

Beitrag zur Kenntnis des Oxyhämoglobins verschiedener Tierarten.

I. Mitteilung.

Von

Emil Abderhalden und **Florentin Medigreceanu** (Bukarest).

Mit einer Tafel.

(Aus dem physiologischen Institut der tierärztlichen Hochschule, Berlin.)

(Der Redaktion zugegangen am 4. März 1909.)

Es ist eine auffallende Tatsache, daß das Hämoglobin des Pferdeblutes einen sehr hohen Gehalt an Histidin besitzt. Vorläufige Untersuchungen über den Gehalt des Oxyhämoglobins vom Hunde und vom Rinde an Histidin ergaben ebenfalls hohe Werte, und es scheint, daß eine den Hämoglobinarten der Säugetiere gemeinsame Eigenschaft vorliegt. Nun zeigt der Bau des Histidins Beziehungen zur Gruppe der Purin-substanzen und damit zur Klasse der Nucleinsäuren, d. h. zu den Kernsubstanzen. Der Gedanke war nahe liegend, daß der hohe Gehalt des Oxyhämoglobins der kernlos gewordenen roten Blutkörperchen der Säugetiere gewissermaßen eine Reminiscenz an die ehemals vorhandenen Kernsubstanzen darstellt, ja man könnte sogar vermuten, daß das Hämoglobin mit Hilfe seines hohen Histidingehaltes die Funktionen der Kernsubstanzen in gewissem Umfange übernimmt. Die Frage nach der Bedeutung des Histidins in dem erwähnten Sinne mußte sich durch die Feststellung des Gehaltes des Hämoglobins von Tieren mit kernhaltigen roten Blutkörperchen an dieser Aminosäure beantworten lassen. Wir können gleich erwähnen, daß die eben angeführten Vermutungen nicht zutreffen. Auch die roten Blutkörperchen der Vögel enthalten viel Histidin. Es scheint, daß der hohe Gehalt an dieser Aminosäure eine Eigentümlichkeit

aller Hämoglobinarten darstellt. Wir werden diese Frage noch weiter prüfen. Es seien im folgenden die erhaltenen Mengen an Histidin angeführt.

In 100 g bei 100° getrockneten roten Blutkörperchen aus Pferdeblut fanden wir 5,3 g Histidin, ferner 2,8 g in 100 g analog behandelte rote Blutkörperchen des Huhns und 2,5 g in 100 g Entenblutkörperchen. In 506 g vom Serum durch Zentrifugieren befreiten roten Blutkörperchen der Gans fanden wir 3,62 g Histidin. In diesem Falle war der Blutkörperchenbrei nicht getrocknet worden. Es lassen sich diese Zahlen nicht ohne weiteres unter einander vergleichen, weil einmal der Hämoglobingehalt der Blutkörperchen und daher die Menge des verarbeiteten Hämoglobins nicht genau bekannt war, und ferner auch die übrigen Proteine der Blutkörperchen Histidin, wenn auch in viel geringerer Menge, enthalten. Eine auf eine annähernde Berechnung des Hämoglobingehalts der einzelnen Blutarten sich stützende Bestimmung des Histidingehaltes pro 100 g Hämoglobin gab für alle Blutarten annähernd gleiche Werte. Ganz exakt wird das gestellte Problem erst durch die Ausführung der Hydrolyse der einzelnen isolierten Hämoglobinarten zu beantworten sein.

