

Ueber das Jodprodukt des Oxyhämoglobins.

Von

Privatdocent Dr. **D. Kurajeff.**

Aus dem physiol.-chemisch. Laboratorium von Prof. A. Danilewsky zu St. Petersburg.
(Der Redaction zugegangen am 4. December 1900.)

Das Studium der Jodirungsprodukte verschiedener Eiweissstoffe bietet, wie aus Untersuchungen mehrerer Autoren hervorgeht, ein Interesse in mehrfacher Hinsicht, insbesondere für die chemische Charakterisirung verschiedener Eiweissformen, da ja der Unterschied in der Jodaufnahmefähigkeit der einzelnen Eiweisskörper in direkter Abhängigkeit von ihrer chemischen Zusammensetzung stehen muss. Besonderes Interesse in dieser Hinsicht haben selbstverständlich Jodprodukte gut individualisirter d. h. krystallisirter Eiweisskörper. Prof. F. Hofmeister¹⁾ hat als erster das Jodprodukt des krystallisirten Eieralbumins dargestellt und analysirt; dann studirte ich²⁾ näher in seinem Laboratorium die Bedingungen der Jodirung krystallisirter Eiweissstoffe und beschrieb das Jodprodukt des krystallisirten Serumalbumins.

Es blieb also noch, das Jodprodukt des dritten krystallisirenden Eiweisskörpers, nämlich des Oxyhämoglobins, darzustellen.

Nachdem F. Blum und W. Vaubel³⁾ und ich, unabhängig von einander, gezeigt hatten, dass die Jodirung der Eiweissstoffe auch bei neutraler oder schwach alkalischer

1) F. Hofmeister, Zeitschr. f. phys. Chemie. Bd. XXIV, S. 159, 1898.

2) D. Kurajeff, ibidem, Bd. 26, S. 462, 1899.

3) F. Blum u. W. Vaubel, Journal f. prakt. Chemie. N. F. Bd. 57, S. 365, 1898.

Reaction geschehen kann, ergab sich die Möglichkeit, das Oxyhämoglobin bei für das Intactbleiben seines Moleküls günstigen Bedingungen der Jodirung zu unterwerfen. In der Litteratur, soviel ich weiss, gibt es nur einen Versuch von F. J. Hopkins und S. N. Pinkus,¹⁾ das Oxyhämoglobin des Hundes zu bromiren. Bei der Bromirung des Hundeoxyhämoglobins haben die Autoren einen flockigen braunen Niederschlag erhalten, der sich sogar in kaltem Alkohol leicht löste und aus alkoholischer Lösung durch Aether ausgefällt werden konnte. Im Filtrat vom Bromprodukt des Oxyhämoglobins haben die Verfasser das Vorhandensein von BrFe constatirt, der Niederschlag selbst aber enthielt 0,33—0,41% Fe d. h. eine Eisenmenge, die dem Eisengehalt des Hundeoxyhämoglobins selbst sehr nahe steht.

Ich machte auch einen Versuch, das Pferdeoxyhämoglobin zu jodiren, und analysirte das erhaltene Jodprodukt des Oxyhämoglobins, das ich der Kürze wegen Jodhämoglobin nennen werde.

II.

Darstellung des Jodhämoglobins.

Das krystallisirte Pferdeoxyhämoglobin wurde im Allgemeinen nach der Hoppe-Seyler'schen Methode dargestellt: im Einzelnen folgte ich der Beschreibung des Darstellungsverfahrens, die in der Arbeit von D. Lawrow²⁾ angeführt worden ist. Die zuerst erhaltenen Krystalle von Oxyhämoglobin wurden noch zweimal umkrystallisirt. Das von mir angewandte krystallinische Oxyhämoglobin besass alle typischen Eigenschaften. Für die Jodirung des Oxyhämoglobins benutzte ich in einigen Versuchen die Blum-Vaubel'sche Methode, d. h. ich liess Jod in KJ -Lösung in Ueberschuss auf die wässrige Lösung von Oxyhämoglobin bei Anwesenheit von überschüssigem Natriumbicarbonat reagiren: die Reaction der Flüssigkeit wurde durch Hinzufügen von Natriumbicarbonat

¹⁾ F. J. Hopkins u. S. N. Pinkus, Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch., 31, S. 1314, 1898.

²⁾ D. Lawrow, Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXVI, S. 343, 1898.

immer schwach alkalisch erhalten. In anderen Versuchen benutzte ich diejenige Jodirungsmethode, welche ich in meiner früheren Arbeit hauptsächlich angewandt hatte, nämlich, ich verwandte einen Ueberschuss von Jod in Jodkaliumlösung in Gegenwart von einer bestimmten Menge $KJ\text{O}_3$. Um alle Bedingungen, die auf das Intactbleiben des Oxyhämoglobins schädlich einwirken können, zu beseitigen, führte ich die Jodirung bei Zimmertemperatur im Laufe von mehreren Tagen aus.

