

76. M. Nencki und N. Sieber: Untersuchungen über den Blutfarbstoff.

(Eingegangen am 21. Februar; mitgeth. in der Sitzung von Hrn. A. Pinnor.)

IV.¹⁾

Die von uns beschriebene Verbindung des Hämins mit Amylalkohol von der Zusammensetzung: $(C_{32}H_{31}ClN_4FeO_3)_4C_5H_{12}O$, im Luftbade bis zu constantem Gewichte bei 130—135° getrocknet, verliert den Amylalkohol vollständig. Bei dieser Temperatur entweicht aber keine Salzsäure, wie überhaupt das Aussehen der Krystalle keine Veränderung erleidet, nur werden sie stark hygroskopisch. Sie sind dann, entsprechend der Formel $C_{32}H_{31}ClN_4FeO_3$ zusammengesetzt. Durch Auflösen der bei 130—135° getrockneten Präparate in verdünnter Natronlauge, Fällen des Filtrates mit verdünnter Salzsäure, Auswaschen des Niederschlages bis zur Entfernung des Chlors, wird daraus reines Hämatin erhalten, dessen Analysen der früher von uns ermittelten Formel: $C_{32}H_{32}N_4FeO_4$ entsprechen.

So enthielt ein bei 135° getrocknetes Häminpräparat 62.88 pCt. C, 5.04 pCt. H, 9.08 pCt. N, 5.33 pCt. Cl und 8.94 pCt. Fe.

Die Formel $C_{32}H_{31}ClN_4FeO_3$ verlangt 62.91 pCt. C, 5.08 pCt. H, 5.79 pCt. Cl, 9.17 Fe und 9.17 N. Der Rest des analysirten Präparates wurde in Hämatin verwandelt, das bei 110° bis zu constantem Gewicht getrocknet, bei der Verbrennung folgende Zahlen ergab: 65.01 pCt. C, 5.54 pCt. H, 9.12 pCt. Fe und 9.53 pCt. N.

Die Formel $C_{32}H_{32}N_4FeO_4$ verlangt C 64.86, H 5.40 pCt. N und Fe 9.46 pCt.

Ein anderes, ebenso wie das vorherige aus Rinderblut dargestelltes und bei 130—135° getrocknetes Präparat enthielt 62.81 pCt. C, 5.30 pCt. H, 5.49 pCt. Cl und 8.88 pCt. Fe. Ein anderer Theil der analysirten Krystalle wurde in Hämatin verwandelt, das bei der Elementaranalyse 64.60 pCt. C, 5.39 pCt. H und 9.16 pCt. Fe ergab. Wie wir also früher hervorgehoben haben, wird bei der Umwandlung der Häminkrystalle in das Hämatin durch Auflösen der ersteren in Alkalien Salzsäure abgespalten und dafür Wasser in das Molekül aufgenommen, oder vielleicht richtiger das Chlor des Hämins durch Hydroxyl ersetzt.

Die Häminkrystalle lösen sich in etwa 100 Theilen kochenden Eisessigs auf; doch ist Eisessig zum Umkrystallisiren wenig geeignet, da beim Erkalten des heissen Filtrates nur ein geringer Theil des Hämins auskrystallisirt und der grössere in Lösung bleibt. Dagegen werden sowohl die Häminkrystalle, als auch das Hämatin beim Erwärmen mit Essigsäureanhydrid gelöst. Namentlich die ersteren sind

¹⁾ Diese Berichte XVII, 2270.

