

Pulvers, das im Durchschnitt 43.06% C, 4.28% H, 5.55% S, 13.73% Ba und 12.45% OCH_3 besaß.

4.340 mg Sbst.: 6.850 mg CO_2 , 1.730 mg H_2O (4.46% H); 0.2054 g Sbst.: 0.3245 g CO_2 , 0.0780 g H_2O (4.25% H). — 0.1846 g Sbst.: 0.0749 g BaSO_4 (S). — 0.1033 g Sbst.: 0.0241 g BaSO_4 (Ba). — 0.1456 g Sbst.: 0.1380 g AgJ.

Bei Makro-Analysen wurde der Wasserstoffwert im Durchschnitt immer zu 4.2—4.3% gefunden und dürfte daher richtiger sein.

Das gesammelte Ultrafiltrat ging noch einmal durch ein Ultrafeinfilter „feinst“, wobei 4.0 g zurückblieben, die 23.26% Ba enthielten und sich weiter aufteilen ließen. Die wäßrige Lösung wurde ebenfalls durch Fällern mit Methanol in verschiedene Fraktionen aufgeteilt, die sich wie früher beschrieben verhielten, so daß auf eine Fortsetzung des Versuches verzichtet werden konnte.

256. Hermann Fink: Über die Isolierung der natürlichen Harnporphyrine*).

[Aus d. landwirtschaftl.-tierärztl. Fakultät d. Universität Berlin und d. Institut für Gärungsgewerbe.]

(Eingegangen am 14. Mai 1937.)

Bei aller Wichtigkeit, die dem Studium pathologischer Porphyrin-Ausscheidungen zukommt, und so wichtig auch die chemische Aufklärung der in pathologischen Fällen auftretenden Porphyrinfarbstoffe ist, so wurde es als ein ebenso bedeutendes Problem bezeichnet^{1) 3)}, den normalen Fall des gesunden Menschen zu studieren und klar zu stellen, welche Porphyrine im normalen Harn vorkommen. Daß diese Frage trotz der jahrelangen Bemühungen von Chemikern und Medizinern solange unbeantwortet blieb, hängt damit zusammen, daß in 1 l Harn von gesunden Menschen, wie wir heute wissen, nur etwa 10—20 γ Porphyrin vorkommen. Die Isolierung im kristallisierten Zustande und damit die Identifizierung schienen bisher unüberwindliche Schwierigkeiten zu bereiten. Wenn auch durch die eingehenden spektroskopischen Untersuchungen von H. Fischer¹⁾, von Schumm²⁾ u. a. bewiesen worden war, daß im ätherlöslichen Porphyrin Koproporphyrin vorliegt, so blieb in der Folgezeit immer noch im Dunkeln, welches von den isomeren Koproporphyrinen, vor allem, ob Koproporphyrin I oder das dem Blutfarbstoff näher stehende Koproporphyrin III im normalen Urin enthalten ist. Auf die grundlegende biologische Bedeutung dieser Frage, auf die ich hier leider nicht weiter eingehen kann, ist in früheren Jahren immer wieder von H. Fischer¹⁾ und H. Kämmerer³⁾ hingewiesen worden, von denen letzterer dieses Problem geradezu als einen Angelpunkt für die Deutung in der Biologie der Porphyrine betrachtete.

*) Vortrag, gehalten beim Reichstreffen der Deutschen Chemiker in München am 9. Juli 1936.

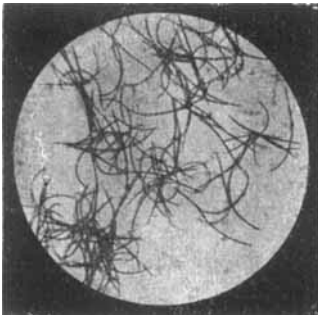
¹⁾ Verh. dtsh. Ges. inn. Med. 45, 21 [1933]; H. Fischer, Abderhaldens Handb. d. biolog. Arbeitsmeth. I/11, H. 2 [1927].

