

Einige Bemerkungen über phosphorhaltige Blutfarbstoffe.

Von

Dr. med. Y. Inoko.

(Aus der chemischen Abtheilung des physiologischen Instituts in Berlin.)
(Der Redaction zugegangen am 19. März 1893.)

Hoppe-Seyler¹⁾ zeigte bei seinen Untersuchungen über die Blutfarbstoffe, dass die Oxyhämoglobinkrystalle der Gans sich durch ihren Phosphorgehalt von den gleichen Krystallen anderer Blutarten unterscheiden. Derselbe Forscher wies bereits darauf hin²⁾, dass in diesem Falle das in den rothen Blutkörperchen vorhandene Nuclein in ursächlichem Zusammenhang mit dem Phosphorgehalt stehe, da die kernlosen Blutkörperchen auch phosphorfreie Oxyhämoglobinkrystalle liefern. Zu einem ähnlichen Resultate führten auch die Analysen der Krystalle des Hühnerblutes von Jaquet³⁾. Hoppe-Seyler erhielt in 3 Analysen 0,375—0,323—0,306 % P, Jaquet fand 0,197 % P im Oxyhämoglobin des Hühnerblutes. Wenn das Nuclein oder die Nucleinsäure in den Krystallen des Oxyhämoglobins enthalten ist, so liegt hier eine Verbindung vor, welche sehr interessant erscheinen muss. Bekanntlich betrachtet man die Nucleine als Verbindungen von Nucleinsäuren mit Eiweiss. Wenn es gelingt, eine solche Verbindung in kristallisirtem Zustande zu gewinnen, so ist dadurch die Möglichkeit gegeben, diese wichtigen Verbindungen genau zu charakterisiren. Ich

¹⁾ Medic.-chem. Untersuchungen, S. 169.

²⁾ Handbuch d. physiol. u. pathol.-chem. Analyse, 5. Aufl., S. 292.
Anmerkung.

³⁾ Diese Zeitschrift. Bd. 14. S. 289.

habe es daher auf Veranlassung von Herrn Prof. A. Kossel unternommen, die Frage zu entscheiden, ob die Vogelblutkrystalle Nucleinsäure enthalten und ob man durch Zusatz von Nucleinsäure zu Oxyhämoglobin eines Säugethieres eine analoge krystallisirende Verbindung erhalten kann.

I.

Da die Darstellung der Nucleinsäure als solcher bei den relativ geringen Mengen des zu Gebote stehenden Materials kaum möglich erschien, versuchte ich den Nachweis der Nucleinbasen, welche nach A. Kossel Zersetzungsproducte der Nucleinsäuren sind, zu führen.

Zu diesem Zwecke wurden 15 gr. Gänsebluthämoglobin, welche zweimal umkrystallisirt waren, gepulvert, in 150 cbcm. 1proc. Schwefelsäure suspendirt und auf dem Wasserbade drei Stunden lang gekocht, dann noch einmal 150 cbcm. 1proc. Schwefelsäure hinzugefügt und die Mischung direct über Drahtnetz erhitzt und zwar eine Stunde. Darauf mit Baryt stark alkalisch gemacht, auf dem Wasserbade eine Stunde erwärmt, Kohlensäure bis zur Uebersättigung durchgeleitet, alsdann filtrirt. Das Filtrat wurde durch verdünnte Schwefelsäure vom Baryt befreit und nach Neutralisation mit Ammoniak auf dem Wasserbade eingeengt bis auf etwa ein Viertel. Eine kleine Probe wurde mit ammoniakalischer Silberlösung behandelt, ohne dass jedoch irgend eine Fällung auftrat. Die weitere Untersuchung zeigte, dass eine beträchtliche Menge Pepton zugegen war, welches bekanntlich die Bildung des Silberniederschlages zu verhindern vermag. Um dasselbe zu entfernen, wurde die Flüssigkeit auf dem Wasserbade stark concentrirt, der Rückstand mit absolutem Alkohol versetzt und filtrirt. Das Filtrat wurde auf dem Wasserbade vom Alkohol befreit, die restirende Masse mit Wasser aufgenommen, worin sie sich nicht völlig klar auflöste, und filtrirt. Das Filtrat gab nun mit ammoniakalischer Silberlösung zwar sehr spärliche, aber immerhin deutlich flockige, weisse Fällung. Dieselbe wurde durch ein ganz kleines Filter abfiltrirt, mit Salpetersäure von 1,1 specif. Gewicht unter Zusatz von etwas

