

# Beiträge zur Kenntnis der prosthetischen Gruppe des Blutfarbstoffs.

Über den Einfluss des Alterns auf den Blutfarbstoff.

## II. Mitteilung.

Von

**William Küster**

nach Versuchen von Dipl.-Ing. Dr. Otto Geering.

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

(Der Redaktion zugegangen am 28. Januar 1920.)

Schon vor längerer Zeit habe ich in dieser Zeitschrift<sup>1)</sup> darauf hingewiesen, daß es von Wichtigkeit werden könne, das Blut von Schlachttieren einzeln zu untersuchen, um feststellen zu können, ob das Alter, Krankheiten, der Ernährungszustand, vielleicht auch das Geschlecht etwa Veränderungen oder Verschiedenheiten bedingen könnten, die den Blutfarbstoff betreffen und sich in dem aus dem Blut gewonnenen Hämin widerspiegeln.

Eine erste diesbezügliche Mitteilung habe ich dann an anderer Stelle gemacht<sup>2)</sup>. Es hatte sich gezeigt, daß aus dem Blut eines alten Pferdes ein  $\alpha$ -Chlorhämin, also nach der Methode Schalfejeffs gewonnen, hervorgeht, das bei der Umscheidung ein Pseudohämin und entsprechend bei der Behandlung mit Anilin ein De(hydrochlorid)hämin liefert, welches sich mit Hilfe von Methylalkohol und verdünnter Schwefelsäure nicht dimethylieren ließ, sondern nur ein Mono-

<sup>1)</sup> Bd. 101, S. 36 (1917).

<sup>2)</sup> Ber. d. d. pharmac. Ges. 29, S. 98 (1919).

methylhämin ergab, so daß das Vorliegen eines N-De(hydrochlorid)hämins<sup>1)</sup> angenommen werden mußte. Das „ $\alpha$ “-Hämin verhielt sich somit ähnlich, wie es am  $\beta$ -Hämin beobachtet worden war, und es sprach alles dafür, daß im Blut des alten Tieres sozusagen die  $\beta$ -Form der prosthetischen Gruppe bereits vorgebildet war. So wurde die Frage aufgeworfen, ob die Veränderung, welche sich hier zeigte, gegenüber dem Verhalten des Hämins, das aus dem Blut junger Ochsen hergestellt worden war, durch das Alter oder durch die Art des Schlachttieres zu erklären sei, und schon dahin beantwortet, daß allem Anschein nach Veränderungen mit dem Altern resp. durch Erkrankungen eintreten. Versuche mit dem Blut eines alten Rindes standen aber noch aus. Über solche zu berichten bin ich nunmehr in der Lage, und ihr Ausfall bestätigte in erwünschter Weise unsere Erwartungen. Zunächst waren die Ausbeuten an  $\alpha$ -Hämin gering — das Tier besaß also nur noch wenig Blutfarbstoff —, es zeigten sich aber Teichmannsche Formen. Bei der Umscheidung aus Eisessig wurden jedoch gut ausgebildete würfelförmliche Kristalle erhalten, wie sie dem  $\beta$ -Typus eigentümlich sind. Das dann durch Einwirkung von Anilin erhaltene Produkt stellte, nach der Analyse zu urteilen, ein Gemisch von Hämin mit Hydroxyhämin im Verhältnis 1:3 vor. Die Herausnahme des Chlors war also nur unvollständig geglückt. Hier war also ein Unterschied gegenüber dem Hämin aus dem Blut junger kräftiger Ochsen zu konstatieren, denn dieses Hämin geht durch Einwirkung von Anilin in O-De(hydrochlorid)hämin über. Es zeigte sich aber auch ein Unterschied gegenüber dem bisher beobachteten Verlauf der Einwirkung von Anilin auf das aus altem Pferdeblut gewonnene Hämin, denn hierbei wurde vornehmlich ein N-De(hydrochlorid)hämin erhalten, während das Entstehen von Hydroxyhämin namentlich bei Bromhäminen beobachtet worden war. Veresterungsversuche zeigten dann aber ein übereinstimmendes Verhalten des Hydroxyhämins mit dem N-De(hydrochlorid)hämin, insofern bei Verwendung verdünnter

<sup>1)</sup> Diese Zeitschr. Bd. 101, S. 49 (1917).