darin leicht löslich, so dass in der Siedhitze 7 Gewichtstheile des Anhydrids zur Auflösung von 1 Theil der Häminkrystalle genügen. Längere Zeit am Rückflusskühler mit Essigsäureanhydrid gekocht, ändern sowohl das Hämin, wie das Hämatin ihre procentische Zusammensetzung, was auf einen Eintritt der Acetylgruppen in das Molekül schliessen lässt. Die Häminkrystalle scheinen ausserdem mit dem Essigsäureanhydrid eine additionelle Verbindung zu geben. Als wir in einem Versuche 10 g der Häminkrystalle mit dem 9fachen Gewichte des Anhydrids eine Stunde lang am Rückflusskühler kochten, schieden sich aus der heissfiltrirten Lösung beim Erkalten über Schwefelsäure concentrisch gruppirte Krystalle von grosser Unbeständigkeit aus. Man konnte nämlich unter dem Mikroskope verfolgen, wie die Krystalle durch Zusatz von absolutem Alkohol, Eisessig oder Wasser sich zersetzten und in amorphe, körnige Gebilde verwandelt wurden. Auch durch längeres Kochen mit Essigsäureanhydrid wird aus den Häminkrystallen keine Salzsäure abgespalten; eine Thatsache, welche zu Gunsten der Annahme spricht, dass in dem Hämin das Chlor nicht als Chlorwasserstoffsäure enthalten, sondern eher an Kohlenstoff oder Eisen gebunden ist. Unsere Untersuchungen über die Einwirkung des Anhydrids auf Hämin und Hämatin sind nicht abgeschlossen. Wir werden später darauf zurückkommen. Sie wurden unterbrochen durch eine krystallinische Proteinsubstanz, welche unsere ganze Aufmerksamkeit auf sich lenkte.

V. Das Parahämoglobin.

Die Frage, wie der farbige Bestandtheil der Hämoglobine — das Hämin — mit den Eiweissstoffen verbunden ist, hat uns von Anbeginn unserer Untersuchung beschäftigt. Zu ihrer Beantwortung waren zunächst mehrere Vorfragen zu erledigen.

Von der Thatsache ausgehend, dass die Häminkrystalle leicht Doppelverbindungen eingehen, sahen wir uns veranlasst, zu untersuchen, ob die Hämoglobinkrystalle wirklich absolut chlorfrei sind. Nach Hüfner hat z. B. das Hundehämoglobin annähernd die Formel: $C_{636}H_{1025}N_{164}FeS_3O_{189}$. Wenn diese Hämoglobinkrystalle nur eine additionelle Verbindung von Hämin mit Eiweiss wären, etwa nach der Formel: $C_{32}H_{31}ClN_4FeO_3 + C_{604}H_{694}N_{180}S_3O_{186}$, so würde ein solches Molekül nur 0.26 pCt. Cl enthalten und eine so geringe Menge Chlor hätte von den früheren Analytikern entweder übersehen, oder als von Verunreinigung mit Chloralkalien herrührend angesehen werden können. Wir haben deshalb aus Pferdeblut nach dem üblichen Verfahren Hämoglobin dargestellt, in der Absicht, die Krystalle auf ihren Chlorgehalt zu prüfen. Frisches, defibrinirtes Pferdeblut wurde mit dem 9fachen Volumen 4procentiger Kochsalzlösung vermischt und die

