

# Untersuchungen über den Blutfarbstoff.

Von

Richard Willstätter.

## I. Mitteilung.

### Über den Abbau des Hämins zu den Porphyrinen.

Von

Richard Willstätter und Max Fischer.

Mit zwei Abbildungen im Text.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Chemie in Berlin-Dahlem.)  
Der Redaktion zugegangen am 19. August 1913.)

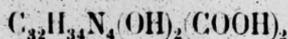
### Inhaltsübersicht.

	Seite
I. Betrachtungen über die Konstitution des Hämins . . .	424
II. Zwischenprodukte der Hämatoporphyrinbildung . . .	437
Theoretische Einleitung . . . . .	437
Einwirkung wässriger Bromwasserstoffsäure . . . . .	443
Einwirkung von Eisessig-Bromwasserstoff . . . . .	445
Einwirkung von flüssigem Bromwasserstoff . . . . .	449
Einwirkung von flüssigem Chlorwasserstoff . . . . .	452
III. Die Porphyrine mit mehr als vier Sauerstoffatomen (Gruppe des Hämatoporphyrins).	
Gewinnung von Hämin aus zentrifugiertem Blut . . . . .	456
Hämatoporphyrin . . . . .	459
Darstellung in amorphem Zustand . . . . .	459
Darstellung in krystallisiertem Zustand . . . . .	462
Analyse . . . . .	462
Beschreibung . . . . .	465
Esterifizierung . . . . .	468
Tetramethylverbindung . . . . .	470
Dimethyläther . . . . .	474
Monoacetylverbindung . . . . .	475
Häminoporphyrin . . . . .	477
Hämidoporphyrin . . . . .	479
IV. Die Porphyrine mit vier Sauerstoffatomen (Gruppe des Mesoporphyrins).	
Einleitung . . . . .	480
Hämoporphyrin . . . . .	484
Mesohämin . . . . .	488
Mesoporphyrin . . . . .	491
V. Ätioporphyrin . . . . .	494

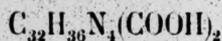
## I. Betrachtungen über die Konstitution des Hämins.

Unsere Untersuchung soll dazu beitragen, das Gemeinsame und das Unterscheidende in der Struktur von Chlorophyll und von Hämin klarzulegen.

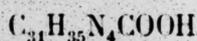
Wenn die beiden Farbstoffe stark abgebaut werden, so tritt zwischen ihren Derivaten eine gewisse Verwandtschaft auf, die freilich weniger nahe ist, als man immer angenommen hat und die in ihrer Bedeutung überschätzt worden ist. Die Porphyrine aus Chlorophyll und Hämin sind einander ähnlich, nämlich Hämatoporphyrin, dem die Formel



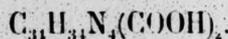
zugeschrieben wird, und Mesoporphyrin, nach Zaleski von der Formel



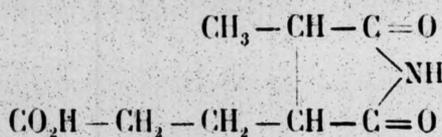
erinnern optisch und im Verhalten an Phyllo- und Pyrroporphyrin von der Formel



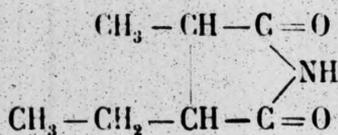
und noch mehr an Rhodo-, Erythro- und Rubiporphyrin von der Formel



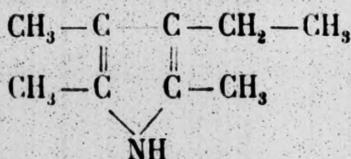
Identische Produkte sind bei dem Abbau beider Pigmente noch nicht erhalten worden, außer bei durchgreifender Spaltung des Farbstoffs, bei der Oxydation zur Hämatinsäure:



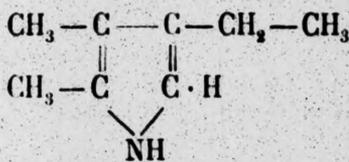
und zum Methyläthylmaleinimid:



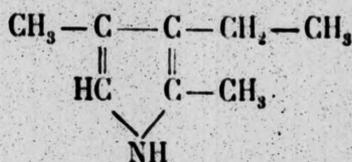
und bei der Reduktion zu den Hämopyrrolen, einem Gemisch von Pyrrolhomologen, worin hauptsächlich enthalten sind:



Phyllopyrrol.

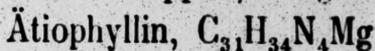


Isöhämopyrrol.

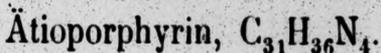


Kryptopyrrol.

Den Abbau der beiden Chlorophyllkomponenten durch Alkalien bei hoher Temperatur, der eine Reihe von Carbonsäuren mit komplex gebundenem Magnesium, die Phylline, ergab, haben wir vor kurzem zu den carboxylfreien Verbindungen, den Stammsubstanzen dieser Gruppen, fortgeführt,<sup>1)</sup> nämlich zum



und dem durch Abspaltung von Magnesium bei der Einwirkung von Säure daraus entstehenden



Diese sauerstofffreien Verbindungen sind gut krystallisierende Substanzen, die sich in ihren Eigenschaften dem Gruppenbilde einfügen, das mit zahlreichen zuvor untersuchten Phyllinen und Porphyrinen gezeichnet worden ist.

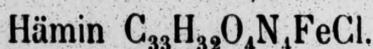
Zum Ätioporphyrin hat nun auch der Abbau des Hämins geführt (Kapitel V). Während Hämin und Hämatoporphyrin beim Erhitzen mit methylalkoholischer Kalilauge leicht in amorphe, hochmolekulare Produkte umgewandelt werden, lassen sie sich bei Zusatz von viel Pyridin zur alkalischen Flüssigkeit glatt in einfachere Porphyrine umwandeln (Kapitel IV). Aus Hämatoporphyrin entsteht ein schön krystallisierendes Porphyrin mit vier Sauerstoffatomen, für das wir den Namen Hämoporphyrin vorschlagen, aus Hämin entsteht unter denselben Bedingungen die komplexe Eisenverbindung des Mesoporphyrins. Die beiden Porphyrine stehen einander in der Zusammensetzung sehr nahe, sie sind entweder isomer oder Hämoporphyrin enthält zwei Atome Wasserstoff weniger als Mesoporphyrin.

Die Abspaltung der Carboxyle gelingt bei Hämoporphyrin wie bei Rhodoporphyrin nach der Natronkalkmethode, nämlich durch kurzes Erhitzen sehr kleiner Substanzmengen mit dem Alkali. Da die Magnesiumverbindungen leichter Kohlensäure abspalten, führen wir in das Hämoporphyrin zuerst Magne-

<sup>1)</sup> XXIII. Untersuchung über Chlorophyll. Ann. d. Chem., im Druck.

sium ein und spalten es nach der Decarboxylierung aus dem gebildeten Ätiophyllin wieder ab. Das Reaktionsprodukt ist identisch mit dem Ätioporphyrin aus Chlorophyll nach Zusammensetzung und Eigenschaften wie dem Spektrum und seiner basischen Natur, die mittels der Verteilung zwischen Äther und Salzsäure quantitativ geprüft wurde.

Aus der Zusammensetzung  $C_{31}H_{36}N_4$  des Ätioporphyrins ergibt sich, daß seine Dicarbonsäure Hämoporphyrin der Formel  $C_{33}H_{36}O_4N_4$  entspricht, daß sie also mit den zweibasischen Porphyrinen aus Chlorophyll (Rhodo- und Erythroporphyrin) isomer ist. Die Analyse des Hämoporphyrins stimmt damit gut überein, während sie mit einer  $C_{34}$ -Formel schwer in Einklang gebracht werden könnte. Da die Bildung von Hämoporphyrin aus Hämatoporphyrin ohne Verlust von Kohlenstoff stattfindet, so geht daraus weiter hervor, daß Hämin, Hämato- und Mesoporphyrin nicht mit den üblichen Formeln  $C_{34}H_{32}O_4N_4FeCl$ ,  $C_{34}H_{38}O_6N_4$  und  $C_{34}H_{38}O_4N_4$  auszudrücken sind, sondern gleichfalls durch Formeln mit 33 Kohlenstoffatomen, nämlich:



Unabhängig von der Bildung des Ätioporphyrins haben wir es auch bei der Analyse einer Anzahl von Derivaten des Hämins wahrscheinlich gefunden, daß die Formeln des Hämins und Hämatoporphyrins in diesem Sinne abzuändern sind.

Das bedeutende analytische Material der Literatur fügt sich zum großen Teil gut dieser Abänderung, wie in den experimentellen Abschnitten beim Hämatoporphyrin und Mesoporphyrin gezeigt wird; auch für Hämin trifft dies zu. Aus der gründlichen analytischen Untersuchung von W. Küster<sup>1)</sup> über Hämin führen wir z. B. den Durchschnittswert von 16 Analysen des Hämatins an neben den theoretischen Werten für die Formeln mit  $C_{33}$  und  $C_{34}$ .

Berechnet für $C_{34}H_{33}O_5N_4Fe$ :	$C_{33}H_{33}O_5N_4Fe$ :	Gefunden:
C = 64,43	63,74	63,98
H = 5,25	5,35	5,34

Die ältere Häminformel  $C_{32}H_{31}O_3N_4FeCl$  ist auf Grund der sorgfältigen Analysen des Mesoporphyrins von J. Zaleski<sup>2)</sup>

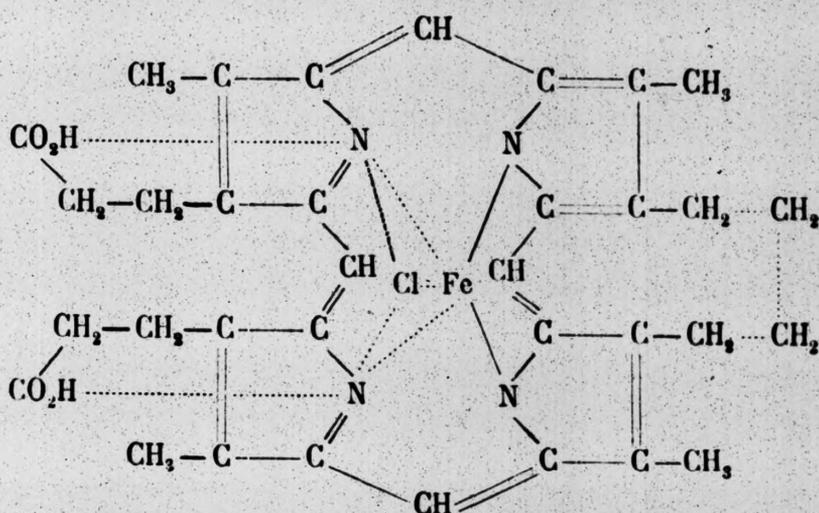
<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 40, S. 391 (1904).

<sup>2)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 37, S. 54 (1902).

in die nun allgemein angenommene mit  $C_{34}$  abgeändert worden; dabei sind aber, worauf Willstätter und Pfannenstiel<sup>1)</sup> aufmerksam gemacht haben, Formeln mit  $C_{33}$  nicht in Betracht gezogen worden. Zwischen so nahe stehenden Formeln ergibt die Analyse nicht leicht eine sichere Entscheidung, um so weniger als bei manchen Derivaten des Hämins die Bestimmungen erheblich differieren. Die Entscheidung durch die Überführung in die sauerstofffreie Verbindung, deren Formulierung sich auf die Ableitung aus den Chlorophyllderivaten, also auf ein beträchtliches analytisches Material stützt, ist daher von größerer Beweiskraft.

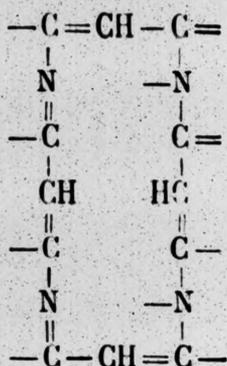
Um für die Struktur des Ätioporphyrins einen Ausdruck zu finden, müssen wir die Ergebnisse der Oxydation und Reduktion des Hämins und der Chlorophyllderivate berücksichtigen. Darnach setzt sich das Molekül der Stammsubstanz aus vier Pyrrolkernen zusammen. Die Zahl seiner Wasserstoffatome ist auffallend niedrig, die Pyrrole müssen daher so verbunden und substituiert sein, daß dabei im Vergleich mit einfachen Bindungen acht Atome Wasserstoff erspart werden, sei es durch Doppelbindungen oder weitere Ringschlüsse. Einigen Vorstellungen hinsichtlich der Art, in der man die Pyrrolkerne verknüpft denken kann, begegnen wir in der Literatur über Hämin.

W. Küsters wichtige Arbeiten haben das Gebiet des Blutfarbstoffs mit folgender Konstitutionsformel des Hämins

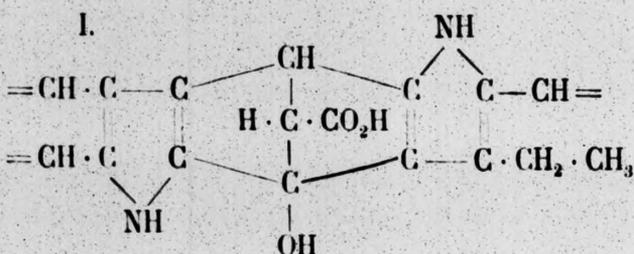


<sup>1)</sup> Ann. d. Chem., Bd. 358, S. 205, 213 (1907), und Ann. d. Chem., Bd. 371, S. 45 (1909).

beleuchtet, welche besonders dem Verlauf der Oxydation und Reduktion Rechnung trägt. Diese Annahme fordert indessen den Einwand heraus, daß von den beiden mit dem Eisen verbundenen Iminogruppen nur die eine als das saure Imin eines Pyrrols dargestellt wird, die andere aber als basische Imino-Gruppe eines Dihydropyrrols. Das Unwahrscheinliche dieser Formel liegt namentlich in der Annahme eines aus vier Stickstoffatomen und zwölf Kohlenstoffatomen bestehenden 16-gliedrigen Ringgebildes:



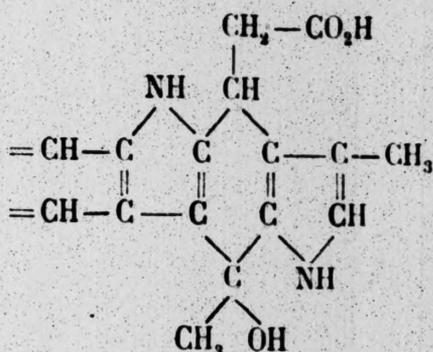
Die ersten Umwandlungen des komplizierten Pigmentes sind so schwer zu enträtseln und sogar die reagierenden Atomgruppen<sup>1)</sup> so schwer zu bestimmen, daß die Ansichten verschiedener Forscher weit auseinander gehen. Von O. Piloty<sup>2)</sup> wird das Hämin auf zwei miteinander verbundene kondensierte Systeme zurückgeführt, die aus Pyrrolen mit Kohlenstoffsechs- und -fünfringen bestehen:



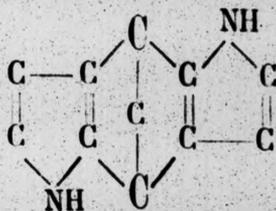
<sup>1)</sup> Siehe dazu R. Willstätter und M. Utzinger, Ann. d. Chem., Bd. 382, S. 129 und 141 (1911), und dagegen O. Piloty und E. Dormann, Ann. d. Chem., Bd. 388, S. 329 (1912).

<sup>2)</sup> O. Piloty und E. Dormann, Ann. d. Chem., Bd. 388, S. 313.

und II.



Eine solche Auffassung ist nur unter der Voraussetzung möglich, daß die Cyklopentan- und Cyklohexanringe und die cyclischen Systeme bei der Reduktion leicht zerfallen. Das ist wenig wahrscheinlich<sup>1)</sup>. Noch bedeutsamer ist der Widerspruch zwischen den Ergebnissen der Oxydation und dem wesentlichen Inhalt dieser Konstitutionsannahmen. Aus Hämin und seinen Derivaten gemäß den Formeln von Piloty könnte Hämatinsäure nicht hervorgehen. Die tertiären Kohlenstoffatome der beiden Systeme (I und II), z. B.



machen die Bildung des Propionsäurerestes der Hämatinsäure unmöglich; derselbe Einwand ist gegen die Formel der Bilirubinsäure (Bilinsäure) von Piloty und S. J. Thannhauser<sup>2)</sup> zu erheben. Die eigentümlichen Ringgebilde, welche die angeführten Formeln darstellen, ergaben sich aus der Schwierigkeit, die Vereinigung der Pyrrole zu einem so wasserstoffarmen Molekül auszudrücken. Es ist eben nicht wohl möglich, wenn man die zur Erklärung der Oxydationsprodukte erforderlichen Äthylgruppen vorsieht, das Ätioporphyrin ohne Annahme mindestens eines Kohlenstoffringes zu formulieren.

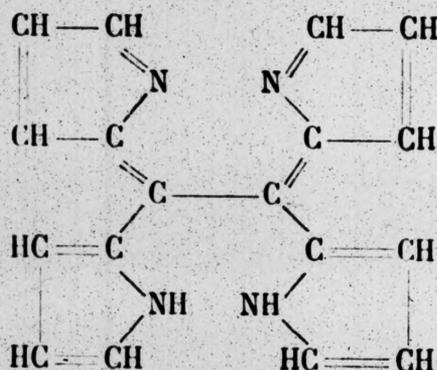
Eine Verknüpfung von vier Pyrrolen durch ein einziges Kohlenstoffatom führt nicht zu einem Farbstoff; eine Verbindung von Pyrrol zu Pyrrol mit Methylen- oder Methin-

<sup>1)</sup> Vgl. H. Fischer und E. Bartholomäus, Diese Zeitschrift, Bd. 83, S. 50 (1912).

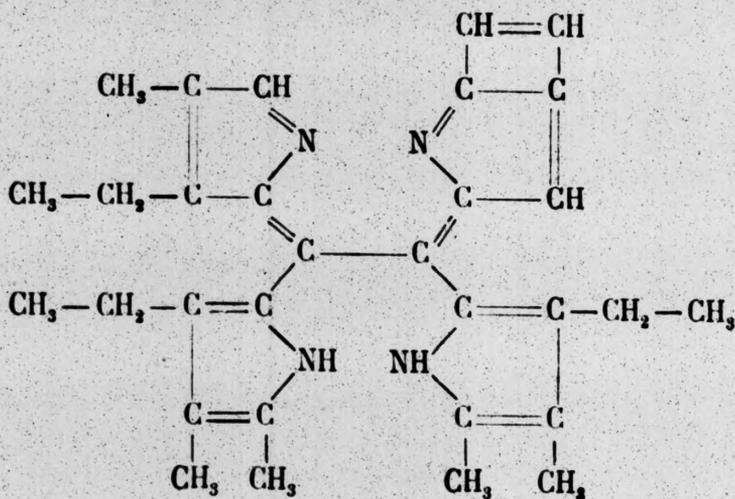
<sup>2)</sup> Ann. d. Chem., Bd. 390, S. 191 (1912).

gruppen gemäß der Formel von Küster ist nicht annehmbar, weil sie einen ungewöhnlich komplizierten Ring ergibt.

Als eine einfache Verknüpfung von vier Pyrrolkernen, von nur zwei salzbildenden und zwei komplexbildenden, zum Kern eines Farbstoffs ist uns folgende Formel wahrscheinlich:

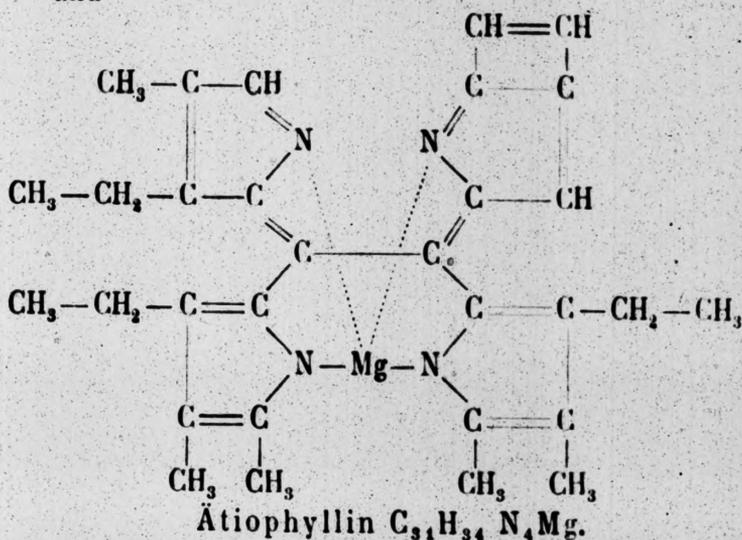


Lassen wir in diese Grundsubstanz entsprechend den bekannten Oxydationsprodukten drei Methyl- und drei Äthylgruppen und mit Rücksicht auf die Reduktionsprodukte mindestens noch eine Methylgruppe eintreten, so bleibt schließlich für die letzten drei Kohlenstoffatome des Ätioporphyrins nur so viel Wasserstoff übrig, daß entweder zwei Doppelbindungen oder zwei Kohlenstoffringe oder je eines von beiden angenommen werden muß. Wenn wir nun entsprechend dem Verlaufe der Reduktion es vermeiden, einen Ring von großer Beständigkeit anzunehmen, einen Cyklopentan- oder -hexanring, so gelangen wir mit einiger Wahrscheinlichkeit zu folgenden Formeln für Ätioporphyrin und Ätiophyllin:



Ätioporphyrin  $C_{31}H_{36}N_4$

und



Diese Formel sucht die Wasserstoffzahl des Ätioporphyrins durch die Verbindung eines Vinylrestes mit einem Pyrrol zum Cyclobutenring zu erklären. Mehrere Einzelheiten, wie die Stellung von zwei Methylen, sind willkürlich, auch könnte der Cyclobutenring in  $\beta$ - $\beta$ -Stellung an das Pyrrol angegliedert sein.

Die Carboxyle des Phyllo- und Pyrroporphyrins und anderer saurer Porphyrine substituieren Äthylgruppen; die Formel ist unsymmetrisch genug, um den beobachteten Isomerien zu genügen.

Versuchen wir nun, die Beziehung zwischen dem Ätioporphyrin und dem Hämin klarzulegen, so treten uns die Fragen entgegen, welche die ersten Umwandlungen des Hämins noch stellen.

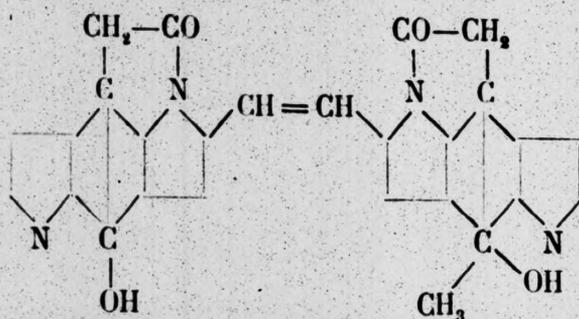
Willstätter und Fritzsche<sup>1)</sup> haben vor vier Jahren darauf aufmerksam gemacht, daß im Hämin gemäß den Versuchen von M. Nencki und J. Zaleski<sup>2)</sup> über die Esterbildung zwei freie Carboxyle angenommen werden müssen. Dieser Ansicht hat sich mit gründlichen Beweisen W. Küster<sup>3)</sup> angeschlossen, während O. Piloty an der Annahme festhält,

<sup>1)</sup> Ann. d. Chem., Bd. 371, S. 49 (1909).

<sup>2)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 30, S. 384 (1900).

<sup>3)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 66, S. 165 (1910). — Chem. Ber., Bd. 45, S. 1935 und 2503 (1912). — Diese Zeitschrift, Bd. 86, S. 185 (1913).

