



Over de ademhalingsfunctie van haemocyanine

<https://hdl.handle.net/1874/281590>

H. Gr. 192, 1924.

OVER DE ADEMHALINGSFUNCTIE
VAN HAEMOCYANINE



HERMAN BEGEMANN

ht

OVER DE ADEMHALINGSFUNCTIE VAN
HAEMOCYANINE.

Diss Utrecht 1924

OVER DE ADEMHALINGSFUNCTIE VAN HAEMOCYANINE

PROEFSCHRIFT TER VERKRIJGING VAN
DEN GRAAD VAN DOCTOR IN DE WIS- EN
NATUURKUNDE AAN DE RIJKS-UNIVERSI-
TEIT TE UTRECHT, OP GEZAG VAN DEN
RECTOR-MAGNIFICUS DR. H. F. NIERSTRASZ,
HOOGLEERAAR IN DE FACULTEIT DER WIS-
EN NATUURKUNDE, VOLGENS BESLUIT
VAN DEN SENAAT DER RIJKS-UNIVERSITEIT
TEGEN DE BEDENKINGEN VAN DE FACUL-
TEIT DER WIS- EN NATUURKUNDE TE VER-
DEDIGEN OP DINSDAG 7 OCTOBER 1924,
DES NAMIDDAGS TEN VIER UUR, DOOR

HERMAN BEGEMANN,

GEBOREN TE GANTOENG (BILLITON) N. O. I.



AAN DE NAGEDACHTENIS VAN MIJN VADER
EN AAN MIJN VROUW.

VOORWOORD.

Bij het afsluiten van dit proefschrift en daarmee van een tijdperk, waarnaar ik graag zal blijven terugzien, wil ik hier allen dank zeggen, die op eenigerlei wijze tot mijn vorming hebben bijgedragen.

U Hooggeleerden in de Faculteit der Wis- en Natuurkunde ben ik zeer erkentelijk voor het genoten onderwijs maar vooral voor wat enkelen Uwer mij persoonlijk hebben willen geven.

In de allereerste plaats geldt mijn dank U, Hooggeleerde JORDAN, Hooggeachte leermeester en promotor. Aangetrokken tot Uw persoon en Uw vak, door het enthousiasme waarmee Gij Uwe colleges weet te geven, heb ik later, als Uw assistent het voorrecht gehad den rijkdom van Uwe denkbeelden te mogen ervaren. In de vele uren van persoonlijk gesprek, hebt Gij mij geleerd, hoe voor een bioloog het exacte denken onontbeerlijk is.

Steeds meer heb ik leeren waardeeren de wijze waarop Gij Uwen leerlingen de noodzakelijkheid van zelfbewustwording toont.

Wat ik U persoonlijk te danken heb, vooral door het buitengewone vertrouwen, dat U mij schonk, door Uw hulp en belangstelling en door de vrijheid, die U mij gaf voor mijn onderzoek, zoover de drukbezette tijd, dat toeliet, zal ik niet verder omschrijven. Ook de vriendschap die Mevrouw JORDAN en U, mij en mijn gezin in deze jaren bewezen hebben, zal ons onvergetelijk blijven.

Hooggeleerde WENT, ik zal het steeds als een voorrecht blijven beschouwen, dat ik, hoewel niet tot den kring van Uwe speciale leerlingen behorende, gedurende mijn studietijd menige keer bij U heb mogen komen om Uw raad in te winnen.

Ik betreur het zeer, Hooggeleerde WESTERDIJK, dat ik niet in de gelegenheid geweest ben, onder Uw leiding praktisch werkzaam te zijn. De vriendelijke belangstelling van U ondervonden, zal bij mij in dankbare herinnering blijven.

Uw colleges Hooggeleerde KRUYT, waren mij een toonbeeld van helderheid en boeienden betoogtrant. Mijn belangstelling in de Kolloïdchemie eenmaal door U gewekt, zal in de toekomst steeds

levendig blijven. Het spijt mij zeer, dat ik om mijn haastig vertrek geen gelegenheid heb gehad mijn werk met U te bespreken.

Hooggeleerde MAGNUS, ik acht het een groot voorrecht, dat ik Uwe bezielende colleges heb kunnen volgen, maar bovenal acht ik het een voorrecht dat Gij mij toegang hebt willen verleen tot Uw referaatavonden, waar door Uw helder oordeel en onuitputtelijke kennis de Physiologie leven voor mij heeft gekregen.

Bij de bewerking van mijn proefschrift, heb ik van zeer velen een onmisbaren steun ontvangen.

Gij, Hooggeleerde RINGER, hebt mijn eerste schreden geleid op het gebied der Physiologische-Chemie. Het was in Uw laboratorium, dat ik de eerste methoden leerde, noodig voor het uitvoeren van dit onderzoek. De bijzondere welwillendheid van Dr. COHEN TERVAERT wil ik daarbij niet vergeten.

Buitengewone gastvrijheid, Hooggeleerde SCHOORL, heb ik gedurende meer dan 2 jaar in Uw persoonlijk laboratorium ondervonden. Zonder Uw kritiek, zonder Uw geduld en onverflauwde aanmoediging, zou het mij zeer moeilijk geweest zijn mijn taak tot een goed einde te brengen.

Voor alles, wat ik van U leerde, ben ik U zeer veel dank verschuldigd. Evenzoo ben ik Mejuffrouw GILTAY erkentelijk voor haar welwillend verleende hulp.

Zeergeleerde KOLTHOFF, nooit tevergeefs heb ik U mijn moeilijkheden voorgelegd, Uw hartelijke hulpvaardigheid heb ik zeer op prijs gesteld.

Hooggeleerde ORNSTEIN, ook U ben ik dankbaar voor de gastvrijheid, die Gij mij op Uw laboratorium hebt willen verleen.

Zeergeleerde BURGER, dat Gij in Uwen drukbezetten tijd nog gelegenheid vindt mij te helpen, waardeerde ik ten zeerste.

Voor al U waarde DENIER VAN DER GON ben ik veel dank verschuldigd voor de royale wijze, waarop Gij in vele kostbare uren met Uw ingenieus toestel opnamen voor mij hebt willen verrichten. Het spijt mij zeer, dat wij dit onderzoek hebben moeten afbreken.

U waarde PRYS, betuig ik mijn dank voor de voortreffelijke wijze, waarop Gij de teekeningen voor mijn proefschrift hebt vervaardigd en ook voor de hartelijkheid, waarmee Gij mij steeds geholpen hebt.

Een warm woord aan U, Zeergeleerde DE MOL, trouw stondt Gij mij bij de samenstelling van dit proefschrift met Uw ervaring ter zijde.

Tenslotte gedenk ik met dankbaarheid allen, die mij buiten mijn studie tot steun waren en mij hun vriendschap hebben bewezen. In het Utrechtsch-Studenten-Corps maar vooral in de V. C. S. B. heb ik trouwe vrienden leeren kennen.

Onvergetelijk zullen mij de vele uren zijn, Hooggeleerde HEERING, waarin ik met U heb mogen samenwerken in de jongenskampen. Voornamelijk in dien tijd is tot ontwikkeling gekomen, wat ik hooger schat dan wetenschappelijke kennis.

Ook Gij, Hooggeleerde ROESSINGH, waart steeds vol belangstelling voor mij en mijn gezin.

INHOUD.

Bladz.

HOOFDSTUK I.

<i>Algemeene Inleiding</i>	1
--------------------------------------	---

HOOFDSTUK II.

<i>Het zuurstofbindingsvermogen van haemocyanine</i>	4
Het zuurstofgehalte van met lucht verzadigd bloed van <i>Helix pomatia</i>	11
Het zuurstofgehalte van met lucht verzadigd bloed van <i>Carcinus maenas</i>	12

HOOFDSTUK III.

De specifieke zuurstofcapaciteit.

Inleiding.	15
Materiaal	17
Methoden	17
1. Bepaling van het koper	18
2. Bepaling van de zuurstof	32
A. De kwikpomp	33
B. Meting en analyse van de opgevangen gassen	39
3. Het aftappen van bloed	42
4. Het zuiveren van haemocyanine	44
5. Het verzadigen van bloed met verschillende gasmengsels.	48
Experimenten.	52

HOOFDSTUK IV.

<i>De dissociatiekromme</i>	69
Inleiding	69
Experimenten.	71

HOOFDSTUK V.

<i>Het absorptiespectrum.</i>	78
Literatuuroverzicht	78
Experimenten.	79

SAMENVATTING	87
------------------------	----

LITERATUUR.	89
---------------------	----

HOOFDSTUK I.

ALGEMEENE INLEIDING.

Steeds is men er zich van bewust geweest, dat de rol, die het bloed bij de ademhaling van mensch en dier speelt, zeer belangrijk is.

Meende men aanvankelijk, door de voorstellingen van LAVOISIER, (1780) dat het bloed tot taak had de warmte, die door de verbranding in de longen ontstond, op te nemen en in het lichaam te verdeelen, later vooral door de onderzoekingen van GUSTAV MAGNUS, (1837) is gebleken dat het bloed niet de warmte maar de zuurstof opneemt, die voor de verbranding noodig is. Het zou echter nog een dertigtal jaren duren, eer PFLÜGER (1872) kon uitmaken, dat de verbranding niet in het bloed zèlf, maar vooral in de weefsels plaats vindt.

Dacht men eerst, dat haemoglobine slechts een transportmiddel was, tendienste van de gaswisseling van de weefsels, in de laatste jaren is gebleken, dat het probleem van de ademhalingsfunctie van het bloed niet zoo eenvoudig is als men het zich wel voorstelde. Vooral Engelschen en Amerikanen hebben door intensief en exact onderzoek aan het licht gebracht, dat van de meerdere of mindere verzadiging van het haemoglobine met zuurstof, een aantal evenwichtsprocessen in het bloed afhankelijk zijn, die voor het leven van het organisme van fundamenteel belang zijn.

Anderzijds heeft ook de chemische kant van het vraagstuk van de ademhalingsfunctie van het haemoglobine reeds vroeg de onderzoekers beziggehouden. Ter bestudeering van de vraag of bij het opnemen van de zuurstof door haemoglobine, al dan niet van een zuiver chemische binding sprake is, werd in de laatste 60 jaar een enorme experimenteele arbeid verricht.

Thans mogen wij het bewezen achten, dat hier een chemische reactie plaats heeft.

Het eigenaardige en interessante van deze reactie is echter, dat de organische chemie geen voorbeeld kent, dat er mede gelijk te stellen is.

Door de bijzondere eigenschappen van haemoglobine wordt de belangstelling der onderzoekers in toenemende mate aan het bloed gewijd, zoodat weinig gebieden der Physiologie zich thans zoo snel ontwikkelen, als juist dat der kennis van de functie van het bloed.

Haemoglobine komt in de dierenwereld zeer verspreid voor nl.:

1e. in bloedlichaampjes van alle Vertebraten;

2e. in bloedlichaampjes of opgelost in het plasma van zeer vele, tot verschillende groepen behorende, Invertebraten.

Naast deze roode bloedkleurstof echter, komt bij 2 groepen der Invertebraten — de *Mollusken* en de *Arthropoden* — een blauw pigment voor, het haemocyanine, dat dezelfde functie te vervullen heeft als het haemoglobine.

Heeft men thans na jarenlange arbeid, een — zij het ook nog gebrekkig — inzicht gekregen in de ademhalingsfunctie van haemoglobine, van de beteekenis van haemocyanine in dit opzicht is nog zeer weinig bekend.

Terecht zegt BAYLISS (1918) in zijn „Principles of general Physiology”:

„As yet we know comparatively little about haemocyanin, „especially with regard to its relation to oxygen. It is a matter „which would well repay investigation to determine whether it „has the remarkable properties which haemoglobin has in this „respect, properties which are at present unique”.

In analogie met wat er van het haemoglobine bekend is, hebben wij getracht onze kennis van het haemocyanine te vermeerderen.

Ook de exacte bestudeering van de eigenschappen van haemocyanine is uit verschillend oogpunt interressant:

1e. van chemisch standpunt gezien, zou het zeer belangrijk zijn te weten of haemocyanine, in verband met zijn chemische constitutie, zich ten opzichte van zuurstof op dezelfde bijzondere wijze gedraagt als haemoglobine.

2e. Het haemocyaninehoudende bloed — evenals het haemoglobinehoudende bloed van sommige Invertebraten — is een betrekkelijk

eenvoudig systeem, vergeleken bij het bloed der Vertebraten. Het is te verwachten, dat de eigenschappen van haemocyanine, alhoewel in beginsel op die van haemoglobine gelijkende, in andere opzichten zoo zullen afwijken, dat eene studie van de ademhalingsfunctie van het haemocyanine nieuwe en vergelijkbare inzichten in den physisch-chemischen samenhang tusschen zuurstof en ademhalingspigmenten zal geven.

3e. Verschillende onderzoekers hebben zich afgevraagd, „waarom” bij zoo verschillende soorten der Invertebraten haemoglobine voorkomt, terwijl bij daarmee nauw verwante soorten haemocyanine aanwezig is. Wij meenen dat deze vraag, zóó gesteld, in eene proefondervindelijke wetenschap niet thuis hoort. In de grillige verdeling van de ademhalingspigmenten meenen wij geheel andere, uiterst belangrijke problemen te zien. Het is een feit, dat de ademhalingskleurstoffen bij verschillende dieren zeer verschillende eigenschappen bezitten: niet alleen komen er verschillende soorten van pigmenten voor, maar ook één en dezelfde bloedkleurstof, b. v. haemoglobine, heeft bij verschillende dieren onderzocht, steeds weer andere eigenschappen. Deze eigenschappen staan op zeer bepaalde wijze in verband met bijzonderheden van het *milieu* (b. v. meer of minder gebrek aan zuurstof) of van de *organisatie* van het dier (b. v. de noodzakelijkheid, om bij een duikende leefwijze, korteren of langeren tijd van een zuurstofvoorraad in de long te moeten leven).

Belooft de studie van den samenhang van milieu en organisatie een beter inzicht in de talrijke factoren, die de functie van de verschillende ademhalingspigmenten beheerschen, omgekeerd geeft ons de kennis van de eigenschappen der bloedkleurstoffen een kijk op den ingewikkelden samenhang tusschen het dier en zijn milieu.

Uit dit alles volgt, dat de bestudeering van de eigenschappen van haemocyanine, aan de hand der moderne methoden, zooals die bij het haemoglobineonderzoek gebezigd worden, een groot en interessant arbeidsveld openen, zoowel voor de algemeene- als ook voor de vergelijkende-fysiologie.

HOOFDSTUK II.

HET ZUURSTOFBINDINGSVERMOGEN VAN HAEMOCYANINE.

SWAMMERDAM was de eerste die vermeld heeft, dat de slak geen rood gekleurd, maar blauw bloed heeft.

Eerst veel later deed HARLESS (1847) de interessante waarneming, dat het bloed van *Loligo*, *Eledone* en *Helix pomatia* aan de lucht blootgesteld, donker blauw van kleur werd.

Hij toonde aan, dat deze kleurverandering, tenminste bij *Helix pomatia*, door zuurstof werd veroorzaakt.

De chemische analyse van het bloed, uitgevoerd door VON BIBRA bracht aan het licht, dat er geen spoor ijzer, daarentegen vrij veel koper in het bloed dezer dieren aanwezig is.

Ook PAUL BERT (1867) zag bij zijn experimenten met *Sepia*, dat het bloed, eerst zoo goed als ongekleurd, bij aanraking met de buitenlucht intensief blauw werd.

Hij was de eerste, die deze kleurverandering in verband bracht met de ademhalingsfunctie van het bloed.

De eigenlijke ontdekker van de beteekenis van het haemocyanine voor het lagere dier is echter L. FRÉDÉRICQ (1878).

In 1878 ontdekte deze bekende Belgische physioloog, dat de blauwe kleurstof, waaraan hij den naam „haemocyanine” (van *αἷμα* bloed en *κύανος* blauw) gaf, werkelijk een rol speelde bij de ademhaling van *Octopus vulgaris*.

Hij beschrijft deze vondst met de volgende woorden:

„Le sang est bleu tant que l'animal respire normalement dans l'eau; dèsqu'on l'en empêche, en le retirant de l'eau ou simplement en introduisant les doigts dans la cavité palléale, le sang de l'artère se décolore et prend la teinte pâle asphyxique”.

In analogie met Hb noemde hij de ongekleurde vorm haemocyanine en de blauwe, geoxydeerde, oxyhaemocyanine. *)

*) In het hiernavolgende afgekort tot Hcy en Hcy O.

Hij uitte tevens het vermoeden, dat het Cu in het Hcy eenzelfde rol zou spelen, als het Fe in het haemoglobine.

Behalve bij Cephalopoden toonde FRÉDÉRICQ (1879) het voorkomen van Hcy ook aan bij decapode-Crustaceae, en sindsdien zijn er een zeer groot aantal dieren bekend geworden, die deze stof bezitten.

Zij behooren echter alle tot 2 groepen der Invertebraten: de Mollusken en de Arthropoden. Onder de Mollusken hebben alle Cephalopoden, vele Gastropoden en vele Lamellibranchiaten Hcy.; onder de Arthropoden, vooral de hoogere Crustaceae en verder Limulus, enkele Scorpionidae en Araneidae.

Bij al deze dieren komt het Hcy uitsluitend opgelost in het bloed voor.

Dat Hcy een eiwitstof is heeft FRÉDÉRICQ reeds ondubbelzinnig aangetoond (1878) eveneens, dat het Cu een vast bestanddeel is van het molecuul. Weliswaar heeft HEIM (1892) dit later betwijfeld, maar zijn conclusie is onjuist gebleken.

Behalve GENTH (1852), WITTING (1858) en DUBOIS (1900) hebben vooral DHÉRÉ (1900—1901) en BURDEL (1922) uitgebreide onderzoekingen gedaan en het Cu-gehalte bepaald van het bloed van verschillende Mollusken en Crustaceae.

Het is gebleken, dat het Hcy-gehalte niet alleen bij verschillende soorten verschillend is, maar ook dat één dier in verschillende jaargetijden en bij verschillende omstandigheden belangrijke verschillen in het kopergehalte van zijn bloed vertoonen kan.

Zoo vond ik bij *Helix pomatia* 0.064 en 0.051 % Cu; het laatste vooral na een hongerperiode.

Dat het kopergehalte bij verschillende diersoorten, verschillend is, vindt zijn oorzaak in het Hcy gehalte van het bloed dezer dieren. Zoo heeft bloed van Cephalopoden vergeleken bij dat van andere dieren het meeste Cu, maar ook het hoogste Hcy-gehalte.

Verscheidene onderzoekers hebben het Cu-gehalte van gezuiverde Hcy trachten te bepalen.

Hun resultaten zijn in achterstaande tabel samengevat.

Auteur.	Bewerking van de stof.	Gehalte.
Henze 1901.	gekristal. Hcy van Octopus vulg.	0.38 %
Griffith 1892.	met $Mg SO_4$ geprec. Hcy van Sepia.	0.34 %
	" " " " " Cancer.	0.32 %
	" " " " " Homarus.	0.34 %
Alsberg & Clark 1910	„ $(NH_4)_2SO_4$ „ " „ Limulus p.	0.28 %
Dhéré 1919.	gekristal. Hcy van Helix pomatia.	0.25 %

Ook ik heb van Hcy van *Helix pomatia* na 3 maal omkristallisatie volgens de methode van DHÉRE (1908), het Cu gehalte bepaald.

Daartoe werden 8.5730 gr. Hcy oplossing in vacuo gedroogd naast P_2O_5 tot 0.200 gr. Naast een verzadigde oplossing van NaBr werd dit gewicht 0.2260 gr. De op deze wijze verkregen stof had dus een watergehalte van $\frac{26}{2.26} = 11.5 \%$ *)

Hiervan werden 29.7, 29.7 en 29.6 mgr. gemineraliseerd en in de asch werd, op de in Hoofdstuk III beschreven wijze, het Cu-gehalte bepaald. Daarbij werd gevonden 0.076, 0.075 en 0.076 mgr. Cu d.i. van 29.7 mgr. Hcy 0.256 % en berekend op absoluut droge stof 0.29 %.

De sulfaatash van 105 mgr. van dit Hcy woog 1, mgr. en bevatte behalve koperoxyde tamelijk veel gips en een spoor phosphorzuur. *)

Over de wijze waarop het Cu in het Hcy molecuul aanwezig is, zijn de meeningen van verschillende onderzoekers nog zeer verdeeld.

PHILIPPI (1918) heeft kunnen aantonen, dat Hcy uit *Helix pomatia* afkomstig, na splitsing met loog een sterke pyrrolreactie geeft.

In analogie met Hb zou men dan kunnen aannemen, dat het Cu in het Hcy molecuul aan verschillende pyrrolringen gebonden is.

Andere onderzoekers hebben kunnen vaststellen, dat het Cu zich gemakkelijker uit Hcy laat afsplitsen dan het Fe uit Hb. Zij meenen daarom, dat Hcy als een koperalbuminaat beschouwd mag worden.

*) Deze bepaling werd met groote welwillendheid door Prof. Dr. N. SCHOORL voor mij uitgevoerd.

Wat de **verbinding van Hcy met O₂** betreft, is reeds vermeld hoe FRÉDÉRICQ aantoonde, dat Hcy in 't bloed van *Octopus* den rol van ademhalingspigment vervult.

HEIM (1892) heeft echter de ademhalingsfunctie van Hcy voor Crustaceae ontkend, ofschoon de door hem gepubliceerde cijfers het tegendeel zouden doen vermoeden.

Dit was voor DHÉRE (1900) aanleiding om voor verschillende dieren het O₂ gehalte van met lucht geschud bloed vast te stellen. Helaas bezigde hij daarvoor de niet steeds betrouwbare methode van SCHÜTZENBERGER (1873). Weliswaar komen enkele der door hem verkregen cijfers overeen met die van andere onderzoekers, die voor de O₂ bepaling de kwikpomp hebben gebezigd.

Behalve de genoemde, hebben nog andere onderzoekers zich met het zuurstofbindingsvermogen van Hcy bezig gehouden. De door hen verkregen resultaten zijn zeer verschillend. Teneinde een beter overzicht te geven, vat ik in onderstaande tabellen de tot nu toe verkregen uitkomsten samen.

TABEL I.

Bepalingen met de kwikpomp.

Auteur.	Soort.	Vol. % O ₂ .	Temp.
Henze 1901	<i>Octopus vulgaris</i>	3.09—3.70	25—26°
Winterstein 1909	"	4.2—5.0	17—22°
Cuénot 1900	<i>Helix aspersa</i>	1.2	20°
Jolyet & Regnard 1877 .	<i>Astacus fluviatilis</i>	3.5	15—16° 16—19° 27°
"	<i>Cancer pagurus</i>	2.4—4.4	
"	<i>Carcinus maenas</i>	3.0—3.2	
Winterstein 1909	<i>Palinurus vulg.</i>	1.43—1.48	
"	<i>Maja squinado</i>	0.84—1.13	
Jolyet & Viallanes 1895.	<i>Limulus polyph.</i>	2.7	27°
Alsberg & Clark 1914 .	"	0.45	

TABEL II.

Titrimetrische bepalingen.

Auteur.	Soort.	Vol. % O ₂ .	Temp.
Dhéré 1903 .	Octopus vulgaris.	3.9—4.2	18°
" 1900 .	Helix pomatia.	1.45—2.2	17—19°
Cuénot 1892 .	"	1.15—1.28	
Dhéré 1900 .	Astacus fluviatilis.	2.4	22°
Heim 1892 .	"	3.3—3.9	
" .	Cancer pagurus.	3.9—4.6	
Dhéré 1903 .	"	1.6	18°
" .	Carcinus maenas.	3.9—3.9	"
Heim 1892 .	"	3.2—4.0	
" .	Homarus vulgaris.	4.3—4.8	
Dhéré 1900 .	"	3.0—3.1	17—18°
" 1903 .	Maja squinado.	1.6—1.6	
Heim 1892 .	"	3.9—4.6	
" .	Palinurus vulgaris.	5.1—5.9	
" .	Portunus puber.	3.5—4.1	

De cijfers, welke verkregen werden door het gebruik van de kwikpomp zijn gescheiden van die, welke verkregen zijn met de methode van SCHÜTZENBERGER.

Niet in deze tabel opgenomen zijn de resultaten van GRIFFITH (1892) daar deze klaarblijkelijk geheel verzonnen zijn. Ook heb ik het onderzoek van RICHET (1879) over *Palinurus* weggelaten, aangezien hij een veel te hoog cijfer heeft gevonden.

Uit deze tabel blijkt, dat op één uitzondering na alle onderzoekers tot het resultaat gekomen zijn, dat een meer of minder groot gedeelte van de opgenomen zuurstof door het Hcy werd gebonden, dus ook HEIM, niettegenstaande hijzelf anders meent.

Door het bezit van deze kleurstof kan volgens bovenstaande cijfers het bloed van:

<i>Octopus vulgaris</i>	6—7	maal	meer	zuurstof	
<i>Helix pomatia</i>	1	"	"	"	
<i>Astacus fluviatilis</i>	4	"	"	"	
<i>Cancer pagurus</i>	4	"	"	"	
<i>Carcinus maenas</i>	4	"	"	"	
<i>Maja squinado</i>	1	"	"	"	
<i>Palinurus vulgaris</i>	2	"	"	"	
<i>Homarus vulgaris</i>	4	"	"	"	bevatten

dan het plasma zonder Hcy.

ALSBERG & CLARK (1914) als eenige uitzonderingen kunnen met de kwikpomp niet meer zuurstof uit het bloed van *Limulus polyphemus* verkrijgen, dan de hoeveelheid die normaal daarin opgelost zou voorkomen zonder de aanwezigheid van Hcy. Zij constateerden tevens, dat de blauwe kleur van het bloed in vacuo niet verdween en meenden daaruit te mogen concluderen dat Hcy O een stabiele verbinding is, die op andere wijze dan Hb O₂ haar zuurstof aan de weefsels afstaat.

Dergelijke waarnemingen zijn door BOTAZZI (1919) vermeld. Deze onderzoeker beweert nl. dat het bloed van *Octopus vulgaris* onder de klok van een gewone luchtpomp, ook na zeer langen tijd, zich niet ontkleurt, terwijl in een vacuum, verkregen door een rotatiepomp, de ontkleuring pas bij ongeveer 0 m.M. begon en het zeer lang duurde, voordat het geheel ontkleurd was.

Daarbij moest het bloed een zeer groot oppervlak hebben.

Uit de waarneming, dat het bloed van *Octopus* zich zoo moeilijk ontkleurde, meende hij zelfs te mogen concluderen dat HENZE (1901) en WINTERSTEIN (1909) bij hun onderzoekingen omtrent het O₂ gehalte bij *Octopus* — waarbij zij beiden een kwikpomp hadden gebezigd — niet de totale hoeveelheid O₂ uit het bloed hebben kunnen verkrijgen. Daarom kwalificeert hij deze onderzoekingen als „*dépourvues de toute valeur*”. (1919 p. 4)

Het is klaarblijkelijk dat niet alleen ALSBERG & CLARK, maar vooral BOTAZZI onjuiste waarnemingen hebben gedaan.

Want bij de bestudeering van de zuurstofbinding van Hcy in het bloed van *Helix* heb ik voortdurend kunnen constateeren, dat de blauwe kleur van het HcyO in het vacuum van een kwik-

pomp bijna onmiddellijk verdwijnt ook zouden schudden of verwarmen en zonder dat de vloeistof kookt onder invloed van de sterk verminderden druk.

Hcy oplossingen vertoonden tenslotte nog slechts een zeer zwak blauwe tint veroorzaakt door het Tyndall-effect. Slakkenbloed werd na verlies van zijn O_2 geelachtig, met een lichtblauwe tint.

Het bloed van *Carcinus* is door de aanwezigheid van tethron erythrine, donker blauwgroen.

In vacuo wordt deze kleur wel lichter, maar hierbij vindt volkome ontkleuring niet plaats door de aanwezigheid van het tethronerythrine.

Niet alleen in een kwikpomp, maar ook onder de stolp van een gewone luchtpomp die met de hand gedreven wordt, ontkleuren HcyO-oplossingen en slakkenbloed zich volkomen. Zelfs als de vloeistof in een lange en smalle reageerbuis of in een cuvet van enkele m.M. wijdde onder de klok staat, treedt gedurende den nacht ontkleuring op.

