

Ueber das durch Pepsin-Salzsäure aus Oxyhämoglobin entstehende Hämatin und Hämochromogen.

Von

Dr. Rich. v. Zeynek.

Mit einer Abbildung.

(Aus dem Laboratorium für medic. Chemie in Wien.)

(Der Redaction zugegangen am 18. Juni 1900.)

Aus den nicht unbeträchtlich von einander differirenden Analysenergebnissen mancher nach verschiedenen Methoden dargestellten Hämatine scheint hervorzugehen, dass die Zerreißung des grossen Hämoglobinkmoleküls unter Abspaltung des eisenhaltigen Farbcomplexes nicht immer an der gleichen Stelle erfolgt. Neben den Analysendifferenzen zeigen auch manche Hämatine in Bezug auf ihre Löslichkeitsverhältnisse Verschiedenheiten. — Auffallend erscheint, dass eine naheliegende Methode zur Abspaltung des Hämatins aus dem Blutfarbstoff bisher noch nicht verwendet worden ist, die Ablösung des Farbcomplexes durch Verdauung.

Dass im Magen aus dem Blutfarbstoff Hämatin entsteht, ist lange bekannt. Mehr jedoch als die Notirung dieser Beobachtung war mir in der chemischen Litteratur nicht auffindbar. Sollte es gelingen, durch die Pepsinverdauung aus Blutfarbstoff Hämatin darzustellen, so hätte diese Darstellungsart für sich, mit den mildesten Mitteln, einer Säureconcentration, die das Hämatineisen sicher intact lässt, bei relativ niedriger Temperatur und doch unter gleichzeitiger, weitgehender Zerstörung des Eiweisscomplexes die Loslösung des Hämatins zu bewirken; andererseits dürfte die Verfolgung dieses Processes von physiologischem Interesse sein. Ich habe mich mit dem Studium

der Verdauung des Blutfarbstoffs vorerst in der Vorstellung befasst, es werde dadurch, dass die vollständige Lostrennung des Hämatins erst erfolgen dürfte, wenn schon die Eiweisscomponente des Blutfarbstoffes weitgehend zerstört ist, ein möglichst kleines Hämatinmolekül erhalten werden. Unter den Versuchsbedingungen, welche ich eingehalten habe, scheint jedoch die Wirkung der Salzsäure rascher einzutreten, als dieser vorgefassten Meinung entsprach.

Der Verdauung wurden Lösungen von Oxyhämoglobinkrystallen aus Pferdeblut unterworfen. Sie waren aus einem Blutkörperchenbrei im Beginne der Fäulniss desselben dargestellt worden und wurden einmal umkrystallisirt. Die Concentration der Oxyhämoglobinlösungen betrug etwa 5%. Die klaren Lösungen wurden mit Sauerstoff gesättigt, hierauf mit so viel Salzsäure versetzt, dass der Salzsäuregehalt 0,2—0,3% betrug; dann wurden sie mit einer Auflösung eines gut wirkenden Pepsinpräparates in 0,4%iger Salzsäure versetzt und bei 38—40° mehrere Tage sich überlassen. Die ursprünglich dünnflüssigen Blutfarbstofflösungen werden bald gallertig dickflüssig; bei mikroskopischer Betrachtung sieht man hellbraune Schollen, daneben kleine schwarze Körner. Nach einiger Zeit wird die zersetzte Blutfarbstofflösung wiederum dünnflüssig. Als keine Consistenzänderung mehr eintrat, wurde die Flüssigkeit mit 0,4%iger Salzsäure stark verdünnt. Es setzte sich nun ein brauner Niederschlag zu Boden. Die über dem Niederschlag befindliche Flüssigkeit ist braun gefärbt, sie enthält nur sehr geringe, durch Ferrocyankalium nachweisbare Spuren von Eisen. Mit Ammoniak und Hydrazinhydrat färbt sie sich kirschroth und zeigt ein hämochromogenartiges Spectrum. Der Bodensatz ist nun ein feiner brauner Schlamm von Hämatin, dem wenig grosse hellgelbe Schollen beigemengt sind. Um diese zu lösen, wurde der Hämatinschlamm mit 1%iger Salzsäure verrührt, eine Abspaltung von Eisen, durch Ferrocyankalium nachweisbar, erfolgt dadurch nicht.¹⁾ Nachdem bei mikroskopischer Untersuchung dem Schlamme keine Schollen mehr beigemengt gefunden wurden, wurde der Schlamm durch Decantation mit

¹⁾ Vergl. Küster, Diese Zeitschr., Bd. XXIX, S. 190.

