

Über die Konstitution des Kotporphyrins.

Von

Hans Fischer.

Mit drei Figuren.

(Aus dem Institut für angew. med. Chemie Innsbruck.)

(Der Redaktion zugegangen am 25. Juli 1916.)

In früheren Arbeiten wurde gezeigt, daß Urinporphyrin die Zusammensetzung $C_{40}H_{36}N_4O_{16}$ besitzt, während Kotporphyrin der Formel $C_{36}H_{36}N_4O_8$ entspricht. Beide konnten in direkte Beziehungen zueinander gebracht werden, indem durch Kohlensäureabspaltung Urin — in Kotporphyrin übergeführt werden konnte. Das Urinporphyrin ist also ein vierfach carbonyliertes Kotporphyrin und eine weitere Aufgabe wird sein, den Ort des Eintritts der Carboxylgruppen und die Veränderungen, die dadurch hervorgerufen werden, zu ermitteln.

Ich habe mich zunächst mit dem Kotporphyrin beschäftigt, soweit es das in geringer Menge auf mühsamem Wege erhältliche Material erlaubt hat.

Nähere Beziehungen zum Blutfarbstoff waren schon durch frühere Befunde gegeben, von denen besonders die Existenz eines komplexen Eisen- und Kupfersalzes unter Umschwung der spektroskopischen Erscheinungen hervorzuheben ist. Ich habe dann neuerdings zunächst versucht, die beiden Sauerstoffatome, die nicht in Form einer Carboxylgruppe im Kotporphyrin vorhanden sind, auf reduktivem Wege zu entfernen. Benützt wurde dabei die Reduktionsmethode mit Eisessigjodwasserstoff, mit der es leicht gelingt, dem Hämatoporphyrin seine beiden neu hinzugekommenen Sauerstoffatome zu entziehen, und so zum Mesoporphyrin zu gelangen. Hier gelang dies nicht, entweder trat keine Einwirkung ein oder wurde bei energischerem Vorgehen das Kotporphyrin vollkommen aufgespalten. Es ist hiernach sehr wahrscheinlich, daß die

beiden Sauerstoffatome nicht in Form von alkoholischen Hydroxylgruppen vorhanden, sondern wie bei der Bilirubinsäure direkt an Kohlenstoff in den Pyrrolkernen gebunden sind.

Daß sich Pyrrolkerne im Kotporphyrin befinden, wurde durch die totale Aufspaltung bewiesen. In der Säurefraktion konnte leicht Phonopyrrolcarbonsäure nachgewiesen werden in einer Ausbeute, die ein Molekül etwas übersteigt. Anhaltspunkte für das Vorkommen einer isomeren oder anderer Pyrrolsäuren konnten nicht gewonnen werden, wenn auch die geringe Menge Ausgangsmaterial, mit der gearbeitet werden mußte, zur Vorsicht mahnt. Die Basenfraktion fehlte vollkommen, ein sehr auffallender Befund.

Entsprechend dem Entstehen von Phonopyrrolcarbonsäure bei der reduktiven Spaltung konnte bei der Oxydation Hämatinsäure nachgewiesen werden, ebenfalls in einer Menge, die ein Molekül übersteigt. Anhaltspunkte für die Bildung von Methyläthylmaleinimid konnten nicht erhalten werden.

Bei der Behandlung mit Kaliummethylat unter Druck bei hoher Temperatur wurde glatt Aufspaltung erzielt und Phyllopyrrolcarbonsäure erhalten, ebenfalls in befriedigender Ausbeute. In der Basenfraktion wurde ein schön krystallisierender Körper beobachtet, aber in so geringer Ausbeute, daß eine Identifikation nicht gelang. Vielleicht handelt es sich um ein Pyrrolin. Tetramethyl-, Trimethyl- oder Phyllopyrrol lagen bestimmt nicht vor, wie die krystallographischen Messungen von Herrn Dr. Steinmetz in München ergaben, dem ich auch hier für seine vielfachen Bemühungen meinen verbindlichsten Dank ausspreche.