Ik heb dit meermalen kunnen constateeren bij het onderzoek van het spectrum van Hcy en Hcy O (Hoofdstuk V).

Dat HcyO tegen de bewering van BOTAZZI (1919) in, door het inleiden van gasen ontkleurt, hebben DHÉRE & SCHNEIDER (1919) aangetoond met bloed van *Helix* en *Homarus*, waardoor zij H_2 hadden laten borrelen.

Bij 15° was na $\frac{1}{2}$ uur reeds het bloed geheel ontkleurd. Ook is de bewering van BOTAZZI onjuist, dat $(NH_4)_2S$ het Hcy chemisch zou veranderen en dat het door toevoeging van $(NH_4)_2S$ ontkleurde bloed niet meer blauw zou kunnen worden. Met deze stof ontkleurde Hcy-oplossingen echter, en evenzoo slakkenbloed, werd niet alleen door schudden met lucht weer blauw, doch ook spontaan trad de kleur weer op, als de vloeistof eenigen tijd aan de lucht werd blootgesteld.

De intensiteit van de blauwe kleur van een Hcy-oplossing kan niet als maat voor de meer of mindere verzadiging met O_2 worden gebezigd; roteert men slakkenbloed of Hcy oplossing met gasmengsels van verschillend O_2 gehalte, dan kan men vaak geen verschil in de intensiteit van de blauwe kleur constateeren.

Uit het bovenstaande blijkt dus, dat de bewering van BOTAZZI,

als zou het HcyO de O_2 eerst na langen tijd bij ongeveer 0 m.M. spanning loslaten, onjuist is.

Bij de bestudeering van de zuurstofbinding van haemocyanine heb ik steeds in ongeveer 1 minuut alle zuurstof uit het Hcy kunnen vrijmaken.

Uit de bepalingen van het zuurstofbindingsvermogen van bloed van *Carcinus maenas* en *Helix pomatia*, die in de volgende hoofdstukken verder besproken zullen worden, vat ik in onderstaande tabel die resultaten samen, welke verkregen zijn bij verzadiging met lucht, omdat zij een antwoord geven op de vraag hoeveel O_2 bij normale O_2 spanning in het bloed der bovengenoemde dieren in het bloedplasma is opgelost en hoeveel aan het Hcy is gebonden. De gebezigde methodiek wordt uitvoerig in het volgende hoofdstuk beschreven.

TABEL III.

Helix pomatia.

Zuurstofgehalte van met lucht verzadigd bloed.

Cu gehalte in mgr. p. c.M ³ .	O_2 gehalte in vol. %.	Opgel. O_2 in vol. %.	Geb. O_2 in vol. %.
0.051	1.48 1.38	0.7 0.65	gemid. 0.75
0.052	1.44 1.44 1.43	0.64	gemid. 0.8
0.057	1.54 1.57 1.47 1.50	0.63 0.66 0.63 0.65	gemid. 0.9

TABEL IV.

Carcinus maenas.

Zuurstofgehalte van met lucht verzadigd bloed.

Cu gehalte in mgr. p. c.M ³ .	O ₂ gehalte in vol. %.	Opgel. O ₂ in vol. %.	Geb. O ₂ in vol. %.
0.033	1.14 1.14 1.16	0.59 0.57	gemid. 0.85

Uit deze tabellen blijkt, dat in het bloed van *Helix pomatia* onder normale omstandigheden een weinig meer O₂ aan het Hcy gebonden is, dan in het plasma is opgelost. Dit vindt zijn oorzaak in het geringe Hcy-gehalte van het bloed dezer dieren.

Dit Hcy-gehalte kan in de verschillende jaargetijden belangrijk variëren.

Ongeveer dezelfde verhouding tusschen gebonden en opgeloste hoeveelheid O₂ vinden wij in het bloed van *Carcinus maenas*.

Nemen wij voor het oogenblik aan, dat gedurende de circulatie van het bloed door het lichaam van *Helix pomatia* het O₂ gehalte van het bloed alleen van het verschil in de partieele O₂ spanningen, die in de „long” en in de weefsels heerscht, afhankelijk is, dan kan onderstaande curve duidelijk maken, hoe bij verschillende O₂-spanningen van het bloed, de verhouding tusschen de hoeveelheden opgeloste en gebonden O₂ is. Men ziet, dat bij lage O₂-spanning de hoeveelheid opgeloste O₂ (voorgesteld door den afstand van de horizontale as tot de lijn OA) veel minder is dan de hoeveelheid O₂, die aan het Hcy gebonden is (voorgesteld door den afstand van de horizontale as tot de kromme.)

Haemocyanine houdend bloed is dus — vooral bij lage zuurstofspanning — een veel beter hulpmiddel om O₂ te verkrijgen dan pigmentvrije bloedsoorten. In dit opzicht is Hcy met Hb te vergelijken, al is de werking van Hb veel krachtiger dan die van Hcy.

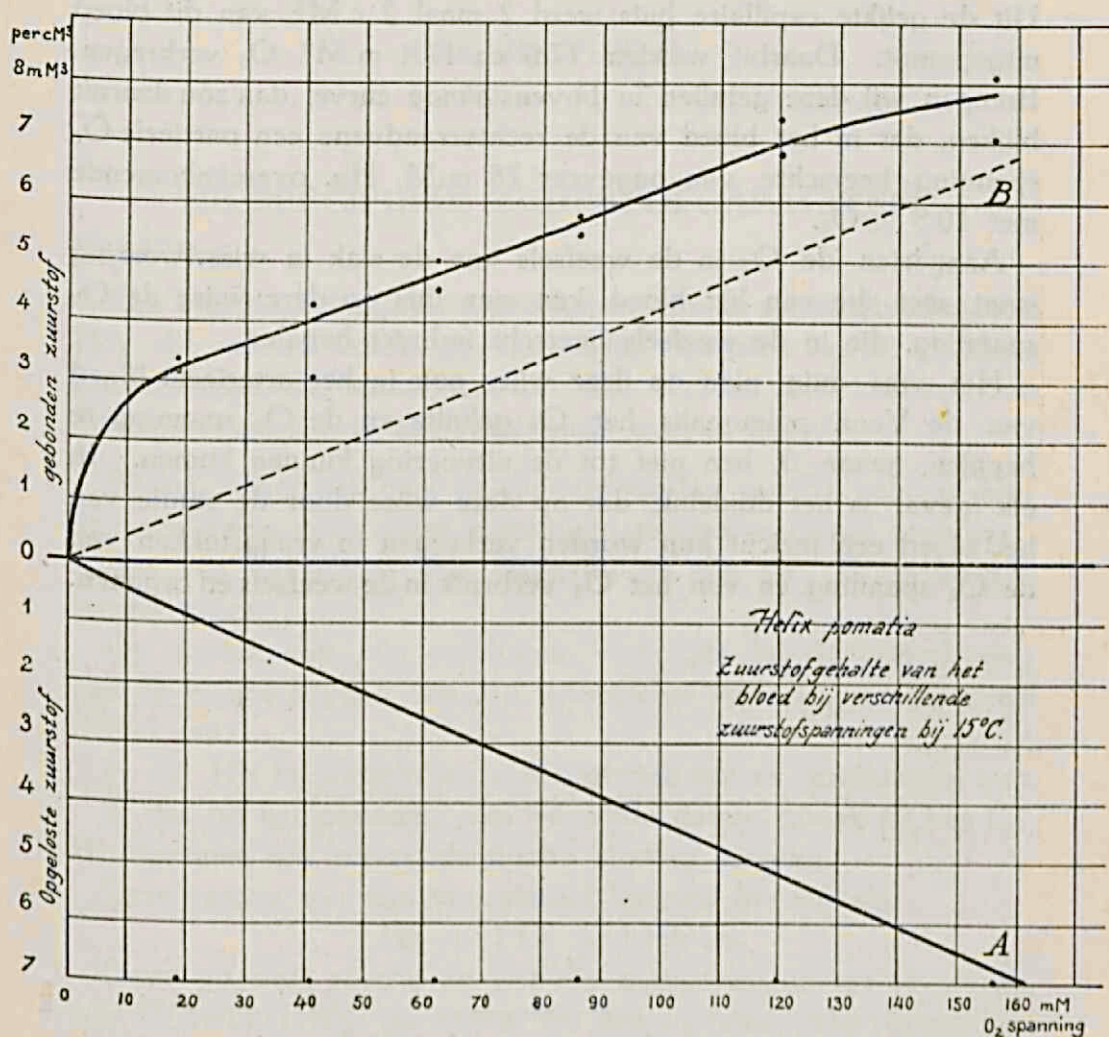


Fig. 1

Bij hogere O_2 spanningen is dit verschil geringer dan bij lagere. De afstand van de stippellijn OB tot de kromme geeft voor de verschillende partieele O_2 -spanningen dit verschil aan. De totale hoeveelheid O_2 in het bloed aanwezig bij verschillende O_2 druk wordt door den afstand van de kromme tot OA uitgedrukt.

In dit verband zijn de volgende waarnemingen interessant:

Door een injectienaald te steken in de rechtterrandvene (zie Hoofdstuk III) en daaraan een capillaire buis te verbinden waarin wat paraffine-olie gebracht was, kon ik ongeveer 5 c.M³. veneus bloed opvangen, dat niet met de lucht in aanraking was geweest.

Uit de geijkte capillaire buis werd 2 maal 2 c.M³. van dit bloed uitgepompt. Daarbij werden 17.6 en 17.4 m.M³. O₂ verkregen. Brengen wij deze getallen in bovenstaande curve, dan zou daaruit blijken, dat in het bloed van de rechterrandsvene een partieele O₂ spanning heerschte van ongeveer 78 m.M. Hg. overeenkomende met 10.5 % O₂.

Aangezien de O₂ in de weefsels van de slak in wisselwerking staat met die van het bloed, kan men dus op deze wijze de O₂ spanning, die in de weefsels heerscht indirect bepalen.

Het was mijn plan op deze wijze ook in het arterieele bloed van de Vena pulmonalis het O₂ gehalte en de O₂ spanning te bepalen, maar ik ben niet tot de uitvoering kunnen komen. In elk geval is het duidelijk, dat op deze wijze door de studie van het bloed een inzicht kan worden verkregen in vraagstukken van de O₂ spanning en van het O₂ verbruik in de weefsels en organen.

HOOFDSTUK III.

DE SPECIFIEKE ZUURSTOFCAPACITEIT.

INLEIDING.

Een van de belangrijkste problemen van de zuurstofbinding van Hcy, die moeten worden opgelost, is het vraagstuk van de specifieke zuurstofcapaciteit, omdat daarmee alle verdere onderzoeken op dit nieuwe gebied op een vaste basis worden gesteld.

Bij het onderzoek naar de zuurstofbinding van Hb hebben meer dan een halve eeuw twee meeningen tegenover elkaar gestaan:

Die van de school van HÜFNER en die van BOHR en zijn medewerkers.

Op grond van zijn resultaten, verkregen bij de bestudeering van de eigenschappen van Hb tenopzichte van CO, nam HÜFNER (1894) aan:

1^e dat Hb bij verschillende diersoorten een en dezelfde stof was,

2^e dat bij het opnemen van bepaalde gassen, zooals CO en O₂, Hb daarmee een zuiver chemische binding aanging.

Deze reactie zou dan voorgesteld kunnen worden als:

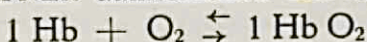


Door op deze reactie de wet der massawerking toe te passen, was HÜFNER (1901) de eerste, die een mathematische voorstelling verkreeg van het evenwicht, dat er moest bestaan tusschen Hb en O₂. Dit evenwicht kon volgens HÜFNER grafisch worden voorgesteld door een rechthoekig hyperbool. BOHR (1904) echter bestreed deze voorstelling op grond van resultaten van eigen onderzoeken en van die van vele anderen.

Indien de bloedkleurstof steeds dezelfde samenstelling had, zoo zegt BOHR, dan moet noodzakelijk ook zijn ijzergehalte en de maximale hoeveelheid zuurstof, die Hb onder gelijke omstandigheden kan binden, steeds dezelfde zijn. De verhouding dezer twee grootheden werd door hem de specifieke zuurstofcapaciteit (1909) genoemd en gedefinieerd als „das Verhältniss der maximalen

¹⁾ Verder met Sp. O. C. aangeduid.

Sauerstoffbindung zur Eisenmenge des Blutes oder der Haemoglobinlösung". Deze Sp. O. C. zou dus moeten zijn volgens de voorstelling van HÜFNER aannemende dat in de reactie:



1 Hb 1 Fe bevat:

$$\text{O}_2 : \text{Fe} = \frac{1 \text{ mol. O}_2}{1 \text{ at. Fe}} = \frac{22,394}{55,85} = 401.$$

De hoeveelheid zuurstof, die aan zóóveel Hb gebonden is, dat daarin 1 gram Fe aanwezig is, zou dus steeds moeten zijn 401 c.M³. Deze Sp. O. C. was in de proeven van BOHR en zijn medewerkers niet alleen nooit constant, maar verschildte in enkele gevallen wel eens 30 %. Hierdoor kwam BOHR tot de opvatting, dat Hb niet alleen bij verschillende diersoorten verschillend was, maar dat zelfs in een en hetzelfde individu minstens 4 soorten Hb aanwezig moesten zijn.

Hij zegt dan ook „Es wäre z. B. denkbar, dass einer dieser Farbstoffe Sp. O = 400, ein anderer Sp. O = 200 hätte". (1909 p. 100)

In dezen strijd is tenslotte de beslissing gevallen ten gunste van HÜFNER, vooral door het onderzoek van PETERS (1912) die, gebruik makende van verbeterde methoden, kon aantoonen, dat de Sp. O. C. van het bloed van verschillende diersoorten constant was en binnen de foutengrens overeenkwam met de theoretisch berekende waarde.

Toen ik nu hetzelfde vraagstuk voor Hcy aanvatte, rees onmiddellijk de vraag of het mogelijk was van te voren de Sp. O. C. te berekenen. *) Door de volgende overwegingen bleek dit mogelijk.

Het is bekend, dat 1 gram Hb 1.34 c.M³. O₂ binden kan. Uit de onderzoekingen van WINTERSTEIN (1909) was gebleken, dat in het bloed van Octopus 1 gram Hcy ongeveer 0,5 c.M³. O₂ kon binden.

Nemen wij nu aan, dat 1 molecuul Hcy 1 at. Cu bevat, evenals 1 Hb 1 Fe en stellen wij het Cu gehalte van Hcy op $\frac{1}{3}$ % (HENZE (1901) vond 0,38 %) dan zou dus 1 gram Hcy 3 mgr. Cu bevatten; 3 mgr. Cu zouden dan overeenkomen met 0,5 c.M³. O₂ en 1 gr. Cu met 167 c.M³. O₂. De Sp. O. C. zou dus zijn 167. Berekenen wij de Sp. O. C. uit theoretische getallen, dan hebben wij de keuze die van uit verschillende verhoudingen nl. 1 Cu tot 2 O, 1 Cu tot

*) Deze berekening had ik reeds gemaakt en met anderen besproken, voordat het artikel van QUAGLIARIELLO in WINTERSTEIN's Handbuch d. verg. Physiol. Bd. I. 1. Hälfte p. 597 verschenen was.

1 O enz. Nemen wij aan, dat de verhouding 1 Cu op 1 O is, dan krijgen wij de volgende getallen:

$$\frac{1 \text{ O}}{1 \text{ Cu}} = \frac{1/2 \text{ mol O}_2}{1 \text{ gr. at. Cu}} = \frac{11,197}{63,57} = 176,1.$$

Dit getal komt dus zeer goed overeen met het bovenstaande, verkregen uit experimenteele gegevens.

Het spreekt vanzelf, dat deze overwegingen een zekere aantrekkelijkheid gaven aan de experimenteele oplossing van het vraagstuk.

MATERIAAL.

Teneinde Hcy voor het onderzoek te verkrijgen, zou het bloed van verschillende dieren gebezigd kunnen worden.

In de eerste plaats zouden daartoe Cephalopoden in aanmerking komen, omdat het bloed dezer dieren ongeveer 9% Hcy bevat. Het is echter duidelijk, dat in een laboratorium, niet aan de zee gelegen, Cephalopoden een zeer duur materiaal zouden vormen; afgezien van de vraag, of men ze ten allen tijde in voldoende aantal levend ter beschikking zou kunnen hebben. Daarom moest het onderzoek verricht worden met *Helix pomatia*, een dier dat ten allen tijde beschikbaar is, daar het als consumptieartikel ter markt komt. Bovendien stelt het al zeer geringe eischen aan zijn verzorging.

Het bloed van de wijngaardslak bevat 2-3% Hcy, een zeer geringe hoeveelheid vergeleken met het Hb gehalte van het bloed van Vertebraten. Berekenen wij de hoeveelheid zuurstof, die uit een paar c.M³. van dit slakkenbloed verkregen kan worden, dan blijkt, dat de uitvoering van het onderzoek eigenaardige moeilijkheden oplevert en speciale methoden vereischt, die ik eerst zal vermelden, alvorens de verkregen uitkomsten mee te delen.

METHODEN.

Teneinde de specifieke zuurstofcapaciteit van haemocyanine te kunnen bepalen, is het dus noodig te beschikken over:

- 1^o. een methode die ons nauwkeurig leert vaststellen, hoe groot de hoeveelheid koper is, die in haemocyanine wordt aangetroffen;
- 2^o. een methode, die het mogelijk maakt te bepalen, hoeveel zuurstof er maximaal door het haemocyanine kan worden gebonden.

1. BEPALING VAN HET KOPER *)

Hiervoor had ik een der gebruikelijke macromethoden kunnen bezigen. Bij aanwezigheid van voldoende koper ware dit dan daarmee nauwkeurig te bepalen geweest. Voor een meer uitgebreid onderzoek echter zou daartoe te veel materiaal nodig geweest zijn, want: 1^e uit één wijngaardslak kunnen slechts enkele c.M³ bloed worden verkregen; 2^e het gehalte aan haemocyanine is maximaal 3% en 3^e deze kleurstof bevat slechts 0.29% koper.

Daarom moest er een quantitatieve micromethode uitgewerkt worden, waarmee hoeveelheden koper van 0.5-0.1 mgr. zoo mogelijk tot 0.001 mgr. nauwkeurig vastgesteld kunnen worden. Dit is oogenschijnlijk geen moeilijke opgave maar een quantitatieve bepaling van koper kan door de aanwezigheid van andere metalen worden gestoord; deze moeten dan vooraf verwijderd of onwerkzaam worden gemaakt. Dat dit laatste groote moeilijkheden kan opleveren, zal uit het onderstaande blijken.

Het was dus noodzakelijk voor den verderen loop van het onderzoek te weten, welke metalen in het bloed van *Helix pomatia* aanwezig zijn. Daartoe werden eenige c.M³. in een platina-kroes met zwavelzuur verascht. In deze sulfaatash werden naast Cu ook K, Na, Ca en Fe gevonden terwijl Mn en Zn microchemisch niet konden worden aangetoond.

Hieruit bleek dus, dat op een storing van de koperbepaling door ijzer gerekend moest worden.

Keuze van een methode.

In de literatuur worden voor de quantitatieve microbepaling van koper vermeld:

- 1^o. gewichtsanalytische,
- 2^o. colorimetrische,
- 3^o. nephelometrische,
- 4^o. titrimetrische methoden.

Alvorens een passende te vinden hebben wij verschillende dezer methoden geprobeerd.

1. Van een gewichtsanalyse werd afgezien om de volgende

*) De hier beschreven methode heb ik in den loop van 1922 en 1923 zoover de tijd het mij toeliet, in het Pharmaceutisch Laboratorium van de Utrechtsche Universiteit, onder de welwillende leiding van Prof. SCHOORL uitgewerkt.

redenen: Een quantitative electrolytische afscheiding van verschillende metalen op een passende electrode is voor grootere hoeveelheden gemakkelijk. Op een geschikte balans kan het metaal dan nauwkeurig worden gewogen. Voor zeer kleine hoeveelheden echter is de *quantitative* afscheiding moeilijk. De weging vereischt een speciale balans; RIESENFELD & MÖLLER (1915) hebben een instrument daarvoor beschreven, hetwelk echter zoo gevoelig is, dat de weging van de kathode daarop vaak moeilijkheden oplevert. De door PREGL (1913) beschreven methode daarentegen gaat tot een nauwkeurigheid van 0.005 mgr., wat voor mijn doel nog niet voldoende is. Tenslotte zou de mogelijkheid van een volledige afscheiding van het koper bij aanwezigheid van ijzer nog moeten blijken.

2. Onder de oudere colorimetrische methoden hebben DHÉRE (1900) en, later, BURDEL (1922) bij hun onderzoekingen betreffende haemocyanine die met kaliumferrocyanide gebezigd. Zij bepaalden hoeveelheden van 1-0.5 mgr. met een nauwkeurigheid van 0.05 mgr. Deze methode moest dus voor mijn doel ongeschikt geacht worden.

Ook van de nieuwere, zeer gevoelige kleurreacties nl. die met phenolphthaline + H_2O_2 volgens THOMAS & CARPENTIER (1921) en die met hydrochinon volgens ALOY & VALDIGUIÉ (1922) moest worden afgezien, omdat het gebruikte gedestilleerde water alleen reeds deze kleurreacties vertoonde.

3. De precipitatie-reactie met cupferron was ongeschikt, omdat zij een gelijken zuurgraad van de standaarden met de te bepalen oplossing bleek te vereischen; bovendien — en dit is wel het voornaamste — omdat zij niet kon worden toegepast zonder voorafgaande scheiding van het aanwezige ijzer. Dit laatste bleek bij deze kleine hoeveelheden niet mogelijk.

4. Van de titrimetrische methoden, gaf die met titaanchloruur*) volgens KNECHT & HIBBERT (1903) uitzicht op succes. Wegens de omslachtigheid van de opstelling echter, werd voorloopig aan de bekende jodometrische kopertitratie volgens DE HAEN (1854) de voorkeur gegeven. Zij is eenvoudig uit te voeren en zeer nauwkeurig.

Met deze methode is het tenslotte gelukt, ook bij aanwezigheid

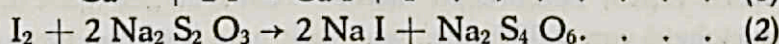
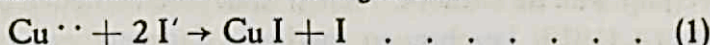
*) De titratie met titaanchloruur is o.a. door JAHN 1911, Zeitschr. f. physiol. chem. 75 p. 308 en door PETERS 1912 Jl. of Physiol. 44 p. 131 toegepast op de microbepaling van ijzer.

van ijzer, zeer kleine hoeveelheden koper tot een nauwkeurigheid van 0.001 mgr. vast te stellen.

De jodometrische microbepaling van koper.

Het *principe* der jodometrische kopertitratie is de reactie van een cuprizout met een jodide onder vorming van cuprojodide en vrij jodium, dat met thiosulfaat weer gebonden wordt.

De reacties kunnen aldus worden voorgesteld:



Het is bekend, dat de aanwezigheid van zuren en van een groote overmaat jodide de snelheid van de eerste reactie sterk bevordert.

Om deze reactie te kunnen bezigen voor de bepaling van kleine hoeveelheden koper, moesten de zuurconcentratie en de hoeveelheid jodide zoodanig gekozen worden, dat onmiddellijk de juiste hoeveelheid jodium wordt vrijgemaakt.

Door aanwezigheid van zuur en van een overmaat jodide ontstaat joodwaterstof, dat door de lucht wordt geoxydeerd onder vrijmaking van een extra hoeveelheid jodium, dat voor de bepaling zeer storend kan zijn.

Deze luchtoxydatie wordt door het koper katalytisch versneld en treedt in sterk zure oplossingen zeer licht op. Uit proeven, die ten doel hadden den zuurgraad vast te stellen, bleek, dat in 10 c.c. maximaal slechts 2 druppels 4 N. $\text{H}_2 \text{SO}_4$ aanwezig mocht zijn, dat azijnzuur daarentegen in veel grootere concentraties niet storend werkte. Ook bleek een te groote overmaat jodide de luchtoxydatie te bevorderen, terwijl toch een zekere overmaat noodig is om de reactie van het Cu voldoende snel te doen verlopen.

Er moest dus bij een bepaalde zuurconcentratie, die hoeveelheid toe te voegen jodide worden gezocht, die de reactie van het cuprizout voldoende versnelt, maar nog geen storende luchtoxydatie veroorzaakt.

Voor dit onderzoek werd uitgegaan van een standaard-koperoplossing, verkregen door een plaatje zuiver koper (*Kahlbaum*) van nauwkeurig 1 gram, op te lossen in sterk salpeterzuur, af te dampen op het waterbad en het residu met enkele druppels azijnzuur in water op te lossen tot 100 c.M³. Van deze standaardoplossing werd, door een gedeelte 100 maal te verdunnen, een

andere verkregen, die precies 0,1 mgr. per cM^3 . bevatte en voor de onderstaande titraties gebezigd werd. Aan 0,1 mgr. Cu werden telkens 6 druppels azijnzuur van 30 % toegevoegd en verschillende hoeveelheden eener normaaloplossing van kaliumjodide tot een totaal volume van 10 cM^3 .

De gebezigde thiosulfaatoplossing werd verkregen door een oplossing van ongeveer 0,1 N. 100 maal te verdunnen.

De titraties werden uitgevoerd met een microburet, die een totaalinhoud had van 10 cM^3 . en voorzien was van een Schellbach'sche streep. De inhoud was verdeeld in 0,05 cM^3 . en daar de streepjes van de schaalverdeling een onderlingen afstand hadden van 1,8 m.M., konden verschillen van 0,01 cM^3 . gemakkelijk geschat worden.

In de hier volgende tabel zijn vereenigd de resultaten van titraties na toevoeging van verschillende hoeveelheden jodide.

TABEL V.

Titraties van 0,1 mgr. Cu in 10 cM^3 . bevattende 6 druppels azijnzuur van 30 %.

Toegevoegd	Titerscijfer in cM^3 . $0,973 \times 0,001$ N. thio	Gevonden Cu in mgr.
1,5 cM^3 . N. KI opl.	1,400	0,082
2,0 " "	1,510; 1,510	0,094
2,5 " "	1,600; 1,600; 1,600	0,099
3,0 " "	1,645; 1,640	0,102
4,0 " "	1,680; 1,680	0,104
5,0 " "	1,710; 1,715	0,106

Hieruit blijkt dus, dat de juiste hoeveelheid Cu wordt teruggevonden met ongeveer 2,5 cM^3 . eener normaal KI oplossing onder bovengenoemde omstandigheden.

De mogelijkheid bestaat, dat de juiste uitkomst wordt verkregen door compensatie van twee fouten, nl. een tekort — veroorzaakt door de onvoltooide reactie van het cuprizout — gecompenseerd door jodiumafscheiding, afkomstig van beginnende luctoxydatie.

Een moeilijkheid bij de uitvoering van de bepaling lag ook in de waarneming van den kleuromslag van den stijfseindicator.

Deze wordt niet plotseling van blauw kleurloos, maar verandert geleidelijk van paars in goudgeel en ontkleurt zich terwijl de laatste 0.5 c.M³. 0.001 N. thiosulfaat-oplossing wordt toegevoegd.

Bij daglicht is deze ontkleuring moeilijk te volgen. Daarom werd in de donkere kamer de bepaling bij kunstlicht met bepaalde voorzorgen uitgevoerd.

Teneinde het omslagpunt nauwkeurig te bepalen werd aan het einde van de titratie, na toevoeging van elken druppel thio, de kleur van de vloeistof met water vergeleken. Het gemakkelijkst geschiedt dit als men de kolfjes op een vel dof wit papier plaatst en belicht met een elektrische metaaldraadlamp, waarvan het licht door een scherm van hetzelfde papier op de kolfjes wordt geconcentreerd.¹⁾ Geen directe stralen van de lamp kunnen dan de oogen van den waarnemer treffen.

Bij eenige oefening is de kleuromslag onder deze omstandigheden tot op 0.02 c.M³. 0.001 N. thiosulfaat te zien, dus met een nauwkeurigheid van ongeveer 0.001 mgr. koper.

Met de zoo verkregen opstelling moest nu worden onderzocht of bij de titratie van verschillende hoeveelheden koper de resultaten van dublobepalingen voldoende met elkaar overeenstemden.

