

## Spaltungsprodukte des Hämatins.

(II. Mittheilung.)

Ueber die Hämatine verschiedener Darstellungs- und Blutarten.

Von

William Küster.

---

(Die Untersuchungen sind mit Unterstützung des Elizabeth-Thompson Science Fund in Boston ausgeführt worden.)

(Der Redaction zugegangen am 18. Januar 1900.)

---

Die vorliegenden Versuche bezwecken eine Ergänzung der früher veröffentlichten Arbeiten.<sup>1)</sup> Es war gezeigt worden, dass bei der in eisessigsaurer Lösung durch Chromate erfolgenden Oxydation des Hämatins als charakteristische Spaltungsprodukte die «zweibasische Hämatinsäure  $C_8H_9NO_4$ » und das «Anhydrid der dreibasischen Hämatinsäure  $C_8H_8O_5$ » auftreten. Daneben wurde ausser Kohlensäure die Bildung bald geringer, bald erheblicher Mengen Ammoniaks nachgewiesen, womit das wechselweise Vorwalten von  $C_8H_9NO_4$  und  $C_8H_8O_5$  wahrscheinlich im Zusammenhange stand. Nachdem dann auch die Methoden zur Trennung<sup>2)</sup> letzterer Säuren ausgearbeitet worden

---

1) Diese Zeitschrift, Bd. XXVIII, S. 1 und 34. — Bei dieser Gelegenheit möchte ich auch eine fehlerhafte Angabe berichtigen, die sich in der Arbeit von Kölle und mir befindet. Das Hämatoporphyrin ist mit einer Chromatmenge oxydirt worden, welche «6» und 8, nicht wie auf Seite 34, 35 und 37 angegeben ist, 12 und 8 Atomen Sauerstoff entspricht.

2) l. c. pag. 23 war gezeigt worden, dass beim Behandeln eines Gemisches der Säuren mit Calciumcarbonat häufig ein Theil der Säure nicht reagirt und sich mit Aether ausschütteln lässt. Es war die Vermuthung ausgesprochen worden, dass letztere Theile mit  $C_8H_9NO_4$  identisch sein dürften.

Dies ist in der That der Fall. Die Säure gibt nämlich bei erneuter Behandlung mit Calciumcarbonat ein wasserlösliches Kalksalz,

waren, erschien es möglich zu entscheiden, ob beide Säuren als primäre Spaltungsprodukte anzusehen sind oder — was wahrscheinlicher — ob unter gewissen Bedingungen, die nun zu ermitteln waren, der Uebergang des als primäres Oxydationsprodukt anzusehenden Körpers  $C_8H_9NO_4$  in  $C_8H_8O_5$  schon während der Oxydation selbst, d. h. also in saurer Lösung, stattfindet.<sup>1)</sup>

Die erstere Annahme, dass also auch  $C_8H_8O_5$  primäres Spaltungsprodukt sei, war ja von vornherein nicht unmöglich; ein solches Verhalten konnte z. B. in dem inneren Bau der nach verschiedenen Methoden oder aus verschiedenen Blutarten hergestellten Hämine begründet sein. Viel wahrscheinlicher war es allerdings, dass die während der Oxydation eingehaltene Temperatur oder vielleicht intensive Belichtung eine Rolle spiele, oder dass bei der Ueberführung der Hämine in Hämatin Veränderungen in verschiedener Richtung vor sich gehen, je nachdem in der Hitze oder bei gewöhnlicher Temperatur gearbeitet wurde, was sich nun bei der Oxydation bemerkbar machte. Letzteres war um so wahrscheinlicher, als ja diese Oxydation mit einer Wasseraufnahme Hand in Hand geht; ja, nach einigen Analysen schien sogar schon die Zusammensetzung der Hämatine von der Art der Darstellung abhängig zu sein.

---

das nach dem Umkrystallisiren sich in folgender Weise zusammengesetzt zeigte:

0,1334 g, über Schwefelsäure getrocknet, verloren im Vacuum 0,0074 g, dann bei  $110^\circ$  noch 0,001 g und liessen 0,0172 g CaO zurück = 9,83 % Ca (berechnet 9,90 % für  $(C_8H_8NO_4)_2$  Ca). Die regenerirte Säure, aus Essigester zweimal umkrystallisirt, zeigte bei langsamem Erhitzen den richtigen Schmelzpunkt  $113,5^\circ$  (corrigirt).

