

107,824^a.

38.

Ueber die
**Einwirkung des Zinkes und seiner
Salze auf das Blut.**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines

Doctors der Medicin

verfasst und mit Bewilligung

Einer Hochverordneten medicinischen Facultät
der Kaiserlichen Universität zu Jurjew (Dorpat)

zur öffentlichen Vertheidigung bestimmt

von

Emil Grahe.

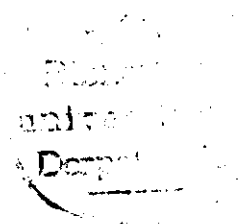
Ordentliche Opponenten:

Prosector V. Schmidt. — Prof. Dr. D. Barfurth. — Prof. Dr. R. Kobert.

Dorpat.

Druck von C. Mattiesen.

1893.



Печатано съ разрѣшеніа Медицинскаго Факультета Император-
скаго Юрьевскаго Университета.

Референтъ: Профессоръ Дръ. Р. Нобертъ.

Юрьевъ, 18 Марта 1893 г.

№ 181.

Декавъ: Драгендорфъ.

С 112-193

Meinen Eltern

in Liebe und Dankbarkeit

gewidmet.

Herrn Prof. Dr. R. K o b e r t, auf dessen
Anregung die vorliegende Abhandlung ent-
standen ist, spreche ich meinen innigsten Dank
aus für vielfache Unterstützung in Rath und
That.

I.

Uebersicht der Litteratur.

In einigen Vorträgen ¹⁾, welche Prof. Dr. R. Kobert seiner Zeit verschiedenen Orts gehalten hat, sprach er über ein neues von ihm entdecktes Haemoglobinderivat, welches er in seinem ersten diesbezüglichen Vortrage in Anlehnung an Nencki's ²⁾ Nomenclatur mit dem Namen Parhaemoglobin [Par-Hb] und in seinen beiden anderen genauer als Zink-Par-Haemoglobin [Zn-Par-Hb] bezeichnet hat. Dieser Körper entsteht nach den

1) Prof. Dr. R. Kobert:

I. Vortrag: „Ueber ein neues Parhaemoglobin.“ Sitzungsberichte der Dorpater Naturforscher-Gesellschaft Jahrg. 1891.

II. Vortrag: „Ueber den Nachweis von Fermenten und Giften im Blute“, gehalten in der Section für Pharmacie und Pharmakognosie der 64. Versammlung der Gesellschaft deutscher Naturforscher und Aerzte zu Halle a. S. im September 1891, abgedruckt in den Verhandlungen dieser Versammlung p. 177.

III. Vortrag: „Ueber resorbirbare Eisenpräparate“, gehalten in der wissenschaftlichen Sitzung der med. Facultät zu Dorpat am 15. Nov. 1891. Separatabdruck aus der St. Petersburger Med. Woch. Nr. 49, 1891.

2) M. Nencki: „Ueber das Parhaemoglobin“, Archiv f. experim. Pathol. und Pharmakol. Bd. XX. 1886, p. 337.

Ausführungen in genannten Vorträgen, durch Einwirkung von pulverisirtem Zink und noch besser durch Einwirkung von Zinkstaub auf's Blut, welches zweckmässiger Weise mit Wasser zu verdünnen ist, indem beide mit einander bei neutraler Reaction energisch geschüttelt werden. Dabei entsteht ein, je nach der Menge des dazu verwendeten Zinkstaubes, mehr oder weniger saftigbraun bis chocoladen-sepia artig gefärbter, voluminöser, nach dem Schütteln mit Schaum durchsetzter Niederschlag, welcher sich, auf ein Filter gebracht, leicht sammeln, waschen, trocknen und zu einem eleganten Pulver verreiben lässt und beim richtigen Arbeiten ein farbloses, wasserklares Filtrat liefert.

Der Gedankengang, der Prof. R. Kobert zur Entdeckung seines neuen Körpers geführt hatte, sei hier noch einmal in Kürze wiedergegeben. Durch die Arbeiten von E. Stadelmann-Gorodecki¹⁾, denen zu Folge im Blute frei werdendes oder im freien Zustande injicirtes Hb von der Leber „aufgefangen“ und zu einem sehr geringen Theile, höchstens 1,9% in Gallenfarbstoff umgewandelt wird, eröffnete sich eine neue Frage, deren Beantwortung wohl von vornherein einer

1) E. Stadelmann und Gorodecki: „Ueber die Folgen subcutaner und intraperitonealer Hb-Injectionen“ Archiv f. exp. Path. u. Pharm. Bd. 27, 1890, p. 104.

eigenen Untersuchung für werth erscheinen konnte, nämlich: was denn aus den übrigen eingespritzten 98,1 % Hb werde. Beim Suchen nach diesen 98,1 % hatte sich Kobert zunächst an die Angaben von Al. Schmidt¹⁾ gehalten, wonach beim Schütteln von sowohl intacten, glycogenhaltigen, lebenden, als auch von sehr fein zerriebenen Leberzellen mit Hb-Lösungen das Haemoglobin aus der Lösung verschwindet, um noch eine Zeit lang in den Zellen „als solches spectroscopisch nachweisbar“ zu bleiben, ehe es für immer verschwindet, d. h., nach A. Schmidt in Gallenfarbstoff umgewandelt wird. Diese Fähigkeit das Haemoglobin unlöslich zu machen, wurde von Kobert durch analoge Versuche auch für das Zellprotoplasma sowohl der frischen, als auch der mehrere Wochen alten Milz constatirt und chemisch als ein Reductionsvorgang gedeutet. In der That wird eine Lösung von indigoschwefelsaurem Natrium zu demselben Zellenbrei zugesetzt, bis zur Farblosigkeit reducirt. Dieses dürfte mit den Beobachtungen Ehrlichs²⁾, dass gewisse blaue Farbstoffe, Alizarinblau und Indophenolblau, von den Geweben des lebenden Thieres

1) A. L. S c h m i d t: „Ein Beitrag zur Physiologie der Leber.“ Biologisches Centralbl. Jhrg. 10, 1890, Nr. 19—20, citirt nach Kobert.

2) Citirt nach O. H a m m a r s t e n: Lehrbuch der physiol. Chemie 1891 p. 4.

entfärbt und bei Luftzutritt wieder blau werden, und mit den Versuchen von C. Ludwig¹⁾ und Alex. Schmidt²⁾, dass in dem Blute erstickter Thiere, — also bei Mangel an Sauerstoff, — eine Anhäufung von reducirenden, leicht oxydablen Substanzen stattfindet, vollkommen übereinstimmen.

Den vermutheten Reductionsvorgang beim Schütteln von Milz und Leberzellen mit Haemoglobinlösung hat Kobert durch Schütteln von feinstem Zinkstaub mit Blut und Haemoglobin-Lösungen nachzuahmen gesucht, wobei er zu der interessanten Wahrnehmung gelangte, dass man „mit Hilfe dieses Mittel im Stande ist, nicht nur Lösungen von kryst. Haemoglobin, sondern auch von Blutkörperchen sowie von frischem oder wochenaltem Blute (bei neutraler Reaction) bis zur Wasserklarheit zu entfärben und das gesammte Haemoglobin in Form eines sehr feinen, aber natürlich zinkhaltigen, braunen Pulvers niederzuschlagen“³⁾.

Die hauptsächlichsten Eigenschaften dieses neuen Körpers, die seine Natur, seine Aehnlichkeit mit den schon bekannten Modificationen des

1) D. A. M o s s o: „Von einigen neuen Eigenschaften der Gefässwand.“ Arb. a. d. Physiolog. Anstalt zu Leipzig v. C. Ludwig. IX. Jahrg. 1874.

2) A. l. S c h m i d t: „Athmung innerhalb des Blutes.“ Arbeit. a. d. physiol. Anst. zu Leipzig v. C. Ludwig. II. Jahrg. 1869 p. 99.

3) Citirt nach dem Separatabdrucke des I. Vortrages p. 447.

Haemoglobins, -- sowie seine wichtigsten Unterscheidungsmerkmale documentiren, sind im Folgenden zusammengefasst:

I. Aehnlichkeit des Zn-Par-Hb mit Met-Hb.

a) Beide Substanzen sind im Gegensatz zum Hb nicht roth, sondern chocoladen- oder sepiafarbig.

b) Beide können durch reducirende Substanzen aus Haemoglobin gebildet werden.

c) Wie das Met-Hb, so wird auch das Par-Hb durch organische und anorganische Basen, sowie in Contact mit faulendem Harnstoff in eine schöne rothe Lösung zurück verwandelt, welche ein Hb- oder Oxy-Hb-Spectrum zeigt.

d) Wie das Met-Hb, so wird das Par-Hb beim Schütteln mit Ferrum hydrogenio reductum in eine schöne rothe Lösung mit Oxy-Hb-Spectrum verwandelt.

e) Wie das Met-Haemoglobin so wird auch das Par-Haemoglobin in Contact mit faulendem Protoplasma (Milzzellen etc.) in Hb oder eine dem Hb ungemein ähnliche Substanz verwandelt ¹⁾.

III. Aehnlichkeit des Zn-Par-Hb mit Oxy-Hb.

a) Beide haben genau dasselbe Spectrum.

b) Beide lösen sich gleich gut und ohne

¹⁾ Wörtlich citirt nach dem I. Vortr. pp. 448 u. 449.

irgend wie verändert zu werden in Normallösungen von Ammonhydrat.

