

## Ueber die Grösse des Hämoglobinmolecüls.

Von

**Dr. O. Zinoffsky.**

(Der Redaction zugegangen am 29. Juli 1885.)

Die bisherigen Analysen des Hämoglobins haben zu dem überraschenden Resultat geführt, dass diese Verbindung auf ein Atom Eisen 600 Atome Kohlenstoff, somit wenigstens 600 Atome Kohlenstoff in einem Molecül enthält. Das Hämoglobin ist also unvergleichlich viel complicirter als alle uns bisher bekannt gewordenen chemischen Verbindungen. Die angeführte Grösse aber ist eine Minimalzahl. Sie ist aus der Voraussetzung berechnet worden, dass das Hämoglobin nur ein Atom Eisen im Molecül enthält. Diese Voraussetzung aber ist widerlegt, sobald es sich herausstellt, dass zwischen dem Eisengehalt und dem Gehalte an einem anderen Elemente kein einfaches Aequivalentverhältniss besteht. Sollte es sich zeigen, dass auf ein Atom Eisen nicht eine ganze Zahl von Schwefelatomen kommt, sondern eine ganze Zahl und ein Bruch, so müsste die Grösse des ganzen Hämoglobin-Molecüls mit dem Nenner dieses Bruches multiplicirt werden. Wir würden also gezwungen werden, uns dieses Molecül noch weit grösser zu denken. Es ist daher von hohem Interesse, den Eisen- und Schwefelgehalt des Hämoglobins genau festzustellen. Wir würden dadurch einen Einblick in die Grösse und Complicirtheit der Eiweissmolecüle gewinnen. Die bisherigen Analysen des Hämoglobins haben in Bezug auf den Eisen- und Schwefelgehalt sehr abweichende Resultate ergeben und kein einfaches Verhältniss zwischen beiden Elementen.

Ja es ist auf Grund dieser Thatsache sogar die Vermuthung ausgesprochen worden, das Hämoglobin sei überhaupt kein chemisches Individuum, das eisenhaltige Hämatin sei nur mechanisch von dem krystallisirenden Eiweisskörper mitgerissen. <sup>1)</sup>

Sollte durch genauere Analyse das einfache Aequivalentverhältniss zwischen Eisen und Schwefel sich feststellen lassen, so wäre damit dieses Bedenken widerlegt und die chemische Individualität des Hämoglobins bewiesen. Auch aus diesem Grunde ist eine genaue Bestimmung dieser Elemente von Wichtigkeit.

In der folgenden Tabelle stelle ich die Resultate der bisherigen Bestimmungen zusammen:

Autoren.	S %	Fe %	Auf 1 Atom Fe kommen Sn. Mittel- werth.	Menge des eingäscherten Hämoglobins		
				für S.	für Fe.	
Hundeblut. {	Schmidt . . .	0,66	0,43	2,686	1,6637	1,6637
	Hoppe Seyler .	0,375	0,45	1,60	1,9972	1,7062
	» . . .	0,448	0,42	—	1,4933	2,5122
	» . . .	0,359	0,42	—	1,8915	4,7855
Pferdeblut. {	Bücheler . . .	0,6532	0,46370	—	1,8481	} 0,9430
	» . . .	0,6443	0,47238	2,427	1,8132	
	» . . .	—	0,46720	—	—	—
	Kossel . . .	0,65	0,47	2,42	—	—
Otto . . . . .	0,67	0,45	2,60	2,4876	4,0866	

Diese Verhältnisse waren es, welche an zwei Möglichkeiten denken liessen:

1. Konnte das von den genannten Autoren analysirte Präparat unrein gewesen sein.

<sup>1)</sup> Lehmann. Lehrbuch der physiologischen Chemie, 1850 II. S. 175. Struve (Erdmann's Zeitschrift für practische Chemie, 1884. Heft 7 u. 8) stellte, indem er den in Alcohol gehärteten Hämoglobin-crystallen durch ammoniakhaltigen Alcohol einen eisenhaltigen Stoff (das Hämatin) entzog, fast farblose Krystalle dar, die diese Behauptung unterstützen sollten. Weder er, noch auch ich, der ich diesen Versuch nachgemacht habe, konnten jedoch diese Krystalle umkrystallisiren.

2. Könnten die analytischen Methoden Fehlerquellen darbieten und die Mengen der angewandten Substanz zu einer genauen Bestimmung zu gering sein.

Ich stellte mir daher die Aufgabe:

