

88. William Küster: Ueber den Blut- und den Gallen-Farbstoff.

[Mittheilung aus dem physiologisch-chemischen Institute zu Tübingen.]
(Eingegangen am 8. März.)

Meinen früheren Mittheilungen¹⁾ über den eisenhaltigen Bestandtheil des Oxyhämoglobins, das Hämatin $C_{39}H_{32}N_4FeO_4$, habe ich einige wesentliche Berichtigungen zu geben, welche ich im Folgenden darlege.

Wie ich zeigte, zerfällt das Hämatin, wenn es, im frisch gefällten Zustande in Eisessig gelöst, der Einwirkung von Natriumdichromat ausgesetzt wird, in verschiedene Spaltungsproducte, unter denen sich auch ätherlösliche Säuren befinden, welche nach einer qualitativen Prüfung als stickstofffrei betrachtet werden mussten. Ans dem Rohmaterial konnte ich einmal eine Säure isoliren, deren Schmelzpunkt zu $109.5-111.5^\circ$ angegeben wurde²⁾, bei weiteren Versuchen wurde eine bei 94.5° schmelzende Säure erhalten.

Auf Grund einer Analyse (I) wurde der ersteren die Formel $C_8H_{10}O_5$ ertheilt, womit auch das Molekulargewicht übereinstimmte, die Analyse des Silbersalzes ergab einen Gehalt von 2 Atomen Metall. Der Körper wurde als: »zweibasische Hämatinsäure« bezeichnet.

Dieselbe Säure wurde nach der gleichen Abbaumethode auch aus dem Hämatoporphyrin, $C_{16}H_{18}N_2O_5$, erhalten; die von Hrn. Völter³⁾ ausgeführten Analysen (II) stimmten mit den von mir erhaltenen Resultaten überein.

$C_8H_{10}O_5$.	Ber. C 51.61,	H 5.37,
	Gef. » I. 51.68, II. 51.70, II. 51.49, » I. 5.29, II. 5.27, II. 5.14.	
$C_8H_8Ag_2O_5$.	Ber. C 24.00, H 2.00, Ag 53.84,	
	Gef. » 24.05, » 2.12, » I. 53.76, II. 53.75.	

Die bei 94.5° schmelzende Säure ergab bei der Analyse Werthe, welche — allerdings nicht genau — für die Formel $C_8H_8O_5$ stimmten.

$C_8H_8O_5$.	Ber. C 52.17,	H 4.35.
	Gef. » 51.24, 51.35, » 4.44, 4.50.	

Da nun die für das im Vacuum getrocknete Silbersalz gefundenen Zahlen (C 17.79, 17.60, H 1.75, Ag 60.49, 61.09⁴⁾) noch am besten mit der Formel $C_8H_7Ag_3O_6$ (C 18.3, H 1.34, Ag 61.88) in Einklang

¹⁾ Habilitationschrift. Tübingen bei Pietzker. 1896. Diese Berichte 29, 823.

²⁾ Bei einer weiteren Bestimmung wurde $112-113^\circ$ beobachtet.

³⁾ Diese Berichte 30, 107 und Völter's Dissertation [Tübingen bei Pietzker] pag. 16, 21.

⁴⁾ Die in meiner Habil.-Schrift pag. 43 angegebene Zahl 61.4 beruht auf einem Rechenfehler.

zu bringen waren, wurde $C_8H_8O_5$ als das »Anhydrid« einer dreibasischen Hämatinsäure, $C_8H_{10}O_6$, angesprochen.

Ich will gleich hinzufügen, dass es später gelang, den Körper $C_8H_8O_5$ in reiner Form zu erhalten, er zeigte dann den scharfen Schmelzpunkt $97-98^\circ$ und ergab bei der Analyse:

Gef. C 52.25, 51.77, 52.15, H 4.55, 4.58, 4.33,

während für das Silbersalz ein Gehalt von $\frac{1}{2} H_2O$ festgestellt wurde, welches bei 110° entweicht:

$C_8H_7Ag_3O_6 + \frac{1}{2} H_2O$. Ber. $\frac{1}{2} H_2O$ 1.69. Ag 60.83.

