

Zur Kenntnis des Hämocyanins.

II. Mitteilung.

Von

M. Henze.

(Aus dem chemisch-physiologischen Laboratorium der zoologischen Station zu Neapel.)

(Der Redaktion zugegangen am 21. Oktober 1904.)

In einer früheren Mitteilung¹⁾ habe ich auf Grund eingehenderer Untersuchungen über die allgemeinen chemischen Eigenschaften des Hämocyanins berichtet. Unter anderem konnten dabei durch gasometrische Bestimmung des Sauerstoffabsorptionsvermögens die früheren, teilweise bestrittenen Angaben von Bert und Frederiq bestätigt werden, so daß das Hämocyanin (speziell aus dem Blute von Octopus) als respiratorischer Eiweißkörper aufzufassen ist. Es erfüllt physiologisch dieselbe Funktion wie das Hämoglobin. Um so interessanter ist es, daß es in chemischer Hinsicht nicht unbedeutend vom Hämoglobin abweicht. An Stelle von Eisen findet sich Kupfer, das einen konstanten Prozentgehalt des Moleküls ausmacht. Ferner fehlen dem Hämocyanin die Eigenschaften eines Proteids, die das Hämoglobin aufweist. Es gelingt daher nicht, durch noch so gelinde wirkende Agentien eine Spaltung in einen Eiweißkörper und eine eiweißfreie Komponente (entsprechend Globin und Hämatin) zu erreichen. Im ganzen verhält sich das Hämocyanin wie ein Kupferalbuminat, in dem das Kupfer maskiert, aber doch außerordentlich leicht abspaltbar ist. Diese schon früher gemachte Angabe hat sich durch neue wiederholte Versuche bestätigt.

In der Absicht, die Stellung des Hämocyanins in der Reihe der Eiweißkörper deutlicher zu charakterisieren, soweit dies

¹⁾ M. Henze, Diese Zeitschrift, Bd. XXXIII, S. 370.

mit Hilfe der vorhandenen Methoden und des immerhin spärlichen Materials möglich ist, wurde zunächst die Verteilung des Stickstoffs im Molekül bestimmt. Die hierfür von Hausmann¹⁾ ausgearbeitete Methode macht nicht den Anspruch einer exakten chemischen Analyse. Es ergeben sich jedoch, namentlich bei Innehaltung gewisser Kautelen, Resultate, die wichtige Einblicke in den Aufbau eines Eiweißkörpers gestatten, wie von neuem die letzte Untersuchung von Gumbel²⁾ beweist. Ich habe mich fast ganz an die Arbeitsweise gehalten, die von Osborne und Harris³⁾ zur Untersuchung einer größeren Zahl von Eiweißkörpern verwandt worden ist.

Zur Darstellung des Ausgangsmaterials wurde das dem lebenden Tiere entnommene blaue, also mit Sauerstoff gesättigte Blut (vergl. die erste Mitteilung) zentrifugiert, wobei sich eine geringe Menge von Leukocyten zu Boden setzt. Hierauf wurde filtriert und das Hämocyanin nach Verdünnung des Blutes mit Wasser durch Alkoholzusatz unter Erwärmung koaguliert. Der sehr fein verteilte Eiweißkörper wurde durch mehrfaches Dekantieren ausgewaschen, dann auf einem Seidenfilter gesammelt und längere Zeit mit Wasser, Alkohol und zuletzt mit Äther behandelt. Da frühere Versuche gezeigt haben, daß das Hämocyanin der einzige Eiweißkörper ist, der sich im Octopusblute findet, darf man schließen, auf diese Weise eine reine, einheitliche Substanz vor sich zu haben.

I. Die Verteilung des Stickstoffs im Hämocyanin.

Ich gebe kurz den Gang der Arbeitsweise, um die Resultate zum Schluß tabellarisch anzuführen. Zu den einzelnen Versuchen wurden stets Präparate von Hämocyanin benutzt, die dem Blute verschiedener Tiere entstammten, um auf etwaige individuelle Unterschiede aufmerksam zu werden. In Form eines feinen Pulvers wurde der Eiweißkörper bis zur Gewichts-

¹⁾ W. Hausmann, Diese Zeitschrift, Bd. XXVII, S. 91 und Bd. XXIX, S. 136.

²⁾ Gumbel, Beitr. zur chem. Physiol. u. Pathol., Bd. V, S. 297.

