

Über das Hämatoporphyrin

VON

M. Nencki und N. Sieber.

(Mit 1 Tafel.)

(Vorgelegt in der Sitzung am 3. Februar 1888.)

In zwei, in dem Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie¹ und auch im Auszuge in den berl. chem. Berichten² erschienenen Publicationen haben wir die Resultate unserer Untersuchungen über den Blutfarbstoff mitgetheilt, die wir hier zum leichteren Verständniss des Nachfolgenden recapituliren.

Wir haben gezeigt: 1. Dass die Hämoglobinkrystalle durch verdünnte Säuren oder Alkalien nicht allein unter Aufnahme von Sauerstoff, sondern auch des Wassers in einen Eiweisskörper — das Globin — und den farbigen Bestandtheil — das Hämatin — zerfallen. Die Menge des dabei aufgenommenen Sauerstoffs wurde in unserem Laboratorium vor kurzem durch Herrn Dr. Lebensbaum³ bestimmt, wonach 100 g trockenen Oxyhämoglobins beim Zerfall in Eiweiss und Hämatin 1,1 g O₂ absorbiren.

2. Dass bei der Spaltung des Hämoglobins durch Salzsäure in amyalkoholischer Lösung der farbige Bestandtheil des Hämoglobins in Form der bekannten Teichmann'schen Krystalle erhalten wird.

Die Zusammensetzung der so erhaltenen Krystalle — des Hämins — haben wir = (C₃₂H₃₆N₄FeO₃HCl)₄C₅H₁₂O gefunden. Der Amylalkoholgehalt der Krystalle war ein constanter und liess

¹ Bd. 18, S. 401; Bd. 20, S. 325.

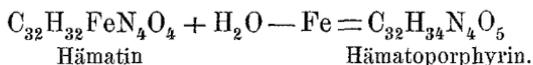
² Berl. chem. Ber., Jahrg. 1884. S. 2267.

³ Diese Berichte, Bd. 95, Jahrg. 1887.

sich durch anhaltendes Waschen mit Alkohol oder Äther nicht entfernen. Erst beim Trocknen der Krystalle im Luftbade bis zu constantem Gewicht bei 130—135° verlieren die Krystalle den Amylalkohol vollständig. Ähnlich wie die aus der amyalkoholischen Lösung abgeschiedenen Krystalle Amylalkohol, enthalten nach Hoppe-Seyler¹ die durch Ausziehen des Blutes mit Eisessig erhaltenen Häminkrystalle Essigsäure. Durch Auflösen der Häminkrystalle in verdünnten Alkalien unter Aufnahme von Wasser und Abspaltung von Salzsäure und Amylalkohol wird das Hämin zu Hämatin nach folgender Gleichung: $(C_{32}H_{30}N_4FeO_3HCl)_4C_5H_{12}O + (NaOH)_4 = (C_{32}H_{32}N_4FeO_4)_4 + C_5H_{12}O + (NaCl)_4$ umgewandelt.

3. Hämin oder Hämatin in concentrirter Schwefelsäure gelöst, verliert das Eisen und es entsteht ein durch seine Absorptionsbänder im Spectrum ausgezeichneter Farbstoff — das Hämatoporphyrin.

Das durch Eingiessen der schwefelsauren Lösung in Wasser in amorphen braunrothen Flecken abgeschiedene Hämatoporphyrin war in Alkohol, Äther und verdünnten Säuren fast unlöslich, leicht löslich in Alkalien. Der aus der alkalischen Lösung durch Säuren abgeschiedene Farbstoff enthält auch nach vollständigem Auswaschen etwas Schwefel, von geringen Mengen einer Sulfoverbindung herrührend. Die bei den Elementaranalysen nach Abzug der kleinen Schwefelsäuremenge erhaltenen Zahlen stimmten am besten zu der Formel $C_{32}H_{34}N_4O_5$, entsprechend der ganz einfachen Bildungsgleichung:



Wir betrachteten jedoch diese Formel des Hämatoporphyrin nicht als endgiltig entschieden. Es schien uns unwahrscheinlich, dass gerade unter dem Einfluss von concentrirter Schwefelsäure, eines wasserentziehenden Agens, das Hämatin Eisen verlieren und Wasser in das Molekül aufnehmen sollte. Durch besondere Versuche haben wir constatirt, dass beim Auflösen des Hämins oder Hämatins in concentrirter Schwefelsäure weder Wasserstoff entwickelt, noch Sauerstoff absorbirt wird.

¹ Berl. chem. Ber. 1885. S. 603.

Wir werden später auf die weiteren Resultate unserer Arbeiten über den Blutfarbstoff zurückkommen. Bekanntlich sind diese Untersuchungen von Hoppe-Seyler lebhaft angegriffen worden und in einer kürzlich erschienenen Publication beklagt Herr C. le Nobel¹, dass die seit Decennien in der Chemie des Blutfarbstoffes herrschende Verwirrung durch unsere Publicationen noch vermehrt worden sei, ja sogar ihren Höhepunkt erreicht habe.

An der Richtigkeit der von uns aufgestellten Hämin- und Hämatinformel haben wir nie gezweifelt. Die Übereinstimmung der Analysen, der aus verschiedenen Blutarten mit Sorgfalt dargestellten Farbstoffe war uns hinreichende Garantie dafür. Die befremdende Bildung des Hämatoporphyrins aus Hämatin nöthigte uns aber zu weiteren Untersuchungen, um Aufklärung über den hier stattfindenden Process zu erhalten. Es handelte sich, die allem Anscheine nach leichte Abspaltung des Eisens in einer glatten Reaction, namentlich unter Vermeidung der Sulfoverbindungen, zu bewirken. Nach vielfachen Versuchen haben wir in einer gesättigten Lösung von Bromwasserstoff in Eisessig ein Mittel gefunden, wonach aus dem Hämin unter Abspaltung von Eisen glatt Hämatoporphyrin entsteht. Freilich war das so erhaltene Hämatoporphyrin von ganz anderen Eigenschaften, als das bisher bekannte. Wir unterlassen hier die Beschreibung der von uns dabei angewandten Reinigungsmethoden und theilen gleich diejenige mit, die uns zur Darstellung des reinen Productes geführt hat.

