

# Über die Zersetzung des roten Blutfarbstoffs durch Trypsin.<sup>1)</sup>

von Prof. B. REINBOLD.

Um die chromophore Gruppe des roten Blutfarbstoffs in möglichst unverändertem Zustande gewinnen zu können, darf man zur Trennung derselben vom Globinanteil nur in ganz milder Weise eingreifen. v. Zeynek<sup>2)</sup> digerierte Hämoglobin mit Pepsin in schwach salzsaurer Lösung. Da das Globin dabei verdaut wurde, schied sich das freigewordene und in Säuren unlösliche Hämatin aus dem Gemische aus. Das so gewonnene Produkt wurde von v. Zeynek „Verdauungshämatin“ genannt und für diejenige Substanz gehalten, welche der chromophoren Gruppe des Blutfarbstoffs tatsächlich entspricht. Dieser Auffassung schloss sich auch Küster<sup>3)</sup> an. Seiner Auffassung nach soll jedoch das Verdauungshämatin die chromophore Gruppe des Methämoglobins darstellen, während derjenigen des Oxyhämoglobins ein von ihm Hämochromogenperoxyd genannter Körper entsprechen soll. Auf ähnlichem Wege haben noch Sollmann<sup>4)</sup> und Garzia<sup>5)</sup> Hämatin dargestellt.

Über die Zersetzung des Blutfarbstoffs durch Trypsin sind mir nur spärliche Angaben bekannt. F. Hoppe-Seyler teilte schon im Jahre 1877 die Beobachtung mit, dass das Oxyhämoglobin dem Pankreasferment gegenüber sich weniger resistent

---

<sup>1)</sup> Die Versuche sind noch im Jahre 1918 im physiologisch-chemischen Institut der kön. ung. Franz Josef Universität in Kolozsvár ausgeführt worden.

<sup>2)</sup> R. v. Zeynek. Zeitschr. f. physiol. Chemie. 30, 126 (1900).

<sup>3)</sup> W. Küster. Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch. 43, 370 (1910).

<sup>4)</sup> F. Sollmann Americ. Journ. Pharm 74, 275 (1902).

<sup>5)</sup> Fr. Garzia. Biochem. Zeitschr. 16, 277 (1909).

verhält, als das reduzierte Hämoglobin, ohne über den Gang der Zersetzung nähere Angaben zu machen.

In der Mitteilung von *Zeynek* über sein „Verdauungshämatin“ lesen wir die Bemerkung, dass ihm die Zerlegung des Blutfarbstoffs durch Trypsin nicht gelang. Es ist andererseits bekannt, dass ganz geringe Spuren von Blutserum die tryptische Verdauung der Eiweisskörper aufheben, resp. die Aktivierung des Trypsinogens verhindern.

Es konnte demnach angenommen werden, dass bei Anwesenheit von genügendem Sauerstoff beziehungsweise Verhinderung der sogenannten „Selbstreduktion“ des Blutfarbstoffs und nach vollkommener Entfernung des Blutserums nichts im Wege der tryptischen Zerlegung des Blutfarbstoffs stehen würde. Die bei ganz schwach alkalischer Reaktion verlaufende tryptische Verdauung dürfte die chromophore Gruppe besser schonen, als die Einwirkung der Pepsin-Salzsäure, während das Globin durch Trypsin eine weitergehende Zerlegung erleiden sollte. Es konnte somit erhofft werden, dass man durch die tryptische Verdauung des Blutfarbstoffs zu einem Hämatinpräparate gelangen konnte, welches der ursprünglichen chromophoren Gruppe des Blutfarbstoffs ebenso oder noch mehr entspricht als das „Verdauungshämatin“ von *v. Zeynek*.

In den vorliegenden Versuchen suchte ich folgende Fragen zu beantworten: Spielt der rote Blutfarbstoff bei der anti-tryptischen Wirkung des Blutes eine Rolle? Kann das Hämoglobin (Oxyhämoglobin, Methämoglobin) durch Trypsin unter Gewinnung von Hämatin zerlegt werden? Wie ist der Verlauf der tryptischen Verdauung des Blutfarbstoffs bei Luftzutritt und bei Luftabschluss?

In den zur Beantwortung der ersten Frage angestellten Versuchen wurde die tryptische Verdauung von reinem Kasein weder durch Lösungen rein dargestellter Hämoglobinpräparate noch durch Lösungen gut angewaschener Pferdeblutkörperchen oder einen wässerigen Auszug der Stromata irgendwie gehindert, während stark verdünntes frisches Blut eine starke Hemmung ausübte. Nach dieser Feststellung bestand allerdings noch die Möglichkeit, dass der Blutfarbstoff einen spezifischen Widerstand der Trypsinwirkung gegenüber leisten könnte.

Zur Schilderung des allgemeinen Verhaltens einer Blutfarbstofflösung bei der tryptischen Verdauung soll hier der Verlauf eines Vorversuches beschrieben werden.

Eine geringe Menge eines aus Pferdeblutkörperchen dargestellten trockenen kristallinen Oxyhämoglobinpräparates, welches wenig Methämoglobin enthielt, wurde mit 0.1 %-iger  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung aufgerührt, 3—4 Tage mit Trypsinglycerin bei 35—40 digeriert und das Absorptionsspektrum von Zeit zu Zeit beobachtet.

Anfangs zeigten sich zwei Streifen, welche demjenigen des Oxyhämoglobins resp. des alkalischen Methämoglobins entsprachen.

