

ZASTOSOWANIA SPEKTROFOTOMETRU GLANA do chemii zwierzęcej.

CZĘŚĆ I i II.

Przez

A. Wróblewskiego.

~~~~~  
(Z dwiema rycinami).  
~~~~~

Rzecz przedstawiona na posiedzeniu Wydziału matem.-przyr. d. 3 listopada 1896 r.,
ref. czł. Cybulski.

W S T Ę P.

Podczas badań naukowych lub zajęć praktycznych częstokroć zniewoleni jesteśmy oznaczać ilość ciał barwnych znajdujących się w organizmie, jak np. oksyhemoglobiny, urobiliny, barwików żółciowych i innych. Najbardziej pewną i ścisłą metodą do tego celu wiodącą jest metoda posługująca się spektrofotometrem. Spektrofotometr może też służyć z korzyścią do ilościowego oznaczania ciał bezbarwnych, lecz dających barwne odczyny, jakoteż do oznaczania bardzo małych ilości barwnych ciał, których za pomocą zwykłego spektroskopu różnić nie jesteśmy w stanie. Wszystkie spektrofotometry przewyższa prostotą oraz doskonałością budowy, spektrofotometr Glana.

Chociaż sam przyrząd dawno już był znany, jednakże za wyjątkiem prac Kluga w Budapeszcie, pozostawiających nieco do życzenia, nie spotykamy się ani z opracowaną metodą stosowania tego przyrządu,

ani z doświadczeniami metodycznymi za pomocą niego wykonanemi. Przeto z wdzięcznością przyjąłem propozycję Pana prof. N. Cybulskiego, abym się podobnemi badaniami zajął, za co Mu też serdecznie dziękuję. Dziękuję również Panu prof. A. Witkowskiemu za rady i wskazówki w rzeczach natury fizycznej, których mi uprzejmie nie szczędził.

Podaję tu wyniki badań nad oksyhemoglobina, oraz solami rodanowemi. W przyszłości mam zamiar zająć się badaniami urobiliny.

CZEŚĆ I.

O ilościowem oznaczaniu oksyhemoglobiny we krwi.

I. O używaniu spektrofotometru Glana.

Do oznaczania oksyhemoglobiny we krwi powszechnie używana bywa metoda Malasseza oraz Fleischla; są one bardzo wygodne, jednakże dają niezbyt dokładne rezultaty. Obie polegają na porównaniu zabarwienia roztworu krwi z zabarwieniem przesuwalnego klina w różnych jego miejscach. Z grubości znalezionej miejsca klina, które ma zabarwienie badanego roztworu krwi, sądzi się o zawartości oksyhemoglobiny we krwi. Hemometer Fleischla jest przyrządem powszechnie znanym, nie będę więc go tutaj opisywał. Skala empiryczna tego przyrządu, podzielona na stopnie od 0 do 120, pozwala na obserwacje w granicach od 20 do 110 stopni. Pole obserwacji jest dosyć duże, jedna jego połowa zabarwia się równomiernie za pomocą roztworu krwi, druga zaś nierównomiernie za pomocą zabarwionego klina, a mianowicie mocniej z tej strony, gdzie się znajduje grubszy koniec klina, z drugiej zaś słabiej. Obserwacje nie mogą być dokładne już i z tego powodu, że barwa klina ma odcień odmienny, niż barwa świeżej krwi rozcieńczonej, mianowicie odcień bardziej wiśniowy, podobniejszy do roztworów krwi, które stały długo i już się rozłożyły.

Podczas każdej obserwacji ma się to nieprzyjemne uczucie, iż się porównywa dwa pola, z których jedno jest równomiernie, drugie zaś nierównomiernie zabarwione, jedno ma jeden, drugie zaś inny od-

cień. Koniecznie potrzeba jeszcze podnieść tu tę właściwość przyrządu, iż skala jego empirycznie jest ułożona i rezultaty badań nie dają się porównać z wynikami otrzymanymi za pomocą innych metod: naukowych i praktycznych. Co więcej, nawet te względne stosunki oksyhemoglobiny w roztworze, jakie wskazuje hemometer Fleischla, nie odpowiadają przedstawiającym je liczbom. Dla jaśniejszego zrozumienia rzeczy przytoczę tu podane przez Dehio¹⁾ wyniki, jakie on otrzymał sprawdzając skalę hemometru Fleischla.

Sporządził on roztwór krwi, odpowiadający podziałce skali 100, rozcieńczył ten roztwór w stosunku 9:1, 8:2, 7:3, i t. d. Roztwory, otrzymane w ten sposób, badał za pomocą wielu odrębnych przyrządów Fleischla i stwierdził, iż różnice rosły za zbliżaniem się ku końcowi skali. Dehio znalazł dla jednego z hemometrów

odczytując: 100 89·6 78·6 67·2 56·4 45·5 34·8 24·6 14·5

obliczając: 100 90 80 70 60 50 40 30 20

Różnice: 0 + 0·4 + 1·4 + 2·8 + 3·6 + 4·5 + 5·2 + 5·4 + 5·5

Powyzsze różnice, a właściwie omyłki, były w różnych przyrządach różnej wielkości.

Porównyując tę rzecz za pomocą hemometra używanego w tujszej klinice, otrzymałem różnice nieco mniejsze.

Z powodu tych niedogodności, a potrzeby gromadzenia dokładnego materiału naukowego, fizyologowie zwrócili się już dawno do metody, stojącej o wiele wyżej od wspomnianych, mianowicie do metody spektrofotometrycznej. Mała ilość potrzebnego materiału, dokładność, szybkość i prostota w wykonaniu — to są jej cechy i jej zalety.

Pierwszym był Vierordt²⁾, który dla ugruntowania tej metody, wsparł się na podstawach ścisłego rozumowania, ścisłych dedukcyj matematycznych, oraz dużego szeregu mozolnych obserwacyj. Od czasu ogłoszenia jego prac przyrządy zostały znacznie ulepszone, lecz zasada metody została też sama. Hüfner, dążąc do ulepszenia metody, skorzystał w swoim spektrofotometrze z właściwości promieni spolaryzowanych. Gdy promienie takie przechodzą przez pryzmat Nikola, to podczas obracania tego pryzmatu, możemy ich jasność w znacznym stosunku mniej lub bardziej zmniejszyć, a nawet zupełnie je zgasić.

¹⁾ C. Dehio. — Zur Kritik des Fleischl'schen Häometers. Verhandl. d. XI. Congr. f. innere Medicin. 1892.

²⁾ Hüfner. — Zeitschr. für physik. Chemie. 18.

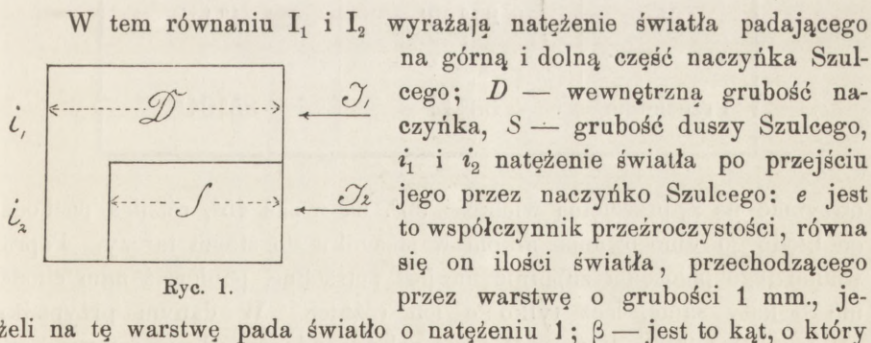
W przyrządzie Hufnera szpara jest przedzielona na dwie części: górną i dolną, obie mają szerokość jednostajną. Spolaryzowanymi zostają tylko promienie, padające na jedną połowę szpary. Będziemy więc widzieli przez szkło oczne jedno widmo utworzone przez promienie zwykłe, drugie zaś przez promienie spolaryzowane, to drugie widmo zostaje trochę osłabione podczas przejścia przez pryzmat Nikola i, ażeby jednostajne oświetlenie obu widm uzyskać, Hufner umieszcza przesuwalny klin ze szkła zadymionego przed tą częścią szpary, na którą padają promienie zwykłe. Zastosowanie tego klina sprowadza właśnie główne wady przyrządu. Najważniejszą z nich jest ta, iż szkło zadymione nie przepuszcza wszystkich promieni jednostajnie i światło przez nie przechodzące bywa zawsze mniej lub więcej zabarwione, z tego powodu oba pasma, obserwowane przez szkło oczne, będą miały ton cokolwiek odmienny.

Za pomocą tego spektrofotometru zrobiono wiele cennych spostrzeżeń. Dla udoskonalenia metody pozostawało jednak braki jego usunąć. Zadanie to rozwiązał Glan przez odpowiednie zmiany w budowie przyrządu.

Przyrządu Glana opisywać tu nie będę. Opis jego budowy i użycia znajdzie czytelnik w podręczniku Wiedemanna¹⁾.

Wzór, podług którego można obliczyć współczynnik wygasania światła E daje się wyprowadzić, biorąc za podstawę równanie następujące:

$$\frac{I_1}{I_2} \cdot e^e = \operatorname{ctg}^2 \beta \dots \dots \dots (1)$$



¹⁾ Wiedemann. — Physikalisches Practicum. 1890. Str. 320.

musimy obrócić Nikol, ażeby (rozpatrując rozczyzn bezbarwny) przejść z położenia, w którym widmo dolne było zupełnie zaciemnione, do położenia równej jasności widm obu.

$$E = -\log e = \frac{2 \{ \log \operatorname{ctg} (\alpha_0 - \alpha_1) - \log \operatorname{ctg} (\alpha_0 - \alpha) \}}{s} \quad (2)$$

α_0 — jest to kąt, który odczytujemy na tarczy przyrządu, gdy widmo dolne zupełnie się zaciemni, u nas $\alpha_0 = 85^\circ 04'$, gdy widma staną się jednostajnej jasności odczytujemy $\alpha = 38^\circ 14'$. Powinniśmy byli

Tablica I.

	α_1	α_0
I	$39^\circ 02'$	$85^\circ 20'$
II	$38^\circ 18'$	$85^\circ 10'$
III	$38^\circ 40'$	$85^\circ 05'$
IV	$37^\circ 30'$	$85^\circ 01'$
V	$37^\circ 42'$	$84^\circ 44'$
Przeciętnie	$38^\circ 14'$	$85^\circ 04'$

otrzymać na α_0 przeciętną wielkość 90° , na α zaś 45° , różnica pochodzi od błędnego umocowania nikola w stosunku do stopni tarczy. Poprawianie jego położenia zupełnie nie jest potrzebne, ponieważ nam chodzi nie o kąty same, lecz tylko o ich różnicę. W danym przypadku $\alpha_0 - \alpha_1 = 46^\circ 50'$. Różnica ta jest zależna od oświetlenia szpary i po każdym nowem zapaleniu lampy trzeba ją sprawdzać.

Obracając nikol podczas obserwowania danego rozczyznu barwnego aż do uzyskania równego oświetlenia, odczytamy kąt α na tarczy.

W naszym przyrządzie $S = 1,006 \text{ cm}$.

$$E = \frac{\log \operatorname{ctg} (85^{\circ}04' - \alpha_1) - \log \operatorname{ctg} (85^{\circ}04' - \alpha)}{0,503} \quad (3)$$

Odczytane w czasie obserwacji kąty α i α_1 wstawiamy do tego wzoru i obliczamy E .

Skoro przez c oznaczymy ilość gramów substancji barwnej, zawartej w 1 cm^3 rozczynu, to otrzymamy równanie

$$c = A \cdot E \quad (4)$$

gdzie A jest stałą liczbą i nosi miano — stałego stosunku pochłaniania światła.

Jeżeli znamy A i z obserwacji oznaczymy E , to możemy z równania (4) obliczyć c , zawartość barwiącej substancji w badanym rozczyźnie.

H. Oznaczenie stałego stosunku pochłaniania światła przez oksyhemoglobinę.

Stosując metodę oznaczania oksyhemoglobiny we krwi zapomocą spektrofotometru Glana, należało przedewszystkiem oznaczyć stały stosunek pochłaniania światła A przez oksyhemoglobinę. Próby trzeba było wykonać z oksyhemoglobina czystą, dla bezpośredniego oznaczenia c , t. j. stężenia rozczyńców, których współczynnik wygasania światła E można było oznaczyć za pomocą przyrządu Glana. Znając te dwie wielkości da się oznaczyć A z równania 4.

Dla otrzymania czystej oksyhemoglobiny stosowałem nieco zmienioną metodę Hoppe-Seylera. Do krwi psa dolałem dwadzieścia części rozczyńcu chlorku sodowego (1 część stężonego NaCl + 9 części wody), pozostawiłem ją w temperaturze 0° . Skoro ciałka osiadły, zlałem ostrożnie ciecz czystą i ciałka krwi po raz drugi i trzeci w ten sposób od resztek surowicy wymyłem, poczem z równą objętością wody je zmieszałem, dolałem $\frac{1}{4}$ część objętości eteru, przyczem ciałka zaczęły powoli swój barwik oddawać. Oksyhemoglobina wkrótce zaczęła się krystalizować, tak iż dla rozpuszczenia jej musiałem dodać więcej wody; przesączyłem, ochłodziłem na lodzie i kroplami dodałem $\frac{1}{3}$ część ochłodzonego wysokoku 95% -wego, mieszając ciągle. Pozostawiłem ciecz zakorkowaną w mieszaninie oziębiającej w temperaturze około -10° .

