

## Beiträge zur Kenntniss des Blutfarbstoffes.

Von

**Dr. A. Jaquet.**

(Aus dem Laboratorium des Herrn Professor Bunge in Basel.)

(Der Redaction zugegangen am 20. October 1889.)

In einer Reihe von Analysen des Hundeblothämoglobins, die ich im Bd. XII, S. 285. dieser Zeitschrift veröffentlicht habe, habe ich für den Eisen- und Schwefelgehalt des Moleküls Zahlen bekommen, die beträchtlich differirten von denjenigen anderer Autoren, und ein Aequivalentverhältniss zeigten, welches sich einem Einfachen zu nähern schien.

Es schien mir der Mühe werth, an einem möglichst reinen Präparate die Bestimmungen zu wiederholen.

Dieses Präparat wurde in der gleichen Weise dargestellt wie das erste, nur wurde hier die Blutkörperchenlösung nach Zusatz von Aether schon centrifugirt, was die Filtration wesentlich erleichterte und eine vollständige Abscheidung der Stromata bewirkte. Zu diesem Zwecke stand mir eine ausgezeichnet gearbeitete Centrifuge zu Gebote, welche 1600—2000 Umdrehungen machte und in 6 Glascylindern zusammen 600 ccm. Flüssigkeit fasste.

2,5 Liter defibrinirten Blutes von zwei mittelstarken Hunden lieferten nach dreimaligem Umkrystallisiren eine Ausbeute von 119 gr. Hämoglobin.

Dieses Präparat enthielt nur Spuren von Phosphorsäure, die quantitativ nicht bestimmbar waren.

**Analyse.****Bestimmung des Wassergehalts.**

2,6990 gr. der bei Zimmertemperatur getrockneten Krystalle verloren bei 115° 0,3072 H<sub>2</sub>O = 11,38% H<sub>2</sub>O.

1,9510 gr. verloren 0,2222 H<sub>2</sub>O = 11,39% H<sub>2</sub>O.

Als Mittel aus diesen zwei Bestimmungen findet man:

11,39% H<sub>2</sub>O.

Die Eisen- und Schwefelbestimmungen wurden genau nach denselben Methoden ausgeführt wie im ersten Präparat.

**Eisenbestimmung.**

a) 8,4534 gr. (= 7,4909 Trockensubstanz) mit Kali und Salpeter geschmolzen. Das Eisen titirt. Es wurden verbraucht 23,3 cem. Chamäleon. Titre 0,001082 = 0,3365% Fe.

b) 9,7120 gr. (= 8,6063 Trockensubstanz) in der Platinschale eingäschert. Das Eisen titirt. Es wurden verbraucht 26,8 cem. Chamäleon. Titre 0,001082 = 0,337% Fe.

c) 8,5028 gr. (= 7,5347 Trockensubstanz) mit Kali und Salpeter geschmolzen. Das Eisen titirt. Es wurden verbraucht 23,0 cem. Chamäleon. Titre 0,001095 = 0,3343% Fe.

Als Mittel aus diesen drei Bestimmungen findet man:

0,336% Fe.

**Schwefelbestimmung<sup>1)</sup>.**

a) 8,2280 gr. (= 7,2912 Trockensubstanz) gaben 0,3020 SO<sub>4</sub>Ba = 0,0415 S = 0,5688% S.

b) 8,5028 gr. (= 7,5347 Trockensubstanz) gaben 0,3108 SO<sub>4</sub>Ba = 0,0427 S = 0,5665% S.

Als Mittel aus diesen zwei Bestimmungen finden wir:

0,568% S.

**Bestimmung des C und H.**

a) 0,3802 gr. bei 115° N. getrockneten Hämoglobins gaben

0,2432 H<sub>2</sub>O = 0,027 H = 7,11% H,

0,7602 CO<sub>2</sub> = 0,2073 C = 54,52% C.

