

Ein Beitrag zur Spectroskopie des Blutes.

Von
Dr. V. Arnold.

Mit einer Abbildung.

(Aus dem Institut für physiologische Chemie der Universität zu Lemberg.)

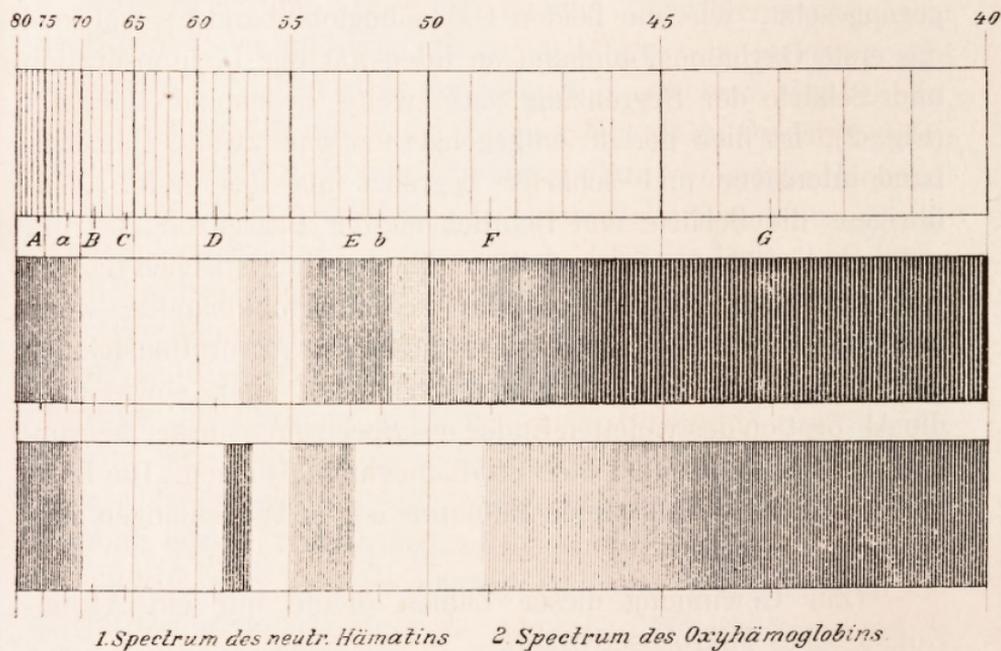
(Der Redaction zugegangen am 19. November 1899.)

Das Spectrum des neutralen Hämatins.

Das Hämatin ist nach den Angaben der Autoren (z. B. Neubauer-Vogel, Analyse des Harns 1898; Olof Hammarsten, Lehrbuch der physiolog. Chemie 1899 u. A.) unlöslich in Wasser, Alkohol, Aether und Chloroform. Bezüglich des spectralen Verhaltens desselben sind die Spectren des alkalischen Hämatins, des Hämatins in saurer Lösung und des reducirten Hämatins beschrieben worden. Ein Zwischenprodukt zwischen Hämatin und Hämochromogen haben 1890 Bertins-Sans und Moitessier beschrieben. Dasselbe ist durch ein auf D liegendes Absorptionsband charakterisirt. Ein neutrales Hämatinspectrum war bisher unbekannt.

Nun beobachtete ich, als ich eine alkoholische, stark mit Kalilauge versetzte Hämatinlösung neutralisirte, dass im Moment des Eintritts der neutralen Reaction die braune Farbe der Lösung in Roth umgeändert wurde, zugleich aber fiel mir auf, dass das Hämatin nur theilweise ausgefällt wurde, zum grossen Theil aber in (neutraler, alkoholischer) Lösung blieb. Erst durch stärkere Verdünnung mit destillirtem Wasser wurde das Hämatin ausgefällt. (Die alkalische Hämatinlösung erhielt ich auf diese Weise, dass ich frisches, defibrinirtes Blut in stark mit KOH versetzten Alkohol eintrug, worauf zum Sieden erhitzt und durch Glaswolle filtrirt wurde.)