Nazajutrz znalazłem gęstą zawiesinę jasnoczerwonych kryształów, odsączyłem je, przemyłem raz jeden wodą lodową na sączku. Drobne i poplątane ze sobą kryształy dają się tylko z wielką trudnością przemywać i operacja ta zajmuje wiele godzin czasu. Kryształy wycisnąłem pomiędzy bibułą i rozpuściłem je w wodzie w 35° C. Rozpuszczanie szło bardzo powoli. Po raz drugi i trzeci powtórzyłem proces przekryształizowania i taką oksyhemoglobinę, która nieco ciemniejszą barwę posiadała, niż kryształy pierwotne, użyłem do doświadczenia.

Otrzymaną w ten sposób oksyhemoglobinę suszyłem pod kloszem w próżni ponad kwasem siarkowym, lecz psuła się w tych warunkach, czerniejąc na powierzchni i, jak się przekonałem, przechodząc częściowo w methemoglobinę, gdyż po rozpuszczeniu miała charakterystyczne widmo methemoglobiny. Chcąc przeszkodzić temu rozkładowi, ochładzałem klosz do temperatury poniżej 0° , lecz ponieważ ten sposób postępowania sprawiał zbyt wielkie trudności, więc kładłem do rury szklanej częściowo osuszoną oksyhemoglobinę, rurę wstawiałem do lodu i wypompowywałem z niej powietrze, poczem zatapiałem rurę i pozostawiałem ją w mieszaninie oziębiającej. Jeżeli potrzebowałem oksyhemoglobiny, to po odcięciu końca rury wydobywałem z niej drobne kawałeczki barwika, powietrze z rury wypompowywałem i znowu ją zatapiałem. — W ten sposób oksyhemoglobina daje się tylko z nadzwyczajną trudnością wysuszyć i podczas ważenia na powietrzu, przyciąga niezmiernie szybko wilgoć. Z tych powodów nie udało mi się ani razu odważyć zupełnie dokładnie pewnej ilości oksyhemoglobiny. Oprócz przyciągania wilgoci, taka oksyhemoglobina zmienia się na powietrzu daleko szybciej, aniżeli w stanie rozpuszczonym. Kilka określeń, jakie z taką ważoną oksyhemoglobiną zrobiłem, dały mi tak niezadowolające rezultaty, iż ich nawet nie przytaczam. Pozostawało mi więc oczyszczoną i przemytą oksyhemoglobinę i przez wysuszenie pozbawioną resztek wysokoku, rozpuścić w wodzie. Należało też wybrać metodę określenia jej ilości w takim roztworze.

Najwłaściwszą na pierwszy rzut oka, byłaby metoda taka, któraby uwzględniała ilość tlenu przez dany roztwór pochłoniętego i wydzielonego, ponieważ opierałaby się ona na specyficznej własności hemoglobiny wiązania tlenu, lecz zważywszy przedewszystkiem, iż próby podobne z niezmiernymi trudnościami związane, już robił Otto¹⁾ — i nie doszedł do najświetniejszych pod tym względem wyników, zważywszy, iż według

¹⁾ J. G. Otto: Untersuchungen über die Blutkörperchenzahl und den Haemoglobingehalt des Blutes — Pfl. Arch. 1885, 13, 36.

rezultatów pracy Siegfrieda hemoglobina daje dwa połączenia z tlenem, iż połączenia jej z małą ilością tlenu są silniejsze i tę resztę tlenu otrzymać jest niezmiernie trudno — przyszedłem do wniosku, iż niemniej dokładną, a bez porównania łatwiejszą będzie metoda bezpośrednia, oznaczenia ilości substancji suchej w pewnej części badanego roztworu, w którym mamy tylko chemicznie czystą oksyhemoglobinę.

Rozpuściłem więc kilka kawałeczków jaskrawo czerwonej oksyhemoglobiny w wodzie i odsączyłem od jeszcze nierozpuszczonych kryształów (ciecz I.), 50 centymetrów sześciennych tej cieczy rozcieńczyłem wodą do 100 centymetrów sześciennych (ciecz II.); w tenże sposób jak ciecz II., otrzymałem ciecz III. z cieczy II.; ciecz IV. z cieczy III. W suszonych tygielkach odważyłem po 20 gr. tych cieczy, odparowałem na łaźni wodnej, a pozostałość wysuszyłem do stałej wagi w temperaturze 100°—110°. Otrzymałem przytem wartości zestawione w drugiej kolumnie następującej tablicy.

Tablica II.

	W 20 gr. cieczy pozostałości suchej	c	E	A
Ciecz I.	0,0800 gr.	0,0040	2,616	0,00150
" II.	0,0403 "	0,0020	1,429	0,00140
" III.	0,0200 "	0,0010	0,655	0,00152
" IV.	0,0102 "	0,0005	0,317	0,00158

Wyniki są zupełnie zgodne z obliczeniem. Ciecz IV. rozcieńczona 8 razy, zawierała też 8 razy mniej oksyhemoglobiny, aniżeli ciecz I. Różnice otrzymane nie przekraczają granic zwykłych błędów. Stąd wnioskować mogłem, iż podczas odparowywania i suszenia roztworów nie zachodziły żadne zmiany chemiczne, któreby ciężar substancji suchej zmieniać mogły, t. j. iż droga obrana przeze mnie do oznaczenia stężenia cieczy była odpowiednia. I nadal więc, na podstawie tak do-

brych wyników, gdy miałem do czynienia z krystalizowaną oksyhemoglobina psią lub kocią, stosowałem tęż samą metodę. Metody stosowane przez innych badaczy do oznaczenia stężenia cieczy, nie były bardziej dokładne. Tak n. p. u Hüfnera czytamy: „W chłodnej atmosferze wyciśnięto pomiędzy bibułą gęstą masę dwa razy przekrystalizowanego barwika krwi. Można było przyjąć, iż w tak otrzymanym plačku zawartość wilgoci była przeciętnie, przynajmniej w przybliżeniu też sama we wszystkich jego częściach. Z plačka tego wzięto małe kawałeczki, odważono je, rozpuszczono w wodzie i do doświadczenia użyto. Reszta plačka została tymczasem zamknięta pomiędzy szkiełkami, odważona i wysuszona do stałej wagi¹⁾ dla oznaczenia zawartej w plačku wilgoci. 1)

Oczywiście, iż zupełnie niepewną jest rzeczą, czy taki plaček ma wszędzie jednakową zawartość wilgoci, przeciwnie środkowe jego warstwy muszą być wilgotniejsze, niż te, które się z papierem stykały. Takie wyciskane kryształy będą naturalnie zanieczyszczone włoskami bibuły.

Przy tym szeregu spostrzeżeń sprawdzałem wielkości α_0 i α_1 . Na α_0 znalazłem tęż wielkość, co i poprzednio, na α_1 zaś — $39^\circ 54'$, co pochodzi od innego stopnia oświetlania, a właściwie od innego stosunku $I_1 : I_2$. W tym wypadku

$$\alpha_0 = \alpha_1 = 45^\circ 10'$$

α cieczy pierwszej = $-2^\circ 11'$, więc ma wielkość ujemną, ponieważ w naszym przyrządzie 0° leży o kilka stopni ponad zerem tarczy, więc w kącie ujemnym. α cieczy drugiej = $5^\circ 49'$ i t. d.

Według wzorów w rozdziale poprzednim podanych, obliczyłem E oraz A. Liczby otrzymane na A różnią się nieco pomiędzy sobą i dają wielkość przeciętną 0,00150.

Dla sprawdzenia otrzymanych wyników zrobiłem z oksyhemoglobina psią, ponownie otrzymaną, drugi szereg spostrzeżeń. Tym razem udało mi się otrzymać w czasie drugiej krystalizacji niezmiernie piękne kryształy, niektóre — do centymetra długości dochodzące i ślicznie w gwiazdeczki poukładane. Po każdej krystalizacji badałem kryształy mikroskopowo: stosownie do oznaczeń były zupełnie czyste, bez śladów jakichkolwiek domieszek.

¹⁾ G. Hüfner: Ueber die Quantität Sauerstoff, welche 1. Gr. Haemoglobin zu binden vermag. Z. f. ph. Chem. B. I.

Tym razem i później nie sączyłem kryształów przez bibułę, lecz przez gęste, dobrze wymyte stare płótno, wskutek czego sączenie i przemywanie wodą lodową szło szybciej; miałem również gwarancję, iż włókienka sączka, przyzepiające się podczas zdejmowania kryształów, nie będą tu ich zanieczyszczały. Zaznaczam, iż wodę lodową otrzymywałem przez zamrażanie wody przekrojonej i częściowe jej topnienie w temperaturze pokojowej.

Tablica III.

	Pozostałości suchej	W ilości cieczy	c	E	A
Ciecz I.	0,0640	20 gr.	0,0032	2,133	0,00150
„ II.	0,0320	20 „	0,0016	1,119	0,00143
„ III.	0,0201	25 „	0,0008	0,548	0,00146
„ IV.	0,0705	25 „	0,0004	0,265	0,00151

W tym szeregu prób otrzymaliśmy na A przeciętną wielkość nieco mniejszą, niż w poprzednim, mianowicie 0,001475.

Mając już stałą stosunkowego pochłaniania światła przez oksyhemoglobinę psią, chciałem porównać ją pod tym względem z oksyhemoglobina jakiegoś innego zwierzęcia, aby się przekonać, czy zajdzie pomiędzy nimi zgodność zupełna. Do tego celu wybrałem kota, ponieważ barwik jego mało dotychczas był badany.

Oksyhemoglobinę kocią krystalizowałem w podobny sposób, jak i psią. Krystalizowała się ona wolniej, niż tamta i wydzielala się w formie igiełek o barwie ciemno czerwonej, posiadających po kilka milimetrów długości, ze sobą nie poznaczonych i nie poplątanych, lecz pojedynczo w cieczy się unoszących, lub przesypanych się na dnie naczynia podczas jego wstrząsania. Kryształy te dały się daleko lepiej odsączyć i przemyć, niż preparaty poprzednie. Rozpuszczały się też w wodzie trudniej, niż kryształy psiej oksyhemoglobiny. — Biorąc na uwagę powyższe własności oksyhemoglobiny kocięj, zdaje się, iż ją ła-

twiej w czystym stanie otrzymać, ponieważ zaś i operować z nią łatwiej, to można w ogóle polecić ten preparat do doświadczeń z oksyhemoglobina.

Tablica IV.

	Pozostałości suchej	W ilości cieczy	c	E	A
Ciecz I.	0,0470	25 gr.	0,00188	1,220	0,00154
„ II.	0,0192	20 „	0,00094	0,628	0,00149
„ III.	0,0118	25 „	0,00047	0,295	0,00153
„ IV.	0,0058	25 „	0,000235	0,149	0,00157

Przeciętną wielkość A znaleźliśmy = 0,00153.

Opierając się na wszystkich trzech szeregach spostrzeżeń, możemy przyjąć, że przeciętna wartość A = 0,00150.

Ażeby sprawdzić, czy znaleziona wartość A na oksyhemoglobinę ściśle rzeczywistości odpowiada, osobliwie w tych granicach stężenia, z którymi ma się do czynienia w praktyce, zrobiłem jeszcze dwa szeregi spostrzeżeń z krwią kocią i ludzką.

Oznaczając osobno A ludzkiej oksyhemoglobiny, spodziewałem się usunąć wątpliwości, jakieby mogły powstać z powodu różnicy, która zachodzić może we własnościach ludzkiego i kocięgo barwika, ponieważ opisywana metoda miała być stosowana do ludzkiego barwika. — Aby się zbytnio nie trudzić otrzymaniem oksyhemoglobiny kocięj w stanie czystym, na co potrzeba co najmniej dwóch do trzech tygodni i przez ten czas podtrzymywania temperatury niskiej, zrobiłem dosyć gęsty roztwór krwi kocięj w wodzie i zapomocą mierzenia biureta, mieszałem rozmaite ilości tej cieczy z wodą. W ten sposób przygotowałem szereg cieczy w Tabl. V. zestawionych. Następnie oznaczyłem ich E, ażeby zaś obliczyć ich A, trzeba było znać stężenie tych roztworów.

Ponieważ bezpośrednio stężenia oznaczyć nie mogłem, chodziło mi tylko o to, aby przyjąwszy dla jednej z cieczy pewne stężenie przybli-

żone obliczyć, w pozostałych stosunkowe wartości c i, biorąc to c za punkt wyjścia, obliczyć A wszystkich rozczyńców. W ten sposób mogłem poznać, w jakich granicach wielkość A wahać się będzie i czy bardzo będzie się oddalać od przyjętej normy. Przyjąłem, iż wartość A wynosząca 0,00150 odpowiada $E = 1,167$, stąd obliczyłem $c_3 = 0,00176$.

Tablica V.

	Stopień rozcieńczenia		c	E	A
	Ciecz I.	Woda			
Ciecz I.	10 cm ³	0 cm ³	0,00220	1,454	0,00151
" II.	9 "	1 "	0,00198	1,247	0,00158
" III.	8 "	2 "	0,00176	1,167	0,00150
" IV.	7 "	3 "	0,00154	1,057	0,00145
" V.	6 "	4 "	0,00132	0,895	0,00147
" VI.	5 "	5 "	0,00110	0,733	0,00150
" VII.	4 "	6 "	0,00088	0,564	0,00156
" VIII.	3 "	7 "	0,00066	0,415	0,00159

Na tej podstawie obliczone są c i A tablicy V. — Otrzymałem przeciętnie $A = 0,00152$. Wahania były niewielkie w granicach od 0,00145 do 0,00159.