Een reeks van bepalingen werd gedaan, waarvan de resultaten in onderstaande tabel zijn samengevat.

TABEL VI.

Titratie van verschillende hoeveelheden koper in 10 c.M³. bij toevoeging van 2.5 c.M³. N. K I en 10 druppels 30 % azijnzuur.

Genomen Cu in mgr.	Titercijfer in c.M ³ , 0.989 × 0.002 N. thio.	Gevonden Cu in mgr. gemiddeld uit triplo.
0.010	0.115; 0.105; 0.110	0.014
0.020	0.180; 0.180; 0.185	0.023
0.050	0.430; 0.415; 0.420	0.053
0.100	0.780; 0.795; 0.800	0.099
0.200	1.610; 1.638; 1.630	0.204
0.505	4.000; 4.010; 4.020	0.504
1.000	7.860; 7.850; 7.890	0.990

¹⁾ TOULK & MORRIS 1922, p. 225.

Uit deze tabel blijkt:

1^o. dat in den regel de absolute fout niet meer is dan 0.02 c.M³., een half schaaldeel der buret;

2^o. dat bij gebruik van 0.002 N. thiosulfaat de relatieve fout voor hoeveelheden van 1—0.1 mgr. ongeveer 1 % is.

Tenslotte werd nog een reeks van bepalingen uitgevoerd. Hiervoor werd gebezigd een thiosulfaatoplossing van precies 0.001 N. en een microburet volgens BANG. Deze buret heeft een totaalinhoud van 5 c.M³. Bij gebruik van een loupe is het volume tot op 0.002 c.M³. te schatten. Daar aan het einde der titratie de thio druppelsgewijs wordt toegevoegd, is het voor de nauwkeurigheid van belang de punt der buret zoo fijn te maken, dat 1 c.M³. in ongeveer 40 druppels uitvloeit.

Onderstaande tabel vereenigt de resultaten van de reeks van bepalingen op deze wijze uitgevoerd.

TABEL VII.

Titratie van verschillende hoeveelheden koper in 10 c.M³. na toevoeging van 2.5 c.M³. N. KI en 10 druppels azijnzuur.

Genomen Cu in mgr.	Gevonden Cu in mgr. gemiddeld uit duplo.	Titercijfer 0.001 N. thio,	Afwijking	
			in mgr.	in %
0.0195	0.0215	0.330 : 0.341	+ 2	+ 10
0.039	0.040	0.626 : 0.625	+ 1	+ 2,5
0.058	0.058	0.910 : 0.920	0	0
0.079	0.078	1.235 : 1.225	— 1	— 1.2
0.0975	0.965	1.511 : 1.520	— 1	— 1
0.296	0.293	4.600 : 4.613	— 3	— 1
0.492	0.486	7.648 : 7.641	— 6	— 1.2

Hieruit blijkt dus:

1^o. dat de duplo-bepalingen onderling minder dan 1 druppel (0.02 c.M³.) uit de buret van BANG verschillen.

2^o. dat bij gebruik van 0.001 N. thiosulfaatoplossing, het onderlinge verschil in een duplo-bepaling minder is dan 0.001 mgr. Cu.

3^o. dat hoeveelheden van 0.5—0.05 mgr. koper microjo-

dometrisch bepaald kunnen worden met een relatieve fout van 1 %.

Het is noodzakelijk hier te vermelden, dat bovenstaande resultaten alleen bereikt werden bij gebruik van *zeer zuivere reagentia*. Alle pogingen, die aanvankelijk werden aangewend, om bij opeenvolgende titraties van eenzelfde hoeveelheid koper overeenstemmende cijfers te verkrijgen, mislukten. Zij hebben zeer veel tijd in beslag genomen. Tenslotte bleek, dat de gebezigde reagentia (azijnzuur, zwavelzuur, loog) stoffen bevatten, die belangrijke hoeveelheden jodium konden binden. Anderzijds bleek, dat KI (Kahlbaum) door metaalverontreiniging (Cu?) in azijnzuur-oplossing jodium kon vrijmaken. Deze hoeveelheden zijn zoo klein, dat zij bij de gewone jodometrische titratie geen merkbaren invloed uitoefenen. Bij een microjodometrie echter, kunnen zij een belangrijke fout teweegbrengen. Daarom moeten hierbij alleen zuivere reagentia gebezigd worden.

Alvorens over te gaan tot de bepaling van onbekende hoeveelheden koper — teneinde toevallige afwijkingen in de omstandigheden uit te schakelen — werd bij alle latere bepalingen steeds de thio-sulfaat-oplossing van ongeveer 0.001 N. gesteld op een standaard-koper-oplossing. De latere titercijfers werden dan op het eerst-verkregene omgerekend.

De jodometrische microtitratie van koper bij aanwezigheid van ijzer.

In het begin werd reeds medegedeeld, dat er gerekend moet worden op een storing van de quantitatieve koperbepaling door ijzer, daar dit in slakkenbloed voorkomt. Behalve bij de andere methoden kan ook bij de jodometrische titratie ijzer storend werken want ferrizouten reageeren met jodiden onder vrijmaking van jodium. Er moest dus naar een middel worden gezocht om die reactie te onderdrukken, teneinde haar invloed op de quantitatieve bepaling van koper volgens bovenstaande methode, uit te schakelen.

Door toevoeging van natriumpyrophosphaat ¹⁾ werd wel het ferrizout complex gebonden, maar 1 druppel $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7$ oplossing van 5 % vertraagt de reactie van de kleine hoeveelheid Cu reeds zoodanig, dat van een nauwkeurige bepaling geen sprake meer

¹⁾ MOSER (1904).

was. Phosphorzuur daarentegen was niet in staat de reactie van het ferrizout voldoende te onderdrukken. Pogingen om het koper in zure oplossing quantitatief op een Al. plaatje neer te slaan en na wederoplossing in verdund salpeterzuur, jodometrisch te bepalen, mislukten, omdat het gebezigde zeer zuivere aluminium nog sporen Cu bevatte.

Een bevredigend resultaat werd tenslotte verkregen met toevoeging van natriumfluoride.¹⁾ Bij de bepaling van 0.1 mgr. Cu — bij aanwezigheid van evenveel ijzer — in 10 c.M³., was de passende hoeveelheid 0.6 à 0.8 c.M³. fluoride-oplossing van 0.5 %. De titratie moet echter met eenige voorzorgen worden uitgevoerd, want de reactie van het ferrizout wordt door het fluoride niet blijvend onderdrukt maar slechts vertraagd.

Daarom mag de temperatuur niet hoger zijn dan 15° C. en moet de titratie binnen 1 à 1.5 min. uitgevoerd worden. Daarna moet de oplossing minstens gedurende de daaropvolgende minuut ongekleurd blijven. Treedt de blauwe kleur binnen dezen tijd weer op, dan is er te weinig thiosulfaat toegevoegd.

De titratie, na toevoeging van natriumfluoride, heeft weliswaar de gewenschte nauwkeurigheid, maar zij vereischt veel oefening. Eveneens werden goede resultaten verkregen met de toevoeging van natriumphosfaat. (LEY 1918.)

De uitvoering van de bepaling is hier gemakkelijker dan met toevoeging van natriumfluoride, daar er geen bijzondere voorzorgen genomen behoeven te worden en de nauwkeurigheid van de titratie binnen ruime grenzen onafhankelijk is van de fosfaat-concentratie.

Zoowel met toevoeging van fluoride als met die van fosfaat konden dus ten slotte kleine hoeveelheden koper, ook naast een ferrizout, met een nauwkeurigheid tot op 1 % worden bepaald.

In het voorgaande is alleen rekening gehouden met een mogelijke storing van de koperbepaling door ferri. Bij de toepassing van de methode op de analyse van bloed was het echter niet uitgesloten, dat ook andere elementen de nauwkeurigheid van de uitkomsten konden beïnvloeden (WÖBER 1922). Daarom heb ik getracht, het koper eerst electrolytisch quantitatief af te scheiden en dit daarna microjodometrisch te bepalen.

¹⁾ Een voorstel van Dr. I. M. KOLTHOFF.

Reeds dadelijk bleek, dat bij een klemspanning van 2 Volt kleine hoeveelheden koper niet quantitatief worden afgescheiden. De hoeveelheid, die in oplossing blijft, kan bij de bepaling van grootere hoeveelheden koper verwaarloosd worden; in ons geval echter is dit niet toelaatbaar (Tabel X N^o. 1-5).

Door

- 1^o. verkleining van het volume;
- 2^o. sterk roeren van de vloeistof gedurende de electrolyse;
- 3^o. verwarming tot 70°-90° C.;
- 4^o. opvoering van de klemspanning aan het einde van de electrolyse, werd bereikt, dat van 0.1 mgr. koper praktisch alles werd afgescheiden (Tabel X N^o. 6-14).

Is de quantitative afscheiding van zeer kleine hoeveelheden koper betrekkelijk gemakkelijk, moeilijker is deze te bereiken als in de vloeistof ook ijzer aanwezig is. De moeilijkheid ligt nl. hierin, dat bij een klemspanning beneden 3 Volt het koper niet quantitatief wordt afgezet — waarschijnlijk onder invloed van het aanwezige ijzer —, terwijl boven 3 Volt, behalve het koper, ook ijzer, op de kathode wordt afgescheiden (Tabel XI en XII).

Teneinde een volledige afscheiding van het koper te bereiken, kon niet worden afgezien van een opvoering der klemspanning aan het einde der electrolyse. Daarom werd besloten de jodometrische bepaling van het afgescheiden koper steeds na toevoeging van fluoride of fosphaat uit te voeren, opdat eventueel mede-afgescheiden ijzer de bepaling niet zou storen.

De hierboven beschreven methode werd tenslotte op de bepaling van koper in slakkenbloed toegepast.

Beschrijving van de opstelling (Zie fig. 2 en 3).

Een cylindertje van platinagaas, 3 c.M. lang en 1 c.M. in doorsnee, wordt als kathode gebezigd. Teneinde contact met den wand van het electrolysevat te vermijden, is de kathode aan den boven- en onderrand voorzien van glaskraaltjes. Als anode dient een platina-draad, die in het vaatje is vastgesmolten.

Het electrolysevat — gemaakt van een reageerbuisje — bevat meestal 6 c.M³. electrolyse vloeistof. Door een aangesmolten zijbuisje wordt langzaam lucht in het vat geblazen om de vloeistof

stof te roeren. Dit is noodzakelijk voor een snelle en volledige afscheiding van het koper.

Teneinde de temperatuur van de vloeistof te kunnen regelen, is het electrolysevat gedompeld in een glazen waterbad, dat door een heeteluchtbrander op 70° - 90° C. wordt gehouden. De vloeistof mag

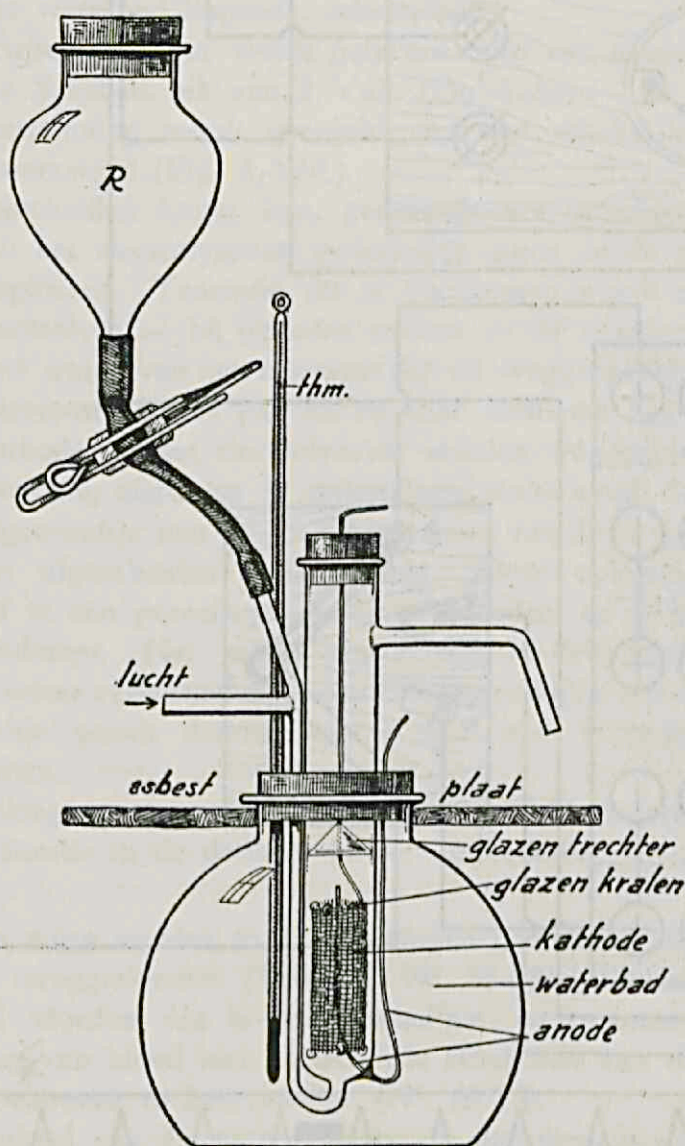


Fig. 2

niet koken, daar anders licht verlies door overkoken wordt veroorzaakt. Teneinde spatjes, die door de opstijgende gasbellen meegenomen worden, op te vangen en weer in de vloeistof terug

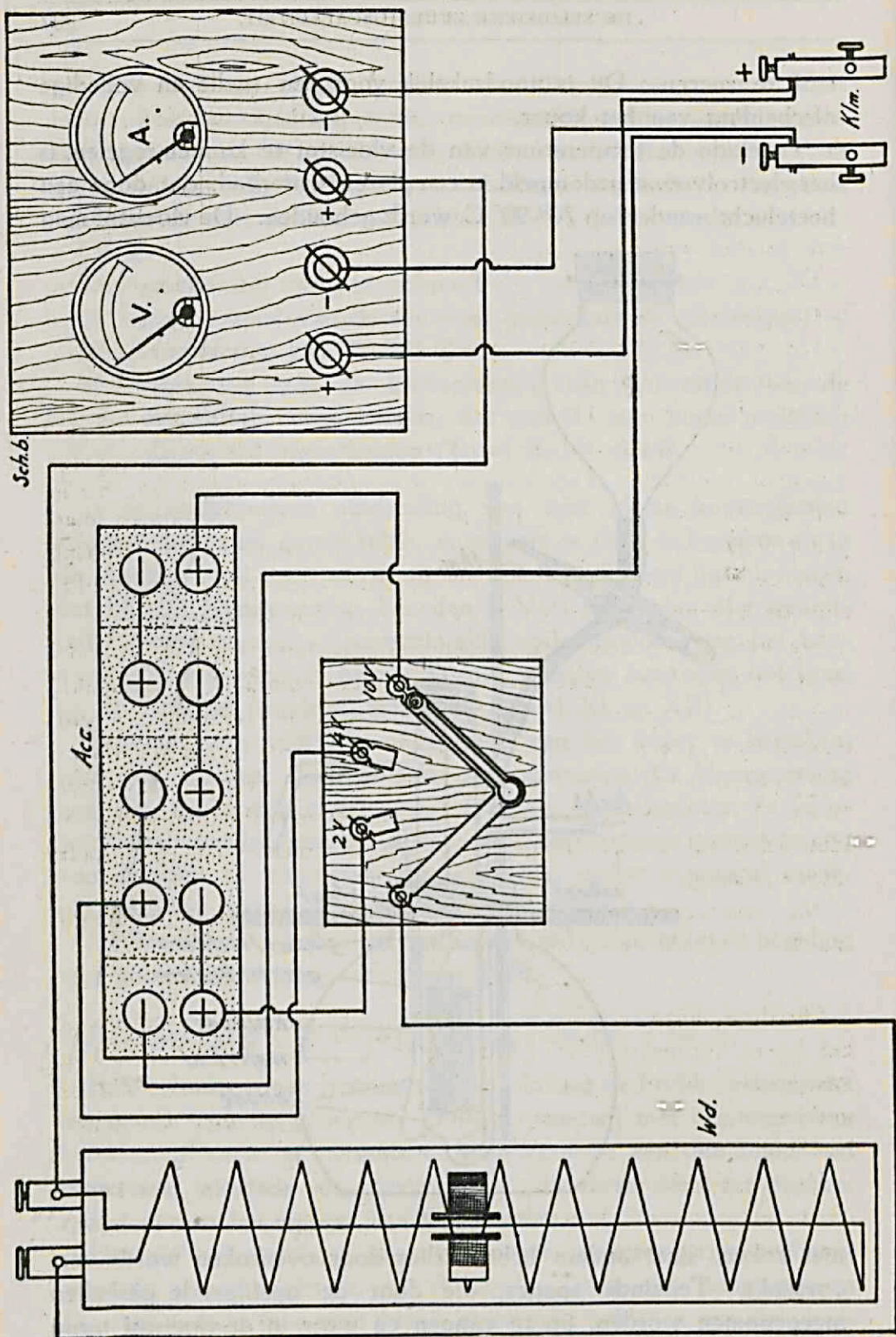


Fig. 3
28

te brengen, is een glazen trechtertje ongeveer 1 c.M. boven den vloeistofspiegel vastgesmolten aan de platinadraad van de kathode, die door het kurkje loopt, dat het electrolysevat van boven afsluit.

Het bovengedeelte van het electrolysevat, waarin de waterdamp condenseert, wordt tegen de opstijgende warmte beschermd door een, op het waterbad liggende, asbestplaat.

De elektrische stroom wordt geleverd door een accumulatoren batterij van 5 cellen, elk van 2 Volt. (Fig 3 Acc.)

De klemspanning wordt geregeld met den schakelaar en met den schuifweerstand (Fig. 3 Wd.)

Het afgescheiden koper kan, gedurende het uitlichten van de kathode uit het electrolysevat, gedeeltelijk weer in de zure rest-vloeistof oplossen. Teneinde dit te voorkomen wordt na afloop van de electrolyse — bij gesloten stroom — de moederloog met gedestilleerd water van het reservoir (R) uit weggespoeld. Hierbij daalt de stroomsterkte en pas als zij haar minimum heeft bereikt, mag de kathode uit het electrolysevat worden weggenomen.

Na voorzichtig afspoelen in gedestilleerd water wordt de kathode in een reageerbuisje met warm salpeterzuur van 25 % gedompeld, waarin het afgescheiden koper oplost. Deze oplossing wordt quantitatief in een porceleinen schaalte gegoten, en op het waterbad ¹⁾ afgedampt. Het residu wordt met 10 druppels azijnzuur en 2 c.M³. water verwarmd en in een Erlemeyer-kolfje overgebracht. Het schaalte wordt daarna nog 2 maal met 1-2 c.M³. water uitgewassen.

Na toevoeging van fosphaat, KI en 1 c.M³. stijfseloplossing wordt de titratie in de donkere kamer uitgevoerd.

Op deze wijze werden in 13 bepalingen gemiddeld 98.5% van het koper teruggevonden. (Tabel XII N^o. 56-68). Bovendien kon vastgesteld worden dat bi- en pyrosulfaat, welke ontstaan door verbranding van bloed met H₂SO₄, de resultaten van de electrolyse niet behoeven te beïnvloeden. (N^o. 69-73).

De exactheid van de methode voor de microbepaling van koper bleek ten slotte uit de resultaten van een analyse van drie mengsels van zouten, samengevat in onderstaande tabel.

¹⁾ Om fouten te voorkomen niet van koper maar van geëmailleerd ijzer.

TABEL VIII.

Microjodometrische bepaling van koper in een mengsel van zouten.

N ^o .	Toegevoegd.	Klemspanning en Tijd.	Temp.	Gevonden koper.	Samenstelling v/h. mengsel.
1	1 druppel 4 N. H ₂ SO ₄ 2 druppels 4 N H NO ₃ 20 mgr. ureum.	3 Volt gedurende 15 min. 4 " " 10 " 9.5 " " 10 "	75°	0.100 mgr. (titratie na toevoeging van Na F oplossing).	0.1 mgr. Cu 0.1 " Fe 0.1 " Pb 0.4 " Zn 0.1 " Mn 0.02 " As
2	als bij 1.	3.2 Volt gedurende 25 min.	75°	0.099 mgr. (titratie zonder toevoeging van Na F oplossing).	0.1 mgr. Cu 0.1 " Fe 0.2 " Pb 0.3 " Zn 0.2 " Mn 0.01 " As
3	als bij 1.	3.2 Volt gedurende 20 min.	75°	0.0995 mgr. zonder Na F	0.1 mgr. Cu 0.1 " Fe

Verassing van het bloed.

Voor de mineralisatie van organische stoffen worden verschillende methoden aanbevolen ¹⁾.

Bij verbranding in een platinakroes met toevoeging van sterk zwavelzuur is het zeer noodzakelijk, dat er voortdurend toezicht gehouden wordt. Geschiedt dit niet, dan ontstaat zeer licht verlies door spatten of door over den rand loopen van het zwavelzuur.

Bij drooge verassing moet de vlam zoodanig geregeld worden dat de hitte niet te klein of niet te groot is, in beide gevallen blijft de verbranding dan onvolkomen. Veel sneller en zekerder verloopt de destructie van organisch materiaal in een Kjeldahlkolf met toevoeging van een mengsel van gelijke deelen zwavelzuur en salpeterzuur.

Teneinde condensatie van de zure dampen in den hals van de kolf — en daarmee den duur van de verbranding — tot een minimum te beperken, wordt door een rechthoekig omgebogen glazen buis een sterke luchtstroom in den bol van de kolf geblazen. ²⁾

¹⁾ Lockemann. ²⁾ Pregl.

De verwarming van de kolf geschiedt het best met een heetelucht-brander. De vlam wordt in het begin zeer laag gehouden want de vloeistof kan zeer licht stooten. De destructie kan dan aan zichzelf worden overgelaten. Na eenigen tijd, als de witte dampen van zwavelzuur zich ontwikkelen, moet de vlam hoog worden opgedraaid, daar anders de verbranding onvolledig blijft. Teneinde de laatste resten zwavelzuur te verdrijven, moet ook de hals van de kolf worden verhit. Is na verdrijving van het zuur het residu in de kolf nog niet geheel ontkleurd, dan moet opnieuw zuur worden toegevoegd. Dit is echter zelden het geval.

Op deze wijze kunnen eenige c.M³. bloed, met een dubbele hoeveelheid zwavelzuur en evenzooveel salpeterzuur in één keer toegevoegd, bij een passende grootte van de vlam, bijna geheel zonder toezicht in $\frac{3}{4}$ uur volkomen worden verascht.

Door 3 maal uitwasschen met telkens 2 c.M³. warm gedestilleerd water wordt de asch in het electrolysevat overgebracht en na toevoeging van 1 druppel 4 N. zwavelzuur, 1 druppel 4 N. salpeterzuur en 20 mgr. ureum geëlectrolyseerd.

Microjodometrische koperbepaling in asch van slakkenbloed.

Tenslotte werd de microjodometrische titratie toegepast bij de bepaling van de hoeveelheid koper in 2 c.M³. slakkenbloed. Daarbij werd in 3 bepalingen het koper electrolytisch afgescheiden, daarnaast in 3 andere de electrolyse achterwege gelaten. In dit laatste geval werden hogere titercijfers verkregen. Naderhand werd hetzelfde nogeens gedaan met een andere hoeveelheid slakkenbloed maar bij de bepaling zonder electrolyse werd de sulfaatasch eerst geneutraliseerd met natronloog en daarna pas getitreerd. Ook hier werden zonder electrolyse hogere cijfers verkregen.

Dat de resultaten der directe titraties hooger zijn dan die verkregen na electrolyse kon niet verklaard worden door aanwezigheid van ijzer. Bij de bepalingen werd fluoride toegevoegd. Wel is mogelijk, dat de aanwezigheid van veel alkalizouten de directe titraties heeft beïnvloed. Slakkenbloed bevat zeer veel Ca en Na, die door de electrolyse van de asch verwijderd worden. In elk geval stemmen de resultaten van de triplobepalingen onderling goed overeen. (Vgl. Tabel IX).

TABEL IX.

Microjodomometrische bepaling van koper in asch van 2 c.M³.
slakkenbloed. (*Helix pomatia*).

Datum.	Gevonden koper na electrolyse.	Gevonden koper zonder electrolyse.	Opmerkingen.
5-IV-'23	0.127 mgr. 0.127 „ 0.127 „	0.134 mgr. 0.134 „ 0.134 „	Bij de directe titratie was de sulfaatasch niet geneutraliseerd.
7-V-'23	0.129 mgr. 0.129 „ 0.129 „	0.133 mgr. 0.140 „	Sulfaatasch vóór de titratie met loog geneutraliseerd.

2. BEPALING VAN DE ZUURSTOF.

Voor de bepaling van de hoeveelheid zuurstof, die in het bloed aanwezig is, bestaan twee methoden:

1^e een chemische,

2^e een fysische.

De eerste is de titratie volgens SCHÜTZENBERGER & RISLER (1873¹).

Deze methode, berustende op de sterk reduceerende eigenschappen van natriumhydrosulfit ($\text{Na}_2 \text{S}_2 \text{O}_4$), is oorspronkelijk bedoeld voor de bepaling van vrije zuurstof in waterige oplossingen. Naderhand is echter deze titratie door SCHÜTZENBERGER & RISLER (1873²) toegepast bij de bepaling van het zuurstofgehalte van runder- en hondenbloed.

Eveneens hebben CUÉNOT (1892), HEIM (1892), DHÉRE (1900) e.a. zich er van bediend bij hun onderzoekingen omtrent het zuurstofbindingsvermogen van het bloed van Mollusca en Crustaceae.

Het is echter duidelijk, dat de methode niet alleen voor de bepaling van het zuurstofgehalte van water¹⁾ onvoldoende is, maar ook, dat bij de titratie van de zuurstof in bloed²⁾ onbetrouwbare cijfers werden verkregen.

Terecht waarschuwt WINTERSTEIN (1909) dan ook voor het gebruik van de zuurstoftitratie volgens SCHÜTZENBERGER in een chemisch niet verder bekende vloeistof.

¹⁾ Cuénot 1892. ²⁾ Schützenberger 1873.

TABEL X.

Electrolytische afscheiding van 0.1 mgr. in 6 c.M³. oplossing met 0.5 c.M³. 4 N. zwavelzuur bij verschillende tijdsduur en klemspanning.

N ^o .	Klemspanning in Volt.	Stroomsterkte in Ampère.	Duur in minuten.	Temp. der oplossing.	Door titratie teruggevonden hoeveelheid Cu in %.	Datum.	Opmerkingen.
1	2	0.017	120	75° C.	99	15-I-'23	Kathode onbeschermd.
2	"	"	"	" "	87	"	" "
3	"	"	"	" "	88	"	" "
4	"	"	"	" "	91	"	" "
5	"	0.010-0.003	180	" "	71	13-III-'23	Kathode met glaskralen.
6	3.4	"	120	" "	100	22-I-'23	" " "
7	3.8	"	"	" "	100	"	" " "
8	"	"	"	" "	100	"	" " "
9	4	0.025	60	95° "	90.5	19-II-'23	} Bij deze spanning is de tijd blijkbaar te kort.
10	"	"	"	" "	88.5	"	
11	"	"	180	70° "	95	12-III-'23	
12	5.8	"	17	95° "	96	26-II-'23	
13	"	"	20	" "	95	"	" " "
14	7.75	"	25	70° "	100	9-III-'23	" " "

TABEL XI.

Electrolytische afscheiding van 0.1 mgr. Cu in 6 c.M³. oplossing bij aanwezigheid van ijzer bij verschillende tijdsduur en klemspanning in zwavelzure oplossing.