Bei der Jodirung des Oxyhämoglobins erschien sehr bald (in einigen Minuten) ein flockiger schwarzbrauner Niederschlag, der sich bald auf dem Boden des Gefässes sammelte. Nach einigen Tagen wurde die über den Niederschlag stehende Flüssigkeit nur schwach gelbgrünlich gefärbt und zeigte kein bestimmtes Spectrum (etwa des Oxyhämoglobins oder des Hämatins). Das Filtrat vom Niederschlag beim Hinzufügen vom gleichen Volumen gesättigter Ammonsulfatlösung gab entweder nur eine minimale Trübung, oder aber Anfangs sogar keine Trübung; nur bei langdauerndem Stehen der Probe erschien eine kleine Menge von zarten, braunen Flöckchen. Der abfiltrirte Niederschlag des Jodprodukts des Oxyhämoglobins wurde zur Beseitigung von überschüssigem K und J zuerst gut mit Wasser gewaschen. Da der Niederschlag sich in verdünntem Ammoniak als fast unlöslich erwies, löste ich ihn behufs weiterer Reinigung von beigemischtem J und JH in verdünnter NaHO (1—3%). Man muss bemerken, dass Niederschläge, welche nach der Blum-Vaubel'schen Methode dargestellt wurden, sich sogar in 3%iger NaHO nur mit grosser Schwierigkeit lösten und zur Auflösung bei Zimmertemperatur 2—3 Tage forderten. Die nach der Methode mit $KJ\text{O}_3$ erhaltenen Niederschläge lösten sich dagegen viel leichter, als die ersten, sogar in 1—2%iger NaHO . Die alkalischen Lösungen der Niederschläge wurden sogleich mit einem kleinen Ueberschuss von Essigsäure gefällt: die erhaltenen Niederschläge wurden mit Wasser, Alkohol und Aether bis zum völligen Verschwinden der Jodreaction sorgfältig gewaschen. In einem Falle löste ich den nach der Blum-Vaubel'schen

Methode erhaltenen Niederschlag (Präp. 3) nicht in Natronhydrat, sondern wusch ihn nur mit Wasser, Alkohol und Aether durch, bis die Waschflüssigkeiten keine Jodreaction mehr gaben. Die Darstellung und Analyse des auf diese Weise erhaltenen Niederschlages war von Bedeutung wegen des Vergleichs mit anderen mit Alkali behandelten Präparaten von Jodhämoglobin. Die gleiche Darstellungsweise (ohne Alkali) führte bei einem nach der Methode mit KJO_3 dargestellten Präparat von Jodhämoglobin nicht zum Ziele, weil die Waschflüssigkeiten ungeachtet des sorgfältigen und sehr langdauernden Auswaschens mit Wasser, Alkohol und Aether immer merkliche Spuren von freiem Jod (resp. JH) enthielten.

Deshalb beschränkte ich mich auf die Analyse nur des oben erwähnten Präparats 3.

Die Präparate von Jodhämoglobin, deren Reinigung mittelst Alkali ausgeführt wurde, gaben zuerst keine Jodreaction beim Schütteln mit verdünnter Schwefelsäure bei Anwesenheit von KNO_2 und Chloroform: nur nach langem Stehen erschienen Spuren von Jodreaction. Das nicht mit Alkali bearbeitete Präparat zeigte unter den erwähnten Bedingungen ziemlich bald eine Jodreaction, d. h. es erschien eine schwache Rothviolettffärbung des Chloroforms.

Um eine Vorstellung von dem Verhalten des Hämatins zur Jodirung zu bekommen, machte ich in dieser Richtung einen Versuch. Das Hämatin wurde von mir aus dem nach Schaffejeff¹⁾ erhaltenen krystallisirten Hämin dargestellt. Obgleich dieser Versuch, wie es aus den weiter angeführten Analysen hervorgeht, nicht gelungen ist, will ich ihn nichtdestoweniger im Folgenden zusammen mit der ausführlichen Schilderung des Darstellungsverfahrens der drei von mir zur Analyse angewandten Präparate von Jodhämoglobin beschreiben.

Präparat 1.

Zur Lösung von ca. 50 g rohem Oxyhämoglobin in $1\frac{1}{2}$ l Wasser wurde nach und nach 20 g J. 30 g KI und