Z krwią ludzką¹⁾ postąpiłem podobnie, jak poprzednio z kocią: przygotowałem 10 rozczyńców, oznaczyłem ich E ., wybrałem rozczyń,

¹⁾ Krew do tego szeregu spostrzeżeń, jak również i do następujących, z ludzką oksyhemoglobina dokonanych prób i doświadczeń, otrzymałem z tutejszej kliniki położniczej prof. Jordana, dzięki pośrednictwu I. asystenta Dra Świtalskiego, za co tym panom i na tem miejscu podziękowanie serdeczne składam.

którego $E = 0,0930$, przyjąłem jego $A = 0,00150$, oznaczyłem podług tego wszystkie c , a podług nich wszystkie A . Przeciętna wartość A wynosi $0,001467$, jej wahania — pomiędzy $0,00143$ — $0,00153$ (Tabl. VI).

Tablica VI.

	Stopień rozcieńczenia		c	E	A
	Ciecz I.	Woda			
Ciecz I.	10 cm ³	0 cm ³	0,001860	1,269	0,00146
„ II.	8,0 „	2,0 „	0,001488	1,019	0,00146
„ III.	7,5 „	2,5 „	0,001395	0,930	0,00150
„ IV.	7,0 „	3,0 „	0,001302	0,910	0,00143
„ V.	6,5 „	3,5 „	0,001209	0,790	0,00153
„ VI.	6,0 „	4,0 „	0,001116	0,778	0,00143
„ VII.	5,5 „	4,5 „	0,001023	0,688	0,00149
„ VIII.	5,0 „	5,0 „	0,000930	0,628	0,00148
„ IX.	4,5 „	5,5 „	0,000837	0,582	0,00144
„ X.	4,0 „	6,0 „	0,000744	0,511	0,00145

Na podstawie tego, iż w granicach c od $0,0006$ do $0,002$ wielkość A niezbyt się waha, w wynikach wszystkich moich spotrzeżeń uznałem za możliwe i odpowiednie uważać poprzednio przyjętą jego wartość $0,00150$ za najbardziej właściwą i tę wielkość używać, oznaczając zawartości oksyhemoglobiny.

Vierordt, Hüfner i ich uczniowie, zajmując się badaniem oksyhemoglobiny i oznaczając jej A , znajdowali wielkości, różniące się

między sobą. — Za pomocą przyrządu Hüfnera otrzymał Hüfner 0,00110, v. Noorden¹⁾ 0,00100, Szczełkow²⁾ 0,001125, Albrecht³⁾ 0,001312, Otto⁴⁾ 0,001403. Szczełkow stwierdza, iż te różnice nie pochodzą od omyłek przypadkowych, lecz zależą od własności samych przyrządów. Tem większej różnicy można było oczekiwać, robiąc badania za pomocą przyrządu o innej budowie, jakim jest spektrofotometr Glana. Nie powinno więc wydawać się dziwne, iż otrzymaliśmy $A = 0,00150$, ponieważ pomiędzy tym wynikiem, a liczbą 0,001403, znalezioną przez Otta, zachodzi o wiele mniejsza różnica, niż pomiędzy tą ostatnią i stałą v. Noordena, chociaż pierwsza za pomocą przyrządu Glana, dwie zaś ostatnie — przyrządem Hüfnera otrzymane były.

Zastanawiającą jest i ta okoliczność, iż na A barwików różnych zwierząt, prawie jednakowe wartości otrzymane zostały, podczas gdy inne ich własności, a i nawet skład chemiczny, różnią się nieraz znacznie. Na tej podstawie przypuszczaćby należało, iż barwiki te różnią się pomiędzy sobą nie swoją grupą barwiącą, lecz grupą globulinową, barwiąca zaś grupa atomów jest prawdopodobnie u wszystkich jednaka. — Do podobnego przypuszczenia dochodzi v. Noorden. Niejednokrotnie zauważył Hoppe-Seyler i jego uczniowie, iż kryształy oksyhemoglobiny zawierały substancje organiczne do oksyhemoglobiny nie należące, prawdopodobnie lecytynę, z którą według przypuszczenia Hoppego oksyhemoglobina w ciałkach krwi jest ściśle połączona.

Otóż, dopóki nie będziemy mieli możności otrzymywania absolutnie czystej oksyhemoglobiny, dopóty wszystkie przypuszczenia co do różnorodności tego barwika u różnych zwierząt, szczególnie w świetle wyników powyższych, są absolutnie pewne.

Nie omieszczałem starać się o czystą krystaliczną oksyhemoglobinę ludzką. Wydawało mi się to tem ważniejsze, iż dotychczas tylko w stanie nieoczyszczonym krystalizowali ją niektórzy badacze, jak zaś Neumeister, a i Hoppe-Seyler stwierdzają, nikt jej jeszcze w stanie czystym nie miał. Postępowałem podług metody Hoppe-Seylera, modyfikując ją o tyle, iż brałem bardzo gęste roztwory oksyhemoglobiny i dodawałem $\frac{1}{3}$ część, lub nawet więcej wysokoku absolutnego. Robiłem

¹⁾ C. v. Noorden Beiträge zur quantitativen Spectranalyse, insbesondere zu derjenigen des Blutes. Z. f. physiol. Ch. 4. 1880.

²⁾ Szczełkow: Spektrofotometrya. Zbiór prac z pracowni prof. Danilewskiego 1880 (ros.).

³⁾ E. Albrecht: Hüfners Spectrophotometer 1892.

⁴⁾ l. c.

to przez wzgląd na niezmiernie łatwą rozpuszczalność oksyhemoglobiny ludzkiej. Po dolaniu wysoko pozostawiałem ciecz w przeciągu 48 godzin w temperaturze -15° i rzeczywiście całe duże skupienie kryształów, mających wygląd cieniuchnych delikatnych pryzmatów, udało mi się otrzymać i nawet przez chwilę obserwować pod mikroskopem, gdy się rozpuszczały, lecz odsączyć ich od cieczy rodzimej w żaden sposób nie mogłem, ponieważ na sączku (pomimo oziębiania) rozpuszczały się całkowicie. Wobec cieplejszej pory, musiałem te doświadczenia przerwać. Spodziewam się jednak otrzymać w przyszłości czystą krystaliczną oksyhemoglobinę ludzką innym sposobem.

III. Dysocjacja barwików.

Zastanawiając się nad dysocjacją oksyhemoglobiny i próbując pod tym względem jej własności, musiałem się zwrócić do innych barwików, ażeby stwierdzić, czy i o ile spektrofotometr może służyć do wykazania dysocjacji elektrolitycznej.

Podczas prób z siarkanem miedziowym obserwowałem pasmo pomiędzy 40 i 43 podziałki, co odpowiada długości fal $\lambda = 633$ do $\lambda = 617$. W jednym przypadku wziąłem roztwór CuSO_4 dosyć gęsty, rozcieńczyłem go wodą w stosunkach podanych w tablicy VII i stężenie takich roztworów oznaczałem przez odparowanie i suszenie w 110° . W drugim przypadku wziąłem roztwór CuSO_4 przygotowany do odczynnika Fehlinga. Stężenie było w tym przypadku oznaczone przez ważenie krystalicznego siarkanu miedziowego.

Tablica VII.

	Pozostałości suchej	w ilości cieczy	Stopień rozcień.		C	E	A
			Ciecz I	woda			
Ciecz I	1,9432 gr.	25 cm ³	50 cm ³	0 cm ³	0,07776	2,153	0,036
„ II	0,6201 „	20 „	20 „	30 „	0,03110	0,940	0,033
„ III	0,0615 „	10 „	10 „	40 „	0,00622	0,178	0,035

	Pozostałości suchej	w ilości cieczy	Stopień rozcień.		C	E	A
			Ciecz I	woda			
Ciecz I	—	—	10 cm. ³	0 cm. ³	0,06928	0,578	0,120
„ II	—	—	5 „	5 „	0,03464	0,306	0,113
„ III	—	—	3 „	7 „	0,02079	0,166	0,125

Jako wynik przeciętny otrzymałem A suszonego siarkanu miedziowego = 0,035, A zaś krystalizowanego siarkanu miedziowego = 0,119.

Prócz tego zrobiłem jeszcze dwa szeregi pomiarów z rozczyznami CuSO_4 zachowując wszelkie ostrożności co do płomienia lampy. Obserwowałem pasmo pomiędzy 37—40 podziałki, co odpowiada długości fal $\lambda = 651,5$ do $\lambda = 634$. Na zasłonkach szpary ocznej z lewej strony odczytałem 6, z prawej zaś 6,2. Ponieważ nie znamy absolutnego stężenia cieczy, a tylko możemy obliczyć stosunkowe wartości, przeto nie możemy podać stałych A . W danym przypadku chodzi nam tylko o sprawdzenie, czy A pozostaje stałą, czy się zmniejsza lub zwiększa, o zmianach tych sądzić możemy ze zmian, jakim podlega E w stosunku do stężenia, np. gdy stężenie dwa razy się zmniejszyło, to i E powinno było dwa razy się zmniejszyć, t. j. miało się równać 1,08614; różnica jest nieznaczna, jak to widać z następującej tablicy.

Tablica VIII.

Stopień rozcieńcz.		E	Stopień rozcieńcz.		E
rozczyzn CuSO_4	wody		CuSO_4	wody	
10 cm. ³	0 cm. ³	0,89014	10 cm. ³	0 cm. ³	2,17229
5 „	5 „	0,44437	5 „	5 „	1,08756
2 „	8 „	0,18897	3 „	7 „	0,63315
1 „	9 „	0,10076	2 „	8 „	0,41586
			1 „	9 „	0,23469

Do pierwszego szeregu spostrzeżeń użyłem roztworu CuSO_4 przygotowanego do miareczkowania cukru podług metody Fehlinga. Ze wszystkich tych spostrzeżeń, dotyczących się CuSO_4 widać, iż E zmienia się prawie zupełnie prawidłowo, więc A jest w istocie wielkością stałą. Ponieważ zaś wiemy, iż CuSO_4 ulega w roztworach silnej dysocjacji elektrolitycznej, przypuścić więc należy, zgodnie z Ostwaldem, iż jony siarkanu miedziowego posiadają też samo widmo absorpcyjne, jak i sól nierozłożona, dysocjująca więc na zmianę w wygasaniu wpłynąć nie może. Do podobnych wyników doszedł Ewan¹⁾.

Indygo-karmin obserwowałem w paśmie $\lambda = 607$ do $\lambda = 595$, co odpowiada podziałkom 45—48.

Tablica IX.

	Pozost. suchej w 25 gr. cieczy	Stopień rozcieńcz.		C	E	A
		Ciecz I	wody			
Ciecz I	0,0033 gr.	10 cm ³	0 cm ³	0,000130	2,217	0,000058
" II	"	5 "	5 "	0,000065	1,156	0,000056
" III	"	3 "	7 "	0,000039	0,613	0,000063
" IV	0,0001 "	2 "	8 "	0,000026	0,426	0,000061

Przeciętnie $A = 0,0000595$.

Prócz tego zrobiłem jeszcze jeden szereg obserwacji, zachowując wszelkie ostrożności względem płomienia lampy, i otrzymałem wyniki następujące:

Tablica X.

Stopień rozcieńcz.		E
roztwór indygo	woda	
10 cm ³	0 cm ³	3,11785
5 "	5 "	1,56994

¹⁾ Ewan. — On the Absorption Spectra of Dilute Solutions; Proc. of t. R. Soc. vol. LVII. N. 341.

Stopień rozcieńcz.		E
roczym indygo	woda	
3 cm ³	7 cm ³	0,97216
2 „	8 „	0,63313
1 „	9 „	0,33231

I tu więc wahania E są zupełnie niewyraźne i są raczej zależne od zwykłych omyłek obserwacyi, aniżeli od zmian, jakim drobiną w roztworze podlegają.

Nigrozynę obserwowałem w paśmie $\lambda = 569$ do $\lambda = 560$, co odpowiada podziałkom 55 do 58.

Tablica XI.

	Pozost. suchej w 25 gr. cieczy	Stopień rozcieńcz.		C	E	A
		cieczy I	wody			
Ciecz I	0,00130	10 cm ³	0 cm ³	0,000050	2,651	0,000019
„ II	0,00006	5 „	5 „	0,000025	1,067	0,000023
„ III	„	3 „	7 „	0,000015	0,644	0,000024
„ IV	„	2 „	8 „	0,000010	0,439	0,000022
„ V	„	1 „	9 „	0,000005	0,208	0,000024

Przeciętnie $A = 0,0000224$.

Prócz tego robiłem pomiary z nigrozyną w paśmie pomiędzy podziałkami 50—53. co odpowiada długości fal $\lambda = 589$ do $\lambda = 576$.

