

# Über das Urinporphyrin.<sup>1)</sup>

## I. Mitteilung.

Von

**Hans Fischer.**

Mit einer Tafel in Lichtdruck.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität München.)

(Der Redaktion zugegangen am 2. Juli 1915.)

Mulder zuerst und dann Hoppe-Seyler<sup>2)</sup> untersuchten die Einwirkung von konzentrierten Mineralsäuren auf Blut und Hämin. Es wurde beobachtet, daß hierbei das Eisen aus dem Blutfarbstoff austritt und sich ein neuer Farbstoff, Hämatoporphyrin, bildet. Dieser Farbstoff unterschied sich in charakteristischer Weise vom Hämoglobin bzw. Hämin, indem er spektroskopisch ein ganz anderes Bild bot. In saurer Lösung waren drei Streifen zu konstatieren, während in neutraler bzw. alkalischer Lösung vier Streifen auftraten.

Hoppe-Seyler gelang es nicht, das Hämatoporphyrin in krystallisiertem Zustand darzustellen, dies gelang erst Nencki.<sup>3)</sup> Durch Einwirkung von Eisessigbromwasserstoff erhielt er das Hämatoporphyrin krystallisiert als salzsaures Salz und seine Zusammensetzung wurde zu  $C_{34}H_{38}N_4O_6$  festgestellt. Neuerdings ist es Willstätter und Max Fischer<sup>4)</sup> gelungen, auch das freie Hämatoporphyrin krystallisiert zu gewinnen.

Von besonderem Interesse ist nun, daß Nencki und Zaleski<sup>5)</sup> aus Hämin ein zweites Porphyrin in krystallisiertem Zustande darstellen konnten und zwar auf einem ganz anderen Weg, nämlich durch Reduktion mit Eisessigjodwasserstoff.

<sup>1)</sup> Der wesentliche Inhalt dieser Mitteilung wurde am 9. Juni vor der chemischen Gesellschaft in München vorgetragen.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seyler, Med.-chem. Untersuchungen.

<sup>3)</sup> Nencki und Sieber, Arch. für exper. Pathol., Bd. 24, S. 430.

<sup>4)</sup> R. Willstätter und Max Fischer, Diese Zeitschr., Bd. 87, S. 423.

<sup>5)</sup> Nencki und Zaleski, Diese Zeitschr., Bd. 30, S. 384.

Auch hierbei tritt Eisenabspaltung ein, außerdem Wasserstoffanlagerung und es entsteht das Mesoporphyrin von der Zusammensetzung  $C_{34}H_{38}N_4O_4$ . Dieses Porphyrin ist also um zwei Sauerstoffatome ärmer wie Hämatoporphyrin, kann also als dessen Reduktionsprodukt aufgefaßt werden und entsteht auch in der Tat, wie Zaleski<sup>1)</sup> zeigte, aus Hämatoporphyrin durch Behandlung mit Eisessigjodwasserstoff.

In den Spektralerscheinungen sind die beiden Porphyrine nahezu identisch, nähere Angaben hierüber findet man bei O. Schumm.<sup>2)</sup>

Ein besonderes Interesse, diese Porphyrine nun zu studieren, ist dadurch gegeben, daß im Organismus des Menschen und niederer Tiere gelegentlich ein Farbstoff auftritt, der in seinen spektroskopischen Eigenschaften mit den eben erwähnten Porphyrinen übereinstimmt.<sup>3)</sup> Es ist von jeher angenommen worden, daß dieses Porphyrin Hämatoporphyrin ist, ohne daß ein zwingender Grund hierfür vorläge.

Normalerweise kommt das Porphyrin im Harn nur in Spuren vor. Pathologisch tritt es in größerer Menge auf, besonders bei Fieber, sowie nach Sulfonal und Trionalvergiftung. In besonders großer Menge findet man es bei der Hämatoporphyrinurie, einer Krankheit, die neuerdings eingehend von H. Günther studiert worden ist. Über die Symptome, den Krankheitsverlauf und allgemein über das Vorkommen des Porphyrins bei Mensch und Tier siehe H. Günther, Dtsch. Arch. f. klin. Med. 105, Seite 89.

Von besonderem Interesse ist ein Symptom bei der «Hämatoporphyrinurie» des Menschen, und das ist das der Lichtempfindlichkeit, das übrigens nicht immer vorhanden ist.

Tappeiner und Raab<sup>4)</sup> fanden, daß manche Farbstoffe optische Sensibilisatoren sind. Fügt man z. B. eine Lösung von Eosin zu einer Paramäcienkultur zu und setzt die eine

<sup>1)</sup> Zaleski, Diese Zeitschr., Bd. 37, S. 54.

<sup>2)</sup> O. Schumm, Diese Zeitschr., Bd. 90, S. 1.

<sup>3)</sup> Siehe besonders Salkowski, Diese Zeitschr., Bd. 15, S. 286.

<sup>4)</sup> Siehe Tappeiner, H. v. und H. Jodlbauer, Gesammelte Untersuchungen über die photodynamische Erscheinung. Leipzig 1907.

Hälfte der Kultur dem strahlenden Licht aus, während der Rest im Dunkeln gehalten wird, so beobachtet man, daß die belichteten Tierchen alsbald zugrunde gehen, während die Dunkelkontrollen am Leben bleiben. Auf diese Versuche stützte sich W. Hausmann,<sup>1)</sup> als er zeigen konnte, daß Nenckis Hämatorporphyrin ein ausgezeichnete optischer Sensibilisator ist. Hausmann spritzte weißen Mäusen Hämatorporphyrin subcutan ein und fand, daß die belichteten Tiere alsbald zugrunde gingen, während die Dunkeltiere keinerlei Erscheinungen zeigten. Auch diese Beobachtung wurde in dem Sinne verwertet, daß das in der Natur vorkommende Porphyrin Hämatorporphyrin sei.

Ich hatte nun gelegentlich eines Vorlesungsversuches von Prof. Neubauer, München, beobachten können, wie schwere Erscheinungen Hämatorporphyrin bei belichteten weißen Mäusen macht und mir fiel der Unterschied auf zwischen Tier und Mensch, indem bei letzterem bei der Hämatorporphyrinurie in verschiedenen Fällen keinerlei Lichterscheinungen beobachtet worden sind. Gelegentlich meiner Probevorlesung machte ich ausdrücklich darauf aufmerksam, daß bis jetzt kein Anhaltspunkt gegeben sei dafür, welches Porphyrin im Urin vorhanden ist. Bei einem Fall von Gelbsucht gab ich Hämatorporphyrin per os, ohne Lichterscheinungen beobachten zu können, subkutan wagte ich den Versuch nicht auszuführen.

Mit Meyer-Betz, Bartholomäus und Röse<sup>2)</sup> nahm ich dann in Ermangelung eines Porphyrinpatienten die differenzialdiagnostische Untersuchung von Hämatorporphyrin und Mesoporphyrin auch in bezug auf Lichterkrankung auf.

Wir konnten zunächst einen großen Unterschied in bezug auf Sensibilisierung von Tieren zwischen Hämatorporphyrin und Mesoporphyrin feststellen. Während Hämatorporphyrin schon in geringen Dosen bei kurzer Belichtung regelmäßig zu schweren Krankheitserscheinungen und baldigem Tode führte, waren beim Mesoporphyrin die Erscheinungen viel milder. Nur in wenigen

<sup>1)</sup> W. Hausmann, Biochem. Ztschr., Bd. 30, S. 276.

<sup>2)</sup> H. Fischer und F. Meyer-Betz, Diese Zeitschr., Bd. 82, S. 96. H. Fischer und E. Bartholomäus und H. Röse, Diese Zeitschrift, Bd. 84, S. 262. H. Fischer und H. Röse, Diese Zeitschr., Bd. 88, S. 9.

Fällen trat eine Sensibilisation ein mit Krankheitserscheinungen, während viele Tiere völlig gesund blieben. Es war also das Mesoporphyrin in dieser Richtung dem Urinporphyrin viel ähnlicher wie Hämatoporphyrin.

Alle diese Versuche waren bis jetzt nur bei Tieren ausgeführt und es war wohl von großem Interesse, ob Hämatoporphyrin imstande sei, auch beim Menschen schwere Lichterscheinungen hervorzurufen. Mein damaliger Mitarbeiter, Friedrich Meyer-Betz, unternahm, trotz dringender Warnung meinerseits, einen kühnen Selbstversuch. Er ließ sich 0,2 g Hämatoporphyrin intravenös einspritzen und wurde trotz nur 10 Minuten langer Belichtung durch die Sonne schwer sensibilisiert. Nähere Angaben hierüber findet man Dtsch. Arch. f. klin. Med. 112, S. 486.

