

Über die Veresterung und die empirische Zusammensetzung der Hämine.

Von
William Küster.

(Aus dem Laboratorium für organische und pharmazeutische Chemie der Technischen Hochschule Stuttgart).

(Der Redaktion zugegangen am 16. September 1917.)

In den beiden Abhandlungen über die Methylierung des Hämins und über Brom-Hämine¹⁾ sind einige Präparate beschrieben worden, deren Analyse Werte ergab, die mit der empirischen Zusammensetzung $C_{34}H_{32}O_4N_4FeHlg.$ für das Hämin nicht völlig übereinstimmten, es wurden vielmehr für den Kohlenstoff Zahlen erhalten, die den berechneten Wert bis zu 0,5 % übertrafen.²⁾ Bei einigen dieser Präparate konnte noch eine Nachprüfung erfolgen. Sie ergab als Grund für das Abweichen von den normalen Werten einen Gehalt an Äthyl statt Methyl, daher stammend, daß der verwendete Methylalkohol Äthylalkohol enthalten hatte, was wiederum dadurch bewiesen wurde, daß zwei neue für diesen Zweck mit Hilfe eines Gemisches der Alkohole hergestellte Präparate und zwar ein β -Chlor- und ein β -Brom-Hämin sich ebenfalls als Gemische erwiesen, die neben Methylestern auch Äthylester des Hämins enthielten, wie die Bestimmung nach der von Willstätter³⁾ angegebenen Methode ergeben hat.

Durch die Feststellung, daß die mit Äthylalkohol enthaltendem Methylalkohol hergestellten Häminpräparate Äthyl enthalten,

¹⁾ Diese Zeitschr., Bd. 82, S. 113 (1912) und Bd. 91, S. 115 (1914).

²⁾ Für ein β -Chlor-Hämin wurde dies besonders hervorgehoben, es trifft aber auch für eine ganze Reihe der beschriebenen β -Brom-Hämine zu, vgl. S. 136, 140, 144 und 145 der Abhandlung in Bd. 91.

³⁾ Untersuchungen über Chlorophyll, S. 225.

wird die beobachtete Verschiedenheit in der Löslichkeit der Präparate z. B., die zunächst verwirrend wirken mußte, geklärt; es erscheinen aber auch die Schlüsse auf die empirische Zusammensetzung des Hämins, die aus der Elementaranalyse abgeleitet wurden, beeinträchtigt. Doch geht schon aus der bereits erwähnten Tatsache, daß eine ganze Reihe der Präparate zu hohe Werte für den Kohlenstoff gab, hervor, daß die Formulierung mit 34 Kohlenstoffatomen für das Hämin den analytisch ermittelten Werten am besten entspricht, und die im experimentellen Teil mitgeteilten neuen Analysen weisen ebenfalls mit größter Wahrscheinlichkeit darauf hin, daß für das Hämin die Formulierung



beizubehalten ist.

Endlich muß hervorgehoben werden, daß das Ergebnis doch in einer Beziehung zunächst wenigstens überraschen muß. Denn ein nach der ursprünglichen Methode Mörners, d. h. mit reinem Äthylalkohol hergestelltes Hämin stellt sich dar als ein Gemisch von Hämin mit wenig monoäthyltem Hämin, ein β -Hämin dagegen, das mit reinem Methylalkohol bereitet worden ist, enthält in der Regel Monomethyl-Hämin neben dimethyltem Hämin. Es war also nicht vorauszusehen, daß die Verwendung eines Gemisches der Alkohole das gleiche Ergebnis in Beziehung auf den Grad der Alkylierung haben würde wie die Anwendung reinen Methylalkohols, was aber nach dem Ausfall der analytischen Untersuchung doch der Fall war.