nach ruhigem Stehen in flachen Schalen abgeschiedenen Blutkörperchen mit Wasser und Aether, bis die Lösung lackfarben geworden, geschüttelt. Die filtrirte, eiskalte Hämoglobinlösung mit $\frac{1}{4}$ ihres Volumens absoluten, ebenfalls auf 0° abgekühlten Alkohols versetzt, erstarrte in den meisten Fällen nach 12stündigem Stehen bei 0° zu einem Krystallbrei, der abfiltrirt, durch Liegen auf Fliesspapier von dem grössten Theil der Mutterlauge befreit, durch Umkrystallisiren aus lauwarmem Wasser gereinigt wurde. Dieses nur einmal umkrystallisirte, zwischen Fliesspapier sorgfältig abgepresste, sodann über Schwefelsäure und hierauf bei 115° getrocknete Hämoglobin enthielt 0.16 pCt. Cl. Zweimal umkrystallisirtes und dann mit 25 procentigem Alkohol gut ausgewaschenes Hämoglobin war absolut chlorfrei, so dass 7.3414 g der Substanz mit Salpetersäure und etwas salpetersaurem Silber zunächst in einem Erlenmeyer'schen Kolben gekocht, sodann in einer Schale zur Trockne verdunstet und wieder mit Wasser aufgenommen, nicht die geringste Trübung zeigte. Bei diesen Prüfungen auf den Chlorgehalt sahen wir, dass trocknes Hämoglobin von concentrirter Salpetersäure sehr heftig angegriffen und unter Entwicklung rother Dämpfe rasch gelöst wird. Wird das Kochen der salpetersauren Lösung so lange fortgesetzt, bis keine rothen Dämpfe mehr entweichen, so krystallisirt in den meisten Fällen beim Erkalten noch immer eine organische, sehr beständige Säure aus, die wir Anfangs als ein specifisches Oxydationsprodukt des mit dem Hämin verbundenen Eiweissstoffes angesehen haben. Wir haben deshalb das von unserer Häminbereitung rückständige, mit angesäuertem Amylalkohol extrahirte und fast farblose Eiweiss — das Globin — zunächst scharf getrocknet und sodann in Portionen von je 50 g mit Salpetersäure oxydirt. Wir haben so in grösseren Mengen diese Säure dargestellt und sie als Paranitrobenzoësäure erkannt. Gleichzeitig fanden wir aber, dass nicht allein das Globin, sondern auch andere Eiweissstoffe, wie z. B. das Casein und das Serumweiß mit Salpetersäure oxydirt, ebenfalls Paranitrobenzoësäure liefern. Zu ihrer Darstellung aus den Proteïnsubstanzen hat sich folgendes Verfahren als das zweckmässigste erwiesen: Ein Gewichtstheil der gepulverten Eiweisssubstanz wird mit dem fünffachen Gewichte rauchender Salpetersäure in einem geräumigen Kolben übergossen und die eintretende, sehr stürmische Reaction durch häufiges Umrühren gemässigt. Hat die Entwicklung rother Dämpfe nachgelassen, so wird die Flüssigkeit auf dem Wasserbade so weit eingedampft, bis die meiste Salpetersäure entfernt ist. Der hinterbleibende Rückstand besteht vorwiegend aus Oxalsäure, neben der Paranitrobenzoësäure, welche durch kaltes Wasser von einander getrennt werden. Die Paranitrobenzoësäure, welche ungelöst zurückbleibt, wird durch mehrfaches Umkrystallisiren aus heissem Wasser unter Zusatz von Thierkohle in farblosen Blättchen erhalten. Die Elementar-

analyse der über Schwefelsäure getrockneten Säure ergab 50.03 pCt. C, 3.19 pCt. H und 8.19 pCt. N. Die Formel $C_6H_4(NO_2)CO_2H$ verlangt 50.29 pCt. C, 2.99 pCt. H und 8.39 N. Im Reagenzröhrchen trocken erhitzt, verpuffte die Säure. Der Schmelzpunkt des analysirten Präparates lag bei 236° . Nach Widemann¹⁾ schmilzt die Paranitrobenzoësäure bei 238° . Wir erhielten zwischen 0.6—1.5 pCt. der rohen Säure von dem Gewichte des angewandten Eiweiss.

Die reinen, zweimal umkrystallisirten und sorgfältig mit 25 procentigem Alkohol ausgewaschenen Hämoglobinkrystalle des Pferdeblutes enthalten ferner keinen Phosphor. 6.4709 g des bei 115° getrockneten Hämoglobins, in einer Silberschaale mit Kali und Salpeter oxydirt, gaben nach dem Auflösen der Schmelze in Salzsäure mit Molybdänsäurelösung nach 12stündigem Stehen eine nicht wägbare Trübung. In zweimal umkrystallisirtem, jedoch nur wenig mit verdünntem Alkohol gewaschenem Präparate fanden wir nach gleicher Methode 0.26 pCt. P_2O_5 . Es geht hieraus sicher hervor, dass die Hämoglobine keine additionellen Verbindungen von salzsaurem, oder etwa phosphorsaurem Hämin mit Eiweissstoffen sind. Einen weiteren Beweis dafür, dass die farbige Gruppe ein untheilbarer Bestandtheil des Hämoglobinmoleküls ist, nämlich die Thatsache, dass das in Wasser lösliche Hämoglobin höchst wahrscheinlich durch Polymerisation in einen Körper von gleicher procentischer Zusammensetzung und total andern Eigenschaften übergeht, haben wir erst später gefunden.

Es war unsere Absicht, die bisherige Vorstellung, dass die Häminkrystalle ein salzsaures Salz des Hämatins sind, durch Darstellung der Salze mit anderen Säuren auf ihre Richtigkeit zu prüfen. Da aus den rothen Blutkörperchen oder Hämoglobinkrystallen, sobald dieselben nur Spuren von Chloralkalien enthalten, durch Kochen z. B. mit Oxalsäure nicht etwa oxalsaures Hämatin, sondern chlorhaltige und oxalsäurefreie Häminkrystalle entstehen²⁾, so musste zur Darstellung des schwefelsauren oder oxalsauren Salzes absolut chlorfreies Hämoglobin verwendet werden.