Hämin enthalte die beiden Carboxyle in der Form von Lactamgruppen und die zwei übrigen Sauerstoffatome als Hydroxyle:



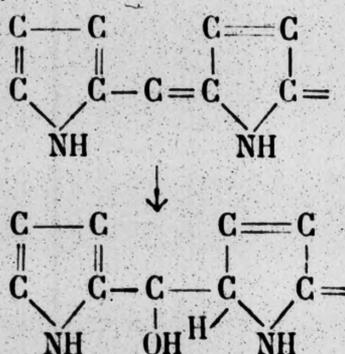
Indessen stehen mit dieser Lactamformel der Dialkyl-ester von Nencki und Zaleski, deren Werte Formeln wie



entsprechen, und dann die Oxydation des Dimethylhämins zu Hämatinsäureester nach Küster im Widerspruch.

Mit dem Austritt des Eisens aus dem Hämin erfolgt nach Piloty zugleich die Lösung der angenommenen Lactamgruppen, Hämatoporphyrin wäre darnach die eisenfreie, dem Hämin genau entsprechende Verbindung. Dem entgegen betrachtet W. Küster zwei Vinylgruppen im Hämin als Angriffstellen der Reagenzien z. B. Bromwasserstoff-Eisessig bei der Eliminierung des Eisens, und H. Fischer<sup>1)</sup> hält es für wahrscheinlich, daß es Doppelbindungen zwischen Methingruppen und Pyrrolkernen sind, die Halogenwasserstoff, also mittelbar Wasser aufnehmen.

Die Erklärung von H. Fischer ließ erwarten, daß die Farbe der Verbindung bei den Additionen in Mitleidenschaft gezogen, nämlich abgeschwächt würde:

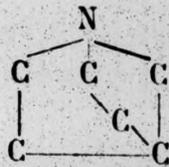


<sup>1)</sup> H. Fischer, E. Bartholomäus und H. Röse, Diese Zeitschrift, Bd. 84, S. 262 (1913).

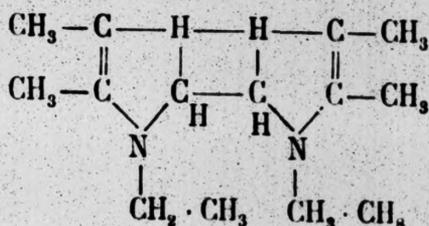
was nicht zutrifft. Nach den Betrachtungen von W. Küster wären es unwichtige, die komplexe Bindung nicht beeinträchtigende Gruppen, an welchen Addition stattfinden würde.

Wir haben über die Beziehung zwischen Hämin und seinen Porphyrinen, namentlich über den Verlauf der Hämato-porphyrinbildung Versuche angestellt, die wir in den Kapiteln II und III beschreiben und deren Ergebnisse wir im nächsten Abschnitt erörtern werden. Dabei hat es sich gezeigt, daß Hämin zunächst 2 Moleküle Halogenwasserstoff addiert und daß dadurch die Bindung des Eisens eine Lockerung erfährt. Erst dann ist es möglich, das Eisen abzuspalten, während das Metall noch mit keinem Mittel aus Hämin selbst abgespalten wurde.

Zur Erklärung der Reaktionen beim Austritt des Eisens erscheint uns die Annahme begründet, daß die Gruppen, die sich durch ihr Additionsbestreben auszeichnen, mit Stickstoffatomen in Verbindung stehen, etwa nach folgendem Schema, für das manche Alkaloide Analogien bieten:



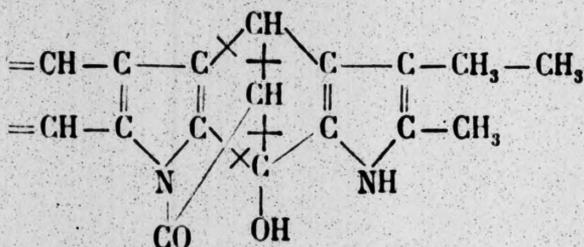
Diese Formel für einen Teil des Häminmoleküls stimmt sehr gut zu einer merkwürdigen, aber noch unsicheren Beobachtung von O. Piloty und J. Stock,<sup>1)</sup> die in der Form eines Pikrates ein polymerisiertes, wahrscheinlich am Stickstoff äthylirtes Pyrrol, nämlich vielleicht ein bis- $\alpha$ - $\beta$ -Dimethyl-N-Äthylpyrrol von der Formel



unter den Hämopyrrolen aufgefunden haben. Daß die Äthylgruppen aus den als Lactam vorhandenen Carboxylen und

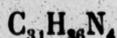
<sup>1)</sup> Ann. d. Chem., Bd. 392, S. 215 (1912); siehe aber dagegen O. Piloty und K. Wilke, Chem. Ber., Bd. 46, S. 1597 (1913).

einem Kohlenstoffatom des Kohlenstoffünfringes hervorgeht, wie Piloty und Stock annehmen:

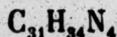


ist sehr unwahrscheinlich.

Wenn schon das Ätioporphyrin von der Formel



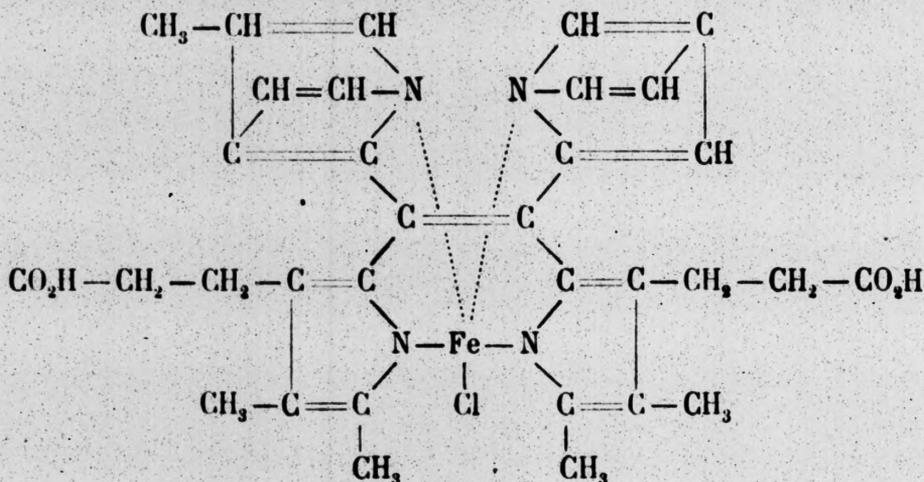
auffallend wasserarm erscheint, so leitet sich Hämin  $C_{33}H_{32}O_4N_4FeCl$  von einer noch um 2 Wasserstoffatome ärmeren Grundsubstanz



ab, welche die Annahme von Doppelbindungen und Kohlenstoffringen erzwingt. Auf der Grundlage der angenommenen Verknüpfung von 4 Pyrrolen durch die Gruppe:

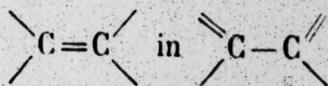


und der Bindung von 2 Vinylen an Stickstoffatome versuchen wir, eine dem Verhalten bei der Oxydation, der Reduktion und der Porphyrinbildung genügende Konstitutionsformel des Hämins zu entwickeln, die noch in mehreren Einzelheiten unsicher und zu verbessern ist, aber, wie wir hoffen, weitere Untersuchungen anzuregen und zu leiten vermag:



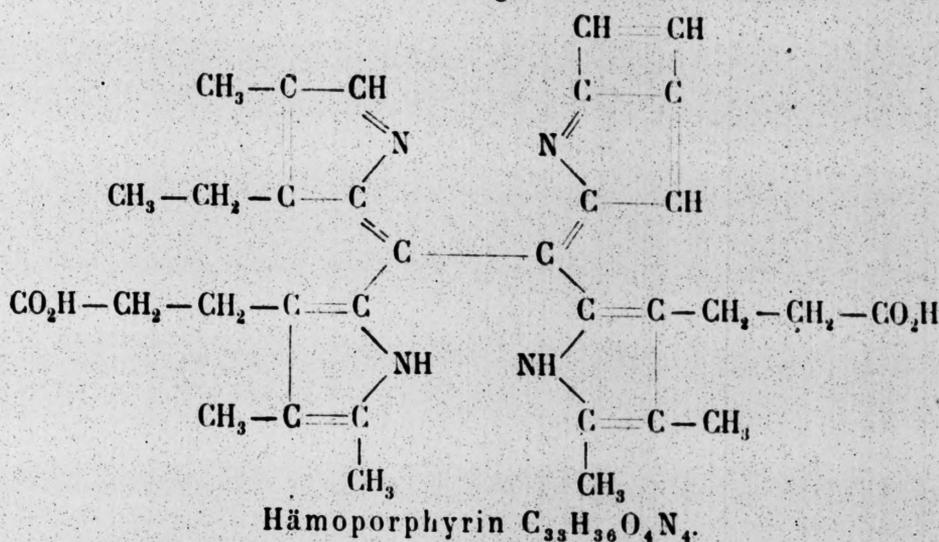
Hämin  $C_{33}H_{32}O_4N_4FeCl$ .

Bei der Bildung des Hämatoporphyrins werden sich die Brücken von den zwei Pyrrolstickstoffen lösen, worauf sich die mittlere Gruppe



umwandeln kann.

Bei der Umwandlung des Hämatoporphyrins soll nach unserer Annahme die Kondensation eines Vinylrestes mit einem Kohlenstoffatom des Pyrrolkernes erfolgen, welche das Strukturbild des Ätioporphyrins zum Ausdruck bringt. Das Hämaporphyrin wird daher durch folgende Formel erklärt:



und das möglicherweise um zwei Wasserstoffatome reichere Mesoporphyrin vielleicht durch die entsprechende Formel mit Sättigung der Gruppe  $\text{CH}=\text{CH}$ .

Die Formeln veranschaulichen, daß das Molekül des Hämins sich beim Abbau in unsymmetrischer Weise ändert, worauf mehrere Reaktionen hindeuten. Während bei der Oxydation von Hämin kein Methyläthylmaleinimid auftritt, liefert<sup>1)</sup> Mesoporphyrin dieses Imid, indessen nicht mehr als ein Molekül.

Da auf dem Wege vom Hämin zu den Porphyrinen Änderungen in der Konstitution vorkommen, so ist der Vorschlag von Küster<sup>2)</sup> nicht einwandfrei, Hämin und seine Derivate mit

<sup>1)</sup> H. Fischer und F. Meyer-Betz, Diese Zeitschrift, Bd. 82, S. 96 (1912) und W. Küster und P. Deihle, Chem. Ber., Bd. 45, S. 1935, 1945 (1912) und diese Zeitschrift, Bd. 82, S. 463 (1912).

<sup>2)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 86, S. 55 und 190 (1913).

einer einheitlichen Bezeichnung auf eine scheinbar gemeinsame Grundsubstanz Hämaterin zurückzuführen.

Unsere Betrachtungen über die Konstitution des Hämatins und des Hämatoporphyrins setzen die einfache Molekulargröße dieser Verbindungen voraus, welche die Formel mit 33 Atomen Kohlenstoff ausdrücken. Diese Annahme läßt die Ergebnisse der Arbeiten von Piloty und Dormann und Fink unberücksichtigt; diese Forscher glauben zu beweisen, daß die Molekulargewichte von Hämin und Hämatoporphyrin zu verdoppeln seien und sie finden in dieser «Entdeckung einen neuen Gesichtspunkt von grundlegender Bedeutung» für die Untersuchung des Hämins. Wir werden die betreffenden Angaben in dem Abschnitte über Hämatoporphyrin erörtern und unsere mit der krystallisierten Tetramethylverbindung des Hämatoporphyrins ausgeführten Bestimmungen mitteilen, welche die einfache Molekulargröße bestätigen.

Obwohl nun Chlorophyll und Hämin auf dasselbe Ätioporphyrin zurückgeführt worden sind, das man als eine Stammsubstanz der Porphyrine bezeichnen kann, so dürfen wir aus den Untersuchungen über den Abbau keineswegs den Schluß einer nahen Strukturverwandtschaft zwischen Chlorophyll und Hämin ziehen. Hier Magnesium, dort Eisen, hier Esterbildung mit Phytol, dort Paarung mit Globin; zu solchen, den ungleichartigen Funktionen entsprechenden Unterschieden kommen noch in dem eigentlichen Farbstoffkern bedeutende Unterschiede, die erst bei tiefgreifendem Abbau verschwunden sind.

Auf dem Wege vom Hämin zum Ätioporphyrin gibt es zwei Verwandlungen, die den Bau des Moleküls wesentlich ändern, nämlich den Übergang von Hämin zu Hämatoporphyrin und von diesem zu Hämoporphyrin, das mit den Porphyrinen des Chlorophylls isomer ist.

Auch zwischen Chlorophyll und dem Ätiophyllin, genauer zwischen Chlorophyll und den zweibasischen Phyllinen liegen zwei das Molekül wesentlich umgestaltende Einwirkungen, die sich mit den Reaktionen des Hämins nicht in Parallele bringen lassen.

Der eine Schritt ist die Umlactamisierung<sup>1)</sup> der Chlorophyll-

---

<sup>1)</sup> R. Willstätter und H. Utzinger, Ann. d. Chem., Bd. 382, S. 129 (1912).

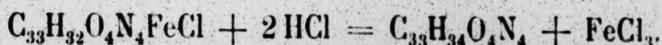
komponenten, durch die ein Ringsystem aufgespalten, ein neues synthetisiert wird. Die zweite, gleichfalls erhebliche Umformung<sup>1)</sup> des Moleküls, die weniger augenfällig stattfindet, geschieht durch die Einwirkung von Alkali bei hoher Temperatur und führt von den Chlorophyllinen zu den einfacher konstituierten Dicarbonsäuren, z. B. Rhodophyllin, oder vom Phytochlorin und Phytorhodin zu den entsprechenden Porphyrinen.

Künftigen Untersuchungen fällt die Aufgabe zu, die Konstitution des Ätioporphyrins in wichtigen Einzelheiten zu erforschen, um unsere vorläufige Strukturannahme nachzuprüfen und zu verbessern, und die Aufgabe, die konstitutionellen Veränderungen aufzuklären, die vom Hämin und andererseits vom Chlorophyll zu den Porphyrinen führen.

## II. Zwischenprodukte der Hämatoporphyrinbildung.

### Theoretische Einleitung.

Es muß eine eigentümliche Ursache haben, daß es nicht gelungen ist und nach den üblichen Methoden nicht gelingt, dem Hämin unter Bildung des ihm zugrunde liegenden Porphyrins mit vier Sauerstoffatomen das Eisen zu entziehen nach der Gleichung:



Bekanntlich enthält das beim Austritt von Metall entstehende Hämatoporphyrin sechs Sauerstoffatome gemäß der bisher angenommenen Formel  $\text{C}_{34}\text{H}_{38}\text{O}_6\text{N}_4$  und der abgeänderten  $\text{C}_{33}\text{H}_{38}\text{O}_6\text{N}_4$ .

Alle Forscher, deren eindringende und mühevollen Untersuchungen in den letzten Jahren unsere Kenntnis vom Blutfarbstoff vertieft haben, William Küster, Oskar Piloty und Hans Fischer, sind der Frage näher getreten, ob bei der Einwirkung von Bromwasserstoff auf Hämin zunächst Addition von Halogenwasserstoff und weiterhin Ersatz der Halogenatome durch Hydroxyl erfolgt oder ob diese Reaktion ohne Bildung von Zwischenprodukten verläuft.

<sup>1)</sup> XXII. Abhandlung über Chlorophyll, Ann. d. Chem. im Druck.

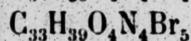
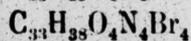
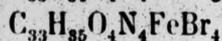
Die Anschauungen darüber sind verschieden.

O. Piloty<sup>1)</sup> findet, daß die Bildung des Hämatoporphyrins ohne konstitutionelle Änderung, also ohne Addition von Halogenwasserstoff vor sich gehe und daß neben dem Austritt des Eisens nur noch die Hydrolyse von zwei Lactamgruppen erfolge.

H. Fischer, E. Bartholomäus und H. Röse<sup>2)</sup> berichten über einen erfolglosen Versuch, bei der Abspaltung des Eisens aus Hämin mit Hilfe von Eisessig-Chlorwasserstoff ein chlorhaltiges Zwischenprodukt nachzuweisen. Dennoch vermuten sie eine solche Zwischenstufe, aber sie schließen aus ihrer Vergänglichkeit, daß nicht an eine Vinylgruppe primär die Addition von Halogenwasserstoff erfolge, sondern eher an  $\alpha$ -ständige Methingruppen.

Auch W. Küster<sup>3)</sup> hat das Auftreten von halogenhaltigen Zwischenprodukten dieser Reaktion geprüft und er hat vor kurzem, ohne solche zu isolieren, einen Beweis für ihre Bildung erbracht. Die Auflösung des Hämins in Bromwasserstoff-Eisessig haben nämlich Küster und Deihle abgedampft und mit Methylalkohol erwärmt. So entstand ein Tetramethylderivat des Hämatoporphyrins, eine Verbindung, die zugleich Äther und Ester dieser Dioxysäure ist.

Wir haben gleichfalls die Einwirkung von Halogenwasserstoffen auf Hämin untersucht und haben die unbekanntenen Zwischenprodukte der Enteisung unter verschiedenen Bedingungen isoliert, mit wässriger Bromwasserstoffsäure, mit Bromwasserstoff-Eisessig, mit flüssigem Bromwasserstoff und mit flüssigem Chlorwasserstoff. Die bei der Reaktion mit Bromwasserstoffsäure erhaltenen Additionsprodukte sind:



Diese Verbindungen liefern durch Hydrolyse Hämatoporphyrin, das wir nach zahlreichen Bildungsweisen in einheit-

<sup>1)</sup> Ann. d. Chem., Bd. 377, S. 314 (1910).

<sup>2)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 84, S. 262 (1913).

<sup>3)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 86, S. 51 (1913).

lichem und schön krystallisiertem Zustand erhielten, während es bisher als freie Säure nur amorph bekannt war. Zwei neue, ebenfalls krystallisierende Porphyrine, für welche wir die Bezeichnung Hämino- und Hämidoporphyrin vorschlagen, entstehen bei der Hydrolyse der Chlorwasserstoffadditionsprodukte. Sie sind dem Hämatoporphyrin nahe verwandt, aber durch ihre basischen Eigenschaften und ihr Verhalten in der Hitze von ihm unterschieden.

Für die Untersuchung dieser eisenfreien Häminderivate, zu welchen noch einige einfachere Porphyrine hinzukommen, die wir bei dem Abbau mit methylalkoholischer Kalilauge erhielten, finden wir die Methode unentbehrlich, die zur Bestimmung und Trennung von Chlorophyllderivaten von Willstätter und Mieg<sup>1)</sup> geschaffen worden ist. Sie beruht auf der ungewöhnlichen Differenzierung der basischen Eigenschaften dieser Verbindungen, welche sich darin zeigt, daß sich das Verhältnis ihrer Verteilung zwischen Äther und Salzsäure mit der Säurekonzentration sehr stark ändert. Daher lassen sich die Chlorophyll- und Häminderivate kennzeichnen und auf ihre Reinheit prüfen durch die Konzentration der Salzsäure (Salzsäurezahl), welche erforderlich ist, um die Substanz aus Äther reichlich auszuziehen, oder genauer durch quantitative Bestimmung der Verteilung zwischen Salzsäure und Äther (Verteilungszahl).<sup>2)</sup>

So viele Male wir auch auf die analytische und präparative Bedeutung dieser Methode aufmerksam gemacht haben, ist sie doch leider bisher in keinem Falle zur Prüfung der Einheitlichkeit von Häminderivaten, namentlich von Hämatoporphyrin und Mesoporphyrin, herangezogen worden.

Salzsäurezahl von

Hämatoporphyrin . . . . .	$\frac{1}{10}$	
» -dimethyläther . . . . .	1	
Tetramethylderivat des Hämatoporphyrins . . . . .	3	
Hämoporphyrin . . . . .	$\frac{3}{4}$	Verteilungszahl 23
Mesoporphyrin . . . . .	$1\frac{1}{2}$	» 12
Ätioporphyrin . . . . .	3,	» 43

<sup>1)</sup> Untersuchungen über Chlorophyll I, Ann. d. Chem., Bd. 350, S. 1 (1906).

<sup>2)</sup> Siehe R. Willstätter und A. Stoll, Untersuchungen über Chlorophyll, Methoden und Ergebnisse, Berlin 1913. (Verlag von J. Springer).

Nicht die Isolierung der halogenhaltigen Zwischenprodukte bei der Bildung von Hämatoporphyrin war das Ziel unserer Versuche, sondern die in den folgenden Kapiteln beschriebene Untersuchung ist von der Frage veranlaßt und geleitet worden, ob die Addition von Halogenwasserstoff bei der Bildung von Hämatoporphyrin einen wesentlichen Zusammenhang mit dem Austritt des Eisens hat.

Ist es eine zufällige Erscheinung, daß sich einige reaktionsfähige Stellen in erster Linie den für die Enteisung angewandten Reagenzien darbieten und sich durch Addition absättigen? Das ist die ausgesprochene Meinung der Forscher, deren Arbeiten bisher die Additionsreaktionen des Hämins behandelt haben. Die Konstitutionsformel von Küster sucht in einigen ungesättigten Gruppen, die eigentlich für die Konstitution des Farbstoffmoleküls belanglos erscheinen, den ersten Angriffspunkt der Halogenwasserstoffe.

Oder ist es die notwendige Vorbedingung für den Austritt des Eisens, daß sein komplexer Zustand zuerst gelockert wird durch eine Änderung der Bindungsverhältnisse der beteiligten Stickstoffatome?

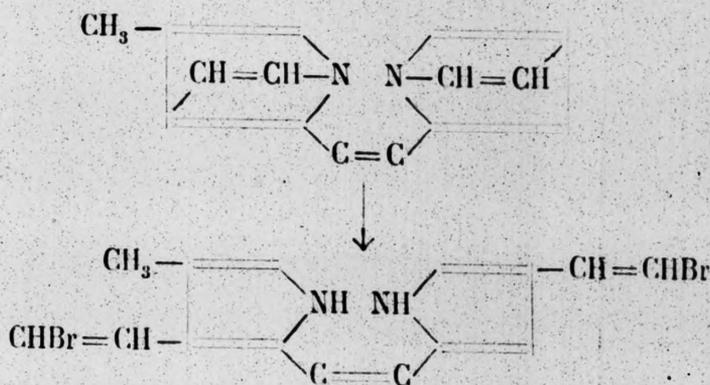
Es ist nach allen Beobachtungen überhaupt noch nicht gelungen, vom Hämin das Eisen abzuspalten. In den untersuchten Fällen ist es nicht Hämin, das enteisen wurde, sondern Additionsprodukte desselben. In diesen ist also das Eisen lockerer gebunden. Lassen wir Halogenwasserstoff unter solchen Bedingungen einwirken, unter denen es sich nicht addiert, unter denen eher Dissoziation der Additionsprodukte erfolgt, so wird kein Eisen abgespalten.

Wir erhitzen z. B. Hämin 48 Stunden lang in einem Strom von Chlorwasserstoff auf 100°. Die Löslichkeitsverhältnisse, die Reaktion mit Schwefelsäure und die Zusammensetzung, wie die folgende Analyse des erhitzten Präparates zeigt, erwiesen das Hämin als unverändert.

0,2085 g Substanz gaben 0,4709 g CO<sub>2</sub> und 0,0941 g H<sub>2</sub>O.

