

Einige Versuche über Kohlenoxydhämochromogen.

Von

Fritz Pregl (Graz).

Mit einer Abbildung.

(Aus dem Institut für physiologische Chemie in Tübingen.)

(Der Redaktion zugegangen am 4. März 1905.)

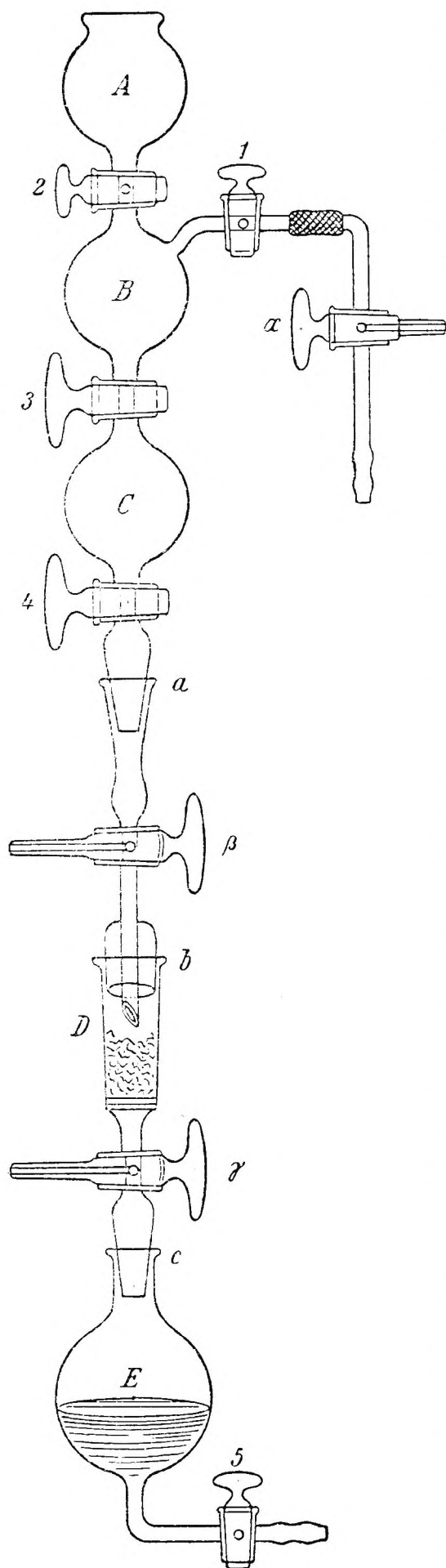
Die erste Mitteilung, aus der wir von einer Verbindung des Hämochromogens mit Kohlenoxydgas erfahren, rührt noch von Hoppe-Seyler¹⁾ her. Hoppe-Seyler hat aus gewissen Beobachtungen und Versuchen den Schluß gezogen, daß in dieser Verbindung auf 1 Atom Eisen 1 Molekül Kohlenoxyd kommt. Aber erst vor kurzem haben Hüfner und Küster²⁾ die Beobachtungen Hoppe-Seylers nachgeprüft und durch exakte Versuche mit einem großen Absorptiometer seine Annahme bestätigt gefunden.

Bei der Wiederholung eines ebensolchen Absorptionsversuches habe ich einige Erscheinungen beobachtet, die zu einer genaueren Untersuchung aufforderten. Über diese soll im folgenden kurz berichtet werden.

Wenn man eine mit Kohlenoxydgas gesättigte Lösung von Hämochromogen, das durch Einwirkung von Kaliumsulfhydrat auf eine Lösung von Acethämin in $\frac{1}{50}$ n-Kalilauge oder auch durch Zusatz von ein wenig Hydrazinhydrat zu einer solchen erhalten worden ist, anhaltend mit atmosphärischer Luft schüttelt, so wird die Lösung alsbald mißfarbig und ihr Spektrum gleicht dann demjenigen einer alkoholischen Hämatinlösung. Fügt man ferner zu einer Lösung von Kohlenoxydhämochromogen — gleichgültig ob zur Bereitung des Hämochromogens Kaliumsulfhydrat oder Hydrazinhydrat

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XIII, S. 477, 1889.

²⁾ Archiv f. Anat. u. Physiol., Physiol. Abt., 1904, S. 387.



verwendet worden war —, ein gleiches Volumen konzentrierter Kochsalzlösung, so beobachtet man das Auftreten eines roten Niederschlages. Bei meinem ersten Versuche, diesen abzufiltrieren, änderte auch er an der Luft sofort seine Farbe, — wie es schien, gleichfalls unter Rückbildung von alkalischem Hämatin.