Schwefelsäure nur Monomethylierung eintrat, erst mit Hilfe konzentrierter Schwefelsäure konnte Dimethylierung erreicht werden. Die Hämine aus dem Blut der alten Tiere zeigten also in dem wesentlichsten Punkt völlige Übereinstimmung. Das eine Carboxyl (A) dieser Hämine hat hier nicht reagiert und dürfte somit der Chlorferrigruppe fernstehen, während es beim Hämin junger Tiere mit derselben unter Austritt von Chlorwasserstoff reagiert, und zwar so, daß ein

O-De(hydrochlorid)hämin mit der Gruppierung  $-\text{CO}-\text{O}-\text{Fe}$  entsteht. Carboxyl B des Hämins aus dem Blut des alten

Ochsen ist betaïnartig festgelegt:  $-\text{CO}-\text{ONH}$  und hat sich

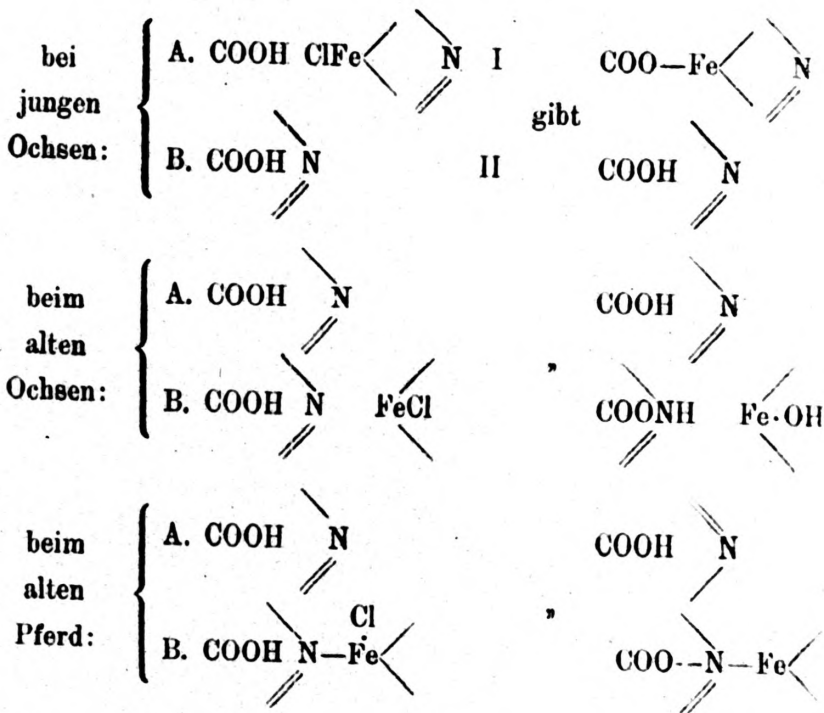
hier ebenfalls nicht mit der Chlorferrigruppe umgesetzt, da letztere ja, soweit sie verändert wurde, in die Hydroxyferrigruppe übergegangen ist, während beim Hämin aus dem Blut des alten Pferdes Carboxyl B mit der Chlorferrigruppe unter Austritt von Chlorwasserstoff und Bildung des N-de(hydrochlorid)-