Berechnet für C <sub>33</sub> H <sub>32</sub> O <sub>4</sub> N <sub>4</sub> FeCl:	Gefunden:
C = 61,91	61,60
H = 5,04	5,05

Wenn die Addition und die Lockerung der komplexen Bindung des Eisens Hand in Hand geht, so glauben wir die Erklärung darin zu finden, daß die reagierenden Stellen Kohlenstoffatome gebunden an Stickstoffatome sind, daß also in zwei Pyrrolkernen des Hämins Brücken vom Stickstoff zu einem Ringkohlenstoffatom führen, die bei den Additionen gesprengt werden:



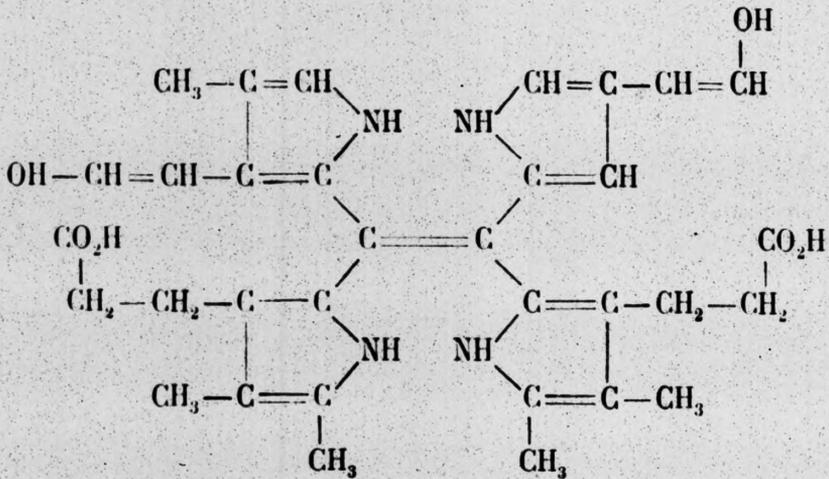
Wir müssen diese Annahme mit einiger Willkür in bezug auf die Einzelheiten formulieren, aber es erscheint uns nützlich, sie für weitere Untersuchungen zur Prüfung zu stellen, auf die Gefahr hin, daß die Formel noch Abänderung erfahren wird.

Unter den angenommenen Verhältnissen ändert die Anlagerung von Halogenwasserstoff, von Schwefelsäure oder von Wasser die Bindungsweise zweier Stickstoffgruppen und infolgedessen ihre Wirkung auf den Eisenkomplex. Die Auflockerung desselben kann zwei konstitutionelle Ursachen haben. Es ist möglich, daß die sauren Iminogruppen der Pyrrole weniger als die zuvor angenommenen tertiären Stickstoffatome für die komplexe Bindung des Metalls wirksam sind oder die Verminderung, aber nicht Aufhebung, der Wirkung dieser beiden Stickstoffatome kann die Folge einer Verschiebung von Doppelbindungen sein, welche der aus einer Brücke hervorgegangenen Seitenkette zwei Wasserstoffatome zuführt und die Konstitution zweier Pyrrolkerne ändert.<sup>1)</sup> Diese beiden Annahmen, zwischen

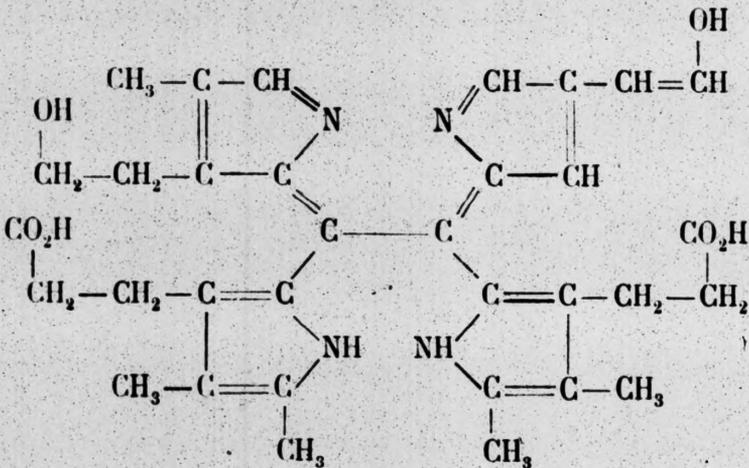
<sup>1)</sup> Vielleicht erklärt die besondere Anordnung der Bindungen in den Pyrrolkernen der oberen Hälfte von Formel II (S. 442), daß die Porphyrine trotz einiger freier Stellen nicht mit Dimethylaminobenzaldehyd u. a. reagieren.

denen eine Entscheidung noch nicht möglich ist, finden ihren Ausdruck in folgenden Strukturformeln für Hämatoporphyrin. Die Unsymmetrische (II) halten wir für die wahrscheinlichere, da die Hydroxyle des Hämatoporphyrins ungleich reagieren:

I.



II.

Hämatoporphyrin C<sub>33</sub>H<sub>33</sub>O<sub>6</sub>N<sub>4</sub>.

Die verwickelten Verhältnisse bei der Alkylierung des Hämatoporphyrins, die Methylierung in den alkoholischen Hydroxyle durch Methylalkohol und Chlorwasserstoff, die schon von Nencki und Zaleski<sup>1)</sup> festgestellt worden ist, lassen sich an Hand dieser Formeln erklären, nach welchen das Hämatoporphyrin mit den Oxymethylenverbindungen zu vergleichen ist. Auch stehen damit (namentlich mit Formel II) die sauren Eigenschaften von Hämato- und Häminoporphyrin im Einklang; diese

<sup>1)</sup> Nenckis Werke, Bd. 2, S. 756.

zweibasischen Säuren absorbieren nämlich drei Moleküle Ammoniak, während Hämo- und Mesoporphyrin (wie alle zweicarboxyligen Porphyrine des Chlorophylls) nur zwei Moleküle Ammoniak aufnehmen.<sup>1)</sup>

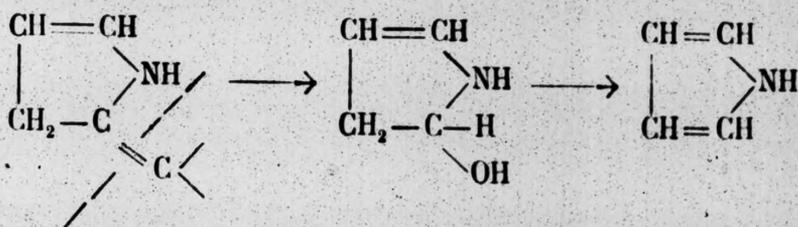
### Einwirkung wässriger Bromwasserstoffsäure.

Von wässriger Bromwasserstoffsäure wird Hämin in ein schön krystallisierendes Dihydrobromid verwandelt, das bei weiterer Einwirkung der Säure Hämatoporphyrin liefert.

Mit Bromwasserstoffsäure vom spezifischen Gewicht 1,49 reagiert Hämin auch bei mehrtägigem Schütteln nicht, mit bei 0° gesättigter Bromwasserstoffsäure hingegen verwandelt es sich allmählich in Krystalle des Additionsproduktes, die bei Anwendung von sehr viel Reagens im Laufe einiger Tage unter Verlust des Eisens in Lösung gehen. Um Hämatoporphyrin zu bilden, braucht man diese Lösung nur mit Wasser zu verdünnen, worauf das eisenfreie Dihydrobromid der Hydrolyse unterliegt. Zur Isolierung des Hämindihydrobromids ist es zweckmäßig, eine Säure vom spezifischen Gewicht 1,78 (ca. 66% von Kahlbaum) anzuwenden.

Wir schüttelten 5 g Hämin mit 200 g solcher Bromwasserstoffsäure in einer Stöpselflasche eine Stunde lang und ließen über Nacht stehen. Die Säure war dann intensiv blaurot, da schon etwa  $\frac{1}{3}$  der Substanz das Eisen verloren hatte.

<sup>1)</sup> H. Fischer, E. Bartholomäus und H. Röse (Die Zeitschrift, Bd. 84, S. 271 (1913) beschreiben eine wichtige Eigenschaft des Porphyrinogens; bei der Titration unter Anwendung von Phenolphthalein als Indikator ist es neutral. Wir schließen daraus, daß Porphyrinogen zwei stark basische Gruppen, also Dihydropyrrole enthält. Da bei der Reduktion über Porphyrinogen hinaus jedoch fast nur Pyrrole auftreten, so handelt es sich dabei um eine hydrolytische Spaltung, die in ihrer Wirkung auf die Dihydropyrrole oxydativ ist:





Hämin; es löst sich nicht mehr klar in Pyridin und läßt sich nicht aus kochsalzhaltigem Eisessig umkrystallisieren. Hämin selbst scheint eben längeres Erhitzen bei 105° auch nicht zu vertragen, wenn schon es seine Zusammensetzung dabei nicht ändert.

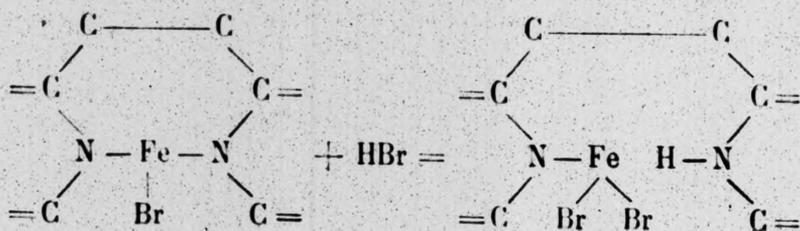
Das Dihydrobromid wird von einem großen Überschuß bei 0° gesättigter Bromwasserstoffsäure in einer Viertelstunde gelöst und enteisent, träger von der Säure 1,78.

2 g Hydrobromid ließen wir unter zeitweisem Schütteln mit 200 g wässriger Bromwasserstoffsäure (1,78) drei Tage lang stehen; dann verdünnten wir die Lösung mit dem gleichen Volumen Wasser und filtrierten von unversehrter Eisenverbindung ab, die noch  $\frac{2}{3}$  der angewandten Menge ausmachte. Um das eisenfreie Bromid vollständig zu Hämatoporphyrin zu hydrolysieren, ließen wir das Filtrat einige Stunden stehen. Dann führten wir unter weiterem Verdünnen und ziemlich genauem Neutralisieren das Porphyrin in 3 l Äther über. Beim Einengen auf  $\frac{1}{10}$  des Volumens fielen daraus 0,25 g einheitliches Hämatoporphyrin (Salzsäurezahl 0,1) als schweres Kry stallmehl aus, in länglichen, an den Ecken gerundeten Täfelchen von lebhaftem Glanz (Analyse I des Hämatoporphyrins).

#### Einwirkung von Eisessig-Bromwasserstoffsäure.

##### a) Trihydrobromid des Hämins, $C_{33}H_{35}O_4N_4FeBr_4$ .

Bromwasserstoff-Eisessig bewirkt rascher und schon bei niedrigerer Konzentration als wässrige Bromwasserstoffsäure die Enteisenung des Hämins. Wendet man das Reagens in einer etwas zu geringen Konzentration an, so bleibt die Einwirkung bei einem Zwischenprodukt stehen, das nach seiner Zusammensetzung  $C_{33}H_{35}O_4N_4FeBr_4$  durch Addition von 3 Molekülen Bromwasserstoff gebildet ist. Es sind verschiedene Annahmen möglich, um diese Formel zu erklären, am wahrscheinlichsten ist es uns, daß Hämin wie bei der oben beschriebenen Verbindung 2 Moleküle Bromwasserstoff addiert hat und daß durch ein drittes die Bindung des Eisens zur Hälfte gelöst worden ist:



25 g gepulvertes Hämin wurden mit 640 g der zur Hämatoporphyrinbildung etwas zu verdünnten Eisessig-Bromwasserstoffsäure 1,40 an der Maschine geschüttelt und 5 Tage lang stehen gelassen. In dieser Zeit waren 10—11 g Hämin in Lösung gegangen und enteisent; der größere Teil lag als dunkles Pulver scheinbar unangegriffen am Boden. Dieses war nach Zusammensetzung und Verhalten aber verändert. Wir verdünnten, um zu filtrieren, die Säure mit demselben Volumen Eisessig und isolierten nach dem Waschen mit Alkohol und etwas Äther 18 g unlöslichen Anteil, ein braunrotes Pulver, das unter dem Mikroskop aus korrodierten häminähnlichen Kristallen bestand.

Für die Analyse wurde das Präparat bei gewöhnlicher Temperatur getrocknet.

0,2491 g Substanz gaben 0,2094 g AgBr (nach Carius)

Berechnet für  $\text{C}_{33}\text{H}_{35}\text{O}_4\text{N}_4\text{FeBr}_4$ : Gefunden:

Br = 34,49

35,77

Im Hochvakuum bei  $105^\circ$  erlitt die Substanz einen Gewichtsverlust von 10,6% (ber. für 1 Mol. HBr 8,5%); sie entsprach dann annähernd der Zusammensetzung  $\text{C}_{33}\text{H}_{34}\text{O}_4\text{N}_4\text{FeBr}_3$  und zeigte nun ähnliche Eigenschaften wie das oben beschriebene Dihydrobromid nach seinem Erhitzen auf  $105^\circ$ .

Das Trihydrobromid gibt mit konzentrierter Schwefelsäure eine prächtig blaurote Lösung und es löst sich in Alkohol leicht mit intensiv braunroter Farbe; in Äther ist es hingegen unlöslich.

Das Additionsprodukt wird von Eisessig-Bromwasserstoff in Hämatoporphyrin übergeführt, sogar, allerdings träge, von der Säure 1,40. Wir schüttelten mit 200 g derselben 7 g Bromid acht Stunden lang und ließen noch einige Tage damit stehen. Beim Eingießen in einen Liter Wasser gewannen wir 5 g der Eisenverbindung unverändert wieder; die verdünnte Lösung blieb zur Beendigung der Hydrolyse 5 Stunden stehen, dann wurde

durch Abstumpfen der Säure durch Natriumacetat das Porphyrin in amorphem Zustand ausgefällt. Wir lösten es sogleich in 200 ccm Alkohol und brachten es daraus in 4 l Äther. Aus der mit destilliertem Wasser gründlich gewaschenen Lösung fielen nach dem Einengen bei 400 ccm 1,2 g Hämatoporphyrin in schöner Form aus als Aggregat von deutlich krystallinischer Struktur. (Analyse II und X des Hämatoporphyrins.)

b) Dibromhydrat des Hämatoporphyrin-Bromwasserstoffesters.  
 $C_{33}H_{36}O_4N_4Br_2 \cdot 2HBr$ .

Sobald Hämin in Eisessig-Bromwasserstoff aufgelöst ist, läßt sich mit Äther das bromwasserstoffsäure Salz einer eisenfreien Verbindung fällen und von Eisenbromid trennen. Sie ist durch Addition zweier Moleküle Bromwasserstoff an die reaktionsfähigen Stellen des Hämins gebildet. Zwei von ihren Bromatomen unterliegen bei gelinder Behandlung mit Säure in der Kälte der Hydrolyse, die zum Hämatoporphyrin führt. Die beiden alkoholischen Hydroxyle desselben sind also mit Bromwasserstoff verestert.

Wir schütteln 3 g grobe Häminkrystalle mit 75 g Eisessig-Bromwasserstoff vom spezifischen Gewicht 1,41 (bei 0° bestimmt) in einer Stöpselflasche während eines Tages und filtrieren die dunkelrote Lösung durch Talk; auf der Filtrierschicht bemerken wir nichts Ungelöstes. Beim Eingießen des Filtrates in 2 l trockenen Äthers fällt das Hydrobromid in hellroten Flocken aus: nur wenn der Eisessig-Bromwasserstoff Wasser enthielt oder der Äther feucht war, entstand eine sirupöse Fällung. Der Niederschlag enthält noch Eisensalz, er wird gründlich mit trockenem Äther gewaschen, dann gibt eine Probe keine Asche mehr. Das Salz ist hygroskopisch: nach dem Trocknen beträgt die Ausbeute 4 g, sie entspricht der Theorie.

Für die Analyse reinigen wir die Substanz durch Aufnehmen mit Aceton, worin sie leicht löslich ist, und Fällern mit Äther.

0.1993 g Substanz gaben 0,1770 g AgBr (nach Carius)

Berechnet für  $C_{33}H_{36}O_4N_4Br_4$ : Gefunden:

Br = 36,57

37,79

Im Hochvakuum bei  $105^{\circ}$  erleidet die Substanz einen Gewichtsverlust von 18% (berechnet für 2 HBr 18%); sie weist dann die Zusammensetzung der freien Dibromsäure auf, aber die Substanz ist verdorben wie erhitztes Hämatorporphyrin.

- I. 0,1711 g Substanz gaben 0,0986 g AgBr (nach Carius)  
 II. 0,1846 „ „ „ 0,1036 „ „ „ „

Berechnet für	Gefunden:	
$C_{33}H_{36}O_4N_4Br_2$ :	I.	II.
Br = 22,45	24,52	23,88

Die Tetrabromverbindung ist auch in Alkohol leicht löslich mit blauroter, in Eisessig mit grünlich roter Farbe, noch mehr grünstichig ist die Lösung in Chloroform.

Sie wird sehr leicht hydrolysiert; man braucht sie nur in etwas Wasser aufzulösen und die rotviolette Lösung unter vorsichtigem Abstumpfen mit Natriumbicarbonat auszuäthern, um durch die Salzsäurezahl  $1/10$  das gebildete einheitliche Hämatorporphyrin nachzuweisen. Bei der Gewinnung des Hämatorporphyrins erfolgt diese Reaktion nach dem Verdünnen der Auflösung von Hämin in Eisessig-Bromwasserstoff, wenn man die Flüssigkeit einige Zeit stehen läßt.

Die basischen Eigenschaften der freien bromhaltigen Säure sind viel geringer; wird das Salz in Aceton aufgelöst und diese durch Abstumpfen mit wasserfreiem Natriumcarbonat in Äther übergeführt, so findet man die Salzsäurezahl höher als 3.

Wie wir finden, daß die beiden Hydroxyle des Hämatorporphyrins von ungleicher Reaktionsfähigkeit sind, so beobachten wir auch an den Bromatomen dieses Bromwasserstoffesters einen Unterschied in der Beweglichkeit. Bei gelinder Einwirkung von Alkaliacetat auf das beschriebene Bromid reagiert nämlich nur 1 Bromatom und zwar wird es wahrscheinlich gegen die Gruppe  $CH_3COO-$  ausgetauscht unter Bildung der Acetylverbindung eines primären Bromwasserstoffesters von Hämatorporphyrin.

Versetzt man im Reagierglas die Lösung des Bromides  $C_{33}H_{38}O_4N_4Br_1$  in Eisessig mit Äther und dann mit einem Krystall von Natriumacetat, so schlägt die Farbe rasch von Grün in Braunrot um. Dieselbe Reaktion läßt sich mit der Auflösung von Hämin

in Bromwasserstoff-Eisessig ausführen: anstatt zu verdünnen und nach einigem Stehen das Porphyrin zu fällen, braucht man nur zuerst mit Alkaliacetat abzustumpfen und dann zu verdünnen. Wir vermischten die Auflösung von 7 g Hämin in 200 g Bromwasserstoff-Eisessig mit demselben Volumen Eisessig, filtrierten und trugen unter Rühren 100 g krystallisiertes Natriumacetat ein; dabei änderte sich die Nuance der Flüssigkeit von bräunlichem Rot zu violettrot. Auf Zusatz von Wasser fiel ein braunrotes Pulver aus (9 g).

0,2179 g Substanz gaben 0,0604 g AgBr (nach Carius)

Berechnet für  $C_{33}H_{36}O_4N_4Br \cdot OCOCH_3$ : Gefunden:

Br = 11,58

11,80

Beim Erhitzen im Hochvakuum auf  $105^{\circ}$  wurden von dem aus Äther krystallisierten Präparat 11,5 und 10,4% des Gewichts verloren (ber. für  $1 CH_3CO_2H$ : 8,6%; vgl. das Verhalten des Monoacetylhämatoporphyrins). Der Bromgehalt stieg dabei auf 12,6% und 12,9%. Die Monobromverbindung krystallisiert prächtig aus ätherischer Lösung, wenn man das frisch dargestellte Präparat in absolutem Alkohol aufnimmt, in viel Äther einträgt und nach dem Wegwaschen des Alkohols einengt. Man erhält große, in der Durchsicht rubinrote Doppelpyramiden.

Bei langem Stehen in verdünnter Salzsäure wird die Substanz zu Hämatoporphyrin hydrolysiert.

#### Einwirkung von flüssigem Bromwasserstoff.

Durch Behandeln mit flüssigem Bromwasserstoff wird Hämin bei gewöhnlicher Temperatur glatt enteist: die entstehende Bromverbindung läßt sich (anders als es bei Anwendung von Chlorwasserstoff der Fall ist) vom abgespaltenen Eisensalz leicht trennen.

Wir füllen 5 g Häminkrystalle in ein Einschlußrohr und verdichten darin durch Kühlen mit flüssiger Luft 10—15 g Bromwasserstoffgas, das mit Calciumbromid getrocknet worden ist. Die Einleitungsröhre läßt man, damit sie durch den krystallisierenden Bromwasserstoff nicht verstopft wird, etwa 1 cm über dem Dewargefäß enden. Nach dem Zuschmelzen der Röhre und Erwärmen auf Zimmertemperatur geht das Hämin



Das Abstumpfen von Bromwasserstoff führt bei Gegenwart von Äther weiter zur Bildung einer ätherlöslichen Verbindung, die nur 2 Bromatome enthält. Wir nehmen 1 g eisenfreies Pentabromid mit 20 ccm Aceton auf und fällen es mit 100 ccm trockenem Äther in feiner Verteilung wieder aus. Beim Schütteln mit etwas wasserfreiem Natriumcarbonat entstand in einer Viertelstunde eine klare rotbraune Lösung, die wir filtrierten und für die Analyse sofort mit niedrig siedendem Petroläther gefällt haben (0,6 g). Die entstandene Verbindung ist sehr zersetzlich; beim Eindunsten der Aceton-Ätherlösung bei tiefer Temperatur unter Anwendung einer mit flüssiger Luft gekühlten Vorlage oder bei raschem Abdampfen auf dem Wasserbade nimmt die Flüssigkeit wieder grünliche Farbe an, was auf Abspaltung von an Kohlenstoff gebundenen Bromwasserstoff und Salzbildung hindeutet.

Einmal isoliert, ist das Dibromid nicht mehr leicht löslich in Äther, hingegen in Alkohol und Aceton. 2,5%ige Salzsäure löst es sehr gut mit violetter Farbe unter rascher Bildung von Hämatoporphyrin.

0,1990 g Substanz gaben 0,1007 g AgBr (nach Carius)

Berechnet für  $C_{33}H_{36}O_4N_4Br_2$ : Gefunden:

Br = 22,44 22,09

Umwandlung in Hämatoporphyrin. Das aus Aceton mit Äther umgefällte Pentabromid (5 g) lösten wir unter gelindem Erwärmen in 20%iger Salzsäure (1 l) und filtrierten von dunkeln Flocken ab. Die Hydrolyse war sogleich beendet: wir führten aus der Säure das Produkt, welches kein Brom mehr enthielt, unter fast vollständigem Neutralisieren mit Ammoniak in 15 l Äther über und dampften die Lösung bis auf einen Liter ein. Nun schied sich das Hämatoporphyrin als schönes Krystallmehl aus (1,2 g), worin man sehr oft eine typische Form beobachtet: an beiden Enden abgerundete, längliche Blättchen (Analyse III des Hämatoporphyrins).

Dimethyläther des Hämatoporphyrins. Von eisenfreiem Pentabromid lösten wir im Silbertiegel 1 g in 50 ccm konzentrierter methylalkoholischer Kalilauge unter gelindem Erwärmen und brachten aus der prächtig roten Flüssigkeit

durch Verdünnen und Ansäuern die Substanz in Äther. Nach dem Wegwaschen des Holzgeistes und Einengen krystallisierte die Dimethoxyverbindung (0,5 g) in einheitlichen geraden Prismen und Nadeln (siehe Analyse I des Dimethyläthers).

