

Ueber den von V. Arnold als „neutrales Hämatin“ beschriebenen Farbstoff.

Von

K. H. L. Van Klaveren.

(Aus dem physiologischen Laboratorium der Universität Utrecht.)

(Der Redaction zugegangen am 6. Juli 1901.)

Vor einiger Zeit theilte V. Arnold mit, dass das Hämatin bei neutraler Reaction in salzhaltigem Alkohol löslich ist.¹⁾ Er fand nämlich, dass frisches defibrinirtes Blut, mit einer alkoholischen Kalilösung gekocht und mittelst Glaswolle filtrirt, nach der Neutralisation mit Salzsäure den Farbstoff grösstentheils gelöst hielt, indem die Farbe der Lösung von braun roth wurde. Hämatin ist, ausser in Wasser, Aether und Chloroform, auch in Alkohol unlöslich; dass hier der Farbstoff in dem Alkohol gelöst blieb, schrieb Arnold dem zu, dass die Lösung viel Neutralsalz enthielt. Erst mittelst starker Verdünnung mit Wasser wurde der Farbstoff gefällt. Diese Fällung, von Arnold als neutrales Hämatin betrachtet, wurde abfiltrirt und mit Wasser gut ausgewaschen. Dieselbe zeigte sich dann unlöslich in Wasser, in verdünntem sowie in absolutem Alkohol, in concentrirten wässerigen Kochsalz- und Ammoniumsulfatlösungen, löslich aber, besonders beim Erwärmen, in einer alkoholischen Kochsalz- oder Ammoniumsulfatlösung. Diese Lösung ist schön roth von Farbe und zeigt bei der spectroscopischen Untersuchung zwei, zwischen den Fraunhofer'schen Linien D und b gelegenen Absorptionsstreifen. Beim Erhitzen wird die Lösung braun und zeigt dann das Spectrum des alkalischen Hämatins; beim Abkühlen kehrt die

¹⁾ Centralbl. f. d. med. Wissensch. 1899, 9. und 16. Dec. und diese Zeitschr. Bd. XXIX, S. 78.

rothe Farbe und zu gleicher Zeit auch das Spectrum des «neutralen Hämatin» wieder. Zusatz von Alkali ruft den alkalischen, Zusatz von Säure den sauren Hämatinstreifen hervor. Am leichtesten erhielt Arnold das «neutrale Hämatin» aus Methämoglobin. Wurde eine Methämoglobinlösung mit dem gleichen Volum starken Alkohol versetzt, so schlug sofort die braune Farbe der Flüssigkeit in eine rothe um, das Spectrum des Methämoglobins verschwand und bald schied sich das «neutrale Hämatin» aus. Auch wiederholtes Schütteln mit Chloroform genügte zur Ausscheidung von «neutralem Hämatin» aus einer Methämoglobinlösung. Die am meisten charakteristischen Eigenschaften des von ihm entdeckten Farbstoffes sind, nach Arnold, erstens der mit unbewaffnetem Auge und spectroscopisch nachzuweisende Farbenunterschied bei Zimmertemperatur und beim Erhitzen und zweitens die Löslichkeit in salzhaltigem Alkohol. «Diese beiden Eigenschaften», so spricht er sich aus, «charakterisiren eine neutrale Hämatinlösung hinlänglich einer Oxyhämoglobinlösung gegenüber.»¹⁾

Gegen die Auffassung Arnold's wurde inzwischen bald Zweifel erhoben. Formánek bemerkte, dass auch aus einer Oxyhämoglobinlösung, wenigstens bei einer Temperatur von etwa 50° C., durch Zusatz von Chloroform ein rother Niederschlag erhalten wird, welcher aber als ein schwerlösliches Oxyhämoglobin zu betrachten sei. Der Niederschlag enthielt ebensoviel Eisen wie das Hämoglobin, 0,33% und 16% N. «Es unterliegt daher keinem Zweifel, dass dieser Körper kein Hämatin ist.»²⁾ Formánek fügt dann hinzu, dass durch Vermischung einer Oxyhämoglobinlösung mit einer concentrirten alkoholischen Kochsalzlösung eine Substanz erhalten wird, welche dem Arnold'schen «neutralen Hämatin» analog ist, die zwei von diesem Forscher beschriebenen Absorptionsstreifen zeigt, beim Erhitzen eine braune Farbe annimmt und dann den alkalischen Hämatinstreifen gibt. Dieser Farbstoff ist aber offenbar nicht identisch mit dem von Formánek

1) a. a. O., S. 85.

2) Diese Zeitschr., Bd. XXIX, S. 421.

mittelst Chloroform aus Oxyhämoglobin erhaltenen. Obgleich also Formánek vollkommen zu dem Ausspruche berechtigt ist, der letztgenannte Farbstoff sei gewiss kein Hämatin, so hat er dennoch nicht nachgewiesen, dass dasselbe von dem von Arnold neutrales Hämatin genannten Stoff gesagt werden darf.

