

# Untersuchungen über das Blut der Ascidien.

## II. Mitteilung.

Von

**M. Henze.**

---

(Aus der chemisch-physiologischen Abteilung der zoologischen Station zu Neapel.)  
(Der Redaktion zugegangen am 27. April 1912.)

---

### I. Die freie Schwefelsäure der Blutkörperchen.

Die erste Mitteilung<sup>1)</sup> behandelte das Chromogen der Blutkörperchen von *Phallusia mamillata*, das als eine organische Vanadiumverbindung erkannt wurde. Gleichzeitig war auf die auffallend stark saure Reaktion des Blutkörpercheninhalts aufmerksam gemacht worden, mit der offenbar die Funktion der Vanadverbindung in Zusammenhang steht. Irrtümlicherweise wurde damals nicht nur dem Inhalt der Blutkörperchen, sondern auch dem Blut an und für sich saure Reaktion zugeschrieben. Genauere Beobachtungen haben gezeigt, daß diese Angabe falsch war. Trennt man das Plasma durch scharfes Zentrifugieren so vollständig als möglich von den Blutkörperchen, so rötet dasselbe Lackmus nicht mehr, vielmehr gibt es eine neutrale oder fast neutrale, mit dem Seewasser übereinstimmende Reaktion.

Auf jeden Fall bleibt die Tatsache bestehen, daß in einem neutralen Plasma Blutkörperchen mit stark saurem Inhalt schweben. Es hat sich nunmehr herausgestellt, daß die saure Reaktion der Blutkörperchen durch die Gegenwart freier Schwefelsäure bedingt ist. Die Blutkörperchen enthalten freie Schwefelsäure in der erstaunlich hohen Konzentration von ca. 3%, eine Konzentration, die also in Stärke die Salzsäure des Magensafts erheblich übertrifft.

---

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 72, S. 494.

Bei der Plasmolyse der Blutkörperchen mit destilliertem Wasser (cf. I. Mitteilung) tritt das Chromogen, d. i. die organische Vanadiumverbindung in löslicher Form aus. Nach Abzentrifugieren der Stromata erhält man eine klare tiefbraune, stark sauer reagierende Flüssigkeit, aus der früher das Chromogen durch Aceton ausgefällt worden war. Dasselbe läßt sich ebenso und zwar quantitativ durch genaues Neutralisieren der braunen Lösung erreichen. Beim Neutralpunkt, der durch Tüpfelproben auf empfindliches Lackmuspapier festgestellt wurde, fällt die Vanadverbindung aus und die überstehende Flüssigkeit wird völlig farblos. Man trennt das Chromogen durch Zentrifugieren ab und wäscht es gut mit Wasser aus. Die Waschwässer werden mit der ursprünglichen Flüssigkeit vereint.

Quantitative Bestimmungen ergaben nun, daß in dieser Flüssigkeit der Quotient  $\frac{\text{SO}_3}{\text{Cl}}$  nicht weniger als 2,5 beträgt, daß mit anderen Worten der Schwefelsäuregehalt gegenüber dem Chlorgehalt ca. 20mal größer ist als im Seewasser.

Die verschiedenen Basen und Säuren der im Seewasser vorhandenen Salze stehen bekanntlich in einem ganz konstanten Verhältnis zueinander. Nach den Untersuchungen Dittmars (Rep. of Challenger Expedition, Vol. I, 138) stellt sich dasselbe folgendermaßen dar:

Cl	Br	SO <sub>3</sub>	CO <sub>2</sub>	CaO
99,848	0,3402	11,576	0,2742	3,026
	MgO	K <sub>2</sub> O	Na <sub>2</sub> O	
	11,212	2,405	74,462.	

Im Seewasser beträgt demnach der Quotient  $\frac{\text{SO}_3}{\text{Cl}} = 0,1158$ , wobei das Brom durch die äquivalente Menge Chlor ersetzt zu denken ist. Eine Bestimmung für das Wasser des Aquariums der zoologischen Station ergab  $\frac{\text{SO}_3}{\text{Cl}} = 0,1171$ .

Nach Feststellung dieser Tatsache wurde in der sogenannten «braunen Flüssigkeit» titrimetrisch die zu ihrer Neutralisation nötige Menge  $\frac{n}{10}$ -NaOH bestimmt; gleichzeitig aber

neben dem Chlorgehalt auch der Schwefelsäuregehalt gewichtsanalytisch ermittelt. Als Resultat ergab sich eine völlige Übereinstimmung der aus der Titrationsalkalinität berechneten  $\text{SO}_3$  mit der direkt bestimmten  $\text{SO}_3$ .