Man darf nämlich bei der Verwertung der einfachen Absorptionsspektren nicht vergessen, dass die Streifen des alkalischen Methämoglobins, wenn dieser Farbstoff in nicht zu grossen Mengen neben Oxyhämoglobin zugegen ist, durch die Streifen des letzteren verdeckt werden können. Ist die relative Menge des Methämoglobins grösser, so wird ihre Gegenwart sich durch einen Schatten vor dem ersten Streifen und durch die Trübung des hellen Raumes zwischen beiden Oxyhämoglobinstreifen dem geübten Auge verraten.

Vor diesen beiden Streifen trat im Verlaufe der Verdauung noch ein dritter — derjenige des „sauereren“ Methämoglobins — von Zeit zu Zeit im Roten auf und verschwand immer auf Zusatz ganz geringer Sodamengen. Die Reaktion des Gemisches blieb dabei gegen Lakmus stets alkalisch.

Im Laufe der Verdauung traten die Methämoglobinstreifen über die Oxyhämoglobinstreifen in Vordergrund, zugleich ist jedoch das ganze Absorptionsspektrum verwaschener geworden. Am vierten Tage des Versuches waren die Methämoglobinstreifen schon kaum zu beobachten. Auf vorsichtigen Essigsäurezusatz schied sich nun ein reichlicher dunkelbrauner Niederschlag aus, welcher beinahe sämtlichen Farbstoff der Lösung enthielt. Die von diesen durch Zentrifugieren befreite Flüssigkeit war hellbraun, im Absorptionsspektrum fehlten die charakteristischen Streifen, weiterer Säurezusatz oder Trichloroessigsäure erzeugten in ihr keinen weiteren Niederschlag.

Der in Wasser unlösliche, gründlich ausgewaschene

Niederschlag trocknete auf der Tonplatte in schwarzen Krusten, welche sich leicht zu einem rötlichbraunen Pulver zerreiben liessen. Die Substanz erwies sich als unlöslich in Wasser sowie in 95%-igem kaltem Alkohol, kaum löslich in heissem 95% Alkohol, löslich in Eisessig, Pyridin, pyridinhaltigem Wasser, Piperidin, wässriger verdünnter NaOH, —  $\text{NH}_4\text{OH}$  — Trimethylaminlösung, Kalkwasser. Kristallinisches Hämin konnte aus dem trockenen Pulver durch Erwärmen am Objektträger mit kochsalzhaltigem Eisessig nicht dargestellt werden. Eine Lösung in Eisessig lieferte beim Aufkochen unter Kochsalzzusatz graue, rosettenförmig geordnete Nadelchen. Mit salzsaurem Alkohol oder Aceton entstand ein häminartiger Niederschlag in etwas reichlicheren Mengen. Die Substanz ergab in verdünnter Natronlauge gelöst und mit Pyridin und einer reduzierenden Substanz unter Luftabschluss erwärmt eine klare Lösung von Hämochromogen, beim Abkühlen einen schön kristallinischen Niederschlag von Hämochromogen. Es wurde also eine stätige Umwandlung des Oxyhämoglobins in Methämoglobin und dabei eine stätige Abnahme der Gesamtmenge des Blutfarbstoffes bis zum Verschwinden desselben beobachtet. Am Schlusse des Versuches fand sich eine reichliche Menge eines Stoffes von den Eigenschaften des Hämatins in der Lösung, welcher von den bisher bekannten Hämatinen durch seine Darstellung unterschieden wurde. Er stand dem Zeynek-schen „Verdauungshämatin“ insofern näher als dem gewöhnlichen Hämatin, dass er verhältnismässig leicht kristallinisches Hämin lieferte.

Aus mehreren Versuchsgruppen seien hier zwei ausführlich beschrieben.

#### *Versuchsgruppe A.*

Eine gesättigte wässrige Lösung von frisch aus Pferdeblut dargestelltem kristallinischem Oxyhämoglobin wurde vom Überschuss des Farbstoffes durch Zentrifugieren befreit und mit destilliertem Wasser zweifach verdünnt. Ein Teil dieser Lösung wurde mit 1% einer  $\frac{1}{10}$  n. Natronlauge, ein zweiter Teil ausserdem noch mit 10% einer 3%-igen Trypsinlösung (Kahlbaum) versetzt. Von beiden Teilen wurde je eine Portion von

ungefähr 10 cc. in entsprechend geformten Glasröhren mit der Luftpumpe entgast, dann mit reinem Wasserstoff völlig sauerstofffrei gewaschen und schliesslich von der freien Luft durch Abschmelzen (trypsinfreie Lösung) resp. durch Verdrehen eines Hahnes (trypsinhaltige Lösung) abgeschlossen.

Da die Stammlösung vor dem Beginn der Verdauung ein gemischtes Absorptionsspektrum (Streifen des Oxyhämoglobins, des alkalischen und des sauren Methämoglobins)<sup>6)</sup> zeigte, wurde eine weitere Portion der trypsinhaltigen Lösung<sup>7)</sup>, mit NaOH soweit alkalisiert bis der Streifen des saueren Methämoglobins verschwand. Aus dieser Lösung wurde ein Teil sauerstofffrei in ein Röhrchen eingeschmolzen.

Die zugeschmolzenen Röhren mit den drei sauerstofffreien Lösungen, sowie drei offene Probierröhren mit den entsprechenden sauerstoffhaltigen Lösungen wurden gleichzeitig in ein gemeinsames Wasserbad von 40 C. gesenkt und ihre Absorptionsspektren von Zeit zu Zeit beobachtet.