Die Ergebnisse der Oxydation und Reduktion zeigen also in bezug auf die Säurefraktion Ähnlichkeit mit dem Hämin und seinen Derivaten, in der Basenfraktion ergibt sich jedoch ein prinzipieller Unterschied, indem diese fehlt außer bei der Aufspaltung durch Kaliummethylat. Auch letzterer Befund spricht dafür, daß die beiden Sauerstoffatome, die nicht in Form von Carboxylgruppen im Kotporphyrin vorhanden sind, in α - oder β -Stellung die Pyrrolkerne des basischen Anteiles substituieren, wodurch dieses Verhalten seine Erklärung finden

würde. Allerdings muß hervorgehoben werden, daß ein exakter Beweis für das Vorliegen von Pyrrolkernen im basischen Anteil noch nicht erbracht ist.

Weiterhin wurde ein schön krystallisierendes Tetrachlor- und Tetrabromkotporphyrin dargestellt, wodurch eine weitere Analogie mit dem Häminderivat Mesoporphyrin gegeben ist, das die gleiche Reaktion zeigt.

Ich habe früher die Ansicht ausgesprochen, daß Kotporphyrin bzw. seine noch nicht dargestellte zwei Carboxylgruppen-haltige Muttersubstanz ein intermediäres Stoffwechselprodukt auf dem Wege Blut- zum Gallenfarbstoff sei, und es fragt sich, ob der chemische Abbau Anhaltspunkte für diese Theorie gewinnen läßt, mit andern Worten, ob Kotporphyrin in seinem chemischen Verhalten mehr dem Blut- oder dem Gallenfarbstoff ähnelt. Die Frage ist dahin entschieden, daß tatsächlich das Kotporphyrin eine Mittelstellung einnimmt.

An Blutfarbstoff erinnert die Kompleksalzbildung, die Tetrachlor- und Tetrabromverbindung, das Entstehen von Phono-pyrrolcarbonsäure, der Übergang in eine Leukoverbindung bei der Reduktion mit Natriumamalgam, die die Ehrlichsche Probe nicht erfüllt und die wieder in den Farbstoff leicht übergeht.

An Gallenfarbstoff erinnert das Fehlen der Basenfraktion (beim Gallenfarbstoff entsteht diese zwar, aber nur in sehr geringer Menge) und die glatte Bildung von Phyllopyrrolcarbonsäure, die bei der Behandlung von Hämin mit Kaliummethylat zwar auch beobachtet wird, aber in viel geringerer Ausbeute.

Weiterhin ist das Entstehen nur einer Pyrrolsäure, der Phonopyrrolcarbonsäure hervorzuheben, beim Gallenfarbstoff erhält man zwar nicht diese, sondern Isophonopyrrolcarbonsäure, das Wesentliche aber scheint darin zu liegen, daß nur eine Pyrrolsäure entsteht, während beim Blutfarbstoff drei verschiedene Säuren beobachtet werden.

An Blut- und Gallenfarbstoff gemeinschaftlich erinnert der oxydative Abbau, der Hämatinsäure in guter Ausbeute liefert, wie bei den genannten Farbstoffen. Daß das Kotporphyrin außer der Carboxylgruppe noch ein Kohlenstoffatom mehr besitzt wie der Blutfarbstoff, scheint mir nicht allzusehr

ins Gewicht zu fallen, wenn man bedenkt, wie leicht der Organismus zum Beispiel Methylierung und Entmethylierung vornehmen kann.

Weitere Untersuchungen müssen über den Bau des Kotporphyrins nähere Aufklärungen bringen.

Experimenteller Teil.

Versuch, das Kotporphyrin in Mesoporphyrin oder einen dem Mesoporphyrin nahestehenden Körper überzuführen.

1 g Kotporphyrinester wurde genau in derselben Weise behandelt, wie es gelingt, Hämatoporphyrin oder Hämin¹⁾ in Mesoporphyrin überzuführen, d. h. es wurde mit 15 ccm Eisessig, 2 ccm Jodwasserstoffsäure 1,96, 1,5 g rotem Phosphor und 3 ccm Wasser einundeinhalb Stunden lang unter Rückfluß gekocht. Nach der angegebenen Zeit wurden noch 6 ccm Wasser zugegeben, durch die keine Fällung eintritt und die es ermöglichen, die schnell abgekühlte Lösung auf gehärtetem Filtrierpapier abzusaugen, um den Phosphor abzutrennen; dann wurde noch zweimal mit wenig Eisessig nachgewaschen, das Filtrat mit dem ca. vierfachen Volumen Wasser und 15 ccm 33%iger Natronlauge versetzt, wodurch der Farbstoff in braunen Flocken ausfällt. Hierauf wurde abgesaugt und mit Wasser ausgewaschen. Ein schwerlösliches Natronsalz war nicht abscheidbar, deshalb wurde die Gesamtmenge verestert mit Methylalkoholsalzsäure und 0,7 g reiner, krystallisierter Kotporphyrinmethylester wieder gewonnen. F. P. 252°.

