

Über Brommesoporphyrin und die Reduktion von Blut- und Gallenfarbstoff bei Gegenwart von kolloidalem Palladium.

Von

H. Fischer und A. Hahn.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität München.)

(Der Redaktion zugegangen am 4. April 1914.)

Fischer und Röse¹⁾ haben vor kurzer Zeit durch Einwirkung von Chlor auf Mesoporphyrin einen in grünen Nadeln krystallisierenden Körper erhalten, der sich als Tetrachlormesoporphyrin erwies. Nach den Eigenschaften und der Darstellung muß es sich um ein Substitutionsprodukt handeln.

Wir haben in analoger Weise einen prachtvoll krystallisierenden Bromkörper erhalten, der jedoch das Brom leider nur äußerst locker gebunden enthält, sodaß die Analyse nicht zu entscheiden vermag, ob Tri- oder Tetrabrommesoporphyrin vorliegt. Nach seinen Eigenschaften könnte man den Körper für ein Perbromid halten (s. exp. Teil), indessen setzt er aus Jodkalilösung kein Jod in Freiheit. Gegen eine einfache Addition spricht unbedingt die Darstellungsweise, und es ist wahrscheinlich, daß Brom- und Chlorkörper die gleiche Konstitution besitzen. Die weitere Diskussion der erhaltenen Resultate soll in einer späteren Mitteilung erfolgen, wenn noch mehr experimentelles Material vorliegt.

Weiterhin wurden Hämin und Bilirubin der Reduktion mit Wasserstoff bei Gegenwart von kolloidalem Palladium unterworfen, und es konnte bei beiden Farbstoffen eine Reduktion der ungesättigten Seitenketten erzielt werden, da nach der Behandlung mit Wasserstoff und nachfolgender Oxydation in beiden Fällen Methyl-äthyl-maleinimid isoliert werden konnte.

¹⁾ Chem. Ber., Bd. 46, S. 2460.

War beim Bilirubin dieses Verhalten wohl zu erwarten, hat ja doch die Reduktion mit Natriumamalgam die gleiche Wirkung, so ist es auffallend, daß beim Hämin diese Reduktion erfolgt, denn dort ist es nicht möglich durch Natriumamalgam den Vinylrest zu reduzieren, dies gelingt erst durch Einwirkung von Jodwasserstoff, bezw. Kaliumalkoholat. Bei der Reduktion des Bilirubins konnte ein neuer, schön krystallisierender gelber Körper isoliert werden, der die Ehrlichsche Aldehydreaktion noch nicht gibt. Diese Tatsache ist bemerkenswert, weil hieraus hervorgeht, daß bei der Hemibilirubinbildung nicht allein die Wasserstoffanlagerung das Ausschlaggebende ist, sondern noch ein zweiter Eingriff gleichzeitig erfolgen muß, nämlich die Öffnung der Sauerstoffbrücke im Sinne der früher aufgestellten Formel.¹⁾

Küster hat den Beweis erbracht, daß alle Hämine identisch sind, jedoch kann die Elementaranalyse allein nicht entscheiden, ob Hämin oder Mesohämin vorliegt. Das Vorkommen von Mesohämin, dem Reduktionsprodukt von Hämin, als Farbstoffkomponente des Hämoglobins niederer Tiere ist von phylogenetischem Standpunkt aus nicht ohne weiteres abzuweisen. Macht man die Hypothese, daß der Blutfarbstoff sich aus dem Chlorophyll entwickelt, so steht das Mesohämin in gewisser Beziehung dem Chlorophyll näher als das Hämin. Denn das Chlorophyll besitzt ja die Befähigung bei der Oxydation im Gegensatz zum Hämin und Bilirubin, im Einklang mit Hemibilirubin und Mesohämin direkt Methyl-äthyl-maleinimid zu geben (Willstätter und Asahina).²⁾

Von diesem Gesichtspunkt aus haben wir aus Karpfenblut Hämin dargestellt und zur Charakterisierung dieses Hämins es in das zugehörige Porphyrin verwandelt. Dieses erwies sich als Hämatoporphyrin. Also hat sich kein Anhaltspunkt dafür ergeben, daß das Mesohämin etwa bei Fischen vorkommt. Jedoch ist es nicht ausgeschlossen, daß man bei der Untersuchung des

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 89, S. 255. Dort sind die Bruttoformeln für Bilirubin und Hämin zu korrigieren in: Bilirubin $C_{33}H_{36}N_4O_6$, Hämin $C_{34}H_{30}N_4O_4FeCl$.

²⁾ Willstätter und Asahina, Ann., Bd. 373, S. 227.