Andererseits schien mir auch die Auffassung Arnold's nicht genügend begründet zu sein. Wenn man auch schon annehmen dürfte, der in salzhaltigem Alkohol lösliche, in Wasser unlösliche, bei Temperaturwechsel Aenderung der Lichtabsorption zeigende Farbstoff sei nicht als Hämoglobin zu betrachten, so war damit noch nicht festgestellt, dass derselbe Hämatin genannt werden musste, nur weil der Farbstoff durch Behandlung des Hämoglobins mit alkoholischer Kalilauge erhalten wurde und bei alkalischer Reaction das Licht in derselben Weise wie Hämatin absorhirt.

Thatsächlich fand ich, dass die von Arnold beschriebene Substanz dem Hämoglobin noch sehr nahe steht. Sie ist nicht, wie das Hämatin, ein eiweissfreies Spaltungsprodukt, sondern ein aus einer noch sehr geringfügigen Zersetzung des Blutfarbstoffes hervorgegangenes Proteid: Hämoglobin, in welchem nicht, wie im Methämoglobin, nur eine Atomverschiebung stattgefunden hat, sondern von welchem schon ein, wenn auch kleiner Theil des so hoch zusammengesetzten Moleküls abgespalten worden ist.

Ich erlaube mir deshalb vorzuschlagen, diesem Produkt den Namen Kathämoglobin zu geben, wodurch angedeutet sei, dass diese Substanz nicht, wie das Methämoglobin, durch intramolekulare Umlagerung, sondern durch einen ersten Anfang des Abbaues des Moleküls entstanden ist.

Arnold hat die fragliche Substanz durch Aufkochen einer Mischung von defibrinirtem Blut mit einer alkoholischen Kalilösung bereitet. Ueber die relativen Mengen von Blut, Kalilauge und Alkohol, und über die Zeit, während welcher die Mischung erhitzt werden soll, macht er aber keine Angaben. Dennoch ist es nöthig, darauf bei der Bereitung zu achten. Beim Verdünnen der neutralisirten Flüssigkeit mit Wasser wird die rothe Fällung nicht oder nur in geringer Menge er-

halten, wenn der Gehalt der Lösung an KOH viel mehr ist wie 5% und wenn das Kochen einige Zeit fortgesetzt worden ist. Wenn hierauf geachtet wurde, erhielt ich, genau so wie Arnold angibt, eine, so lange die Reaction alkalisch war, die Farbe des alkalischen Hämatin zeigende, bei der Neutralisation roth werdende Lösung, welche, nachdem das gefällte Eiweiss abfiltrirt war, beim Zusatz von Wasser einen grobflockigen, blassrothen Niederschlag lieferte. Der Niederschlag war unlöslich in Wasser, beim Erhitzen aber leichtlöslich in salzhaltigem Alkohol. Diese Lösung zeigte die von Arnold beschriebenen Absorptionsbänder und den Farbenwechsel beim Erhitzen und Abkühlen. Sie enthielt aber nicht nur Hämatin, sondern auch in reichlicher Menge Eiweiss. Kochen der Lösung mit Essigsäure und darauf folgender Zusatz von gesättigter Kochsalzlösung rief eine massige Eiweissfällung hervor.

Dass dieses Eiweiss vom Blutserum herrühren sollte, war kaum anzunehmen. Nach dem Kochen mit Kali und Alkohol, Neutralisiren und Filtriren, dürften in dem durch Verdünnen der alkoholischen Lösung mit Wasser hervorgerufenen Niederschlag von diesem Eiweiss nicht mehr als Spuren erwartet werden. Dennoch wurde, zur grösseren Sicherheit, für die weitere Untersuchung statt defibrinirten Blutes reines, krystallisirtes Hämoglobin verwendet.

Dasselbe wurde in der von Schuurmans-Stekhoven angegebenen Weise¹⁾ bereitet, welche hauptsächlich hierin von anderen Methoden verschieden ist, dass der Blutfarbstoff den Stromata nicht durch Wasserzusatz, sondern durch Zerquetschung der Blutkörperchen entzogen wird. Die Blutkörperchen werden mit 1%iger Kochsalzlösung auf der Centrifuge ausgewaschen und dann während zwei Stunden mit Asbestflocken kräftig geschüttelt. Der Blutfarbstoff löst sich dann in der Salzlösung auf, indem die Stromata grösstentheils an den Asbestflocken festkleben und durch Filtration entfernt werden. In dieser Weise braucht das Hämoglobin nicht mit Aether in Berührung gebracht zu werden. Dann wird

1) Onderz. Physiol. Laborat. Utrecht. 4. Reeks. I. p. 67.

die Hämoglobinlösung in einem Pergamentpapierschlauch in 45^o oigen Alkohol in den Eisschrank gestellt. Sobald die Hämoglobinkrystalle sich an der Dialysatorwand abzusetzen anfangen (nach 24 bis 40 Stunden), wird der Dialysatorinhalt in ein cylindrisches Gefäss gebracht und darin im Eisschrank bis zum vollständigen Ablauf der Krystallisation belassen. Das Hämoglobin wird also mit nicht mehr Alkohol in Berührung gebracht, als für die Krystallisation nothwendig gefordert wird. Auf den Krystallbrei wird dann ein seidenes Siebbecken gestellt, welches, mehr oder weniger, je nachdem es nöthig scheint, belastet, die Mutterlauge durchtreten lässt. Nach Entfernung der Mutterlauge werden die Krystalle bei 37^o C. in möglichst wenig Wasser gelöst. Diese Lösung wird wieder im Dialysator in 45^o oigen Alkohol gestellt. Jetzt fängt die Krystallisation viel schneller an als das erste Mal. Nachdem die Krystalle in der angegebenen Weise zur vollständigen Ausscheidung gekommen und von der Mutterlauge getrennt sind, werden dieselben erst auf porösem Teller und dann in einer Porzellanschale über Chlorcalcium bei Zimmertemperatur getrocknet.