<sup>1)</sup> Die genaue Methode der Schwefelbestimmung ist bei Zinoffsky. Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. X, S. 16, 1885, angegeben.

b) 0,3205 gr. Hämoglobin gaben

$$0,2048 \text{ H}_2\text{O} = 0,0228 \text{ H} = 7,1\% \text{ H,}$$

$$0,6411 \text{ CO}_2 = 0,1748 \text{ C} = 54,55\% \text{ C.}$$

c) 0,3218 gr. Hämoglobin gaben

$$0,2158 \text{ H}_2\text{O} = 0,0240 \text{ H} = 7,45\% \text{ H,}$$

$$0,6448 \text{ CO}_2 = 0,1758 \text{ C} = 54,64\% \text{ C.}$$

Als Mittel ergibt sich:

$$\text{H} = 7,22\%$$

$$\text{C} = 54,57\%$$

### Bestimmung des N.

Diese wurde nach der Will-Warrentrapp'schen Methode ausgeführt.

a) 0,2823 Hämoglobin gaben 0,3281 Pt = 0,0464 N = 16,44% N.

b) 0,2833 " " " 0,327 " = 0,0463 " = 16,33 " "

Mittel: 16,38% N.

Zur Uebersicht stelle ich die Resultate der Analysen noch einmal zusammen:

	54,52	}	
C	54,55		54,57,
	54,64		
	7,11	}	
H	7,1		7,22,
	7,45		
	16,44	}	
N	16,33		16,38,
	0,5688	}	
S	0,5665		0,568,
	0,3365	}	
Fe	0,3370		0,336,
	0,3343		
O	20,93,		

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

$$\frac{56}{x \cdot 32} = \frac{0,336}{0,568}; x = 2,96.$$

Die Schwefelbestimmungen im ersten Präparat haben offenbar zu niedrige Zahlen ergeben. Durch die verbesserte Darstellungsmethode, sowie durch die grössere Uebung, die

ich bei den Analysen des ersten Präparats erlangt habe, glaube ich mich berechtigt, die letzten Zahlen, die ich bekommen habe, als die richtigen anzusehen. Aus diesen Zahlen geht unzweifelhaft hervor, dass auf 1 Atom Eisen 3 Atome Schwefel im Hundehämoglobinmolekül kommen. Ich gebe schliesslich die aus den von mir gefundenen Werthen resultirende Formel des Hundehämoglobins



mit einem Molekulargewicht von 16669.

### Hühnerbluthämoglobin.

Zur weiteren Verfolgung der Frage habe ich noch versucht, das Hämoglobin eines Thieres aus einer anderen Classe der Wirbelthiere darzustellen. Ich wählte das Vogelblut. Wir besitzen bis jetzt nur eine Analyse des Gänsebluthämoglobins von Hoppe-Seyler. Dieses Präparat enthält jedoch eine beträchtliche Menge Phosphorsäure (0,77%), was bei den anderen Hämoglobinarten gar nicht der Fall ist, wo die Phosphorsäure im Gegentheil als Zeichen der Unreinheit eines Präparates angesehen wird. Es war der Mühe werth zu untersuchen, ob wirklich Phosphorsäure im Vogelbluthämoglobin vorkommt, oder wenn sie nur darin als Verunreinigung enthalten ist, ob es nicht möglich wäre, sie fortzuschaffen. Als Vogel habe ich das Huhn gewählt, weil hier Gänseblut nicht zu bekommen ist, und weil es von Interesse wäre, die Zusammensetzung des Hühnerhämoglobins mit der Vorstufe desselben, dem Hämatogen, zu vergleichen.

### Darstellung des Präparates.

Wenn man die Blutkörperchen in Wasser bei 35° C. gelöst hat und die lackfarbene Flüssigkeit mit Aether behandelt, so bekommt man eine dünne Gallerte, die nicht zu filtriren ist und sich sehr schwer centrifugiren lässt. Die Kerne sind unzerstört in die Lösung suspendirt. Man kann dieselben mit wenig Baryt fällen. Die Lösung lässt sich dann leicht filtriren, die Krystallisation scheint mir aber dadurch beeinträchtigt.

Eine gute Methode, um eine klare Hämoglobinlösung zu bekommen, ist folgende: Nachdem man die Blutkörperchen vom Serum getrennt hat, schüttelt man sie mit dem gleichen Volumen Wasser und  $\frac{1}{3}$  Volumen Aether. Die Blutkörperchen werden dadurch zerstört und die Flüssigkeit nimmt die Consistenz einer dünnen Gallerte an. Erhitzt man während einiger Zeit auf  $35^{\circ}$  C., so scheiden sich aus der Flüssigkeit dicke dunkelrothe Gallertklumpen ab, die dann durch die Centrifuge sehr leicht zu trennen sind. Die abgeschiedene klare Lösung lässt sich leicht filtriren. Das weitere Verhalten ist dasselbe wie bei den anderen Blutarten. Bei der ersten Krystallisation bekommt man einen dicken Krystallbrei, bestehend aus kleinen leicht löslichen Nadeln. Beim Umkrystallisiren bekommt man theilweise rhombische Tafeln, theilweise rhombische Prismen, die sich zu radiären Bildungen vereinigen.