So war bewiesen, daß Hämatoporphyrin Nencki auch den Menschen lichtkrank machen kann, aber für die vorliegende Frage, welches Porphyrin das im Urin vorkommende sei, war keine Entscheidung getroffen. Die Reindarstellung des Porphyrins aus Urin mußte unbedingt erfolgen.

Nun ist von Günther, Dtsch. Arch. f. klin. Med., Bd. 105, S. 130, eine ausgeprägte Hämatoporphyrinurie, beobachtet in der Poliklinik zu Bonn, beschrieben; klinisch ist der Patient genau untersucht, es handelt sich um einen Fall von «Hämatoporphyrin congenita», wie der Autor diese Erkrankung bezeichnet. Spektroskopisch stellte Günther die absolute Übereinstimmung des im Urin enthaltenen Porphyrins mit Hämatoporphyrin fest und neuerdings wiederum O. Schumm<sup>1)</sup> in Hamburg. Ich wandte mich nun an Herrn Prof. Krause, Direktor der Poliklinik in Bonn mit der Bitte um Überlassung des Urins, und Herr Prof. Krause stellte mir in liebenswürdigster Weise sämtlichen Urin des Patienten zur Verfügung. Ich möchte nicht verfehlen, auch an dieser Stelle Herrn Prof. Krause meinen ergebensten Dank auszusprechen.

Zunächst handelte es sich darum, das Porphyrin zur Abscheidung zu bringen. Methoden zur Abscheidung des Farb-

<sup>1)</sup> Festschrift des Eppendorfer Krankenhauses zum 25jährigen Jubiläum. Leipzig 1914. S. 198.

stoffes aus Harn sind zahlreiche angegeben. Alle beruhen mehr oder weniger auf der Erzeugung von Niederschlägen im Urin, die den Farbstoff mitreißen. Ich nenne die Methoden von Garrod,<sup>1)</sup> Salkowski<sup>2)</sup> und Nebelthau.<sup>3)</sup> Eine besondere Beachtung verdiente eine Arbeit von O. Hammarsten,<sup>4)</sup> der aus Sulfonalharn das Porphyrin in krystallisiertem Zustand isoliert hat. Hammarsten fällte den Harn mit Baryumacetat und extrahierte den entstandenen Barytniederschlag mit Alkohol, der mit Schwefelsäure oder Salzsäure zu 5% versetzt war. Die sauren Extrakte wurden mit Chloroform vermischt und mit Wasser entmischt. Der größte Teil des Farbstoffs blieb im Chloroform, das verdunstet wurde. Nachdem durch kalten Alkohol Verunreinigungen entfernt waren, krystallisierte der Rückstand aus heißem Alkohol in kleinen Nadeln. Für eine Analyse oder Schmelzpunkt reichte die erhaltene Menge nicht aus, jedoch konnte Hammarsten bei einer vergleichenden Untersuchung mit Nenckis Hämatoporphyrin deutliche Unterschiede in bezug auf die Löslichkeitsbedingungen feststellen. Trotzdem gibt Hammarsten noch in der siebten Auflage seines Lehrbuches 1910 an, daß er Hämatoporphyrin in reinem krystallisiertem Zustande aus Sulfonalharn isoliert habe. In der neuesten Auflage 1914, S. 751, ist allerdings nicht mehr ausschließlich von Hämatoporphyrin die Rede, sondern (offenbar veranlaßt durch meine Einwände) von einem Porphyrin, welches man als Hämatoporphyrin angesehen hat, während Abderhalden (in seinem Lehrbuche S. 707) noch 1914 Urinporphyrin und Hämatoporphyrin für identisch ansieht.

Das Hammarstense Porphyrin ist nun in Chloroform leicht löslich, dagegen in verdünntem Alkali unlöslich, wonach mir eine Identität mit Nenckis Hämatoporphyrin ausgeschlossen schien, vorausgesetzt, daß das Urinporphyrin nicht unter dem Einfluß der chemischen Behandlung erst das von Hämatoporphyrin Nencki abweichende Verhalten angenommen hat. In-

<sup>1)</sup> Jl. of Physiol., 1892, Bd. 13, S. 598.

<sup>2)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 15, S. 286 (1891).

<sup>3)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 27, S. 324 (1899).

<sup>4)</sup> Skand. Arch. Physiol., Bd. 3, S. 319 (1892).

dessen kommt Hammarsten zu der Erkenntnis, daß dies nicht der Fall sei, eine Auffassung, die neuerdings von O. Schumm<sup>1)</sup> auf Grund eigener Beobachtungen bestätigt wird. Hierauf werde ich später zurückkommen.

Das nächstliegende war, das Porphyrin mit Hilfe von Lösungsmitteln aus Urin zu extrahieren. Die Angaben der Autoren<sup>2)</sup> über diesen Punkt schwanken stark. Ich konnte feststellen, daß das Urinporphyrin, vorausgesetzt, daß der Urin unzersetzt ist, auch nicht in Spuren in den gebräuchlichen Lösungsmitteln (Chloroform, Äther, Benzol, Toluol, Essigäther) löslich ist; selbstverständlich war vorher mit Essigsäure angesäuert. Schon durch diesen einfachen Versuch war eine Identität mit den bis jetzt bekannten Porphyrinen ausgeschlossen. Diese färben sämtlich, in essigsaurer Lösung, mit Äther behandelt, diesen mehr oder weniger stark an.

Hiernach wandte ich mich den Fällungsmethoden zu. Ich konnte feststellen, daß sobald man nur einen Niederschlag im Urin erzeugt, dieser dann den Farbstoff in der Hauptsache mitreißt, ein Teil aber bleibt in Lösung. Am besten ist es, zunächst den Farbstoff mit Essigsäure zu fällen, wie dies schon Nebelthau vor mir getan hat. Indessen gibt O. Schumm an, daß diese Methode im Falle Günther und in einem anderen Falle von Hämatorporphyrinurie versagt<sup>3)</sup> habe. Das Experiment entschied aber, daß der Farbstoff glatt und nahezu vollkommen ausfällt, wenn man nur genügend Essigsäure zusetzt. Ist der Urin in ammoniakalischer Gärung, so sind relativ sehr große Mengen von Eisessig nötig, ca. 20 ccm pro Liter. Hierbei fällt ein Teil der Harnsäure mit, wie auch schon Nebelthau beobachtet hat. Dieser Autor löste dann sein Präparat, das er durch Auszentrifugieren gesammelt hatte, in Natronlauge und fällte mit Essigsäure. Denselben Prozeß wiederholte er noch

---

<sup>1)</sup> l. c. S. 199.

<sup>2)</sup> Die sehr umfangreiche Literatur über die Darstellungsmethoden und Eigenschaften des «Urinhämatorporphyrins» findet man in Neubauer-Huppert, Analyse des Harns, S. 1319—1343 ff., Wiesbaden 1913; ferner bei Neuberg; Der Harn, S. 932 ff.

<sup>3)</sup> l. c. S. 201.

einmal und unterwarf sein Präparat dann der Elementaranalyse. Er fand bei vier Bestimmungen zwischen 9,5% und 10% Stickstoff und 3,2% Asche im Mittel.

Die Asche enthielt Phosphorsäure, Calcium und Eisen. Von letzterem 0,37% für den Farbstoff.

Kohlenwasserstoffbestimmungen hat Nebelthau nicht ausgeführt.

Auch ich schied den Farbstoff durch Essigsäure aus dem Urin ab, und löste ihn nach dem Absaugen in Natronlauge und fällte wieder mit Essigsäure. Aschefrei konnte ich ihn so nicht erhalten. 1% Asche war noch vorhanden, jedoch kein Eisen. Bei der Analyse erhielt ich folgende Zahlen:

$$C = 55,76 \quad H = 6,31 \quad N = 9,7.$$

Der Stickstoffgehalt stimmte also mit den Präparaten Nebelthaus überein. Außerdem enthält das Produkt Schwefel. Auf diesen Befund wird weiter unten näher einzugehen sein. Alle Bemühungen, den Farbstoff krystallisiert zu erhalten, scheiterten, offenbar deshalb, weil ich kein Lösungsmittel für ihn fand. Besonders auffallend war der niedrige Kohlenstoffgehalt im Verhältnis zum Stickstoffgehalt, und es lag der Verdacht nahe, daß das Präparat noch Harnsäure enthielt. Ich versuchte daher, den Farbstoff zu verestern, da anzunehmen war, daß der Ester wohl bessere Löslichkeitsbedingungen besäße. Das Experiment bestätigte durchaus diese Erwartung und ich erhielt den Methylester (Abbild. III) in schön krystallisiertem Zustand, aschefrei.

