

421. Br. Lachowicz und M. Nencki: Ueber das Parahämoglobin.

(Eingegangen am 5. August.)

Im 4. Hefte der diesjährigen Berichte, S. 392, hat der Eine von uns gemeinschaftlich mit N. Sieber die Beobachtung mitgeteilt, dass Oxyhämoglobinkrystalle mehrere Stunden mit starkem Alkohol stehen gelassen in eine, in Wasser unlösliche, ebenfalls krystallinische Modification von gleicher procentischer Zusammensetzung übergehen. Die Entstehung dieses Körpers — des Parahämoglobins — ist nach der dort ausgesprochenen Ansicht, die Folge einer Atomverschiebung im Molekül des Oxyhämoglobins oder dessen Polymerisation. Die Resultate der weiteren Untersuchung des Parahämoglobins sind der Gegenstand der vorliegenden Mittheilung.

Wir haben zunächst grössere Quantitäten des Körpers aus Pferdeblut dargestellt. Reines, zweimal aus Wasser umkrystallirtes und mit 25 pCt. Alkohol gut ausgewaschenes Oxyhämoglobin wurde mit etwa dem 10fachen Gewichte absoluten Alkohols übergossen und mehrere Stunden im Eisschranke stehen gelassen. Nach Verlauf dieser Zeit ist das Oxyhämoglobin in die Paramodification übergegangen, d. h. in Wasser vollkommen unlöslich geworden. Die Krystalle wurden ein wenig dunkler und bestanden bei der mikroskopischen Besichtigung aus kurzen, dicken Säulen, allem Anscheine nach, dem quadratischen Systeme angehörend. Die meisten sind gut ausgebildet und nur einzelne waren etwas verbogen. Die Krystalle sind doppelbrechend. Bringt man trockenes oder mit absolutem Alkohol befeuchtetes Parahämoglobin auf ein Objectglas, so leuchten die Krystalle im Polarisationsmikroskop bei gekreuzten Nicols. Sie lassen rothe und grüne Lichtstrahlen durch. Das Leuchten ist aber schwächer als bei den Oxyhämoglobinkrystallen. Suspendirt man die in Wasser unlöslichen Krystalle und schüttelt kräftig in einem Reagenzröhrchen, so dass sie gleichmässig in der Flüssigkeit vertheilt sind, so sieht man im Spectralapparate bei guter Beleuchtung deutlich die beiden Streifen des Oxyhämoglobins. Viel besser kann man die beiden Streifen an einzelnen grossen Parahämoglobinkrystallen im Mikrospectralapparate sehen. Wir haben sie mit einem Zeiss'schen Mikrospectroskop an mehr als vier Monate alten Parahämoglobinkrystallen sehr gut sehen können. Die beiden Streifen sind nur, auch bei frisch dargestellten Parahämoglobin, nicht so scharf wie bei Oxyhämoglobin, mehr verwaschen.

Von besonderem Interesse ist das Verhalten des Parahämoglobins gegen ammoniakhaltigen Alkohol. Dass durch wässrige Mineralsäuren

oder Alkalien Parahämoglobin, wenn auch langsam, in Hämatin und Eiweiss zerlegt werde, wurde schon früher angegeben. Das Verhalten der Krystalle gegen alkoholisches Ammoniak, und zwar bei Ausschluss von Luft und Feuchtigkeit, ist dagegen ein ganz anderes, indem sie sich daraus umkrystallisiren lassen. Wird Parahämoglobin mit absolutem Alkohol, der bei 0° mit Ammoniak gesättigt wurde, geschüttelt, und zwar in einer verkorkten Flasche oder Reagenzrohr, so dass Luft nicht hinzutreten kann, so geht ein geringer Theil mit schön rother Farbe in Lösung, welche in dünner Schicht im Spectrum nur einen Streifen ziemlich genau in der Mitte zwischen D und E zeigt. Diese Lösung bleibt tagelang unverändert. Filtrirt man nun dieselbe in ein grosses flaches Uhrglas, so dass Alkohol und Ammoniak sich rasch verflüchtigen können, so setzt sich am Boden des Uhrglases ein Theil des Parahämoglobins als schwerer krystallinischer Niederschlag ab, welcher dann unter dem Mikroskope als kurze, vierseitige Prismen ganz von dem Aussehen und Farbe des ursprünglichen Parahämoglobins erscheint. Die Krystalle sind doppelbrechend und durchsichtiger als die ursprünglichen. Nach kurzer Zeit zerfallen auch diese an der Luft in Eiweiss und Hämatin. Obgleich nun das Umkrystallisiren des Parahämoglobins auf diese Weise jedesmal gelingt, so ist es begreiflich, dass wir bei der Zersetzbarkeit der Krystalle in der alkalischen Mutterlauge nur so viel davon isoliren konnten, um ihre Eigenschaften resp. ihre Eiweissnatur zu constatiren. Nach monatelangem Stehen in verkorkten Flaschen nimmt die Parahämoglobinlösung einen Stich in's Bläuliche an und an Stelle des einen Streifens sieht man dann im Spectrum zwei scharf begrenzte, ähnlich den Lösungen des Oxy- oder Kohlenoxydhämoglobins. Ihre Lage ist nur mehr nach dem Violett zu verschoben. Sobald die ammoniakalisch alkoholische Parahämoglobinlösung statt des einen die zwei Absorptionsstreifen zeigt, werden beim Verdunsten derselben keine Krystalle mehr erhalten. Auch dieser Versuch wurde öfter und immer mit gleichem Resultate wiederholt. Es ist sehr wahrscheinlich, dass hier die gleiche Erscheinung vorliegt, wie sie schon früher bei ganz anderer Versuchsanordnung Hoppe-Seyler¹⁾ beobachtete. Er beschreibt sie folgendermaassen: »Verdünnte Natronlauge mit Blutfarbstofflösung nach Entfernung des Sauerstoffs durch anhaltenden Wasserstoffstrom im zugeschmolzenen Kugelapparate gemischt, giebt eine prächtig gefärbte Flüssigkeit, welche auch bei sehr grosser Verdünnung nur einen Streifen ziemlich genau in der Mitte zwischen der Liniengruppe D und E im Spectrum hervorrufft. Die Mischung blieb ziemlich unverändert, als sie einige Zeit auf 90° im Wasserbade erhitzt war. Nur wurde sie etwas trübe und weniger schön gefärbt. Nach einiger Zeit zeigten sich