Demnach muß angenommen werden, daß primär eine Methylierung des Hämins stattfindet und daß sich der entstandene Methylester mit dem Äthylalkohol sekundär umsetzt, wobei sich nunmehr äthyliertes Hämin auf Kosten des methylierten bildet.¹⁾ Da nun, wie erwähnt, die Reaktion zwischen Hämin und Methylalkohol vorwiegend zur Bildung des Monomethylesters führt, wäre also jetzt der diesem entsprechende Äthylester zu erwarten. In der vorgehenden Abhandlung wurde aber darauf hingewiesen, daß bei direkter Einwirkung von Äthylalkohol auf Hämin ein anderes Carboxyl allem Anschein nach

¹⁾ Vgl. L. Cambi, Chem. Centr.-Bl. 1914, I, S. 1412.

verestert wird als bei der Einwirkung von Methylalkohol. Der Äthylester des Hämins, welcher sich durch das Gemisch der Alkohole bildet, sollte demnach das Isomere des Esters sein, der bei direkter Einwirkung von Äthylalkohol entsteht. Und hierfür spricht nun in der Tat nicht nur die verschiedene Krystallform der erhaltenen Produkte — hier prächtig ausgebildete Würfel eines β -Monoäthylbromhämins, dort undeutliche Krystallformen —, sondern auch das Verhalten gegenüber einer 5%igen Sodalösung — hier Unlöslichkeit, dort allmähliches Inlösungsgehen bei Zimmertemperatur — und namentlich das Verhalten gegenüber Diazomethan — hier weitere Methylierung bis zum Methyläthylester, dort keine Einwirkung.

Ehe ein abschließendes Urteil gefällt werden darf, muß aber auch in diesem Fall Bestätigung durch weitere Versuche abgewartet werden, da eine andere Möglichkeit nicht ausgeschlossen ist, die zur Erklärung der Beobachtungen ebenfalls geeignet ist.

Bei verschiedenen Gelegenheiten wurde ja schon darauf hingewiesen, daß vielleicht das Blut resp. das Hämoglobin des Blutes für das Entstehen der beiden isomeren Ester verantwortlich zu machen ist,¹⁾ und schon Hoppe-Seyler dachte im Protoplasma der roten Blutkörper an chemische Bindung zwischen Lecithinen und Hämoglobin.²⁾ Vielleicht handelt es sich auch um eine solche zwischen letzterem und Cholesterin. Zur Reinigung müssen die nach Mörners Methode gewonnenen β -Hämine mit Petroläther ausgezogen werden, der immer Cholesterin fortnimmt und daneben stark gefärbte Stoffe, die an rohes Wollfett erinnern. Es dürfte sich also um Ester des Cholesterins handeln, deren Vorkommen im Blute neben freiem Cholesterin nachgewiesen ist. Es wäre also auch nicht ganz unmöglich, daß im Hämoglobin selbst eine Verbindung vorliegt, an deren Zustandekommen Cholesterin beteiligt ist, und zwar könnte dasselbe mit dem Hämochromogen durch dessen eines Carboxyl esterartig verbunden sein, während nur das andere verwendet

¹⁾ Diese Zeitschr., Bd. 82, S. 114 (1912); Bd. 91, S. 125 (1914).

²⁾ Diese Zeitschr., Bd. 13, S. 479 (1889).

wird, um die Verbindung mit dem Globin zu bewerkstelligen. Solche Cholesterinester des Hämoglobins resp. des Hämochromogens würden dann an das Chlorophyll als Phytolester erinnern und bei der Herstellung von β -Hämin würde dann der Cholesterinrest durch Methyl oder Äthyl ersetzt werden, gleichwie bei der Einwirkung von Salzsäure und Methylalkohol auf Phäophytin Phytol durch Methyl ersetzt wird. Dann würde also der Gehalt an Alkyl in den β -Häminen von dem Grad der Veresterung des Hämochromogens im Hämoglobin mit Cholesterin abhängig sein, und die Beobachtungen würden verständlich, daß bei der Herstellung von β -Hämin mit Methylalkohol manchmal nur das Auftreten geringer Mengen alkylierten Hämins beobachtet worden ist, obgleich es sogar auf die Gewinnung der Ester abgesehen und die Ausführung der Darstellung darauf hinausgehend geleitet worden war,¹⁾ und daß andererseits weitgehendere Alkylierung eingetreten war, als der Regel nach erwartet werden konnte.²⁾