Das Verfahren ist folgendes: Eine Anzahl von Kölbchen, zu etwa 300 *cm*³ Inhalt werden mit je 75 *g* Eisessig, der bei 10° T. mit Bromwasserstoff gesättigt ist, beschickt und in jedes Kölbchen allmählig und unter fortwährendem Umrühren je 5 *g*, der nach dem früher von uns beschriebenen Verfahren dargestellten und bei 100° getrockneten Häminkrystalle eingetragen. Das Hämin geht hierbei zum grössten Theil in Lösung über, worauf dann die Kölbchen 20 bis 30 Minuten lang auf dem Wasserbade erwärmt werden. Es entweicht Bromwasserstoff in Strömen, der eventuell in frischen Eisessig aufgefangen werden kann. Man

¹ Pflüger's Archiv f. Physiol. Bd. 40, S. 501. 1887.

erwärmt so lange unter fortwährendem Umrühren, bis kein Gas mehr entweicht und entweder gar kein, oder nur ein geringer Rückstand von ungelöstem Hämin hinterbleibt. Die braunrothe Farbe der Lösung geht in ein prächtiges Roth des Hämatoporphyrin über. Es ist nöthig, das Hämin in kleinen Portionen in den Eisessig einzutragen. Schüttet man die 5 g auf einmal ein, so verbarzt das Hämin und geht nur sehr schwer in Lösung über. Auch das Erwärmen darf nicht zu lange fortgesetzt werden, da sonst die schön rothe Lösung einen braunen Stich bekommt und die Ausbente an reinem Product geringer wird. Der Kölbcheninhalt wird jetzt in viel Wasser gegossen. Auf 40 bis 50 g des verarbeiteten Hämins 5 bis 6 l destillirten Wassers. Beim Vermischen der eisessigsaurer Lösung mit Wasser, tritt der angenehme Geruch des gebildeten Essigsäureamylesters hervor, es entsteht ein brauner, flockiger Niederschlag und die Flüssigkeit färbt sich tief roth. Man lässt einige Stunden stehen, filtrirt vom Ungelösten ab und versetzt das Filtrat mit Natronlauge. Sobald aller Bromwasserstoff gesättigt ist, fällt aus der Lösung der in Essigsäure unlösliche Farbstoff fast vollständig aus. Man lässt absetzen und wäscht den Niederschlag durch Decantation, oder auf dem Filter so lange aus, bis im Filtrat durch Silbernitrat kein Niederschlag entsteht. Das aus dem Hämin abgespaltene Eisen findet sich im Filtrate zum grössten Theil als Oxydul-, in geringen Mengen auch als Oxydsalz vor.

Der ausgewaschene Niederschlag, nachdem er durch Liegen auf Fliesspapier den grössten Theil des Wassers verloren, wird noch feucht mit reiner verdünnter Natronlauge auf warmem Wasserbade $\frac{1}{4}$ Stunde digerirt. Es wird dadurch das noch anhängende Eisenoxydulsalz entfernt, während der Farbstoff in Lösung geht. Bei ruhigem Stehen des warmen Filtrates in der Kälte bilden sich allmählig an den Wänden und am Boden des Gefässes kugelige Aggregate des weiter unten zu beschreibenden Natronsalzes des Hämatoporphyrin aus. Es ist zweckmässig, sie zu sammeln, da man daraus durch Umkrystallisiren aus warmem Wasser leicht das Natronsalz rein erhalten kann. Die alkalische Lösung wird jetzt durch Essigsäure im Überschusse versetzt und der abgeschiedene Farbstoff von neuem gut ausgewaschen, vom Filter abgehoben, mit wenig Wasser in einer Schale zu einem

dicken Brei angerührt und unter Umrühren mit reiner Salzsäure vorsichtig versetzt. Der Farbstoff geht bis auf einen geringen harzigen Rest in Lösung über. Das tiefroth gefärbte Filtrat wird jetzt im Vacuum über SO_4H_2 verdunstet, woraus sich nach zwei- bis fünftägigem Stehen der grösste Theil des Hämatoporphyrins als salzsaures Salz in braunrothen mikroskopischen Krystallnadeln absetzt. Das so erhaltene Salz ist jedoch nicht ganz rein. Bei mikroskopischer Durchmusterung der Krystalle findet man neben den rhombischen Nadeln des salzsauren Hämatoporphyrins auch dunkle amorphe Körner, die das Präparat verunreinigen. Zur weiteren Reinigung werden die Krystalle auf ein Filter gebracht, mit wenig 10% Salzsäure nachgewaschen und auf Fliesspapier liegen lassen, bis davon keine Feuchtigkeit mehr aufgenommen wird. Jetzt werden die Krystalle mit möglichst wenig, auf 30 bis 35° vorgewärmtem Wasser unter Zusatz von einigen Tropfen Salzsäure geschüttelt, bis vollständige, oder fast vollständige Lösung erfolgt. Man filtrirt und versetzt das klare Filtrat mit einem nicht allzu starken Überschusse von Salzsäure (spec. Gew. 1.12). Das salzsaure Hämatoporphyrin ist in ganz schwach saurem Wasser leicht löslich, mit zunehmender Concentration der Säure nimmt die Löslichkeit jedoch ab. Lässt man jetzt die angesäuerte Lösung im Vacuum über SO_4H_2 stehen, so krystallisirt in kurzer Zeit das salzsaure Hämatoporphyrin aus. Das jetzt auskrystallisirte Salz ist vollkommen rein und homogen und geben Präparate verschiedener Darstellung bei den Elementaranalysen untereinander stimmende Zahlen. Die abfiltrirten und mit 10% Salzsäure nachgewaschenen Krystalle haben wir zunächst zwischen Fliesspapier abgepresst, sodann im Exsiccator über concentrirter Schwefelsäure und Natronkalk bis zu constantem Gewichte getrocknet. Da die Substanz am Lichte sich leicht bräunt, so ist es nothwendig, während des Trocknens sie im Dunklen aufzubewahren. Aus den Mutterlaugen der Krystalle kann durch Übersättigen mit Natronlauge, Fällen mit Essigsäure, Auswaschen des Niederschlages und Auflösen in Salzsäure von Neuem das salzsaure Hämatoporphyrin krystallinisch erhalten werden.

