

Über die Verbindungen des Pyridins mit Blutfarbstoff.

Von

Landesgerichtsarzt Dr. Ernst Kalmus.

(Aus dem k. k. deutschen medizinisch-chemischen Laboratorium der Universität in Prag.)

(Der Redaktion zugegangen am 14. November 1910.)

Hoppe-Seyler gibt an, durch Erhitzen einer Hämoglobulinlösung mit Lauge eine krystallinische Abscheidung von Hämochromogen erhalten zu haben. Es ist uns bisher nie gelungen, auf diese Weise Krystalle zu erhalten. Da überdies Thierfelder¹⁾ hervorhebt, daß Hoppe selbst seine Angabe nicht aufrecht gehalten zu haben scheint, kann gegenwärtig wohl von weiteren Versuchen in dieser Hinsicht abgesehen werden.

Die bisher dargestellten und analysierten Hämochromogenverbindungen: Hämochromogenammonium v. Zeyneks²⁾ und Kohlenoxydhämochromogenammonium Pregls³⁾ waren amorph. Herr Prof. v. Zeynek gestattet mir, hier mitzuteilen, daß auch das freie Hämochromogen, durch Zerlegung von Hämochromogenammonium mit sehr verdünnter alkoholischer Essigsäure in seinem Apparate dargestellt, gleichfalls nicht krystallisiert erhalten werden konnte.

Da mußte es auffallen, daß Donogány⁴⁾ charakteristische Krystalle beschrieb, welche durch die Einwirkung von Pyridin auf Blutfarbstoff entstanden und das Hämochromogenspektrum zeigten. Donogány's Befunde wurden von H. U. Kobert⁵⁾

¹⁾ Physiol.-chem. Analyse, 8. Aufl., S. 352, Anmerkung.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXV, S. 492.

³⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLIV, S. 173.

⁴⁾ Mathem.-naturwissenschaftl. Berichte aus Ungarn, Bd. XI, 1893.
R. Friedlander u. Sohn, Berlin.

⁵⁾ Das Wirbeltierblut in mikrokrystrallogr. Hinsicht.

bestätigt. Beide Autoren waren lediglich auf Grund mikroskopischer Präparate dazu gelangt, die Krystalle als «krystallisiertes Hämochromogen» aufzufassen.

Ich habe die Beobachtungen der beiden Autoren nachgeprüft und konstatiert, daß auch aus altem unlöslich gewordenem Blutfarbstoff, wie man ihn bei gerichtlichen Untersuchungen in die Hände bekommt, solche Krystalle zu erhalten waren, so daß man sie wohl als Abbauprodukte von Blutfarbstoff ansehen konnte; auf Grund meiner gerichtlichen Erfahrungen kann ich bestätigen, daß der Nachweis dieser Krystalle dem der Häminkrystalle an Wichtigkeit nicht nachsteht.¹⁾

Herr Prof. v. Zeynek machte mich auf die Divergenz seiner Erfahrungen betreffend die Krystallisierbarkeit des Hämochromogens mit den Erfahrungen Donogány's aufmerksam und zeigte mir folgende Versuche:

Wird eine Lösung von Blutfarbstoff (Oxyhämoglobin oder Methämoglobin) mit einer kleinen Menge von Pyridin versetzt, so zeigt die Lösung ein Spektrum, welches dem einer Hämochromogenlösung ähnlich, aber bei weitem weniger intensiv ist. Besonders auffallend ist die Änderung des Spektrums an einer (sauren) Methämoglobinlösung zu beobachten. Wird hierauf eine größere Menge von Pyridin zugefügt, so gelingt es, bei vorsichtigem Zusatz des Pyridins den ganzen Blutfarbstoff auszufällen, analog wie Blutfarbstoff durch Alkohol gefällt wird. Auch diese Fällung zeigt ein dem Hämochromogen einigermaßen ähnliches Spektrum. Ein Überschuß von Pyridin löst den gebildeten Niederschlag auf; in der Lösung war das oben geschilderte, aber nicht das scharfe charakteristische Hämochromogenspektrum zu sehen.

Wird in einer Eprouvette Hämin oder Hämatin in Pyridin gelöst, so bildet sich kein Hämochromogen, obwohl das Spektrum different von dem einer alkalischen Hämatinlösung ist, wie Zeynek (Diese Zeitschr., Bd. XXX, S. 126) schon ausdrücklich erklärt hat.