---

<sup>6)</sup> Es wurde vom Verfasser früher gezeigt (Festschrift für Prof. Lechner 1915, S. 442, ungarisch), dass das Methämoglobin beim Ansäuern seiner alkalischen Lösung sein Absorptionsspektrum nicht mit einem Schlage sondern nur allmählich ändert, so dass auf der Grenze der Neutralität ein „Übergangsspektrum“ existiert in welchem sowohl die Streifen der sauren, wie die der alkalischen Lösung sichtbar sind.

<sup>7)</sup> Von der trypsinfreien Lösung stand mir schon keine genügende Menge zur Verfügung.

TABELLE I.  
Trypsinfreie Blutfarbstofflösung mit wenig Alkali.

Zeit der Beobachtung	A. In offenem Rohre		B. Sauerstofffrei, in geschlossenem Rohre	
	Verhalten und Absorptionsspektrum der alkalischen Lösung	Verhalten und Absorptionsspektrum nach Ansäuern mit Essigsäure	Verhalten und Absorptionsspektrum der alkalischen Lösung	Verhalten und Absorptionsspektrum nach Ansäuern mit Essigsäure
31/V. 11 U. 30' v. M. (Beginn des Versuchs)	Hb <sub>o</sub> } Hb <sub>m</sub> <sup>alk</sup> } I, II <sup>1)</sup> In dicker Schicht wird Hb <sub>m</sub> <sup>ac</sup> I deutlich	—	Hb <sub>r</sub> Hb <sub>m</sub> <sup>ac</sup> I wird auch bei dicker Schicht nicht sichtbar	—
2 U. n. M.	Hb <sub>o</sub> } Hb <sub>m</sub> <sup>alk</sup> } I, II Hb <sub>m</sub> <sup>ac</sup> I deutlich	—	"	—
4 U. n. M.	—	Bleibt klar Hb <sub>o</sub> I, II stark Hb <sub>m</sub> <sup>ac</sup> I deutlich	"	—
6. U. n. M.	"	"	"	—
1/IV. 9 U. v. M.	Ziegelroter Niederschlag Hb <sub>o</sub> } Hb <sub>m</sub> <sup>alk</sup> } I, II Hb <sub>m</sub> <sup>ac</sup> I Die Flüssigkeit wird abzentrifugiert und weiter erwärmt	Keine Steigerung der Trübung, Absorptionsspektrum, wie früher	"	—
2/VI. 10. U. v. M.	Neuer, ähnlicher Niederschlag	Essigsäurezusatz zur abzentrifugierten Lösung: kein weiterer Niederschlag Hb <sub>o</sub> I, II stark Hb <sub>m</sub> <sup>ac</sup> I schwach	"	—
			Dass Rohr wird geöffnet	
			Hb <sub>o</sub> } Hb <sub>m</sub> <sup>alk</sup> } I, II In einigen Minuten wird auch Hb <sub>m</sub> <sup>ac</sup> I schwach sichtbar	Bleibt klar Hb <sub>o</sub> I, II Hb <sub>m</sub> <sup>ac</sup> I deutlich

1) In dieser Tabelle, wie auch in den folgenden bedeuten:

Hb<sub>o</sub> I, II: die zwei charakteristischen Streifen des Oxyhämoglobins ( $\lambda = 577 \mu\mu$ ,  $\lambda = 540 \mu\mu$ ).

Hb<sub>m</sub><sup>alk</sup> I, II: die zwei ähnlichen Streifen des in alkali gelösten Methämoglobins ( $\lambda = 579 \mu\mu$ ,  $\lambda = 540 \mu\mu$ ).

Hb<sub>m</sub><sup>ac</sup> I: den für saure Lösungen von Methämoglobin bezeichnenden Streifen im Roten ( $\lambda = 626 \mu\mu$ ) Dieser Streifen kann im „Übergangsspektrum“ bei mässig alkalischer Reaktion neben Hb<sub>m</sub><sup>alk</sup> I, II erscheinen.

Hb<sub>r</sub>: den für reduziertes Hämoglobin bezeichnenden Streifen ( $\lambda = 559 \mu\mu$ ).

TABELLE II.

## Trypsinhaltige Blutfarbstofflösung, mit wenig Alkali.

Zeit der Beobachtung	A. In offenem Rohre		B. Im geschlossenem Rohre bei stark beschränktem Luftzutritt	
	Verhalten und Absorptionsspektrum			
	der alkalischen Lösung	nach Ansäuern mit Essigsäure	der alkalischen Lösung	nach Ansäuern mit Essigsäure
31/V. 11 U. 30' v. M. (Beginn des Versuchs)	Hb <sub>o</sub> } Hb <sub>m</sub> <sup>alk</sup> } I, II Hb <sub>m</sub> <sup>ac</sup> I schwach	—	Hb <sub>r</sub>	—
2 U. n. M.	Hb <sub>o</sub> } Hb <sub>m</sub> <sup>alk</sup> } I, II Hb <sub>m</sub> <sup>ac</sup> stärker, wie früher	—	Hb <sub>o</sub> } Hb <sub>m</sub> <sup>alk</sup> } I, II Hb <sub>m</sub> <sup>ac</sup> deutlich	—
4 U. n. M.	Hb <sub>o</sub> } Hb <sub>m</sub> <sup>alk</sup> } I, II Hb <sub>m</sub> <sup>ac</sup> noch stärker	Trübung Hb <sub>o</sub> I, II schwach Hb <sub>m</sub> <sup>ac</sup> I stark	Hb <sub>o</sub> } Hb <sub>m</sub> <sup>alk</sup> } I, II Hb <sub>m</sub> <sup>ac</sup> I stark	—
6 U. n. M.	Hb <sub>o</sub> } Hb <sub>m</sub> <sup>alk</sup> } I, II schwach	Brauner Nieder- schlag Hb <sub>o</sub> I, II schwach Hb <sub>m</sub> <sup>ac</sup> I stark	"	—
I/VI. 9 U. n. M.	Hb <sub>m</sub> <sup>ac</sup> I. An der Stelle von Hb <sub>o</sub> } Hb <sub>m</sub> <sup>alk</sup> } I, II. ein verwasche- ner Schatten	Reichlicher brauner Nieder- schlag, bordeaux rote Lösung Hb <sub>m</sub> <sup>ac</sup> I Hb <sub>o</sub> I, II schwach und atypisch (der erste Streifen ist verwaschener, als der zweite)	"	—
4 U. 30' n. M.	Hb <sub>m</sub> <sup>ac</sup> schwach An der Stelle von Hb <sub>o</sub> } Hb <sub>m</sub> <sup>alk</sup> } I, II sind zwei Strei- fen, deren erster verwaschener ist, als der zweite	—	Hb <sub>o</sub> } Hb <sub>m</sub> <sup>alk</sup> } I, II Hb <sub>m</sub> <sup>ac</sup> I	—