1. 5 Tiere gaben ca. 60 ccm Blut. «Braune Lösung» verbraucht zur Neutralisation 11,60 ccm  $\frac{n}{10}$ -NaOH entsprechend 0,0464 g  $\text{SO}_3$ . Gesamt-Cl- und  $\text{SO}_3$ -Gehalt der braunen Flüssigkeit:

Gefunden:  $\text{AgCl} = 0,0878 \text{ g} = 0,0217 \text{ g Cl}$  entsprechend 0,0013 g  $\text{SO}_3$ .<sup>1)</sup>

Gefunden:  $\text{BaSO}_4 = 0,1430 \text{ g} = 0,0491 \text{ g } \cdot \text{SO}_3$ .

0,0491 g  $\text{SO}_3$

— 0,0013

---

0,0478 g  $\text{SO}_3$  direkt gefunden,

0,0464 g  $\text{SO}_3$  durch Titration bestimmt.

2. Wie Versuch Nr. 1. Braune Lösung verbraucht zur Neutralisation 9,80 ccm  $\frac{n}{10}$ -NaOH entsprechend 0,0392 g  $\text{SO}_3$ . Gesamt-Cl- und  $\text{SO}_3$ -Gehalt der braunen Lösung:

Gefunden:  $\text{AgCl} = 0,0662 \text{ g} = 0,0163 \text{ g Cl}$  entsprechend 0,00095 g  $\text{SO}_3$ .

Gefunden:  $\text{BaSO}_4 = 0,1210 \text{ g} = 0,0416 \text{ g } \cdot \text{SO}_3$ .

0,0416 g  $\text{SO}_3$

— 0,0009

---

0,0407 g  $\text{SO}_3$  direkt gefunden,

0,0392 g  $\text{SO}_3$  durch Titration bestimmt.

3. Wie oben. Braune Flüssigkeit verbraucht zur Neu-

---

<sup>1)</sup> Im Plasma (cf. unten) beträgt der Quotient  $\frac{\text{SO}_3}{\text{Cl}} = 0,0056$ . Da beim Isolieren der Blutzellen sowohl an ihnen selbst als auch am Zentrifugengläse stets etwas Plasma hängen bleibt, wurde die in der «braunen Lösung» bestimmte Chlormenge als aus dem Plasma stammend angesehen und aus ihr mit Hilfe des obigen Quotienten  $\frac{\text{SO}_3}{\text{Cl}}$  die entsprechende  $\text{SO}_3$ -Menge berechnet und als Korrektion eingesetzt. Ob dies absolut richtig ist, steht dahin, denn wir wissen nicht, ob die Blutkörperchen wirklich ganz chlorfrei sind. Jedenfalls ist die Korrektion so geringfügig, daß selbst ohne dieselbe das Gesamtergebnis d. h. der Nachweis freier Schwefelsäure nicht beeinflusst werden würde.

tralisation 11,55 ccm  $n_{10}$ -NaOH entsprechend 0,0462 g  $\text{SO}_3$   
Gesamt-Cl- und  $\text{SO}_3$ -Gehalt der braunen Lösung:

Gefunden:  $\text{AgCl} = 0,0792 \text{ g} = 0,0196 \text{ g Cl}$  entsprechend  
0,0011 g  $\text{SO}_3$ .

Gefunden:  $\text{BaSO}_4 = 0,1318 \text{ g} = 0,0453 \text{ g SO}_3$ .

0,0453 g  $\text{SO}_3$

— 0,0011

---

0,0442 g  $\text{SO}_3$  direkt gefunden,

0,0462 g  $\text{SO}_3$  durch Titration bestimmt.

Es unterliegt somit keinem Zweifel, daß die in den Blutzellen auftretende Säure Schwefelsäure ist. Ergänzend sei bemerkt, daß weder in der «braunen Flüssigkeit» noch im Plasma organische Säuren oder Phosphorsäure nachzuweisen waren. Da auf ein Volumen von rund 2 ccm abzentrifugierter Blutkörperchen die zur Neutralisation erforderliche Menge  $n_{10}$ -NaOH im Durchschnitt etwa 12 ccm beträgt, handelt es sich in dem Zellsaft um eine ungefähre Schwefelsäurekonzentration von 3<sup>o</sup>/<sub>o</sub>.