III. Von Unterschieden zwischen Zn-Par-Hb und Met-Hb sind angeführt.

a) Met-Haemoglobin ist in Wasser und in Lösungen von Kochsalz, Glaubersalz, Magnesiumsulfat ungefähr ebenso löslich wie Hb und Oxy-Hb; (Zn)-Par-Haemoglobin ist in den genannten Lösungsmitteln vollkommen unlöslich.

b) Met-Hb wird durch mit Terpentinöl geschütteltes Wasser, d. h., durch O_1 ¹⁾ als graubraune Masse aus seinen Lösungen ausgefällt, während (Zn)-Par-Hb durch dieses Reagenz mit prachtvoll rother Farbe (die, wenn man neutralisirt, sich lange hält) gelöst wird. Durch diese Reaction scheint bewiesen, dass das Zn-Par-Hb ein Reductionsproduct des Blutfarbstoffes ist, denn sonst könnte es nicht durch ein oxydirendes Agens wieder zu Oxy-Hb werden.

IV. Unterschiede zwischen Oxy-Hb und Zn-Par-Hb.

a) Oxy-Hb; Haemoglobin sind in Wasser,

1) Nach N. Kowalewsky soll übrigens im Terpentinöl nichts das Ozon (oder richtiger O_3), sondern ein Oxydationsproduct des Terpentinöls, als oxydirendes Agens wirken. (N. Kowalewsky: „Ueber das oxydirende Agens des Terpentinöls.“ Centralbl. f. d. med. Wiss. 1889 Nr. 7, pp. 113—116). Н. О. Ковалевскій. „Объ окисляющемъ агентѣ терпентиннаго масла.“ Мед. обозр. 1889 Nr. 5, стр. 534—537.

verdünntem Alkohol¹⁾ löslich; Zn-Par-Hb ist in diesen Lösungsmitteln vollkommen unlöslich.

b) Oxy-Hb, resp. Hb verändert sich beim Trocknen, Zn-Par-Hb nicht im geringsten²⁾.

c) Wasserstoffsuperoxyd wird von Zn-Par-Hb in Wasser und in activem Sauerstoff zersetzt, während Oxy-Hb sich bekanntlich total anders verhält³⁾, d. h., ohne Entwicklung von O² zu Met-Hb umgewandelt und dann entfärbt wird.

Von weiteren Eigenschaften des Zn-Par-Hb sind folgende erwähnt: „Das Zn-Par-Hb wird von verdünnter Salz-, Schwefel-, Phosphor-, Oxal-, Malon-, Ameisen-, Essig-, Wein-, Citronensäuren etc. etc. augenblicklich gelöst. Durch Salpetersäure zersetzt es sich augenblicklich zu einer grauen in Wasser unlöslichen Substanz. Die frischen Lösungen der übrigen Säuren zeigen z. Th. das Met-Hb-Spectrum, z. Th. zeigen sie überhaupt keine auswählende Absorption.“ Desgleichen wird es von verdünnten freien Basen, wie NaOH, KOH, Aetzkalk, Aetzbaryt, Piperazidin, Neurin, sowie von kohlen-sauren und corbamin-sauren Alkalien und allen organischen Salzen des

1) Alkohol verwandelt nach A. v. Vorkampff-Laue Oxy-Hb Blut in Met-Hb Blut („Beiträge zur Kenntniss des Met-Hb und seiner Derivate.“ Dissert. Dorpat 1892 p. 29.), nach Nencki (l. c.) in Parahaemoglobin.

2) I. Vortrag l. c. p. 450

3) Desgl. I. Vortr. p. 450.

Ammons bei gehöriger Verdünnung unzersetzt mit schön rother Farbe gelöst und zeigt in allen angeführten Lösungen ein Oxy-Haemoglobin-Spectrum, während die „Neutralsalze der fixen Alkalien und die alkalischen Erden nicht das geringste Lösungsvermögen für Zn-Par-Hb besitzen; letztere begünstigen sogar die Fällung des Zn-Par-Hb aus seinen Lösungen.“ Die concentrirten Lösungen der oben angeführten freien Basen NaOH etc. lösen es unter Zersetzung auf.

Werden die Lösungen des Zn-Par-Hb in kohlen- und carbaminsauren Alkalien sehr stark mit Wasser verdünnt, oder wird die Alcalescenz dieser Lösungsmitteln mit Säure (HCl) (bis zu fast neutraler Reaction) abgestumpft, so fällt das Zn-Par-Hb unverändert aus derselben wieder als brauner, flockiger voluminöser Niederschlag heraus und repräsentirt jetzt in dieser Form, falls die genannten Lösungen vorher filtrirt wurden, ein relativ reineres Präparat, da schon nach der damaligen Meinung von Kobert, das dem rohen Zn-Niederschlage noch stets in grosser Menge mechanisch anhaftende Zink, nur zum geringsten Theil mit von den Kohlensäuren Alkalien und Salzen des Ammons gelöst werde und somit nur spurweise mit ins Filtrat übergehe. — Ob sich ein vollständig zinkfreies Par-Hb nach der in Rede stehenden Methode überhaupt darstellen lässt,

wagte Kobert damals noch nicht mit Sicherheit zu entscheiden; er stellte die Existenz eines solchen sogar in Zweifel, und zwar in Anbetracht des Umstandes, dass selbst ein „Zusatz von Schwefelammonium zur Lösung des Zn-Par-Hb in kohlen. Ammon das Metall nicht vollständig zu entfernen schien“²⁾. Aus diesem Grunde, als auch auf Grund der Resultate, die ich bei meinen chemischen Untersuchungen an diesem Körper mittlerweile gewonnen hatte, und in Erwägung schliesslich dessen, dass das Hb physiologisch allgemein als eine schwache Säure betrachtet wird, fasst Kobert den neuen von ihm entdeckten Körper entweder als haemoglobinsaureres Zink²⁾, d. h. als ein Salz auf, oder als ein durch sehr gelinde Reduction erzielte Modification des Haemoglobins d. h. als **Zink-Par-Haemoglobin** (Zn-Par-Hb) auf.

Durch Kochen wird das Zn-Par-Hb, gleichgültig ob es gelöst ist oder nicht, wie Hb, Oxy-Hb und Met-Hb in Haematin umgewandelt.

Das Zn-Par-Hb lässt sich, wie die diesbezüglichen Versuche von Kobert und mir gezeigt haben, aus dem Blute der verschiedensten Thiere: Mensch, Pferd, Rind, Schwein, Schaf, Hund, Ratte, Kaninchen, Meer-

1) I. Vortrag p. 450.

2) III. Vortrag citirter Separatabdruck p. 9.

schweinchen, Ente, Henne, Eichhörnchen, Frosch und auch im Blute der Schnecken, bei welchen das Haemoglobin nicht an die Blutkörperchen gebunden ist, sowie auch aus reinem in Wasser gelöstem Haemoglobin (Pferd und Hund) darstellen. Schliesslich wird in den gen. Vorträgen auch noch der Umstand hervorgehoben, dass bei dieser Methode der Blutfarbstofffällung aus dem Blute es hauptsächlich nur der Blutfarbstoff als solcher allein ist, der von Zinkstaub gefällt werde. „Die übrigen Eiweissstoffe des Blutes werden aber in keiner Weise alterirt“¹⁾.

Die angestellten Untersuchungen beziehen sich hauptsächlich auf die naheliegende Verwendbarkeit dieser Haemoglobin-Fällungsmethode zu toxicologischen und forensischen Zwecken. Bei diesen Untersuchungen hatte es sich in der That herausgestellt, dass mittelst des Zn-Staubes von allen denjenigen Stoffen, von denen nicht von vornherein eine chemische Bindung mit Haemoglobin gemutmasst werden konnte, fast keiner in irgend einer Weise verändert, noch in nennenswerther Menge mit dem Niederschlag gefällt wird. So liessen sich ganz ohne Mühe²⁾: „Glycoside wie Sapotxin, Alkaloide, wie Strychnin

1) II. Vortrag p. 178 oben.

2) II. Votr. p. 179.

und Atropin, Enzyme, wie Pepsin, Amide, ja selbst Säuren und Alkohol etc. im Filtrate in fast quantitativen Mengen wieder gewinnen.“ Ausserdem hatte sich bei diesen Versuchen noch ein Vorzug dieser Methode herausgestellt, nämlich, dass dabei das älteste, stinkendste Blut weniger stinkend, ja manchmal vollkommen geruchlos wird.

II.

Eigene Untersuchungen.

Darstellung der Zinkverbindung des Blutfarbstoffes.

Um dem Studium der Eigenschaften dieses Körpers näher treten zu können, war es nöthig, denselben zunächst in grösserer Menge möglichst rein darzustellen. Bei diesen Darstellungsversuchen erwies sich, dass Vermeidung gewisser äusserer Umstände, die störend und zersetzend auf's Präparat einwirken können, sowie genaues und rasches Arbeiten erforderlich ist, um ein gutes und reines Präparat zu erhalten. Nach meinen Erfahrungen ist die unten folgende Darstellungsmethode die beste. Von welcher Blutart man bei der Darstellung ausgeht, ist im Grunde genommen gleichgiltig, da alle Blutarten brauchbar sind. Pferde- und Katzenblut hat jedoch den Vortheil, dass es beim ruhigen Stehen die rothen Blutkörperchen, auf welche es uns hier gerade ankommt, zu Boden fallen lässt, so dass das

Serum sich klar darüber absetzt und leicht zu entfernen ist. Bei anderen Blutarten bedarf man, um diese Trennung hervorzurufen, entweder der Centrifuge oder der vorherigen starken Verdünnung mit physiologischer Kochsalzlösung. Entfernt man das Serum gar nicht, so gelingt die Darstellung zwar auch, man muss aber die Verbindung des Zinks mit dem Blutfarbstoff viel länger auswaschen, weil man eben das gesammte Serum durch Waschen entfernen muss, was natürlich weniger bequem ist, als wenn man es durch Absetzenlassen von vornherein beseitigt hat. Wo es sich um die therapeutische Verwendung des Zinkhaemoglobins oder des daraus darzustellenden Haemols¹⁾ handelte, wurde bisher immer von Rinderblut ausgegangen, da der Gedanke, ein Derivat des Pferdeblutes einzunehmen, vielen Patienten namentlich des weiblichen Geschlechtes unangenehm sein dürfte. Nach dieser Vorbemerkung gehe ich zur eigentlichen Darstellung über.