Zur Bereitung des Kathämoglobins wurden 100 ccm. einer möglichst concentrirten Lösung dieser Krystalle mit 200 ccm. 96^o oigen Alkohols und 1—2 ccm. gesättigter Kalilauge versetzt, bis auf 60^o C. erhitzt, sofort mit Salzsäure neutralisirt, abgekühlt und mit einer reichlichen Menge destillirten Wassers verdünnt. Der Niederschlag wurde mit Wasser gewaschen bis das Filtrat ganz farblos war, in 60^o oigen Alkohol, unter Zusatz von Kochsalz, bei 60^o C. gelöst und wieder mit Wasser gefällt. Zur weiteren Reinigung wurde die Lösung in salzhaltigem Alkohol und die Fällung mit Wasser noch einmal wiederholt.

Die Ausbeute wurde kleiner, sobald zur Bereitung mehr Kalilauge verwendet wurde, ebenso wenn das Gemisch mehr oder weniger als 60—70^o Alkohol enthielt, und wenn die Erhitzung zu hoch getrieben oder längere Zeit fortgesetzt wurde.

Auch das so erhaltene Kathämoglobin, welches sicher nicht mit Eiweissstoffen des Serums verunreinigt war, enthielt

reichlich Eiweiss. Die Lösung gab eine Fällung beim Kochen mit Essigsäure und Kochsalz. Zusatz von Salpetersäure verursachte einen Niederschlag, welcher beim Kochen gelöst wurde. Ebenso wurde eine Fällung hervorgerufen durch Essigsäure und Ferrocyankalium, durch Pikrinsäure, durch Sättigung mit Kochsalz oder mit Ammonsulfat. Das Kathämoglobin löst sich in 0,2%iger HCl. Wurde diese Lösung mit Pepsin versetzt und die Nacht über bei 37° C. digerirt, so waren die Kathämoglobinstreifen durch Neutralisiren der Lösung nicht mehr hervorzurufen.

Die von Arnold als Hämatin betrachtete Substanz ist also, ebenso wie das Hämoglobin, ein Proteid. Erst bei mehr eingreifender Behandlung des Blutfarbstoffes mit stärkerer alkoholischer Kalilauge oder bei anhaltender Erhitzung wird das Hämatin völlig von dem Eiweisscomponenten losgelöst.

Es war jetzt zu untersuchen, ob bei der beschriebenen, vorsichtigen Behandlung das Eiweiss des Hämoglobins dennoch theilweise entfernt oder vielleicht denaturirt wird.

Wie Schulz nachgewiesen hat, lässt sich das Hämoglobin mittelst sehr verdünnter Salzsäure spalten und wird dann als eiweissartiges Spaltungsprodukt ein, wie es scheint, mit den Histonen verwandter Körper erhalten, das Globin.¹⁾

Dem von Schulz gezeigten Weg folgend, habe ich erstens krystallisirtes Oxyhämoglobin und zweitens daraus in der beschriebenen Weise bereitetes Kathämoglobin in 0,1%iger HCl gelöst und die Lösung, genau wie von Schulz angegeben, mit Alkohol versetzt und im Scheidetrichter mit Aether geschüttelt.

In Bezug auf das Oxyhämoglobin stimmten meine Befunde mit den Schulz'schen Angaben gut überein. In den Aether ging ein brauner, die Absorptionsstreifen des sauren Hämatins zeigender Farbstoff über. Dieser Farbstoff konnte, nach Verflüchtigung des Aethers, in Ammoniak gelöst werden. Die Lösung zeigte den Streifen des alkalischen Hämatins und, nach Zusatz Stokes'scher Flüssigkeit, die beiden Absorptionsbänder des Hämochromogens.

¹⁾ Diese Zeitschr., Bd. XXIV, S. 449.

Aus der von dem Aether getrennten wässerigen alkoholischen Lösung konnte durch Neutralisation mit Ammoniak das Globin gefällt werden. Das von mir bereitete Globin wich von dem von Schulz beschriebenen nur in Bezug auf folgende Reactionen ab:

Wurde das Globin mittelst Ammoniak gefällt, mit Wasser gewaschen, in verdünnte Essigsäure gelöst und dann ein Paar Tage gegen strömendes Wasser dialysirt, so konnte es durch Alkohol nicht gefällt werden.

