

Weitere Mittheilungen über die Eigenschaften des Blutfarbstoffs von F. Hoppe-Seyler.

(Fortsetzung von Bd. I, Heft 3, S. 139 dieser Zeitschrift.)

6. Das Oxyhämoglobin des Pferdeblutes.

Aus dem Blute von Pferden erhält man bekanntlich sehr leicht grosse Quantitäten krystallisirtes Oxyhämoglobin. Das Verfahren, welches ich in meinem Handbuche der physiol. chem. Analyse 4. Aufl. S. 251 für Hundeblood u. s. w. angegeben habe, ist ganz geeignet, um auch aus Pferdeblut den krystallisirten Farbstoff zu gewinnen. Mehrmaliges Umkrystallisiren gelingt bei Lufttemperaturen unter 0° sehr gut. Die Krystalle sind in Wasser etwas leichter löslich als die des Hundebloodes, viel schwerer löslich als die des Gänseblutes. Ich habe aber weder die Löslichkeit noch den Krystallwassergehalt näher bestimmt, da es scheint, als gebe es zweierlei Art von Krystallen, die sich durch den Gehalt an Krystallwasser unterscheiden werden. Es wurden nämlich mehrmals makroskopische bis über 5 mm. lange und 1 mm. dicke Prismen erhalten, welche bei der Behandlung mit einer Mischung von 4 Vol. Wasser und 1 Vol. Alkohol bei oder unter 0° bald verschwanden, indem sich zugleich eine entsprechende, anscheinend viel grössere Quantität zarter hellrother mikroskopischer Krystalle ausbildete. Zuweilen habe ich beide Arten von Krystallen in derselben Flüssigkeit neben einander gefunden.

Das Hämoglobin des Pferdeblutes krystallisirt so wenig als das einer andern Blutart.

Mehrmals umkrystallisirtes Oxyhämoglobin aus Pferdeblut mit der Luftpumpe bei und unter 0° getrocknet, wurde auf meinen Wunsch von Hrn. Dr. Kossel, Assistenten am

physiologisch-chemischen Institute, analysirt und folgende Werthe erhalten:

	I.	II.	III.	IV.	V.	VI.	VII.	VIII.	IX.	X.	Mittel.
C	55,95	54,96	54,87	54,58	—	—	—	—	—	—	54,87.
H	7,07	6,96	6,98	6,86	—	—	—	—	—	—	6,97.
N	—	—	—	—	17,51	17,27	17,15	—	—	—	17,31.
S	—	—	—	—	—	—	—	0,665	0,637	—	0,65.
Fe	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0,47	0,47.

Da die Stickstoffwerthe, welche bei der Verbrennung nach Dumas mit Kupferoxyd erhalten sind, viel höher ausfallen als in den früher von mir analysirten Oxyhämoglobinen vom Hunde, Meerschweinchen, Gans, Eichhorn, deren Stickstoffgehalt nach Will Varentrapp's Methode ermittelt war, wird eine Wiederholung der Analyse der letzteren nach der volumetrischen Methode erforderlich sein.

7. Die Zusammensetzung des Methämoglobin und seine Umwandlung zu Oxyhämoglobin.

Die Zusammensetzung des Methämoglobins und seine Stellung zu den Farbstoffen des arteriellen und des venösen Blutes hatten sich bis jetzt nicht sicher feststellen lassen. Als ich den Körper zuerst unterschied, ihn benannte und seine Bildung durch Ozon u. s. w. beobachtete, musste ich es zweifelhaft lassen, ob ein besonderer chemischer Körper oder ein Gemenge von löslichem Albuminstoff und Haematin vorlag. In mehreren anderen Arbeiten ist dann das Methämoglobin als ein Hyperoxyd des Hämoglobins bezeichnet, ohne dass meines Wissens andere Gründe für diese Ansicht aufgeführt sind, als seine Bildung durch oxydirende Substanzen.

Im Kohlenstoff-, Wasserstoff- und Stickstoffgehalt weicht die Zusammensetzung des Methämoglobins nach einigen von mir ausgeführten Bestimmungen nicht erkennbar vom Oxyhämoglobin ab, dies war auch bei der bedeutenden Grösse des Molekuls dieser Stoffe nicht anders zu erwarten; ein Atom Sauerstoff mehr oder weniger würde durch die Analyse nicht erkannt werden können, der Unterschied würde in den Fehlergrenzen liegen.

Behandelt man eine Lösung, welche viel Methämoglobin

und etwas Oxyhämoglobin enthält, mehrere Stunden lang mit einem Wasserstoffstrom und fügt dann getrennt davon durch Wasserstoffstrom von Sauerstoff befreite Kalilauge hinzu (in dem von mir früher beschriebenen Kugelapparat)¹⁾. so erhält man sowohl Hämatin als auch Hämochromogen. Dieser Versuch ist aber nicht entscheidend, weil, freilich langsam, aber schliesslich vollständig bei längerem Stehen das Hämatin in Hämochromogen übergeht. Die Kalilauge zersetzt den abgespaltenen Eiweisskörper, bildet SKH und andere reducirende Stoffe, welche das Hämatin reduciren. Es könnte also nicht sicher ausgeschlossen werden, dass gleich von vornherein ein kleiner Theil reducirt würde. Entscheidender ist das Verhalten im Recipienten der Quecksilberpumpe.

