

Einwirkung von Alkoholaten auf Hämin und seine Derivate.

II. Mitteilung.

Überführung von Hämin in Mesohämin.

Von

Hans Fischer und Heinrich Röse.

(Aus der II. medizinischen Klinik zu München).
(Der Redaktion zugegangen am 15. August 1913.)

Vor kurzem teilten Fischer und Hahn¹⁾ mit, daß es gelungen ist, die Molekulargröße des Hämins zu 600 zu ermitteln. Eine Bestätigung dieses Resultates auf chemischem Wege schien erwünscht und wir setzten daher die in der ersten Mitteilung über die Einwirkung von Alkoholat auf Hämin bereits begonnenen Versuche, Hämin im ganzen unter Erhaltung des komplex gebundenen Eisens in Mesoporphyrin überzuführen, fort. Diese Bemühungen waren nun erfolgreich; es ist uns gelungen, sowohl durch methylalkoholische Kalilauge wie Kaliumäthylat das krystallisierte Eisensalz des Mesoporphyrins, für das wir den Namen Mesohämin vorschlagen, zu erhalten.

Hiermit ist bewiesen, daß das Hämin vier Pyrrolkerne enthält, und die Schlußfolgerungen aus den beim Mesoporphyrin erhaltenen Resultaten können ohne weiteres auf das Hämin übertragen werden, natürlich unter Berücksichtigung der Tatsache, daß Mesoporphyrin ein Reduktionsprodukt des Hämins ist. Abspaltung einer Carboxylgruppe, wie sie ja beim Abbau des Chlorophylls durch Alkali nach Willstätter stattfindet, konnte bis jetzt nicht erzielt werden. Die Versuche werden jedoch fortgesetzt.

Weiterhin wurde dann Hämatoporphyrin mit Alkoholaten behandelt und auch hier die Entstehung des Mesoporphyrins

¹⁾ Chem. Ber., Bd. 45, S. 2308.

sehr wahrscheinlich gemacht. Sicher gestellt ist, daß auch hier die Äthylgruppe des Hämopyrrolanteiles erzeugt wird, denn bei der Oxydation erhielten wir Methyläthylmaleinimid.

Die Ausbeute an Imid war recht schlecht, so daß jedenfalls nur wenig Mesoporphyrin entstanden war, sicher weniger als aus Hämin. Dieser Befund spricht für die Küstersche Auffassung der Hämatoporphyrinbildung, da bei Vorhandensein einer Vinylgruppe im Hämatoporphyrin eigentlich ein ebenso glatter Übergang in Mesoporphyrin wie beim Hämin zu erwarten wäre, zum mindesten in bezug auf die Reduktion der ungesättigten Seitenkette. In Übereinstimmung damit stehen auch die Befunde von Fischer und Hahn,¹⁾ die beim Hämin durch Einwirkung von Wasserstoff bei Gegenwart von kolloidalem Palladium leicht die Hydrierung der Vinylgruppe erzielten, indem bei darauf folgender Oxydation Methyläthylmaleinimid erhalten wurde, während dies beim Hämatoporphyrin nach analoger Behandlung noch nicht gelungen ist.

Wie wir schon früher²⁾ feststellten, besitzt das Porphyrinogen, die Leukobase des Mesoporphyrins, stärker sensibilisierende Wirkung als das Mesoporphyrin, und wir zogen hieraus den Schluß, daß entweder das farblose Porphyrinogen selbst sensibilisierende Wirkung besitzt, oder daß es im Organismus in ein noch unbekanntes Porphyrin übergeht. Letztere Anschauung hielten wir für die wahrscheinlichere, weil die Sensibilisierung durch Licht bei den mit Porphyrinogen behandelten Tieren erst am folgenden Tag eintrat. Es lag nun nahe, das Hämatoporphyrinogen gleichfalls auf sensibilisierende Wirkung zu prüfen.

Das Hämatoporphyrinogen ist nun noch nicht dargestellt und wir versuchten es mit Hilfe der Natriumamalgamreduktion aus Hämatoporphyrin zu erhalten. Alle Bemühungen waren jedoch vergeblich, wir konnten den Körper bis jetzt nicht in kristallisiertem Zustand gewinnen. Wenn nun die zur Farblosigkeit reduzierte Lösung tatsächlich das Hämatoporphyrinogen enthält, so konnte man ja auch direkt diese Lösung verwenden.

¹⁾ Die Publikation der noch nicht völlig abgeschlossenen Versuche erfolgt demnächst.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 84, S. 262.

Hindernd stand im Wege, daß Piloty¹⁾ ausdrücklich festgestellt hat, daß diese nicht die Leukobase des Hämatoporphyrins enthält, indem durch Luftoxydation Desoxyhämatoporphyrin, ein nicht krystallisierender Körper, entsteht, der ein Sauerstoffatom weniger enthalten soll als das Hämatoporphyrin. Diese Feststellung ist nun irrtümlich, man erhält leicht und ohne Schwierigkeit durch Luftoxydation des mit Natriumamalgam zur Farblosigkeit reduzierten Hämatoporphyrins den Farbstoff in schön krystallisiertem Zustand zurück (Ausbeute ca. 30%). Nachdem so festgestellt war, daß die mit Natriumamalgam reduzierte Lösung des Hämatoporphyrins tatsächlich in beträchtlichen Mengen die Leukobase dieses Farbstoffes enthält, spritzten wir die Lösung direkt Meerschweinchen ein. Bei Belichtung am gleichen zeigten sich keinerlei und am folgenden Tage keine ausgeprägten Erscheinungen. Am dritten Tage trat hochgradige Sensibilisierung ein, sodaß an dem Übergang in ein stark wirkendes Porphyrin nicht zu zweifeln ist, auch war das Porphyrin im Kot spektroskopisch nachweisbar.