Schließlich würde auch das Entstehen der isomeren Monoalkylester des Hämins bei der Bereitung des β -Hämins auf den Zustand des Blutes in jedem Einzelfall zurückzuführen sein, insofern als das eine oder das andere Carboxyl des Hämochromogens mit Cholesterin verestert war. Aus diesen Überlegungen heraus ergibt sich aber die Notwendigkeit, das Blut eines jeden Tieres für sich bei der Herstellung von β -Hämin zu verarbeiten und auf Art, Geschlecht, Alter, Krankheiten, Ernährungszustand genau zu achten, während bisher meist Mischblut verschiedener Tiere benutzt worden ist. Der Anfang hierzu ist in dieser und der vorhergehenden Abhandlung gemacht worden. Aus den mitgeteilten Überlegungen ergibt sich auch, daß die Veresterung bei der Bereitung der β -Hämine nicht erst durch das Hinzufügen des Halogenwasserstoffs erfolgt, sondern schon beim Erhitzen des alkoholischen Auszugs durch die vorhandene Schwefelsäure bewirkt wird. Einen Anhaltspunkt hierfür ergibt ein im experimentellen Teil der folgenden Abhandlung

¹⁾ Vgl. das 5. Präparat von β -Hämin aus Pferdeblut mit nur 0,4% CH_3 , beschrieben in dieser Zeitschr., Bd. 91, S. 133 und 146 (1914).

²⁾ Ebenda, das 3. Präparat, S. 142.

beschriebener Versuch. Endlich kann aus einigen in der ersten Mitteilung über Brom-Hämine beschriebenen Beobachtungen geschlossen werden, daß bei der Umscheidung alkylierter Hämine mit Hilfe von Chinin oder Pyridin mit der Möglichkeit einer Verschiebung des Alkyls¹⁾ von dem einen zum andern Carboxyl zu rechnen ist und daß hierdurch die Änderung der Eigenschaften, die festgestellt werden konnte, zusammenhängt. Die genaue Untersuchung dieser Verhältnisse, die ich mir vorbehalten möchte, wird vielleicht auch ein neues Licht auf die von Willstätter beim Chlorophyll beobachteten Erscheinungen werfen, die als Umlactamisierung bezeichnet worden sind.

Experimenteller Teil.

Zur Darstellung des β -Brom-Hämins wurden 13 Liter eines 13jährigen Pferdes verwendet, das wegen Bösartigkeit geschlachtet werden mußte. Das Absetzen der Blutkörper ging sehr langsam vonstatten, sodaß nur 3 Liter Serum glatt abgehoben werden konnten. Die Verarbeitung erfolgte mit einem Methylalkohol, der Äthylalkohol enthielt; der schwefelsaure Extrakt wurde 15 Minuten im Sieden erhalten, nach dem Abkühlen auf 40° mit 25%iger Bromwasserstoffsäure gefällt, die mit Bromkalium gesättigt war und zwar pro Liter Blut 28 ccm.

Ausbeute an mit Petroläther²⁾ extrahiertem Rohprodukt: 52 g; hiervon gingen durch 4tägige Extraktion 10 g in Chloroform über, von denen 4 g sehr leicht, 6 g schwerer im genannten Lösungsmittel löslich waren. Eine Probe der ersteren war bei Z.-T. in 5%iger Sodalösung nicht löslich, wohl aber beim Erhitzen, ein dialkyliertes Produkt lag also nicht vor.³⁾

¹⁾ Nachdem ein Äthylgehalt der verwendeten Präparate festgestellt worden war, konnte daran gedacht werden, daß die Änderung in der Löslichkeit durch Verdrängung des Äthyls hervorgerufen worden sei. Diesbezügliche Bestimmungen ergaben aber, daß dies bei Zimmertemperatur nicht geschieht. Auch wurden verschiedene Eigenschaften vor und nach der Umscheidung bei einem Präparat beobachtet, das mit Hilfe von reinem Methylalkohol hergestellt worden war.

²⁾ Dieses Lösungsmittel nahm hier bemerkenswert viel Cholesterin fort.