²⁾ Spektrochem. Analyse natürl. organ. Farbstoffe. Fischer 1927.

³⁾ Verh. dtsh. Ges. inn. Med. 45, 30 [1933].

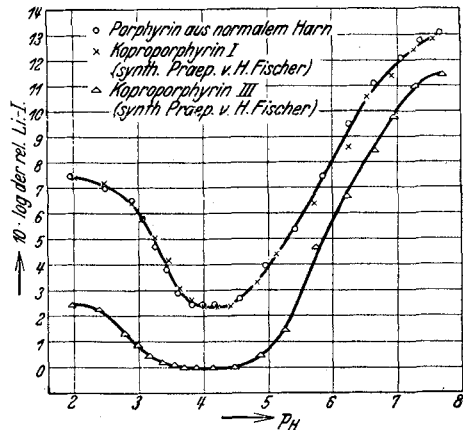
Neben anderen Arbeiten auf gärungschemischem Gebiete habe ich mich mit Hrn. Dr. Hoerbinger dank der entgegenkommenden Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft mit diesem Problem der Porphyrine des normalen menschlichen Urins beschäftigt. Das endgültige Ergebnis dieser Untersuchungen ist die Tatsache, daß im Harn des Gesunden Koproporphyrin I als integrierender Bestandteil und als normales Stoffwechselprodukt vorkommt.

In einer kurzen Notiz in den „Naturwissenschaften“⁴⁾ haben wir schon vor einigen Jahren mitgeteilt, daß uns zum ersten Male die Gewinnung des Porphyrins aus größeren Harnmengen mittels einer neuartigen Adsorptions-



Abbild. 1.

Krystallisation von Koproporphyrin I-Tetramethylester aus normalem Harn (1934).



Abbild. 2.

Identitätsbeweis durch p_H -Fluoreszenzkurven.

methode, auf die ich noch näher eingehen werde, und die Darstellung in reiner krystallisierter Form gelungen sei. Die Identifizierung ist damals mit einer von uns geschaffenen Methode, nämlich der Messung der p_H -Fluoreszenzkurve durchgeführt worden.

In den ersten beiden Abbildungen sind zu sehen einerseits die 1934 erzielte Krystallisation des Koproporphyrins I, andererseits die p_H -Fluoreszenzkurven, die zu seiner Identifizierung mit synthetischem Koproporphyrin I führten.

Bei der Tragweite der Entscheidung, ob Koproporphyrin I oder III vorliegt, war es selbstverständlich, daß die Beweiskraft der Identifizierungsmethode durch eingehende Vorarbeiten erhärtet worden war, und es muß nun kurz auf diese Methode und ihr Prinzip eingegangen werden.

Nachdem die allgemeinen chemischen und physikalischen Grundlagen und der Einfluß der einzelnen Faktoren auf die Porphyrinfluoreszenz in wäßrigen Lösungen und auf die Fluoreszenzkurve studiert worden waren, konnten wir durch die Untersuchungen an 34 verschiedenen Porphyrinen und Gruppen von Porphyrin-Isomeren⁵⁾ — die uns Hr. Geheimrat Hans

⁴⁾ Naturwiss. **22**, 292 [1934].

⁵⁾ Ztschr. physiol. Chem. **218**, 181 [1933]; **220**, 123 [1933]; **225**, 49 [1934]; **232**, 28 [1935].

Fischer in liebenswürdiger Weise zur Verfügung gestellt hatte — die schon 1929 von mir ausgesprochene Vermutung⁶⁾ erhärten, daß jedem Porphyrin eine charakteristische p_H -Fluoreszenzkurve zukommt und daß diese abhängig von der Zahl und Anordnung der Seitenketten im Porphyrin-Molekül und somit eine Eigenschaft von ausgeprägter Spezifität ist.