¹⁾ Dossen med.-chem. Untersuchungen. Berlin 1866—67. S. 573.

bei der Spectraluntersuchung zwei Streifen, nämlich die beiden des Stokes'schen reducirten Hämatins, von denen der erste sehr scharfe, dunkle Streif mit dem obigen in der Mitte zwischen D und E beobachteten völlig identisch ist.«

Bei dem Zerfall des Parahämoglobins in Eiweiss und Hämin ist nicht allein Sauerstoff, sondern auch Feuchtigkeit betheiligt, wovon wir uns durch folgende Versuche überzeugten.

In einen, mit Quecksilber gefüllten Eudiometer wurden 9.5 ccm (auf 0° und 760 mm Barometerstand reducirt) trockenes Sauerstoffgas eingeführt; sodann in einem kleinen Gläschen, in welchem durch ammoniakhaltigen Alkohol alle Luft ausgetrieben wurde, ca. 0.5 g Parahämoglobinkristalle in den Sauerstoffraum hineingeschoben und schliesslich, mittelst einer gebogenen Pipette, 25 ccm stark ammoniakhaltiger absoluter Alkohol zugesetzt. Nach einiger Zeit löste sich ein Theil der Krystalle im Alkohol mit rother Farbe auf und die Lösung zeigte, spectroscopisch untersucht, nur den einen breiten Streifen zwischen D und E. So blieb die Lösung zwei Tage lang, während welcher Zeit sie öfter mit Sauerstoff geschüttelt wurde, und ihr Spectrum zeigte keine Spur eines Absorptionsstreifens im Roth. Das Eudiometer wurde hierauf sammt seinem Inhalt in Wasser gebracht und sofort nach Zutritt des letzteren änderte sich die Farbe der Lösung. Sie wurde braunroth, das Absorptionsband zwischen D und E verschwand und statt dessen wurde der Hämatinstreifen im Roth sichtbar. Ob Sauerstoff absorbirt wurde, konnte in diesem Versuche wegen der Beimengung von Ammoniak nicht ermittelt werden. Dass dies aber der Fall ist, ergab die Wiederholung des Versuches mit folgender Modification: 0.3612 g Parahämoglobin wurden in einem Gläschen in ein mit Sauerstoff und Quecksilber gefülltes Eudiometer gebracht, und nachdem die zur Berechnung des Sauerstoffvolumens nöthigen Zahlen notirt wurden, liessen wir mittelst gebogener Pipette 55 ccm 5 pCt. Kalilauge hinzu. Die Auflösung des Parahämoglobins in Alkali geschieht sehr langsam, obgleich wir sie durch häufiges Schütteln unterstützten. Erst nach viertägigem Stehen ist alles in Lösung gegangen. Das Eudiometer wurde jetzt in Wasser überbracht und das rückständige Sauerstoffvolumen abgelesen. Das Resultat dieses Versuches war folgendes: Ursprüngliches Sauerstoffvolum auf 0° und 760 mm Barometerstand reducirt = 36.29 ccm. Nach Zusatz von Kalilauge und vollkommener Auflösung der Krystalle das Volum des rückständigen Sauerstoffs = 20.83 ccm. Bei der Auflösung daher von 0.3612 g über SO_4H_2 getrockneten Parahämoglobins wurden absorbirt 15.36 ccm = 0.021969 g Sauerstoff oder 6.08 pCt. Es ist dies bis jetzt der einzige von uns angestellte quantitative Versuch und bedarf daher der Wiederholung. Wir werden auch prüfen, ob beim Uebergang des Oxyhämoglobins in Methämoglobin, welcher letztere Körper

aller Wahrscheinlichkeit nach eine Verbindung von Hämin mit Eiweiss ist, nicht ebenfalls atmosphärischer Sauerstoff absorbirt werde.