Gef. 1.46, 1.99, 1.69, » 60.35, 60.60, 61.04.

Die »zweibasische Hämatinsäure« wurde noch charakterisiert durch das in Wasser lösliche Calciumsalz, welches aus einer heiss gesättigten Lösung in zu Drusen vereinigten Nadeln krystallisiert.

Der Körper $C_8H_8O_5$ giebt endlich in wässriger Lösung bei der Einwirkung von Calciumcarbonat in der Kälte Calciumsalzlösung, aus der beim Erhitzen basische Salze in mikroskopischen Krystallen ausfallen, welche einen Gehalt von ca. 20—21 pCt. Calcium aufweisen.

Dieses Verhalten leistete für die Abtrennung von $C_8H_8O_5$ treffliche Dienste.

Nach den Untersuchungen Völter's schien auch der Zusammenhang der beiden Säuren erklärt. Durch Oxydation in »alkalischer« Lösung konnte $C_8H_{10}O_5$ in $C_8H_8O_5$ übergeführt werden, in saurer Lösung war es nicht möglich. In alkalischer Lösung ging aber die Ueberführung sehr leicht von Statten, kleine Mengen von $C_8H_8O_5$ fanden sich schon nach längerem Stehen an der Luft vor, sodass eine Einwirkung des atmosphärischen Sauerstoffs angenommen wurde.

Zu gleicher Zeit wie diese Untersuchung ausgeführt wurde, hatte ich begonnen, den Gallenfarbstoff einer ähnlichen Spaltung zu unterziehen, um die vermutete Verwandtschaft desselben mit dem Blutfarbstoff zu prüfen¹⁾. Ich war dabei, zuerst nur mit sehr geringen Mengen des kostbaren Materials arbeitend, wider Erwarten zu einer Stickstoff haltenden Säure vom Schmelzpunkte $100-101^\circ$ gekommen, der nach der Analyse die Formel $C_8H_9NO_4$ zukam. Sie wurde Biliverdinsäure genannt, erwies sich gegen $\frac{1}{2}$ n-Ammoniak als einbasisch, ihr Silbersalz enthielt aber 2 Atome Metall.

Nachdem ich dann im Verlaufe eines Jahres grössere Mengen von Gallensteinen hatte sammeln und verarbeiten können, sodass im Ganzen 130 g Farbstoff oxydiert wurden, gelang es scheinbar, die Biliverdinsäure besser zu reinigen. Während Analyse und Molekulargewichtsbestimmung die angenommene Zusammensetzung bestätigten, wurde der Schmelzpunkt bei 110° gefunden, allerdings nicht ganz

¹⁾ Diese Berichte 30, 1831.

scharf, es fand schon von 108° etwa ein Erweichen statt. Bei der Einwirkung von Natronlauge spaltete nun die Biliverdinsäure eine Molekel Ammoniak ab und lieferte hierbei das aus dem Hämatin früher gewonnene Anhydrid, $C_8H_8O_5$ ¹⁾.

Dieses Verhalten veranlasste mich zu einer Controlle der früheren Beobachtungen, welche zunächst ergab, dass die bei der Oxydation des Hämatins erhaltenen ätherlöslichen Rohproducte Stickstoff enthielten.

Allerdings versagte manchmal die Probe oder sie fiel ausserordentlich schwach aus. Weitere Versuche lehrten, dass das primäre Oxydationsproduct des Hämatins zum grossen Theile aus $C_8H_8O_5$ bestehen konnte, z. B. fielen einmal bei der Reinigung über die Calciumsalze durch Erhitzen der in der Kälte bereiteten Lösung $\frac{3}{4}$ der vorhandenen Säure als basisches Calciumsalz von $C_8H_8O_5$ aus. In diesem Fall liess sich aus der durch Ausäthern von den Rohsäuren befreiten Lösung eine Menge Ammoniak austreiben, welche mehr als $\frac{2}{3}$ des in der angewendeten Hämatinmenge vorhandenen Stickstoffs entsprach.

