

Über den Blutfarbstoff der *Thalassochelys corticata*.

Von

Dr. Franz Bardachzi.

(Aus dem Prager deutschen medizinisch-chemischen Universitätsinstitute.)
(Der Redaktion zugegangen am 18. Oktober 1906.)

Von Blutfarbstoffen poikilothermer Tiere liegen meines Wissens keine Analysen vor. R. v. Zeynek hatte beobachtet, daß der Blutfarbstoff der Seeschildkröte *Thalassochelys corticata*, welche aus der südlichen Adria auf den Triester Markt in Exemplaren bis etwa 30 kg Gewicht gebracht wird und uns mehrmals von dem Vorstände der k. k. Triester zoologischen Station, Herrn Professor Dr. C. J. Cori, liebenswürdigst besorgt wurde, ziemlich leicht krystallisiert.

Die Darstellung dieses Blutfarbstoffes hat gegenüber jener des Blutfarbstoffs der Warmblüter nach der gewöhnlich geübten Methode nur die eine Schwierigkeit, daß die Fibrinausscheidung aus dem Blute langsam und in Nachschüben auftritt, selbst wenn man Delezennes¹⁾ Beobachtung über die gerinnungsbefördernde Wirkung der Gewebe (welche wir wiederholt bestätigen konnten) sich zunutze macht. Auch in dem zentrifugierten Blutkörperchenbrei treten, selbst nach dem Verdünnen und Lösen des Blutfarbstoffs, noch Gerinnungen auf.

Am besten gelingt es, die störenden Nachgerinnungen zu entfernen dadurch, daß der zentrifugierte Brei der (kernhaltigen) Blutkörperchen, mit Wasser versetzt, einige Stunden auf etwa 50° erwärmt wird, wobei gleichzeitig der Blutfarbstoff in Lösung geht. Von dem derben Gerinnsel läßt sich die Flüssigkeit leicht durch Papier filtrieren. Man erleidet zwar einen kleinen Verlust an Blutfarbstoff, aber das Filtrat gibt bei einem Weingeistgehalt von etwa 20% im Eiskasten rasch und reichlich

¹⁾ Bull. soc. de Biol., 1897, S. 489.

Krystalle. Selbst wenn der Blutkörperchenbrei wiederholt mit ca. 1%iger Steinsalzlösung, welcher 0,1% Fluornatrium zugesetzt ist, gewaschen und zentrifugiert wurde, gab er, nach dem Lösen mit Wasser, solche Nachgerinnungen.

Beim raschen Krystallisieren des Blutfarbstoffs entstehen Tafeln, die man für rhombische anzusehen geneigt wäre: bei langsamem Krystallisieren flachen sich zwei gegenüberliegende Spitzen ab: es werden dann dickere, sechsseitige Tafeln erhalten. Niemals jedoch sah ich die sechs Kanten gleichmäßig entwickelt, vielmehr ähneln die Formen oft den Wetzsteinen der krystallisierenden Harnsäure. Bei langsamem Wachstum bildet sich parallel zu den sekundär entwickelten beiden Kanten eine Verdickung des Krystalls in der Mittellinie: weiterhin gilt diese Richtung als Längsaxe, in welcher der Krystall beträchtlich an Größe zunehmen kann. Gelegentlich sind die Krystalle schön entwickelt, ihr Aussehen erinnert dann an frei gewachsene Quarzkrystalle. Auch Zwilingsformen sind nicht selten zu beobachten. So entstehen mannigfache Bilder, deren Auflösung auf den ersten Blick kompliziert erscheint.

In einem Falle gelang es, aus im Eiskasten faulendem Blutkörperchenbrei diese Krystalle ohne Alkoholzusatz zu erhalten, wobei die einzelnen Krystallindividuen über 1 mm lang waren.

Die Krystalle sind recht schwer löslich in kaltem Wasser und können daher durch Dekantation mit eiskaltem Wasser wiederholt gewaschen werden. Zur Analyse wurden sie dann in Wasser von 40° gelöst, nach dem Abkühlen der Lösung unter Zusatz von etwa 15% kaltem Weingeistes wiedergewonnen, nach der Separierung mittels der Zentrifuge im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet, verrieben und in verstöpselten Gläsern aufbewahrt.

Für dieses (lufttrockene) Krystallpulver wurde die folgende Zusammensetzung ermittelt.

0,2321 g gaben 0,4192 g Kohlensäure, 0,1539 g Wasser, entsprechend 49,24% Kohlenstoff, 7,41% Wasserstoff.