1. Ein Präparat darzustellen, das von Jedermann als rein anerkannt werden musste.

2. Nach sorgfältiger Prüfung der zu Gebote stehenden analytischen Methoden dieses Präparat zu analysiren.

### Darstellung des Hämoglobins.

Hoppe-Seyler schreibt vor<sup>1)</sup>: Zur Darstellung des Hämoglobins zunächst die Blutkörperchen vom Serum zu trennen. Zu diesem Zwecke wird das defibrinirte Blut durchgeseiht eine Zeit lang stehen gelassen, damit die Blutkörperchen sich im Serum senken können. Die über den Blutkörperchen stehende Flüssigkeit giesst man ab und versetzt den Blutkörperbrei mit einer Kochsalzlösung, welche ihn vom Serum-eiweiss befreien soll; durch Abstellenlassen und Decantiren entfernt man den grössten Theil der Chlornatriumlösung. Hoppe-Seyler fügt aber auch in derselben Arbeit hinzu, dass «die Reinigung der Blutkörper auf diese Art keine leichte sei. Die sich im Serum leicht senkenden Blutkörperchen senken sich in der Kochsalzlösung sehr schwer.» In der That brauchen sie eine lange Zeit, um bis zum Boden des Gefässes zu gelangen; es dauert 3 bis 5 Tage, bis die Senkung eine einigermaßen vollständige ist, nach 3 Tagen aber nehmen die Blutkörperchen, trotzdem dass man in der Kälte operirt, eine venöse Farbe an und es tritt die Gefahr der Zersetzung ein. Es erscheint daher wünschenswerth, das Auswaschen der Blutkörperchen zu umgehen. Es liesse sich ja annehmen, dass ein Theil des Serum-eiweisses in dem Blutkörperbrei zurückbleiben könne, ohne der, später zu erfolgenden, Zerlegung der Blutkörperchen, der Krystallisation des Oxy-Hämo-

<sup>1)</sup> Hoppe-Seyler, medicin.-chemische Untersuchungen, Heft II. S. 170. Berlin 1867.

globins und der Reinigung der Krystalle hinderlich zu sein. Darauf musste der Versuch antworten.

1 Volumen Serum, 3 Vol. Wasser und 1 Vol. Alcohol gemischt trübten sich kaum. Es blieben also die Serumbestandtheile gelöst. Daraus folgere ich, dass man den Blutkörperbrei, ohne zu waschen, in Arbeit nehmen kann. Oxy-Hämoglobinkrystalle und Serumbestandtheile können dann später durch wiederholte Krystallisation getrennt werden. Wie sich später zeigen wird, beeinträchtigt diese Modification der Vorschrift die Reinheit des Präparates nicht.

Es folgt nun die Trennung des Hämoglobins vom Stroma; auch hier mussten Versuche den richtigen Weg zeigen. Verdünnt man den Blutkörperbrei mit dem 3-fachen Volumen destillirten Wassers und erwärmt auf 35° C., so wird die Flüssigkeit lackfarben, eine Indication, dass das Oxy-Hämoglobin sich gelöst hat; die Stromata mussten jetzt als farblose Scheiben in der Flüssigkeit suspendirt sein.

Da man nun weiss, dass diese Scheiben durch Filtration nicht zu entfernen sind, dass sie ferner den O.-Hämoglobinkrystallen hartnäckig anhaften, so ging ich darauf aus, sie aufzulösen.

Behandelt man die lackfarbene, auf 35° C. erwärmte Flüssigkeit mit einer sehr kleinen Menge Ammoniak, so lösen sich die Stromata auf; versetzt man jetzt eine Probe der Flüssigkeit mit einer concentrirten Lösung schwefelsauren Natrons und etwas Schwefelsäure, so sieht man mikroskopisch keine Stromata mehr. Das Ammoniak, dessen Menge man sehr genau kennen muss, wird dann mit der ihr entsprechenden Menge sehr verdünnter Salzsäure genau neutralisirt, weil das Hämoglobin aus ammoniakalischer Lösung nicht krystallisirt <sup>1)</sup>.

Das gleiche Resultat kann bekanntlich auch durch Aethyläther erreicht werden. Nach meinen Erfahrungen genügen

<sup>1)</sup> Ich verdanke diese Methode der Lösung des Stroma einer mündlichen Mittheilung meines verehrten Lehrers Dr. A. Schmidt; sie ist bisher nicht publicirt worden.

dazu weit geringere Mengen, als Hoppe-Seyler in seiner Vorschrift angiebt; 39 cbcm. Aether reichen hin, das Stroma von 9 Liter Blut aufzulösen.

Nach dieser Manipulation haben wir eine unreine wässrige Lösung von O.-Hämoglobin vor uns; es gilt aus derselben das O.-Hämoglobin durch Krystallisation zu gewinnen. Zu diesem Zweck kühlt man die Flüssigkeit bis nahezu 0° ab, versetzt sie mit  $\frac{1}{4}$  Vol. absol. Alcohol und lässt bei 0° krystallisiren<sup>1)</sup>. Schon nach 24 Stunden hat sich die Flüssigkeit in einen dicken Krystallbrei verwandelt; zweckmässig lässt man diesen noch 48 Stunden stehen, die Krystalle vergrössern sich und können dann die Poren des Filtrums, das Mutterlauge und Krystalle trennt, nicht verstopfen. Die Krystalle müssen nun mit einer auf 0° abgekühlten Mischung von 1 Theil absoluten Alcohol und 4 Theile Wasser ausgewaschen werden, was man nach zahlreichen von mir ausgeführten Versuchen am besten so bewerkstelligt, dass man den Krystallbrei mit dem 3-fachen Volum der Mischung übergiesst, aufrührt, abstehen lässt und dann decantirt. Behufs weiterer Reinigung wird der Krystallbrei in dem 3-fachen Volum destillirten Wassers bei 35° C. aufgelöst, die Lösung filtrirt und nach Zusatz von Alcohol in der schon früher erwähnten Weise umkrystallisirt.

Wie oft soll man die Krystalle waschen und umkrystallisiren, um ein absolut reines Präparat zu erhalten?

Auch zur Beantwortung dieser Frage wurden eine Anzahl von Versuchen gemacht.

Es wurde, wie oben beschrieben, eine Anfangs unreine O.-Hämoglobinlösung dargestellt und das daraus erhaltene Krystallisationsproduct noch zweimal umkrystallisirt. Von jedem Krystallisationsproduct wurde ein Theil analysirt, ebenso von jeder Mutterlauge. Als Controle für die Reinheit des Präparates und der Mutterlauge diente die Bestimmung des Eisengehaltes derselben.