Etwa 100 Gewichtstheile frischen, defibrinirten, so gut als möglich von Plasma und Serum befreiten Blutes irgend eines Thieres, bei meinen Versuchen am besten des Pferdes, d. h., also 100 Gewichtstheile Blutkörperchenbrei werden mit

1) Siehe Anmerkung auf pag. 46.

dem 8- bis 10-fachen Volumen kohlenensäurehaltigen destillirten Wassers versetzt und an einem kühlen Orte in hohen Gefässen so lange stehen gelassen, bis sich am Boden des Gefässes ein deutlich wahrnehmbarer gut abgegrenzter gelblich-weisser Bodensatz von Stromata der rothen Blutkörperchen gebildet hat¹⁾. Darauf decantire man die sich über dem Bodensatz abgestandene schön rothgefärbte und klare neben anderen zurückgebliebenen Bestandtheilen des Blutes Haemoglobin enthaltende Flüssigkeit mittelst Heber ab und versetze sie mit etwa einem Drittel der verwendeten Menge Blutes, also mit 35—40 Gewichtstheilen möglichst reinen, namentlich arsenik- und eisenfreien Zinkstaubes und schüttele jetzt kräftig so lange, bis eine Probe des sich mittlerweile gebildeten braunen, chocoladenfarbi-

1) Diese zuerst von G. Semmer¹⁾ an Amphibien- und Vogelblut und nachher von Al. Schmidt²⁾ an Säugethierblut angewandte Methode der Gewinnung und Isolirung von Stromata der rothen Blutkörperchen hat leider in den existirenden Lehr- und Handbüchern der physiologischen Chemie, selbst bei O. Hammersten, der sich sonst in seinem Lehrbuche durchgehend der ausgesuchtesten Genauigkeit befeissigt, gar keine Berücksichtigung gefunden, trotzdem dieselbe die überall angeführte W o o l d r i d g e'sche³⁾ Methode an Einfachheit und Billigkeit bei Weitem übertrifft.

1) G. Semmer: „Ueber die Faserstoffbildung bei Amphibien und Vogelblut“. . . Inauguralabhandl. Dorpat 1874.

2) Al. Schmidt: „Ueber die Beziehung der Faserstoffgerinnung zu den körperlichen Elementen des Blutes.“ Pflüger's Archiv 1875. „Zur Blutlehre.“ F. C. W. Vogel's Verl. Leipzig 1892, p. 10.

3) O. Hammersten: Lehrbuch der physiologischen Chemie. 1891, p. 55.

gen Zn-Par-Hb-Niederschlag ein vollkommen farbloses Filtrat giebt. Darauf giesse man die ganze schaumdurchsetzte geschüttelte Masse wiederum in ein hohes Gefäss und lasse sie wiederum ruhig an einem nicht zu warmen Orte stehen.

Es sinkt hierbei der dem Zn-Par-Haemoglobin mechanisch beigemengte überschüssige Zinkstaub, — denn 100 Theile Blut vermögen viel weniger als 25 Theile Zink chemisch zu binden, — zum grössten Theile als unterste schwarzgrau erscheinende Schicht, über welcher Zn-Par-Hb-Niederschlag als sehr voluminöse, chocolbdenbraun gefärbte mittlere und das beinahe vollkommen entfärbte klare Wasser, welches zur Verdünnung des Blutes verwandt worden war, als oberste grösste Schicht sich absetzen. Hierauf hebere man vorsichtig die mittlere Schicht heraus, was natürlich nur unter Verlust eines Theiles derselben und nicht ohne doch etwas Zinkpulver mitzureissen möglich ist. Diesen abgeheberten Zn-Par-Hb-Niederschlag kann man jetzt nach Belieben durch wiederholtes Vermengen mit Wasser und Absetzenlassen, in welchem er vollkommen unlöslich ist, waschen und von den immer noch vom Blute herstammenden Salzen und anderen löslichen Bestandtheilen zum allergrössten Theile befreien. Nach genügendem Auswaschen des Präparates bringe man den Niederschlag auf ein Filter, wo

er durch Saugvorrichtungen bald so weit trocken gezogen werden kann, dass man ihn bequem von demselben abnehmen kann. Zum vollständigen Trocknen, welches bei einer nicht zu hohen Temperatur (etwa $+ 30^{\circ}$ C.) geschehen darf, da er sich sonst sehr leicht zersetzt, stelle man ihn im Trockenschrank oder irgend einem warmen Ort auf. (Da das Zn-Par-Haemoglobin, wie bereits in der Einleitung erwähnt wurde, in sehr vielen Lösungen, namentlich in kohlensaurem und carbaminsaurem Ammon mit schön rother Farbe leicht löslich ist und als solche Lösung stets das charakteristische Oxy-Hb-Spectrum aufweist, so kann eine etwaige Zersetzung des Präparates am Fehlen dieser Eigenschaften erkannt werden). — Nach dem Trocknen lässt sich das Präparat zu einem feinen, mehr oder weniger dunkelbraun gefärbten Pulver, je nach dem Wassergehalte, zerstoßen, zerreiben, durchsieben und als solches noch weiter unter dem Exsicator entwässern und unbegrenzt lange vollständig unverändert erhalten.

Wie erwähnt, lässt sich das dem Zn-Par-Hb-Niederschlage mechanisch anhaftende metallische Zink nur unter grossen Verlusten an Zeit und Zn-Par-Hb mittelst Schlämmen mit sehr viel destill. Wasser entfernen. Auch ist es anzunehmen, dass dem Präparate ausser diesem mechanisch beige-mengten Zink noch andere, vom Blute herstem-

mende Körper anhaften. Aus diesem Grunde wurde zwecks Erlangung eines noch reineren Präparates der ausgewaschene, also von allen in Wasser löslichen Substanzen gereinigte Niederschlag in einem seiner besten Lösungsmitteln und zwar in 5—10% Kohlensäurem Ammon gelöst, wiederum in hohe Gefässe zum Absetzen etwaiger ungelöster Theile gebracht und als solche abgestandene schön rothe, klare Lösung vom ungelösten die mutmasslichen Verunreinigungen enthaltenden Bodensätze abgehebert und filtrirt. Giesst man zu dieser filtrirten Lösung vorsichtig unter stetigem Umrühren verdünnte 0,5—1,0-procentige Essig- oder Salzsäurelösung bis zur fast neutralen Reaction zu, oder verdünnt man durch das 50—100fache Volumen destillirten Wassers, so fällt das Zn-Par-Hb als röthlich braun gefärbter, voluminöser, flockiger, leichter Niederschlag wieder heraus.

Dieser Niederschlag ist jetzt nochmals gut von der zur Fällung verwandten Säure, resp. von der betreffenden bei der Fällung gebildeten Ammonverbindung (Chlorammon oder essigsäures Ammon) auszuwaschen, wonach man mit ihm, wie mit dem rohen Zn-Niederschlage, verfahren kann, d. h., sammeln, trocknen, pulverisiren u. s. w. Nach dieser zuletzt beschriebenen Operation soll das Präparat alle seine beschriebenen Eigen-

schaften, vor Allem aber seine Löslichkeit in den angeführten Lösungsmitteln und sein charakteristisches, spectroscopisches Absorptionsvermögen bewahren, sonst ist es als zersetzt oder modificirt anzusehen. Es ist noch Folgendes bei der Besprechung dieses Darstellungsverfahrens zu bemerken:

1. Die in ihrer Intensität allerdings recht wechselnde Alkaleszenz des frischen Blutes wirkt beim Niederschlagen des Blutfarbstoffes in sofern störend, als zur Erzielung eines wasserklaren Filtrates ein unverhältnissmässig grosser Aufwand an Zeit, Mühe und theilweise auch an Zinkstaub nöthig ist, woher die Alkaleszenz durch Säure, am besten Essig- oder Salzsäure, bis zu fast neutraler Reaction abzustumpfen ist. Es muss hier bemerkt werden, dass nur die ursprüngliche, auf den Alkalien des Blutes beruhende Alkaleszenz abzustumpfen ist; beim Schütteln mit Zink nimmt nämlich das Gemisch, selbst wenn man vorher angesäuert haben sollte, bald wieder eine alkalische Reaction an. Diese secundäre Alkaleszenz beruht aber auf dem Zink und ist zum Zustandekommen der Fällung des Blutfarbstoffes nicht nur nicht schädlich, sondern nützlich. Es ist aber hier ausdrücklich zu betonen, dass es doch wiederholt gelungen war, durch längeres manchmal stundenlang fortgesetztes Schütteln vollkommen

frisches aus der Ader gelassenes, so wie defibrinirtes, als auch nicht defibrinirtes, also stark alkalisch reagirendes, Blut ohne jeglichen Säurezusatz vollkommen niederschlagen, folglich auch ein wasserklares Filtrat zu erzielen.