Blutfarbstoffes niedriger stehender Tiere doch noch auf Meso-hämin oder anders geartetes Hämin¹⁾ stößt. Hindernd steht derartigen Untersuchungen besonders die schwierige Beschaffung des Ausgangsmateriales im Wege.

Im Organismus erfolgt die Reduktion des Gallenfarbstoffes zu Hemibilirubin im Darmkanal sehr leicht, und es war nahe-liegend, auf die gleiche Weise Hämin in Mesohämin umzuwandeln zu suchen. Zu diesem Zwecke wurden der Versuchsperson ziemlich große Mengen von Blutwurst eingegeben. Hierbei stellte sich die überraschende Tatsache heraus, daß weitaus die größte Menge des Blutfarbstoffes völlig verschwindet, so-daß jedenfalls eine erfolgreiche chemische Verarbeitung aus-geschlossen erscheint, wenn nicht ein Übergang in farblose Zwischenprodukte erfolgt, die bei der Oxydation nicht mehr zur Farbstoffbildung befähigt sind. Merkwürdigerweise führt da-gegen die Fäulnis in vitro nicht zum Verschwinden des Blut-farbstoffes. Ob eine Reduktion hierbei erfolgt, haben wir noch nicht untersucht, jedoch ist es nicht sehr wahrscheinlich, weil die Reduktion bis jetzt mit durchaus negativem Erfolge an leichter zu bearbeitbarem Material, dem Cholesterin, ohne Erfolg versucht worden ist. Bei dieser Gelegenheit haben wir uns überzeugt, daß im Pferdehirn nur Cholesterin und kein Phyto-sterin vorhanden ist. Es erscheint dies bemerkenswert deshalb, weil diese Tiere im Futter doch wohl nur Phytosterin auf-nehmen. Entweder muß also hier ein Umbau des Phytosterines zu Cholesterin erfolgen, oder es findet eine Synthese des Chole-sterines statt, oder aber es kommt in den Pflanzen doch Chole-sterin vor, worüber wir allerdings keine Literaturangabe ge-funden haben.

Auch Fischer und Röse konnten in Rindergallensteinen bis jetzt kein Phytosterin finden.

Endlich wurden noch einzelne Blutderivate auf ihre Wir-kung am Frosch studiert. Hierbei stellte sich heraus, daß die bis jetzt untersuchten Präparate: Hämin, Mesohämin, Hämato-

¹⁾ Von besonderem Interesse wäre die Untersuchung der kupfer-haltigen Farbstoffkomponente des Hämocyanins von M. Henze (Diese Zeitschrift, Bd. 43, S. 290).

porphyrin¹⁾ und Porphyrinogen bei subcutaner Injektion diese Tiere töten, während Blutinjektion keine Wirkung hatte. Es ist dies bemerkenswert besonders deshalb, weil nach Schittenhelm und Weichardt,²⁾ wie H. Freund³⁾ auch der Eiweißparling, das Globin, sich als giftig erwies, während die Gesamtkomponente Hämoglobin auch in dessen Versuchen ungiftig war.

Nach unseren Versuchen, die natürlich am Warmblüter wiederholt werden sollen, ist also zu schließen, daß durch die Vereinigung der beiden Gifte eine «Neutralisation» zum physiologisch indifferenten Hämoglobin erfolgt.

Experimenteller Teil.⁴⁾

Einwirkung von Bromwasserstoff-Eisessig und Brom auf Mesoporphyrin.

2 g Mesoporphyrin wurden in einem Gemisch von 80 ccm Eisessig und 60 ccm Bromwasserstoff (spez. Gew. 1,38) unter Erwärmen gelöst. Nach Abkühlen der Lösung wurden 18 ccm Wasserstoffsuperoxydlösung (mediz.) zugesetzt. Nach einiger Zeit begann die Krystallisation eines prachtvoll violett gefärbten Körpers, die nach 12-stündigem Stehen vollständig war. Ausbeute 3 g.

Statt das Brom erst durch Oxydation von Bromwasserstoff mit Wasserstoffsuperoxyd zu erzeugen, kann man auch direkt Brom in Substanz anwenden. Dem entspricht folgende Vorschrift: 1 g Mesoporphyrin wird in 40 ccm Eisessig und 30 ccm Bromwasserstoff gelöst. Hierzu setzt man 1,1 g Brom in 10 ccm Eisessig gelöst allmählich zu. Die Abscheidung des Bromkörpers erfolgt, wie oben beschrieben.

¹⁾ Für das Hämatorporphyrin hatten schon seine Entdecker Nencki und Sieber (Archiv für exper. Pathol., Bd. 24, S. 445) festgestellt, daß es Kaninchen unter Auftreten von Hämatorporphyrin und Eiweiß im Harn tötet.