Die Rückbildung von Hämatin aus der Verbindung des Hämochromogens mit Kohlenoxyd hat auch Hoppe-Seyler schon beobachtet; er hat ihrer aber nur flüchtig Erwähnung getan, ohne sie besonders hervorzuheben.

Die Erscheinung verdient aber gerade unsere besondere Beachtung; denn sie zeigt, daß sich das Hämochromogen den Gasen Kohlenoxyd und Sauerstoff gegenüber durchaus nicht gleich dem komplizierteren Hämoglobin verhält, insofern es nicht wie jenes das Kohlenoxyd fester bindet als den Sauerstoff, sondern umgekehrt diesen fester als das Kohlenoxyd.

Da es von vornherein nicht als ganz unmöglich erschien, des Kohlenoxydhämochromogens bei völligem Abschlusse der Luft schließlich doch in trockenem Zustande habhaft zu werden, und man vermuten durfte, daß es dann nicht mehr die große Empfindlichkeit gegen Sauerstoff besitzen würde wie in wässriger

Lösung, ließ ich von der bewährten Firma Gustav Eger in Graz nach meinen Angaben den links abgebildeten und beschriebenen gläsernen Apparat anfertigen, mit Hilfe dessen mir die Lösung der gestellten Aufgabe in der Tat gelungen ist.

Der Apparat besteht aus 3 Teilen. In dem oberen, der mit Schliff a an den mittleren luftdicht angefügt ist, geschieht zunächst die Bereitung und dann die Ausfällung des Kohlenoxydhämochromogens: in dem mittleren, von Schliff a bis Schliff c reichend, wird der erzeugte Niederschlag abfiltriert, gewaschen und getrocknet, und der untere, von Schliff c abwärts befindliche, d. i. die Kugel E mit etwa 250 ccm Rauminhalt, dient zur Aufsammlung der Filtrate.

Da die Konstruktion des Apparates aus der Zeichnung ohne weiteres ersichtlich ist, so genügt es, hier zu bemerken, daß die Kugeln B und C einen Fassungsraum von je etwa 150 ccm haben; daß ferner die mit 1, 2, 3, 4 und 5 bezeichneten Hähne einfache weite Bohrungen besitzen, und daß endlich von den mit α , β und γ bezeichneten Dreiweghähnen der Hahn α um der geringeren Zerbrechlichkeit willen mittels eines Schlauchstücks mit dem Rohrfortsatz von 1 verbunden ist.

Der Apparat wird in einem gewöhnlichen Eisenstative so befestigt, daß E in einen kleinen Eisenring gestellt und D von einer Klammer lose gefaßt wird, wodurch der von oben her ebenfalls durch einen Eisenring hindurch in den Schliff a gesteckte Kugelapparat (A, B und C) hinreichend sicheren Halt gewinnt.

Obwohl die Hähne und Schiffe schon mit Wasser allein befeuchtet hinreichend dicht schlossen, wurden sie doch der leichteren Beweglichkeit halber sorgfältig eingefettet.

Zwecks Isolierung des Kohlenoxydhämochromogens in trockenem Zustande löst man zunächst etwa 0,5 g nach der Vorschrift von Schallejeff¹⁾ dargestelltes und nach Küster²⁾ mit Chinin umkristallisiertes Acethämin unter Beifügung von ein wenig Ammoniakflüssigkeit in ungefähr 50 ccm destillierten

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXX, S. 390, 1900.

Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XVIII, Referat 232, 1885.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXX, S. 391, 1900.

Wassers, filtriert und gießt, während Hahn 4 geschlossen ist, die braune Lösung in den Einfülltrichter A. Beim Öffnen der Hähne α , 1, 2 und 3 fließt die Hämatinlösung bis in die Kugel C.

Darauf läßt man mit dem Wasch- und Spülwasser zugleich $\frac{1}{2}$ ccm einer 50%igen Lösung von Hydrazinhydrat nachfließen und schüttelt das Ganze etwas um. Dabei nimmt die Lösung alsbald einen schön rosenroten Farbenton an und schäumt lebhaft auf infolge von Stickgasentwicklung. Nun schließt man Hahn 2, pumpt von α aus alle Luft aus den Kugeln B und C heraus und läßt dafür aus einem gläsernen Gasometer durch einen an α angesetzten Schlauch, nach entsprechender Umstellung dieses Hahnes, Kohlenoxydgas eintreten, um die Lösung nunmehr mit diesem durchzuschütteln, wobei sich die Lösung noch intensiver rot färbt. Dieses Auspumpen der Gase, Einlassen von frischem Kohlenoxyd und Schütteln desselben mit der Lösung wird noch mehrmals wiederholt.