Was die Darstellung des Histidins aus den Blutkörperchen der einzelnen Blutarten anbetrifft, so ist folgendes zu bemerken. Das frische, defibrinierte Blut wurde durch Zentrifugieren und dreimaliges Waschen mit isotonischer Kochsalzlösung möglichst vom Serum befreit. Der Blutkörperchenbrei wurde zunächst auf dem Wasserbade und dann bei 100° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Nun hydrolysierten wir die trockene, braunschwarz gefärbte Masse durch sechsstündiges Kochen mit der dreifachen Menge rauchender Salzsäure, dann wurde die Hydrolysenflüssigkeit filtriert und unter vermindertem Druck bis zur Trockene eingedampft. Die weitere Verarbeitung auf Histidin erfolgte in der üblichen Weise. Wir haben jedesmal festgestellt, ob Histidinmonochlorhydrat oder -dichlorhydrat vorlag und zwar durch Bestimmung des Zersetzungspunktes und des Chlorgehaltes. Zuerst schied sich das Histidinmonochlorhydrat aus.

Wir haben ferner versucht, die Frage nach dem **Phosphorgehalt des Oxyhämoglobins aus Vogelblut** zu entscheiden. Bekanntlich ist stets Phosphor im Vogeloxyhämoglobin aufgefunden worden. Daß der Phosphor dem Oxyhämoglobin als solchem nicht zukommt, sondern vielmehr durch eine Verunreinigung mit nucleinhaltigem Material bedingt ist, hat bereits Y. Inoko¹⁾ sehr wahrscheinlich gemacht. Es gelang ihm, einmal aus Gänsebluthämoglobin Adenin zu isolieren, und ferner nach Zusatz von Nucleinsäure zu Oxyhämoglobin aus Pferdeblut phosphorhaltiges Oxyhämoglobin zu gewinnen. Es schien uns der Mühe zu lohnen, die erwähnte Frage nach dem Phosphorgehalt des Oxyhämoglobins aus Vogelblut durch direkte Versuche zu entscheiden, d. h. zu versuchen, möglichst phosphorfreie Oxyhämoglobinkrystalle zu gewinnen.

Wir haben zu unseren Versuchen das Oxyhämoglobin aus Gänseblut gewählt. Es ist uns gelungen, eine größere Menge von Krystallen darzustellen, und zwar verwendeten wir im Prinzip die alte Hoppe-Seylersche Methode. Die roten Blutkörperchen wurden aus ganz frischem, geschlagenem Gänseblut möglichst gut durch Zentrifugieren und Waschen mit isotonischer Kochsalzlösung vom Serum befreit. Dann erwärmten wir den Blutkörperchenbrei mit der zweifachen Menge Wasser auf 37°. Es traten gallertige Klumpen auf. Die warme Lösung wurde nunmehr filtriert, abgekühlt und mit Äther geschüttelt. Oft trat nun nochmals Abscheidung von gallertigen Massen ein. Es wurde nochmals filtriert, dann das Filtrat in Eis gestellt und nunmehr tropfenweise unter fortwährendem Rühren $\frac{1}{4}$ Volumen 90%igen Alkohols zugegeben. Auch der Alkohol war auf 0° abgekühlt. Oft erfolgte nach kurzem Stehen in einer Kältemischung (ca. 10—15°) Krystallisation, oft schieden sich neben Krystallen auch amorphe Massen ab. In letzterem Falle ist es vorteilhaft, das Gemenge nochmals auf 37° zu erwärmen und zu filtrieren. Je vollständiger all diese offenbar hauptsächlich von den Kernen der roten Blutkörperchen herrührenden Massen

¹⁾ Y. Inoko, Einige Bemerkungen über phosphorhaltige Blutfarbstoffe. Diese Zeitschrift, Bd. XVIII, S. 57, 1894.

entfernt werden, um so reinere Krystalle von Oxyhämoglobin erhält man. In genau der gleichen Weise lassen sich auch relativ leicht Krystalle von Oxyhämoglobin aus Hühner- und Entenblut gewinnen. Das Umkrystallisieren erfolgte durch Lösen der Krystalle in 2 Volumen Wasser von 37° und Wiederholung des Zusatzes von $\frac{1}{4}$ Volumen Alkohol unter den gleichen Bedingungen, wie vorher. Das Absaugen der Krystalle muß bei niedriger Temperatur vorgenommen werden. Am besten stellt man die Saugflasche mit der Nutsche in eine Kältemischung. Die folgenden Tafeln geben die Form der erhaltenen Krystalle von Oxyhämoglobin aus Gänseblut wieder. Gleichzeitig bilden wir noch einen großen, sechsseitigen Krystall ab. Diese Form trat in großen Massen in Oxyhämoglobinlösungen auf, die längere Zeit aufbewahrt worden waren. Es handelt sich vielleicht um Hämoglobin- oder Methämoglobinkrystalle.