Ammoniumchlorid rief, in nicht zu geringer Menge zugesetzt, auch bei saurer Reaction einen Niederschlag hervor.

Magnesiumsulfat gab bei neutraler Reaction keine Fällung.

Natriumphosphat, in geringer Menge zugesetzt, lieferte einen Niederschlag, welcher sich aber beim Erhitzen nicht löste. Wurde viel Natriumphosphat zugleich zugesetzt, so blieb die Lösung klar; sie trübte sich dann aber beim Kochen.

Ausser diesen gewiss nicht wichtigen Unterschieden entsprach das von mir bereitete Globin völlig demjenigen, welches Schulz aus Oxyhämoglobin erhielt. Dabei muss ich bemerken, dass in meinen Versuchen Hämoglobin aus Rinderblut verwendet wurde, während die Beschreibung Schulz's sich auf den Blutfarbstoff des Pferdes und des Hundes bezieht.

Genau dieselbe Behandlung, wie auf das Oxyhämoglobin, wurde auf den daraus bereiteten, von Arnold neutrales Hämatin genannten Stoff angewandt und dabei wurde, genau so wie beim Oxyhämoglobin, eine Hämatinlösung in Aether und eine Globinlösung in verdünntem Alkohol erhalten. Dieses Globin war in keiner Hinsicht von dem in meinen Versuchen aus Oxyhämoglobin abgespaltenen zu unterscheiden.

Von einer Verunreinigung der wiederholt in salzhaltigem Alkohol gelöst und mittelst Wasser wieder gefällten Substanz mit von zersetztem Hämoglobin herrührendem Globin kann wohl nicht die Rede sein. Es ist also klar, dass der von Arnold beschriebene Stoff, ebenso wie das Hämoglobin, ein Proteid darstellt und unrichtiger Weise mit dem Namen Hämatin belegt worden ist.

Schulz hat nachgewiesen, dass bei der Behandlung des

Hämatins mit verdünnter Salzsäure neben dem Hämatin und dem Globin noch andere, kohlenstoffarme und stickstoffreiche Zersetzungsprodukte frei werden. Denn das Hämatin und das Globin enthalten beide mehr Kohlenstoff, als dem Hämatin, aus welchem sie entstanden sind, entspricht. Die Ausbeute an den beiden genannten Stoffen war denn auch geringer als die Menge des zersetzten Hämoglobins. Die Menge des Hämatins wurde durch Wägung des nach der Verflüchtigung des Aethers bleibenden Rückstandes bestimmt, indem das Globin aus dem wässerigen Alkohol mittelst Ammoniak, unter Zusatz von Ammoniumchlorid, ausgefällt, filtrirt, getrocknet und gewogen wurde. So wurde 9,3% weniger gefunden, als dem zersetzten Hämoglobin entsprach. Auch wenn in Betracht genommen wurde, dass die Ausfällung des Globins wahrscheinlich nicht ganz ohne Verlust stattfand, wäre es doch nicht wohl möglich, das Deficit von 9,3% aus diesem Verluste zu erklären. Von welcher Art die das Deficit verursachenden Spaltungsprodukte sind, war bis jetzt nicht zu eruiren.

Ganz ähnliche Befunde, wie Schulz für das Oxyhämoglobin des Pferdes, erhielt ich in Bezug auf das Oxyhämoglobin des Rindes.

Schulz fand aus 1,788 g Oxyhämoglobin:

Hämatin 0,075 g, also 4,2%, und Globin 1,547 g, also 86,5%

und ich aus 0,594 g Oxyhämoglobin:

Hämatin 0,025 g, also 4,2%, und Globin 0,517 g, also 87,2%

Bei Schulz war der Verlust 9,3%, bei mir 8,6%.

Ich hatte jetzt zu untersuchen, ob dieses Verhältniss durch die Behandlung des Blutfarbstoffes mit alkoholischer Kalilauge in der oben beschriebenen Weise geändert wird.

Dazu wurden die aus der durch wiederholtes Lösen in salzhaltigen Alkohol und Fällen mit Wasser gereinigten Substanz erhaltenen Mengen von Hämatin und Globin genau auf dieselbe Weise wie beim Oxyhämoglobin bestimmt. Drei Bestimmungen lieferten folgende Resultate:

	Kathämoglobin	Hämatin	Globin	Verlust
I	0,545 g	0,0265 g. 4,8%	0,492 g. 90,2%	5,0%
II	0,654	0,027 4,1%	0,5975 91,2%	4,7%
III	0,684	0,0255 3,87%	0,600 87,7%	8,43%

Beim ersten Anblick kann es vielleicht scheinen, als ob das Deficit bei der Spaltung des Kathämoglobins kleiner ist als beim Oxyhämoglobin. Es ist aber einleuchtend, dass die Grösse der unvermeidlichen Bestimmungsfehler nicht zulässt, den gefundenen Unterschieden irgend einen Werth beizumessen. Das Gewichtsverhältniss zwischen Farbstoff und Eiweiss war:

für Oxyhämoglobin (Pferd)	20,6
» » » (Rind)	20,7
» Kathämoglobin (Rind) I. 18,6	
II. 22,1	
III. 23,5	
	64,2, Mittel 21,4

Berücksichtigt man, dass immer ein kleiner Theil des Hämatins nicht in den Aether übergeht; sondern am Globin haftet¹⁾ und dass ein kleiner Verlust an Globin wohl nicht zu vermeiden ist, dann hat man, wie ich glaube, nicht das Recht, aus den unbedeutenden Unterschieden, welche gefunden wurden, zu folgern, beim Uebergang des Hämoglobins in Kathämoglobin würde ein Theil des Eiweisses dem Molekül entzogen werden.

