

# Zur Kenntnis der Gallenfarbstoffe.

## II. Mitteilung.

### Über das Urobilinogen des Urins und das Wesen der Ehrlichschen Aldehydreaktion.

Von

**Hans Fischer und Friedr. Meyer-Betz.**

Mit einer Tafel in Lichtdruck.

(Aus der II. medizinischen Klinik zu München.)  
(Der Redaktion zugegangen am 10. September 1911.)

## I. Über das «Urobilinogen» des Urins.

Die Entdeckung des «Urobilins» verdanken wir Jaffé; <sup>1)</sup> er fand das Pigment im pathologischen Urin und stellte die Eigenschaften fest, die bis heute die einzig charakteristischen geblieben sind, nämlich die Fluorescenz des Zinksalzes und das spektroskopische Verhalten sowohl der Zinksalzlösung als auch des ursprünglichen Körpers.

Dem Scharfblick dieses Forschers war es nicht entgangen, daß der Farbstoff erst ein sekundäres Produkt ist, ein Zersetzungsprodukt des «Urobilinogens» und er nahm an, daß die Muttersubstanz des Farbstoffes, das «Urobilinogen», zum «Urobilin» in einem ähnlichen Verhältnis steht, wie z. B. Indigweiß zu Indigo.

In der Folgezeit finden wir die Mehrzahl der Autoren auf diesem Gebiet mit der Isolierung des Urobilins beschäftigt, und die Methoden hierfür wurden insbesondere durch die Arbeiten Friedrich Müllers <sup>2)</sup> und seiner Schüler <sup>3)</sup> soweit gefördert, daß man zu Lösungen gelangte, die quantitativ das «Urobilin» enthielten.

War hiermit für die klinische Untersuchung Bahn gebrochen, so war man damit chemisch nicht weiter, da über die Zusammensetzung, ja nicht einmal Herkunft des «Urobilins» etwas bekannt war. Auch hier verdanken wir den Unter-

<sup>1)</sup> Virchows Archiv. 1862, Bd. 23, und 1869, Bd. 47.

<sup>2)</sup> Jahresber. d. Schles. Gesellschaft f. vaterländische Kultur, Breslau 1892, und Verhandl. des med. Kongr. zu Wiesbaden. 1888.

<sup>3)</sup> D. Gerhardt, Inauguraldissertation, Berlin 1889.

suchungen Fr. Müllers Aufklärungen. Fr. Müller<sup>1)</sup> gab einem Patienten mit totalem Choledochusverschluß, der kein Urobilin im Harn und Stuhl hatte, Galle ein, und konnte darnach im Harn und Stuhl «Urobilin» bzw. «Stercobilin» nachweisen. Bilirubin führte er durch Bakterien in Urobilin über, wodurch er den Beweis geliefert hat, daß Bilirubin die Muttersubstanz des Urobilins ist.

War bis hierher der Weg klar und eindeutig, so kamen bald Schwierigkeiten, als man sich bemühte, «Urobilin» in Substanz darzustellen und mit Gallenfarbstoffen zu vergleichen.

Garrod und Hopkins,<sup>2)</sup> im wesentlichen nach den bekannten Methoden der Urobilinisolierung mit Hilfe von Ammonsulfat arbeitend, stellten für das Urobilin aus Kot und Urin die analytischen Daten fest und fanden den N-Gehalt übereinstimmend zu 4,2%, während der Gallenfarbstoff 9,8% N (Bilirubin) enthält.

Es mußte also geschlossen werden, daß bei der von Fr. Müller beobachteten Überführung von Bilirubin in «Urobilin» Stickstoff, wohl in der Form von Ammoniak, abgespalten würde. Dieser Vorgang schien chemisch nicht undenkbar, da Küster<sup>3)</sup> gefunden hat, daß durch Einwirkung von Alkali auf Bilirubin annähernd 1 Mol. Ammoniak abgespalten wird.

Unvereinbar aber war der niedrige N-Gehalt des Garrod-Hopkinsschen Präparates mit dem N-Gehalt des von Maly aus Bilirubin durch Reduktion mit Natriumamalgam gewonnenen «Hydrobilirubins».