1) Durch Natronlauge wird dieser Uebergang ja leicht bewirkt. Ich möchte hier erwähnen, dass die zur Reinigung der Rohsäuren dienenden Operationen stets gleichmässig ausgeführt wurden, namentlich geschah das Lösen in Natriumcarbonat in der Kälte, die alkalische Lösung wurde dann rasch dreimal mit Aether ausgeschüttelt, um dann sofort wieder angesäuert zu werden, so dass in dieser kurzen Zeit eine Ammoniakabspaltung nicht eintreten konnte. Allerdings muss man rasch arbeiten: als eine Lösung von  $C_8H_9NO_4$  in Soda eine Stunde stehen blieb, hatten sich bereits Spuren von  $C_8H_8O_5$  gebildet.

In den beiden folgenden Tabellen sind nun die unter den angeführten Verhältnissen<sup>1)</sup> gewonnenen Resultate getrennt angeordnet, zwei Versuche, II 4 und 7, fanden, was die Analysen der Calciumsalze betrifft, schon in der ersten Mittheilung Verwendung, die übrigen Analysen sind neu ausgeführt worden. Was die Ammoniakabspaltung betrifft, so sind ebenfalls einige Resultate wiederholt aufgeführt.

Wie man sieht, wurde neuerdings das «vorwiegende» Auftreten von  $C_8H_8O_5$  nicht mehr beobachtet, ja die einwandfreisten Versuche<sup>2)</sup> ergaben das Fehlen dieser Säure, so dass also die Annahme,  $C_8H_8O_5$  könne als primäres Spaltungsprodukt auftreten, nicht aufrecht erhalten werden kann. Es liefert das Hämatin, ob es nun nach Nencki's oder nach Schalfejew's Methode<sup>3)</sup> dargestellt ist, ob es aus Pferde-

---

1) Es ist natürlich nicht ausgeschlossen, dass noch andere Factoren in Betracht zu ziehen sind.

2) Die Versuche, I 3 und 4, welche verhältnissmässig viel  $C_8H_8O_5$  ergaben, wurden zu Ende geführt, nachdem die Rohsäure 4 Monate aufbewahrt worden war.

3) In neuester Zeit habe ich auch das Mörner'sche Hämin untersucht, nachdem es mir mit Hilfe genauer Angaben, welche mir Herr Professor Dr. Mörner in liebenswürdigster Weise zur Verfügung stellte, gelungen war, die gute Ausbeute von ca. 3 g Hämin aus einem Liter Blut zu erreichen. Im Folgenden gebe ich die Einzelheiten dieser Methode, welche in der That auf die bequemste Weise grössere Mengen Hämins herzustellen gestattet.

1 l. Blut wird mit 3 l. Wasser gemischt und nach Zusatz von 10 ccm. 1<sup>o</sup>/<sub>10</sub>iger Schwefelsäure bis zum lebhaften Aufwallen erhitzt, das Coagulum wird colirt, ausgewaschen und scharf abgepresst. Dann wird mit ca. 1/2 l. 90<sup>o</sup>/<sub>10</sub>igen Alkohols angerieben und wieder scharf abgepresst. Jetzt wird der Blutkuchen mit 1750 ccm. 90<sup>o</sup>/<sub>10</sub>igen Alkohols, dem ein erkaltetes Gemisch von 17,5 ccm. concentrirter Schwefelsäure und 17,5 ccm. 90<sup>o</sup>/<sub>10</sub>igen Alkohols zugesetzt ist, verrieben und bei Zimmertemperatur eine Stunde digerirt, dann colirt, der Rest ausgepresst, die erhaltene dunkel gefärbte Lösung filtrirt, das Filtrat in etwa zwei Portionen getheilt, rasch zum Sieden erhitzt und jetzt pro Liter Blut 8 ccm. 25<sup>o</sup>/<sub>10</sub>ige Salzsäure, die mit ca. 12 ccm. 90<sup>o</sup>/<sub>10</sub>igen Alkohols versetzt sind, eingetragen und durch Einstellen in kaltes Wasser abgekühlt. Nach zweitägigem Stehen wird der über dem abgesetzten Hämin stehende Alkohol abgossen, der Krystallbrei abgesaugt, mit Wasser ausgewaschen und im Vacuum getrocknet. Eine Reinigung von etwa noch beigemengtem