Um aus dem salzsauren Salze das freie Hämatoporphyrin zu erhalten, werden die reinen trockenen Krystalle im Wasser,

das durch einige Tropfen Salzsäure schwach sauer ist, in der Kälte gelöst und die Lösung genau mit Natronlauge neutralisirt. Um die Neutralisation der Salzsäure vollkommen zu erreichen, werden der Lösung einige Tropfen Essigsäure zugesetzt. Oder noch besser die salzsaure Lösung mit essigsauerm Natron ausgefällt. Das in braunrothen amorphen Flocken abgeschiedene Hämatoporphyrin wird auf dem Filter vollständig ausgewaschen und im Vacuum über SO_4H_2 bis zu constantem Gewichte getrocknet. Wie aus der ganzen obigen Beschreibung ersichtlich, ist das Hämatoporphyrin ein sehr delicateser und leicht veränderlicher Körper. Die Lösung des salzsauren Salzes darf nicht erwärmt werden, da leicht Verharzung eintritt. Ebenso verträgt das freie Hämatoporphyrin kein Trocknen im Luftbade bei 100° und darüber. Man erkennt dies leicht daran, dass das bloß im Vacuum getrocknete Präparat in verdünnter Salzsäure und Alkohol leicht und vollkommen löslich ist. Versucht man es im Luftbade bei 100° zu trocknen, so wird es je nach der Dauer allmählig in Salzsäure, hernach auch in Alkohol unlöslich und nimmt eine bräunliche Färbung an. Dabei verliert es immer an Gewicht, und zwar so, dass das bei 105 bis 110% bis zu constantem Gewichte getrocknete Präparat bei 110 bis 115% u. s. w. von neuem an Gewicht verliert. Ähnliches gilt auch von den weiter unten zu beschreibenden Metallverbindungen des Hämatoporphyrins.

Die Elementaranalysen des salzsauren, sowie des daraus dargestellten freien Hämatoporphyrins ergaben uns die überraschende Thatsache, dass dasselbe nach der Formel: $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_3$ zusammengesetzt, das heisst dem Gallenfarbstoff — dem Bilirubin — isomer ist.

0·2062 g des salzsauren Salzes mit Kupferoxyd und vorgelegter metallischer Silber- und Kupferspirale verbrannt, gaben 0·4522 g CO_2 und 0·1144 g H_2O oder 59·80% C und 6·16% H.

0·2966 g mit Salpetersäure und salpetersauerm Silber in zugeschmolzenem Rohre erhitzt, gaben 0·1292 g AgCl = 10·77% Cl.

0·2254 g mit Kupferoxyd im Schiffchen verbrannt, gaben 18 cm^3 Ngas bei 19° T. und 705 mm Bst. = 8·5% N.

Die Analysen des aus diesem Präparate dargestellten freien Hämatoporphyrins ergaben folgende Zahlen:

0·2005 *g* mit Kupferoxyd verbrannt, gaben 0·4914 *g* CO₂ und 0·1142 *g* H₂O oder 66·84% C und 6·32% H.

0·2193 *g* gaben mit Kupferoxyd verbrannt 20 *cm*³ N_{gas} bei 17·4° T. und 706 *mm* Bst. = 9·77% N.

0·2179 *g* des gleichen Präparates gaben 0·5367 *g* CO₂ und 0·1289 *g* H₂O oder 67·16% C und 6·56% H.

0·2592 des salzsauren Hämatoporphyrins von einer anderen Darstellung herrührend, gaben 0·5682 *g* CO₂ und 0·1376 *g* H₂O oder 59·79% C und 5·89% H.

0·2425 *g* der Substanz gaben 0·1052 *g* Ag Cl = 10·73% Cl.

Der Rest des Präparates wurde in freies Hämatoporphyrin verwandelt und analysirt.

0·1973 *g* der Substanz gaben 0·4846 *g* CO₂ und 0·1103 *g* H₂O oder 66·98% C und 6·21% H.

0·2677 *g* des salzsauren Hämatoporphyrins von einer dritten Darstellung herrührend, gaben 0·1177 *g* Ag Cl = 10·9% Cl.

0·2157 *g* gaben 0·4712 *g* CO₂ und 0·1223 *g* H₂O oder 59·57% C und 6·29% H.

0·243 *g* gaben 18·4 *cm*³ N_{gas} bei 14° T und 720 *mm* Bst = 8·41% N.

Ein anderer Theil des Präparates in freies Hämatoporphyrin verwandelt, gab folgende Zahlen:

0·2445 *g* gaben 0·5996 *g* CO₂ und 0·1438 *g* H₂O = 66·85% C und 6·53% H.

0·2383 *g* gaben 20·7 *cm*³ N bei 16·6% T. und 720 *mm* Bst = 9·51% N.