Diese Reduktion mit Natriumamalgam hat zuerst Städeler<sup>4)</sup> ausgeführt und klar erkannt, daß hierbei ein Leukofarbstoff entsteht, und Städeler glaubte, daß bei einer dann folgenden Oxydation Bilirubin zurückgebildet werde. Er verglich den Prozeß mit dem oben angeführten Verhältnis von Indigweiß zu Indigo.

Städeler,<sup>5)</sup> der nur sehr wenig Bilirubin in den Händen

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

<sup>2)</sup> Journ. of Physiol., Bd. 22.

<sup>3)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 59, S. 88.

<sup>4)</sup> Liebigs Annalen, Bd. 132, S. 323.

<sup>5)</sup> l. c.

gehabt haben kann, hat das Produkt der Reduktion mit Natriumamalgam nicht näher studiert, sein Wesen aber richtig erkannt, während Maly,<sup>1)</sup> der von größeren Mengen Bilirubin ausgegangen war, ganz übersah, daß zuerst ein Leukofarbstoff entsteht, dagegen entdeckte, daß der braunrote Farbstoff, den er isolierte, dieselben Reaktionen gab, wie das Jaffésche «Urobilin», weshalb er beide Stoffe für identisch ansah.

Die Malyschen Analysen ließen keinen Zweifel, daß der von ihm untersuchte Farbstoff 9% Stickstoff enthält, was auch von vornherein wahrscheinlich war, da etwa bei der Reduktion entstandenes Ammoniak der Beobachtung nicht hätte entgehen können. (Der Prozeß ist späterhin von zahlreichen Autoren studiert worden, unter denen Disqué<sup>2)</sup> hervorzuheben ist, der wiederum feststellte, daß zuerst ein Leukofarbstoff entsteht und dieser durch Sauerstoffaufnahme in «Urobilin» übergeht.)

Malys Ansicht, der sein «Hydrobilirubin» für identisch mit dem «Urobilin» des Urins hielt, wurde in der Folgezeit von der Mehrzahl der Kliniker geteilt; da aber durch die Analysen von Garrod und Hopkins nachgewiesen war, daß das «Urobilin» nur 4% N aufweist, während das Hydrobilirubin 9,2% N enthält, und das Malysche Hydrobilirubin der ganzen Darstellung nach als chemisches Individuum nicht angesehen werden konnte, so mußte zunächst der Reduktionsprozeß des Bilirubins mit Natriumamalgam eingehender studiert werden.

Bei der Reduktion des Bilirubins mit Natriumamalgam entsteht ein krystallisierender Körper, Hemibilirubin,<sup>3)</sup> und ein zweiter Körper (Substanz II<sup>3)</sup>), der vorläufig nicht zur Krystallisation gebracht werden konnte. Beide Körper besitzen die Fähigkeit, in «Urobilin» überzugehen.

Das Malysche Hydrobilirubin besteht nun aus Hemibilirubin und einer anderen, bei der Oxydation<sup>4)</sup> viel Hämatinsäure

1) Liebigs Annalen, Bd. 163, S. 88.

2) Diese Zeitschrift, Bd. 2.

3) Vgl. Mitteilung I, Diese Zeitschrift, Bd. 73, S. 204 ff.

4) Das Hemibilirubin selbst wie auch diese Substanz geben bei der Oxydation auch noch Methyläthylmaleinimid (im Druck befindliche Mitteilung von H. Fischer und P. Meyer).

liefernden Komponente des Bilirubins und ist ein wechselndes Gemisch. Mit der spektroskopischen Untersuchung<sup>1)</sup> kommt man hier nicht weiter, weil die Reduktionsprodukte des Bilirubins beziehungsweise ihre Zersetzungsprodukte («Urobilin») in dieser Hinsicht die gleichen Eigenschaften in hervorragendem Maße besitzen, ebenso wie eine Reihe anderer Körper, von denen das Hämopyrrol schon lange von Nencki<sup>2)</sup> untersucht ist.

Wir haben die Reihe solcher «Urobilinbildner» noch erheblich vermehren können und haben eine Anzahl von synthetischen Pyrrolderivaten, die durch die Arbeiten von Knorr,<sup>3)</sup> Hantzsch,<sup>4)</sup> Feist<sup>5)</sup> und ihren Schülern relativ leicht zugänglich sind, auf ihre Fähigkeit im Reagensrohr und Tierversuch, dem «Urobilinogen» bzw. «Urobilin» gleiche Reaktionen zu geben, geprüft.