Der Methylester des Urinporphyrins besitzt die Zusammensetzung



Elementaranalyse und Molekulargewichtsbestimmung bestätigen die Zusammensetzung. Der Methylester schmilzt scharf bei 295°.

Ebenso gelang es mir, den schön krystallisierten Äthylester (Abbild. II) vom Schmelzpunkt 220° zu gewinnen. Nach den Elementaranalysen und der Molekulargewichtsbestimmung besitzt dieser die Zusammensetzung:

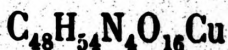


Die Differenz in der Anzahl der Kohlenstoffatome zwischen Methyl- und Äthylester beträgt 7, und es folgt hieraus, daß bei der Veresterung in das freie Porphyrin 7 Methyl- bzw. 7 Äthylgruppen eingetreten sind, ein Resultat, das auch durch die direkten Bestimmungen der Methoxy- bzw. Äthoxygruppen erhärtet wurde. Für das freie Porphyrin berechnet sich hiernach die Formel:



Die Analysenzahlen des freien Porphyrins stehen hiermit im Einklang. Das freie Porphyrin erhält man aus den Estern durch Verseifung auf saurem oder alkalischem Wege, es krystallisiert schön (Abbild. I).

Der Methylester wurde weiterhin charakterisiert durch ein schön krystallisierendes Kupfersalz von der Zusammensetzung:



und ein schön krystallisierendes Eisensalz (Abbild. IV) von der Zusammensetzung:



Letzteres ist auch in spektroskopischer Beziehung dem Hämin sehr ähnlich. Was das wesentliche ist, ist das, daß sowohl durch die Einführung des Kupfers wie des Eisens eine totale Veränderung der Absorptionserscheinungen bei der Betrachtung im Spektroskop erfolgt, woraus zu schließen ist, daß die Metalle komplex gebunden sind. Dies geht auch daraus hervor, daß die Metalle mit den üblichen Reagenzien nicht nachweisbar sind.

Die bisher gewonnenen analytischen Daten beweisen einwandfrei, daß das Urinporphyrin weder Hämato- noch Mesoporphyrin ist, und beweisen die von mir von Anfang an vertretene Anschauung, daß ein übereinstimmender spektroskopischer Befund keineswegs beweisend ist für das Vorliegen eines bestimmten Körpers, vielmehr ist zur Identifizierung die Elementaranalyse unbedingt zu verlangen.

Was nun die Konstitution des Urinporphyrins anlangt, so ist es naheliegend an eine Paarung zu denken, mit Glukuron-



säure z. B., die besonders den hohen Sauerstoffgehalt erklären würde. Die experimentellen Ergebnisse sprechen gegen eine derartige Auffassung. Eine Ablenkung des polarisierten Lichtes konnte ich nicht konstatieren, ebensowenig war durch Erhitzen mit Eisessigbromwasserstoff und konzentrierter Salzsäure bis auf 200° im zugeschmolzenen Rohr eine Spaltung erzielen.

Nach der Art der Darstellung der Ester (mit Hilfe von Alkohol und Salzsäure) ist ein großer Teil des Sauerstoffs in Form von Carboxylgruppen vorhanden. Man käme auf 7 Carboxylgruppen = 14 Atomen Sauerstoff. Dann blieben noch 2 Atome Sauerstoff übrig, die als Hydroxylgruppen vorhanden sein könnten. Hierüber müssen weitere Versuche Auskunft geben. Gegen das Vorhandensein von Carboxylgruppen im Urinporphyrin spricht das Verhalten gegen Natriumbicarbonatlösung; denn das freie Porphyrin löst sich zwar in Bicarbonat glatt, aber ohne sichtbare Kohlensäureentwicklung, aber auch Mesobilirubinogen, das nach der Titration zwei Carboxylgruppen enthält, treibt keine Kohlensäure aus Bicarbonat aus, ebenso die Aminosäuren und die leichte Verseifbarkeit des Esters spricht entschieden für Carboxylgruppen.

Um einen weiteren Einblick in die Konstitution zu gewinnen, besonders darüber, ob überhaupt ein Pyrrolfarbstoff vorliegt, habe ich die totale Reduktion des Urinporphyrins ausgeführt.

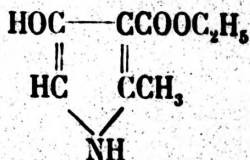
An kleinen Proben ist mit dem Urinporphyrin schon von vielen Autoren gezeigt worden, daß es beim trockenen Erhitzen über freier Flamme Dämpfe entwickelt, die den Fichtenspahn röten, was als ein Zeichen dafür, daß das Urinporphyrin mit Hämatoporphyrin übereinstimmt, aufgefaßt worden ist. Diese Versuche beweisen lediglich, daß ein stickstoffhaltiger Körper vorgelegen hat; denn z. B. fast alle Aminosäuren zeigen beim trockenen Erhitzen ein derartiges Verhalten. Übrigens ist die Fichtenspahnreaktion auch keineswegs eine charakteristische Pyrrolreaktion, denn schon v. Baeyer fand, daß Phloroglucin die Fichtenspahnreaktion erfüllt.

Die totale Reduktion mit Eisessigjodwasserstoff nach dem beim Hämin und Bilirubin üblichen Verfahren ergab in der Säurefraktion Phonopyrrolcarbonsäure, die ich als Pikrat

isolieren konnte. Die Ausbeute bleibt jedoch weit hinter der beim Hämin erreichten zurück. In dieser Hinsicht gleicht das Urinporphyrin mehr dem Bilirubin, jedoch konnte ich für die Anwesenheit von Bilirubinsäure keinen Anhaltspunkt gewinnen.

Prinzipiell verschieden vom Hämin ist die Basenfraction. Während diese beim Hämin ca. 25% ausmacht und beim Bilirubin noch immer nachweisbare Mengen auftreten, fehlt sie hier total. Nicht einmal die so überaus empfindliche Reaktion mit Dimethylaminobenzaldehyd ist hier positiv.

Schon früher konnte ich mit Röse<sup>1)</sup> feststellen, daß Oxy-pyrrole z. B. das von Benary<sup>2)</sup> erhaltene 2 Methyl- 3 Carb-äthoxy- 4 Oxy-pyrrol



durch Eisessigjodwasserstoff zerstört wird, und diese Tatsache im Verein mit dem Fehlen der Basenfraction beim Urinporphyrin spricht dafür, daß im basischen Anteil dieses Porphyrins Oxygruppen an den Pyrrolkernen sitzen.

Daß mehrere Pyrrolkerne, offenbar 4, entsprechend den 4 Stickstoffatomen, vorhanden sind, geht aus der Tatsache der Existenz des komplexen Kupfer- und Eisensalzes hervor. Kupfer und Eisen können bei dem Ester nur an den Imidgruppen von Pyrrolkernen sitzen, wenn man nicht die zwei noch freien Hydroxylgruppen in Betracht ziehen will, was jedoch sehr unwahrscheinlich ist.

Auffallend ist die relativ große Menge Porphyrin im Urin des Patienten. Ich konnte aus 25 l Urin nicht weniger als 3 g krystallisierten Methylester erhalten. Daneben wurde noch eine größere Menge eines krystallisierten Nebenproduktes gewonnen, außerdem noch Fraktionen, die nicht zur Krystallisation gebracht werden konnten. Die Gesamtmenge an Farbstoff wird daher 6 g oder 0,24 g pro Liter betragen. Salkowski (l. c., S. 306) gibt die tägliche Ausscheidung mit 0,87 g an, während Nebelthau 0,041 g findet. Nehmen wir meinen Be-

<sup>1)</sup> Fischer und Röse, Diese Zeitschr., Bd. 89, S. 255.

<sup>2)</sup> Benary und Silbermann, Ber., Bd. 46, S. 1363.

fund als Grundlage für die weiteren Betrachtungen<sup>1)</sup> an, so entspricht dieser ungefähr der Menge Bilirubin, die nach Abderhalden, Lehrbuch f. physiol. Chem., 2. Auflage, S. 509, im Mittel 0,5 g täglich beträgt. Es liegt so die Vermutung nahe, daß das Porphyrin eine Zwischenstufe bei der Bildung von Bilirubin ist oder aber ein Abbauprodukt dieses, worüber die Untersuchung des Kotes Aufschluß geben kann. Hierauf wird in der nächsten Mitteilung näher eingegangen werden, besonders muß ja auch die weitere chemische Untersuchung des Urinporphyrins zeigen, was für eine Umwandlung des Hämins beim Übergang in das Porphyrin erfolgt, wenn man nicht an eine sekundäre Synthese aus Spaltprodukten des Blutfarbstoffs denken will.