Dass das Hämatin — entgegen der Eingangs erwähnten Ansicht von der Unlöslichkeit des Hämatins in Alkohol, hier in Lösung verblieb, musste ich auf den Umstand beziehen, dass die Lösung bei dem von mir gewählten Verfahren reich an Neutralsalz war und dass dieser Gehalt an Neutralsalz die Löslichkeit des Hämatins in Alkohol bedingte. Das ausgeschiedene, auf dem Filter gut ausgewaschene und getrocknete Hämatin erwies sich nämlich unlöslich in Wasser, in concentrirten wässerigen Lösungen von Neutralsalzen (Ammonsulfat, NaCl), in reinem absoluten und verdünnten Alkohol:



wurde es jedoch mit einer alkoholischen Lösung eines Neutralsalzes (ich verwendete NaCl und Ammonsulfat) erwärmt, so löste es sich mit ziemlicher Leichtigkeit. Die erhaltene neutrale Hämatinlösung wurde nun auf ihre spektroskopischen und sonstigen Eigenschaften hin untersucht. Eine solche Lösung ist deutlich roth gefärbt. Sie besitzt bei geeigneter Verdünnung ein charakteristisches, aus zwei Bändern bestehendes Absorptionsspectrum, welches zwischen den Fraunhofer'schen Linien D und b eingeschlossen ist (Fig. 1).

Diese Bänder sind jedoch im Vergleich zu dem Spectrum des Oxyhämoglobins deutlich gegen das violette Ende des Spectrums verschoben, so dass das erste Band von der D-Linie durch einen entsprechend breiten Zwischenraum getrennt ist. Auch das zweite Hämatinband ist im Vergleich zum entsprechenden Oxyhämoglobinband gegen das violette Ende verschoben; es reicht übrigens mit seinem rechten Rande ein wenig über die b-Linie hinaus, während das zweite Oxyhämoglobinband diese Linie nicht erreicht, indem es etwa mit E abschliesst. Ausserdem verhalten sich die beiden Bänder bezüglich ihres Intensitätsverhältnisses zu einander gerade entgegengesetzt, wie die beiden Oxyhämoglobinbänder: während das erste Oxyhämoglobinband an Intensität der Lichtabsorption und Schärfe der Begrenzung das zweite bedeutend übertrifft (Fig. 2), ist hier gerade entgegengesetzt das zweite Hämatinband intensiver und schärfer begrenzt als das erste. Was übrigens die Schärfe und Deutlichkeit der Begrenzung betrifft, so sind die für das neutrale Hämatin charakteristischen Bänder weniger scharf begrenzt als die Oxyhämoglobinbänder, wozu noch der Umstand beiträgt, dass die beiden Absorptionsbänder durch einen schwachen Schatten verbunden sind, sowie dass die Absorption des violetten Endes des Spectrums stärker hervortritt als bei gleich gefärbten Oxyhämoglobinlösungen. Die Lage beider Bänder des neutralen Hämatins ist, in Wellenlängen ausgedrückt, folgende:

(Zur Gewinnung dieser Zahlen diente mir ein Abbe-Zeiss'sches Mikrospectroskop.)

Band 1. λ 575—556.

Band 2. λ 546—516.

Behufs exacter Feststellung des Ortes beider Absorptionsbänder wurde das Spectrum des neutralen Hämatins noch vermittelst eines grossen Spectroskops von Krüss (bei Verwendung von 2 Prismen) untersucht. Die vermittelst dieses Instrumentes gewonnenen Zahlen wichen übrigens kaum von den mitgetheilten ab:

Band 1. λ 576—555.

Band 2. λ 545—518.

Des Vergleiches halber wurde mit demselben Instrumente auch eine Oxyhämoglobinlösung untersucht:

Band 1. λ 582—571.

Band 2. λ 550—526.