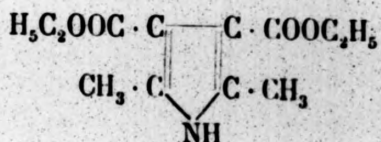
Ebenso haben wir die bekannten Abbauprodukte des Blutfarbstoffs und Bilirubins auf diese Fähigkeiten hin untersucht. Wir haben diese Versuche angestellt, um zu beweisen, wie leicht man mit den bisher üblichen Nachweismethoden des Urobilinogens und Urobilins zu dem Glauben geführt werden kann, diese Körper gefunden zu haben, während in Wirklichkeit lediglich ein in Zersetzung befindliches Pyrrolderivat vorhanden zu sein braucht. Wir geben zunächst unsere diesbezüglichen Versuchsprotokolle.

### Versuchsprotokolle.

#### I. Pyrrolderivate.<sup>6)</sup>

##### 1. 2,5-Dimethylpyrrol-3,4-dicarbonsäureester.

Darstellung nach Knorr, Liebigs Annalen, Bd. 236, S. 296.



Der schön krystallisierte Körper ist durchaus luft- und

<sup>1)</sup> Vgl. auch die Ausführungen R. Willstätters und W. Miess. Liebigs Annalen, Bd. 350, S. 3.

<sup>2)</sup> Op. omn., II, S. 798.

<sup>3)</sup> Liebigs Annalen, Bd. 236, und Berichte, Bd. 35, S. 2998.

<sup>4)</sup> Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch., Bd. 23.

<sup>5)</sup> Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch., Bd. 35.

<sup>6)</sup> Der überraschend leichte Übergang von Körpern, deren Existenz

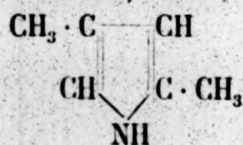
lichtbeständig und gibt keine Fluoreszenzreaktion mit Zinksalzen. In Alkohol gelöst, tritt in der Kälte bei Zusatz von Ehrlichs Reagens (p-Dimethylamidobenzaldehyd in salzsaurer Lösung) nur ganz schwache Rosafärbung ein.

1. Tierversuch. Ein Kaninchen erhält am 21. VIII. 3<sup>h</sup> 25 p. m. 0,2 g des Esters in Olivenöl gelöst mit der Schlundsonde. 8<sup>h</sup> p. m. Katheterismus. Aldehydreaktion des Urins in der Kälte negativ, in der Wärme intensiv. Keine Fluoreszenz mit gesättigter alkoholischer Zinkacetatlösung. 22. VIII. 8<sup>h</sup> a. m. Weder Aldehyd- noch Fluoreszenzreaktion vorhanden.

2. Tierversuch. 1 Kaninchen erhält am 24. VII. 12<sup>h</sup> mittags 0,1 des Körpers in 5 ccm  $\frac{1}{10}$ -NaOH gelöst subcutan. Die schwach alkalische Lösung gab mit Ehrlichs-Reagens eine ganz schwache Rosafärbung. 4<sup>h</sup> p. m. Katheterismus. Der erhaltene dunkelbraune Urin gibt in der Kälte keine Färbung bei Zusatz von Aldehydreagens, nach Erhitzung tritt sie sehr intensiv auf. Spektroskopisch fand sich ein Streifen im Grün, im injizierten Originalpräparat war er nach Erhitzen ebenfalls, nur weiter rechts gelagert, nachweisbar. Fluoreszenzreaktion war in dem Urin auch nach längerem Stehen nicht deutlich zu konstatieren.

## 2. 2,4-Dimethylpyrrol.

Darstellung nach Knorr, Ann., Bd. 236, S. 326.



Das frisch dargestellte Öl gab in Alkohol gelöst in geeigneter Verdünnung intensive Aldehydreaktion. Spektroskopisch fand sich ein «Urobilinogenstreifen» in der Ausdehnung von  $\lambda = 580-505 \mu\mu$ .