Die Oxyhämoglobinkrystalle sind in Wasser sehr leicht löslich. Schon unter dem Mikroskop begann die Auflösung. Das zweimal krystallisierte Oxyhämoglobin ließ nicht die geringste Verunreinigung erkennen. Die Krystalle waren ganz einheitlich. Natürlich bietet dieses «reine» Aussehen keine Garantie für die chemische Reinheit der Krystalle. Wir haben zu wiederholten Malen Krystalle von Oxyhämoglobin aus verschiedenen Blutproben gewonnen und zunächst C, H, N, S und Fe bestimmt. Die gefundenen Werte stimmen mit den früher gefundenen¹⁾ gut überein. Was nun den Gehalt an Phosphor anbetrifft, so erhielten wir bei verschiedenen Präparaten verschiedene Werte. Ein besonders sorgfältig gereinigtes Präparat ergab nur Spuren von Phosphor (0,0059 ‰), während eine nur einmal krystallisierte Probe 0,12 ‰ Phosphor aufwies. Ein drittes, ebenfalls nicht weiter gereinigtes Präparat enthielt 0,095 ‰ Phosphor. Diese schwankenden Zahlenwerte und der Befund, daß es gelingt, den Phosphorgehalt des Oxyhämoglobins aus Gänseblut außerordentlich zu vermindern, lassen unter Berücksichtigung der Befunde von Inoko (l. c.) den Schluß zu, daß dem Oxy-

¹⁾ F. Hoppe-Seyler, Medizinisch-chemische Untersuchungen, S. 366, 1868.