Die wichtigste Eigenschaft einer neutralen Hämatinlösung ist jedenfalls die, dass die rothe Lösung beim Erhitzen ihre Farbe in Braun ändert, während gleichzeitig an Stelle des charakteristischen neutralen Spectrums das Absorptionsband des alkalischen Hämatins tritt; beim Abkühlen der Lösung restituirt sich zugleich mit der ursprünglichen rothen Färbung auch das neutrale Spectrum. Dies ist für die Charakterisirung einer neutralen Hämatinlösung um so wichtiger, als nicht nur das Spectrum derselben dem Oxyhämoglobinspectrum ähnlich ist, sondern auch die Farbe der Lösung lebhaft an Oxyhämoglobin erinnert, derart, dass eine stärker verdünnte neutrale Hämatinlösung von einer verdünnten Oxyhämoglobinlösung nur schwer ohne Spectroskop zu unterscheiden ist, da beide denselben röthlichgelben Farbenton besitzen. Beim Erhitzen würde sich eine Oxyhämoglobinlösung trüben, während eine klare Hämatinlösung selbstverständlich auch beim Erhitzen klar bleibt. Was übrigens die Färbung einer neutralen Hämatinlösung betrifft, so tritt diese Schwierigkeit der Unterscheidung derselben von einer Oxyhämoglobinlösung hauptsächlich bei stärkerer Verdünnung hervor. Concentrirtere Lösungen unterscheiden sich doch darin, dass eine Oxyhämoglobinlösung lebhafter roth erscheint, während das Roth der neutralen Hämatinlösung jedenfalls stumpfer und matter ist, sowie einen Stich ins Gelbe zeigt. (Dies tritt besonders im auffallenden Licht deutlich hervor.) Verdünnt man eine neutrale Hämatinlösung sowie eine Oxyhämoglobinlösung derart, dass ihre Farbenintensität dem Auge gleich erscheint, so bemerkt man, dass bei einer Verdünnung, bei welcher das Spectrum des neutralen Hämatins schon verschwindet, die beiden Bänder des Oxyhämoglobins noch sehr scharf hervortreten, sowie bei weiterer Verdünnung noch ziemlich lange sichtbar bleiben. Ausgefälltes neutrales Hämatin erscheint, wenn man dasselbe zwischen zwei Glasplatten zu einer durchsichtigen Schicht

durch starken Druck ausbreitet, roth mit leicht gelblichem Farbenton.

Was die weiteren Eigenschaften einer neutralen Hämatinlösung betrifft, so ist für diese noch charakteristisch, dass eine klare Lösung, die also eine zur Auflösung des Hämamins genügende Menge Neutralsalz enthält, durch Verdünnen mit destillirtem Wasser oder reinem Alkohol sich trübt und ihr Hämatin in Form von fleischfarbenen Flöckchen ausfallen lässt. Eine solche, eine ungenügende Menge Neutralsalz enthaltende Lösung wird sich beim Erwärmen klären, indem sich das ausgefällte Hämatin im Alkohol löst, beim Abkühlen der Lösung aber wird wieder ein Theil des Hämamins ausgefällt werden.

Setzt man einer neutralen Hämatinlösung auch nur die geringste Menge Kalilauge zu, so wird die Lösung braun und es erscheint das Spectrum des alkalischen Hämamins. Gegen den Zusatz von Säure ist dagegen die Lösung um ein Bedeutendes weniger empfindlich und sie verändert sich dementsprechend nur langsam. Zuerst bemerkt man, dass das erste Hämatinband verwaschen auszusehen beginnt; bei weiterem Säurezusatz verschwindet dann dasselbe, worauf auch das zweite Band an Intensität und Schärfe der Begrenzung verliert und etwas nach vorn rückt. Gleichzeitig damit tritt das Band zwischen C und D auf. Die Lösung hat mittlerweile ihre rothe Färbung eingebüsst und ist braun geworden.