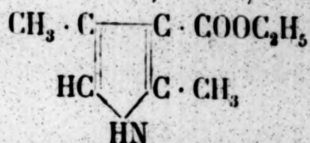
1. Tierversuch. Ein Kaninchen erhält am 21. VIII. 0,2 g im Tierkörper der Vorstellung keine Schwierigkeit bietet, wie z. B. Acetessigester, Amidoacetessigester oder Diacetbernsteinsäureester in Pyrrole legt den Gedanken nahe, daß auch die Synthese des Blutfarbstoffs auf diesem Wege erfolgen könnte. Die Annahme hätte jedenfalls viel für sich, insofern, als hierdurch die Bausteine des Blutfarbstoffs von allen drei Nahrungsbestandteilen geliefert werden könnten.

der Substanz in Olivenöl gelöst per os. Katheterismus nach 4<sup>h</sup>. Aldehydreaktion im Harn in der Kälte positiv, in der Wärme sehr intensiv. Spektroskopisch zeigte die Probe ein «Urobilinogen»-Band in der Ausdehnung von  $\lambda = 566-540 \mu\mu$ . Nach Versetzen mit Zn-Salzlösung starke Fluorescenz und spektroskopisch einen Streifen von  $\lambda = 505-470 \mu\mu$ , sowie starke Verdunkelung der rechten Seite des Spektrums. Am 22. VIII. Aldehydreaktion in der Kälte verschwunden, Fluorescenz noch stark positiv.

2. Tierversuch. Ein Kaninchen erhält am 25. VII. 1<sup>h</sup> p. m. ca. 0,1 g 2,4-Dimethylpyrrol in Alkohol gelöst subcutan. 5<sup>h</sup> 30' katheterisiert. Urin gibt intensivste Aldehydreaktion in der Kälte: spektroskopisch zeigt der Urin nach der Reaktion einen breiten, von Gelb bis ins Grün reichenden Streifen. Mit alkoholischer Zinksalzlösung keine deutliche Fluorescenz.

### 3. 2,4-Dimethylpyrrol-3-carbonsäureäthylester.

Darstellung nach Knorr, Ann., Bd. 236, S. 325.



Das krystallisierte Präparat und ebenso die freie Säure (nach Verseifung mit alkohol. Kalilauge) gaben in Alkohol gelöst starke Rotfärbung nach Zusatz von Ehrlichs Reagens und spektroskopisch zwei Streifen im Bereich von I.  $\lambda = 565$  bis  $538 \mu\mu$ , II. von  $\lambda = 510-465 \mu\mu$  ca.

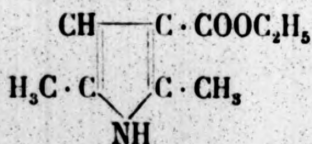
1. Tierversuch. Ein Kaninchen erhält am 18. VIII. 3<sup>h</sup> 15 p. m. 0,2 g der freien Säure in Olivenöl gelöst per os. 6<sup>h</sup> 50' Katheterismus. Aldehydreaktion in der Kälte sehr intensiv. Spektroskopisch ein von  $570-530 \mu\mu$  ca. reichendes Band rechte Seite des Spektrums von  $518 \mu\mu$  ab vollkommen ausgelöscht. Fluorescenz mit Zn-Salz nicht deutlich. Keine entsprechende Spektralerscheinung. 19. VIII. Aldehydreaktion in der Kälte stark positiv, Fluorescenz auch heute nach längerem Stehen negativ.

2. Tierversuch. Ein Kaninchen erhält am 24. VII. 12<sup>h</sup> 15 p. m. 0,05 g des Esters in Alkohol gelöst. 4<sup>h</sup> katheterisiert.

Aldehydreaktion in der Kälte stark positiv. Fluorescenz nach längerem Stehen schwach vorhanden. Am 25. VII. war die Reaktion mit Aldehydreagens in der Kälte noch angedeutet, in der Wärme stark.

#### 4. 2,5-Dimethylpyrrol-3-monocarbonsäureäthylester.

Darstellung nach Hantzsch, Ber., Bd. 23, S. 1473.



