

**17. William Küster: Ueber Oxydationsproducte des Hämatoporphyrins und die Zusammensetzung des nach verschiedenen Methoden dargestellten Hämins.**

(Eingegangen am 11. Januar.)

Nach den Untersuchungen von Nencki wandelt sich das Hämatin,  $C_{32}H_{32}N_4FeO_4$ , mit in Eisessig gelöstem Bromwasserstoff behandelt in Hämatoporphyrin,  $C_{16}H_{18}N_2O_3$ , um, indem sich Eisen abspaltet und Wasser aufgenommen wird, welcher Vorgang wohl durch folgende Gleichung ausgedrückt werden kann:



Ist dieser Process ein glatter, bei dem kein tieferer Eingriff in die Molekel des Hämatins stattfindet, so müssen aus dem Hämatoporphyrin durch Oxydation mittels dichromsauren Natriums in eisessigsaurer Lösung dieselben wohlcharakterisirten sauren Producte wie aus dem Hämatin erhalten werden, d. h. die zwei- und die dreibasische Hämatinsäure,  $C_8H_{10}O_5$  und  $C_8H_{10}O_6$ <sup>1)</sup>. Meine diesbezüglichen Versuche haben in der That die erwarteten Resultate ergeben; ausserdem fand ich, dass die Ausbeute wenigstens an rohem Hämatoporphyrin fast der theoretisch berechneten gleichkommt, daneben werden nur geringe Mengen eines anderen Körpers erhalten, der sein Entstehen jedenfalls dem frei werdenden Wasserstoff verdankt. Die Annahme ist daher wohl durchaus berechtigt, dass das Eisen im Hämatin zwei an Atomen gleich reiche Gruppen zusammenhält, d. h. dass das Hämatin symmetrisch gebaut ist.

Zur Darstellung des Hämatoporphyrins diente reines Hämin aus Rinderblut, das nach den Angaben Nencki's<sup>2)</sup> in Portionen von 5 g verarbeitet wurde. Ich liess gewöhnlich die Einwirkung des mit Bromwasserstoff bei 10<sup>0</sup> gesättigten Eisessigs zwei bis drei Tage bei gewöhnlicher Temperatur vor sich gehen, ehe im Wasserbade erwärmt wurde. Dann wurde die tief rothe und völlig klare Flüssigkeit in etwa die zehnfache Menge kalten Wassers eingetragen, worauf sich das erwähnte Nebenproduct nach einigem Stehen in ganz geringer Menge absetzt; es wurde noch nicht näher untersucht. Die von ihm abfiltrirte Flüssigkeit wurde mit Natronlauge versetzt, bis die Reaction nur noch schwach sauer war, das hierbei ausfallende Hämatoporphyrin abfiltrirt und ausgewaschen, bis Silbernitrat im Waschwasser keinen Niederschlag mehr hervorrief, dann scharf abgesaugt und im Vacuum getrocknet. Die Ausbeute an diesem rohen Hämatoporphyrin kam

<sup>1)</sup> cf. W. Küster, Beiträge zur Kenntniss des Hämatins. Tübingen 1896 bei F. Pietzker und diese Berichte 29, 821.

<sup>2)</sup> Archiv f. exp. Patol. Pharmakologie 24, 430 und Wiener Monatshefte 10, 569.