0,2038 g gaben nach Dumas 25,0 ccm trockenen Stickstoff, bei 24,1° und 749,5 mm Quecksilberdruck, entsprechend 15,41% Stickstoff.

0,1865 g gaben nach Dumas 25,0 ccm trockenen Stickstoff, bei 21,1° und 743,5 mm Druck, entsprechend 15,29% Stickstoff.

2,5301 g gaben bei 107° im reinen Wasserstoffstrom erhitzt, einen Gewichtsverlust von 0,2553 g oder 10,09% Wasser. 0,6860 g gaben analog 0,0692 g Gewichtsverlust.

6,3144 g trockener¹⁾ Blutfarbstoff wurde in 70 ccm Salzsäure mit kleinen Mengen chlorsauren Kaliums oxydiert, zuerst in der Kälte, dann in der Wärme; es wurde soviel Kaliumchlorat in kleinen Anteilen zugefügt, bis die Flüssigkeit hellgelb blieb. Sie wurde nun verdünnt, filtriert, das Filtrat wurde mit Schwefelammonium gefällt, der entstandene Niederschlag mit schwefelwasserstoffhaltigem Wasser gewaschen, in verdünnter Salzsäure gelöst und nach der Oxydation mit Bromwasser durch Ammoniak gefällt. Das anhaltend geglühte Eisenoxyd wog 0,0366 g, entsprechend **0,405%** Eisen.

6,3977 g lufttrockener Blutfarbstoff wurde mit reiner Soda und Salpeter geschmolzen, die in Wasser gelöste Schmelze wurde filtriert, der Niederschlag wurde in Salzsäure gelöst, zur Trockene gebracht, und durch Erhitzen und Abrauchen mit Schwefelsäure wurde die Salzsäure völlig vertrieben. Diese mit Wasser verdünnte Lösung wurde mit Zink im Wasserstoffstrom reduziert und das Eisen mit Chamäleon titriert. 1 ccm Chamäleon entsprach 0,001559 g krystallisierter Oxalsäure, resp. 0,001386 g Eisen.

Verbraucht wurden 18,9 ccm Chamäleon, für die verwendete Zinkmenge allein wurden 1,9 ccm Chamäleon verbraucht, daher zur Oxydation des Eisens **17,0** ccm, entsprechend 0,02356 g Eisen, in Prozenten 0,369% Fe. Gerechnet auf trockenen Blutfarbstoff: **0,410%** Eisen.

1,8968 g lufttrockener Blutfarbstoff wurde mit Soda und Salpeter geschmolzen, die filtrierte wässrige Lösung mit Salzsäure angesäuert, durch Fällung mit Chlorbaryum und Abrauchen mit Salzsäure wurden 0,0474 g reines Baryumsulfat gewonnen, entsprechend 0,344% Schwefel.

2,3108 g trockener Blutfarbstoff wurde mit Soda und Natriumperoxyd erhitzt, die Schmelze wurde, in Wasser gelöst, filtriert. Die eine Hälfte des Filtrates, mit Salpetersäure angesäuert, blieb auf Zusatz von Silbernitratlösung vollkommen klar. Die andere Hälfte wurde nach dem Ansäuern mit Salpetersäure mit Molybdänsäure erwärmt, es trat weder Gelbfärbung noch die Bildung eines Niederschlages em. Somit sind Chlor und Phosphor nicht vorhanden.

Für den trockenen Blutfarbstoff berechnet ergeben sich folgende Mittelwerte:

$$\begin{aligned} \text{C} &= 54,77\% \\ \text{H} &= 6,99\% \\ \text{N} &= 17,07\% \end{aligned}$$

¹⁾ Frei von Krystallwasser.

$$S = 0,38\%$$

$$Fe = 0,41\%$$

Während die übrigen Werte Zahlen geben, welche den bisher untersuchten Blutfarbstoffen annähernd entsprechen, ist das Fehlen des Phosphors recht auffallend. Von Blutfarbstoffen aus kernhaltigen Blutkörperchen sind allerdings bisher nur wenige Analysen und zwar vom Hausgeflügel in der Literatur angeführt. Diese Analysen zeigen für den Phosphorgehalt große Unterschiede. Es liegt daher die Vermutung nahe, daß dieser Phosphorgehalt auf Verunreinigungen, vielleicht auf eine Beimengung von Nucleinstoffen zu beziehen wäre.

Auch die optische Untersuchung hat, soweit ich sie durchgeführt habe, die Übereinstimmung des Blutfarbstoffs der Thalassochelys mit den bisher näher untersuchten Blutfarbstoffen ergeben.