³⁾ Osborne u. Harris, zit. nach Chem. Zentralblatt 1903, Bd. I, S. 1279.

konstanz bei 100—105° getrocknet und zunächst auf dem Wasserbad mit 20%iger Salzsäure digeriert. Hierauf wurde er durch 7—12stündiges Kochen in einem Kölbchen mit eingeschliffenem Kühler gespalten. Nachdem die Hauptmenge der Salzsäure auf dem Wasserbade durch Eindampfen entfernt worden war, wurde der Ammoniakstickstoff durch Destillation mit gereinigtem MgO bestimmt. Der Magnesiumschlamm, der die Huminsubstanzen mit enthält, wurde auf einem gehärteten Filter abgesaugt, mit heißem Wasser gut ausgewaschen und dabei mehrmals vom Filter genommen. Durch Zersetzung dieses Niederschlages im Kjeldahl-Kolben erfährt man die Menge des sogenannten Huminstickstoffs.

Filtrat und Waschwässer vom Magnesiumschlamm wurden nach dem Ansäuern auf 100 ccm eingeeengt, mit 5 g Schwefelsäure versetzt und mit 30 ccm einer Phosphorwolframsäurelösung gefällt, die 20 g Phosphorwolframsäure und 5 g Schwefelsäure auf 100 g Wasser enthielt (vergl. Osborne u. Harris). Nach 24stündigem Stehen wurde der Niederschlag abgesaugt, vom gehärteten Filter genommen und mit einer verdünnten Lösung von Phosphorwolframsäure (2,5 g P.W.S., 5 g Schwefelsäure auf 100 g Wasser) angerührt und wieder abgesaugt. Dieselbe Prozedur wurde wiederholt und dann auf dem Filter nachgewaschen, bis die Wasserflüssigkeit ca. 200 ccm betrug.

Die Zerlegung dieses P.W.S.-Niederschlags bietet Schwierigkeiten. Man erhält leicht zu niedrige Werte, noch öfters aber geht die Analyse durch Springen der Kolben verloren. Es wurde viel konz. H_2SO_4 angewandt, mit Permanganat oxydiert und mindestens 12 Stunden erhitzt.

Im Filtrate des P.W.S.-Niederschlags wurde der Monamidstickstoff direkt bestimmt und nicht, wie bei Osborne und Harris angegeben ist, aus der Differenz berechnet. Man hat so nicht nur eine Kontrolle, sondern kann auch im Falle des Verlustes des P.W.S.-Niederschlags umgekehrt immer noch die Zahl für den Diamidstickstoff aus der Differenz finden. In der Tabelle ist in diesem Falle die betreffende Zahl in Kursivschrift gedruckt.

Angewandte Substanz:

| | |
|------------|-----------|
| I 1,3508 | IV 1,0566 |
| II 1,4434 | V 1,0286 |
| III 1,2600 | |

| | Durch Titration gefundener N in Gramm | In Prozenten | Mittel | Mittel auf 100 (N-Gehalt = 16,09) |
|----------------------------|---|--------------|--------|---|
| N als NH ₃ | 0,0115 I | 0,85 | 0,93 | 5,78 |
| | 0,0106 II | 0,73 | | |
| | 0,0136 III | 1,08 | | |
| | 0,0098 IV | 0,92 | | |
| | 0,0109 V | 1,05 | | |
| N im Magnesium- schlamm | 0,0910 I | 0,66 | 0,43 | 2,67 |
| | 0,0070 II | 0,48 | | |
| | 0,0035 IV | 0,33 | | |
| | 0,0027 V | 0,26 | | |
| Diamid-N | 0,6582 II | 4,56 | 4,45 | 27,65 |
| | — III | 4,70 | | |
| | — IV | 4,18 | | |
| | 0,3780 V | 3,67 (4,34) | | |
| Monamid-N | 1,3720 II | 9,50 | 10,20 | 63,39 |
| | 1,2992 I | 10,31 | | |
| | 1,0738 IV | 10,66 | | |
| | 1,0640 V | 10,34 | | |

II. Bestimmung der basischen Spaltungsprodukte des Hämocyans.

Zur Untersuchung des Hämocyans in dieser Richtung standen ca. 30 g des nach obiger Angabe dargestellten Eiweißkörpers zur Verfügung. Die Methodik lehnt sich in der Hauptsache ganz an die Kosselschen Angaben.¹⁾

Das Hämocyanin wurde durch Kochen mit der dreifachen Menge Schwefelsäure und der sechsfachen Menge Wasser gespalten. Dauer des Erhitzens 14 Stunden. Die schwarzgefärbte, Huminsubstanzen enthaltende Flüssigkeit wurde auf 1 l aufgefüllt und einer Stickstoffbestimmung unterworfen.