¹⁾ Schaffejeff, Journ. d. russ. phys.-chem. Gesellsch. Bd. 17. S. 36, 1885

NaHCO_3 in Ueberschuss zugesetzt; die Reaction wurde immer schwach alkalisch erhalten. Die Mischung blieb 16 Tage bei Zimmertemperatur stehen. Schon nach einigen Minuten bildete sich in der Flüssigkeit ein flockiger schwarzbrauner Niederschlag. Die Flüssigkeit wurde häufig umgerührt. Nach 16 Tagen wurde der Niederschlag abfiltrirt; das schwach grünlichgelb gefärbte Filtrat enthielt einen Ueberschuss von freiem Jod, gab kein bestimmtes Spectrum, mit gesättigter Lösung von Ammonsulfat (mehr als das gleiche Volumen) gab es nur eine minimale Trübung, die sich nach langem Stehen in zarte braune Flöckchen verwandelte. Der mit Wasser ausgewaschene Niederschlag wurde mit Schwierigkeit im Laufe von 3 Tagen in 3% NaHO gelöst. Beim Lösen des Niederschlages entwickelte sich eine nicht unbedeutende Menge von Glasbläschen, die feuchtes rothes Lakmuspapier blau färbten. Die erhaltene braunrothe alkalische Lösung des Niederschlages wurde abfiltrirt und mit kleinem Ueberschuss von Essigsäure ausgefüllt. Der Niederschlag wurde abfiltrirt, das Filtrat war nur schwach grünlichgelb gefärbt und enthielt nur Spuren von Eiweiss (Probe mit $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$). Der Niederschlag wurde mit Wasser, Alkohol und Aether so lange gewaschen, bis die Reaction auf Jod (resp. JH) vollständig verschwunden war.

Präparat 2.

Verwendet wurden ca. 50 g rohes Oxyhämoglobin, 15 J g, 30 g JK, 2 g KJO_3 und ca. $1\frac{1}{2}$ Liter Wasser. Die Mischung stand bei Zimmertemperatur 18 Tage. Darauf wurde der gebildete Niederschlag abfiltrirt; das schwach grünlichgelb gefärbte Filtrat enthielt einen grossen Jodüberschuss, zeigte keine Absorptionsstreifen; bei Zusatz von etwa gleichem Volumen gesättigter Ammonsulfatlösung entstand zuerst keine Trübung; erst nach einem Tage bildeten sich zarte braune Flöckchen. Der Niederschlag wurde mit Wasser ausgewaschen, in 1% igem Natronhydrat gelöst und die Lösung nach $1\frac{1}{2}$ Tagen abfiltrirt. Die Lösung dieses Niederschlages in Alkali ging viel leichter vor sich, als diejenige des Niederschlages 1. Die

rothbraune alkalische Lösung wurde mit kleinem Ueberschuss von Essigsäure gefällt: der gebildete Niederschlag wurde mit Wasser, Alkohol und Aether ausgewaschen.

Präparat 3.

Verwendet wurden ca. 25,0 feuchtes Oxyhämoglobin, 600 ccm. Wasser, 7,0 J, 14,0 KJ und Natriumbicarbonat in Ueberschuss. Der Niederschlag bildete sich bei Zusatz von Jod fast sogleich. Die Mischung blieb bei Zimmertemperatur 14 Tage stehen. Der Niederschlag wurde abfiltrirt und mit Wasser, Alkohol und Aether so lange gewaschen, bis keine Reaction auf Jod (resp. JH) mehr auftrat. Verdünnte Schwefelsäure, die mit dem schon ausgewaschenen Niederschlage während 15 Minuten durchgeschüttelt und sodann abfiltrirt wurde, gab keine Reaction auf Jod mit KNO_2 und Chloroform. Wenn man aber diese Reaction bei Anwesenheit des Niederschlages ausführt, so tritt ziemlich bald eine schwache rothviolette Färbung des Chloroforms auf.

Jodirung des Hämatins. Eine kleine Menge (ca. 3,0) von krystallisirtem Hämin wurde nach Schallejeff dargestellt. Das mit Wasser sorgfältig ausgewaschene krystallinische Hämin wurde in 1%iger NaHO gelöst, die Lösung wurde abfiltrirt und mit 2%iger H_2SO_4 gefällt. Der Niederschlag von Hämatin wurde mit Wasser ausgewaschen und in ca. 400 ccm. NaHCO_3 gelöst, zur Lösung wurde nach und nach 3,0 Jod und 6,0 KJ zugesetzt. Die ersten 6 Stunden stand die Mischung bei 45—50° C. und darauf eine Nacht bei 38° C. In der Flüssigkeit war kein Niederschlag, beim Ansäuern mit Essigsäure schied sich ein flockiger braunschwarzer Niederschlag aus; der Niederschlag wurde abfiltrirt (im Filtrat Ueberschuss von Jod), mit Wasser ausgewaschen, dann in 1%iger NaHO gelöst und mit Essigsäure gefällt. Der ausgefällte Niederschlag wurde mit Wasser, Alkohol und Aether so lange ausgewaschen, bis die Waschflüssigkeiten keine Jodreaction mehr zeigten. Der Alkohol löst merkliche Mengen des Niederschlages auf. Das lufttrockene Jodprodukt des Hämatins besass folgende Eigenschaften. Es löst sich sehr leicht in allen Alkalien. Die

alkalische Lösung des Jodprodukts des Hämatins zeigt den für Hämatin typischen breiten Absorptionsstreifen zwischen C und D (näher an D).