<sup>1)</sup> Hoppe-Seyler nimmt in seiner Vorschrift dieselbe Quantität 80% Alkohols.

In Mutterlauge und Krystallen differirte der Procentgehalt des Eisens beim I. Product um 0,0792, beim II. um 0,0376, beim III. Product enthielten sowohl Mutterlauge als auch Krystalle fast gleiche Quantitäten Eisen. Ich gebe die Zahlenbelege hierfür im analytischen Abschnitt der Arbeit.

Nachdem ich gefunden hatte, auf welche Weise reine Krystalle zu erhalten seien, musste studirt werden, wie sie getrocknet werden sollen.

Hoppe-Seyler<sup>1)</sup> schreibt vor, die Krystallmasse bei 0° im Vacuum zu trocknen. Ich habe ein Präparat im Vacuum bei möglichst niedriger Temperatur zu trocknen versucht; das Trocknen von 50 gr. O.-Hämoglobin nahm 2 Monate in Anspruch. Der Versuch belehrte mich abermals, dass man den Krystallbrei, recht dünn in flache Schalen vertheilt, bei 18 bis 20° C. in 8 Stunden so trocknen kann, dass das Präparat sich nicht zersetzt.

Das so getrocknete O.-Hämoglobin löst sich klar in Wasser, die Lösung giebt, spectral-analytisch untersucht, das reine Oxy-Hämoglobinspectrum und wird von basisch essigsaurem Bleioxyd nicht gefällt — ein Zeichen, dass sich kein Methämoglobin gebildet hat. Wurde das Präparat bei 40° C. weiter getrocknet, so löste es sich schwer und nicht ganz vollständig in Wasser.

Diese Vorstudien hatten die Methoden zur Darstellung des O.-Hämoglobins klargelegt; es konnte nun zur Herstellung mehrerer Präparate geschritten werden. Ich habe davon im Ganzen drei angefertigt, bei jedem derselben gebe ich die Darstellungsweise an. Anzuführen ist noch, dass ich zu allen Präparaten Pferdeblut angewandt habe, weil dessen Blutkörperchen sich leichter senken, grosse Mengen davon erhalten werden können, und das Hämoglobin leicht krystallisirt.

#### Präparat I.

20 Liter Pferdeblut (Blut von 2 Pferden) werden zu je 10 Liter defibrinirt und dann in die Kälte gestellt, wo sich

<sup>1)</sup> Hoppe-Seyler, Med.-chem. Unters., Heft II, S. 170.

nach drei Stunden die Blutkörperchen bis auf  $\frac{1}{4}$  des Volums gesenkt haben. Das Serum wird decantirt, der Blutkörperbrei mit dem 8-fachen Volum einer 2% Kochsalzlösung übergossen, aufgerührt und bei Seite gestellt. Nach 3 Tagen nehmen die Blutkörper das unterste Viertel des Gefäßes ein. Die Kochsalzlösung wird nun decantirt, der Blutkörperbrei mit dem 3-fachen Volum destillirten Wassers vermischt und auf 35° C. erwärmt. Der noch nicht lackfarbenen Flüssigkeit werden nun 16 ccm. einer titrirten  $\frac{1}{10}$  normalen Ammoniakflüssigkeit allmählich unter Umrühren zugesetzt. Nach fünf Minuten ist die Flüssigkeit lackfarben. Das Ammoniak wird nun durch ein entsprechendes Quantum titrirter, sehr verdünnter Salzsäure allmählich und vorsichtig neutralisirt, und die Flüssigkeit möglichst rasch abgekühlt (die Erfahrung belehrte mich, dass sich bei langsamem Abkühlen Methämoglobin bildet). Der bis nahe 0° abgekühlten Flüssigkeit wird auf 0° abgekühlter absoluter Alcohol auf je 4 Vol. 1 Vol. zugesetzt und das Ganze in eine Kältemischung aus Kochsalz und Eis gestellt. Nach drei Tagen werden die Krystalle von der Mutterlauge getrennt, mit einer auf 0° abgekühlten Mischung aus 4 Vol. Wasser und 1 Vol. Alcohol 2mal gewaschen, dann in dem 3-fachen Volum Wasser von 35° C. gelöst, die Lösung filtrirt, abgekühlt, mit Alcohol versetzt und wieder in die Kältemischung gestellt. Die resultirenden Krystalle werden noch 2mal derselben Reinigungsprocedur unterworfen und dann unter der Luftpumpe getrocknet.

Ausbeute: ca. 200 gr.

### Präparat II.

In Arbeit genommene Menge Pferdeblut 10 Liter. Die nach dem Defibriniren durch Abstehen und Decantiren gewonnenen Blutkörperchen werden nicht mit Chlornatriumlösung behandelt, sondern sofort mit dem 3-fachen Volum Wasser von 35° C., darauf mit Ammoniak versetzt und wie Präparat I behandelt bis zur Gewinnung reiner Krystalle. Ausbeute 520 gr.

Die zu Präparat I angewandten 20 Liter Blut gaben, wie wir gesehen haben, bloß 200 gr. Hämoglobin. Hier geben 10 Liter 520 gr. Ich glaube, dass das Waschen mit Kochsalzlösung die Ausbeute verringert.