wie gesagt der theoretisch berechneten sehr nahe, z. B. wurden aus 25 g Hämin 21 g Hämatoporphyrin gewonnen, d. h. 90 pCt. — Zur Oxydation wurden je 5 g in 50 g Eisessig gelöst und dann eine gesättigte wässrige Lösung von dichromsaurem Natrium langsam eingetragen. Es zeigte sich, dass bei gewöhnlicher Temperatur eine drei Atomen Sauerstoff entsprechende Menge des oxydirenden Mittels unter geringer Wärmeentwicklung — die Temperatur stieg von 20° auf 25° — verhältnissmässig schnell aufgenommen wurde, z. B. konnte bei 5 g Hämatoporphyrin die Chromsäure nach zwei Stunden nicht mehr nachgewiesen werden. Mehr wie drei Atome Sauerstoff wurden aber bei 25° nicht verbraucht, deshalb erhitze ich auf dem Wasserbade bis auf 90°, bei welcher Temperatur nun die beabsichtigte Einführung von 6 Atomen Sauerstoff innerhalb weniger Stunden für die angegebene Menge Hämatoporphyrin bewerkstelligt werden konnte. Die weitere Verarbeitung geschah so, wie ich sie für die Oxydation des Hämatins angegeben habe, auch hier schied sich nach dem Verjagen der freien Essigsäure ein Niederschlag aus, der für sich gesammelt wurde und als erstes Oxydationsproduct des Hämatoporphyrins bezeichnet werden mag. Ausserdem bildete sich noch langsam eine zweite harzige Abscheidung, als nach Zusatz der berechneten Menge Schwefelsäure auch die gebundene Essigsäure vertrieben wurde. Beide Niederschläge sollen noch näher untersucht werden. Die auch vom zweiten Ausfall abfiltrirte Flüssigkeit wurde ausgeäthert und der nach Abdestillation des Aethers verbleibende Rückstand in der ebenfalls schon beschriebenen Weise gereinigt. Erhalten wurden an ätherlöslichen Producten aus ca. 60 g Hämatoporphyrin: etwas über 1 g aus alkalischer Lösung und 15 g Säuregemisch. Das letztere wurde in kaltem Wasser gelöst und in die stark saure Lösung Calciumcarbonat eingetragen, bis eine Entwicklung von Kohlendioxyd nicht mehr zu beobachten war. Die filtrirte Lösung der Calciumsalze wurde zum Sieden erhitzt und vom hierbei entstandenen Ausfall abfiltrirt. In diesem liegen basische Salze der dreibasischen Hämatinsäure vor, wie ich früher bereits gezeigt habe. Im gegebenen Falle war die Menge derselben im Verhältniss zur angewandten Säure sehr gering<sup>1)</sup>, auch gab das Filtrat beim längeren Sieden im Becherkolben keinen Niederschlag mehr, wohl aber trübte es sich beim Eindampfen in einer Schale. Ich glaube dies auf eine sich langsam vollziehende Oxydation zurückführen zu können, bei welcher sich aus der zweibasischen Hämatinsäure die dreibasische bildet, und bin in Gemeinschaft mit Herrn Völter, dem ich auch die unten angeführten Analysen verdanke, u. a.

<sup>1)</sup> Bei einem Vorversuche, welcher mit der 5 g Hämin entsprechenden Menge Hämatoporphyrin durchgeführt wurde, entstand beim Erhitzen der wässrigen Lösung der Calciumsalze überhaupt kein Niederschlag.

damit beschäftigt, die Bedingungen jenes Uebergangs genauer zu verfolgen.

Die von den ausgeschiedenen Niederschlägen durch Filtration getrennte Lösung wurde nun im Vacuum vollends verdunstet, der Rückstand in einer möglichst geringen Menge heissen Wassers aufgenommen, von ungelöst bleibenden Spuren mit Benutzung eines Heisswassertrichters filtrirt, und das Filtrat in eine Kältemischung gebracht. Beim kräftigen Umrühren erstarrte es zu einem Brei schwach gelb gefärbter Nadeln, die scharf abgesaugt und mit eiskaltem Wasser nachgewaschen wurden. Dieses auch in Alkohol lösliche Calciumsalz ist das saure Salz der zweibasischen Hämatinsäure.

Analyse: Ber. für  $(C_8H_5O_5)_2Ca + H_2O$ .

