

## Ueber den Kupfergehalt der Cephalopodenleber.

Von  
**M. Henze.**

Mittheilung aus dem physiologisch-chemischen Laboratorium der zoologischen Station zu Neapel.)

(Der Redaction zugegangen am 10. August 1901.)

Eine grosse Anzahl von Untersuchungen haben den constanten und im Vergleich zu anderen Organen hohen Eisengehalt der Wirbelthierleber festgestellt. Im Verein mit rein physiologischen und pathologischen Erfahrungen, es sei nur an die Schwankungen des Eisengehaltes bei perniciöser Anämie erinnert, führte diese Thatsache zu dem Schluss, dass man in der Leber den Ort für den Zerfall des Blutfarbstoffes resp. ein Depot für das zur Bildung desselben nothwendige Eisen zu sehen habe. Besonders scheinen nucleinartige Körper, welche das Eisen ausserordentlich festgebunden halten, die Muttersubstanzen dafür zu sein. Ich erwähne z. B. das Hämatogen Bunge's und das Hepatin Zaleski's.

Auch eine andere wichtige Erscheinung stützt diese Vermuthung. Wir wissen, dass die Leber die Bildungsstätte der specifischen Gallenfarbstoffe ist. Die Abstammung dieser Pigmente vom Hämatin ist auf rein chemischem Wege zweifellos festgestellt worden und wird immer klarer werden, je weiter unsere Kenntnisse über die chemische Constitution des Hämatins fortschreiten, wozu in letzter Zeit wieder die schönen Arbeiten von Küster und von M. Nencki beigetragen haben.

Von diesen Voraussetzungen ausgehend, suchte ich der Frage näher zu treten, ob auch bei Thieren, deren Blut kein Hämoglobin, also kein Eisen enthält, ein ähnlicher Zusammenhang zwischen Leber und Blut zu finden sei.

Am geeignetsten schienen hierzu die Cephalopoden

(Octopus, Eledone, Sepia). Ihr Blut ist absolut eisenfrei und enthält als einzigen Eiweisskörper das kupferhaltige Hämocyanin.

Die grosse Mitteldarmdrüse der Mollusken wird gewöhnlich als Leber bezeichnet, obwohl sie nicht schlechtweg der Leber höherer Thiere an die Seite zu stellen ist. Wir kennen sie z. B. als den Träger verschiedener Enzyme, was ihre Function als Verdauungsdrüse kennzeichnet und seinen Ausdruck in dem Namen «Hepatopankreas» gefunden hat. Griffiths<sup>1)</sup> sagt sogar von Octopus: «the liver is a true pancreas.» Aus verschiedenen Gründen, es sei z. B. nur auf eine neuere Arbeit von Biedermann und Moritz: Ueber die Function der sogenannten «Leber» der Mollusken<sup>2)</sup> hingewiesen, kann man diesem radicalen Vorgehen wohl nicht ganz beistimmen.

Einen gewichtigen Grund gegen die Auffassung als Leber glaubt man in dem Fehlen der echten Gallenpigmente in der Molluskenleber zu sehen. Die gebräuchlichen Reagentien auf Bilirubin oder Biliverdin versagen. Mir scheint diese Thatsache gar nicht so wunderbar, da man den chemischen Zusammenhang zwischen Hämatin und Gallenpigment kennt. Wir können nicht erwarten, dass z. B. aus Hämocyanin Pigmente hervorgehen, die genau die gleichen chemischen Reactionen geben, wie die aus dem Hämoglobin entstehenden echten Gallenfarbstoffe.

Ehe ich meine eigenen Beobachtungen anführe, ist noch eine Arbeit von Dastre und Floresco<sup>3)</sup> zu erwähnen, die bereits einiges Licht über die oben gestellte Frage verbreitet hat. Freilich kann ich mich der Meinung dieser Autoren nicht ohne Weiteres anschliessen.