²⁾ Zeitschrift für Imm. u. exper. Therap., Bd. 14, S. 609 (1912).

³⁾ Chem. Zentralblatt, 1914, S. 1199.

⁴⁾ Ein großer Teil der hier beschriebenen Versuche wurde noch in der 2. mediz. Klinik ausgeführt.

Versuche, den Bromkörper ohne Anwendung von Wasserstoffsperoxyd oder Brom zu erhalten, hatten ein völlig negatives Ergebnis.

Leider gaben die Analysenwerte keine konstanten Werte und zwar liegt das daran, daß der Bromkörper langsam, aber ständig Bromwasserstoff abgibt. Die Analysen schwanken daher zwischen einem Bromgehalt von 5 bzw. 6 Atomen Brom. Ein Präparat, das 5 Tage über Chlorcalcium neben Ätzkali getrocknet war, gab bei der Analyse folgendes Resultat:

0,2460 g Substanz: 0,3671 g CO₂ und 0,1040 g H₂O.

0,1571 „ „ : 8,6 ccm N (18°, 713 ccm).

0,2700 „ „ : 0,2633 g AgBr.

C₃₄H₃₇O₄N₄Br₃ · 2 HBr. Ber.: 42,28% C, 3,87% H, 5,81% N, 41,41% Br

C₃₄H₃₆O₄N₄Br₄ · 2 HBr. „ : 39,01% „ 3,66% „ 5,36% „ 45,85% „

Gef.: 40,70% „ 4,73% „ 5,94% „ 41,50% „

Es wurden dann noch einige Brombestimmungen ausgeführt, nach 12-stündigem Stehen über Chlorcalcium neben Ätzkali im Exsikkator. Auch hier waren die Resultate wechselnd.

0,2881 g Substanz: 0,2756 g AgBr. Gef. 40,71% Br.

0,2766 „ „ : 0,2735 „ „ „ 42,08% „

0,3239 „ „ : 0,3150 „ „ „ 41,39% „

Da die Möglichkeit vorhanden war, daß beim Diäthylester des Mesoporphyrins die Bromverbindung vielleicht stabiler wäre, so wurde diese in analoger Weise hergestellt und zwar sowohl mit Wasserstoffsperoxyd (Analyse a), wie direkt durch Bromzusatz (Analyse b).

a) 0,1012 g Substanz: 0,1510 g CO₂ und 0,0425 g H₂O.

0,1804 „ „ : 0,1793 „ AgBr.

C₃₈H₄₄N₄O₄Br₅. Ber.: 44,66% C, 4,44% H, 39,14% Br.

C₃₈H₄₄N₄O₄Br₆. „ : 41,46% „ 4,03% „ 43,6% „

Gef.: 40,69% „ 4,69% „ 42,30% „

b) 0,1409 g Substanz: 0,2147 g CO₂ und 0,0645 g H₂O.

0,2425 „ „ : 0,2413 „ AgBr.

Gefunden: 41,56% C, 5,12% H, 42,35% Br.

Hier stimmen die Werte besser auf Eintritt von 6 Atomen Brom, während beim Mesoporphyrin eher auf den Eintritt von 5 Atomen Brom geschlossen werden kann.

Spektroskopisch konnte der Bromkörper nicht untersucht werden und zwar deswegen, weil er sich in allen versuchten

Lösungsmitteln außer in Aceton nicht löst. In dieser Lösung zeigt er ein äußerst charakteristisches 6-bandiges Spektrum; jedoch ist aller Grund vorhanden (s. unten), daß hier nicht mehr der unveränderte Bromkörper vorliegt. Bei dieser Gelegenheit sei nachgeholt, daß das Tetrachlormesoporphyrin im Rot einen charakteristischen Absorptionsstreifen besitzt, der uns früher entgangen war. (Ber., Bd. 46, S. 2460). Es ist dies deshalb bemerkenswert, weil aus dem Verschwinden des spektroskopischen Befundes auf eine tiefgreifende Änderung im Molekül hätte geschlossen werden können.

Der Bromkörper zeigt im großen und ganzen gegen Reduktionsmittel das gleiche Verhalten, wie der früher beschriebene Chlorkörper. Durch Reduktion mit Natriumamalgam, die wie beim Chlorkörper beschrieben ausgeführt wurde, erhält man Porphyrinogen. Mit Zinkstaub und Eisessig entsteht leicht Mesoporphyrin, das durch Überführung in den bei 202° schmelzenden Diäthylester sicher erkannt wurde.