Die aus den erhaltenen Zahlen berechnete Formel des salzsauren Salzes = C₁₆H₁₈N₂O₃HCl verlangt in Procenten

Theorie	Versuch		
	I.	II.	III.
C ₁₆ 59·53%	C . . . 59·80%	59·79%	59·57%
H ₁₉ 5·89	H . . . 6·16	5·89	6·29
N ₂ 8·68	N . . . 8·5	—	8·41
Cl 11·00	Cl . . 10·77	10·73	10·9

Die Hämatorporphyrinformel = $C_{16}H_{18}N_2O_3$ verlangt in Procenten

Theorie	Versuch			
	I.		II.	III.
C...67·13%	C...66·84%	und 67·16%	66·98%	66·85%
H .. 6·29	H.. 6·32	„ 6·56	6·21	6·53
N .. 9·79	N.. 9·77	—	—	9·51

Das mittelst Bromwasserstoff erhaltene Hämatorporphyrin ist in fixen und kohleisauer Alkalien, verdünnten Mineralsäuren und Alkohol leicht löslich. Nur wenig löslich in Äther, Amylalkohol und Chloroform. In Wasser und verdünnter Essigsäure ist es fast unlöslich. Die alkoholische, sowie die alkalische Lösung sind schön roth und zeigen im Spectrum die bekannten vier Absorptionsstreifen, wie sie schon von Hoppe-Seyler und neuerdings von le Nobel¹ in ihren Arbeiten abgebildet sind. An der Luft nehmen die alkalischen Lösungen allmählig einen bräunlichen Stich an. Mit Säure ausgefälltes und abfiltrirtes Hämatorporphyrin färbt sich feucht an der Luft grünlich. Die alkoholische Lösung mit Essigsäure angesäuert, zeigt im Spectrum ebenfalls die vier Absorptionsbänder. Besonders schön sind die Lösungen des Hämatorporphyrins in verdünnten Mineralsäuren, wo die lebhaft rothe Farbe einen bläulichen Stich hat. Solche Lösungen zeigen im Spectrum die zwei scharfen Absorptionsbänder zu beiden Seiten der Natriumlinie, wie sie von früheren Autoren als Spectrum des Hämatorporphyrins in saurer Lösung abgebildet wurden. Von Interesse, namentlich für solche Pseudochemiker, die sich bei ihren Arbeiten einzig mit dem Spectralapparate begnügen und darauf hin neue Körper entdecken, ist das spectroscopische Verhalten des salzsauren Hämatorporphyrins. So lange den Krystallen Feuchtigkeit und überschüssige Salzsäure anhaftet, sind sie im Wasser leicht löslich und zeigen im Spectrum die zwei Absorptionsbänder des Hämatorporphyrins in saurer Lösung. Über Schwefelsäure und Natronkalk bis zu constantem Gewichte getrocknet, sind sie im Wasser nicht mehr ganz löslich, wohl aber im Alkohol. Eine solche alkoholische Lösung zeigt im Spectrum fünf Absorptionsbänder, genau so wie sie Herr le Nobel

¹ Pflüger's Archiv, Bd. 40.

für sein Isohämatoporphyrin in alkoholischer Lösung abgebildet hat. Ein minimaler Zusatz von Mineralsäure genügt, um die fünf Bänder verschwinden zu lassen und statt deren die zwei Streifen des Hämatoporphyrins in saurer Lösung hervorzurufen. Durch Eintragen von NaCl , MgCl_2 , $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ und anderer Neutralsalze wird das Hämatoporphyrin aus seiner salzsauren Lösung ausgefällt.

Meistentheils ist der abgeschiedene Farbstoff amorph. Hat man aber die Lösung mit dem Neutralsalz nicht übersättigt oder von dem ausgefallten Theil abfiltrirt, so bilden sich bei ruhigem Stehen des Filtrates in der Kälte zu Büscheln vereinigte Krystalle des salzsauren Salzes. So haben wir sie zum ersten Male gesehen und auf der beiliegenden Tafel, Fig. 1, abgebildet. Leider sind die Krystalle nicht haltbar. Allem Anscheine nach enthalten sie Krystallwasser, das sie schon an der Luft verlieren. Nach dem Pulvern und Trocknen über Schwefelsäure ist das Salz amorph. Durch Wasser werden sie zersetzt, wesshalb sie auch bei der Darstellung mit salzsäurehaltigem Wasser nachzuwaschen sind. In verdünnter Salzsäure suspendirt, halten sie sich unverändert. Wir bewahren ein solches Präparat seit nahezu einem Jahre.

Es ist dies jedoch nicht die einzige krystallinische Verbindung des Hämatoporphyrins. Wir haben oben erwähnt, dass beim Auflösen desselben in warmer Natronlauge beim Erkalten des Filtrates sich kugelige Aggregate absetzen. Es ist dies das Natronsalz des Hämatoporphyrins. Dieses Salz wurde abfiltrirt, zwischen Fliesspapier abgepresst und zwei Mal aus wenig heissem Wasser umkrystallisirt. Es ist nothwendig, das Salz möglichst kurze Zeit zu erwärmen und es empfiehlt sich desshalb, durch einen warmen Trichter zu filtriren. Wir erhielten so die Natriumverbindung völlig homogen, in sehr kleinen Drusen aus mikroskopischen, concentrisch gruppirten Prismen bestehend (siehe Fig. 2). Die Krystalle sind doppelbrechend. Eine Natriumbestimmung in dem im Vacuum bis zu constantem Gewichte getrockneten Salze, ergab uns folgende Zahlen: 0.2624 g gaben 0.0561 g $\text{SO}_4\text{Na}_2 = 6.92\%$ Na. Die Formel $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{NaN}_2\text{O}_3 + \text{H}_2\text{O}$ verlangt 7.05% Na. Das Natronsalz ist in Wasser bedeutend leichter löslich, als die salzsaure Verbindung, wesshalb bei Zusatz von Salzsäure zu seiner wässerigen Lösung sich sofort salzsaures Hämatoporphyrin

abscheidet; in Alkohol ist dagegen die Natriumverbindung nur wenig löslich. Aus diesem Salze lassen sich durch Doppelzersetzung eine ganze Reihe Metallverbindungen des Hämatoporphyrins darstellen. Allem Anscheine nach entstehen hierbei durch wässrige Lösung der Metallsalze mit Mineralsäuren Verbindungen, die auf ein Molekül des Hämatoporphyrins ein Atom eines einwerthigen Metalls enthalten. Durch Fällung mit essigsauren Salzen entstehen dagegen Verbindungen mit 2 Atomen Metall. Mit Ausnahme noch des Kalium- und des Ammoniumsalzes sind die Metallverbindungen des Hämatoporphyrins in Wasser unlösliche, amorphe, rothe bis braunrothe Niederschläge.