### Präparat III.

Die Blutkörperchen aus 9 Liter Pferdeblut werden wie bei dem vorigen Präparat ohne Anwendung von Kochsalzlösung vom Serum möglichst befreit. Der Blutkörperbrei wird in 3 Vol. Wasser gebracht, auf  $35^{\circ}$  C. erwärmt, abgekühlt und dann mit 30 chem. Aether versetzt. Die klare Lösung wird dann mit  $\frac{1}{4}$  Vol. Alcohol versetzt. Die resultirenden Krystalle werden wie früher durch 2maliges Umkrystallisiren gereinigt. Proben eines jeden der 3 Krystallisationsproducte und der zu ihnen gehörigen Mutterlaugen wurden auf ihren Eisengehalt geprüft.

Dieses Präparat erwies sich als das reinste von den dreien. Die Asche enthielt kaum eine Spur von Chlor. Nach dem Einäschern von ca. 2 gr. mit kohlensäurem Natron gab die salpetersaure Lösung der Asche mit Silbernitrat nur eine eben wahrnehmbare Opalescenz. Alkalien liessen sich in der Asche nicht nachweisen. Phosphor liess sich zwar mit Sicherheit nachweisen, quantitativ aber nicht bestimmen; aus der Asche von 23,6 grm. Hämoglobin wurde nur eine unwägbar Menge von pyrophosphorsaurem Magnesia erhalten: beim Versuch, dieselbe zu wägen, wurden 0,0021 gefunden. Kalk und Magnesia waren in noch weit geringeren Spuren in dieser Asche nachweisbar.

Das Präparat I enthielt deutliche Spuren von Chlor, keine Alkalien; Kalk und Magnesia waren in der Asche von 60,8006 gr. nur in quantitativ nicht bestimmbarer Menge enthalten, etwas grösser war die Menge des Phosphors: die Asche von den 60,8006 gr. lieferte 0,0223 pyrophosphorsaure Magnesia =  $0,0143 \text{ P}_2\text{O}_5 = 0,0235 \% \text{ P}_2\text{O}_5$ .

Am wenigsten rein war das Präparat II. Dasselbe enthielt, wie aus weiter unten anzuführenden Zahlenbelegen hervorgeht,  $0,0401 \% \text{ P}_2\text{O}_5$ ,  $0,0097 \% \text{ CaO}$ ,  $0,0131 \% \text{ MgO}$ .

Alle Präparate sind, als sie noch feucht waren, auch mikroskopisch untersucht worden. Es liessen sich auf diesem Wege nicht einmal Spuren von Verunreinigungen nachweisen: die Contouren der Krystalle waren scharf und geradlinig, nicht ausgefranst oder angebohrt, wie es bei den durch Stromata verunreinigten der Fall zu sein pflegt.

#### Bestimmung des Wassergehalts.

Nach vorhergegangenem Trocknen bei 40° C. (cf. S. 21) wurden die Präparate im Luftbade mit Bunsen-Kemp'schem Regulator bei 115° C. so lange getrocknet, bis nach weiterem 24stündigen Trocknen nicht die geringste Gewichtsabnahme mehr eintrat.

#### Methoden der Eisenbestimmung.

Die Methoden der Eisenbestimmung gehören zu den zuverlässigsten und schärfsten, welche wir besitzen. Dennoch hielt ich es nicht für überflüssig, die Genauigkeit der Ausführung dieser Methoden dadurch zu prüfen, dass die Resultate der Titrirung mit Chamäleonlösung durch die Gewichtsanalyse controlirt wurden. Mein verehrter Lehrer Dr. G. Bunge hatte die Freundlichkeit, die Gewichtsanalysen auszuführen.

Zu jeder Bestimmung wurde eine grosse Menge O.-Hämoglobin, in einem Falle sogar 60 gr., verwandt. Der Fehler musste also ein sehr kleiner werden. Die Reagentien waren sämtlich eisenfrei.

Zum Titriren wurde das Hämoglobin in Platinschalen eingeäschert, die Asche in Salzsäure gelöst, die salzsaure Lösung fast zur Trockne eingedampft, mit Schwefelsäure aufgenommen, in der bekannten Weise mit Zink reducirt und dann titirt. Der Titre wurde auf met. Eisen gestellt.

Bei der Gewichtsanalyse wurde folgendermassen verfahren: Einäschern des Hämoglobins, Lösen der Asche in Salzsäure; diese wird mit Ammoniak abgestumpft, dann Zusatz von essigsaurem Ammon (Flüssigkeit dabei nur schwach sauer), Erwärmen bis essig- und phosphorsaures Eisen ge-

ronnen. Heiss filtrirt, mit heissem essigsauerm Ammon durchgewaschen, Verbrennung des Filtrums, Glühen und Wägen. Das Gewogene zeigt die Menge des Eisenoxyds + Phosphorsäure. Auflösen des Gewogenen in Salzsäure, Versetzen der Lösung mit Weinsäure, darauf mit Ammoniak, Fällung des Eisens mit Schwefelammonium, Ueberführung des Schwefeleisens in der bekannten Weise in Eisenoxyd und Wägung dieses Niederschlages. In derselben Asche wurden zugleich auch die Phosphorsäure, der Kalk und die Magnesia bestimmt. Aus dem Filtrat vom Schwefeleisen wurde die Phosphorsäure mit Magnesiamixtur ausgefällt. Aus dem Filtrat vom basisch-essigsaueren und phosphorsauren Eisenoxyd wurde durch Uebersättigen mit Ammoniak und Zusatz von oxalsaurem Ammon der Kalk ausgefällt; das Filtrat vom oxalsauren Kalk wurde eingedampft, die Ammoniaksalze vertrieben, der geringe Rückstand in Salzsäure gelöst und aus dieser Lösung mit Ammoniak und phosphorsaurem Ammon die Magnesia ausgefällt.