Die Konstatierung der Tatsache, daß die Leukobasen der beiden bis jetzt bekannten Porphyrine primär unwirksam sind, erklärt vielleicht mancherlei widersprechende Erscheinungen bei der menschlichen Hämatoporphyrinurie, je nachdem bei dieser Erkrankung der Farbstoff oder seine Leukobase auftritt. Es ist dabei sehr wohl denkbar, daß der Farbstoff nur zeitweise gebildet wird, und zu diesen Zeiten würden dann Krankheitserscheinungen auftreten, während im übrigen der betreffende Mensch normal wäre.

Die stillschweigende Voraussetzung ist dabei natürlich, daß bei der Hämatoporphyrinurie tatsächlich die Ausscheidung des Farbstoffes nicht etwa nur ein mehr oder weniger unwichtiges Symptom ist, sondern die Krankheitsursache. Bewiesen ist dies nicht, jedoch wissen wir durch den kühnen Selbstversuch von F. Meyer-Betz,²⁾ daß Hämatoporphyrin intravenös beigebracht den Menschen nach der Belichtung krank macht, ganz analog den Tierversuchen. Man kann daher jetzt

¹⁾ A., Bd. 377, S. 355—358.

²⁾ Deutsch. Archiv für klin. Mediz., Bd. 112.

wohl alle im Tierexperiment gewonnenen Resultate mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit auf den Menschen übertragen.

Natürlich könnte man sich auch vorstellen, daß die Leukobase eines Porphyrins ein normales intermediäres Stoffwechselprodukt ist, das gewöhnlich weiter abgebaut bzw. in Bilirubin umgewandelt wird, während die Oxydation zum Farbstoff (Porphyrin) pathologisch ist. Wir beabsichtigen, dieses Kapitel weiter zu bearbeiten, das noch ein besonderes Interesse dadurch erhält, daß die Ausscheidung einer Porphyrinleukobase inzwischen bei einem Falle von Porphyrinurie von Herrn Dr. Schumm in Hamburg (gütige Privatmitteilung) tatsächlich beobachtet worden ist.

I. Gewinnung von Mesohämin aus Hämin durch methylalkoholische Kalilauge.

25 g Hämin wurden in eine Lösung von 50 g Kalihydrat in 200 ccm Methylalkohol und 15 ccm Wasser eingerührt. Im Autoklaven wurde die Temperatur 5 Stunden lang auf 225° gehalten (48—51 Atmosphären Druck). Nach dem Erkalten war nur wenig Druck vorhanden und es wurde zunächst mit Wasserdampf abgetrieben, wobei nur Spuren eines an der Luft sich schnell gelb färbenden Öles abgetrieben wurden. Die hinterbliebene Lösung wurde nach der Filtration mit Salzsäure angesäuert, abgesaugt und mit Wasser ausgewaschen. Noch feucht wurde der Niederschlag sehr sorgfältig in einer geräumigen Porzellanschale mit 96%igem Alkohol verrieben und der gleichmäßige Brei in eine 2 l-Flasche eingefüllt. Nach mehrstündigem Schütteln auf der Maschine wurde der in Alkohol unlösliche Teil abfiltriert. Dieser wog 10,3 g und gab nach dem Behandeln mit Eisessigbromwasserstoff 1,1 g reines salzsaures Mesoporphyrin.

Beim Eingießen der Eisessigbromwasserstofflösung in Wasser fiel die Hauptmenge wieder aus und diese gab auch nach der Behandlung mit Eisessig-Jodwasserstoff kein Mesoporphyrin.

Das Filtrat vom alkoholunlöslichen Teil schied beim Eindunsten bald große Mengen körniger Substanz ab, die

unter dem Mikroskop sich als nicht krystallisiert erwies. Es wurden so im ganzen 13 g dieses körnigen Produktes gewonnen, das eisenhaltig war. 10 g dieses Körpers wurden mit Eisessigbromwasserstoff auf Mesoporphyrin verarbeitet und insgesamt 5,3 g reines salzsaures Mesoporphyrin erhalten. Zur weiteren Identifizierung führten wir dieses analog dem von uns angegebenen Veresterungsverfahren der Phonopyrrolcarbonsäure in den schon von Zaleski erhaltenen Diäthylester des Mesoporphyrins über: 4 g salzsaures Mesoporphyrin wurden in 80 ccm Äthylalkohol suspendiert und Salzsäure bis zur Sättigung eingeleitet. Nach 12stündigem Stehen wurde in viel Wasser gegossen, mit Natronlauge die Salzsäure zum größeren Teil abgestumpft, abgesaugt und mit Wasser ausgewaschen. Der Rückstand wurde aus Äthylalkohol zweimal umkrystallisiert, wobei die von Zaleski beschriebenen schiefwinkeligen Blättchen erhalten wurden. Schmelzpunkt 198 bis 200°. Die Analyse bestätigte das Vorliegen des Esters.