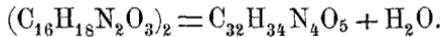
Das Zinksalz, durch Fällung des oben beschriebenen Natronsalzes mit einer Lösung von Zinkacetat erhalten, ist ein braunrother, in Wasser vollkommen unlöslicher Niederschlag. Auf dem Filter bis zum Verschwinden des Zinks im Filtrate ausgewaschen und über SO_4H_2 bis zu constantem Gewichte getrocknet, ergab das Salz uns folgende Zahlen: 0.2522 g gaben $0.0545\text{ g ZnO} = 17.35\%$ Zn, entsprechend der Formel: $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{ZnN}_2\text{O}_3 + \text{H}_2\text{O}$, welche 17.71% Zn verlangt. Wir haben versucht zur Entfernung des Krystallwassers das Salz bei 105 bis 110% zu trocknen. Es findet hierbei zwar Gewichtsverlust statt, das Salz wird jedoch bräunlich und ist in verdünnter Salzsäure nicht mehr vollständig löslich.

Durch Silbernitrat wird die Lösung des Hämatoporphyrinatrons ebenfalls gefällt. Der entstandene, gut ausgewaschene Niederschlag wurde auch nur über SO_4H_2 getrocknet. 0.1882 g dieses Salzes hinterliessen nach dem Glühen $0.0498\text{ g Ag} = 26.46\%$ Ag. Die Formel $(\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{Ag}_2\text{N}_2\text{O}_3)_2 + \text{H}_2\text{O}$ oder auch $(\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3)_2\text{Ag}_2\text{O}$ — denn es ist möglich, dass die Salze des Hämatoporphyrins Verbindungen mit Metalloxyden sind — verlangt 26.86% Ag.

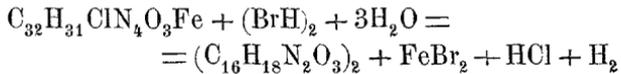
Auch die Barium- und die Calciumsalze des Hämatoporphyrins sind in Wasser nahezu unlöslich. Sie werden durch Fällung der Natriumverbindung mit BaCl_2 , CaCl_2 , resp. den Acetaten dieser Erdmetalle erhalten.

Aus allem Mitgetheilten geht zur Genüge hervor, dass das mittelst Bromwasserstoff erhaltene Hämatoporphyrin bis auf das spectroscopische Verhalten in allen übrigen Eigenschaften und der Zusammensetzung von dem, mittelst concentrirter SO_4H_2 dar-

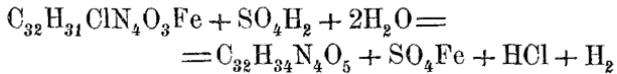
gestellten verschieden ist. Dass das mittelst Bromwasserstoff dargestellte Product eine reine chemische Verbindung von der Formel $C_{16}H_{18}N_2O_3$ ist, geht mit Sicherheit aus den oben mitgetheilten Analysen hervor. Ob das mittelst concentrirter Schwefelsäure dargestellte Product rein, oder ein Gemenge mehrerer Substanzen ist, lassen wir unentschieden. Es muss aber hervorgehoben werden, dass die von uns in unserer zweiten Mittheilung¹ aus den analytischen Resultaten abgeleitete Formel in sehr naher Beziehung zu der Formel der mit Bromwasserstoff erhaltenen Substanz steht. Man hat in der That:



Das mittelst concentrirter Schwefelsäure erhaltene Hämatoporphyrin wäre also ein Anhydrid des neu erhaltenen und diese Annahme erscheint uns auch als die wahrscheinlichste. Die Häminkrystalle sind nach der Formel $C_{32}H_{31}ClN_4O_3Fe$ zusammengesetzt. Bei der Bildung des Hämatoporphyrins daraus müsste freier Wasserstoff auftreten, entsprechend der Gleichung:



Für die Formel $C_{16}H_{17}N_2O_3$ wurde der Wasserstoff in den Analysen des salzsauren Salzes wie des freien Hämatoporphyrins durchgängig zu niedrig gefunden. Sie bleibt also ausgeschlossen. Freier Wasserstoff müsste übrigens auch bei der Bildung des Schwefelsäurehämatoporphyrins auftreten nach der Gleichung:



und doch haben wir beim Auflösen der Häminkrystalle in concentrirter SO_4H_2 an gasförmigen Producten nur Chlorwasserstoff nachweisen können. Ohne es direct nachgewiesen zu haben, sind wir der Ansicht, dass der Wasserstoff bei der Umwandlung des Hämins in Hämatoporphyrin deshalb nicht frei auftritt, weil er von einem andern Theil des leicht reducibaren Hämins absorbiert wird. Es wurde oben mitgetheilt, dass beim Eingiessen der eissigsäuren Lösung in Wasser das bromwasserstoffsäure Hämatoporphyrin in Lösung geht, und gleichzeitig ein flockiger, in ver-