## II. Die Salze des Blutplasmas verglichen mit denen des Seewassers.

Um möglicherweise einen Anhalt zu bekommen, wie die Anreicherung freier Schwefelsäure in den Blutzellen vor sich gehe, schien mir in erster Linie von Bedeutung, die Salzkonzentration und Salzverteilung des Blutplasmas mit der des äußeren Milieus, d. h. der des Seewassers zu vergleichen.

Der osmotische Druck, resp. der Gefrierpunkt des Plasmas stimmt mit dem des Seewassers überein (cf. auch I. Mitteilung). Es wurde gefunden:

Seewasser  $\Delta = 2,18^{\circ}$   
2,21<sup>o</sup>

Plasma  $\Delta = 2,12^{\circ}$   
2,16<sup>o</sup>.

Weiter wurde der Gesamtsalzgehalt bestimmt und zwar in Form der Sulfate. Gleiche Mengen von Plasma und Seewasser wurden in einer Platinschale unter Schwefelsäurezusatz eingedampft und der Rückstand nach erneutem Zusatz von etwas Schwefelsäure bis zur Gewichtskonstanz geglüht. Die Sulfate von Magnesium und Calcium können bei Alkalisulfatgegenwert ohne Bedenken geglüht werden. Umwandlung von  $\text{MgSO}_4$  in  $\text{MgO}$  findet dabei nicht statt. Vgl. Dittmar (Report of Chal-

lenger Exped.), dessen klassische Untersuchungen über die Zusammensetzung des Seewassers im folgenden stets als Grundlage benutzt wurden.

Es wurden stets 10 ccm der betreffenden Flüssigkeit benutzt.

Gesamtsulfate im Seewasser:	Gesamtsulfate im Plasma:
0,4562	0,4674
0,4574	0,4654
	0,4660.

Es wiegen: 50 ccm Plasma	50 ccm Seewasser	
51,3788 g	51,4166 g	bei 18°.

Der Gesamtsalzgehalt des Plasmas ist also ein wenig kleiner als der des Seewassers, worauf auch der Gefrierpunkt hindeutet.

Es ist bekannt, daß der osmotische Druck der Körperflüssigkeiten der Invertebraten mit dem ihres äußeren Milieus übereinstimmt. Das gleiche wird vom Salzgehalt angegeben, was jedoch, soweit mir bekannt, immer nur durch einfaches Eindampfen oder durch Chlortitrationen festgestellt worden ist. Es zeigte sich nun, daß bei Phallusia der Chlorgehalt des Plasmas nur wenig, aber immerhin merklich höher ist als im Seewasser. Dagegen war der Schwefelsäuregehalt des Plasmas nur etwa halb so groß als im Seewasser.

Am deutlichsten kommen die Verhältnisse zum Ausdruck, wenn wir den Quotienten  $\frac{SO_3}{Cl}$  in den drei uns interessierenden Flüssigkeiten nebeneinander stellen.

Der Quotient  $\frac{SO_3}{Cl}$  betrug:

in den Blutkörperchen	im Plasma	im Seewasser
2,55	0,0558	0,1171.

Der folgenden Zusammenstellung sind die absoluten Mengen von Cl und  $SO_3$  in Plasma und Seewasser, umgerechnet auf je 100 ccm Flüssigkeit, zu entnehmen:

	Plasma:		
	Cl	$SO_3$	$\frac{SO_3}{Cl}$
1.	2,2356	0,1362	0,0609
2.	2,2740	0,1264	0,0556
3.	2,2740	0,1266	0,0559.

## Seewasser:

Cl	SO <sub>3</sub>	$\frac{\text{SO}_3}{\text{Cl}}$
2,1732	0,2546	0,1171.

Analytische Belege: Die sehr geringe Menge Eiweiß des Plasmas wurde durch Alkohol bei schwach essigsaurer Reaktion unter Erhitzen entfernt. Der Niederschlag wurde sehr gut ausgewaschen und der Alkohol vertrieben.

1. 50 ccm Plasma enteiweißt und mit destilliertem Wasser auf 200 ccm gebracht. Davon 20 ccm (d. h. 5 ccm Plasma) zur Cl-Bestimmung und 150 ccm (d. h. 37,5 ccm Plasma) zur SO<sub>3</sub>-Bestimmung.

Gefunden: AgCl = 0,4520 = 0,1118 Cl

» BaSO<sub>4</sub> = 0,1488 = 0,0511 SO<sub>3</sub>.