hämins:  $-\text{CO}-\text{ON}-\text{Fe}$  zusammentrat, ihr also benach-

bart sein muß. Diese Unterschiede kommen auch bei der Umscheidung der Hämine zum Ausdruck: das aus dem Blut des alten Ochsen hergestellte  $\alpha$ -Hämin ließ sich nach der Eisessigmethode umscheiden und lieferte in guter Ausbeute (ca. 85%, wobei in dem Verlust das dem Rohhämin anhaftende Eiweiß inbegriffen ist) ein echtes Hämin, während ein auf gleichem Wege von Herrn Geering erhaltenes Hämin aus dem Blut eines alten Pferdes bei der Umscheidung ein Pseudohämin mit 60% Ausbeute gab. Ganz ähnlich verlief der in der ersten Mitteilung (Seite 108) beschriebene Versuch mit dem Blut eines 14-jährigen Wallachs, während das Blut einer 18-jährigen Fuchsstute bei der ersten Umscheidung ein un- deutlich kristallisierendes echtes Hämin und erst bei der zweiten Umscheidung „kuglige“ Aggregate eines Pseudohämins gab (Seite 105).

Wir haben demnach bisher drei Anordnungen der in Be-

tracht kommenden Gruppen zu unterscheiden, die wir bildlich wie folgt zum Ausdruck bringen können:



wobei es noch unentschieden bleiben muß, ob die als I und II unterschiedenen basischen Stellen in ihrem Verhalten einander gleichgesetzt werden können<sup>1)</sup>.

Ein etwas vom Ausfall der Methylierung abweichendes Resultat ergaben die Äthylierungsversuche mit dem aus dem Blut des alten Ochsen erhaltenen Gemische aus Hydroxyhämmin und Hämin. Bei der Veresterung mit verdünnter Schwefelsäure fand Aufnahme von mehr Äthyl statt, als einem Monoderivat entspricht, mit konzentrierter Schwefelsäure wurde

<sup>1)</sup> Willstätter (Untersuchungen über Chlorophyll S. 29—30) nimmt an, daß bei der Umwandlung von Chlorophyllin a in Isochlorophyllin a eine Umlaktamisierung sich vollzieht, wobei das eine Carboxyl, welches zuerst mit dem Stickstoffatom  $\delta$  laktamartig verbunden ist, frei wird und nunmehr ein anderes Carboxyl mit einem Stickstoffatom  $\gamma$  zusammentritt. Diese Laktamtheorie halte ich nicht für wahrscheinlich und ersetze sie durch die Betaïn-Annahme, weil durch den Austritt von Wasserstoff vom Stickstoffatom die Möglichkeit der komplexen Bindung des Metalls gefährdet wird. Übrigens müssen in den von Willstätter gegebenen Formeln die Wasserstoffatome aus den Laktamgruppen gestrichen werden, da ja sämtliche Stickstoffatome in Pyrrolringen enthalten sind.

die Diäthylierung dagegen nicht vollständig erreicht. Die erstere Beobachtung stimmt mit der früher schon begründeten Annahme<sup>1)</sup> überein, wonach das Äthyl auch das betaïnartig gebundene Carboxyl, wenn auch schwierig, verestern kann. Daß eine Diäthylierung schwierig ist, erhellt bereits aus den ersten Versuchen hierüber, die Nencki und Zaleski<sup>2)</sup> beschreiben. Der Grund für das Mißlingen ist wieder im Zustandekommen einer betaïnartigen Bindung, die nun auch das zweite Carboxyl eingehen kann, zu suchen. Hierüber ergeben Beobachtungen beim Hämatoporphyrin einen Anhaltspunkt, die in der folgenden Abhandlung näher beschrieben sind<sup>3)</sup>.

### Experimenteller Teil.

#### I. Herstellung von $\alpha$ -Hämin aus Pferdeblut.

Zur Verwendung gelangte das Blut eines 12 Jahre alten, wegen Erkrankung geschlachteten Wallachs.

Je ein Liter Blut, nach Schalfejeffs Methode verarbeitet, gab 3 g gut ausgebildete, sehr kleine Kristalle von Chlorhämin, resp. 3,2 g größere Kristalle von Bromhämin in Teichmannschen Formen.