Genannte Forscher haben in der Leber verschiedener Evertebraten, speciell auch von Cephalopoden, einen constanten Eisengehalt festgestellt. Das Ergebniss ihrer Untersuchung begründet die Annahme einer sogenannten «fonction martiale du foie», d. h. sie glauben, dass der Eisengehalt der Leber wenigstens zum Theil dazu bestimmt sei, die Oxydations-

1) Proceed. R. Soc. Edinburgh. 13. 120.

2) Pflüger's Archiv, Bd. 75. S. 1. 1899.

3) Dastre et Floresco, Fonction martiale du foie chez tous les animaux. Arch. d. Physiol., Bd. 10. S. 176. 1898.

vorgänge in diesem Organe zu bewirken. Nach ihrer Hypothese ist es unrichtig, die alleinige «fonction hématolique», also die Beziehung zwischen Leber und Blutfarbstoff aufrecht zu erhalten und zu sagen: «Le fer est dans le foie par le sang et pour le sang.» Die Hauptstütze erfährt ihre Theorie dadurch, dass es ihnen nicht gelang, Kupfer in der Leber der Evertibraten nachzuweisen, was sie zu dem Schluss führt: «Cette fonction n'est pas relative à l'hématolyse. Le métal du foie est indépendant du pigment métallique du sang.»

Wenn man nun zweifellos Eisen in der Leber der Evertibraten findet und darauf die ebengenannte Theorie gründen kann, so ist es jedenfalls unrichtig, zu behaupten, der Metallgehalt der Leber sei unabhängig vom Blutfarbstoff.

Nachdem ich mich durch mehrere rein qualitative Versuche überzeugt hatte, dass der Kupfergehalt der Leber von Octopus, Eledone, Sepia ganz unverkennbar ist, habe ich auch einige quantitative Bestimmungen gemacht. Das Verfahren war folgendes: Die Thiere wurden verblutet. Das Blut diente zu speciellen Untersuchungen. Zweimal wurde auch vor Entfernung der Leber das ganze Blutgefässsystem durch Seewasser ausgespült. Die Leber wurde sauber heraus präparirt, der Tintenbeutel entfernt, und hierauf bei 110° bis zur Gewichtsconstanz getrocknet. Nach vorsichtiger Veraschung unter mehrfacher Befeuchtung der Asche mit concentrirter HNO<sub>3</sub> ging der Rückstand durch Salzsäure völlig in Lösung. Durch Abdampfen auf dem Wasserbad wurde die überschüssige Salzsäure entfernt und nun in die noch saure Lösung Schwefelwasserstoff eingeleitet. Das gefällte Kupfersulfid wurde schliesslich gegläht und als CuO resp. als Cu<sub>2</sub>S + CuO gewogen. Zur Kontrolle löste ich auch, wenn die Menge hinreichend war, nochmals in Salzsäure und bestimmte das Kupfer als CuO nach vorangegangener Fällung mit reiner Natronlauge.

#### Resultate:

##### 1. Leber von Octopus.

Frischgewicht 112 g.

Trockengewicht 36 g.

Gefunden CuO = 0,3443 g, entsprechend 0,2742 g Cu.

Auf Trockengewicht bezogener Kupfergehalt 0,762 %.

## 2. Leber von Octopus.

Frischgewicht 27.6 g.

Trockengewicht 7.6 g.

Gefunden CuO = 0,0564 g. entsprechend 0,0450 g Cu.

Auf Trockengewicht bezogener Kupfergehalt 0.59 ‰.

## 3. Leber von Eledone.

Frischgewicht 35.2 g.

Trockengewicht 12,7 g.

Gefunden CuO = 0,0300 g. entsprechend 0,0240 g Cu.

Auf Trockengewicht bezogener Kupfergehalt 0.19 ‰.

## 4. Leber von Sepia officinalis.

Frischgewicht von 3 Lebern? (fehlt)

Trockengewicht 3,1128 g.

Gefunden CuO = 0,0357 g. entsprechend 0,0285 g Cu.

Auf Trockengewicht bezogener Kupfergehalt 0.32 ‰.