# Tabelle I.

## Versuche mit Rindshämatin.<sup>1)</sup>

|   | 1          | 2               | 3                      | 4                         | 5   | 6            | 7   | 8                |
|---|------------|-----------------|------------------------|---------------------------|---|--------------|---|------------------|
| Methode der Darstellung                         | Schalfejew | Nencki          | Schalfejew             | Schalfejew                | Schalfejew  | Schalfejew   | Schalfejew                                  | Schalfejew       |
| Menge des Sauerstoffs                           | 12 Atome   | 12 Atome        | 12 Atome               | 12 Atome                  | 12 Atome  | 12 Atome     | 20 Atome                                    | 20 Atome         |
| Die Oxydation erfolgt                           | —          | an trüben Tagen | in grellem Sonnenlicht | unter Abschluss von Licht | im zerstreuten Licht                                  | —            | —   | —                |
| Häm in Hämatin                                  | —          | —               | —                      | —                         | es wird 12 Stunden mit NaOH auf dem Wasserbad erhitzt | kalte NaOH   | mit NaOH mehrere Stunden im Sieden erhalten | kalt             |
| Oxydationsprodukt I                             | 40,0       | 55,5            | 55                     | 62,5                      | 60,5  | 52           | fast 0                                      | —                |
| Menge   | 3,2 g      | 7 g             | 7g                     | 6 g                       | 3,9 g   | 2,7 g        | 8,6 g                                       | 3 g              |
| Farbe   | 8,9        | 19,4            | 19,4                   | 16,6                      | 10,8  | 7,4          | 23,8  | 8,3              |
| Menge des erhaltenen Chlorammoniums             | 40,0       | 32,5            | 32,5                   | 34                        | 34  | 36           | 46  | 48               |
| Stickstoff, in Proc. des im Hämatin vorhandenen | —          | 25,5            | 31,5                   | 26                        | 28  | 31,5         | 41,5  | —                |
| Aetherlösliche Rohsäure                         | gering     | Kein Anstall    | 4,5                    | 2,5                       | 0,5   | 0,5          | 5,5   | gering           |
| Gereinigte Rohsäure                             | —          | —               | 11,4                   | 8,0                       | 1,4   | 1,3          | 10,6  | —                |
| Menge des beim Erhitzen ausfall. Calciumsalzes  | —          | —               | —                      | —                         | —   | —            | —   | —                |
| $C_8H_8O_5$ in Proc. der gereinigten Rohsäure   | —          | —               | —                      | —                         | —   | —            | —   | —                |
| Lösliches Calciumsalz                           | —          | —               | —                      | —                         | —   | —            | —   | —                |
| Wassergehalt des 1mal umkryst. Calciumsalzes    | 1,77       | 0               | 0                      | 0,52                      | 0,7   | 1,96         | 1,87  | 2) <sup>2)</sup> |
| a) im Vacuum                                    | 1,04       | 4,59            | 4,45                   | 4,27                      | 5,06  | 2,11         | 2,51  | 2,45             |
| b) bei 105—110°                                 | 9,82       | 9,62            | 9,67                   | 9,71                      | 9,90  | 9,90         | 9,69  | 9,66             |
| Ca-Gehalt in Procent                            | —          | —               | —                      | —                         | —   | —            | —   | —                |
| Berechnet für $(C_8H_8NO)_2Ca$ 9,90             | —          | —               | —                      | —                         | —   | —            | —   | —                |
| Schmelzpunkt 3) der Säure $C_8H_8NO_4$          | 113,5—115° | —               | 115—116°               | 114—115°                  | —   | 113,5—115,5° | 114,5—116°                                  | 114—116°         |

1) Die Versuche sind zumeist mit 20 g Hämatin ausgeführt worden, in der Tabelle sind alle Werthe der Uebersichtlichkeit halber auf 100 g bezogen.

