

Den vorstehend beschriebenen Imidazolderivaten ähnliche Verbindungen liegen vielleicht auch in den von Schiff (diese Berichte **25**, 1936) beschriebenen Producten der Umsetzung von Benzidin bezw. Tolidin und Formaldehyd vor.

Organisches Laboratorium der technischen Hochschule zu Berlin.

102. W. Küster: Ueber chlorwasserstoffsäures und bromwasserstoffsäures Hämatin.

(Eingegangen am 10. Februar.)

In den Jahren 1884—1888 ¹⁾ wurden von Nencki und Sieber aus dem Blute verschiedener Thiere durch Extraction mittels Amylalkohols und Salzsäure Häminkrystalle gewonnen, deren nach peinlichster Reinigung ausgeführte Analysen ergaben, dass alle Blutarten ein und dasselbe Hämin liefern, und dass die Zusammensetzung desselben eine verhältnissmässig einfache ist, jedenfalls eine einfachere als bisher angenommen wurde. Auch der Uebergang in Hämatin und die Zerlegung in Hämatoporphyrin wurde klargestellt und durch chemische Gleichungen ungezwungen erklärt.

Gegen diese unsere Anschauungen wesentlich erweiternden und berichtigenden Arbeiten wurden von mehreren Seiten Bedenken geltend gemacht ²⁾, namentlich von Hoppe-Seyler, dem wir ja die ersten bahnbrechenden Untersuchungen des Hämins verdanken, und, wenn auch Nencki und Sieber in den meisten Punkten die Einwendungen überzeugend bekämpften, erschien es doch wünschenswerth, Bestätigung von dritter Seite zu bringen.

Auf Veranlassung von Hrn. Prof. Hüfner habe ich daher das Studium des Hämins aufgenommen und will im Folgenden über die seit dem Sommersemester 1891 gewonnenen Resultate berichten.

Zu Beginn der Untersuchung folgte ich genau Nencki's Angaben, nur wurden die Blutkörperchen durch Ausschleudern vom Serum getrennt. 10 L Rinderblut, entsprechend ungefähr 5000 g präparirten Blutpulvers, lieferten mir beim Ausziehen mit reinem Amylalkohol vom Siedepunkt 129—131° und Salzsäure ca. 12.5 g Roh-Hämin, welche Menge durch die weitere Reinigung beträchtlich gemindert wurde (Präparat I).

¹⁾ Archiv f. exp. Pathologie und Pharmakologie 18, 404; 20, 325; 24, 430. Archiv des sciences biologiques, St. Petersburg 1893. T. II, No. 1, 120.

²⁾ Hoppe-Seyler, diese Berichte 18, 601. C. le Nobel, Pflüger's Archiv 40, 501.

Um ein von Anfang an reineres Product zu gewinnen — die aus Rinderblut erhaltenen Häminkrystalle erschienen unter dem Mikroskop stets mit eiweissartigen Massen durchsetzt — wandte ich später mit Erfolg Oxyhämoglobinkrystalle an, welche, in bekannter Weise dargestellt, in möglichst wenig Wasser gelöst und mit soviel 95 procentigem Alkohol versetzt wurden, dass ein dünner Brei entstand. Derselbe verdichtete sich nach einiger Zeit und wurde nach 24 Stunden auf ein Filter gegehen. Sobald dann der Alkohol abgelaufen war, wurde die Masse auf Filtrirpapier getrocknet¹⁾ und dann wiederum mit der vierfachen Menge Amylalkohols ausgezogen, welches Verhältniss auch hier die besten Ausbeuten zu geben scheint, auf 10 L Blut ca. 7 g Hämin.

Ist nun also auch die Ausbeute erheblich verringert, so wurde doch aus dem krystallisirten Oxyhämoglobin wesentlich reineres Material gewonnen. Beim Durchmestern der aus dem Amylalkohol abgesetzten Krystalle sind unter dem Mikroskop fast keine Fremdkörper zu erblicken, weshalb auch von dem umständlichen, viel Verlust mit sich bringenden Reinigungsverfahren Abstand genommen werden kann. Es genügt, den Amylalkohol durch Aethylalkohol zu verdrängen, dann mit Aether und Alkohol, zuletzt mit Wasser so lange auszuwaschen, bis im Abfiltrirenden keine Chlorreaction mehr auftritt. (Präparat II.)