³⁾ Das Produkt erlitt bei dem Versuch, es aus siedendem Eisessig umzukristallisieren, eine teilweise Umwandlung. Ein Teil blieb nämlich

Eine Probe der 6 g, die aus Methyläthylketon in kleinen, oft gekreuzten Nadelchen krystallisierten, löste sich in 5%iger Sodalösung bei Z.-T. allmählich auf, während die bei der Extraktion mit Chloroform zurückgebliebenen Teile sofort löslich waren; in der Krystallform glichen sich beide Präparate vollständig.¹⁾ Diese Löslichkeit in 5%iger Sodalösung bei Z.-T. ist insofern bemerkenswert, als wir es in diesem in Chloroform recht schwer löslichen Präparat mit einem monoalkylierten β -Brom-Hämin zu tun haben,²⁾ das allerdings ein Gemisch vorstellt, wie die Analyse ergab. Es setzt sich nämlich aus Monomethyl- und Monoäthyl- β -Brom-Hämin zusammen: ersteres macht etwa $\frac{1}{4}$, letzteres $\frac{3}{4}$ des Gemisches aus, da es 0,38% CH_3 und 2,6% C_2H_5 enthält.

0,4550 Substanz : 0,0235 $\text{N}(\text{CH}_3)_4\text{J}$ und 0,0888 $(\text{CH}_3)_3\text{NC}_2\text{H}_5\text{J}$.

Legt man also für das Hämin die Formel mit 34 Kohlenstoffatomen zugrunde, so setzt sich das Präparat zusammen aus $\frac{1}{4}$ $(\text{C}_{35}\text{H}_{34}\text{O}_4\text{N}_4\text{FeBr})$ und $\frac{3}{4}$ $(\text{C}_{36}\text{H}_{36}\text{O}_4\text{N}_4\text{FeBr})$, bei 33 Kohlenstoffatomen aus $\frac{1}{4}$ $(\text{C}_{34}\text{H}_{34}\text{O}_4\text{N}_4\text{FeBr})$ und $\frac{3}{4}$ $(\text{C}_{35}\text{H}_{36}\text{O}_4\text{N}_4\text{FeBr})$.

Die Analyse entschied für die erstere Formulierung mit 34 Kohlenstoffatomen.



Ber.: 59,54% C 4,93% H 7,77% Fe 11,17% Br 0,52% CH_3 3,02% C_2H_5



Ber.: 58,86% C 5,00% H 7,91% Fe 11,29% Br 0,53% CH_3 3,07% C_2H_5

Gef.: 59,08% 4,86% 10,99% 0,38% 2,6%

0,1647 Substanz (90°) : 0,3568 CO_2 und 0,0720 H_2O

0,2400 „ (90°) : 0,0620 AgBr .

Durch Behandlung mit Diazomethan blieb nun dieses der

unlöslich zurück (eine kleine Probe hatte sich vollständig gelöst) und erwies sich gegen kochende Sodalösung beständig, trotzdem er nur 3,13% CH_3 enthielt (0,1721 Substanz [90°] : 0,0845 AgJ , auf Äthyl wurde hier nicht untersucht). Vielleicht war hier also eine Lactambindung eingetreten.

¹⁾ Diese Angabe bezieht sich auf das mikroskopische Bild nach der Behandlung mit Methyläthylketon, vor derselben zeigten sich nur undeutliche Krystallformen.

²⁾ Das in der vorhergehenden Arbeit beschriebene Monoäthyl- β -Brom-Hämin krystallisierte in Würfelform und löste sich nicht in 5%iger Sodalösung bei Z.-T.

Hauptmenge nach monoäthylierte β -Brom-Hämin zu etwa 50% unverändert.

2 g wurden in 80 ccm Chloroform suspendiert und die Suspension mit der aus 5 ccm Nitrosomethylurethan entwickelten Diazomethanmenge behandelt. Nach 12stündiger Einwirkung wurde filtriert, wobei 1 g zurückblieb, welcher Teil sich in 5%iger Sodalösung als löslich und damit als nicht weiter alkyliert erwies. Aus dem Filtrat wurde das Chloroform bis auf 25 ccm abdestilliert und, da ein Ausfall nicht eintrat, der Farbstoff mit Äther gefällt. Dieser Teil erwies sich als in der Sodalösung bei Zimmertemperatur unlöslich.