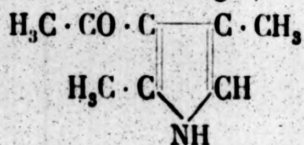
In Alkohol gelöst gab der schön krystallisierte Ester mit p-Dimethylamidobenzaldehyd in saurer Lösung starke Rotfärbung. Spektroskopisch einen Streifen zwischen  $\lambda = 556 \mu\mu$  und  $525 \mu\mu$ , außerdem einen zweiten undeutlicheren von  $504$  bis  $490 \mu\mu$ , zwischen beiden Streifen Verdunkelung.

1. Tierversuch. Ein Kaninchen erhält am 21. VIII. 3<sup>h</sup> 20' p. m. 0,2 g des Körpers in Olivenöl mit der Schlundsonde. Nach 3<sup>1</sup>/<sub>2</sub> Stunden Katheterismus. Aldehydreaktion in der Kälte schwach positiv. Spektroskopisch: Band von  $496$ — $470 \mu\mu$ . Fluorescenzreaktion negativ. 22. VIII. 8<sup>h</sup> p. m. Aldehydreaktion in der Kälte negativ, in der Wärme noch stark positiv.

2. Tierversuch. Ein Kaninchen erhält am 28. VII. 1<sup>h</sup> 15' p. m. 0,2 g des Körpers subcutan. 4<sup>h</sup> katheterisiert. Aldehydreaktion in der Kälte unsicher, in der Wärme sehr intensiv. 7<sup>h</sup> p. m. Aldehydreaktion in der Kälte angedeutet, in der Wärme stark positiv. Spektroskopisch kein sicherer Streifen. Fluorescenz negativ.

#### 5. 3,5-Dimethyl-4-acetylpyrrol.

Darstellung nach Knorr und Lange, Ber., Bd. 35, S. 3007.



Das krystallisierte Präparat gab in Alkohol gelöst intensivste Aldehydreaktion, spektroskopisch fand sich ein intensiver Streifen von  $\lambda = 580$ — $535 \mu\mu$ , ein zweiter unscharfer im Blaugrün war bis ca.  $\lambda = 520 \mu\mu$  verfolgbar.

1. Tierversuch. Ein Kaninchen erhält 0,2 g der Substanz in Olivenöl am 18. VIII. 3<sup>h</sup> p. m. per os. 6<sup>h</sup> 45' Katheterismus. Aldehydreaktion in der Kälte schwach positiv, in der Wärme intensiv. Spektroskopisch (in der Wärme!) Streifen von  $\lambda = 568$  bis 490  $\mu\mu$  verwaschen. Keine deutliche Fluoreszenz. 19. VIII. Weder Aldehyd- noch Fluoreszenzreaktion vorhanden.

2. Tierversuch. Ein Kaninchen erhält am 24. VII. 12<sup>h</sup> 20 0,1 g des Körpers in Alkohol gelöst subcutan. 4<sup>h</sup> 15 Urin p. C. klar, hellgelb. Aldehydreaktion in der Kälte schwach, wird bei Erhitzen stärker. Spektroskopisch schwacher Streifen im Gelb gegen Grün, nach Erhitzen Streifen im Gelb. Fluoreszenz nach längerem Stehen schwach, aber deutlich. 25. III. noch schwache Aldehydreaktion des Urins nach Erwärmen.

#### 6. 1-Phenyl-2,5-dimethylpyrrol-3-carbonsäure.

Darstellung nach Feist, Ber., Bd. 35, S. 1547.



In Alkohol gelöst gab das Originalpräparat Aldehydreaktion und spektroskopisch einen schmalen Streifen von  $\lambda = 556$  bis 520  $\mu\mu$ , von 520—490  $\mu\mu$  zeigte sich das Spektrum verdunkelt.

1. Tierversuch. Ein Kaninchen erhält am 15. VIII. 12<sup>h</sup> 45' p. m. 0,2 g der Substanz in Eigelb verrührt mit der Schlundsonde. 6<sup>h</sup> 45 p. m. Katheterismus. Aldehydreaktion in der Kälte schwach positiv. Spektroskopisch breiter schwacher Streifen von  $\lambda = 530 \mu\mu$  an. Fluoreszenzreaktion 0. 19. VIII. Aldehydreaktion in der Kälte 0, in der Wärme noch sehr intensiv. Fluoreszenz 0.