N ^o .	Klemspanning in Volt.	Stroomsterkte in Ampère.	Toegevoegd.	Duur in minuten.	Temp. der oplossing.	Door titratie teruggevonden hoeveelheid Cu in %.	Datum.	Opmerkingen.
15	3	0.025	2 dr. sterk H ₂ SO ₄	120	80° C.	82.5	29-I-'23	Ijzer mede afgescheiden.
16	"		0.5 c.M ³ . 4 N. H ₂ SO ₄	"	" "	86	30-I-'23	
17	"		"	"	" "	88.5	"	
18	"		"	"	" "	89	"	
19	3.2		2 dr. sterk H ₂ SO ₄	"	" "	104	29-I-'23	
20	"		0.5 c.M ³ . 4 N. H ₂ SO ₄	90	95° "	80	8-II-'23	
21	"		"	105	" "	87	"	
22	3.8		"	120	80° "	110	24-I-'23	
23	"		"	"	" "	107.5	"	
24	"		geen zuur	"	" "	140	"	
25	4	"	0.5 c.M ³ . 4 N. H ₂ SO ₄	60	95° "	87.5	23-II-'23	" " "
26	"		"	45	" "	92.5	23 "	
27	"		"	270	" "	85	19 "	
28	5.8		0.3 c.M ³ . 4 N. H ₂ SO ₄	20	" "	89.5	26 "	
29	"		0.5 "	30	" "	89	27 "	
30	7.3		"	15	80° "	95	6-III-'23	
31	"		"	25	75° "	103	"	
32	"		"	25	" "	103	"	
33	7.5		"	20	95° "	100	2-III-'23	
34	"		"	150	80° "	175	"	
35	7.75	"	"	15	70° "	97	9 "	Door spatten iets verloren.
36	"		"	20	65° "	105	8 "	Ijzer mede afgescheiden.
37	"		"	20	" "	104	8 "	" " "

TABEL XII.

Electrolytische afscheiding van 0.1 mgr. Cu in 6 c.M³. oplossing bij aanwezigheid van ijzer bij verschillende tijdsduur en klemspanning in een mengsel van zwavelzuur en salpeterzuur.

N ^o .	Klemspanning in Volt.	Stroomst. in Amp.	Toegevoegd.	Duur in min.	Temp. der oplossing.	Door titratie terug- gevonden Cu in %.	Datum.	Opmerkingen.
37 _a	1.8	2.8	1 c.M ³ . 4 N. HNO ₃	240	75° C.	8.5	21-III-'23	Titraties met toevoeging van Na F.
38	2.0		1 c.M ³ . 4 N. HNO ₃ + 3 dr. 4 N. H ₂ SO ₄	390	90° "	92	20-III "	
39	3.0		0.3 c.M ³ . 4 N. H ₂ SO ₄ + 0.1 c.M ³ . 4 N. HNO ₃	150	80° "	100	31-I "	
40	3.0		" "	90	95° "	99.7	5-II "	
41	3.0		" "	90	95° "	90.5	" "	
42	3.0		" "	210	" "	83	" "	
43	3.0		" "	180	80° "	94.5	21-III "	
44	3.0		" "	330	" "	92	22 " "	
45	3.0		0.5 c.M ³ . 4 N. H ₂ SO ₄ + 1 dr. 4 N. HNO ₃	360	" "	91	23 " "	
46	5.0		" "	20	75° "	95	5-IV "	
47	6.0	0.8	" "	20	" "	95	" "	Titratie zonder toevoeging van Na F.
48	7.0		" "	20	" "	100	4 " "	
49	7.0		" "	20	" "	100	" "	
50	7.0		" "	30	" "	95	9 " "	
51	7.5		" "	17	" "	92.5	4 " "	
52	8.0		" "	15	80° "	91	27-III "	
53	8.0		" "	20	" "	84.5	28 " "	
54	8.0		" "	20	" "	97.5	28 " "	
55	8.0		" "	20	75° "	92.5	4-IV "	
56	20' met 3 Volt en 10' met 8 Volt		" "	30	65° "	100	10 " "	
57	" "	1	" "	" "	" "	105	" "	Titratie zonder toevoeging van Na F.
58	" "		" "	" "	" "	97	" "	
59	" "		" "	" "	" "	96.5	" "	
60	5'-3 V.; 20'-4 V.; 35' met 8 V.		" "	60	70° "	100	12 " "	
61	" " " " " " 6 "		" "	60	" "	100	" "	
62	15'-3.8 V.; 30'-7 V.		" "	45	65° "	100	" "	
63	20'-3 V.; 5'-4 V.; 30'-8 V.		" "	55	70° "	95 0/0	13 " "	
64	15'-4 Volt en 20'-8 Volt.		" "	35	70° "	95 0/0	" "	
65	" en 30' "		" "	45	" "	99	" "	
66	" "		" "	" "	" "	100	" "	
67	" "	0.02	" "	" "	" "	100	" "	Fout door spatten. Na F.
68	" "		" "	" "	" "	97 0/0	" "	
69	3.4		12 mgr. bisulf. + 12 mgr. pyrosulf. + 1 dr. 4 N. HNO ₃ .	35	85° "	104	4-V "	
70	3.1		" "	" "	75° "	100	7 " "	
71	3.9		1 dr. 4 N. H ₂ SO ₄ + 1 dr. 4 N. HNO ₃	50	75° "	100	9 " "	
72	3.0		bisulf. + pyrosulf. + 1 dr. 4 N. HNO ₃	15	75° "	100	" "	
73	2.7		" "	85	" "	93	7 " "	
								De spanning dus te laag (Na F).

Ware er een stof bekend, die bij toevoeging aan het bloed uit het haemocyanine quantitatief de O_2 verdreef, evenals ferricyanide dit uit haemoglobine doet, dan zou een pressimetrische zuurstofbepaling in het bloedgas-apparaat volgens BARCROFT (1914) groot gemak hebben opgeleverd; thans was ik aangewezen op de physische methode nl. de extractie van de zuurstof in het vacuum van een kwikpomp.

A. DE KWIKPOMP.

Het spreekt vanzelf, dat voor het uitpompen van bloed en in 't algemeen van organische vloeistoffen niet elke kwikpomp geschikt is.

Voor het onderzoek van bloedgassen der Vertebraten zijn door zeer verschillende onderzoekers pompen geconstrueerd, maar ten slotte hebben slechts enkele vormen dezer apparaten zich weten te handhaven.

Een volledig en kritisch overzicht der verschillende soorten van pompen vindt men bij BOHR in Tiegerstedt's Handb. d. physiol. Methodik, Bd. 2, 1^e Hälfte.

Heeft men eenmaal een kwikpomp met goede kranen en glazen verbindingen, die langen tijd een vacuum kan behouden, dan kan daarmee practisch elke gewenschte hoeveelheid bloed worden uitgepompt.

Met een reeks van verschillende pipetten, elk voor een bepaalde hoeveelheid, kan men dan het bloed in de pomp brengen. Een groote kwikpomp volgens ZUNTZ stond mij ter beschikking. Wat de werking betreft zou deze hebben voldaan aan de daaraan te stellen eischen, doch door de constructie heeft het gebruik van deze groote kwikpomp verschillende nadeelen:

1^e. Het is een ingewikkeld toestel, geheel van glas vervaardigd en dus zeer breekbaar.

2^e. Het gebruik is zeer omslachtig en tijdroovend. Er moet eerst een volledig vacuum worden verkregen; daarna moet een pipet gevuld met bloed aan de pomp bevestigd en gevacueerd worden, terwijl het bloed onderwijl verwarmd en geschud moet worden. Vooral dit laatste moet voorzichtig geschieden, teneinde de pomp niet te beschadigen.

Het verzamelde gas moet dan uit de buret in een gasanalyse-

toestel worden overgebracht, teneinde het volume en de samenstelling daarvan te bepalen.

Tegen deze nadeelen weegt het voordeel, de groote exactheid, niet op.

Daarom werd overgegaan tot het gebruik van de kwikpomp volgens VAN SLYKE (1917), die vooral in Amerika algemeen in gebruik is gekomen bij onderzoekingen van bloedgassen. Dit toestel is oorspronkelijk bedoeld voor de bepaling van CO_2 in bloedplasma van den mensch. Daarna is het ook gebezigd voor de bepaling van het zuurstofgehalte en van het zuurstofbindingsvermogen van het bloed. Het is er op ingericht om 1—3 c.M³. bloed uit te pompen en het verkregen gas, 300—800 m.M³., met een nauwkeurigheid tot gemiddeld 1,5 % te meten.

De absolute nauwkeurigheid gaat dus tot 7 m.M³., doch dit is voor mijn doel, het meten van ongeveer 50 m.M³., niet voldoende.

De nauwkeurigheid waarmee het gasvolume, dat bij de extractie verkregen is, kan worden afgelezen, is afhankelijk van de nauwkeurigheid, waarmee het kwikniveau buiten en binnen in het toestel op gelijke hoogte kan worden gebracht.

Dit wordt nog bemoeilijkt, doordat binnen in het toestel steeds een deel der uitgepompte vloeistof op het kwik blijft drijven; ook al tracht men de vloeistof vóór de meting zoo nauwkeurig mogelijk weg te vangen. Teneinde de aflezing van het volume met grooter nauwkeurigheid mogelijk te maken, hebben VAN SLIJKE & STADIE (1921) later het oorspronkelijke toestel gewijzigd door de ruimte waarin 't gas gemeten wordt langer en nauwer te maken.

Nog grooter verbetering bereikten zij door bij kleine hoeveelheden gas de aflezing bij verminderden druk uit te voeren (260 m.M. Hg.).

Niettegenstaande deze verbeteringen, zag ik er van af de opgevangen gasen in de pomp zelf te meten, daar het in evenwicht brengen der kwikniveau's binnen en buiten het apparaat niet gemakkelijk was.

Na aan het oorspronkelijke toestel van VAN SLIJKE eenige veranderingen te hebben aangebracht, gebruikte ik het alleen om daarmee de vloeistoffen uit te pompen.

De verkregen gasen werden uit de pomp boven kwik opge-

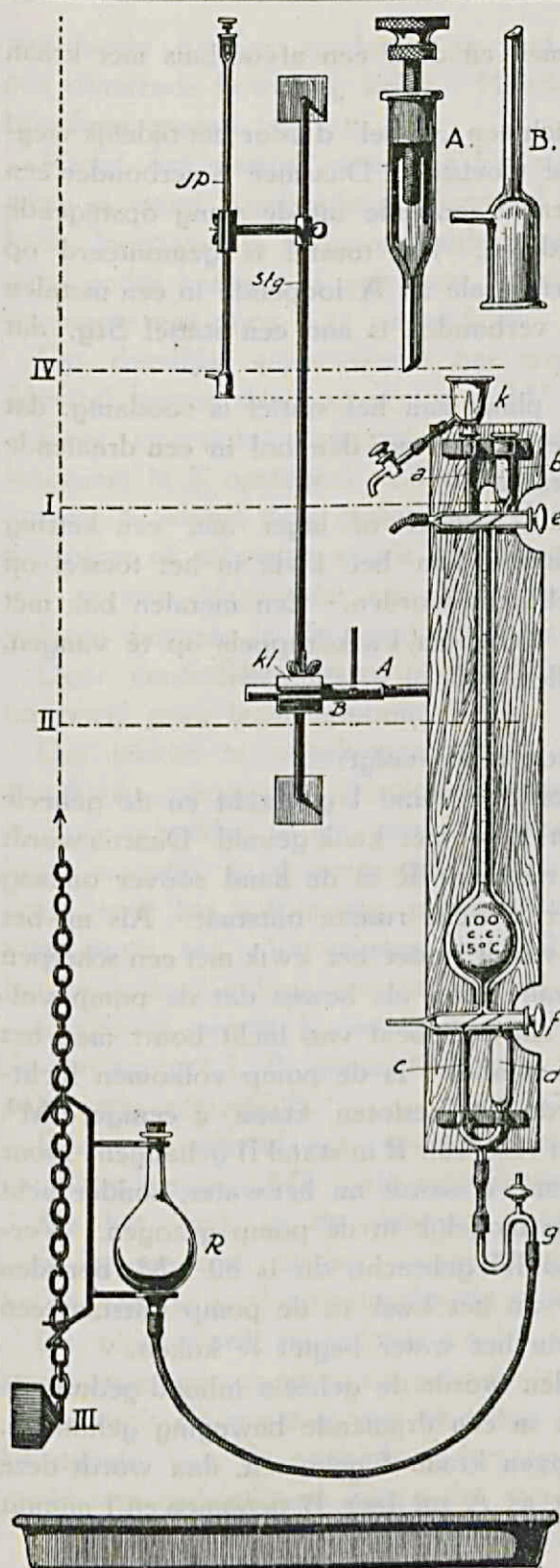


Fig. 4

vangen, in een geschikte capillaire buis opgenomen en daarin gemeten en geanalyseerd.

Beschrijving van het apparaat (zie fig. 4).

De pomp heeft een inhoud van 100 c.M³.; op de buret behoeft geen verdeling te worden aangebracht, de beide driewegkranen e en f zijn elk 7 c.M. lang en zeer nauwkeurig geslepen.

De oorspronkelijke kranen waren te kort en lekten, zoodra het kranenvet vochtig was geworden. De kraanmantel loopt uit in een bolletje, dat uitgepompt en dichtgesmolten kan worden; hierdoor wordt het lekken volkomen uitgesloten.

Het buisje b heeft een inhoud van 6 c.M³. De capillaire buis a, in het oorspronkelijke toestel naar beneden omgebogen en bestemd voor het verwijderen van de uitgepompte vloeistoffen, is in ons toestel gebezigd om de verkregen gassen boven kwik te kunnen opvangen. Zij is daartoe voorzien van een kelkje K, dat gemak-

kelijk kan worden afgenomen en door een afvoerbuis met kraan kan worden geledigd.

Onder kraan **f** bevindt zich een „wissel” **d** voor het tijdelijk wegvangen van de uitgepompte vloeistof. Daarmee is verbonden een „fuik” **g** van glas, aangebracht teneinde uit de slang opstijgende gasbellen te kunnen verwijderen. Het toestel is gemonteerd op een plank en heeft een horizontale as **A** loopende in een metalen buis **B**, die door een klem verbonden is aan een statief **Stg**, dat aan den muur is bevestigd.

De verbinding van de plank aan het statief is zoodanig, dat bij voorzichtig schudden de inhoud van den bol in een draaiende beweging kan worden gebracht.

Een kwikreservoir **R** kan hooger of lager aan een ketting worden vastgehaakt. Daarmee kan het kwik in het toestel op elke gewenschte hoogte gebracht worden. Een metalen bak met water, onder het toestel, dient om kwikdruppels op te vangen, als ze uit het apparaat vallen.

De gang van een extractie is als volgt:

Het kwikreservoir **R** wordt in stand I gebracht en de geheele pomp — ook de buis **a** en **b** — met kwik gevuld. Daarna wordt kraan **e** gesloten en het reservoir **R** in de hand zóóver omlaag gebracht, dat er een Torricellische ruimte ontstaat. Als nu het reservoir weer opgeheven wordt, moet het kwik met een scherp metaalklank tegen de kraan slaan als bewijs dat de pomp volkomen luchtledig is. Bij aanwezigheid van lucht hoort men het scherpe geluid niet of veel minder. Is de pomp volkomen luchtledig bevonden, dan wordt bij gesloten kraan **e** eenige c.M³. water in **b** gebracht en het reservoir **R** in stand II gehangen. Door voorzichtig openen van kraan **e** wordt nu het water, zonder lucht toe te laten, zoo volledig mogelijk in de pomp gezogen. vervolgens wordt **R** in stand III gebracht, dit is 80 c.M. beneden kraan **f**. Door het dalen van het kwik in de pomp ontstaat een Torricellische ruimte, waarin het water begint te koken.

Door voorzichtig schudden wordt de geheele inhoud gedurende het zakken van het kwik in een draaiende beweging gehouden. Is het kwikniveau even boven kraan **f** gekomen, dan wordt deze gesloten en het toestel met as **A** uit buis **B** genomen en 1 minuut

met beide handen zoodanig geschud, dat het water in den bol een draaiende beweging krijgt. Hierdoor komen de in het water opgeloste gassen vrij.

Nadat het toestel weer aan het statief bevestigd is, wordt **R** weer in stand I gebracht en kraan **f** zóóver geopend, dat het kwik langzaam in de pomp omhoog stroomt. Zoodra het water even onder kraan **e** is gekomen, wordt deze geopend om het uitgepompte gas door **b** te verwijderen.

Op dezelfde wijze wordt het water nog eens uitgedompt. Meestal komen dan nog eenige $m.M^3$. gas vrij.

Door voorzichtig openen van kraan **e** laat men het water nu langzaam in **b** opstijgen. Zoodra eenig kwik boven de kraan gekomen is, wordt deze gesloten en **R** in stand II geplaatst. Met een pipet of saturator wordt vervolgens de te onderzoeken vloeistof in een laag onder het uitgepompte water gebracht en vervolgens daarmee in de pomp opgenomen.

Door contrôlebepalingen is gebleken, dat het afsluitende water onderwijl geen lucht opneemt.

Om lekken te voorkomen wordt nu de boring van kraan **e** met kwik „verzegeld”. De vloeistof wordt, zooals boven beschreven is, door schudden in het toestel uitgedompt en vervolgens zoo volledig mogelijk in **d** overgebracht; om dit gemakkelijk te kunnen doen loopt het buisvormig gedeelte van de pomp boven kraan **f** zeer nauw toe. Vervolgens wordt **R** in stand IV gehangen en het kwik door **c** langzaam in den bol toegelaten.

Onderwijl wordt **k** met kwik gevuld en daarin het kelkje van de Jordanpipet **J. P.** gedompeld, echter zoodanig, dat geen luchtbel daarin achterblijft.

Door de schroef een weinig omhoog te draaien wordt in de capillaire eenige $c.M^3$. kwik opgenomen.

Als het kwik in de pomp tot **e** gestegen is, wordt de kraan naar **a** geopend en het verkregen gas, door deze heen, in het kelkje van de Jordanpipet gebracht en in de capillaire opgeschroefd.

De pipet wordt vervolgens uit het kwikbekertje gelicht en het opgenomen gas gemeten en geanalyseerd.

Teneinde de werking van de pomp te controleeren en de nauwkeurigheid van de methode te bepalen, werd het gasgehalte bepaald van gedestilleerd water, dat met lucht verzadigd was.

De volgende resultaten werden daarbij verkregen:

TABEL XIII.

Gasgehalte van 2 c.M³. gedestilleerd water verzadigd met lucht bij verschillende temperaturen en luchtdruk.

Datum.	Barom. (gecorrigeerd).	Temp. gedest. water in gr. C.	Temp. badw. in gr. C.	Lengte gasbel in m.M.	Inhoud capill. per m.M.	Vol. gasbel gered. tot 0° en 760 m.M. droog in m.M ³ .	2 c.M ³ . gedestilleerd water bevat volgens de tabellen van Fox			Afwij- king in m.M ³ .
							O ₂	N ₂	CO ₂	Totaal.
26-IV-23	750.7	14.7	14.5	86.5	0,550	$47.6 \times 0.923 = 43.9$	14.3	27.2	0.6	42.1
	750.0	14.8	14.5	80.5	"	$48.7 \times 0.922 = 44.9$	14.3	27.2	0.6	42.1
	749.0	15.1	14.7	84.0	"	$46.2 \times 0.919 = 42.4$	14.3	27.0	0.6	41.9
	748.0	15.4	14.8	87.0	"	$47.8 \times 0.918 = 43.9$	14.1	26.8	0.6	41.5
28-IV-23	750.1	12.1	11.8	84.5	"	$46.5 \times 0.933 = 43.4$	15.1	28.4	0.7	44.2
	750.0	13.0	12.2	88.5	"	$48.7 \times 0.931 = 45.3$	14.8	27.8	0.6	43.2
	749.8	14.0	13.0	86	"	$47.3 \times 0.928 = 40.9$	14.5	27.4	0.6	42.5
	749.2	15.1	13.9	86.5	"	$47.6 \times 0.923 = 44.0$	14.3	27.0	0.6	41.9

Voor de reductie van met waterdamp verzadigde gasvolumina tot 0° C. droog en 760 m.M. druk werd gebruik gemaakt van de tabellen van T. M. Carpenter (1921).

Hieruit blijkt:

1^e dat er uit het gedestilleerde water meer gas werd verkregen, dan de nauwkeurige tabellen van FOX (1907-1909) aangeven; of het CO₂-gehalte van de laboratoriumlucht daarvoor aansprakelijk was, weet ik niet;

2^e dat de afwijking voor 2 c.M³. gedestilleerd water gemiddeld 1.5 m.M³. is;

3^e dat in deze gevallen weliswaar een mogelijke fout van + 2.8 m.M³. op 45 m.M³. kan optreden, maar dat bij het onderzoek van bloed deze verhouding veel gunstiger is, aangezien daarbij grotere gasvolumina verkregen worden;

4^e dat deze opstelling dus aan de gestelde eischen voldoet, daar de bereikte nauwkeurigheid voldoende is.

B. METING EN ANALYSE VAN DE OPGEVANGEN GASSEN.

Teneinde de uitgepompte gassen nauwkeurig te meten en te analyseeren, werden bij de kwikpomp 4 verschillende gaspipetten volgens JORDAN (1920) gebezigd, 40 c.M. lang verdeeld in m.M. met capillairen van verschillende wijden, varieerend van 0.8 tot 2 m.M. diameter. (Zie fig. 4, A en B).

Het kelkje is zoodanig aan de capillaire gesmolten, dat er geen verwijding heeft plaats gehad; daardoor wordt voorkomen, dat bij het dompelen van het kelkje in kwik, in de monding van de capillaire een luchtbelletje achterblijft, dat niet te verwijderen is. Het kelkje is 1.2 c.M. in doorsnede en 3 c.M. lang en heeft een zijbuisje, dat daar loodrecht op staat. Als de pipet voor het opvangen van het uitgepompte gas verticaal staat, kan door dit zijbuisje geen gas ontsnappen.

Voor het opzuigen van het te analyseeren gas is een stalen schroef met kleinen spoed in een buis aan de capillaire bevestigd. Hierdoor kan het opzuigen van een gasbel zeer regelmatig geschieden, wat noodig is voor een zuivere meting. Voor het constant houden van de temperatuur van de gasbel werd een bak van aluminium gebezigd, zoover gevuld met water, dat het kelkje daarin verticaal ondergedompeld kan worden. Er is dan zóóveel water aanwezig, dat de temperatuur in dezen bak gedurende een analyse practisch niet verandert.

Als absorbeerende vloeistof voor CO₂ werd gebruikt een KOH

oplossing van 10 %, voor O_2 een oplossing van de volgende samenstelling:

5 deelen seignettezoutoplossing van 30 %,

1 deel ferrosulfaatoplossing van 40 %,

1 deel KOH oplossing van 60 %.

Deze oplossingen moeten samengevoegd worden in de hierboven gegeven volgorde, daar er anders een onoplosbaar neerslag ontstaat, dat de vloeistof onbruikbaar maakt.

Deze zuurstof absorbeerende vloeistof verdient de voorkeur boven het meer gebruikelijke alkalische pyrogalol, omdat ze helder en doorzichtig is en men gedurende de absorptie de gasbel kan blijven waarnemen.

Om het kelkje met absorptievloeistof te vullen wordt het afgesloten met een gummistop, waardoorheen een glazen buisje loopt voorzien van een kraan. Dit buisje wordt in de vloeistof gedompeld. Men verlengt het zijbuisje met een capillaire en zuigt eraan, de absorbeerende vloeistof loopt dan in het kelkje.

Als dit geheel gevuld is en geen luchtbellen daarin zijn achtergebleven, sluit men het kraantje.

De gasbel wordt nu uit de capillaire in het gevulde kelkje geschroefd en daarin flink geschud. Men zorg ervoor, dat daarbij geen lucht door het zijbuisje van de kelk kan toetreden.

Het CO_2 wordt bijna onmiddellijk, de O_2 in ongeveer 1 minuut volkomen weggenomen. Door eenige keeren de gasbel in en uit te schroeven, overtuige men zich, dat de absorptie volledig is geweest.

Teneinde de nauwkeurigheid der metingen in de capillaire niet te beïnvloeden, zorg men ervoor, dat daarin geen absorptievloeistof wordt opgenomen. Zeer belangrijk is ook, dat het op- en neerschroeven langzaam en zeer regelmatig geschiedt en dat de capillaire bij de aflezing op een spiegel wordt gelegd teneinde de parallactische fout te vermijden.

Teneinde den graad van nauwkeurigheid van analyses met de Jordanpipet te bepalen, werden verschillende hoeveelheden lucht daarmee geanalyseerd. De resultaten zijn in onderstaande tabel vereenigd.

TABEL XIV.

Analyse van atmosferische lucht met de Jordanpipet.

Inhoud van de capillaire per m.M.	Oorspronkelijke lengte der luchtbel in m.M.	Lengte na O ₂ abs. in m.M.	Geabsorbeerde O ₂ in m.M.	O ₂ gehalte in %.	N ₂ gehalte in %.
0.853 m.M ³ .	256.0	202.5	53.5	20.9	79.1
	227.5	179.0	47.5	20.9	79.1
	243.0	192.5	50.5	20.8	79.2
	211.0	167.0	44.0	20.9	79.1
"	119.0	94.0	25.0	21.0	79.0
	110.5	87.5	23.0	20.8	79.2
	106.0	84.0	22.0	20.8	79.2
	112.0	88.5	23.5	21.0	79.0
"	60.0	48.0	12.0	20.0	80.0
	63.0	50.0	13.0	20.6	79.4
	71.5	57.0	14.5	20.3	79.7
	58.5	47.0	11.5	19.7	80.3

Uit deze cijfers blijkt, dat een analyse van kleine luchtvolumina met deze methode, voldoende nauwkeurig uitgevoerd kan worden, indien de geschikte capillaire daarvoor wordt gebezigd, want bovenstaande resultaten zijn weliswaar verkregen met een buis van ongeveer 1 m.M. diameter, doch gelijke resultaten zouden te bereiken zijn met capillairen van 0.5 of 2 m.M. diameter.

De Jordanpipet is dus een zeer nauwkeurig en gemakkelijk te hanteeren apparaat, vooral geschikt voor de analyse van hoeveelheden gas, die te groot zijn voor de microtonometer van KROGH (1908) en te klein voor het toestel van HALDANE (1916).

Kan men bij een onderzoek het volume der uit te pompen gassen vooraf reeds ongeveer schatten, dan kan men met een passende capillaire de analyse uitvoeren met een relatieve nauwkeurigheid van 0.1 %. Voor mijn onderzoek werden voornamelijk

zulke met een inwendige doorsnee van 0.8 en 1 m.M. gebezigd. Ze waren op eudiometrie onderzocht en geijkt door ze uit te wegen met vochtig kwik (BARCROFT 1908, p. 790).

3. HET AFTAPPEN VAN BLOED. *)

Teneinde het bloed gemakkelijk en zonder verontreiniging uit *Helix pomatia* te verkrijgen, wordt de schelp zorgvuldig schoon-gewasschen en vervolgens daarin een kleine opening getikt, op de voorlaatste winding, zoo dicht mogelijk tegen den naad aan (zie fig. 4)

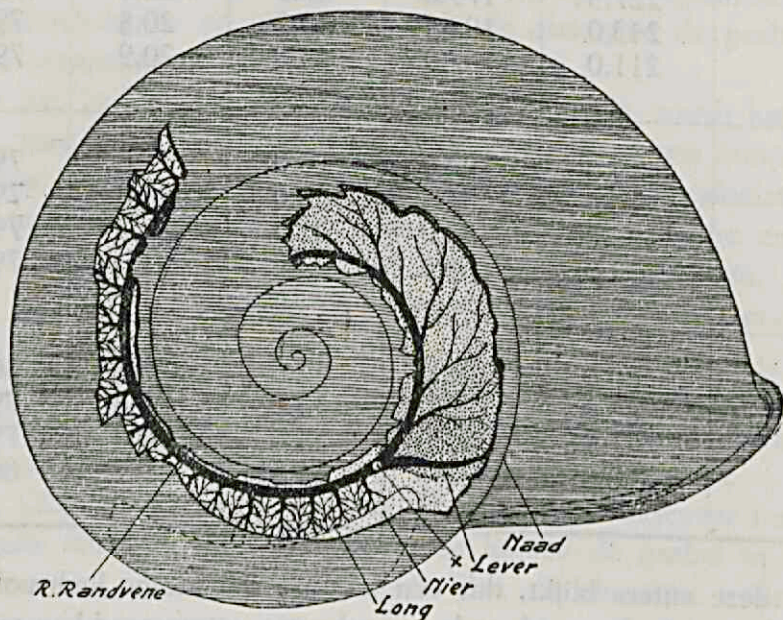


Fig. 5

Na verwijdering van de kleine kalkstukjes ziet men duidelijk een bloedvat loopen — de rechter-Randvene — dat van den apex af langs den geheelen rechterraand van den ingewandszak loopt, tot dicht bij de ademopening toe.