Der mit Schwefelsäure etwas angesäuerte Alkohol löst auch das Jodprodukt des Hämatins und zeigt das charakteristische Spectrum für saure Lösungen von Hämatin. Kalk und Baryhydrat geben gefärbte Niederschläge in alkalischen Lösungen von Jodprodukt des Hämatins: verdünnte Säuren, wie z. B. 0,5%ige Salzsäure, lösen es gar nicht. Gesättigte Lösungen von Ammonsulfat geben mit alkalischen nicht zu starken (noch durchsichtigen) Lösungen des Jodprodukts des Hämatins einen flockigen Niederschlag, nur wenn sie in gleichem Volumen zugesetzt werden.

III.

Eigenschaften des Jodhämoglobins.

Beim Trocknen an der Luft wandelt sich das ausgewaschene Jodhämoglobin in eine sehr feste Masse mit glänzendem, fast schwarzem Bruche um. Fein zerrieben stellt sich das Jodhämoglobin als braunschwarzes Pulver dar. Die mit Natronhydrat nicht gereinigten Präparate von Jodhämoglobin lösen sich ziemlich schwer sogar in 3—5%iger NaHO; in verdünntem Ammoniak lösen sich nur Spuren von Substanz, in Soda und Natriumbicarbonat lösen sich solche Präparate von Jodhämoglobin fast gar nicht.

Verdünnte Säuren sogar bei langdauernder Einwirkung lösen nur Spuren von mit Alkali nicht gereinigtem Jodhämoglobin. Alkohol beim Schütteln mit Jodhämoglobin nimmt nur Spuren einer gelbgrünlichen Färbung an, mit Schwefelsäure angesäuert aber färbt sich der Alkohol mehr oder weniger scharf. Die braunrothen alkalischen Lösungen von Jodhämoglobin zeigen, wie es scheint, dasselbe Spectrum, wie diejenigen von Hämatin. Alkalische Lösungen von Jodhämoglobin geben mit $\text{Ca}(\text{HO})_2$ keinen Niederschlag, mit $\text{Ba}(\text{HO})_2$ aber geben sie eine Fällung, die alle Eigenschaften des Jodhämoglobins selbst haben. Die mit Natronhydrat bearbeiteten nicht zu trockenen Präparate von Jodhämoglobin

lösen sich leicht in allen Alkalien (NaHCO_3 , Na_2CO_3 , NH_3 , NaHO) und auch in verdünnter (0,5^o, 0) Salzsäure. Das Spectrum der sauren Lösungen von Jodhämoglobin scheint mit demjenigen der sauren Lösung von Hämatin und Methämoglobin (der scharfe Absorptionsstreifen zwischen C und D näher an C) identisch zu sein. Alkalische Lösungen von Jodhämoglobin, sowohl die gesättigten, als auch die verdünnten, werden sehr bald und quantitativ durch Zusatz von weniger als dem halben Volumen gesättigter Ammonsulfatlösung gefällt: das Filtrat vom schwarzbraunen Niederschlag ist ganz farblos und enthält kein Jodhämoglobin.

Sorgfältig angestellte vergleichende Versuche über die Ammonsulfatfällung von alkalischen Lösungen von Jodhämoglobin, vom Jodprodukt des Hämatins und auch des Hämatins selbst, gesondert von einander und in bestimmten Mischungen, haben gezeigt, dass die Präparate von Jodhämoglobin kein freies beigemischtes Hämatin oder sein Jodprodukt enthalten. Bei den Bedingungen der Fällung mit Ammonsulfat, bei welchen das Jodhämoglobin ziemlich rasch und vollständig ausgefällt wird, scheidet sich das Jodprodukt des Hämatins aus der sogar viel stärker gefärbten Lösung, als die Lösung von Jodhämoglobin, lange Zeit gar nicht ab. Desgleichen bleibt das Jodprodukt des Hämatins, mit dem Jodhämoglobin gemischt, bei Zusatz von bestimmtem Volumen gesättigter Ammonsulfatlösung fast vollständig in Lösung, während das Jodhämoglobin schon total ausgefällt ist. Ganz gleich, wie das Jodprodukt des Hämatins, verhält sich auch das Hämatin selbst bei den besprochenen Bedingungen.

IV.

Verhalten des Jodhämoglobins zur Pepsin- und Trypsinverdauung.

a) Einwirkung der Pepsinsalzsäure auf das Jodhämoglobin.

Den 12. October 1900. Ca. 2,0 Jodhämoglobin Präp. 1 wurden mit 100 cem. 0,5^o oiger ClH gemischt und die Mischung in den Thermostat bei 37—40^o C. gestellt. Nach einigen Stunden trat schon eine merkliche Lösung des Niederschlages

ein. Dann wurde der Flüssigkeit eine kleine Menge Pepsin Grübler zugesetzt.

Den 13. October. Nach der Nacht ging der Niederschlag vollständig in ganz klare, braunrothe Lösung über. Das Spectrum der Flüssigkeit: scharfer Absorptionsstreifen im Roth und diffuse Verdunkelung in anderen Theilen. Die Flüssigkeit gibt starke Jodreaction mit H_2SO_4 , KNO_2 und Chloroform.