Dies Ergebniss bestätigte also lediglich die früheren. Andere Portionen von Hämatin und Hämatoporphyrin dagegen lieferten vorwiegend nur Stickstoff haltende Säure, und diese gab ein leicht lösliches, beim Erhitzen nicht ausfallendes Calciumsalz, welches durch Umkristallisiren gereinigt werden konnte. Die nunmehr regenerirte Säure zeigte den Schmelzpunkt 111—113°²⁾.

Das sind aber Eigenschaften der »zweibasischen Hämatinsäure«.

Die Analyse führte nun zur Formel $C_8H_9NO_4$.

$C_8H_9NO_4$.	Ber. C 52.45,	H 4.92,	N 7.65.
	Ht. (Pferd) Hp. (Rind)		Hp. ³⁾
	Gef. C 52.49, 52.52, 52.12, • 5.16, 5.30, 5.06,		• 7.59.

Ich bin also durch das einstmalige Versagen der qualitativen Probe auf Stickstoff und die zufällig gut auf $C_8H_{10}O_5$ stimmenden Werthe für den Kohlenstoff zur Aufstellung der falschen Formel $C_8H_{10}O_5$ geführt worden, während alle früheren gefundenen Werthe für den Wasserstoff besser zur richtigen Formel passen. Eine nachträgliche Prüfung der von früher noch vorhandenen als »zweibasische Hämatinsäure« bezeichneten Reste bestätigte den Stickstoffgehalt.

Auch diese Säure geht durch Erwärmen mit Natronlauge unter Abspaltung von Ammoniak in $C_8H_8O_5$ über, der Zusammenhang beider Säuren beruht also nicht auf einer in alkalischer Lösung ein-

¹⁾ Zeitsch. f. phys. Ch. 26, 314, 335.

²⁾ Bei anderen Präparaten wurde beobachtet: 110—113°; 111.5—112.5, Erweichen von 103° an.

³⁾ Ht. = Hämatin; Hp. = Hämatoporphyrin.

tretenden Oxydation, sondern auf dem Ersatz von Imidgruppe durch Sauerstoff.

Nunmehr versuchte ich die Bedingungen zu ermitteln, unter denen es schon bei der Oxydation des Hämatins zur Bildung der stickstoffsreien Säure kommt. Bei der verschiedenartigen Zusammensetzung, welche die auf verschiedenem Wege gewonnenen »Hämine«¹⁾ zeigen, war es ja nicht unmöglich, dass das Entstehen der in Betracht kommenden Säuren seinen Grund schon im Bau der Hämine fand. Des weiteren konnte die Thierart eine Rolle spielen — ich hatte Hämin aus Pferdeblut und solches aus Rinderblut durcheinander verwortheret, in der Voraussetzung, dass nicht nur die empirische Formel, sondern auch die Structur aller »Hämine« die gleiche ist. Endlich war es möglich, dass die während der Oxydation eingehaltene Temperatur oder die Menge des Oxydationsmittels den Unterschied bewirke, auch starke Belichtung habe ich in Frage gezogen.

Aus einer grossen Zahl von Versuchen, die mit Hämin aus Rinder-, Pferde- und Schaf-Blut, dargestellt nach dem Verfahren von Nencki und Schalfejew, sowie mit Hämatoporphyrin angestellt wurden, scheint nun hervorzugehen, dass bei Einhaltung möglichst niederer Temperaturen bei allen Operationen als erstes Oxydationsproduct die Säure $C_8H_9NO_4$ entsteht und zwar in einer Ausbeute von ca. 40 pCt. des verwendeten Hämatins.