0,2210 g Substanz gaben 0,5925 g CO₂ und 0,1550 g H₂O.

0,2037 » » » 17 ccm N (18° 719 mm).

C₃₈H₄₀N₄O₄ (622,41). Berechnet: C 73,26% H 7,45% N 9,00%.

Gefunden: C 73,12% H 7,84% N 9,14%.

3 g des in Alkohol löslichen Teiles wurden in einer Reibschale mit Äther zerrieben, einige Stunden auf der Maschine geschüttelt und abgesaugt. Der Rückstand (2,3 g) wurde in 7,5 ccm Pyridin gelöst, mit 12,5 ccm Chloroform verdünnt, filtriert und das Filtrat in 175 ccm auf 105° erhitzten Eisessig, der mit Kochsalz gesättigt war und 2,5 ccm konzentrierte Salzsäure enthielt, eingetragen. Beim Erkalten schieden sich 1,2 g chlorhaltiges schön krystallisiertes Eisensalz ab, das sich in nichts von dem nach Zaleski synthetisch aus Mesoporphyrin gewonnenen Eisensalz unterschied. Die vergleichende spektroskopische Untersuchung ergab keinen Unterschied und die Analyse bestätigte die Identität.

0,1890 g Substanz gaben 0,4268 g CO₂ und 0,1017 g H₂O.

0,2208 » » » 17 ccm N (19°, 717 mm).

0,2083 » » » 0,0243 g Fe₂O₃.

C₃₄H₃₆O₄N₄ClFe (655,63). Berechnet: C 62,23% H 5,54% N 8,55% Fe 8,52.

Gefunden: C 61,58% H 6,08% N 8,37% Fe 8,16.

Die Gesamtausbeute an Mesoporphyrin bei diesem Versuch beträgt ca. 32%, steht also nicht hinter der durch Eisessigjodwasserstoff aus Hämin erhaltenen zurück.

Zur völligen Sicherung des erhaltenen Resultates haben wir den gleichen Versuch in der gleichen Weise wiederholt und die Gesamtmenge des alkohollöslichen Teiles auf Mesohämin verarbeitet. Das aus der alkoholischen Lösung beim Eindunsten abgeschiedene körnige Produkt wurde scharf abgesaugt und noch feucht mit viel Äther einige Stunden unter Zusatz von Glasperlen geschüttelt. Der trockene Rückstand wog 10 g. Er wurde mit Hilfe von 30 ccm Pyridin und 50 ccm Chloroform in Lösung gebracht und nach der Filtration in 700 ccm Eisessig, der mit 10 ccm gesättigter Kochsalzlösung und 10 ccm konzentrierter Salzsäure versetzt und auf 110° erhitzt war, eingetragen. Nach eintägigem Stehen wurden 5,6 g schön kristallisiertes Mesohämin erhalten. Die Mutterlauge gab beim weiteren Stehen noch 0,7 g. Die Elementaranalyse bestätigte wiederum das Vorliegen des gesuchten Körpers.

0,2385 g Substanz gaben 0,5431 g CO₂ und 0,1252 g H₂O.

0,1960 „ „ „ 15,4 ccm N (18°, 718 mm).

0,1915 „ „ „ 0,0410 g AgCl.

0,1975 „ „ „ 0,0240 „ Fe₂O₃.

C₃₄H₃₆O₄N₄ClFe (655,63).

Berechnet: C 62,23% H 5,54% N 8,55% Cl 5,41% Fe 8,52%.

Gefunden: C 62,10% H 5,87% N 8,60% Cl 5,30% Fe 8,50%.

Natürlich kann die Analyse allein nicht entscheiden zwischen Hämin und Mesohämin und deshalb wurde 1 g des Eisensalzes in der früher beschriebenen Weise durch Eisessigbromwasserstoff in Mesoporphyrin übergeführt, das als salzsaures Salz isoliert wurde. Ausbeute 0,5 g.

0,1539 g Substanz gaben 0,3593 g CO₂ u. 0,0930 g H₂O.

0,1300 „ „ „ 10,5 ccm N (17° 715 mm).

C₃₄H₄₀O₄N₄Cl₂. Berechnet: C = 63,84% H = 6,26% N = 8,76%.

Gefunden: C = 63,67% H = 6,76% N = 8,83%.

II. Gewinnung von Mesohämin aus Hämin durch Kaliumäthylat.

50 g Kalium wurden in 290 g Äthylalkohol gelöst, und in diese Lösung 25 g Hämin eingetragen. Die Temperatur im Innern des Autoklaven stieg nicht über 175°. Wie aus der bei-

gegebenen Tabelle (II) hervorgeht, verlief die Reaktion außerordentlich gleichmäßig. Nach dem Erkalten war kaum noch Druck vorhanden. Es wurde zunächst mit Dampf destilliert, jedoch gingen nur Spuren eines Öles über. Die dunkelgefärbte Mutterlauge wurde nach der Filtration mit Essigsäure angesäuert, der voluminöse Niederschlag abgesaugt und mit Wasser ausgewaschen. Im Filtrat waren keine Pyrrole oder höchstens Spuren vorhanden.