Wir haben daher aus Pferdeblut grössere Quantitäten zweimal umkrystallisirten vollkommen chlorfreien Hämoglobins dargestellt und beabsichtigten den lange mit verdünntem Alkohol ausgewaschenen Krystallbrei, nachdem er durch Liegen auf Fliesspapier von dem grössten Theil der Mutterlauge befreit war, durch Zusatz des etwa fünf-fachen Volumens 93 procentigen Alkohols zu coaguliren, ähnlich wie wir

¹⁾ Ann. Chem. Pharm. 193, 226.

²⁾ Vergl. unsere ausführlichen Mittheilungen im Archiv für exp. Path. u. Pharm. Bd. 18, S. 141, und Cazeuve, Sur l'hématine, Thèse pour le doctorat en médecine. Paris 1876, p. 58.

das früher mit dem Blutkörperchenbrei behufs weiterer Verarbeitung auf das Hämin gethan haben. Da die Masse nicht gleich zu einem Coagulum erstarrte, so setzten wir etwas mehr Alkohol hinzu und liessen sie 16 Stunden lang bei einer Temperatur von etwa 8° ruhig stehen. Die Flüssigkeit verwandelte sich allerdings nach dieser Zeit in eine feste Masse, die aber zu unserer Ueberraschung nicht etwa in Folge der Alkoholeinwirkung aus zersetztem, amorphem Hämoglobin, sondern aus ganz homogenen, rhombischen Prismen von der Farbe des Hämoglobins bestand. Die Krystalle wurden nun abfiltrirt und das absolut farblose Filtrat zeigte uns, dass nichts in Lösung gegangen war. Die Krystalle waren in der That nicht allein in Alkohol oder Aether, sondern auch in Wasser absolut unlöslich und wir erkannten sehr bald, dass wir es hier mit einer isomeren oder polymeren Modifikation der Blutkrystalle zu thun hatten. Wir wollen diese krystallinische Proteïnsubstanz mit dem Namen Parahämoglobin bezeichnen. Die überhaupt zuerst von Reichert beobachteten Blutkrystalle waren der Beschreibung nach jedenfalls nicht Hämoglobin, sondern Parahämoglobin. Auch Kunde erhielt durch Einwirkung von Alkohol auf Meerschweinchenhämoglobin offenbar ebenfalls das entsprechende Parahämoglobin. Doch wurde von Letzterem und den späteren Autoren diese Umwandlung, in der Voraussetzung, dass Alkohol Hämoglobin zersetze, nicht näher untersucht. Ist das Hämoglobin ganz rein, so enthält das daraus dargestellte Parahämoglobin keine körnigen Beimengungen und man kann unmöglich die gut ausgebildeten Krystalle als Pseudomorphosen bezeichnen. Wir werden in unserer ausführlichen Mittheilung noch einmal auf diesen Punkt zurückkommen. Jedenfalls ist diese Substanz durch ihre Entstehungsweise, Zusammensetzung und Eigenschaften nicht allein in der Chemie der Eiweisskörper, sondern der Chemie überhaupt, von hervorragendem Interesse. Wir haben die Krystalle zunächst auf Fliesspapier getrocknet, dann mit viel destillirtem Wasser geschüttelt, wobei sich das ganz unlösliche Parahämoglobin nach einigen Stunden ruhigen Stehens zu Boden setzte, so dass die darüber stehende Flüssigkeit ohne Verlust decantirt werden konnte. Der Bodensatz wurde auf ein Filter gebracht, mit Alkohol und sodann mit Aether sorgfältig ausgewaschen und über Schwefelsäure im Exsiccator getrocknet. Bei allen diesen Manipulationen veränderte das Parahämoglobin seine Krystallform nicht im mindesten, wovon man sich durch Vertheilen des Körpers in etwas Alkohol und mikroskopische Besichtigung des Präparates leicht überzeugen konnte. Sie lassen sich auch sehr gut pulvern und geben dann ein hell ziegelrothes Pulver von sammetartigem Aussehen, das über Schwefelsäure getrocknet im Luftbade bei 115—120° noch 1.88 pCt. am Gewichte verliert.

