
»	0,861	15,70	0,1011

DIE BERECHNUNG DER DISSOZIATIONSKONSTANTEN

Die Dissoziationskonstanten wurden aus den potentiometrisch gemessenen $p(aH)$ -Werten der Säure-Basen-Titration berechnet. In den folgenden Gleichungen, die für Konzentrationswerte abgeleitet worden sind, wird statt $[aH^+]$ die H^+ -Ionenkonzentration verwendet werden. Der zu deren Berechnung erforderliche Aktivitätskoeffizient wurde nach der Debye-Hückelschen Theorie berechnet (S. 381).

Der Übersichtlichkeit halber wurde bei den Berechnungen als Anfangspunkt der Titration der kleinste $p(aH)$ -Wert der Titrationskurve verwendet, der zugleich der Endpunkt beim Titrieren von Hämoglobin mit einer starken Säure ist. [B] bezeichnet im folgenden die Konzentration der zuzufügenden Menge einer starken Base, berechnet von diesem Punkt aus. Dieser Anfangspunkt wurde so gewählt, dass der gemessene $p(aH)$ -Wert an demselben mit dem mit Hilfe der erhaltenen Konstanten für diesen Punkt berechneten $p(aH)$ -Wert übereinstimmt (S. 380).

Die Säure-Basen-Dissoziationskonstanten bzw. die Hydrolysekonstanten der Basen-Kationen ³ sowie deren Konzentrationen seien bezeichnet:

$$\begin{aligned}
 K_1 &> K_2 > K_3 \dots\dots\dots \\
 C_1 &= [HA_1] + [A_1^-] \\
 C_2 &= [HA_2] + [A_2^-] \\
 C_3 &= [HA_3] + [A_3^-] \\
 - &- &- &- &- &- \\
 - &- &- &- &- &-
 \end{aligned}$$

Aus den Gleichgewichtsgleichungen:

$$\begin{aligned}
 \frac{[H^+][A_1^-]}{[HA_1]} &= K_1 \\
 \frac{[H^+][A_2^-]}{[HA_2]} &= K_2 \\
 - &- &- &- &- &- \\
 - &- &- &- &- &-
 \end{aligned}$$

und aus der nach dem Neutralisationsprinzip sich ergebenden Gleichung:

$$[B] + [H^+] = [A_1^-] + [A_2^-] + \dots\dots + [OH^-]$$

erhält man für die Berechnung von K die Gleichungen:

$$\left. \begin{aligned}
 K_p = [H^+] \frac{[B] - \sum_{i=1}^{p-1} [A_i^-] - \sum_{i=p+1}^n [A_i^-] + [H^+] - [OH^-]}{C - \left\{ [B] - \sum_{i=1}^{p-1} [A_i^-] - \sum_{i=p+1}^n [A_i^-] + [H^+] - [OH^-] \right\}} \\
 [A_i^-] = \frac{K_i C_i}{K_i + [H^+]}
 \end{aligned} \right\} \quad (1)$$

die sich zur Berechnung der Dissoziationskonstanten durch Annäherungsrechnung eignen. Bei der Berechnung von K_ν mit Hilfe der $p(aH)$ -Werte zwischen den Äquivalentpunkten $\nu-1$ und ν ist:

$$\begin{aligned} [H^+] &\ll K_{\nu-1} < K_{\nu-2} \dots\dots \\ [H^+] &\gg K_{\nu+1} > K_{\nu+2} \dots\dots \end{aligned} \quad (2)$$

weshalb, wenn $K_1 \dots K_{\nu-1}, K_{\nu+1}, K_{\nu+2} \dots\dots$ unbekannt sind, zur Berechnung des ersten Näherungswertes von K_ν gesetzt werden darf:

$$\begin{array}{c} [A_{\nu-1}^-] \sim C_{\nu-1} \\ [A_{\nu-2}^-] \sim C_{\nu-2} \\ \text{---} \text{---} \text{---} \text{---} \\ [A_{\nu+1}^-] \sim 0 \\ [A_{\nu+2}^-] \sim 0 \\ \text{---} \text{---} \text{---} \text{---} \\ \text{---} \text{---} \text{---} \text{---} \end{array}$$

Die obigen Gleichungen sind für ein Säure- bzw. Basen-Gemisch abgeleitet worden. Sie gelten deshalb nicht exakt für mehrbasische Säuren bzw. mehrsaurige Basen, die in einem Molekül mehrere Säure- bzw. Basenfunktionen haben, wie dies betreffs des unhydrolysierten Hämoglobins der Fall ist. Die Gleichungen (1) liefern indessen praktisch genaue Werte in dem Fall, dass $K_\nu/K_{\nu+1} \geq 10^2$. Beim Hämoglobin liegen die Konstanten näher einander. Aber die Messungsfehler sind in diesem Fall so gross, dass die Gleichungen (1) trotzdem verwendbar sind. Um auf jedem Fall die Grösse des möglichen Fehlers zu prüfen, wurden K_1, K_2, K_3' und K_3'' des menschlichen Hämoglobins ausser mit Hilfe der Gleichungen (1) auch mit Hilfe der für mehrbasische Säuren geltenden weniger übersichtlichen Gleichungen:

$$\left. \begin{aligned} K_\nu &= [H^+] \frac{([B] + [H^+] - [OH^-]) M - N}{[O - ([B] + [H^+] - [OH^-]) R]} \\ M &= 1 + \frac{[H^+]}{K_{\nu-1}} + \frac{[H^+]^2}{K_{\nu-1} \cdot K_{\nu-2}} + \dots\dots + \frac{[H^+]^{\nu-1}}{K_{\nu-1} \cdot K_{\nu-2} \dots K_1} \\ N &= \sum_{i=1}^{\nu-1} C_i + \frac{[H^+]}{K_{\nu-1}} \sum_{i=1}^{\nu-2} C_i + \frac{[H^+]^2}{K_{\nu-1} \cdot K_{\nu-2}} \sum_{i=1}^{\nu-3} C_i + \dots + \frac{[H^+]^{\nu-2}}{K_{\nu-1} \dots K_2} C_1 \\ O &= \sum_{i=1}^{\nu} C_i + \frac{K_{\nu+1}}{[H^+]} \sum_{i=1}^{\nu+1} C_i + \frac{K_{\nu+1} \cdot K_{\nu+2}}{[H^+]^2} \sum_{i=1}^{\nu+2} C_i + \dots + \frac{K_{\nu+1} \cdot K_{\nu+2} \dots K_n}{[H^+]^{n-\nu}} \sum_{i=1}^n C_i \\ R &= 1 + \frac{K_{\nu+1}}{[H^+]} + \frac{K_{\nu+1} \cdot K_{\nu+2}}{[H^+]^2} + \dots + \frac{K_{\nu+1} \cdot K_{\nu+2} \dots K_n}{[H^+]^{n-\nu}} \end{aligned} \right\} (3)$$