Deze groote vene (daarom ook wel Vena magna genoemd), welke dus geheel onder den naad van de schelp verloopt, voert het bloed van lever en ingewanden naar de „long” en heeft verschillende groote zijtakken.

Men zou ze dus overal onder den naad kunnen openen, maar

*) Deze methode werd reeds lang in het laboratorium van Prof. JORDAN toegepast en heeft dit boven andere voor, dat de proefdieren zich meestal herstellen.

in 't gebied van de long en de nier — welke laatste men meestal door de schelp heen kan zien liggen — loopt de vene langs het rectum en den secundairen ureter, zoodat dit gedeelte niet geschikt is voor het aftappen van bloed.

Een zeer geschikte plaats bevindt zich even vóór den overgang van de vene in de „long”. Om het bloed snel te laten uitstroomen, wordt in de opening van de schelp een watteprop geduwd en daarmee een zoodanigen druk op het dier uitgeoefend, dat het bloed meestal in een fijne straal uit de vene spuit. Men leert spoedig de juiste plaats vinden voor de punctie en kan dan 4 à 5 c.M³. bloed per slak verkrijgen.

Het zoo verkregen bloed is een opalescente blauwe vloeistof, waarin vele leucocyten voorkomen. Deze werden vóór het nemen der proeven steeds verwijderd, door het bloed te centrifugeeren of af te filtreren na adsorptie met carbo animale.

Worden de leucocyten niet verwijderd, dan versmelten ze na eenige uren met elkaar. Er ontstaan kleine en grootere gelatineuze korrels.

Om deze korrels heen verdwijnt weldra de blauwe kleur van het bloed door reductie van het haemocyanine en na 12 uur gestaan te hebben — zelfs in de ijskast — is, alleen nog een laag aan de oppervlakte van de vloeistof blauw.

Het bloed, verkregen na adsorptie en filtratie, was donker blauw. Deze kleur verminderde niet indien het in een goed gesloten kolfje in de ijskast werd bewaard.

Van *Carcinus maenas* werd bloed verkregen door het voorlaatste lid van een extremititeit weg te knippen.

Onmiddellijk zoodra dit gebeurd is, treedt er een sterke tonus van de strekspieren op; dit leidt meestal tot autotomie, waarbij de wond gesloten wordt en het dier weinig bloed verliest. Wordt de poot niet afgeworpen, dan vloeit daaruit langzaam druppelsgewijze het bloed, dat in een buisje wordt verzameld. Zoodra het bloed met de lucht in aanraking komt, zet zich de fibrine in draden en klompjes af. Er wordt geen „koek” gevormd zooals dit in het bloed van Vertebraten plaats vindt maar de stukjes fibrine drijven in het serum.

Als men geduldig wacht en zorgt, dat de wond niet door het stolsel verstopt raakt, kan men uit een volwassen krab ongeveer 5 c.M³. bloed verzamelen. Na adsorptie met carbo animale en

affiltratie werd er een donkere, blauwgroene vloeistof verkregen, die vooral bij opvallend licht bekeken blauw schijnt. Het is bekend, dat behalve haemocyanine in het bloed van Crustaceae een lipochroom voorkomt, het *tethronerythrine*, dat in een zuurstofrijke atmosfeer onder invloed van het licht zeer donker wordt. Vandaar de donkere kleur van het bloed.

DHÉRÉ (1920) vermeldt dat deze kleurstof, waarvan de functie nog niet bekend is, door uitschudden met aether uit het bloed verwijderd kan worden. Ik heb deze bewerking echter achterwege gelaten, aangezien daardoor het haemocyanine zou kunnen veranderen in zijn eigenschappen ten opzichte van zuurstof. Dit bloed werd gedurende eenige dagen in ijs bewaard; de kleur veranderde daarbij niet.

4. HET ZUIVEREN VAN HAEMOCYANINE.

Behalve bloed waarin de eigenschappen van het haemocyanine door de daarin aanwezige electrolyten beïnvloed worden, moest er bij het onderzoek ook de zuivere stof gebezigd worden. Teneinde haemocyanine in zuiveren toestand te verkrijgen is het noodzakelijk dit te doen uitkristalliseeren.

Dit was reeds gelukt aan HENZE (1907) KOBERT (1903) en vooral aan DHÉRÉ (1908) en DHÉRÉ & BURDEL (1914).

Volgens DHÉRÉ is het optreden van Hcy-kristallen een teken van zeer vergevorderde demineralisatie. Bij het begin van het kristallisatieproces was het specifiek geleidingsvermogen dan ook 9.14×10^{-6} reciproke Ohm.

Voor het doen kristalliseeren van haemocyanine bestaan verschillende methoden. Naar gelang van het dier waaruit het Hcy verkregen is, dient men een andere methode te kiezen. DHÉRÉ (1919)

Voor bloed van *Helix pomatia* is dialyse de aangewezen weg.

Het is bekend, dat men door dialyse practisch alle electrolyten uit een eiwitoplossing verwijderen kan.

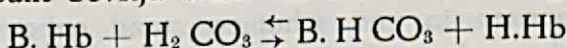
Uit het Hb-onderzoek is echter gebleken, dat alleen het Ca *) moeilijkheden kan opleveren, daar het tegen gedestilleerd water gedialyseerd slechts voor 50—75 % diffusibel is. NEUHAUSEN (1923)

Teneinde alle kationen zooveel mogelijk te verwijderen, hebben

*) Hcy verkregen door gewone dialyse bleek na 3 maal omkristallisatie geen K of Na meer te bevatten maar wel Ca, (zie noot pg 6).

ADOLF & FERRY (1921) hun haemoglobine-oplossingen gedialyseerd, intermitterend om den anderen dag in gedestilleerd water, dat met CO_2 was verzadigd; of zij hebben om den anderen dag hunne oplossingen zelf met CO_2 verzadigd.

Zij nemen aan, dat door deze bewerking het haemoglobine in zijn isoëlectrisch punt bevrijd werd van alle kationen volgens de reactie:



Hierin stelt B een willekeurige base voor en H. Hb het zuivere haemoglobine.

Zij verkregen zodoende zeer zuivere oplossingen met een electrisch geleidingsvermogen van $\text{max. } 3 \times 10^{-4}$ en $\text{min. } 8 \times 10^{-5}$ reciproke Ohm. Deze cijfers behooren tot de beste, die in de literatuur dienaangaande vermeld zijn.

Gelijke resultaten verkreeg HEIDELBERGER (1922) door Hb na kristallisatie op te lossen met $\text{Na}_2 \text{CO}_3$ en te dialyseeren in gedestilleerd water, verzadigd met een mengsel van 4 deelen CO_2 en 1 deel O_2 .

DIALYSE.

Voor het dialyseeren worden verschillende soorten van membranen gebezigd. Een volledig overzicht over deze methode en haar verschillende toepassingen is gegeven door H. THOMS, Abderhalden Handb. biol. Arbeitsmeth. Abt. III, Teil B. p. 360—'84.

Voor mijn doel bezigde ik zakjes gemaakt van collodium.

De voordeelen van het gebruik dezer zakjes boven die van perkamentpapier vervaardigd, zijn de volgende:

1e. Ze zijn volkomen doorzichtig, zoodat het kristallisatieproces daarin gemakkelijk te volgen is.

2e. Ze kunnen gemakkelijk zelf vervaardigd worden in elke gewenschte afmeting, terwijl ook de meerdere of mindere doorlaatbaarheid geregeld kan worden door één of meer lagen collodium te nemen.

De gebezigde collodiumoplossing bestond uit 10 gram watervrije collodiumwol, opgelost in een mengsel van 50 c.M³. absoluten alkohol en 150 c.M³. watervrijen aether. Met deze oplossing werden als volgt zakjes vervaardigd. Een nauwkeurig droog en schoongemaakt verzamelbuisje van ongeveer 15 c.M. lengte en 2—4 c.M. wijdte wordt met de oplossing tot den rand gevuld. Daarna wordt het buisje boven de flesch met collodium omge-

keerd en gedurende een $\frac{1}{2}$ minuut in dien stand gehouden, teneinde het te laten uitdruipen.

Vervolgens wordt het buisje met de beide handen zoo regelmatig mogelijk in een horizontalen stand geroteerd, teneinde de vloeistof goed te verdeelen. De bodem van het zakje moet dikker zijn dan de wanden, daarom wordt het buisje gedurende de rotatie met tusschenpoozen in een schuinen stand gehouden, hierdoor vloeit een deel van het collodium naar den bodem en droogt daar tenslotte op.

Wordt de rotatie niet regelmatig uitgevoerd, dan ontstaan er zeer licht onregelmatige gedeelten in den wand van het zakje, dat hierdoor niet gemakkelijk van het glas kan worden losgemaakt.

De rotatie wordt zoolang voortgezet totdat al de aether verdampst is, wat gemakkelijk aan den reuk te constateeren valt. Is het collodium zoo ver opgedroogd, dan wordt het buisje in alcohol van 70 % gedompeld en eenige minuten daarna in een bak met water gelegd.

Als de buizen niet te veel collodium bevatten, kunnen gemakkelijk 10 zakjes per uur vervaardigd worden.

Teneinde de vervaardigde zakjes zonder gevaar voor scheuren uit de buizen te kunnen nemen, moeten zij eenigen tijd in het water blijven liggen. Na ongeveer 24 uur hebben zij zich van het glas losgemaakt en kunnen ze worden gebruikt.

Op deze wijze verkregen zakjes kunnen in verdunden alcohol onbepaalden tijd worden bewaard. Ik gaf er echter de voorkeur aan, ze vóór het gebruik steeds versch te vervaardigen.

Men overtuigt zich van het al of niet dicht zijn van de gemaakte zakjes, door deze met een oplossing van congorood te vullen, te sluiten, en gedurende een nacht in water te laten drijven.

Is er den volgenden dag kleurstof in het water gekomen, dan zijn de zakjes onbruikbaar.

Teneinde de gevulde zakjes in het water te laten drijven werden ze slechts voor ongeveer $\frac{3}{4}$ gevuld en gesloten door den bovenrand van het zakje dicht te drukken en eenige keeren om te vouwen. De lucht, die in het zakje boven de vloeistof is opgesloten, kan niet ontsnappen en houdt niet alleen het zakje drijvende maar verhindert door haar spanning het binnendringen van water.

Mij aan de voorschriften van DHÉRÉ houdende, dialyseerde ik aanvankelijk het slakkenbloed tegen gedestilleerd water, dat dagelijks werd ververscht.

Na 8—12, soms pas na 16 dagen ontstond er in de zakjes een neerslag van kristallen van Hcy, in den vorm van sterren met 6 stralen zooals DHÉRÉ (1908) ze beschreven heeft.

Eenige keeren zag ik echter in plaats daarvan lange fijne naalden ontstaan.

De moederloog, bij het begin van de kristallisatie, nog sterk blauw getint, ontkleurde zich naarmate er meer neerslag ontstond. Tenslotte, als de dialyse lang genoeg werd voortgezet (soms pas na eenige maanden) was de moederloog geheel ongekleurd, terwijl daaronder zich een sediment gevormd had, dat ongeveer $\frac{1}{3}$ van het zakje innam. Dit sediment was van onderen blauw en van boven grijs gekleurd. Bij langdurige dialyse buiten de ijskast kan uit de kristallen een fijn korrelige massa ontstaan, die niet meer als kristallijn te herkennen is.

DHÉRÉ (1919 III) vermeldt dit niet, wel echter, dat de kristallen in de zakjes gedurende eenige jaren goed kunnen blijven, ook bij gewone temperatuur.

Wij hebben kunnen constateeren, dat in een oplossing van gezuiverde Hcy gedurende meer dan een jaar geen verandering optrad. In een enkel geval zag ik evenals DHÉRÉ een bruin pigment ontstaan, dat langzamerhand donkerder werd, en tenslotte de kleur van het maagsap aannam.

Terwijl DHÉRÉ aanneemt, dat haemocyanine, zelfs bij langdurige dialyse, niet verandert, heeft HEIDELBERGER (1922) aangetoond, dat bij dialyse gedurende langer dan een week het zuurstofbindingsvermogen van gekristalliseerde haemoglobine voortdurend vermindert.

Daar dit bij haemocyanine ook het geval zou kunnen zijn, heb ik getracht het zuiveringsproces door dialyse, sterk te bekorten. De toepassing van de methode van HEIDELBERGER gaf daartoe gelegenheid.

Ik ging als volgt tewerk:

Collodiumzakjes, gevuld met versch afgetapt gefiltreerd bloed, werden in een flesch geplaatst gevuld met gedestilleerd water.

Gedurende 10 minuten werd uit een KIPP's toestel koolzuur door het water geleid. Het bloed, dat te voren volkomen helder

was, werd hierdoor licht troebel. Vervolgens werd gedurende 5 minuten uit een cylinder zuurstof in het water geblazen, teneinde het haemocyanine in geoxydeerden toestand te houden. *)

De flesch werd onmiddellijk daarop met een rubberstop gesloten en in ijs geplaatst. Den volgenden dag was de troebeling in het bloed verdwenen. Het water werd ververscht en evenals den vorigen dag met CO_2 en O_2 behandeld.

Om de twee dagen werd echter geen CO_2 door het water geleid. Afhankelijk van de doorlaatbaarheid der collodiummembraan, ontstaat na 3 of 4 dagen in het bloed een blijvende troebeling, die echter verdwijnt zoodra CO_2 in het buitenwater geleid wordt. Laat men nu het verzadigen met CO_2 achterwege, dan ontstaat er een sediment op den bodem der zakjes. De moederloog, nog zwak blauw gekleurd, wordt nu zoo volledig mogelijk met een Pasteursche pipet weggezogen en vervangen door gedestilleerd water. Vervolgens worden de zakjes weer gesloten, en eenige malen omgekeerd, teneinde den inhoud te vermengen.

Nu worden de kristallen door het inleiden van CO_2 in het buitenwater opgelost en daarna worden de zakjes in versch gedestilleerd water in ijs geplaatst.

Na 2 dagen is het Hcy dan weer opnieuw uitgekristalliseerd. Deze omkristallisatie kan desgewenscht nog eenige keeren worden uitgevoerd.

Na éénmaal omkristalliseeren was het spec. geleidingsvermogen van de moederloog bij 15°C . reeds tot 4×10^{-4} reciproke Ohm gedaald. Het sediment aldus verkregen, is donkerblauw gekleurd. Waarschijnlijk zijn oplossingen van Hcy, op deze wijze van electrolyten gezuiverd, beter geschikt voor het onderzoek van zijn zuurstofbindingsvermogen, dan die verkregen na langdurige dialyse zonder gebruik van CO_2 en O_2 . Vergelijkende bepalingen heb ik echter niet uitgevoerd.

5. HET VERZADIGEN VAN BLOED MET VERSCHILLENDE GASMENGSELS.

Bij de bestudeering van het evenwicht tusschen zuurstof en haemocyanine was het noodig bloed of haemocyanine oplossingen

*) Dialyseert men bloed, dat zijn blauwe kleur verloren heeft, dan kan het in enkele dagen weer blauw worden; vaak echter gebeurt dit pas na langeren tijd.

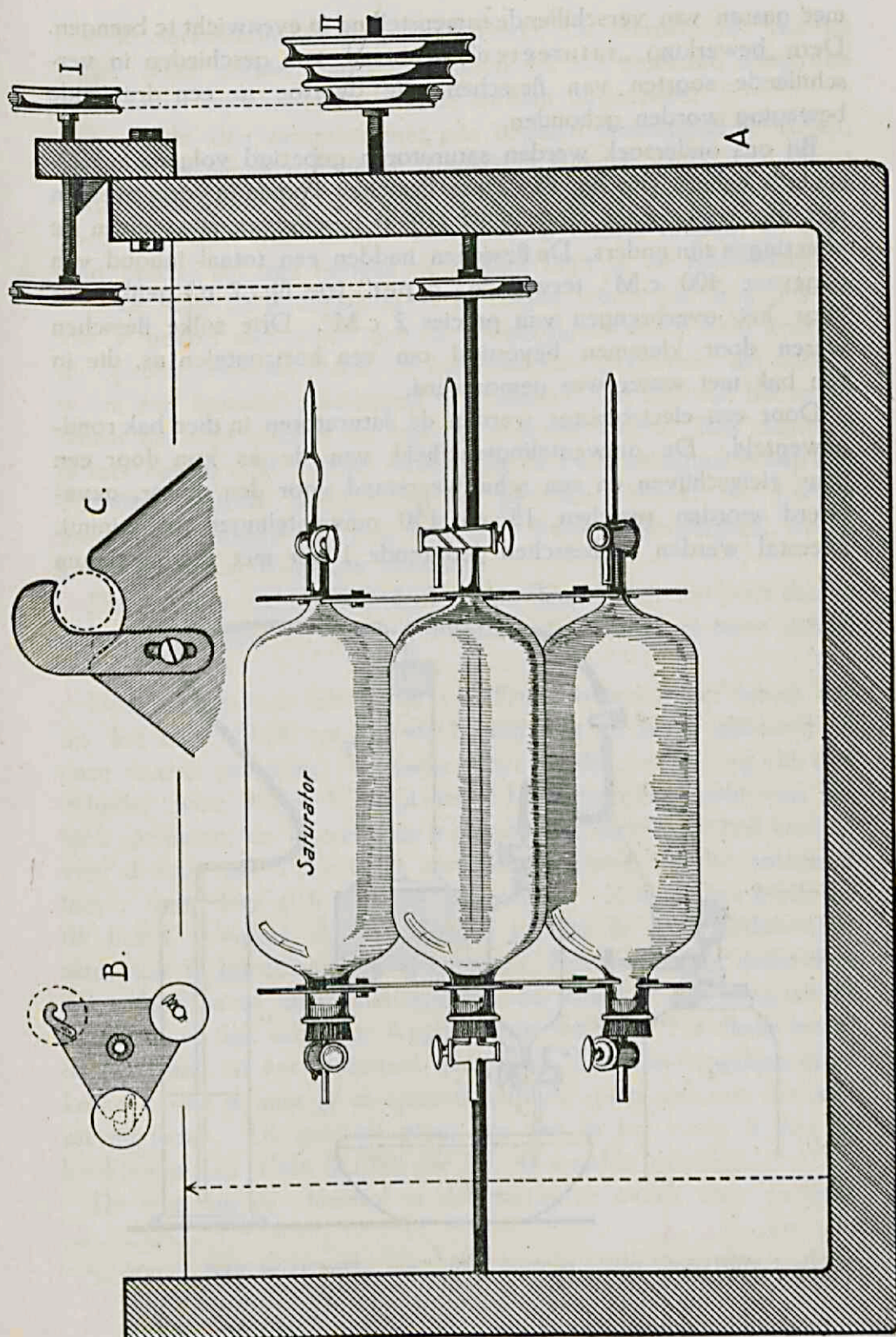


Fig. 6

met gasen van verschillende samenstelling in evenwicht te brengen. Deze bewerking „satureeren” genoemd, kan geschieden in verschillende soorten van flesschen, die daartoe in een draaiende beweging worden gehouden.

Bij ons onderzoek werden saturatoren gebezigd volgens achterstaande schets. (zie fig. 6). Deze flesschen komen in vorm overeen met die, welke door BARCROFT (1914) beschreven zijn, alleen de afmetingen zijn anders. De flesschen hadden een totaal inhoud van ongeveer 400 c.M³. terwijl de „pipet” (zie fig. 7 p.) geijkt was voor het overbrengen van precies 2 c.M³. Drie zulke flesschen waren door klemmen bevestigd om een horizontalen as, die in een bak met water was gemonteerd.

Door een electromotor werden de saturatoren in dien bak rondgewenteld. De omwentelingssnelheid van de as kon door een paar riemschijven en een schuifweerstand voor den motor, gevarieerd worden tusschen 15 en 150 omwentelingen per minuut. Meestal werden de flesschen gedurende 1 uur met een maximum

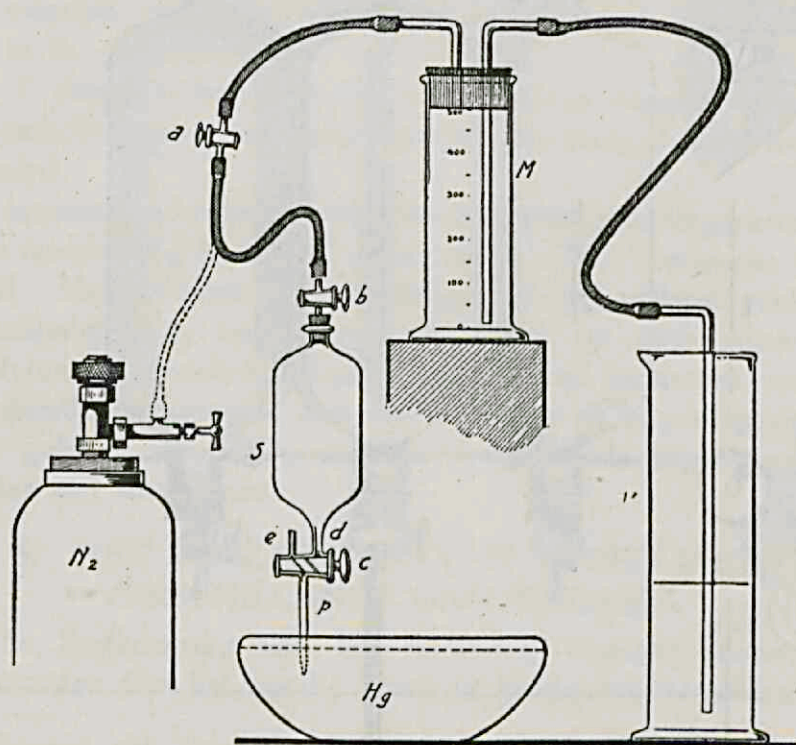


Fig. 7

van 50 omwentelingen p. m. geroteerd. De temperatuur van het water bleef zonder regeling binnen $0,2^{\circ}$ C. constant, aangezien de proeven bij kamertemperatuur werden uitgevoerd.

Teneinde den saturator met een bepaald gasmengsel te vullen, werd de volgende opstelling *) gebezigd (zie fig. 7).

Een maatglas M, geplaatst op een blok, is voorzien van een goed sluitende gummistop, waardoor 2 buisjes lopen; de eene gaat precies tot den bodem, de andere blijft in de rubberstop.

Door aan de gummislang A te zuigen wordt het maatglas uit vat V geheel met water gevuld. Vervolgens wordt door kraan a te openen, zooveel lucht in het maatglas toegelaten, als noodig is om een bepaald gasmengsel te vormen. De rest van het water wordt nu door stikstof uit een cylinder vervangen. Een saturator S met eenige c.M³. bloed wordt met de waterstraalluchtpomp zoo volledig mogelijk geëvacueerd en gesloten. Nadat de pipet p van den saturator in een bak met kwik is gedompeld, wordt kraan c naar d langzaam geopend.

Door den verminderden druk in de flesch stijgt het kwik daarin omhoog en kan bij goede evacuatie den saturator bijna geheel vullen.

Door zuigen aan het buisje van kraan b wordt het bloed, dat op het kwik drijft, tot aan de boring van de kraan gebracht en deze daarna gesloten. Vervolgens wordt de gummislang van den cylinder naar kraan b verplaatst. Het maatglas wordt van het blok genomen, de kranen a en b geopend en vervolgens ook kraan c van d naar p. Terwijl het kwik nu langzaam uit den saturator loopt, vult deze zich met het gasmengsel. Zoodra het kwik uit de flesch gevloeid is, worden de kranen b en c gesloten, de saturator weggenomen en geroteerd. Eenige keeren gedurende de rotatie moet door het openen van kraan b een eventueelen overdruk in den saturator weggenomen worden. Na afloop wordt de saturator uit het waterbad genomen. Door in verticalen stand kraan c van d naar p te openen, vult de pipet zich met vloeistof uit de flesch. De gevulde pipet kan dan in het buisje b van de kwikpomp van VAN SLIJKE (zie fig. 4) worden geledigd.

De rest van de vloeistof in den saturator wordt voor contrôle

*) Vgl. J. BARCROFT. The respiratory function of the blood 1914. p. 308.

bepalingen gebruikt. Vooral als de flesch even in de handen wordt verwarmd, vult zich de pipet met de vloeistof, die door den lichten overdruk uit den saturator wordt gedreven.

Tenslotte wordt de saturator met de buret van een gasanalyse-toestel volgens HALDANE (1916) verbonden, en door een analyse wordt de zuurstofspanning in den saturator gecontrôleerd.

EXPERIMENTEN.

Met de hierboven beschreven methoden, heb ik vervolgens getracht de Sp. O. C. van Hcy te bepalen.

Zooals reeds in het begin van dit hoofdstuk is vermeld, werd daarvoor bloed van *Helix pomatia* gebezigd.

Ongeveer 50 c.M³. bloed verkregen uit 12—15 slakken werden gefiltreerd en gecentrifugeerd of na adsorptie met carbo animale afgefiltreerd.

Deze bewerking is niet alleen noodig om kleine kalkstukjes, die door het bloed zijn meegenomen te verwijderen, maar vooral om de leucocyten uit het bloed weg te nemen.

Vervolgens werden van bovengenoemde hoeveelheid 3 soms 4×2 c.M³. verascht en voor de koperbepaling gebezigd.

Van een ander gedeelte werd, na veriadiging met lucht, telkens 2 c.M³. in het apparaat van VAN SLIJKE uitgepompt, en in de opgevangen gassen werd het zuurstofgehalte bepaald.

Het is duidelijk, dat de zuurstof op deze wijze bepaald, uit twee gedeelten bestaat nl. een deel, dat aan het Hcy was gebonden en een ander, dat in de waterige vloeistof van het bloed was opgelost.

De hoeveelheid gebonden zuurstof, die bekend moet zijn voor de berekening van de Sp. O. C. is dus niet direct te bepalen en alleen te berekenen als het verschil van de verkregen totale hoeveelheid en de opgeloste hoeveelheid zuurstof.

Het volume van de opgeloste O₂ kan ook worden berekend, als het zoutgehalte van het bloed bekend is.

Ik gaf er echter de voorkeur aan deze hoeveelheid experimenteel te bepalen in de overweging, dat de cijfers, die men voor de hoeveelheden uitgepompt gas verkrijgt, een zekere fout bevatten.

Deze fout kan wegvallen, wanneer van de experimenteel be-

paalde totale hoeveelheid O_2 , niet een andere hoeveelheid wordt afgetrokken, die door berekening is gevonden, maar een, die met dezelfde methodiek verkregen is.

Teneinde de in het bloed opgeloste zuurstof te kunnen bepalen moest dus eerst het Hcy verwijderd worden. Daartoe werden in een kolfje ongeveer 20 c.M³. bloed gekookt, waardoor het Hcy stolde en een waterige vloeistof zich afscheidde.

De inhoud van het kookkolfje werd zoo volledig mogelijk in een mortier overgebracht, daarin tot een papje gewreven en vervolgens gefiltreerd. Na afkoeling en verzadiging met lucht werden van dit filtraat, telkens 2 c.M³. uitgepompt. Het spreekt vanzelf, dat de hier gebezigde methode een ruwe is. Om het eiwit te verwijderen, had ik beter ultrafiltratie kunnen toepassen.

De verkregen resultaten echter, vertoonden een zoo gering verschil met de theoretisch berekende waarde, dat ik het koopen van een kostbaar ultrafiltratie-apparaat niet voldoende gerechtvaardigd achtte.

In Tabel XV zijn samengevat de resultaten der bepalingen van het totale volume zuurstof in 2 c.M³. slakkenbloed aanwezig, van de opgeloste hoeveelheid O_2 en van het kopergehalte.

De gevonden Sp. O. C. is dus gemiddeld 158.5 d. i. 90 % van het theoretische getal.

In een andere reeks (Tabel XVI) was de gevonden Sp. O. C. gemiddeld 154 d. i. 87.5 % van het theoretische getal.

Alvorens verder te gaan, is het noodzakelijk hier even bij de gevonden getallen stil te staan teneinde niet uit het oog te verliezen, hoe wij bij dit onderzoek ons doel trachten te bereiken.

In het begin van dit hoofdstuk is uiteengezet, dat na lange jaren van onderzoek aan het licht is gebracht, dat Hb de zuurstof zoodanig opneemt, dat 1 molecuul Hb 1 molecuul zuurstof opneemt, niet meer en niet minder.

Dit beteekent, dat in dit proces een chemische reactie plaats heeft.