Wasser gut gewaschen, bis das Waschwasser neutral reagirte und ungefärbt blieb, hierauf auf einem Filter gesammelt.

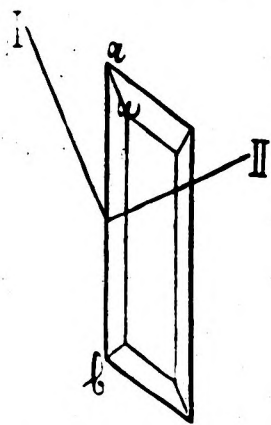
Das so erhaltene Hämatin löst sich wenig in Weingeist, leicht in verdünnten Alkalien. Die Lösungen haben das typische Aussehen von Hämatinlösungen, auf Zusatz von Hydrazinhydrat wird das Hämochromogenspectrum sehr schön erhalten. Da das Hämatinpulver durch sein wenig charakteristisches mikroskopisches Aussehen nicht genügende Sicherheit gibt, eine analysenreine Substanz zu sein, habe ich zur möglichsten Garantie der Reinheit versucht, aus diesem Hämatin Häminkrystalle behufs Ausführung von Elementaranalysen herzustellen.

Als ein sehr brauchbares Verfahren erwies sich, den noch feuchten Schlamm in Aceton zu suspendiren und in kleinen Antheilen gewöhnliche Salzsäure zuzusetzen, etwas mehr, als zur Häminbildung nothwendig ist. Es wurden für 1 g Hämatin ca. 0,06—0,08 g Chlorwasserstoff verwendet. Rasch nach dem Salzsäurezusatz gehen die Hämatinkörner in Lösung, die Flüssigkeit erwärmt sich dabei in geringem Maasse; nach kurzer Zeit beginnt die Ausscheidung von prächtigen mikroskopischen Häminkrystallen, welche nach einigen Stunden beendet zu sein scheint. Die von den Krystallen abgossene braune Flüssigkeit lässt nach dem Verdünnen mit Wasser noch Krystalle ausfallen, letztere waren aber niemals besonders schön ausgebildet. In der Acetonlösung konnte, wie mehrmals geprüft wurde, durch Ferrocyankalium kein Eisen nachgewiesen werden.

Die ersterwähnten Krystalle sind durchweg sehr schön ausgebildet, niemals verzerrt. Es finden sich Einzelindividuen, etwa von der Form der Krystalle des Doppelspats, ferner Drusen von sternförmig gruppirten Nadeln. Obwohl keine makroskopischen Individuen zu erhalten waren, schien mir eine möglichst genaue krystallographische Untersuchung der Krystalle wünschenswerth. Für die Ausführung derselben bin ich meinem Freund, Herrn Prof. Dr. A. Pelikan, zu besonderem Danke verpflichtet.

Man sieht im Mikroskope säulenförmige Krystalle mit schieferm Ende, ähnlich wie dies bei den Gypskryställchen der Fall ist. Eine goniometrische Behandlung ist unmöglich, da

die Dimensionen zu gering sind. Die Dicke der Säulchen beträgt ca. 0,01 mm., die Länge das Vier- bis Sechsfache dieses Werthes. Derartige Formen können triklin, monoklin, selbst rhomboedrisch sein. Das letztere scheint das wenigst Wahrscheinliche, da man ab und zu Flächen in der Anordnung



wahrnimmt, wie sie in der Figur angedeutet ist. Der Winkel ω beträgt (natürlich gemessen in der Ebene des Tisches) ca. 63° . Die eine Auslöschungsrichtung I bildet mit $a b$ einen Winkel von ca. $44\text{—}45^\circ$, die andere II, senkrecht zur ersten, theilt den stumpfen Winkel in zwei Theile mit 71 bzw. 46° . Schwingungsrichtung I ist Axe der kleineren, II ist Axe

der grösseren Elasticität. Lichtschwingungen nach I sind dunkelbraun, fast schwarz, wenn die Säulchen etwas dicker werden, solche nach II gelb. —

Der Dichroismus dieser Krystalle ist im Mikroskope an jedem Krystalle schön zu beobachten, wenn die Krystalle auf dem Objectträger bewegt werden; den gleichen Farbenunterschied habe ich auch bei Häminkrystallen gesehen, die nach Schaffejew dargestellt waren, ohne aber bei einem und demselben Krystall den Farbenwechsel verfolgen zu können.