Dimethyläther-Dimethylester. Der Ester dieser Dimethoxyverbindung entstand durch Einwirkung von Methylalkohol bei Zimmertemperatur auf das Pentabromid. Wir ließen 2 g davon mit 100 ccm Methylalkohol 3 Tage lang stehen, bis die ganze Menge ihre sauren Eigenschaften verloren hatte. Dann führten wir den Ester in Äther über und engten nach dem Waschen mit verdünnter Lauge und mit viel Wasser bis auf wenige Kubikzentimeter ein. Die sehr leicht lösliche Tetramethylverbindung (1,1 g) krystallisierte in großen glänzenden Doppelpyramiden aus; im Schmelzpunkt  $163^{\circ}$ , der Salzsäurezahl 3 und in der Zusammensetzung stimmt sie mit einem aus Hämatoporphyrin gebildeten Präparat überein (Analyse I des Tetramethylderivates).

Bei der Einwirkung von flüssigem Chlorwasserstoff auf Hämin und darauf folgenden Behandlung mit Methylalkohol entstand eine andere Methylverbindung, die im folgenden beschrieben wird; zu demselben Dimethyläther-Dimethylester kommen wir indessen, wenn wir zuerst Bromwasserstoff, dann flüssigen Chlorwasserstoff einwirken lassen und die Halogenverbindung mit Methylalkohol umsetzen.

#### Einwirkung von flüssigem Chlorwasserstoff.

Flüssiger Chlorwasserstoff reagiert mit dem Hämin schon bei so tiefer Temperatur, daß man im offenen Gefäße damit arbeiten kann. Die Einwirkung liefert ungleich zusammengesetzte und verschieden reagierende Produkte, je nachdem sie im offenen Rohre beim Schmelzpunkt des Chlorwasserstoffs oder im geschlossenen Rohr bei Zimmertemperatur vorgenommen wird. Die entstandenen Chloride waren unter keinen Umständen durch gewöhnliche Lösungsmittel vom Eisenchlorid zu trennen, z. B. durch Fällen aus Aceton mit Äther, übrigens auch nicht durch erneute Behandlung mit einem Gemisch gleicher Volumina von Eisessig und flüssigem Chlorwasserstoff im Einschlußrohr.



ab: hingegen wirkt selbst wasserfreie Chlorwasserstoffsäure nicht auf die Carboxyle ein. Um über die Möglichkeit der Bildung von Säurechloriden Anhaltspunkte zu gewinnen, haben wir eine größere Zahl von Carbonsäuren, darunter auch Phylloporphyrin, mit flüssigem Chlorwasserstoff im geschlossenen Rohr behandelt, aber unverändert wiedergewonnen. Hämatoporphyrin reagiert nur mit seinen beiden alkoholischen Hydroxylen. Auch die Lactamgruppen von Glykokollanhydrid widerstehen dem Reagens.

Wir beschicken die Einschlußröhre mit je 5 g Häminkrystallen und kondensieren darin etwa die doppelte Menge Chlorwasserstoff unter Kühlung mit flüssiger Luft und Vermeiden des Luftzutritts. Während wässrige Salzsäure, auch bei tiefer Temperatur gesättigte, und Chlorwasserstoff-Eisessig bei gewöhnlicher Temperatur kein Lösungsmittel für Hämin ist, geht dieses in der wasserfreien Säure sofort mit prächtig blauroter Farbe in Lösung; sie zeigt nicht das grünliche Tingieren wie die Bromwasserstoffsäure. Die Röhren werden zugeschmolzen — man muß wegen der Explosionsgefahr vorsichtig mit ihnen umgehen — und nach etwa einem Tag wieder geöffnet, indem man sie entweder nur mit Kohlensäure-Äther oder zuerst damit und dann mit flüssiger Luft abkühlt.<sup>1)</sup> Der Chlorwasserstoff wird bei gewöhnlicher Temperatur verdunstet, am Ende unter vermindertem Druck; zu starkes Schäumen läßt sich vermeiden, indem man die Röhre in ein leeres Dewargefäß stellt.

Der Rückstand (7 g) ist eine hygroskopische, metallglänzende, blätterige Masse von violetter Farbe. Von verdünnter Säure wird die Substanz unter gleichzeitigem Verlust des Eisens hydrolytisch gespalten; beim Behandeln mit methylalkoholischer Kalilauge nimmt sie zwei Methoxyle auf und liefert den auch aus den Bromiden erhaltenen Dimethyläther des Hämatoporphyrins (siehe bei dieser Analyse V).

Wir versuchten vergebens, durch Umfällen z. B. aus Aceton mit Äther, das Präparat von Eisenchlorid zu befreien. Das

<sup>1)</sup> Die mit Chlorwasserstoff beschickten Röhren unmittelbar mit flüssiger Luft abzukühlen, ist gefährlich.



Es enthält nun Chlor und Brom und stimmt in seinen Reaktionen mit den oben beschriebenen Bromiden überein. Beim Auflösen in Methylalkohol und 4tägigem Stehen entstand dann die Tetramethylverbindung des Hämatoporphyrins (1,2 g aus 2 g eisenhaltigem Chlorid), die in schönen Pyramiden krystallisierte (Analyse III des Methylderivats).

Von den Umwandlungsprodukten des eisenhaltigen Chlorides soll hier nur vergleichsweise die Methylverbindung angeführt werden, die beim Auflösen des Rohproduktes (5 g) in Methylalkohol (100 ccm) entstand. In diesem Falle war schon in einem Tag die Esterbildung vollständig, eine Probe gegen verdünnte Natronlauge indifferent. Wir führten die Verbindung in Äther über und erhielten schon bei mäßigem Einengen eine Krystallisation langer, dünner, netzartig verfilzter Nadeln von brauner Farbe in der Durchsicht. Sie sind in Äther leicht löslich, aber erheblich schwerer wie die Pyramiden des schon beschriebenen Tetramethylderivates. In der Salzsäurezahl 3 stimmen sie mit letzteren überein, auch der Schmelzpunkt ist ganz ähnlich: 165°, nach längerem vorangehenden Sintern. Es liegt gleichfalls eine Tetramethylverbindung mit nur zwei verseifbaren Methylen vor, aber sie ist anders zusammengesetzt als die erste.

0,1775 g Substanz gaben	0,2347 AgJ (nach Zeisel)
0,2090 »	» » 0,5061 g CO <sub>2</sub> und 0,1263 g H <sub>2</sub> O
Berechnet für C <sub>37</sub> H <sub>5</sub> O <sub>8</sub> N <sub>4</sub> :	Gefunden:
C = 65,45	— 66,05
H = 7,43	— 6,76
OCH <sub>3</sub> = 18,29	17,46 —

### III. Die Porphyrine mit mehr als 4 Sauerstoffatomen. (Gruppe des Hämatoporphyrins.)

#### Gewinnung von Hämin aus zentrifugiertem Blut.<sup>1)</sup>

Wir zentrifugieren defibriniertes Blut unverdünnt, während es sonst üblich ist, es zuvor mit Kochsalzlösung stark zu verdünnen.

<sup>1)</sup> Nach Versuchen von R. Willstätter und A. Stoll.

Mit einer Laboratoriumszentrifuge von Gebrüder Heine in Viersen, deren Kranzdurchmesser 66 cm beträgt, die 3000 Touren in der Minute macht und in 6 Gläsern 1,9 l faßt, wird die Hälfte des Rinderblutes als Blutkörperchenbrei abgesetzt. Es ist aber schwierig, das Serum vollständig abzuheben, so daß aus 1900 ccm Blut doch praktisch 1100 ccm Blutkörperchen erhalten werden. Beim Vermischen mit 0,9%iger Kochsalzlösung und erneutem Zentrifugieren bleibt das Volumen des konzentrierten Blutes unverändert.

Viel günstiger wirkt eine Jouan-Zentrifuge mit hoher Tourenzahl von Leune in Paris (Modell C mit elektrischem Antrieb, 9000 Touren mit den Gläsern von 120 ccm Gesamtvolumen, äußerer Kranzdurchmesser 24 cm), und zwar besonders bei Anwendung ihres sogenannten Bol métallique (innerer Durchmesser 18 cm, Volumen 1½ l und 5000—5500 Touren), der das Füllen und Entleeren bei laufender Zentrifuge gestattet. Trotz des kleineren Weges pro Sekunde wird die Leistung der großen Zentrifuge übertroffen.

Von einem Liter Rinderblut werden nämlich nach zehn Minuten 635—640 ccm, bei einer anderen Probe 660 ccm klares Serum, d. i. annähernd die größte mögliche Menge, abgelassen. Stellt man dann die Zentrifuge ab, so enthält der Bol die Suspension der unveränderten Blutkörperchen (340—365 ccm). Entleert man aber bei laufender Zentrifuge durch die Messingröhre des Apparates, so werden die Blutkörperchen durch den Anprall an die Wand der Abflußröhre zerschlagen und es läuft aus dem Bol eine lackartige, prächtig tiefrote Oxyhämoglobinslösung ab; das ist das gesamte Oxyhämoglobin des Blutes, klar vermischt mit der kleinsten Wassermenge. Unter dem Mikroskop sind in der roten Lösung nur die Schatten der Blutkörperchen zu erkennen.

Beim Waschen des unversehrten Blutkörperchenbreis, wie er durch langsames Arretieren der Zentrifuge erhalten wird, mit Kochsalzlösung und Ausschleudern im Bol nimmt das Volumen nicht ab, auch nicht bei 9000 Touren in den Gläsern der Zentrifuge; das Waschen ist für die Hämingewinnung ohne Nutzen. Nach dem Zerschlagen kann man natür-

lich nicht mehr waschen, da die Oxyhämoglobinlösung mit der Kochsalzlösung mischbar ist.

Die Anwendung der Oxyhämoglobinlösung hat für die Häminbereitung gegenüber der Verarbeitung von Blutkörperchenbrei den Vorzug, daß die Entleerung des Apparates leichter erfolgt und daß man kontinuierlich größere Mengen nachfüllen und entleeren kann, ohne die Zentrifuge dabei abzustellen.

Das Zentrifugieren des Blutes und die Behandlung der gewonnenen Hämoglobinlösung mit Eisessig lassen sich bequem nebeneinander ausführen. Die Arbeitsweise ist nicht weniger einfach, das Hämin ebenso rein wie nach den älteren Verfahren. Anstatt des Vierfachen oder des Dreifachen vom Blute an Eisessig genügt es, gleichviel Eisessig wie Blut anzuwenden.

Ausführung des Verfahrens. Man läßt frisches, defibriniertes Rinderblut<sup>1)</sup> in Portionen von 1 l in den mit 3000 Touren in der Minute rotierenden Bol durch ein 2 mm weites Röhrchen einlaufen, steigert alsdann die Tourenzahl innerhalb einer Minute auf etwa 5500 und läßt die Zentrifuge 10 Minuten mit dieser Geschwindigkeit gehen. Nun wird das nahezu farblose Serum durch langsames Senken des Entleerungsröhrchens abgehoben, bis die Flüssigkeit plötzlich tiefrot abfließt, und dann in ein anderes Gefäß die lackfarbene Oxyhämoglobinlösung, bis ein leises Zischen in der Zentrifuge die Berührung des Röhrchens mit der Bolwand verrät. Der Bol ist dann bis auf einige Kubikzentimeter entleert und das Abflußröhrchen wird zurückgeschraubt. Wir schalten nun vor den Elektromotor wieder so viel Widerstand ein, daß der Bol nur mit 3000 Touren pro Minute rotiert, und beschicken ihn von neuem.

In Fünfliterrundkolben mit weitem Hals erwärmen wir je 2 l Eisessig, denen wir 10 g Kochsalz zufügen, auf Gaskochern zum Sieden und lassen die Oxyhämoglobinlösung aus 2 l Blut (0,7 l) während einer halben Stunde in die durch einen Rührer lebhaft bewegte, schwach siedende Flüssigkeit

<sup>1)</sup> Daß Pferdeblut, wie Küster und Deihle (diese Zeitschr., Bd. 86, S. 59) finden, sich zur Hämindarstellung weniger eignet als Rinderblut, rührt wohl davon her, daß es nicht immer die besten Gäule sind, die ins Schlachthaus kommen.

eintropfen, wobei die Berührung der Oxyhämoglobinlösung mit der Kolbenwand und mit dem Rührer vermieden werden muß. Dann halten wir die tiefbraune Flüssigkeit noch 10 Minuten in schwachem Sieden und lassen hierauf während einer Viertelstunde 1 l destilliertes Wasser zufließen. Das Hämin scheidet sich dabei in glänzenden groben Krystallen größtenteils aus; bei zu raschem Arbeiten krystallisierte es so fein, daß die zur Isolierung erforderliche Filtration sehr erschwert wurde.

Bei eintägigem Stehen wird die Krystallisation vollständig. Wir filtrieren dann durch doppeltes Koliertuch die Krystalle von der nur noch wenig gefärbten Mutterlauge ab und waschen mit Essigsäure, Wasser, Alkohol und Äther etwas nach. Das Präparat ist so rein, daß es keine Umkrystallisation erfordert.

Die Ausbeute betrug 4,6—5,2 g aus dem Liter eines Rinderblutes, welches bei Verarbeitung nach unserer Ausführungsweise<sup>1)</sup> des Verfahrens von Schalfenjeff 4,2 g Hämin ergab.

### Hämatoporphyrin.

#### Darstellung in amorphem Zustand.

M. Nencki und N. Sieber<sup>2)</sup> haben die Bildung des Hämatoporphyrins durch Einwirkung von Bromwasserstoff-Eisessig auf Hämin bei Wasserbadtemperatur beschrieben; M. Nencki und J. Zaleski<sup>3)</sup> haben die Darstellung verbessert, ihre Angaben sind bis heute nur in geringen Einzelheiten abgeändert worden. Nach ihrer Vorschrift arbeitet man bei gewöhnlicher Temperatur mit Bromwasserstoff-Eisessig (bei 10<sup>0</sup> gesättigt von Kahlbaum käuflich) zweckmäßig in kleinen Portionen von Hämin; die Einwirkung dauert 3—4 Tage, beim Verdünnen mit Wasser und mehrstündigem Stehen soll nur ein kleiner Bodensatz ausfallen, von dem man abfiltriert.

<sup>1)</sup> R. Willstätter und Y. Asahina, IX. und XVIII. Untersuchung über Chlorophyll, Ann. d. Chem., Bd. 373, S. 232 (1910) und Bd. 385, S. 197 (1911).

<sup>2)</sup> Monatsh. f. Chem., Bd. 9, S. 115 (1888), Nenckis gesammelte Werke, Bd. 2, S. 74.

<sup>3)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 30, S. 384, 423 (1900); Nenckis Werke, Bd. II, S. 753.

O. Piloty<sup>1)</sup> hat den Verlauf der Hämatoporphyrinbildung untersucht und Angaben über die Methode veröffentlicht; er arbeitet mit bei 0° gesättigtem Bromwasserstoff-Eisessig, nach etwa sechstägiger Behandlung wird die Flüssigkeit mit Wasser verdünnt und ohne weiteres Stehenlassen Hämatoporphyrin ausgefällt und zwar durch Zusatz von Natriumacetat in der Form eines Ferrisalzes. Piloty bemerkt dazu:

«Es ist uns auf keine Weise gelungen, ein bromhaltiges Zwischenprodukt bei der Hämatoporphyrinbildung zu isolieren. Und es ist äußerst unwahrscheinlich, daß unter den gelinden Bedingungen, wie wir sie eben geschildert haben, an Kohlenstoff gebundenes Brom quantitativ durch Hydroxyl ersetzt werde.»

Nach den letzten Angaben von W. Küster und P. Deihle<sup>2)</sup> soll umkrystallisiertes Hämin in 10 Portionen von 0,5 g in 100 g Bromwasserstoff-Eisessig im Laufe von 5 Tagen unter möglichstem Ausschluß von Luftfeuchtigkeit eingetragen werden. Nach dem Verdünnen mit Wasser lassen diese Autoren 5 Stunden lang stehen, versetzen mit Natronlauge bis zur schwach sauren Reaktion und fällen mit Natriumacetat das Hämatoporphyrin vollständig aus.

Für den wichtigsten Umstand bei der Gewinnung des Hämatoporphyrins halten wir die geeignete Konzentration des Eisessig-Bromwasserstoffs. Die von Kahlbaum käufliche Säure schwankt in ihrem Bromwasserstoffgehalt erheblich, manchmal eignet sie sich zum Lösen des Hämins, manchmal nicht. Zumeist fanden wir im Handel die Säure vom spezifischen Gewicht 1,40 (bei 0° bestimmt); sie löst Hämin sehr schlecht, sie verwandelt es hauptsächlich in die beschriebene Verbindung  $C_{33}H_{35}O_4N_4FeBr_4$ . Sättigt man den Eisessig-Bromwasserstoff bei 0°, so löst das Reagens wieder auffallend schlecht, auch hier entsteht Additionsprodukt. Die geeignete Konzentration ist 1,41 (bei 0° bestimmt), man braucht Hämin nicht zu pulvern, nicht mit kleinen Portionen zu arbeiten, nicht langsam einzutragen und nicht tagelang damit stehen zu lassen.

<sup>1)</sup> Ann. d. Chemie, Bd. 377, S. 314, 351 (1910).

<sup>2)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 86, S. 51, 60 (1913); Chem. Ber., Bd. 45, S. 1941 (1912).

Eine wichtige, noch zu wenig hervorgehobene Phase in der Umwandlung von Hämin in Hämatoporphyrin ist das Stehenlassen der mit Wasser verdünnten Eisessig-Bromwasserstofflösung. Dabei erfolgt nämlich die Einführung der Hydroxyle an Stelle der Bromatome des addierten Halogenwasserstoffs. Man kann zwar diese Hydrolyse überspringen und sie durch längeres Waschen des Niederschlages auf dem Filter oder durch Behandeln mit verdünnter Natronlauge nachholen, das ist aber für die Darstellung eines reinen Präparates nicht zu empfehlen.

Ein gutes Mittel, die Präparate von Hämatoporphyrin auf ihre Einheitlichkeit zu untersuchen, bietet die Prüfung der Salzsäurezahl nach den Angaben von Willstätter und Mieg<sup>1)</sup> für die Bestimmung und Trennung von Chlorophyllderivaten. Diese Methode hat für die Derivate des Blutfarbstoffes bisher keine Anwendung gefunden, wir finden sie aber auch hier sehr nützlich. Die ätherische Lösung von Hämatoporphyrin gibt an 0,03%ige Salzsäure Spuren, an Säure von 0,1—0,15%ige etwa  $\frac{2}{3}$ , an 0,4%ige bei einmaligem Durchschütteln fast die ganze Menge ab. Wenn wir die nach unserem Verfahren erhaltenen Rohprodukte in Fraktionen zerlegen, so stimmen diese in der Verteilung zwischen Salzsäure und Äther überein. Halogenhaltige und andere unreine Präparate enthalten schwächer basische Anteile und lassen sich durch die Fraktionierung mit Salzsäure reinigen.

Wir tragen z. B. 36 g Häminkrystalle auf einmal in eine Stöpselflasche mit 900 g Eisessig-Bromwasserstoff (1,41) ein und schütteln  $\frac{1}{4}$  Stunde lang. Dann ging beim Stehen in 7 Stunden der Farbstoff klar in Lösung. Die Menge des Eisessig-Bromwasserstoffs läßt sich etwas vermindern; 4 g wurden schon in 75 g Eisessig-Bromwasserstoff (an einem Sommertag) vollständig gelöst. (Nach Küster werden 20, nach Piloty etwa 32 Gewichtsteile vom Reagens verwendet).

Die Auflösung aus 36 g wurde in 5 l Wasser eingetragen und durch eine dünne Talksicht von wenig körnigen Partikeln abfiltriert. Die Flüssigkeit blieb 3 Stunden stehen, ehe

<sup>1)</sup> Untersuchungen über Chlorophyll I, Ann. d. Chemie, Bd. 350, S. 1 (1906).

wir sie mit konzentrierter Natriumacetatlösung fällten. Das Porphyrin schied sich in braunvioletten Flocken aus, die bei gewöhnlicher Temperatur getrocknet wurden. Die Ausbeute an diesem (eisenhaltigen) Produkt betrug 34 g. Durch Auflösen in Natronlauge, Filtrieren vom Eisenhydroxyd und Ansäuern mit Essigsäure wurde es aschefrei.

#### Darstellung von krystallisiertem Hämatoporphyrin.

Nach dem Umfällen des Hämatoporphyrins aus verdünnter Natronlauge mit Essigsäure saugten wir die flockige Fällung auf Koliertuch ab und verdrängten die Mutterlauge mit Wasser. Dann lösten wir das noch feuchte Präparat aus 10 g Hämin in 1 l Alkohol und trugen die Lösung in 25 l Äther ein, die auf fünf 7 l-Scheidetrichter verteilt waren. Der Alkohol wurde gewaschen, indem wir durch jeden Scheidetrichter etwa 20 Minuten lang am Brunnen Wasser durchfließen ließen. Dabei fiel allerdings etwas flockiges Calciumsalz aus, das wir sammelten, um es mit Säure zu zersetzen und das entbundene Porphyrin zur Hauptmenge zurückzubringen. Die ätherische Lösung haben wir mit Natriumsulfat getrocknet und auf 1 l eingeeengt. Bei diesem Volumen beginnt schon in der Wärme Hämatoporphyrin auszufallen. Wir lassen nun die Ätherlösung bei gewöhnlicher Temperatur stehen und erhalten das Porphyrin als glänzende violette Krystallisation, die aus schön gerundeten, in der Durchsicht rotbraunen Blättchen besteht. Der Betrag des auskrystallisierten Anteils war 4,5 g, diese Ausbeute wird sich leicht noch erhöhen lassen.

In krystallisiertem Zustand haben wir Hämatoporphyrin auch aus den verschiedenen Zwischenprodukten der Enteisung mit Bromwasserstoff sowie bei der Hydrolyse seines Esters erhalten.

#### Analyse.

Für die Analyse sind die krystallisierten Präparate im Vakuumexsikkator getrocknet worden. Die Werte weisen beträchtliche Schwankungen auf, vielleicht infolge eines kleinen Wassergehaltes, den man leider nicht ohne Erhitzen entfernen

kann. Sie stimmen aber durchweg besser für die Formel mit  $C_{33}$  als für  $C_{34}$ . Dasselbe gilt von den Analysen des freien Hämatoporphyrins in amorphem Zustand und des krystallisierten Chlorhydrates, die Nencki und Sieber<sup>1)</sup> veröffentlicht haben.

Chlorhydrat.	Nach Nencki u. Sieber			H. Fischer <sup>2)</sup>			
	C =	59,80	59,79	59,57	59,50	60,64	
H =	6,16	5,89	6,29	6,08	6,48		
Berechnet für $C_{34}H_{40}O_4N_4Cl_2$ :			Berechnet für $C_{33}H_{40}O_4N_4Cl_2$ :				
C =	60,81			60,07			
H =	5,96			6,12			
Freies Porphyrin.	Nach Nencki u. Sieber				H. Fischer	W. Küster <sup>3)</sup>	
	C =	66,84	67,16	66,98	66,85	67,20	68,63
H =	6,32	6,26	6,21	6,53	6,33	6,15	
Berechnet für $C_{34}H_{38}O_6N_4$ :				Berechnet für $C_{33}H_{38}O_6N_4$ :			
C =	68,19				67,54		
H =	6,40				6,53		

I. Krystallisiertes Präparat aus  $C_{33}H_{34}O_4N_4FeBr_3$ :

0,2142 g Substanz gaben 0,5241 g  $CO_2$  und 0,1260 g  $H_2O$ .

II. Krystallisiertes Präparat aus  $C_{33}H_{35}O_4N_4FeBr_3$ :

0,1936 g Substanz gaben 0,4732 g  $CO_2$  und 0,1134 g  $H_2O$ .