2. Analog wie in Nr. 1.

Gefunden: AgCl = 0,4598 = 0,1137 Cl

» BaSO<sub>4</sub> = 0,1380 = 0,0474 SO<sub>3</sub>.

3. In 5 ccm Plasma: AgCl = 0,5318 = 0,1315 Cl

In 45 » » BaSO<sub>4</sub> = 0,1919 = 0,0659 SO<sub>3</sub>.

Daraus folgt  $\frac{\text{SO}_3}{\text{Cl}} = 0,0559$ , woraus indirekt der Wert von SO<sub>3</sub> unter Einsetzung von Cl = 1,1137 (vgl. Analyse Nr. 2) ausgerechnet wurde.

4. 50 ccm Seewasser auf 200 ccm verdünnt. Davon 20 ccm zur Cl-Bestimmung und 150 ccm zur SO<sub>3</sub>-Bestimmung.

Gefunden: AgCl = 0,4394 = 0,1087 Cl

AgCl = 0,4394 = 0,1087 Cl

» BaSO<sub>4</sub> = 0,1488 = 0,0511 SO<sub>3</sub>.

Die einzelnen Basen CaO, MgO und K<sub>2</sub>O fanden sich in folgenden Mengenverhältnissen im Plasma:<sup>1)</sup>

In 100 ccm Plasma wurden gefunden:

CaO = 1. 0,0650

2. 0,0666

Im Seewasser CaO = 0,0660

3. 0,0638

<sup>1)</sup> Direkte Bestimmungen des Natriums wurden nicht ausgeführt, da Dittmar (loc. cit.) die nach der gewöhnlichen Methodik ausgeführten Natriumanalysen im Seewasser nicht für präzise erachtet.

$$\text{MgO} = 1. 0,2414 (?)$$

$$2. 0,2310 \quad \text{Im Seewasser MgO} = 0,2322$$

$$3. 0,2288$$

$$\text{K}_2\text{O} = 4. 0,0562 \quad \text{Im Seewasser K}_2\text{O} = 0,0514.$$

Analytische Belege: Die Trennung von Ca und Mg wurde nach T. W. Richards (Treadwell, Lehrbuch der Analyt. Chem., S. 63) durchgeführt. Kalium wurde aus den in Sulfate umgewandelten Gesamtsalzen nach Finkner (Treadwell, S. 41) als  $\text{K}_2\text{PtCl}_6$  bei Gegenwart von Alkoholäther gefällt. Der resultierende Niederschlag wurde im Wasserstoffstrome geglüht, die Salze durch Auswaschen entfernt und aus dem zurückbleibenden Platin das Kalium berechnet (vgl. auch Dittmar in Challenger Rep.).

1. 50 ccm enteweißtes Plasma auf 200 ccm verdünnt, 170 ccm zur Ca-, Mg-Bestimmung:

$$\text{Gefunden: Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 = 0,2830 = 0,1026 \text{ MgO}$$

$$, \quad \text{CaO} = 0,0276.$$

2. 50 ccm enteweißtes Plasma auf 200 ccm verdünnt. 150 ccm zur Ca-, Mg-Bestimmung:

$$\text{Gefunden: Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 = 0,2390 = 0,0866 \text{ MgO}$$

$$, \quad \text{CaO} = 0,0250.$$

3. 60 ccm Plasma mit  $\text{H}_2\text{SO}_4$  abgeraucht. — Rückstand in 200 ccm Wasser gelöst. 115 ccm zur Ca-, Mg-Bestimmung:

$$\text{Gefunden: Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 = 0,2178 = 0,0790 \text{ MgO}$$

$$, \quad \text{CaO} = 0,0220.$$

4. Wie in Versuch Nr. 3. 75 ccm der Gesamtlösung zur K-Bestimmung.

$$\text{Gefunden: Pt} = 0,0263 = 0,0127 \text{ K}_2\text{O}.$$

Wir finden demnach in bezug auf die Mengenverhältnisse der Kationen kaum in Betracht kommende Abweichungen von denen des Seewassers. Dagegen differieren die Anionen nicht unbedeutend, indem etwa doppelt soviel Schwefelsäure im Seewasser vorhanden ist als im Plasma, während umgekehrt der Chlorgehalt des Plasmas ein wenig höher ist als im Seewasser. Hierzu kommt noch der auffallend geringe Kohlen-

säuregehalt des Plasmas, der schon Winterstein<sup>1)</sup> aufgefallen ist.