Die beschriebene typische Krystallisation gelang nicht immer: hie und da wurden auch beim Verdauungshämin kleine würfelförmige Kryställchen erhalten (ähnlich wie Cloetta¹⁾ sie beschreibt). Es schien mir, dass ein zu rascher Zusatz von Salzsäure zur Acetonaufschwemmung des Hämatinschlammes eine derartige Häminausscheidung bewirkt.

Zu den im Folgenden beschriebenen Versuchen sind nur die schön ausgebildeten Krystalle verwendet worden, die von der Mutterlauge getrennt und reichlich mit Wasser gewaschen waren.

Bei der Elementaranalyse der bei $110\text{—}120^\circ$ getrockneten Krystalle wurden folgende Werthe erhalten:

0,1995 g Substanz gaben 0,4457 g Kohlensäure, 0,0960 g Wasser, entsprechend 60,93% Kohlenstoff und 5,35% Wasserstoff.

1) Arch. f. exper. Path. u. Pharmak., Bd. 36, S. 352.

0,1565 g Substanz gaben 0,3482 g Kohlensäure, 0,0739 g Wasser, entsprechend 60,68% Kohlenstoff, 5,25% Wasserstoff.

0,1453 g Substanz, gut mit feinkörnigem Kupferoxyd gemischt, gaben nach Dumas 14,2 ccm. Stickstoff bei 20,2° und 749 mm. Quecksilberdruck, entsprechend 11,27% Stickstoff.

0,1355 g Substanz gaben, ebenfalls nach Dumas, 13,7 ccm. Gas bei 21,8° und 746,5 mm. Quecksilberdruck, entsprechend 11,55% Stickstoff.

0,8220 g Substanz, mit 4 g chlorfreiem kohlensauren Natronkali und 1 g in kleinen Antheilen zugefügtem reinen Salpeter geschmolzen, gaben 0,1006 g Eisenoxyd, bei der Chlorbestimmung 0,1587 g Chlorsilber und 0,0028 g metall. Silber, entsprechend 8,57% Eisen und 4,88% Chlor.

0,4194 g Substanz gaben, ebenso behandelt, 0,0490 g Eisenoxyd, 0,0869 g Chlorsilber, 0,0031 g metall. Silber, in Procenten: 8,18% Eisen, 5,37% Chlor.

0,21 g Substanz, mit Soda und Salpeter geschmolzen, gaben eine Schmelze, welche nach dem Lösen in Wasser und folgendem Ansäuern mit Salzsäure auf Chlorbaryumzusatz vollkommen klar blieb.

Das aus etwa 0,54 g Substanz durch Glühen erhaltene Eisenoxyd war vollkommen frei von Phosphorsäure.

Die Analysenwerthe entsprechen etwa einer Formel $C_{31}H_{34}N_5FeClO_4$. Diese verlangt 61,12% Kohlenstoff, 5,09% Wasserstoff, 10,49% Stickstoff, 8,39% Eisen, 5,32% Chlor, 9,59% Sauerstoff.

	Gefunden		Berechnet
C	60,93	60,68	61,12
H	5,35	5,25	5,09
N	11,27	11,55	10,49
Fe	8,57	8,18	8,39
Cl	4,88	5,37	5,32
O	—	—	9,59

Es sind demnach hier Häminkrystalle erhalten worden, welche dem Hämin Hoppe-Seyler's wie Mörner's ähnlich zusammengestellt sind, mit Ausnahme des höheren Stickstoffgehalts, welcher einem Plus an einem Stickstoffatom im Molekül entspricht. In welcher Gruppe dieses Stickstoffatom in dem neuen Hämin enthalten ist, lässt sich vor der Hand nicht sagen, da die Differenzen in der Zahl der Wasserstoffatome durch die Elementaranalyse nicht genügend zum Ausdruck kommen. Dass der höhere Stickstoffgehalt von Verunreinigungen herrühre, dagegen spricht das gleichmässige Aussehen der Krystalle, die Abwesenheit von Schwefel und von Phosphor.