Die erhaltenen Häminkrystalle (Präparat I und II) enthalten Amylalkohol, der beim Trocknen im Vacuum, ja selbst bei 110° noch nicht entweicht, beim Erhitzen mit Natronlauge aber abgespalten wird, ins Destillat geht und hierin leicht nachgewiesen werden kann; dass ihre Zusammensetzung aber grade durch die Formel $(C_{32}H_{31}ClN_4FeO_3)_4C_5H_{12}O$, wie Nencki angiebt, ausgedrückt wird, konnte nicht bestätigt werden. Dieselbe verlangt einen Gehalt von 3.48 pCt. Amylalkohol; ein entsprechender Gewichtsverlust konnte aus später anzuführenden Gründen niemals gefunden werden, und die bei der Analyse erhaltenen Zahlen können uns kaum einen Aufschluss geben, wie aus der unten angeführten Tabelle leicht ersichtlich ist. Meine Präparate z. B. ergaben bei der Analyse Werthe, welche am besten zu der Formel $(C_{32}H_{31}ClN_4FeO_3)_2C_5H_{12}O$ passen würden.

Es verlangt z. B.:

$C_{32}H_{31}ClN_4FeO_3$	$16C_5H_{12}O$	C	62.96,	H	5.155,	Cl	5.74,	N u. Fe	9.09 pCt.
$C_{32}H_{31}ClN_4FeO_3$	$8C_5H_{12}O$	»	63.006,	»	5.23,	»	5.69,	» » »	9.01 »
$C_{32}H_{31}ClN_4FeO_3$	$4C_5H_{12}O$	»	63.08,	»	5.376 ²⁾ ,	»	5.59,	» » »	8.85 »
$C_{32}H_{31}ClN_4FeO_3$	$2C_5H_{12}O$	»	63.27,	»	5.66,	»	5.45,	» » »	8.55 »

¹⁾ cf. die Bemerkung Nencki's, Archiv 18, 404.

²⁾ 5.376 pCt. Wasserstoff, nicht 5.69, wie Nencki l. c. 409 angiebt.

Nencki u. Sieber erhalten

durchschnittlich ¹⁾: . . . C 62.78, H 5.79, Cl 5.294, N 9.06, Fe 8.84 pCt.

Meine Analysen ergeben:

Präparat I	» 62.95,	» 6.04,	» 5.04,	» 8.91,	» 8.28	»
Präparat II	» 62.94,	» 6.07,	» 5.08,		» 8.57	»
					» 8.48	»

Nachdem Hämin aus Rinderblut und krystallisirtem Oxyhämoglobin vom Rind nach Nencki's Verfahren erhalten worden war, versuchte ich auch aus dem Oxyhämoglobin des Pferdes den Farbstoff zu gewinnen. Als aber einmal umkrystallisirtes Material, nachdem es durch Alkohol zersetzt und dann getrocknet worden war, mit Amylalkohol ausgezogen wurde, legte sich bei zwei Versuchen die Masse trotz Schüttelns an den Boden, verkohlte zum Theil und aus dem abfiltrirten Amylalkohol schieden sich nur äusserst wenige, stark mit Eiweiss verunreinigte Krystalle aus. Diese Versuche wurden deshalb und weil es gelang, aus anders vorbereitetem Materiale ausgezeichnet reines Hämin zu erhalten, abgebrochen.

Nencki hatte schon beobachtet ²⁾, dass zweimal umkrystallisirtes, lange mit verdünntem Alkohol ausgewaschenes Hämoglobin vom Pferde durch starken Alkohol in eigenthümlicher Weise verändert werde. Es findet keine Zersetzung, sondern nur eine Farbenänderung statt, und das Product, welches Parahämoglobin genannt wird, zeigt, von einem geringeren Krystallwassergehalt abgesehen, procentisch die gleiche Zusammensetzung wie Oxyhämoglobin. Es gelang Nencki jedoch nicht, aus diesem Parahämoglobin Hämin darzustellen.

Da es wegen der Schwerlöslichkeit ³⁾ des einmal bereits umkrystallisirten Oxyhämoglobins vom Pferde mit den grössten Schwierigkeiten verknüpft erschien, so grosse Mengen zweimal umkrystallisirten Materials zu erhalten ⁴⁾, wie man sie zur Häminbereitung braucht,

¹⁾ Berechnet aus der Gesammtheit ihrer Analysenresultate.

²⁾ Archiv 20, 335.

³⁾ Die gegentheilige Angabe im Beilstein II. Aufl., 3. Band 1284 ist entschieden zu berichtigen.