Den 14. October. In der Flüssigkeit bildete sich ein feiner braunschwarzer Niederschlag. Bei Neutralisation der Flüssigkeit schied sich ein schwarzbrauner Niederschlag aus, der sich bei weiterem Ansäuern mit Essigsäure, oder noch besser mit Salzsäure, wieder vollständig löste. Der Neutralisationsniederschlag besitzt alle Eigenschaften des Jodhämoglobins. Das Filtrat vom Niederschlag ist rothbraun gefärbt und gibt mit Ammonsulfat einen braunen Niederschlag.

Den 19. October. Die Flüssigkeit wurde abfiltrirt; auf dem Filter blieb eine kleine Menge von sehr feinem braunschwarzen Niederschlage. Die Untersuchung dieses Niederschlages zeigte, dass er die Eigenschaften des Hämatins besitzt und grosse Quantität von Fe und J enthält. Das Filtrat vom Niederschlag wurde bis nahezu saurer Reaction neutralisirt, dabei bildete sich ein flockiger, schwarzbrauner Niederschlag, der im Allgemeinen alle Eigenschaften des Jodhämoglobins zeigte. Das Filtrat vom Neutralisationsniederschlag war braun gefärbt, zeigte einen Absorptionsstreifen im Roth und enthielt, wie das sich aus weiteren Untersuchungen herausstellte, eine Mischung von verschiedenen Albumosen mit den Resten vom nicht völlig ausgefallten Jodhämoglobin, Hämatin (resp. seinem Jodprodukt) u. A. Gleich dem Präparat 1 verhält sich zur Pepsinverdauung Präp. 3 und 2; nur löst sich das Präparat 2 viel leichter, schon direkt in 0,5%iger ClH ohne das Pepsin. Die Lösung des Präparats 2 in 0,5%iger ClH ist ganz klar und braunroth gefärbt und gibt keine Trübung während geraumer Zeit (mehr als ein Monat). Die Jodreaction (resp. JH) erscheint schon nach einem Tage nach dem Lösen des Präparats in 0,5%iger ClH, während die Jodabspaltung bei Anwesenheit von Pepsin viel früher geschieht. Bei Neutra-

lisation der sauren Lösung von Jodhämoglobin fällt ein brauner Niederschlag, der sich beim weiteren Ansäuern sogar mit Essigsäure wieder löst: bei Zusatz von $\frac{1}{3}$ Volumen gesättigter Ammonsulfatlösung zur sauren Lösung von Jodhämoglobin bildet sich ein brauner flockiger Niederschlag und das Filtrat erscheint ganz farblos. Der Vergleichung wegen wurde noch ein Versuch mit Pepsin-Verdauung der rothen Blutkörperchen gemacht (zur Zeit hatte ich leider kein reines Oxyhämoglobin). In der Flüssigkeit bildete sich schon in einigen Stunden der Verdauung ein voluminöser braunschwarzer Niederschlag. Nach einigen Tagen wurde der Niederschlag abfiltrirt und erwies sich als Hämatin. Das Filtrat wurde nur schwach gelbgrünlich gefärbt und zeigte kein bestimmtes Spectrum. Nach neun Tagen der Verdauung wurde das Filtrat vom Niederschlag schon sehr scharf braunroth gefärbt, während sein Spectrum nur Spuren von Hämatin zeigte.

Die Lösung des reinen Hämatins, die viel schwächer als das genannte Filtrat gefärbt ist, zeigt scharf das spezifische Spectrum. Man muss denken, dass das Hämatin bei peptischer Verdauung theilweise verändert wird und in saure Lösung übergeht. Dasselbe gilt wahrscheinlich auch für das Jodprodukt des Hämatins, das sich bei peptischer Verdauung des Jodhämoglobins abspaltet.

b) Trypsinverdauung des Jodhämoglobins.

2,0 Jodhämoglobin Präp. I wurden mit 100 ccm. 0,5%igem Na_2CO_3 gemischt, zur Mischung wurde eine kleine Menge von Trypsin Grübler zugesetzt. Das Lösen geschah ziemlich bald: die Flüssigkeit ist braunroth gefärbt, nicht unbedeutende Ammoniakentwicklung, scharfe Reaction auf Jod (resp. JH). Nach zwölfstündigem Stehen im Thermostat bei $37-40^\circ \text{C}$. blieb die Lösung klar. Bei Neutralisation der Flüssigkeit mit Salzsäure bildete sich ein flockiger schwarzbrauner Niederschlag nur bei deutlich saurer Reaction. Es ist auffallend, dass der Niederschlag bei weiterem Zusatz von verdünnter Salzsäure vollständig in Lösung überging, beim Hinzufügen aber von Essigsäure geschah kein vollständiges Lösen des Niederschlages. Wenn man zur alkalischen Lösung vom Neutralisationsnieder-

schlag auf ein Mal eine grosse Menge von starker Salzsäure hinzufügt, so bildet sich ein feiner Niederschlag, der in der Säure unlöslich ist. Dasselbe Verhalten beobachtete ich auch für den Neutralisationsniederschlag aus pepsinsalzsaurer Lösung von Jodhämoglobin. Der durch wiederholtes Lösen in Alkali und Ausfällen mit Säure gereinigte Neutralisationsniederschlag erwies sich als eisen- und jodhaltig. Das Filtrat vom Neutralisationsniederschlag war braunroth gefärbt und enthielt ein Gemisch von Albumosen und Farbstoffen. Ebenso verhält sich zur Trypsinverdauung auch das Präparat 3. Was das Verhalten der rothen Blutkörperchen zur Trypsinverdauung anbetrifft, so fällt nach mehrtägiger Verdauung beim Ansäuern der alkalischen Flüssigkeit ein braunschwarzer Niederschlag von Hämatin aus, das Filtrat ist nur schwach gefärbt und zeigt kein deutliches Spectrum.