¹⁾ Vierteljahrsschr. f. gerichtl. Medizin, Verhandlung der V. Tagung der deutsch. Gesellsch. f. gerichtl. Medizin, S. 57.

In allen diesen Fällen wird das Absorptionsspektrum durch Zusatz von Hydrazinhydrat oder Schwefelammonium geändert, es tritt alsbald das prägnante typische Hämochromogenspektrum auf.

Diese Erfahrungen legten uns nahe, in der Beurteilung der mikroskopischen Befunde doch einigermaßen vorsichtig zu sein. Es sei in dieser Hinsicht auf die langwierige und erbitterte Polemik über die Existenz von Methämoglobin («Hoppein»), aus der letzten Zeit sei auf das neutrale Hämatin Arnolds hingewiesen. Ferner hat Copeman Pseudomorphosen von Hämoglobinkristallen beschrieben, welche das Hämochromogenspektrum gezeigt haben. Auch Bürkers Erfahrung, daß aus dem Eisessigätherextrakt von Blut die Hämochromogenkristalle nicht zu erhalten seien, mußte ebenso einiges Bedenken erregen.

Es schien demnach geboten, die Darstellung solcher Krystalle in größerem Maßstabe zu versuchen.

Zu den Versuchen wurden zuerst Oxyhämoglobinlösungen verwendet, die aus zweimal umkrystallisiertem Oxyhämoglobin vom Pferde bereitet waren. Der Oxyhämoglobingehalt, spektrophotometrisch bestimmt, ergab sich zu 9,2%. Mit je 30 ccm dieser Lösung wurde Pyridin in verschiedener Menge gemischt, es entstanden bei hinreichendem Pyridinzusatz derbe amorphe Gerinnsel. Nach mehrtägigem Stehen fanden sich neben den amorphen, parahämoglobinartigen Massen mikroskopische Krystalle, die zumeist zu Büscheln aggregiert waren, von Formen, wie sie H. U. Kobert beschrieben hatte. Diese Krystalle waren gegen wässerige Lauge recht beständig. Durch vorsichtiges Abhebern der Flüssigkeit im Stickstoffstrome und wiederholtes Waschen mit 3%iger Lauge ließen sich die amorphen Massen teilweise beseitigen. Doch waren immerhin recht große Verluste vorhanden und die vollständige Entfernung der amorphen Massen gelang uns nicht.

Die Krystalle zeigten bei mikroskopischer Untersuchung ein intensives Hämochromogenspektrum, an die Luft gebracht lösten sie sich zu einer braungrünen Flüssigkeit, welche das alkalische Hämatinspektrum zeigte.

Auf Grund dieser Beobachtung glaubten wir annehmen

zu können, daß eine zweifache Reaktion des Pyridins auf Oxyhämoglobin stattfindet, 1. die Koagulation, 2. die Spaltung, und wir haben im folgenden in dieser Richtung Versuche ausgeführt.

Sehr schön und glatt erhält man die Krystalle durch längeres Kochen einer nicht zu konzentrierten Hämoglobin-(oder Methämoglobin)lösung mit viel Pyridin, bis die Koagula sich gelöst haben und die Hauptmenge des Pyridins sich verflüchtigt. Dr. F. Bardachzisz in der vorhergehenden Mitteilung beschriebene Beobachtung, daß Oxyhämoglobin durch 2stündiges Kochen mit etwa 10%iger Lauge sich vollkommen löst, wobei die prosthetische Gruppe des Hämoglobins glatt zu Hämochromogen reduziert wird, gab uns die Möglichkeit, ohne besondere Mühe große Mengen von Hämochromogenlösungen, die allerdings reichlich Spaltungsprodukte von Eiweiß enthielten, darzustellen.

Es wurden etwa 10%ige Oxy- und Methämoglobinlösungen mit etwa 10% reinem Ätzkali versetzt und zwei Stunden auf dem Wasserbade in langhalsigen Kolben erwärmt, wobei die Flüssigkeit bis in den Kolbenhals hinaufreichte. Die Flüssigkeit war, wie wir uns wiederholt überzeugten, vollkommen klar und blieb es auch nach dem Abkühlen. Auf Zusatz von etwa 10 ccm Pyridin per Liter trübte sie sich und ließ bald einen krystallinischen Bodensatz von intensiv roter Farbe ausfallen, die Flüssigkeit roch nach Pyridin.