### Resultate der Eisenbestimmung.

Präparat I.	Titration.	a) 0,336 0/0
		b) 0,337 0/0
		c) 0,334 0/0
Gewichtsanalyse von Dr. Bunge		0,330 0/0
Präparat II.	Titrat.	a) 0,327 0/0
		b) 0,327 0/0 (ausgef. v. Dr. Bunge).
Gewichtsanalyse von Dr. Bunge		0,325 0/0

### Präparat III.

Mutterlaugentrockenrückstand:	Krystallisationsproducte:
a) 0,230 0/0	a) 0,309 0/0 (unrein).
b) 0,2966 0/0	b) 0,334 0/0 1mal umkrystallisirt.
c) 0,347 0/0	c) α. 0,334 0/0
	β. 0,338 0/0
	γ. 0,337 0/0
Dr. Bunge's Gewichtsanalyse	0,334 0/0

### Zahlenbelege.

Für Präparat I:

2,0282 gr. geben 0,0873 gr.  $H_2O = 4,3046\%$   $H_2O$ .

2,0430 gr. geben 0,0878 gr.  $H_2O = 4,3047\%$   $H_2O$ .

a) 10,3058 gr. = 9,8622 gr. Trockensubstanz verbrauchen 35,40 ccm. Chamäleonlösung, Titre: 0,0009350 gr. Fe pro ccm. = 0,3356% Fe.

- b) 10,0436 gr. = 9,6106 gr. Trockensubstanz verbrauchen 34,60 ccm. Chamäleon, Titre: 0,0009350 gr. Fe pro ccm. = 0,3366% Fe
- c) 21,5152 gr. = 20,5889 gr. Trockensubstanz verbrauchen 71,60 ccm. Chamäleon, Titre: 0,000960 gr. Fe pro ccm. = 0,3338% Fe.
- Gewichtsanalyse von Dr. Bunge: 63,5358 gr. = 60,8006 gr. Trockensubstanz geben 0,2866 gr.  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  = 0,3300% Fe.

## Für Präparat II:

2,0139 gr. geben 0,0935 gr.  $\text{H}_2\text{O}$  = 4,6437%  $\text{H}_2\text{O}$ .

1,9956 gr. geben 0,0926 gr.  $\text{H}_2\text{O}$  = 4,6402%  $\text{H}_2\text{O}$ .

- a) 22,7538 gr. = 21,6980 gr. Trockensubstanz verbrauchen 74,00 ccm. Chamäleon, Titre: 0,000960 gr. Fe pro ccm. = 0,3274% Fe.
- b) 23,4728 gr. = 22,3837 gr. Trockensubstanz verbrauchen 76,20 ccm. Chamäleon, Titre: 0,000960 gr. Fe pro ccm. = 0,3268% Fe.

Dr. Bunge's Gewichtsanalyse: 47,4529 gr. = 45,2511 gr. Trockensubstanz geben 0,2100 gr.  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  = 0,325% Fe. Dieselbe Menge ergibt:

0,0290  $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$  = 0,0186  $\text{P}_2\text{O}_5$  = 0,0409%  $\text{P}_2\text{O}_5$ .

0,0165  $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$  = 0,0059  $\text{MgO}$  = 0,0131%  $\text{MgO}$ .

0,0107  $\text{CaSO}_4$  = 0,0044  $\text{CaO}$  = 0,011%  $\text{CaO}$ .

## Für Präparat III:

## a) Mutterlauge 1.

2,1775 gr. Trockenrückstand geben 0,0177 gr.  $\text{H}_2\text{O}$  = 0,8129%.

2,1960 gr. geben 0,0180 gr.  $\text{H}_2\text{O}$  = 0,8196%  $\text{H}_2\text{O}$ .

22,1770 gr. Trockenrückstand = 21,9951 gr. wasserfreier Substanz verbrauchen 53,00 ccm. Chamäleon, Titre: 0,0009550 gr. Fe pro ccm., = 0,2302% Fe.

## b) Mutterlauge 2.

Der Trockenrückstand ist wasserfrei.

20,3522 gr. Trockenrückstand verbrauchen 63,20 ccm. Chamäleon, Titre: 0,0009550 gr. Fe pro ccm., = 0,2966% Fe.

## c) Mutterlauge 3.

1,9958 gr. Trockenrückstand geben 0,1138 gr.  $\text{H}_2\text{O}$  = 5,7019%  $\text{H}_2\text{O}$ .

5,2869 gr. Trockenrückstand = 4,9855 gr. wasserfreier Substanz verbrauchen 18,50 ccm. Chamäleon, Titre: 0,0009350 gr. Fe pro ccm. = 0,3469% Fe.

## Krystallisationsproducte:

a) Erstes Krystallisationsproduct: 2,1953 gr. geben 0,0334 gr.  $\text{H}_2\text{O}$  = 1,5213%  $\text{H}_2\text{O}$ .

22,5587 gr. = 22,2203 gr. Trockensubstanz verbrauchen 71,60 ccm. Chamäleon, Titre: 0,000960 gr. Fe pro ccm. = 0,3094%.

b) Zweites Krystallisationsproduct: 2,0060 gr. geben 0,0682 gr.  $H_2O$   
 $= 3,3998\%$ .