berechnet (vgl. Tabelle 6a). Die Übereinstimmung ist für den vorliegenden Zweck genügend, denn der Unterschied steigt nicht über die Versuchsfehler und hat keinen prinzipiellen Einfluss auf die Resultate. Der verhältnismässig grössere Unterschied bei K_4 , K_5 und K_6 wird verursacht durch die Vergrösserung der Faktoren $\sum_{i=1}^{v-1} C_i$ und $\sum_{i=1}^{v+1} C_i$; denn die nach (3) zu berechnenden Werte von K werden dadurch stärker von den möglichen Fehlern in C_i und von den Fehlern in den naheliegenden Werten von K beeinflusst.

Die Gleichungen (3) wurden durch Verallgemeinerung der für eine vierbasische Säure geltenden Gleichung abgeleitet. Es sei hier die Ableitung der betreffenden Gleichungen für eine zweibasische Säure dargestellt*), weil dieselben zur Berechnung der Dissoziationskonstanten von Hämin verwendet wurden.

Aus den Gleichungen:

$$\frac{[\text{H}^+][\text{HA}^-]}{[\text{H}_2\text{A}]} = K_1; \quad \frac{[\text{H}^+][\text{A}^{2-}]}{[\text{HA}^-]} = K_2$$

$$[\text{H}_2\text{A}] + [\text{HA}^-] + [\text{A}^{2-}] = C; \quad [\text{B}] + [\text{H}^+] = [\text{HA}^-] + 2[\text{A}^{2-}] + [\text{OH}^-]$$

ergeben sich für eine zweibasische Säure die Gleichungen:

$$\left. \begin{aligned} K_1 &= [\text{H}^+] \frac{([\text{B}] + [\text{H}^+] - [\text{OH}^-])}{C \left(1 + \frac{2K_2}{[\text{H}^+}\right) - ([\text{B}] + [\text{H}^+] - [\text{OH}^-]) \left(1 + \frac{K_2}{[\text{H}^+}\right)} \\ K_2 &= [\text{H}^+] \frac{([\text{B}] + [\text{H}^+] - [\text{OH}^-]) \left(1 + \frac{[\text{H}^+]}{K_1}\right) - C}{2C - ([\text{B}] + [\text{H}^+] - [\text{OH}^-])} \end{aligned} \right\} \quad (4)$$

die sich zur Berechnung von K_1 und K_2 durch Annäherungsrechnung eignen. Im vorliegenden Fall sind $[\text{H}^+]$ und $[\text{OH}^-]$ im Vergleich zu $[\text{B}]$ so klein, dass sie neben $[\text{B}]$ unberücksichtigt bleiben können. Sie sind jedoch der Vollständigkeit halber in die Gleichungen mitgenommen worden, weil sie bei sehr starken bzw. sehr schwachen Säuren zu berücksichtigen sind. Bei der Berechnung des ersten Näherungswertes von K_1 darf $2K_2/[\text{H}^+]$ neben 1 vernachlässigt werden und ebenso $[\text{H}^+]/K_1$ neben 1 bei der Berechnung des ersten Näherungswertes von K_2 .

* Die früher in anderem Zusammenhang für zweibasische Säuren mitgeteilte Gleichung (Kilpi, S., und Harjanne, P. *Suomen Kemistilehti* B, 21, 1948, 14–18) ist fehlerhaft; doch wirkt der betreffende Fehler auf das Berechnungsergebnis nur ein, wenn K_1 und K_2 nahe einander liegen. In dem zitierten Fall ist der Einfluss des fehlerhaften Ausdrucks auf das Berechnungsergebnis von untergeordneter Bedeutung.

DIE DISSOZIATIONSKONSTANTEN VON HÄMOGLOBIN

Von den Dissoziationskonstanten des Hämoglobins wurden die zwischen den Inflexionspunkten wirkenden zuerst berechnet, weil deren Berechnung verhältnismässig wenig von den übrigen Dissoziationskonstanten abhängig ist. Beim Untersuchen von fabrikmässig hergestelltem Hämoglobin wurde für dieses Intervall nur eine einzige Dissoziationskonstante ermittelt, deren Grösse etwa 10^{-7} betrug². Von derselben Grössenordnung ist der sich nach den nachstehend dargestellten Messungen ergebende Mittelwert der im Zwischengebiet der Inflexionspunkte gefundenen Werte der Dissoziationskonstante beim nativen Hämoglobin, wenn vorausgesetzt wird, dass in diesem Bereich nur eine Dissoziationskonstante vorkommt. Die ermittelten Werte der Dissoziationskonstante zeigten jedoch die Neigung, bei zunehmender Wasserstoffionenkonzentration zu wachsen. Beim fabrikmässig hergestellten Hämoglobin konnte dies nicht beobachtet werden wegen der Koagulation des Hämoglobins bei $p(\alpha H) = 7,2$, wobei die Fällung beim Wachsen der Wasserstoffionenkonzentration fortwährend zunahm. Beim nativen Hämoglobin ergab sich die beste Konstanz der Dissoziationskonstante bei Annahme von zwei Dissoziationskonstanten zwischen den Inflexionspunkten und mit der Annahme, dass der Äquivalentpunkt beim »Neutralpunkt« ($p\alpha H = 7,5$) liegt, d.h. in der ursprünglichen Lösung, die weder mit Säure noch mit Base versetzt worden war.