⁴⁾ Nach neueren Versuchen ist dies doch möglich, wenn man vom reducirten Hämoglobin ausgeht. Die grossen sechsseitigen Tafeln dieses Körpers sind sehr leicht in Wasser löslich. Man erhält sie stets beim Lösen der aus etwas fauligem Blut abgesetzten Blutkörperchen, Abfiltriren dieser Lösung und Versetzen mit Alkohol. Die Krystalle wie ihre wässrige Lösung nehmen allerdings äusserst leicht Sauerstoff auf, wie auch Nencki und Sieber bereits beobachtet haben. Diese Berichte 19, 126. Betrachtet man z. B. unter dem Mikroskop die sechsseitigen Tafeln bei Zimmertemperatur, so zerfliessen dieselben und nach einiger Zeit erscheinen an ihrer Stelle die hellrothen Prismen des Oxyhämoglobins. Diese Erscheinung hat offenbar auch schon Funke beobachtet, man vergl. z. B. auf Tafel X seines Atlas der physio-

verwendete ich nur einmal umkrystallisirte Pferdeblutkrystalle, welche entweder nach dem Abheben der Mutterlauge auf Tellern aus Holzfaser getrocknet oder durch Ausschleudern von der Mutterlauge vollständig getrennt waren. Wird diese Masse mit dem drei- bis vierfachen Gewichte 93procentigen Alkohols angerührt, so findet ebenfalls keine Zersetzung der Krystalle statt, nach 24 Stunden kann man den völlig klaren Alkohol abheben; er ist jetzt ca. 80procentig, hat also lediglich Wasser entziehend eingewirkt. Die Krystallmasse wurde alsdann auf ein Filter gegeben, auf Filtrirpapier getrocknet und wie früher verarbeitet. Aus dem amyalkoholischen Filtrate setzten sich hierbei sofort äusserst reine Häminkrystalle ab in einer Ausbeute, welche den früher erhaltenen Resultaten entspricht. (Präparat III.)

Diese Art der Hämindarstellung wird dadurch noch interessanter, dass das ausgezogene und abfiltrirte Eiweiss, welches getrocknet eine graue Masse darstellt, unter dem Mikroskop weitaus zum grössten Teile noch die Krystallform, lange Prismen, des Oxyhämoglobins zeigt, während die Farbe fast verschwunden ist. Diese Beobachtung von Pseudomorphosen des Eiweiss nach Oxyhämoglobin ist jedenfalls der an die Seite zu stellen, welche H. Struve bereits gemacht hat¹⁾.

Die Elementaranalyse von Präparat III ergab 62.74 pCt. C und 6.26 pCt. H, welches bezüglich des Wasserstoffs mangelhafte Resultat leider nicht mehr controllirt werden konnte, da der Rest des Materials für quantitative Versuche — Ueberführung in amyalkoholfreies Häm — verwendet worden war²⁾.

Es war mir nämlich nicht gelungen, das amyalkoholhaltige Häm in Luftbade bei 130—135° bis zu constantem Gewicht zu

logischen Chemie, Fig. V, wo hellrothe prismatische Krystalle an Stellen anschliessen, an denen zuvorst blossrothe Blättchen sich befanden.

Beim Umkrystallisiren muss daher der Luftzutritt möglichst beschränkt werden, und das geschieht am besten in der Weise, dass die abgesetzten Krystalle mit einem Theil der Mutterlauge ausgeschleudert werden. Die jetzt klar über den Krystallen befindliche Flüssigkeit — am besten wählt man den Krystallbrei so, dass sie die Hälfte des Gefässes einnimmt — wird abgegossen und durch ausgekochtes Wasser von 36—37° ersetzt, worauf man noch in lauwarmes Wasser stellt. Sehr bald tritt nun Lösung ein, und man giesst alsdann den Inhalt in eine grosse Flasche, die mit Wasserstoff gefüllt ist, während man noch ausserdem Wasserstoff einleitet. Die möglichst gefüllte und gut verstopfte Flasche lässt man dann 24 Stunden in der Kälte stehen, nach welcher Zeit sich die Blättchen des venösen Hämoglobins wieder fast ausschliesslich ausgeschieden haben, gleichviel ob man noch Alkohol hinzugefügt hat oder nicht.

¹⁾ Mémoires de l'académie impériale des sciences de St. Petersbourg, VII série 1884, T. 32; erwähnt von Nencki, loc. cit. 341.

²⁾ Man vergleiche aber die gut stimmenden Analysen des im Stickstoffstrome getrockneten Materials.

trocknen; zunächst tritt zwar Gewichtsverlust ein, beim längeren Erhitzen wurde jedoch stets Gewichtszunahme beobachtet, was, nach den Analysen zu urtheilen, einer beginnenden Oxydation zuzuschreiben ist. Ber. für $C_{32}H_{31}ClN_4FeO_3$: C 62.91, H 5.08, Cl 5.79, N u. Fe 9.17 pCt. Präparat I, 15 Stunden im

ganzen erhitzt, gab . . » 61.75, » 5.62, » — » 8.36 »
62.06, » 5.46.