Nur als einmal das Hämin mit der zur Ueberführung in Hämatin nötigen Natronlauge längere Zeit erhitzt wurde, bestand das Rohproduct der Oxydation zum grossen Theile aus $C_8H_8O_5$.²⁾.

Endlich dürften die aus Hämatin und die aus dem Gallenfarbstoff erhaltenen Säuren $C_8H_9NO_4$ identisch sein. Beide geben bei der Behandlung ihrer wässrigen Lösung mit Calciumcarbonat in Wasser lösliche Calciumsalze. Wird diese Lösung im Vacuum eingedunstet, so kann das Salz aus der etwa vierfachen Menge Wassers umkristallisiert werden, wenn man die auf die angegebene Weise bereitete Lösung ausgeäthert hat. Auch bei längerer Einwirkung eines Ueberschusses von Calciumcarbonat kann nämlich die Lösung noch freie

¹⁾ cf. Schalfejew, Diese Berichte 18, 232 c. Nencki, Arch. f. exp. Path. u. Pharmak. 18, 401. 20, 325. Mollta, Arch. f. exp. Path. u. Pharmak. 36, 339. Rosenfeld, Arch. f. exp. Path. u. Pharmak. 40, 136. Mörner, Sonderabdrücke aus dem Nordiskt Medicinskt Arkiv 1896 u. 1897.

²⁾ In diesem Fall hatte auch das nach dem Abdestilliren des als Lösungsmittels dienenden Eisessigs und Wiederaufnehmen des Rückstands mit Wasser unlöslich bleibende Oxydationsproduct des Hämatins, welches sich bei Einwirkung von ca. 12 Atomen Sauerstoff auf die Molekel Hämatin in einer Menge von ca. 40 pCt. bildet, eine hellbraune Farbe, während es sonst getrocknet fast wie Hämatin, also schwarz aussah.

Säure enthalten, und diese verhindert dann das Ausscheiden des Calciumsalzes beim Erkalten¹⁾.

Andererseits genügt bereits die Einwirkung von Calciumcarbonat, um kleine Mengen von $C_8H_8O_5$ zu bilden, und stets bleibt beim Aufnehmen des im Vacuum bei Zimmer-Temperatur eingetrockneten Salzes mit heissem Wasser ein Theil ungelöst, aus dem dann $C_8H_8O_5$ dargestellt werden kann.

Beim Eindampfen der Calciumsalzlösung auf dem Wasserbade findet endlich eine derartige Zersetzung statt, dass ein Umkristallisiren nicht mehr möglich ist.

Unter Berücksichtigung der angegebenen Vorsichtsmaassregeln verhalten sich nun die aus Hämatin und die aus Bilirubin unter denselben Bedingungen gewonnenen Säuren gleich, beide geben Calciumsalze, welche aus heißer Lösung in zu Drusen vereinigten Nadeln kristallisiren, welche denselben Krystallwassergehalt und den gleichen Gehalt an Calcium aufweisen

$(C_8H_8NO_4)_3Ca + H_2O.$	Ber.	H_2O	4.27	Ca.	9.90
		Ht (Pferd)	Br. ²⁾	Ht	Br.
	Gef.		4.15	4.94.	9.88 9.60.

Bei der Bestimmung des Krystallwassergehalts von Calciumsalzen, welche aus Säuren hergestellt waren, die unter verschiedenen Bedingungen erhalten wurden, bin ich allerdings auf Unterschiede gestossen, insofern manche Salze, über Schwefelsäure zum constanten Gewichte getrocknet, bereits im Vacuum wesentlichen Verlust erlitten.

