

Посвящается памяти † проф. А. А. Панормова.

К методике получения стойких кристаллов гемоглобина.

Д-ра В. Р. Дмитриева.

В русской литературе совершенно нет подробных указаний на способы получения кристаллического гемоглобина, и нам кажется, что для врачей будет небезинтересно познакомиться с ними.

В нашей лаборатории исследованием гемоглобина занимался мой уважаемый учитель, покойный проф. А. А. Панормов, еще с 1910 года. Им была проделана в этой области очень большая работа, и накоплен обширный сырой материал, который будет впоследствии обработан и опубликован. По его предложению и я занялся исследованием гемоглобина коровьей крови.

Микроскопические кристаллы этого гемоглобина были получены еще Kunde в 1852 году. Однако добыть эти кристаллы в больших количествах исследователям, работавшим после Kunde, не удалось в виду их легкой растворимости. При этом с подробными аналитическими результатами по данному вопросу имеется в литературе только одна работа Hufner'a. Что касается работы Butterfield'a, появившейся через 22 года после Hufner'овской, то ее автор, получив гемоглобин коровьей крови по способу Horpe-Seyley'a, при помощи центрифуги, делавшей 2000—2400 оборотов в 1', определял в нем лишь одно железо.

Hufner, взяв в основу тот же метод Horpe-Seyley'a, получал кристаллы гемоглобина коровьей крови таким образом: свежedefибринированная кровь коровы отделялась от сыворотки механически, центрифугированием в цилиндрах при 900—1000 оборотах в минуту, продолжавшимся более 2 часов; после этого сыворотка сливалась, кашица кровяных телец перемешивалась с равным объемом физиологического раствора поваренной соли, смесь центрифугировалась еще раз и растворялась в центрифугальных цилиндрах, при осторожном встряхивании, при температуре 30—40° С, в дистиллированной воде, которая предварительно кипятилась и опять охлаждалась до указанной температуры; к охлажденному до 0° раствору гемоглобина прибавлялась небольшими порциями $\frac{1}{3}$ по объему охлажденного до 0° чистого спирта, смесь встряхивалась и оставлялась стоять в охлаждающей смеси из льда и поваренной соли от 24 до 48 часов. Полученные кристаллы центрифугировались и промывались смесью из воды и спирта. Чтобы избежать растворения их во время центрифугирования (так как смесь в это время постепенно нагревается), Hufner покрывал всю центрифугу точно пригнанным цинковым ящиком, который наполнял охлаждающей смесью. Получившаяся кристаллическая масса растворялась с целью перекристаллизации, и такая пере-

кристаллизация делалась 3 раза, причем получались красные кристаллы иглообразной формы. Кристаллическая кашица последней кристаллизации раскладывалась на пористой глиняной пластинке и оставлялась стоять над серной кислотой при 8° около 24 часов. Высушенные таким образом кристаллы легко растворялись в воде обыкновенной температуры, причем раствор их перед фотометром давал правильное частное число $\frac{E'_0}{E_0}$ разбавленной насыщенной кислородом крови. В пепле 10 граммов кристаллической субстанции Hüfner находил невесомые следы фосфорной кислоты, что указывает на не вполне чистый препарат, ибо фосфора не только в гемоглобине млекопитающих, но и птиц нет (см. статью д-ра А. Н. Полякова в № 3 „Каз. Мед. Журнала“ за тек. год).

Мы получали кристаллы коровьего гемоглобина, пользуясь способом нашей лаборатории, который представляет из себя существенное изменение способа Horre-Seuyley'a. Один литр дефибринированной крови центрифугировался при 1500 оборотах в 1' в течение одного часа, осевшие кровяные шарики сливанием освобождались от сыворотки и лейкоцитов, промывались 20% раствором NaCl в центрифугальных банках емкостью в 500 куб. сант. и снова центрифугировались. Промывание повторялось 2—3 раза. Промытая кашица кровяных шариков начисто смывалась дистиллированной водой сначала в градуированный цилиндр—для измерения объема, затем в колбу, куда при постоянном взбалтывании приливалась вода и 100 к. с. эфира с таким расчетом, чтобы получился один литр лакового раствора. Последний центрифугировался еще раз в течение одного часа, чтобы по возможности отделить строу шариков. Сливался в банку, охлаждался на открытом воздухе за окном до 0° (работа с гемоглобином производилась зимой), и к нему, при энергичном встряхивании, очень медленно прибавлялся охлажденный до 0° 95% алкоголь в количестве 40—50 куб. сант. на 100 куб. сант. раствора; после этой процедуры смесь выставлялась на холод, где несколько раз встряхивалась.