Ich halte es vor der Hand verfrüht, aus diesen Daten theoretische Folgerungen in bezug auf die Bildung der freien Schwefelsäure in den Blutzellen zu ziehen.

### III. Die chemische Zusammensetzung des Vanadiumchromogens.

Die Aufklärung der Konstitution der Vanadiumverbindung dürfte infolge Materialmangels großen Schwierigkeiten begegnen. Bisher war es möglich, folgende Beobachtungen zu machen.

Das Chromogen wurde für die Analyse aus der bei der Plasmolyse der Blutzellen erhaltenen «braunen Lösung» durch genaues Ausfällen mit  $n_{10}$ -NaOH dargestellt (vgl. 1. Abschnitt). Dabei findet gleichzeitig eine Sauerstoffaufnahme statt, wie im 4. Abschnitt ausführlich angegeben ist. Das flockig gefällte Chromogen wird abzentrifugiert und mehrfach mit Wasser, Alkohol und Äther gewaschen. Getrocknet bildet es ein tief schwarzblaues Pulver. Es wurden zwei Analysen ausgeführt, und zwar nach Messingers Verfahren, um Material zu sparen, sodaß gleichzeitig eine C- und N-Bestimmung resultierte. Die Substanz wurde bei 100<sup>o</sup> getrocknet.

1. 0,2754 g Substanz lieferten 0,4335 g CO<sub>2</sub>.

Aus der im Zersetzungskolben zurückbleibenden Flüssigkeit wurde der Ammoniak nach Zusatz von Lauge abdestilliert. Zur Neutralisation verbraucht 17,00  $n_{10}$ -HCl.

2. 0,2044 g Substanz lieferten 0,3126 g CO<sub>2</sub>.

Zur Neutralisation des Ammoniaks verbraucht 11,89 ccm  $n_{10}$ -HCl.

Gefunden: 1. C = 42,93%    N = 8,64%

»        2. C = 41,71%    N = 8,14%

Der Vanadiumgehalt des Chromogens wurde in folgender Weise bestimmt: Bei Behandlung des Chromogens mit verdünnter Schwefelsäure und schwefliger Säure wird das Vanadium quantitativ unter Entfärbung der Substanz abgespalten. Der

<sup>1)</sup> H. Winterstein, Zur Kenntnis der Blutgase wirbelloser Seetiere. Biochem. Zeitschr., Bd. 19, S. 384.

unlösliche Anteil wurde abzentrifugiert und völlig ausgewaschen. Er diente z. T. zur Untersuchung auf Purinbasen (vgl. nächsten Abschnitt). Die schwefelsaure Lösung samt den Waschwässern enthält alles Vanadium, jedoch mit etwas organischem Material verunreinigt. Sie wurde deshalb zur Trockene verdampft und mit Salpetersäure abgeraucht. Der Rückstand wurde in HCl gelöst und letztere nach Schwefelsäurezusatz wieder völlig vertrieben. Diese schwefelsaure Vanadsalzlösung wird nunmehr in der Hitze durch Einleiten von schwefliger Säure zu  $Vd_2O_4$ -Salz reduziert, bis sie rein blau erscheint (vgl. Treadwell, Lehrbuch der Analyt. Chem., S. 489). Hierauf wird der Überschuß an schwefliger Säure durch Kochen und Einleiten von Kohlensäure vertrieben und die Flüssigkeit mit  $n/10$ -Kaliumpermanganat in der Hitze titriert. 1000 ccm  $n/10$ -Permanganat entsprechen 9,12 g  $Vd_2O_5$ . Angewandt: 0,5742 g Chromogen.

Titer der Permanganatlösung: 10 ccm = 11,45 ccm  $n/10$ -Permanganatlösung. Verbraucht 10,20 ccm = 11,68 ccm  $n/10$ -P.M.

Gefunden: 18,50%  $Vd_2O_5$  = 10,36% Vd.

Eine zweite Analyse gab nur einen Gehalt von 15,4%  $Vd_2O_5$ , doch glaube ich, daß dieselbe weniger Zutrauen verdient. Das Chromogen war zur Purinbasenbestimmung direkt mit 10%iger Schwefelsäure zersetzt worden. Bei der daran anschließenden Barytfällung wird das Vanadium auch gefällt, doch scheint diese Fällung — und darin liegt vielleicht der Fehler — nicht ganz quantitativ zu sein. Der Barytniederschlag wurde hierauf erschöpfend mit Schwefelsäure ausgezogen und die Schwefelsäurelösung nach der Zerstörung aller noch vorhandenen organischen Beimengungen wie oben behandelt.