Bei der Umscheidung mit Hilfe von Pyridin-Chloroform wurden aus 0,5 g Rohhämin 0,3 g in rhomben- und würfelförmigen Formen als Pseudohämin wieder erhalten, da durch mit Schwefelsäure angesäuerten Alkohol Lösung eintrat. Das Bromhämin verhielt sich bei der Umscheidung genau wie das Chlorhämin.

Der Rest dieses Pferdeblutes wurde nach Mörners Methode verarbeitet; über die Untersuchung der hier erhaltenen  $\beta$ -Hämine wird später berichtet werden. Es sei nur erwähnt, daß sich der in Chloroform schwer lösliche Teil des Brom-Äthylhämins als ein Pseudohämin erwies.

#### II. Herstellung von $\alpha$ -Hämin aus Ochsenblut.

a) Nach Aussage des Metzgers handelte es sich um ein sehr altes Tier. Die Herstellung des  $\alpha$ -Hämins erfolgte

<sup>1)</sup> Diese Zeitschr. Bd. 101, S. 34 (1917).

<sup>2)</sup> Diese Zeitschr. Bd. 30, S. 405 (1900).

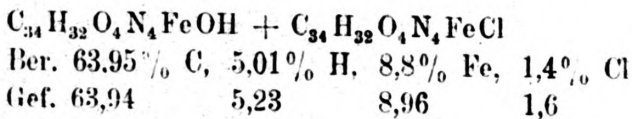
<sup>3)</sup> S. 125f.

wie angegeben; das Chlorhämin filtrierte außerordentlich schlecht und erschien durch Eiweiß stark verunreinigt, weshalb es mit einer Auflösung von 2,5 g Pepsin in 200 ccm 0,3% iger Salzsäure bei 35° digeriert wurde. Nach zweistündiger Behandlung konnte dann das Hämin glatt filtriert werden. Die Ausbeute betrug aber nur 5,2 g aus zwei Litern Blut; es wurde in Form der Teichmannschen Kristalle erhalten.

- b) Bei der Umscheidung mit Hilfe von Pyridinchloroform ergaben sich dann 4,4 g echtes Hämin in Form von großen Würfeln und Rhomben, welche sich unter dem Einfluß von Methyläthylketon nicht änderte.
- c) Die 4,4 g wurden dann in gewohnter Weise mit Anilin behandelt, wonach 3,8 g verblieben, die bei der Analyse folgende Werte ergaben:

0,2083 Substanz (90°): 0,4884 CO<sub>2</sub>, 0,1066 H<sub>2</sub>O, 0,0267 Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>  
 0,1430 „ (90°): 0,0098 AgCl (Carius).

Es mußte sich also um ein Gemisch aus drei Teilen Hydroxyhämin mit einem Teil Chlorhämin handeln:



Das Gemisch war anscheinend vollständig in angesäuertem Alkohol löslich, welche Beobachtung zur Alkylierung benutzt wurde.

1. a) 0,75 g wurden in 38 ccm absoluten Methylalkohols unter Zusatz von 9 Tropfen verdünnter Schwefelsäure gelöst, die Lösung 15 Minuten am Rückflußkühler gekocht und dann durch Eintragen von 5 ccm 38% iger Salzsäure eine Fällung erzeugt. Nach 24stündigem Stehen wurde diese abgesaugt und ausgewaschen, nach sorgfältigem Trocknen betrug ihr Gewicht 0,7 g. Sie kristallisierte aus Chloroform sowohl wie aus heißem Eisessig in Form von feinen Nadelchen, Spindeln und Prismen und erwies sich bei Zimmertemperatur in 5% iger Sodalösung als löslich.