Wie oben bemerkt, ist dies aber nur dann der Fall, wenn bei der Bereitung der Gehalt des Alkohols an Kalilauge nicht zu gross genommen und die Mischung, sobald die Temperatur auf 60° C. gebracht ist, sofort neutralisirt wird. Sobald man die Kalilauge in grösserer Concentration, bei höherer Temperatur oder während längerer Zeit auf den Blutfarbstoff einwirken lässt, tritt dieselbe Reaction ein, wie beim Kochen von Hämoglobin mit alkalischem Wasser; dann wird das Hämatin abgespalten und in Alkali gelöst. Dann wird auch beim Neutralisiren und Verdünnen mit Wasser der

1) Das Globin wird, wie auch Schulz angibt, niemals völlig farblos erhalten, es ist immer mehr oder weniger von Hämatin verunreinigt. In Uebereinstimmung damit ist die Asche des Globins eisenhaltig. Die Menge des Eisens ist aber so klein, dass sie wohl der Beimischung des Hämatins zugeschrieben werden darf. Ich erhielt:

aus 1,1285 g Globin aus Oxyhämoglobin	0,9 mg Fe, also 0,08%
1,002 » » » Kathämoglobin	0,8 » » » 0,08%

Das Globin selbst darf also wohl als eisenfrei betrachtet werden.

fleischfarbene, in warmem salzhaltigen Alkohol lösliche Niederschlag nicht oder nur in geringer Menge erhalten.

Das Mitgetheilte könnte vielleicht die Vermuthung nahe legen, die von Arnold als neutrales Hämatin beschriebene Substanz wäre als ein modificirtes Hämoglobin zu bezeichnen, als ein dem Methämoglobin analoger, nicht durch Zersetzung, sondern durch Atomverschiebung im Molekül entstandener Stoff.

Dem ist aber nicht so, wie aus der weiteren Untersuchung hervorging. Ein Anfang des Abbaues des Moleküls konnte nachgewiesen werden und darin möge die vorgeschlagene Benennung «Kathämoglobin» ihre Berechtigung finden.

Durch die Erhitzung mit Alkohol und Kalilauge wird dem Blutfarbstoff Eisen entzogen, wie sich bei der Bestimmung des Eisengehalts des Oxyhämoglobins und des daraus bereiteten Kathämoglobins herausstellte.

Für die Eisenbestimmung wurde die bei 110° C. getrocknete Substanz im Platintiegel verbrannt und in 10% iger eisenfreier Schwefelsäure gelöst. Alles Eisen wurde, in der üblichen Weise, mit Hülfe von eisenfreiem, platinirtem Zink unter Durchleiten von Kohlensäure in Ferrosulfat übergeführt und dann mit einer Chamäleonlösung titrirt. Aus krystallisirtem Oxyhämoglobin, in der oben beschriebenen Weise aus Rinderblut bereitet, erhielt ich:

I. 2,241 g Oxyhämoglobin	7,3246 mg Eisen.	also 0,326 %
II. 1,829 »	5,8406 »	» 0,319 %
		Mittel 0,322 %

Kathämoglobin, aus einem Theil desselben Hämoglobinpräparates dargestellt, lieferte:

I. 1,018 g Kathämoglobin	2,7242 mg Eisen,	also 0,267 %
II. 3,457 »	9,116 »	» 0,266 %
III. 1,379 »	3,582 »	» 0,259 %
		Mittel 0,264 %

Der Stickstoffgehalt dagegen war nicht merkbar geändert. Die Substanz wurde im Kjeldahlkölbchen mit 15 ccm. einer Mischung von 500 ccm. starker Schwefelsäure und 100 g Phosphorpentoxyd unter Zusatz eines Tröpfchens Quecksilbers verbrannt. Das gebildete Ammoniak wurde in $\frac{1}{4}$ n-Schwefel-

säure, welche schon vor dem Anfang der Destillation mit Methylorange versetzt war, aufgefangen.

So fand ich:

aus 0,7275 g krystallisiertem Oxyhämoglobin 120,9 mg N, also 16,62%
und aus daraus bereitetem Kathämoglobin:

I. 0,8925 g Kathämoglobin	147,7 mg N, also	16,56%
II. 0,4845	82,9	17,11%

Aus defibrinirtem Blut statt aus Krystallen, also weniger rein hergestelltes Kathämoglobin ergab: 0,242% Eisen und 16,24% N. Die aus diesem Befund hervorgehende Folgerung, dass bei der Behandlung mit alkoholischer Kalilauge eine eisenhaltige Atomgruppe aus dem Hämoglobin abgespalten wird, fand in der weiteren Untersuchung eine Bestätigung. Es war nämlich möglich, in der vom durch Wasserzusatz ausgeschiedenen Kathämoglobin abfiltrirten Flüssigkeit Eisen nachzuweisen. Ich habe zu bestimmen versucht, wieviel von dem aus dem Hämoglobin verloren gegangenen Eisen zurückgefunden werden konnte.