In der Erwartung, dass vielleicht das Parahämoglobin leichter darin löslich sein wird, haben wir statt Aethyl- Methylalkohol angewendet. Doch war die Löslichkeit in beiden Fällen ziemlich die gleiche, so dass wir beim Verdunsten der filtrirten Lösung in ammoniakalischem Methylalkohol nicht mehr Parahämoglobinkrystalle erhielten, als wie aus ammoniakalischem Aethylalkohol.

Lässt man Parahämoglobinkrystalle einige Zeit im Wasser liegen, so quellen sie darin auf und verlieren ihr Doppelbrechungsvermögen.

Im Polarisationsmikroskope bei gekreuzten Nicols bleiben die Krystalle ganz dunkel. Nimmt man aber das Deckgläschen von dem Präparate weg und lässt das Wasser verdunsten, so tritt die Erscheinung der Doppelbrechung deutlich hervor. Dieses Spiel kann am gleichen Präparate öfter wiederholt werden. Das Aufquellen ist die einzige Veränderung, welche Wasser an den Parahämoglobinkrystallen hervorruft. Sie können jedoch wochenlang darin liegen, ohne die Krystallform zu verlieren.

Die Ueberführung des Oxyhämoglobins in die unlösliche Modification legte uns die Frage nahe, wie sich das Kohlenoxydhämoglobin und das Methämoglobin gegen Alkohol verhalten würden. Wir haben zu dem Zwecke zunächst Kohlenoxydhämoglobin aus Pferdeblut dargestellt. Die zweimal aus lauwarmem Wasser umkrystallisirten Krystalle, durch Liegen auf Fliesspapier von dem grössten Theil der Mutterlauge befreit, wurden einerseits mit absolutem Alkohol, andererseits mit Aether übergossen und längere Zeit stehen gelassen. Es gelang uns aber nicht, daraus die entsprechende Paraverbindung zu erhalten. In Alkohol und Aether halten sich die Krystalle monatelang unverändert und behalten ihr Doppelbrechungsvermögen. Lässt man sie aber trocken an der Luft liegen, so schrumpfen sie zusammen und werden zu einer braunen, amorphen Masse. In Wasser suspendirt, quellen sie auf und sind in wenigen Minuten ebenfalls in eine amorphe Masse verwandelt. Aehnlich verhält sich das Methämoglobin, nur ist hier der Uebergang in den amorphen Zustand ein fast augenblicklicher. Hüfner hat vor Kurzem gefunden, dass das Methämoglobin aus Schweineblut krystallinisch erhältlich sei. Nach Hüfner's Vorschrift dargestellte Methämoglobinkrystalle lassen sich ebenfalls in Alkohol und Aether unverändert aufbewahren. In Berührung mit Wasser gehen sie sofort in den amorphen Zustand über.

H. Struve¹⁾, welcher schon früher constatirte, dass die Oxyhämoglobinkrystalle durch Alkohol ohne Veränderung ihrer Form in

¹⁾ Mémoires de l'académie impériale des sciences de St. Pétersbourg. VII. série 1884. S. 32.

Wasser unlöslich waren, giebt an, dass man den Parahämoglobinkrystallen durch Behandlung mit ammoniakalischem Spiritus, Eisessig oder concentrirter Schwefelsäure den Farbstoff entziehen kann, ohne dass sie ihre Krystallform verlieren. Ebenso werden die durch Alkohol in den unlöslichen Zustand übergeführten Blutkrystalle durch Schütteln mit Chlorwasser rasch und vollständig entfärbt, wobei durchaus keine Veränderung der Krystalle zu bemerken ist. Auf Grund dieser seiner Beobachtung spricht H. Struve die Ansicht aus: »dass die Hämoglobinkrystalle als Krystalle einer farblosen, eiweissartigen Substanz aufzufassen sind, die bisher noch nicht im reinen Zustande dargestellt werden konnten, sondern immer von kleinen, aber überaus gleichen Quantitäten eines oder verschiedener Blutfarbstoffe mechanisch gefärbt sind.«