2. Die Entfernung der Stromata der rothen Blutkörperchen nach der Alex. Schmidt'schen Methode gelingt erst bei 8- bis 10-facher Verdünnung mit destillirtem Wasser unter gleichzeitigem Einleiten von Kohlensäure, wie ich durch wiederholte Versuche für Pferde-, Rinder-, Schafs-, Schweine- und frisches Menschenblut constatirt habe.

3. Falls man nicht auf Entfernung der Stromata der rothen Blutkörperchen ausgeht, genügt schon eine 2 bis 3fache Verdünnung des Blutes mit Wasser, um den Farbstoff vollständig nieder zu schlagen und klares Absetzen zu erzielen.

4. Die Menge des zum Niederschlagen verwendeten Zink-Staubes liess sich, ohne dass die Alkalescenz des Blutes dabei hätte abgestumpft werden müssen, verringern bis zum Verhältnisse von 1 Th. Zink zu 4 Th. Blut, wie es wiederholte Versuche gezeigt haben.

5. Statt des Zink-Staubes lässt sich eben so gut, nur natürlich in entsprechend grösserer Menge (etwa die Hälfte der unverdünnten Blutmenge)

nicht all zu fein pulverisirtes Zink verwenden. Theoretisch ist dies von Interesse, weil der Zinkstaub stets theilweise oxydirt ist, dieses Präparat aber nicht: es ist eben zur Fällung des Hb reines metallisches Zn auch ohne Beimischung von Zinkoxyd hinreichend.

6. Es ist empfehlenswerther grössere Mengen von nicht sehr fein pulverisirtem Zink, als geringere Mengen von dem sogenannten käuflichen Zink-Staub zu verwenden, da ersteres als specifisch schwereres und grobkörniges Präparat leichter und vollständiger aus dem Niederschlage durch Schlämmen, Absetzenlassen und Decantiren zu entfernen ist, als letzterer.

7. Es kann beim Auswaschen des Präparates von den in Wasser löslichen Bestandtheilen namentlich dann, falls dieses Auswaschen sich über zu lange Zeit hinzieht oder in zu ausgiebigem Maasse und in warmen staubreichen Räumen geschehen ist, oder, falls nicht frisches sondern bacterienhaltiges Wasser und Blut in Arbeit genommen worden war, vorkommen, dass die sich sonst stets wasserklar abstehende Flüssigkeit nicht klar wie Wasser ist, sondern gelblich, manchmal sogar schwach röthlich tingirt erscheint, da sie den Zn-Par-Hb-Niederschlag in feinsten Suspension enthält und am Absetzen verhindert.

Durch Zusatz von neuen Mengen Zink-Staub

und abermaliges Schütteln gelang es das suspendirte Zn-Par-Hb niederzuschlagen und das Wasser bis zur völligen Farblosigkeit zu entfärben. Dasselbe wurde gleichfalls erreicht durch Zusatz von einigen Tropfen einer gesättigten Kochsalzlösung: Das Zn-Par-Hb setzte sich sofort zu Boden und die Färbung des Wassers verschwand.

8. Dauert die Filtration des in kohlen saurem Ammon gelösten Zn-Par-Hb zu lange und ist die kohlen saure Ammonlösung zu concentrirt, so fand eine Umwandlung des Zn-Par-Hb in eine Modification statt, welche sich im genannten Lösungsmittel als unlöslich erwies. Daher ist eine nicht zu concentrirte, etwa 5—7% Kohlen saure Ammonlösung zu verwenden und das Filtriren möglichst rasch, vermittelst vieler kleiner Filter, zu bewerkstelligen. Eine Verdunstung des kohlen. Ammons kommt dabei auch mit in Betracht.

9. Das Wiederausfällen aus der kohlen sauren Ammonlösung geschieht am Besten durch Zusatz von viel Wasser (etwa der 50—100 fachen Menge), weniger gut durch Neutralisation mit sehr verdünnter Essig- oder Salzsäure-Lösung.

10. Das Trocknen des reinen, fertigen Präparates, welches in kohlen saurem Ammon gelöst und aus dieser Lösung wieder gefällt war, geschieht am Besten über Schwefelsäure und Chlorcalcium, bei nicht zu hoher Temperatur (höchstens

20—28° C.), denn bei Einwirkung von Wärme zersetzt sich dieses nunmehr reine Präparat noch leichter, als der rohe Zink-Niederschlag.

Anfangs gelang es mir fast niemals nach Lösung des ausgewaschenen und vom mechanisch beigemengten Zink zum grössten Theile gereinigten rohen Zinkniederschlags in kohlen-saurem Ammon dem Präparate seine ihm charakteristischen Eigenschaften zu erhalten: es verlor vollkommen sein Löslichkeitsvermögen fast für alle seine Lösungsmittel; nur in einigen concentrirten Säurelösungen schien es sich mit bräunlicher Farbe zu lösen, zeigte aber dabei keine irgend welche charakteristischen spectroscopischen Absorptionser-scheinungen. Ich fing sogar an, die Existenz einer Verbindung von Zink mit Haemoglobin zu bezweifeln und gab mich der Ansicht hin, dass das von K o b e r t beschriebene Zn-Par-Hb nur ein dem feinen Zinkstaube mechanisch anhaften-des, modificirtes Haemoglobin sei, als solches vom Zinkstaub beim Schütteln mit niedergerissen und durch alkalische Lösungsmittel, worin übri-gens auch das Oxy-Hb löslich ist, spectroscopisch wieder nachweisbar gemacht werden kann. Ob es aber aus seinen als kalischen Lösungsmitteln unverändert wieder gefällt werden könne, musste ich damals bezweifeln, da bei etwaiger zu star-

ken Concentration und zu langer Einwirkung des Lösungsmittels das Präparat in Haematin resp. Hämin, falls salzsäure beim Fällen verwendet wurde, sich zu zersetzen schien. Diese Voraussetzung ergab sich als berechtigt bei genauerer Prüfung einiger von mir dargestellten Präparate, wo eine nicht genügend verdünnte Salzsäure-Lösung zum Fällen des Präparats verwendet worden war und, wo ich mich keiner hinreichenden Vorsicht im Zusetzen der Säure beim Neutralisiren beflüssigt hatte. Ich machte darauf an den aus der kohlsauren Ammonlösung ausgefällten mutmasslich zersetzten und vom Zink befreiten Präparaten eine Reihe qualitativer Zinkanalysen, welche mir das überraschende Resultat ergaben, dass in allen Fällen das Präparat auch nach Lösung in kohlsaurem Ammon und nachheriger Fällung, sowohl feucht, als auch gewaschen und getrocknet in grosser Menge Zink enthielt. Dieser Befund wies mich darauf hin, dass es sich hier doch um eine feste Verbindung des Zinkes mit Haemoglobin handeln müsse, d. h. dass es also wirklich ein Zn-Par-Hb giebt. Ich stellte darauf neue Portionen des Präparates dar, wobei ich das Ausfällen des Präparates aus kohlsaurer Ammonlösung einfach durch sehr starke Verdünnung mit destillirtem Wasser und auch durch äusserst vorsichtige Neutralisation vermit-

telst sehr verdünnter HCl-Lösung und schliesslich das Trocknen im Exsiccator über Schwefelsäure und Chlorcalcium bei niedriger Temperatur bewerkstelligte, wodurch es mir gelang, ein Präparat zu erhalten, welches auch nach den beschriebenen Operationen sämtliche, dem rohen Zink-Niederschlag zukommende Eigenschaften, vor Allem das charakt. Oxy-Hb-Spectrum beibehalten hatte und diese auch jetzt noch nach monatelangem Aufheben besitzt.

In Anbetracht aber des Umstandes, dass die relativ grossen Mengen des Zinks in dem fertigen Zn-Par-Hb-Präparate möglicherweise von dem im Zn-Staube stets in grosser Menge enthaltenen ZnO ¹⁾, welches durch dasselbe kohlensaure Ammon ja leicht gelöst wird, herkommen könne, löste ich den rohen Zink-Niederschlag (zum Zwecke, ihn vom mechanisch beigemengten Zinkstaube zu reinigen) statt in kohlensaurem Ammon bei Vermeidung eines Ueberschusses in 10% Sodalösung. Das etwa vorhandene Zinkoxyd würde als kohlensaures Salz, welches nur im Ueberschusse von Soda löslich ist, vollständig herausfallen und durch Filtration leicht aus der Lösung des Zn-Par-Hb zu entfernen sein.