2) Im Wassergehalt wurden also wieder die schon früher beobachteten Differenzen gefunden.

3) Am Normalthermometer zeigte ein reines Präparat den Schmelzpunkt 113,5—114,5°, Hiernach sind alle übrigen Angaben zu berichtigen. Man muss übrigens, um den Schmelzpunkt scharf zu erhalten, bis 100° rasch, dann sehr langsam erhitzen. Hiervon erklären sich die früher angegebenen unscharfen Schmelzpunkte.

Tabelle II.

Versuche mit Pferdelämmin.<sup>1)</sup>

|   | 1                      | 2               | 3         | 4                          | 5                         | 6                                | 7           |
|---|------------------------|-----------------|-----------|----------------------------|---------------------------|----------------------------------|-------------|
| Methode der Darstellung   | Schafffejew            | Nencki          | Nencki    | Nencki                     | Schafffejew               | Schafffejew                      | Schafffejew |
| Menge des Sauerstoffs   | 12 Atome               | 12 Atome        | 12 Atome  | 12 Atome                   | 12 Atome                  | 12 Atome                         | 21 Atome    |
| Die Oxydation erfolgt   | im Licht <sup>2)</sup> | an trüben Tagen | im Licht  | unter Abschluss des Lichts | —                         | —                                | —           |
| Hämün in Hämatin  | —                      | —               | —         | —                          | bei Zimmer-<br>temperatur | in der Hitze<br>(5 Std. gekocht) | —           |
| Oxydationsprodukt I   | 22,5                   | 38,5            | 33,5      | 35                         | 38,0                      | 36                               | —           |
| Menge<br>Farbe  | —                      | —               | —         | —                          | braun                     | hellbraun                        | —           |
| Menge des erhaltenen Chlorammoniums<br>Stickstoff, in Proc. des im Hämatin vorhandenen                  | 14,5<br>40,1           | 6,25<br>17,3    | 6,5<br>18 | 5,5<br>15                  | 2,0<br>5,5                | 2,0<br>5,5                       | —           |
| Aetherlösliche Rohsäure   | 30                     | 36              | 37,5      | 45                         | 37                        | 32                               | ca. 35      |
| Gereinigte Rohsäure   | 26                     | 31              | 36        | 44                         | —                         | —                                | —           |
| Menge des beim Erhitzen ausfallenden Calciumsalzes<br>$C_8H_8O_5$ in Procenten der gereinigten Rohsäure | 17,5<br>56             | 2               | ca. 0,5   | ca. 0,5                    | —                         | —                                | —           |
| Lösliches Calciumsalz, einmal umkrystallisirt   | —                      | 3,23            | 4,32      | —                          | 0                         | 1,11                             | —           |
| Wassergehalt im Vacuum<br>bei 110°  | —                      | 2,37            | —         | 3,93                       | 4,68                      | 2,59                             | 5,35        |
| Ca-Gehalt in Procent  | —                      | 9,77            | 9,76      | 9,71                       | 9,81                      | 9,84                             | 9,87        |
| Berechnet für $(C_8H_8NO_4)_2$ Ca 9,90  | —                      | —               | —         | —                          | —                         | —                                | —           |
| Schmelzpunkt der Säure $C_8H_9NO_4$   | —                      | —               | 114—115°  | 114—115° <sup>3)</sup>     | 113—114°                  | —                                | —           |

1) Alle Werthe sind in Procenten angegeben.

2) Bei diesem Versuche kam die Lösung des Hämamins während der Oxydation zufällig in grelle Beleuchtung; dies schien mir daher für das Auftreten von  $C_8H_8O_5$  von Bedeutung. Die Versuche 3 und 4 zeigen aber, dass das Licht ohne Einfluss ist.

3) Ein Gemisch dieser Säure mit der aus dem I 4 aufgeführten Versuche stammenden schmolz ebenfalls bei 114—115°.

oder aus Rinderblut gewonnen wurde, als primäres Spaltungsprodukt die stickstoffhaltige «zweibasische Hämatinsäure»  $C_8H_9NO_4$ .