Die Werte aller übrigen Dissoziationskonstanten wurden mit Hilfe der Gleichungen (1) durch Annäherungsrechnung ermittelt. Der Endpunkt der Titration auf der sauren Seite, der als »Anfangspunkt« in den Berechnungen verwendet wurde, wurde ermittelt durch Ausprobieren mit Hilfe der Gleichung³:

$$[H^+] = \sqrt{\sum_{i=1}^n K_i C_i / (1 + \frac{K_i}{[H^+]})} \quad (5)$$

wobei die gemessene H^+ -Konzentration mit der nach dieser Gleichung berechneten übereinstimmen soll. Die Bestimmung des Endpunktes der Titration auf der alkalischen Seite beim Titrieren mit einer Base geschah in entsprechender Weise mit Hilfe der Gleichung³:

$$[OH^-] = \sqrt{\sum_{i=n}^1 \frac{K_w}{K_i} C_i / (1 + \frac{[H^+]}{K_i})} \quad (6)$$

Die Äquivalentpunkte wurden durch Ausprobieren so gewählt, dass der Gang der Dissoziationskonstanten zwischen ihnen, welcher bei unrichtig gewählten Äquivalentpunkten vorkommt, möglichst ausblieb (vgl. Tab. 6).

In den Berechnungen wurden folgende für 0,1 N NaCl-Lösungen früher ermittelte Beziehungen verwendet:

$$\begin{aligned} p(aH) &= p(cH) + 0,085^4 \\ [H^+][OH^-] &= 1,65 \cdot 10^{-14}^5 \end{aligned} \quad (7)$$

Die für Menschen-, Pferde- und Rinderhämoglobin bei 25° C in 0,1 N NaCl-Lösung erhaltenen Werte der Dissoziationskonstanten, die Konzentrationen C der verschiedenen Säure- bzw. Basenfunktionen und deren Äquivalentgewichte \bar{A} ($= \frac{g\text{-Hämogl.}/1}{C}$) sowie die Zahl n der verschiedenen Säure- bzw. Basenfunktionen im Hämoglobinmolekül ($n = \frac{67000}{\bar{A}}$) befinden sich in den Tabellen 2—4. In diesen sind weiter die Konzentration des Hämoglobins in der Lösung und die $p(aH)$ -Werte der obengenannten Inflexionspunkte angegeben. Die Werte der Inflexionspunkte wurden in dieser Arbeit mit Hilfe der von Meretoja hergeleiteten Gleichung¹³ berechnet.

Tabelle 2. Menschliches Hämoglobin, 5,88 g/l. Die Inflexionspunkte bei $p(aH) = 5,76$ und $8,70$.

	HA ₁	HA ₂	HA ₃ '	HA ₃ ''	HA ₄	HA ₅	HA ₆
C · 10 ³	2,95	3,81	1,676	0,884	1,1	2,743	4,86
pK (Gl. 1)	3,15	4,35	6,69	7,63	9,82	10,73	11,37
pK (Gl. 3)	3,09	4,32	6,65	7,61	9,63	10,56	11,45
\bar{A}	2000	1550	3500	6650	5350	2150	1210
n	33	43	19	10	13	31	55

Tabelle 3. Pferdehämoglobin, 8,28 g/l. Die Inflexionspunkte bei $p(aH) = 5,77$ und $8,79$.

	HA ₁	HA ₂	HA ₃ '	HA ₃ ''	HA ₄	HA ₅	HA ₆
C · 10 ³	4,23	3,5	2,1	1,4	1,5	3,75	4
pK	3,21	4,28	6,70	7,66	9,87	10,73	11,38
\bar{A}	1960	2370	3940	5,900	5500	2210	2070
n	34	28	17	11	12	30	32

Tabelle 4. Rinderhämoglobin, 8,61 g/l. Die Inflexionspunkte bei $p(aH) = 5,77$ und $8,72$.

	HA ₁	HA ₂	HA ₃ '	HA ₃ ''	HA ₄	HA ₅	HA ₆
C · 10 ³	7,95	3,715	2,0	1,0	1,6	4,15	4,25
pK	3,46	4,23	6,71	7,71	10,04	10,66	11,45
\bar{A}	1080	23,20	4280	8450	5380	2075	2025
n	62	29	16	8	12,5	32	33

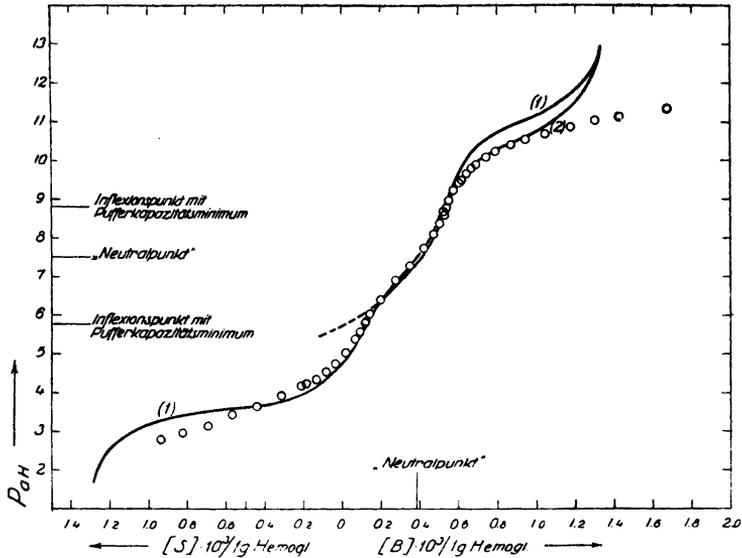


Abbildung 1. Titrierkurven von Pferdehäemoglobin.

Kurve (1) nach Cohn und Mitarb. ohne NaCl-Zusatz.

» (2) » » » » in $\frac{1}{1} N$ NaCl.

○ Titrierungswerte von Kilpi in 0,1 N NaCl; bei diesen ist $[OH^-]$ bzw. $[H^+]$ nicht von dem bezüglichen Basen- bzw. Säureverbrauch abgezogen.

Den Tabellen gemäss sind die für Menschen-, Pferde- und Rinderhäemoglobin erhaltenen, einander entsprechenden Dissoziationskonstanten von der gleichen Grössenordnug. Zwischen den Inflexionspunkten ist nach den Tabellen die Zahl der Säure-Basen-Funktionen in einem Häemoglobinmolekül am kleinsten beim Rinderhäemoglobin. Damit hängt zusammen der aus Abb. 2 ersichtliche, im Vergleich zu den anderen Titrationskurven grössere Anstieg der Titrationskurve des Rinderhäemoglobins zwischen den Inflexionspunkten, wonach die Pufferkapazität des Rinderhäemoglobins zwischen den Inflexionspunkten etwas kleiner ist als die Pufferkapazität des Menschen- und Pferdehäemoglobins.