Bringt man eine frischbereitete reine Oxyhämoglobinlösung in diesen Recipienten und evacuirt, so dass der grösste Theil des locker gebundenen Sauerstoffs entfernt wird, und lässt dann bei warmer Stubentemperatur stehen, so bildet sich in der Flüssigkeit Methämoglobin neben Hämoglobin. Will man das Methämoglobin als Hyperoxyd ansehen, so muss man annehmen, dass ein Theil des noch nicht dissociirten Oxyhämoglobin vom andern Theil desselben den Sauerstoff sich aneignete, um ein Hyperoxyd zu bilden. Es braucht nicht hervorgehoben zu werden, wie unwahrscheinlich dies ist.

Vollkommen beweisend ist aber ein Versuch mit Palladiumwasserstoff, den ich mehrmals und stets mit den gleichen Resultaten angestellt habe. Bringt man in eine verdünnte Lösung von Oxyhämoglobin in einer ganz damit gefüllten Flasche ein mit Wasserstoff stark beladenes Palladiumblech, so bildet sich sehr schnell Methämoglobin und der ganze Farbstoff wird allmählig in Methämoglobin umgewandelt, wenn die Menge des Farbstoffs nicht relativ zu gross ist; Hämoglobin habe ich daneben zunächst nicht entstehen gesehen. Da bei diesem Versuche der Wasserstoff einen Theil des Sauerstoffs zur Wasserbildung verbraucht, ist ersichtlich, dass das Methämoglobin nicht mehr, sondern weniger Sauerstoff enthält als Oxyhämoglobin. Die Entstehung des Methämo-

¹⁾ Med.-chem. Untersuchungen. Tübingen Heft 4 S. 541.

globins ist hier unzweifelhaft in der Weise aufzufassen, dass der active Wasserstoff der Lösung absorbirten Sauerstoff entzieht, Wasser bildet und nun durch den activ gemachten Sauerstoff den Blutfarbstoff in Methämoglobin verwandelt. Das Oxyhämoglobinmolecul liefert 1 Mol. O_2 und dies reicht hin, um 2 H Atome zu oxydiren und ausserdem noch das Molecul in Methämoglobin zu verwandeln.

Es geht aus diesem Versuche hervor, dass das Methämoglobin kein Hyperoxyd sein kann, aber es könnte noch ein Gemenge eines löslichen Eiweissstoffes und Hämatin sein; die Spectralerscheinungen, welche die Methämoglobinlösungen zeigen, stimmen mit denen saurer Hämatinlösungen ziemlich gut überein.

Unterwirft man nun Methämoglobinlösungen, die aus Oxyhämoglobin des Hunde- oder Pferdeblutes bereitet sind, andauernder Fäulniss im zugeschmolzenen Glasrohre, so verschwindet bald der Absorptionsstreif im Roth bei der spectroscopischen Untersuchung und es entsteht Hämoglobin. Ist nach einigen Monaten die Umwandlung sicher vollkommen geschehen, so man kann aus der Lösung, wenn sie hinreichend concentrirt ist, sehr reichlich krystallisirtes Oxyhämoglobin gewinnen, indem man das Rohr unter 0° bis zur begonnenen Eisbildung abkühlt, dann öffnet und die Lösung schnell mit $\frac{1}{4}$ ihres Volumen stark abgekühlten Alkohol versetzt, umschüttelt und bei -7° bis -10° stehen lässt.

Es ist eine zuerst von Stokes beobachtete und nachher von mehreren Anderen geschilderte Erscheinung, dass Methämoglobinlösungen mit etwas Schwefelammonium oder anderen alkalischen reducirenden Flüssigkeiten versetzt die Spectralstreifen des Hämoglobin und nach Schütteln mit Luft die beiden Streifen des Oxyhämoglobin zeigen; die Erkennung der Spectralveränderungen konnte aber keinen genügenden Beweis geben, welche Umwandlungen hier erfolgten, es ist jedenfalls sehr schwierig, aus solchen Lösungen Oxyhämoglobin zu gewinnen. Durch Fäulniss gelingt die Reduction, und der Darstellung steht nur das im Wege, dass bei Oeffnung der Röhre und Zutritt von Sauerstoff sofort wieder viel

Methämoglobin gebildet wird, wenn nicht durch starke Abkühlung, Alkoholzusatz u. s. w. die Abscheidung des Oxyhämoglobin beeilt und die Einwirkung der Fäulniss und ihrer Producte möglichst gehindert wird.