Und ich will gleich hinzufügen, dass dieselbe auch aus einem Hämatin erhalten wurde, zu dessen Herstellung von Schafblut ausgegangen war. Aus Essigester umkrystallisirt, zeigte sie den Schmelzpunkt 113—114°. Ihr wasserlösliches, einmal umkrystallisirtes Calciumsalz, aus dem sie gewonnen wurde, gab bei der Analyse folgendes Resultat:

0,2099 g verloren im Vacuum 0,0020 g, bei 110° noch 0,0073 g und hinterliessen 0,027 g CaO = 0,0193 g Ca.

| Berechnet für:               |       | Gefunden: |          |       |
|------------------------------|-------|-----------|----------|-------|
| $(C_8H_8NO_4)_2 Ca + 1 H_2O$ |       | Im Vacuum | Bei 110° | Ca    |
| H <sub>2</sub> O             | 4,27% | 0,95%     | 3,51%    | —     |
| Ca                           | 9,90% | —         | —        | 9,62% |

Was die Menge der Rohsäure betrifft, so zeigte ich schon früher, dass die Ausbeute bei Rinderhämatin am günstigsten ist, wenn man ca. 20 Atome Sauerstoff auf das Molekül Hämatin verwendet; sie beträgt dann fast 50% vom Ausgangsmaterial. Fast die gleiche Quantität wurde nun aus Pferdehämatin schon bei Verwendung von 12 Atomen Sauerstoff gewonnen, II 4;<sup>1)</sup> unter gleichen Bedingungen kam die Ausbeute beim Rindshämatin nur einmal bis auf 40%. Das könnte an der Reinheit des verwendeten Materials liegen, obwohl bei allen Präparaten, wenn nicht eine völlige, so doch möglichst vollständige Reinigung erstrebt worden war.

Auch möchte ich auf eine weitere Differenz zwischen Rinds- und Pferdehämatin, die sich bei der Spaltung ergibt, aufmerksam machen.

Bei der Oxydation mit 12 Atomen Sauerstoff entsteht ja dabei ein wasser- und ätherunlöslicher, in Alkalien löslicher,

---

Eiweiss scheint auch hier durch ca. 1%ige Salzsäure zu gelingen. Bisher wurden 6,5 g solchen Hämins nach meiner Methode oxydirt und hierbei die gleichen ätherlöslichen Säuren, wie aus den nach anderen Methoden bereiteten Häminen, erhalten.

1) Dieser Fall ist nicht vereinzelt; bei einem anderen nicht in die Tabelle aufgenommenen Versuche mit Nencki'schem Hämin wurden sogar 47% Rohsäure erhalten.

als erstes Oxydationsprodukt aufgeführter Körper. Die Menge desselben wurde nun bei Verwendung von Rindshämatin stets bedeutend grösser wie bei Verarbeitung von Pferdehämatin gefunden. Sie stieg dort bis 62,5% vom Ausgangsmaterial, während hier 40% nicht erreicht wurden.

Die genauere Untersuchung dieses Körpers, der ja nach einigen orientirenden Analysen sich als recht verschieden zusammengesetzt erwies und bei verschiedenen Versuchen erhalten, auch schon in der Farbe differirte, wird vielleicht besseren Einblick in die recht complicirten Verhältnisse gestatten.

Um endlich noch einmal auf die Ammoniakabspaltung zurückzukommen, so geht aus den Tabellen nur hervor, dass eine geringe Menge des Stickstoffs des Hämatins in Form dieser Verbindung austreten kann, ohne dass Theile von  $C_8H_9NO_4$  in  $C_8H_8O_5$  übergehen. Starke Belichtung<sup>1)</sup> oder das Erhitzen des Hämatins mit Natronlauge vor der Oxydation erweisen sich als einflusslos, sobald nur mit 12 Atomen Sauerstoff oxydirt wird. Werden aber 20 Atome verwendet, wird also der als erstes Oxydationsprodukt bezeichnete Körper fast völlig wegoxydirt, so scheinen, wie sich aus I 7 und 8 ergibt, grössere Mengen von Ammoniak und auch von  $C_8H_8O_5$  dann aufzutreten, wenn das Hämatin vor der Oxydation mit Natronlauge mehrere Stunden gekocht worden war. Doch möchte ich dieser einen Beobachtung noch nicht zu viel Belang zuerkennen.