Als besonderer Vorzug dieser Methode hat sich ergeben, daß man nur etwa 0.5—1.0 mg der reinen Substanz benötigt und daß das meist kostbare Material nach der Untersuchung wieder fast vollständig zurückgewonnen werden kann, während es z. B. bei der Schmelzpunkt- oder Mischschmelzpunktbestimmung vernichtet oder entwertet ist. Da gerade die physiologisch wichtigsten Porphyrine, die Koproporphyrine und die Uroporphyrine, die in der Natur z. B. auch bei klinischen Fällen als verschiedene Isomere vorkommen können, markante Verschiedenheiten in den p_H -Fluoreszenzkurven aufweisen, kann diese Methode hier wertvollste Dienste leisten. Absorptions- und Emissions-Spektren bieten hier keine sicheren Anhaltspunkte für eindeutige Unterscheidung, und für Schmelzpunktbestimmungen oder die sichere Identifizierung durch chemischen Abbau ist in solchen Fällen meistens zu wenig Substanz vorhanden.

Demgemäß konnten durch Anwendung der p_H -Fluoreszenzkurven-Methode in den letzten Jahren auch wiederholt wichtige Entscheidungen getroffen werden. So ist von uns der Beweis erbracht worden, daß bei der Ochronose der Schlachttiere⁷⁾ in den gelbbraun bis schokoladebraun gefärbten Knochen des erkrankten Tieres Uroporphyrin I vorkommt und nicht Hämatorporphyrin, wie in der älteren Literatur angenommen worden ist. Weiterhin haben wir in mehreren Krankheitsfällen von klinischer Porphyrie, so aus der Medizinischen Akademie Düsseldorf (Prof. Schreus⁸⁾), aus dem St. Maria-Viktoria-Krankenhaus Berlin⁸⁾ (Prof. Maase), aus der Charité in Berlin (Prof. Frieboes), bei denen uns die chemische Bearbeitung überlassen wurde, eindeutig die Natur der Farbstoffspuren im Harn — meistens unter 1 mg — mittels p_H -Fluoreszenzkurve aufklären können. Es lag teils Koproporphyrin III, teils Koproporphyrin I vor. Die Veröffentlichung über den letztgenannten Fall wird demnächst erfolgen.

Im Sommer des Jahres 1934 hat der Mediziner Waldenström aus Stockholm, der als Rockefeller-Stipendiat bei Hrn. Geheimrat Fischer weilte, verschiedene Porphyrine bzw. Porphyrin-Gemische, die er als noch unreine Präparate von Porphyriefällen aus der schwedischen Hauptstadt mitgebracht hatte, unter Mitwirkung von W. Hoerburger gereinigt und auf die p_H -Abhängigkeit der Fluoreszenz untersucht. Dabei konnte zum ersten Male eindeutig⁹⁾ gezeigt werden, daß außer dem Uroporphyrin I ein weiteres isomeres Uroporphyrin mit stark abweichender p_H -Fluoreszenzkurve und, wie erst nachher festgestellt worden ist, mit anderem Schmelzpunkt unter pathologischen Verhältnissen vorkommen kann.

Bei dieser Gelegenheit wurden auch Anhaltspunkte gefunden, daß das aus der Muschel *Pteris* stammende Porphyrin aus mehreren isomeren Uroporphyrinen besteht, von denen eines mit dem neuen Iso-uroporphyrin nach der p_H -Fluoreszenzkurve identisch ist.

Auch in rein chemischen Fällen, in denen die Frage der Identität bzw. die Isomerieverhältnisse zu entscheiden waren, ist die Methode in allerletzter

⁶⁾ Naturwiss. 18, 16 [1929].

⁷⁾ Ztschr. physiol. Chem. 202, 8 [1931].

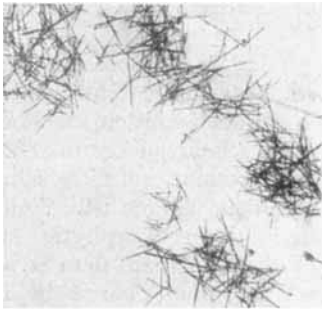
⁸⁾ Ztschr. physiol. Chem. 236, 136 [1935].

⁹⁾ Ztschr. physiol. Chem. 233, 1 [1935].