1) Д Менделѣевъ, Основы химіи IV. изд. 1881, стр. 695

Bei diesen Versuchen ergab es sich, dass der rohe Zn-Par-Hb-Niederschlag nur in gesättigteren Sodalösungen und nicht in verdünnten mit fast eben so schön rother Farbe löslich ist, wie in den andern erwähnten Lösungsmitteln, dass aber das Wiederausfällen des Präparates aus dieser Lösung, weder durch Verdünnung mit Wasser noch durch Neutralisation vermittelt Säure, ohne es dabei zu zersetzen, mehr möglich ist. Durch beide Verfahren wird es zu einem vorläufig noch nicht bestimmbar haematinartigen Körper zersetzt. Das Herausfällen aus der Sodalösung liess sich jedoch durch Zusatz von relativ recht grossen Mengen (bis zu etwa $1\frac{1}{2}$ fachen Vol.) von gesättigter Kochsalzlösung erzielen¹⁾. Der sich hierbei bildende Niederschlag ist von brauner mit einem Stich in's Graue behafteten Farbe, voluminös, und sieht sonst dem aus der kohlen-sauren Ammonlösung herausgefällten bis auf die Farbe ähnlich. Er lässt sich mit Leichtigkeit wiederum in derselben Sodalösung,

1) Anmerkung. Es wurde das Herausfällen des Präparates aus der Sodalösung auch durch Zusatz von krystallis. schwefelsaurem Ammon erzielt. Letzteres Verfahren konnte aber nicht Verwendung finden, da das Zn-Par-Hb beim Auswaschen vom zugesetzten schwefels. Ammon wieder in Lösung übergang, was beim Niederschlagen vermittelt concentrirter Kochsalzlösung nicht der Fall ist.

so auch gleichfalls in kohlen-saurem und anderen, wie, z. B. in Essig-, verdünnten Schwefelsäuren, und Ammon-Salzen (mit Ausnahme des Salmiaks, welcher im Gegentheil gleich dem Kochsalz das Zn-Par-Haemoglobin aus allen seinen Lösungen zur Ausscheidung bringt), sowie auch in einfachem, verdünntem und concentrirtem Ammoniak mit schön rother Farbe auflösen und zeigt in allen diesen Lösungsmitteln im Spectrum die nämlichen charakteristischen Oxy-Hb-Streifen.

Auch als von der concentrirten Kochsalzlösung durch Decantiren gut ausgewaschenes, getrocknetes und pulverisirtes Präparat behält dieser Niederschlag alle seine eben hergezählten Eigenschaften vollkommen bei.

Weiter wendete ich zum Lösen des Zink-Niederschlages und zum Zwecke der Reinigung vom überschüssigen metallischem Zink eine sehr verdünnte 0,25 % Schwefelammonlösung¹⁾, durch welche ja das nicht fest an's Haemoglobin gebundene Zink gefällt werden müsste, und welches, wie bereits erwähnt, auch ein sehr gutes Lösungsmittel für das Zn-Par-Hb ist. Nach Auflösung in Schwefelammon und Filtration der Lösung fällte ich es wieder durch verdünnte HCl.

1) Es wurde der officielle Liq. ammon. caustici mit H²S gesättigt und von diesem Präparat eine 0,25 % Lösung hergestellt. In Wahrheit ist diese viel dünner, als 0,25 % (NH⁴)²S entspricht.

Auch dieses Präparat verhielt sich gewaschen und getrocknet genau ebenso, wie die früheren.

An den auf die zuletzt beschriebenen Weisen dargestellten Präparaten wiederum ausgeführten qualitativen Zn-Bestimmungen ergaben, dass auch diese Präparate reichliche Mengen Zink enthielten. Also noch ein Umstand mehr, eine chemische Verbindung von Zink und Haemoglobin in unserem Zink-Niederschlage anzunehmen.

Ich legte mir weiter die Frage vor, ob es nicht möglich wäre denselben Körper darzustellen indem ich statt des Zn-Staubes, der wie bereits erwähnt unrein und ein Gemenge von Zinkoxyd und Zink darstellt, eine andere Zn-Verbindung zur Darstellung verwende.

Das nächstliegende war ja das Zinkoxyd. Ich musste mir aber vorher Klarheit verschaffen, ob man durch Schütteln des reinen zerkleinerten von ZnO vollständig gereinigten metallischen Zinkes auch allein an sich schon im Stande ist den Blutfarbstoff aus dem Blute niederzureissen. Ich reinigte mit schwachen Essig-, Schwefel- und Salz-Säuren und nachherigem gründlichen Auswaschen mit H₂O nach Möglichkeit einige Portionen von grobkörnigem pulversitirten Zink, von feinsten, käuflichen Zn-Staub und schüttelte sie mit Blut. Es gelang in allen Fällen

den Farbstoff vollkommen niederzureissen.

Darauf liess ich reines Zinkoxyd auf's Blut einwirken, mit gleichem Erfolge, d. h., in allen Fällen liess sich den Farbstoff als Bodensatz durch energisches, lang andauerndes Schütteln, auch ohne jedlichen Säurezusatz (!) mit dem Zinkoxyd niederschlagen, worauf stets wasserklares Absetzen folgte und als solcher Niederschlag wiederum in den schon mehrfach angeführten Lösungsmitteln mit rother Farbe auflösen. Auch diese Präparate behielten ihre spectroscopischen Eigenthümlichkeiten.

Durch diese Versuche ist die Möglichkeit eine chemischen Bindung des Zinkoxyds mit Haemoglobin sichergestellt.

Ich griff weiter zu anderen Zinkverbindungen und zwar zu einer Reihe von Zinksalzen.

I. Zink-Sulfat. Durch Zusatz dieses Zinksalzes sowohl in unaufgelösten Krystallen, als auch in Lösung zu Blutlösungen entsteht augenblicklich ein ziegelrother, sonst aber den beschriebenen, durch Einwirkung des Zn-Staubes und des Zn-Oxyds aufs Blut entstehenden Niederschlägen sehr ähnlicher, leichter, flockiger, sich sofort zu Boden absetzender, in Wasser vollkommen unlöslicher Niederschlag; daher durch letzteres sich

sehr gut von dem etwa überschüssigem im Wasser leicht löslichen Zinksulfat, sowie auch von übrigen in der Blutlösung enthaltenen Körpern auswaschen, sammeln lässt und welcher schliesslich wiederum in denselben Lösungsmitteln vor Allem aber besonders gut in einer nicht zu verdünnten (etwa 5%) Zink-Acetatlösung, dann weiter in einer gesättigten Lösung desselben Zinksalzes, durch dessen Einwirkung er entstanden, als auch in frisch aufgelösten Natriumsuperoxyd¹⁾ (Na_2O_2) Ammonhydrat, sehr verdünnten (0,1—1,0%) Schwefel-Ammon und Terpentinwasser²⁾, mit prachtvoll rother Farbe lösen lässt. In allen diesen Lösungen zeigt dieser Körper das nämliche, auch schon vielfach erwähnte Oxy-Hb-Spectrum. Auch ausgewaschen und getrocknet büsst dieser aus Zn-Sulfat dargestellte Niederschlag keines seiner aufgezählten Eigenschaften ein.

II. Durch Zusatz von derselben (5—10%) neutralen Zink-Acetatlösung, die soeben also ein besonders gutes Lösungsmittel für das Zn-Par-Hb hervorgehoben worden ist, zu Blutlösungen entsteht der nämliche ziegelrothe Nieder-

1) Das Natriumsuperoxyd Na_2O_2 ist auch für ander Blutfarbstoffderivate, namentlich für die von der Firma E. Menck gelieferten, Hämol, Hämogallol etc, welche sonst in wenigen Mitteln unzersetzt löslich sind, ein ausgezeichnetes Lösungsmittel.

2) Gemeint ist damit Wasser, welches mit Terpentinöl am Licht längere Zeit geschüttelt und dann abfiltrirt worden ist. Es reagirt bekanntlich sauer.

schlag, welcher seinerseits genau dieselben Eigenschaften besitzt, wie der aus Zinksulfat und Blut erhaltene. Zu erwähnen wäre hier noch, dass er sich ebenso gut in concentrirter Zinksulfatlösung löst, wie der eben vorher beschriebene (aus Zn-Sulfat dargestellte) sich seinerseits in Zink-Acetatlösungen gelöst hatte und, ausserdem noch, dass das auf beide Arten erzeugte Zn-Par-Hb in kohlen-saurem Ammon aufgelöst, sich aus dieser (letzten) Lösung wieder durch einfache Verdünnung mit Wasser fällen lässt und auch als solche Fällung nichts von seinen Eigenschaften und spectro-skopischem Verhalten einbüsst.

III. Mit *Zincum salicylicum* lässt sich gleichfalls mit der nämlichen Präcision der Blutfarbstoff als Zink-Par-Hämoglobin mit wasser-klaarem Absetzen darstellen. Nur ist der sich hierbei bildende Niederschlag von etwas mehr bräun-licher Farbe. In seinen Lösungsmitteln aufgelöst, weist auch das auf diese Weise gewonnene Prä-parat das charakteristische Oxy-Hb-Spectrum auf.

IV. Desgleichen lässt sich das Zn-Par-Hb auch durch Zusatz von Zinkchlorid zu Blut ge-winnen; Farbe dieses Niederschlages gleichfalls hellziegelroth; sofortiges rasches klares Absetzen. Dieses Präparat ist besonders leicht in Ammon-hydrat und Schwefelammonium löslich. In allen Lösungen Oxy-Hämoglobin-Spectrum.

V. *Zincum valerianicum* zu Blutlösungen zugesetzt verursacht auch sofort denselben ziegelrothen Niederschlag mit den nämlichen Eigenschaften.

VI. Dasselbe ist auch von der Einwirkung des *Zincum sulfocarboicum* und

VII. *Zincum tartaricum* zu sagen.

VIII. *Zincum lacticum* giebt mit Blut einen röthlich braunen Niederschlag. Mit:

IX. *Zincum sozodolicum*, sowie

X. *Zincum sulfothymolicum* geben Blutlösungen die nämlichen, sofort sich bildenden, rasch absetzenden Niederschläge, welche aber keine röthliche, sondern chacoladen bis dunkelbraune Färbung besitzen.