Abb. 1 zeigt, wie sich die gemessenen $p(aH)$ -Werte beim Titrieren von Pferdehäemoglobin der von Cohn, Green und Blanchard gegebenen Titrationskurve von Pferdehäemoglobin (CO-Häemoglobin)⁶ anpassen. Als 0-Punkt der Titration ist in der Abbildung der von Cohn und Mitarb. verwendete angenommen. Obgleich die Häemoglobinlösungen in ganz verschiedener Weise bereitet worden sind, ist die Übereinstimmung innerhalb des $p(aH)$ -Bereichs

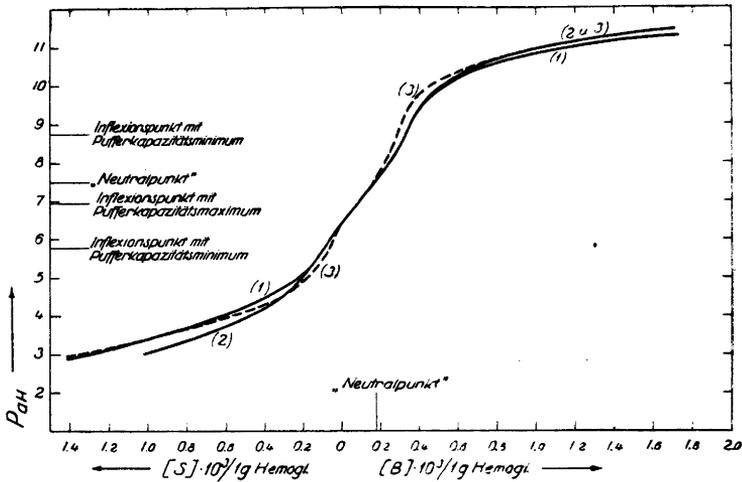


Abbildung 2. Titrationskurven von Menschen (1)-, Pferde (2)- und Rinderhämoglobin (3) in 0,1 N NaCl.

4—9,5 gut, am besten in dem physiologisch wichtigsten Bereich zwischen den Inflexionspunkten. Die in den stärker sauren bzw. stärker basischen Lösungen eintretende Abweichung unserer Werte von der Cohn'schen Titrationskurve dürfte wenigstens zum Teil durch die ungleiche Hydrolyse des Hämoglobins verursacht sein.

Während unsere Titrationskurve in ihrem wichtigsten Teil mit der von Cohn und Mitarb. übereinstimmt, weichen die erhaltenen Konstanten mehr voneinander ab. Cohn und Mitarb. teilen folgende Werte für die Säure-Dissoziationskonstanten des Hämoglobins mit:

$$\begin{array}{cccccccc}
 pK_1, & pK_2, & pK_3, & pK_4, & pK_5, & pK_6, & pK_7 \\
 3,7 & 4,0 & 4,8 & 5,7 & 7,5 & 10,8 & 11,6
 \end{array}$$

Es möge bemerkt werden, dass beim Berechnen von $p(aH)$ mit Hilfe der Gleichungen (1) und (7) sich Werte ergeben, die sich mit den Titrationskurven in Abb. 2 decken, sofern man sich bei den Berechnungen der in den Tabellen 2—4 angegebenen Dissoziationskonstanten und Konzentrationen bedient.

DIE PUFFERWIRKUNG DES BLUTES

Sind die Konzentrationen und die Dissoziationskonstanten der in der Lösung befindlichen Säuren bzw. Basen bekannt, kann die Pufferkapazität

bei verschiedenen H^+ -Konzentrationen mit Hilfe der van Slyke'schen ⁷ Gleichung:

$$\frac{d[B]}{d\text{pH}} = P = 2,303 \left\{ \sum_i \frac{K_i C_i [H^+]}{(K_i + [H^+])^2} + [H^+] + [OH^-] \right\}$$

berechnet werden, wo K_i die Konzentrationsdissoziationskonstanten der Säuren bzw. die Hydrolysekonstanten ³ der Basen-Kationen sind.

Mit Hilfe dieser Gleichung wurde die Pufferkapazität des Blutes bei $p(aH) = 7,3$ und $6,5$ berechnet, unter der Annahme, dass die Pufferkapazität vom Hämoglobin sowie von Kohlensäure und Phosphorsäure des Blutes herrührt. Die Pufferwirkung des Hämoglobins bei $p(aH) = 7,3$ and $6,5$ ist hauptsächlich von den zwischen den Inflexionspunkten wirkenden Dissoziationskonstanten K_3' und K_3'' abhängig, während die Pufferwirkung der Kohlensäure bei diesen $p(aH)$ -Werten hauptsächlich von der ersten Dissoziationskonstante und die der Phosphorsäure hauptsächlich von der zweiten abhängig ist. Betreffs der Kohlensäure wurde die zweite Dissoziation gleichfalls berücksichtigt, obgleich deren Wirkung von untergeordneter Bedeutung ist, weshalb zur Berechnung der betreffenden Pufferwirkung ein angenäherter Wert dieser Dissoziationskonstante genügt.

Die betreffenden Konzentrationsdissoziationskonstanten wurden berechnet für die Ionenstärke $I = 0,1$ mit NaCl als hauptsächlichlicher Elektrolyt, weil die Ionenstärke des Blutes annähernd von dieser Grösse ist. Die nach der Debye-Hückelschen Theorie berechneten Konzentrationsdissoziationskonstanten der Kohlensäure ⁸ und der Phosphorsäure ⁹ und die stöchiometrischen molaren Konzentrationen C derselben im Blut sind:

	K_1	K_2	C
Kohlensäure	$7,76 \cdot 10^{-7}$	10^{-10}	0,0245
Phosphorsäure		$1,8 \cdot 10^{-7}$	0,0013

Bei der Berechnung der Pufferkapazität des Hämoglobins wurde das Blut als 16 %ig in bezug auf das Hämoglobin angenommen. Man erhält dann die Konzentrationen der verschiedenen Säurefunktionen des Hämoglobins im Blut durch Multiplizieren der in den Tabellen 2—4 angegebenen Konzentrationen C beim menschlichen Hämoglobin mit 16/0,584, beim Pferdehämoglobin mit 16/0,828 und beim Rinderhämoglobin mit 16/0,861. Die Rechnung ergab für die Pufferkapazität bei $p(aH) = 7,3$ und $6,5$ die Werte der Tabelle 5.