Procente:  $H_2O$  : 8.07 Ca: 8.96

Gef.        «        »        7.5        «        8.93

Aus dem Calciumsalze wurde das Silbersalz gewonnen, indem die Lösung des ersteren in 50-procentigem Weingeist durch Silbernitrat gefällt wurde. Das mit Alkohol rein ausgewaschene Salz wurde im Vacuum getrocknet; die Analyse ergab, dass sich das neutrale Salz gebildet hatte.

Analyse: Ber. für  $C_8H_5O_5Ag$ .

Procente: C 24.00, H 2.00, Ag 53.84.

Gef.        »        »        24.05,        »        2.12,        »        53.75.

Durch diese Versuche ist also erwiesen worden, dass bei der Oxydation des aus Rinderblut gewonnenen Hämatoporphyrins mit 6 Atomen Sauerstoff in kleinen Mengen die dreibasische, in grösseren die zweibasische Hämatinsäure erhalten wird.

Im Anschluss hieran habe ich auch das nach Cloëtta's<sup>1)</sup> Methode dargestellte Hämin einer Untersuchung unterworfen. Wie ich erwähnte, ist die Annahme berechtigt, dass das Hämatin nahezu quantitativ in Hämatoporphyrin übergeht, womit die Nencki'sche Formel  $C_{32}H_{32}N_4FeO_4$  übereinstimmt. Das von Cloëtta nach einer abweichenden Darstellungsart gewonnene Hämin soll nun nach seinen Analysen auf ein Atom Eisen nur drei Atome Stickstoff enthalten und die Zusammensetzung  $C_{30}H_{35}N_3FeO_3Cl$  besitzen. Da es Cloëtta gelungen war, sein Hämin umzukrystallisiren, hält er es für reiner als die bisher analysirten Präparate und glaubt, dass die letzteren etwa durch Xanthin verunreinigt sein könnten. Es war nun interessant, das Verhalten des Cloëtta'schen Hämins gegen mit Bromwasserstoff gesättigten Eisessig kennen zu lernen. Ist es wirklich unsymmetrisch gebaut, so kann der Zerfall nicht quantitativ verlaufen, muss vielmehr zu zwei oder mehr verschiedenen Producten führen. Um dies prüfen zu können, stellte ich mir nach der Methode Cloëtta's »Hämin« her. Zur Darstellung des einen Präparats wurde Rinderblut

<sup>1)</sup> Arch. f. exper. Path. Pharmac. 36, 349.

in flachen Schalen mit etwa der fünffachen Menge 4-procentiger Glaubersalzlösung gemischt, das Serum abgehoben, nachdem sich die Blutkörperchen gesenkt hatten, und die letzteren durch 95-procentigen Alkohol zersetzt. Da hierbei eine vollständige Trennung der Bestandtheile des Serums nicht erwartet werden und dies möglicher Weise von Einfluss auf die Beschaffenheit des Hämins sein konnte, wurden ferner etwa 3 L Blut — genau nach den Angaben Cloëtta's — nach Zusatz der gleichen Menge 2-procentiger Glaubersalzlösung ausgeschleudert und dies Verfahren wiederholt, alsdann wurde erst der Blutkörperchenbrei durch Alkohol zersetzt und hieraus schliesslich Präparat II gewonnen. In beiden Fällen wurde das Coagulum auf Fliesspapier gebreitet und an der Luft getrocknet, dann wurde es möglichst fein gerieben und gesiebt, abermals auf Fliesspapier ausgebreitet und nun in einem warmen Zimmer getrocknet. Der erste Theil enthielt: 12.4 pCt. Feuchtigkeit; aus den drei Litern Blut wurden fast 500 g Blutpulver gewonnen mit einem Gehalt von 14.9 pCt. Feuchtigkeit.