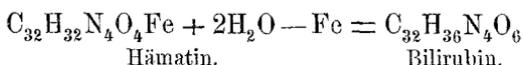
¹ Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmak. Bd. XX, S. 330.

dünnten Mineralsäuren unlöslicher Niederschlag entsteht. Dieser Niederschlag besteht nur zum geringen Theil aus unzersetztem Hämatin und unlöslich gewordenem Hämatoporphyrin. Es findet sich hauptsächlich darin ein brauner, in Chloroform leicht löslicher Körper, der allem Anscheine nach dieses Reductionsproduct ist. Es gelang uns aber nicht, diese Substanz von dem ihm beige-mengten Hämatoporphyrin zu trennen. Wir versuchten den Bromwasserstoff durch eine kaltgesättigte Lösung von Chlorwasserstoff in Eisessig zu ersetzen. Doch wird Hämin damit auf dem Wasserbade erwärmt, nicht zersetzt; während bei Anwendung von Jodwasserstoff in Eisessig die Reduction schon in der Kälte viel weiter geht und als Endproduct derselben mit jodsubstituirtten Substanzen vermengt, das später zu beschreibende Urobilin auftritt. Auch Hämatin wird durch Bromwasserstoff in Eisessig zu Hämatoporphyrin umgewandelt. Doch ist die Ausbeute wegen der Schwerlöslichkeit des ersteren viel geringer, und selbst bei Anwendung von Häminkrystallen ist wegen der nothwendigen Reinigungen und damit verbundenen Verlusten die Menge des rein erhaltenen Hämatoporphyrins keineswegs gross. Wir haben im Laufe dieser Untersuchung über ein halbes Kilo Hämin verarbeitet, das theilweise von uns, hauptsächlich aber von unserm Laboratoriumsabwart nach der in der ersten Mittheilung angegebenen Methode dargestellt worden ist. Bei dieser Gelegenheit wollen wir noch bemerken, dass trotz Hoppe-Seyler der Amylalkoholgehalt der Krystalle ein constanter ist. So auffallend auch uns selbst diese Thatsache war, so hatte ihre objective Anerkennung zunächst den Nutzen, dass wir den später von Hoppe-Seyler bestätigten Essigsäuregehalt der aus Eisessig dargestellten Häminkrystalle vorausgesagt haben. Dieser Befund steht jetzt nicht vereinzelt da. Nach den kürzlich veröffentlichten Mittheilungen von Mylius¹ ist die blaue Jodcholsäure nach der Formel $(C_{24}H_{40}O_5J)_4HJ$ und die blaue Jodstärke nach der Formel $(C_{24}H_{40}O_{20}J)_4JH$ zusammengesetzt. Auf vier Moleküle der gejodeten Verbindung kommt als ein fünfter nothwendiger Bestandtheil ein Molekül Jodwasserstoff, worin das Wasserstoffatom auch durch verschiedene Metalle ersetzt werden kann.

¹ Berl. Chem. Ber. 1887, S. 694.

Die auffällige Erscheinung, dass bei Einwirkung von concentrirter Schwefelsäure oder in Eisessig gelösten Bromwasserstoffes das Hämin unter Wasseraufnahme in Hämatoporphyrin übergehe, findet nach unserer Vermuthung darin ihre Aufklärung, dass in erster Instanz Schwefelsäureester, beziehungsweise Acetylverbindungen entstehen, welche durch Wasser, respective Alkali, unter Aufnahme von Wasser zersetzt werden.

Als Ergebniss unserer ersten Untersuchung über das Hämatin haben wir den Satz aufgestellt, dass, wenn Blutfarbstoff in Gallenfarbstoff übergehe, dies unter Abspaltung von Eisen und Aufnahme von zwei Molekülen Wasser geschehen müsse.



Diese Gleichung ist durch die Darstellung des Hämatoporphyrins mittelst Bromwasserstoff realisirt. Gleichzeitig erscheint dadurch die ursprüngliche einfache Formel des Bilirubins von Städeler als die richtigere. Aus der Zusammensetzung des salzsauren Hämatoporphyrins, sowie der Metallverbindungen desselben, geht mit Sicherheit hervor, dass ihm die Formel $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_3$ zukommt. Maly hat die Städeler'sche Formel des Bilirubins verdoppelt. Veranlassung dazu waren ihm die Zusammensetzung des Tribrombilirubins, des Biliverdins und des Urobilins.

Sicher ist es, dass aus der Bilirubinformel $\text{C}_{32}\text{H}_{36}\text{N}_4\text{O}_6$ die Bildung der genannten Producte sich viel einfacher erklärt. Doch ist dies für die Verdoppelung der Formel kein zwingender Grund. Hämatoporphyrin verliert schon bei 100° allmählig das Wasser und geht aller Wahrscheinlichkeit nach unter Verdoppelung des Moleküls und Abspaltung von Wasser in das gleiche Product über, das aus Hämatin durch concentrirte Schwefelsäure entsteht. Ähnliches könnte mit dem Bilirubin bei der Einwirkung oxydirender oder reducirender Mittel der Fall sein. Trotz der auffälligen Verschiedenheit zwischen Hämatoporphyrin und Bilirubin sind sich diese beiden Körper, namentlich wenn man ihre gleiche Zusammensetzung kennt, in vielen Punkten sehr ähnlich. Trocken auf Platinblech erhitzt, entwickelt das Hämatoporphyrin reichlich Pyrroldämpfe und hinter-