I w nigrozynie więc, mierząc wygasanie światła, nie możemy zauważyć jakiegś dysocjacji. Nie należy jednak zapominać, iż oba te barwiki: indygo-karmin i nigrozyna już w niezmiernie małym rozcieńczeniu pochłaniają tak silnie światło, że można je badać spektrokolorymetrycznie tylko w nader silnym rozcieńczeniu. Jeżeli więc one dysocjują, to w takim rozcieńczeniu będą w postaci zupełnie zdysocjowa-

nych jonów, o drobinowem więc ich widmie sąd wydaćbyśmy mogli chyba tylko z obserwacyi niezmiernie cienkich warstwek stężonej cie-

Tablica XII.

Stopień rozcieńcz.		E
Rozc. nigr.	woda	
10 cm ³	0 cm ³	1,66673
5 "	5 "	0,83438
3 "	7 "	0,51503
2 "	8 "	0,36452
1 "	9 "	0,17633

czy. W danym razie dla rozstrzygnięcia kwestyi należałoby zastosować metodę przewodnictwa elektryczności.

Pomiary wykonane z FeCl₃ w paśmie między podziałkami 80 i 83, co odpowiada długości fal $\lambda = 498$ do $\lambda = 490,5$, dały następujące wyniki:

Tablica XIII.

Stopień rozcieńcz.		E
Fe Cl ₃	woda	
10 cm ³	0 cm ³	2,72259
5 "	5 "	1,44292
3 "	7 "	0,92491
2 "	8 "	0,61954
1 "	9 "	0,37146

Z tablicy XIII widzimy, iż E stosunkowo wzrasta, a więc i wygasanie światła się zwiększa stosunkowo; pochodzi to od hydrolizy, a może częściowo i od dysocjacji FeCl₃ wskutek rozcieńczenia wodą

tej soli. Ciekawe badania pod tym względem poczynili W i e d e m a n n E w a n ¹⁾, oraz inni. Pokazało się mianowicie, że powstający w słabych roztworach pod działaniem wody kolloidalnej $\text{Fe}(\text{OH})_3$ nadaje barwę o wiele ciemniejszą roztworom, aniżeli ona jest właściwą FeCl_3 . Dodanie kwasu solnego znosi hydrolizę. Moje kilkakrotne próby co do tego w zupełności potwierdziły wnioski E w a n a.

Dla ostatecznego stwierdzenia tych wniosków poddawałem dyalizie słabe roztwory obojętnego FeCl_3 i często zmieniałem dializat. Otóż w pierwszym dyalizacie mogłem wykryć Cl i Fe, w następnych Fe nie było, tylko ślady Cl można jeszcze było wykryć. W cieczy pozostałej, która przybrała ciemniejsze zabarwienie, pozostał wodnik żelazowy i tylko bardzo małe ilości chloru obok niego dały się wykryć. W ten sposób udało mi się stwierdzić, iż w roztworze pierwotnym obok HCl znajdował się rzeczywiście $\text{Fe}(\text{OH})_3$.

Widzimy więc z tych dostrzeżeń, jak to również z wyników spostrzeżeń innych wywnioskować się daje, iż spektrokolorymetrya oddać może pewne usługi w badaniu dysocjacji barwików i że za jej pomocą można wysnuwać cenne wnioski o zachowaniu się ciał barwnych w roztworze.

Tak więc spektrofotometr staje się potężnym narzędziem badań fizyczno-chemicznych, i wążuchna szpara przedmiotowa kolimatora otwiera nam szerokie pole poszukiwań, na którym niejedyn badacz zbierze bujny plon.

IV. Zmienność roztworów oksyhemoglobiny.

W zwykłej temperaturze daje się oksyhemoglobina w roztworze tylko przez czas bardzo krótki przechowywać bez zmiany. W temperaturze 0° jest ona o wiele trwalszą. Jeżeli pozostawimy na dłuższy przeciąg czasu roztwór oksyhemoglobiny w temperaturze pokojowej, to barwa jego zmienia swój odcień na lekko wiśniowy. W barwie czerwonej widna takiego roztworu pojawia się słaba smuga absorpcyjna. Najczulszą zaś cechą przemiany jest przezroczystość cieczy. Kąt α przy zmianie takiej zwiększa się, świadcząc temsamem o zmniejszeniu się zawartości oksyhemoglobiny w roztworze. Wszystko to przemawia za wytwarzaniem się methemoglobiny w razie dłuższego stania roztworu.

¹⁾ l. c.

Jeżeli zmiana jest nieduża, widmo cieczy pozostaje jak gdyby niezmiennione, nawet ciemnej smugi w czerwonym dojrzeć nie można, lecz zmiana w pochłanianiu wykazuje zmianę zaszłą w składzie cieczy. To spostrzeżenie daje nam środek niezmiernie ważny, pozwalający w pewnych przypadkach wykryć za pomocą spektrofotometru zmiany zaszły w cieczy, gdy zwykły spektroskop, a może i środki chemiczne usług odmawiają. Być może, że w przyszłości spektrofotometr będzie w stanie oddać pewne usługi w badaniu bardzo nieznacznych zmian chemicznych w roztczynach.

Teraz przytoczę parę spostrzeżeń, dotyczących się zmiany roztczynów oksyhemoglobiny.

Rozczyny użyte do spostrzeżeń dawały po przeciągu 2 godzin na α wartości większe.

Co do oksyhemoglobiny kocięj, ta się po przeciągu godziny prawie zupełnie nie zmieniła, a tylko po dwóch godzinach wykazała zmiany, lecz jeszcze nieznaczne.

Na dowód tego, jak łatwo oksyhemoglobina się zmienia, posłużyć mogą następujące spostrzeżenia:

Po wykonaniu drugiego szeregu spostrzeżeń z oksyhemoglobina psią, przechowywałem kryształy w stanie półsuchym w temperaturze 0° w przeciągu tygodnia, poczem użyłem je do nowych spostrzeżeń. Powierzchnia placka z kryształów była zupełnie ciemna, a i wewnątrz już barwy prawidłowej oksyhemoglobina nie posiadała. Chodziło mi o to, aby się przekonać, jak daleko zmiany w niej zaszły. Nie chcąc czytelnika zbyt utrudzać, danych nie przytaczam, wspomnę tylko, iż wyniki znacznie się różniły od poprzedzających. Widmo wskazywało obecność methemoglobiny.

Przypuszczałem, iż z tego preparatu za pomocą przekryształizowania uda mi się otrzymać czystą oksyhemoglobinę, lecz i kryształy posiadały własności zmienione, widocznie były zanieczyszczone.

Stąd wynika, iż próby trzeba robić tylko ze świeżymi roztczynami. I lekarz badając krew chorego nie powinien roztworu tej krwi pozostawiać na czas dłuższy, lecz badać go niezwłocznie.

V. Dysocjacja oksyhemoglobiny.

Wyżej już zauważyłem, iż wielkości A wahają się w pewnych granicach. Rozpatrując dokładniej te wahania, daje się zauważyć w wię-

kszości przypadków pewna prawidłowość, mianowicie A rośnie ze zmniejszeniem się stężenia, osobliwie w stężeniach bardzo słabych. Dla usunięcia przypuszczeń, iż te zmiany z powodu błędów w ustawieniu przyrządu powstać mogły, muszę tu zauważyć, że wypróbowałem, czy nikol znajduje się w położeniu środkowym. Różnice pomiędzy wielkością kątów, odczytanych podczas obracania nikola w jedną i w drugą stronę dla zaciemnienia go, leżały w granicach zwykłych błędów spostrzeżenia, umieszczenie więc nikola jest centralne i odpowiednie.

Te zmiany, jakie zauważyłem w A , stoją w sprzeczności z wynikiem badań v. Noordena ¹⁾, który zauważył zjawisko odmienne, mianowicie zmniejszanie się A ze słabnięciem rozczyńców.

Podaję tu oryginalne liczby v. Noordena, ułożone w tabelkę:

Tablica XIV.

c	A
0,001219	0,001033
0,001204	0,001054
0,001086	0,001009
0,000906	0,001065
0,000872	0,001037
0,000747	0,000984
0,000728	0,000994
0,000653	0,000950
0,000592	0,000959
0,000584	0,000992
0,000570	0,001036
0,000514	0,000948
0,000431	0,000955

¹⁾ l. c.

Czy v. Noorden miał podstawy dostateczne do wyprowadzenia swoich wniosków, wykazują następujące jego słowa: „Rozpatrując powyższe tablice, uwidacznia się jeszcze coś innego, zjawisko ciekawe wprawdzie bardziej pod względem optycznym, mające jednak pewne znaczenie dla całej naszej metody, ilościowej analizy spektralnej. Mianowicie z tablicy I. (powyżej przytoczonej), mniej z tablicy II. i wcale nie z tabl. III., uwidacznia się wyraźnie, iż wahania, jakim wartości A_0 i A'_0 podlegają, znajdują się w pewnym związku ze stężeniem rozczyńńów odpowiednich, i mianowicie zmniejszają się te wartości w każdym z małych szeregów obserwacyjnych ze zmniejszaniem się stężenia.“

Jakimi dowodami posiłkuje się v. Noorden, widzieć można stąd, iż w celu krytyki spostrzeżeń Settegasta, który znalazł, iż E alunu chromowego zmniejsza się podczas rozpatrywania widma w prawo od linii D — opiera się on na następującej tablicy (XV.) Vierordta

Tablica XV.

Miejsce widma	Stęż.	Stęż.	Stęż.	Stęż.
	0,07176	0,035888	0,01794	0,00897
	E	E	E	E
D 11 E — D 50 E	1,5720	0,7917	0,3915	0,1938
D 50 E — D 87 E	1,3010	0,6421	0,3344	0,1675
D 87 E — E 26 F	1,9469	0,4584	0,2076	0,1266

i wysnuwa z niej taki wniosek:

„v. Vierordt oznaczając E rozczyńńów alunu chromowego w paśmie pomiędzy D 50 E — D 87 E, a więc w prawo od linii D, zauważył podobne zjawisko, jak i my, t. j. stosunkowe zwiększanie się E“. — Z załączonej tablicy widać, iż w paśmie D 50 E — D 87 E współczynnik E stosunkowo się zmniejsza w pierwszym rozcieńczeniu, wzrasta w drugim i pozostaje stosunkowo prawidłowym w trzecim. W pasmach zaś D 11 E — D 50 E, oraz D 87 E — E 26 F, a więc leżących też w prawo od D jego zmniejszenie daje się stosunkowo jeszcze bardziej zauważyć. Spostrzeżenia więc Vierordta przemawiają za Settegastem, a więc przeciw temu, co v. Noorden twierdzi.

H ü f n e r, uniesiony wynikiem, tak zresztą niejasnym, w jego pracowni otrzymanym, obiecał zająć się dokładniej tą „ciekawą kwestyą.“ Spostrzeżenie v. Noordena zrobiło pewne wrażenie w literaturze, tak iż nawet panowie K r ü s s ¹⁾, opierając się na powyższej tablicy, przypuszczali istnienie dysocjacji oksyhemoglobiny. Dopiero w trzynastu lat po ogłoszeniu pracy v. Noordena, ogłosił H ü f n e r ²⁾ wyniki swoich badań nad tym przedmiotem i postawił swoją teorię.

Doświadczenia jego, wykonane w bardzo skromnych rozmiarach nad oksyhemoglobina i hemoglobina tlenko-węglowa, wykazały w wynikach, przytoczonych całkowicie poniżej, mylność wniosków v. Noordena.

Tablica XVI.

c	E	A
0,01754	1,34870	0,01300
0,01408	1,07310	0,01312
0,01333	0,98268	0,01357
0,01299	0,97384	0,01334
0,01266	0,97296	0,01302
0,01206	0,91127	0,01324
0,01031	0,77798	0,01325
0,00990	0,75792	0,01306

Rozczyny otrzymywał H ü f n e r przez rozcieńczanie krwi. Stężenie c ma u niego wartości nie absolutne, lecz stosunkowe. H ü f n e r wyciąga stąd wniosek następujący: „Jak widać, to wielkość A wcale się nie zmniejsza ze wzrostem rozcieńczenia; przeciwnie wartości odpowiednie wahają się tak nieregularnie około pewnej przeciętnej, iż w danym razie wątpić nie można o prawdziwej stałości A.“

¹⁾ l. c.

²⁾ Über die Dissociation des Oxyhämeoglobins in wässriger Lösung v. G. H ü f n e r
Z. f. physik. Ch. 18. XI.

„W ten sposób się wyjaśnia, jak bezpodstawne są przypuszczenia o istnieniu związku pomiędzy siłą wygasania światła i rozmiarem rozpadania się skupień drobinowych na drobiny pojedyncze.

Moje spostrzeżenia co do wahań, jakim podlega stała A , dające wynik wprost przeciwny rezultatom v. Noordena, a nawet i H ü f n e r a, naprowadziły mię na tę myśl, iż przyczyna różnicy wyników tkwić musi nie w różnicy przyrządów, nie w materiale do obserwacji użytym, t. j. we krwi samej, lecz prawdopodobnie w sposobie obserwowania, w jakichś trudno dostrzegalnych błędach, dotyczących się n. p. ustawienia samego przyrządu.