V.

Elementare Zusammensetzung des Jodhämoglobins.

Die Präparate von Jodhämoglobin und das Jodprodukt des Hämatins trocknete ich zuerst im Trockenschrank bei 100° C. darauf wurde die Temperatur auf 115—125° C. erhöht. Nichtsdestoweniger konnte ich die Präparate während langer Zeit bis zum constanten Gewicht nicht austrocknen. Die Präparate zeigten immer einen kleinen Gewichtsverlust.

Da man durch langdauerndes Trocknen bei hoher Temperatur etwa wesentliche Veränderungen des Jodhämoglobins erwarten konnte, so entschloss ich mich, für Elementaranalysen andere Präparate von Jodhämoglobin zu benutzen, die bis zur Gewichtskonstanz im Vacuumexsiccator ausgetrocknet waren.

Das Präparat vom Jodprodukt des Hämatins, das ich analysirt habe, wurde von mir lange Zeit bei 115—125° C. getrocknet, zeigte immer einen merklichen Gewichtsverlust. Die Jodbestimmungen wurden von mir nach der Volhard'schen Methode ausgeführt, der Stickstoff wurde nach Kjeldahl-Willfahrt bestimmt, die Bestimmung des Kohlenstoffes und Wasserstoffes geschah durch Verbrennung im offenen Rohre mit Bleichromat, Kupferoxyd und vorgelegter reducirter Kupferspirale im Luft- und Sauerstoffströme.

Der Schwefel wurde durch Schmelzen der Substanz mit Soda-Salpetergemisch bestimmt. Für Eisenbestimmung wurde die Substanz auch mit Soda-Salpetergemisch, das ganz eisenfrei war, geschmolzen: die Schmelze wurde im Wasser, zu dem ein wenig Ammoniak zugesetzt wurde, gelöst. Nach einer Nacht wurde der Eisenoxydniederschlag durch aschenfreies Filter abfiltrirt, ausgetrocknet und verbrannt; die Asche wurde beim Erwärmen mit Salzsäure extrahirt, die saure Eisenchloridlösung wurde mit Ammoniak gefällt u. s. w. Die Analysen gaben folgendes Resultat:

Präparat 1.

1.	0,3892	gaben	0,047 498 J	=	12,20% J
2.	0,3412	..	0,042 799 J	=	12,54% J
3.	0,2490	..	0,036 146 N	=	14,51% N
4.	0,4386	..	0,063 407 N	=	14,45% N
5.	0,2436	..	0,4246 CO ₂	=	47,53% C
			0,1454 H ₂ O	=	6,63% H
6.	0,2396	..	0,4186 CO ₂	=	47,64% C
			0,1416 H ₂ O	=	6,56% H

Präparat 2.

1.	0,4094	gaben	0,045 974 J	=	11,23% J
2.	0,3970	..	0,044 196 J	=	11,13% J
3.	0,3056	..	0,045 311 N	=	14,82% N
4.	0,2446	..	0,036 146 N	=	14,77% N
5.	0,2270	..	0,4034 CO ₂	=	48,46% C
			0,1450 H ₂ O	=	7,09% H
6.	0,2030	..	0,3590 CO ₂	=	48,23% C
			0,1298 H ₂ O	=	7,10% H
7.	0,7585	..	0,0242 BaSO ₄	=	0,44% S
8.	1,5976	..	0,0084 Fe ₂ O ₃	=	0,37% Fe

Präparat 3.

1.	0,3700	gaben	0,040 767 J	=	11,02% J
2.	0,5716	..	0,062 992 J	=	11,02% J
3.	0,2024	..	0,030 031 N	=	14,83% N
4.	0,3008	..	0,044 500 N	=	14,79% N
5.	0,3038	..	0,5392 CO ₂	=	48,40% C
			0,1670 H ₂ O	=	6,11% H
6.	0,1880	..	0,3348 CO ₂	=	48,57% C
			0,1010 H ₂ O	=	5,97% H
7.	0,6478	..	0,0230 BaSO ₄	=	0,49% S
8.	1,7322	..	0,0076 Fe ₂ O ₃	=	0,31% Fe

Jodprodukt des Hämatins.