lässt schwer verbrennbare Kohle, wesshalb auch, besonders bei den Stickstoffbestimmungen, mit Kupferoxyd ein heftiges und anhaltendes Glühen nothwendig ist. Reines, nach der Vorschrift von Städeler dargestelltes Bilirubin verhält sich ähnlich. Auch hier tritt beim Erhitzen auf Platinblech zunächst der Pyrrolgeruch auf und die Dämpfe röthen einen mit Salzsäure befeuchteten Fichtenspan. Später riechen die Dämpfe unangenehm kratzend, dem verbrennenden Phymatorhusin ähnlich und es hinterbleibt schwer verbrennbare Kohle. Übergiesst man etwas Hämatoporphyrin mit rauchender Salpetersäure und erwärmt gelinde, so geht die anfänglich prächtig rothe Farbe in schönes Grün, Blau, später Gelb über, welche Farbänderung lebhaft an die Gmelin'sche Gallenfarbstoffreaction erinnert. Das bei der Oxydation des Hämatoporphyrins mit Salpetersäure zuerst auftretende, mit schön grüner Farbe darin lösliche Product, fällt durch Zusatz von Wasser in amorphen, gelblich grünen Flocken aus. Von Alkalien wird es mit gelber Farbe gelöst. Wir haben es nicht näher untersucht. Vor allem ist es aber das Verhalten gegen nascirenden Wasserstoff, worin sich die Verwandtschaft zwischen dem Bilirubin und dem Hämatoporphyrin documentirt. Während das Bilirubin durch Natriumamalgam zu Urobilin wird, ist das Hämatoporphyrin gegen reducirende Agentien beständiger, indem es durch Natriumamalgam, oder durch Eisen und Essigsäure kaum angegriffen wird. Erst durch Kochen seiner alkoholischen Lösung mit Zinn und Salzsäure am Rückflusskühler auf dem Wasserbade, wird es zu einem Körper reducirt, der die grösste Ähnlichkeit mit dem Urobilin hat. Das entstandene Pigment ist in Alkohol leicht löslich. Aus den concentrirteren Lösungen fällt durch Wasserzusatz der Farbstoff in amorphen, braunrothen Flocken aus. Durch Säurezusatz nimmt die gelbe Lösung eine schön rothe Nuance an. Die sauren Lösungen zeigen im Spectrum den bekannten Urobilinstreifen zwischen grün und blau, dessen Lage, wie uns vergleichende Versuche zeigten, genau dem Absorptionsbande des Urobilins aus Bilirubin entsprechen. Auch die grüne Fluorescenz mit ammoniakalischer Zinklösung ist ebenso schön und intensiv, wie die einer Urobilinlösung aus Bilirubin von gleicher Concentration. Ebenso ist die Lage des Absorptionsbandes der beiden Zinksalze in

ammoniakalischer Lösung dieselbe. Trotzdem sind allem Anscheine nach die beiden Urobiline nicht identisch, indem wie schon le Nobel¹ bemerkt, das Urobilin aus Hämatoporphyrin sich an der Luft rasch oxydirt. Wir haben ammoniakalische Lösungen mit Chlorzink beider Urobiline von gleicher Concentration und gleicher Fluorescenz angefertigt. Schon nach drei Tagen war die Fluorescenz und der Streifen im Spectrum des Hämatoporphyrinurobilins verschwunden. Die Lösung wurde blassgelb, fast farblos. Das Bilirubinurobin zeigte nach sieben Tagen kaum noch Fluorescenz. Dagegen war der Streifen im Spectrum noch sehr deutlich. Nach fünfzehn Tagen wurde auch hier die Lösung ganz blass und zeigte keinen Absorptionsstreifen mehr. Wir gedenken, grössere Quantitäten des Hämatoporphyrinurobilins darzustellen und durch Analysen und genauere Vergleiche die Frage endgiltig zu entscheiden.

Es konnte nicht fehlen, dass wir im Laufe dieser Untersuchung die früheren Arbeiten über den Gallenfarbstoff einer erneuerten Durchsicht unterworfen haben. Städeler,² welcher für das Bilirubin die Formel $C_{16}H_{18}N_2O_3$ aufstellte, fand in seinen bei 120—130° getrockneten Präparaten 67·15% C, 6·27% H, 9·59% N, respective 67·11% C und 6·12% H. Das bei 130° getrocknete Kalksalz enthielt 6·40% Ca. Die Formel $(C_{16}H_{17}N_2O_3)_2Ca$ verlangt 6·52% Ca. Die gleichen Zahlen erhielt Maly.³ Er fand in seinen Bilirubinpräparaten 67·52% C, 6·29% H und 66·95% C und 6·29% H. Die Analysen der beiden Autoren stimmen also gut untereinander, und die Zusammensetzung des Kalksalzes spricht für die Beibehaltung der einfachen Formel $C_{16}H_{18}N_2O_3$. Thudichum hat bekanntlich für das Bilirubin die Formel $C_9H_9NO_2$ aufgestellt. Diese Formel verlangt 66·26% C, 5·52% H und 8·59% N. Er sucht sie noch durch eine Reihe von ihm dargestellter Salze und Bromsubstitutionsproducte zu beweisen. Für uns sind die Angaben Thudichum's einer ernsten Beachtung nicht werth, und jeder sachverständige Chemiker, der sich die

¹ Pflüger's Archiv. Bd. 40, S. 516.

² Vierteljahrsschr. d. naturf. Gesellsch. in Zürich. VIII. Jahrg. 1863. S. 277 u. ff.

³ Diese Sitzungsber. Bd. 70, 1874.

Mühe gegeben hat, seine Publicationen durchzulesen, wird gewiss unserer Ansicht sein. Man vergleiche z. B. wie er mit der Reindarstellung seines Bibrombilirubins (Ann. Chem. Pharm. Bd. 181, S. 247 u. ff.) fertig wird.