Zur Bestimmung des Eisens, was durch Titration mit Permanganat geschah, wurde das Filtrat vom Kupfersulfidniederschlag eingedampft und die Salzsäure durch Schwefelsäure vertrieben. Zur Reduction des Eisens zu Oxydulsalz diente eisenfreies Zink. Ich fand einmal 0,032 ‰, das andere Mal 0,076 ‰. Diese Zahlen stimmen mit der von Dastre und Floresco angegebenen Durchschnittszahl 0,052 ‰ gut überein.

Der Kupfergehalt der Cephalopodenleber ist demnach rund zehnmal so gross wie der Eisengehalt.

Die weitere Frage war nun: Woran ist das Kupfer gebunden und in welcher Form ist es vorhanden? Wenn die folgenden Mittheilungen auch mehr den Charakter von Vorstudien an sich tragen, da ich dieselben einstweilen abbrechen musste, so lässt sich doch schon Einiges mit Sicherheit sagen.

Durch die Arbeiten Dastre's und Floresco's<sup>1)</sup> kennen wir zwei verschiedene Leberpigmente von Octopus:<sup>2)</sup> Ein

1) Pigments hépatiques chez les invertébrés. Arch. de Phys. 19. 289. 1898.

2) Die folgenden Beobachtungen beziehen sich sämmtlich auf die Leber von Octopus vulgaris.

wasserlösliches eisenhaltiges Pigment, «pigment aqueux, ferrugineux, ferrine,» und ein wasserunlösliches, wohl aber in Chloroform und anderen organischen Solventien lösliches Pigment, «pigment chloroformique oder pigment chlorophylloide ou xanthophylloide» genannt. Das letztere liefert ein Absorptionsspectrum, das erste dagegen nicht. Mittheilungen über das pigment xanthophylloide, namentlich in optischer Hinsicht, sind auch schon früher von anderen Autoren, ich erwähne nur Mac Munn, gemacht worden.

Ich suchte nun zunächst festzustellen, ob nicht doch eines der Pigmente kupferhaltig sei, gleichzeitig aber suchte ich nach kupferführenden Eiweisskörpern. Es schien mir nicht unmöglich, dass sich kupferhaltige Nucleoproteide unter den Eiweisskörpern der Leber finden liessen. Bei den Versuchen, diese Eiweisskörper zu isoliren, bin ich auf Schwierigkeiten gestossen, die überdies durch die hohe Sommertemperatur in Neapel vergrössert wurden. Auch ist das Organ so stark fetthaltig, dass es mir einstweilen nicht gelungen ist, die Proteide in reinem nativen Zustande zu erhalten. Ich übergehe deshalb hier die diesbezüglichen Versuche und Beobachtungen.

Um der obengenannten Frage näher zu kommen, habe ich mich schliesslich begnügt, einstweilen wie folgt zu verfahren:

Die sofort nach dem Tode des Thieres herausgenommene Leber wurde mit dem Mörserpistill zerquetscht, der Brei in Leinwand eingeschlagen und unter Wasser oder bei anderen Versuchen unter 1%iger Kochsalzlösung geknetet. Die neutrale, bräunliche, trübe Flüssigkeit filtrirte selbst durch mehrfache Lagen Filtrirpapier ohne Klärung aber ohne nennenswerthen Rückstand. Die genügend verdünnte Flüssigkeit wurde hierauf erhitzt, um die Eiweisskörper zu coaguliren. Nach dem Erkalten und Abfiltriren erhält man ein klares schwärzlich-grünes Filtrat. Das Eiweisscoagulum wurde gut mit Wasser gewaschen, zu dem Zwecke mehrfach vom Filter genommen und in Wasser suspendirt, um schliesslich mit Alkohol und Aether nachgewaschen zu werden. Die letzteren Lösungsmittel färben sich sofort bräunlichgelb durch das pigment chloroformique, welches mitsammt dem Fett durch die coagulirenden

Eiweisskörper niedrigerissen wird. Zuletzt wurde im Soxleth-Apparat erschöpfend mit Aether extrahirt.