Dazu wurde eine gewogene Menge krystallisiertes Oxyhämoglobin in Wasser gelöst. Die Lösung wurde in der oben beschriebenen Weise mit Kali und Alkohol vermischt, auf 60° C. erhitzt und dann mit Salzsäure neutralisirt. Dabei blieb die Flüssigkeit, so lange die Temperatur auf 60° C. gehalten wurde, vollständig klar. Durch Abkühlen und Wasserzusatz wurde das Kathämoglobin gefällt. Die vom Niederschlag abfiltrirte, schwach röthlich gefärbte Flüssigkeit wurde eingeeengt, von dem sich noch ausscheidenden Kathämoglobin, welches mit dem zuerst gefällten vereinigt wurde, abfiltrirt und bis zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde verbrannt und der Eisengehalt desselben bestimmt. Ich erhielt aus 6,1002 g Oxyhämoglobin 5,7558 g Kathämoglobin. Ersteres enthielt 0,322%, also 19,64 mg, letzteres 0,264%, also 15,19 mg Eisen. Es waren danach 4,45 mg Eisen abgespalten worden. Davon fand ich im Rückstand des vom Kathämoglobin getrennten Filtrates 2,34 mg zurück.

Das Filtrat enthielt das Eisen in organischer Bindung. Irgend ein Eisensalz konnte darin nicht nachgewiesen werden.

Zur völligen Entfernung des Kathämoglobins, unter Vermeidung des Eindampfens, wurde folgender Weg eingeschlagen.

Das zwar schwach, aber doch immer röthlich gefärbte Filtrat wurde mit Ammonsulfat gesättigt. Dabei entstand keine Trübung, aber die Lösung trennte sich in zwei Theile, eine obere, alkoholhaltige, den Farbstoff enthaltende, und eine untere, völlig farblose Schicht, welche mit Hülfe des Scheidetrichters gesondert aufgefangen wurden. Der in der oberen Schicht enthaltene Farbstoff wurde mittelst Dialyse, wobei Salz und Alkohol entfernt wurden, gefällt. Der Niederschlag war in salzhaltigem Alkohol unter Erwärmen löslich und stimmte auch in Bezug auf das spektroskopische Verhalten mit Kathämoglobin überein. Einmal habe ich eine Eisenbestimmung gemacht und erhielt aus 0,067 g der Substanz 0,1273 mg Eisen, also 0,19%. Selbstverständlich konnte bei einer so kleinen Menge eine genaue Uebereinstimmung mit den oben angeführten Analysen nicht erwartet werden.

Die farblose, mit Ammonsulfat gesättigte Lösung wurde mittelst Alkohol theilweise vom Salz befreit und dann mit Barytwasser gefällt. Das Baryumsulfat wurde abfiltrirt, der überschüssige Baryt mittelst Kohlensäure entfernt und das Filtrat erst auf dem Wasserbad, dann bei Zimmertemperatur über Schwefelsäure eingeeengt. Indem sich Krystalle von Ammoniumchlorid ausschieden, blieb die eisenhaltige Substanz in Lösung. Die Mutterlauge zeigte aber keine Spur einer Eisenreaction, bevor die organische Substanz durch Verbrennung zerstört war.

Diese organische Eisenverbindung ist nicht nur sehr leicht löslich in Wasser, sodass alle Versuche, dieselbe durch Concentration der Lösung zu isoliren, fehl schlugen, sie wird auch bei der Dialyse gegen Wasser vom Pergamentpapiere durchgelassen. Wenn die mittelst Ammonsulfat vom Kathämoglobin befreite Lösung ein paar Tage gegen strömendes Wasser dialysirt war, konnte im Dialysatorinhalt auch nach Eindampfen und Verbrennen keine Spur von Eisen mehr nachgewiesen werden.

Arnold fand sein «neutrales Hämatin» leichter aus Methämoglobin, wie aus Oxyhämoglobin zu erhalten. Beim Schütteln

einer Methämoglobinlösung mit dem gleichen Volumen Alkohol oder mit Chloroform, oder auch mit Aether, wurde die Farbe von braun roth; anstatt Methämoglobin enthielt jetzt die Flüssigkeit den in salzhaltigem Alkohol löslichen, in Wasser unlöslichen Farbstoff.

Dieser Farbstoff stimmt nicht nur in Löslichkeit und in Lichtabsorption, sondern auch in Bezug auf den Eisengehalt mit der mittelst alkoholischer Kalilauge aus Oxyhämoglobin erhaltenen Substanz überein, wie aus Folgendem hervorgeht.