III. Krystallisiertes Präparat aus  $C_{33}H_{37}O_4N_4Br_5$ :

0,2178 g Substanz gaben 0,5359 g  $CO_2$  und 0,1288 g  $H_2O$ .

IV. Krystallisiertes Präparat aus Aceton umgefällt:

0,2462 g Substanz gaben 0,6030 g  $CO_2$  und 0,1448 g  $H_2O$ .

V. Amorphes Präparat aus Dimethylester mit Alkali:

0,2149 g Substanz gaben 0,5297 g  $CO_2$  und 0,1298 g  $H_2O$ .

VI. Krystallisiertes Präparat aus Dimethylester mit Säure:

0,2532 g Substanz gaben 0,6226 g  $CO_2$  und 0,1475 g  $H_2O$ .

VII. Krystallisiertes Präparat aus Häminoporphyrin mit wässriger  $HBr$ :

0,1996 g Substanz gaben 0,4914 g  $CO_2$  und 0,1184 g  $H_2O$ .

VIII. Krystall. Präparat von der Verseifung des Esters aus Häminoporph.

0,2215 g Substanz gaben 0,5459 g  $CO_2$  und 0,1322 g  $H_2O$ .

Gefunden: I. II. III. IV. V. VI. VII. VIII.

C = 66,73 66,60 67,09 66,80 67,47 67,04 67,14 67,22

H = 6,58 6,55 6,62 6,58 6,78 6,52 6,64 6,68

Im Hochvakuum bei  $105^{\circ}$  verliert Hämatoporphyrin Wasser, wir fanden bei verschiedenen Darstellungen Gewichts-

<sup>1)</sup> Nenckis gesammelte Werke, Bd. 2, S. 78.

<sup>2)</sup> H. Fischer, E. Bartholomäus und H. Röse. Diese Zeitschrift, Bd. 84, S. 281 (1913).

<sup>3)</sup> Chem. Ber., Bd. 45, S. 1941 (1912).

verluste von 5,6 und 5,07% (ber. für 1 Mol.  $\text{H}_2\text{O}$  3,0%). Die Analyse stimmt dann für eine Verbindung mit fünf Sauerstoffatomen.

IX. Krystallisiertes Präparat aus Hämin mit wässriger  $\text{HBr}$ :

0,1962 g Substanz gaben 0,5021 g  $\text{CO}_2$  und 0,1131 g  $\text{H}_2\text{O}$ .

X. Krystallisiertes Präparat aus  $\text{C}_{33}\text{H}_{35}\text{O}_4\text{N}_4\text{FeBr}_4$ :

0,2180 g Substanz gaben 0,5562 g  $\text{CO}_2$  und 0,1209 g  $\text{H}_2\text{O}$ .

Berechnet für ( $\text{C}_{34}\text{H}_{36}\text{O}_5\text{N}_4$ ):	$\text{C}_{33}\text{H}_{35}\text{O}_5\text{N}_4$ :	Gefunden:	IX.	X.
C = 70,31	69,68		69,79	69,58
H = 6,25	6,39		6,45	6,21

Als wir bei  $105^\circ$  an der Quecksilberpumpe das Trocknungskölbchen (unter Zwischenschaltung einer mit Blattgold gefüllten Röhre) mit einer durch flüssige Luft gekühlten Vorlage verbanden, gab das Hämatoporphyrin noch ein weiteres Molekül Wasser ab (Gewichtsverlust 7,54 und 5,93%); seine Zusammensetzung entsprach dann einer Formel mit vier Sauerstoffatomen. Die in der Vorlage kondensierte Flüssigkeit haben wir mittels der Elementaranalyse untersucht; sie war fast reines Wasser und enthielt nur eine Spur organischer Substanz.

Alle erhitzten Präparate von Hämatoporphyrin waren gänzlich verdorben, schwachbasisch, unlöslich, unkrystallisierbar. Bei dem Versuche, sie wieder in Äther überzuführen, war die Hauptmenge unlöslich, ein kleiner Anteil, der in Äther gebracht werden konnte, ließ sich erst mit 2—3%iger Salzsäure ausschütteln und ging in diese mit grünstichig roter anstatt violettroter Farbe. Die Carboxyle sind an dieser Veränderung unbeteiligt, das Verhalten gegen Ammoniak ist nach der Trocknung dasselbe wie zuvor.

In trockenem Ammoniakgas nimmt merkwürdigerweise Hämatoporphyrin (ebenso wie in wässrigem Ammoniak nach der Beobachtung von W. Küster<sup>1)</sup>) 3 Moleküle Ammoniak auf, die schon im nichtevakuierten Exsikkator langsam, aber vollständig wieder abgegeben werden. Gefunden mit exsikkator-trockenem Porphyrin 7,1 und 7,5%, mit dem bei  $105^\circ$  getrockneten 7,2 und 7,1%, berechnet für 3  $\text{NH}_3$ : 8,7%.

Da also weder Anhydrid- noch Lactonbildung stattgefunden hat, so ist allein von den alkoholischen Hydroxylen des

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 86, S. 63 (1913).

Hämatoporphyrins Wasser abgespalten worden und das gebildete Produkt hat sich polymerisiert.

W. Küster<sup>1)</sup> hat in seinen letzten Untersuchungen mitgeteilt, daß Hämatoporphyrin durch verdünnte Schwefelsäure in einen sowohl in Säure wie in Alkali unlöslichen, sehr resistenten Körper übergeführt und daß es schon durch Aceton bei gewöhnlicher Temperatur verändert werde, nämlich durch intramolekulare Ätherbildung Wasser verliere. Bei diesen Angaben ist leider das Verhalten des Hämatoporphyrins in der Hitze nicht berücksichtigt worden. Die von Aceton scheinbar veränderten Präparate wurden für die Analyse bei 120° getrocknet und stimmten danach für eine Formel mit fünf Sauerstoffatomen. Wir haben die Einwirkung von Aceton nach den Angaben von Küster wiederholt. Das aus Acetonlösung zurückgewonnene und im Exsikkator getrocknete Präparat war nach allen Eigenschaften und nach der oben angeführten Analyse IV unverändert.

Das Chlorhydrat stellen wir durch Auflösen des Hämatoporphyrins in mäßig warmer 3%iger Salzsäure dar; man hat eben Zeit, die Lösung zu filtrieren, dann scheidet sich rasch die ganze Menge des Salzes in Nadeln aus, die in der Durchsicht unter dem Mikroskop olivgrün erscheinen, aber ein schön rotes Pulver geben. Für die Analyse diente das Salz exsikkatortrocken, im Vakuum und in der Wärme ließ es sich nicht trocknen, da es Chlorwasserstoff verliert.

Chlorhydrat aus krystallisiertem Präparat der beschriebenen Darstellung:

0,1826 g Substanz gaben 0,4060 g CO<sub>2</sub> und 0,1002 g H<sub>2</sub>O.

Gefunden: C = 60,64

H = 6,14

### Beschreibung.

In krystallisiertem Zustand ist Hämatoporphyrin haltbar; ein aufbewahrtes Präparat war nach einem  $\frac{3}{4}$  Jahr unversehrt, was am besten mit der Salzsäurezahl beobachtet wird.

Das krystallisierte Hämatoporphyrin ist in Äther schwer löslich, ebenso in Methyl- und 96%igem Äthylalkohol, etwas

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 86, S. 60 und Chem. Ber., Bd. 45, S. 1942.

mehr in absolutem Alkohol; Chloroform färbt es gar nicht an. In der Wärme löst es sich in Alkohol auch nur träge, während das amorphe Präparat in absolutem Alkohol leicht löslich ist. Aceton löst beträchtlich, Eisessig leicht mit prächtig violetter Farbe; bei kurzem Kochen oder Erwärmen erfolgt Acetylierung, dabei wird der blaue Ton der Flüssigkeit abgeschwächt, zugleich ändert sich die Salzsäurezahl des Porphyrins von 0,1 in 1. In verdünnter Schwefelsäure löst sich die Substanz rasch mit violetter Farbe, hingegen in konzentrierter stark grünstichig rot. Beim Verdünnen fällt das Porphyrin verdorben in ätherunlöslichen Flocken aus. In konzentrierter Salzsäure tritt eine solche Änderung nicht ein; schon in 3%iger löst sich Hämatoporphyrin leicht, in 0,5%iger langsam.

Flüssiger Chlorwasserstoff wirkt bei gewöhnlicher Temperatur auf die alkoholischen Hydroxyle des Hämatoporphyrins ein, während im offenen Rohr, also bei sehr tiefer Temperatur, nur das Chlorhydrat entsteht. Wir ließen das Porphyrin mit wasserfreier Salzsäure im Einschlußrohr zwei Tage stehen. Nach dem Verjagen des Chlorwasserstoffs war der metallisch glänzende, violette Rückstand in Aceton leicht löslich, während das Chlorhydrat des Hämatoporphyrins schwer löslich ist. Wir nahmen das Reaktionsprodukt mit Aceton auf, fällten es fein verteilt mit Äther und schüttelten die ätherische Suspension mit viel wasserfreiem Natriumcarbonat unter Zusatz eines Tropfens Wasser kräftig durch. Die aus ihrem Salz entbundene chlorierte Säure löste sich mit brauner Farbe in Äther und wurde von Petroläther in dunkelbraunen Flocken gefällt. Salzsäurezahl ungefähr 3.

I. Präparat aus Hämatoporphyrin:

0,1282 g Substanz gaben 0,0591 g AgCl (nach Carius).

II. Präparat aus Monoacetylverbindung:

0,1132 g Substanz gaben 0,0518 g AgCl (nach Carius).

Berechnet für

$C_{33}H_{36}O_4N_4Cl_2$ :

Cl = 11,38

Gefunden:

I.

II.

11,40

11,32

Bei einem folgenden Versuche ließen wir auf das Chlorhydrat des chlorierten Porphyrins Methylalkohol einwirken.

Nach eintägigem Stehen bei gewöhnlicher Temperatur war die Esterifizierung vollständig. Der Äthersäureester wurde aus ätherischer Lösung in prachtvollen Krystallen erhalten, die nach der Analyse und der Salzsäurezahl 3 mit der Tetramethylverbindung des Hämatoporphyrins identisch waren. (siehe Analyse VI dieser Verbindung).

**Absorptionsspektrum.** Mit Präparaten von zweifelhafter Reinheit ist das Spektrum des Hämatoporphyrins häufig untersucht worden,<sup>1)</sup> zumeist in saurer oder in alkalischer Lösung. Unter solchen Bedingungen ist aber das Spektrum wesentlich abhängig von den Erscheinungen der Dissoziation in den Salzlösungen. In den Untersuchungen von Willstätter und Pfannenstiel<sup>2)</sup> und Fritzsche<sup>3)</sup> ist dies durch den Vergleich der Chlorhydrate von Hämatoporphyrin und anderen Porphyrinen in Alkohol mit und ohne Überschuß von Chlorwasserstoff gezeigt worden.

Das Spektrum des freien Hämatoporphyrins in Äther haben E. Schunck und L. Marchlewski,<sup>4)</sup> ohne übrigens Messungen mitzuteilen, mit dem von Phylloporphyrin verglichen.

Das krystallisiert erhaltene freie Hämatoporphyrin hat uns in ätherischer Lösung für die folgende Messung des Absorptionsspektrums gedient, die wir mit dem Löweschens Gitterspektroskop mit Wellenlängeschraube (der Firma Zeiß) ausgeführt haben (siehe Figur I).

Wenn man von einem schwachen dünnen Streifen (II) im Orange absieht, besteht das Spektrum einer mittleren Schicht in der sichtbaren Region aus vier Absorptionsbändern, einem sehr schmalen scharfen und dunkeln (I) im Orange gegen Rot

<sup>1)</sup> Die Angaben der Literatur sind sorgfältig in H. Kayzers Handbuch der Spektroskopie, Bd. 4, S. 129 (1908) und ferner in den „Beiträgen zur Photographie der Blutspektra“ von E. Rost, F. Franz und R. Heise (Arbeiten aus dem kaiserlichen Gesundheitsamt, Bd. 32, S. 223, 290 [1909]) zusammengestellt worden; zur Ergänzung ist auf die Messung von Willstätter und Pfannenstiel hinzuweisen.

<sup>2)</sup> Ann. d. Chem., Bd. 358, S. 262 (1907).

<sup>3)</sup> Ann. d. Chem., Bd. 371, S. 116 (1909).

<sup>4)</sup> Proc. Roy. Soc., Bd. 59, S. 233 (1896) und Ann. d. Chem., Bd. 290, S. 306 (1896).

hin, einem schmalen, etwas weniger dunkeln Streifen (III) beim Beginn von Grün, dem ein sehr breiter, die gelbe Region ausfüllender Schatten vorgelagert ist, und zwei starken Bändern im Grün und beim Übergang von Grün in Blau. Das letztere (V) ist das dunkelste und weitaus breiteste.

0.0586 g Substanz in 1 l Äther ( $\frac{1}{1000}$ -Mol. in 10 Liter).

Schicht	10 mm	20 mm	40 mm	60 mm
Band I.	626—622	626—622	632/628—622/615	633 . . 630—620 . . 611
II.	599 595	599 . 595	599 . . 595	600 . . . 595
III.	584 . 572 570 . . 567 584 . . 573 570 — — 567 589 . 585 — — 575 . . 571—567	584 . . 573 570 — — 567 589 . 585 — — 575 . . 571—567	584 . . 573 570 — — 567 589 . 585 — — 575 . . 571—567	591 . 586 — 565 . 559
IV.	533 — — 525	537 — 524	539 — 521	544 — 520
V.	509 — 484	512 — 482	516 — 481	516 — 479
VI.	—	—	472/469	472/468
Endabs.	434 —	438 —	443 —	446 —

Intensitätsfolge der Bänder vor der Linie G: V, IV, III, I, II.

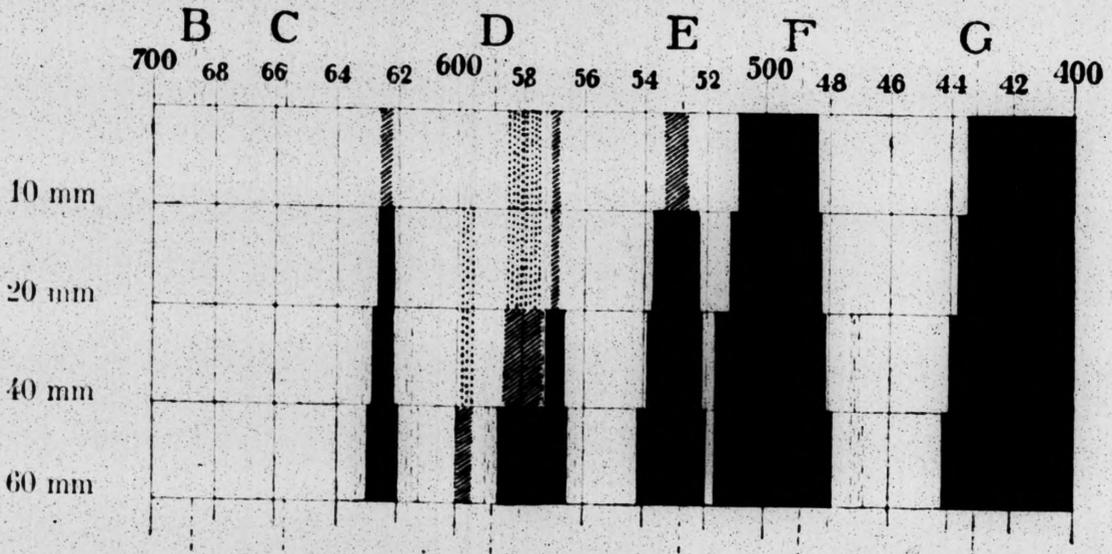


Fig. 1.

### Esterifizierung des Hämatoporphyrins.

Die Esterbildung des Hämatoporphyrins haben Nencki und Zaleski<sup>1)</sup> und vor einigen Wochen W. Küster und P. Deihle<sup>2)</sup> beschrieben. Längeres Kochen mit chlorwasser-

<sup>1)</sup> Nenckis Werke, Bd. 2, S. 756.

<sup>2)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 86, S. 51 (1913).

stoffhaltigem Methylalkohol führte zur Tetramethylverbindung, die aber auf diesem Wege nicht rein zu erhalten war. Bei kurzem Kochen entsteht nach Küster der Dimethylester des Hämatoporphyrins, ein amorphes Pulver vom Schmelzpunkt  $140-142^{\circ}$ .

Wir haben beobachtet, daß Hämatoporphyrin je nach den Bedingungen der Esterifizierung zwei verschiedene Dimethylester liefert. Die Methylene sind nur in die Carboxyle eingetreten, die Reaktion beschränkt sich aber nicht auf diese Gruppen.

Durch dreitägiges Stehen bei gewöhnlicher Temperatur mit 8%iger methylalkoholischer Chlorwasserstoffsäure wurde Hämatoporphyrin vollständig esterifiziert. Das Produkt war leicht löslich in Äther und krystallisierte daraus nicht. Beim Abdampfen hinterblieb es in Form einer spröden glänzenden, dunkelroten Kruste vom Schmelzpunkt  $149^{\circ}$ . Es ist dieselbe Verbindung, die Küster durch kurzes Erwärmen mit 1%iger methylalkoholischer Salzsäure dargestellt hat.

0,2134 g Substanz gaben 0,1664 g AgJ (nach Zeisel).

Berechnet für  $C_{32}H_{42}O_6N_4$ :

$OCH_3 = 10,10$

Gefunden:

10,53

Dieser Ester ist durch die Salzsäurezahl  $\frac{1}{2}$  gekennzeichnet. Bei kurzem Kochen mit normaler Schwefelsäure oder durch Auflösen in methylalkoholische Kalilauge wird er verseift und bildet Hämatoporphyrin zurück (Analyse V und VI desselben). Da wir den nämlichen Ester aus Häminoporphyrin erhalten haben, so ließ sich auf diesem Wege Häminoporphyrin in Hämatoporphyrin überführen (siehe Analyse VIII des letzteren).

Beim Erhitzen des Hämatoporphyrins mit 6%iger methylalkoholischer Chlorwasserstoffsäure während einer Stunde entstand noch keine Tetramethylverbindung. Der so gebildete Ester, durch Abdampfen der ätherischen Lösung als ziegelrotes Pulver vom Schmelzpunkt  $121^{\circ}$  erhalten, ging aus Äther erst in 1%ige Salzsäure reichlich (zu  $\frac{2}{3}$ ) über. Nach seiner Zusammensetzung scheint die Dimethylverbindung ähnlich wie Häminoporphyrin durch Austritt von einem Mol. Wasser aus zwei Molekülen Hämatoporphyrin und zwar aus ihren alkoholischen Hydroxylen entstanden zu sein.

0,0845 g Substanz gaben 0,2158 g CO<sub>2</sub> und 0,0555 g H<sub>2</sub>O  
 0,1714 „ „ „ 0,1267 „ AgJ (nach Zeisel).

Berechnet für C <sub>35</sub> H <sub>41</sub> O <sub>5</sub> <sup>1/2</sup> N <sub>4</sub> :		Gefunden:
C	= 69,42	69,65
H	= 6,83	7,35
OCH <sub>3</sub>	= 10,25	9,76

### Tetramethylverbindung des Hämatoporphyrins.

(Ätherester, C<sub>34</sub>H<sub>34</sub>N<sub>4</sub>(OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(COOCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

Den Eintritt von 4 Methylen in Hämatoporphyrin beim Erhitzen mit Methylalkohol und Chlorwasserstoff haben schon Nencki und Zaleski beobachtet. Die Bildung dieser Tetramethylverbindung hat sodann in den Arbeiten von W. Küster zum Beweise der Addition von Bromwasserstoff bei der Eliminierung des Eisens aus dem Hämin gedient. Die Bromwasserstoff-Eisessiglösung ist abgedampft und der Rückstand bei 50° mit Methylalkohol behandelt worden. So erhielt Küster<sup>1)</sup> das Tetramethylderivat zunächst unrein und amorph, vor kurzem<sup>2)</sup> auch rein in schön krystallisiertem Zustand. Dadurch ist die Veröffentlichung dieses Teils unserer Versuche überholt worden.

Als wir die bisher fehlenden halogenhaltigen Zwischenprodukte der Porphyrinbildung isolierten, haben wir aus ihnen durch Stehenlassen mit Methylalkohol den Ester der Äthersäure dargestellt. Die Konstitution der Tetramethylverbindung ergibt sich daraus, daß wir diese Verbindung in glatter Weise aus dem Hämatoporphyrin durch Einwirkung von wasserfreier Salzsäure und darauffolgende Methanolyse erhalten haben. Auch gelingt es, auf folgende Weise vom Methylester wieder zu Hämatoporphyrin zu gelangen. Wir lösen das Methylderivat in Bromwasserstoff-Eisessig (1,41) und verdünnen nach einer Stunde mit Wasser; nach abermaligem Stehenlassen führen wir die hydrolysierte Substanz in viel Äther über und identifizieren sie durch ihre Salzsäurezahl als Hämatoporphyrin.

Der Ätherester ist in den üblichen Solventien, namentlich in den Alkoholen, Äther, Chloroform, Benzol sehr leicht löslich mit braunroter Farbe und krystallisiert erst bei großer Kon-

<sup>1)</sup> Chem. Ber., Bd. 45, S. 1935 (1912).

<sup>2)</sup> W. Küster u. P. Deihle, Diese Zeitschrift, Bd. 86, S. 51 (1913).

zentration, dann aber bis zum letzten Tropfen der Lösung, in charakteristischen großen Pyramiden, deren Pulver leuchtend rot ist. Die Salzsäurezahl der Verbindung ist 3, ihre saure Lösung prächtig violettrot.

Bei ziemlich raschem Erhitzen im Schmelzpunktrohr beobachteten wir das Entweichen von Methylalkohol, dann nach einigem Sintern bei 163° Schmelzen unter starkem Aufschäumen; das ist indessen der Schmelzpunkt der Substanz nach vorangegangener Zersetzung. W. Küster gibt den Schmelzpunkt 128° an.

I. Darstellung aus dem Bromid  $C_{33}H_{39}O_4N_4Br_5$ .

0,1882 g Substanz gaben 0,4778 g  $CO_2$  und 0,1226 g  $H_2O$

0,2450 „ „ „ 0,6226 „ „ „ 0,1585 „ „

0,1931 „ „ „ 0,2548 „ AgJ (nach Zeisel).

II. Aus demselben nach Einwirkung von flüssigem Chlorwasserstoff.

0,2193 g Substanz gaben 0,5513 g  $CO_2$  und 0,1369 g  $H_2O$

0,2543 „ „ „ 0,3475 „ AgJ (nach Zeisel).

III. Darstellung aus  $C_{33}H_{37}O_4N_4FeCl_6$  nach Einwirkung von flüssigem Bromwasserstoff.

0,2879 g Substanz gaben 0,7340 g  $CO_2$  und 0,1863 g  $H_2O$ .

IV. Darstellung aus der Bromwasserstoff-Eisessiglösung des Hämins nach Erhitzen auf 100°, Fälln mit Äther und Methanolyse.

0,1968 g Substanz gaben 0,4984 g  $CO_2$  und 0,1247 g  $H_2O$

0,1379 „ „ „ 0,1909 „ AgJ (nach Zeisel).

V. Ebenso aus Chlorwasserstoff-Eisessiglösung.

0,2723 g Substanz gaben 0,3564 g AgJ (nach Zeisel).

VI. Darstellung aus Hämatoporphyrin durch Einwirkung von flüssigem Chlorwasserstoff und Methanolyse.

0,1378 g Substanz gaben 0,3525 g  $CO_2$  und 0,0892 g  $H_2O$

0,1640 „ „ „ 0,2238 „ AgJ (nach Zeisel).