Wie außerordentlich leicht der Bromkörper sein Brom abgibt, geht aus folgendem Versuch hervor: 1,3 g Bromkörper wurden in 50 ccm Aceton gelöst, darauf mit Wasser bis zur beginnenden Trübung versetzt (ca. 15 ccm). Nach Stehen über Nacht war in nahezu quantitativer Ausbeute freies Mesoporphyrin auskrystallisiert, das durch Überführung in den Diäthylester (Schmelzp. 202°) identifiziert werden konnte. Die Analyse des Esters ergab:

0,1730 g Substanz: 0,4614 g CO₂ und 0,1280 g H₂O.

C₃₈H₄₆N₄O₄. Ber.: 73,26% C, 7,45% H.

Gef.: 72,77% > 8,27% >

Statt Wasser zuzusetzen, kann man mit gleichem Erfolge Natronlauge verwenden: 1 g Bromkörper, in 50 ccm Aceton gelöst, wurde mit 6 ccm ⁿ/₁₀-NaOH versetzt. Es tritt Ausfällung des Mesoporphyrins auf, das durch Überführung in den bei 202° schmelzenden Diäthylester erkannt wurde.

Ein ganz anderes Verhalten zeigt der Bromkörper, wenn man ihn mit Wasser ohne Aceton behandelt. Zwar tritt in völlig analoger Weise Bromabspaltung ein (freies Brom ist mit Jodkalistärkepapier ebensowenig nachweisbar, wie bei dem

Acetonversuch), aber es entsteht kein Mesoporphyrin. Alle Versuche, das Reaktionsprodukt, das noch geringe Mengen Brom enthält, zur Krystallisation zu bringen, scheiterten.

Mit Natronlauge versetzt erfolgt in analoger Weise Abspaltung des Broms, wenigstens zum größten Teil, aber auch das so erhaltene Produkt konnte nicht zur Krystallisation gebracht werden. Eine orientierende Analyse ergab folgende Werte, jedoch kann ihrem Resultat keine Bedeutung beigemessen werden, da der Körper nicht krystallisiert war.

0,1562 g Substanz: 0,3968 g CO₂ und 0,1078 g H₂O.

0,1305 » » : 11,9 ccm N (18°, 714 mm).

0,1499 » » : 0,0072 g AgBr.

Gefunden: 69,28% C, 7,72% H, 9,91% N, 2,04% Br.

Hämin aus Karpfenblut.

Als Ausgangsmaterial dienten 65 Pfund Karpfen. Die Tiere wurden durch Stich in den Kopf getötet, der Kopf sodann gespalten und das Blut aufgefangen. Da auf diese Weise nur wenig Blut zu bekommen war, wurden die Tiere ins Herz gestochen, aber auch bei dieser Methode konnte nur wenig Blut erhalten werden. Die Gesamtmenge an defibriertem Blut, die so gewonnen worden war, betrug 175 ccm. Daraus wurde Hämin in üblicher Weise hergestellt. Ausbeute: 0,2 g.

Die Krystalle dieses Hämins wiesen gegenüber dem aus Rinderblut gewonnenen keinen wesentlichen Unterschied in Form und Größe auf.

Die 0,2 g Hämin wurden in 10 ccm Eisessig-Bromwasserstoff gegeben, das Ganze in ein Reagenzglas eingeschmolzen. Nachdem vollkommene Lösung eingetreten war, wurde dessen Inhalt in 60 ccm Wasser gegossen. Die dabei entstehenden geringen Ausscheidungen wurden abfiltriert, das Filtrat mit NaOH gefällt. Der Niederschlag wurde abgesaugt und mit Wasser ausgewaschen. Hiernach wird in verdünnter Natronlauge gelöst. Erst bei Zusatz von konzentrierter Natronlauge konnte ein Natronsalz abgeschieden werden, ein Verhalten, wie es dem Hämatoporphyrin entspricht, im Gegensatz zum Mesoporphyrinnatrium, das schon bei ganz schwacher Alkali-

konzentration ausfällt. (Z. B. mit $n/10$ -NaOH). Das so gewonnene Natronsalz war nicht aus 2 $\frac{1}{2}$ %iger Salzsäure krystallisierbar im Gegensatz zum Mesoporphyrin, dagegen schied sich nach Zusatz von konzentrierter Salzsäure nach längerem Stehen das salzsaure Hämatoporphyrin in krystallisiertem Zustand aus. (Menge 0,05).