При температуре от 5° до 10° вся смесь в короткое время превращалась в густую кристаллическую массу. Под микроскопом при комнатной температуре в ней видны были большие, длинные, шестисторонние призмы красного цвета с приставшей к ним кое-где строюй. Для перекристаллизации полученная кристаллическая масса переливалась в холодные центрифугальные банки и центрифугировалась в течении 3—5 минут (при более длительном центрифугировании оседала строма), после чего маточный раствор сливался, кристаллическая кашица промывалась охлажденным до 0° раствором из 100 куб. сант. воды, 40 куб. сант. спирта и 1—1,5 куб. сант. эфира и снова центрифугировалась. Затем жидкость сливалась, кристаллы растворялись в возможно малом, измеренном количестве воды и снова выкристаллизовывались при тех же условиях. После второй кристаллизации кристаллы получались более стойкие и более чистые, приставшей к ним строуы под микроскопом видно не было,—она плавала между ними в очень малом количестве.

Перед пятой перекристаллизацией раствор фильтровался, и после этого получались очень стойкие кристаллы, которые при комнатной температуре не расплывались в течение долгого времени. Кристаллы эти фильтровались через гладкий фильтр, отжимались и высушивались между

бумагой. Полученные засохшие комочки легко растирались в ступке в мелкий порошок красно-коричневого цвета. Из одного литра крови получалось 65 грм. воздушно-сухих кристаллов.

Чистота полученного препарата Hüfner'ом определялась фотометрически, что более сложно и требует дорого стоящего аппарата. Наша проба на чистоту препарата производилась гэмометром Fleischl-Miescher'a по способу, предложенному проф. А. А. Панормовым, таким образом: из 1 куб. сант. раствора гэмоглобина делалось разведение, и определялось число на шкале гэмометра, после чего узнавался вес сухого остатка в 1 куб. сант. того же раствора; отношение найденного числа к весу и было критерием чистоты, если оно не давало резких колебаний. Разведение делалось такое, чтобы полученные на шкале числа не превышали 40. Это производилось с тем расчетом, чтобы, во первых, ошибка в наблюдении была приблизительно одинакова, во-вторых, в этом районе не получалось резких колебаний при отдельных определениях.

Полученные нами после различных кристаллизаций данные приведены в нижеследующей таблице:

№ кристаллизации	Разведение	Число Fleischl'a в районе	Вес сухого остатка	Отношение
После 3-й	1:1000	31,6	0,2456	128,7
» 4-й	1:1000	29,35	0,2504	117,2
» 5-й	1: 800	24,8	0,1719	115,36
» 6-й	1: 800	31,8	0,2178	116,8

Если разведение делалось меньше, чем 1:1000, то оно приводилось к таковому при вычисления отношения. Напр., при разведении 1:800 отношение равно $\frac{24,8}{0,1719} = 144,2$, а при разведении 1:1000 оно будет равно $144,2 \times 0,8 = 115,36$. Из таблицы видно, что после 4-й кристаллизации колебания в отношениях были у нас очень незначительны, и потому мы полагаем, что после 5-й кристаллизации получался уже вполне чистый препарат. Для вычисления мы предлагаем формулу $\frac{F \cdot S}{P} = K$, где F—число, полученное в гэмометре Fleischl-Miescher'a, P—вес сухого остатка, S—разведение и K—критерий чистоты.

В заключение приведем некоторые анализы, которые мы проделали с полученным указанным путем гэмоглобином.

А) Анализы для определения воды:

1) Навеска в 1,6773 грм. кристаллической массы, отжатой в гладком фильтре, потеряла после высушивания в сушильном шкафу при 100—110° С 0,801 грм. или 47,2%.

2) Навеска в 2,6435 грм. потеряла 1,2537 (47,43%).

3) „ в 2,0893 грм. „ 0,9884 (47,3%).

Б) Анализы для определения азота (определялся по Kjeldal'ю и Dumas).

аа) По Kjeldal'ю: 1) Навеска 0,1988 грм., связано 22,8 H_2SO_4 , титр которой равнялся 0,001423 N, т. е. N было 16,3⁰/о.

2) Навеска 0,2018 грм., связано H_2SO_4 22,9, N—16,15⁰/о.

3) " 0,2113 грм., " " 24,41, N—16,43⁰/о.

4) " 0,1806 грм., " " 20,81, N—16,4⁰/о.

бб) По Dumas: 1) Навеска 0,2081 грм., об'ем N 30,5, t^0 22⁰, дав. 757.14, N—16,48⁰/о.

2) Навеска 0,2072 грм., об'ем, t^0 и дав. те же, N—16,48⁰/о.

В) *Анализы С и Н* (определение производилось сжиганием в закрытой трубке):

1) Навеска 0,2095 грм., С—54,81⁰/о, Н—7,2⁰/о.

2) " 0,1857 грм., С—54,95⁰/о, Н—7,24⁰/о.

3) " 0,2004 грм., С—54,7⁰/о, Н—7,27⁰/о.

Л И Т Е Р А Т У Р А:

Е. Е. Butterfield. Zeit. für. phys. Chem. 1909, Bd. 62, S. 173.—
G. Hüfner. Beiträge zur Physiol. Carl Ludwig zu seinem siebenzigsten Geburtstage gewidmet von seinen Schülern. Leipzig, 1887, S. 74.—
F. Kunde. Zeit. für rat. Medicin, 1851, Bd. 2, S. 271.