Die Krystalle lösen sich in siedendem Chloroform sehr wenig, in Aether fast gar nicht, etwas leichter in Essigsäureanhydrid, besser löslich, aber noch immer schwer, sind sie in kochendem Weingeist. In keiner dieser Lösungen ist auch nur eine Spur des Hämatoporphyrinspectrums wahrzunehmen. Zum Vergleiche verwendetes Hämin, das im Tübinger Institute für physiologische Chemie aus Pferdeblut nach Schalfejew hergestellt war, löste sich in Essigsäureanhydrid etwas weniger auf, verhielt sich sonst gegen die aufgezählten Lösungsmittel analog. Bei der Destillation der lufttrocknen Krystalle im Wasserdampfstrom konnte kein Aceton im Destillate nachgewiesen werden: der Destillirrückstand reagirte neutral. Durch Kochen mit Laugen wurde eine geringe Menge Ammoniak (mit Nessler's Reagens nachweisbar) abgespalten.

Wie schon erwähnt, gelang nicht immer die typische Krystallisation, hier und da wurden kleine würfelförmige schwarze Krystalle erhalten. Aus Hämatin, welches aus Hämin nach Schalfejew hergestellt war, konnte ich bisher auch keine schönen Häminkrystalle mittelst Aceton und Salzsäure herstellen. Neben wenig kleinen Nadeln wurden schwarzbraune Körnchen erhalten, deren Form für Hämin nicht charakteristisch war. Während Hämin, nach Schalfejew dargestellt, in Aceton und Salzsäure nur sehr wenig löslich ist, löst sich das aus diesem Hämin dargestellte Hämatin reichlich in der Combination der beiden Reagentien zu einer intensiv rothbraunen Flüssigkeit.

Bei Versuchen, durch Trypsinverdauung Hämatin zu erhalten, habe ich kein Resultat erreicht. —

Durch Lösen der Häminkrystalle mit verdünnter Lauge in einer Stöpselflasche und Fällen der Lösung mit verdünnter Schwefelsäure wird ein sehr voluminöser Hämatinniederschlag erhalten; derselbe wurde mit heissem Wasser gut gewaschen. Nach seinem Aussehen ist dieser Niederschlag nicht von dem Hämatinniederschlag anderer Darstellungsmethoden zu unterscheiden.

Die Analysen der reinen Substanz gaben folgende Werthe:

0.1756 g Substanz gaben 0,4009 g Kohlensäure, 0,0868 g Wasser, entsprechend 62,24% Kohlenstoff, 5,49% Wasserstoff.

0.3045 g Substanz gaben 29,3 ccm. Gas bei 15,0° C. und 748,5 mm. Quecksilberdruck, entsprechend 11,28% Stickstoff.

0,4823 g Substanz gaben 0,0574 g Eisenoxyd, entsprechend 8,33% Eisen.

Berechnet für	Gefunden
$C_{34}H_{35}N_5FeO_5$	
C 62,87	62,24
H 5,39	5,49
N 10,79	11,28
Fe 8,63	8,33
O 12,33	—

Das so dargestellte Hämatin löst sich nicht in Aether, sehr wenig in Chloroform, etwas mehr in Weingeist; etwas besser löst es sich, als in den vorgenannten Lösungsmitteln, in Essigsäureanhydrid, bedeutend mehr löst Pyridin.

Aus diesem Hämatin habe ich in analoger Weise, wie diese Zeitschrift, Band XXV, Seite 494 ff., beschrieben, Hämochromogenammonium hergestellt. Das Aussehen des Produktes ist das gleiche wie bei dem damals beschriebenen Hämochromogenammonium aus Schalfesjew's Hämin, feucht von der Farbe des rothen Phosphors, braunroth nach dem Trocknen bei 130°.

Bei der Analyse dieses Produktes wurden die folgenden Werthe erhalten:

0,2556 g Substanz gaben 0,0308 g Eisenoxyd, 0,5847 g Kohlensäure, 0,1242 g Wasser; in Procenten 62,39% Kohlenstoff, 5,40% Wasserstoff, 8,44% Eisen.

0,1985 g Substanz gaben 0,0252 g Eisenoxyd, 0,4535 g Kohlensäure, 0,1011 g Wasser; in Procenten 62,32% Kohlenstoff, 5,66% Wasserstoff, 8,87% Eisen.

