

Ueber die Einwirkung von Chloroform und Chloralhydrat auf den Blutfarbstoff.

Von
Docent Dr. **Em. Formánek.**

(Aus dem Institute für angew. medicinische Chemie der böhm. Universität in Prag.
(Der Redaction zugegangen am 23. April 1900.)

Bei den Untersuchungen über die Vorstufen der Harnsäure benützte im Jahre 1891 Professor Horbaczewski zur Sterilisirung einer faulenden Flüssigkeit, welche auf ungefähr 40–50° C. erwärmt war, Chloroform. Bei dieser Gelegenheit beobachtete er, dass der Blutfarbstoff von Chloroform gefällt wurde.

Diesen Umstand weiter zu verfolgen, ist der Zweck der vorliegenden Arbeit.

In dieser Richtung sind folgende Versuche angestellt worden:

Zweimal umkrystallisirtes Oxyhämoglobin wurde in Wasser gelöst, auf 50–55° C. erwärmt und mit Chloroform geschüttelt. Es bildete sich ein feinflockiger Niederschlag, der eine sehr schwache Tendenz zum Absetzen zeigte. Nach der Filtration wurde eine klare Flüssigkeit erhalten, in welcher der Blutfarbstoff spectroscopisch nicht nachweisbar war. Es unterliegt also keinem Zweifel, dass auch ein ziemlich reines Hämoglobin mit Chloroform vollkommen gefällt wird. Es handelte sich nun darum, sich eine grössere Menge dieser Verbindung in reinem Zustande darzustellen, um analytisch ihre Zusammensetzung feststellen zu können.

Zu diesem Zwecke wurden vier Liter defibrinirten Pferdeblutes mit 36 Liter 3% iger Kochsalzlösung sedimentirt, von

den abgesetzten Blutkörperchen wurde die darüber stehende Flüssigkeit mittelst eines Hebers abgezogen und aus denselben mit Hilfe eines gleichen Volumens Aethers eine lackfarbene Lösung des Blutfarbstoffes bereitet.

Die klar filtrirte Flüssigkeit wurde zur Darstellung der Chloroformverbindung benützt. Es muss hervorgehoben werden, dass alle geschilderten Operationen nahe bei 0° und in freier Luft durchgeführt wurden.

Die oben erwähnte klare Lösung wurde in eine 10 Liter fassende Flasche gegeben, auf 50—55° C. erwärmt, mit 200 g Chloroform versetzt, mit gut eingeschliffenem Glasstöpsel verschlossen und geschüttelt. Das Schütteln geschah in grösseren Intervallen, wobei die sich bildenden Chloroformdämpfe durch vorsichtiges öfteres Öffnen des Stöpsels ausgelassen wurden. Nach einigen Minuten des Schüttelns wurde die Flasche wieder in ein auf 55° C. erwärmtes Wasser gestellt.

Die Flüssigkeit trübte sich und es bildete sich langsam ein flockiger Niederschlag, der sich nach einigen Stunden zu Boden setzte. Am nächsten Tage wurde die farblose, über dem Niederschlage stehende Flüssigkeit, welche bei der spectrokopischen Untersuchung keine Absorptionsstreifen zeigte, mittelst eines Hebers abgezogen und der Niederschlag viermal mit je 9 Liter einer 2%igen Kochsalzlösung gewaschen. Um das Kochsalz zu entfernen, wurde der Niederschlag viermal mit destillirtem Wasser decantirt, hierauf in 96%igen, dann in absoluten Alkohol und schliesslich in Aether gebracht. Vom Aether wurde abfiltrirt und der Niederschlag an freier Luft getrocknet.

Derselbe stellte eine ziegelrothe Masse dar, welche nach völligem Austrocknen in ein sehr feines Pulver zerfiel.

Die Masse wurde nun bei 130° C. im Trockenkasten zum constanten Gewichte getrocknet und ein Theil derselben mit Soda und Salpeter verbrannt. In der wässerigen, mit Salpetersäure angesäuerten Lösung der Schmelze konnte mittelst salpetersauren Silbers Chlor nicht nachgewiesen werden. Der Niederschlag besteht demnach nicht aus einer Chloroformverbindung des Blutfarbstoffes, sondern es wurde das Chloro-

form bereits durch Einwirkung von Alkohol und Aether u. s. w. dem Niederschlage entzogen.

Nun lag die Vermuthung nahe, dass dieser Niederschlag ein mit Alkohol gefällter Blutfarbstoff sei. Behufs Entscheidung dieser Vermuthung wurde in der Substanz der Stickstoff nach Kjeldahl und das Eisen elektrolytisch bestimmt.