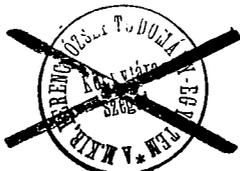
Zeit der Beobachtung	A. In offenem Rohre		B. In geschlossenem Rohre bei stark beschränktem Luftzutritt	
	Verhalten und Absorptionsspektrum			
	der alkalischen Lösung	nach Ansäuern mit Essigsäure	der alkalischen Lösung	nach Ansäuern mit Essigsäure
2/Vl. 10 U. v. M.	Hb <sub>m</sub> <sup>ac</sup> verschwunden Hb <sub>o</sub> } I, II Hb <sub>m</sub> <sup>alk</sup> } wie früher	Sehr reichlicher brauner Niederschlag. Die geklärte Flüssigkeit ist hellbraun. An Stelle von Hb <sub>o</sub> I, II zwei verwaschene Streifen. Bei 1 cm. Schichtdicke wird Hb <sub>m</sub> <sup>ac</sup> I sichtbar	Hb <sub>m</sub> <sup>alk</sup> } I, II Hb <sub>o</sub> } schwach Hb <sub>m</sub> <sup>ab</sup> stark	—
			Dass Rohr wird geöffnet	
			Keine unmittelbare Veränderung	

TABELLE III.

## Trypsinhaltige Blutfarbstofflösung mit hinreichendem Alkali.

Zeit der Beobachtung	A. In offenem Rohre		B. Sauerstofferei, in geschlossenem Rohre	
	Verhalten und Absorptionsspektrum			
	der alkalischen Lösung	nach Ansäuern mit Essigsäure	der alkalischen Lösung	nach Ansäuern mit Essigsäure
31/V. 11 U. 30' v. M. (Beginn des Versuchs)	Hb <sub>o</sub> } I, II Hb <sub>m</sub> <sup>alk</sup> }	—	Hb <sub>r</sub>	—
2 U. n. M.	Hb <sub>o</sub> } I, II Hb <sub>m</sub> <sup>alk</sup> } Hb <sub>m</sub> <sup>ac</sup> I deutlich	—	Hb <sub>r</sub> Hb <sub>m</sub> <sup>ac</sup> I deutlich	—
4 U. n. M.	—	Brauner Niederschlag Hb <sub>m</sub> <sup>ac</sup> I stark Hb <sub>o</sub> I, II schwach	"	—
6 U. n. M.	Hb <sub>o</sub> } I, II Hb <sub>m</sub> <sup>alk</sup> } schwach Hb <sub>m</sub> <sup>ac</sup> I deutlich	Brauner Niederschlag Hb <sub>o</sub> I, II schwach Hb <sub>m</sub> <sup>ac</sup> I deutlich	"	—

Zeit der Beobachtung	A. In offenem Rohre		B. Sauerstofffrei, in geschlossenem Rohre	
	Verhalten und Absorptionsspektrum			
	der alkalischen Lösung	nach Ansauern mit Essigsäure	der alkalischen Lösung	nach Ansauern mit Essigsäure
1/VI 9 U. v. M.	Hb <sub>m</sub> <sup>ac</sup> schwach An Stelle von Hb <sub>o</sub> } I, II zwei Hb <sub>m</sub> <sup>alk</sup> } verwaschene Streifen, welche bei grösserer Schichtdicke verfließen. Schütteln mit Luft ändert am Bilde nichts.	Reichlicher brauner Niederschlag. Die geklärte Lösung ist bordeauxrot. Hb <sub>m</sub> <sup>ac</sup> I stark Hb <sub>o</sub> I, II schwach und atypisch (der erste Streifen ist verwaschener als der zweite.	Hb <sub>r</sub> Hb <sub>m</sub> <sup>ac</sup> ist verschwunden	—
4 U. 30' n. M.	Wie früher	Reichlicher brauner Niederschlag. Die geklärte Lösung ist hellbraun mit einem Stich ins Rosa. Hb <sub>m</sub> <sup>ac</sup> I bei 1 cm. Schichtdicke sichtbar Hb <sub>o</sub> I, II wie oben.	Hb <sub>r</sub>	—
2/VI. 10 U. v. M.	Hb <sub>m</sub> <sup>ac</sup> verschwunden	Reichlich brauner Niederschlag. Die geklärte Flüssigkeit ist hellbraun Hb <sub>m</sub> <sup>ac</sup> I bei einer Schichtdicke von mehreren cm. schwach sichtbar. Schatten im Grünen.	Hb <sub>r</sub>	—
			Das Rohr wird geöffnet	
11 U 15' v. M.			Offen weiter digeriert	
			Hb <sub>m</sub> <sup>ac</sup> I stark Hb <sub>o</sub> } I, II Hb <sub>m</sub> <sup>alk</sup> } schwach	Ziemlich reichlicher brauner Niederschlag Hb <sub>m</sub> <sup>ac</sup> I stark Hb <sub>o</sub> I, II schwach