Wie schon erwähnt, habe ich das hier untersuchte Porphyrin aus dem Urin des Falls Günther dargestellt und untersucht. Dies ist ein Fall von angeborener Porphyrinurie<sup>2)</sup> und es fragt sich nun, ob bei sonstigen Fällen dieser Erkrankung das gleiche Porphyrin vorkommt oder nicht. Von besonderem Interesse ist unter diesen die Sulfonalvergiftung, bei der häufig größere Mengen von Porphyrin beobachtet worden sind, so insbesondere in den von Hammarsten l. c. untersuchten Fällen. Hammarsten hat, wie erwähnt, hierbei das Urinporphyrin krystallisiert erhalten und ich bin überzeugt, daß bei seinem Verfahren — Behandlung des Barytniederschlags mit Alkohol und 5% wässriger Salzsäure — Veresterung eingetreten ist. So hätte Hammarsten nicht das freie Porphyrin isoliert, sondern den oben beschriebenen Äthylester bzw. sein salzsaures Salz. Die von Hammarsten angegebenen Eigenschaften stimmen durchaus mit dieser Erklärung überein. Dann wäre auch das «Sulfonalporphyrin» identisch mit dem Urinporphyrin. Es ist wichtig, daß dies in einwandfreier Weise konstatiert wird.

Zur Zeit habe ich Versuche im Gange, um nachdem Vorgang von Stokvis und O. Neubauer im Tierexperiment Por-

<sup>1)</sup> Eine (allerdings unwesentliche) Modifikation müssen diese erfahren, durch die Isolierung des Porphyrins aus dem Stuhl des Patienten.

<sup>2)</sup> Es wird zweckmäßig sein, den Namen «Hämatoporphyrinurie» zu streichen und durch den richtigen «Porphyrinurie» zu ersetzen.

phyrinurie nach Sulfonalvergiftung zu erzeugen, bis jetzt allerdings ohne Erfolg. Es scheinen Kaninchen nur bei noch unbekanntem Versuchsbedingungen, vielleicht auch nur gewisse Rassen, zu dieser Erkrankung zu neigen, eine Erfahrung, die auch O. Neubauer (Privatmitteilung) schon früher gemacht hat. Es lag nun nahe, auch das Hämatoporphyrin Nencki wie Mesoporphyrin und weiter allgemein Pyrrolderivate auf ihr spezielles Verhalten beim Durchgang durch den tierischen Organismus zu untersuchen. Nach den bisherigen Versuchen scheint Hämatoporphyrin Nencki nicht in einen dem Urinporphyrin ähnlichen Körper überzugehen. Die Versuche sind besonders schwierig deshalb, weil Hämatoporphyrin außerordentlich giftig ist.

Ein besonderes Interesse bietet nun die Frage, ob das Porphyrin, auf dem Umweg über den Ester isoliert, nun auch im Urin ursprünglich in dieser Form vorhanden ist, oder ob durch die Einwirkung des «salzsauren Alkohols» außer der Veresterung noch anderweitige Einwirkung stattgefunden hat. Ein Anhaltspunkt zur Entscheidung dieser Frage kann die Differenz im analytischen Befund des unveresterten Rohproduktes und der krystallisierten Substanz geben. Die beiden unterscheiden sich prinzipiell dadurch, daß nur das Rohprodukt schwefelhaltig ist und daß es einen weit höheren Stickstoffgehalt wie das aus dem Ester durch Verseifung gewonnene Porphyrin besitzt. Bei der Veresterung mit Salzsäure und Alkohol bleibt dieses schwefelhaltige Produkt ungelöst zurück und nach der Analyse scheint es sich um einen Eiweißkörper zu handeln.

Das Produkt enthält: 49,8% C; 7,19% H; 14,95% N; 4,03% S; 1,07% S und 1% Asche.

Ich unterwarf es der totalen Hydrolyse mit konzentrierter Salzsäure und konnte hiernach in einwandfreier Weise die Anwesenheit von Aminosäuren feststellen. Es ist damit sicher bewiesen, daß es sich tatsächlich um einen Eiweißkörper oder mindestens ein Derivat eines solchen handelt.

Auffallend ist nur, daß relativ wenig Eiweiß vorhanden ist. Im Hämoglobin macht der Eiweißgehalt 96% aus, der Farbstoff nur 4%. Hier liegen die Verhältnisse wesentlich anders, indem nur ca.  $\frac{1}{3}$  Eiweiß vorhanden ist.

Die weitere Untersuchung des frischen Harns muß zeigen, ob eine feste Verbindung zwischen dem Eiweißkörper und dem Porphyrin vorliegt oder nicht.

Möglich ist ja auch, daß Eiweißverbindung und freies Porphyrin nebeneinander vorkommen.

Wir müssen nun nochmals auf die Lichtsymptome bei der Porphyrinurie zurückkommen. Diese Lichtsymptome treten nicht bei allen Fällen auf, und es ist bis jetzt den früheren Autoren nicht gelungen, mit Porphyrin aus Urin Lichtkrankheit zu erzeugen.

Mit meinem aus dem Fall Günther stammenden Porphyrin erhielt ich wechselnde Resultate beim Meerschweinchen, jedoch konnte ich in einem Falle eine typische Sensibilisierung beobachten.

Weiterhin erhebt sich die Frage, ob bei der Porphyrinurie des Menschen primär neben dem Farbstoff auch seine Leukoverbindung auftritt. Von Sallet,<sup>1)</sup> A. Eichholz,<sup>2)</sup> A. Riva und L. Zoja,<sup>3)</sup> sowie Schumm,<sup>4)</sup> wird diese Frage bejaht und auch ich konnte stets ein Nachdunkeln des vom Farbstoff befreiten Urins beobachten. Darnach gelang es dann wieder, neue Mengen von Porphyrin abzuscheiden. Es scheint mir dies wichtig zu sein in Anbetracht der von Röse und mir<sup>5)</sup> beobachteten Tatsache, daß die Leukoverbindungen Hämatoporphyrins und Mesoporphyrins im Tierexperiment keine Lichterkrankung erzeugen. Wir sprachen damals die Vermutung aus, daß auch beim Menschen die Lichtempfindlichkeit davon abhängig ist, ob eben Farbstoff oder Leukoverbindung ausgeschieden wird. Nur wenn Farbstoff ausgeschieden wird, bezw. in der Haut vorhanden ist, könnten überhaupt Krankheitserscheinungen auftreten. Besonders könnte man sich vorstellen, daß bei Dermatitis solaris und Hydroa die Verhältnisse so liegen, daß aus irgend welchen Gründen

<sup>1)</sup> Revue de Med., Bd. 16, S. 542.

<sup>2)</sup> Journ. of Physiol., Bd. 14, S. 332.

<sup>3)</sup> Gazz. Med. di Torino, Bd. 43, S. 421.

<sup>4)</sup> l. c. und Münchner med. Wochenschr. Nr. 49, 1913, sowie Zeitschrift für urolog. Chirurg. 1914.

<sup>5)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 88, S. 9.

nur Leukoverbindung gebildet wird. Wenn dann bei der Belichtung an den dem Licht zugekehrten Stellen der Farbstoff erzeugt wird, so treten die Krankheitserscheinungen auf, jedoch ist dann noch keineswegs zu verlangen, daß dann das Porphyrin im Urin erscheint. Wie O. Neubauer<sup>1)</sup> gezeigt hat, wird Hämatoporphyrin Nencki in erster Linie durch die Galle ausgeschieden, ein Befund, den ich durchaus bestätigen kann. Erst bei Eingabe relativ großer Mengen von Farbstoff erscheint dieser in geringen Mengen im Urin, während große Mengen im Kot vorhanden sind. Man wird in Zukunft bei Dermatitis solaris, Hydroa, Bleivergiftung usw. ganz besonders auf die Untersuchung der Galle, bzw. des Stuhles zu achten haben. Natürlich muß noch besonders festgestellt werden, daß auch das Porphyrin des Menschen seinen Hauptweg durch die Galle und Kot nimmt. Nebelthau konnte allerdings bei seinem Fall in den Fäces kein Porphyrin nachweisen, während dagegen Günther, l. c. S. 136 angibt, daß der Stuhl seines Patienten schwarzbraun gefärbt war und er leicht spektroskopisch «Hämatoporphyrin» nachweisen konnte. Über meine Untersuchung des Kotes hoffe ich in der nächsten Mitteilung nähere Angaben machen zu können.<sup>2)</sup>

Durch das Vorkommen der Leukoverbindung des Porphyrins erklären sich auch die zahlreichen Angaben der Autoren über das Vorkommen von «Urobilin», «Urofuscin» usw. im Porphyrinurin; denn so gut wie die Leukoverbindungen von Hämato- und Mesoporphyrin zu «Urobilin» verharzen können, tritt dieser Prozeß auch hier ein. Das im pathologischen Urin nachgewiesene Mesobilirubinogen ist in dem Falle Günther im Urin nicht vorhanden; die Ehrlichsche Aldehydprobe ist negativ, auch im Chloroformextrakt.