Die Mutterlauge wurde entfernt, indem ein doppelt durchbohrter Stöpsel auf den Kolben aufgesetzt wurde, die Bohrungen enthielten 2 Röhren, in derselben Anordnung wie bei Spritzflaschen. Durch das kürzere Rohr wurde ein Strom elektrolitischen Wasserstoffs, der mit Wasser gewaschen war, geleitet. Nachdem die Mutterlauge zum größten Teile entfernt war, wurde mit heißem, gut gekochtem Wasser bis in den Kolbenhals nachgefüllt. Das Waschen wurde solange fortgesetzt, bis die Flüssigkeit keine Biuretprobe mehr gab und nur schwach nach Pyridin roch. Dann wurden Proben der Krystalle in beiderseits kapillar ausgezogene Röhren aufgesaugt und die Enden zugeschmolzen. In den Röhren setzten sich die Krystalle bald zu Boden; über ihnen befand sich eine leicht rot gefärbte

Flüssigkeit (etwa von der Farbe einer 1^o/₁₀₀igen Oxyhämoglobinlösung), welche Lösung trotz des geringen Farbentones sehr intensiv das Hämochromogenspektrum zeigte.

Eine solche Probe, an der Luft geöffnet, zeigte eine rasche Veränderung des Farbentones, die Krystalle lösten sich rasch zu einer braungrünen Flüssigkeit, die das charakteristische Hämatinspektrum zeigte. Zu der Lösung wurde Lauge zugefügt, hierauf wurde erwärmt, etwas Kupfersulfat zugegeben und filtriert. Das Filtrat zeigte nicht die Spur einer Biuretfärbung.

Eine größere Menge der in der Flüssigkeit befindlichen Krystalle wurde in ein Trockengefäß eingesaugt und nach dem Absetzen der Krystalle wurde durch reinen, mit Schwefelsäure getrockneten, über glühendes Kupfer, hierauf über Ätzkali geleiteten elektrolytischen Wasserstoff unter vorsichtigem Neigen des Trockengefäßes die Hauptmenge der Flüssigkeit entfernt. Dann wurde im Wasserstoffstrome bei langsam gesteigerter Temperatur, schließlich kurze Zeit bei 120° getrocknet. Der letzte Anteil des Wasserstoffs war frei von Pyridingeruch. Bei sorgsamem Arbeiten hinterbleibt ein rein roter Rückstand, der das Hämochromogenspektrum ausgezeichnet zeigt. Nach dem Lösen in Lauge wurde die Lösung erwärmt, sie roch deutlich nach Pyridin.

Wir können demnach die Mitteilungen Donogánys und Koberts bestätigen, daß durch Pyridinwirkung aus Blutfarbstoff Krystalle zu erhalten sind, welche das Hämochromogenspektrum geben; sie sind aber nicht freies Hämochromogen, sondern eine Verbindung desselben mit Pyridin.

Zur Bestätigung unserer Ansicht haben wir analoge Versuche sowohl mit Hämin, als auch mit Hämatin unternommen. Beide Präparate waren analysenrein, nach Schalfew's und Küsters Vorschriften bereitet.

In Lauge wie in Ammoniak gelöst, mit Hydrazinhydrat versetzt (zur Vermeidung einer starken Gasentwicklung wurde evakuiert), gaben die Krystalle klare, intensiv rote Lösungen, die auf Zusatz von kleinen Mengen von Pyridin alsbald und zwar quantitativ gefällt wurden, so daß die über dem scharlachroten Niederschlag befindliche Flüssigkeit nur hell rosa war; trotz-

dem zeigte sie deutlich das Hämochromogenspektrum. Analoge Resultate wurden erhalten, wenn statt Hydrazinhydrat farbloses, frisch bereitetes Schwefelkalium (K_2S) verwendet wurde, aber nach mehrtägigem Stehen hatte sich der Niederschlag verändert, er war braunrot geworden; unter dem Mikroskop betrachtet, sah er ähnlich den Häminkrystallen aus. Die nähere Untersuchung dieser Substanz steht noch aus.