VII. Ebenso aus Monoacetylhämatoporphyrin.

0,2790 g Substanz gaben 0,7018 g  $CO_2$  und 0,1751 g  $H_2O$

0,2272 „ „ „ 0,3047 „ AgJ (nach Zeisel).

(Berechnet für  $C_{35}H_{46}O_6N_4$ ):                      Berechnet für  $C_{37}H_{46}O_6N_4$ :

C = 69,68    69,12

H = 7,09    7,22

$OCH_3$  = 18,96                                        19,32

Ge-	I.		II.		III.	IV.		V.	VI.		VII.		
funden													
C . . .	69,24	69,31	—	68,56	—	69,53	69,07	—	—	69,79	—	68,59	—
H . . .	7,29	7,24	—	6,99	—	7,24	7,09	—	—	7,23	—	7,02	—
$OCH_3$ .	—	—	17,43	—	18,05	—	—	18,27	17,29	—	18,02	—	17,72

Das Tetramethylderivat eignet sich zur Bestimmung des Molekulargewichts dank seiner großen Löslichkeit.

Über die Molekulargröße des Hämatoporphyrins sind schon drei Untersuchungen veröffentlicht worden, abgesehen von Zaleskis<sup>1)</sup> Bestimmung für Mesoporphyrin, welche keinen Zweifel an der Formel mit 32—34 Kohlenstoffatomen gelassen haben. Zuerst haben M. Nencki und A. Rotschy<sup>2)</sup> Hämatoporphyrin trotz seiner geringen Löslichkeit nach der kryoskopischen Methode in Eisessig und Phenol untersucht und Werte beobachtet, welche die Formel  $C_{16}H_{18}O_3N_2$  zu beweisen schienen.

Entgegengesetzt sind die Resultate, zu welchen vor einem Jahr O. Piloty und W. Schlenk<sup>3)</sup> bei Bestimmung nach der Siedemethode in Pyridinlösung gelangten: mit einem Apparat von großer Empfindlichkeit fanden sie für Hämatoporphyrin<sup>4)</sup> die Werte 1143, 1113 und 1194 und schlossen daraus, «daß für das Hämatoporphyrin das doppelte des bisher angenommenen Molekulargewichts angenommen werden muß», also die Formel  $C_{68}H_{76}N_8O_{12}$ . Diese Folgerung ist von O. Piloty und H. Fink<sup>5)</sup> auf Hämin und sogar auf Hämoglobin übertragen worden. Diese Forscher isolierten bei der Darstellung des Mesoporphyrins ein amorphes Nebenprodukt, das Phonoporphyrin, und erblickten darin eine Bestätigung der Molekulargewichtsbestimmung von Hämatoporphyrin. Piloty und Fink führen nämlich aus, daß das Mesoporphyrin nur aus einer Hälfte des Moleküls gebildet werde, und sie ziehen den Schluß:

«Demnach ist mit Bestimmtheit erwiesen, daß das Hämin durch die gelinde Behandlung mit Jodwasserstoff in zwei Kom-

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 37, S. 73 (1902).

<sup>2)</sup> Monatsh. f. Chemie, Bd. 10, S. 568 (1889) und Nenckis Werke, Bd. 2 S. 127.

<sup>3)</sup> Mitgeteilt von O. Piloty und E. Dormann, Ann. d. Chem., Bd. 388, S. 319 und 327 (1912).

<sup>4)</sup> Über Darstellung und Trocknung des angewandten Präparates sind keine Angaben gemacht worden: entweder war das angewandte Präparat nicht gut, nämlich vielleicht beim Trocknen polymerisiert, oder Hämatoporphyrin verträgt das Sieden in Pyridin ebensowenig wie das Trocknen bei 100°.

<sup>5)</sup> Chem. Ber., Bd. 45, S. 2495 (1912) und Bd. 46, S. 2020 (1913).

ponenten zerfällt, welche beide mindestens je 34 Kohlenstoffatome enthalten.»

Eine dritte Angabe haben im vorigen Monat H. Fischer und A. Hahn<sup>1)</sup> über die Bestimmung des Molekulargewichts von Hämatoporphyrin veröffentlicht. Sie wiederholten mit einem bei gewöhnlicher Temperatur getrockneten Präparat die Bestimmung nach der Siedemethode in Pyridin und fanden nur so geringe Siedepunktserhöhung (entsprechend dem Molekulargewicht 4295 und 3397), daß eine kolloidale Lösung anzunehmen war. Hingegen gab Hämin in Pyridin nach der ebullioskopischen Methode gute Werte, die der einfachen Formel (mit  $C_{34}$ ) entsprachen.

Bei diesem Stande der Anschauungen genügt es nicht, das Molekulargewicht des Hämins zu bestimmen. Es ist notwendig, die Frage für das Hämatoporphyrin zu lösen. Denn nach Piloty und Dormann soll das Porphyrin, wenn Hämin auch der einfachen Formel entspricht, daraus durch Kondensation zweier Moleküle entstehen.

Mit der krystallisierten Tetramethylverbindung des Hämatoporphyrins haben wir wegen der leicht eintretenden Abspaltung von Methylalkohol nicht die ebullioskopische Methode angewandt, sondern wie bei vielen Chlorophyllderivaten die kryoskopische mit Veratrol als Lösungsmittel. Aus den Beobachtungen ergibt sich für das Methylderivat und für Hämatoporphyrin selbst die einfache Molekulargröße entsprechend der Formel mit 33 Kohlenstoffatomen.

Die angewandte Substanz war bei gewöhnlicher Temperatur im Vakuum getrocknet.

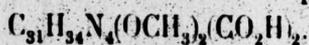
Bestimmung in Veratrol, Konstante 63,8.

Gefrierpunktserniedrigung

Bestimmung in Veratrol, Konstante 63,8.		Gefrierpunktserniedrigung					
I. 0,2513 g Substanz gaben in	10,55 Veratrol		0,246				
II. 0,1984 » » » »	10,33 »		0,207				
III. 0,4206 » » » »	10,33 »		0,433				
IV. 0,6630 » » » »	10,33 »		0,694				
V. 0,1768 » » » »	9,60 »		0,188				
VI. 0,3737 » » » »	9,60 »		0,398				
Berechnet für $C_{37}H_{46}O_6N_4$ :	Gefunden:	I.	II.	III.	IV.	V.	VI.
Molekulargewicht: 642		618	592	600	590	625	624

<sup>1)</sup> Chem. Ber., Bd. 46, S. 2308 (1913).

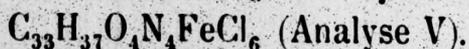
## Dimethyläther des Hämatoporphyrins.



Die Dimethoxysäure gewannen wir genau übereinstimmend in ihrer Salzsäurezahl und der Krystallisationsweise:

1. Durch Einwirkung von methylalkoholischer Kalilauge auf das Hydrobromid  $C_{33}H_{37}O_4N_4Br$ , (Analyse I).

2. Bei gleicher Behandlung des Hydrochlorids



3. Aus der Tetramethylverbindung des Hämatoporphyrins durch Auflösen in wasserhaltiger methylalkoholischer Kalilauge (Analyse II).

4. Aus der Tetramethylverbindung  $C_{33}H_{50}O_8N_4$  bei gleicher Behandlung (Analyse III und IV).

I. 0,2415 g Substanz gaben 0,6049 g  $CO_2$  und 0,1532 g  $H_2O$

II. 0,1555 „ „ „ 0,1145 „ AgJ (nach Zeisel)

III. 0,1566 „ „ „ 0,0960 „ „ „ „

IV. 0,1505 „ „ „ 0,3767 „  $CO_2$  und 0,0907 g  $H_2O$

V. 0,1640 „ „ „ 0,0999 „ AgJ (nach Zeisel).

Berechnet für $C_{33}H_{42}O_6N_4$ :	Gefunden:	I.	II.	III.	IV.	V.
C = 68,36		68,31	—	—	68,26	—
H = 6,89		7,09	—	—	6,74	—
$OCH_3$ = 10,10		—	9,72	8,10	—	8,04

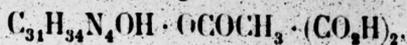
Von der Theorie für die Formel  $C_{34}H_{36}O_4(OCH_3)_2$  nämlich C: 69,12, H: 6,77 entfernen sich die gefundenen Werte erheblich.

Die Säure zeichnet sich durch ihre Krystallisationskraft aus, wir sahen sie nie anders als schon aus ziemlich verdünnter ätherischer Lösung in schönen, glänzenden, in der Durchsicht braunroten prismatischen Täfelchen krystallisierend, die schief abgeschnitten waren und öfters schwalbenschwanzförmige Zwillinge bildeten. Die Substanz sintert ein wenig beim Erhitzen und schmilzt nicht bis über  $270^\circ$ . Es ist daher schwer, die Verbindung für identisch zu halten mit der ganz kürzlich von Küster und Deihle als Dimethyläther des Hämatoporphyrins beschriebenen Substanz (gefunden C: 69,6, H: 6,4), die nur amorph beobachtet wurde und bei  $105^\circ$  schmolz.

Dem Dimethyläther kommt die Salzsäurezahl 1 zu; aus einer ätherischen Lösung geht er spurenweise in Salzsäure von 0,25%<sub>0</sub>, fast vollständig auf einmal in 2%<sub>0</sub>ige Säure. Die saure

Lösung ist schön violett und fluoresciert rot; unter den Bedingungen wie Hämatoporphyrin als Chlorhydrat ausfällt, z. B. durch Auflösen in 30/10 iger Salzsäure, bleibt die Methylverbindung gelöst. Gegen konzentrierte Schwefelsäure, worin sie sich grünlich rot löst, verhält sich die Substanz wie Hämatoporphyrin. In Eisessig ist sie schon kalt mit wenig bläustichig roter Farbe leicht löslich, viel leichter als Hämatoporphyrin, auch in Aceton sehr leicht und in Alkohol leicht mit braunroter Farbe und braunroter Fluorescenz. Durch Einwirkung von Bromwasserstoff-Eisessig läßt sich aus der Methylverbindung Hämatoporphyrin zurückbilden.

### Monoacetylverbindung des Hämatoporphyrins.



Aus verschiedenen Halogenwasserstoff-Additionsprodukten, den Zwischenprodukten der Porphyrinbildung, geht bei der Einwirkung von Natriumacetat in Eisessig eine Monoacetylverbindung hervor. Man sollte dabei ein Diacetylderivat erwarten, es ist auch wahrscheinlich zunächst gebildet, aber sehr leicht, nämlich schon von wässriger Essigsäure, gespalten worden. Nach der Salzsäurezahl und dem Verhalten zu urteilen, entsteht aus Hämatoporphyrin dieselbe Acetylverbindung. Ihre Einheitlichkeit ist aber zweifelhaft, da sie nicht in kristallisiertem Zustand erhalten worden ist.

Das aus der Bromwasserstoff-Eisessiglösung des Hämins gefällte Tetrabromid (4 g) lösten wir in 500 ccm heißem Eisessig und fügten bis zum vollständigen Verschwinden der grünlichen Nuance krystallisiertes Natriumacetat hinzu, etwa 5 g. Die noch warme Lösung wurde mit Wasser gefällt und der flockige Niederschlag bei gewöhnlicher Temperatur getrocknet.

Um Hämatoporphyrin zu acetylieren, braucht man nur mit Eisessig aufzukochen und mit Wasser zu fällen; man darf nicht länger erhitzen, sonst verdirbt die Substanz und gibt ein in Äther unlösliches Produkt.

Das blauviolette Pulver ist in Alkohol und Aceton mit braunroter, in Eisessig mit schön violetter Farbe leicht löslich, in Äther schwerer, doch beträchtlich löslich. Die Salz-

säurezahl ist 1<sup>1</sup>/<sub>2</sub>, die saure Lösung hat weniger blauen Ton als die des Hämatoporphyrins. Bei längerem Aufbewahren verdirbt die Substanz.

I. Präparat aus  $C_{33}H_{34}O_4N_4Br_4$ :

0,1972 g Substanz gaben 0,4803 g  $CO_2$  und 0,1137 g  $H_2O$ .

II.) Präparat aus  $C_{33}H_{37}O_4N_4FeCl_6$ :

0,2538 g Substanz gaben 0,6229 g  $CO_2$  und 0,1468 g  $H_2O$ .

Berechnet für	Gefunden:	
$C_{33}H_{37}O_5N_4 \cdot OCOCH_3$ :	I.	II.
C = 66,84	66,43	66,93
H = 6,42	6,45	6,47

Beim Erwärmen an der Quecksilberpumpe im Acetonbad verliert die Acetylverbindung langsam, im Toluolbad rasch an Gewicht, nämlich 12—14<sup>0</sup>/<sub>0</sub>; für 1 Mol. Essigsäure und 1 Mol.  $H_2O$  ist 12,4<sup>0</sup>/<sub>0</sub> berechnet. Die flüchtigen Anteile kondensierten wir in einer mit flüssiger Luft gekühlten Vorlage.

2,3976 g Substanz verloren 0,2563 g, davon kondensiert 0,2309 g. Diese erforderten zur Neutralisation 32,3 ccm  $n_{10}$ -NaOH entsprechend 0,2083 g Essigsäure. Für 1 Mol.  $CH_3COOH$  sind berechnet 0,2240 g.

Die Zusammensetzung der erhitzten Präparate stimmt annähernd für die Formel mit vier Sauerstoffatomen, ähnlich wie lang erhitztes Hämatoporphyrin.

0,1791 g Substanz gaben 0,4675 g  $CO_2$  und 0,1024 g  $H_2O$

0,1666 „ „ „ 0,4380 „ „ „ 0,0965 „ „

Berechnet für $C_{33}H_{34}O_4N_4$ :	Gefunden:	
C = 71,96	71,19	71,70
H = 6,23	6,40	6,48

Die Acetylverbindung liefert mit flüssigem Chlorwasserstoff im geschlossenen Rohr das Dichlorid des Hämatoporphyrins und sie wird von Bromwasserstoff-Eisessig, auch schon von 4<sup>0</sup>/<sub>0</sub>iger Salzsäure bei zweistündigem Stehen in der Kälte, ferner von Natronlauge verseift, dabei entsteht wieder Hämatoporphyrin mit der Salzsäurezahl 0,1.

<sup>1</sup>) Die beiden Präparate sind einander sehr ähnlich, aber ihre Identität ist nicht ganz sicher.

## Häminoporphyrin.

Bei der Einwirkung von flüssigem Chlorwasserstoff auf Hämin unter Hydrolyse des Zwischenproduktes von der Formel  $C_{33}H_{37}O_4N_4Cl_6$  durch Säure entsteht nicht das bekannte Hämatoporphyrin, sondern eine neue Verbindung, die als Häminoporphyrin bezeichnet werden soll. Sie ist sehr ähnlich, namentlich in der Krystallform, der Löslichkeit und in den basischen Eigenschaften (Salzsäurezahl) mit Hämatoporphyrin übereinstimmend. Die Zusammensetzung ist aber etwas verschieden; Häminoporphyrin scheint durch Austritt von einem Mol Wasser aus zwei Molen Hämatoporphyrin gebildet zu werden, also der Formel  $(C_{33}H_{37}O_{3\frac{1}{2}}N_4)_2$  zu entsprechen. Vielleicht ist unter dem Einfluß des Eisenhalogenides die Porphyrinbildung aus dem Hydrochlorid etwas anders verlaufen als beim Hydrobromid. Im Verhalten gegen Ammoniak gleicht Häminoporphyrin dem Hämatoporphyrin: an dem Verlust von Wasser sind also nicht die Carboxyle beteiligt, sondern die alkoholischen Hydroxylgruppen. Es wäre wünschenswert, die angenommene Formel durch eine Molekulargewichtsbestimmung zu prüfen, aber es ist uns noch keine dafür geeignete Form des Häminoporphyrins bekannt. Bei der Esterifizierung ist nämlich eine Methylverbindung des Hämatoporphyrins aus ihm entstanden.

Es gibt folgende charakteristische Unterschiede zwischen Hämino- und Hämatoporphyrin:

Beim Erhitzen im Hochvakuum bei  $105^\circ$  spaltet Hämatoporphyrin Wasser ab und geht in sauerstoffärmere Produkte über. Dabei wird es unlöslich und schwachbasisch. Unter denselben Bedingungen verliert Häminoporphyrin kein Wasser und bleibt nach Zusammensetzung, Löslichkeit und Salzsäurezahl unverändert.

Während Hämatoporphyrin ein Dichlorhydrat bildet, entsteht unter den gleichen Umständen ein Trichlorhydrat des Häminoporphyrins.

Das Häminoporphyrin kann durch Hydrolyse mit energischen Mitteln in Hämatoporphyrin übergeführt werden.

Das Chlorwasserstoffadditionsprodukt des Hämins (3 g) lösten wir unter gelindem Erwärmen in 20%iger Salzsäure

auf und filtrierten von etwas flockiger Ausscheidung. Die Hydrolyse erfolgte sofort. Unter genauem Neutralisieren extrahierten wir mit viel Äther das gebildete Porphyrin, das schon aus verdünnter Lösung als schweres dunkelviolettes Krystallmehl (1 g) ausfiel, aus metallglänzenden, rechteckigen, an den Ecken gerundeten Blättchen bestehend.

Hinsichtlich der Löslichkeit gilt für das neue Porphyrin die Beschreibung des Hämatoporphyrins, die Salzsäurezahl ist  $1,10$  bis  $1,5$ , die Verbindung scheint ein wenig schwächer basisch zu sein als Hämatoporphyrin.

Die Analyse I ist mit einem exsikkatortrocknen Präparat, II mit demselben nach vierstündigem Erhitzen im Hochvakuum auf  $105^{\circ}$  (Gewichtsverlust  $1,8\%$ ) ausgeführt; in drei weiteren Stunden trat keine Gewichtsabnahme mehr ein. Die erhitzte Substanz wies keinen Unterschied auf gegenüber der frisch dargestellten.

I. 0,1927 g Substanz gaben 0,4874 g  $\text{CO}_2$  und 0,1149 g  $\text{H}_2\text{O}$   
 II. 0,2140 „ „ „ 0,5389 „ „ 0,1250 „ „

Berechnet für	Gefunden:	
$\text{C}_{33}\text{H}_{27}\text{N}_4\text{O}_{5,1/2}$ :	I.	II.
C = 68,59	68,98	68,68
H = 6,46	6,67	6,54

Trichlorhydrat.  $3\%$ ige Salzsäure löst Hämatoporphyrin klar auf und scheidet das schwer lösliche, aber nicht unlösliche Salz als hellroten Brei von Krystallnadeln aus.

0,2204 g Substanz (exsikkatortrocken) gaben 0,4628 g  $\text{CO}_2$  und 0,1176 g  $\text{H}_2\text{O}$

Berechnet für $\text{C}_{33}\text{H}_{40}\text{N}_4\text{O}_{5,1/2}\text{Cl}_3$ :	Gefunden:
C = 57,66	57,27
H = 5,87	5,97

Umwandlung in Hämatoporphyrin. Das Häminoporphyrin (0,3 g) lösten wir in viel bei  $0^{\circ}$  gesättigter Bromwasserstoffsäure auf und trugen die Flüssigkeit in Wasser ein. Nach drei Stunden wurde das Porphyrin in Äther übergeführt und aus mäßig eingengter Lösung krystallisiert erhalten (0,2 g). Es war Hämatoporphyrin (Analyse VII desselben).

Eine zweite Überführung wird vom Methylester vermittelt, den wir bei eintägigem Stehen des Häminoporphyrins mit  $8\%$ iger methylalkoholischer Chlorwasserstoffsäure erhielten.

Er bildet ein in Äther leicht lösliches ziegelrotes Pulver ( $\text{OCH}_3$ , gefunden 10,5%) von der Salzsäurezahl  $\frac{1}{2}$ , ist also wahrscheinlich mit dem in der Kälte dargestellten Dimethylester des Hämatoporphyrins identisch. Wir verseiften ihn mit methylalkoholischer Kalilauge und brachten das freie Porphyrin in Äther, woraus es schon bei großer Verdünnung krystallisierte. Die Analyse VIII des Hämatoporphyrins ist mit diesem Präparat ausgeführt.

### Hämido-porphyrin.

Ein anderes Porphyrin, über welches wir nur einige vorläufige Angaben machen können, entsteht aus dem Hydrochlorid des Hämins beim Behandeln einer warmen Lösung in Aceton (anstatt in Eisessig wie bei der Bildung der Monoacetylverbindung des Hämatoporphyrins) mit Eisessig-Natriumacetat. Das Produkt dieser Reaktion hatte vor dem Trocknen die Zusammensetzung des Hämatoporphyrins. Es ist eine prächtig krystallisierende Verbindung, durch die Salzsäurezahl 1 gekennzeichnet und von Hämato- sowie Häminoporphyrin scharf unterschieden. Wir schlagen für diese Substanz den Namen Hämido-porphyrin vor. Man sollte die Bildung einer Acetylverbindung erwarten, aber das Hämido-porphyrin enthielt keine Essigsäure. Im Hochvakuum auf  $105^\circ$  erhitzt und mit einer durch flüssige Luft gekühlten Vorlage verbunden, verhielten sich verschiedene Präparate der Substanz zwar auffallend ungleich, aber alle spalteten nur Wasser ab, ein bis zwei Moleküle und von Essigsäure höchstens Spuren. Das Hämido-porphyrin verhielt sich also wie eine Oxysäure. Gegen Säure und Alkalilauge ist es beständig, sodaß noch keine Umwandlung in Hämatoporphyrin beobachtet wurde.

Das eisenhaltige Hydrochlorid lösten wir in Aceton (2 g in 100 ccm) und ließen, während die Flüssigkeit am Rückflußkühler kochte, eine Lösung von krystallisiertem Natriumacetat in Eisessig zutropfen. Die blaurote Farbe schlug in rot, dann in braun um und es trat gewöhnlich eine Trübung ein; an diesem Punkte unterbrachen wir den Zusatz der Eisessiglösung und filtrierten von etwas Nebenprodukt ab. Das Filtrat ver-

dünnten wir mit viel Äther, beseitigten alle Essigsäure mit festem Natriumbicarbonat und wenig Wasser und engten die mit viel Wasser gewaschene ätherische Lösung stark ein. Dann krystallisierte das Hämidoporphyrin in prachtvollen großen Prismen aus, die gerade abgeschnitten waren und braunvioletten Glanz zeigten (Ausbeute 1 g). Das Porphyrin ist in Salzsäure mit schön blauvioletter Farbe, in Ammoniak mit leuchtend roter Farbe löslich.

I. 0,1660 g Substanz gaben 0,4123 g CO<sub>2</sub> und 0,0960 g H<sub>2</sub>O  
 II. 0,2241 „ „ „ 0,5533 „ „ „ 0,1345 „ „

Berechnet für	Gefunden:	
C <sub>33</sub> H <sub>33</sub> O <sub>4</sub> N <sub>4</sub> :	I.	II.
C = 67,54	67,74	67,33
H = 6,53	6,47	6,67

Analyse der heiß getrockneten Substanz.

I. 0,2926 g Substanz gaben 0,7512 g CO<sub>2</sub> und 0,1709 g H<sub>2</sub>O  
 II. 0,1332 „ „ „ 0,3434 „ „ „ 0,0809 „ „  
 III. 0,2147 „ „ „ 0,5538 „ „ „ 0,1302 „ „

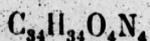
Berechnet für	Gefunden:		
C <sub>33</sub> H <sub>36</sub> O <sub>5</sub> N <sub>4</sub> :	I.	II.	III.
C = 69,68	70,02	70,31	70,35
H = 6,39	6,53	6,79	6,79

#### IV. Die Porphyrine mit 4 Sauerstoffatomen. <sup>1)</sup>

(Gruppe des Mesoporphyrins.)