Ein Teil desselben wurde zur weiteren Identifizierung mit Kupferacetat und Eisessig behandelt. Es konnte hierbei nicht das für Mesoporphyrin so charakteristische Kupfersalz erhalten werden, sodaß kein Zweifel bestehen kann, daß nicht Mesoporphyrin, sondern Hämatoporphyrin vorlag.

Reduktion von Hämin mit Wasserstoff bei Gegenwart von kolloidalem Palladium.

Zur direkten Reduktion des Hämins mit Wasserstoff wurde als Katalysator das von Paal und Hartmann (B. 42, 3932) angegebene kolloidale Palladium, und zwar sowohl in Substanz, wie in 1%iger Lösung, verwendet.

1,5 g Hämin wurden in 50 ccm $n/10$ -NaOH gelöst, darauf mit 0,2 g Palladium, gelöst in 8 ccm Wasser und 1 ccm $n/10$ -NaOH, versetzt. Die Lösung wurde in eine Saugflasche gefüllt, die Luft in derselben durch Wasserstoff vertrieben, sodann die Flasche vorn verschlossen, während die Verbindung mit dem Kippschen Apparat während der ganzen Versuchsdauer erhalten blieb. Die Saugflasche wurde über Nacht geschüttelt. Am anderen Morgen wurde die Lösung mit konzentrierter HCl gefällt, der Niederschlag abgesaugt und ausgewaschen. Der ganze Niederschlag wurde sodann in 75 ccm $n/10$ -NaOH gelöst und oxydiert mit 30 g Bleisuperoxyd und 75 ccm H_2SO_4 (50%). Aus dem Reaktionsgemisch konnte neben Hämatinsäure schön krystallisierendes Methyl-äthyl-maleinimid erhalten werden. (Schmelzp. 65—66°.) Der Mischschmelzpunkt mit synthetischem Imid ergab keine Depression.

Nachdem so erwiesen war, daß die Reduktion der ungesättigten Seitenketten des Hämins tatsächlich erfolgte, wurde versucht, direkt das zugrunde liegende Porphyrin zu isolieren.

Es wurde von jetzt ab nur noch eine 1%ige Palladiumlösung verwandt, die nach den Angaben Paals von der Firma Kalle & Co. dargestellt und uns in liebenswürdiger Weise überlassen war. 5,8 g reines Hämin wurden in 193 ccm n_{10} -NaOH gelöst und nach Zusatz von 14 ccm Palladiumlösung in oben beschriebener Weise mit Wasserstoff behandelt. Die Lösung wurde dann mit HCl gefällt, der Niederschlag ausgewaschen, getrocknet und mit 100 g Eisessig-Bromwasserstoff (bei 0° gesättigt) eingeschlossen. Nachdem nach 24stündigem Stehen Lösung eingetreten war, wurde das Ganze in 600 ccm Wasser gegossen. Die sich ausflockenden relativ geringen Abscheidungen wurden abfiltriert und das Filtrat bis zur verschwindenden Kongoreaktion mit NaOH versetzt. Der hierbei entstehende Niederschlag wurde nach Absaugen und Auswaschen durch Verreiben mit sehr verdünnter NaOH gelöst und zum Filtrat wenig konzentrierte NaOH zugegeben, wobei ein Natronsalz sich abschied. Dieses wurde auf ein Filter gebracht, mit verdünnter NaOH ausgewaschen und mit heißer 2 $\frac{1}{2}$ %iger HCl übergossen. Nach schnellem Aufkochen wurde abfiltriert und alsbald schied sich aus dem Filtrat eine Krystallisation von konzentrisch vereinigten Nadelchen ab, die der des Mesoporphyrins täuschend ähnlich war. Nach Absaugen und Trocknen über Phosphor-pentoxyd wog die Gesamtmenge 0,6 g. Eine N-Bestimmung ergab folgendes:

0,1457 g Substanz: 11,2 ccm N (18°, 707 mm).

$C_{34}H_{40}N_4O_4Cl_2$. Gef.: 8,28% N. Ber.: 8,76% N.

Es ergab sich also ein erhebliches Defizit. Nun gibt es eine Reaktion, die für Mesoporphyrin in hohem Maße charakteristisch ist, nämlich seine Eigenschaft, in überraschend leichter Weise quantitativ in das komplexe Kupfersalz überzugehen, wie Zaleski¹⁾ gefunden hat. Löst man eine kleine Portion von HCl-saurem Mesoporphyrin in Eisessig und versetzt heiß mit Kupferacetat in Eisessig, so krystallisiert fast momentan in feinen Nadelchen das Komplexsalz aus. Als nun der gleiche Versuch mit dem oben erhaltenen Salz angestellt wurde, bildete sich zwar auch ein Kupfersalz, das aber erst

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 37, S. 54.