Men is tot deze opvatting gekomen omdat

1e. het gebleken was, dat haematine, een splitsingsproduct van Hb, een constant ijzergehalte had;

2e. bij de zuurstofbinding van Hb er een vaste verhouding bleek te bestaan tusschen de hoeveelheid ijzer en de maximale hoeveelheid zuurstof, die door het Hb kon worden gebonden.

Het doel van ons onderzoek nu is na te gaan, in analogie met wat van Hb bekend is, of ook Hcy de zuurstof chemisch bindt. Aannemende, dat het koper op dezelfde wijze en in dezelfde verhouding in het Hcy aanwezig is, als het ijzer in Hb, moest onderzocht worden of de verhouding $\frac{\text{max. gebonden O}_2}{\text{Cu}} = \text{Sp. O. C. constant}$ was. Uit de vergelijking van experimenteele en theoretische gegevens, hebben wij voor deze verhouding, de Sp. O. C. van Hcy, het getal 176 gevonden, overeenkomende met de verhouding $\frac{1 \text{ O}}{1 \text{ Cu}}$.

Uit eigen onderzoek vinden wij thans in een aantal bepalingen voor de verhouding $\frac{\text{gebonden O}_2}{\text{Cu}}$ gemiddeld 158.5 en vervolgens nog eens in een aantal andere bepalingen gemiddeld 154.

De vraag rijst dus vanzelf: wat is de oorzaak, dat hier voor de Sp. O. C. inplaats van 176, 158.5 werd gevonden?

Ter verklaring zou men nu kunnen aannemen;

1e. of het Hcy bindt de zuurstof niet in vaste verhouding tot zijn kopergehalte, dus niet chemisch;

2e. of, mocht de binding van zuurstof wel chemisch zijn, dat in de gevonden verhouding tusschen zuurstof en koper de hoeveelheid gebonden O_2 te klein was (wegens ontoereikende O_2 -druk veroorzaakte onvolledige O_2 -verzadiging van het Hcy) of, dat de hoeveelheid Cu te groot was.

Of de eerste veronderstelling, dat het Hcy de O_2 niet in vaste verhouding tot zijn Cu gehalte bindt juist is of niet, kan pas later blijken. De mogelijkheden in het 2e geval genoemd moesten in elk geval onderzocht worden.

In de eerste plaats moest dus worden nagegaan of de hoeveelheid koper, die in het slakkenbloed aanwezig is, uitsluitend in het Hcy voorkomt, dan wel of een gedeelte als een koperzout in 't bloed is opgelost. Het is immers een bekend feit dat Cu in verschillende organen van zeer vele dieren voorkomt.

Daar *Helix pomatia* zich met planten voedt, die zonder twijfel Cu kunnen bevatten, zou het dus niet te verwonderen zijn als in het bloed dezer dieren ook, buiten het Hcy, nog koper aanwezig was.

In de vloeistof verkregen na verwijdering van het Hcy heb ik echter meermalen te vergeefs getracht Cu aan te toonen*).

Dit was tevens een bewijs dat Hcy van *Helix pomatia* bij het coaguleeren door hitte geen Cu afsplitst, wat door COUVREUR & ROUGIER (1902) werd beweerd, maar door DHÉRÉ (1903) is tegengesproken.

Er bleef dus voorloopig niets anders over, dan aan te nemen dat bij de bepaling van de Sp. O. C. van slakkenbloed na schudden met lucht, het Hcy niet volledig met zuurstof was verzadigd.

Teneinde een volledige verzadiging van het Hcy met zuurstof te bereiken, was de aangewezen weg het bloed met zuivere O₂ in evenwicht te brengen.

Hoe eenvoudig dit moge schijnen, de moeilijkheid was niet op deze wijze te overwinnen.

Dit blijkt duidelijk uit tabel .

In de 3^e kolom van rechts, is voor de hoeveelheid opgeloste O₂ in 2 c.M³. bloed gemiddeld : 12.8 m.M³. opgegeven. Onder deze kolom ziet men, dat de gevonden totale hoeveelheid O₂ gemiddeld 30.8 is.

De gebonden O₂ is gemiddeld 17.9 m.M³. varieerend tusschen 16.2 en 18.8 m.M³. De nauwkeurigheid van de bepaling gaat dus tot 2 m.M³., een zeer geringe hoeveelheid gas, als men met groote volumina te maken heeft, maar in dit geval echter 10 0/0 van het gevonden cijfer.

Wordt nu het bloed met zuivere O₂ inplaats van met lucht verzadigd, dan is 't duidelijk dat de opgeloste hoeveelheid O₂ 5 maal zoo groot wordt, terwijl de gebonden hoeveelheid O₂ hoogstens 20 m.M³. worden kan. De foutengrens wordt in dit geval, dus onbeduidend kleiner en daarmee wordt dus de nauwkeurigheid in de berekening van de Sp. O. C. ook weinig groter. Uit deze overwegingen blijkt dus, dat de gevonden getallen voor de Sp. O. C. van Hcy, het maximum zijn van wat met bloed van *Helix pomatia* bereikbaar was, aangezien de chemische capaciteit van dit bloed zoo gering is.

Het is dus niet mogelijk gebleken de theoretische waarde van de Sp. O. C. van Hcy — met slakkenbloed — meer dan 90 0/0 te benaderen, aangezien de hoeveelheid gebonden zuurstof, daarin te klein was, om nauwkeurige bepalingen mogelijk te maken.

*) Met kaliumferrocyanide.

TABEL XV.

HELIX

Zuurstofbepaling in 2 c.M³. bloed

Barom. gecorr.	T. zout- oplossing in gr. C.	T. badw. in gr. C.	Lengte gasbel in de capill. in m.M.			
			Oorspr.	NaCO ₂ abs.	Na O ₂ abs.	O ₂ weg- genomen.
752.8	15.2	12.3	176.5	74.5	50.0	24.5
"	15.5	13.0	150.0	77.0	51.5	25.5
"	15.8	13.6	103.0	52.0	36.0	16.0
"	16.2	14.0	90.0	54.5	38.0	16.5

Zuurstofbepaling in

Barom. gecorr.	T. bloed in gr. C.	T. badw. in gr. C.	Lengte gasbel in de capillaire in m.M.			
			Oorspr.	NaCO ₂ abs.	Na O ₂ abs.	O ₂ weg- genomen.
752.8	15.6	13.0	222.5	111.0	51.0	60.0
"	15.7	13.4	202.5	114.0	52.5	61.5
"	16.4	14.1	176.0	74.0	37.0	37.0
"	15.1	14.2	194.5	73.5	35.5	38.0

Koperbepaling in 2 c.M³. versch bloed.

Titercijfers ± 0.001 N. thio in c.M ³ .		Gevonden Cu. in mgr.
Bloed.	0.1 mgr. standaard oplossing.	
1.655 1.640 1.630	1.445 1.455	0.113 gemiddeld.

POMATIA.

na verwijdering van het eiwit.

Inhoud capill. per m.M. in m.M ³ .	Vol. O ₂ gereduc. 0° C. 760 m.M. droog. in m.M ³ .	Red. fact.	Datum.
0.550	12.6	0.935	28-III-'24.
"	13.1	0.932	
0.853	12.7	0.929	
0.853	13.0	0.927	
gemidd. 12.85			

2 c.M³. versch bloed.

Inhoud capill. per m.M. in m.M ³ .	Vol. O ₂ gereduc. 0° C. 750 m.M. droog. in m.M ³ .	Red. fact.	Datum.
0.550	30.8	0.932	28-III-'24
0.550	31.4	0.930	
0.853	29.3	0.927	
0.853	30.0	0.926	
gemidd. 30.8			

Berekening van de specif. zuurstof-capaciteit.

Gevonden totale hoeveelheid O ₂ gemidd . . .	30.8 m.M ³ .
" opgeloste " " " . . .	12.85 "
" gebonden " " " . . .	17.95 "
" Cu gemiddeld	0.113 mgr.
Sp. O. C.	158.5
% van de theoret. waarde (176)	90

TABEL XVI.

HELIX
Zuurstofbepaling in 2

Barom. gecorr.	T. bloed in gr. C.	T. badw. in gr. C.	Lengte gasbel in de capill. in m.M.			
			Oorspr.	Na CO ₂ abs.	Na O ₂ abs.	O ₂ weggen
768.5	16.7	15.3	146.0	74.0	38.0	36.0
"	18.2	17.0	105.0	73.0	37.0	36.0
"	18.2	17.1	82.0	72.0	36.0	36.0

Koperbepaling in 2 c.M. versch bloed.

Titercijfers $\pm$ 0.001 N thio in c.M ³ .		Gevonden Cu in mgr.
Bloed.	0.1 mgr. stand. opl.	
1.675	1.610	0.104 gemiddeld.
1.685	1.620	
1.670		

X POMATIA.

in 2 c.M³. versch bloed.

Inhoud capill. per m.M. in m.M ³ .	Vol. O ₂ gereduceerd 0° C. 760 m.M. droog in m.M ³ .	Red. fact.	Datum.
0.853	28.9	9.41	17-V-'24.
"	28.7	9.33	
"	28.7	"	

Berekening van de specif. zuurstof-capaciteit.

Gevonden totale hoeveelheid O ₂ gemiddeld. . . .	28.8 m.M ³ .
" opgeloste " "	12.8 "
" gebonden " " " "	16.0 "
" hoeveelheid Cu " " " "	0.104 mgr.
Sp. O. C.	154 "
% van de theoret. waarde (176)	87.5 "

TABEL XVII.

ZUURSTOF
Haemocyanine

Groep.	Barom. gecorr.	T. op- lossing in gr. C.	T. bad- water in gr. C.	Lengte gasbel in de capill. in m.M.		
				Oorspr.	Na O ₂ abs.	O ₂ weggen.
I	756.8	15	14.5	135.5	12.0	123.5
	756.8	"	"	133.4	11.0	121.5
	756.8	"	"	134.0	12.0	122.0
II	756.8	15.1	14.5	129.5	21.0	108.5
	"	"	"	126.0	20.0	106
	"	"	"	126.5	21.5	10.5

Koperbepaling in 2 c.M³. Hcy oplossing.

Titercijfers ± 0.001 N thio in c.M ³ .		Gevonden Cu in mgr.
Hcy opl.	0.1 mgr. stand opl.	
4.495	1.575	0.285 gemiddeld.
4.500	1.585	
4.475	1.560	

BEPALING IN 2 c.M³.
oplossing.

Inhoud capill. per m.M. in m.M ³ .	Vol. O ₂ gereduc. 0° C. 760 m.M. droog. in m.M ³ .	Red. fact.	O ₂ /N ₂	O ₂ opge- lost.
0.853	98.0 } 96.5 } 97.1 96.8 }	0.930 " "	72/28	48.0
0.853	86.1 } 84.2 } 84.4 83.2 }	0.930 " "	52/48	35.0 " "

Berekening van de specif. zuurstof-capaciteit.

Groep I.	Gevonden totale hoeveelheid O ₂ . . .	97.1
	Berekende opgeloste hoeveelheid O ₂ . .	48.0
	" gebonden " " . .	49.1
	Gevonden Cu gemiddeld	0.285
	Sp. O. C.	172
	% van de theor. waarde (176)	97.7
Groep II.	Gevonden totale hoeveelheid O ₂ . . .	84.4
	Berekende opgeloste hoeveelheid O ₂ . .	35.0
	" gebonden " " . .	49.4
	Gevonden Cu gemiddeld	0.285
	Sp. O. C.	173
	% van de theor. waarde (176)	98.2

TABEL XVIII.

CARCINUS

Zuurstofbepaling in 2 c.M³. bloed

Barom. gecorr.	T. bloed in gr. C.	T. badw. in gr. C.	Lengte gasbel in de capill. in m.M.			
			Oorspr.	Na CO ₂ abs.	Na O ₂ abs.	O ₂ weggen.
752.0	15.3	14.5	60.5	48.0	33.0	15.0
"	"	14.4	62.0	46.5	32.0	14.5

Zuurstofbepaling in

Barom. gecorr.	T. bloed in gr. C.	T. badw. in gr. C.	Lengte gasbel in de capill. in m.M.			
			Oorspr.	NaCO ₂ abs.	Na O ₂ abs.	O ₂ weggen.
752.9	15.5	14.7	88.5	25.1	13.5	11.6
"	"	"	117.0	94.0	50.0	44.0
"	"	"	71.0	61.0	32.0	29.0

Koperbepaling in 4 c.M³. versch bloed.

Titercijfers ± 0.001 N. thio. in c.M ³ .		Gevonden Cu in mgr.
Bloed.	0.1 mgr. stand. opl.	
2.050	1.545	0.133 gemidd. dus in 3 c.M ³ . 0.100
2.060	1.550	
2.075	1.540	

MAENAS.

na verwijdering van het eiwit.

Inhoud capill. per m.M. in m.M ³ .	Vol. O ₂ gereduc. 0° C. 760 m.M. droog. in m.M ³ .	Red. fact.	Datum.
0.853	11.8	0.924	21-VIII-'24
0.853	11.4 } 11.6	0.924	

3 c.M³. versch bloed.

Inhoud capill. per m.M. in M ³ .	Vol. O ₂ gereduc. 0° C. 760 m.M. droog.	Red. fact.	Datum.
3.20	34.3	0.924	21-VIII-'24
0.853	34.7	0.924	
"	22.8 (2 c.M ³) } 34.3	0.924	

Berekening van de specif. zuurstof-capaciteit.

Gevonden totale hoeveelh. O ₂ gemiddeld . .	34.3 m.M ³ .
" opgel. " " " . . .	17.4 "
" gebonden " " " . . .	16.9 "
" hoeveelheid Cu " . . .	0.100 "
Sp. O. C.	169
% van de theor. waarde (176)	96

Daarom heb ik getracht deze moeilijkheid te overwinnen, door inplaats van slakkenbloed een Hcy-oplossing te bezigen.

Door een grootere Hcy concentratie werd ook de hoeveelheid gebonden O_2 veel grooter. Door slakkenbloed te dialyseeren, op de reeds beschreven wijze, werd Hcy in kristallijnen toestand verkregen.

Van dit gezuiverde product werd door toevoeging van eenige kristallen Na_2CO_3 een oplossing gemaakt, die op dezelfde wijze als bloed werd gebezigd voor de bepaling van de Sp. O. C. Teneinde echter zeker te zijn van de volledige verzadiging van het Hcy met O_2 werd de oplossing niet met lucht, maar met een zuurstofrijk gasmengsel geroteerd.

In de 1^e groep van bepalingen bleek bij analyse het O_2 gehalte van het gasmengsel waarmee geroteerd werd 72 % en in de 2^e groep 52 % te bedragen.

Met opzet werd de saturatie niet met zuiver O_2 uitgevoerd aangezien dan de verhouding van de hoeveelheid opgeloste tot de hoeveelheid gebonden O_2 weer minder gunstig zou worden.

Tabel XVII vereenigt de resultaten van twee groepen van bepalingen.

De hoeveelheid opgeloste O_2 werd berekend aangezien de experimenteele bepaling niet mogelijk was; de oplossing stolde niet bij koken; dit is een bekend feit, dat reeds door DHÉRE (1903) is vermeld.

De, op deze wijze verkregen, getallen voor de Sp. O. C. 172 en 173 bereikten dus, binnen de foutengrens van de gebezigde methoden het theoretische getal.

Al ontbrak mij de gelegenheid nog meer bepalingen uit te voeren, toch meen ik te mogen concludeeren, dat hiermee waarschijnlijk gemaakt is, dat de Sp. O. C. van Hcy werkelijk een verhouding van 1 at. O. op 1 at. Cu aanwijst, tenminste bij de zuurstofbinding van Hcy van *Helix pomatia*. Daarnaast echter werd het physiologisch belangrijke feit, geconstateerd dat het Hcy in het bloed van deze slak bij normale temperatuur en zuurstofspanning niet volkomen verzadigd is.

Zooals reeds meermalen vermeld is, komt Hcy niet alleen bij Mollusca, maar ook bij Arthropoda, voor. Het zou nu kunnen zijn, dat bij de zuurstofbinding van het Hcy van Mollusca de

Sp. O. C. 176 is maar van het Hcy van dieren behorende tot de andere groep een ander getal. Deze veronderstelling wordt b.v. gesteund door de resultaten van DHÉRE, waarover straks meer gezegd zal worden.

Teneinde bovengestelde vraag op te lossen, heb ik getracht de Sp. O. C. te bepalen van het Hcy in het bloed van een Crustacea. Het is mij helaas niet mogen gelukken bloed van *Homarus*, dat veel Hcy bevat, voor dit onderzoek te verkrijgen. Van het Zoölogisch Station te den Helder ontvingen wij echter *Carcinus maenas*. Het bloed dezer dieren bevat minder Hcy, dan dat van *Helix pomatia*. Bij voorbaat was het dus reeds duidelijk, dat de moeilijkheden groot zouden zijn. Voor de verassing werden telkens 4 c.M³. gebezigd en voor de bepaling van de totale hoeveelheid O₂ na verzadiging met lucht 2 maal 3 c.M³. en eenmaal 2 c.M³. De opgeloste zuurstof werd bepaald zooals dat voor *Helix* is beschreven. Tabel XVIII geeft de verkregen resultaten.

Helaas heeft ook hier gebrek aan tijd verdere bepalingen verhinderd. In elk geval is hiermee aangetoond, dat de Sp. O. C. van Hcy van Crustaceae waarschijnlijk eveneens 176 is. Mocht door latere bepalingen aan het licht worden gebracht, dat aan de hier vermelde onderzoekingen met bloed van *Helix* en van *Carcinus* geen methodische of andere fouten kleven, dan zou dus hieruit blijken dat bij 15° C. en 160 m.M. O₂ spanning het Hcy in het bloed van *Carcinus* (en misschien van Crustaceae in het algemeen) meer verzadigd is dan in het bloed van *Helix pomatia*. Dit feit zou in verband kunnen staan met het grootere zoutgehalte van het bloed van de krab. Ik ben er mij van bewust, dat bovenvermelde cijfers echter nog geen conclusie in dezen zin wettigen.

Vragen wij ons af of de hier verkregen resultaten geheel nieuw zijn, dan zien wij, dat de literatuur slechts de onderzoekingen van DHÉRE 1900-'03) vermeldt.

In 1892 verscheen het onderzoek van HEIM waarin medegedeeld werd, dat bloed van verschillende, door hem onderzochte, decapode Crustaceae geen Cu bevatte en daar in dit bloed wel Hcy aanwezig was, zou het Cu dus geen bestanddeel van Hcy zijn.

Dit was voor DHÉRE aanleiding tot een onderzoek naar de

verhouding van de hoeveelheid Cu, die in het bloed van verschillende Crustaceae en Mollusken aanwezig is en de hoeveelheid O₂ bij verzadiging met lucht.

De volgende tabel vat de resultaten van zijn beide publicaties samen.

TABEL XIX.

Species.	Vol. ‰ O ₂	Temp.	Cu in mgr.	Opge- lost.	Gebon- den.	Sp. O. C.	
<i>Octopus vulgaris</i>	4.2	18° C	28.5	0.6	3.6	126	Mollusca.
"	3.9	18°	23.	0.6	3.3	143	
<i>Helix pomatia</i> . .	2.2	19°	11.5	0.65	1.55	135	
"	1.45	17°	6.5	0.7	0.75	115	
<i>Astacus fluviat</i> .	2.4	22°	8.	0.6	1.8	225	
<i>Cancer pagurus</i> .	1.6	18°	7.0	0.6	1.0	143	Crustaceae.
"	1.6	18°	5.5	0.6	1.0	183	
<i>Carcinus maenas</i>	3.9	18°	10.0	0.6	3.3	330	
"	3.9	18°	8.5	0.6	3.3	388	
<i>Homarus vulg</i> . .	3.1	17°	10.5	0.6	2.5	238	
"	3.0	18°5	9.5	0.6	2.4	252	
<i>Maja squinado</i> .	1.6	18°	4.5	0.6	1.0	222	
"	1.6	18°	3.0	0.6	1.0	333	

De 3 laatste kolommen zijn door mij toegevoegd. *) De hoeveelheden opgeloste zuurstof werden berekend uit het vermoedelijke zoutgehalte van het bloed dezer dieren.

Uit deze tabel blijkt, dat het bloed der Crustaceae een grootere Sp. O. C. heeft dan 't bloed der Mollusca. Het feit opzichzelf komt dus overeen met de resultaten boven verkregen, maar het verschil is echter, dat DHÉRE slechts in één enkel geval de theoretische waarde ongeveer heeft bereikt nl. bij *Cancer pagurus* 183. De cijfers voor de Mollusca zijn allen zeer laag, terwijl die voor de Crustaceae allen zeer hoog zijn. Voor sommigen, bijv. *Carcinus maenas*, zou de gevonden Sp. O. C. een verhouding van 1 Cu tot 2 O doen vermoeden.

*) DHÉRE brengt deze kolommen ook in een recente publicatie (1919 II) maar geeft andere getallen.

Teneinde deze verschillen te kunnen verklaren noemt DHÉRE verschillende mogelijkheden op, die echter weinig waarschijnlijk zijn.

De meest plausible verklaring van de geringe overeenstemming in de gevonden getallen, lijkt mij toe te liggen in zijn methode voor de bepaling van het zuurstofgehalte.

DHÉRE toch bezigt voor de O_2 bepaling, de titrimetrische methode volgens SCHÜTZENBERGER.

Dat deze methode onbetrouwbaar is, blijkt o.a. uit de cijfers van SCHÜTZENBERGER (1873) zelf, verkregen bij de bepaling van de hoeveelheid O_2 in leidingwater (0,97 vol %) en in bloed van eenige zoogdieren (± 28 vol %).

Het is begrijpelijk, dat de cijfers van DHÉRE voor het O_2 gehalte van het bloed, van Crustaceae in 't algemeen zoo hoog zijn, vergeleken met die voor het O_2 gehalte van het bloed van Mollusca. Crustaceae hebben behalve Hcy en tethronerythrine andere eiwitten in hun bloed, stoffen die zonder twijfel door het $Na_2S_2O_4$ gereduceerd kunnen worden.

Tenslotte zou ik nog op het volgende willen wijzen: QUAGLIARIELLO (1922) heeft in Wintersteins Handbuch der vergl. Physiol. eveneens gebruik makende van de cijfers van DHÉRE, voor 5 van de 7 onderzochte diersoorten de Sp. O. C. berekend en tenslotte de verkregen getallen gemiddeld.

Het is op deze wijze, dat hij een waarde van 179 heeft verkregen. Het is echter duidelijk, dat bij zoo sterk uiteenlopende getallen (126 en 238) het nemen van een gemiddelde, geen waarde heeft.

Het resultaat van de bepalingen in dit hoofdstuk vermeld is dus: dat met groote waarschijnlijkheid is gebleken, dat Hcy de zuurstof bindt in vaste verhouding tot zijn Cu gehalte en wel als 1 at Cu tot 1 at O. Wij zouden dus ook hier op dezelfde gronden als bij Hb van een chemische binding van de O_2 mogen spreken. Dit is niet alleen voor Hcy van *Helix* maar ook voor dat van *Carcinus* waarschijnlijk gemaakt.

Hiermee wordt niet gezegd, dat het Hcy van de slak identiek is met dat van de krab, integendeel dit is zeer onwaarschijnlijk, maar de prosthatische groep van deze eiwitmoleculen bindt de O_2 op dezelfde wijze.

In het vorige hoofdstuk is vermeld, dat Hcy uit bloed van *Helix pomatia* verkregen 0.29 % Cu bevat. Hieruit is te berekenen, dat (bij een Sp. O. C. van 176,) 1 gr. Hcy $2.9 \times 0.176 = 0.51$ c.M³. zuurstof binden kan. Daarentegen kan 1 gr. Hb. max. 1.34 c.M³. zuurstof opnemen. Haemocyanine heeft dus $\frac{2}{5}$ van de chemische capaciteit van haemoglobine.

HOOFDSTUK IV.

DE DISSOCIATIE-KROMME.

Na het vraagstuk van de stoechiometrische binding van de zuurstof moest ongetwijfeld dat van het evenwicht tusschen zuurstof en Hcy worden aangevat.

INLEIDING.

Het is een algemeen bekend feit, dat bloed gemakkelijk zuurstof opneemt en ook gemakkelijk weer kan afstaan; dit komt doordat in het bloed twee vormen van Hb voorkomen, die alleen in hun zuurstof gehalte van elkaar verschillen maar overigens voortdurend in elkaar kunnen overgaan. Tusschen Hb en oxy Hb bestaat dus steeds een zeker evenwicht, dat alleen van de omstandigheden van het milieu — voornamelijk van het zuurstofgehalte — afhankelijk is.

Teneinde de hoeveelheid oxy Hb, als maat voor het zuurstofbindingsvermogen van Hb, bij verschillende O_2 spanningen te bepalen, moet bloed, of een Hb oplossing, waarvan de concentratie bekend is, met gasmengsels van verschillend O_2 gehalte, in evenwicht worden gebracht.

Vervolgens wordt, door uitpompen of op andere wijze, van een nauwkeurig afgemeten hoeveelheid het O_2 gehalte bepaald en daaruit berekend welk gedeelte van de totale hoeveelheid Hb als oxy Hb aanwezig was. Neemt men nu de gebezigde O_2 spanningen als abscis en het percentage oxy Hb als ordinaat en zet men in dit systeem de cijfers, die uit de proeven verkregen zijn, als punten uit, dan vormt de verbindingslijn van deze punten de **dissociatie-kromme**, dus een graphische voorstelling van het evenwicht tusschen Hb en O_2 bij verschillende zuurstofspanningen.

De bestudeering van de vraag welk verband er bestaat tusschen de hoeveelheid oxy Hb en de partieele O_2 spanningen waarmee het in evenwicht is, onder verschillende omstandigheden, heeft een enorme literatuur doen ontstaan in ons o.a. een inzicht ge-

geven in een van de mooiste deelen van de physiologie van den mensch.

Zooals reeds in het begin van Hoofdstuk III is vermeld was HÜFNER (1901) de eerste die in de rechthoekige-hyperbool een graphische voorstelling meende te mogen zien, van het overwicht tusschen Hb en O₂ bij verschillende zuurstofspanningen.

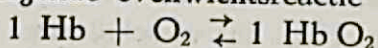
Hij was echter volkomen speculatief, op theoretischen grondslag, tot deze voorstelling gekomen. Toen later BOHR (1903) experimenteel het bovengenoemde evenwicht bestudeerde, verkreeg hij een geheel andere voorstelling.

Later is door het onderzoek van ROBERTS & BARCROFT (1909) aan het licht gekomen, dat zoowel HÜFNER als BOHR gelijk hadden.

De door hen gegeven graphische voorstellingen konden uit een gemeenschappelijk oogpunt worden verklaard.

Ofschoon een oplossing van Hb in water klaarblijkelijk geen homogeen systeem vormt, heeft toch eerst HÜFNER en daarna vooral BARCROFT en zijn medewerkers, op de reactie van Hb en O₂ de wet van de massawerking toegepast, teneinde de experimenteel bepaalde curven te kunnen verklaren.

Aannemende dat de zuurstofbinding van Hb kan worden voorgesteld door de volgende evenwichtsreactie



hebben BARCROFT & ROBERTS (1909) aangetoond, dat voor een gedialyseerde Hb oplossing de langs experimenteelen weg verkregen punten op de theoretisch berekende kromme vielen. In dit geval was de kromme een rechthoekig hyperbool.

Bij aanwezigheid van electrolyten echter, krijgt de curve een anderen vorm.

Teneinde de wisselende vorm van de dissociatie-kromme te kunnen verklaren heeft HILL (1913) de aggregatietheorie opgesteld. Hij neemt aan, dat een Hb oplossing zonder electrolyten moleculair dispers is maar dat onder invloed van zouten de moleculen polymeriseeren.

De daardoor ontstane molecuulaggregaten nu binden de O₂ volgens onderstaande evenwichtsreactie.

$\text{Hbn} + n \text{ O}_2 \rightleftharpoons (\text{Hb O}_2)_n$ waarin n het gemiddelde aantal moleculen aangeeft, dat in een complex aanwezig is. BARCROFT (1913) kon aantonen, dat deze vergelijking voldeed voor alle gevonden

dissociatiekrommen van bloed, binnen de foutengrens van de gebezigde methodiek. Hierdoor werd het dus mogelijk de evenwichtsreactie tusschen Hb en O_2 onder zeer verschillende omstandigheden uit een gemeenschappelijk oogpunt te beschouwen.