Angewandte Substanz 0,2300 g.

Zur Titration verbraucht: 3,4 ccm Permanganat = 3,89 ccm  $n/10$ -P.M.

Gefunden: 15,4%  $Vd_2O_5$  = 8,62% Vd.

Das Chromogen ist nicht dialysabel. Bei der Dialyse der «braunen Flüssigkeit» fällt das Chromogen im oxydierten, blaugefärbten Zustande im Dialysierschlauch aus, während die Schwefelsäure ins Außenwasser übergeht.

Beim trockenen Erhitzen des Chromogens erhält man starke Pyrrolreaktion. Nachweis durch die Fichtenspanreaktion. Purinbasen nehmen nicht am Aufbau des Moleküls teil. Vgl. 4. Abschnitt.

Das Chromogen liefert fast alle für die Eiweißkörper charakteristischen Reaktionen. Dieselben wurden mit der genuine Chromogenlösung, d. h. der «braunen Flüssigkeit» an- gestellt.

Beim Erhitzen derselben erhält man eine nur unvollständige braune Ausflockung. Wahrscheinlich ist die Lösung zu stark sauer. Alkohol und Aceton fällen, besonders beim Erwärmen, unoxydiertes Chromogen (cf. 4. Abschnitt).

Sättigung mit  $MgSO_4$  oder  $Na_2SO_4$  bewirkt Ausflockung. Ferner erhält man flockige Ausfällungen mit kolloidaler Eisen- lösung, mit Eisenchlorid beim Erwärmen, mit Jodquecksilber- Jodkalium, Sublimat, Phosphorwolframsäure, Millons Reagens (bräunlicher Niederschlag). Konzentrierte  $HNO_3$  färbt gelb beim Kochen.

Alles deutet darauf hin, daß dem Chromogen ein komplizierter Aufbau zukommt und man es mit einem eiweiß- artigen Körper zu tun hat, mit dem das Vanadium in Form seiner Trioxydstufe, wie im folgenden Abschnitt ausführlich dar- gelegt ist, verkettet ist.

#### IV. Die Oxydationsstufe des Vanadiums

In der I. Mitteilung wurde die Andeutung gemacht, das Vanadium könne in Anbetracht der chemischen Verwandtschaft zwischen Phosphorsäure und Vanadinsäure möglicherweise in dem Chromogen als Vanadinsäure gebunden sein und das Chromogen damit Beziehung zur Nucleinsäure haben. Diese Vermutung hat sich nicht bestätigt, da es in keinem Fall gelang, Purinbasen bei der Hydrolyse des Chromogens nachzu- weisen.

Das Chromogen (es wurden 3 verschiedene Versuche ge- macht) wurde durch 12stündiges Kochen mit 10%iger Schwefel- säure zersetzt und in der Zersetzungsflüssigkeit nach der Methode

von Burian und Walker Hall<sup>1)</sup> auf Purinbasen gefahndet. Das Resultat war völlig negativ.<sup>2)</sup> Damit war auch das Auftreten des Vanadiums als Vanadinsäure zweifelhaft geworden. Im Gegenteil, es konnte festgestellt werden, daß in dem genuinen Chromogen das Vanadium in Form einer niederen Oxydationsstufe, d. h. so gut wie sicher in der Form der  $Vd_2O_3$ -Stufe gebunden ist, durch Oxydationsmittel aber, ohne abgespalten zu werden in die  $Vd_2O_4$ -Stufe übergeht. Damit stimmen auch die Farbtöne des Chromogens überein.  $Vd_2O_3$ -Verbindungen sind unter gewissen Umständen, z. B. wenn saure Lösungen mit Zn nahezu neutralisiert werden, chokoladenbraun;  $Vd_2O_4$ -Verbindungen sind blau gefärbt.

Die genuine braune Chromogenlösung ist aus folgenden Gründen als Vanadtrioxydverbindung aufzufassen:

Alle Oxydationsmittel verändern die «braune Lösung» so, daß dieselbe über schmutziggrün in grünblau und schließlich in tiefblau übergeht, wobei in den meisten Fällen das Chromogen denaturiert (?), d. h. ausgefällt wird. Beim Zusatz stärkerer Oxydationsmittel wie  $H_2O_2$  muß man sehr vorsichtig verfahren, da ein Überschuß vollständige Entfärbung herbeiführt, wahrscheinlich unter Abspaltung des Vanadiums und Überführung desselben in Vanadinsäure.