0,3037 g Substanz gaben nach Dumas 34,8 ccm. Gas bei 14,0° und 737,5 mm. Quecksilberdruck, entsprechend 13,29% Stickstoff.

Es liegt daher hier wie damals die Hämochromogenammoniumverbindung vor.

Wenn die für unser neues Hämatin angenommene Formel als gültig betrachtet wird, so müsste diesem Hämochromogenammonium unter der Annahme, dass ein Sauerstoffatom aus einem Molekül Hämatin austritt, die Formel (a) $C_{34}H_{38}N_6FeO_4$

zukommen: unter der Annahme, dass bei der Hämochromogenbildung zwei Hämatinmoleküle unter Verlust eines Sauerstoffatoms zusammentreten, würde die Formel (b) $C_{68}H_{76}N_{12}Fe_2O_9$ resultiren. In Procenten berechnen sich

	Formel (a)	Formel (b)	Gefunden	
C	62,77	62,01	62,39	62,32
H	5,85	5,77	5,40	5,66
N	12,92	12,77	—	13,29
Fe	8,61	8,51	8,44	8,87
O	9,85	10,94	—	—

Leider ist auch hier eine definitive Entscheidung nicht mit aller Schärfe möglich, obwohl die Werthe etwas besser zu Formel (a) als zu Formel (b) stimmen. Zu einer ganz präzisen Beantwortung der Frage über den Sauerstoffverlust des Hämatins bei der Hämochromogenbildung wird zweckmässig ein anderer Weg als die Elementaranalyse gewählt werden müssen.

Ich habe versucht, ob durch Elektrolyse alkalischer Hämatinlösungen Hämochromogen gebildet werden kann; es ist mir dies bei Verwendung einer Klemmenspannung von 4—10 Volt niemals gelungen, ebensowenig wird dabei Hämatinporphyrin gebildet. Unter Abscheidung von Eisenhydroxyd tritt schliesslich stets eine vollständige Entfärbung der Hämatinlösung ein. Mit der Untersuchung der dabei entstehenden Produkte bin ich beschäftigt. Bis zu dieser Entfärbung kann man an einer herausgenommenen Probe immer noch Hämatin beobachten, das mit Hydrazinhydrat die charakteristische Spectralerscheinung des Hämochromogens gibt. Es scheint der Erwähnung werth zu sein, dass Substanzen, die man als Zersetzungsprodukte des Hämatins ansprechen darf, bei ziemlich starken Reagentienwirkungen, z. B. nach längerem Kochen mit Laugen u. dgl., immer noch mit Hydrazinhydrat das charakteristische Hämochromogenspectrum geben. Nur die Intensität des im Blaugrün gelegenen Absorptionsstreifens unterliegt Schwankungen.

Z. Donogány¹⁾ beschreibt Hämochromogenkrystalle, welche er aus Blut durch Zusatz von Schwefelammon und

¹⁾ Referat im Jahresb. f. Thierchemie, Bd. 27, 150.

Pyridin erhält. H. M. Kobert¹⁾ gibt an, solche Krystalle unter Luftabschluss durch blossen Pyridinzusatz erhalten zu haben. Ich habe nur die Wirkung des Pyridins auf Hämatin untersucht. Sowohl das nach Schalfejew dargestellte Hämatin wie das eben beschriebene lösen sich in kochendem Pyridin leicht auf. Die Lösung zeigt nicht das Spectrum alkalischer Hämatinlösungen, aber auch nicht das Hämochromogenspectrum.

Ebensowenig bewirkt ein Zusatz von Pyridin in wässrigen ammoniakalischen Hämatinlösungen Hämochromogenbildung. Erst wenn zur Hämatin-Pyridinlösung oder zu der wässrigen alkalischen Hämatinlösung, welche mit Pyridin versetzt worden war, eine geringe Menge Hydrazinhydrat zugefügt wird, kann alsbald in diesen Lösungen das schöne Hämochromogenspectrum beobachtet werden, welches auf Zutritt von Sauerstoff verschwindet. Ich theile diese Versuche nur mit, um dem möglichen Irrthum vorzubeugen, dass das Pyridin den Hämochromogen bildenden Reductionsmitteln gezählt werde.

1) Zeitschr. f. angew. Mikroskopie, 5, 1900.