Der Niederschlag wurde in einer Reibschale noch feucht mit 96%igem Alkohol verrieben, mit Hilfe von Alkohol in eine 2 l-Flasche gespült, sodaß die Alkoholmenge im ganzen ca. 1 l betrug. Nach mehrstündigem Schütteln auf der Maschine wurde filtriert. Der mit Alkohol ausgewaschene Rückstand wog nach dem Trocknen 10,3 g.

Das Filtrat wurde eingedunstet und bald schieden sich körnige, aber nicht krystallisierte Massen ab, die abgesaugt wurden (9,8 g). Diese 9,8 g wurden in 27 ccm Pyridin mit 45 ccm Chloroform einige Zeit geschüttelt, wobei der größte Teil in Lösung ging. Die klar filtrierte Lösung wurde langsam in 630 ccm Eisessig, der mit 9 ccm Salzsäure conc. und 9 ccm gesättigter Kochsalzlösung versetzt und auf 105° erhitzt war, eingetragen. Nach 48 Stunden hatten sich reichliche Mengen (4,1 g) krystallisierten Eisensalzes abgeschieden. Daß es sich um Mesohämin handelte, wurde durch Überführung in Mesoporphyrin durch Eisessigbromwasserstoff bewiesen.

Es konnte nun der Einwand gemacht werden, daß bei der bisherigen Gewinnung von Mesohämin, bei der ja das Erhitzen mit den Alkoholaten im eisernen Autoklaven ausgeführt war, dieser Umstand die Entstehung des Eisensalzes bedingen würde. Deshalb wurde der gleiche Versuch, wie eben geschildert, in gläsernen Röhren wiederholt. Das Resultat war das gleiche:

21,5 g Kalium wurden in 160 ccm absolutem Alkohol gelöst und hierzu 10 g fein gepulvertes Hämin gegeben. Die Mischung wurde in 2 schwer schmelzbaren Jenaer Glasröhren 5 Stunden lang auf 175° erhitzt. Die Verarbeitung war im wesentlichen, wie oben beschrieben, der in Alkohol lösliche Teil wog 5,6 g, nach dem Schütteln mit Äther noch 4,8 g. Diese wurden mit

Hilfe von 15 ccm Pyridin und 25 ccm Chloroform gelöst und nach der Filtration eingetragen in 350 ccm heißen Eisessig, der 5 ccm Salzsäure und 5 ccm Kochsalz enthielt. Ausbeute 2,5 g schön krystallisiertes Mesohämin. Die Elementaranalyse bestätigte das Vorliegen der gesuchten Verbindung.

0,1825 g Substanz gaben	0,4112 g CO ₂	und 0,0952 g H ₂ O.
0,1734 „ „ „	13,6 ccm N (18°, 718 mm).	
0,1928 „ „ „	0,0418 g AgCl.	
0,1707 „ „ „	0,0210 „ Fe ₂ O ₃ .	

C₃₄H₃₆O₄N₄ClFe. Ber.: C 62,23% H 5,54% N 8,55% Cl 5,41% Fe 8,52%
 Gef.: C 61,45% H 5,84% N 8,58% Cl 5,36% Fe 8,60%

2 g des Eisensalzes wurden mit Hilfe von Eisessigbromwasserstoff in das zugehörige Porphyrin übergeführt. Erhalten wurde 1 g salzsaures Mesoporphyrin, das mit Hilfe von Äthylalkohol und Salzsäure in der oben beschriebenen Weise in den schön krystallisierenden Ester übergeführt wurde. F. P. 199 bis 200°. Die Elementaranalyse bestätigte das Vorliegen des Esters.

0,1700 g Substanz gaben	0,4533 g CO ₂	und 0,1268 g H ₂ O.
0,2175 „ „ „	18,1 ccm (18°, 718 mm).	

C₃₃H₁₆N₄O₄ (622,41). Berechnet: C 73,26% H 7,45% N 9,00%
 Gefunden: C 72,72% H 8,35% N 9,11%

Es sei ausdrücklich hervorgehoben, daß nur peinlichste Beobachtung der oben angegebenen Vorschriften zu dem krystallisierten Eisensalz des Mesoporphyrins führt, relativ geringfügige Abweichungen in der Alkalikonzentration führen zwar die Reduktion zum Mesoporphyrin auch herbei, aber es gelingt nicht, das krystallisierte Eisensalz zu erhalten. So gelang es nicht, unter den in Versuch IV in der ersten Mitteilung angegebenen Bedingungen das krystallisierte Eisensalz zu erhalten. Ebenso negativ verlief ein Versuch, bei dem die Alkalikonzentration etwas höher war:

72 g Ätzkali wurden in 200 g Holzgeist gelöst, 15 g Wasser zugegeben und 25 g fein gepulvertes Hämin eingetragen (III). Nach 5stündigem Erhitzen auf 225° wurde der Autoklavinhalt in der oben beschriebenen Weise verarbeitet. Im Alkohol löste sich fast nichts (1,7 g) und hieraus konnte kein Mesohämin gewonnen werden. Der in Alkohol unlösliche Teil wog 21,5 g und hieraus konnte (aus einer Probe) leicht mit Hilfe

von Eisessigbromwasserstoff krystallisiertes salzsaures Mesoporphyrin erhalten werden, dessen Vorliegen durch Überführung in den bei 198° schmelzenden Ester sicher gestellt wurde. Eine weitere Probe wurde in der schon oft beschriebenen Weise mit Bleisuperoxyd oxydiert und Methyläthylmaleinimid vom Schmelzpunkt $66\text{--}67^{\circ}$ erhalten.