Durch diese leichte Rückverwandlung in Hämoglobin unterscheidet sich Methämoglobin von Hämatin. Ich habe in dieser Richtung die Coagula untersucht, welche man aus Blutfarbstofflösung 1) beim Erhitzen auf 100°, 2) durch Ansäuern mit verdünnter Schwefelsäure und Erhitzen auf 80°, 3) durch Zusatz grösserer Quantität verdünnter Schwefelsäure und Erhitzen auf 80° erhält und ausserdem das Verhalten von 4) Hämin (salzsaurem Hämatin) und 5) das durch schwefelsäurehaltigen Alkohol abgetrennte, durch Ammoniak von der Schwefelsäure befreite Hämatin geprüft.

Durch Kochen allein oder vorheriges Ansäuern und Erhitzen auf dem Wasserbade dargestellte Coagula geben bei Einwirkung der Fäulniss baldige Reduction des Hämatin, so dass die spectroscopische Untersuchung im auffallenden Lichte die Absorptionsstreifen des Hämochromogen zeigt; daneben bildet sich eine mehr und mehr rothe Färbung der Lösung aus, welche den Absorptionsstreifen des Hämoglobin erkennen lässt. Aus einer solchen Lösung, welche durch Einwirkung der Fäulniss auf ein mittelst Ansäuern durch Schwefelsäure und Erhitzen auf 80° dargestelltes und gut ausgewaschenes Coagulum in gut verschlossener Flasche erhalten war, ist es mir gelungen, krystallisirtes Oxyhämoglobin wieder zu gewinnen. Da dies aber mit den mit stärkerem Säureüberschuss behandelten und von den Eiweissstoffen abgetrennten Hämatinportionen bis jetzt gar nicht gelungen ist, auch in den coagulirten Portionen, wo es gelang, nur ein Theil diese Umwandlung zeigte und weder Zusatz von faulem Fibrin, Eieralbumin, Serumalbumin, Krystallinsen das Hämochromogen löste, noch mit den Hämatin bei Anwesenheit von CaCO_3 eine Vereinigung ergab, so ist es mir jetzt das Wahrscheinlichste, dass die Rückbildung von Hämoglobin nicht aus Hämochromogen und Albuminstoff, sondern aus Methämoglobin geschehen war, welches auch beim starken Ansäuern

mit Schwefelsäure und Erhitzen auf 80° ebenso wie beim Kochen der neutralen Lösung zum Theil unzersetzt bleibt. Eine vorläufige Mittheilung von mir im letzten Hefte des ersten Bandes dieser Zeitschrift Seite 397 wird dementsprechend corrigirt werden müssen, wenn ich auch zur endgiltigen Entscheidung dieser Sache mit länger dauernden Versuchen noch beschäftigt bin.

Das Hämatin, einigermaßen rein dargestellt, wird durch reducirende Substanzen, wie Schwefelammonium, auch durch Fäulniß nicht leicht reducirt, während die coagulirten hämatinhaltigen Eiweisscoagula sehr bald umgewandelt werden. Bringt man Hämatinkristalle, in wenig Ammoniak gelöst, mit Schwefelammonium zusammen, so tritt keine Reduction ein; fügt man aber dann etwas gelösten Albuminstoff oder mehr Aetzammoniak hinzu, so tritt die Reduction ein; eine grosse Anzahl organischer Stoffe wirkt ebenso wie das Albumin. Durch die Fäulniß geht die Reduction sehr langsam vor sich.

Mag es nun später gelingen, aus Hämatin und Eiweissstoff Hämoglobin zu bilden oder nicht, jedenfalls ist die relativ geschwinde Umwandlung des Methämoglobin in Hämoglobin durch Reduction ein ganz charakteristisches Unterscheidungsmerkmal dieses Körpers vom Hämatin, welches durch Zusatz von Schwefelammonium zur Lösung sofort erkannt werden kann, denn Hämatinlösung gibt bei Gegenwart von Eiweissstoff Hämochromogen und Methämoglobin gibt Hämoglobin.

Methämoglobin ist nach den geschilderten Versuchen und meinen früher mitgetheilten Beobachtungen eine Verbindung, welche auch bei Abwesenheit von Sauerstoff durch Einwirkung von Säure oder Alkalien in Hämatin und einen Eiweissstoff gespalten wird, in welcher das Eisen sich im Oxydzustand befinden wird, während es im Hämochromogen, Hämoglobin und Oxyhämoglobin nachweisbar im Oxydulzustande enthalten ist. Wird durch irgend eine Einwirkung Oxyhämoglobin gespalten, so entsteht Hämochromogen, O₂ und Eiweissstoff. Das Hämochromogen ist wie Eisenoxydulhydrat, Indigoweiss und viele andere Stoffe im Stande das

Sauerstoffmolecul zu zerlegen und sich selbst oxydirend noch activen Sauerstoff zu bilden, welcher auch noch vorhandenes Oxyhämoglobin in Methämoglobin umwandeln kann. So ist es zu erklären, dass sich bei der Coagulation von Oxyhämoglobinlösung neben Hämatin Methämoglobin bildet, dass ferner bei der Spaltung des Oxyhämoglobins fette Säuren wie Ameisensäure und Buttersäure entstehen.