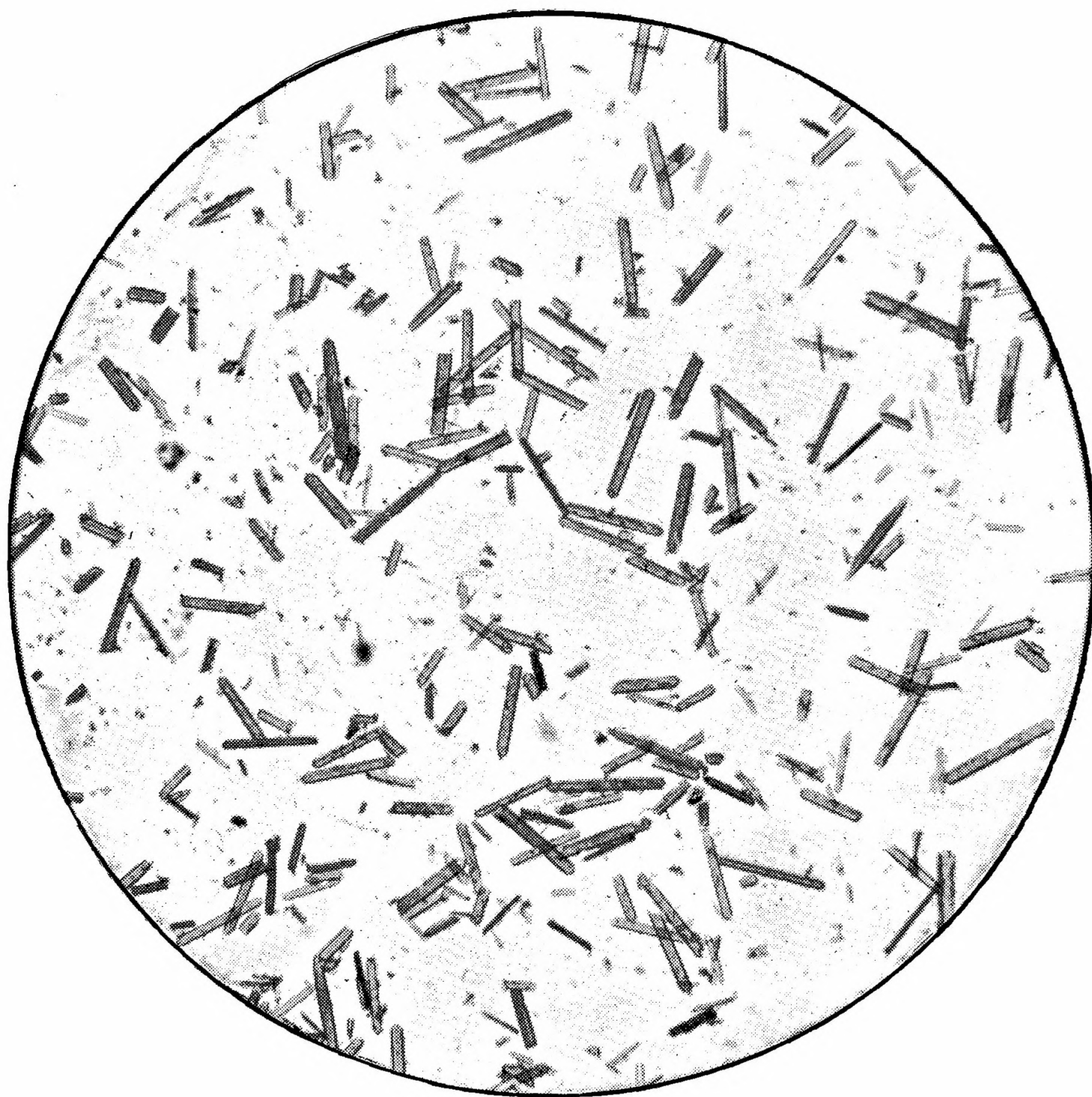


Fig. 1 — 135fach vergrößert.