Das verwendete Kohlenoxydgas war in meinen Versuchen aus Oxalsäure und konzentrierter Schwefelsäure bereitet und über Kalilauge abgesperrt.

Die Ausfällung des nun gebildeten Kohlenoxydhämochromogens aus seiner Lösung nimmt man mit dem gleichen Volumen einer zuvor gasfrei gepumpten, nachher mit Kohlenoxyd gesättigten, konzentrierten Chlornatriumlösung vor. Zu diesem Zwecke schließt man die Hähne 1 und 3, läßt die konzentrierte Salzlösung von A nach B fließen, wobei unter Glucksen eine entsprechende Menge Kohlenoxydgas bei 2 entweicht, und schließt 2. Nach kräftigem Umschütteln pumpt man B nochmals aus und füllt die Kugel sogleich wieder mit Kohlenoxydgas an. Nun erst öffnet man 3 und fällt unter Umschütteln das Kohlenoxydhämochromogen mit der so vorbereiteten Salzlösung aus. Die Fällung besteht aus roten Flocken mit schwach ins Violette spielendem Stich, die sich bei ruhigem Stehen bald aus der farblosen Flüssigkeit zu Boden senken.

Zuvor schon ist für die Isolierung dieses Niederschlages das Filtrierröhrchen D in der Weise vorbereitet worden, daß man in dasselbe nach Abnahme der Verschußkappe bei Schliff b eine Porzellansiebplatte, wie solche bei Goochschen Tiegeln

Verwendung finden, und auf diese zwei feuchte Filtrierpapierscheiben gebracht und mit der Pumpe von 5 aus festgesaugt hat. Über den Filtern hat man ferner eine Asbestsuspension, wie sie ebenfalls zur Beschickung Goochscher Tiegel benutzt wird, in etwa 2 mm hoher Schicht abgesaugt und diese mit einer zweiten Porzellansiebplatte bedeckt, um dem etwaigen späteren Hängenbleiben von Asbestfasern am Niederschlage vorzubeugen. Nun verschließt man das Filtrierröhrchen mit seiner Kappe, setzt bei a den Kugelapparat auf und evakuiert die unter 4 befindlichen Räume von 5 aus. Durch Ansetzen des Gasometerschlauches an β und durch entsprechende Stellung dieses Hahnes füllt man diese Räume mit Kohlenoxydgas an, wiederholt diese Prozeduren nochmals, schließt endlich den Hahn 5 und bringt β in seine ursprüngliche Stellung zurück.

Öffnet man jetzt Hahn 4, so werden zunächst nur wenige Teilchen von dem abgesetzten Niederschlage auf die Filterschichte gelangen können. Man verdünnt daher von 5 aus das Gas in E vorsichtig, um eine für die Filtration eben hinreichende Druckdifferenz herbeizuführen; denn bei zu hoher Druckdifferenz geht die Filtration noch langsamer vorr. Hat man im Verlaufe von 1 oder 2 Tagen den gesamten Niederschlag aufs Filter gebracht, so läßt man die übrige klare Flüssigkeit aus C durch β abtropfen, während von α aus ein Strom von Kohlenoxydgas aus dem Gasometer in die Kugel nachdringt.

Den erhaltenen Niederschlag wäscht man nun mit einer halbkonzentrierten Chlornatriumlösung, die zuvor mit wenigen Tropfen Hydrazinhydrat versetzt, in der früher beschriebenen Weise entgast, hernach wiederum mit Kohlenoxydgas gesättigt worden ist. Nach dem Abfließen dieser wäscht man die Kugeln A, B und C zur Entfernung der Salzlösung erst mit destilliertem Wasser, zur Entfernung des letzteren mit Alkohol und zuletzt mit absolutem Äther aus, welche Flüssigkeiten man von A aus durch Hahn 2 eintreten und bei β wieder austreten läßt. Dann erst wäscht man auch den Niederschlag mit erst gasfrei gepumptem und darauf mit Kohlenoxydgas gesättigtem absoluten Alkohol aus, welcher letzterem es vor allem obliegt, den noch feuchten Niederschlag zu entwässern. In absolutem Alkohol ist nämlich das Kohlen-

oxydhämochromogen vollständig unlöslich, während es in wasserhaltigem spurenweise löslich ist; daher auch die ersten Portionen des Waschalkohols schwach rot gefärbt abfließen, während die späteren vollkommen farblos bleiben.