20,5787 gr. = 19,8790 gr. Trockensubstanz verbrauchen 69,60 cbem.  
 Chamäleon, Titre: 0,0009550 gr. Fe pro cbem.  $= 0,3343\%$  Fe.

c) Drittes Krystallisationsproduct: Eine Portion wird weniger scharf  
 getrocknet, sie dient zur Analyse sub  $\alpha$ .

$\alpha$ ) 1,9801 gr. geben 0,1453 gr.  $H_2O = 7,3380\%$   $H_2O$ .

11,0430 gr. = 10,2323 gr. Trockensubstanz brauchen 36,20 cbem.

Chamäleon, Titre: 0,0009440 gr. Fe pro cbem.  $= 0,3339\%$  Fe.

Die übrige Menge wird schärfer getrocknet, daher ergibt sich  
 auch ein anderer Gehalt an Wasser.

2,0205 gr. geben 0,0880 gr.  $H_2O = 4,3553\%$   $H_2O$ .

1,9935 gr. geben 0,0867 gr.  $H_2O = 4,3491\%$   $H_2O$ .

Gerechnet wurde mit dem Mittel:  $4,35\%$ .

$\beta$ ) 13,2016 gr. = 12,6274 gr. Trockensubstanz verbrauchen 45,60 cbem.

Chamäleon, Titre: 0,0009350 gr. Fe pro cbem.  $= 0,3376\%$  Fe.

$\gamma$ ) 9,9213 gr. = 9,4898 gr. Trockensubstanz brauchen 34,20 cbem.

Chamäleon, Titre: 0,0009350 gr. Fe pro cbem.  $= 0,3369\%$  Fe.

Gewichtsanalyse, ausgeführt von Dr. Bunge: 24,6854 gr. =

23,6116 gr. Trockensubstanz geben 0,1127 gr.  $Fe_2O_3 = 0,3341\%$  Fe.

Wie der Leser sehen wird, stimmen die Zahlen leidlich  
 mit einander, aber ganz und gar nicht mit denen der übrigen  
 Autoren. Dass das Präparat I und III tadellos rein sei,  
 glaube ich durch die Schilderung der Darstellung und Eigen-  
 schaften derselben bewiesen zu haben. Für die Accuratesse  
 der Analysen bürgt dem Leser schon der Umstand, dass  
 Dr. Bunge und ich zu gleichen Resultaten gekommen sind  
 und dass die Gewichtsanalyse dieselben Zahlen ergeben hat,  
 wie die Titration. Ich habe also Grund genug, meine Zahlen  
 als die richtigen anzusehen.

### Methode der Schwefelbestimmung.

Wenn man sich die Schwefelbestimmungen, besonders  
 die am Casein ausgeführten, ansieht, wenn man dabei erfährt,  
 wie sehr die Angaben der einzelnen Forscher auseinander  
 gehen, wie die Autoren, um die eigenen Zahlen als die richtigen  
 hinzustellen, einander beschuldigen, unreine Niederschläge  
 gewogen zu haben etc., so wird es sofort klar, dass die  
 Differenzen nicht von der Ungenauigkeit der Ausführung her-

rühren können, sondern dass wahrscheinlich die Methoden der Schwefelbestimmung Fehlerquellen mit sich bringen müssen. Es kommt vor Allem darauf an, die organische Substanz so zu zerstören, dass aller Schwefel an die Asche gebunden wird. Dieses ist auf die verschiedenste Weise versucht worden, aber immer und immer wieder ist man auf eine alte Methode, die des Schmelzens mit Salpeter und Aetzkali, zurückgekommen. Aus den früheren Analysen entnehmen wir, dass das O-Hämoglobin 0,65% Schwefel enthält, dass man folglich, um genügende Mengen eines schwefelhaltigen Niederschlages zu erhalten, grössere Quantitäten in Arbeit nehmen muss. Die Berechnung zeigte, dass 10,0 Substanz genügen würden.

Die Substanz musste nun zerstört werden. Wieviel man dazu Aetzkali und Salpeter braucht, musste der Versuch lehren. Nach mehrfachen Versuchen ergab es sich, dass eine Mischung von 1 Theil Hämoglobin mit 7 Theilen Salpeter und 3 Theilen Aetzkali ruhig, ohne Flammerscheinung, schmolz und vollständig verbrannte. Die Schmelze war weiss mit einem Stich in's Gelbliche; die Färbung rührte vom Eisen her. Am geeignetsten erwies es sich, das O-Hämoglobin in der Lösung des Aetzkali zu lösen, dann den Salpeter zuzusetzen, auf dem Dampfbad in einer Silberschale einzudampfen und zu schmelzen. Ich muss hier über eine Erfahrung berichten, die wohl von Jedermann bei Verbrennung solcher Substanzen gemacht, aber von Niemand in der Literatur mitgetheilt worden ist. Beim Erhitzen des Gemenges von Salpeter, Aetzkali und einer Eiweisssubstanz entwickeln sich, bevor die Verbrennung eintritt, penetrant stinkende Gase. Es lag nahe zu denken, dass mit diesen Gasen ein Theil des Schwefels in die Luft ginge. Das ist aber nicht der Fall. Ich habe ein Gemisch von O-Hämoglobin und Aetzkali in einem Kolben erhitzt, die Destillationsproducte in Königswasser aufgefangen und analysirt; es war kein Schwefel darin.

