

Nachträgliche Bemerkungen betreffend die Pyridinverbindung des Hämochromogens.

Von
R. von Zeynek.

Mit einer Abbildung im Text.

(Der Redaktion zugegangen am 14. November 1910.)

Herr Prof. Kobert hat mich auf dem Heidelberger Physiologenkongreß auf die Krystallbildung, welche Pyridin in Hämoglobinlösungen bewirkt, aufmerksam gemacht und mir freundlichst mikroskopische Präparate zur Ansicht gesendet. Ich glaubte, auf Grund der im vorstehenden von Herrn Dr. Kalmus geschilderten Versuche die Vermutung aussprechen zu dürfen, daß die Krystalle der mir vorgelegten Präparate keine weitgehenden Abbauprodukte des Hämoglobins darstellen. Seither bin ich, durch Publikationen auf dem Gebiete der gerichtlichen Medizin angeregt, zu einer anderen Auffassung gelangt, und unsere Erfahrungen finden sich in den beiden vorliegenden Mitteilungen. Ich bedaure sehr, daß Herr Prof. Kobert ohne mein Wissen einen mehr als 2 Jahre alten, diese Frage betreffenden, an ihn gerichteten Brief teilweise von Herrn Dilling publizieren ließ. Eine Verständigung über diese seine Absicht und ein Austausch unserer Erfahrungen hätte zur rascheren und einfacheren Klärung besser beigetragen.

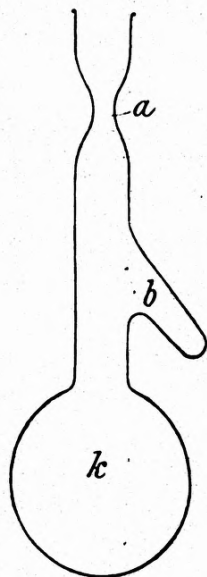
Auf Grund der Dillingschen Arbeit habe ich kürzlich folgende Versuche ausgeführt, über welche ich kurz berichten will, um mir ein weiteres Arbeiten auf diesem Gebiete, bei welchem jedoch die mikroskopischen Versuche für mich nicht sonderlich in Betracht kommen, zu ermöglichen.

Vor mehreren Jahren habe ich gezeigt,¹⁾ daß Pyridin nicht imstande ist, Hämatin zu Hämochromogen zu reduzieren. Es entsteht zwar bei der Pyridinwirkung ein dem Hämochromogen ähnliches, aber bei weitem nicht so intensives Spektrum, erst durch Zusatz eines Reduktionsmittels geht dieses Spektrum in das charakteristische Hämochromogenspektrum über. Diese Versuche hat Dr. Kalmus vor etwa einem Jahre hier bestätigt.

Die Versuche wurden in Eprovetten an der Luft, z. T. mit vorher ausgekochten Lösungen angestellt.

W. J. Dilling hat nun neuerlich unter seinen interessanten mikroskopischen Beobachtungen solche über Hämochromogenkrystalle mitgeteilt, die aus Schalfesjew-Hämatin durch Pyridinwirkung gewonnen waren; wemgleich die Krystalle ebenso wie das Hämochromogenspektrum erst nach verschiedenen langer Zeit auftraten (u. a. nach einer Woche), also jedenfalls keine glatte Reaktion vorliegt, so konnte doch an den Tatsachen nach den eingehenden Beschreibungen kaum gezweifelt werden.

Ich habe die gleichen Versuche in größerem Maßstabe durchgeführt. In einem Kolben *k*, der einen seitlichen Ansatz *b* trug, wurde in diesen Ansatz Hämatin resp. nach Schalfesjew-Küster umkrystallisiertes Hämin gegeben, in den Kolben selbst kam Pyridin (Merck puriss.). Der Kolben wurde hierauf bei *a* ausgezogen, mit einer Quecksilberpumpe unter gelindem Erwärmen sorgsam evakuiert, dann bei *a* abgeschmolzen. Bei der Lösung des Hämatins resp. Hämins trat keine Hämochromogenbildung ein, wohl aber beim Erwärmen der Lösung auf etwa 50°. Diese Reaktion ging rascher bei den Häminproben als bei dem verwendeten Hämatin, bei dem letzteren anscheinend nicht vollständig vor sich. Nachdem der Kolben auf-



¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXX, S. 133.

gesprengt worden war, verschwand an der Luft das Hämochromogenspektrum und konnte nicht wieder durch erneutes Auspumpen und Erwärmen erhalten werden.