Dieses Pulver wurde darauf in Portionen von etwa 50 g verarbeitet. Aber auch ich konnte Cloëtta's Rath, jede Schematisirung fern zu halten, ebensowenig wie Bialobrzski<sup>1)</sup> befolgen, da es sich sehr bald zeigte, dass dem Verfahren enge Grenzen gesteckt sind, deren Ueberschreitung sofort dem Entstehen eines Hämins oder eines krystallisirenden Körpers überhaupt ein Ende macht. Denn ich konnte durch Versuche nachweisen, dass bei Anwendung von weniger Schwefelsäure oder weniger alkoholischer Salzsäure, als weiter unten angegeben werden wird, überhaupt kein Hämin sich bildet und dass andererseits Zusatz von nur wenig mehr alkoholischer Salzsäure völlige Zerstörung des gebildeten Hämins bewirkt. Das letztere hat übrigens Cloëtta selbst schon beobachtet, und Bialobrzski schreibt die gleiche Wirkung einem ganz geringen Ueberschusse von concentrirter Schwefelsäure zu.

Ich habe schliesslich nach folgendem Verfahren gearbeitet: 50 g des präparirten Blutpulvers werden mit  $\frac{1}{2}$  L 95-procentigen Alkohols in einer Reibschale übergossen und nach gutem Verreiben 4 ccm einer erkalteten Mischung von gleichen Theilen 95-procentigen Alkohols und 90-procentiger Schwefelsäure ganz allmählich hinzugegeben. Nun wird die braun gewordene Masse in einen Kolben gegossen und ein paar Stunden lang unter häufigem Umschütteln auf dem Wasserbade schwach erwärmt. Dann wird an der Saugpumpe filtrirt, mit wenig des gleich starken Alkohols nachgewaschen und das tief dunkelrothe Filtrat 12 bis 24 Stunden stehen gelassen. Von dem ganz geringfügigen Bodensatz wird dann abfiltrirt, auf etwa 70° erwärmt und mit genau 2 ccm

<sup>1)</sup> Diese Berichte 29, 2842.

einer alkoholischen Salzsäure versetzt, deren Gehalt an Chlorwasserstoff sich durch Titration auf 25 pCt. bestimmen lässt. Nach dem langsamen Erkalten findet man dann das Hämin am Boden und an den Wänden in prachtvollen Krystallen abgesetzt, die unter dem Mikroskope betrachtet sich als völlig frei von Beimengungen erweisen. Zur Erzielung einer einigermaassen guten Ausbeute ist es nöthig, jede Portion für sich zu verarbeiten, doch lässt sie auch dann noch zu wünschen übrig, da z. B. aus 3 L Rinderblut nur 1.7 g Hämin gewonnen wurden.

Die Präparate von Hämin wurden schliesslich auf ein Filter gebracht, mit Aether ausgewaschen, bis derselbe fast farblos ablief, dann getrocknet und mit kaltem Wasser so lange behandelt, bis das Waschwasser weder eine Reaction auf Salzsäure noch eine solche auf Schwefelsäure zeigte. Hierauf wurde im Vacuum bis zur Gewichtsconstanz, endlich zur Analyse bei 110° getrocknet. Von einem Umkrystallisiren wurde Abstand genommen, da der Stickstoffgehalt, um den es sich hauptsächlich handelt, durch dasselbe bei den Cloëtta'schen Präparaten nicht beeinflusst wird, der Chlorgehalt aber deshalb zu niedrig gefunden werden musste, weil das Trocknen des Hämins im feuchten Zustande bei 80° bewerkstelligt wurde, ein Verfahren, das, wie ich gezeigt habe<sup>1)</sup>, Abspaltung von Chlor herbeiführt; aus demselben Grunde erhöhen sich dann auch die Werthe, welche für Kohlenstoff und Wasserstoff gefunden werden.

Die Analysen meiner beiden Präparate ergaben nun Uebereinstimmung untereinander und mit der von Nencki aufgestellten, resp. einer um 2 Wasserstoffatome reicheren Formel.