Nur einmal gelang es scheinbar, reines Hämin zu erhalten, als Präparat III 3 Stunden lang auf $130-135^{\circ}$ erhitzt wurde. Der Amylalkohol war, wie der Versuch lehrte, vollständig entwichen; der Gewichtsverlust gegen das im Vacuum getrocknete Material betrug aber nur 0.7 pCt.

Die Analysen ¹⁾ ergaben:

C 63.36, 62.85, H 5.41, Cl 5.04, N 9.13, Fe 8.86, 8.94 pCt.

Jedenfalls konnte durch Trocknen im Luftbade der procentische Gewichtsverlust nicht genau ermittelt werden. Ich versuchte daher, ob dies durch Ueberleiten von Wasserstoff oder Stickstoff bei 135 bis 145° möglich wäre. Es stellte sich aber heraus, dass durch dieses Verfahren der Amylalkohol nicht oder nicht vollständig herausgenommen wurde.

Z. B. gab Präparat III nach $7\frac{1}{2}$ stündigem Erhitzen auf 145° im Stickstoffstrome eine Gewichtsabnahme von 0.93 pCt. und bei der Analyse

C 63.11, H 5.99, Cl 5.52, Fe 8.70, 8.77,

welche Zahlen auf ein amyalkoholhaltiges Hämin von angegebener Zusammensetzung hinweisen.

Vielen missglückten Versuchen, reines Hämin darzustellen, stand nur ein einziger gegenüber, wo es erhalten wurde. Ich suchte nach andern Mitteln, um die Formel $C_{32}H_{31}ClN_4FeO_3$ zu stützen. Ein solches stand mir in dem Material zu Gebote, welches zur Darstellung von Präparat III gedient hatte. Bei geeigneter Behandlung mussten aus diesem Derivate des Hämatins zu erhalten sein, aus deren Analyse Rückschlüsse auf die Formel des chlorwasserstoffsäuren Hämatins oder Hämins gezogen werden konnten.

Die mikroskopische Bildung von »Hämin« durch Einwirkung verschiedener Säuren ist schon oft beobachtet worden²⁾, ja der eine

¹⁾ Die eine Wasserbestimmung ging verloren, die Abspaltung des Chlors wurde hier durch Natronlauge bewirkt, woraus sich der Fehler einigermaassen erklärt.

²⁾ Husson, Compt. rend. 81 (1875, 2), 477. — Cazeneuve, Bull. de la société chimique de Paris 1877, T. 26, 485. — Bikfalvi, Centralblatt f. d. med. Wissensch. 1886, 289—291. — D. Axenfeld, Ann. di chim. e di farmacol. 4 Ser. 5. 98, 100. — Die beiden letzten Arbeiten habe ich nur im Referat (diese Berichte 19, 578 und 21, 364) eingesehen, aus welchem aber schon hervorgeht, dass Analysen der »Hämine« nicht gemacht worden sind.

Weg, den Hoppe-Seyler zur Gewinnung von Hämatin in grösseren Mengen angiebt¹⁾, führt augenscheinlich über das schwefelsaure Salz. Es scheint aber noch nie versucht worden zu sein, reine Derivate des Hämatins in grösserem Maassstabe zu gewinnen, die missglückten Versuche Nencki's ausgenommen.

Ich wählte als nächstliegendes die Darstellung des bromwasserstoffsäuren Hämatins und kam durch folgendes Verfahren zum Ziel: Das auf die angegebene Art vorbereitete Material wird lange Zeit mit verdünntem Alkohol ausgewaschen, bis im Filtrat höchstens Spuren von Halogen noch nachzuweisen sind, getrocknet und dann mit der vier- bis fünffachen Menge absoluten Alkohols im Sandbade zum Sieden erhitzt, worauf bei 200 g verwendeten Materials 35 ccm Bromwasserstoffsäure von 1.47 spec. Gew. dazu gegeben werden. Sofort tritt jetzt Zersetzung ein, was an der Farbenänderung deutlich sichtbar ist, es wird noch eine Minute im Sieden erhalten und durch ein gewöhnliches Filter filtrirt. Aus dem Filtrate setzt sich alsdann im Laufe einiger Tage das Hämin in schwarzen Massen ab²⁾. Unter dem Mikroskop erkennt man bei starker Vergrösserung Krystalle, die viel kleiner wie die des salzsauren Hämatins sind und meist die Form eines Rhombus haben. Die Reinigung der Krystalle wurde in der Art bewirkt, dass kurz mit Alkohol und Aether, darauf mit Wasser so lange ausgewaschen wurde, bis im Filtrate kein Brom mehr nachgewiesen werden konnte. Alsdann wurde im Vacuum über Schwefelsäure oder bei 120° im Luftbade getrocknet, was keinen Unterschied bedingt. Aus 2250 g Material erhielt ich so fast 11 g bromwasserstoffsäures Hämatin, dessen Analyse am besten zur Formel $C_{32}H_{31}BrN_4FeO_3 + C_2H_5OH$ stimmt. In der That enthalten die Krystalle Alkohol, welcher beim Auflösen in reiner Natronlauge abgespalten wird und im Destillat durch die Jodoformreaction nachgewiesen werden kann.