Bei dieser Entwässerung des von Chlornatriumlösung durchfeuchteten Niederschlages ist freilich ein gleichzeitiges Ausfallen von Kochsalz unvermeidlich. Daher mußten bei den später mitzuteilenden Analysen die gefundenen Werte zu dem Eisengehalte desselben Präparates in Beziehung gebracht werden.

Der Alkohol wird hierauf mit absolutem Äther verdrängt. Wenn endlich dieser abgelaufen ist, wird der Binnenraum von D durch entsprechende Stellung der Hähne β und γ geschlossen, das Filtrierröhrchen samt Niederschlag aus der Verbindung mit den übrigen Teilen bei a und c herausgenommen, und die von Äther feuchte Substanz durch einen von a aus darüber geleiteten Wasserstoffstrom trocken geblasen.

Der in einem Kippschen Apparate erzeugte Wasserstoff muß natürlich erst selber vorher mit saurer Permanganatlösung gewaschen, dann mit konzentrierter Schwefelsäure getrocknet, hierauf zur Entfernung der letzten Spuren von Sauerstoff über eine glühende Kupferspirale und zuletzt nochmals durch konzentrierte Schwefelsäure geleitet werden, bevor er durch β zunächst ins Freie ausströmen darf. Nach einigen Minuten erst wird β so gedreht, daß der Gasstrom in das Innere von D eintreten kann. Nun wird auch γ geöffnet, und mit einem durch dessen gerade Bohrung eingeführten Draht die Filterplatte samt Niederschlag schief gestellt, damit der Durchgang des Wasserstoffs unbehindert sei. Nach ein- bis mehrstündigem Drüberleiten des Gases ist der Niederschlag trocken, und kann nun von der Filterplatte entfernt, zerrieben und in den Exsikkator über Schwefelsäure gebracht werden.

Daselbst völlig getrocknet und nochmals zerrieben, stellt die Substanz ein dunkelblauviolettes, ihrem Aussehen nach an Kaliumpermanganat erinnerndes Pulver dar, das sich, soweit bis jetzt meine Erfahrungen reichen, an trockner Luft nicht mehr verändert. In vorher ausgekochtem und bei möglichstem Abschluß von Luft wieder abgekühltem Wasser löst sie sich leicht mit blutroter Farbe.

Das Spektrum dieser Lösung zeigt 2 Absorptionsstreifen zwischen D und E, ähnlich denen, die dem Spektrum des Kohlenoxydhämoglobins eigentümlich sind. Mit Luft geschüttelt, wird die Lösung rasch mißfarbig, dann braun; die Absorptionsstreifen ihres Spektrums werden schwächer, verschwinden zuletzt ganz und es tritt nun bleibend das Spektrum des Alkalinämatins auf mit seinem breiten Absorptionsstreifen zwischen C und D.

Fügt man der so veränderten Lösung einen Tropfen Hydrazinhydrats (50%ige wässrige Lösung) hinzu, so nimmt sie rasch wieder eine rosenrote Färbung an, zeigt wieder das typische Spektrum des Hämochromogens, und nach dem Schütteln der rosenroten Lösung mit Kohlenoxyd kehrt auch das Spektrum der Kohlenoxydverbindung wieder.

Dieser Versuch beweist, daß die Lösung der vorher isolierten Kohlenoxydverbindung noch ebenso empfindlich gegen den atmosphärischen Sauerstoff ist, wie die Lösung des Körpers vor seiner Isolierung in fester Form, und läßt darauf schließen, daß darin auch das unveränderte Skelett der 34 Kohlenstoffatome des Hämatins enthalten ist.

Nun zeigte sich aber eine Analogie zwischen unserem Körper und der Kohlenoxydverbindung des Hämoglobins insofern, als die Lösung des Kohlenoxydhämochromogens ebenso wie die des Kohlenoxydhämoglobins durch Ferricyankalium unter Kohlenoxydentwicklung zersetzt wird.

Diese Beobachtung bot den Anlaß zur Anstellung des folgenden quantitativen Versuchs.