Es ist noch nicht gelungen und bietet ein wichtiges Ziel für künftige Versuche, dem Hämin das Eisen zu entziehen ohne irgend eine weitere Änderung, also die Reaktion auszuführen, die so leicht vom Chlorophyll zum Phaeophytin führt, mit keinem anderen Eingriff als dem Ersatz des Magnesiums durch Wasserstoff.

Nach der bis jetzt angenommenen Zusammensetzung des Hämins wäre die Formel seines eisenfreien Derivates:



und nach der von uns vorgeschlagenen Abänderung:



<sup>1)</sup> Bei den in diesem Kapitel beschriebenen Versuchen erfreute ich mich (im Wintersemester 1911/12 und Sommersemester 1912) der eifrigen Hilfe meines Privatassistenten, des Herrn L. Forsén, dem ich dafür meinen besten Dank ausspreche. Willstätter.

Bisher war ein einziges Porphyrin aus Hämin dargestellt, welches wie Hämin eine Dicarbonsäure ist und keinen anderen Sauerstoff enthält als den der Carboxyle, nämlich das Mesoporphyrin. Es ist von M. Nencki und J. Zaleski<sup>1)</sup> durch Reduktion des Hämins und des Hämatoporphyrins mit Eisessig-Jodwasserstoffsäure und Jodphosphonium erhalten und von Zaleski<sup>2)</sup> gründlich untersucht worden. Als wahrscheinlichste Formel galt dafür  $C_{34}H_{38}O_4N_4$ , nach der es ein Tetrahydroderivat sein sollte und bei der Abspaltung seiner Carboxyle nicht zur eigentlichen Stammsubstanz des Hämins führen könnte.

Um andere, dem Hämin in ihrer Zusammensetzung näher stehende Porphyrine zu erlangen, haben wir versucht, die Methode des Abbaus von Chlorophyll durch Erhitzen mit methylalkoholischer Kalilauge auf Hämin und Hämatoporphyrin zu übertragen. Es gelang uns anfangs nicht, so lange dasselbe auch mit der Chlorophyllkomponente b noch nicht gelungen war. Die Spaltungsprodukte des letzteren, namentlich Phytorhodin g, sind gegen Alkalien empfindlich und werden beim Erhitzen in alkalischen Medien in hochmolekulare amorphe Stoffe verwandelt. Durch einen Zusatz von Pyridin zur konzentrierten Kalilauge haben wir aber vor kurzem die glatte Umwandlung des Phytorhodins g bis zum einbasischen Porphyrin erzielt.<sup>3)</sup> Das gleiche Verfahren — Erhitzen mit methylalkoholischer Kalilauge und mit Pyridin im Autoklaven — ist für den Blutfarbstoff anwendbar.

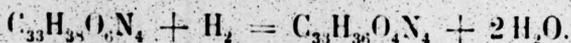
Hämatoporphyrin liefert unter diesen Bedingungen ein einheitliches, gut krystallisierendes Porphyrin mit vier Sauerstoffatomen, das Hämoporphyrin, welches dem Mesoporphyrin sehr nahe steht, aber stärker basische Eigenschaften hat; in dieser Beziehung stellt es sich zwischen Hämato- und Mesoporphyrin. Wie die entsprechende Behandlung des Phytorhodins g mit Wahrscheinlichkeit als eine Reduktion gilt, so fassen wir gemäß der Analyse, die für Hämoporphyrin die Formel  $C_{33}H_{36}O_4N_4$  ergibt, seine Bildung als eine Reduktion des Hämatoporphyrins auf, nämlich als Abspaltung von zwei

<sup>1)</sup> Chem. Ber., Bd. 34, S. 997 (1901).

<sup>2)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 37, S. 54 (1902).

<sup>3)</sup> XXII. Abhandlung über Chlorophyll. Ann. d. Chem., im Druck.

Hydroxylgruppen, mit andern Worten als Austritt von Wasser und Reduktion mit einem Molekül Wasserstoff:



Dennoch ist Hämoporphyrin nicht etwa einfach eine Dihydroverbindung des enteisenen Hämins, vielmehr sind bei der Bildung des Hämoporphyrins durch Addition von Bromwasserstoff oder von Wasser reaktionsfähige Stellen angegriffen und bei der Überführung in Hämoporphyrin keineswegs zurückgebildet worden. Hämin addiert leicht, Hämoporphyrin addiert nicht, ebensowenig wie Mesoporphyrin.

Durch das Ergebnis der Analyse wird das Hämoporphyrin den aus Chlorophyll erhaltenen zweicarboxyigen Porphyrinen:

Glauko-, Rhodo-, Cyano-, Erythro-, Rubiporphyrin sehr nahe gerückt: es ist mit diesen (wenigstens mit den drei roten Porphyrinen) isomer. Es verhält sich bei weiterem Abbau zwar nicht ganz gleich diesen, es verliert nämlich nicht so leicht ein Carboxyl wie alle die Isomeren, aber beim Erhitzen mit Natronkalk liefert es, wie im folgenden Kapitel beschrieben wird, durch Abspaltung seiner beiden Carboxylgruppen das nämliche Ätioporphyrin:



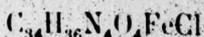
Aus diesem Ergebnis schließen wir zurück auf die Zusammensetzung des Hämoporphyrins, dessen Formel  $C_{31}H_{31}N_4(COOH)_2$  Bestätigung findet, und auf die Formel des Hämins mit 33 Kohlenstoffatomen.

Wir untersuchen nun die Wirkung der methylalkoholischen Kalilauge bei Gegenwart von Pyridin auf Hämin selbst und isolieren daraus in Form des Kaliumsalzes, des Chlorids und des Esters eine Eisenverbindung: das Eisen ist unter diesen Bedingungen bei 200° dem Molekül noch erhalten geblieben, es läßt sich auch in die Porphyrine durch Erhitzen mit methylalkoholischem Kali und Eisenoxyd wieder einführen ähnlich wie Magnesium.<sup>1)</sup>

Beim Eliminieren des Metalls gibt das Reaktionsprodukt nichts anderes als Mesoporphyrin. Diese Eisenverbindung ist

<sup>1)</sup> R. Willstätter und L. Forsén, Ann. d. Chem., Bd. 396, S. 180 (1913).

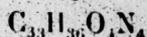
also dieselbe, die Zaleski<sup>1)</sup> durch Einführung des Metalls (eigentümlicherweise nicht mit einer Ferriverbindung, sondern unter Anwendung von Ferroacetat) in Mesoporphyrin erhalten und als Tetrahydrohäm in:



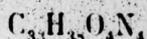
betrachtet hat. Wir schlagen vor, daß Chlorid Mesohäm in, das Derivat mit der Gruppe FeOH Mesohäm atin zu nennen.

Unsere Gründe, die Formeln mit  $C_{34}$  abzuändern in Formeln mit  $C_{33}$ , gelten auch für Mesoporphyrin. Für dieses haben schon vor sechs Jahren Willstätter und Pfannenstiel eine Formel mit  $C_{33}$  zur Erörterung gestellt: vor kurzem hat auch H. Fischer in einer schönen Arbeit über das Reduktionsprodukt des Mesoporphyrins, das Porphyrinogen, die Formel mit  $C_{33}$  in Erwägung gezogen, allein die Analysen des Porphyrinogens haben die Frage nicht geklärt und sie haben am Ende zur Formel mit  $C_{34}$  zurückgeleitet.

Eine zweite Frage betrifft die Zahl der Wasserstoffatome im Mesoporphyrin. Weder die gründliche analytische Untersuchung von Zaleski noch die Bestimmungen von H. Fischer, von O. Piloty und von uns entscheiden darüber, ob wir bei dem Übergang von  $C_{34}$  auf  $C_{33}$  die Dihydroformel



oder die Tetrahydroformel



zu wählen haben.

Berechnet für $C_{34}H_{38}O_4N_4$ :	$C_{33}H_{36}O_4N_4$ :	$C_{33}H_{38}O_4N_4$ :
C = 72.04	71.70	71.44
H = 6.76	6.57	6.91
Gefunden von Zaleski:	W. u. F.:	W. u. F.:
(Mittel von 4 Analysen)	(Darst. aus Häm in mit Alkali, Mittel von 2 Analysen)	(Darstellung nach Zaleski, Mittel von 2 Analysen)
C = 71.80	71.93	71.91
H = 6.84	6.83	7.14
Berechnet für $C_{34}H_{38}O_4N_4 \cdot 2HCl$	$C_{33}H_{36}O_4N_4 \cdot 2HCl$	$C_{33}H_{38}O_4N_4 \cdot 2HCl$
C = 63.82	63.36	63.13
H = 6.31	6.13	6.43

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 43, S. 11 (1904/1905).

Gefunden von Zaleski:	H. Fischer: <sup>1)</sup>	O. Piloty: <sup>2)</sup>	W. Küster: <sup>3)</sup>
(Mittel von 16 Analysen)	(Mittel von 5 Analysen)	(Mittel von 2 Analysen)	
C = 63,50	62,50	64,25	63,6
H = 6,49	6,49	6,88	6,26

Indessen spricht die neue Bildungsweise, die mit der Entstehung des Hämoporphyrins parallel geht, dafür, daß Mesoporphyrin und Hämoporphyrin Isomere sind. Es ist wahrscheinlicher, daß die Umformung der reaktionsfähigen Bindungen des Hämins beim Alkaliabbau und im anderen Falle durch aufeinanderfolgende Einwirkung von Säure und Alkali in etwas verschiedener Weise verläuft und zu einem Unterschied in der Struktur führt, als daß aus Hämin ein Hydroderivat desjenigen Porphyrins entstehen sollte, welches unter gleichen Umständen aus Hämatoporphyrin hervorgeht. Vielleicht wird die Abspaltung der Carboxyle von Mesoporphyrin, die wir zurzeit untersuchen, über seine Beziehung zu Hämoporphyrin Aufschluß geben.

### Hämoporphyrin, $C_{33}H_{36}O_4N_4$ .

Als Ausgangsmaterial diente amorphes Hämatoporphyrin, das eisenfrei und nach der Salzsäurezahl 0,1 einheitlich war. Wir erhitzen es in Mengen von 2 g mit 50 ccm konzentrierter methylalkoholischer Kalilauge und 100 ccm Pyridin im Silbertiegel und Autoklaven während 4—5 Stunden auf 200°. Nach dem Erkalten gab eine Probe, in Äther übergeführt, an 0,1%ige Salzsäure kein Porphyrin mehr ab. Am Boden des Silberbeehers war fast die ganze Menge des Reaktionsproduktes als krystallinische Kaliumverbindung ausgeschieden. Sie wurde nach Dekantieren des Pyridins in Wasser aufgelöst und daraus durch Ansäuern das freie Hämoporphyrin gefällt. Die Ausbeute an Rohprodukt betrug 1,8 g.

Zur Reinigung fanden wir die Fraktionierung mit verdünnter Salzsäure nach der Methode von Willstätter und

<sup>1)</sup> H. Fischer, E. Bartholomäus und H. Röse, Diese Zeitschrift, Bd. 84, S. 277, 278, 279 (1913).

<sup>2)</sup> O. Piloty und H. Fink, Chem. Ber., Bd. 45, S. 2498 (1912).

<sup>3)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 82, S. 470 (1912).

Mieg geeignet. Wir bereiteten durch Aufnehmen mit Salzsäure, Verdünnen und Ausäthern unter Abstumpfen mit Ammoniak eine ätherische Lösung, die zunächst einige Male mit 0,1%iger Salzsäure gewaschen wurde. Sodann extrahierten wir den Farbstoff mit 2- oder 3%iger Salzsäure und befreiten diese Auszüge durch wiederholtes Waschen mit Äther von ein wenig gelber Beimischung. Die Salzsäurelösung fluorescierte und war schön rot; das Hämaporphyrin ging aus ihr bei annäherndem Neutralisieren in reinem Zustand in Äther über. Es krystallisierte verschieden, je nachdem die ätherische Lösung feucht oder getrocknet war: beim Einengen der wasserhaltigen Lösung schied es sich in feinen oft haarförmigen rotbraunen Nadeln ab, aus trockenem Äther erhielten wir bräune Aggregate von dicken Platten neben gut ausgebildeten rhombenförmigen Täfelchen. Bei dieser Reinigung wurden aus 7,4 g Rohprodukt 3,5 g krystallisiertes Porphyrin gewonnen (Präp. A der Analysen).

Für weitere Analysen diente ein Präparat nach schärferer Fraktionierung mit Salzsäure, die zur Prüfung der Einheitlichkeit vorgenommen wurde. Von der krystallisierten Substanz sind 2 g wieder in Äther gebracht und mit 0,2-, 0,5-, 0,7- und 1%iger Salzsäure ausgeschüttelt worden. Aus dem Anteil der 0,5%igen Säure gewannen wir 0,5 g schöne nadelförmige Krystalle (Präp. B), aus der 0,7%igen Salzsäure 0,7 g und von den Auszügen mit viel 0,2%iger und mit 1%iger Säure nur je 0,2 g. Bei der quantitativen Bestimmung der Verteilung zwischen Äther und Salzsäure von 0,5% stimmten die so erhaltenen Fraktionen gut überein.

Ein drittes Präparat (C) ist aus einem Versuche hervorgegangen, in welchem wir die Temperatur bei der Reaktion mit methylalkoholischer Kalilauge auf 280° gesteigert haben.

Die Substanz hinterließ keine Asche. Beim Trocknen im Hochvakuum erfuhr sie nur eine geringfügige Gewichtsminderung und wurde nicht hygroskopisch. Nach den Analysen enthält Hämaporphyrin möglicherweise etwas weniger Wasserstoff als Mesoporphyrin (siehe Seite 435 und 483) entsprechend dem Unterschiede der Formeln  $C_{33}H_{36}O_4N_4$  und  $C_{33}H_{38}O_4N_4$ .

## Präparat A.

- I. 0,1567 g Substanz gaben 0,4107 g CO<sub>2</sub> und 0,0902 g H<sub>2</sub>O  
 II. 0,1749 „ „ „ 0,4580 „ „ „ 0,0994 „ „  
 III. 0,1399 „ „ „ 10,39 ccm n<sub>10</sub>-NH<sub>3</sub> (nach Kjeldahl).

## Präparat B.

- IV. 0,1782 g Substanz gaben 0,4680 g CO<sub>2</sub> und 0,1040 g H<sub>2</sub>O  
 V. 5,70 mg „ „ „ 14,98 mg „ „ „ 3,29 mg „ „  
 VI. 3,19 „ „ „ 0,294 ccm N bei 712 mm ü. 19° (nach Pregl)  
 VII. 4,29 „ „ „ 0,397 „ „ „ 712 „ „ „ 19° „ „

## Präparat C.

- VIII. 0,0764 g Substanz gaben 0,1997 g CO<sub>2</sub>, 0,0437 g H<sub>2</sub>O und 0,0005 g Asche.

Berechnet	Gefunden:							
für C <sub>33</sub> H <sub>36</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> :	I.	II.	III.	IV.	V.	VI.	VII.	VIII.
C = 71,70	71,48	71,42	—	71,63	71,68	—	—	71,76
H = 6,57	6,44	6,36	—	6,53	6,46	—	—	6,44
N = 10,14	—	—	10,40	—	—	10,09	10,13	—

In trockenem Ammoniakgas nehmen Hämoporphyrin und Mesoporphyrin 2 Mole NH<sub>3</sub> auf und verlieren im Vakuum-exsikkator 1 Mol.

Berechnet für 2 Mole NH<sub>3</sub> 6,17, für 1 Mol 3,08%.

Hämoporphyrin nahm auf 6,58 und behielt im Vakuum 3,25%

Mesoporphyrin „ „ 6,35 „ „ „ 3,33 „

In diesem Verhalten stimmen beide Verbindungen mit Rhodoporphyrin überein, während Erythro- und Rubiporphyrin im Exsikkator das gesamte Ammoniak durch Dissoziation verlieren.<sup>1)</sup>

Von den mit ihm isomeren zweibasischen Porphyrinen, die beim Abbau der zwei Chlorophyllkomponenten erhalten worden sind, unterscheidet sich Hämoporphyrin durch seine viel stärker basischen Eigenschaften. Während die Salzsäurezahlen jener Porphyrine zwischen 3 und 4½ liegen, finden wir für Hämoporphyrin 4, für Mesoporphyrin 1½. Die ätherische Lösung des neuen Porphyrins gibt an 0,1%ige Salzsäure noch nichts ab, färbt aber 0,5%ige schon violettstichig rot an; 1%ige nimmt mehr als zwei Drittel des Porphyrins auf.

Das Chlorhydrat ist viel leichter löslich als das von Mesoporphyrin, sowie von Rhodo-, Erythro- und Rubiporphyrin.

<sup>1)</sup> R. Willstätter, M. Fischer und L. Forsén, XXII. Abhandlung über Chlorophyll, Ann. d. Chem., im Druck.

Die Krystalle von Hämoporphyrin lösen sich leicht in konzentrierter Salzsäure mit rein roter Fluorescenz, auch noch leicht in 5%iger Salzsäure, während sie 1%ige Salzsäure nur ganz schwach färben. Aus der Lösung in 5—20%iger Salzsäure krystallisiert das Chlorhydrat erst nach längerem Stehen in schönen Nadeln aus, während Mesoporphyrin sich in Salzsäure von demselben Prozentgehalt zuerst löst, aber sofort als Chlorhydrat in groben Flocken wieder abscheidet.

Die Verteilungszahlen von Häm- und Mesoporphyrin, vergleichsweise für 0,50%ige Salzsäure bestimmt, sind 23,5 und 12.

Hämoporphyrin ist in absolutem Alkohol beim Kochen beträchtlich löslich mit wenig bläustichiger bräunlich roter Farbe, kalt recht schwer löslich: es krystallisiert daraus, allerdings weniger vollständig wie Mesoporphyrin, beim Erkalten und man kann gut ausgebildete, langgestreckte rhombenförmige Krystalle erhalten, die in der Durchsicht rot sind. In Eisessig löst sich die Substanz wie Mesoporphyrin in der Wärme leicht, auch in der Kälte beträchtlich mit stark bläustichig roter Farbe. Äther, Benzol und Chloroform werden von dem krystallisierten Präparat kaum angefärbt.

Während die isomeren Dicarbonsäuren aus Chlorophyll schon unterhalb 200° ein Carboxyl verlieren und in die zwei Monocarbonsäuren Phyllo- und Pyrroporphyrin übergehen, blieb Hämoporphyrin unversehrt, als wir es mit methylalkoholischer Kalilauge und Pyridin viele Stunden von 220—280° erhitzen.

Durch Behandeln mit Bromwasserstoff-Eisessig läßt sich Hämoporphyrin nicht in Hämatoporphyrin überführen; wir gewinnen es unverändert wieder.

Dimethylester. Durch Methylalkohol bei Gegenwart von etwas Chlorwasserstoff wird Hämoporphyrin in den Ester verwandelt, der in Äther viel leichter löslich ist als die Säure und erst aus konzentrierter Lösung in schief abgeschnittenen Prismen mit häufigen Zwillingsbildungen krystallisiert. In Eisessig und Chloroform ist die Substanz sehr leicht, in siedendem Aceton sehr leicht löslich; die Salzsäurezahl ist  $1\frac{1}{2}$  bis 2.

0,1657 g Substanz gaben 0,1430 g AgJ (nach Zeisel)  
 0,1927 " " " 13,58 ccm  $\frac{n}{10}$ -NH<sub>3</sub> (nach Kjeldahl).

Berechnet	Gefunden:	
für C <sub>31</sub> H <sub>34</sub> N <sub>4</sub> (COOCH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> :	I.	II.
N = 9,66	9,87	—
2 OCH <sub>3</sub> = 10,69	—	11,39

### Mesohämin.

Während Hämin sich beim Erhitzen mit methylalkoholischer Kalilauge leicht in amorphe Produkte verwandelt, gelingt es bei Zusatz von Pyridin, also nach dem Verfahren der Hämoporphyringewinnung, das Hämin zur Ferriverbindung des Mesoporphyrins zu reduzieren.<sup>1)</sup>

3 g Hämin wurden in 100 ccm Pyridin gelöst und in 50 ccm konzentrierte methylalkoholische Kalilauge eingetragen: nach längerem, gründlichem Verrühren erhitzen wir im Autoklaven mit Silbereinsatz 4—4½ Stunden auf 200°. Wenn man die Häminlösung mit der Alkalilauge sorgfältig verrührt hat, so entsteht kein braunes Zersetzungsprodukt. Nach dem Erkalten gibt eine Probe des Autoklaveninhalts beim Abspalten des Eisens mit Bromwasserstoff-Eisessig oder konzentrierter Schwefelsäure ein Porphyrin, dessen ätherische Lösung mit 0,1%iger Salzsäure nicht reagiert (Unterschied von Hämoporphyrin). Ob die Umwandlung vollständig ist, erkennt man schon an der Farbe einer Probe in konzentrierter Schwefelsäure. Sie muß rein rot sein: enthält aber das Produkt noch unverändertes Hämin, so ist die Farbe grünstichig; eine unschöne braune Farbe der schwefelsauren Lösung würde auf Zersetzungsprodukte hindeuten.

Die alkalische Masse ist von glitzernden braunroten Krystallen erfüllt, die sich nach Zusatz von etwas Methylalkohol abfiltrieren und mit Äthylalkohol waschen lassen. Sie bestehen in schönen, langen, gerade abgeschnittenen Prismen, deren Farbe in der Durchsicht rot ist. In Methylalkohol und in Wasser ist diese Kaliumverbindung leicht löslich, aber nicht in Äthylalkohol und in Aceton, auch in methylalkoholischem Kali und in Pyridin ist sie unlöslich.

<sup>1)</sup> L. Forsén, Promotionsarbeit, Zürich 1912.

Das Salz enthält 3 Atome Kalium, wahrscheinlich eines in Form der Gruppe  $\text{>Fe}-\text{OK}$ . Wir analysierten es durch Veraschen und Auslaugen der Asche mit Wasser.

0.4116 g Substanz gaben 0.1412 g Asche, daraus 0.0450 g  $\text{Fe}_2\text{O}_3$   
und 0.1406 g  $\text{K}_2\text{SO}_4$

Berechnet für $\text{C}_{33}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_5\text{FeK}_3$ :	Gefunden:
Fe = 7.57	7.65
3 K = 15.91	15.33

Zur Darstellung des Mesohämins wurde ohne Isolierung des Kaliumsalzes die alkalische Masse in Wasser gelöst und durch Ansäuern das Mesohämin in schweren braunen Flocken gefällt. Die Ausbeute an diesem Produkt betrug 2.8—2.9 g. Es ließ sich reinigen durch Auflösen in siedendem Methylalkohol (1 Liter für die Charge), wobei ein geringer, in Schwefelsäure mit bräunlicher Farbe löslicher Rückstand hinterblieb. Das mit Wasser oder Kochsalzlösung wieder gefällte Präparat zeigt hingegen in konzentrierter Schwefelsäure eine schön rote Farbe. Nach wiederholtem Umfällen aus Holzgeist lösten wir 2 g der Eisenverbindung in siedendem Eisessig (50 ccm) und fügten 2 ccm konzentrierte Salzsäure hinzu. Die Substanz schied sich in dunklen Körnern aus, indessen unvollständig (nur 1 g), obwohl sie, einmal ausgeschieden, in kaltem Eisessig sehr wenig löslich ist. Das so gebildete Mesohämin wird aus siedendem kochsalzhaltigem Eisessig umkrystallisiert oder wie Hämin durch Auflösen in Pyridin und Eintragen in warmen kochsalzhaltigen Eisessig: es bildet häminähnliche glänzende Prismen oder sehr dünne in der Durchsicht gelbbraune Blättchen.

Das Mesohämin ist sehr schwer löslich in den meisten Lösungsmitteln, doch färbt es diese z. B. Chloroform und Alkohol mehr an als Hämin. Besonders groß ist der Löslichkeitsunterschied in Aceton, worin Hämin unlöslich, Mesohämin aber mäßig löslich ist.