Hämatoporphyrin, dem Thierkörper einverleibt, wird zum kleinen Theil mit dem Harn unverändert ausgeschieden, zum grössten im Organismus zurückgehalten und vielleicht zur Hämoglobinbildung verwendet. Ein Kaninchen erhielt 0.1 g des reinen Natronsalzes in wässriger Lösung subcutan. Der darauf nach fünf und zehn Stunden, sowie am folgenden Tage mit Katheter entnommene Harn enthielt weder Gallenfarbstoff, noch Urobilin, noch unverändertes Hämatoporphyrin. Nach drei Wochen wird der Versuch am gleichen Thiere wiederholt. Das Kaninchen erhält jetzt 0.4 g des Natronsalzes in vierprocentiger Lösung an zwei Stellen subcutan injicirt. Der fünf Stunden später entnommene Harn enthält keinen Gallenfarbstoff, kein Urobilin, wohl aber geringe Mengen von Hämatoporphyrin, das durch Ansäuern des Harnes und Ausschütteln mit Amylalkohol isolirt wird. Der vier Stunden später entnommene Harn enthält schon weniger Hämatoporphyrin. Der Harn vom folgenden Tage — in der Nacht hat das Thier keinen Harn gelassen — enthält nur Spuren von Hämatoporphyrin. In dem fünf Stunden später entnommenen Harne war kein Hämatoporphyrin mehr nachweisbar. Achtzehn Tage später wird das Thier getödtet. Die Section zeigt, dass die eine Injectionsstelle verhärtet ist. Die Schrunde nach innen zu ist roth gefärbt. In der ganzen Umgebung im Unterhautzellgewebe, sowie an den entsprechenden Stellen an den Muskeln keine Verfärbung. An der rechten Seite, der zweiten Injectionsstelle, findet sich ein haselnussgrosser, verkäster Abscess, der etwas Farbstoff enthält. In der ganzen Umgebung war keine abnorme Verfärbung vorhanden. Der an beiden Injectionsstellen noch vorgefundene Farbstoff erwies sich als Hämatoporphyrin. Als wir einem Kaninchen 1.5 g des Natronsalzes subcutan injicirten, enthielt der Harn bedeutend grössere Mengen Hämatoporphyrin. Daneben auch Urobilin und Eiweiss. Das Thier ging am dritten Tage zu Grunde. Bei einem Hunde von 13 kg Körpergewicht, der per os 0.7 g Hämatoporphyrin erhielt, haben wir im Harne weder Hämatoporphyrin, noch sonst was Abnormes gefunden. Der darauf gelassene

Koth enthielt etwas unverändertes Hämatoporphyrin, das durch Ausziehen mit Amylalkohol nachgewiesen wurde.

Mit der Feststellung der Formel des Hämatins und des Hämatoporphyrins ist die Frage nach der Zusammensetzung des Blutfarbstoffs erledigt. Die zukünftige Untersuchung auf diesem Gebiete wird sich voraussichtlich einerseits dem vollständigen Abbau des Hämatoporphyrinmoleküls, andererseits der künstlichen Darstellung des Blutfarbstoffes zuwenden. Das Hämatoporphyrin, für welches Mulder und van Goudoever die Formel $C_{44}H_{44}N_6O_6$ und Hoppe-Seyler die Formel $C_{68}H_{74}N_8O_{12}$ aufstellten, ist wie man sieht, ein verhältnissmässig einfach zusammengesetzter Körper. Es ist ein Abkömmling des Pyrrols und seiner künstlichen Darstellung dürften kaum grössere Schwierigkeiten entgegenstehen, als wie der des Hämatoxylins oder der bereits realisirten des Indigo. Von Interesse ist die folgende, gelegentlich der Chlorbestimmung im salzsauren Salze gemachte Beobachtung. Beim Erwärmen des Hämatoporphyrins mit NO_3H und NO_3Ag auf dem Wasserbade im zugeschmolzenen Rohr wird das Hämatoporphyrin unter lebhafter Gasentwicklung gelöst. Lässt man nun nach etwa einer halben Stunde, wenn die Lösung ganz farblos geworden, erkalten, so krystallisirt in ziemlicher Menge ein farbloses Silbersalz einer Säure aus, deren Untersuchung voraussichtlich von Wichtigkeit für die Erkenntniss der chemischen Constitution des Hämatoporphyrinmoleküls sein wird. Allem Anscheine nach werden im Organismus und speciell in der Leberzelle gleichzeitig Hämatoporphyrin und Bilirubin gebildet, und wir werden beim Übergang von Urobilin in den Harn zu unterscheiden haben, ob es vom Blut- oder Gallenfarbstoff abstammt. Aber nur das leicht veränderliche Hämatoporphyrin ist zum Aufbau des Hämoglobinmoleküls geeignet. Das nicht verwerthbare Bilirubin wird mit dem Darminhalt entleert.

Die vielfach discutirte Frage, ob aus dem Blutfarbstoff im Organismus Gallenfarbstoff gebildet werde, kann auf Grund der erhaltenen Resultate mit grosser Wahrscheinlichkeit bejahend beantwortet werden. Durch Spaltpilze oder auch Alkalien entsteht bekanntlich aus den Kohlehydraten Gährungsmilchsäure. In thierischen Organismen wird dagegen daraus die ihr isomere Fleischmilchsäure gebildet. Ein ähnliches Verhältniss scheint

bezüglich der Bildung des Hämatoporphyrins und des Bilirubins aus dem Blutfarbstoff zu bestehen. Von Interesse ist daher die Thatsache, dass unter Umständen auch im Thierkörper Hämatoporphyrin gebildet wird. So ist nach Mac Munn¹ der Farbstoff im Integument einiger wirbelloser Thiere Hämatoporphyrin, und Tappeiner² fand es in pathologischen Knochen zweier Schweine als körniges, braunrothes Pigment in allen Schichten der Knochen- substanz eingelagert.

¹ Maly's Jahresber. f. 1886, S. 348.

² Ibid. S. 320.

Erklärung der Tafel.

Figur 1. Krystalle des salzsauren Hämatoporphyrins.

Figur 2. Hämatoporphyrinnatron. 300fache Vergrößerung.