Erwähnenswert ist noch eine interessante Beobachtung Günthers. Dieser Autor gibt an, l. c., daß die mikroskopische

<sup>1)</sup> Arch. für exper. Pathol., Bd. 43, S. 456.

<sup>2)</sup> In der Tat ist es mir inzwischen gelungen, auch aus dem Stuhl des Patienten das Kot-Porphyrin krystallisiert abzuscheiden; der Stuhl enthält auch «Sterkobilin». Das Kotporphyrin enthält 4 Carboxylgruppen weniger als das Urinporphyrin.

Untersuchung des Stuhles keine Besonderheiten ergab, außer daß fast keine grampositiven Bakterien vorhanden waren. Ich darf wohl daran erinnern, daß H. Kämmerer<sup>1)</sup> gefunden hat, daß durch Mesohämatin das Wachstum von grampositiven Mikroorganismen völlig vernichtet wird, während Hämatin, Hämatoporphyrin, Mesoporphyrin und Bilirubin keine ähnliche Wirkung hatten. Die Untersuchung des Urinporphyrins in dieser Hinsicht, ebenso die seiner Derivate wird von besonderem Interesse sein.

### Experimenteller Teil.

#### I. Isolierung des Methylesters des Urinporphyrins.

Für die Gewinnung des Urinporphyrins in Form des kristallisierten Methylesters scheint es nach der bisherigen Untersuchung gleichgültig zu sein, ob der Harn sich in ammoniakalischer Gärung befindet oder nicht. Bei der Erstdarstellung in kristallisiertem Zustand (Frühjahr 1915) war der Urin unzersetzt, bei der folgenden war er trotz zugesetztem Chloroform in ammoniakalischer Gärung begriffen. Im Resultat ergab sich kein Unterschied. Die erhaltenen Präparate hatten die gleichen Eigenschaften, jedoch sind die erhaltenen Nebenprodukte nicht identisch. Zur weiteren Entscheidung über diesen Punkt habe ich eine Probe Urin seit längerer Zeit faulen lassen, beabsichtige diese nach  $\frac{1}{4}$ jährigem Stehen zu verarbeiten und hoffe, dann definitive Auskunft geben zu können, in welcher Art eine Veränderung des Urinporphyrins erfolgt.

#### Das Verfahren.

Das Verfahren gestaltet sich wie folgt: Der filtrierte Urin (25 Liter; eine nachweisbare Menge Eiweiß war mit den üblichen Proben nicht festzustellen) wird mit einem Überschuß von Eisessig versetzt. (Beim unzersetzten Urin waren für 8 Liter Urin 100 ccm Eisessig nötig, beim zersetzten die doppelte Menge.) Über Nacht fällt das Porphyrin in Flocken aus, die sich teils an den Boden setzen, teils an der Oberfläche schwimmen. Die dazwischen befindliche klare Flüssigkeit, die das Porphyrinspek-

<sup>1)</sup> Verhandlungen des Kongresses für innere Medizin 1914.

trum nur noch angedeutet zeigt, wird abgehebert (Verarbeitung siehe S. 55), der Niederschlag auf einem mit Kieselguhr beschickten Filter auf einer großen Steinzeugnutsche abgesaugt, mit Wasser ausgewaschen und dann das Filter ca. 1–2 Stunden zum Trocknen aufgestellt. Völliges Eintrocknen des Niederschlages ist zu vermeiden, da die jetzt folgende Auflösung in Natronlauge sonst viel Zeit in Anspruch nimmt. Der Gesamtniederschlag wird in 40 ccm n-Natronlauge und 1 Liter Wasser gelöst, filtriert und mit Essigsäure unter Vermeidung eines größeren Überschusses gefällt, auf gehärtetem Filter abgesaugt und vollkommen ausgewaschen.

Zur Analyse wurde bei gewöhnlicher Temperatur im Vakuum zur Gewichtskonstanz getrocknet.

0,1277 g Substanz: 0,2611 g Kohlensäure und 0,0737 g Wasser. 0,1570 g Substanz gaben 14 ccm N bei 18° und 715 mm Hg.

$C_{27}H_{36}N_4O_{10}$ . Ber.: C = 56,21, H = 6,30, N = 9,72.

Gef.: C = 55,76, H = 6,31, N = 9,70.

Es ist auffallend, wie leicht man bei solch amorphen Präparaten fast regelmäßig Analysenzahlen findet, die auf eine bestimmte Formel recht gut stimmen.

Das Präparat enthielt außerdem noch Schwefel und eine geringe Menge Asche. Die Ausbeute aus 25 Liter Urin betrug 12 g feuchtes Material, 6 g trockenem entsprechend. Zur Verarbeitung auf Methylester ist es zweckmäßig, das Präparat nicht völlig eintrocknen zu lassen, sondern feucht zu verarbeiten. Demgemäß wird der Niederschlag mit ca. 300 ccm Methylalkohol übergossen und unter guter Eiskühlung mit trockener gasförmiger Salzsäure gesättigt. Unter öfterem Umschütteln läßt man 24 Stunden stehen, verdünnt dann mit der gleichen Menge Methylalkohol und filtriert vom ungelösten Rückstand, der trocken 2,7 g wiegt, ab. Diesen 2,7 g konnte bei nochmaliger Behandlung mit Methylalkoholsalzsäure kein Farbstoff mehr entzogen werden. Näheres über diesen Körper weiter unten. Die methylalkoholische Lösung wird in das mehrfache Volum Wasser gegossen und unter Eiskühlung mit Soda alkalisiert, hierauf mit Chloroform extrahiert.



Der gesamte Farbstoff geht ins Chloroform, ein Beweis, daß die Veresterung unter den angewandten Bedingungen eine vollkommene ist. Der Chloroformextrakt wurde nach der Befreiung vom Wasser im Vakuum zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wiegt etwas über 3 g und ist krystallisiert.

Zur Reinigung wurde in ca. 70 ccm Chloroform gelöst, filtriert und zu der warmen Lösung kochend heißer Methylalkohol zugegeben. Alsbald krystallisiert der Methylester in konzentrisch vereinigten Nadeln. (Vgl. die Abbildung III.) Die Mutterlauge ist stark gefärbt und enthält ein Nebenprodukt, das weiter unten beschrieben werden soll. Zu den Analysen des Methylesters dienten Präparate verschiedener Darstellung, teils war 3 mal umkrystallisiert. Die Mikroanalysen hat Herr Dr. Lieb in Graz wieder ausgeführt, wie überhaupt sämtliche Mikroanalysen dieser Arbeit. Die Unentbehrlichkeit der Pregl'schen Mikromethoden für den physiologischen Chemiker hat sich auch hier wieder erwiesen.

0,1530 g Subst.	gaben	0,3419 g Kohlensäure	und	0,0855 g Wasser.
0,1540 „	„	8,7 ccm N bei 20°	und	716 mm Hg.
0,1585 „	„	0,3565 g Kohlensäure	und	0,0876 g Wasser.
0,1219 „	„	7 ccm N bei 20°	und	716 mm Hg.
4,350 mg	„	9,70 mg Kohlensäure	und	2,13 mg Wasser.
4,572 „	„	10,14 „	„	2,36 „
4,623 „	„	0,248 ccm N bei 20°	und	734 mm Hg.
4,266 „	„	9,57 mg Kohlensäure	und	2,23 mg Wasser.
4,058 „	„	0,229 ccm N bei 23°	und	730 mm Hg.