Die qualitative Untersuchung lehrte, dass das so gereinigte Eiweiss stark phosphorhaltig, aber auch eisen- und besonders kupferhaltig war. Um einen ungefähren Anhalt über die vorhandene Kupfermenge zu haben, wurden zwei quantitative Analysen gemacht. Auf das bei  $110^{\circ}$  getrocknete Eiweiss bezogen, erhielt ich einmal 0,42% Cu, das andere Mal 0,48% Cu. Der Eisengehalt betrug 0,32%. Ich verschweige nicht, dass das Eiweisscoagulum möglicher Weise unvollkommen vom sogenannten wässerigen Pigment befreit sein konnte. Der hohe Kupfergehalt, der sogar noch etwas höher als der des Hämocyanins<sup>1)</sup> ist, lässt sich jedoch nicht lediglich auf eine Verunreinigung zurückführen, sodass ich sicher bin, es werden sich wohl charakterisirte kupferhaltige Proteide, nach dem hohen Phosphorgehalt zu urtheilen, vielleicht Nucleoproteide, in der Leber auffinden lassen.

Ich wandte meine Aufmerksamkeit nunmehr den beiden Pigmenten zu. Das chloroformlösliche Pigment (pigment xanthophylloide) befand sich der Hauptmenge nach in den alkoholischen ätherischen Extracten des gefällten Eiweisses. Die Lösungen wurden auf dem Wasserbad langsam eingetrocknet und der Rückstand mit Aether extrahirt. Nachdem die Aetherlösung mit geglühtem Natriumsulfat getrocknet worden war, wurde sie, die natürlich ausser dem Pigment noch Fett und andere ätherlösliche Körper enthielt, verdampft und der Rückstand verascht. Es liess sich in der Asche nicht die geringste Menge von Kupfer oder Eisen auffinden.

Anders das wasserlösliche Pigment. Nach Dastre und Floresco enthält dasselbe Eisen. Sie wiesen es dadurch nach, dass sie den wässerigen Auszug der getrockneten Leber oder auch den bei der Verdauung des Organs mit Pepsin in Lösung gehenden Antheil ohne Weiteres auf Eisen prüften. Ist diese Methode aber völlig einwandfrei? Ist das nachgewiesene Eisen auch wirklich dem Pigment, welches sich

<sup>1)</sup> cf. M. Henze. Zur Kenntniss des Hämocyanins, diese Zeitschr.

allerdings mit in der Lösung befand, eigenthümlich? Die Eisenreaction kann doch ebensogut von gleichzeitig darin befindlichen Eisensalzen, die eventuell erst secundär entstanden sind, herrühren.

Ich verfuhr folgendermassen: Das obengenannte, von dem Eiweisscoagulum herrührende Filtrat wurde schwach mit Essigsäure angesäuert. In den meisten Fällen entstand dabei ein, wenn auch sehr geringer, Niederschlag. Derselbe löste sich leicht in schwach alkalischem Wasser und wurde durch Ansäuern aufs Neue gefällt. Diese Operation wurde mehrfach zur Reinigung wiederholt. Da zur quantitativen Analyse die Menge nicht ausreichte, musste ich mich vor der Hand damit begnügen, den Phosphor- und Eisengehalt qualitativ nachzuweisen. Alles deutet auf das Vorliegen eines Nucleoproteids oder Nucleoalbumins. Hammarsten<sup>1)</sup> hat z. B. auch aus dem Leberextract von *Helix pomatia* nach dem Aufkochen und der Coagulation des Eiweisses beim Ansäuern ein Nucleoproteid dargestellt.

Die von dem durch Essigsäure gefällten Niederschlage befreite Flüssigkeit wurde nunmehr auf dem Wasserbad eingeeengt. Es schieden sich dabei meist noch geringe flockige Partikel ab. Die hinreichend concentrirte und dabei fast schwarz gefärbte Lösung wurde nunmehr mit absolutem Alkohol versetzt (etwas mehr als dem gleichen Volumen). Es senkte sich dabei ein schwarzgrauer Niederschlag zu Boden, dessen Absitzen durch Centrifugiren erreicht wurde. Die überstehende Flüssigkeit wurde nahezu farblos. Durch Wasser wurde der Bodensatz wieder in Lösung gebracht, von Neuem durch Alkohol gefällt und dieses Verfahren vielmals wiederholt. Auf diese Weise musste das Pigment zum grössten Theil von anorganischen wasserlöslichen Salzen befreit sein. Die letzten alkoholisch-wässerigen Waschflüssigkeiten gaben z. B. keine nennenswerthe Reaction mit Silbernitrat. Zum Schluss wurde das Pigment mit Alkohol und Aether ausgewaschen. Getrocknet löst sich das Pigment nur schwierig und unvollkommen in