Tabelle 5. Pufferkapazität (P).

	In Menschenblut		In Pferdeblut		In Rinderblut	
	$p_{aH} = 7,3$	$p_{aH} = 6,5$	$p_{aH} = 7,3$	$p_{aH} = 6,5$	$p_{aH} = 7,3$	$p_{aH} = 6,5$
Hämoglobin	$3,04 \cdot 10^{-2}$	$2,85 \cdot 10^{-2}$	$2,90 \cdot 10^{-2}$	$2,60 \cdot 10^{-2}$	$2,37 \cdot 10^{-2}$	$2,22 \cdot 10^{-2}$
Kohlensäure	$0,48 \cdot 10^{-2}$	$1,27 \cdot 10^{-2}$	$0,48 \cdot 10^{-2}$	$1,27 \cdot 10^{-2}$	$0,48 \cdot 10^{-2}$	$1,27 \cdot 10^{-2}$
Phosphorsäure	$0,06 \cdot 10^{-2}$					
P des Blutes:						
berechnet	$3,58 \cdot 10^{-2}$	$4,18 \cdot 10^{-2}$	$3,44 \cdot 10^{-2}$	$3,93 \cdot 10^{-2}$	$2,91 \cdot 10^{-2}$	$3,55 \cdot 10^{-2}$
gemessen	$3,61 \cdot 10^{-2}$	$4,25 \cdot 10^{-2}$	$3,26 \cdot 10^{-2}$	$4,00 \cdot 10^{-2}$	$2,97 \cdot 10^{-2}$	$3,59 \cdot 10^{-2}$

Gemäss der Tabelle 5 wird die Pufferkapazität des Blutes hauptsächlich durch das Hämoglobin verursacht. Der Anteil der Kohlensäure an der Pufferwirkung variiert jedoch stark mit der Veränderung der H^+ -Konzentration der Lösung.

Zum Vergleich mit den mit Hilfe der erhaltenen Dissoziationskonstanten berechneten Werten wurde die Pufferkapazität des Blutes direkt durch Titration gemessen. Dazu wurden im Verhältnis von 1/10 verdünnte und in bezug auf NaCl 0,1-normale Blutlösungen verwendet, nachdem durch Titration gezeigt worden war, dass sich die Pufferkapazität des Blutes innerhalb dieses Intervalls linear mit der Konzentration verändert.

Das $p(aH)$ des »Neutralpunktes« des Blutes, zu dem keine Säure bzw. Base zugesetzt worden war, war $7,5 \pm 0,1$, wie beim »Neutralpunkt« des Hämoglobins (vgl. Abb. 1 und 2). Auch hat die Titrationskurve des Blutes (vgl. Abb. 3 und die Tabellen 8–10) der Titrationskurve des Hämoglobins entsprechend zwei Inflexionspunkte mit Pufferkapazitätsminima, deren $p(aH)$ -Werte annähernd gleich den $p(aH)$ -Werten der Inflexionspunkte des Hämoglobins sind.

In der Tabelle 5 sind die berechneten Pufferkapazitätswerte bei $p(aH) = 7,3$ und bei $p(aH) = 6,5$ den sich nach den Titrationskurven ergebenden Werten nebengestellt. Die berechneten und gemessenen Werte der Pufferkapazität zeigen eine gute Übereinstimmung. Die Titrationskurven des Menschen- und Rinderblutes waren gut reproduzierbar. Beim Pferdeblut war die Reproduzierbarkeit schlechter, wahrscheinlich wegen der Neigung zur Sedimentation. In bezug auf das Rinderblut wurde erwiesen, dass der Gang der Titrationskurve von dem Alter des Tieres unabhängig ist. Die aus der Abb. 3 und nach der Tabelle 5 ersichtliche geringe gegenseitige Abweichung der Pufferkapazitätswerte des Menschen-, Pferde- und Rinderblutes voneinander (Menschenblut > Pferdeblut > Rinderblut) dürfte deshalb durch die Titrationsen mit ziemlich

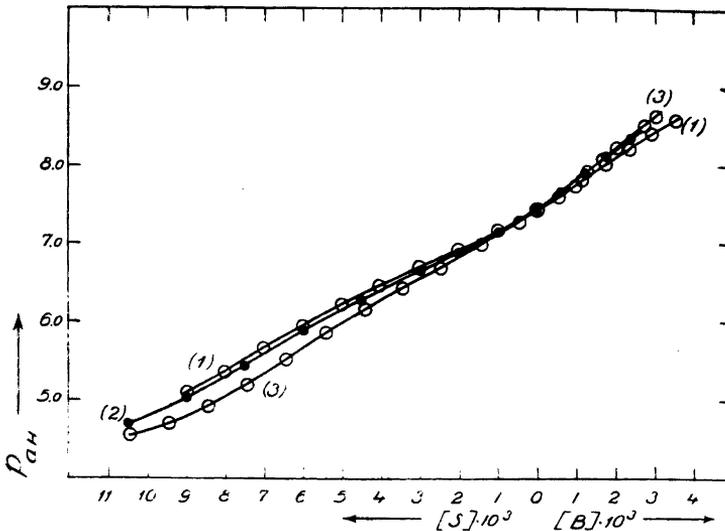


Abbildung 3. Titrationskurven von in Verhältnis von $\frac{1}{10}$ verdünnten Menschen (1)-, Pferde (2)- und Rinderblutlösungen (3) in 0,1 N NaCl.

grosser Sicherheit erwiesen sein. Diese Abweichung würde durch den verschiedenen Gehalt des Hämoglobins an Säure-Basenfunktionen mit den Dissoziationskonstanten K_3' und K_3'' verursacht. Die Grössen dieser Konstanten waren nämlich gemäss den Messungen gleich, unabhängig von der Herkunft des Hämoglobins.

DIE DISSOZIATIONSKONSTANTEN VON HÄMATIN IM VERGLEICH MIT DENEN DES HÄMOGLOBINS

Weil der Hämatingehalt des Hämoglobins ziemlich gross ist (vier Hämatingruppen pro Hämoglobinmolekül¹⁰), war es von Interesse, die Säure-Basen-Dissoziationskonstanten des Hämatins mit denen des Hämoglobins zu vergleichen.