0,1123 Substanz (i. V.): 0,0442 AgJ (Zeisel)  
 0,2210 " (90°): 0,5096 CO<sub>2</sub>, 0,1059 H<sub>2</sub>O, 0,0274 Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>  
 0,1052 " (90°): 0,0228 AgCl (Carius)  
 C<sub>34</sub>H<sub>31</sub>(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>O<sub>1</sub>N<sub>4</sub>FeCl. Ber. 63,11% C, 5,11% H, 8,41% Fe, 5,33% Cl, 2,33% CH<sub>3</sub>  
 Gef. 62,89 5,36 8,67 5,35 2,51

Nach diesen Analysen zu urteilen lag also ein monomethyliertes Hämin vor.

β) Der bei α beschriebene Versuch wurde unter denselben Bedingungen wiederholt, nur wurden 8 Tropfen konzentrierte Schwefelsäure verwendet. Dabei ergaben sich 0,65 g eines zunächst amorphen, dunkelbraunen Pulvers, das aus heißer 98%iger Essigsäure in feinen, teilweise zu Bündeln angeordneten Nadeln kristallisierte. Im kochenden Wasserbade mit 5%iger Sodalösung erhitzt waren nach Einwirkung von 20 Minuten höchstens Spuren gelöst.

0,1905 Substanz (90°): 0,4430 CO<sub>2</sub>, 0,0915 H<sub>2</sub>O, 0,0230 Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>  
 0,0863 " (i.V.): 0,0593 AgJ (Zeisel)  
 0,1066 " (90°): 0,0223 AgJ (Carius).  
 C<sub>34</sub>H<sub>31</sub>(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>O<sub>1</sub>N<sub>4</sub>FeCl. Ber. 63,57% C, 5,29% H, 8,24% Fe, 5,22% Cl, 4,4% CH<sub>3</sub>  
 Gef. 63,42 5,37 8,44 5,17 4,38,

wonach der Dimethylester des Hämins vorliegt.

2. α) 0,5 g wurden in 30 ccm absoluten Äthylalkohols unter Zusatz von 12 Tropfen 10%iger Schwefelsäure gelöst, die Lösung 30 Minuten am Rückflußkühler gekocht und dann filtriert, wobei ein Rückstand von 0,1 g blieb<sup>1)</sup>. Das noch heiße Filtrat wurde dann mit 4 ccm 38%iger Salzsäure gefällt, nach 24 stündigem Stehen der Niederschlag filtriert, ausgewaschen und im Vakuum getrocknet. Er wog 0,35 g, kristallisierte aus Chloroform als Gemisch von Nadelchen und langgestreckten Prismen, war in 5%iger Sodalösung bei Zimmertemperatur nicht löslich, wohl aber im kochenden Wasserbade nach etwa 20 Minuten anscheinend colloid löslich.

0,1009 Substanz (90°): 0,0393 AgJ (Zeisel) = 4,8% C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>.

<sup>1)</sup> Es ist anzunehmen, daß dieser Rückstand das intakte Hämin des Gemisches enthielt, leider wurde unterlassen, den Chlorgehalt des Rückstandes quantitativ zu ermitteln.

Da sich für einen Monoäthylester nur 4,27%  $C_2H_5$  berechnen, war demnach etwas Diäthylester beigemischt.

- β) Der Versuch wurde unter Verwendung von 6 Tropfen konzentrierter Schwefelsäure unter sonst gleichen Bedingungen wiederholt mit dem Resultat, daß ein amorphes, dunkelbraunes Pulver erhalten wurde, welches aus heißem Eisessig in feinen Nadelchen kristallisierte, in 5%iger Sodalösung bei Zimmertemperatur nicht, im kochenden Wasserbade nach 20 Minuten spurenweis löslich war.

0,0942 Substanz (90°): 0,0530 AgJ (Zeisel) = 6,95%  $C_2H_5$ .

Für den Diäthylester berechnen sich 8,19%  $C_2H_5$ . Es lag also ein Gemisch vor von etwa 2 Teilen des Diäthyl- und einem Teil Monoäthylester des Hämins.