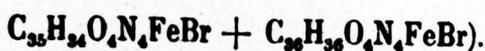
Da das in der vorhergehenden Abhandlung beschriebene Monoäthyl- β -Brom-Hämin unter gleichen Bedingungen durch Diazomethan jedenfalls zum größten Teil methyliert, d. h. in Methyläthyl- β -Brom-Hämin übergeführt wurde, ist es höchst wahrscheinlich, daß hier die beiden isomeren Äthylester des β -Brom-Hämins vorliegen. Der Grund für das Auftreten der isomeren Form wäre dann darin zu suchen, daß bei der ersten Darstellung Äthylalkohol benutzt wurde, der Carboxyl A verestert, bei der zweiten wurde ein, wie erwähnt, äthylalkoholhaltiger Methylalkohol verwendet. Letzterer verestert aber Carboxyl B und das Äthylprodukt ist dann sekundär durch Verdrängung des Methyls durch Äthyl entstanden.

Die eingehende Untersuchung mußte leider aufgeschoben werden, da Herr Dipl. Ing. Otto Geering, der, verwundet aus dem Felde kommend, sich kurze Zeit mit Häminuntersuchungen befassen konnte, in eine Munitionsfabrik eintrat. Die folgenden Versuche des Herrn Dipl. Ing. O. Geering erbringen einmal eine Bestätigung dafür, daß ein mit Hilfe von Methylalkohol hergestelltes β -Brom-Hämin durch Diazomethan nicht weitergehend methyliert wird, und dann sprechen die ausgeführten Analysen erneut für die Formulierung des Hämins mit 34 Kohlenstoffatomen.

Zur Verwendung gelangten 8 Liter Blut einer 15—16 Jahre alten Stute; die Extraktion wurde mit reinem Methylalkohol (Kahlbaum) ausgeführt, dem 10% Wasser zugesetzt waren. Ausbeute 25 g gereinigtes Roh-Hämin. Bei der Extraktion

durch Chloroform ergab sich vollständige Lösung! Ein Teil des Hämins hatte sich im Extraktionskolben wieder abgeschieden (A b), der andere (A a) war in Lösung geblieben.

A a. Nach Abdestillation von $\frac{2}{3}$ des Chloroforms wurde das Hämin durch Äther gefällt. Eine Probe war in 5%iger Sodalösung bei Z.-T. nicht löslich, beim Erhitzen wurde sie schwach angegriffen. Ein Dimethylhämin lag also nicht vor, was die Analyse bestätigte, da nur 3,03% CH_3 enthalten waren, wonach es sich um ein äquimolekulares Gemisch von Mono- und Dimethylhämin handeln mußte.



Ber.: 59,41% C 4,89% H 11,16% Br 7,81% Fe 3,17% CH_3



Ber.: 58,72% C 4,97% H 11,35% Br 7,94% Fe 3,23% CH_3

Gef.: 58,98% 5,24% 11,10% 7,76% 3,03%

0,2055 Substanz (90°) : 0,4444 CO_2 , 0,0929 H_2O und 0,0228 Fe_2O_3 ,

0,2232 > : 0,0582 AgBr (Carius)

0,1125 > (i. V.) : 0,0535 AgJ (Zeisel).

Es wurde nun versucht völlige Methylierung mit Hilfe von Diazomethan zu erreichen, zu welchem Zweck 2 g des Präparats in 90 ccm Chloroform gelöst und mit der aus 5 ccm Nitrosomethylurethan entwickelten Diazomethanmenge 12 Stunden in Berührung gelassen wurde. Hierbei hatte sich ein Niederschlag gebildet, der durch Filtration abgetrennt wurde. Aus dem Filtrat wurde das Chloroform größtenteils abdestilliert und das Hämin durch Äther gefällt. Dieser Teil verhielt sich gegen 5%ige Sodalösung wie das Hämin vor der Behandlung mit Diazomethan; die Menge betrug 1,6 g, der Gehalt an Methyl 3,26%, es war also nur wenig mehr Methyl als vor der Behandlung mit Diazomethan vorhanden, und dieser Zuwachs erklärt sich wohl daraus, daß während der Behandlung eine teilweise Trennung des vorliegenden Gemisches von Mono- und Dimethylhämin eingetreten war und das erstere sich als in Chloroform schwer löslich abgeschieden hatte.

Die Elementaranalyse weist wieder auf ein Hämin mit 34 Kohlenstoffatomen hin.