Harnstoff erwärmt und heiss filtrirt auf ein Uhrglas. Beim Erkalten entstand eine Fällung, die nach nochmaligem Lösen und Abscheiden eine krystallinische Beschaffenheit erlangte. Es gelang auf diese Weise, kleine gelbe Körnchen zu erhalten, die schon bei schwacher Vergrößerung als farblose Prismen ersichtlich waren, welche sich als doppelbrechend erwiesen. Diese Krystallconglomerate wurden zuerst durch Behandlung mit Ammoniakflüssigkeit von Salpetersäure befreit, mit etwas Wasser und einem Tropfen Salzsäure versetzt, über der Flamme vorsichtig erwärmt, durch einen Papierstreifen filtrirt und das Filtrat auf zwei Objectgläser vertheilt. Das eine wurde mit einem Deckglas bedeckt einfach hingestellt; das andere mit einem Tropfen Salzsäure und Goldchlorid versetzt und ebenfalls der Krystallisation überlassen. Nach einiger Zeit entstanden auf dem ersteren mikroskopische Krystalle, unter denen wir die dem salzsauren Adenin eigenthümlichen Prismen sehr deutlich sehen konnten. Auf dem andern Objectglas krystallisirte alsbald das Golddoppelsalz von Adenin in prächtigen gelben mikroskopischen Krystallen von prismatischer Gestalt.

Somit ist das Vorkommen des Adenins unter den Zersetzungsproducten des Gänsebluthämoglobins sicher nachgewiesen und hierdurch gewinnt die Ansicht, dass der Phosphorgehalt auf Nuclein oder Nucleinsäure zu beziehen sei, eine weitere Stütze.

II.

Die für die folgenden Versuche benutzte Nucleinsäure wurde nach einem mir von Prof. Kossel angegebenen, später zu publicirenden Verfahren aus Kalbsthymus dargestellt. Es standen mir 0,7 gr. völlig reine Substanz zu Gebote. Das Oxyhämoglobin erhielt ich nach der üblichen Methode aus Pferdeblut.

Es zeigte sich schon bei den ersten Versuchen, dass die Oxyhämoglobinlösung durch Zusatz von Nucleinsäure in Form eines klebrigen Niederschlages gefällt wird, ohne dass die optischen Eigenschaften eine Aenderung erfahren; auch nach einiger Zeit zeigten dieselben das reine Spectrum des Oxy-

hämoglobins. Es war bisher ausser dem Alkohol nur ein Fällungsmittel bekannt, welches das Oxyhämoglobin aus den Lösungen ohne tiefgreifende Veränderung niederschlägt, nämlich das bis zur Sättigung eingetragene Kaliumcarbonat. Beide Fällungsmittel können aber bekanntlich nur unter ganz besonderen Cautelen angewandt werden, ohne den Farbstoff zu verändern. Das Oxyhämoglobin bildet noch eine zweite Verbindung mit Nucleinsäure, welche in Wasser löslich ist und krystallisirt, und diese letztere habe ich in folgender Weise gewonnen.

Ich löste 10 gr. feuchtes Oxyhämoglobin in 100 ccm. 5 promill. Nucleinsäurelösung (Nucleinsäure = 0,5 gr.) bei 40° C., filtrirte rasch, liess auf 0° abkühlen, fügte dazu 25 ccm. absoluten Alkohol, der ebenfalls auf 0° abgekühlt war, und liess einen Tag unter 0° stehen. Es bildeten sich feine Krystalle, die sich bei mikroskopischer Betrachtung in der Form von Prismen zeigten. Die Krystalle filtrirte ich ab, löste sie bei 40° in Wasser, filtrirte, liess das Filtrat abkühlen, versetzte mit abgekühltem Alkohol und setzte der Kälte aus. Die ausgeschiedenen Krystalle wurden abfiltrirt, zwischen Fliesspapier abgepresst und im Exsiccator getrocknet. Sie waren phosphorhaltig. Eine Phosphorbestimmung nach der Molybdänmethode ergab folgendes:

1,1491 gr. auf 105°—110° C. bis zur Gewichtsconstanz getrockneten Krystallpulvers lieferten $0,017 \text{ Mg}_2 \text{ P}_2 \text{ O}_7 = 0,00475 \text{ P} = 0,413\% \text{ P}$.

Somit ergibt sich, dass bei Zusatz einer Nucleinsäurelösung zu dem Oxyhämoglobin des Pferdeblutes Krystalle erhalten werden, welche bezüglich ihres Phosphorgehaltes denen des Gänseblutes entsprechen.

Diese Versuche werden im hiesigen Laboratorium fortgesetzt werden.

Zum Schluss erlaube ich mir, Herrn Prof. Dr. A. Kossel für seine lebenswürdige Unterstützung meinen wärmsten Dank abzustatten. Ebenso danke ich seinem Assistenten Herrn Dr. Krüger.

Berlin, im März 1893.