Was endlich den schon früher besprochenen Fall II 1 betrifft, bei dem 40% des Hämatinstickstoffs als Ammoniak abgespalten und damit im Zusammenhange 56% der Rohsäure als  $C_8H_8O_5$  gefunden wurden, so haben die neueren Versuche nicht die erwünschte Aufklärung gebracht.

Auch die Differenzen, welche in der Zusammensetzung der nach verschiedenen Methoden dargestellten Hämine ge-

---

1) In greller Beleuchtung verläuft die Oxydation etwas rascher, weil sich die dunkle Flüssigkeit rasch auf 40—50° erwärmt, doch ist es weit zweckmässiger, im Dunkeln zu operiren, weil dann ein weniger gefärbtes ätherlösliches Rohprodukt erhalten wird.

funden wurden, finden durch vorliegende Arbeit keine Erklärung. Vielmehr konnte erwiesen werden, dass — wie die procentische Zusammensetzung der aus verschiedenen Blutarten erhaltenen Hämine von den Darstellern übereinstimmend gefunden wurde — diese nun auch als best charakterisirtes Spaltungsprodukt die gleiche Säure  $C_8H_9NO_4$  geben.

Tübingen, Physiologisch-chemisches Institut, am 17. Januar 1900.

### Analytische Belege.

I. 1. 0,6894 g Ca-Salz<sup>1)</sup> verloren im Vacuum 0,0122 g, bei 110° noch 0,0068 g und gaben 0,0922 g CaO.

I. 2. 0,3308 g Ca-Salz verloren im Vacuum 0,0 g, bei 100 bis 105°: 0,0152 g und gaben 0,0425 g CaO.

I. 3. 0,2241 g Ca-Salz verloren im Vacuum nichts, bei 105°: 0,0100 g und gaben 0,0290 g CaO.

I. 4. 0,2473 g Ca-Salz verloren im Vacuum 0,0013 g, bei 105°: 0,0105 g und gaben 0,0320 g CaO.

I. 5. 1,0675 g Ca-Salz verloren im Vacuum 0,0075 g, bei 105°: 0,0536 g und gaben 0,1395 g CaO.

I. 6. 0,2855 g Ca-Salz verloren im Vacuum 0,0056 g, bei 110°: 0,0059 g und gaben 0,0380 g CaO.

I. 7. 0,2674 g Ca-Salz verloren im Vacuum 0,005 g bei 110°: 0,0066 g und gaben 0,0347 g CaO.

I. 8. 0,2085 g Ca-Salz, über  $H_2SO_4$  getrocknet, verloren bei 110°: 0,005 g und gaben 0,0275 g CaO.

II. 2. 0,3833 g Ca-Salz verloren im Vacuum 0,0124 g bei 110°: 0,0088 g und gaben 0,0495 g CaO.

II. 3. 0,4770 g Ca-Salz verloren im Vacuum 0,0206 g, bei 110°: 0,0004 g und gaben 0,0623 g CaO.

II. 4. 0,3187 g Ca-Salz verloren im Vacuum 0,0005 g, bei 110°: 0,0125 g und gaben 0,0413 g CaO.

II. 5. 0,2413 g Ca-Salz verloren im Vacuum nichts, bei 105° 0,0113 g und gaben 0,0316 g CaO.

II. 6. 0,3913 g Ca-Salz verloren im Vacuum 0,0045 g, dann bei 105° 0,0104 g und gaben 0,0539 g CaO.

II. 7. 0,1760 g Ca-Salz verloren im Vacuum nichts, bei 110°: 0,0096 g und gaben 0,0230 g CaO.

<sup>1)</sup> Das Calciumsalz wurde stets über Schwefelsäure liegend bis zum constanten Gewicht getrocknet.