III. Reduktionsversuche des Hämatoporphyrins zum Mesoporphyrin durch Alkoholate.

4 g Kalium wurden in 23 g absolutem Alkohol gelöst und nach Zugabe von 2 g salzsaurem Hämatoporphyrin 5 Stunden auf 175° im zugeschmolzenen Rohr erhitzt. Nach Erkalten des Rohres wurde der Inhalt mit Wasser herausgespült und nach dem Ansäuern mit Essigsäure der voluminöse Niederschlag abgesaugt. Dieser wurde in verdünnter Natronlauge gelöst, filtriert und durch Zusatz von wenig konzentrierter Natronlauge ein schwer lösliches Natronsalz abgeschieden. Durch Umkrystallisieren aus heißer 2,5%iger Salzsäure wurden 0,15 g Porphyrin vom Aussehen des Mesoporphyrins erhalten. Dieses wurde durch Alkohol und Salzsäure in den Ester übergeführt, der gegen 190° schmolz (statt 200°), also nicht rein war. Aus der Mutterlauge des salzsauren Salzes wurde durch Eintragen von Natriumacetat das freie Porphyrin isoliert und in der üblichen Weise mit Bleisuperoxyd oxydiert. Hierbei wurden kleine Mengen von Methyläthylmaleinimid isoliert.

Ein zweiter Versuch wurde mit Kaliummethylat bei 200° ausgeführt. Zu einer Lösung von 4 g Kalium in 16 ccm Methylalkohol wurden 2 g fein gepulvertes salzsaures Hämatoporphyrin gegeben und $3\frac{1}{2}$ Stunden lang im zugeschmolzenen Rohr auf 200° erhitzt. Die Verarbeitung war die gleiche wie eben beschrieben, nur wurde auf die Isolierung des Porphyrins verzichtet, und die Gesamtmenge mit Bleisuperoxyd in der üblichen Weise oxydiert. Es wurde eine kleine Menge von Methyläthylmaleinimid erhalten, das nach einmaligem Umkrystallisieren bei $67\text{--}68^{\circ}$ schmolz. Der Mischschmelzpunkt mit synthetischem Imid ergab keine Depression. Die Reduktionsversuche des Hämatoporphyrins durch Alkoholate werden selbstverständlich fortgesetzt.

Reduktion von Hämatoporphyrin durch Natriumamalgam zur Leukobase und Rückoxydation zu kristallisiertem Hämatoporphyrin.

5 g reines Hämatoporphyrin wurden in 400 ccm Wasser unter Zusatz von 100 ccm Normalnatronlauge gelöst und mit 100 g 3%igem Natriumamalgam bis zur Farblosigkeit geschüttelt. Es wurde nun vom Quecksilber getrennt und 4 Tage lang ein kräftiger Luftstrom durchgesaugt. Nach dieser Zeit hatte sich eine beträchtliche Menge Natronsalz abgeschieden, von dem abfiltriert wurde. Aus dem Filtrat wurden durch Zusatz von 30 ccm konzentrierter Natronlauge weitere Mengen von Natronsalz erhalten. Nach dem Auswaschen mit verdünnter Natronlauge wurden die vereinigten Natronsalze mit kalter 2,5%iger Salzsäure digeriert und schnell filtriert. Nach kurzer Zeit schieden sich 1,45 g absolut einheitlich kristallisiertes Porphyrin ab, das durch Eigenschaften und Elementaranalyse als Hämatoporphyrin erkannt wurde.

0,3009 g Substanz gaben 0,6680 g CO₂ und 0,1733 g H₂O.

0,2465 „ „ „ 18,2 ccm N (18°, 716 mm).

0,2850 „ „ „ 0,1235 g AgCl.

C₃₄H₄₀O₆N₄Cl₂ (671,28). Ber.: C 60,78% H 6,01% N 8,35% Cl 10,56%.

Gef.: C 60,55% H 6,44% N 8,06% Cl 10,72%.