<sup>1)</sup> Pflüger's Arch., 36, 373 (1885).

Wasser. Leichter gelingt dies durch verdünnten Ammoniak. Im Exsiccator trocknet die Pigmentlösung langsam ein, ohne Tendenz zur Krystallisation zu verrathen.

Die Pigmentlösung zeigte keine Eiweissreaction. Verdünnte Säuren oder Alkalien gaben keine sichtbaren Veränderungen. Concentrirte Salpetersäure entfärbte die schwarze Lösung bis zu einem schwachen Gelb. Wurde einige Zeit damit gekocht, so gab die Flüssigkeit starke Phosphorsäurereaction. Schwermetallsalze erzeugten sämmtlich Niederschläge, wobei die Flüssigkeit entfärbt wurde.

Interessant ist nun, dass das Pigment nach dem Veraschen starke Reaction auf Kupfer und auf Phosphorsäure gab. Eisen liess sich ebenfalls, wenn auch nur in untergeordneter Menge, nachweisen. Ich bin weit entfernt, zu behaupten, dass ich das Pigment durch die obengenannte Operation in reinem Zustande erhalten habe. Es scheiterte dies an seiner Wasserlöslichkeit, gelingt aber vielleicht durch die Darstellung geeigneter Salze. Es ist auch fraglich, ob man es mit einem constant zusammengesetzten Körper zu thun hat. Nach den folgenden analytischen Resultaten möchte man fast daran zweifeln.

Jedes der analysirten Präparate stammte von der Leber eines anderen Thieres und ist auf die obengenannte Weise dargestellt. Sie wurden bei 100° getrocknet.

#### Pigment I.

0,4275 g gaben  $\text{CuO} = 0,0190$  g oder  $\text{Cu} = 0,0152$  g.  
Demnach Kupfergehalt 3,55%.

#### Pigment II.

0,4865 g gaben  $\text{CuO} = 0,0473$  g oder  $\text{Cu} = 0,0378$  g.  
Demnach Kupfergehalt 7,77%.

#### Pigment III.

0,1321 g gaben  $\text{CuO} = 0,0111$  g oder  $\text{Cu} = 0,0089$  g.  
Demnach Kupfergehalt 6,71%.

#### Pigment IV.

0,2042 g gaben  $\text{CuO} = 0,0033$  g oder  $\text{Cu} = 0,0026$  g.  
Demnach Kupfergehalt 1,29%.

Um eine ungefähre Anschauung über den Eisen- und Phosphorgehalt der Pigmente zu haben, lasse ich die betreffenden



Analysen, zu denen das Filtrat der CuS-Fällung von Pigment II benutzt wurde, folgen:

Das Filtrat wurde zunächst unter Schwefelsäurezusatz eingedampft, um die bei der Eisentitration störende Salzsäure zu entfernen. Die Phosphorsäure wurde zuerst durch molybdänsaures Ammon abgeschieden, der Niederschlag in Ammoniak gelöst und mit Magnesiamischung gefällt. Gewogen wurde er als  $Mg_2P_2O_7$ .

Zur Titration von Fe verbraucht: 0,65 ccm. Permanganat (Titer 0,1 Fe = 18,47 ccm.) d. i. 0,0035 g Fe.

Folglich Eisengehalt von Pigment II: 0,72%.

Gef.  $Mg_2P_2O_7$  = 0,0821 g. entsprechend 0,0229 g P.

Folglich Phosphorgehalt von Pigment II: 4,69%.