¹⁾ Kossel u. Kutscher, Diese Zeitschrift, Bd. XXXI, S. 165.

5 ccm verbrauchten 1. 15,70 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4 } Mittel 15,80 ccm, das ist
 2. 15,90 " $\frac{n}{10}$ " } 0,0221 g N,
 Gesamt-N-Gehalt demnach: 4,4240 g.

Nach meinen früheren Analysen enthält das Hämocyanin 16,09% N, folglich sind 27,49 g Hämocyanin zersetzt und in Anwendung gekommen.

Die Zersetzungsflüssigkeit wurde nunmehr verdünnt, mit Baryumhydroxyd bis zur schwachsauren Reaktion versetzt, der $BaSO_4$ -Niederschlag abgenutscht und mehrfach ausgekocht. Filtrat und Waschwässer wurden auf 1 l gebracht und abermals eine Stickstoffbestimmung ausgeführt.

5 ccm verbrauchten 1. 14,35 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4 } Mittel 14,42 ccm, das ist
 2. 14,50 " $\frac{n}{10}$ " } 0,0202 g N.

Der Gesamtstickstoff betrug also noch 4,0400 g.

Im Baryumniederschlag sind demnach 0,384 g N, das ist Huminstickstoff I, verblieben.

Von einer Bestimmung des Ammoniakstickstoffs wurde abgesehen, da dieselbe mehrfach ausgeführt und übereinstimmende Zahlen ergeben hatte (cf. unter I).

Die schwach schwefelsaure Lösung wurde deshalb mit Magnesiumoxyd im Überschuß längere Zeit auf dem Wasserbad in einer offenen Schale erhitzt, bis kein Ammoniak mehr wegging. Dann wurde mit überschüssigem Baryumhydroxyd ausgefällt und der Niederschlag abgesaugt und ausgewaschen. Die vereinigten Flüssigkeiten wurden mit Schwefelsäure vom Baryum befreit und das Baryumsulfat ebenfalls gut ausgekocht. In der resultierenden Flüssigkeit, die auf 1 l konzentriert worden war, wurde eine Stickstoffbestimmung gemacht.

5 ccm davon brauchten 1. 12,55 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4 } Mittel 12,57.
 2. 12,60 " $\frac{n}{10}$ " }

Die Gesamtstickstoffmenge betrug also noch 3,5196 g.

Nach der unter I stehenden Bestimmung enthält das Hämocyanin 0,93% Stickstoff in Form von Ammoniak. Die angewandten 27,49 g Hämocyanin würden demnach 0,26 g Ammoniakstickstoff geliefert haben. Subtrahiert man diese Zahl von 4,0400, der Stickstoffmenge nach Abzug des Huminstickstoffs I (d. i. 3,7800) und von letzterer die soeben ge-

fundene Stickstoffmenge, so ergibt sich der Huminstickstoff II = 0,2604 g.

Die auf diese Weise zur Fällung der Hexonbasen vorbereitete Flüssigkeit wurde nach Kossel mit Silbersulfat und Barytwasser gefällt. Der zerlegte Niederschlag und die schließlich erhaltene Flüssigkeit, in der sich Histidin und Arginin befinden konnten, wurde auf 1 l gebracht und darin der Stickstoff bestimmt.

20 ccm davon brauchten 14,50 ccm $n/10$ H_2SO_4 , das ist 0,0203 g N. Gesamtstickstoff auf Histidin und Arginin zu beziehen = 1,0150 g.

In der Lösung wurde hierauf in der bekannten Weise durch vorsichtigen Zusatz von Silbernitrat und Barytwasser das Histidin abgeschieden. Der Silberniederschlag wurde zerlegt und das Histidin nach Kossel¹⁾ in 2,5%iger schwefelsaurer Lösung mit Quecksilbersulfat von neuem gefällt. Nach 12stündigem Stehen wurde die Fällung filtriert, mit Schwefelwasserstoff zerlegt und die Lösung nach Vertreiben des Schwefelwasserstoffs auf 500 ccm aufgefüllt.