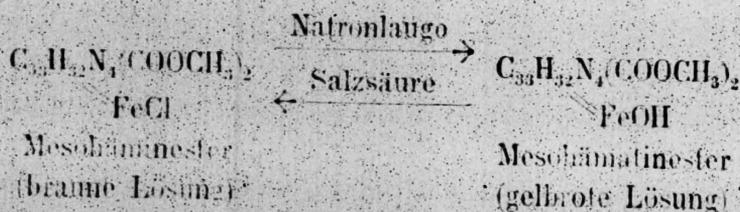
Für die Analyse wurde das Präparat im Hochvakuum bei  $105^\circ$  getrocknet.

- I. 0.2204 g Substanz gaben 0.0269 g  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  und 0.0563 g  $\text{AgCl}$  nach Carius.  
 II. 8.18 mg „ „ 0.642 ccm N bei 723 mm und  $21^\circ$  „ Pregl.

Berechnet	Gefunden:	
für $C_{33}H_{34}O_5N_4FeCl$ :	I.	II.
N = 8,73	—	8,67
Fe = 8,70	8,54	—
Cl = 5,53	5,64	—

Mesohämindimethylester. Von methylalkoholischer Salzsäure wird Mesohämin esterifiziert und die Dimethylverbindung krystallisiert gut aus, wenn Wasser zugegen ist. Wir versetzten die warme Lösung von 2,8 g Mesohämatin in 2,5 l Holzgeist mit 1 l konzentrierter Salzsäure; nach einigen Stunden war der Ester in prächtigen metallglänzenden braunen Nadeln auskrystallisiert, die auf dem Filter mit chlorwasserstoffhaltigem und mit wenig reinem Methylalkohol gewaschen wurden (Ausbeute 1,7 g).

Diese Esterbildung erfolgt merkwürdig rasch. Versetzt man eine Probe der methylalkoholischen Mesohämatinlösung mit Äther und gibt man vorsichtig verdünnte Natronlauge hinzu, so färbt sich der Äther nicht an, die Säure bleibt als Alkalisalz in der wässrigen Schicht. Wiederholt man diese Probe alsbald nach dem Zusatz der Salzsäure zur methylalkoholischen Lösung, so geht der gebildete Ester mit schön gelblich roter Farbe in den Äther, während die Alkalilauge sich kaum mehr anfärbt. Beim Durchschütteln der ätherischen Lösung mit verdünnter Salzsäure schlägt ihre Farbe in braun um, beim Versetzen mit Natronlauge wieder in gelbrot. In der ätherischen Schicht erfolgt die Reaktion:



Der Mesohämimester ist in Methyl- und Äthylalkohol in der Wärme leicht, kalt schwer löslich, in Äther unlöslich, aber sehr leicht löslich in Aceton und in Chloroform. Durch Auflösen in Pyridin und Eintragen in methylalkoholische Salzsäure läßt er sich umkrystallisieren, Häminester in gleicher Weise.

I.	0.1472 g	Substanz gaben	0.3398 g	CO <sub>2</sub> und	0.0730 g	H <sub>2</sub> O
II.	0.1796	»	0.4156	»	0.0881	»
III.	0.1384	»	8.32 ccm	N <sub>2</sub> -NH <sub>3</sub>	(nach Kjeldahl)	
IV.	0.2583	»	0.0291 g	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> und	0.0564 g	AgCl (nach Carius)
V.	0.1283	»	0.0147	»	Asche (Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )	
VI.	0.2028	»	0.1341	»	AgJ (nach Ziesel)	

Berechnet		Gefunden:					
für C <sub>33</sub> H <sub>37</sub> N <sub>3</sub> FeCl(COOCH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> :		I.	II.	III.	IV.	V.	VI.
C	= 62.72	62.96	63.02	—	—	—	—
H	= 5.71	5.55	5.49	—	—	—	—
N	= 8.37	—	—	8.42	—	—	—
Fe	= 8.34	—	—	—	7.88	8.00	—
Cl	= 5.30	—	—	—	5.40	—	—
2 OCH <sub>3</sub>	= 9.27	—	—	—	—	—	8.73

Hämatindimethylester. Auch Hämin, dessen Esterifizierung M. Nencki und J. Zaleski<sup>1)</sup> beschrieben haben, wird rasch esterifiziert; sein Ester ist über verdünnter Natronlauge gleichfalls leicht löslich in Äther. Der Hämatinester hat in Äther dieselbe schön gelbbrote Farbe wie die Mesoverbindung; schütteln wir die Lösung mit verdünnter Salzsäure, so schlägt ihre Farbe in braun um und das Chlorid, der Häminester, krystallisiert in glitzernden, schief abgeschnittenen Prismen vollständig aus. Beim Versetzen mit Lauge gehen sie wieder mit der roten Farbe in den Äther.

Aus einer größeren Menge Häminester wurde durch Verreiben mit Alkohol und Zusatz methylalkoholischer Kalilauge und Äther die prächtig rote und gelb tingierende Hämatinesterlösung gewonnen; nach starkem Einengen krystallisierte der Ester in dunklen Prismen von metallischem Glanz aus. Er ist in vielen Lösungsmitteln, in den Alkoholen, Äther, Aceton und Chloroform leicht löslich.

0.1329 g Substanz gaben 0.0154 g Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> und 0.0006 g AgCl (nach Carius).

Berechnet für C <sub>33</sub> H <sub>37</sub> O <sub>5</sub> N <sub>3</sub> Fe:	Gefunden:
Fe = 8.93	8.1
Cl = 0	0.11

### Mesoporphyrin.

Durch Abspaltung des Eisens gibt das Mesohämin in glatter Reaktion das entsprechende Porphyrin, ohne daß zugleich wie

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 30, S. 384, 399 (1900).

bei Hämin eine Addition von Wasser erfolgt. Wir ließen auf Mesohämin entweder Bromwasserstoff-Eisessig (Präp. A für die Analysen) oder konzentrierte Schwefelsäure (Präp. B) einwirken. z. B. lösten wir 1 g Mesohämin in käuflichen Bromwasserstoff-Eisessig, verdünnten nach eintägigem Stehen mit Wasser und führten die Substanz durch Abstumpfen der Säure in viel Äther über. Aus der ätherischen Lösung extrahierten wir, nachdem sie mit Wasser und mit 0,1% iger Salzsäure gewaschen worden, das Porphyrin mit 3% iger Säure. Die Auszüge wurden zuerst mit etwas Äther gewaschen, dann brachten wir unter Verdünnen und annäherndem Neutralisieren das Porphyrin wieder in viel Äther. Bei mäßigem Einengen krystallisierte es (0,6 g) in dünnen Prismen und Nadeln, deren Pulver hellbrotbraun ist: aus Alkohol, worin es sich ähnlich wie Hämaporphyrin beim Kochen beträchtlich löst und in der Kälte äußerst schwer löslich ist, schied es sich in einheitlich spindelförmigen Krystallen aus, die oft Durchwachsungszwillinge bildeten.

Unsere Analysen und die zahlreichen von Zaleski ermöglichten keine Entscheidung über die Formel. Sie stimmen für die Zusammensetzung  $C_{33}H_{36}O_4N_4$  des Hämaporphyrins und würden sich auch einer um 2 Wasserstoffatome reicheren Formel hinlänglich fügen.

## Präparat A.

I. 0,4799 g Substanz gaben 0,4741 g  $CO_2$  und 0,1097 g  $H_2O$ .

## Präparat B.

II. 0,1437 g Substanz gaben 0,3794 g  $CO_2$  und 0,0878 g  $H_2O$   
 III. 3,16 mg " " " 0,294 ccm N bei 712 mm u. 18° (nach Pregl)  
 IV. 4,05 " " " 0,390 " " " 712 " " 18°

Berechnet für

Gefunden:

Berechnet für		Gefunden:			
$C_{33}H_{35}O_4N_4$	$C_{33}H_{36}O_4N_4$	I.	II.	III.	IV.
C = 71,74	71,70	71,87	72,00	—	—
H = 6,91	6,57	6,82	6,84	—	—
N = 10,11	10,14	—	—	10,23	10,13

Zum Vergleich mit dem aus Hämin durch Erhitzen mit Alkali und Pyridin erhaltenen Porphyrin haben wir sowohl aus Hämin wie aus Hämaporphyrin Präparate von Mesoporphyrin nach den Angaben von J. Zaleski dargestellt und durch Fraktionieren mit verdünnter Salzsäure nach der Methode von

Willstätter und Mieg gereinigt.<sup>1)</sup> Aus der jodwasserstoffsauren Lösung wurde das Reduktionsprodukt durch Zusatz von Wasser und Abstumpfen der Säure mit Natriumacetat gefällt und der Niederschlag auf Talk filtriert. Dann brachten wir die Substanz durch Verreiben mit konzentrierter Salzsäure und Äther in Lösung und führten sie unter Verdünnen und Neutralisieren mit Ammoniak in sehr viel Äther über; amorphes Nebenprodukt, das auch in konzentrierter Säure braune Farbe zeigt, fiel dabei aus. Die ätherische Lösung extrahierten wir 3mal mit je 1 Liter 2%iger Salzsäure (für 1–2 g Mesoporphyrin), im Äther hinterblieb ein schwachbasischer Rest von brauner Farbe. Die leuchtend rote Salzsäurelösung ist rasch mit Äther gewaschen, dann mit viel Äther überschichtet und annähernd neutralisiert worden; aus der nun erhaltenen reinen ätherischen Lösung krystallisierte bei mäßigem Einengen das Mesoporphyrin in langen Prismen aus.

Präparat I aus Hämmin.

0.2062 g Substanz gaben 0.5435 g CO<sub>2</sub> und 0.12.0 g H<sub>2</sub>O.

Präparat II aus Hämatoporphyrin.

0.1720 g Substanz gaben 0.4337 g CO<sub>2</sub> und 0.1119 g H<sub>2</sub>O.

Gefunden:

	I.	II.
C =	71.88	71.94
H =	7.00	7.28

An der Identität der durch Abbau mit Alkalien erhaltenen Substanz mit dem Mesoporphyrin von Nencki und Zaleski war nach dem Vergleich nicht zu zweifeln. Die quantitative Bestimmung der Verteilung zwischen Äther und 0.50%iger Salzsäure ergab für die neue Darstellung die Verteilungszahl 12.9, für das Produkt der Reduktion mit Jodwasserstoff die Verteilungszahl 11.8. Die Bestimmung nach dem in unserer XXII. Abhandlung über Chlorophyll angeführten Verfahren ist in diesem Falle etwas weniger genau als sonst, weil infolge der

<sup>1)</sup> Die Versuche sind in der ersten Hälfte von 1912 ausgeführt worden; eine andere Verbesserung der Isolierung, in der Abscheidung des Natriumsalzes bestehend, haben vor kurzem H. Fischer, F. Bartholomäus und H. Röse veröffentlicht. Diese Zeitschrift, Bd. 84, S. 262 und 278 (1913).

Schwerlöslichkeit des Chlorhydrates etwas Verlust beim Überführen der Substanz aus Salzsäure in Äther vorkommt.

### V. Ätioporphyrin, $C_{51}H_{66}N_4$ .

Das Hämoporphyrin verhält sich beim Erhitzen mit Natronkalk ähnlich dem isomeren Rhodoporphyrin, die Abspaltung von Kohlensäure nimmt aber einen noch weniger glatten Verlauf, so daß viel sauerstoffhaltiges Nebenprodukt auftritt. Es ist vorzuziehen, da die Phylline ihre Carboxyle leichter verlieren als die Porphyrine, die Magnesiumverbindung des Hämoporphyrins für die Decarboxylierung anzuwenden und das Ätioporphyrin auf dem Umwege über das Ätiophyllin zu bilden, zu welchem wir vor kurzem durch den Abbau des Chlorophylls gelangt sind.

Für die Einführung des Magnesiums in die Porphyrine des Chlorophylls und Hämins haben Willstätter und Forsén<sup>1)</sup> zwei allgemein anwendbare Methoden gefunden, die Einwirkung von Grignardschen Lösungen und die Behandlung mit Magnesiumoxyd und methylalkoholischer Kalilauge. Mit der ersteren Methode hat kürzlich J. Zaleski<sup>2)</sup> unabhängig von der Veröffentlichung von Willstätter und Forsén die Magnesiumverbindung des Mesoporphyrins dargestellt: in unserem Falle ist die Magnesiummethode vorzuziehen, da man in einem einzigen Prozesse aus Hämoporphyrin das Magnesiumderivat des Hämoporphyrins in der für die weitere Verarbeitung geeigneten Form des Kaliumsalzes erhält.

Das Phyllin des Hämoporphyrins entsteht nämlich unmittelbar aus Hämoporphyrin beim Erhitzen auf 190° im Autoklaven in Mengen von 6 g mit 90 ccm methylalkoholischer Kalilauge und 2 g Magnesiumoxyd unter Zusatz von Pyridin (160 ccm). Nach dem Erkalten wurde die alkalische Flüssigkeit zur Entfernung des Pyridins mit 500 ccm Äther versetzt und die ausgefällte alkalische Schicht wiederholt mit Äther gewaschen. Dann verdünnten wir sie mit 200 ccm Wasser und fällten dadurch das Kaliumsalz des Phyllins in hellroten

<sup>1)</sup> Ann. d. Chem., Bd. 396, S. 180 (1913).

<sup>2)</sup> Chem. Ber., Bd. 46, S. 1687 (1913).

Flocken vollständig aus. Beim Ausschütteln mit Äther im Scheidetrichter sammelten sie sich an der Grenzschicht und ließen sich nach dem Ablassen der Lauge, die ein braunes Nebenprodukt entfernt, vom Äther abfiltrieren: die Ausbeute an der hochprozentigen Kaliumverbindung betrug 8 g. Beim Ansäuern einer Probe mit primärem Phosphat entstand das freie Phyllin: es ist in ätherischer Lösung fuchsienrot, fluoresciert stark und krystallisiert schön. Durch Säure wird es leicht in Hämoporphyrin mit der Salzsäurezahl  $3 \frac{1}{2}$  übergeführt.

Von dem Kaliumsalz dieses Phyllins vermischen wir je 1 g gründlich mit 5 g reinem (eisenfreiem) Natronkalk in der Reibschale und erhitzen, wie für Rhodophyllinsalz beschrieben, im Reagierrohr in vielen sehr kleinen Portionen rasch und vorsichtig über einer kleinen Flamme, wobei durch Bewegen das Anhaften der Substanz an der Glaswand verhütet wurde. Bei dem Eintritt eines Farbwechsels von Hellgrau in Braun war das Erhitzen sofort zu unterbrechen, aus der alkalischen Masse ging beim Anfeuchten und Ausschütteln mit reinem Äther das gebildete Phyllin in Lösung, unrein und daher braunrot. Die Auszüge vieler Portionen wurden zusammen mit konzentrierter methylalkoholischer Kalilauge, dann mit 4%iger Salzsäure durchgeschüttelt, wodurch sich ohne Zersetzung des Phyllins braune Beimischungen entfernen ließen. Es war wichtig, das Rohprodukt weiter mit Petroläther zu reinigen. Beim Versetzen der sehr konzentrierten ätherischen Lösung mit viel (z. B. 1 l) Petroläther fielen sofort und noch mehr beim Stehen Flocken von amorphem Nebenprodukt aus. Nach einer wiederholten derartigen Behandlung war die Lösung des Ätiophyllins prächtig violettrot und fluorescierte schön rot.

Nun spalteten wir aus dieser Verbindung mit Säure das Magnesium ab: während die ätherische Lösung des Ätiophyllins gegen wässrige Salzsäure auffallend beständig ist, z. B. bei einigem Schütteln mit 10%iger Salzsäure unverändert bleibt, genügt schon eine sehr verdünnte Säure (von 0.1 bis 0.05%) um bei der Einwirkung auf die Petrolätherlösung die Magnesiumverbindung zu zersetzen, sodaß die Farbe in den Bronzeton des Ätioporphyrins umschlägt. Um das Ätioporphyrin auf-

zunehmen, bedarf es freilich, entsprechend seiner Salzsäurezahl 3, einer stärkeren Säure.

Der große Unterschied im Verhalten der petrolätherischen und ätherischen Phyllinlösung beruht wahrscheinlich darauf, daß der Äther die komplexe Bindung des Magnesiums schützt, indem er eine beständige Verbindung mit dem Phyllin bildet. Wie die andern Phylline und ähnlich den Grignardschen Verbindungen enthält nämlich Ätiophyllin gebundenen Äther, der im Hochvakuum bei  $100^{\circ}$  abgegeben wird.

Wir zogen aus Petroläther mit 6%iger Salzsäure das Ätioporphyrin aus und führten es unter Neutralisieren wieder in Äther über. Während des Einengens begann bei einem Volumen von 0,5 l die Substanz sich abzuscheiden, indessen dampften wir rasch auf 100 ccm ein und ließen dann die Flüssigkeit stehen: nun krystallisierte das Ätioporphyrin vollständig aus in schönen und einheitlichen glänzenden spitzen Prismen. Die Ausbeute betrug 0,6 g aus 25 g Hämatoporphyrin, bei einem anderen Versuche 0,3 g aus 9 g.

Die exsikkatortrocknen Präparate erlitten im Hochvakuum bei  $100^{\circ}$  einen Gewichtsverlust von 1–3%; ihre basischen Eigenschaften änderten sich nicht beim Trocknen. Die Substanz war ohne Umkrystallisation aschefrei; obwohl sie ganz einheitlich und ebenso rein zu sein schien wie die Präparate aus Chlorophyllderivaten, ergaben unsere Analysen etwas zu niedere Werte.

Präparat I. 0,1645 g Substanz gaben 0,4800 g  $\text{CO}_2$  und 0,1067 g  $\text{H}_2\text{O}$

II. 0,1526 " " " 0,4450 " " 0,1009 "

Berechnet	Gefunden:	
für $\text{C}_{51}\text{H}_{30}\text{N}_4$	I.	II.
C = 80,11	79,58	79,53
H = 7,82	7,26	7,40

Zur weiteren Reinigung führten wir die Substanz in ihr styphninsäures Salz über, das gut krystallisiert, indessen von überschüssiger Styphninsäure nicht leicht ganz zu trennen ist. Das Porphyrin ließ sich am besten durch Auflösen in alkoholhaltiger 20%iger Salzsäure und Abstumpfen der Säure mit Ammoniak in Äther überführen. Beim Versetzen mit ätherischer Styphninsäure fielen wenige Flocken und dunkle Partikel aus,

aber nach dem Einengen prächtige Krystalle des Styphnates, rubinrote trigonale Pyramiden mit gerundeten Kanten. Das Salz zersetzt sich beim Erhitzen, sintert und schmilzt bei  $170^{\circ}$  wie das Styphnat des Präparates aus Phylloporphyrin. Die Verbindung ist mit Wasser und Äther zerlegt und das Porphyrin beim Einengen wieder in Krystallen erhalten worden, die im Hochvakuum nur  $0,3\%$  an Gewicht verloren.

0,1595 g Substanz gaben 0,4643 g  $\text{CO}_2$  und 0,1076 g  $\text{H}_2\text{O}$

Berechnet	Gefunden
für $\text{C}_{31}\text{H}_{36}\text{N}_4$ :	
C = 80,11	79,39
H = 7,82	7,55

Trotz der schwer erklärlichen Abweichungen der Analyse, die auf eine nicht ganz genügende Reinheit hindeuten, halten wir die Identität der Substanz mit dem Ätioporphyrin aus den Chlorophyllderivaten für sicher. Die Übereinstimmung in allen Eigenschaften und die quantitative Bestimmung der Verteilung zwischen Salzsäure und Äther, der Verteilungszahl, ist dafür beweisend. Wir finden für  $3\%$  ige Salzsäure (an diese gibt die ätherische Lösung etwa  $\frac{2}{3}$  der Substanz ab) die Verteilungszahl 43 und hatten für die Darstellung aus Chlorophyll 40 ermittelt.

Das Ätioporphyrin der neuen Herkunft ist in Alkohol und Petroläther schwer, in Eisessig leicht löslich mit prächtig blau-roter Farbe, während es in Äther bronzerot ist. Beim Verdunsten einer petrolätherischen Lösung krystallisiert es in kleinen, rotbraunen, schief begrenzten Prismen; das Pulver hat die Farbe von Alizarin auf Chrombeize. Es schmilzt allmählich bei  $265^{\circ}$  (unter Zersetzung), etwas tiefer als das Präparat aus Phylloporphyrin ( $280^{\circ}$ ).

Absorptionsspektrum. Die ätherische Lösung stimmt, wie die Figur und die folgenden Zahlen zeigen, in ihrem charakteristischen Spektrum mit unseren früheren Messungen überein. Wir beobachten hauptsächlich 4 starke Bänder; ein besonders dunkles und scharfes liegt in Blau (VIII), ein anderes breites in Grün, ein eigentümlich gegliedertes in der gelbgrünen Region und im Orange ein schmales Band, dem gegen Gelb hin ein Schatten folgt.

0.0464 g in 1 l Äther (C<sub>1000</sub> Mol. in 10 l)

Schicht in mm . . .	20	80
Band I . . . . .	—	649/641
II . . . . .	624—619	634/627—617 . . . 609
III . . . . .	613·609	—
IV . . . . .	598/593	598·593
V . . . . .	581 . . . 572	588·581—562 . . 556
VI . . . . .	568—565/556	—
VII . . . . .	536/531—522·518	537—547
VIII . . . . .	506—478	513—480·465
Endabsorption . . .	433—	443—
Reihenfolge nach der Intensität: Endabsorption, VIII, VII, II, VI, V, III, IV, I.		

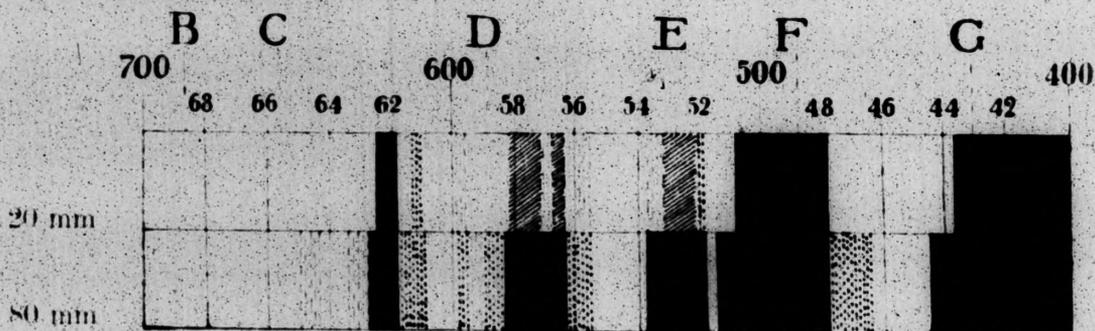


Fig. 2.

In das Ätioporphyrin läßt sich Eisen einführen, wenn man es in Eisessig mit Eisenchlorid und etwas Natriumacetat erwärmt. Ohne den Zusatz von Natriumacetat erfolgt die Substitution nicht, so gibt die ätherische Lösung mit Eisenchlorid nur die hellrote flockige Fällung eines lockeren Additionsproduktes, das schon von Wasser zerlegt wird.

Die Ferriverbindung, braunrot in Ätherlösung, ist zum Unterschied vom Ätioporphyrin noch gegen 20%ige Salzsäure indifferent, stärkere Salzsäure nimmt ohne Abspaltung des Eisens die komplexe Verbindung auf. Mit Alkali reagiert ihre ätherische Lösung sofort wie Häminester und Mesohäminester, sie wird braun und nimmt intensives gelbes Tingieren an. Dabei erfolgt die Umwandlung des Chlorides in die Base nach der Gleichung:  $C_{31}H_{34}N_4FeCl + NaOH = C_{31}H_{34}N_4FeOH + NaCl$ .