Die in diesen Tabellen aufgezeichneten Beobachtungen zeigen, dass in der trypsinfreien Blutfarbstofflösung, welche schon beim Beginn des Versuchs ein wenig Methämoglobin neben viel Oxyhämoglobin enthielt in den ersten 6 Stunden der Digestion bei Luftzutritt eine geringe Steigerung des Methämoglobingehaltes, sonst aber keine Veränderung des Blutfarbstoffes und besonders keine Hämatinbildung stattfand. Im Laufe der weiteren protrahierten Digerierung d. h. in 21, 30, 40 Stunden entstand ein geringer rötlicher Niederschlag, welcher sich vom Hämatin unterschied. Der Oxyhämoglobin- und Methämoglobin-Gehalt der Lösung blieb bis zum Ende des Versuchs beinahe unverändert. (Tabelle I. A).

In der sonst gleichen und gleich behandelten trypsinhaltigen Lösung fand dagegen schon in den ersten vier Stunden der Verdauung eine bedeutende Vermehrung des Methämoglobins auf Kosten des Oxyhämoglobins statt, in der vierten Stunde war auch der Beginn der Hämatinbildung zu beobachten. In der 6-ten Stunde der Verdauung ist die Menge des freigewordenen Hämatins beträchtlich geworden, vom 21-ten Stunde an war dagegen schon kein typisches Oxyhämoglobinspektrum zu beobachten. Im weiteren Verlaufe des Versuchs nahm das Hämatin zu, der Blutfarbstoff bis zum völligen Verschwinden ab. (Tabelle II; A).

Mit etwas mehr Lauge verlief der Vorgang ganz in der gleichen Weise (Tabelle III; A). Es ist klar, dass in dieser Zersetzung des Oxyhämoglobins und zwar nicht nur im Freiwerden des Hämatins, sondern auch in seiner Umwandlung in Methämoglobin, das Trypsin eine Rolle spielt. Der Umstand, dass in einem Versuch (Tabelle I, A) die Hämatinbildung erst in der vierten Stunde merkbar wurde, als schon beinahe sämtliches Oxyhämoglobin in Methämoglobin umgewandelt war, lässt den Schluss zu, dass die Hämatinbildung und Methämoglobinbildung nicht als parallele Vorgänge mit dem gemeinschaftlichen Ausgangspunkte Oxyhämoglobin, sondern als verschiedene Stadien eines und desselben Zersetzungsvorganges auf zu fassen wären, deren eine Stufe Methämoglobin bildete.

Unter Luftabschluss veränderte sich das reduzierte Hämoglobin der sauerstofffreien trypsinhaltigen Lösung in 46 Stun-

den nur kaum merklich. (Tabelle III. B). Die Lösung zeigte sowol am Anfang wie am Ende des Versuchs das reine Absorptionsspektrum des reduzierten Hämoglobins. In den 2--6-ten Stunden der Verdauung war jedoch daneben auch der Streifen der sauren Methämoglobinlösungen vorübergehend zu beobachten. Dieser Streifen verschwand im weiteren Verlaufe des Vorganges.

Zur Erklärung dieser Erscheinung sind zwei Möglichkeiten in Betracht zu ziehen. Das anfangs vorhandene Methämoglobin dürfte erstens zu reduziertem Hämoglobin umgewandelt werden, oder es traten vorübergehend saure Affinitäten im Überschusse auf, wodurch der erste Streifen des „Übergangsspektrums“ des Methämoglobins erschien, später aber infolge einer Zunahme der alkalischen Reaktion wieder verschwand. Die Streifen des alkalischen Methämoglobins dürften dabei durch den starken Streifen des reduzierten Hämoglobins verdeckt bleiben. Welche dieser Annahmen der Wahrheit näher liegt, liess sich bei der vorliegenden Anordnung der Versuche nicht feststellen.

Nach dem Öffnen des Glasrohres wandelte sich das reduzierte Hämoglobin der Lösung in Oxyhämoglobin um. Die Streifen des Oxyhämoglobins konnten natürlich die Streifen des vielleicht vorhandenen Methämoglobins verdecken. In wenigen Minuten wurde aber auch der Methämoglobinstreifen im roten sichtbar. Ist dies als ein Zeichen einer, durch Luftzutritt rasch gesteigerten Methämoglobinbildung aufzufassen, oder ist sie einfach durch die Säurewirkung der Luftkohlenensäure zu erklären, welche das „Übergangsspektrum“ des Methämoglobins zu Tage brachte, war wieder nicht zu entscheiden.

In der Lösung bildete sich eine geringe Menge Hämatins, die von diesem durch Essigsäure befreite Lösung enthielt überwiegend Oxyhämoglobin neben wenig Methämoglobin.