20 ccm der Lösung brauchten bei der Kjeldahlbestimmung 9,60 ccm $n/10$ H_2SO_4 , das ist 0,0134 g N. Insgesamt könnte man also 0,3360 g N auf Histidin, das wären 1,24 g Histidin, beziehen.

Zum exakten Nachweis dieser Hexonbase wurde aus obiger Lösung die Schwefelsäure mit Barytwasser entfernt und gleichzeitig in der Hitze Kohlensäure eingeleitet. Nach der Filtration wurde bis nahe zur Trockene konzentriert und das dabei abgeschiedene Baryumkarbonat nach Aufnahme des Rückstandes mit Wasser abfiltriert. Nachdem das Filtrat jetzt mit überschüssiger Salzsäure versetzt worden war, trat bei hinreichender Konzentration Kristallisation ein, die Alkoholzusatz vermehrte. Es wurde nochmals gelöst und gefällt und aus konzentrierter Salzsäure umkristallisiert, um nach Kutscher zum Histidindichlorid zu gelangen. Die Analysen lieferten jedoch selbst bei wiederholtem Umkristallisieren keine stimmenden Zahlen. Es zeigte sich, daß die Substanz baryumhaltig war. In der Literatur gibt Lawrow²⁾ einen analogen Fall an, der auf Existenz eines Baryumdoppelsalzes schließen läßt.

¹⁾ Kossel, Diese Zeitschrift, Bd. XXXVIII, S. 39.

²⁾ Lawrow, Diese Zeitschrift, Bd. XXVIII, S. 391.

Die sämtlichen Kristallfraktionen und Mutterlaugen wurden deshalb vereinigt und mit Silbernitrat von Salzsäure befreit. Im Filtrat vom Chlorsilber wurde nunmehr das Histidin nach Hedin¹⁾ mit Silbernitrat und Ammoniak gefällt. Nach genanntem Forscher hat das so dargestellte Histidinsilber nach Trocknen bei 100° die Zusammensetzung $\text{Ag}_2\text{C}_6\text{H}_7\text{N}_3\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}$.

Angewandte Substanz = 0,1732 g.

Gefunden 0,0958 g Ag_2 = 55,32% Ag_2

Berechnet für $(\text{Ag}_2\text{C}_6\text{H}_7\text{N}_3\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O})$ = 55,77% Ag_2 .

Histidin ist somit als Spaltungsprodukt des Hämocyanins nachgewiesen. Die Ausbeute an reinem Silbersalz betrug nur ca. 0,4 g, also bei weitem weniger als die obige Kjeldahlbestimmung anzeigte.

Das Filtrat der ursprünglichen Histidinfällung wurde mit Barytwasser im Überschuß versetzt, der ausfallende Niederschlag zerlegt und in der resultierenden, auf 100 ccm gebrachten Flüssigkeit der Stickstoff bestimmt.

20 ccm brauchten 8,30 ccm n_{10} H_2SO_4 = 0,0116 g N.

Die Gesamtlösung enthielt also = 0,0580 g N.

Rechnet man diese Zahl auf Arginin um, so würde dies 0,4 g Arginin entsprechen. Bei sorgfältigster Verarbeitung auf Arginin (es wurde versucht, das charakteristische, schwerlösliche Kupfernitratsdoppelsalz darzustellen) ließ sich jedoch keine Spur davon nachweisen. Wie bekannt, ist gerade Arginin am leichtesten und sichersten von den drei Hexonbasen zu erkennen. Ich wage trotzdem augenblicklich noch nicht zu behaupten, daß das Arginin völlig unter den Spaltungsprodukten des Hämocyanins fehlt. Bisher nimmt man an, daß das Arginin ein integrierender Komplex eines jeden Eiweißmoleküls ist und in den meisten Fällen unter den drei Hexonbasen der Quantität nach überwiegt. Jedenfalls tritt das Arginin, falls es wirklich noch nachgewiesen werden sollte, nur in minimaler Menge unter den Spaltungsprodukten auf und weist dem Hämocyanin schon dadurch eine besondere Stelle unter den bekannten Eiweißkörpern an.

Sobald wieder genügendes Material zu Gebote steht, denke ich auf diese Frage zurückzukommen.

¹⁾ Hedin, Diese Zeitschrift. Bd. XXVIII, S. 391.