2,215 g der bei 130° C. getrockneten Substanz gaben 0,3584 g Stickstoff entsprechend 16,20%.

1,7426 g derselben Substanz wurden in einem Platintiegel verascht, mit saurem schwefelsauren Kali geschmolzen, in Wasser gelöst, mit Ammoniak vorsichtig neutralisirt, mit 3 g oxalsauren Ammons versetzt und bei 1 Ampère und 2,5 Volt das Eisen elektrolytisch bestimmt. Es ergaben sich 0,0068 g Eisen, entsprechend 0,33%.

Da das Pferdehämoglobin 17,31—17,94% Stickstoff enthält, war es klar, dass dieses Präparat entweder kein Oxyhämoglobin ist, oder dass es eine Mischung von Blutfarbstoff und anderen Eiweissstoffen des Blutes sei, wobei man annehmen müsste, dass das Chloroform auch andere Eiweissstoffe mitgefällt hat.

Um sich über die Zusammensetzung des Niederschlages näher zu orientiren, wurde ein neues Präparat durch Fällung des Oxyhämoglobins mit Chloroform bereitet, mehrmals auf der Centrifuge mit Wasser gewaschen, die obere Schichte des Niederschlages möglichst chloroformfrei abgegossen, durch Zusatz von 1—2 Tropfen Soda gelöst und spectroscopisch untersucht. Die Lösung zeigte zwei schwache Absorptionsstreifen des Oxyhämoglobins. Wurde nun die Lösung mit Schwefelammonium versetzt, so verschwanden die zwei Streifen und es entstand der eine Absorptionsstreifen des Hämoglobins. Dieser Streifen war in der Mitte ein wenig dunkler und im Roth war zugleich ein schwacher Absorptionsstreifen zu sehen: der letztere gehörte dem Thiohämoglobin, die Verstärkung des Hämoglobinstreifens rührte davon her, dass sich auch ein wenig Hämatin bildete, welches durch Einwirkung von Schwefelammonium Hämochromogen gab, dessen Absorptionsstreifen die Mitte des Hämoglobinstreifens verstärkte.

Benützt man als Reductionsmittel das basische weinsaure Eisenoxydul, bleibt die Linie im Roth aus, der Hämoglobinstreifen besitzt aber eine starke Schattirung in der Mitte, was jedenfalls durch Hämochromogen, welches aus dem Hämatin entsteht, bewirkt wird.

Aus diesem Verhalten sieht man, dass aus dem Chloroformniederschlage des Oxyhämoglobins dieses letztere wieder erhalten werden kann.

Bei der Behandlung des Niederschlages mit Alkohol wird das Chloroform aus dem Niederschlage entfernt und der letztere in ein schwerer lösliches Oxyhämoglobin verwandelt.

Das Verhalten des Chloroforms zu den Eiweissstoffen wurde an einer Lösung von Eiereiweiss und am Blutserum geprüft.

Das Blutserum wird bei saurer Reaction bei einer Temperatur von $50-55^{\circ}$ C. ziemlich rasch gefällt, ebenso bei neutraler Reaction, während bei alkalischer Reaction, dasselbe nicht gefällt wird. Bei gewöhnlicher Temperatur ist die Wirkung des Chloroforms eine langsamere.

Das Eiereiweiss wird bei einer Temperatur von $50-55^{\circ}$ C. bei der sauren Reaction ziemlich gut, bei der neutralen sehr rasch, bei der alkalischen Reaction gar nicht gefällt. Die Einwirkung von Chloroform auf Eiereiweiss ist auch bei gewöhnlicher Temperatur wahrnehmbar und zwar ist dieselbe stärker als bei den Eiweissstoffen des Blutserums.

Zugleich ersieht man aus diesem Verhalten, dass die Eigenschaft des Chloroforms, Blutfarbstoff zu fällen, zur quantitativen Bestimmung des Blutfarbstoffes direkt nicht benützt werden kann, da eben auch andere Eiweissstoffe mitgefällt werden.

Lässt man Chloroform auf Methämoglobin einwirken, so wird dasselbe schon bei gewöhnlicher Temperatur gefällt: bei Temperaturen von $50-55^{\circ}$ C. ist die Einwirkung eine noch raschere.

Es kann aber dieses Verhalten wohl zum qualitativen Nachweise des Blutfarbstoffes dienen, besonders in solchen Fällen, wo eine kleine Menge Blutfarbstoff in einer grosse

Menge Flüssigkeit enthalten ist, so z. B. im Harn. Man kann durch Chloroform den Blutfarbstoff fällen und den Niederschlag, da sich derselbe gewöhnlich schlecht absetzt, durch Zusatz von etwas Calciumchlorid und phosphorsaurem Natron zum Absetzen bringen, einige Male mit Wasser waschen, filtriren, dann im Wasser unter Sodazusatz auflösen, die Lösung filtriren und spectroscopisch untersuchen.