Nach den Bestimmungen Hufner's¹⁾ verliert das über Schwefelsäure getrocknete Pferdehämoglobin bei 115° 3.9 pCt. Wasser, demnach genau doppelt so viel als unser Präparat.

Die Elementaranalysen des zunächst über Schwefelsäure, sodann bei 115—120° getrockneten Parahämoglobins aus Pferdeblut ergaben uns folgende Zahlen: Wir stellen sie der leichteren Uebersicht halber mit den Analysen des Pferdehämoglobins von Kossel, Otto und Bücheler zusammen:

	Oxyhämoglobin.			Para-
	Kossel	Otto	Bücheler	hämoglobin.
	pCt.	pCt.	pCt.	Nencki u. Sieber
				pCt.
Kohlenstoff . . .	54.87	54.76	54.40	54.91 u. 54.70
Wasserstoff . . .	6.97	7.03	7.20	7.04 u. 6.97
Stickstoff	17.31	17.28	17.61	17.04 u. 17.08
Schwefel	0.65	0.67	0.65	0.68 —
Eisen	0.47	0.45	0.47	0.468 u. 0.467
Sauerstoff	19.73	19.81	19.67	19.86
	100.00	100.00	100.00	100.00

Die Kohlenstoff- und Wasserstoffbestimmung geschah durch Verbrennung mit chromsaurem Blei im offenen Rohre im Sauerstoffstrom. Der Stickstoff wurde aus dem Volumen bestimmt, Schwefel durch Schmelzen mit Kali und Salpeter, das Eisen durch Veraschung grösserer Quantitäten der Substanz, Lösen der Asche in Salzsäure, Fällen mit Ammoniak und Wägung nach vorausgehendem Glühen als Eisenoxyd. Wir werden übrigens an anderem Orte ausführlich die Analysen sowohl des Parahämoglobins, wie der vorhergehenden Präparate mittheilen.

Die geringen Differenzen in der procentischen Zusammensetzung des Hämoglobins und des Parahämoglobins liegen innerhalb der Fehlergrenzen und es ist zu erwarten, dass die Parahämoglobine anderer Blutarten die gleiche procentische Zusammensetzung wie die zugehörigen Hämoglobine haben werden.

Von verdünnten, fixen Alkalien wird das Parahämoglobin beim Umschütteln gelöst. Die braunrothe, alkalische Lösung zeigt im Spectrum einen Absorbtiionsstreifen im Roth. Säuren erzeugen in der

¹⁾ Zeitschr. f. phys. Chemie, Bd. 8, S. 360.

alkalischen Lösung einen braunen amorphen Niederschlag. Durch verdünnte wässrige Mineralsäuren wird das Parahämoglobin, wenn auch viel langsamer, zersetzt. In alkoholischem Ammoniak halten sie sich dagegen lange unverändert. Mit angesäuertem Alkohol können die Krystalle sogar längere Zeit gekocht werden, ohne sich zu verändern. Sie eignen sich deshalb nicht zur Häminbereitung. Als wir in der Absicht, daraus schwefelsaures Hämin darzustellen, die Krystalle mit Amylalkohol zum Sieden erhitzen und nach dem Ansäuern mit etwas Schwefelsäure noch 10 Minuten lang kochten, blieb fast alles Parahämoglobin unverändert und aus der schwach gefärbten, heiss filtrirten Lösung schieden sich nur wenige amorphe Flocken und Körner aus. Das gleiche Resultat erhielten wir, als wir aus den Krystallen das Hämin mit Amylalkohol und wenig Salzsäure extrahiren wollten. Es ging zwar mehr Hämin in Lösung über, das sich aber ebenfalls beim Erkalten der Lösung amorph abgeschieden hat. Da das reine Oxyhämoglobin, wie wir bei wiederholten Darstellungen gesehen haben, quantitativ in das Parahämoglobin übergeht und das letztere in trockenem Zustande bei gewöhnlicher Temperatur beständig ist und die Krystallform nicht ändert, im Gegensatz zu den Oxyhämoglobinkrystallen, die sich nur bei niedriger Temperatur unverändert halten, so eignet sich das Parahämoglobin ganz besonders zu Versuchen und Demonstrationen auch in der wärmeren Jahreszeit.