Bei der Bestimmung der Dissoziationskonstanten von Hämatin wurde zuerst ein Hämatin-Präparat von Fraenkel & Landau verwendet². Dieses löste sich doch nur teilweise in Natriumhydroxyd. Die folgenden Messungsergebnisse sind mit in Natriumhydroxyd gelöstem Hämin (krist. reinst, Fraenkel & Landau) erhalten, wobei die Titrationskurve wie bei Anwendung von Hämatin zwei Inflexionspunkte hatte.

Für die Dissoziationskonstanten konnten nur angenäherte Werte erhalten werden. Die Unsicherheit der Messungen beruht hauptsächlich darauf, dass wegen der Schwerlöslichkeit des Hämins nur äusserst verdünnte Lösungen (0,68 g/l) verwendet werden konnten.

Den Hämoglobinlösungen entsprechend hatte die Titrierungskurve des Hämins zwei deutliche Inflexionspunkte, nämlich bei $p(aH) = 5,51$ und $9,13$ bei obiger Konzentration der Lösung. Beim sauren Inflexionspunkt fiel das Hämin aus. Die stöchiometrische Konzentration der Basenmenge, die bei der Titrierung von dem ersten Inflexionspunkt zum anderen zuzusetzen war, betrug $2 \cdot 10^{-3}$. Daraus berechnet sich für das Äquivalentgewicht der Hämins $0,68/2 \cdot 10^{-3} = 340$, welcher Wert innerhalb der Titrationsfehler mit dem halben Molekulgewicht des Hämins $325,8$ übereinstimmt. Dieses ist damit in Übereinstimmung, dass das Hämin zwei Carboxylgruppen enthält. Für die pK_A -Werte der Dissoziationskonstanten wurde $6,63$ bzw. $7,76$ erhalten, welche Werte von derselben Grössenordnung sind wie die erhaltenen pK'_3 und pK''_3 des Hämoglobins.

Unter der Annahme, dass die Konstanten des Hämins gleich denen des Hämatins sind, ist deshalb die Pufferwirkung des Hämoglobins zwischen den Inflexionspunkten von dem Hämingehalt des Blutes abhängig, wie auch auf Grund der Titration von Hämatin zu schliessen war². Weil ein Hämoglobinmolekül vier Hämingruppen enthält¹⁰, ist nach unseren Titrationsresultaten (vgl. Tabellen 2—4) zwischen den Inflexionspunkten der Anteil des Hämatins ca. $4/10$ der gesamten Pufferwirkung des Hämoglobins. Die Pufferwirkung zwischen den Inflexionspunkten dürfte daneben von Histidylhistidin verursacht sein. Denn das Histidylhistidin hat nach Greenstein¹¹ vier Dissoziationskonstanten, von denen zwei mit den pK_A -Werten $6,80$ bzw. $7,80$ von ähnlicher Grössenordnung sind.

DIE MESSUNGEN

50 ml der betreffenden Hämoglobin-, bzw. Häminlösung wurden mit $0,1 N$ NaOH- bzw. $0,1 N$ HCl-Lösung titriert.

Die $p(aH)$ -Werte der Hämoglobin- und Häminlösungen wurden bestimmt durch Messen des Potentials der Kette:



und unter Anwendung von $p(aH) = 2,075$ für die Veibelsche Lösung ($0,09 N$ KCl + $0,01 N$ HCl).

Beim Titrieren von Blut wurden die $p(aH)$ -Werte mit einer Glaselektrode gemessen. Die Kettenanordnung war dieselbe wie in (8), jedoch wurde statt

der Veibelschen Lösung ein Acetat-Puffer mit $p(aH) = 4,65$ als Vergleichslösung¹² verwendet.

(8') Glas- | Acetat- | Gesätt. | 0.1 N KCl | Hg₂Cl₂, Hg | 0.1 N KCl | Gesätt. | Titr.- | Glas-
elektr. | Puffer | KCl-Lös. | | | KCl-Lös. | flüss. | elektr.

Beim Pferdehäemoglobin wurde die Ausführung der Messungen in sauren Lösungen durch die Bildung einer Fällung bei $p(aH) = 4,2$ erschwert. Die

Tabelle 6a. Menschen-Hämoglobin, 5,88 g/l.

(Die Titrationen sind von A. A. O. Kuosmanen ausgeführt.)

E mV	p(aH)	[H ⁺]	[OH ⁻]	[B] · 10 ³	V ml	pK	
						Gl. (1)	Gl. (3)
		(ber.) 1,15 · 10 ⁻³		0	55,40		
57,0	3,040	1,12 · 10 ⁻³					
58,9	3,172	8,23 · 10 ⁻⁴		0,440	54,40	3,30	3,24
68,4	3,232	7,16 · 10 ⁻⁴		0,835	55,80	3,20	3,15
71,0	3,276	6,47 · 10 ⁻⁴		1,277	54,80	3,05	3,00
81,0	3,446	4,38 · 10 ⁻⁴		1,673	56,15	3,17	3,12
84,6	3,507	3,80 · 10 ⁻⁴		2,110	55,15	3,04	2,98
94,6	3,676	2,58 · 10 ⁻⁴		2,507	56,52	3,14	3,06
Äquiv.							
99,1	3,752	2,16 · 10 ⁻⁴		2,949	55,50	3,15	3,09 im Mittel
112,6	3,980	1,28 · 10 ⁻⁴		3,343	56,90	4,35	4,34
115,2	4,024	8,65 · 10 ⁻⁵		3,783	55,92	4,38	4,38
131,5	4,300	6,12 · 10 ⁻⁵		4,180	57,32	4,39	4,39
136,9	4,391	4,97 · 10 ⁻⁵		4,629	56,45	4,30	4,31
151,5	4,640	2,80 · 10 ⁻⁵		5,020	57,78	4,41	4,43
152,7	4,659	2,68 · 10 ⁻⁵		5,466	56,85	4,23	4,26
188,2	5,259	6,73 · 10 ⁻⁶		6,310	57,30	4,39	4,37
197,2	5,412	4,73 · 10 ⁻⁶		6,520	57,40	4,38	4,28
207,5	5,586	3,17 · 10 ⁻⁶		6,720	57,45	4,34	4,10
214,6	5,706	2,33 · 10 ⁻⁶		6,730	54,88	4,35	4,32 im Mittel
Äquiv.	5,762			6,755	54,80		
231,8	5,997	1,19 · 10 ⁻⁶		6,932	54,72	6,69	6,66
247,3	6,259	6,53 · 10 ⁻⁷		7,166	54,68	6,67	6,65
260,8	6,488	3,86 · 10 ⁻⁷		7,378	54,60	6,69	6,66
286,3	6,922	1,42 · 10 ⁻⁷		7,790	54,32	6,77	6,78
312,0	7,354	5,25 · 10 ⁻⁸		8,420	54,00	6,61	6,69
Äquiv.						6,69	6,65 im Mittel
358,5	8,141	8,57 · 10 ⁻⁹	2 · 10 ⁻⁶	9,050	53,72	7,63	7,67
382,5	8,547	3,39 · 10 ⁻⁹	4 · 10 ⁻⁶	9,272	53,70	7,62	7,55
Äquiv.	8,698			9,320		7,63	7,61 im Mittel

Tabelle 6b. Menschen-Hämoglobin 5,88 g/l.