Das Präparat wurde drei Male umkrystallisirt. Bei der Lösung der ersten Krystallisationsproducte sah man noch Stromata in der Flüssigkeit, die nächste Lösung war aber vollkommen rein.

2080 chem. defibrinirten Blutes von 77 Hühnern, nach der oben angegebenen Methode behandelt, lieferten eine Ausbeute von 22 gr. Hämoglobin.

#### Analyse.

Dieses Präparat wurde nach den gleichen Methoden analysirt wie das Hundehämoglobin. Die Phosphorsäure wurde in der gleichen Portion wie der Schwefel bestimmt.

Nach dem Filtriren des schwefelsauren Baryts wurde die Lösung mit concentrirter Salpetersäure angesäuert, ein grosser Ueberfluss von Molybdänflüssigkeit zugesetzt, 24 Stunden an einen warmen Ort gestellt, decantirt und gewaschen mit einer Mischung von 10 Theilen Molybdänflüssigkeit, 2 Theilen Salpetersäure und 8 Theilen Wasser. Der Niederschlag wurde dann in Ammoniak gelöst und aus der Lösung die Phosphorsäure mit Magnesiamixtur gefällt.

## Wassergehalt.

2.2214 gr. des bei Zimmertemperatur getrockneten Hämoglobins verloren bei 115° C.  $0.2074 \text{ H}_2\text{O} = 9.336\%$ .

2.5157 gr. Hämoglobin verloren bei 115°  $0.2347 \text{ H}_2\text{O} = 9.33\%$ .

Mittel:  $9.333\%$ .

## Eisenbestimmung.

Alle Eisenbestimmungen wurden gleichzeitig mit der Schwefelbestimmung vorgenommen.

6,2834 gr. (= 5,6970 gr. Trockensubstanz) mit Kali und Salpeter geschmolzen. Das Eisen titriert. Es wurden verbraucht 17,5 ccm. Chamäleon, Titre 0,0010814 Fe pro ccm. =  $0.3322\%$  Fe.

6,3949 gr. (= 5,7981 gr. Trockensubstanz). Idem. Das Eisen titriert. Es wurden verbraucht 18,1 ccm. Chamäleon, Titre 0,0010814 Fe pro ccm. =  $0.3376\%$  Fe.

4,6093 gr. (= 4,1791 gr. Trockensubstanz). Idem. Das Eisen titriert. Es wurden verbraucht 13,0 ccm. Chamäleon. Titre 0,0010814 Fe pro ccm. =  $0.3364\%$  Fe.

Als Mittel für diese drei Bestimmungen finden wir:

$0.3353\%$ .

## Schwefelbestimmung.

6,2834 gr. (= 5,6970 gr. Trockensubstanz) gaben  $0.3564 \text{ SO}_4\text{Ba}$  —  $0.04895 \text{ S} = 0.8592\%$  S.

6,3949 gr. (= 5,7981 gr. Trockensubstanz) gaben  $0.3622 \text{ SO}_4\text{Ba}$  —  $0.04974 \text{ S} = 0.858\%$  S.

Die dritte S-Bestimmung verunglückte.

Als Mittel ergibt sich:

$0.8586\%$  S.

## Phosphorbestimmung.

6,2834 gr. (= 5,697 gr. Trockensubstanz) gaben  $0.0402 \text{ P}_2\text{O}_5\text{Mg}_2$  =  $0.0257 \text{ P}_2\text{O}_5$  =  $0.01122 \text{ P} = 0.1970\%$  P.

4,6093 gr. (= 4,1791 gr. Trockensubstanz) gaben  $0.0296 \text{ P}_2\text{O}_5\text{Mg}_2$  =  $0.0189 \text{ P}_2\text{O}_5$  =  $0.0083 \text{ P} = 0.1977\%$  P.

Mittel:  $0.1973\%$  P.