Die Abscheidung des Lysins erfolgte in der bekannten Weise, zunächst als Phosphorwolframat. Das letztere wurde in das sofort sehr schön kristallisierende Pikrat übergeführt, das getrocknet 4,34 g wog, was 1,8 g Lysin entspricht. Das Pikrat ließ sich als solches sowohl durch seine Kristallform als durch seinen Schmelzpunkt 230—232° charakterisieren. Ein Teil dieses Salzes wurde in das Chlorid übergeführt, letzteres mit einer konzentrierten Platinchloridlösung gemischt und mit absolutem Alkohol versetzt. Nach 12 Stunden hatte sich Lysinplatinchlorid in schön ausgebildeten Kristallen abgeschieden, die mit Alkohol gewaschen, dann im Vacuum und schließlich bei 130° getrocknet wurden. Vergl. Drechsel¹⁾ und Siegfried.²⁾

0,2750 g gaben 0,9956 g Pt, gefunden 34,77% Pt

Für $C_6H_{14}N_2O_2 \cdot 2HCl \cdot PtCl_4$ berechnet 35,05%

III. Die Aminosäuren des Hämocyans.

Das Filtrat des Phosphorwolframsäureniederschlags wurde von Phosphorwolframsäure befreit und eingengt. Hierbei kristallisierten Tyrosin und Lencin aus. Die Menge des ersteren betrug ca. 5,5%. Mit Hilfe ammoniakalischer Silbernitratlösung gelang es ferner, ein Silbersalz abzuscheiden, das bei der Zerlegung durch Schwefelwasserstoff eine Säure lieferte, die sich durch Umkristallisieren reinigen ließ. Sie wurde von neuem in das Silbersalz verwandelt, von dem bei der Analyse

0,1750 g = 0,1024 g Ag gaben, d. i. 58,52% Ag

Berechnet für glutaminsaures Silber: 59,81%

Trotz des etwas zu niedrig gefundenen Wertes dürfte es keinem Zweifel unterliegen, daß wirklich Glutaminsäure vorliegt.

Eine weitere Aufteilung der etwa noch vorhandenen Aminosäuren war wegen des geringen Materials unmöglich.

IV. Prüfung auf eine Kohlehydratgruppe im Hämocyanin.

Dieser orientierende Versuch gab ein negatives Resultat. Es standen dazu ca. 20 g Hämocyanin zur Verfügung, die von früheren Blutgasanalysen stammten. Da der Eiweißkörper nicht

¹⁾ Drechsel, Arch. f. Anat. u. Physiol. (Physiol. Abt.) 1891; S. 269.

²⁾ Siegfried, ebenda. S. 272.

mit der nötigen Sorgfalt gereinigt worden war, hätte ein positives Resultat nicht beweisend sein können. (Vergl. Anm.)

Die angegebene Menge Hämocyanin wurde zunächst in 300 cem 20% iger Kaliumhydratlösung ca. 3 Stunden auf dem Wasserbad digeriert. Nach hinreichender Verdünnung der Flüssigkeit wurde der am Boden liegende schwarze Schlamm, der zu einem großen Teil aus Kupferoxyd bestand, abfiltriert. Im Filtrat fällt beim Neutralisieren ein flockiger Niederschlag aus, der ausgewaschen nur ganz schwach Molischs Reaktion zeigt. Das Filtrat, welches völlig klar war, lieferte dagegen die Reaktion deutlich. Beim Einengen desselben schieden sich an den Wandungen der Schale harzige Produkte ab, die positive Furfurolprobe zeigten, aber nicht Fehlingsche Lösung reduzierten. Die Biuretprobe gaben sie gleichfalls. In mehreren Proben wurde diese ca. 2 g wiegende Substanz in 3 und stärker prozentiger Salzsäure zu hydrolysieren versucht. In keinem Falle ließ sich jedoch hierdurch ein reduzierender Zucker abspalten.

Anm.: Nach einigen speziellen Versuchen enthält das Blut von Octopus, wenn auch in geringer Menge, ein Fehlingsche Lösung direkt reduzierendes Kohlehydrat. Das frische Blut wurde durch Alkoholhitze-koagulation von Hämocyanin befreit und das Filtrat eingeengt. Nachdem der durch sehr verdünnte Natronlauge entstehende Niederschlag von anorganischen Salzen abfiltriert worden war, reduzierte die Flüssigkeit deutlich Fehlingsche Lösung.