W celu sprawdzenia tych przypuszczeń, prześledziłem skrupulatnie cały przebieg jednej obserwacji od początku do końca i źródło możliwych poważnych nawet błędów dało się wykryć w wahaniami, jakim w czasie szeregu obserwacji podlega kąt α_1 . Wahania te wynikają z niejednostajnej wysokości płomienia lampy naftowej, który służy za źródło światła. Intensywność światła tego ma wpływ tylko na stopień oświetlenia widma, więc bardzo nieznaczny wpływ na omyłki, pochodzące w tym razie ze źródła subiektywnego. Wysokość zaś płomienia wpływa na stosunek w oświetleniu górnej i dolnej połowy szpary, t. j. na stosunek $\frac{I_1}{I_2}$, stosunek zaś ten stanowi podstawę wzoru 3 (str. 369), podług którego obliczamy E . Jeżeli więc spostrzegaliśmy kąt α przy jednym stosunku, kąt zaś α_1 przy stosunku drugim, i wielkości te wstawiliśmy do równania, za którego podstawę służy pewien stosunek stały $\frac{I_1}{I_2}$, to oczywiście wynik będzie błędny. Podczas każdego zapalenia lampy stosunek ten może być inny; oprócz tego, wskutek rozpalonego knota wzrasta płomień, a więc i stosunek ten rośnie; gdy zaś, wskutek bardzo długiego użycia lampy, knot się wypala, płomień się zmniejsza, to i on spada odpowiednio.

Takie stopniowe wzrastanie błędów obserwacji może naturalnie spowodować wzrastanie lub zmniejszanie się stałych A , otrzymanych na podstawie szeregu spostrzeżeń błędnych. Uderzyło mię i to jeszcze, iż na te, tak ważne źródła omyłek — o ile mi wiadomo — nikt dotychczas w literaturze uwagi nie zwrócił. Wprawdzie w doświadczeniach moich wyczekiwałem zawsze, aż knot się zupełnie rozpali, wolałem jednak, aby wszelkie wątpliwości usunąć, spostrzeżenia powtórzyć zachowując możliwe ostrożności. Sprawdzałem więc kąt α_1 , przed rozpoczęciem obserwacji i po ich ukończeniu, gdy zaś długo trwały, sprawdzałem je i pomiędzy niemi.

Jak poprzednie, tak i te spostrzeżenia robiłem w daleko szerszych granicach rozcieńczenia, aniżeli to robili inni badacze. Wyniki są bardzo pouczające.

Tablica XVII.

	Stopień rozcieńczenia		c	E	A
	Rozcz. krwi	Woda			
I.	10 cm ³	0 cm ³	0,003494	2,20396	0,00158
II.	5 "	5 "	0,001747	1,12434	0,00155
III.	3 "	7 "	0,001048	0,69881	0,00150
IV.	2 "	8 "	0,000698	0,43669	0,00159
V.	1 "	9 "	0,000349	0,18697	0,00186

A roztworu III przyjąłem = 0,00150, i na podstawie tego obliczyłem c i A wszystkich roztworów.

Jak widzimy więc, to, używając roztworów bardziej stężonych, wartości A spadają podczas rozcieńczania, dochodzą do pewnego minimum, potem zaś znowu i to bardzo szybko wzrastają w roztworach słabych. Wzrost A odpowiada słabnięciu E, oraz zmniejszaniu się wygasania światła w roztworach. Widzimy więc, iż to nowe spostrzeżenie potwierdza w zupełności moje spostrzeżenia poprzednie.

Zjawisko to objaśnić można tylko w ten sposób, iż istniejące w mocnych roztworach skupienia drobiny, wygasają światła w paśmie obserwowanem słabiej, aniżeli drobin pojedyncze, luźnie się unoszące, które ze skupień powstały podczas rozcieńczania.

Skoro zaś rozpad skupień nastąpi, to podczas dalszego rozcieńczania zachodzi dysocjacja drobin oksyhemoglobiny i wygasanie w charakteryzującym ją paśmie szybko się zmniejsza.

Dla sprawdzenia, czy przypuszczenie o skupieniu drobin jest słuszne, używałem do następnego doświadczenia 0,5%-go NaOH, w którym oksyhemoglobina łatwiej się rozpuszcza, aniżeli w wodzie i jako kwas słaby wchodzi prawdopodobnie w związek chemiczny z NaOH. Należało więc przypuszczać, iż skupienia drobin zostaną tu przez roztwórnik rozluźnione.

Tablicę XVIII, przedstawiającą wyniki tych spostrzeżeń, ułożyłem w podobny sposób, jak i poprzednią.

Tablica XVIII.

Stopień rozcieńczenia		c	A
Rozcz. krwi	Woda		
10 cm ³	0 cm ³	0,0016920	0,00123
5 "	5 "	0,0008460	0,00147
3 "	7 "	0,0005088	0,00150
2 "	8 "	0,0003380	0,00158
1 "	9 "	0,0001692	0,00180

Liczby podane w tablicy powyższej wskazują, iż przypuszczenia moje się sprawdziły. Używając wodnika sodowego, obserwować możemy tylko dysocyaę oksyhemoglobiny, rozpadu zaś drobin zauważyć nie można.

Dalej należało stwierdzić, jaki charakter posiada widmo produktu dysocyaey (jeżeli dysocyaey jest elektrolityczną), widmo jonów oksyhemoglobiny. W celu zbadania tej kwestyi obrałem do spostrzeżeń inne pasmo widma, niż poprzednio, mianowicie pasmo leżące pomiędzy charakterystycznymi dla oksyhemoglobiny smugami absorpcyjnymi, pomiędzy podziałkami 57 i 60, co odpowiada długości fal $\lambda = 562,5$ do $\lambda = 554$.

Tablica XIX.

Stopień rozcieńczenia		c	E	A
Rozcz. krwi	Woda			
10 cm ³	0 cm ³	0,004670	2,81047	0,00166
5 "	5 "	0,002340	1,46709	0,00160
3 "	7 "	0,001400	0,93437	0,00150
2 "	8 "	0,000940	0,70929	0,00133
1 "	9 "	0,000467	0,38222	0,00123

W tablicy powyższej wielkości A nie mają znaczenia absolutnego i zostały obliczone tylko w tym celu, aby zmniejszanie się A uwidocznić, naturalnie, iż w obserwowanem tu pasmie A nie będzie równe 0,00150, lecz będzie miało jakąś inną wielkość przeciętną.

Zjawisko stosunkowego zwiększania się E , a więc i stosunkowego zwiększania się wygasania światła w obserwowanem pasmie, które leży w miejscu smugi charakterystycznej dla hemoglobiny, wskazuje na to, iż zwiększa się stosunkowa ilość substancji lub jonów, które w tem miejscu właśnie silniej absorbują, prawdopodobnie ilość hemoglobiny.

Tak więc zdołałem wykazać z wielkiem prawdopodobieństwem, iż stosunkowa ilość oksyhemoglobiny się zmniejsza, hemoglobiny zaś wzrasta, t. j. iż oksyhemoglobina rozkłada się prawdopodobnie, podczas silnego rozcieńczania, na hemoglobinę, lub na jon, mający niektóre przynajmniej wspólne cechy widma z hemoglobiną, oraz na jon drugi, który w takim razie jest zapewne tlenem.

Ażeby stwierdzić na pewno, czy w tym przypadku zachodzi dysocjacja elekrolityczna, należy poczynić próby odpowiednie za pomocą mierzenia przewodnictwa elektryczności. W braku odpowiednich przyrządów, pozostawiam próby te na później.

Pozostawało mi jeszcze sprawdzić, czy hemoglobina tlenko-węglowa, będąc połączeniem daleko stalszem niż oksyhemoglobina, wykaże podczas rozcieńczania, podobne zjawisko dysocjacji.

Hemoglobinę tlenko-węglową otrzymałem przez nasycanie roztworu krwi w przeciągu $\frac{1}{2}$ godziny tlenkiem węgla, przepuszczając go silnym strumieniem. Obserwacje robiłem w pasmie pomiędzy podziałkami 60 i 63.

Tablica XX.

Stopień rozcieńczenia		E	
Rozez. krwi	Woda	podział. 60—63	podział. 57—60
10 cm ³	0 cm ³	2,55938	2,34669
5 "	5 "	1,32999	1,20184
3 "	7 "	0,82957	0,64856
2 "	8 "	0,55879	0,45100
1 "	9 "	0,27041	0,20458

Przedostatnia kolumna tej tablicy wykazuje bardzo nieznaczne nieprawidłowości.

Badając wygasanie światła w paśmie pomiędzy podziałkami 57 i 60 rozczyńców hemoglobiny tlenko-węglowej, znalazłem dosyć znaczne nieprawidłowości na E, lecz powodują je zapewne tylko błędy obserwacyi, ponieważ wahają się w obie strony.

Ze spostrzeżeń powyższych wnosić można, iż hemoglobina tlenko-węgłowa w rozcieńczeniu nie podlega wcale dysocjacyi, albo też tylko w małym stopniu.

Usługi, jakie nam, w przypadkach podobnych do podanych powyżej, oddać może spektrofotometer, są nieocenione. Tam, gdzie w rozczyinach powstają lub znikają bardzo małe ilości ciała barwnego, gdzie te przemiany nie mogą być stwierdzone ani za pomocą środków chemicznych, ani też za pomocą zwykłego spektroskopu, tam spektrofotometer służy jako odkrywca mierzący ilościowo tak drobne zmiany.

VI. Zastosowanie metody spektrokolorymetrycznej dla badania krwi.

Znając w danym przyrządzie stały stosunek pochłaniania światła A , który w oksyhemoglobinie wynosił u nas 0,00150, — można stosować go do badania krwi i oznaczać w niej zawartość oksyhemoglobiny.

Do badania bierze się zwykle krew naczyń włoskowatych, otrzymaną przez nakłócie końca palca od spodu lub u podstawy paznoga, co wywołuje ból mniejszy.

Krew rozcieńcza się wodą lub węglanem sodowym. Używałem 0,1% węglanu sodowego w tym celu, aby ciałka krwi łatwiej rozpuszczać się mogły. Węglan, mający odczyn alkaliczny, łączy się z oksyhemoglobina, nadając jej rozczyinom charakter bardziej stały; dają się one dłużej przechowywać bez zmiany. Ten wpływ 0,1% węglanu mogłem zauważyć wyraźnie, jeżeli brałem do porównania wodę czystą i węglan. Taki rozczyin węglanu jest zupełnie przezroczysty i pod tym względem na przezroczystość rozczyinu krwi wpływać nie może, również jak i woda.

Do mierzenia ilości krwi, oraz do rozcieńczenia jej w znanym stosunku używa się pipetki. Pipeta powinna być wykalibrowana, lecz niema potrzeby oznaczać jej zawartości w centymetrach sześciennych, ponieważ w naszym celu wystarczy znać stosunek pojemności całej pipetki do pojemności włoskowatej jej części. Stosunek ten daje nam stopień rozcieńczenia krwi.

Przytyka się koniec pipety do kropli krwi, wyciąga się z niej powietrze bezpośrednio ustami, lub za pomocą rurki gumowej; skoro krew wypełni rurkę włoskowatą do podziałki, to się zaciska rurkę gumową, lub palcem zatyka otwór pipety, obciera się watą jej koniec ze krwi, zanurza go do obok stojącego otwartego naczynia z wodą lub węglanem sodowym, wciąga tę ciecz do górnego znaczka pipetki, obciera koniec i wlewa się ciecz całą do naczynia szklanego o ścianach równoległych, z którego dusza Szulcego została wyjęta. Ażeby rozczyń lepiej zmieszać, wciąga się raz jeszcze ciecz do pipetki i wylewa się ją powtórnie, wówczas wkłada się duszę do naczynka i obserwuje przezroczystość rozczyń. Trzeba dbać o to, aby ściany naczynka były zupełnie czyste i suche na zewnątrz, po każdej obserwacji należy niezwłocznie rozebrać naczynko, każdą z jego części wymyć, wytrzeć na sucho i znowu złożyć.

Po każdym użyciu pipetki należy ją dokładnie wodą przemyć i wodę o ile możności wydmuchać. Na dokładne mierzenie krwi, oraz dokładne jej rozcieńczenie należy zwracać baczną uwagę, ponieważ znaną zawartość oksyhemoglobiny w cieczy mnożymy przez jej stopień rozcieńczenia, a więc i wszystkie omyłki mnożymy przez dużą liczbę.

Dla wypróbowania metody zrobiłem szereg spostrzeżeń, wyniki których przedstawione są w tabl. XXI. Kolumna pierwsza oznacza datę, litery *w* i *r* objaśniają, czy rano, czy też wieczorem krew była brana. Kolumna druga wykazuje, czyja krew badaną była, w kolumnie trzeciej zestawilem odnośne współczynniki wygasania światła, w czwartej wreszcie — obliczoną zawartość procentową oksyhemoglobiny we krwi.

Wyliczałem podług wzoru:

$$c = A \cdot E \text{ gdzie } A = 0,00150.$$

Pierwsze dwa spostrzeżenia zrobione były z pipetą o stosunku 131,9, dalsze zaś z pipetą o stosunku 141,44.

Tablica XXI.