IV. Aufspaltung von Hämin durch Kaliumäthylat.

50 g Kalium wurden in 290 ccm absolutem Alkohol gelöst und in einen eisernen Autoklaven von ca. 1 l eingefüllt. Nachdem 25 g fein gepulvertes Hämin in diese Lösung eingerührt waren, wurde der Autoklav verschlossen. Wie bei den früheren Versuchen wurde im Ölbad erhitzt; die einzelnen Daten über Zeit, Temperatur und Druck sind aus der beiliegenden Tabelle (IV) zu ersehen. Nach 3stündigem Erhitzen auf 225° wurde der Versuch unterbrochen und erkalten gelassen. Am nächsten Morgen betrug der Druck noch 25 Atmosphären. Die Bombe wurde jetzt geöffnet, der hellgelb gefärbte Inhalt ausgeschöpft und mit Dampf eine reichliche Menge eines übelriechenden Öles abgetrieben. Das Öl wurde in Äther gelöst, die Mutterlauge noch zweimal ausgeäthert und in die vereinigten

ätherischen Lösungen solange gepulverte Pikrinsäure eingetragen, bis sich nichts mehr löste. Jetzt wurde in Eis gestellt und alsbald begann die Krystallisation eines hellgelb gefärbten Pikrates, das nach dem Absaugen und Trocknen im Vakuum 2,5 g wog. Durch Umkrystallisieren aus 20 ccm Alkohol wurden 1,5 g reines Pikrat erhalten, das den Schmelzpunkt 95—96° zeigte. Nach der Analyse lag das Pikrat eines Dimethyldiäthylpyrrols vor.

0,1838 g Substanz gaben 0,3413 g CO₂ und 0,1010 g H₂O.

0,2882 „ „ „ 38,9 ccm N (17°, 722 mm).

C₁₆H₂₀N₄O₇ (380,20). Berechnet: C 50,50% H 5,30% N 14,74%.

Gefunden: C 50,62% H 6,15% N 14,88%.

Die Mutterlauge der Dampfdestillation wurde in der früher beschriebenen Weise auf tetrasubstituierte Säure verarbeitet, bis jetzt ohne Erfolg. Auch bei einem neuen Versuch (V), bei dem die Temperatur bei 205° gehalten wurde, konnte keine Säure isoliert werden. Dies ist sehr auffallend; die Versuche zur Gewinnung der Säure werden auf jeden Fall fortgesetzt.

Tierversuche.

Zu den Tierversuchen wurden wieder Meerschweinchen¹⁾ benützt. Die Versuchsanordnung war die gleiche wie früher, d. h. die erste Belichtung wurde am Tage nach der Einspritzung vorgenommen, um etwaige anderweite durch die Injektion an sich hervorgerufene schädigende Wirkungen auszuschließen.

0,2 g salzsaures Hämatoporphyrin wurden in 16 ccm Wasser gelöst, 4 ccm Normalnatronlauge zugegeben und mit 4 g Amalgam (3%ig) zur Farblosigkeit reduziert. Die Hälfte der Lösung wurde einem ca. 300 g schweren, gescheckten Meerschweinchen am 31. Juli eingespritzt. Am andern Morgen wurde das völlig gesunde Tier von 9—11 Uhr dem Sonnenlicht ausgesetzt, ohne daß irgend welche Erscheinungen auftraten. Abends bekam das Tier 0,05 g Hämatoporphyrin in schwach alkalischer Lösung eingespritzt. Am 2. August wurde es von 9¹⁰—10⁵⁰ Uhr bestrahlt. Es trat nur schwache Schwellung der Schnauze und

¹⁾ Bei Abfassung der ersten Arbeit über Sensibilisierung war uns entgangen, daß schon H. Pfeiffer (Abderhaldens biochem. Arbeitsmethoden, Bd. 5, S. 562) diese Tiere für derartige Versuche verwandt hat.

der Augenlider ein, während ein mit Hämatoporphyrin gleich behandeltes an Gewicht und Farbe ähnliches Kontrolltier nach 2 stündiger Belichtung die allerschwersten Erscheinungen zeigte. Die Schnauze war unförmig geschwollen, das linke Auge verklebt, das rechte war noch schwach geöffnet. Es traten Atembeschwerden ein und das Tier wurde deshalb getötet.

Aus Versuch I ergibt sich, daß auch Hämatoporphyrin bei gescheckten Tieren gelegentlich weniger starke Erscheinungen hervorrufen kann, und wir spritzten deshalb bei den jetzt folgenden Versuchen den Meerschweinchen am dritten Tage Hämatoporphyrin ein, um uns zu überzeugen, daß diese Tiere sensibilisierbar waren. (Näheres geht aus den Versuchsprotokollen hervor.) 0,15 g salzsaures Hämatoporphyrin wurden in 12 ccm Wasser, 3 ccm Normalnatronlauge mit 3 g 3%igem Natriumamalgam zur Farblosigkeit reduziert und hiervon, 0,1 g entsprechend, einem 575 g schweren, gescheckten Meerschweinchen eingespritzt. Am andern Tage wurde es von 9^{10} — 10^{50} bestrahlt. Es sprang ab und zu in die Höhe, zeigte aber sonst keinerlei besondere Erscheinungen. Am Abend desselben Tages bekam das völlig gesunde Tier 0,1 g salzsaures Hämatoporphyrin, gelöst in 6 ccm Wasser und 2 ccm Normalnatronlauge, eingespritzt. Am folgenden Morgen wurde das noch ganz normale Tier ab 8^{45} belichtet. Schon um 10 Uhr lag es in den letzten Zügen.