Zum Nachweise, daß auch mit Hämatin eine Pyridinverbindung des Hämochromogens entsteht, wurde ca. 0,5 g Hämatin nach Chalfejew bereitet, in Pyridin gelöst, dieser Lösung wurden einige Tropfen Hydrazinhydrat zugefügt, hierauf wurde vor der Quecksilberpumpe ausgepumpt und bei 50° unter fortgesetztem Auspumpen über Schwefelsäure getrocknet. Das trockene Produkt war geruchlos, zeigte das reine Hämochromogenspektrum, es war relativ resistent an der Luft; es wurde in verdünnter Lauge gelöst, die Lösung wurde destilliert, wobei eine nicht unbeträchtliche Menge von Pyridin überdestillierte.

Außer mit Pyridin haben wir noch Versuche mit Piperidin ausgeführt, durch welches prächtige Krystalle aus Blutfarbstoff, wie aus Hämatin entstehen.

Im Gegensatze zum Pyridin gibt Piperidin ohne Zusatz eines Reduktionsmittels rasch rote Lösungen, welche das reine Hämochromogenspektrum zeigen. Auffallend ist, daß bei Zutritt von Sauerstoff, auch wenn ein reichlicher Überschuß von Piperidin vorhanden ist, das Hämochromogenspektrum verschwindet und erst durch ein Reduktionsmittel, wie Hydrazinhydrat, wiederkehrt. In solchen, mehrere Monate lang aufbewahrten Flüssigkeiten, die von der Laugenzerkochung von Oxyhämoglobin herrührten (die Krystalle der Piperidinverbindung waren mehrmals, wie oben beschrieben, gewaschen worden) hat Prof. v. Zeynek eine beträchtliche Abscheidung von Eisenhydroxyd beobachtet, während die Lösung noch Hämatinreaktion zeigte und stark nach Piperidin roch. In anderen Fällen, in welchen Blutfarbstoff mit Piperidin in verstöpselten Eprouvetten gestanden war, trat eine fast vollständige Entfärbung ein.

Es scheint daher, daß Piperidin in verschiedener Weise mit Blutfarbstoff reagieren kann.

Analoge Beobachtungen wie mit Oxy- und Methämoglobin habe ich mit Kohlenoxydhämoglobin ausgeführt, die Wiedergabe der Details hat an dieser Stelle gegenwärtig kaum ein Interesse. Ich möchte hier nur hervorheben, daß die Pyridinverbindung des Kohlenoxydhämochromogens leichter löslich ist als Pyridinhämochromogen, ferner daß sie leicht Kohlenoxyd abspaltet, daher für gerichtliche Zwecke von geringer Bedeutung ist.

Wir hatten vor, diese Versuche erst nach der Durchführung von Analysen der interessanten Körper zu publizieren; die kürzlich erschienene Publikation von W. Dilling veranlaßt uns aber, schon jetzt unsere Erfahrungen mitzuteilen.

Ein Irrtum Dillings¹⁾ mag hier berichtigt werden. «Pyridinhämochromogen gibt die für den Blutfarbstoff und seine Derivate charakteristische Benzidinreaktion nicht. Das Piperidinhämochromogen gibt weder die Benzidin- noch die Guajakreaktion» (S. 70, 4).

Der Irrtum ist wohl darauf zurückzuführen, daß überschüssiges Schwefelammon, Pyridin und Piperidin die Guajakharz-Terpentinprobe und die Benzidinprobe hemmen. Reines Hämochromogen, auch dessen Pyridinverbindung, gibt, mit hinreichender Menge von Terpentinöl und Guajakharz versetzt, bei Luftabschluß prompt die typische Reaktion. Die Hemmung der Benzidinprobe durch Schwefelammon, Pyridin und Piperidin läßt sich auch bei analogen Reaktionen mit anorganischen Körpern beobachten.

So gibt z. B. eine Lösung von Kaliumpermanganat prompt die Benzidinreaktion; diese bleibt jedoch aus, wenn der Lösung Pyridin zugesetzt war. Verdünnte Formaldehydlösung, welche bei der Benzidinprobe sofort einen grünblauen Ring entstehen läßt, gibt bei Anwesenheit von Pyridin einen weißbleibenden Niederschlag.

¹⁾ Atlas der Hämochromogene. Stuttgart, Encke, 1910.