Data		E	% oksyhemoglobiny we krwi
	Dr. M.	0,6358	12,58
	Służ. J.	0,8643	17,10

Data		E	% oksyhemoglobiny we krwi
w. 9 kw.	Służ. J.	0,6396	13,57
r. 10 "	"	0,6429	13,64
11 "	"	0,6684	14,18
16 "	"	0,6867	14,57
w. 18 "	"	0,6929	14,70
r. 19 "	"	0,6801	14,43
17 "	Stud. G.	0,6679	14,17
w. 16 "	Pies	0,6552	13,90
r. 17 "	"	0,6589	13,98
w. " "	"	0,6276	13,17
r. 18 "	"	0,6929	14,70
w. " "	"	0,5665	12,02
r. 19 "	"	0,6132	13,01
w. " "	"	0,5731	12,16
r. 20 "	"	0,5986	12,70
w. " "	"	0,4464	9,47
r. 19 "	Suka szczenna	0,6071	12,88
w. " "	"	0,6010	12,75
r. 20 "	"	0,5929	12,58
w. " "	"	0,5868	12,45
r. 21 "	"	0,6203	13,16
w. " "	"	0,5878	12,47
r. 22 "	"	0,5995	12,72
w. " "	"	0,5420	11,50
r. 24 "	"	0,5397	11,45
w. " "	"	0,4666	9,90
r. 25 "	"	0,4600	9,76
w. " "	"	0,4798	10,18
r. 26 "	"	0,5237	11,11
w. " "	"	0,4572	9,70
r. 27 "	"	0,3601	7,64

Data		E	% oksyhemoglobiny we krwi
w. " "	Suka szczenna	0,4398	9,33
r. 28 "	"	0,4134	8,77
w. " "	"	0,4082	8,66
r. 29 "	"	0,4200	8,91
w. " "	"	0,3733	7,92
r. 30 "	"	0,4134	8,77
w. " "	"	0,3780	8,02
r. 1 maja	"	0,3865	8,20
w. " "	"	0,3608	7,65
r. 2 "	"	0,3832	8,13
w. " "	"	0,3398	7,21
r. 3 "	"	0,3332	7,07
w. " "	"	0,3205	6,80
r. 4 "	"	0,3167	6,72
w. " "	"	0,2927	6,21
" " "	Szczeniak I	0,6995	14,84
" " "	" II	0,6702	14,22
w. 9 kw.	Dośw. na sobie	0,6981	14,71
r. 10 "	"	0,5665	12,02
w. " "	"	0,5491	11,65
r. 11 "	"	0,6679	14,17
w. " "	"	0,6603	14,01
r. 12 "	"	0,7178	15,23
w. " "	"	0,5741	12,18
r. 13 "	"	0,5727	12,15
w. " "	"	0,5529	11,73
r. 14 "	"	0,6203	13,16
w. " "	"	0,6948	14,74
r. 15 "	"	0,6976	14,80
w. " "	"	0,6698	14,21
r. 16 "	"	0,6787	14,40

Data		E	% oksyhemoglobiny we krwi
w. 16 kw.	Dośw. na sobie	0,6208	13,17
r. 17	"	0,6674	14,16
w. "	"	0,6269	13,30
r. 18	"	0,6618	14,04
w. "	"	0,6467	13,72
r. 19	"	0,5986	12,70
w. "	"	0,5840	12,39
r. 20	"	0,5939	12,60
w. "	"	0,5397	11,45
r. 21	"	0,6448	13,68
w. "	"	0,6203	13,16
r. 22	"	0,6618	14,14
w. "	"	0,5279	11,20
r. 23	"	0,5081	10,78
w. "	"	0,5628	11,94
r. 24	"	0,6269	13,30
r. 25	"	0,6071	12,88
w. "	"	0,5336	11,32
r. 26	"	0,5868	12,45
w. "	"	0,5797	12,30
r. 27	"	0,6198	13,15
w. "	"	0,6132	13,01
r. 28	"	0,6661	14,13
w. "	"	0,6212	13,18
r. 29	"	0,6264	13,29
w. "	"	0,6264	13,29
r. 30	"	0,5741	12,18
w. "	"	0,6245	13,25
r. 1 maja	"	0,6693	14,20
w. "	"	0,6504	13,80
r. 2	"	0,6580	13,96

D a t a		E	% oksyhemoglobiny we krwi
w. 3 maja	"	0,6646	14,10
r. 4 "	"	0,6661	14,13
w. " "	"	0,6401	13,58
w. 5 "	"	0,6740	14,30

Co się tyczy procentowej ilości oksyhemoglobiny we krwi człowieka, to ze szczupłych danych otrzymanych przeze mnie wynika, iż około 14⁰/₀ uważać można za normalne.

S z c z e ł k o w, który badał krew za pomocą spektrofotometru Hüfnera, znajdował u ludzi zdrowych 15—17⁰/₀; są to stanowczo za wysokie liczby, ponieważ liczby innych badaczy, zebrane u V i e r o r d t a ¹⁾, są znacznie niższe i z mojemu bardziej zgodne. Wogóle przyjąć można, iż u przeciętnego zdrowego mężczyzny zawartość oksyhemoglobiny we krwi waha się pomiędzy 13¹/₂ a 15⁰/₀. H e r m a n n ²⁾ podaje 13,8⁰/₀ jako przeciętną wartość u mężczyzn.

U psów otrzymane były trochę niższe wartości, niż u człowieka. Pies, którego badać zacząłem 16/IV miał się niedobrze, jadł mało, chudł, tak iż w końcu musiałem doświadczenia przerwać. Zmniejszanie się ilości oksyhemoglobiny we krwi psa tego widoczne jest z tablicy. Suka szczenna, której krew badać zacząłem 24/IV, miała się bardzo dobrze, była wesołą, jadła dużo i dobrze była kormiona. Pomimo to daje się zauważyć ciągle zmniejszanie się zawartości oksyhemoglobiny we krwi, aż do oszczenięcia się. Zaraz po oszczeniciu się (sześcioro potomstwa) zaprobowałem jej krew i krew dwu szceniąt; różnice, widoczne już od pierwszego rzutu oka na krew samą, uplastyczniają się rażąco w tablicy. Te różnice pomiędzy krwią matki i potomstwa zauważano już niejednokrotnie u ludzi ³⁾. Co do zmniejszania się zawartości oksyhemoglobiny we krwi położnic, to przeprowadzenie szeregu szczegółowych badań pod tym względem byłoby bardzo pożądane, ponieważ dotychczas spostrzeżeń takich prawie że nie posiadamy, prócz wyników przytoczonych u V i e r o r d t a, lecz sprzecznych ze sobą. Zauważę tu, iż

¹⁾ Daten und Tabellen. 1893.

²⁾ Physiologie str. 55. 1896.

³⁾ Vierordt. Daten und Tabellen str. 347.

krw u psów brałem z ogolonego i obmytego ucha. Zdziwiony byłem tą trudnością, jaką mi sprawiało wydobyć odrobiny krwi z ucha suki szczennej, trudnością wzmagającą się z przybliżeniem się oszczenienia. W ostatnich dniach musiałem czasem po kilka razy nacinać grube stosunkowo naczynia, aby z nich kropelkę krwi otrzymać. U szczeniąt z uszu krwi brać nie mogłem. U jednego szczenięcia wziąłem krew z łapki, u drugiego zaś krew z Carotis służyła mi do doświadczenia, ponieważ z łapki nie udało się ilości dostatecznej otrzymać.

Rozpatrując liczby całej tablicy, możemy zauważyć pewne różnice pomiędzy zawartością oksyhemoglobiny rano i wieczorem, spotykamy je u ludzi i u psów również. Różnice te wskazują na prawo, iż rano po kilkagodzinnym odpoczynku, ilość oksyhemoglobiny wzrasta, wieczorem zaś jest mniejsza.

Należałoby się to prawo sprawdzić na większej ilości osobników.

Na zakończenie podaję krótki przepis postępowania podczas oznaczania oksyhemoglobiny.

Skoro spektrofotometr jest raz na zawsze ustawiony, to, przystępując do oznaczeń, zapalamy lampę, czekamy minut około 20, aż knot się rozpali; sprawdzamy położenie kątów α_0 i α_1 , bierzemy krew za pomocą pipety w sposób opisany na str. 393. Naczynko wypełnione roztworem krwi, zawierające duszę Szulcego, stawiamy na stolczku przed samą szparą i równolegle do niej, oraz tak, aby brzeg górny duszy Szulcego znajdował się naprzeciw poprzeczki rozdzielającej szparę. Patrząc przez szparę oczną, obracamy tarczę do zupełnego zrównania jasności obu pasem widma. Ścisłego ustawienia dokonywa się w sposób opisany w podręczniku Wiedemanna (l. c.).

Na tarczy odczytujemy kąt α , spostrzeżenia powtarzamy pięć razy i bierzemy średnią arytmetyczną. Wartość α wstawiamy do równania:

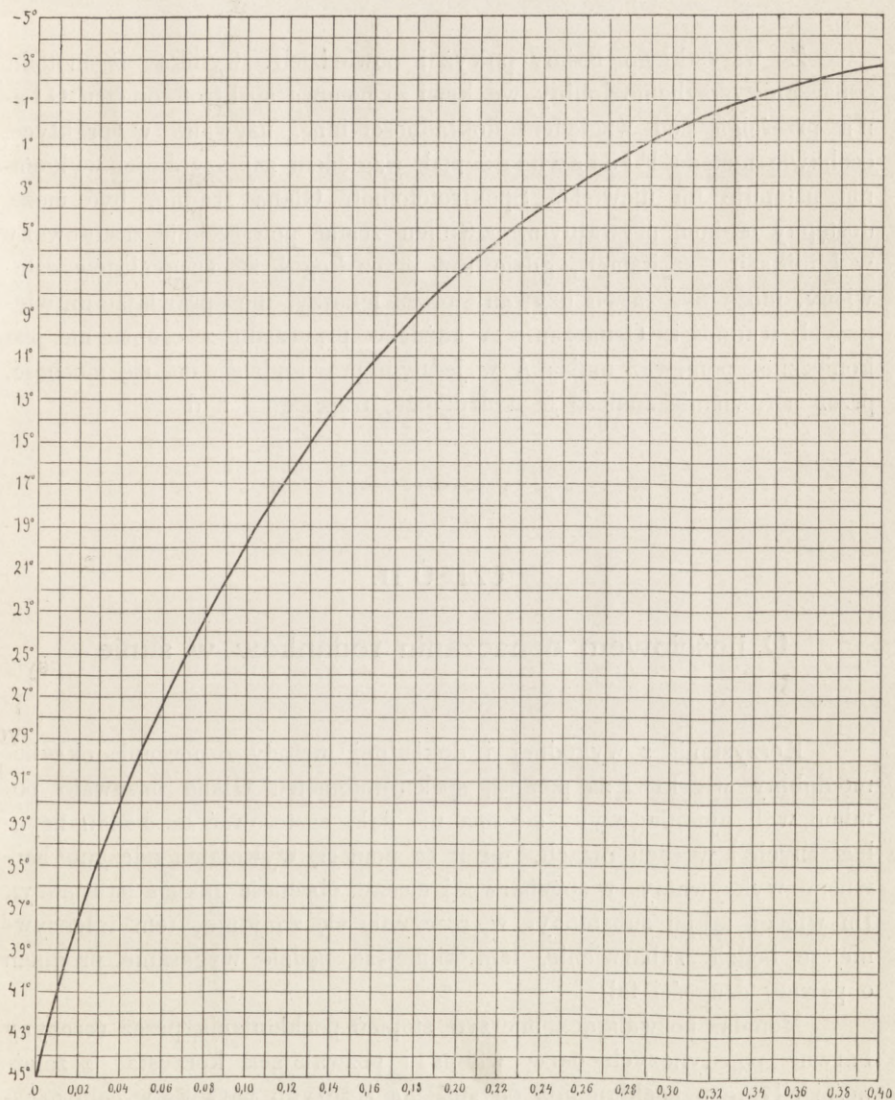
$$\log e = \frac{\log \operatorname{ctg} (85^\circ 04' - \alpha) - \log \operatorname{ctg} (85^\circ 04' - \alpha_1)}{0,503}$$

i obliczamy $\log e$; mnożymy $-\log e = E$ przez $A = 0,00150$ i otrzymujemy wielkość będącą zawartością oksyhemoglobiny w badanym roztworze krwi. Jeżeli tak otrzymaną wielkość pomnożyć przez stopień rozcieńczenia krwi, to otrzymamy rzeczywisty procent barwika we krwi.

Dla ułatwienia rachunku należy ułożyć tablicę iloczynów $E \cdot A$, oraz tablicę iloczynów e przez stopień rozcieńczenia krwi. Gdybyśmy mogli raz na zawsze płomień lampy tak dokładnie ustawić, aby α_1 wcale się nie zmieniało, to w takim razie moglibyśmy, znając α_1 , korzystać wprost z tablicy ułożonej na wartości E , lub z odpowiednio

wykreślonej krzywej kątów. Taką krzywą mamy wykreśloną na załączonej tablicy. Korzystać z niej można tylko w razach, jeżeli oznacza-

Ryc. 2.



jąc E ma się $\alpha_1 = 45^\circ$. Trzeba więc, chcąc korzystać z tej tablicy, światło lampy dopóty podnosić lub opuszczać, aż α_1 będzie się ściśle równało 45° . Korzystając z takiej krzywej kątów, lub też z liczb odpowiednich

w tablicę ułożonych, możemy, znając α , bezpośrednio c , a dalej i % oksyhemoglobiny we krwi odczytywać. Zawile rachunki odpadają tu zupełnie.

Ze wszystkiego, cośmy powyżej powiedzieli, wynika, iż metoda oznaczania oksyhemoglobiny we krwi za pomocą spektrofotometru Glana prześciga pod względem dokładności inne, używane w praktyce, osobliwie metodę Fleischla, pod względem zaś szybkości wykonania ustępuje im niewiele. Spektrofotometr Glana trudno, być może, dostępny osobom prywatnym, powinien zostać powszechnie zastosowany w klinikach i szpitalach, gdzie raz przez kogoś ze specjalistów ustawiony, może być łatwo używany przez lekarzy, nie sprawiając im większych trudności. Oznaczanie A każdego przyrządu z osobna nie jest konieczne, ponieważ mając A w jednym przyrządzie, ma się możliwość, przez porównanie znaleźć je u drugiego, trzeciego i t. d.