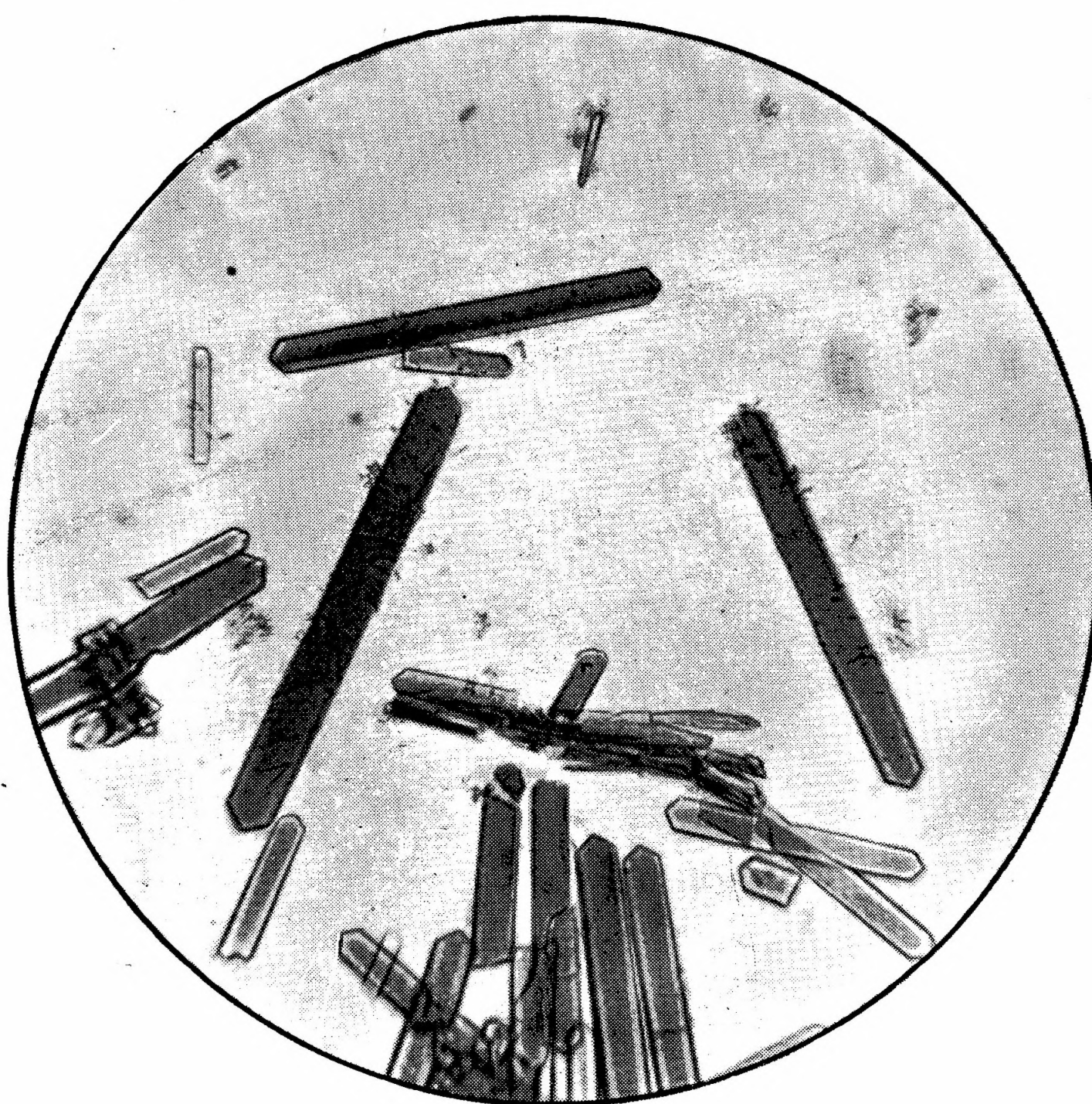


Fig. 2. — 350fach vergrößert.