Diese Ansicht ist schon viel früher von Lehmann vertreten worden. Aus unseren oben mitgetheilten Versuchen geht hervor, dass bei der Abspaltung des Farbstoffes aus den Blutkrystallen Sauerstoff und Wasser in Reaction treten. Diese Thatsache spricht nicht zu Gunsten der Auffassung von Struve. Allerdings ist aus unseren Versuchen nicht zu ersehen, welcher von den beiden Bestandtheilen des Parahämoglobins — der Farbstoff oder das Eiweiss — den Sauerstoff absorbiert. Nach unseren bisherigen Kenntnissen ist die Annahme wahrscheinlicher, dass der Farbstoff oxydirt werde. Es bleibt aber dabei nicht ausgeschlossen, dass auch der eiweissartige Bestandtheil ebenfalls Sauerstoff aufnehme. Die bemerkenswerthen Beobachtungen Struve's bedürfen weiterer Untersuchungen. Vielleicht dass seine durch Chlorwasser farblos gewordenen Hämoglobinkrystalle aus wasserfreiem, ammoniakalischem Alkohol sich ebenfalls umkrystallisiren lassen. Die Angabe des Hrn. v. Stein¹⁾, dass durch Schütteln von Blut mit Thierkohle aus der farblosen, filtrirten Lösung, farblose Hämoglobinkrystalle erhältlich seien, konnten wir nicht bestätigen. Reine Oxyhämoglobinkrystalle wurden in lauwarmem Wasser gelöst, mit wenig Thierkohle geschüttelt und filtrirt. Das braunrothe Filtrat zeigte im Spectrum den Methämoglobinstreifen und aus der Lösung schied sich nach Zusatz von Alkohol und ruhigem Stehen im Eisschrank am folgenden Tage Krystalle ab, welche sich bei genauer Untersuchung als Methämoglobin erwiesen. Der Grund hiervon kann wohl darin liegen, dass die Thierkohle Spuren von einem Ferricyanalsalze enthielt, wodurch das Oxyhämoglobin in Methämoglobin verwandelt wurde. Die Thierkohle reagirte völlig neutral und es ist nicht ausgeschlossen, dass die Porosität der Kohle diese Veränderung verursachte. Als wir die gleiche Oxyhämoglobinlösung durch eine dicke Schicht von Thierkohle filtrirten, blieb alles Hämoglobin auf dem Filter. Das Filtrat

¹⁾ Virchow's Archiv, Bd. 97, S. 483.

war zwar farblos, enthielt aber nur Spuren durch Essigsäure und Ferrocyankalium nachweisbaren Eiweissstoffes. Es steht dies in Uebereinstimmung mit den Beobachtungen von Krysinski¹⁾, wonach Hämoglobin oder Eiweiss durch Schütteln mit Thierkohle aus wässerigen Lösungen vollkommen entfernt werden kann.

Bern, im Juli 1885.

422. Emil Fischer und Carl Bülow: Ueber das Benzoylacetone²⁾.

[Mittheilung aus dem chem. Laboratorium der Universität Erlangen.]

(Eingegangen am 5. August.)

Die Darstellung des Benzoylacetons aus dem Benzoylacetessigäther ist eine Operation, welche bei geringen Abänderungen bezüglich der Ausbeute sehr verschiedene Resultate liefert.

Nach mannichfachen Versuchen sind wir bei folgendem, recht ergiebigen Verfahren stehen geblieben, dessen ausführliche Beschreibung wir aus dem angeführten Grunde für nöthig halten. Zur Bereitung des Benzoylacetessigäthers³⁾, dessen Reinheit von wesentlichem Einfluss auf den Verlauf der Verseifung ist, löst man Acetessigäther in der 6—7fachen Menge trockenen Aethers, fügt dann die für 1 Atom berechnete Menge Natrium, am besten in Form von feinem Draht hinzu und lässt das Gemisch am Rückflusskühler unter zeitweisem Umschütteln so lange stehen, bis das Metall in Natracetessigäther umgewandelt ist. Jetzt lässt man zu der breiartigen Masse das Benzoylchlorid, welches mit dem gleichen Volumen Aether verdünnt ist, langsam hinzufliessen. Die Operation kann mit beliebig grossen Mengen ausgeführt werden.

Sobald der Geruch des Chlorids verschwunden ist, versetzt man die Masse mit Wasser zur Lösung des Chlornatriums und verdampft die abgehobene ätherische Schicht auf dem Wasserbade. Der zurückbleibende Benzoylacetessigäther wird zur Reinigung zweimal in der 1½fachen Menge Alkohol gelöst, mit Wasser wieder ausgefällt und

¹⁾ Ueber Suspension und Lösung. Sitzungsberichte der Jenaischen Gesellschaft für Medicin und Naturwissenschaft. Jahrg. 1884.

²⁾ Vergl. E. Fischer und H. Kuzel, diese Berichte XVI, 2239.

³⁾ Vergl. Bonné, Ann. Chem. Pharm. 147, 1.