Ich habe mir nun die Frage vorgelegt, unter welchen Umständen das neutrale Hämatin aus dem Blutfarbstoff entsteht, und habe gefunden, dass überall dort, wo der Blutfarbstoff in neutraler Lösung in seine Componenten zerfällt, der Farbstoff als neutrales Hämatin abgespalten wird.

Am leichtesten bewirkt man diese Umwandlung in neutrales Hämatin bei Verwendung von Methämoglobin, was darauf hinweist, dass das Methämoglobin ein viel lockereres Molekulargefüge besitzt, als das Oxyhämoglobin. Ich habe mit Methämoglobinlösungen folgende Versuche vorgenommen: Wird eine Methämoglobinlösung mit demselben Volumen concentrirten Alkohols versetzt, so ändert sich augenblicklich die Färbung der braunen Lösung in ein helles Roth; das Spectrum des

Methämoglobins verschwindet: die Lösung trübt sich sogleich und lässt nach kurzer Zeit neutrales Hämatin ausfallen. Den ganzen Vorgang kann man mit dem Spectroskop verfolgen, wenn man entweder die Methämoglobinlösung oder den Alkohol mit einer genügenden Menge einer concentrirten Neutralsalzlösung versetzt, da in diesem Falle die Trübung der Lösung und die Ausfällung des Hämatins ausbleiben und die Lösung bequem spectroskopisch untersucht werden kann. Man bemerkt in diesem Fall, dass gleichzeitig mit dem Umschlag der braunen Färbung in Roth das Methämoglobinspectrum verschwindet; an Stelle desselben treten fast augenblicklich die beiden Bänder des neutralen Hämatins auf. Dass wir es hier in der That mit neutralem Hämatin zu thun haben, dies wird ausser der Lage und den sonstigen Eigenschaften dieses Spectrums noch durch das Verhalten der Lösung beim Erhitzen derselben bewiesen (Auftreten des Bandes vor D; Restituierung des neutralen Hämatinspectrums beim Abkühlen der Lösung. Zugleich bemerken wir den schon oben erwähnten Farbenwechsel: Die erhitzte Lösung wird braun, beim Abkühlen erscheint jedoch zugleich mit dem neutralen Spectrum auch die rothe Färbung. Die Lösung trübt sich beim Erhitzen nicht, was bei einer Oxyhämoglobinlösung der Fall sein müsste. Die ausgefällten fleischrothen Flöckchen sind in Wasser, auch beim Erwärmen, vollkommen unlöslich, lösen sich aber in alkoholischer Lösung eines Neutralsalzes). Ueberhaupt gestattet uns das geschilderte Verhalten einer Methämoglobinlösung auf die bequemste Weise, eine neutrale Hämatinlösung zu erhalten, um das Spectrum und die sonstigen Eigenschaften einer solchen Lösung zu untersuchen. (Uebrigens wird durch Alkohol auch eine Oxyhämoglobinlösung in derselben Weise verändert, wie eine Methämoglobinlösung, das ist, es wird neutrales Hämatin abgespalten.)

Im Gegensatz zum Oxyhämoglobin wird aber das Methämoglobin auch durch viel unbedeutendere Eingriffe in derselben Richtung verändert. So genügt mehrmaliges Schütteln mit Chloroform, um die braune Färbung einer Methämoglobinlösung in Hellroth unzuwandeln und den Farbstoff als neutrales Hämatin

auszufällen. Fügt man jetzt etwa $\frac{1}{3}$ Volumen Alkohol hinzu, so wird — nachdem man die Eprouvette einmal umgewendet hat — das ausgefällte Hämatin durch das anhaftende Chloroform in Gestalt eines schön rothen Niederschlages zu Boden gerissen. Man kann dieses sehr charakteristische Verhalten einer Methämoglobinlösung recht gut — wie ich an anderer Stelle ausführlicher mittheilen will — zum qualitativen Nachweis desselben, z. B. im Harn, benutzen. Dieser rothe Niederschlag besitzt die Eigenschaften ausgefällten neutralen Hämamins: Rothe Farbe, vollständige Unlöslichkeit in kaltem oder auf 35° C. erwärmtem destillirten Wasser, charakteristisches Spectrum des neutralen Hämamins u. s. w. Im Gegensatz zum Methämoglobin zeigt eine mit Chloroform geschüttelte Oxyhämoglobinlösung in derselben Zeit (ja sogar nach 24 Stunden) keine sichtbare Veränderung.