Die Untersuchung wurde mittels des Hüfnerschen Spektrophotometers in der von Professor v. Hüfner und seinen Schülern geübten Weise vorgenommen, und zwar mit demselben Apparate, dessen ich mich bei einer vor kurzem veröffentlichten Studie¹⁾ bedient habe, unter Beachtung aller nötigen, zum Teil dort beschriebenen Vorsichtsmaßregeln.

Die Eichung des Spektrophotometers wurde gegen das Sonnenspektrum nachgeprüft und hatte sich als tadellos erwiesen: die Verdünnung der Blutfarbstofflösungen geschah mit 0,1%iger Sodalösung.

Die Spektralgegenden, in welchen die Untersuchungen vorgenommen wurden, waren die seinerzeit von v. Hüfner vorgeschlagenen, nämlich 1. das Intervall der Wellenlängen 554 bis 565 μ und 2. die dunkelste Partie des breiteren im Grün gelegenen Absorptionsstreifens von Oxyhämoglobin, nämlich 531,5 bis 542,5 μ .

Vorerst habe ich das Blut selbst photometrisch untersucht. Zu diesem Zwecke wurde eine gemessene Menge desselben mit 1⁰⁰⁰ natriumcarbonathaltigem Wasser verdünnt.²⁾ Dabei entsteht ein grobflockiger, farbloser Niederschlag, der

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLVIII.

²⁾ Beiläufig sei erwähnt, daß das Blutserum nur wenig gelb gefärbt ist.

sich rasch absetzt, sodaß die klare Flüssigkeit dekantiert werden kann. Es wurden folgende Werte erhalten:

1. Blutverdünnung 1 : 80, $\varphi = 56,57^\circ$, $\varphi' = 66,93^\circ$, $\epsilon = 0,51782$,

$$\epsilon' = 0,81374, \quad \frac{\epsilon'}{\epsilon} = 1,572.$$

2. Blutverdünnung 1 : 90, $\varphi = 54,21^\circ$, $\varphi' = 64,14^\circ$, $\epsilon = 0,46596$,

$$\epsilon' = 0,72068, \quad \frac{\epsilon'}{\epsilon} = 1,547.$$

3. Blutverdünnung 1 : 80, $\varphi = 57,51^\circ$, $\varphi' = 67,53^\circ$, $\epsilon = 0,53980$,

$$\epsilon' = 0,83542, \quad \frac{\epsilon'}{\epsilon} = 1,548.$$

4. Blutverdünnung 1 : 100 (junges Tier in erschöpftem Zustande),

$$\varphi = 46,90^\circ, \quad \varphi' = 56,72^\circ, \quad \epsilon = 0,33082, \quad \epsilon' = 0,52128,$$

$$\frac{\epsilon'}{\epsilon} = 1,576.$$

Im Mittel ist der Quotient $\frac{\epsilon'}{\epsilon} = 1,561$.

Das verwendete Blut war verschiedenen Schildkröten entnommen und wurde möglichst rasch nach der Entnahme untersucht. Da v. Hüfner als das Verhältnis der Extinktionskoeffizienten $\frac{\epsilon'}{\epsilon} = 1,578$ in verschiedenen Oxyhämoglobinsorten, Dreser für Menschenblut 1,557 gefunden hat, so dürfte sich aus diesen Daten zur Genüge ergeben, daß das hier vorliegende Oxyhämoglobin der *Thalassochelys* dem der Säugetiere in bezug auf das so charakteristische Verhältnis von $\epsilon' : \epsilon$ sich gleich verhält.

(Anmerkung. Vor kurzem sind in einer Publikation von H. Aron und Fr. Müller, »Über die Lichtabsorption des Blutfarbstoffs«, Arch. f. (An. u.) Physiol, 1906, Suppl., für das Verhältnis $\frac{\epsilon'_0}{\epsilon_0}$ wesentlich kleinere Werte mitgeteilt worden. In Tabelle II z. B. schwanken die Werte von 1,414 bis 1,491. Da sowohl ich wie mehrere meiner Schüler in allen Fällen bei den spektrophotometrischen Untersuchungen von reinem Oxyhämoglobin, wie von frischem Bute, eine Übereinstimmung mit den v. Hüfnerschen Werten erhalten haben, und auch die vorliegende Arbeit wiederum eine Bestätigung erbringt, ist es wahrscheinlich, daß bei der zitierten Untersuchung ein Fehler unterlaufen ist. Von vornherein läßt sich bei einem immerhin

komplizierten und in der Benützung doch relativ heiklen Apparate, wie es das Spektrophotometer ist, schwer ein Verdacht aussprechen. Am ehesten könnte etwa ein Fehler in der Eichung des Apparates die auffallende Differenz der Resultate erklären.