E mV	$p(aH)$	$[H^+]$	$[OH^-]$	$[B] \cdot 10^3$	V ml	pK (Gl. 1)
420,9	9,333	$5,68 \cdot 10^{-10}$	$2,9 \cdot 10^{-5}$	9,656	50,50	9,88
439,3	9,508	$3,80 \cdot 10^{-10}$	$4,3 \cdot 10^{-5}$	9,878	50,60	9,76
449,6	9,682	$2,54 \cdot 10^{-10}$	$6,5 \cdot 10^{-5}$	10,070	50,65	9,79
459,4	9,848	$1,73 \cdot 10^{-10}$	$9,5 \cdot 10^{-5}$	10,205	50,80	9,83
Äquiv.						9,82 im Mittel
466,0	9,960	$1,34 \cdot 10^{-10}$	$1,23 \cdot 10^{-4}$	10,504	50,90	10,75
477,2	10,149	$8,67 \cdot 10^{-11}$	$1,90 \cdot 10^{-4}$	10,911	51,10	10,75
486,6	10,309	$6,00 \cdot 10^{-11}$	$2,75 \cdot 10^{-4}$	11,346	51,26	10,75
493,5	10,425	$4,59 \cdot 10^{-11}$	$3,59 \cdot 10^{-4}$	11,767	51,48	10,71
499,6	10,529	$3,61 \cdot 10^{-11}$	$4,57 \cdot 10^{-4}$	12,188	51,70	10,69
508,3	10,676	$2,58 \cdot 10^{-11}$	$6,41 \cdot 10^{-4}$	12,784	51,95	10,72
Äquiv.						10,73 im Mittel
521,2	10,894	$1,56 \cdot 10^{-11}$	$1,058 \cdot 10^{-3}$	13,841	52,48	11,42
529,3	11,031	$1,14 \cdot 10^{-11}$	$1,450 \cdot 10^{-3}$	14,867	52,92	11,37
536,1	11,146	$8,73 \cdot 10^{-12}$	$1,890 \cdot 10^{-3}$	15,957	53,55	11,32
547,3	11,336	$5,64 \cdot 10^{-12}$	$2,94 \cdot 10^{-3}$	18,023	54,50	11,37 im Mittel
			$3,04 \cdot 10^{-3}$ (ber.)			

Fällung bildete sich an dieser Stelle sowohl beim Titrieren mit Chlorwasserstoffsäure als mit Natriumhydroxyd. Im letzteren Falle war zu der Lösung zuerst Chlorwasserstoffsäure in einem solchen Überschuss zugefügt worden, dass die Fällung ausblieb. Beim Menschen- und Rinderblut verblieb die Lösung während der ganzen Titration klar sowohl in sauren als in alkalischen Lösungen.

In den folgenden Tabellen bezeichnet E das Potential der Kette (8) bzw. (8') und V das Volumen der Lösung in ml. Die in den Tabellen 2—4 angegebenen Konzentrationen $C_1, C_2, C_3', C_3'', C_4, C_5,$ und C_6 sowie die stöchiometrische Konzentration $[B]$ der vom Beginn der Titration an zugesetzten Basenmenge sind auf das ursprüngliche Volumen der Lösung, nämlich 50 ml, bezogen. In den Berechnungen ist die tatsächliche Konzentration während der Titration, $C \frac{50}{V}$, verwendet worden. $[S]$ der Tabellen bezeichnet die Konzentration der

zugesetzten Säure, weshalb $[B] = -[S]$.

Von den ausgeführten Titrationen des Menschen-, Pferde- und Rinderhämoglobins ist hier als Beispiel nur die des menschlichen Hämoglobins vorgelegt worden. Ausserdem sind im folgenden die Titrationen von Hämin sowie die Titrationen des Menschen-, Pferde- und Rinderblutes wiedergegeben.

Alle Titrationen sind bei $25,0^\circ C$ ausgeführt worden. Die Lösungen waren in bezug auf NaCl 0,1-normal.

Tabelle 7. Hämin, 0,680 g/l in 0,1 N NaCl-Lösung.

(Die Titrationsen sind von Elsa Keränen ausgeführt.)

E mV	p(aH)	[H ⁺]	[OH ⁻]	[B] 10 ³	V ml	pK Gl. (1)	pK Gl. (4)
165,6	4,875	1,62 · 10 ⁻⁵			52,80		
Äquiv.	5,51			0	52,66		
252,5	6,347	5,50 · 10 ⁻⁷		0,340	52,50	6,61	6,58
303,5	7,207	7,59 · 10 ⁻⁸		0,934	52,20	6,64	6,61
Äquiv.				1,000		6,63	6,60 im Mittel
328,0	7,625	2,88 · 10 ⁻⁸		1,260	52,22	7,78	7,80
360,9	8,180	8,04 · 10 ⁻⁹	2 · 10 ⁻⁶	1,661	52,02	7,74	7,77
Äquiv.	9,13			2,000	51,85	7,76	7,79 im Mittel
426,5	9,285	6,31 · 10 ⁻¹⁰	2,7 · 10 ⁻⁵		51,82		

Tabelle 8. Menschenblut.

Die Titrationsen von Blut wurden mit Anwendung der Kette (8') ausgeführt. Die Blutlösungen waren im Verhältnis von 1/10 verdünnt und in bezug auf NaCl 0,1-normal.
(Die Titrationsen sind von P. J. Väänänen ausgeführt.)