CZĘŚĆ II.

O ilościowym oznaczaniu rodanków w ślinie.

Korzystanie z wygodnej i dokładnej metody oznaczania oksyhemoglobiny we krwi za pomocą spektrofotometru Glana nasuwało pomimo woli pytanie, czyby się ona nie dała zastosować do badań fizjologicznych i w tych razach, jeżeli za pomocą wywołania odczynu barwnego wykrywamy w bezbarwnej cieczy obecność jakiejś substancji. Im więcej takiej substancji w roztworze się znajduje, tem intensywniejsze będzie zabarwienie, tem silniejsze będzie wygasanie promieni o pewnej długości fal.

Metoda, pozwalająca mierzyć stopień pochłaniania przez roztwory barwne pojedynczych barw widma i pozwalająca korzystać z zależności siły tego pochłaniania od stężenia roztworu barwnika w celu oznaczenia jego zawartości w cieczy, — zawiera w sobie wszystkie warunki, ażeby była zastosowana i do odczynów barwnych. Do takich odczynów należą przedewszystkiem odczyny na białko, o których będę miał może sposobność donieść kiedyindziej, oraz odczyn na kwas rodanowodorowy.

Ze względu na obecność soli rodanowodorowych w ślinie ludzkiej, w soku żołądkowym, mleku, oraz moczu, ze względu na znaczenie, jakie mu niektórzy badacze w wymianie materji przypisują¹⁾, uważałem za stosowne zająć się tym odczynem.

Rozczyn kwasu siarkosinowodorowego i jego soli dają z solami żelazowymi odczyn barwy krwisto-czerwonej, wywołujący silne pochłanianie w pewnych miejscach widma. Korzystając z tego, oparto większość metod oznaczania ilości rodanku potasu w ślinie na porównywaniu siły zabarwienia normalnego rozczyynu rodanku żelaza z zabarwieniem wywołanem w ślinie.

Vierordt²⁾ pierwszy zajął się widmem rodanku żelazowego i proponował oznaczać małe ilości rodanku potasu w ślinie przez przeprowadzenie go w rodanek żelazowy i mierzenie pochłaniania światła w widmie tego połączenia. Zmierzył on w różnie stężonych rozczyinach współczynniki wygasania światła w różnych pasmach widma, jak to załączona tablica przedstawia, i, pomimo niestałych wyników, podał stałe stosunków pochłaniania, które miały służyć do obliczania ilości rodanku potasu.

Zob. tabl. XXII na str. 402.

Rozpatrując dokładniej tę tablicę, wykrywa się w niej dziwne sprzeczności rachunkowe. Zasługują one na bliższe omówienie już z tego względu, że te liczby służą za podstawę do dalszych wywodów Vierordta co do odczynu rodanowego, oraz do oznaczania rodanku potasu w ślinie.

W górnym poziomym szeregu mamy stężenia rozczyń rodanku żelaza, w drugim ich stężenia w stosunku do rodanku potasu. Jeżeli ostatnią liczbę co do rodanku potasu przyjmemy za jedność, to poprzedzające ku lewej ręce wyrażą się jak 2, 4, 8 i 16, tenże stosunek powinien oczywiście zachodzić i z liczbami tyczącemi się rodanku żelazowego, znajdujemy jednak, iż jeżeli ostatnią liczbę przyjąć za 1, to poprzedzające ku lewej ręce wyrażą się liczbami 2, 4, 8, 12,35. Ta ostatnia liczba jest za wielka, co pochodzi z omyłki drukarskiej, polegającej na tem, że zamiast 1,48750, wydrukowano 1,14875. Poprawiając zatem pomienioną liczbę i obliczając stałą A, otrzymamy następujące

¹⁾ M. Nencki. Über das Vorkommen von Sulfocycansäure im Magensaft. B. der Deutsch. Chem. Ges. B. 28. 1895.

²⁾ I. c. 1873.

Tablica XXII.
W jednym cm.³ roztworu zawiera się miligramów:

Paśmo widma	1,14875 rodanku żelazowego		0,74375 (0,941)		0,371875 (0,4705)		0,185937 (0,23525)		0,092968 (0,117625)		A
	E		E		E		E		E		
C 15 D	0,3354		0,16686		0,0825						0,0038723 rodanku żelazowego (0,0056322 rodanku potasu)
C 40 D			0,4763		0,2351		0,1135				
C 90 D			1,1549		0,5867		0,2790		0,1290		
D 11 E					1,1561		0,5111		0,2503		
D 50 E							0,7212		0,3449		
D 68 E									0,3420		
E 45 F											
E 63 F											
F 21 G											0,0002718 (0,00033104)
F 32 G											
G 10 H											0,0002718 (0,0003439)
G 23 H											

wartości na A trzech współczynników wygasania w paśmie pierwszym, obliczone według wzoru

$$A = \frac{c}{E}$$

$$A_1' = 0,00443$$

$$A_1'' = 0,00446$$

$$A_1''' = 0,00451$$

przeciętna $A_1 = 0,00447$, otrzymaliśmy więc liczbę niezgodną z tą, jaką podaje Vierordt (0,0038723).

W paśmie drugim otrzymamy:

$$A_2' = 0,00156$$

$$A_2'' = 0,00158$$

$$A_2''' = 0,00164$$

przeciętna $A_2 = 0,001593$, u Vierordta 0,0015789.

W paśmie trzecim otrzymamy:

$$A_3' = 0,000644$$

$$A_3'' = 0,000634$$

$$A_3''' = 0,000666$$

$$A_3'''' = 0,000721$$

przeciętna $A_3 = 0,000666$, u Vierordta 0,00064874.

W paśmie czwartym otrzymamy:

$$A_4' = 0,000321$$

$$A_4'' = 0,000363$$

$$A_4''' = 0,000371$$

przeciętna $A_4 = 0,00035117$, u Vierordta 0,00033931 i t. d.

Wszystkie stałe A są według mojego obliczenia z liczb Vierordta znacznie większe, niż podane w jego tablicy. Czy Vierordt obliczał jakoś inaczej A w danym przypadku, nie zaś podług wzoru $A = \frac{c}{E}$, wyjaśnienia żadnego nie załączył.

Że podane przez Vierordta wartości A są rzeczywiście za małe, widać to z jego następnej tablicy, gdzie E , obliczone według wzoru $E = \frac{c}{A}$, są wszędzie za duże w stosunku do obserwowanych, co i Vierordt stwierdza, nie mogąc jednak objaśnić przyczyny tego zjawiska. Z tego też względu i liczby, wyrażające % KCNS w ślinie, jakie otrzymał Vierordt, są nieco za małe. Z tych więc względów, jak również dlatego, iż Vierordt nie uwzględniał dysocjacji w roztworach słabych, — oznaczenia jego, oraz samą metodę uznać należy za niedostateczne.

Panowie K r ü s s ¹⁾ zarzucają zupełnie słusznie, iż metoda przez Vierordta podana zawiera w sobie, jak to już z niezgodnych wyników

¹⁾ l. c. str. 66.

widać, zasadnicze nieporozumienie, lecz podają błędne wyjaśnienie tego zjawiska. Mniemają oni bowiem, iż odczyn pomiędzy chlorkiem żelazowym i rodankiem potasowym nie zachodzi według równania $\text{FeCl}_3 + 3\text{KCNS} = \text{Fe}(\text{CNS})_3 + 3\text{KCl}$, jak twierdzi Vierordt na podstawie swoich spektrokolorometrycznych pomiarów, oraz jak to jest ogólnie w chemii przyjęte. Opierają się oni na wynikach badań podanych w następującej tablicy.

Tablica XXIII.

FeCl_3 cm ³ 1 cm ³ =1 drob.	KCNS cm ³ 1 cm ³ =3 drob.	wody cm ³	E
1	1	18	0,30103
1	1,5	17,5	0,43180
.
.
1	3,9	15,1	1,05552
1	4	15	1,07059
1	5	14	1,07059
1	8	11	1,07059

„Współczynniki wygasania światła wzrastają, dopóki jedna drobina FeCl_3 nie została zaprawiona ściśle dwunastu drobinami (= 4 objętościom) rodanku potasu“. Spostrzeżenia powtarzano, zamieniając rodanek potasu rodankiem żelazowym, oraz chlorek żelazowy ałunem żelazowym i w obudwu przypadkach otrzymano, przy powyżej podanym stosunku drobin 1 : 12 i przy większej ilości rodanku, identyczne wyniki co do współczynników wygasania, mianowicie :

1,45594 1,34679

oraz

1,45594 1,34679.

Zauważę tu, iż panowie Krüss pracowali z przyrządem Vierordta. Wyniki ich badań są zadziwiające już z powodu identyczności wyników oddzielnych oznaczeń, wykonanych wśród różnych warunków, identy-

czności zupełnej, aż do piątego znaku dziesiętnego. Przyznaję, iż do takiej biegłości w obserwacji dojść nie jestem w stanie, nawet używając o wiele doskonalszego przyrządu Glana. Oddzielne moje oznaczenia współczynników, nawet w jednej i tejże cieczy, różnią się zwykle w piątym, a często i w czwartym znaku między sobą. — Panowie Krüss wnioskuje ze swoich spostrzeżeń, „że wskutek działania nadmiaru rodanku potasu na chlorek żelazowy, powstaje nie rodanek żelazowy, lecz zabarwiony rodanek żelazowo-potasowy“.

Krüssowi i Morathowi udało się nawet jakoby wykryć solizować podwójną sól 9 KCNS. Fe (CNS)₃.

Opierając się na tych spostrzeżeniach, panowie Krüss wyjaśniają, iż należy się przyjąć do obliczeń inną stałą A, uwzględniając tworzenie się soli podwójnej. Lecz ostatecznie odrzucają oni zupełnie możliwość stosowania tego odczynu do ilościowych oznaczeń, ponieważ podwójna sól 9 KCNS. Fe (CNS)₃ ma się „łatwo rozkładać pod wpływem wody, kwasów i soli“. Oto są wyniki ich badań:

Tablica XXIV.

FeCl ₃ cm ³ 1 cm ³ = 1 drob.	KCNS cm ³ 1 cm ³ = 3 drob.	wody	E	
1	4	15	1,07059	—
1	4	14,5	1,04576	1/2 cm ³ HCl (c. g. 1,124)
.
.
1	4	—	0,27573	15 cm ³ HCl
1	4	15	0,46853	0,75 gr. NH ₄ Cl
1	4	15	0,37676	2 „ „
1	4	15	0,46853	1 „ NaCl

„Najdziwniejszym jest“ — według nich — „rozkład podwójnej soli rodanowej wskutek działania wody“.

Tablica XXV.

$\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2$ + 12 H_2O 1 $\text{cm}^3 = 1$ drob.	KCNS cm^3 1 $\text{cm}^3 = 3$ drob.	wody	E
1	4	5	1,34679
1	4	15	0,52288
1	4	25	0,33725
1	4	35	0,18046
1	4	45	0,09691

Zobaczymy później, iż zachodzi tu zupełnie prawidłowe zjawisko dysocjacji.

Stąd wnoszą panowie Krüss, „iż wobec silnych rozcieńczeń, których się używa do spostrzeżeń z powodu intensywnego zabarwienia roztynów podwójnej soli rodanowodorowej, zostaje ona częściowo rozłożona przez wodę i zdolność tego połączenia do pochłaniania światła nie może być stosowana do spektrokolorymetrycznego oznaczania żelaza lub rodanków“. Lecz w takim razie cóż dzieje się z głównym wynikiem ich rozumowania o tworzeniu się podwójnej soli 9 KCNS . $\text{Fe}(\text{CNS})_3$; wszak, według tak zgodnych ze sobą liczb tablicy XXIII, jedna drobina FeCl_3 i równo 12 drobin KCNS dają stałe połączenie, które według panów Krüss jest solą podwójną. Częściowo przez wodę rozłożona sól podwójna powinna się znowu, częściowo przynajmniej, odnowić wskutek zdwojenia ilości rodanku potasu, podczas gdy przeciwnie w obydwu przypadkach widzimy identyczne liczby. Tu właśnie istnieje sprzeczność trudna do rozstrzygnięcia. Albo sól podwójna się tworzy, lecz woda ją rozkłada, a w takim razie wzrastająca ilość dodanego rodanku potasu (patrz ostatnie liczby tablicy XXIII str. 404) powinna działać przeciw temu rozkładowi i stopniowo zwiększać współczynnik wygasania, lecz wtedy traci się grunt do teorii o tworzeniu się soli podwójnej. Albo też liczba 1,07059 jest stała, sól podwójna się tworzy, lecz w takim razie przez wodę się nie rozkłada, czemu przeczy tabl. XXV (str. 406).

W r. 1891 wystąpił G. Magnanini¹⁾ przeciwko powyższemu wywo-

¹⁾ G. Magnanini. Ueber die Reaction zwischen Ferrisalzen und löslichen Rodaniden. Zeit. f. physik. Chemie. VIII. 1891.

dom panów K r ü s s, sprowadzając, jak tego spodziewać się można było, wszystkie nieregularności odczynu rodanowego do dysocjacji elektrolitycznej w roztworach, lecz wywody swoje poparł zupełnie niedostatecznie.