Wie diese Reduktion — denn zweifellos liegt eine solche vor — zu erklären ist, weiß ich nicht; vermutet könnte allerdings werden, daß mit dem Pyridin geringe Mengen von reduzierenden Substanzen zugegeben waren, die durch die Reduktionswirkung zerstört worden sind. Ein Abbau des Hämatins tritt anscheinend nicht ein; wird die Pyridinlösung nach dem Luftzutritt mit einer entsprechenden Menge Hydrazinhydrat versetzt, so tritt prompt und rein das Hämochromogenspektrum auf.

Analoge Beobachtungen haben wir vor dem Erscheinen von Herrn Dillings Arbeit betreffend die Einwirkung von Piperidin auf Blutfarbstoff gemacht. Das durch Piperidin zuerst gebildete Hämochromogen wird auch bei beträchtlichem Überschuß von Piperidin durch den Luftsauerstoff oxydiert und beim ruhigen Stehen in verstöpselten Gefäßen trotz des Piperidinüberschusses nicht wieder zurückgebildet. Hier geht aber die Reaktion weiter und führt zu einer Eisenabspaltung unter Bildung gelbbrauner Produkte.

Bekanntlich hat schon Gamgee die Ansicht ausgesprochen, daß die Substanzen, welche durch Oxydation von Hämochromogen entstanden sind, nicht als Hämatin anzusehen seien. Da keine Analysen vorliegen, die Darstellung der Substanzen in größeren Mengen mehr Schwierigkeiten bietet, als ursprünglich vorauszusehen war, möchte ich dazu gegenwärtig nur bemerken, daß wir aus den Mutterlaugen, die durch Oxydation von Hämochromogen durch Luftsauerstoff erhalten waren, mit Pyridin und Hydrazinhydrat den größten Teil des Oxydationsproduktes wieder als Hämochromogen krystallinisch ausfällen konnten. Bei reinen Hämatinlösungen allerdings geht diese Fällung fast quantitativ, d. h. die über den Krystallen befindliche Flüssigkeit ist nur ganz minimal hellrot gefärbt. Schwefelammon und frisch bereitetes Kaliumsulfid als Reduktionsmittel gaben eine nicht so weitgehende Fällung, auch hat der Niederschlag nicht die prachtvoll reinrote Farbe, sondern einen etwas bräunlichen Farbenton. Es besteht also auch in bezug auf die Fällbarkeit

des Hämochromogens durch Pyridin ein Unterschied zwischen dem direkt aus Blutfarbstoff durch Lauge abgespaltenen und dem aus Hämin dargestellten Hämochromogen.

Zweifellos ist es möglich, wie Herr Dilling an mehreren Stellen seiner Arbeit betont, daß durch die Reagenzienwirkung verschiedene Substanzen, die als Hämochromogenarten zu bezeichnen sind, entstehen. Es scheint aber diese Frage noch komplizierter zu sein, als die der Einheit, resp. Verschiedenheit der Hämatine, denn durch verschiedene Reduktionsmittel mögen aus jedem einzelnen Hämatin optisch etwas differente Hämochromogene erhalten werden.

Ehe da nicht quantitative Bestimmungen vorliegen, wird es wohl besser sein, auf geringfügige optische Differenzen keine weitgehenden Schlüsse aufzubauen. Bisher kommt ja zur Charakterisierung von Hämochromogen nur die ungefähre Zusammensetzung, das auffallende optische Verhalten und die Oxydierbarkeit zu Körpern von Hämatinreaktionen, schließlich die Krystallisierbarkeit der Pyridinverbindungen, wie der von Dilling studierten Verbindungen mit anderen organischen Basen in Betracht.

Aber auch aus den Krystallformen weitere Schlüsse zu ziehen, erscheint verfrüht, da bei geringfügigen Änderungen der Versuchsbedingungen in bezug auf Temperatur und Konzentration verschiedene Krystallformen entstehen, wie E. Kalmus im hiesigen Laboratorium sich oftmals überzeugt hat.

Zur Darstellung größerer Mengen der krystallisierten Hämochromogenpyridinverbindungen dürfte die Eigenschaft des Hämochromogens wertvoll sein, aus wässerigen Pyridinlösungen durch hinreichenden Laugen- oder Salzzusatz mit dem Pyridin ausgesalzen zu werden. Über die Reinheit dieser Pyridinlösungen habe ich allerdings noch keine Erfahrungen.