Eine Lösung von krystallisirtem Hämoglobin aus Rinderblut wurde mit Amylnitrit versetzt und ein paar Tage dialysirt. Ein Theil der so erhaltenen Methämoglobinlösung wurde bis zur Trockne eingedampft, verbrannt und zur Eisenbestimmung verwendet. 1,0735 g Methämoglobin lieferte 3,45 mg Eisen, 0,321%, ein Gehalt, mit demjenigen des von mir bereiteten Oxyhämoglobin übereinstimmend, entsprechend.

Der übrige Theil der Methämoglobinlösung wurde mit Alkohol behandelt, wobei das gebildete Kathämoglobin ausfiel. Der Niederschlag wurde abfiltrirt, unter Erwärmen in NaCl-haltigem Alkohol gelöst und aus der klaren Lösung durch Wasserzusatz wieder gefällt und abfiltrirt. In dem jetzt erhaltenen, schwach gefärbten Filtrat war, als die Flüssigkeit in der oben beschriebenen Weise mittelst Ammonsulfat vom Farbstoff befreit worden war, wieder organisch gebundenes Eisen nachzuweisen.

Das Ergebniss der Eisenbestimmung war:

0,545 g Kathämoglobin lieferte 1,45 mg Eisen, 0,266% entsprechend. Der Eisengehalt des mittelst Alkohol aus Methämoglobin bereiteten Kathämoglobins stimmte also mit dem des mittelst alkoholischer Kalilauge aus Oxyhämoglobin bereiteten überein. Daraus geht hervor, dass die bei dem Uebergang des Oxyhämoglobins in Methämoglobin stattfindende Umlagerung den Abbau des Moleküls erleichtert. Der Abbau fängt mit der Ablösung einer wahrscheinlich wenig umfangreichen eisenhaltigen Atomgruppe an. Erst bei heftigerem Eingreifen geht die Zerstörung weiter, wird der Farbstoff vom Eiweiss

getrennt und jedes dieser Spaltungsprodukte für sich weiter zersetzt.

Dass eisenhaltige Atomgruppen leicht vom Hämoglobinmolekül abgesplittet werden, steht mit den Erfahrungen zahlreicher Forscher über die Zusammensetzung des Hämatins im Einklang. Selbst in Bezug auf die Zusammensetzung des krystallisirten Hämins gehen die Ergebnisse der Analysen so weit auseinander, dass, während frühere Bestimmungen zum Schluss geführt hatten, ein Molekül Hämin enthielt 1 Atom Fe auf 4 Atome N, (Cloëtta¹⁾ und Rosenfeld²⁾ 1 Atom Fe fanden auf 3 Atome N. Je nach der Bereitungsweise wurde das Hämin ärmer oder reicher an Eisen gefunden im Verhältniss zum Stickstoff.

Der Grund der Verschiedenheit kann, wie Cloëtta bemerkt, in dem Ablösen eines eisenhaltigen Bestandtheiles, oder auch in Verunreinigung mit einer stickstoffreichen Substanz gelegen sein. Dieser Forscher ist geneigt, die letztgenannte Möglichkeit anzunehmen, und Rosenfeld stimmt ihm darin bei; irgend ein entscheidender Grund wurde dafür aber nicht gefunden.

Eine andere Auffassung schlägt von Zeynek vor in diesen Worten: „Aus den nicht unbeträchtlich von einander differirenden Analyseergebnissen mancher nach verschiedenen Methoden dargestellten Hämatine scheint hervorzugehen, dass die Zerreiſung des grossen Hämoglobinmoleküls unter Abspaltung des eisenhaltigen Farbcomplexes nicht immer an der gleichen Stelle erfolgt.“³⁾

Vielleicht wäre diese Auffassung allzu einfach, wenn wenigstens das Gesagte buchstäblich genommen und vorausgesetzt wird, ein Hämoglobinmolekül würde in nur zwei Stücke zerrissen werden, wobei die Bruchstelle in verschiedenen Fällen etwas anders gelegen sein würde. Hat doch Schulz nachgewiesen, dass bei der Spaltung des Hämoglobins nicht Alles als Hämatin und Globin zurückgefunden wird, dass also noch

1) Arch. f. exp. Path. und Pharm., Bd. 36, S. 349.

2) Ibid. Bd. 40, S. 137.

3) Diese Zeitschr., Bd. XXX, S. 126.

ein oder mehrere andere Spaltungsprodukte frei werden. Wenn man beachtet, wie leicht eisenhaltige Splitter vom Hämoglobinkmolekül losgelöst werden, wie das schon in Folge der Berührung mit Alkohol oder mit Chloroform, wenn nur der Farbstoff zuvor in den Zustand des Methämoglobins gebracht worden ist, stattfindet, so braucht man sich nicht zu wundern, wenn ein Absplitteln in grösserem Massstab unter der Einwirkung tiefer eingreifender, eine Spaltung des Hämoglobins in Eiweiss und Farbstoff hervorrufender Agentien erfolgte.