Dieser Versuch zeigt eindeutig, daß die Leukobase des Hämatoporphyrins am ersten Tage nach der Injektion keine sensibilisierende Wirkung hervorruft. Zur völligen Sicherung des Befundes wurden am 4. August 1913 vier möglichst gleichartige Tiere mit Leukobase eingespritzt. Am 5. August wurden diese völlig gesunden Tiere von 8^{15} —10 Uhr bestrahlt. Zwei Tiere zeigten schwache Sensibilisation. Sie kratzten sich an den Ohren und sprangen ab und zu im Käfig umher, während bei den andern beiden nichts zu bemerken war. Im diffusen Licht gingen die Symptome bei den erstgenannten Tieren (1 + 2) schnell zurück. Die beiden andern ganz normalen (3 + 4) Tiere bekamen am 5. abends je 0,1 g salzsaures Hämatoporphyrin, in Alkali gelöst, eingespritzt. Alle vier Tiere wurden am 6. August 1 Stunde 40 Minuten belichtet. Die beiden Hämatoporphyrin-

tiere (3 + 4) zeigten schwere Erscheinungen und waren am Ende der Belichtung tot. Auch die beiden Leukobasentiere zeigten gegen Ende der Belichtung bedrohliche Erscheinungen, erholten sich dann aber im diffusen Licht wieder ziemlich. Am andern Morgen waren beide Tiere scheinbar normal, nur eines hatte noch geschwollene Augenlider. Am 7. 8. schien die Sonne höchstens 10 Minuten, aber es genügte, um bei beiden Tieren das typische Sensibilisierungsbild auszulösen. Sie kratzten sich wütend und sprangen im Käfig herum. Nach Verschwinden der Sonne waren beide Tiere bald wieder völlig normal. Tier I wurde jetzt geschlachtet und die Gallenblase auf Hämatoporphyrin untersucht. Der Farbstoff konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Das übrig gebliebene Tier III zeigte am 10. 8. eine enorme Empfindlichkeit der Ohrmuscheln. Die Ursache war Gangrän des Ohres und zwar war gut ein Drittel jedes Ohres im Absterben begriffen. Am 12. 8. starb das Tier.

Nach diesen Versuchen konnte es wohl keinem Zweifel mehr unterliegen, daß die Leukobase des Hämatoporphyrins erst nach längerem Verweilen im Organismus zur Wirkung gelangt.

Nun konnte immer noch der Einwand gemacht werden, daß die starke Wirkung des Hämatoporphyrins in diesen Versuchen durch Kumulation bedingt sei, hatten diese Tiere doch vorher auch schon Leukobase erhalten. Es wurden deshalb nochmals sechs gleichartige Tiere ausgesucht und vier am 8. 8. mit Leukobase eingespritzt. Am selben Tage wurden diese vier Tiere bei wechselndem Sonnenlicht bestrahlt, ohne daß eine Einwirkung erfolgt wäre. Am folgenden Tage wurden die beiden übrig gebliebenen Tiere (5 + 6) mit der gleichen Menge Hämatoporphyrin eingespritzt. An diesem Tage schien ab 3 $\frac{1}{2}$ Uhr nachmittags die Sonne sehr schön, und es zeigte sich nun zwischen den sechs Meerschweinchen ein eklatanter Unterschied. Die Hämatoporphyrintiere zeigten nach kurzer Zeit schwere Erscheinungen, kratzten sich unaufhörlich, sprangen in die Höhe usw. Bei den Leukobasentieren waren drei gleichfalls sensibilisiert, aber die schweren Erscheinungen wie die Hämatoporphyrintiere zeigten sie nicht. Am 10. wurden sämtliche geschlachtet; bei den Hämatoporphyrintieren konnte, ent-

sprechend den Beobachtungen O. Neubauers¹⁾ beim Kaninchen, in der Gallenblase, ebenso wie im Kot der Farbstoff spektroskopisch leicht nachgewiesen werden. Bei den Leukobasentieren gelang der Nachweis nicht. Auffallend war, daß die Gallenblase der Hämatorporphyrintiere an Volumen mindestens dreimal so groß war, wie die der Leukobasentiere. Im Kot der letzteren konnte übrigens am vorhergehenden Tage Hämatorporphyrin spektroskopisch nachgewiesen werden.

Zusammenfassend ist zu bemerken, daß die Leukobasen des Meso- und Hämatorporphyrins im Gegensatz zum Hämatorporphyrin erst am Tage (bzw. zwei Tage) nach der Injektion sensibilisierend wirken. Die schweren Gifterscheinungen des Hämatorphyrins sind nicht zu beobachten, wahrscheinlich weil die Oxydation zum Farbstoff nur allmählich erfolgt.

I.

25 g Hämin, 200 ccm Methylalkohol (abs.),
50 g Kalihydrat-rein und 15 ccm Wasser.