Diese unter Oxydation verlaufenden Farbenänderungen treten ein mit sehr verdünnten Lösungen von Wasserstoffperoxyd,  $KClO_3$ ,  $KMnO_4$ ,  $K_2Cr_2O_7$ . Bei letzteren beiden ist der Farbumschlag so scharf, daß man möglicherweise eine titrimetrische Bestimmung des Chromogens darauf gründen könnte. Eisenoxydsalze wirken ebenso, im Gegensatz zu Eisenoxydulsalzen, die keine Veränderungen bewirken.

In der I. Mitteilung wurde angegeben, daß das Chromogen

---

<sup>1)</sup> Burian und Walker Hall, Die Bestimmung der Purinstoffe in tierischen Organen mittels der Methode des korrigierten Wertes. Diese Zeitschrift, Bd. 38, S. 336.

<sup>2)</sup> Wurde die bei der Plasmolyse der Blutkörperchen zurückbleibende und abzentrifugierte Substanz (Stromata) nach dieser Methode auf Purinkörper geprüft, so erhielt man stets reichlich Purinbasen-Silberniederschläge.

immer durch Aceton aus der «braunen Lösung» als blauer Niederschlag ausgefällt worden sei, und ich meinte, daß mit diesem Farbumschlag gleichzeitig eine Reduktion durch organische Verbindungen verbunden sein könne. Diese Annahme stand im Widerspruch mit den obigen Beobachtungen, umsomehr als sich zeigte, daß z. B. Traubenzucker die «braune Lösung» völlig unverändert läßt. Die Vermutung lag daher nahe, daß das verwandte Aceton gerade umgekehrt vielleicht oxydierend wirkende (peroxydähnliche) Verunreinigungen enthalten hätte. Dies war in der Tat der Fall. Benutzt man Aceton, welches vorher durch Destillation über  $\text{KMnO}_4$  und über  $\text{K}_2\text{CO}_3$  gereinigt ist, so fällt dasselbe das Chromogen in der Oxydulstufe in braunen, Eisenhydroxyd ähnelnden Flocken aus. Genau so verhält sich gereinigter und ungereinigter Äther; so wie auch Terpentinöl, das infolge seiner ozoniden Eigenschaften Blaufärbung bewirkt. Reiner Alkohol fällt übrigens auch die rostbraune Oxydulverbindung aus.

In der sauren genuinen Chromogenlösung erfolgt der Übergang der Oxydulstufe in die höhere Oxydationsstufe von selbst nur äußerst langsam. Erst nach vielständigem Stehen sind beginnende Anzeichen dafür zu bemerken und selbst Durchleiten von Sauerstoff bedingt keine merkbar schnellere Veränderung. Dagegen tritt eine fast momentane Selbstoxydation ein, sowie man den Säuregrad der Lösung herabsetzt, resp. dieselbe eben alkalisch macht. Bei der Darstellung des Chromogens durch Neutralisation der «braunen Lösung» findet daher stets auch eine Überführung der braungefärbten Oxydulstufe in die blaugefärbte Oxydstufe statt.

Diese Sauerstoffaufnahme läßt sich auch messend verfolgen. Bringt man die «braune Lösung» in eine Gasbürette über Quecksilber und fügt eine gemessene Menge Sauerstoff zu, so beobachtet man, sobald eine Spur einer verdünnten Natriumcarbonatlösung zugefügt worden ist, eine deutliche Verminderung des Sauerstoffvolumens. Nach einer ungefähren quantitativen Schätzung des Chromogens zu urteilen, scheint pro Atom Vanadium 1 Atom Sauerstoff aufgenommen zu werden.

Es erklärte sich nunmehr auch, warum die genuine Chro-

mogenlösung allein gar nicht sauerstoffübertragend wirkte, während bei Gegenwart von etwas chlorsaurem Kalium sich die verschiedensten darauf geprüften organischen Verbindungen oxydieren ließen. Erwähnt sei nur die Überführung von Anilin in Anilinschwarz, von Hydrochinon in Chinon, sowie von anderen Aminen und Phenolen in die entsprechenden Oxydationsprodukte.