Chcąc się do ostatecznego rozwiązania kwestyi powyższej przyczynić, postanowiłem przedewszystkiem stwierdzić, czy się rzeczywiście tworzy sól podwójna.

Rozpuszczałem czysty wodnik żelazowy w czystym kwasie rodanowodorowym. Ponieważ w roztworze nie innego, prócz połączenia $\text{Fe}(\text{OH})_3$ i HCNS nie było, tworzenie się więc wszelkich soli podwójnych było wykluczone. $\text{Fe}(\text{OH})_3$ otrzymałem przez strącenie za pomocą amoniaku z roztworu chlorku żelazowego. Osad został przez dekantację dziesięć razy wodą wymyty i trzy razy na sączku wypłukany, po czem woda przesączona nie zawierała ani śladu amoniaku, ani kwasu solnego.

HCNS otrzymałem za pomocą destylacji w próżni z mieszaniny rodanku potasowego i niezbyt mocnego kwasu siarkowego.

W ten sposób otrzymany kwas został rozcieńczony i odsączony od produktu polimeryzacji. Ażeby znać stężenie stosowanego do doświadczeń kwasu, sporządziłem go jako $\frac{1}{10}$ N za pomocą $\frac{1}{10}$ N ługu sodowego. W tem rozcieńczeniu z biegiem czasu się nie polimeryzował i prawie że się nie rozkładał, wydzielając tylko słabą woń cyanowodoru; wyglądał jako ciecz bezbarwna ze słabym odcieniem żółtawozielonawym. Do pewnej ilości takiego kwasu dodałem $\text{Fe}(\text{OH})_3$ w nadmiarze, tak iż po 24 godzinach pozostała jeszcze część nierozpuszczona, poczem przesączyłem, pozostawiłem jeszcze na 24 godzin i przesączyłem powtórnie przez sączek podwójny. Taki nasycony roztwór $\text{Fe}(\text{CNS})_3$ rozcieńczyłem do tego stopnia, aż się stał do badania spektrokolorymetrycznego zdolny. Oznaczyłem współczynniki wygasania światła tego słabego roztworu i cieczy otrzymanych przez stopniowe jego rozcieńczenie wodą. Wyniki przedstawione są w tabl. XXVI (str. 408).

Roztwór najbardziej rozcieńczony miał barwę żółto-brunatną, najbardziej stężony równie odcień brunatno-żółty, tylko roztwory pośrednie miały barwę mniej lub bardziej czystą krwisto-czerwoną.

Widma porównywałem w paśmie pomiędzy podziałkami skali 70 i 73, co odpowiada długości fal $\lambda = 525$ do $\lambda = 516$.

Tablica XXVI.

Stopień rozcieńczenia		Kąt α	Współczynnik wygasania światła
Fe(CNS) ₃	wody		
10 cm ³	0 cm ³	0° 12'	2,35837 _t
5 "	5 "	27° 13'	0,67773 _t 1
3 "	7 "	40° 53'	0,25173 _t
2 "	8 "	44° 42'	0,13609
1 "	9 "	47° 28'	0,05080
0 "	10 "	49° 05'	—

Jeden rzut oka na tablicę powyższą wystarczy, aby stwierdzić, iż współczynniki wygasania zmniejszały się o wiele szybciej, niż wzrastało rozcieńczenie. Objasnić to zjawisko można albo przez dysocjację elektrolityczną, jak to robi Magnanini, albo też, przynajmniej częściowo, przez hydrolizę.

Należało się więc stwierdzić, czy po rozcieńczeniu rodanku żelazowego zachodzi dysocjacja, czy też hydroliza. Najbardziej rozstrzygające byłoby w danym przypadku wymierzenie przewodnictwa elektrycznego rozczyńców o rozmaitem stężeniu, lecz, ponieważ nie posiadałem urządzeń odpowiednich, musiałem się zadowolić dyalizowaniem rozczyńców rozcieńczonych.

W pierwszym dyalizacie mogłem wykryć żelazo, które przechodziło przez błonę, widocznie jako Fe(CNS)₃, ponieważ obok niego i kwas rodano-wodorowy wykryć było można; potem zaś, w dyalizatach następnych, mogłem wykryć tylko małe ilości kwasu, żelaza zaś wcale tam nie było. Stąd wynika, iż żelazo znajdowało się w rozczywie przeważnie w formie koloidalnej, niedyalizującej (jak to już i dla FeCl₃ wykazane zostało) prawdopodobnie w postaci Fe(OH)₃, albo Fe(CNS)(OH)₂, albo też Fe(CNS)₂(OH). Spostrzeżenie to przemawia bardziej za hydrolizą, niż za dysocjacją, chociaż tej ostatniej nie wyklucza.

Bardzo szybkie zmniejszanie się współczynników wygasania w powyżej przytoczonym szeregu spostrzeżeń, wskazuje jednak na rzeczywiste trudności, zachodzące w zastosowaniu odczynu tego do ilościowych oznaczeń HCNS lub Fe w rozczywach. Wiemy jednak z wielorakich

przykładów, iż przez dodanie dużej ilości jonów elektro-ujemnych, dysocjacja się zmniejsza, z drugiej zaś strony wiemy, iż hydroliza się zmniejsza, jeżeli dodamy nadmiar kwasu. Czy więc nieproporcjonalne zmniejszanie się E objaśnić będziemy w jeden lub drugi sposób, dodanie nadmiaru kwasu działać powinno — podnosząc barwę. Na tej drodze spodziewałem się otrzymać bardziej prawidłowe liczby.

Do $6 \text{ cm}^3 \text{ Fe(CNS)}_3$ w różnym rozcieńczeniu dodawałem po $4 \text{ cm}^3 \frac{1}{10} \text{ N}$ kwasu rodano-wodorowego. W przedostatniej kolumnie tabl. XXVII. podane są obserwowane kąty, w ostatniej zaś obliczone współczynniki E . Kąt α był oznaczony nie czystej wody, lecz mieszaniny $4 \text{ cm}^3 \text{ HCNS}$ i 6 cm^3 wody, ażeby w ten sposób usunąć, nieznaczny zresztą, wpływ żółtawego odcienia kwasu.

Tablica XXVII.

Stopień rozcieńczenia			α	E
HCNS $\frac{1}{10} \text{ N}$	Fe(CNS)_3	wody		
4 cm^3	5 cm^3	1 cm^3	$- 1^\circ 47'$	2,75483
4 "	3 "	3 "	$+ 6^\circ 23'$	1,64018
4 "	2 "	4 "	$+ 16^\circ 35'$	1,05475
4 "	1 "	5 "	$+ 31^\circ 19'$	0,51902
4 "	0 "	6 "	$+ 48^\circ 17'$	—

Jak to widać z tablicy, zmniejszyła się nieprawidłowość w szeregu E i pozostała tylko w bardzo małym stopniu. Dysocjacji zupełnie usunąć nie można, ponieważ nie zmniejsza się ona równomiernie ze wzrostem ilości dodanego kwasu, lecz asymptotycznie.

Teraz widzimy jasno, na czym polegał błąd panów Krüss. Zjawiska związane z dysocjacją i hydrolizą, tłómaczyli oni przez tworzenie się soli podwójnej. Moje spostrzeżenia dowodzą, iż taka sól podwójna się nie tworzy, ponieważ połączenie Fe(OH)_3 z kwasem HCNS , a więc połączenie pojedyncze — daje zjawiska podobne do tych, jakie panowie Krüss obserwowali podczas działania FeCl_3 na KCNS . W moich spostrzeżeniach sól podwójna nie mogła się tworzyć, jednakże nadmiar HCNS podnosił barwę roztworu. Wobec nadmiaru jonów CNS zmniejszała się dysocjacja. Tenże sam proces zachodził i w doświadczeniach

panów Krüss (patrz tabl. XXIII str. 404), jeżeli dodawali nadmiar jonów CNS w postaci rodanku potasu.

Rozcieńczanie wodą osłabia zabarwienie, nie wskutek rozkładu soli podwójnej, lecz przez zwiększenie dysocjacji (lub hydrolizy) w roztoczynie (Tabl. XXV str. 406). Dodanie soli obojętnych, lub kwasu solnego (Tabl. XXIV str. 405) wpłynąć powinno i w tym przypadku, jak się to dzieje z innymi połączeniami w warunkach analogicznych, na zmniejszanie się dysocjacji, działanie ich zaś na sól podwójną nawet panom Krüss dziwnem się wydaje.

Widzimy więc, iż zastosowanie spektrokolorymetrii do oznaczania ilości rodanku potasu w ślinie jest zupełnie możliwe i nie napotyka na większe przeszkody, niż te, na jakie się przy innych pomiarach spektrokolorymetrych natrafia.

Liczy z tabl. XXVII., które są wartościami na E, wykazują tylko nieznaczne odchylenia od proporcjonalności ze stężeniem. Opierając się na tem, możemy oznaczać żelazo w roztoczynach, jeżeli dodawać będziemy nadmiar kwasu rodano-wodorowego, lub rodanku potasu. Oznaczając rodanek w ślinie, nie mogłem stosować nadmiaru rodanku dla usunięcia hydrolizy, lecz dodawałem nadmiaru drugiego odczynnika, t. j. soli żelazowej. Jako sól żelazową, stosowałem chlorek żelazowy, nie zaś alun żelazowy. Rozczyn pierwszego ma barwę żółtą, roztwór zaś drugiego można mieć prawie bezbarwny, lecz ponieważ otrzymanie takich, tylko słabo zabarwionych roztworów alunu, przedstawia pewne trudności, tak iż V i e r o r d t nie radzi ich używać, ¹⁾ stosowałem więc chlorek żelazowy.

Ze względu na to, iż ślina jest zwykle słabo alkaliczna, należało roztwór zakwasić. Mocne zakwaszenie roztworu potrzebne mi było jeszcze i z tego powodu, ażeby usunąć hydrolizę chlorku żelazowego i przez to możliwie zmniejszyć zabarwienie jego roztworu.

Rozpuściłem 1 gr. suchego FeCl_3 w 25 cm^3 wody, dodałem 5 cm^3 stężonego kwasu solnego i dopełniłem do 100 cm^3 wodą. W ten sposób otrzymałem żółtawy 1% roztwór FeCl_3 w 1,4% kwasie solnym. W dalszym ciągu będę nazywał ten roztwór wprost FeCl_3 . Prócz tego rozpuściłem 0,01 gr. krystalicznego KCNS w 100 cm^3 wody. Do wszystkich próbek dodawałem jednostajną ilość FeCl_3 , mianowicie 4 cm^3 . — Obserwowałem pasmo też samo, co i poprzednio, t. j. pomiędzy podziałkami skali 70 i 73.

Otrzymałem przeciętną wartość $A = 0,00001022$, przyjmując więc tę wielkość, można oznaczać zawartość rodanku potasu za pomocą równania: $\% \text{ KCNS} = E \cdot 0,001022$.

¹⁾ l. c. str. 62.

Tablica XXVIII.

Stężenie roztworu			Stężenie KCNS w 6 cm ³ cieczy	E	A
KCNS	wody	FeCl ₃			
6 cm ³	0 cm ³	4 cm ³	0,01%	1,05277	0,0000950
5 "	1 "	4 "	0,0083%	0,86311	0,0000973
4 "	2 "	4 "	0,0067%	0,69070	0,0000970
3 "	3 "	4 "	0,005%	0,48422	0,0001032
2 "	4 "	4 "	0,0033%	0,30949	0,0001098
1 "	5 "	4 "	0,00167%	0,15038	0,0001110

Ślinę należy przesączyć i 6 cm³ przesączu zmieszać z 4 cm³ FeCl₃. Jeżeli otrzymuje się przy tem zabarwienie zbyt silne, lub jeżeli mamy mało śliny, to można wziąć jej mniejszą ilość, dopełnić do 6 cm³ wodą i potem obliczyć na objętość 6 cm³.

W ten sposób znalazłem zawartość rodanku.

Tablica XXIX.

		Ilość cm ³ śliny	E
W ślinie	Dr M — 0,0163%	3	0,82537
" "	stud. S — 0,01208%	6	1,31759
" "	" Z — 0,00850%	3	0,39775
" "	mojej — 0,00525%	6	0,50676

Znalezione liczby leżą w granicach podanych przez innych autorów.

Próby z mieszaną śliną psów w czterech przypadkach nie wykazały zawartości rodanku.

Mamy więc metodę oznaczania ilości rodanku potasu w ślinie, która z łatwością zastosować się daje w praktyce.

Pospolite zastosowanie tej metody, przyczyni się może do wyjaśnienia pytania, jaką drogą KCNS w organizmie się tworzy.

SPIS RZECZY.

	Str.
Wstęp	364
Część I.	
O ilościowym oznaczeniu oksyhemoglobiny we krwi	365
I. O używaniu spektrofotometru Glana	365
II. Oznaczenie stałego stosunku pochłaniania światła przez oksyhemoglobinę	369
III. Dysocjacja barwików	378
IV. Zmienność rozczyznów oksyhemoglobiny	383
V. Dysocjacja oksyhemoglobiny	384
VI. Zastosowanie metody spektrofotometrycznej do badania krwi	392
Część II.	
O ilościowym oznaczeniu rodanków w ślinie	400