Das Resultat der Schmelze war eine geringe Menge schwefelsauren Kalis in mehr als 100 Gramm einer Salzmasse, welche aus Salpeter, salpetrig-saurem Kali und kohlen-saurem Kali bestand. Die grosse Salzmenge musste ein wenig

erschrecken. Es war vor auszusehen, dass die Fällung des Schwefels als schwefelsaurer Baryt in wenigstens einem Liter Flüssigkeit vorgenommen werden musste.

Behandelt man, wie das Hammarsten<sup>1)</sup> mit dem Casein gethan, das O-Hämoglobin mit conc. Salpetersäure in der Wärme, so wird ein Theil davon zerstört. Es entweicht Kohlensäure, das Uebrige löst sich in der Säure zu einer klaren, gelblichen Flüssigkeit, welche abgedampft einen gelben Rückstand hinterlässt. Dieser kann nun mit weniger Salpeter und Aetzkali geschmolzen werden. Es resultiren kleinere Salzmassen.

Aus der Auflösung der Schmelze sollte nun der Schwefel als schwefelsaurer Baryt ausgefällt, die Flüssigkeit dazu aber erst vorbereitet werden. Löst man die Schmelze auf, so kann man das in ihr suspendirte Eisen durch Filtration entfernen. Man muss es thun, weil es bei den weiteren Operationen in die Lösung übergeht, vom Barytniederschlag mitgerissen wird und daher das Gewicht des Niederschlages vergrößert. Man muss ferner alles Alkali in Chlorid verwandeln und zwar müssen in erster Linie die Salze der Salpeter- und salpetrigen Säure zerstört werden, weil bekanntlich der Barytniederschlag diese Salze mit sich niederreißt. Dazu muss man die Salzmasse 3- bis 5 mal mit concentr. Salzsäure abdampfen. Von der vollständigen Zersetzung der genannten Salze habe ich mich bei jeder Analyse überzeugt, indem ich kleine Proben der mit Salzsäure behandelten Salzmasse mit Schwefelsäure ansäuerte und nach Zusatz von Jodkaliumstärkekleister mit Zink behandelte. Färbte sich die Stärke nur schwach bläulich, so musste das Abdampfen mit Salzsäure wiederholt werden. Es resultirte nun eine Menge von Chlorkalium, in der sich eine kleine Quantität von schwefelsaurem Kali befand, und blieb noch zu untersuchen, welchen Einfluss eine Chlorkaliumlösung von bekannter Concentration auf das Resultat der Analyse haben könnte. 0,1980 gr. schwefelsauren Natrons,

<sup>1)</sup> Zeitschrift für physiologische Chemie, Bd. IX. Heft 3, früher B1. VII. Heft 3.

5 cbcm. 25 % Salzsäure und 50 gr. Chlorkalium wurden in 500 cbcm. Wasser gelöst, mit einer Lösung von 0,62 gr. Chlorbaryum heiss versetzt, der Niederschlag in üblicher Weise gewaschen, getrocknet, geglüht und gewogen. Dieser Versuch wurde zweimal wiederholt.

I. Gewogenes Baryumsulfat 0,3220,

II. » » » 0,3240.

Daraus berechnet sich in:

I. 0,04422 gr. S und in

II. 0,04450 gr. S.

Die theoretisch berechnete Menge beträgt 0,04458 gr. S.

Wie bei diesen Versuchen, habe ich mich auch bei allen späteren Bestimmungen einer mir bekannten Menge von  $\text{BaCl}^2$  bedient; ebenso war die Menge der  $\text{ClH}$  mir bekannt. Ich nahm mir bekannte Mengen von beiden Reagentien, weil  $\text{BaCl}^2$  in zu grossem Ueberschuss zugesetzt, in den Niederschlag geht, ein grösserer Ueberschuss von  $\text{ClH}$  aber den  $\text{BaSO}^4$  löst. Chlorkalium konnte, wie wir gesehen haben, kaum schaden. Hinzuzufügen bleibt noch, dass weder Digeriren des geglühten Niederschlages mit Salzsäure, noch Aufschliessen und abermaliges Fällen das Gewicht erheblich veränderten. Die angewandten Reagentien waren schwefelfrei: von der Salz- und Salpetersäure wurden grosse Quantitäten eingedampft, in den Rückständen liess sich keine Schwefelsäure nachweisen. 10 gr. des Aetzkali wurden mit 10 gr. Salpeter zusammengeschmolzen, die Schmelze gelöst, mit Salzsäure schwach angesäuert und nach Zusatz von  $\text{BaCl}^2$  in die Wärme gestellt. Am folgenden Tage hatte sich nur eine unwägbare Spur schwefelsauren Baryts abgeschieden.

#### Resultate der Schwefelbestimmungen.

Präparat I ergab:	0,3902 % S.
	0,3916 » »
Präparat II ergab:	0,3583 » »
	0,3658 » »
Präparat III ergab:	0,3899 » »
	0,3881 » »

## Zahlenbelege.

## Präparat I.

Das Präparat enthält 4,305%  $H_2O$ .

11,6329 gr. = 11,1325 gr. Trockensubstanz geben 0,3163 gr.  $BaSO_4$   
= 0,3902% S.

11,3955 gr. = 10,9050 gr. Trockensubstanz geben 0,3110 gr.  $BaSO_4$   
= 0,3916% S.

## Präparat II.

Das Präparat enthält 4,64%  $H_2O$ .

11,0468 gr. = 10,5337 gr. Trockensubstanz geben 0,2748 gr.  $BaSO_4$   
= 0,3583% S.

11,3103 gr. = 10,7855 gr. Trockensubstanz geben 0,2873 gr.  $BaSO_4$   
= 0,3658% S.