1.	0,2936	gaben	0,042037	J	=	14,31%	J
2.	0,2546	..	0,032940	N	=	12,93%	N
3.	0,1158	..	0,02021	Fe ₂ O ₃	=	12,21%	Fe

Präp.	1.		2.		3.		Jod- produkt des Hämatins.
	Mittel		Mittel		Mittel		
C	47,53; 47,64	47,58	48,46; 48,23	48,34	48,40; 48,57	48,48	
H	6,63; 6,56	6,59	7,09; 7,10	7,09	6,11; 5,97	6,04	
J	12,20; 12,54	12,37	11,23; 11,13	11,18	11,02; 11,02	11,02	14,31
N	14,51; 14,45	14,48	14,82; 14,77	14,79	14,83; 14,79	14,81	12,93
S			0,44	0,44	0,49	0,49	
Fe			0,37	0,37	0,31	0,31	12,21

VI.

Discussion der Resultate.

Das von mir erhaltene Jodprodukt des Pferdeoxyhämoglobins stellt eine Substanz dar, die sich vom Oxyhämoglobin selbst schon durch seine schwere Löslichkeit sogar in 1—5% igem Natronhydrat sehr scharf unterscheidet. Das Jodprodukt des Oxyhämoglobins fällt bald und, wie es scheint, vollständig sogar bei alkalischer Reaction der Flüssigkeit aus; im Filtrat findet sich nur eine ganz unbedeutende Menge eines Eiweisskörpers. Vor Allem ist von Bedeutung, klar zu stellen, ob nicht das ausgefällte Jodprodukt ein Gemisch von jodirtem Eiweiss (Globin) mit dem Hämatin darstellt. Der von mir angestellte specielle Jodirungsversuch mit reinem Hämatin zeigt, dass das Jodprodukt des Hämatins bei alkalischer Reaction der Flüssigkeit sehr leicht löslich ist und bei der Jodirung nicht ausfällt. Weiter ist das Filtrat vom Jodprodukt des Oxyhämoglobins nur schwach gelbgrünlich gefärbt und zeigt kein bestimmtes Spectrum. Ausserdem zeigen die Versuche mit fractionirter Fällung durch Ammonsulfat des Jodhämoglobins und des Jodproduktes des Hämatins, gesondert von einander und gemischt, dass das Jodhämoglobin kein bei-

1) Die Eisenoxymenge wurde durch direkte Verbrennung bestimmt.

gemischtes Hämatin enthält. Weiter färbt sich die Natriumbicarbonatlösung gar nicht bei langdauerndem Schütteln mit dem Jodhämoglobin. Zuletzt spricht auch die Thatsache des leichten und vollständigen Lösens in 0,5%igem ClH der mit Alkali bearbeiteten Präparate des Jodhämoglobins (Präp. 1 u. 2) dafür, dass das Jodprodukt des Oxyhämoglobins keine Beimischung von Hämatin enthält: dasselbe zeigen auch die Versuche mit Pepsinverdauung des Jodhämoglobins. Also, auf Grund der angeführten Thatsachen muss man mit grosser Wahrscheinlichkeit schliessen, dass die Hämatin-Gruppe des Hämoglobins bei Jodirung desselben keine Abspaltung von seinem Eiweissantheil (Globin) erfährt und das erhaltene Jodprodukt eine einheitliche Substanz darstellt.

Der Gehalt des Jods und anderer Elemente in den Präparaten von Jodhämoglobin 2 und 3, die nach verschiedenen Methoden dargestellt und auf verschiedene Weise bearbeitet wurden, ist fast derselbe. Nur unterscheidet sich merklich das Präparat 1 nach seiner Zusammensetzung von anderen Präparaten. Dieser Unterschied in der Zusammensetzung kann ganz gut durch die Alkalieinwirkung (3% NaHO) erklärt werden, weil ich schon früher notirt habe, dass das Präparat 1 sich sehr schwierig und nur nach langer Zeit (3 Tage) vollständig in Alkali löste; dabei wurde auch eine nicht unbedeutende Ammoniakentwicklung constatirt. Das Präparat 2 wurde dagegen verhältnissmässig leicht in verdünnterem Alkali (1—2% NaHO) gelöst.

Diese Alkalibehandlung hat, wie man aus den Analysenzahlen sieht, im Präparat 2 keine wesentlichen Veränderungen der elementaren Zusammensetzung desselben im Vergleich mit derjenigen des Präparats 3, das mit Alkali nicht bearbeitet wurde, erzeugt. Die Analysenergebnisse zeigen also die Constanz und grosse Aehnlichkeit der Zusammensetzung der von mir erhaltenen Präparate von Jodhämoglobin. Die Beziehung des Jodhämoglobins zur Muttersubstanz, d. h. zum Oxyhämoglobin, bietet ein Interesse. Da bis jetzt die elementare Zusammensetzung und die Formel des Pferdeoxyhämoglobins noch nicht festgestellt ist, so muss man zur Beurtheilung der

Beziehung des Jodprodukts zum Oxyhämoglobin hauptsächlich nur das Verhältniss C : N in beiden benutzen.