Hingegen wurde keine Fällung erhalten, auf Zusatz von folgenden Zink-Präparaten: 1) *Zincum carbonicum*, 2) *Zincum carbonicum basicum*, 3) *Zincum hydratum*, 4) *Zincum hypermanganicum*, 5) *Zincum ferrohydrocyanatum*, 6) *Zincum phosphoricum* und 7) Phosphorzink.

Schliesslich, um sich jeglichen Zweifels bezüglich der Reinheit des Präparates zu erwehren und, um die Gewissheit darüber zu erlangen, ob durch Zusammenbringen des vollkommen reinen Haemoglobins und verschiedener Zink-Verbindungen der näm-

liche Körper entsteht, wie bei Einwirkung des ursprünglich von Kobert verwendeten Zn-Präparates aufs Blut, unternahm ich eine Reihe von Versuchen mit drei mal umkrystallisirtem centrifugirten, zum Theil frischen, d. h., noch feuchten, zum Theil getrocknetem Haemoglobin und den bei den vorhergehenden Versuchen angewandten Zn-Präparaten. Zu diesem Zwecke musste ich mir natürlich zuerst vollkommen reines Oxy-Haemoglobin darstellen. Ich wählte die zuerst von A. l. S c h m i d t ¹⁾ angegebene Methode, welche ungemein einfach, sicher zum Ziele führend ist, leider aber gar keine Berücksichtigung in den Lehr- und Handbüchern gefunden hat, woher ich es auch für geboten halte, sie hier noch einmal kurz zu beschreiben:

Man presse den, womöglich von Plasma und Serum befreiten, flüssigen Blutkörperchenbrei durch einen reinen Lappen und füge zu demselben von einer in Bezug auf Concentration einer Normallösung nahezu gleichkommenden Ammonhydratlösung, deren Titre vorher auf Salzsäure genau bestimmt worden ist, so viel hinzu, bis der flüssige Blutkörperchenbrei eine lackfarbige Beschaffenheit angenommen, d. h., bis die Blutkörperchen aufgelöst worden sind. Darauf verdünne man diese Blutkörperchenlösung mit dem 4 fachen Vol. destillirten Wassers und setze jetzt vorsichtig, unter stetigem Umrühren (!), womöglich tropfenweise, von einer auf die verwendete Ammonhydratlösung eingestellte Salzsäurelösung bis zur vollständigen Neutralisation und schliesslich (nicht minder vorsichtig!) $\frac{1}{6}$ bis $\frac{1}{4}$ Vol. der jetzt ausmachenden Menge

1) l. c.

96° bis 92° Alcohol hinzu, worauf das Ganze in ein hohes Gefäss gegossen und an einen unter 0°C abgekühlten Ort gestellt wird. Nach einem bis drei Tagen, je nach der Temperatur der Umgebung, wird sich das Oxy-Hb bis fast zu dem Rande an den Wänden in nadelförmigen, mit blossen Auge schon erkennbaren Krystallen niedersetzen. Man rühre jetzt die Krystalle sammt der Lauge vermittelst Glasstab gründlich um und lasse sie wiederum etwa 12 Stunden ruhig in der Kälte stehen, worauf sie sich sämmtlich zu Boden gesenkt haben werden, wodurch eine Entfernung vermittelst Heber der sich drüber abgestandenen Mutterlauge nunmehr ohne jegliche Verluste an Krystallen ermöglicht wird.

Jetzt wasche man mit dem $1\frac{1}{2}$ Vol. dest. Wassers die Krystalle und centrifugire. Um sie noch einmal um zu krystallisiren löse man sie weder in 3 fachen Vol. dest. Wassers und derselben Ammoniumhydratlösung, bis zur völligen Auflösung der Krystalle (lackfarbiges Aussehen der Haemoglobinlösung), neutralisire völlig abermals mit HCl und setze $\frac{1}{5}$ Vol. der jetzt ausmachenden Menge 96° Alcohol unter den nämlichen Cautelen wie das erste Mal zu und stelle die Haemoglobinlösung schliesslich wieder an einen unter 0°C abgekühlten Ort etc. Beim nochmaligem Umkrystallisiren ist, falls man sich abermalige grössere Verluste an Krystallen ersparen will, beim Lösen der Krystalle noch weniger, als vorher dest. Wasser, aber dafür dem entsprechend mehr Ammonhydratlösung und Salzsäure zu verwenden. Es ist ersichtlich, dass ein derartiges Sparen von Material auf Kosten der Reinheit der Krystalle geschehen würde.

Nachdem ich mir ein ausreichendes Quantum von Oxy-Hb-Krystallen aus Pferde- und Hundeblut nach der eben beschriebenen Vorschrift dargestellt hatte, prüfte ich sämmtliche bei den vorhergehenden Versuchen angewandten Zn-Präparate der Reihe nach noch einmal in Bezug auf ihre Einwirkung sowohl auf den halbflüssigen, nicht völlig aufgelösten Krystallbrei, als auch auf dessen

Lösungen durch, wobei es sich herausgestellt hatte, dass sich der Blutfarbstoff in präzisester Weise vollkommen fällen liess: 1. durch Schütteln mit Zink-Staub; 2. durch Schütteln mit *Zincum pulveratum*; 3. durch Schütteln mit Zink-Oxyd; 4. auf Zusatz von Zink-Sulfat; 5. Zink-Aetat; 6. *Zincum muriticum*; 7. *vallerianicum*; 8. *sulfo carbonicum*; 9. *lacticum*; 10. *Sozodolicum*; 11. *Sulfothymolicum*; 12. *Tartaricum*. Mit anderen Worten: Hb-Lösungen gaben mit genau denselben Zn-Präparaten, mit welchen auch Blutlösungen Fällungen gegeben hatten, einen Niederschlag der sich in nichts von dem beschriebenen Zn-Par-Hb unterscheidet. Es muss aber hier erwähnt werden, dass in einigen Fällen beim Zufügen von einigen der hier soeben aufgezählten Zn-Salzen zu Hb-Lösungen nicht sofort das Hb- zu Zn-Par-Hb niederschlagen wurde und zwar in denjenigen Fällen, wo die an sich schon eine Spur sauer reagirende Hb-Lösung durch das vielleicht nicht ganz neutrale etwas saure Zinksalz in Lösung erhalten wurde. Bei Zusatz von einer Spur einer verdünnten Ammonlösung erfolgt sofort die in diesen wenigen Fällen ausgebliebene vollständige Fällung des Hb. (Also Zn war in der Lösung genügend vorhanden.

Zum Schlusse sei noch gesagt, dass auch diese Niederschläge sämmtlich von ziegelrother Farbe sind und, dass sie in Bezug auf Löslichkeit und spectroskopischen Eigenschaften das nämliche Verhalten aufweisen, wie alle vorher beschrieben.

Nach wiederholtem Anwaschen verändern sämmtliche ziegelrothen Niederschläge allmählig, — in etwa zwei Tagen — ihre Farbe: sie nehmen einen bräunlichen Farbenton an und sind schliesslich ganz chocoladenbraun gefärbt. Dasselbe ist auch von sämmtlichen aus Blutlösungen und Zinkpräparaten entstehenden Niederschlägen zu sagen. Trotz dieser langsam eintretenden Farbenveränderung, was vielleicht von einem langsam von statten gehenden chemischen Umsetzungsprocesse zeugen könnte, verlieren diese verschiedenen Niederschläge keine ihrer anderen beschriebenen Eigenschaften. Es liesse sich allenfalls vielleicht nur behaupten, dass die gut ausgewaschenen, also schon braun gewordenen Niederschläge, sowohl feucht, als namentlich getrocknet in ihren besten Lösungsmitteln etwas schwerer löslich sind, als die ungewaschenen frischen, ziegelrothen Niederschläge.

Auf Grund der zuletzt gemachten, eben beschriebenen Erfahrungen über die Einwirkung der

Zinksalze auf Hb-Lösungen, konnte ich mit grösserer Sicherheit an die Darstellung eines, wenn auch nicht vollends, so doch wenigstens nahezu chemisch reinen Präparates gehen. In der That kann ja, z. B., das aus Hb + ZnO entstandene Zn-Par-Hb nur eine Verunreinigung von einem dem Präparate mechanisch anhaftendem etwa überschüssigem ZnO bestehen, was durch Schlemmen und Absetzenlassen des Niederschlages in hohen Gefässen, so auch auf folgende Weise, deren auch ich mich in einigen Fällen bei der Darstellung bedient hatte, geschehen kann: Man löst den frischen Niederschlag in sehr verdünntem Ammonhydrat auf und fällt bei Zimmertemperatur (besser bei etwa $+ 18^{\circ} \text{C}$) durch eine etwa 50—100 fache Verdünnung mit Wasser. Auch bedingt schon das Entweichen von Ammoniakgas aus der Lösung, allerdings nicht mit gleicher Präcision und Schnelligkeit die Fällung des unveränderten Zn-Par-Hb- aus der filtrirten Lösung.

Ausser auf die eben beschriebene Weise habe ich mir ein reines Präparat noch durch Einwirkung von ZnCl_2 auf Hb-Lösungen dargestellt. Ich hatte hierbei die überaus empfindliche Reaction des Chlor und der Chloride auf salpetersaures Silber im Auge, welche mir eine gewisse Garantie dafür gewähren kann, dass das Präparat vom Chlor, also

auch vom etwaigem überschüssigem ZnCl_2 vollkommen ausgewaschen worden ist.