4,535 mg Subst.: 0,333 ccm N₂ bei 17° und 705 mm Hg
C₃₉H₄₂N₄O₈ Ber.: N = 8,07 Gef.: N = 8,01.

Totale Reduktion des Kotporphyrins.

1 g Kotporphyrinmethylester wurde, wie oft beschrieben, mit Eisessigjodwasserstoff reduziert und ganz analog den früher

¹⁾ Nencki und Zaleski, Ber. d. dtsh. Chem. Ges., Bd. 34, S. 997. Zaleski, Diese Zeitschrift, Bd. 37, S. 54, O. Piloty und H. Fink, Ber. d. dtsh. Chem. Ges., Bd. 45, S. 2497, Fischer und Röse, ibid., Bd. 46, S. 2465.

gegebenen Vorschriften verarbeitet. Auch hier fehlte die Basenfraktion fast vollkommen, eine minimale Ehrlichsche Probe war vorhanden. Der Ätherextrakt hinterließ beim Eindampfen einen geringfügigen öligen, an der Luft sich rasch rötenden Rückstand, ein Pikrat war nicht faßbar. Zur näheren Feststellung der Natur dieses Öles wären wohl mindestens 20 g Kotporphyrinester notwendig.

Der « saure » Ätherextrakt krystallisierte beim Eindampfen sofort in der für die Phonopyrrolcarbonsäuren charakteristischen Weise. Ausbeute 0,36 g. Diese Fraktion erwies sich nunmehr als in Äther relativ schwer löslich und beim Behandeln mit wenig Äther hinterblieb ein Rückstand (0,1314 g), der aus Chloroformpetroläther umkrystallisiert wurde. Derbe Prismen. F. P. 124—125°, ein Schmelzpunkt, wie ihn die Phonopyrrolcarbonsäure leicht beim Umkrystallisieren aus den genannten Lösungsmitteln zeigt. Den richtigen Schmelzpunkt 131° erhält man beim (verlustreichen) Umkrystallisieren aus Wasser.

Die Analysen bestätigen das Vorliegen von Phonopyrrolcarbonsäure.

4,510 mg Subst.: 0,343 ccm N₂ bei 15° und 711 mm Hg
C₉H₁₃NO₂ Ber.: N = 8,38 Gef.: N = 8,43.

Die Mutterlauge der Phonopyrrolcarbonsäure schied nach Zufügen von Petroläther noch zwei weitere Krystallisationen ab. Schmelzpunkt 120—125°. Mikroskopisch derbe, nadelförmige Prismen, nirgends die von der Bilirubinreduktion her bekannten dreieckigen Plättchen der Bilirubinsäure, die bestimmt nicht vorhanden ist. Die oben erwähnte ätherische Mutterlauge vom ätherschwerlöslichen Teil wurde mit 5 ccm 10%iger ätherischer Pikrinsäure versetzt und so 0,3054 g¹⁾ krystallisiertes Pikrat erhalten, das bei 151° unter Zersetzung schmolz. Nach einmaligem Umkrystallisieren aus Alkohol wurde der richtige Schmelzpunkt des Pikrats der Phonopyrrolcarbonsäure (F. P. 163°)

¹⁾ Um Mißverständnisse zu vermeiden, führe ich an, daß ich es nicht für wichtig halte, die Ausbeuten bis auf die letzten Dezimalen anzugeben, wiege sie aber prinzipiell auf der analytischen Wage, da so Irrtümer so gut wie ausgeschlossen sind.

erreicht und die Analysen bestätigten das Vorliegen dieser Verbindung.

4,183 mg Subst.: 0,533 ccm N_2 bei 16° und 723 mm Hg

4,203 mg Subst.: 0,532 ccm N_2 bei 16° und 723 mm Hg

$C_{16}H_{16}N_4O_6$ Ber.: N = 14,14 Gef.: N = 14,31; 14,22.