Zeit herangezogen worden. Hr. H. Fischer hat uns vor kurzem derartige Präparate zur Untersuchung zugesandt.

Zweifellos das wichtigste Ergebnis, das der Methode zu verdanken ist, war aber der eben erwähnte Beweis, daß das natürliche Harnporphyrin Koproporphyrin I ist. Dieser Beweis konnte mit anderen Methoden nicht erbracht werden, da uns damals nur geringste Mengen des kristallisierten Pigments vorlagen. Wenn die Methode nur dieses eine Ergebnis gezeitigt hätte, so wären die mühevollen Vorarbeiten nicht umsonst gewesen.

Obwohl also in keiner Weise mehr an diesem Befunde zu zweifeln war, ist es uns in letzter Zeit möglich gewesen, durch Aufarbeitung größerer Mengen einwandfrei gesammelten Männerharns, teils Harn einer Person mit normalem Gesundheitszustand, teils von einwandfrei gesammelten Mischharnen von drei gesunden, männlichen Personen, wiederholt einige Milligramme reines Koproporphyrin I in kristallisierter Form (Abbild. 3 und 4) zu isolieren, so daß nun auch noch durch Schmelzpunkt



Abbild. 3.
Koproporphyrin I-Tetra-
methylester aus normalem
Harn (Mischharn von 3 männ-
lichen Personen).



Abbild. 4.
Koproporphyrin I-Tetra-
methylester aus normalem
Harn einer Person
(Wolfgang Hoerburger).

(248—250°) und Mischschmelzpunkt (248—250°) die Identität mit dem synthetischen Koproporphyrin I von H. Fischer bewiesen war.

In den Mutterlaugen war noch Porphyrin vorhanden, das nicht zur ganz einheitlichen Kristallisation zu bringen war. Mehrere Anzeichen sprachen für Koproporphyrin III¹⁰⁾.

Bei den Isolierungsmethoden, mit deren Hilfe wir kristallisiertes Koproporphyrin I (s. Abbild. 1, 3 und 4) erhalten haben, handelt es sich um ein

¹⁰⁾ Durch das Chem. Zentralblatt (C. 1937 I, 1720) wurden wir auf eine Arbeit von C. J. Watson (Journ. clin. Invest. 15, 328 [1936]) aufmerksam, die sich ebenfalls u. a. mit den Porphyrinen des natürlichen Harns beschäftigt. Das eine (0.18 mgm) der in kristallisierter Form erhaltenen Koproporphyrine hatte als Tetramethylester einen unscharfen Schmelzpunkt; es sinterte von 190° an, schmolz von 218—223° (Präparat von Koproporphyrin-I-ester von H. Fischer 245—246°). Von dem zweiten Porphyrin konnte in Anbetracht der geringen Substanzmengen kein Schmelzpunkt erzielt werden. Auf Grund dieser und weiterer Eigenschaften (Kristallform, spektroskopische Befunde) schließt Watson ebenfalls auf das Vorkommen von Koproporphyrin I und III im normalen Harn.

Prinzip von allgemeiner Anwendbarkeit. Wir haben ihm den Namen adsorptive Filtration gegeben.

Im Gegensatz zur gewöhnlichen Filtration, bei der es gewissermaßen nur auf die Siebwirkung bei der Abtrennung eines gröber dispersen Niederschlags von der Flüssigkeit ankommt, werden bei der adsorptiven Filtration aus Kolloiden, meist enorm verdünnten wäßrigen Lösungen die kolloid-dispersen Stoffe durch Adsorption im Filter zurückgehalten. Statt nun allgemein auf das kolloidchemische Prinzip der adsorptiven Filtration, mit deren Hilfe man Substanz-Spuren gewisser Stoffe aus stark verdünnten, wäßrigen Lösungen herausholen kann, näher einzugehen, möchte ich das Prinzip am Beispiel der Gewinnung der geringfügigen Spuren von Harnporphyrin aus großen Harnmengen, z. B. aus 300 l Harn, kurz beschreiben. (Wie erwähnt, enthält 1 l Harn etwa 10–20 γ Porphyrin. Die Verdünnung ist also etwa 1:10⁸.)