War der Luftzutritt nicht völlig ausgeschlossen (Tabelle II. B) so verlief der Vorgang wesentlich so, wie bei freiem Luftzutritt, nur etwas langsamer; am Ende des Versuchs war noch Oxyhämoglobin in der Lösung vorhanden.

Das reduzierte Hämoglobin der trypsinfreien Lösung (Tabelle I. B) veränderte sich bei Luftabschluss in 46 Stunden bei

40° C nicht merklich. Im Absorptionsspektrum war am Beginn und Ende des Versuchs nur der Streifen des reduzierten Hämoglobins sichtbar. Nach dem Zulassen der Luft erschienen die Streifen des Oxyhämoglobins und daneben der Streifen des sauren Methämoglobins, in derselben Intensität, wie sie auch vor dem Auspumpen des Sauerstoffs aus der Lösung schon vorhanden waren.

Hämatin ist nicht frei geworden. Aus der Versuchsgruppe ist deutlich zu ersehen, dass die tryptische Verdauung des Blutfarbstoffs resp. die Methämoglobin und Hämatinbildung aus demselben ohne Sauerstoff nur sehr unvollkommen vor sich gehen. Besonders beweisend ist in dieser Hinsicht der Befund, dass die bei Luftabschluss durch 46 Stunden unverändert gebliebene trypsinhaltige Blutfarbstofflösung eine rasche Methämoglobin und Hämatinbildung zeigte, sobald die Luft frei zugelassen wurde.

#### *Versuchsgruppe B.*

Die abzentrifugierten Blutkörperchen aus 2 Lit. Rinderblut wurden mit 1%-iger Kochsalzlösung zweimal gewaschen, erfrieren gelassen und in wenig Wasser aufgelöst. Die Lösung wurde zweimal mit reinem Aether ausgewaschen, von den Stromata durch Zentrifugieren befreit filtriert und durch einen reinen Luftstrom entäthert. In dieser Weise wurden etwa 350 cc. dunkelrote Lösung erhalten (Stammlösung dieser Versuchsgruppe). Im Absorptionsspektrum derselben waren nur die Oxyhämoglobinstreifen sichtbar, der Streifen des Methämoglobins im Roten kam auch nach Ansäuern mit Essigsäure nicht zum Vorschein.

30 cc. dieser Stammlösung wurden auf 300 cc. mit destilliertem Wasser verdünnt mit 5 cc. norm. NaOH versetzt und wie in der vorigen Versuchsgruppe weiter geprüft.

Die Resultate sind in den folgenden Tabellen zusammengestellt:

TABELLE IV.  
Trypsinfreie Blutkörperchenlösung.

Zeit- der Beob- achtung	A In offenem Röhre		Sauerstofffrei in geschlossenem Röhre	
	Verhalten und Absorptionsspektrum			
	der alkalischen Lösung	nach Ansauern mit Essigsäure	der alkalischen Lösung	nach Ansauern mit Essigsäure
13/VI. 9 U. 30' v. M. (Beginn des Vorsuchs)	Hb <sub>o</sub> I, II	Bleibt klar Hb <sub>o</sub> I, II Hb <sub>m</sub> <sup>ac</sup> I schwach angedeutet	Hb <sub>r</sub>	—
11 U. 45' v. M.	Hb <sub>o</sub> } Hb <sub>m</sub> <sup>alk</sup> } I, II	Bleibt klar Hb <sub>o</sub> I, II stark Hb <sub>m</sub> <sup>ac</sup> I schwach	"	—
1 U. 30' n. M.	"	"	"	—
4 U. n. M.	—	Bleibt klar Hb <sub>o</sub> I, II schwach Hb <sub>m</sub> <sup>ac</sup> I stark	"	—
7 U. 30' n. M.	Hb <sub>o</sub> } Hb <sub>m</sub> <sup>alk</sup> } I, II	Bleibt klar Hb <sub>m</sub> <sup>ac</sup> I stark	"	—
14/VI. 9 U. 45' v. M.	Hb <sub>m</sub> <sup>alk</sup> I, II	Endabsorption vom Grünen	"	—
4 U. n. M.	mit einem Schat- ten vor dem ersten Streifen	—	"	—

Zeit- der Beob- achtung	A in offenem Rohre		Sauerstofffrei in geschlossenem Rchre	
	Verhalten und Absorptionsspektrum			
	der alkalischen Lösung	nach Ansauern mit Essigsäure	der alkalischen Lösung	nach Ansauern mit Essigsäure
15/VI. 10 U. v. M.	Hb <sub>m</sub> <sup>alk</sup> I, II schwach, Schatten vor dem ersten Streifen	Bleibt klar Hb <sub>m</sub> <sup>ac</sup> I schwach Endabsorption rechts	"	—
4 U. n. M.	Hb <sub>m</sub> <sup>alk</sup> I, II sehr schwach Schatten vor dem ersten Streifen	Heller Nieder- schlag, welcher sich im Über- schuss der Säure auflöst Hb <sub>m</sub> <sup>ac</sup> I deutlich, Endabsorption rechts	"	—
16/VI. 10 U. v. M.	—	—	"	—
10 U. 45' v. M.	—	—	Des Rohr wird geöffnet, sein Inhalt mit Luft geschüttelt	
			Rosaroter Schaum Hb <sub>o</sub> I, II	Bleibt klar Hb <sub>o</sub> I, II Hb <sub>m</sub> <sup>ac</sup> schwach angedeutet
6 U. n. M.	—	—	Offen weiter digeriert	
			Hb <sub>o</sub> } I, II Hb <sub>m</sub> <sup>alk</sup> }	Bleibt klar Hb <sub>m</sub> <sup>ac</sup> ziemlich stark Hb <sub>o</sub> I, II verwaschen
18/VI. 12 U. M.	—	—	Hb <sub>o</sub> } I, II Hb <sub>m</sub> <sup>alk</sup> } verwaschen. Endabsorption links	Bleibt klar Hb <sub>m</sub> <sup>ac</sup> I stark Endabsorption links

TABELLE V.  
Trypsinhaltige Blutkörperchenlösung.