Wenn neben der Phonopyrrolcarbonsäure Isophonopyrrolcarbonsäure wie beim Blutfarbstoff war, so mußte sie sich in der Mutterlauge vom Pikrat der Phonopyrrolcarbonsäure befinden. Diese wurde deshalb in der üblichen Weise mit Ätherschwefelsäure zerlegt und nach totaler Entfernung der Pikrinsäure in gewohnter Weise mit salpetriger Säure oxydiert. Dabei wurde das Oxim der Phonopyrrolcarbonsäure erhalten, das an der charakteristischen Krystallform und am Schmelzpunkt 237° erkannt wurde. Die Analyse bestätigte das Vorliegen dieser Verbindung.

Ich glaube, daß die Isophonopyrrolcarbonsäure als Spaltprodukt tatsächlich nicht in Betracht kommt, besonders wenn man noch das Seite 7 beschriebene Resultat in Betracht zieht.

Die Mutterlauge vom Phonopyrrolcarbonsäureoxim wurde sodaalkalisch gemacht und in üblicher Weise auf Methyläthylmaleinimid verarbeitet. Hierbei wurde eine geringe Menge Substanz erhalten, die nicht den charakteristischen Geruch des gesuchten Körpers besaß; zur näheren Untersuchung war die Ausbeute viel zu gering.

Isolierung von Phonopyrrolcarbonsäureester aus Kotporphyrin.

Wie oben beschrieben, wurden 1 g Kotporphyrinmethylester mit verdünnter Eisessigjodwasserstoffsäuremischung behandelt, aber während 16 Stunden, in der Hoffnung, durch das lange Kochen entweder doch eine Reduktion zu einem mesoporphyrinähnlichen Körper oder eine partielle Aufspaltung zu erzielen.

Die Verarbeitung war ganz analog dem oben beschriebenen Versuch. Es wurden 0,2348 g Kotporphyrinmethylester vom F. P. 248° wiedergewonnen.

5,044 mg Subst.: 0,366 ccm N₂ bei 18° und 716 mm Hg
Ber.: N = 8,07 Gef.: N = 8,01.

Die Mutterlauge des Farbstoffes wurde viermal mit Äther ausgezogen, der Ätherextrakt im Vakuum eingedampft, zuletzt in siedendem Wasserbad, und der Rückstand mit Methylalkoholsalzsäure verestert.

Der in üblicher Weise gewonnene Ester krystallisierte und wog 0,30 g. Da man die Ester der Phono- und Isophonopyrrolcarbonsäure leicht durch die verschiedene¹⁾ Farbe der Pikrate unterscheiden kann, wurde der Ester in das Pikrat übergeführt. In allen Fraktionen war nur das typische, braune Phonopyrrolcarbonsäureesterpikrat erkennbar, während das hellgelbe der isomeren Säure nicht beobachtet werden konnte. Nach Umkrystallisieren aus Alkohol F. P. 120°—121°.

4,780 mg Subst.: 0,595 ccm N₂ bei 18° und 710 mm Hg
C₁₆H₁₉O₉N₄ Ber.: N = 13,66 Gef.: N = 13,64

Die Analysen der weiteren Fraktionen hätten das gleiche Resultat. Ich glaube, daß, wenn man diesen Versuch mit dem vorhin beschriebenen zusammenhält, es keinem Zweifel unterliegen kann, daß bei der reduktiven Spaltung des Kotporphyrins tatsächlich nur Phonopyrrolcarbonsäure entsteht. Sollte doch Isophonopyrrolcarbonsäure vorhanden sein, so könnte sie nur in einer gegenüber dem Blutfarbstoff weit zurückbleibenden Ausbeute entstehen, denn ich habe mich überzeugt, daß bei Verarbeitung von 1 g salzsaurem Mesoporphyrin die isomere Säure leicht an der hellgelben Farbe ihres Esterpikrats erkannt werden kann.

Oxydation von Kotporphyrinmethylester mit Bleidioxid.

Isolierung von Hämatinsäure.

1 g Kotporphyrinester wurde genau, wie oben beim Urinporphyrinmethylester beschrieben, mit Bleidioxid in Schwefelsäure oxydiert. Methyläthylmaleinimid konnte nicht nachgewiesen werden, dagegen nach der Verseifung mit 10%iger Schwefelsäure 0,1758 g krystallisierte Hämatinsäure, die aus

¹⁾ Fischer und Röse, Ber. d. deutsch. chem. Ges., Bd. 47, S. 792.