Ich halte darum die Möglichkeit nicht für ausgeschlossen, dass die Körper $C_8H_9NO_4$ (zweibasische Hämatinsäure — Biliverdinsäure) keine chemischen Individuen vorstellen, sondern Gemische von isomeren Körpern sind, welche aber in ein und denselben Körper $C_8H_8O_5$ übergehen. Darauf weisen auch das nicht ganz scharfe Ueber-einstimmen der gefundenen Schmelzpunkte, darauf weisen ferner die Analysen der Silbersalze. In dem aus Biliverdinsäure erhaltenem Salz fand ich zuerst 53.9 pCt. Silber, das neue Präparat ergab nur 52.0 pCt. Silber. Und Aehnliches gilt für die zweibasische Hämatin-

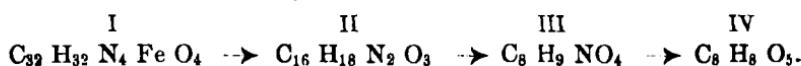
¹⁾ Hierdurch findet die gegenteilige Angabe in meiner letzten Arbeit ihre Erklärung. Zeitsch. f. physiol. Chem. 26, 232. Auch das Ausfallen des öfters erwähnten, basischen Calciumsalzes von $C_8H_8O_5$ kann durch die freie Säure beschränkt oder ganz verhindert werden.

²⁾ Br. = Bilirubin. Es konnten nur 0.1315 g Calciumsalz analysirt werden, diese verloren, über Schwefelsäure getrocknet, im Vacuum nichts an Gewicht, bei 100—105°, 0.0065 g, d. h. 0.001 g bedingt schon einen Unterschied von 0.8 pCt.

säure, die erhaltenen Werth liegen zwischen 53.94 pCt. und 53.02 pCt. Silber, etwa den Formeln $C_8H_9Ag_2O_6$ und $C_8H_7Ag_2O_5$ entsprechend¹⁾.

Durch diese Berichtigung meiner früheren Angaben ist nun auch der Zusammenhang der bisher erhaltenen Spaltungsproducte des Hämatins mit letzterem übersichtlicher geworden.

Unter Abspaltung von Eisen und Aufnahme von Wasser zerfällt, wie Nencki²⁾ zeigte, das Hämatin (I) in Hämatoporphyrin (II), bei der Oxydation giebt das letztere, wie das isomere Bilirubin, die zweibasische Hämatinsäure == Biliverdinsäure (III), aus diesen endlich entsteht durch Abspaltung von Ammoniak das Anhydrid der dreibasischen Hämatinsäure (IV)



Freilich darf nach den bisherigen Resultaten nicht angenommen werden, dass der Zerfall nur in diesem Sinne verläuft, konnten doch aus dem Hämatin nur 40, höchstens 50 pCt. an ätherlöslichen Säuren, aus dem Bilirubin gar nur 20 pCt. erhalten werden.

Die ungesättigte Verbindung $C_8H_8O_5$ geht endlich bei der Reduction mit Jodwasserstoff in eine gegen Kaliumpermanganat beständige Substanz $C_8H_{12}O_6$ über, welche zwar scharfe Werthe bei der Analyse gab und sich als dreibasische Säure erwies, aber bei verschiedenen Präparaten nicht den gleichen und keinen scharfen Schmelzpunkt zeigte und daher wohl auch als Gemisch isomerer Körper zu betrachten ist.

Die vorstehenden Resultate habe ich trotz mancher Unvollständigkeit veröffentlicht, weil ich gezwungen bin, die Arbeit auf mehrere Wochen zu unterbrechen.

Es erübrigt nur noch, Hrn. Dr. Kölle für seine Hilfe bei der Darstellung des Hämatoporphyrins und bei der Ausführung mehrerer Analysen bestens zu danken.

Tübingen, den 7. März 1899.

¹⁾ Ein Wassergehalt konnte bisher nicht festgestellt werden, die am Lichte recht beständigen Silbersalze bräunen sich schon bei 100° sehr stark.

²⁾ Arch. f. exp. Pathol. u. Therapie 24, 430.