## C- und H-Bestimmung.

a) 0,4054 gr. geben	0,7788 CO <sub>2</sub>	= 0,2124 C	= 52,39 % C.
0,4034	0,2596 H <sub>2</sub> O	= 0,0288 H	= 7,11 % H.
b) 0,3589	0,6928 CO <sub>2</sub>	= 0,1889 C	= 52,64 % C.
0,3589	0,2336 H <sub>2</sub> O	= 0,0260 H	= 7,23 % H.
c) 0,3630	0,6974 CO <sub>2</sub>	= 0,1902 C	= 52,39 % C.
0,3630	0,2369 H <sub>2</sub> O	= 0,0237 H	= 7,22 % H.

Als Mittel ergibt sich:

$$C = 52,47 \%$$

$$H = 7,19 \%$$

## N-Bestimmung.

a) 0,2154 gr. Hämoglobin geben	0,2490 Pt	= 0,0352 N	= 16,36 % N.
b) 0,3206	0,3749	= 0,0531	= 16,54 % N.

Mittel: 16,45 % N.

## Mittelzahlen.

C = 52,47	Fe = 0,3353.
H = 7,19	P = 0,1973.
N = 16,45	O = 22,5.
S = 0,8586.	

Das Verhältniss des Schwefels zum Eisen ist:

$$\frac{56}{x \cdot 32} = \frac{0,3353}{0,8586}; \quad x = 4,485.$$

Dieses Präparat enthält daneben noch eine merkliche Menge P. Schon diese grosse Menge macht die Annahme einer Verunreinigung unwahrscheinlich. Diese Unwahrscheinlichkeit wird noch erhöht, wenn man das Verhältniss des P zum Fe betrachtet. Wir haben nämlich

$$\frac{56}{x \cdot 31} = \frac{0,3353}{0,1973}; \quad x = 1,01.$$

Dieses Verhältniss mag zufällig sein, dennoch ist es beachtenswerth. Leider war das Sammeln des Materials zu schwierig, um mir die Darstellung anderer Präparate zu gestatten. Ich hoffe in der nächsten Zeit die Frage weiter verfolgen zu können.

Das Verhältniss des Schwefels zum Eisen scheint auf den ersten Blick kein einfaches zu sein; wenn wir uns aber

das Molekül verdoppelt denken, so kommen wir zum Verhältniss von 2 Fe : 9 S, was nicht undenkbar wäre.

Ueber die Art der Schwefelbindung kann ich noch hinzufügen, dass weder das Hühnerhämoglobin, noch das Pferde- und Hundehämoglobin mit alkalischer Bleilösung abspaltbaren Schwefel enthalten.

Setzt man zur alkalischen Hämoglobinlösung einen Tropfen Chlormagnesiumlösung und kocht, so fällt das Hämatin mit der Magnesia heraus, und man erhält ein nahezu farbloses Filtrat. Kocht man dieses Filtrat mit alkalischer Bleilösung, so tritt keine Schwärzung ein.

Ich möchte noch einen Versuch erwähnen, um Lachshämoglobin darzustellen. Ich versuchte nach allen möglichen Weisen Krystalle zu bekommen, es wollte mir aber nicht gelingen. Erst beim Einschliessen und Faulenlassen von Blut in Glasröhren bekam ich Krystalldrüsen und einzelne schöne rhombische Prismen zu Gesicht. Diesen Misserfolg glaube ich dem grossen Reichthum des Blutkuchens an Fett und Eiweiss zuschreiben zu müssen. Das Blut wurde Anfangs October gesammelt, in einer Zeit, wo der «Liquidationsprocess» beim Lachs ein reger ist. Beim Centrifugiren zum Trennen der Blutkörperchen sammelte sich an der Oberfläche eine wahre Rahmschicht. Nachträglich beim Faulenlassen schien sich noch Fett abzuscheiden und ich beobachtete zahlreiche Fettsäurekrystalle in einem amorphen Niederschlag.

Zum Schluss stelle ich noch die Resultate zusammen, die Zinoffsky und ich bekommen haben.

	Pferd (Zinoffsky):	Hund:	Huhn:
C	51,15	54,57	52,47
H	6,76	7,22	7,19
N	17,94	16,38	16,45
S	0,3899	0,568	0,8586
Fe	0,3351	0,336	0,3353
O	23,42	20,93	22,5
P	—	—	0,1973