Zur Orientierung über die Mengenverhältnisse, in welchen Pyridin mit Hämochromogen zusammentrifft, habe ich folgenden Versuch ausgeführt: Reines Hämatin (nach Schalfesjew) wurde in Pyridin gelöst, mit etwas Hydrazinhydrat versetzt, die Lösung wurde ausgepumpt, hierauf bei 50° im Vakuum der Quecksilberluftpumpe mehrere Stunden getrocknet. Nach dem Abkühlen wurde abgeschmolzen, das Gefäß gewogen, dann aufgesprengt und der Inhalt mit verdünnter Lauge gelöst. Das leere

Gefäß wurde wieder ausgepumpt und zurückgewogen. Das Gewicht der Substanz betrug 0,6743 g. Nach dem Öffnen des Gefäßes war absolut kein Pyridingeruch vorhanden, der rote Körper schien relativ beständig zu sein gegenüber der Luft. Nach dem Lösen in Lauge roch die Lösung deutlich nach Pyridin, sie wurde destilliert, das Destillat titriert. Die Titration gab auf Pyridin gerechnet 0,154 g. Der Destillationsrückstand wurde zur Eisenbestimmung verascht, gefunden wurden 0,0678 g Eisenoxyd, woraus sich auf Grund der Hämochromogenformel $C_{34}H_{34}NFeO_4$ eine Hämochromogenmenge von 0,5253 g berechnet; die Differenz 0,1490 g als Pyridin gerechnet, entspricht etwa 2.2 Mol. Pyridin für 1 Hämochromogen.

Dieser Versuch ist natürlich nur als Orientierungsversuch zu betrachten. Ich hoffe bald über genauere Versuche berichten zu können.

Eine viel umstrittene Frage ist jene betreffend Hoppe-Seylers Beobachtung, daß aus Hämoglobin und Kohlenoxydhämoglobin krystallisiertes Hämochromogen resp. Kohlenoxydhämochromogen erhalten werde. Ich habe die von Hoppe-Seyler beschriebene Versuchsanordnung mit Oxyhämoglobin- und Kohlenoxydhämoglobinlösung, und zwar mit verdünnten und konzentrierten (frisch filtrierten!) Blutfarbstofflösungen und verschieden konzentrierten Laugenlösungen (bis 14% Blutfarbstoff, bis 25% Kali- und Natronlauge) wiederholt, konnte aber, wenn nicht länger als zwei Stunden im Wasserbade erwärmt wurde, keine Krystalle beobachten. In der Hitze wie in der Kälte waren die Flüssigkeiten bis auf minimale Trübungen, die aber auch nur in einigen Proben auftraten, vollkommen klar und intensiv gefärbt.

Anders verhalten sich aber die Proben, wenn sie länger, ca. 6 Stunden und mehr, erwärmt wurden. Da kommt es zur Ausscheidung von viel Farbstoff, aber gleichzeitig schieden sich immer reichliche Mengen flockiger, weniger gefärbter Niederschläge ab. Bei Verwendung konzentrierterer Blutfarbstofflösungen und konzentrierterer Laugen erstarrt schließlich die ganze Flüssigkeit zu einer Gallerte, welche, an der Wand des zugeschmolzenen Rohres heruntergeschüttelt, eine intensiv gefärbte Lösung von den charakteristischen Spektralerscheinungen des Hämochromogens, resp. Kohlenoxydhämochromogens zeigte.

Hämin mit 25%iger Lauge und etwas Hydrazinhydrat oder frisch bereitetem Schwefelkalium oder Schwefelammonium nach dem Auspumpen vor der Quecksilberluftpumpe oder im

Kohlenoxydstrome, auf dem Wasserbade erwärmt, gab im Gegensatz zwar eine Veränderung seiner Farbe und die erwarteten charakteristischen Spektralerscheinungen, jedoch ging von dem Farbstoff nichts in Lösung.

Wahrscheinlich sind auch diese Erscheinungen auf die verschiedene Konstitution des direkt aus Blutfarbstoff abgespaltenen und des über Hämin resp. Hämatin gewonnenen Hämochromogens zurückzuführen.¹⁾

¹⁾ Vgl. R. von Zeynek, Verh. der deutschen Naturf. u. Ärzte, 1910, Bd. II, 1, S. 83, Vortrag geh. in Salzburg: Über die Abspaltung der prosthet. Gruppe bei Chromoproteiden.