Inplaats van deze zuiver chemische reactie van Hb en O_2 neemt o. a. BAYLISS (1918) een andere wijze van binding aan. Zijn voorstelling, waarop ik hier niet nader wil ingaan, vindt m. i. minder steun in de experimenteele data dan de opvatting van HILL.

De bestudeering van het evenwicht tusschen Hb en zuurstof heeft een tweeledig doel:

1e. een fysisch-chemisch oogmerk, teneinde de wisselwerking tusschen Hb en O_2 te leeren kennen onder zeer verschillende omstandigheden;

2e. een biologisch oogmerk, teneinde een inzicht te verkrijgen in de opname van zuurstof in longen en kieuwen en in de afgifte in de weefsels. Reeds uit den vorm van de dissociatiekromme van het bloed van een dier, kunnen belangrijke conclusies worden getrokken (vgl. KROGH (1919) omtrent de biologisch belangrijke eigenschappen van het bloed van dat dier.

In analogie met Hb, was het dus van groot belang de dissociatiekromme vast te stellen van Hcy onder verschillende omstandigheden.

Het sprak vanzelf dat wij zouden moeten beginnen met de kromme van een zuivere, zoo mogelijk electrolytvrije, Hcy-oplossing omdat wij daarin met een eenvoudig systeem te maken hebben. Later zou dan den invloed van verschillende factoren op de eigenschappen van Hcy moeten worden nagegaan. Tenslotte kan door vergelijking een inzicht verkregen worden in de ademhalingsfunctie van dit bloedpigment.

EXPERIMENTEN.

Voor de vaststelling van de dissociatiekromme van zuivere Hcy werd gebezigd een oplossing van kristallen verkregen door dialyse van slakkenbloed volgens de reeds eerder beschreven methode.

De oplossing had bij $15^\circ C$. een specifiek electrisch geleidingsvermogen van 3×10^{-4} reciproke Ohm.

De kleur was bij opvallend licht, donker blauw bij doorvallend licht echter diep paars. Aan het slot van dit hoofdstuk zal ik op deze kleur nog nader terug komen.

Met deze oplossing werd als volgt gehandeld:

Verschillende saturatoren werden elk gevuld met 8—10 c.M³. vloeistof en achtereenvolgens met de waterstraalluchtpomp geëvacueerd.

Vervolgens werden ze na elkaar gevuld met gasmengsels, waarin respectievelijk 2.6; 5.1; 8.5; 12.0; 14.9 % O₂ aanwezig was, en daarop geroteerd gedurende $\frac{3}{4}$ uur met een snelheid van 50 omwentelingen per minuut.

Met den kwikpomp volgens VAN SLIJKE werden uit elken saturator minstens 2 maal 2 c.M³. oplossing uitgepompt. In de opgevangen gasbellen werd met de Jordanpipet het O₂ gehalte bepaald. Evenzoo werden 2 maal 2 c.M³. na schudden met lucht uitgepompt.

Op deze wijze werden de volgende cijfers verkregen: (zie Tab. XX).

De opgeloste hoeveelheid zuurstof werd berekend, aannemende dat de Hcy oplossing evenveel O₂ opgelost kon bevatten als gedestilleerd water.

De maximale hoeveelheid O₂ die in 2 c.M³. aan het Hcy gebonden kon worden, werd berekend uit het Cu gehalte, aannemende dat de Sp. O. C. 176 is. Deze hoeveelheid was dus 31.5 m.M³. De getallen, gevonden voor de gebonden hoeveelheid O₂, zijn in de laatste kolom opgegeven in % van deze 31.5 m.M³.

Zet men nu de zoo berekende getallen in een coördinaten systeem uit dan krijgt men onderstaande dissociatie-kromme. (fig. 8 (III)).

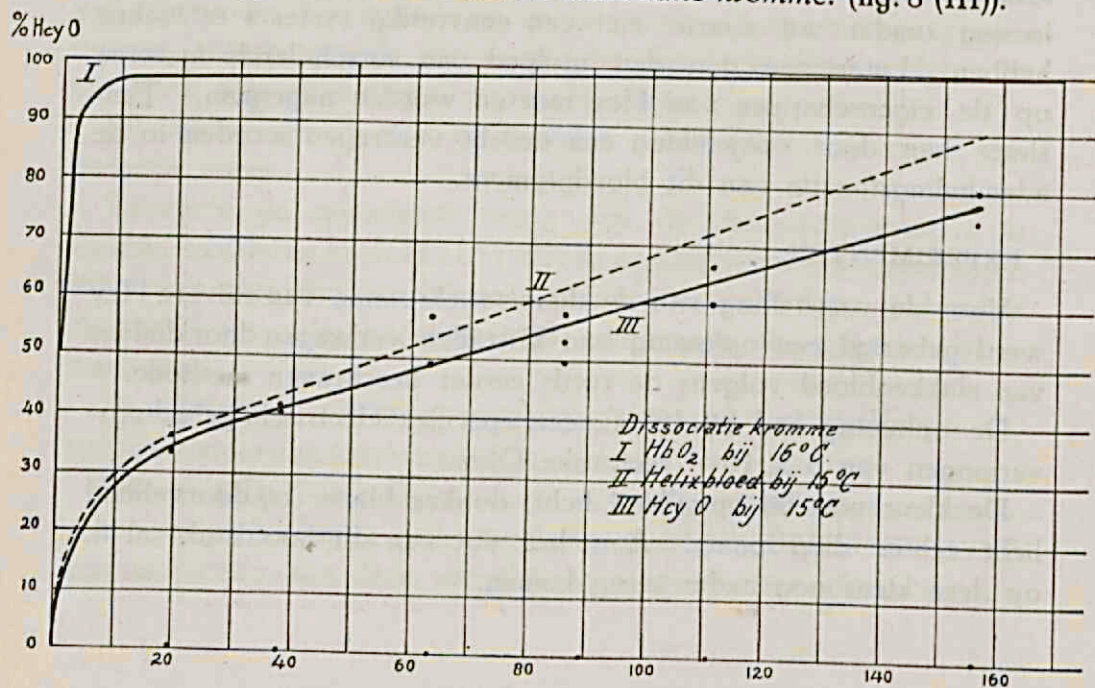


Fig. 8

TABEL XX.

Zuurstofgehalte van een Hcy-oplossing bij verschillende zuurstofspanningen.

Temp. 15° C.	Gasmengsel.	Totale O ₂ .	Opgel. O ₂ .	Geb. O ₂ .	Verzad. in %.
Barom. 761.2	2.6% O ₂ = 19.4 m.M.	13.1; 12.3	m.M. ³	11.3; 10.5	m.M. ³ 36.0; 33.5,
	5.1 " " = 38.0 "	16.4; 16.7	"	12.8; 13.1	" 40.6; 41.6.
Waterd. Sp. 12.8	8.5 " " = 63.5 "	21.5; 21.5; 24.0	"	15.5; 15.5; 18	" 49.2; 57.2; 49.2.
	12.0 " " = 89.5 "	25.0; 24.0; 26.5	"	16.8; 15.8; 18.3	" 53.5; 50.0; 58.0.
	14.9 " " = 111.0 "	29.9; 32.0	"	18.9; 21.0	" 60.0; 66.5.
	20.9 " " = 15.6 "	39.0; 38.1	"	24.6; 23.7	" 78; 75.
Gevonden Cu in 2 c.M. ³ 0.179 mgr.			100 % verzad. = 0.179 × 176 = 31.5		

TABEL XXI.

Zuurstofgehalte van bloed van *Helix pomatia* bij verschillende zuurstofspanningen.

Temp. 15° C.	Gasmengsel.	Totale O ₂ .	Opgel. O ₂ .	Geb. O ₂ .	Verzad. in %.
Barom. 760.5	2.5% O ₂ = 18.7 m.M.	8.4; 8.0 m.M ³ .	1.7 m.M ³ .	6.7; 6.3 m.M.	37; 35
	5.5 " " = 41.0 "	11.9; 9.6 "	3.4 "	8.5; 6.2 "	47; 34.5
Waterd. Sp. 12.8	8.3 " " = 62. "	15.5; 14.5 "	5.5 "	10.0; 9.0 "	55.5; 50
	11.5 " " = 86. "	19.1; 17.5 "	7.6 "	11.5; 9.9 "	64.0; 55.0
	16.0 " " = 119.5 "	25.0; 23.8 "	10.2 "	14.8; 13.6 "	82.0; 75.5
	20.9 " " = 156. "	29.7; 27.6 "	14; 12.9 gemid. 13.5	16.2; 14.1 "	90.0; 78.5
Gevonden Cu in 2 c.M ³ . bloed 0.102 mgr.			100 % = 0.102 × 17.6 = 18.0		

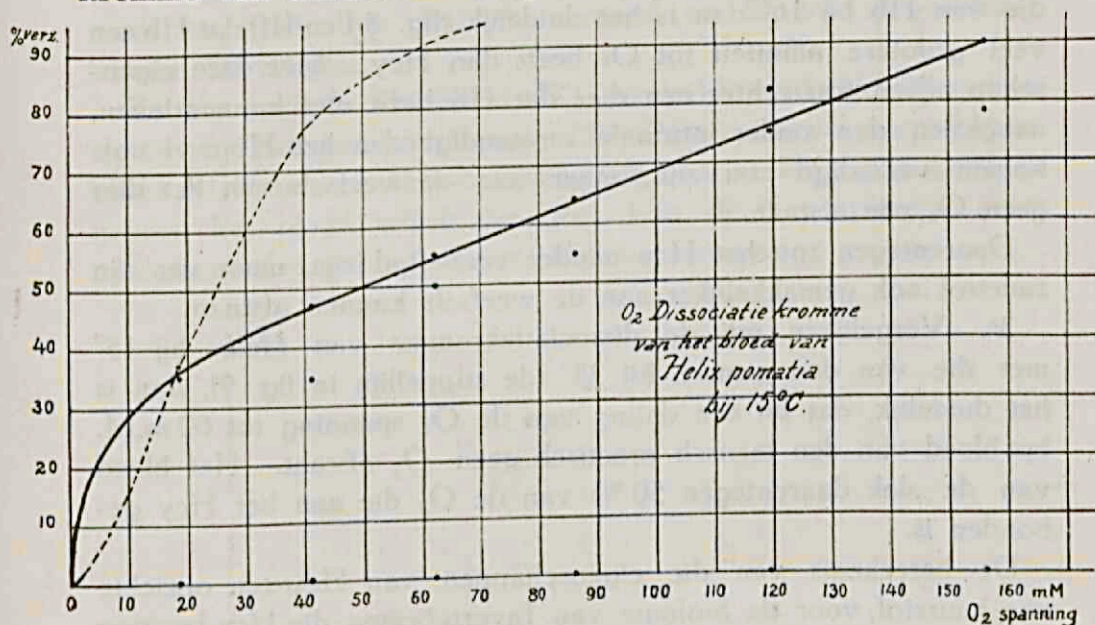
Op dezelfde wijze werd met een hoeveelheid versch afgetapt slakkenbloed gehandeld. De verkregen cijfers zijn vereenigd in tabel XXI.

De opgeloste hoeveelheid O_2 werd evenals bij de bepaling van de Sp. O. C. gemeten na verwijdering van het Hcy uit het bloed door koken.

Deze hoeveelheid was gemiddeld 13.5 m.M^3 . Bij een partieele O_2 spanning van 156 m.M. was dus in 2 c.M^3 . bloed 13.5 m.M^3 . opgelost. Bij een spanning van 0 m.M. zal deze hoeveelheid ongetwijfeld 0 zijn. Door graphische interpolatie vindt men nu de hoeveelheden voor partieele spanningen, die tusschen 0 en 156 liggen.

De maximale hoeveelheid O_2 , die in 2 c.M^3 . van dit bloed gebonden kon worden, werd evenals boven berekend uit het Cu gehalte en de Sp. O. C.

De hier verkregen cijfers voor de hoeveelheid O_2 gebonden worden graphisch voorgesteld in onderstaande curve de dissociatie-kromme van slakkenbloed bij 15° . (fig. 9.)



Figuur 9

Laat ik vooropstellen, dat de curve voor Hcy en voor bloed van *Helix pomatia* verkregen is, door de bepaling van een gering aantal punten. De kromme welke in fig. 8 en 9 getrokken is, zal dus bij nader onderzoek nog belangrijke wijzigingen kunnen ondergaan, maar niettegenstaande deze onzekerheid, meen ik toch tot het volgende gerechtigd te zijn:

1e. Vergelijken wij de dissociatiekromme van bloed van *Helix* met die van Hcy verkregen na verwijdering van de electrolyten (zie fig. 8 II en III) dan staat het vast dat de curve voor slakkenbloed steiler verloopt, dan die voor een Hcy opening. Dit zou dus beteekenen dat onder dezelfde omstandigheden slakkenbloed meer O_2 kan opnemen dan een Hcy oplossing zonder electrolyten. Bij bloed van Vertebraten en een oplossing van electrolytvrije Hb is iets dergelijks vastgesteld voor O_2 spanningen boven 70 m.M. terwijl bij O_2 spanningen lager dan 70 m.M. het omgekeerde plaats heeft, daar is dus bij gelijke zuurstofspanning een Hb oplossing meer verzadigd dan bloed.

2e. Vergelijken wij de dissociatie-kromme van Hcy bij 15° met die van Hb bij 16° dan is het duidelijk (fig. 8 I en III) dat Hb een veel grootere affiniteit tot O_2 heeft dan Hcy. Met deze eigenschap alleen, zou echter een dier dat Hb bezit niet kunnen leven, aangezien dan onder normale omstandigheden het Hb wel volkomen verzadigd zou zijn, maar aan de weefsels van het dier geen O_2 zou afstaan.

Daarentegen zou het Hcy minder verzadigd zijn, maar van zijn zuurstof ook gemakkelijker aan de weefsels kunnen afstaan.

3e. Vergelijken wij de dissociatiekromme van *Helix* bij 15° met die van den mensch bij 38° (de stippellijn in fig. 9), dan is het duidelijk, dat bij een daling van de O_2 spanning tot 60 m.M. het bloed van den mensch practisch geen O_2 afstaat. Het bloed van de slak daarentegen 50 % van de O_2 die aan het Hcy gebonden is.

De beteekenis van die eigenschappen van Hcy ten opzichte van zuurstof, voor de biologie van Invertebraten, die Hcy bezitten vergeleken met die, welke Hb als bloedkleurstof hebben, moet nog verder onderzocht worden, maar het is duidelijk dat door deze vergelijking, veel zal kunnen verklaard worden, van wat thans nog duister is in de biologie van deze dieren.

Ik zou dit hoofdstuk willen besluiten met een opmerking over de kleur van slakkenbloed en Hcy oplossingen.

Zooals reeds vermeld is, heeft een Hcy oplossing, verkregen door kristallen met behulp van sporen zout op te lossen, een heldere, diep blauwe kleur, welke bij doervallend licht een paarse tint heeft. Slakkenbloed echter, heeft door zijn opalescentie een meer licht blauwe kleur, die bij doervallend licht een bruinpaarse tint heeft. Dit bovengenoemde verschil verdwijnt volkomen zoodra men aan een Hcy oplossing b.v. enkele druppels 0.5 % CaCl_2 oplossing toevoegt. Het Hcy vlokt dan niet uit maar verandert slechts van kleur.

Eigenaardig is dat deze kleurverandering gepaard gaat met een verandering in de stabiliteit van de oplossing want goed gedialyseerde Hcy, oplossingen vlokken niet uit bij toevoeging van alcohol, wel echter in bovengenoemd geval, als men eerst electrolyten heeft toegevoegd. Bovendien stolt een electrolytarme Hcy-oplossing niet bij kookhitte. Ze coaguleert echter onmiddellijk zoodra men vooraf zouten toevoegt. Deze laatste waarnemingen werden reeds in 1903 door DHÉRE vermeld en ik heb ze volkomen kunnen bevestigen.

Zooals reeds in Hoofdstuk II is vermeld, verdwijnt bij een extractie in het toestel volgens VAN SLIJKE, zoowel van slakkenbloed als van een Hcy-oplossing, de blauwe kleur zoo goed als geheel, het bloed wordt dan geelachtig, de Hcy oplossing zwak opalescent. Dit gebeurt dus zonder verwarming.

HOOFDSTUK V.

HET ABSORPTIESPECTRUM.

Met het bestudeeren van het absorptiespectrum van Hcy in analogie met dat van Hb, kan men verschillende dingen trachten te bereiken:

1e. De karakteriseering van deze eiwitstof en van zijn verbindingen met gasen. Door deze karakteriseering zou b.v. de vraag opgelost kunnen worden of slechts één soort Hcy bestaat, dan wel of bij de verschillende diersoorten specifieke verschillen in het spectrum van Hcy te constateeren zijn.

2e. De quantitatieve bepaling van het Hcy en van zijn verbinding met zuurstof en andere gasen door spectrophotometrie.

3e. Een inzicht in den onderlingen samenhang der absorptiebanden zooals BAAS BECKING (1921) met behulp van de theorie van PERRIN voor Hb en HbO₂ heeft trachten te geven.

Literatuuroverzicht.

Vele onderzoekers hebben zich bezig gehouden met het absorptiespectrum van haemocyaninehoudend bloed.

De meesten echter hebben slechts kunnen constateeren, dat het Hcy, vooral in dikkere lagen, het spectrum verduistert, zonder bepaalde deelen geheel te absorbeeren.

De eerste, die bij het spectroscopisch onderzoek van bloed van *Helix pomatia* een absorptieband opmerkte, was KRUKENBERG (1882). Hij zag, dat bij toenemende dikte van de laag bloed, om de D lijn (geel) een deel van het spectrum donkerder was dan aan weerszijden daarvan.

Eerst veel later heeft GAUTRELET (1903), eveneens met bloed van *Helix*, dezelfde waarneming gedaan. Hij zag een zeer breede absorptieband zonder scherpe grenzen, waarvan het maximum bij D lag.

Ongeveer tegelijkertijd heeft KOBERT (1903) dezelfde vage band opgemerkt in het absorptiespectrum van het bloed van *Eledone moschata*.

De eigenlijke ontdekkers van het absorptiespectrum van Hcy zijn DHÉRE en BURDEL (1913). Door het bezigen van exacte methoden hebben deze voortreffelijke onderzoekers met bloed van *Helix pomatia*, *Sepia officinalis*, *Palinurus vulgaris*, en *Homarus vulgaris* bij een passende dikte van de laag een scherp afgegrensden absorptieband in het gele deel van het spectrum gevonden.

Dezelfde resultaten verkregen zij met oplossingen van HcyO van *Helix pomatia* en met het gedefibrineerde bloed van *Astacus*. De as van dezen absorptieband varieerde tusschen 571 en 581 $\mu\mu$ voor de verschillende dieren.

Naar hun meening, vindt deze variatie zijn oorzaak niet zoozeer in de meer of mindere aanwezigheid van zouten (het bloed van zeedieren bevat natuurlijk meer zouten, dan dat van *Helix*), als wel in de specifieke verschillen van het absorptiespectrum van het Hcy dezer dieren. Bij reductie van het HcyO verdween de absorptieband geheel.

Bepalingen van VLÈS (1913) met behulp van de spectrophotometer bevestigden de waarnemingen van DHÉRE en BURDEL. Daarentegen heeft ALSBERG (1915) vermeld, dat het spectrum van HcyO van *Limulus* geen bepaalden absorptieband heeft. Behalve in het zichtbare gebied heeft DHÉRE (1913) (1920) ook het absorptiespectrum van HcyO in het ultraviolet onderzocht. Hij ontdekte daarbij twee banden, de eerste tusschen 293 en 263 $\mu\mu$, de tweede tusschen 364 en 328 $\mu\mu$.

Deze absorptiebanden waren identiek zoowel in bloed, als in gezuiverde HcyO-oplossingen, van *Helix*, *Octopus*, *Astacus* en *Palinurus*.

Later heeft BURDEL (1922) hetzelfde geconstateerd voor gezuiverde HcyO van *Sepia*, *Eledone*, *Helix* en *Palinurus*.

Experimenten.

1e. *Het ultraviolette gebied.* Het was mij opgevallen, dat DHÉRE in zijn publicaties over het ultraviolet-absorptiespectrum van HcyO niet vermeld heeft welk beeld men verkrijgt bij reductie van het HcyO.

Waarschijnlijk is dit dus nog niet onderzocht.

Het vraagstuk hoe het ultraviolet-absorptiespectrum van HcyO van dat van Hcy verschilt, heeft een zeer interessante zijde gekregen door de voorstelling van DHÉRE (1919).

Hij meent nl. dat de band tusschen 364 en 328 $\mu\mu$ toegeschreven moet worden aan de prosthetische groep van het Hcy-molecuul.

Indien dit juist is, dan is de mogelijkheid niet uitgesloten, dat door den overgang van HcyO in Hcy, iets in deze groep verandert, en daarbij tevens de plaats of de intensiteit van den band, die deze groep karakteriseert.

Teneinde dit na te gaan heb ik, geholpen door Dr. H. C. BURGER eenige opnamen gedaan van het ultraviolette-absorptiespectrum van Hcy en HcyO.

De gebezigde opstelling was als volgt:

Een kleine booglamp met automatische regeling gaf een horizontalen lichtbundel, die door een kwartslens viel in de as van een cilindrische cuvet, welke door een schroef korter of langer gemaakt kon worden. Uit de cuvet trad de lichtbundel in een kleine kwartsspectrograaf, die op een photographische plaat een ultraviolet spectrum wierp.

Met deze opstelling werden opnamen gedaan van het ultraviolet-absorptiespectrum van onverdund versch slakkenbloed, dat zorgvuldig was gefiltreerd. In nevenstaande figuur ziet men de verkregen resultaten.

N^o. 1, 4 en 7, 11, 12 en 13 zijn opgenomen met water in de cuvet.

N^o. 2 en 3 geeft het spectrum van het geoxydeerde bloed in 2 verschillende laagdikten.

N^o. 5 en 6 evenzoo van Hcy, na reductie met sporen $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$.

N^o. 8, 9 en 10 vertoont het ultraviolet-emmissiespectrum van een kwiklamp.

In de eerste groep (I) was de belichtingstijd bij alle opnamen 60 sec. en bij de tweede groep (II) respectievelijk 10, 30, 90 en 10, 30, 90 sec.

De 2^e groep is slechts bij de 1^e gevoegd, teneinde den absorptieband te kunnen localiseeren met behulp van de kwiklijnen. Op N^o. 10 ziet men namelijk van rechts naar links achtereenvolgens de lijnen 3132, 3655, 4047 Å enz.

Vergelijken wij nu de nummers 2 en 5, dan zien wij duidelijk, dat 2 een absorptieband vertoont, waarvan de as bij ± 3600 Å ligt, dien 5 daarentegen in dit gebied mist. Bij deze twee opnamen was de laagdikte van de vloeistof precies gelijk. De nummers

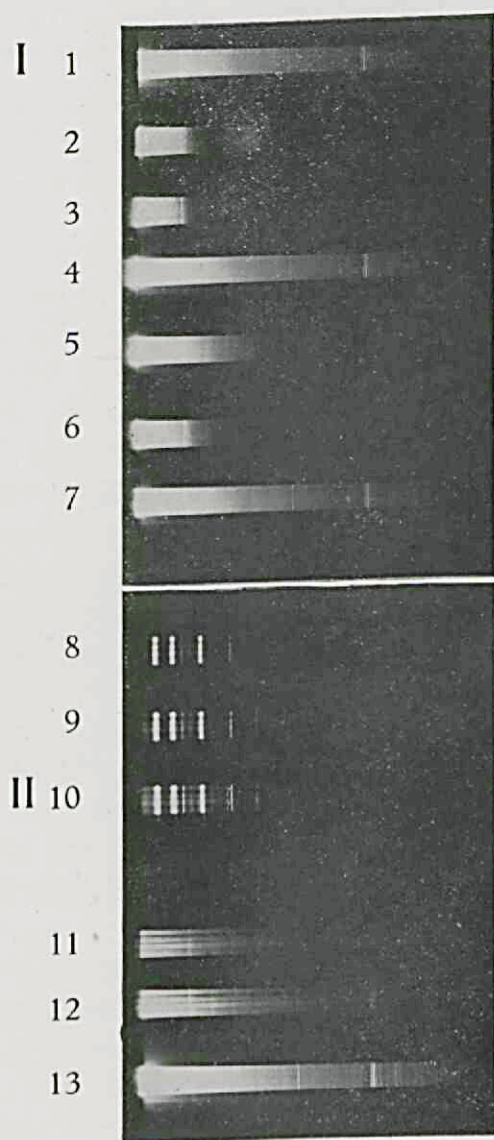


Fig. 8

3 en 6 zijn overeenkomstige opnamen, echter met grootere laagdikte dan 2 en 5. De absorptieband van het oxy-Hcy is hierdoor niet meer duidelijk waarneembaar. In elk geval ziet men door vergelijking van 2 en 3 eenerzijds, 5 en 6 anderzijds, dat bij reductie van het HcyO, de band (welke door DHÉRE tusschen 3640 en en 2380 Å is gelocaliseerd), uit dit gebied verdwijnt. De band, op bovenstaande figuur bij N°. 2 vastgelegd, is zonder twijfel identiek met die, welke door DHÉRE is beschreven.

Bovenstaande opnamen, 2 en 5, heb ik vervolgens gephotometreerd, teneinde het al of niet aanwezig zijn van den absorptieband in een curve te kunnen uitdrukken. De getallen, die de golflengten aangeven, zijn in de curve aangebracht na vergelijking van het spectrum van de gebezigde booglamp, zooals dat bij de nummers 1, 4 en 7 is vastgelegd, met de emissielijnen van het kwik. Men ziet duidelijk enkele emissielijnen in het spectrum, van de booglamp, afkomstig van de vulling der koolspitsen. Deze lijnen zijn ook aanwezig bij de nummers 2, 3, 5 en 6, zoodat daarmee een oriëntering mogelijk is.

Het photometreeren geschiedde als volgt met een microphotometer:

Het negatief I, waarvan nevenstaande reproductie is gegeven, werd in een statief geklemd, dat automatisch in een horizontale richting werd verplaatst. Met behulp van eenige lenzen, werd het licht van een klein electrisch lampje door de photographische plaat geworpen en opgevangen op eene kleine thermozuil, verbonden met een galvanometer volgens MOLL, waarvan de uitslagen photographisch geregistreerd werden.

Bij de verplaatsing van het photographische plaatje, werd op deze wijze de meer of mindere zwarting, in het beeld van het spectrum, geregistreerd op een reep photographisch papier, waarvan achterstaande figuur een reproductie is:

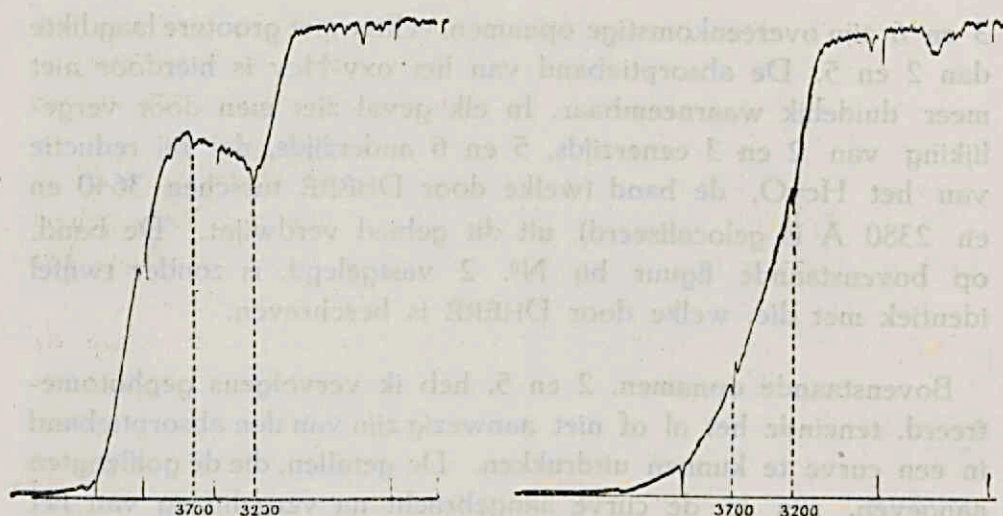


Fig. 11

Men ziet hier dus, beter nog dan fig. 10 kan aantonen, dat bij reductie van het HcyO, de band tusschen 3700—3200 Å uit dit gebied verdwijnt.