Durch Säure-Zusatz brachten wir den Harn auf eine Reaktion, die dem Löslichkeitsminimum des Koproporphyrins I naheliegt, bei der es aber noch positive Ladung besitzt. Dieses Löslichkeitsminimum liegt im isoelektrischen Punkt des Koproporphyrins, den wir in früheren Arbeiten bei p_H 4 ermittelt haben. Bei diesem p_H liegt das Koproporphyrin I selbst in enormer Verdünnung in kolloider Form vor und hat, wenn wir uns etwas auf der sauren Seite halten, also z. B. bis um p_H 3.6 gehen, wie Kataphoreseversuche gezeigt haben, als Kolloid positiven Ladungssinn.

Als Filtermaterial verwendeten wir ein System, das aus einem Filtergerüst und einem geeigneten Adsorbens besteht. Das Filtergerüst hat in der Hauptsache die Aufgabe, für die richtige Filterbeschaffenheit, vor allem für genügende Durchlässigkeit zu sorgen, das aufgebrachte oder besser gesagt eingebaute Adsorbens hat die Aufgabe, das Porphyrin zu adsorbieren und muß deshalb umgekehrten Ladungssinn haben, wie das kolloide Porphyrin im Harn.

So filtrierte wir z. B. jeweils 50 l unter Toluol gesammelten Harn von p_H 3.6, der noch einer mehrtägigen Alterung unterworfen worden war, durch Filterschichten aus einer Seitzschen Filtermasse, die zufällig den obigen kolloidchemischen Forderungen entsprach. Sie ist auf einer 25 ccm Nutsche in etwa 1–1 $\frac{1}{2}$ cm Schicht angeschwemmt worden. Es können natürlich auch andere kombinierte Filtermaterialien verwendet werden.

Die Arbeitsvereinfachung ist, wenn man so verfährt, recht erheblich. Statt z. B. nach der Eisessig-Äther-Methode 50 l Harn auszuäthern oder mit Adsorbentien zu schütteln und dann zu zentrifugieren, wird dasselbe durch einen einfachen Filtrationsvorgang in denkbar einfacher Weise erreicht. Das Porphyrin ist lediglich aus der Filterschicht entweder bei schwach alkalischer Reaktion zu eluieren oder durch Aufgießen von Eisessig zu extrahieren. Die weitere Reinigung und Isolierung erfolgt dann im wesentlichen nach den bekannten Prinzipien der Fischerschen Schule — Überführung in den Methylester, wiederholtes Umkrystallisieren usw. —, hier speziell im Falle des Koproporphyrins I aus Harn durch achtmaliges Umkrystallisieren unter Heranziehung der Arbeitsweisen der Mikrochemie.

Dieses Arbeitsprinzip der adsorptiven Filtration ist von mir in einem Vortrage auf der Tagung der Südwestdeutschen Chemiedozenten in Stuttgart im Frühjahr 1933, also zu einer Zeit, wo die Renaissance der chromatographischen Analyse noch kaum begonnen hatte, besprochen worden. Dieses Prinzip, das man mit gewissem Recht als eine

Weiterentwicklung der Willstätterschen Adsorptions- und Elutionsmethoden bezeichnen kann, ist dann am 26. VI. 1933 einer Patentanmeldung zugrunde gelegt worden, deren Gegenstand ganz allgemein ein Verfahren zur Isolierung von feindispers verteilten, eine elektrische Ladung besitzenden Substanzen aus stark verdünnten, wäßrigen Lösungen war. Als spezielles Anwendungsgebiet sind die Isolierung geringer Mengen von Farbstoffen, Alkaloiden, Hormonen, Fermenten aus größeren Mengen von Flüssigkeiten, z. B. aus Körperflüssigkeiten, aber auch aus Mutterlaugen der Alkaloid- und Hormonherstellung an Hand von Beispielen beschrieben worden.