E	p(aH)	[S] · 10 ³	V (ml)
234,75	8,62	— 3,55	206
223,90	8,44	— 2,96	205
212,50	8,24	— 2,37	204
199,65	8,03	— 1,78	203
187,85	7,83	— 1,18	202
176,35	7,63	— 0,59	201
166,90	7,47	0,00	200
150,10	7,19	1,00	202
135,35	6,94	2,01	204
121,85	6,71	3,01	206
108,50	6,48	4,01	208
94,05	6,24	5,01	210
77,30	5,96	6,01	212
60,45	5,67	7,01	214
43,10	5,38	8,01	216
26,15	5,09	9,01	218

Die Inflexionspunkte bei p(aH) = 5,51 und 8,11.

Tabelle 9. Pferdeblut.

<i>E</i>	p(aH)	[S] · 10 ³	<i>V</i> (ml)
219,10	8,35	— 2,37	204
206,10	8,13	— 1,78	203
192,10	7,90	— 1,18	202
180,00	7,69	— 0,59	201
167,80	7,49	0,00	200
148,45	7,16	1,00	202
132,05	6,88	2,00	204
120,10	6,68	3,01	206
98,35	6,31	4,52	209
75,25	5,92	6,02	212
48,15	5,46	7,52	215
22,70	5,03	9,02	218
3,30	4,71	10,52	221

Die Inflexionspunkte bei p(aH) = 5,78 und 8,06.

Tabelle 10. Rinderblut.

<i>E</i>	p(aH)	[S] · 10 ³	<i>V</i> (ml)
238,10	8,68	— 3,07	204,2
230,90	8,55	— 2,72	203,6
222,30	8,41	— 2,36	203,0
214,70	8,28	— 2,01	202,4
204,55	8,11	— 1,65	201,8
194,55	7,94	— 1,30	201,2
184,75	7,77	— 0,94	200,6
177,55	7,65	— 0,59	200
156,10	7,29	+ 0,41	202
140,35	7,02	+ 1,42	204
120,05	6,68	2,42	206
106,55	6,45	3,42	208
90,80	6,19	4,42	210
72,65	5,88	5,42	212
53,40	5,55	6,43	214
32,45	5,20	7,43	216
16,75	4,93	8,43	218
3,95	4,72	9,43	220
— 6,10	4,55	10,43	222

Die Inflexionspunkte bei p(aH) = 5,48 und 8,11.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurden die Säure-Basen-Dissoziationskonstanten des Hämoglobins von Menschen-, Pferde- und Rinderblut durch potentiometrische Titration bestimmt. Die erhaltenen, einander entsprechenden Dissoziationskonstanten waren von dem Ursprung des Hämoglobins unabhängig und von der gleicher Grössenordnung.

Die Titrationskurven haben zwei Inflexionspunkte mit Pufferkapazitätsminima, nämlich bei $p(aH) = 5,8$ bzw. $8,7$. Die Pufferkapazität des Rinderhämoglobins ist in dem physiologisch wichtigsten Bereich, nämlich zwischen den Inflexionspunkten, kleiner als die des menschlichen und des Pferdehämoglobins. Dieses beruht darauf, dass der Gehalt des Hämoglobins an Säure-Basen-funktionen mit den Dissoziationskonstanten K'_3 und K''_3 , von denen die Pufferkapazität zwischen den Inflexionspunkten hauptsächlich abhängig ist, beim Rinderhämoglobin kleiner ist als beim Menschen- und Pferdehämoglobin.

Die Titrationskurven des Menschen-, Pferde- und Rinderblutes haben zwei den Inflexionspunkten der Titrationskurve des Hämoglobins entsprechende Inflexionspunkte. Die Pufferkapazität zwischen den Inflexionspunkten vermindert sich in der Reihenfolge: Menschen- > Pferde- > Rinderblut.

Mit Anwendung der erhaltenen Dissoziationskonstanten des Hämoglobins berechnen sich Pufferkapazitätswerte, welche mit Berücksichtigung der Pufferkapazität von Kohlensäure und Phosphorsäure des Blutes mit den experimentell nach der Titrationskurve des Blutes gemessenen Werten übereinstimmen. Die Pufferkapazität des Blutes zwischen den genannten Inflexionspunkten lässt sich hauptsächlich auf das Hämoglobin zurückführen.

Betreffend des Hämoglobins scheint die Pufferwirkung zwischen den Inflexionspunkten hauptsächlich von Hämin und Histidylhistidin des Hämoglobins verursacht zu sein.

Für ein Staatsstipendium zur Förderung der höchsten Geistesbildung sowie für ein Stipendium des Staatlichen Naturwissenschaftlichen Kommission, die mir zur Ausführung der vorliegenden Arbeit bewilligt wurden, bringe ich hier meinen Dank zum Ausdruck.

LITERATUR

1. Vgl. Errera, J. und Hirshberg, Y. *Biochem. J.* **27** (1933) 764.
2. Kilpi, S. *Sjätte Nordiska Kemistmötet.* (1947) 254. Lund.
3. Vgl. Kilpi, S. *Z. physik. Chem.* **A 175** (1935) 240, 248.
4. Kilpi, S. und Meretoja, A. *Z. physik. Chem.* **A 180** (1937) 276.
5. Kilpi, S. *Z. physik. Chem.* **A 180** (1937) 470.
6. Cohn, E. J., Green, A. A. und Blanchard M. H. *J. Am. Chem. Soc.* **59** (1937) 509.

7. van Slyke, D. D. *J. Biol. Chem.* **52** (1922) 522; vgl. Kilpi, S. *Z. physik. Chem.* **A 173** (1935) 224.
8. Kolthoff, I. M. und Bosch, W. *Rec. trav. chim.* **47** (1928) 819; Kilpi, S. *Z. physik. Chem.* **173** (1935) 427; Näsänen, R. *Acta Chem. Scand.* **1** (1947) 204.
9. Hentola, Y. *Kemian Keskusliiton julkaisuja* **13** (1946) 2.
10. Pauling, L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **21** (1935) 186. Ref. nach Cohn ⁶.
11. Greenstein, J. P. *J. Biol. Chem.* **93** (1931) 479.
12. Kilpi, S. und Meretoja, A. *Suomen Kemistilehti* **B 16** (1943) 23.
13. Meretoja, A. *Suomalaisen Tiedeakatemia toimituksia A. Chemica.* **12** (1944) 28.

Eingegangen am 19. Dezember 1951.