0,2446 Substanz : 0,1266 AgJ = 3,26% CH₃
 0,1763 „ (90°) : 0,3828 CO₂, 0,085 H₂O und 0,0190 Fe₂O₃
 = 59,22% C 5,36% H 7,54% Fe

Ein Versuch, die Methylierung durch Diazomethan in Acetonlösung zu erreichen, ergab ähnliche Resultate wie bei Anwendung von Chloroform. Das Hauptprodukt enthielt hier 3,4% CH₃.

0,1042 Substanz : 0,0556 AgJ.

Der in Chloroform schwer lösliche Teil (A b) gab bei der Analyse folgende Werte:

0,1920 Substanz (90°) : 0,4159 CO₂, 0,810 H₂O und 0,0221 Fe₂O₃
 0,0886 „ („) : 0,0239 AgBr
 0,1516 „ (i. V.) : 0,0452 AgJ



Ber.: 59,16% C 4,79% H 7,89% Fe 11,27% Br 2,11% CH₃
 Gef.: 59,08% 4,69% 8,06% 11,48% 1,90%

Die Analyse bestätigte also wiederum die Formulierung mit 34 Kohlenstoffatomen für das Hämin und ergab das Vorliegen eines Monomethyl-β-Brom-Hämins. Es löste sich in 5%iger Sodalösung bei Z.-T. auf, verhielt sich also wie das auf Seite 38 beschriebene Präparat.

Ein Versuch, durch Behandlung mit Diazomethan in Acetonsuspension weitere Methylierung zu erreichen, erwies sich insofern vergeblich, als kein Hämin in Lösung ging, doch löste sich das Reaktionsprodukt erst in erwärmter Sodalösung auf. Dieselbe Eigenschaft zeigte ein durch Umscheidung bei Z.-T. erhaltenes Präparat, zu welchem Zweck 2 g des β-Brom-Hämins A b mit Hilfe von 1 g Chinin und 15 ccm Chloroform gelöst und filtriert wurde, worauf mit zweimal je 5 ccm Chloroform nachgespült und dann das Filtrat in 100 ccm 90%igem Methylalkohol, der 2,5 ccm 25%ige Bromwasserstoffsäure enthielt, eingetragen wurde. Das im Lauf von 24 Stunden abgeschiedene Hämin betrug der Menge nach 1,2 g und kristallisierte in Würfelform. Eine weitere Methylierung war nicht eingetreten, da nur 1,68% CH₃ enthalten waren (0,1211 Subst. : 0,0319 AgJ).

Es bedarf daher weiterer Untersuchungen, ob etwa eine Isomerisation eingetreten ist.

Bestimmung von Athyl neben Methyl in einigen Häminpräparaten.

a) β -Chlor-Hämin (Diese Zeitschr. Bd. 82, S. 130, Rohprodukt I und II, die in Chloroform löslichen Teile). Die mitgeteilten Analysen hatten 64,5 und 63,6% C bei 3,9% CH_3 ergeben, anstatt wie berechnet 63,57% C für ein Dimethyl- β -Chlor-Hämin. Nunmehr wurde festgestellt, daß das Präparat 2,30% CH_3 und 1,89% C_2H_5 enthält.

0,2315 Substanz (105°) = 0,0714 $\text{N}(\text{CH}_3)_4\text{J}$ und 0,0322 $\text{N}(\text{CH}_3)_3\text{C}_2\text{H}_5\text{J}$.

b) β -Brom-Hämin (Diese Zeitschr. Bd. 91, S. 147, Rohprodukt V Fraktion A a) hatte 2,9% CH_3 ergeben; die neue Bestimmung zeigte, daß 1,91% CH_3 und 1,82% C_2H_5 vorhanden sind.

0,1745 Substanz (110°) = 0,0449 $\text{N}(\text{CH}_3)_4\text{J}$ und 0,0235 $\text{N}(\text{CH}_3)_3\text{C}_2\text{H}_5\text{J}$.

c) Ein neu hergestelltes Präparat von β -Chlor-Hämin, bei dessen Gewinnung ein äthylalkoholhaltiger Methylalkohol verwendet worden war.

Fraktion C (in Benzol und Chloroform nicht löslich)

0,2182 Substanz (105°) : 0,0100 $\text{N}(\text{CH}_3)_4\text{J}$ und 0,0195 $\text{N}(\text{CH}_3)_3\text{C}_2\text{H}_5\text{J}$
= 0,34 % CH_3 > 1,2 % C_2H_5 .