Die Gewinnung des Koproporphyrins I aus normalem Harn durch adsorptive Filtration hat Hoerburger in seiner Dissertation (Erlangen 1933) eingehend behandelt. Über das Prinzip der adsorptiven Filtration habe ich dann nochmals vorgetragen in einem Antrittsvortrag in Berlin am 8. Oktober 1934. Dieser Vortrag ist im Jahrbuch der Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei in Berlin abgedruckt, der Inhalt ist in einem Referat von Silbereisen, betitelt „Kolloidwissenschaft und Bierbrauerei in den letzten 10 Jahren“ in der Kolloidzeitschrift erschienen.

Im Februarheft des „Hoppe-Seyler“ erschien dann eine Mitteilung von Koschara¹¹⁾, in der im wesentlichen fast das gleiche oder zum mindesten ein äußerst verwandtes Prinzip, nach dem wir das Koproporphyrin I aus Harn isoliert hatten, unter dem Namen „Adsorptionsanalyse wäßriger Lösungen“ als eine neue Arbeitsmethode dargestellt wird, die zum ersten Male an den Lyochromen von Koschara¹²⁾ erprobt worden sei. Und bald darauf kam dann die interessante Arbeit von Koschara¹³⁾, in der ihm die Isolierung des Uropterins aus normalem Harn gelungen ist.

Es unterliegt somit keinem Zweifel, daß wir schon vor Koschara und unabhängig von diesem Autor das Koproporphyrin I aus dem Harn nach einem sehr ähnlichen Prinzip, allerdings von uns adsorptive Filtration genannt, isoliert haben.

Wir machen Hrn. Koschara auch keinerlei Vorwürfe, daß ihm unsere Arbeiten auf diesem Gebiet anscheinend entgangen sind, die auch vor denen Waldenströms¹⁴⁾ liegen. Viel wichtiger ist, daß in diesem Verfahren der adsorptiven Filtration oder Adsorptionsanalyse wäßriger Lösungen eine neue Arbeitsmethode sowohl der Wissenschaft wie der Technik zur Verfügung steht, die ihre Brauchbarkeit sowohl in unserem Falle, der Isolierung von kristallisiertem Koproporphyrin I, wie im Falle Koschara, der Isolierung des neuen Harnpigments Uropterin, erwiesen hat.

257. Hans Beyer: Neue aromatisch substituierte Fettsäuren aus δ -Chlor- γ -valerolacton, II. Mittell.: Über die Friedel-Craftssche Reaktion der Lactone.

[Aus d. Chem. Institut d. Universität Berlin.]

(Eingegangen am 24. Mai 1937.)

In der I. Mittell.¹⁾ konnte ich zeigen, daß bei der Einwirkung von Benzol auf δ -Chlor- γ -valerolacton, $C_5H_7O_2Cl$, in Gegenwart von Aluminiumchlorid neben dem Austausch des Cl-Atoms gegen die Phenylgruppe eine quantitative Aufspaltung des Lactonringes erfolgt. Als Zwischenprodukt entsteht offenbar die Verbindung $C_6H_5 \cdot CH_2 \cdot CHCl \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CO_2AlCl_2$ bzw. die δ -Phenyl- γ -chlor-valeriansäure, aus der dann als Hauptprodukt in einer Ausbeute von 80% die γ , δ -Diphenyl-valeriansäure gebildet wird. In geringerer Menge kondensieren sich 2 Moleküle der δ -Phenyl- γ -chlor-valeriansäure unter dem Einfluß

¹¹⁾ Ztschr. physiol. Chem. **239**, 89 [1936].

¹²⁾ B. **67**, 761 [1934]; Ztschr. physiol. Chem. **229**, 103 [1934]; **232**, 101 [1935].

¹³⁾ Ztschr. physiol. Chem. **240**, 127 [1936].

¹⁴⁾ Dtsch. Arch. Klin. Med. **178**, 38 [1935].

¹⁾ B. **70**, 1101 [1937].