Noch vortheilhafter kann man aber diese Eigenschaft des Chloroforms in der präparativen Chemie benützen, wenn man aus einer Flüssigkeit, die man nicht erhitzen darf, Blutfarbstoff entfernen will. Hierbei ist die Benützung des Chloroforms besonders vortheilhaft, weil dasselbe aus dem Filtrate sehr leicht entfernt werden kann, schon durch Durchleiten von Luft, durch schwaches Erwärmen, besonders im Vacuum.

Weiter wurde auch das Verhalten des Chloralhydrats zum Blutserum, Eiereiweiss und Blutfarbstoff geprüft.

Das Eiereiweiss wird bei saurer Reaction von Chlorhydrat nicht gefällt, bei neutraler Reaction entsteht ein schwacher, bei alkalischer Reaction ein starker Niederschlag, wobei sich Chloroform entwickelt. Ganz analog verhält sich das Chloralhydrat zu den Eiweissstoffen des Blutserums.

Was das Verhalten des Chloralhydrats zum Oxyhämoglobin anbelangt, so wird dasselbe mit Chloralhydrat gefällt; der Niederschlag kann nach dem Entfernen des Chloralhydrats im Wasser unter Zusatz von 1—2 Tropfen Soda gelöst und in der Lösung das Oxyhämoglobin spectroscopisch nachgewiesen werden.

Das Bromoform verhält sich dem Chloroform ganz analog, nur ist die Einwirkung seiner schweren Flüchtigkeit zufolge eine langsamere.

Im December vorigen Jahres erschien eine Arbeit des Herrn Dr. V. Arnold,¹⁾ in welcher es heisst: Im Gegensatz zum Oxyhämoglobin wird aber das Methämoglobin durch viel unbedeutendere Eingriffe in derselben Richtung verändert. Es

¹⁾ Ein Beitrag zur Spectroskopie des Blutes. Diese Zeitschrift. Bd. XXIX, S. 78—85.

genügt ein mehrmaliges Schütteln mit Chloroform, um braune Färbung einer Methämoglobinlösung in Hellroth umzuwandeln und den Blutfarbstoff als neutrales Hämatin auszufällen. Fügt man jetzt etwa $\frac{1}{3}$ Volumen Alkohol hinzu, so wird — nachdem man die Eprouvete 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, benützen. Dieser rothe Niederschlag besitzt die Eigenschaften ausgefallten neutralen Hämatins, rothe Farbe, vollständige Unlöslichkeit in kaltem oder auf 35°C . erwärmtem destillirten Wasser, charakteristisches Spectrum des neutralen Hämatins u. s. w. Im Gegensatz zum Methämoglobin zeigt eine mit Chloroform geschüttelte Oxyhämoglobinlösung in derselben Zeit (ja sogar nach 24 Stunden) keine sichtbare Veränderung.

Hierzu wäre Folgendes zu bemerken:

1. Der Verfasser glaubt, dass Oxyhämoglobinlösungen durch Schütteln mit Chloroform nicht gefällt werden. Diese Beobachtung bezieht sich offenbar auf Zimmertemperatur, wobei das Chloroform nur wenig auf das Oxyhämoglobin einwirkt, dasselbe jedoch bei längerer Einwirkung zum Theile fällt. Erwärmt man aber eine Oxyhämoglobinlösung auf etwa 50°C . und schüttelt, so wird das Oxyhämoglobin vollkommen gefällt.

2. Der Verfasser hält den Chloroformniederschlag für neutrales Hämatin. Hierzu wäre zu bemerken, dass das Hämatin 9,46% Stickstoff (Nencki-Sieber), während der Chloroform-Niederschlag, wie oben angeführt, 16% Stickstoff enthält und für eine Mischung von gefälltem Blutfarbstoff und anderen Eiweissstoffen des Blutes gehalten werden muss. Es unterliegt daher keinem Zweifel, dass dieser Körper kein Hämatin ist.

3. Mischt man eine Oxyhämoglobinlösung mit concentrirter Kochsalzlösung und Alkohol, so verhält sich diese Lösung

dem «neutralen Hämatin» Arnold's ganz analog: gibt die zwei von ihm beschriebenen Absorptionsstreifen, färbt sich beim Erwärmen braun und gibt dann ein Spectrum, welches demjenigen des alkalischen Hämatins ähnlich ist.

Man sieht also, dass das «neutrale Hämatin» Arnold's auch ohne Chloroform erhalten werden kann.