Im Oxyhämoglobin (von F. Schulz) ¹⁾	C : N = 3,673
.. Jodhämoglobin Präp. 3	C : N = 3,819
.. .. Präp. 2	C : N = 3,813
.. .. Präp. 1	C : N = 3,833
.. Globin (von F. Schulz)	C : N = 3,797

Daraus sieht man, dass das Verhältniss C : N in den von mir erhaltenen Jodprodukten des Oxyhämoglobins im Vergleich mit demjenigen im Oxyhämoglobin selbst merklich verändert ist. Auffallender Weise ist das Verhältniss C : N im Jodhämoglobin sehr nahe zu demjenigen im Globin von F. Schulz. Der Unterschied zwischen beiden Verhältnissen muss durch das Vorhandensein der Hämingruppe im Jodhämoglobin bedingt werden.

Auf Grund der angeführten Thatsachen muss man schliessen, dass das von mir erhaltene Jodhämoglobin das Jodprodukt keines ganzen Moleküls des Oxyhämoglobins darstellt. Man muss annehmen, dass sich beim Jodiren des Oxyhämoglobins von demselben irgend eine stickstoffhaltige Substanz abspaltet. Es ist ganz möglich, dass die abgespaltene Substanz ein dritter stickstoffreicher albumosenartiger (nach F. Schulz) Bestandtheil des Oxyhämoglobins ist. Leider sind die Filtrate vom Jodhämoglobin verloren gegangen, und ich untersuchte nicht näher jenen scheinbar albumosenartigen Niederschlag, den ich immer, wenn auch in sehr kleiner Menge, beim Zusatz von gesättigter Ammonsulfatlösung zu den Filtraten bekam. Ob beim Jodiren des Oxyhämoglobins etwa theilweise Eisenabspaltung stattfindet, wie dies nach F. Hopkins und S. Pinkus (l. c.) beim Bromiren des Hundeoxyhämoglobins der Fall ist, kann ich nicht mit Sicherheit behaupten. Die von mir erhaltenen Eisenwerthe für Jodhämoglobin lassen darauf keine bestimmte Antwort geben, weil der Eisengehalt im Pferdeoxyhämoglobin bis jetzt noch nicht festgestellt ist (von 0,33 bis 0,47%). Im Hinblick aber auf mögliche Verluste bei der von mir angewandten Methode für Eisenbestimm-

¹⁾ F. Schulz, Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXIV, S. 449, 1898.

ung bin ich geneigt, zu vermuthen, dass alles Eisen des Oxyhämoglobins im Jodhämoglobin vorhanden sei. Es wäre vielleicht zu frühzeitig, die von mir erhaltenen Analysenwerthe für das Jodhämoglobin in einer Formel auszudrücken, während dieselbe sogar für das krystallisirende Oxyhämoglobin selbst noch nicht aufgestellt ist. Die Jodaufnahmefähigkeit des Oxyhämoglobins (ca. 11% Jod) steht sehr nahe zu der des krystallisirten Serumalbumins (ca. 12% Jod), mit welchem das Oxyhämoglobin manche molekularphysikalischen Eigenschaften, so die Löslichkeit in Wasser und die Fähigkeit, aus halbgesättigter Ammonsulfatlösung auszukrystallisiren, gemein hat. Obwohl auch die Hämatin-Gruppe des Jodhämoglobins, wie dies unter Anderem auch aus den Pepsinverdauungsversuchen hervorgeht, das Jod enthält, so muss man doch annehmen, dass die Jodaufnahmefähigkeit des Globins selbst eigentlich derjenigen des krystallisirten Serumalbumins noch näher steht, wenn auch nicht die gleiche sein wird.

Was das Verhalten des Jodhämoglobins zur Pepsinverdauung anbetrifft, so sprechen die von mir kürzlich angeführten Versuche, wie es scheint, dafür, dass die Abspaltung der jodhaltigen Hämatin-Gruppe vom Jodhämoglobin schon im Stadium der Albumosenbildung geschieht. Bei der Trypsinverdauung des Jodhämoglobins konnte ich eine Abspaltung der Hämatin-Gruppe mit ihren charakteristischen Eigenschaften nicht constatiren: der bei Neutralisation der Verdauungsflüssigkeit erhaltene Niederschlag löste sich immer vollständig beim Ansäuern mit 0,5%iger ClH , während das freie Hämatin oder das Jodprodukt des Hämatins bei solchen Bedingungen unlöslich ist. Jedenfalls bedarf das Verhalten des Jodhämoglobins, auch des Oxyhämoglobins selbst und des Hämatins zur Pepsin- und Trypsinverdauung eingehenderen Studiums.

Der Versuch, das Jodprodukt des Hämatins darzustellen, ist, wie man aus Analysenzahlen sieht, nicht gelungen: das von mir erhaltene Produkt scheint nicht völlig jodirt und dabei im Vergleich mit dem Hämatin selbst sehr verändert zu sein. Ich beabsichtige, das Verhalten des Jodhämoglobins im Thierkörper noch weiter zu untersuchen.