$C_{49}H_{56}N_4O_{16}$	Ber.:	C = 60,98,	H = 5,97,	N = 5,93.
	Gef.:	C = 60,94,	H = 6,25,	N = 6,10.
	„	61,34,	6,19,	6,20.
	„	60,82,	5,48,	6,04.
	„	60,49,	5,78,	—
	„	61,18,	5,85,	6,25.

Die Molekulargewichtsbestimmung des Methylesters wurde in Chloroform nach der Siedepunkterhöhungsmethode ausgeführt. 0,7038 g Substanz bewirkten gelöst in 30,45 g Chloroform eine Erhöhung des Siedepunkts um 0,090°.  $K = 36,6$ . Hieraus berechnet sich das Molekulargewicht zu 940, während obige Formel 944,49 verlangt.

Endlich wurden nach der Zeiselschen Methode die Methoxylgruppen bestimmt.



I. Freies Urinporphyrin.



II. Urinporphyrinäthylester.



III. Urinporphyrinmethylester.



IV. Komplexes Eisensalz des Urinporphyrinmethylesters.

4,312 mg Subst. gaben 8,145 mg AgJ.

4,062 „ „ „ 6,84 „ „

Ber. für 7 OCH<sub>3</sub>: 23,04.

Gef. „ „ : 24,96 und 22,25.

Alle Analysenzahlen mit Ausnahme der Methoxylbestimmungen stimmen gut mit den theoretischen Werten überein. Die Methoxylbestimmungen machten, wie mir Herr Dr. Lieb mitteilte, große Schwierigkeiten,<sup>1)</sup> weil wahrscheinlich ein schwer lösliches entmethoxyliertes Produkt entsteht, das dann noch unangegriffene Substanz einhüllt. Indessen geben die Bestimmungen bei dem gleich zu beschreibenden Äthylester absolut einwandfreie Zahlen, ebenso die des Kupfer- und Eisensalzes, sodaß an der ermittelten Zusammensetzung kein Zweifel sein kann.

## II. Isolierung des Äthylesters des Urinporphyrins.

Der Äthylester des Urinporphyrins wird in genau der gleichen Weise wie der Methylester bereitet. Er wird aus Chloroform-Äthylalkohol umkrystallisiert, indem die Chloroformlösung mit der 4—5fachen Menge heißen Äthylalkohols versetzt wird. (Die Abbildung II zeigt das Aussehen der Krystalle.) Zur Analyse wurden Präparate verschiedener Darstellung, die zwei- und dreimal umkrystallisiert waren, verwandt. Während der Methylester bei 290° unter Zersetzung schmilzt, schmilzt der Äthylester erheblich niedriger, nämlich bei 220°.

Außer in Chloroform ist der Äthylester, ebenso wie der Methylester, in sämtlichen versuchten Lösungsmitteln kalt sehr schwer löslich, heißer Alkohol löst etwas, heißer Eisessig leicht. Alle Lösungen fluoreszieren tiefrot.

4,403 mg Subst. gaben 10,20 mg Kohlensäure und 2,57 mg Wasser.

4,338 „ „ „ 10,03 „ „ „ 2,59 „ „

4,568 „ „ „ 0,224 ccm N bei 20° und 730 mm Hg.

4,188 „ „ „ 9,67 mg Kohlensäure und 2,44 mg Wasser.

4,715 „ „ „ 0,234 ccm N bei 20° und 734 mm Hg.

4,352 „ „ „ 10,08 mg Kohlensäure und 2,565 mg Wasser.

4,920 „ „ „ 0,242 ccm N bei 19° und 734 mm Hg.

<sup>1)</sup> Hierauf wird in der nächsten Mitteilung noch näher eingegangen werden.

$C_{85}H_{70}N_4O_{16}$	Ber.:	C = 63,30,	H = 6,77,	N = 5,38.
	Gef.:	C = 63,18,	H = 6,53,	N = 5,49.
		> > 63,06,	> 6,68,	> —
		> > 62,97,	> 6,52,	> 5,58.
		> > 63,17,	> 6,60,	> 5,55.

Die Molekulargewichtsbestimmung des Äthylesters wurde in Chloroform nach der Siedepunkterhöhungsmethode ausgeführt.

0,6917 g Substanz bewirkten gelöst in 25,40 g Chloroform eine Erhöhung des Siedepunkts um 0,100°.  $K. = 36,6$ . Hieraus berechnet sich das Molekulargewicht zu 997, während obige Formel 1042,60 verlangt.

Nach der Zeiselschen Methode wurden die Äthoxylgruppen bestimmt.

4,178 mg Subst. gaben 6,644 mg AgJ.

3,920 > > > 6,12 > >

4,490 > > > 7,05 > >

Ber. für 7  $OC_2H_5$ : 30,24.

Gef.: 30,50 und 29,95 und 30,12.

Zur Entscheidung der Frage, ob der Farbstoff die Ebene des polarisierten Lichtes ablenkt, wurde die (reinrote) Chloroformlösung des Äthylesters benutzt. 0,0650 g Substanz wurden in 10 ccm Chloroform gelöst. In 1 dm-Rohr konnte, obwohl eine ca. 1000kerzige Nernstlampe als Lichtquelle benutzt wurde, nicht polarisiert werden. Im  $\frac{1}{2}$  dm-Rohr erhielt ich folgende Werte: Nullpunkt 1,5, nach Einlage des Rohres: 1,55; 1,45; 1,57; 1,55; 1,44 usw. Die Substanz war also unter den untersuchten Verhältnissen optisch inaktiv.

Auf die spektroskopischen Befunde sämtlicher hier dargestellten Körper komme ich in der nächsten Mitteilung zurück.

### III. Verseifung des Methylesters.

#### 1. Auf saurem Wege.

0,5 g Methylester wurden mit 30 ccm Eisessigbromwasserstoff 1 Stunde lang geschüttelt, worauf vollkommene Lösung eingetreten war. Es wurde in viel Wasser gegossen und mit Natriumacetat versetzt, wobei ein blauvioletter Nieder-

schlag ausfiel, der abgesaugt und mit Wasser vollkommen ausgewaschen wurde. Das so erhaltene Präparat ist in Bicarbonat restlos löslich (die Lösung zeigt tiefrote Fluorescenz), ein Beweis dafür, daß die Verseifung eine vollkommene war. Aus Pyridin-Alkohol krystallisiert das freie Porphyrin schön (vgl. die Abbildung I), enthält jedoch ein halbes Molekül Krystall-Pyridin, wie die Analyse zeigt. Besonders schön krystallisiert das freie Porphyrin aus Eisessig, jedoch wurde das erhaltene Präparat noch nicht analysiert.

4,583 mg Subst.	gaben	9,705 mg Kohlensäure	und	1,99 mg Wasser.
4,413	>	9,330	>	1,93
4,202	>	0,281 ccm N bei 20,5°	und	728 mm Hg.
4,288	>	9,125 mg Kohlensäure	und	1,84 mg Wasser.
4,290	>	0,294 ccm N bei 23°	und	734 mm Hg.

Methoxylbestimmung nach Zeisel verlief negativ.

$C_{41}H_{43}N_4O_{16} + \frac{1}{2} C_5H_5N$ (883,89).	Ber.:	C = 58,82,	H = 5,19,	N = 7,13.
	Gef.:	C = 57,75,	H = 4,86,	N = 7,45.
		> 57,66,	> 4,89,	> —
		> 58,04,	> 4,80,	> 7,63.

Zu weiteren Analysen wurde in Bicarbonat gelöst, filtriert und mit Eisessig angesäuert. Bei vorsichtigem Zusatz erhält man den Farbstoff in feinen, mikroskopischen Nadelchen, meist aber amorph. Trotz stundenlangem Auswaschen mit Wasser hält der Farbstoff hartnäckig Asche zurück:

3,945 mg Substanz	gaben	0,099 mg Asche
— 0,099		
3,846 mg	>	8,155 > Kohlensäure und 1,78 mg H <sub>2</sub> O
4,608	>	0,269 ccm N bei 20,5° und 732 mm Hg
$C_{41}H_{43}N_4O_{16}$ (846,38).	Ber.:	C = 58,12, H = 5,00, N = 6,62.
	Gef.:	C = 57,83, H = 5,18, N = 6,54
		(6,7 N bei Abzug der Asche).

## 2. Verseifung des Methylesters mit Natronlauge.

0,5 g des Methylesters wurden mit 50 ccm Natronlauge 10% 1 Stunde am Rückflußkühler gekocht, wobei schon nach 5 Minuten Lösung eingetreten war. Hierauf wurde mit 100 ccm Eisessig bei Gegenwart von viel Äther versetzt und viermal ausgeäthert. Der Äther färbt sich schwach an und zeigt das sogenannte «neutrale Hämatoporphyrinspektrum». Ich bemerke

ausdrücklich, daß nur bei Zusatz dieses gewaltigen Überschusses von Eisessig Spuren, bei Zusatz von 20 ccm Eisessig nicht eine Spur des Farbstoffs in den Äther gehen.