Es war zu erwarten, dass das durch Spaltung des schon an sich nicht eisenreichen Kathämoglobins entstandene Hämatin weniger Eisen, als gewöhnlich in Hämatin gefunden wird, enthalten würde. Diese Voraussetzung konnte bestätigt werden: ausserdem stellte es sich heraus, dass auch das aus Oxyhämoglobin mittelst 0,1%iger Salzsäure, Alkohol und Aether bereitete Hämatin eisenarm war. Bei der Analyse des nach Schulz in ätherischer Lösung erhaltenen Hämatins fand ich:

I.	16.5 mg aus Oxyhämogl. bereit. Hämatin	lieferte 0.7 mg Eisen, also	4.2%
II.	109	„ „ „ „	4.7 „ „ 4.3%
I.	53.5 Kathämoglobin	„ „ „ „	1.77 „ „ 3.3%
II.	61.5	„ „ „ „	1.71 „ „ 3.6%

Das aus Kathämoglobin hervorgegangene Hämatin ist also zwar noch eisenärmer als das aus Oxyhämoglobin erhaltene, letzteres enthält aber auch nur etwa halb so viel Eisen, als gewöhnlich in nach verschiedenen Methoden bereitetem Hämatin gefunden wird. Nencki und Sieber¹⁾ fanden den Eisengehalt des Hämatins aus Rinderblut 9,35%, während Gloëtta und Rosenfeld in verschiedenen Präparaten mehr als 9,5% Eisen fanden und das von Küster²⁾ nach der Methode von Nencki und Sieber bereitete Hämin 8,65%, das nach der Vorschrift Schalfejew's bereitete 9,22% Eisen enthält. Untersuchungen der letzten Zeit³⁾ haben die Aussicht

1) Arch. f. exp. Path. und Pharm., Bd. 18, S. 401.

2) Diese Zeitschr., Bd. XXVIII, S. 1.

3) W. Küster, Diese Zeitschr., Bd. XXVIII, S. 1; Bd. XXIX, S. 185. Nencki und Zaleski, ibid. Bd. XXX, S. 384 und Ber. d. chem. Ges. Bd. 34, S. 997.

auf bessere Kenntniss der Structur des Hämatinmoleküls geöffnet. Vielleicht wird bald genauer als jetzt angegeben werden können, welche Atomgruppen es sind, wodurch die Zusammensetzung des nach verschiedenen Methoden bereiteten Hämatins geändert wird.

Dass die Farbe nicht in erster Linie von dem Vorhandensein eisenhaltiger Atomgruppen abhängt, geht schon daraus hervor, dass der Stoff ein Farbstoff bleibt, auch wenn derselbe nach Verlust des gesammten Eisens in Hämatoporphyrin übergegangen ist. Auch die für das Hämatin charakteristischen Absorptionsstreifen aber sind nicht an einen bestimmten Gehalt des Moleküls an Eisen gebunden. Denn das nach der Spaltung mittelst Salzsäure in Aether gelöste, sowohl das aus Kathämoglobin, wie das aus Oxyhämoglobin entstandene Hämatin zeigt die bekannten Bänder im Spectrum genau so, wie auf anderem Weg bereitetes und viel eisenreicheres Hämatin.

Dass überhaupt das Lichtabsorptionsvermögen bei der Beurtheilung von Farbstoffen mit Vorsicht zu verwerthen ist, zeigt auch das Kathämoglobin, welches in alkalischer Lösung den Absorptionsstreifen der Hämatine und, nach Zusatz Stokes'scher Flüssigkeit, die beiden Hämochromogenstreifen beobachten lässt, während doch, wie oben nachgewiesen, der Stoff dem Hämoglobin viel näher steht, als dem Hämatin.

Dass Hämatine verschiedener Herkunft nicht gleich sind, geht auch daraus hervor, dass nicht jedes Hämatin zur Häminbildung geeignet ist. Hämatin, aus nach der Schalfejew'schen Methode bereitetem Hämin durch Zersetzung mit Ammoniak hergestellt, liefert bei der Behandlung mit Eisessig und ein wenig Kochsalz vollkommen charakteristische Teichmann'sche Krystalle; aus dem nach der von Schulz gegebenen Methode aus Oxyhämoglobin oder aus Kathämoglobin bereiteten Hämatin ist es mir aber nicht gelungen, mit Eisessig und Kochsalz oder mit Aceton und Salzsäure Häminkrystalle herzustellen.

Aus meinen Befunden glaube ich Folgendes schliessen zu dürfen. Der von Arnold als neutrales Hämatin beschriebene Stoff ist ein in der Zusammensetzung nur wenig vom Hämoglobin verschiedenes Proteid.

Dasselbe unterscheidet sich in Bezug auf die Zusammensetzung von Hämoglobin hauptsächlich durch einen geringeren Gehalt an Eisen.

Bei der Bildung des Kathämoglobins wird aus dem Blutfarbstoff Eisen abgelöst in einer wasserlöslichen, organischen Verbindung, welche von Pergamentpapier bei der Dialyse gegen Wasser durchgelassen wird.

Der Name Hämatin umfasst eine Gruppe von Stoffen, welche zwar einen gemeinschaftlichen Kern besitzen, übrigens aber, speciell in Bezug auf den Eisengehalt, beträchtliche Unterschiede nachweisen lassen.