Zeit	Temp.	Druck	Ölbad	Zeit	Temp.	Druck	Ölbad
9 42	120°	5	200°	1 15	225°	49	263°
10 03	150°	11	242°	1 30	225°	49	264°
10 15	170°	17	258°	1 45	225°	49 ^{1/2}	264°
10 30	190°	26	270°	2	225°	49 ^{1/2}	264°
10 45	210°	38	278°	2 15	225°	49 ^{1/2}	264°
11	220°	45	275°	2 30	225°	50	264°
11 15	225°	48	270°	2 45	225°	50	264°
11 30	225°	48 ^{1/2}	265°	3	225°	50	265°
11 45	225°	48 ^{1/2}	265°	3 15	225°	50 ^{1/2}	265°
12	225°	48 ^{1/2}	264°	3 30	225°	51	265°
12 15	225°	48 ^{1/2}	265°	3 45	225°	51	265°
12 30	225°	48 ^{1/2}	265°	4	225°	51	266°
12 45	225°	48 ^{1/2}	265°	4 15	225°	51 ^{1/2}	266°
1	225°	49	264°				

¹⁾ Arch. für exper. Pathol., Bd. 43, S. 456.

II.

25 g Hämin, 290 g Äthylalkohol abs., 50 g Kalium.

Zeit	Temp.	Druck	Ölbad	Zeit	Temp.	Druck	Ölbad
10 15	143°	5	240°	1 15	175°	12 $\frac{1}{2}$	218°
10 30	160°	7	250°	1 30	175°	12 $\frac{1}{2}$	219°
10 45	172°	9	245°	1 45	175°	13	220°
11	175°	10	238°	2	175°	13 $\frac{1}{2}$	219°
11 15	175 $\frac{1}{2}$ °	10 $\frac{1}{2}$	225°	2 15	175°	14	220°
11 30	175°	11	225°	2 30	175°	14	218°
11 45	175°	11	220°	2 45	175°	14	219°
12	175°	11	220°	3	175°	15	220°
12 15	175°	11	220°	3 15	175 $\frac{1}{2}$ °	15	220°
12 30	175°	12	218°	3 30	175°	15 $\frac{1}{2}$	219°
12 45	175°	12	220°	3 45	175°	16	220°
1	175°	12 $\frac{1}{2}$	220°	4	175°	16 $\frac{1}{2}$	220°

III.

25 g Hämin, 200 g Methylalkohol, 72 g Ätzkali, 15 g Wasser.

Zeit	Temp.	Druck	Ölbad	Zeit	Temp.	Druck	Ölbad
10 45	120°	5	220°	2	225°	45	272°
11	140°	8	240°	2 15	225°	45	273°
11 15	160°	13	255°	2 30	225°	45 $\frac{1}{2}$	274°
11 30	180°	20	263°	2 45	225°	46	274°
11 45	196°	27	280°	3	225°	47	274°
12	219°	41	295°	3 15	225°	47 $\frac{1}{2}$	274°
12 15	225°	44	280°	3 30	225°	47 $\frac{1}{2}$	274°
12 30	225°	44	270°	3 45	225°	47 $\frac{1}{2}$	274°
12 45	225°	44	271°	4	225°	47 $\frac{1}{2}$	275°
1	225°	44	273°	4 15	225°	47 $\frac{1}{2}$	275°
1 15	225°	45	274°	4 30	225°	47 $\frac{1}{2}$	275°
1 30	225°	45	273°	4 45	225°	48	275°
1 45	225°	45	272°	5	225°	48	275°

IV.

25 g Hämin, 50 g Kalium, 290 g Äthylalkohol.

Zeit	Temp.	Druck	Ölbad	Zeit	Temp.	Druck	Ölbad
8	155°	6	240°	10	226°	77	265°
8 15	165°	8	250°	10 15	225°	80	267°
8 30	186°	13	264°	10 30	225°	83	267°
8 45	205°	23	270°	10 45	225°	86	268°
8 50	210°	28	270°	11	225°	89	268°
9	220°	39	277°	11 15	225°	92	267°
9 10	225°	52	275°	11 30	225°	94	267°
9 15	225°	57	272°	11 45	225°	95	266°
9 30	228°	67	272°	12	225°	96	266°
9 45	227°	73	265°	12 15	225°	97	266°

V.

25 g Hämin, 50 g Kalium in 290 g Äthylalkohol.

Zeit	Temp.	Druck	Ölbad	Zeit	Temp.	Druck	Ölbad
9 35	130°	3	220°	1	205°	47	253°
9 43	140°	5	230°	1 15	205°	47 ¹ / ₂	252°
9 53	150°	6	240°	1 30	205°	48	251°
10	160°	7	250°	1 45	205°	49	251°
10 15	180°	11	260°	2	205°	49	253°
10 30	190°	15	265°	2 15	205°	51	252°
10 45	200°	20	268°	2 30	205°	52	253°
11	202°	25	260°	2 45	205°	52 ¹ / ₂	251°
11 15	205°	30	260°	3	204 ¹ / ₂ °	52 ¹ / ₂	253°
11 30	205°	35	255°	3 15	205°	52 ¹ / ₂	253°
11 45	205°	38	253°	3 30	204 ¹ / ₂ °	53	252°
12	205°	41	253°	3 45	205°	54	254°
12 15	205°	42	253°	4	205°	54 ¹ / ₂	254°
12 30	205°	44	253°	4 15	205°	55	253°
12 45	205°	46	253°				

Am anderen Morgen noch 21 Atmosphären Druck.