Es verlangt:

$C_{32}H_{31}BrN_4FeO_3$	C 58.63, H 4.73, Br 12.21, N u. Fe 8.55	pCt.
$C_{32}H_{31}BrN_4FeO_3, C_2H_5OH$:	» 58.20, » 5.28, » 11.41, » 7.99	»
Gefunden wurde:	» 57.76, » 5.56, » 11.45, N 8.21	»
	» 57.84, » 5.68, Fe 8.31, 8.45	»

Sind nun auch die mitgetheilten Ergebnisse vielfach lückenhaft oder nicht völlig befriedigend, so habe ich doch geglaubt, sie jetzt veröffentlichen zu dürfen, da man schon bei der Reindarstellung des

¹⁾ Handbuch der phys.- u. pathol.-chem. Analyse 239.

²⁾ Die saure alkoholische Lösung enthält Hämatoporphyrin und einen braunen, in wässrigen Alkalien und Säuren unlöslichen, in Chloroform leicht löslichen Körper, den Nencki auch bereits beobachtet hat (Archiv 24, 439). Wird die abfiltrirte Eiweissmasse in viel heissem Wasser gelöst, so setzt sich sofort noch eine beträchtliche Menge von Häminkrystallen ab, deren Untersuchung noch aussteht.

Ausgangsmaterials erstaunlichen Schwierigkeiten begegnet und die nöthige Wiederholung der Versuche voraussichtlich wiederum lange Zeit in Anspruch nehmen wird.

Die gelungene Darstellung des bromwasserstoffsäuren Hämatins — in jüngster Zeit sind noch mehrere Präparate desselben gewonnen worden — berechtigt zu der Hoffnung, auch noch andere reine Derivate des Hämatins aus krystallisirtem Oxyhämoglobin in grösserer Menge erhalten und analysiren zu können. Versuche in dieser Richtung sind bereits in Angriff genommen.

Die Ueberführung der Hämine in Hämatin ist ebenfalls Gegenstand der Untersuchung gewesen, und hoffe ich, hierüber bald berichten zu können.

Zusammenfassung.

Ein amyalkoholhaltiges salzsaures Hämatin lässt sich nicht nur aus durch Alkohol zersetztem Blute, sondern auch aus zersetztem Oxyhämoglobin und endlich auch aus unzersetztem, durch 93procentigen Alkohol aber eigenthümlich veränderten Oxyhämoglobin des Pferdes durch Einwirkung von Salzsäure und Amylalkohol gewinnen.

Die Analyse dieses Hämins liefert Werthe, welche zu der Formel $(C_{32}H_{31}ClN_4FeO_3)_x C_5H_{12}O$ stimmen, wo x zwischen bestimmten Grenzen schwankt.

Durch kurzes Trocknen im Luftbade bei $130-135^{\circ}$ verlieren die Häminkrystalle den Amylalkohol, ein längeres Trocknen ist mit merklicher Oxydation verknüpft. Im Wasserstoff- oder Stickstoffstrome bei 145° wird der Amylalkohol nicht völlig abgespalten.

Bromwasserstoff und absoluter Alkohol liefern aus reinem Oxyhämoglobin vom Pferde, das durch Alkohol eigenthümlich verändert ist, ein bromwasserstoffsäures Hämatin, dessen Analyse zu der Formel $C_{32}H_{31}BrN_4FeO_3, C_2H_5OH$ führt.

Diese Arbeit wurde im physiologisch-chemischen Institute ausgeführt. Es sei mir gestattet, auch an dieser Stelle meinem hochverehrten Chef und Lehrer, Hrn. Prof. Dr. Hüfner, aufrichtigsten Dank auszusprechen für die Anregung zur Bearbeitung dieses Themas und für das Interesse, welches er meinen Untersuchungen erzeigt und durch vielfache Rathschläge bekundet hat.

Tübingen, im Februar 1894.