Zeit der Beobachtung	A. In offenem Rohre		B. sauerstofffrei in geschlossenem Rohre	
	Verhalten und Absorptionsspektrum			
	der alkalischen Lösung	nach Ansäuern mit Essigsäure	der alkalischen Lösung	nach Ansäuern mit Essigsäure
13/VI. 10 U. v. M. (Beginn des Versuchs)	Hb <sub>o</sub> I, II	Bleibt klar Hb <sub>o</sub> I, II Hb <sub>m</sub> <sup>ac</sup> I angedeutet	Hb <sub>r</sub>	—
11 U. 45 v. M.	Hb <sub>o</sub> } I, II Hb <sub>m</sub> <sup>alk</sup> }	Trübung Hb <sub>o</sub> I, II viel schwächer, Hb <sub>m</sub> <sup>ac</sup> I ebenso stark, wie in der entsprechenden trypsinfreien Lösung	"	—
1 U. 30' v. M.	—	Trübung; Verwaschene Streifen Hb <sub>o</sub> I, II sehr geschwächt	"	—
4 U. n. M.	Braun Hb <sub>o</sub> } I, II Hb <sub>m</sub> <sup>alk</sup> } unklar; Schatten im Roten	Reichlicher brauner Nieder- schlag. Die ge- klärte Lösung ist hell rosarot Hb <sub>m</sub> <sup>ac</sup> I, Hb <sub>o</sub> I, II Sulfosalicylsäure erzeugt eine Trübung	"	—
7 U. 30' n. M.	Schatten im Roten	Reichlicher brauner Niederschlag; die geklärte Lö- sung ist blass- gelb. Keine Ab- sorptionsstreifen. Sulfosalicylsäure erzeugt eine ge- ringe Trübung	"	—
14/VI. 9 U. 45 v. M.	Ein Streifen im Roten. Bei dün- ner Schicht ein Schatten im Grünen, welcher sich bei größe- rer Schicht- dicke bis ins Rote ausbreitet	Reichlicher brauner Nieder- schlag. Die ge- klärte Lösung ist beinahe farb- los. Sulfosalicyl- säure erzeugt keine Trübung	Bei dünner Schicht spaltet sich der Streifen in zwei dünne Streifen	—

Zeit der Beobachtung	A. In offenem Rohre		B. Sauerstofffrei in geschlossenem Rohre	
	Verhalten und Absorptionsspektrum			
	der alkalischen Lösung	nach Ansauern mit Essigsäure	der alkalischen Lösung	nach Ansauern mit Essigsäure
16/VI. 10 U. v. M.	—	—	Geringe Trübung Absorptionsspektrum wie früher	—
10 U. 45' v. M.	—	—	Des Rohr wird geöffnet und sein Inhalt mit Luft geschüttelt	
			Brauner Schaum $\text{Hb}_o$ $\text{Hb}_m^{\text{alk}}$ } I, II rein und scharf $\text{Hb}_m^{\text{ac}}$ angedeutet	Die Trübung nimmt nicht zu $\text{Hb}_o$ I, II rein und scharf $\text{Hb}_m^{\text{ac}}$ I
6 U. n. M.	—	—	Offen weiter digeriert	
			Verwaschenes Spektrum. Bei geringer Schichtdicke ein Schatten im Grünen, welcher sich bei gesteigerter Schichtdicke bis ins Rote ausbreitet	Starke Trübung $\text{Hb}_m^{\text{ac}}$ schwach, noch sichtbar
18.VI. 12 U. M.	—	—	Wie früher	Brauner Niederschlag. Die geklärte Lösung ist beinahe farblos $\text{Hb}_m^{\text{ac}}$ verschwunden. Sulfosalicylsäure erzeugt keinen Niederschlag

In diesem Versuch bildete sich also aus dem Oxyhämoglobin der trypsinfreien Blutkörperchenlösung (Tabelle IV. A) in 56 Stunden kein durch Essigsäure fällbares Hämatin, während in der trypsinhaltigen Lösung unter sonst gleichen Umständen (Tabelle V. A) die Hämatinbildung schon in der zweiten Stunde nachweisbar und in 24 Stunden die ganze Mengen des Blutfarbstoffs zerlegt war. Bezüglich der Methämoglobinbildung sind die Befunde hier von denen des vorigen Versuches (Tabelle I. A) verschieden. Während nämlich damals das ohne Trypsin in offenem Gefässe digerierte Oxyhämoglobin sich in 50 Stunden nur zu einem geringen Teil in Methämoglobin umwandelte und zum grösseren Teile unverändert blieb, fand jetzt schon in den ersten 6 Stunden eine bedeutende Umwandlung in diesen letzteren Färbstoff statt. Von der 10-ten Stunde an war in der Flüssigkeit schon kein Oxyhämoglobin mehr vorhanden. Das gebildete Methämoglobin wandelte sich ständig in einen anderen braunen Farbstoff um, welcher keine bezeichnende Absorptionsstreifen zeigte, und auf Essigsäurezusatz nicht ausfiel, sich also vom Hämatin deutlich unterschied.