Ber. für		Ber. für		Gefunden		
$C_{32}H_{31}ClN_4FeO_3$		$C_{32}H_{33}ClN_4FeO_3$		I.	II.	pCt.
C	62.91	62.69		63.01	62.67	
H	5.08	5.39		5.76	5.58	
Cl	5.79	5.77		6.01	5.93	2)
Fe	9.17	9.14		9.25	9.27	2)
N	9.17	9.14		9.77	9.14	9.25 3)

Nach diesen Resultaten glaube ich annehmen zu dürfen, dass es lediglich der Anwendung concentrirter Schwefelsäure zuzuschreiben ist, wenn Cloëtta in seinen Präparaten etwa 2 pCt. Stickstoff

<sup>1)</sup> l. c. S. 11.

<sup>2)</sup> Nach Carius bestimmt; dass etwas (0.2 pCt.) Chlor zuviel gefunden wurde, lässt sich vielleicht durch die Art der Darstellung erklären, bei der das Entstehen eines Hämins  $(C_{32}H_{33}ClN_4FeO_3)_x \cdot C_2H_5Cl$  nicht ausgeschlossen erscheint.

<sup>3)</sup> Die zweite Stickstoffbestimmung wurde von Hrn. Kölle nach der Methode von Kjeldahl ausgeführt, die anderen Werthe wurden nach der Dumas'schen Methode erhalten.

weniger findet, eine Annahme, die in den kürzlich veröffentlichten Versuchen Bialobrzski's eine Bestätigung findet. Diese zersetzende Wirkung der Schwefelsäure dürfte im Momente des Entstehens stattfinden und vielleicht in einer Abspaltung von Blausäure bestehen, wenigstens nähern sich die Werthe, welche Cloëtta gefunden hat, einer um die Elemente der Blausäure ärmeren Formel  $C_{31}H_{32}ClN_3FeO_3$ . Vermeidet man, wie ich es gethan habe, den Einfluss der concentrirten Schwefelsäure, indem man sogleich ihren sauren Aethylester anwendet, so bleibt auch die so ausserordentlich leicht Veränderungen unterliegende Molekel des Hämins intact und entspricht in ihrer Zusammensetzung den bisherigen Präparaten.

Nachdem ich zu diesen Resultaten gelangt war, konnte ich davon absehen, den anfangs entwickelten Plan — Ueberführung des Hämins in Hämatoporphyrin — zur Ausführung zu bringen.

Tübingen, den 9. Januar 1897, Physiol.-chem. Institut.

# 18. E. Baumann und E. Fromm: Ueber die Einwirkung von Schwefel auf gesättigte organische Verbindungen. — Disulfid der Thiobenzoylthioessigsäure.

(Eingegangen am 13. Januar.)

In früheren Mittheilungen<sup>1)</sup> ist gezeigt worden, dass die aromatischen Thioaldehyde und, ähnlich wie diese, das Thioacetophenon beim Erhitzen zunächst in Schwefel und einen ungesättigten Kohlenwasserstoff zerfallen. So entsteht z. B. aus dem Thiobenzaldehyd<sup>2)</sup> Stilben und Schwefel:



aus dem Thioacetophenon<sup>3)</sup> Styrol und Schwefel:



Erhitzt man diese Gemenge von ungesättigten Kohlenwasserstoffen und Schwefel weiter, so entwickelt sich, wie wir (l. c.) gezeigt haben. Schwefelwasserstoff, und es entstehen als Endproducte Derivate des Thiophens. So entstehen aus Stilben und Schwefel Tetraphenylthiophen (Thionessal) und aus Styrol und Schwefel zwei isomere Diphenylthiophene<sup>4)</sup>.

Es lag nahe, die in diesen Fällen beobachtete Einwirkung von Schwefel auf ungesättigte Kohlenwasserstoffe näher zu studiren und

<sup>1)</sup> Diese Berichte 24, 1456, 3308 u. 3597; 25, 600; 28, 903 und Ann. d. Chemie 277, 339.

<sup>2)</sup> Diese Berichte 24, 1456.

<sup>3)</sup> Diese Berichte 28, 903.

<sup>4)</sup> Diese Berichte 28, 893.