Nachdem ich mir ein genügendes Quantum eines nahezu chemisch reinen Präparates dargestellt hatte, unternahm ich an demselben eine Reihe quantitativer Zink- und Eisen-Bestimmungen.

Bei den Zinkbestimmungen kam es hauptsächlich darauf an, die organische Grundlage des Präparates derart zu zerstören, dass dabei nichts vom Zinke verloren gehen konnte. Nach einigem Herumprobiren und, nach vergeblichen Versuchen, das Zn-Par-Hb auf die Fresenius-Babo'sche Art ¹⁾ vermittelst chlorsaurem Kalium und Salzsäure in der mir zur Verfügung gewesenen Zeit vollständig zu zerstören wählte ich die Methode der Zerstörung durch vorsichtiges Erhitzen mit Kaliumcarbonat und Kaliumnitrat bei möglichst niedriger Temperatur, wobei eine Verflüchtigung des Zinkes nicht zu befürchten war und, wobei ich rascher zum Ziele gelangte.

Nach Zerstörung und Veraschung des Präparates trennte ich das Zink vom Eisen durch Kochen der HCl-sauren und vermittelst Bromwasser oder Salpetersäure oxydirten Auflösung der Asche

1) An. d. Chem. und Pharm. Bd. 49 p. 308. Fresenius. Anl. z. qual.-chem. An. Husemann. Hdb. d. Toxicol. Berlin, Reimer 1882 p. 211. citirt nach G. Dragendorff, Ern. v. Giften Göttingen 1888 p. 343.

mit Na-Acetat, nachdem ich vorher die saure Reaction durch eisenfreies Natriumcarbonat bis zur beginnenden Trübung neutralisirt hatte. Das Eisen wurde als basisch essigsaures Eisenoxyd apart gesammelt und in einigen Fällen quantitativ bestimmt. Aus dem vom Eisen getrennten Filtrate wurde das Zink durch Kochen und gleichzeitigem Zusatz von Natrium-Carbonat bis zur vorwaltend alkalischen Reaction und unter Einhaltung der üblichen bei Fresenius (Th. I p. 249) angegebenen Regeln als basisch, kohlen-saures Zink gefällt darauf gesammelt, getrocknet, vom Filter abgenommen und mit dem vorher mit Ammoniumnitrat durchfeuchteten, nachher nochmals getrockneten Filter zusammen geglüht und als Oxyd bestimmt.

Einige quantitative Zn- und Fe-Bestimmungen.

An. I. 1,9512 g. des aus $ZnCl_2$ und zwei mal umkrystallisirtem Hunde-Hb dargestellten, bis zum verschwinden der Cl_2 -Reaction ausgewaschenen, getrockneten, pulverisirten, darauf abermals ausgewaschenen, und bei $+ 110^{\circ} C.$ getrockneten Zn-Par-Hb werden mit Kaliumcarbonat und Kaliumnitrat vorsichtig bei möglichst niedriger Temperatur verascht. Die Menge des Zinkes und des Eisens wird nach dem oben beschriebenen Verfahren als Oxyd bestimmt.

Die Menge des Zinkoxydes betrug 0,026 g. woraus 0,0208 = Zn berechnet wurde, was **1,06%** Zink ausmacht.

An. II. 0,5126 des nämlichen Präparates werden in gleicher Weise verascht und die Zink-Menge als Oxyd bestimmt.

Die Menge des gefundenen ZnO betrug 0,0064 woraus sich 0,00513 Zn berechnen lassen, was einen **0,975%** Zinkgehalt im Präparate ausmacht.

Die Eisenmenge wurde bei dieser Analyse nicht bestimmt, da durch ein Versehen bei dieser Analyse, nicht völlig eisenfreies Na-Carbonat verwendet worden war.

An. III. 3,0 g. desselben Präparates werden verascht. Die Menge

des ZnO betrug = 0,0371 g.

„ Fe₂O₃ „ = 0,0169 „

was einen Gehalt von

0,0297 g. an reinem Zn und

0,0118 „ „ „ Fe

oder **0,99%** Zink

und **0,399%** Eisen ausmacht.

An. IV. 2,10 g. werden verascht und in der Asche nur das Eisen als Oxyd bestimmt. Die Menge des Fe₂O₃ betrug = 0,01195 was einen Gehalt von 0,008358 an reinem Fe₂ und **0,401%** ausmacht.

Der Mittelwerth für den Zinkgehalt be-

trägt den angeführten Analysen zu Folge **1,008%** und für den Eisengehalt **0,406%**.

Der Procentgehalt des Zinkes ist von mir für das reine Zn-Par-Hb im Vergleiche mit dem von der Firma E. Merck in Darmstadt für das Handelspräparat bestimmten (1,54%)¹⁾ niedriger gefunden worden, was seinen Grund darin hat, dass ich zu meinen Analysen ausschliesslich aus zwei mal umkrystallisirtem Hb und reinen Zink-Salzen darstellte verwandte, während die Firma E. Merck zu Handelszwecken ihr Zn-Par-Hb²⁾ etc. sicher nicht aus krystall. Hb und reinen Zn-Salzen bereitet (letztere Darstellungsweise ist ihr noch ganz unbekannt) sondern rationeller Weise einfach

1) Citirt nach A. Sacher „Zur Kenntniss der Wirkung der Zinksalze“.

2) Es ist an dieser Stelle zu erwähnen, dass die Firma E. Merck in Darmstadt den von K o b e r t als Zn-Par-Hb beschriebenen Körper ursprünglich als Hämol in den Handel gebracht hat. Später lieferte diese Firma schon eine ganze Reihe aus dem Zn-Par-Hb hervorgegangener Präparate, wie Zink-Hämol, Hämol, entzinktes Hämol etc. welche sich alle im Wesentlichen durch ihren verschiedenen Zinkgehalt durch ihr verschiedenes Löslichkeitsvermögen von einander, namentlich aber vom reinen Zn-Par-Hb unterscheiden.

Bei der spectroscopischen Untersuchung dieser Handelspräparate wird es vielleicht nicht immer möglich sein ein von K o b e r t und mir für das reine Zn-Par-Hb festgestellte characteristische Oxy-Hb-Spectrum nachzuweisen. Doch lässt sich an diesen Präparaten bei entsprechender Behandlung ohne Mühe das Hämochromogen- und Hämotoporphyrinspectrum H o p p e - S e y l e r¹⁾ nachweisen, was ihre Herkunft von Blutfarbstoff documentirt.

1) H o p p e - S e y l e r. H. Virch. Zeitschrift f. d. gesammte Med. 3. Folge, Bd. IV. 1892. Heft 1. (Krenner.)

aus Blut, wobei eine etwaige Fällung anderer im Blute enthaltenen Körper sehr leicht denkbar ist. Auch ist zu bezweifeln, dass ein zu Handelszwecken dargestelltes Präparat in dem Masse von überschüssigen Zink gereinigt werden kann, wie das, welches ich mir für analytische Zwecke dargestellt habe.

Dahingegen ist der von mir gefundene Eisengehalt höher, als der von Merck für sein Präparat gefundene, was sich in gleicher Weise erklären liesse.

Betrachtungen über die therapeutische Verwendbarkeit des Präparats.

Ueber die therapeutische Verwendbarkeit des Zn-Par-Hb kann man zur Zeit, wo noch gar keine eingehenderen Versuche an Menschen (bei in Betrachtung kommenden Krankheiten, wie Chlorose, Anämie, Darmgeschwüre etc.) vorliegen, publicirt worden sind, nichts Bestimmtes aussagen.

Ich selbst habe an mir die Resorbirbarkeit dieses Eisenpräparates zu prüfen gesucht, indem ich mir das Mittel ¹⁾ per os applicirt und die Eisen-

1) Da diese Analysen vor ungefähr 1½ Jahren, d. h., zu einer Zeit, wo noch gar keine Untersuchungen über die Unschädlichkeit des im Präparate enthaltenen Zinkes vorlagen, so nahm ich der Vorsicht wegen das schon damals von E. Merck dargestellte sogen. „entzinkte Hämol“ ein. Dieses Präparat aber war nicht, wie man vielleicht aus dem Namen schliessen könnte völlig frei von Zink. Im Gegentheil, es enthielt, immer noch eine nicht unbeträchtliche Menge Zink.

ausscheidung durch den Harn vor, während und nach der Einnahme desselben nach der von D a m a s k i n ¹⁾ ausgearbeiteten Methode controlirt habe. Ich lasse gleich hier einige solcher Harnanalysen folgen von denen die Protocolle der ersten Reihe der Uebersichtlichkeit wegen genauer ausgeführt worden sind. Es wurde durchgehend die in 24 Stunden ausgeschiedene Harnmenge in Arbeit genommen.

1. Tag. 21./22. XI. 1891.

Harnmenge = 975 Cem.	Verbr. Zn = 1,62
Spec. Gew. = 1027	Enthaltend = 0,314928 mg. Fe.
Titre 1 Cem. = 0,9634 mg. Fe.	(1 g. Zink = 0,1944344 mg. Fe.)
Verbraucht = 1,60	1,445100
— 0,10	— 0,314928
1,50	1,130172 mg. Fe.
	= 1,130 mg. Fe.

2. Tag. 22./23. XI. 1891.

Harnmenge = 1230 Cem.	Verbr. Zn = 1,91
Spec. Gew. = 1029	Enthaltend = 0,371304 mg. Fe.
Titre 1 Cem. = 0,9634 mg. Fe.	(1 g. Zink = 0,1944344 mg. Fe.)
Verbraucht = 1,70	Vorhanden im Harn
— 0,2	1,44310
1,5	0,371304
	1,071796 mg. Fe.
	= 1,071 mg. Fe.