Of de band geheel uit het spectrum weg gaat dan wel slechts verschuift, heb ik niet kunnen aantonen.

Bij de vele punten van overeenkomst in de eigenschappen van Hcy en Hb, vinden wij hier een punt van verschil, want Hb vertoont, evenals Hcy, een absorptieband in zijn ultraviolet-spectrum, welke voor HbO₂ zijn middellijn heeft bij 414 $\mu.$ en voor Hb. bij 429 $\mu.$ Bij de reductie van HbO₂ verplaatst deze band zich dus een weinig naar het gebied met grotere golflengte.

2e. *Het zichtbare gebied.* DHÉRE en BURDEL (1913) hebben den absorptieband van HcyO in het zichtbare gebied, voor het bloed van verschillende diersoorten gelocaliseerd en evenzoo voor HcyO-oplossingen. Zooals reeds is vermeld heeft VLÈS (1913) de quantitative verhoudingen in het absorptiespectrum bepaald, maar slechts voor bloed van *Octopus*. Het leek mij echter gewenscht eerst de eigenschappen van het gezuiverde Hcy in dit opzicht te bestudeeren, teneinde later daarmee het quantitative spectrum van het bloed van verschillende dieren te kunnen vergelijken.

Het spreekt van zelf, dat voor een nauwkeurig onderzoek in

deze richting een groot aantal bepalingen, met oplossingen van zeer verschillende concentratie, gedaan moeten worden. Hiertoe ontbrak mij helaas echter tijd en gelegenheid, zoodat tot nu toe slechts enkele bepalingen zijn uitgevoerd.

Gebruik makende van de groote welwillendheid van den Heer H. A. C. DENIER VAN DER GON, hebben wij met een geheel automatische opstelling spectrophotometrische bepalingen van het absorptie-spectrum van Hcy- en HcyO-oplossingen gedaan.

Het materiaal voor deze proeven werd verkregen door, op de in Hoofdstuk III beschreven wijze, bloed van *Helix pomatia* te dialyseeren.

Van de verkregen kristallen werden, door toevoeging van sporen NaCl, oplossingen verkregen, die voor de metingen werden gebezigd. Teneinde het HcyO te reduceeren, heb ik gebruik gemaakt van het relatieve vacuum van een gewone luchtpomp. Onder een goed sluitende stolp werd het Hcy gedurende den nacht volkomen gereduceerd.

In enkele bepalingen werd het HcyO met een druppel verdunde $(\text{NH}_4)_2\text{S}$ gereduceerd.

Wij gingen steeds zóó te werk, dat eerst het spectrum van HcyO, daarna, in de zelfde cuvet, dat van de gereduceerde stof werd opgenomen.

De gebezigde opstelling is reeds door DENIER VAN DER GON (1923) beschreven; ik kan volstaan met de volgende hoofdzaken te vermelden:

Van een kleine, constante lichtbron, wordt het licht in een monochromator zoëdanig verdeeld, dat telkens slechts een zeer nauwe bundel uit een bepaald gedeelte van het spectrum kan uit treden; automatisch wordt na elke opname een volgende bundel vrijgelaten, zoodat op deze wijze achtereenvolgens alle stralen van het spectrum door de te onderzoeken oplossing kunnen worden geworpen. Teneinde de absorptie quantitatief te kunnen meten wordt gebruik gemaakt van cuvetten, die zoëdanig zijn geconstrueerd, dat tusschen twee glasplaatjes, met glazen ringen, twee afzonderlijke ruimten naast elkaar worden gevormd. De beide helften van zoo'n cuvet hebben precies dezelfde breedte. In de eene helft wordt de te onderzoeken oplossing gebracht, in de andere water. Afwisselend wordt nu één van de beide helften voor den stralen-

bundel gehouden, die uit den monochromator treedt. Na door de vloeistof te zijn gegaan, wordt het licht opgevangen op een thermozuil, verbonden met een galvanometer volgens MOLL, waarvan de uitslagen op een photographische trommel worden geregistreerd.

Voor elken uittredenden stralenbundel registreert de galvanometer na elkaar 2 punten (eigenlijk lijntjes), en keert dan, door de afsluiting van het licht, weer naar zijn nulpunt terug. Wij krijgen op deze wijze voor de totale opname, een reeks van telkens 3 punten boven elkaar, waarvan één het nulpunt is terwijl de afstand van dit nulpunt tot een der beide andere, telkens een maat geeft voor de intensiteit van het licht, dat door het water, en van de intensiteit van het licht, dat door de oplossing treedt. Voor elke stralenbundel (elke „stap”) wordt dus geregistreerd de verhouding

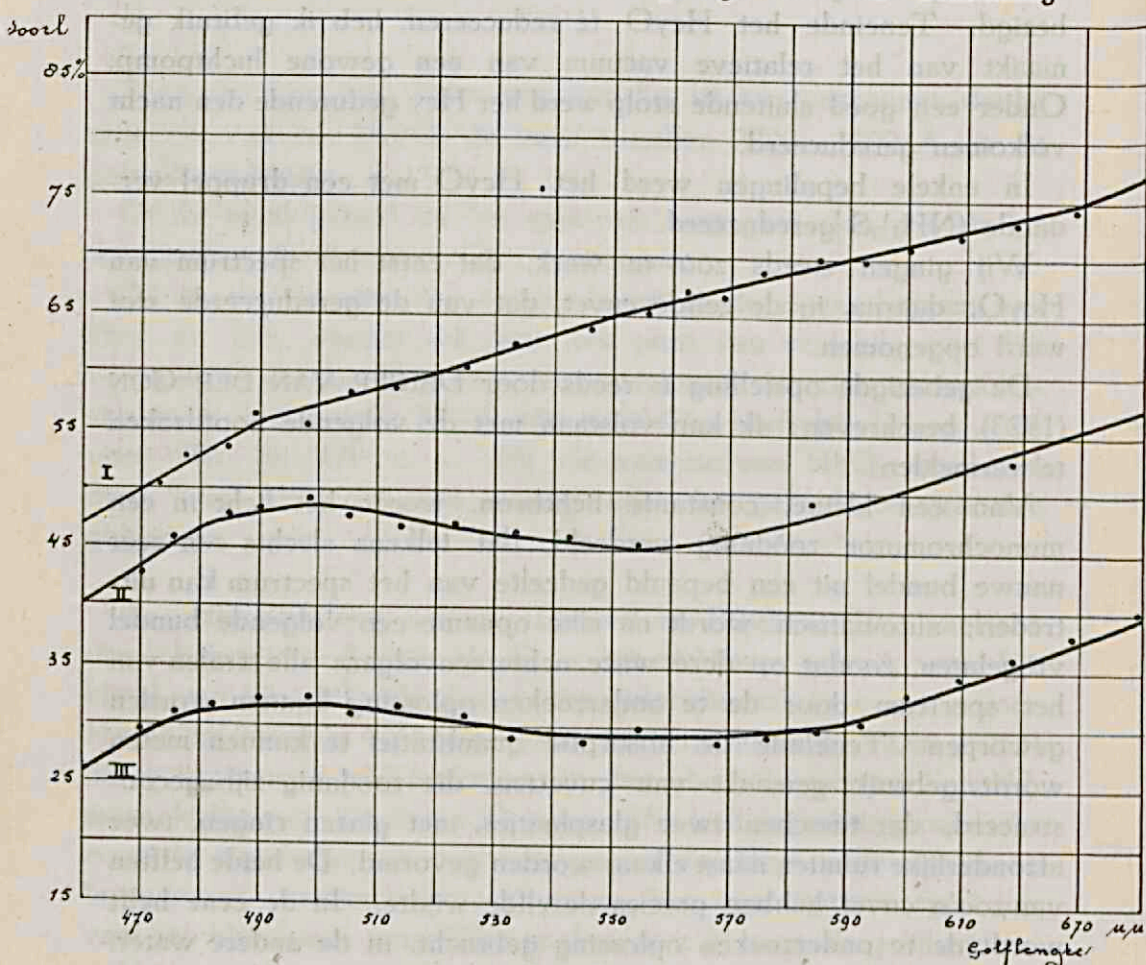


Fig. 12

van de intensiteiten van het licht vóór en na het doorlopen van een laag van bepaalde dikte, van de te onderzoeken oplossing.

Zet men nu de verkregen verhoudingen in de absorptie van de opeenvolgende stappen in een coördinatensysteem uit, met de golflengte als abscis en de doorlating in % als ordinaat, dan krijgt men nevenstaande curven (fig. 12):

I. stelt een curve voor van Hcy (verkregen door reductie van een HcyO oplossing met de luchtpomp) in een cuvet van 3.47 m.M. dikte.

II. is een kromme van dezelfde oplossing in dezelfde cuvet vóór de reductie.

III. is eveneens een curve voor HcyO van dezelfde concentratie maar in een cuvet van 5.15 m.M. dikte.

Het Cu gehalte van de hier gebezigde oplossing was 0.0138 %.

Hieruit ziet men duidelijk, dat het HcyO een band heeft, waarvan de as ligt bij 560 $\mu\mu$ en dat de band verdwijnt bij reductie.

Merkwaardig is het, dat de zoo verkregen lijnen, voor eenzelfde laagdikte en eenzelfde Hcy concentratie, niet op elkaar vallen (natuurlijk met uitzondering van het gedeelte in het absorptiegebied). Dit beteekent dus, dat het HcyO, behalve in het absorptiegebied, in het geheele spectrum een deel van de binnendringende stralen onderschept.

Dit feit is reeds door DHÈRÉ en eveneens door VLÈS vermeld. Wij hebben hier naast een absorptie te maken met een dispersie van een deel van het licht, vooral van de blauwe stralen, door de deeltjes van de oplossing. De kleur van het blauwe HcyO wordt dus veroorzaakt door 2 factoren: de absorptie van de gele en geel-groene en de dispersie van de blauwe stralen.

Het zou zeer interessant zijn te weten of werkelijk, zooals uit deze curven blijkt, de colloïdale deeltjes van de oplossing bij de oxydatie groter worden, dit probleem, kan misschien worden opgelost, aangezien KRUYT en TENDELOO (1924) een methode hebben uitgewerkt voor de bepaling van de grootte der deeltjes in colloïdale oplossingen.

Het ultra-roode gebied:

Tenslotte hebben wij met een dergelijke opstelling als voor het zichtbare gebied, ook de absorptie in het ultra-rood bestudeerd,

met de bedoeling de vraag op te lossen of Hcy evenals Hb. ook in het ultra-rood een absorptie-band vertoont. Wij hebben dit echter niet kunnen constateeren voor de golflengten kleiner dan 1.5μ . In het verdere deel van dit gebied worden de stralen zoodanig door het oplosmiddel (water) geabsorbeerd, dat het moeilijk te constateeren is, of HcyO of Hcy hier een absorptieband heeft.

SAMENVATTING.

In analogie met haemoglobine werd van haemocyanine, de koperhoudende ademhalingskleurstof van vele Invertebraten, het zuurstofbindingsvermogen bestudeerd.

Dit geschiedde aan de hand van zeer exacte methoden, nl.:

1e. een koperbepalingsmethode waarmee hoeveelheden van 0.1 mgr. tot op 1 % nauwkeurig te bepalen is en

2e. een methode voor de bepaling van de totale hoeveelheid zuurstof, die in 2 c.M³. bloed aanwezig is, met een nauwkeurigheid tot ongeveer 2 m.M³.

Er werd aangetoond, dat in bloed van *Helix pomatia* en van *Carcinus maenas* ongeveer evenveel zuurstof aan het Hcy gebonden is, als in de vloeistof is opgelost.

Bij de zuurstofbinding bleek dat er, analoog met Hb, een vaste verhouding bestaat tusschen de hoeveelheid koper en de maximale hoeveelheid gebonden O₂.

Voor deze verhouding — de specifieke zuurstofcapaciteit — werd theoretisch het getal 176 gevonden.

Uit de experimenten met gezuiverde haemocyanine werden voor de spec. zuurst. cap. de getallen 172 en 173 verkregen; met het bloed van *Carcinus maenas* 169, en met het bloed van *Helix pomatia* 154 en 158.5. Deze laatste te lage getallen vonden hun oorzaak in de geringe chemische capaciteit van het bloed dezer dieren, waardoor de foutengrens der gebezigde methode zeer groot werd.

Voor bloed van *Helix* en voor gezuiverde haemocyanine, werd met enkele punten de dissociatie kromme bij 15° vastgesteld.

Ten slotte is ook het spectrum bestudeerd.

Het bleek dat de band van oxyhaemocyanine aanwezig in het ultraviolet bij reductie verdwijnt; dat in het ultrarood beneden 1.5 μ geen absorptieband te vinden is, en dat in het zichtbare gebied, behalve absorptie van de gele- en geelgroene stralen door het oxyhaemocyanine ook een dispersie van het licht plaats heeft.

LITERATUUR.

- ADOLF, E. F. & FERRY. R. M. 1921. The oxygen dissociation of Hemoglobin and the effect of electrolytes upon it.
Journ. of biol. Chem. 47, p. 546.
- ALOY & VALDGUIÉ 1922.
Bull. Soc. Chem. 31, p. 1176.
- ALSBERG, C. L. 1915. Note on the reduction of Oxyhaemocyanine in the serum of *Limulus polyphemus* L.
J. biol. Chem. 23, p. 495.
- ALSBERG, C. L. & CLARK E. D. 1910. The haemocyanin of *Limulus polyphemus* L.
Journ. of biol. Chem. 8, p. 1.
- ALSBERG, C. & CLARK W. M. 1914. The solubility of oxygen in the serum of *Limulus polyphemus* and in solutions of pure *Limulus* haemocyanin.
Journ. of biol. Chem. 19, p. 503.
- BARCROFT, J. 1908. Zur Lehre vom Blutgaswechsel in den verschiedenen Organen.
Ergebnisse der Physiol. 7, p. 701.
- BARCROFT, J. & ROBERTS, F. 1909. The dissociation curve of haemoglobin.
Journ. of Physiol. 39, p. 143.
- BARCROFT, J. 1913. The combination of Haemoglobin with oxygen and with carbon monoxide II.
BIOCHEM. Journ. 7, p. 481.
- BARCROFT, J. 1914. The respiratory function of the blood. Cambridge 1914.
- BAAS BECKING, L. G. M. 1921. Radiation and vital Phenomena. Dissertatie Utrecht.
- BAYLISS, W. M. 1918. Principles of general Physiology. 2nd Edit. London. 1918, p. 613.
- BERT, P. 1867. Mémoire sur la physiologie de la Seiche.
Mem. Soc. des Sciences de Bordeaux 5, p. 120.
- BOHR, CHR. 1892. Ueber den specifischen Sauerstoffgehalt des Blutes.
Skand. Arch. f. Physiol. 3, p. 101.
- 1904. Theoretische Behandlung der quantitativen Verhältnisse bei der Sauerstoffaufnahme des Hämoglobins.
Centralbl. f. Physiol. 17, p. 682.

- BOHR, CHR. 1909. Blutgase und respiratorischer Gaswechsel.
NAGELS Handb. d. Physiol. Bd. I p. 54.
- BOTAZZI, F. 1919. Recherches sur l'Hémocyanine.
I Reduction de l'oxyhémocyanine par des moyens physiques et biologiques.
J. de Physiol. & Path. gén. 18, p. 1.
- BURDEL, ALB. 1922. Contribution à l'étude des Hémocyanines.
Mem. Soc. Fribourg. d. Sc. Nat. 1, p. 195.
- CARPENTER, T. M. 1921. Tables factors and formulas for computing respiratory exchange and biological transformations of energy.
Carnegie Institution of Washington Publ. N^o. 303.
- CUÉNOT, L. 1891. Etudes sur le sang et les glandes lymphatiques dans la serie animale II.
Arch. Zoöl. Exp. [2] 9, p. 13 en 365.
- 1892. Etudes physiologiques sur les Gastéropodes Pulmonés.
Arch. d. Biol. 12, p. 683.
- 1892. La valeur respiratoire de l'hémocyanine.
C. R. Acad. Sc. Paris 115, p. 127.
- 1898. Etudes sur le sang, son role et sa formation dans la serie animale. 2^e Partie, Invertébrés.
Arch. Zoöl. Exp. [2] 7, Note en Revue p. 1—9.
- DHÉRÉ, CH. 1900. Le cuivre hématique et la capacité respiratoire de l'hémocyanine.
C. R. Soc. Biol. Paris 52, p. 395.
- 1903. Dosage du cuivre dans les recherches biologiques.
C. R. Soc. Biol. Paris 52, p. 456.
- 1903. Quelques nouveaux documents concernant le cuivre hématique des Invertébrés et la capacité respiratoire de l'hémocyanine.
C. R. Soc. Biol. Paris 55, p. 1161.
- 1908. Sur la preparation et sur quelques propriétés de l'oxyhémocyanine de l'escargot cristallisée.
C. R. Acad. Sc. Paris 146, 784.
- 1916. Recherches sur l'Hémocyanine I.
Journ. de Physiol. et de Pathol. génér. 16, p. 985.
- 1919. Recherches sur l'Hémocyanine II.
Journ. de Physiol. et de Pathol. génér. 18, p. 221.
- 1919. Recherches sur l'Hémocyanine III.
Journ. de Physiol. et de Pathol. génér. 18, p. 503.
- Recherches sur l'Hémocyanine V.
Journ. de Physiol. et de Pathol. génér. 19, p. 1081.

- DHÉRÉ, CH. & BURDEL A. 1919. Recherches sur l'Hémocyanine IV.
Journ. de Physiol. et de Pathol. génér. **18**, p. 685.
- DHÉRÉ, CH. & SCHNEIDER, A. 1919. Sur la dissociation des oxyhémocyanines.
C. R. Soc. Biol. **82**, p. 1038.
- DHÉRÉ, CH. & SCHNEIDER, A. 1920. Nouvelles recherches sur la réduction des oxyhémocyanines et sur la combinaison des hémocyanines avec le bioxyde d'azote.
C. R. Soc. Biol. **83**, p. 1605.
- DUBOIS, R. 1900. Du cuivre normal dans la série animale (Animaux Marins et Terrestres).
Ann. Soc. Linn. Lyon **47**, p. 93.
- 1900. Sur la cuivre normal dans la série animale.
C. R. Soc. Biol. Paris **52**, p. 392.
- FOX, CH. J. J. 1907. On the coefficients of absorption of the atmospheric gases in distilled water and sea water.
I. Nitrogen and oxygen.
Conseil permanent international pour l'exploration de la mer.
Publications de circonstance N°. 41.
- 1909.
II. Carbonic acid.
Publications de circonstance N°. 44.
- FOULK, C. W. & MORRIS, S. 1922. The comparative values of different specimens of iodine for use in chemical measurements.
Journ. Am. Chem. Soc. **44**, p. 225.
- FRÉDÉRICQ, L. 1878. Sur l'hémocyanine, substance nouvelle du sang du Poulpe.
C. R. Acad. Sc. Paris **87**, p. 996.
- 1878. Recherches sur la physiologie du poulpe commun (Octopus Communis).
Arch. Zoöl. Exp. **7**, p. 535.
- 1879. Note sur le sang du Homard.
Bull. Acad. roy. Sc. Belgique. [2] **47**, p. 409.
- 1878. Sur l'organisation et la physiologie du Poulpe.
Bull. Acad. Sc. Belgique [2] **46**, p. 710.
- GAUTRELET, J. 1903. Les pigments respiratoires et leurs rapports avec l'alcalinité apparente du milieu intérieur. Thèse Faculté des Sciences de Paris.
- GENTH, FR. A. 1852. Ueber die Aschenbestandteile des Blutes von Limulus cyclops.
Liebigs Ann. d. Chem. & Pharm. **81**, p. 68.

- GON, H. A. C. DENIER v. D. 1923. Détermination de coefficients d'absorption.
Arch. Neerl. Sc. exactes & nat. [3] A. 7, p. 140.
- GRIFFITH, A. B. 1890. On the Blood of the Invertebrata I.
Proc. Roy. Soc. Edinburgh. 18, p. 288.
- 1892. On the Blood of the Invertebrata II.
Proc. Roy. Soc. Edinburgh 19, p. 116.
- HALDANE, J. S. 1916. Methods of air-analysis. London.
- 1922. Respiration Oxford 1922.
- DE HAEN, 1854. Liebig's Annalen 91, p. 237.
- HARLESS, E. 1847. Ueber das blaue Blut einiger wirbellosen Thiere und dessen Kupfergehalt.
Arch. Anat. Phys. & Wissensch. Medicin 8, p. 148.
- HEIDELBERGER, M. 1922. A method for the preparation of crystalline oxyhemoglobin.
Journ. of biol. Chem. 53, p. 31.
- HEIM, F. 1892. Etudes sur le sang des Crustacés décapodes.
Thèses Paris Sciences Ser. A. N°. 758.
- 1892. Sur la matière colorante bleue du sang des Crustacés.
C. R. Acad. Sc. Paris 114, p. 771.
- HENZE, M. 1901. Zur Kenntniss des Haemocyanins I.
Z. f. physiol. Chem. 33, p. 370.
- 1904. Zur Kenntniss des Haemocyanins II.
Z. f. physiol. 43, p. 290.
- HILL, A. V. 1912. The combinations of haemoglobin with oxygen and with carbon monoxide I.
Biochem. Journ. 7, p. 471.
- HÜFNER, G. 1894. Arch. f. Anat. u. Physiol. p. 130.
- 1901. Neue Versuche über die Dissociation des Oxyhämoglobins.
Arch. f. Physiol. Sup. Bd. p. 187.
- JOLIET, F. & REGNARD P. 1877. Recherches sur la respiration des Animaux aquatiques.
Arch. de Physiol. [2] 4, p. 584.
- JOLIET & VIALLANES. 1895. Contributions à l'étude du sang et de sa circulation chez les Arthropodes.
Travaux des laboratoires d'Arcachon p. 13.
- JORDAN, H. & SCHWARZ B. 1920. Einfache Apparate zur Gasanalyse und Mikrorespirometrie in bestimmten Gasgemischen und über die Bedeutung des Hämoglobins beim Regenwurm.
Pflüger's Arch. 185, p. 311.

- KNECHT, E. & HIBBERT E. 1903. Das Titanchlorid in der Volumetrischen Analyse.
Ber. d. D. Chem. Ges. **36**, p. 1549.
- KOBERT, R. 1903. Ueber Haemocyanin nebst einigen Notizen über Hämerythrin.
Pflügers Arch. **98**, 411.
- KROGH, A. 1908. On Mikro-Analysis of Gases.
Skand. Arch. Physiol. **20**, p. 279.
- KROGH, A. and LEITCH I. 1919. The respiratory Function of the Blood in Fishes.
Journ. of Physiol. **52**, p. 288.
- KRUKENBERG, C. F. W. 1882. Zur Kenntniss des Häemocyanins.
Vgl. Physiol. Studien II. R. 1. Abt. p. 182.
- KRUYT, H. R. & TENDELOO, H. J. C. 1924. De bepaling van de grootte van onzichtbare deeltjes in emulsoïde solen.
Versl. Kon. Acad. van Wetensch. W. en N. Afd. **33**, p. 184.
- LAVOISIER. Oeuvres de LAVOISIER publiés par les soins du ministre de l'instruction publique.
Paris 1862—'93.
- LEY, H. 1918. Jodometrische Bestimmung der Kupfers und des Eisens.
Chem. Ztg. **41** p. 763.
- LOCKEMANN, G. 1921. Aschenanalyse. Abderhalden Handb. biol. Arbeitsmeth. Abt. 1 Teil 3 p. 663—691.
- MAGNUS, G. 1837. Ueber die im Blute enthaltenen Gase. Sauerstoff, Stickstoff & Kohlensäure.
Annalen d. Physik **40**, p. 583.
- 1845. Ueber das Absorptionsvermögen des Blutes für Sauerstoff.
Annalen d. Physik **66**, p. 177.
- MOSER, L. 1904. Untersuchungen über die Kupfertitration mit Jodkalium und die Anwendbarkeit derselben bei Gegenwart von Eisen und Arsen.
Zeitschr. f. anal. Chem. **43**, p. 597.
- NEUHAUSEN, B. S. & PINKUS, J. B. 1923. A Study of the condition of several inorganic constituents of serum by means of ultrafiltration.
J. biol. chem. **57**, p. 99.
- PETERS, R. A. 1912. Chemical nature of specific oxygen capacity in Haemoglobin.
Journ. of Physiol. **44**, p. 131.
- PFLÜGER, E. 1872. Über die Diffusion des Sauerstoffs, den Ort und die Gesetze der Oxydationsprocesse im tierischen Organismus.
PFLÜGER's Archiv. **6** p. 43.

- PHILIPPI, E. 1918. Zur Kenntniss der Haemocyanine.
Zeitschr. f. physiol. chem. **104**, p. 88.
- PREGI, FR. 1923. Quantitative organische Mikroanalyse. 2^e Auflage.
Berlin 1923.
- RICHE, CH. 1879. De l'hémoglobine et de ses combinaisons avec les gaz.
Progrès med. **7**, p. 601.
- RIESENFELD, H. & MÖLLER, H. T. 1915. Über Mikro-Electroanalyse.
Z. f. Elektrochem **21**, p. 137.
- SCHÜTZENBERGER, P. & RISLER, Ch. 1873. Dosage de l'oxygène libre
ou dissous, au moyen d'une solution titrée de l'hydrosulfite de soude.
Bull. Soc. Chim. Paris **20**, p. 152.
- SCHÜTZENBERGER, P. & RISLER, Ch. 1873. Recherches sur le pouvoir
oxydant du sang.
C. R. Acad. Sc. Paris **76**, p. 440.
- 1873. Sur l'action de l'oxygène dissous sur les réducteurs.
C. R. Acad. Sc. Paris **76**, p. 1214.
- VAN SLIJKE, D. D. Studies of acidosis II. A method for the deter-
mination of carbon dioxide and carbonates in solution.
J. biol. Chem. **30**, p. 347.
- VAN SLIJKE, D. D. & STADIE, W. C. 1921. The determination of the
gases of the blood.
J. biol. Chem. **49**, p. 527.
- SWAMMERDAM, J. Bijbel der Natuure I p. 119—120.
- THOMAS, P. & CARPENTIER, G. 1921. Un réactif très sensible du cuivre:
le réactif de KASTLE—MEYER.
C. R. Acad. Sc. Paris **173**, p. 1082.
- VLÈS. 1913. Sur l'absorption des rayons visibles par le sang de Poulpe.
C. R. Acad. Sc. Paris **157**, p. 802.
- WINTERSTEIN, H. 1909. Zur Kenntniss der Blutgase wirbelloser Seetiere.
Bioch. Zeitsch. **19**, p. 384.
- 1921. Handbuch der vergl. Physiol. Bd. I. 2^e Hälfte p. 86 en 102.
- WITTING, E. 1858. Ueber das Blut einiger Crustaceen und Mollusken.
Journ. f. prakt. Chem. **73**, p. 121.
- WÖBER, A. 1922. Jodometrische Bestimmung des Kupfers bei Gegenwart
von Eisen.
Zeitschr. f. angew. Chem. **35**, p. 336.

STELLINGEN.

I.

De didactyle extremititeit der Vertebrata moet als primitiever worden beschouwd dan de pentadactyle.

II.

De Hexapoda kunnen samen met Cumacea, Amphi- en Isopoda van een gemeenschappelijken oervorm worden afgeleid.

III.

Het is mogelijk bij Phanerogamen door bevruchting het aantal chromosomen doelbewust te vermeerderen.

IV.

Zoogenaamde myrmekophile planten vertoonen geen aanpassing aan een symbiose met mieren.

V.

Niettegenstaande groote verschillen in bouw en grootte van het rostrum, hebben alle Belemniten zich in horizontalen stand voortbewogen.

VI.

Haemocyanine is als ademhalingspigment phylogenetisch ouder dan haemoglobine.

VII.

Het haemoglobine van den regenworm is voornamelijk een transportmiddel voor koolzuur.

VIII.

Bij de bestrijding van virusziekten moet meer aandacht worden geschonken aan de bestrijding van bladluizen.

IX.

Physiologie der dieren is onontbeerlijk in de opleiding van biologen voor onderwijs en praktijk.