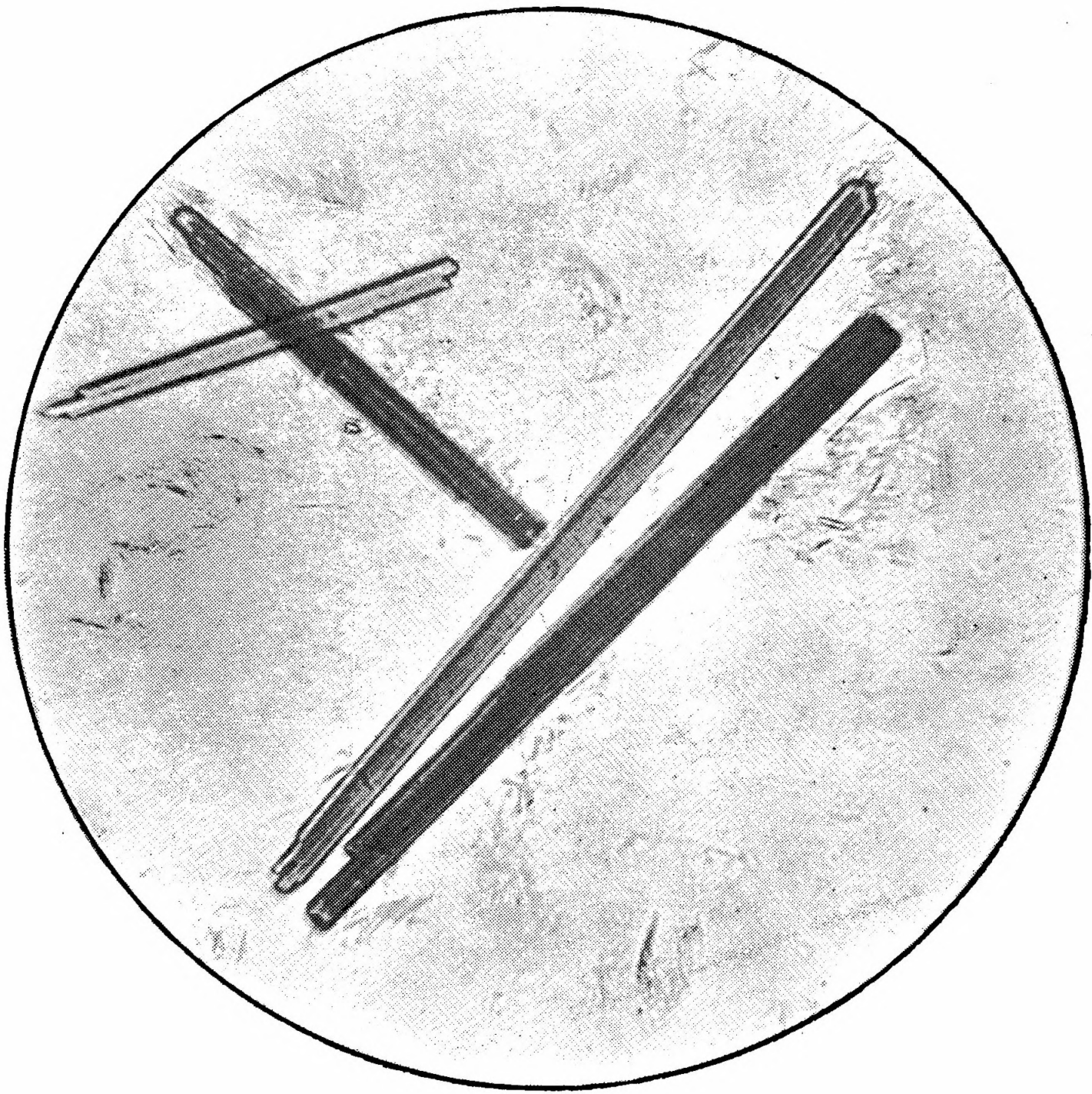


Fig. 3. — 225fach vergrößert.