Ätherpetroläther einheitlich krystallisierte und bei 114° schmolz. Mischschmelzpunkt mit Hämatinsäure aus Hämatoporphyrin ergab keine Depression.

5,225 mg Subst.: 0,352 ccm N_2 bei 17° und 724 mm Hg

4,291 mg Subst.: 0,294 ccm N_2 bei 17° und 724 mm Hg

Ber.: N = 7,65 Gef.: N = 7,55, 7,68.

Oxydation von Kotporphyrinmethylester mit Chromsäure.

1 g Kotporphyrinmethylester wurden in 25 ccm 50%iger Schwefelsäure gelöst, 25 ccm Wasser zugegeben und ohne Kühlung in mäßigem Tempo 1,8 g Chromsäure in Wasser gelöst zugegeben. Es erfolgte starke Erwärmung, durch die, wie sich nachher herausstellte, totale Verseifung der Estergruppen eingetreten war.

Nach Stehen über Nacht wurden der grün gefärbten Lösung durch fünfmaliges Ausäthern die entstandenen Oxydationsprodukte entzogen und in üblicher Weise in eine indifferente und eine saure Fraktion getrennt. Die indifferente Fraktion war minimal, eine Krystallisation konnte nicht beobachtet werden, sondern nur eine geringe Menge eines sirupösen Rückstandes. Die saure Fraktion ergab 0,25 g fast analysenreine Hämatinsäure vom Schmelzpunkte $110-112^{\circ}$. Nach einmaligem Umkrystallisieren aus Ätherpetroläther schmolz sie bei 113° ; Mischschmelzpunkt mit Hämatinsäure aus Hämatoporphyrin ergab keine Depression.

4,330 mg Subst.: 0,299 ccm N_2 bei 17° und 708 mm Hg

Ber.: N = 7,65 Gef.: N = 7,54

Aufspaltung von Kotporphyrinmethylester mit Kaliummethylat.

25 g Kalium wurden in 100 g Methylalkohol gelöst und hiermit 1 g Kotporphyrinmethylester im Silberbecher im eisernen Autoklaven längere Zeit auf 240° erhitzt. Näheres ergibt die Tabelle:

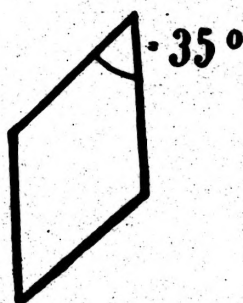
Zeit	Temp. innen	Druck	Ölbad-Temp.
645	101°	2	283°
715	135°	6	310°
745	198°	15	316°
815	214°	21	324°
845	237°	30	330°
915	244°	36	313°
945	241°	41	315°
1015	240°	46	315°
1045	244°	54	319°
1115	242°	59	312°
1145	240°	62	310°
12	240°	64	313°

Beim Erkalten war noch ziemlich viel Druck vorhanden. Der Inhalt des Silberbechers war farblos. Nach dem Überspülen in einen Destillationskolben wurde mit Wasserdampf eine nicht unerhebliche Menge eines Öles abgetrieben, das durch Ausschütteln mit Äther gewonnen wurde.

Der Ätherextrakt wurde im Vakuum bei Zimmertemperatur eingedampft und das hinterbleibende Öl im Vakuum bei 60° destilliert.

Ein Teil krystallisierte in der Vorlage, der größere Teil im Destillationsrohr bzw. Kolbenhals. Die Ausbeute ist minimal, die Empfindlichkeit gegen den Sauerstoff der Luft enorm. Zur Isolierung und eventuellen Identifizierung wäre mindestens ein Ansatz von 25 g Kotporphyrinester notwendig.

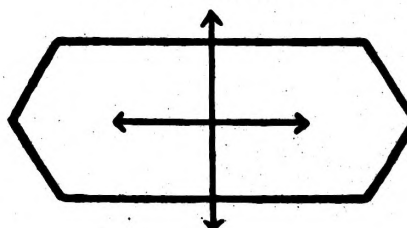
Die Krystalle legte ich Herrn Dr. Steinmetz vor und ich teile seine Resultate hier mit:



Diagonal auslöschende Rhomben von etwa 35° ebenem Winkel. Auf etwa $\pm 2^\circ$ ungenau.