0,1555 g der über Schwefelsäure getrockneten Kohlenoxydverbindung wurden in ein Röhrchen eingewogen und dieses mit trockenem Ferricyankalium vollgefüllt. Das so beschickte Röhrchen ließ ich in ein mit Quecksilber gefülltes, am einen Ende mit einem guten Glashahne verschlossenes Absorptionsrohr aufsteigen, spritzte sodann einige Kubikzentimeter Wasser hindurein und beobachtete sogleich eine in dem Maße, wie die Lösung der festen Substanzen vor sich ging, lebhafter werdende Gasentwicklung.

Nach 24 Stunden wurde etwas Kalilauge und atmosphärische Luft hinzugefügt und hierauf das gesamte Gas mög-

lichst vollständig in ein Explosionsendimeter übergedrängt. Der geringe Gasrest im Absorptionsrohre, sowie der in der Lösung etwa zurückgehaltene Anteil an Kohlenoxyd konnte durch mehrmaliges Hinzufügen frischer Luft und Schütteln der Lösung mit derselben vollends ausgetrieben und in das gleiche Endimeter übergespült werden, worin dann nach Bunsens Methode die Analyse des Gases ausgeführt ward.

Es ergab sich nach der Verpuffung mit Knallgas und nach der Absorption mit 7%iger Natronlauge eine Gesamtkontraktion von 7,25 ccm, berechnet auf 0° und 760 mm Druck. Da nun $\frac{2}{3}$ des verschwundenen Gasvolumens auf Rechnung des Kohlenoxyds entfallen, so betrug die vorhandene Kohlenoxydmenge $7,25 \cdot \frac{2}{3} = 4,83$ ccm, entsprechend 0,006045 g.

Da nun ferner bei einer Eisenbestimmung in 0,1230 g desselben Präparates 0,0131 Fe_2O_3 , entsprechend 0,00917 g metallischen Eisens, gefunden wurden, so enthielten 0,1555 g Substanz 0,0116 g Eisen.

Somit kamen auf 0,0116 g Eisen 0,006045 g Kohlenoxyd, d. h. auf 1 Atom Eisen 1,04 Moleküle Kohlenoxyd, gemäß der Gleichung:

$$0,0116 : 0,006045 = 56 : x, \text{ wonach}$$

$$x = \frac{0,006045 \cdot 56}{0,0116} = 29,1 \text{ (statt 28).}$$

Es ist dies nicht nur eine abermalige glänzende Bestätigung des am Anfange dieser Mitteilung erwähnten stöchiometrischen Satzes, sondern zugleich ein stichhaltiger Beweis dafür, daß der von mir isolierte und in trockenem Zustande dargestellte Körper wirklich die unzersetzte Kohlenoxydverbindung des Hämochromogens ist.

Eine weitere bemerkenswerte Beobachtung betrifft den Stickstoff meiner festen Verbindung.

Bekanntlich hatte von Zeynek¹⁾ bei seinen Versuchen, das Hämochromogen selbst in trockenem Zustande zu gewinnen, gefunden, daß das von ihm dargestellte Präparat auf je 1 Atom

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXV, S. 492.

Eisen nicht 4, sondern 5 Atome Stickstoff enthielt. v. Zeynek hatte, ebenso wie ich, als Lösungsmittel für das Hämatin, das mit Hydrazinhydrat reduziert werden sollte, ein sehr verdünntes wässriges Ammoniak angewandt — nur in einem Falle hatte er sich einer alkoholischen Ammoniaklösung bedient —, sodaß von vornherein eine salzartige Verbindung zwischen beiden angenommen werden durfte. Die Überführung des Hämatins in Hämochromogen schien an dieser Verbindung nichts geändert zu haben.

Ich habe an der Kohlenoxydverbindung des Hämochromogens die gleiche Beobachtung gemacht. Auch in dieser sind neben 1 Eisenatom 5 Stickstoffatome vorhanden, wie folgende von mir ausgeführte Eisen- und Stickstoffbestimmungen beweisen.

1. 0,1469 g der getrockneten Substanz lieferten bei der Stickstoffbestimmung nach Dumas 13,2 ccm Stickgas bei $T = 12^\circ$ und Bar. = 741,5 mm.

Dieses Volumen entspricht 0,01521 g Stickstoff.

2. 0,1146 g desselben Präparates hinterließen 0,0132 g Fe_2O_3 , entsprechend 0,00924 g Fe.

0,1469 g der Substanz enthielten demnach 0,01185 g Fe.

Aus der Proportion

$$0,01185 : 0,01521 = 56 : x$$

ergibt sich $x = 71,88$

$$= 5,13 \text{ Atome Stickstoff.}$$