Der Grund dieses Unterschiedes ist wahrscheinlich in der Verschiedenheit des Ausgangmaterials zu suchen (kristallinisches Oxyhämoglobin aus Pferdeblut—Rinderblutkörperchenlösung).

Bezüglich der Methämoglobinbildung war infolgedessen zwischen der trypsinfreien und trypsinhaltigen Lösung nicht der scharfe Gegensatz vorhanden, wie im vorigen Versuche. In geschlossenem Rohre blieb das reduzierte Hämoglobin der trypsin- und sauerstofffreien Lösung bis zum Öffnen des Rohres, also ca. 72 Stunden unverändert. Vom Sauerstoffzutritte an veränderte sich der Blutfarbstoff ganz so, wie in der vom Anfang an offen behandelten Probe.

Das reduzierte Hämoglobin der in geschlossenem Rohre sauerstofffrei behandelten trypsinhaltigen Lösung veränderte sich nur wenig. In der 24-ten Stunde war eine geringe Menge von Methämoglobin vorhanden, diese vermehrte sich aber nicht im weiteren Verlaufe, so dass der Farbstoff im Inhalt des in der 72-ten Stunde geöffneten und mit Luft geschüttelten Rohres zum grössten Teil noch in Form von Oxyhämoglobin vorhanden

war. Hämatinbildung fand nicht statt. Nach Öffnen des Rohres verschwand zuerst das Oxyhämoglobin, später das Methämoglobin unter Bildung von Hämatin.

In Zusammenfassung der Ergebnisse sämtlicher Versuche lassen sich die folgenden Tatsachen feststellen:

Die tryptische Verdauung der Eiweisskörper wird in alkalischen Lösungen vom Oxyhämoglobin nicht gehindert.

Dieser Farbstoff ist der Trypsinwirkung selbst zugänglich, indem sein Eiweissanteil in durch Sulfosalicylsäure nicht fällbare Bausteine zerfällt und seine chromophore Gruppe in Form eines braunen, durch Essigsäure fällbaren Körpers frei wird. Dieser Körper ist in seinen Eigenschaften dem Hämatin gleich und steht durch die Art seiner Darstellung, sowie dadurch, dass er ziemlich leicht Hämin liefert dem Verdauungs-Hämatin v. *Zeynek's* nahe. Eine Analyse des Hämatins konnte leider nicht ausgeführt werden. Eine solche würde übrigens den Beweis für die Identität mit einem der bisher Hämatin genannten Substanzen noch immer nicht bringen können, da diese selbst nicht genügend definiert sind. Solange für die Identität oder Differenz dieser Stoffe Beweise erbracht werden können, möchte ich für v. *Zeynek's* Verdauungshämatin den Namen Pepsin-Hämatin, für das durch Trypsinwirkung gewonnene Hämatin Trypsin-hämatin vorschlagen, während für die übrigen Hämatine die von Küster vorgeschlagene Bezeichnung  $\beta$ -Hämatin bis auf weiteres zu behalten wäre.

Eine Bedingung der tryptischen Zersetzung des Blutfarbstoffs ist die Anwesenheit von Sauerstoff. Dementsprechend ist das reduzierte Hämoglobin dem Trypsin nicht zugänglich. (Gewissermassen ist der Sauerstoff in dieser Beziehung durch Kohlenoxyd zu ersetzen, wie dies aus anderen, hier nicht mitgeteilten Versuchen hervorgeht. Die tryptische Verdauung des Kohlenoxydhämoglobins geht jedoch langsamer an und schreitet langsamer vor als die des Oxyhämoglobins unter sonst gleichen Umständen. Gewisse Zeichen sprechen dafür, dass die Hämatinartigen Stoffe in beiden Fällen nicht identisch sind).

Es ist wahrscheinlich, dass die erste Stufe der tryptischen Zerlegung des Blutfarbstoffs von seiner Umwandlung in Methämoglobin gebildet wird. Die Methämoglobinbildung ging nähm-

lich regelmässig dem Freiwerden des Hämatins voran, die Zunahme des Hämatins aber hatte einen, dem Verschwinden der Methämoglobinstreifen ungefähr parallelen Gang. Die Hämatinbildung war verzögert oder blieb vollständig aus wenn die Bedingungen der Methämoglobinbildung ungünstig waren oder fehlten. Gegen diese Annahme scheint meine hier nicht beschriebene Beobachtung zu sprechen, wonach aus Kohlenoxydhämoglobin ohne Methämoglobinbildung ein hämatinartiger Körper entsteht. Dieser hämatinartige Körper schien jedoch mit meinem Trypsinhämatin nicht identisch zu sein.

Schliesslich ist noch zu erwähnen, dass das in diesen Versuchen verwendete Trypsinpräparat die Umwandlung des Oxyhämoglobins in Methämoglobin in so hohem Grade beförderte, dass man ihm bei der Methämoglobinbildung eine Rolle zuschreiben muss.

Ist diese Wirkung eine reine Trypsinwirkung, so könnte man daraus folgen, dass bei der Methämoglobinbildung nicht die chromophore Gruppe des Oxyhämoglobins primär verändert wird, da diese keine eiweissartige Verbindung ist, und somit auch nicht in den Bereich der Trypsinwirkung fällt. Die Umwandlung sollte vielmehr, mit der primären Veränderung des Eiweissanteiles beginnen. Dies könnte dann diese Sekundäre Veränderung der chromophoren Gruppe zur Folge haben oder für diese die Möglichkeit eröffnen.

Dies ist auch eine der Fragen, welche noch weitere Erforschung benötigen.