Der Ätherextrakt wurde eingedampft und der geringfügige Rückstand mit Methylalkohol und Salzsäure verestert. Hierbei trat intensive Grünfärbung ein, spektroskopisch war jedoch nur das «saure Hämatoporphyrinspektrum» zu konstatieren. Bei der weiteren Verarbeitung in der oben beschriebenen Weise konnte nur eine unwägbare Menge vom Aussehen des Methylesters (nach der Art der Krystallisation) gewonnen werden, zur Mikroanalyse oder Schmelzpunktbestimmung reichte sie nicht aus. Ich beschreibe diesen Versuch so ausführlich wegen des gleich zu behandelnden Nebenproduktes, das unter gleichen Bedingungen sich ganz anders verhält.

In der vom Äther getrennten Flüssigkeit befindet sich das freie Porphyrin. Dies wird abgesaugt, mit Natriumbicarbonat gelöst, filtriert und dann durch Eisessig gefällt. Trotz stundenlangem Auswaschen konnte auch hier kein aschefreies Präparat erhalten werden.

4,782 mg Subst. gaben 0,089 mg Asche = 1,86 %.

4,693 „ „ „ 9,905 „ Kohlensäure und 2,09 mg Wasser.

6,450 „ „ „ 0,378 ccm N bei 23° und 734 mm Hg.

Methoxylbestimmung nach Zeisel verlief negativ.

$C_4H_4N_4O_{16}$  (846,38). Ber.: C = 58,12, H = 5,00, N = 6,62.

Asche abgezogen. Gef.: C = 57,56, H = 4,98, N = 6,65.

#### IV. Versuche von dem Farbstoff einen hypothetischen (Zucker- oder Glucuronsäure) Rest abzuspalten.

1 g Ester wurde 2 Stunden lang im zugeschmolzenen Rohr mit 50 ccm Eisessigbromwasserstoff auf 160° erhitzt. Darnach war nur geringfügige Verharzung eingetreten, von der nach Verdünnen mit Eisessig abfiltriert wurde. Durch Versetzen mit Wasser und Natriumacetat wurde der Farbstoff abgeschieden, abgesaugt und eine Probe in den Methylester übergeführt, der sofort krystallisierte und den richtigen Schmelzpunkt zeigte. Die Hauptmenge wurde in den Äthylester übergeführt, der gleichfalls schön krystallisierte.

Hierauf wurde ein halbes Gramm Ester in 50 ccm rauchender Salzsäure gelöst und 2 Stunden auf 180° erhitzt. Auch hierbei trat neben der Verseifung nur geringfügige Verharzung ein. In üblicher Weise wurde der Methylester hergestellt, der wieder vollständig krystallisierte.

Ein Versuch, das Urinporphyrin mit Hilfe von verdünntem Eisessigjodwasserstoff entsprechend der Mesoporphyrindarstellung in Mesoporphyrin überzuführen, mißlang.

#### V. Verarbeitung der Mutterlauge des durch Essigsäure in Porphyrinurin erzeugten Niederschlags und über Nebenprodukte.

Die Mutterlauge vom abgeschiedenen Farbstoff (vgl. Seite 49) wurde mit 20%iger Chlorbaryumlösung gefällt und zwar wurde zu je 10 l ein Liter der Chlorbaryumlösung zugegeben. Der entstandene Niederschlag wurde abgesaugt, mit Wasser ausgewaschen und noch feucht mit Methylalkohol-Salzsäure angesetzt. (Methylalkohol mit trockenem Chlorwasserstoff gesättigt.) Wie schon erwähnt, war in der ursprünglichen Lösung das Porphyrinspektrum nur noch andeutungsweise vorhanden. Um so auffallender war es, wie sich nun die methylalkoholische Salzsäure alsbald tiefrot anfärbte. Nach 24stündigem Stehen unter häufigem Umschütteln wurde mit Methylalkohol verdünnt, abgesaugt, gut ausgewaschen und in der oben beschriebenen Weise auf den Methylester verarbeitet. Nun wurde umkrystallisiert aus Chloroform und heißem Methylalkohol und dabei 1,1 g reiner Methylester des Urinporphyrins vom Schmelzpunkt 290° erhalten. Die methylalkoholische Mutterlauge gab beim Eindampfen 2 g Rückstand, der aus einem Nebenprodukt besteht, das wahrscheinlich analog dem auf Seite 50 erwähnten (in der methylalkoholischen Chloroformmutterlauge des Methylesters) zusammengesetzt und dessen Untersuchung noch nicht völlig abgeschlossen ist.

Es wurde ebenfalls auf einem Umweg in Form des bei 250° schmelzenden Methylesters isoliert und festgestellt, daß dieser Ester sauerstoffärmer ist wie der oben beschriebene Porphyrinester und weniger Methoxygruppen enthält. Offen-

bar handelt es sich um ein Reduktionsprodukt, worauf in der nächsten Mitteilung näher eingegangen wird.

Das Filtrat vom Baryumniederschlag, das hellgelb war und kein Porphyrinspektrum zeigte, dunkelte stark nach und wurde nach 24 Stunden mit Natriumsulfat gefällt (50 ccm 20%-Lösung für 8 Liter filtriert). Der Niederschlag wurde, wie oben, auf Methylester verarbeitet und knapp 0,1 g Farbstoff vom Schmelzpunkt 290° erhalten.

Wie Seite 49 erwähnt, hinterbleibt bei der Veresterung mit Methylalkohol und Salzsäure ein in diesem Reagens unlöslicher Rest, der ca.  $\frac{1}{3}$  des Rohproduktes ausmacht. Da das Rohprodukt schwefelhaltig ist, der reine Ester dagegen schwefelfrei, so war zu erwarten, daß dieses Produkt schwefelreicher wäre. Dies ist auch in der Tat der Fall, die Analyse ergab folgende Zahlen.

0,1104 g Subst. gaben 0,0011 g Asche (schneeweiß).

0,2015 „ „ „ 0,3680 „ Kohlensäure und 0,1295 g Wasser.

0,1806 „ „ „ 25,3 ccm N bei 23° und 715 mm Hg.

0,2066 „ „ „ 0,0337 g AgCl.

0,2066 „ „ „ 0,0162 g BaSO<sub>4</sub>.

Gef.: C = 49,81%, H = 7,19%, N = 14,95%, Cl = 4,03%, S = 1,07%.

Hiernach war es sehr wahrscheinlich, daß es sich um einen Eiweißkörper handelt. Zur Feststellung wurden 1,5 g mit 50 ccm rauchender Salzsäure über Nacht am Rückflußkühler gekocht, am nächsten Morgen die braunschwarze Lösung durch Absaugen auf gehärtetem Filtrierpapier von geringer Menge nicht gelöster Substanz befreit, und das Filtrat im Vakuum zur Trockene eingedampft. Der Rückstand (charakteristischer Geruch nach Aminosäuren) wurde mit 10 ccm Wasser aufgenommen, der geringfügige Rest, der nicht in Lösung ging, abfiltriert und mit ein paar Tropfen Phosphorwolframsäure geklärt. Nachdem vom Niederschlag abfiltriert war, wurde im Vakuum wiederum zur Trockene eingedampft, wobei ein zäher Sirup hinterblieb, der mit Kupferoxyd und Wasser wiederholt ausgekocht wurde. Das tiefdunkelblaue Filtrat wird auf ca. 10 ccm eingedampft. Hierbei macht sich der eigenartige Geruch, den man beim Eindampfen der Kupfersalze eines Eiweißhydrolysen-gemisches beobachtet, wieder bemerkbar. Beim Erkalten wurde



nur eine geringfügige Abscheidung konstatiert, weshalb mit Schwefelwasserstoff nach Zusatz von Bleiacetat bei 70° das Kupfer entfernt und aus dem farblosen Filtrat mit Kohlensäure der Schwefelwasserstoff ausgetrieben wurde.

Die so behandelte Flüssigkeit gibt nun intensiv die Paulysche Eiweißreaktion mit Diazobenzolsulfosäure, ebenso die Millonsche Reaktion in charakteristischer Weise. Der Rest der Lösung wurde mit Phenolphthalein als Indikator mit Natronlauge zur Rotfärbung titriert und jetzt neutral titrierte Formaldehydlösung zugegeben. Sofort trat Entfärbung ein und 15 ccm  $\frac{1}{10}$ -Lauge wurden gebraucht bis zur Rotfärbung.