Der Uebergang des in Wasser leicht löslichen Hämoglobins in das Parahämoglobin ist durchaus analog der Umwandlung der löslichen Eiweissstoffe in ihre unlöslichen Modificationen durch die Hitze, oder Alkoholzusatz zu ihren wässrigen Lösungen. Andererseits lässt sich dieser Vorgang wie bei den Aldehyden, oder den Cyanverbindungen nur als Folge einer Atomverschiebung im Molekül auffassen. Diese Atomverschiebung kann entweder nur eine intramolekuläre oder auch eine mit Polymerisation des Moleküls verbundene sein. Dass ein solches Riesenmolekül, wie das Hämoglobin, sich polymerisire, hat für einen physiologischen Chemiker, der bei jedem Gewebe des Thierkörpers höchst complicirt zusammengesetzten Verbindungen begegnet, nichts Befremdendes. Von wesentlicher Bedeutung ist es, dass so oft aus dem Thierkörper chemische Verbindungen möglichst unverändert bei niederer Temperatur isolirt werden — wir erinnern nur an das Flüssigbleiben des Blutplasma bei 0°, an das Oxyhämoglobin, Myosin, Protagon u. dgl. in. —, sie sehr leicht veränderlich und zersetzbar sind.

Loew und Bokorny haben mit Recht behauptet, dass das lebendige protoplasmatische Eiweiss aldehydische Struktur haben müsse und sie haben nachgewiesen, dass die Reduktionsfähigkeit für ammoniakalische Silberlösung nur diesem Eiweiss zukommt. Die Polymerisation des bei niederer Temperatur und ohne alle Angriffe aus den

rothen Blutzellen isolirten Hämoglobins, ist ein weiterer Beweis dafür, dass der molekulare Bau der lebendigen protoplasmatischen Proteinsubstanzen, ähnlich wie der der Aldehyde, labile Gruppen enthalten muss. Wir haben schon früher gezeigt, dass der wichtigste Prozess des thierischen Lebens, nämlich die physiologische Oxydation, durch dieses labile, protoplasmatische Eiweiss bewirkt wird und dass alle die Protoplasmagifte, wie Alkohol, Aether, Chloroform, Metallsalze u. dgl. m., welche die Reduktionsfähigkeit des protoplasmatischen Eiweisses für ammoniakalische Silberlösungen aufheben, dem Organismus einverleibt, die Menge des in den Geweben auftretenden atomistischen Sauerstoffes wesentlich herabsetzen. Vom chemischen Gesichtspunkte aus beruht das Absterben der Gewebe und Aufhören ihrer Funktionen auf einer Atomverschiebung im Molekül des protoplasmatischen Eiweiss und Uebergang in den stabilen Zustand.

Seit den mustergültigen Untersuchungen Schützenberger's wissen wir, dass durch einfache Hydratation das todte Eiweissmolekül vollständig in nur krystalloide Produkte von einfachem molekularem Bau — sie sind fast alle künstlich dargestellt worden — zerlegt werden kann. Mit der Arbeit Schützenberger's hat die analytische Chemie der Eiweisskörper ihren vorläufigen Abschluss gefunden. Wir zweifeln nicht, dass durch Hydratationen und Oxydationen aus den Eiweissstoffen noch verschiedene intermediäre Spaltungsprodukte von hohem Interesse für den thierischen Stoffwechsel isolirt werden. Aber der wesentliche Fortschritt zur Aufklärung der gemeiniglich mit dem Worte »Leben« bezeichneten Erscheinungen ist nur zu erwarten von der Erforschung des Modus, wie diese Spaltungsprodukte mit einander zu den labilen Eiweissmolekülen verkettet sind, wie sie in den lebendigen Zellen enthalten sind. Die Schwierigkeiten, die sich dieser Richtung in der Chemie der Eiweisskörper entgegenstellen, sind nicht unüberwindlich. Die Untersuchungsmethoden werden immer mannichfaltiger und vollkommener und von wesentlichem Vortheil ist hierbei der Umstand, dass allem Anschein nach die meisten dieser labilen Eiweisssubstanzen bei Temperaturen von 0° relativ beständig sind.

Bern, im Februar 1885.