R. v. Zeynek.)

Die Bestimmung des Absorptionsverhältnisses, i. e. des Quotienten der Blutfarbstoffkonzentration durch den Extinktionskoeffizienten, konnte ich für Oxyhämoglobinkristalle nur in einem Falle ausführen, da in den anderen Krystallproben sich bereits etwas Methämoglobin gebildet hatte. In ersterem Falle wurde die Konzentration durch Bestimmung des Abdampfrückstandes der Lösung der Blutfarbstoffkrystalle ermittelt.

c (die Konzentration in 1 ccm, nach Vierordt) war 0,00086, $\varphi = 51,45^\circ$, $\varphi' = 61,57^\circ$, daraus $\epsilon_0 = 0,41074$, $\epsilon'_0 = 0,64464$, $\frac{\epsilon'}{\epsilon} = 1,569$, $A_0 = \frac{c}{\epsilon_0} = 0,002094$, $A'_0 = \frac{c}{\epsilon'_0} = 0,001334$. (Dem gegenüber die Absorptionsverhältnisse anderer Oxyhämoglobine: $A_0 = 0,002070$, $A'_0 = 0,001312$.)

Die übrigen Proben, in denen schon Methämoglobin entstanden war, wurden durch Zusatz einer geringfügigen Menge von Ferricyankalium vollständig in Methämoglobin übergeführt und nach Verdünnung mit 1% iger Sodalösung untersucht.

1. Die Krystalle waren unter Zusatz von 15% igem Weingeist im Eskasten gewonnen, umkrystallisiert und reichlich dekantiert, dann in Wasser bei 40° gelöst. Die Konzentration der Lösung wurde durch Wägung des Trockenrückstandes bestimmt.

$c = 0,001086$, $\varphi = 56,84^\circ$, $\varphi' = 60,66^\circ$, $\epsilon_m = 0,52406$, $\epsilon'_m = 0,61962$, $\frac{\epsilon'_m}{\epsilon_m} = 1,182$, $A_m = 0,002072$, $A'_m = 0,001753$.

2. Frisch gewonnene Krystalle, mittels Weingeist lufttrocken zerrieben. Von einer Probe wurde der Wassergehalt bestimmt.

$c = 0,001079$, $\varphi = 56,78^\circ$, $\varphi' = 60,51^\circ$, $\epsilon_m = 0,52266$, $\epsilon'_m = 0,61560$, $\frac{\epsilon'_m}{\epsilon_m} = 1,178$, $A_m = 0,002064$, $A'_m = 0,001753$.

3. Durch Dialyse gegen schwefelsaures Ammon wurden

Krystalle von Blutfarbstoff erhalten, von denen abfiltriert wurde. Das Filtrat wurde langsam eingedunstet, der Krystallrückstand wiederholt durch Dekantation mit Wasser ammoniumsulfatfrei gewaschen, schließlich in Wasser von 40° gelöst, von einem Teile der Lösung wurde der Trockenrückstand bestimmt.

$$c = 0.001295, \varphi = 60.68^{\circ}, \varphi' = 64.71^{\circ}, \epsilon_m = 0.62016, \\ \epsilon'_m = 0.73874, \frac{\epsilon'_m}{\epsilon_m} = 1.191, A_m = 0.002088, A'_m = 0.001753.$$

$$\text{Im Mittel wurden erhalten: } A_m = 0.002075, A'_m = \\ 0.001753, \frac{\epsilon'_m}{\epsilon_m} = 1.184.$$

Demgegenüber hat R. v. Zeynek¹⁾ als die Mittelwerte für die Absorptionsverhältnisse von Methämoglobin, welches von verschiedenen Säugetieren gewonnen war, $A_m = 0.002077$, $A'_m = 0.001754$, $\frac{\epsilon'_m}{\epsilon_m} = 1.185$ gefunden. So darf gefolgert werden, daß der Blutfarbstoff der *Thalassochelys corticata* in optischer Hinsicht so gut wie identisch ist mit dem der bisher untersuchten Säugetiere.

Unter Zugrundelegung des oben mitgeteilten Wertes von A_0 und A'_0 berechnet sich die Farbstoffkonzentration der vier untersuchten Blutproben zu 1. 8.68, 2. 8.73, 3. 8.98, 4. 6.94% Hämoglobin.

¹⁾ Arch. f. (An. und) Physiol., 1899, S. 460.