Die Substanz ist in Äther spielend löslich. Es kann sich weder um Trimethylpyrrol, noch um Tetramethylpyrrol oder Phyllopyrrol handeln, wie Herr Dr. Steinmetz durch kristallographische Untersuchung feststellte, und ich teile seine Werte der 3 genannten Substanzen hier mit.

Tetramethylpyrrol



- 100 bis 101°

Auslöschungsrichtung parallel der längsten Kante, den Winkel 100° halbiierend.

Phyllopyrrol.



Rechtwinkelige Tafeln von paralleler Auslöschung.

Trimethylpyrrol zeigt mitunter Tafeln, deren Auslöschungsrichtung einer Begrenzungskante parallel ist. Den Umrissen nach scheinen die Krystalle monoklin zu sein.

Die mit Dampf behandelte Mutterlauge wurde in der schon oft beschriebenen Weise auf tetrasubstituierte Säuren behandelt und es gelang leicht Phyllopyrrolcarbonsäure zu isolieren, die als Pikrat erkannt und identifiziert wurde. F. P. 125—126°.

3,806 mg Subst.: 0,478 ccm N₂ bei 18° und 707 mm Hg
Ber.: N = 13,66 Gef.: N = 13,70.

Tetrachlorkotporphyrindihydrochlorid.

Kotporphyrinmethylester wurde ganz analog dem Mesoporphyrin¹⁾ mit Eisessigsalzsäurewasserstoffsperoxyd behandelt. Nach ca. 10 Minuten erfolgte der Farbumschlag in rein Grün und nach Stehen über Nacht erfolgte reichliche Krystallisation in derben, nadelförmigen Prismen mit starkem Oberflächen-

¹⁾ Fischer und Röse, Ber. d. deutsch. chem. Ges. 46. S. 2460.

glanz; sie wurde abgesaugt und mit Eisessig und viel Äther ausgewaschen. Die Analysen beweisen, daß totale Verseifung eingetreten war. Die Methoxylbestimmung verlief demgemäß total negativ und die Substanz erwies sich als in der Kälte in $n/10$ -Natronlauge glatt löslich.

4,676 mg Subst.: 8,38 mg CO_2 ; 1,84 mg H_2O

5,155 mg Subst.: 5,05 mg AgCl

5,245 mg Subst.: 5,12 mg AgCl

3,967 mg Subst. zur OCH_3 -Bestimmung ergab keine Spur von AgJ-Niederschlag.

5,236 mg Subst.: 0,322 ccm N_2 bei 21° und 699 mm Hg

$\text{C}_{30}\text{H}_{34}\text{N}_4\text{O}_8\text{Cl}_2$ (Mgw. 863,07)

Ber.: C = 50,05, H = 3,97, N = 6,49, Cl = 24,65

Gef.: C = 48,88, H = 4,40, N = 6,57, Cl = 24,23, 24,15.

Tetrabromkotporphyrinesterdibromhydrat.

Die Darstellung der Bromverbindung erfolgte analog der der Chlorverbindung, unter Anwendung von Bromwasserstoffsäure. Hier erfolgte schon nach 10 Minuten eine prachtvolle Krystallisation von nadelförmigen Prismen mit starkem Oberflächenglanz. Es wurde mit Eiessig und viel Äther ausgewaschen. Verseifung der Estergruppen war nicht eingetreten.

5,99 mg Subst.: 0,260 ccm N_2 bei 21° und 699 mm Hg

4,840 mg Subst.: 7,14 mg CO_2 ; 1,77 mg H_2O

4,443 mg Subst.: 6,56 mg CO_2 ; 1,68 mg H_2O

5,094 mg Subst.: 4,90 mg AgBr

3,770 mg Subst.: 2,68 mg AgJ

4,290 mg Subst.: 3,03 mg AgJ

$\text{C}_{30}\text{H}_{40}\text{N}_4\text{O}_8\text{Br}_6$ Mgw. = 1171,88

Ber.: C = 39,96, H = 3,44, N = 4,79, Br = 40,94, OCH_3 = 7,92

Gef.: C = 40,23, H = 4,09, C = 40,27, H = 4,23, N = 5,16,
Br = 40,94, OCH_3 = 9,39, 9,33.