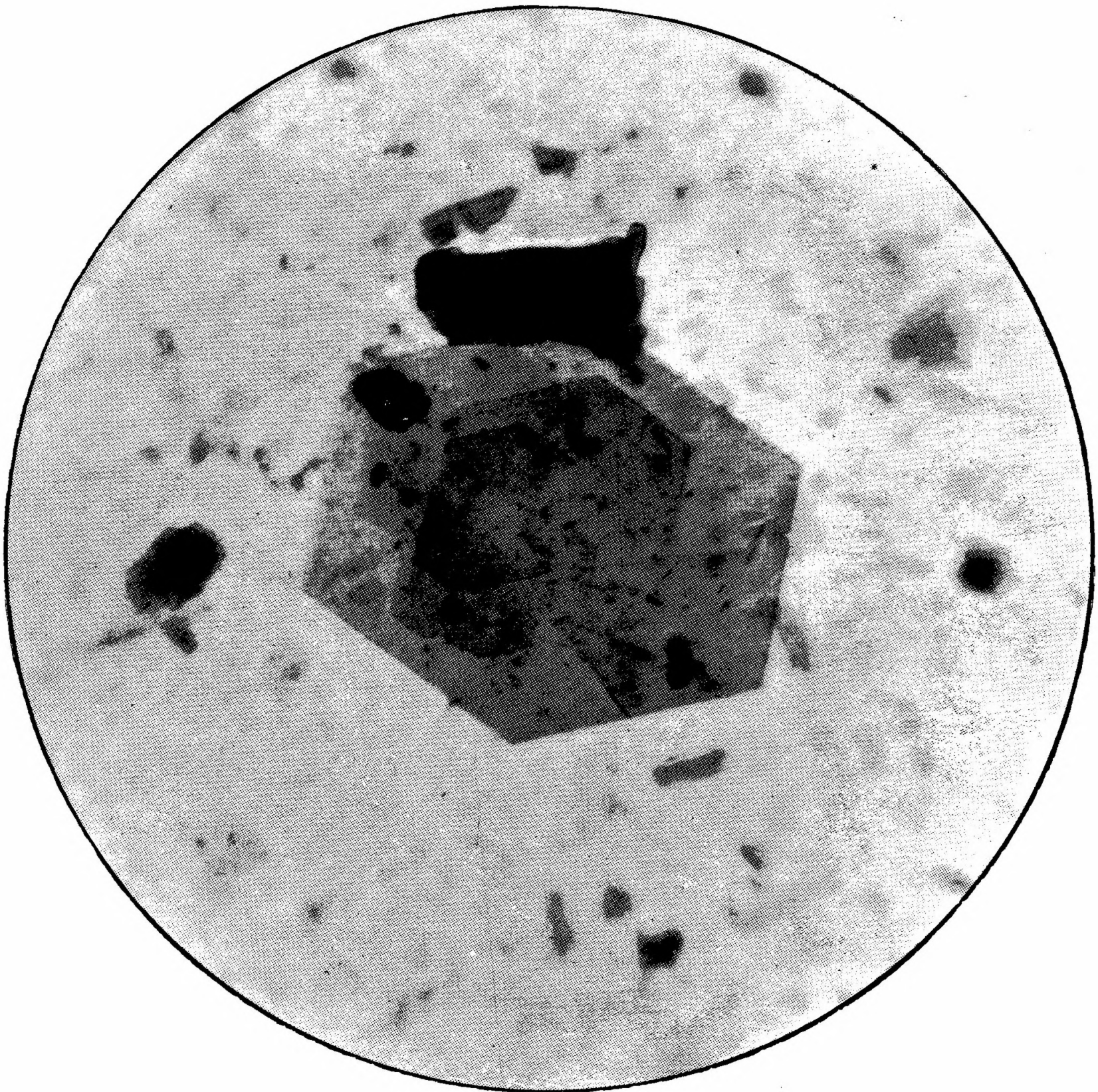


Fig. 4. — 135fach vergrößert.

hämoglobin aus Gänseblut ein Gehalt an Phosphor nicht zukommt. Es scheint vielmehr, daß das Oxyhämoglobin des Vogelblutes in engen Beziehungen zu demjenigen der Säugetiere steht.

Gefunden: **54,11% C, 6,83% H, 16,58% N, 0,65% S, 0,51% Fe**
(und 0,0059% P).

	0,2149 g	Substanz	gaben	0,4263 g	CO ₂	und	0,1312 g	H ₂ O.
	0,1654	»	»	nach Kjeldahl	19,6 ccm	¹ / ₁₀ -n-H ₂ SO ₄ .		
	2,8267	»	»	0,1333 g	BaSO ₄	=	0,01827 g	S.
	2,7006	»	»	0,0255	» Fe ₂ (OH) ₆	=	0,0197 g	Fe ₂ O ₃
						=	0,01378 g	Fe.
Probe I.	2,8074	»	»	0,00039 g	P ₂ O ₅	=	0,00017 g	P
» II.	3,1340	»	»	0,0069	» »	=	0,0030	» »
» III.	2,7006	»	»	0,0115	» Mg ₂ P ₂ O ₇	=	0,0032	» » .

Hierzu sei bemerkt, daß bei Probe I und II der Phosphor nach erfolgter Veraschung nach Neumann bestimmt wurde, während Probe III auf trockenem Wege verascht wurde.