Nimmt man alle Beobachtungen zusammen, so kann es keinem Zweifel unterliegen, daß hier ein Gemisch von Aminosäuren vorliegt und daß das Ausgangsmaterial ein Körper ist, der zur Eiweißgruppe gehört.

## VI. Komplexes Kupfersalz des Urinporphyrinmethylesters.

Der Methylester gibt ein schön krystallisierendes Kupfersalz, das man erhält durch Zusammengießen seiner Eisessiglösung mit einer Eisessiglösung von Kupferacetat. Feine verfilzte hellrote Nadeln, aus Pyridin-Eisessig umkrystallisierbar. Spektroskopisch ist ein Umschlag in den Absorptionserscheinungen zu konstatieren. Es sind nur noch zwei Streifen vorhanden, näheres hierüber in der nächsten Mitteilung.

5,568 mg Sbst. gaben 0,460 mg CuO, 11,67 mg Kohlens. u. 2,62 mg Wasser.

5,298 „ „ „ 0,420 „ „ 11,08 „ „ „ 2,53 „ „

4,768 „ „ „ 0,255 ccm N bei 23° und 730 mm Hg.

5,170 „ „ „ 0,270 ccm N bei 22° und 731 mm Hg.

4,126 „ „ „ 0,336 mg CuO.

$C_{48}H_{54}N_4O_{16}Cu$  (1006,04). Ber.: C = 57,26, H = 5,45, N = 5,57, Cu = 6,32.

Gef.: C = 57,16, H = 5,27, N = 5,92, Cu = 6,60.

Cu = 6,33.

„ C = 57,04, H = 5,34, N = 5,81, Cu = 6,51.

## VII. Komplexes Eisensalz des Urinporphyrinmethylesters.

0,5 g Methylester in Eisessig gelöst wurden mit 1 ccm gesättigter Kochsalzlösung und 0,1 g Eisen, gelöst in Eisessig,

1 Stunde auf dem siedenden Wasserbad erhitzt. Arbeitet man konzentriert, so krystallisiert über Nacht das Eisensalz in derben Prismen heraus, ist dies nicht der Fall, so dunstet man ein und bald beginnt die Krystallisation. Man saugt dann ab und wäscht mit Wasser total aus, löst hierauf in Chloroform und setzt Alkohol und Äther zu. Man erhält 0,4 g an reinem krystallisiertem Material. Die Spektralerscheinung ist der des Hämins sehr ähnlich. Näheres in der nächsten Mitteilung. In Kapillarröhrchen sintert die Substanz ab 238°, ohne richtig zu schmelzen. Gegen 280° tritt totale Zersetzung ein.

5,120 mg Subst. gaben 0,258 ccm N bei 22° und 732 mm Hg.

4,155 „ „ „ 0,329 mg Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> und 0,610 mg AgCl.

5,061 „ „ „ 0,411 „ Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

5,116 „ „ „ 10,46 „ Kohlensäure und 2,31 mg Wasser.

5,050 „ „ „ 10,32 „ „ „ 2,26 „ „

C<sub>48</sub>H<sub>54</sub>N<sub>4</sub>O<sub>16</sub> FeCl (1033,77).

Ber.: C = 55,72, H = 5,27, N = 5,42, Fe = 5,40, Cl = 3,43.

Gef.: 55,76, 5,05, N = 5,62, Fe = 5,54, Cl = 3,63.

55,73, 5,01, Fe = 5,68.

### VIII. Totale Reduktion des Urinporphyrins.

Den ersten Versuch der totalen Reduktion des Urinporphyrins führte ich aus, als es mir noch nicht gelungen war, das Porphyrin krystallisiert zu erhalten. Die Analysen des Präparates sind Seite 49 angegeben.

10 g Porphyrin wurden mit 300 ccm Eisessigjodwasserstoff 2 Stunden lang in siedendem Wasserbad erhitzt. Nach ca. 1/2 Stunde war bei öfterem Umschwenken Lösung eingetreten. Das abgeschiedene Jod wurde mit Jodphosphonium reduziert und der Eisessigjodwasserstoff im Vakuum abdestilliert. Die Verarbeitung erfolgte in der beim Hämin üblichen Weise.

Die Basenfraktion fehlte total; nicht einmal die so empfindliche Ehrlichsche Probe mit Dimethylaminobenzaldehyd war mehr wie rosa gefärbt, auch bei Zusatz von Alkohol.

Die Säurefraktion gab intensive Aldehydreaktion und es wurden 0,3 g Pikrat erhalten vom unscharfen Schmelzpunkt 144°. Nach Umkrystallisieren aus Alkohol schmolz das Pikrat

bei 158—159° unter Zersetzung. Der Mischschmelzpunkt mit Phonopyrrolcarbonsäurepikrat gab keine Depression, der mit Isophonopyrrolcarbonsäure lag bei 144°. Die Ehrlichsche Probe war intensiv positiv.

4,665 mg Subst. gaben 7,905 mg Kohlensäure und 1,68 mg Wasser.

4,362 „ „ „ 7,385 „ „ „ 1,62 „ „ „

5,407 „ „ „ 0,672 ccm N bei 20° und 730 mm Hg.

$C_{15}H_{16}N_4O_9$ . Ber.: C = 45,43, H = 4,07, N = 14,15.

Gef.: C = 46,21, H = 4,03, N = 13,91.

„ „ 46,17, „ 4,16. — —

Gegen das Resultat dieses Versuchs, besonders in bezug auf das Fehlen der Basenfraktion, konnte mit Recht der Einwand gemacht werden, daß dieses Fehlen durch den Eiweißgehalt des Präparates bedingt sei. Ich habe deshalb den Versuch mit 0,6 g reinem krystallisiertem Äthylester wiederholt und konnte feststellen, daß auch hier die Basenfraktion total ausbleibt. Die Ehrlichsche Probe war vollkommen negativ. Phonopyrrolcarbonsäure war nach der intensiven Ehrlichschen Aldehydprobe vorhanden, jedoch nur in geringer Menge, sodaß die oben erhaltene geringe Ausbeute nicht nur auf das verunreinigte Material zurückzuführen ist, sondern auf die Tatsache, daß das Urinporphyrin bei der Reduktion auch in bezug auf die Menge der Säurefraktion weit hinter der des Hämins und seiner Derivate zurückbleibt.

Nun konnte noch der Einwand erhoben werden, daß die angewandte Substanzmenge an reinem Porphyrin zu gering sei, um Basen und Säuren nachweisen zu können. Ich habe deshalb 0,6 g Mesoporphyrinäthylester in der gleichen Weise behandelt und konnte Säuren und Basenfraktion in Form der Pikrate leicht in zur Makroanalyse ausreichenden Menge gewinnen.

### IX. Sensibilisierungsversuche mit Urinporphyrin.

Auch diese Versuche habe ich mit dem Seite 11 angeführten Präparat ausgeführt und es kann sein, daß das reine Porphyrin in allen Fällen sensibilisierend wirken wird. Hier beschreibe ich nur den Versuch, bei dem mit dem unreinen Präparat

eine typische Lichtkrankheit erzielt wurde. Die Versuche mit dem reinen Porphyrin werden selbstverständlich noch ausgeführt.

August 1914. 0,03 g Porphyrin wurden in  $\frac{n}{10}$ -Natronlauge gelöst und einem braun-weiß scheckigen Meerschweinchen subcutan eingespritzt. Es wurde bei wechselndem Sonnenschein 1 Stunde belichtet (die Sonne schien im ganzen höchstens 10 Minuten).

Während der Belichtung gelegentlich Kratzen und Pfeifen, jedoch nicht sehr ausgesprochen. Über Nacht bildete sich aber eine Schwellung der Augenlider und eine starke Konjunktivitis. Das rechte Auge konnte nicht mehr geöffnet werden.

Am nächsten Morgen 8<sup>25</sup> in die hell scheinende Sonne. Schwere Sensibilisierung mit allen charakteristischen Erscheinungen. 9<sup>50</sup> Exitus. Todesursache: Glottisödem.

Verschiedene weitere Versuche unter den gleichen Bedingungen hatten kein Ergebnis. Dieses Präparat unterscheidet sich somit sehr scharf auch biologisch vom Hämatoporphyrin, das ja fast regelmäßig die schwersten Erscheinungen bewirkt.

---