3. Tag. 23./24. XI. 1891.

Diese Analyse ist beim Veraschen verloren gegangen.

1) D a m a s k i n N. „Zur Bestimmung des Eisengehaltes des norm. u. path. Menschenharnes.“ Arbeit des pharmakol. Instituts zu Dorpat, herausgeb. v. Prof. Dr. R. Kobert. Bd. VII. p. 40, bei Enke Stuttgart 1891.

D a m a s k i n N. Desgleichen Dissertation Dorpat, 1891.

4. Tag. 24./25. XI. 1891.

Harnmenge = 1380 Cem.	Verbr. Zn = 1,85
Spec. Gew. = 1024	Enthaltend = 0,359640 mg. Fe.
Titre 1 Cem. = 0,9634 mg. Fe.	(1 g. Zink = 0,1944344 mg. Fe.)
Verbraucht = 1,65	Vorhanden im Harn
— 0,10	1,493270
1,55	0,359640
	1,133630 mg. Fe.

Zusammenfassung der Ergebnisse dieser Reihe: I.

Tag	Harnmenge.	Spec. Gew.	Eisenmenge.	Datum.	Bemerkungen.
1.	975	1027	1,130 mg. Fe.	21/22	Constante Diät.
2.	1230	1029	1,071 „ „	22/23	
3.	verloren			23/24	
4.	1380	1024	1,133 „ „	24/25	

Durchschnitt pro Tag = 1,111 mg. Fe.

Versuchsreihe II im Anschlusse an I: 20 mgr. Fe
in Form von Zink-Hämol eingenommen.

Tag	Harnmenge.	Spec. Gew.	Eisenmenge.	Datum.	Bemerkungen.
1.	975	1027	1,130 mg. Fe.	21/22	Constante Diät.
2.	1230	1029	1,071 „ „	22/23	
3.	verloren			23/24	
4.	1380	1024	1,133 „ „	24/25	
5.	1270	1028	1,168 „ „	25/26	D. 26./XI. 91 2,0 g. Hämol (Abends).
6.	1270	1029	1,198 „ „	26/27	Desgleichen noch am Abend d. 27./XI. 2,0 g. Hämol.
7.	1120	1030 (!)	verloren	27/28	
8.	1180	1028	2,979 „ „	28/29	Constante Diät.
9.	1200	1027	1,200 „ „	29/30	

Wir ersehen aus den angeführten Tabellen, dass der Eisengehalt des Harnes schon gleich nach der ersten Einnahme eine geringe und nach den beiden anderen eine recht beträchtliche Steigerung aufweist; doch erfolgt die Ausscheidung nicht sofort am nächsten, sondern erst am 3. Tage nach der letzten Einnahme von 2,0 g. Hämol, was mit den (schon früher) von Chr. Busch¹⁾ bei seinen Versuchen mit einer Reihe anderer organ. Eisenpraeparate gewonnenen Resultaten übereinstimmen würde. Der Organismus hält das aus dem organischen Eisenpraeparate aufgenommene Eisen auf, um es dann als überflüssiges und in für ihn ausscheidbaren Form langsam wieder auszuscheiden. Nimmt man an, als durchschnittliche Normalzahl die aus meiner sub I angeführten Tabelle sich ergebende Zahl 1,111 (mg.) an, so sind, — selbst falls man die verloren gegangene Analyse des siebenten (7) Tages völlig ausser Acht lässt oder etwa annimmt, dass an dem Tage vielleicht gerade nicht mehr als normal ausgeschieden worden ist —, im Ganzen **2,101** mg. Fe ($6,545 - 4,444 = 1,101$ oder $7,656 - 5,555 = 2,101$) oder **10,55%** der im Ganzen

1) Chr. Busch: „Ueber die Resorbirbarkeit einiger organischer Eisenverbindungen.“ Arbeiten des pharmakol. Institutes zu Dorpat, Bd. VII, 1891, p. 85. Desgl. Dissert. Dorpat, 1891.

eingenen Eisenmenge wieder ausgeschieden worden, wobei es natürlich unentschieden bleibt, wie viel von den eingenommenen 20 mg. Eisen im Ganzen resorbirt worden ist, da ja die Ausscheidung durch den Darm, wie sie von G. Bunge, Jacoby u. anderen und in letzter Zeit von A. Samojloff¹⁾ und Lipski²⁾ auch auf mikroskopischem Wege zur Genüge bewiesen worden ist, mit ins Gewicht fällt. Es lässt sich schwer verschweigen, dass all' die angeführten Resonnements nicht frei von einiger Willkür sind; jedoch geht aber trotz dieses berechtigten Einwandes doch aus der angeführten Versuchsreihe noch soviel hervor, dass das Zn-Par-Hb resorbirbar ist, was auch durch die nachher von Lipski³⁾ und Sacher⁴⁾ gleichfalls im hiesigen Pharmakologischen Institute mit Haemol an Hunden und Katzen ausgeführten Versuchen aufs Praeciseste dargethan worden ist.

Doch neben dieser guten erwünschten Eigenschaft des Präparates leuchtet eine minder erwünschte entgegen: aus den Versuchen von Lipski und Sacher geht unter Anderem

1) A. Samojloff. Ueber das Schicksal des Eisens im thierischen Organismus. Dissert. Dorpat 1892.

2) Lipski. Ueber die Ablagerung und Ausscheidung des Eisens aus dem thierischen Organismus. Dissert. Dorpat 1893.

3) l. e.

4) Desgl. l. e.

auch noch hervor, dass eine Resorption des Zink-complexes im Präparate nicht zu den Unmöglichkeiten gerechnet werden darf, was immerhin einige Bedenken gegen das Präparat erwecken könnte. Es ist hierbei aber zu berücksichtigen, dass Lipski und Sacher relativ kleine Hunde und Katzen mit relativ sehr grossen Dosen Hämol und lange Zeit hindurch ihre Hunde gefüttert haben. Bei einer rationellen Anwendung des Zn-Par-Hb dürften meiner Versuchsreihe zufolge schon die kleinsten Dosen, -- Bruchtheile eines Grammes, -- genügen, um einen therapeutischen Erfolg zu ermöglichen.

Es erübrigt noch zu besprechen, bei welchen Krankheiten das Zn-Par-Hämoglobin zur Anwendung kommen könnte. Ich meine, dass namentlich zwei Krankheiten zu nennen sind: nämlich erstens diejenige Form der Chlorose, bei welcher sich multiple kleine Darmgeschwüre finden und zu den zuerst von Hösslin beschriebenen multiplen Blutungen führen. Bei dieser Krankheit würde unser Präparat durch seinen Zn-Gehalt die Geschwüre adstringierend beeinflussen und durch seinen Par-Hb-Gehalt blutbildend und damit vielleicht heilbringend wirken können.

Die zweite Krankheit würden erschöpfende Durchfälle sein, denn wir wissen durch Quincke und seine Schüler, dass z. B. bei der Sommer-

diarrhoe binnen wenigen Tagen eine sehr erhebliche, tiefgreifende Hb-Zersetzung stattfindet. Unser Präparat würde in diesem Falle erstens den Ausfall an Hb decken und zweitens stopfend wirken, denn wir wissen, dass schon das Hämol den Stuhl anhält. Vom Zn-Hämol dürfte daher eine weit erheblichere stopfende Wirkung zu erwarten sein, als ja alle nicht ätzende Zink-Präparate antidiarrhoisch wirken.

Um endlich auf die in Aussicht stehende Choleraepidemie zu kommen, so dürfte in der Reconvalescenz derselben, wo man stopfende Tonica nöthig hat, das Zn-Hämol ebenfalls therapeutisch verwerthbar sein.

Inhaltsverzeichnis.

	Seite.
I. Uebersicht der Litteratur	7
II. Eigene Versuche	18
Versuche über die Einwirkung des Zink-Staubes auf's Blut	18
Versuche über die Einwirkung des ZnO-freien Zink-Staubes auf's Blut	33
Versuche mit reinem Zink-Oxyd	34
Versuche mit diversen Zink-Salzen	34
Versuche über die Einwirkung verschiedener Zink Präpa- rate auf reines, zwei mal umkrystallisirtes Oxy-Hb	37
Beschreibung der Darstellungsmethode der Oxy-Hb-Kry- stalle nach Alex. Schmidt	38
Darstellung eines nahezu chemisch reinen Präparates . .	41
Quantitative Zink- und Eisenbestimmungen des Zn-Par-Hb	43
Betrachtungen über die therapeutische Verwendbarkeit des Zn-Par-Hb	44
Thesen.	

Thesen.

1. Die subcutane Application von anorganischen Eisenpräparaten ist zu verwerfen.
2. Das Zink kann analog dem Eisen in seinen organischen Verbindungen maskirt sein.
3. Der Farbstoff des Serums ist gleich dem Hämoglobin durch metallischen Zinkstaub fällbar.
4. Das krystallisirte Oxy-Hämoglobin ist auch im trockenen Zustande als solches haltbar.
5. Phenocollum hydrochloricum vermag bei Malaria - Affectionen die Chininpräparate nicht zu ersetzen.
6. Zur Entscheidung über die Zuträglichkeit oder Schädlichkeit der verschiedenen Arten des Sportes sollten nur die in Sportsachen selbst vertrauten Mediciner hinzugezogen werden.