Jodkalium-Stärkelösungen werden durch die «braune Lösung» nicht verändert. Fügt man aber etwas Sodalösung zu und säuert dann sofort wieder schwach an, so erhält man unmittelbar die stärkste Jodausscheidung. — Die Oxydation des Jodwasserstoffs durch ganz verdünnte Wasserstoffperoxydlösungen wird durch das Chromogen ganz bedeutend beschleunigt.

Es wurde ferner beobachtet, daß die genuine Chromogenlösung organische Farbstoffe, wie Indigo, Lackmus, Methylenblau, stark bleicht. Anfangs wurde dies auf eine oxydative Zerstörung der Farbstoffe zurückgeführt. Wir haben es jedoch vielmehr mit einer Reduktion unter Bildung von Leukobasen zu tun. Es ist bekannt, daß auch anorganische Vanadoxydulverbindungen Farbstoffe unter Reduktion bleichen.

Die schwarzblauen Farbtöne und Ausfällungen, welche Tannin, Pyrogallol usw. mit dem Chromogen liefern und die ebenso von der Vanadsäure geliefert werden, wurden in der ersten Mitteilung als Stütze für die Vanadsäurestufe des Chromogens angesehen. Wie in der Literatur gefunden wurde, treten dieselben ebenso ein mit Verbindungen der  $Vd_2O_4$ -Stufe, sodaß auch diese vermeintliche Stütze für die Vanadsäureform des Chromogens hinfällig wird.

#### V. Die Bedeutung des Chromogens.

Das Blutchromogen der Ascidien hat zweifellos nicht die den bekannten Blutfarbstoffen (Hämoglobin, Hämocyanin und Hämoerythrin) zukommende Funktion zu erfüllen, die wir als respiratorische Farbstoffe im eigentlichen Sinne bezeichnen. Schon Winterstein<sup>1)</sup> war es nicht gelungen, im luftgesättigten Blute von Phallusia auspumpbaren Sauerstoff nachzuweisen. Wie

<sup>1)</sup> H. Winterstein, Zur Kenntnis der Blutgase wirbelloser Seetiere. Biochem. Zeitschr., Bd. 19, S. 384.

gezeigt wurde, nimmt auch das isolierte Chromogen keinen Sauerstoff in additioneller und leicht dissoziierbarer Form auf.

Wenn sonach bei den Ascidien kein Blutfarbstoff gefunden werden konnte, der sozusagen als Sauerstoffvehikel dient, so scheint dagegen alle Berechtigung vorzuliegen, dieses Chromogen als einen Katalysator und zwar speziell als Sauerstoffüberträger aufzufassen, der die Natur eines Pseudoautoxydators im Sinne Englers<sup>1)</sup> hat. Das Vanadiumchromogen gleicht den ungesättigten Metallverbindungen, z. B. den Ferroverbindungen (Manchot).<sup>2)</sup> Wir sahen ja, daß auch bei ihm die metallische Komponente, das Vanadium, in der ungesättigten Oxydationsstufe gebunden ist.<sup>3)</sup>

Damit erklärt sich auch die Gegenwart der freien Schwefelsäure, in dem das Chromogen in den Blutzellen gelöst ist. Das stark saure Milieu verhindert offenbar eine Selbstoxydation und damit Vernichtung der katalytischen Eigenschaften des Chromogens.

Es sei erlaubt, daran noch eine weitere hypothetische Annahme zu knüpfen. Möglicherweise spielen sich die für die Lebensprozesse wichtigen Oxydationen nur an der trennenden Zellwand der Blutzellen ab und zwar in dem Moment, in dem die saure Chromogenlösung unter gewissen Bedingungen, die die Durchlässigkeit der Zellmembran verändern, mit dem hydroxylhaltigen Plasma und den darin gelösten und zu oxydierenden Stoffen in Kontakt kommt.

---

<sup>1)</sup> Engler und Weissberg, Kritische Studien über die Vorgänge der Autooxydation. Vieweg u. Sohn, 1904.

<sup>2)</sup> Zeitschrift f. anorganische Chem., Bd. 27, S. 404 u. 420.

<sup>3)</sup> Nach den neuen Anschauungen (Manchot, Über die Wertigkeit des Metalls in den Blutfarbstoffen und die Bestimmung ihres Gasbindungsvermögens. Diese Zeitschrift, Bd. 70, S. 230) ist im Hämoglobin das Eisen und auch im Hämocyanin das Kupfer in der Oxydstufe gebunden. Das spricht gleichfalls für die Differenz in der Funktion dieser Blutfarbstoffe und der des Vanadiumchromogens.