Auch Aether bewirkt in einer Methämoglobinlösung dieselbe Abspaltung des neutralen Hämamins, wiewohl diese Einwirkung hier nicht so energisch verläuft, so dass noch nach 24 Stunden neben ausgeschiedenem Hämatin gelöstes Methämoglobin nachweisbar ist. Eine Oxyhämoglobinlösung wird in derselben Zeit durch Aether nicht sichtbar verändert. Dass es sich in beiden Fällen um neutrales Hämatin handelte, dies konnte ich, abgesehen davon, dass diese Niederschläge dieselbe Färbung und dieselben Löslichkeitsverhältnisse besaßen, wie das aus Hämatinalkali gewonnene neutrale Hämatin, durch spectroscopische Untersuchung desselben feststellen. Zu diesem Zwecke wurde der ausgewaschene Niederschlag noch etwas feucht zwischen zwei Glasplatten einem starken Drucke ausgesetzt, so dass er sich zu einer durchsichtigen Schicht ausbreitete, die bequem spectroscopisch untersucht werden konnte. Es konnten auf diese Weise diese Niederschläge in ihrem ursprünglichen unveränderten Zustande untersucht werden. Sie boten alle das Spectrum des neutralen Hämamins.

Das Resumé dieser Studie lässt sich in folgenden Sätzen zusammenfassen:

1. Eine neutrale Hämatinlösung ist von rother Farbe, mit einem Stich ins Gelbe; stark verdünnte Lösungen

sind gelblichroth, wie stark verdünnte Oxyhämoglobinlösungen.

2. Man erlangt eine solche neutrale Hämatinlösung am bequemsten, wenn man eine Methämoglobinlösung mit genügender Quantität Neutralsalz versetzt (NaCl) und dann $\frac{1}{3}$ — $\frac{1}{2}$ Volumen Alkohol zusetzt; das Neutralsalz verhindert die Ausfällung des Hämatins und hält dasselbe in Lösung. Durch Neutralisiren einer alkoholischen, mit Kalilauge versetzten Hämatinlösung gelangt man zu demselben Ergebniss.
3. Eine solche neutrale Hämatinlösung besitzt ein charakteristisches, aus zwei Bändern bestehendes Absorptionsspectrum, welches zwischen den Frauenhofer'schen Linien D und b eingeschlossen ist; das zweite Band ist intensiver und besser begrenzt als das erste.
4. Die charakteristische Eigenschaft einer neutralen Hämatinlösung ist der Umschlag der rothen Farbe in Braun beim Erhitzen; gleichzeitig verschwindet das Spectrum des neutralen Hämatins, um dem Absorptionsband des alkalischen Hämatins Platz zu machen. Beim Abkühlen der Lösung restituirt sich zugleich mit der ursprünglichen rothen Farbe der Lösung auch das ursprüngliche neutrale Spectrum. Eine weitere Eigenschaft einer neutralen Hämatinlösung wäre die Trübung beim Verdünnen derselben mit destillirtem Wasser, da zur Auflösung des Hämatins ein gewisser Gehalt an Neutralsalz Erforderniss ist. Diese beiden Eigenschaften charakterisiren eine neutrale Hämatinlösung hinlänglich einer Oxyhämoglobinlösung gegenüber.

Es sei mir gestattet, Herrn Prof. Niemilowicz am Schlusse dieser Abhandlung für die mir gewährte Unterstützung meinen lebhaften Dank abzustatten.

Lemberg, am 12. November 1899.