## Präparat III.

9,9661 gr. mit 7,34%  $H_2O$  = 9,2346 gr. Trockensubstanz geben 0,2622 gr.  
 $BaSO_4$  = 0,3899% S.

10,0395 gr. mit 4,356%  $H_2O$  = 9,6022 gr. Trockensubstanz geben  
0,2714 gr.  $BaSO_4$  = 0,3881% S.

In dem Präparat III als dem reinsten wurden auch der C, H und N bestimmt, um das Präparat mit dem anderer Autoren vergleichen und eine Formel des Hämoglobins berechnen zu können.

## Bestimmung des C und H.

Das Präparat, bei 115° C. im Luftbade getrocknet, wurde wie gewöhnlich in einer Verbrennungsröhre mit vorgelegtem chromsauren Bleioxyd, Kupferoxyd und einer 25 cm. langen, im Wasserstoffstrome frisch ausgeglühten Kupferspirale, im Sauerstoffstrome verbrannt.

Es ergibt sich:

$$I. \quad C = 51,2909\%$$

$$H = 6,727 \quad \text{»}$$

$$II. \quad C = 51,01 \quad \text{»}$$

$$H = 6,79 \quad \text{»}$$

## Zahlenbelege.

I. 0,5500 gr. gaben 1,0345 gr.  $CO_2$  und 0,3330 gr.  $H_2O$  = 51,2909% C  
und 6,7272% H.

II. 0,5952 gr. gaben 1,1133 gr.  $CO_2$  und 0,3638 gr.  $H_2O$  = 51,02% C  
und 6,79% H.

## Bestimmung des N.

Diese wurde nach der Will-Warrentrapp'schen Methode ausgeführt und ergab:

I. N = 18,02%

II. N = 17,87%

## Zahlenbelege.

I. 0,4683 gr. gaben 0,5926 gr. Pt = 18,02% N.

II. 0,2751 gr. gaben 0,3452 gr. Pt = 17,87% N.

Bei der folgenden Zusammenstellung sind die bei der Analyse des Präparates II erhaltenen Resultate fortgelassen, weil, wie erwähnt, dieses Präparat weniger rein war.

Präparat I.						Mittel.
C						
H						
N						
S	0,3902	0,3916				0,3909
Fe			0,336	0,337	0,330	0,334
O						

Präparat III.										Mittel.	
C	51,29	51,01									51,15
H	6,73	6,79									6,76
N			18,02	17,87							17,94
S					0,3899	0,3881					0,3890
Fe							0,334	0,338	0,337	0,3341	0,3358
O											

Mittel aus beiden:

C 51,15. H 6,76. N 17,94. S 0,3899. Fe 0,335. O 23,4251.

Berechnen wir nun die Anzahl der Schwefelatome, die auf ein Atom Eisen kommen, so finden wir für das Präparat I:

$$\frac{0,3909}{0,334} = \frac{x \cdot 32}{56} = \frac{x \cdot 4}{7}; x = 2,04.$$

Für das Präparat III:

$$\frac{0,3890}{0,3358} = \frac{x \cdot 4}{7}; x = 2,03.$$

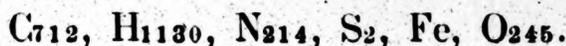
Im Mittel aus allen Bestimmungen:

$$\frac{0,3899}{0,3350} = \frac{x \cdot 4}{7}; x = 2,03.$$

Aus diesen Zahlen geht unzweifelhaft hervor, dass auf 1 Atom Fe genau 2 Atome S im Hämoglobin enthalten sind und dass das Hämoglobin ein chemisches Individuum ist.

Leider war es mir aus äusseren Gründen nicht vergönnt, die Menge des von Hämoglobin locker gebundenen Sauerstoffs genau zu bestimmen, um zu entscheiden, ob auch dieses Element im einfachen Aequivalentverhältniss zum Fe steht.

Ich gebe schliesslich die aus den von mir gefundenen Werthen resultirende Formel des Hämoglobins:



Bei der Spaltung des Hämoglobins scheidet sich das Hämatin mit 34 Kohlenstoffatomen ab. Der Rest kann in höchstens zwei Eiweissmolecüle zerfallen, weil nur zwei Schwefelatome in demselben enthalten sind. Jedes Eiweiss-(Globulin-)Molecül würde 1 Atom Schwefel und 339 Atome Kohlenstoff enthalten.

Thatsächlich aber kann das Eiweiss peptonisirt werden und die Peptone sind gleichfalls noch schwefelhaltig.

Nehmen wir nun an, dass die Peptone Spaltungsproducte des Eiweisses seien, so müssen wir das Eiweissmolecül verdoppeln und schon für jedes Peptonmolecül 1 Atom Schwefel und 339 Atome Kohlenstoff annehmen. Bedenkt man aber, dass das Eiweiss wenigstens zweierlei — in verschiedener Weise gebundene — Schwefelatome enthält, dass

ein Theil derselben leichter als Schwefelwasserstoff sich abspaltet, so ist man gezwungen, wenigstens 4 Atome Schwefel und 1356 Atome Kohlenstoff im Eiweissmolecül anzunehmen.

Die Initiative zu vorliegender Arbeit verdanke ich dem Herrn Professor Dr. G. Bunge, der mich bei der Ausführung derselben auf's Liebenswertigste unterstützte. Ich bitte den Herrn Professor ergebenst, meinen innigsten, wärmsten Dank für die stattgehabte Mühe und Anregung gütigst entgegennehmen zu wollen.

L