2. Tierversuch. Ein Kaninchen erhält am 27. VII. 11<sup>h</sup> 45 a. m. 0,1 g Substanz in Alkohol gelöst. 7<sup>h</sup> p. m. katheterisiert. Aldehydreaktion in der Kälte 0, in der Wärme intensiv. Spektroskopisch in der Kälte kein Streifen, nach Erwärmung Streifen in Gelb. Fluoreszenz vorhanden.



## II. Blut- und Gallenfarbstoffderivate.

## 1. Phonopyrrolcarbonsäure.

Darstellung nach Piloty, Ann., Bd. 366, S. 238.

Mit Aldehydreagens versetzt, gibt sie intensive Rotfärbung und spektroskopisch einen Streifen von  $\lambda$  565—505  $\mu\mu$ .

1. Tierversuch. Ein Kaninchen erhält am 23. VIII. 9<sup>h</sup> 15 a. m. 0,3 g Phonopyrrolcarbonsäure in alkalischer Lösung per os. 7<sup>h</sup> p. m. Katheterismus. Aldehydreaktion in der Kälte sehr intensiv. Spektroskopisch ein Band von 580—512  $\mu\mu$ . Fluoreszenz sehr stark. Spektroskopisch mäßig starkes Band von  $\lambda$  503—480  $\mu\mu$  bis 460  $\mu\mu$  Verdunkelung. Am 24. VIII. noch deutliche Aldehydreaktion 2 Streifen, I. 555—520, II. 499—474  $\mu\mu$ , dazwischen leichte Verdunkelung.

2. Tierversuch. Ein Kaninchen erhält 0,2 g Phonopyrrolcarbonsäure in 5 ccm  $\frac{1}{10}$ -NaOH gelöst subcutan am 22. VII. 12<sup>h</sup> 45. 4<sup>h</sup> 15 Katheterismus. Aldehydreaktion: 1 ccm Urin auf 10 ccm verdünnt und mit Aldehydreagens versetzt, ergibt in der Kälte dunkelkirschrote Färbung und zeigt schwachen Streifen im Gelb, starken Urobilinstreifen. Fluoreszenz mit Zn-Salzen sehr intensiv.

## 2. Hämopyrrol.

Darstellung nach Nencki, Op. omn., Bd. 2, S. 798.

Das Präparat zeigt mit Aldehydreagens versetzt starke Reaktion und spektroskopisch einen Streifen von 552—505  $\mu\mu$ .

Tierversuch. Ein Kaninchen erhält am 24. VIII. 9<sup>h</sup> 30 a. m. 30 ccm konzentrierte wässrige Hämopyrrolösung per os. 7<sup>h</sup> 30 p. m. Katheterismus. Aldehydreaktion in der Kälte schwach positiv. Spektroskopisch Streifen von 580—530  $\mu\mu$  (und Verdunkelung im Blau?). Nach Versetzen mit Zn-Salzlösung schöne Fluoreszenz und spektroskopisch von 508—490  $\mu\mu$  starkes Band bis 480  $\mu\mu$  Verdunkelung erkennbar.

## 3. Hemibilirubin.

Darstellung nach Fischer, Diese Zeitschrift, Bd. 73, S. 204.

Hemibilirubin gibt mit Aldehydreagens starke Reaktion und spektroskopisch zwei Streifen, I. von 578—530  $\mu\mu$ , II. von

506—470  $\mu$ . Der zweite dieser Streifen verdankt seine Entstehung der sofort auftretenden teilweisen Zersetzung des Präparats, die direkt verfolgt werden kann (vgl. später S. 243).

1. Tierversuch. Ein Kaninchen erhält am 25. VIII. 3<sup>h</sup> p. m. 0,1 g Hemibilirubin in Na-Bicarbonat gelöst per os. 8<sup>h</sup> Katheterismus. Aldehydreaktion nur schwach. Spektroskopisch schwacher Streifen im Grün. 26. VIII. Aldehydreaktion schwach +, Fluorescenz vorhanden.

2. Tierversuch. Ein Kaninchen erhält am 28. VIII. 8<sup>h</sup> p. m. 0,1 g Hemibilirubin in 0,1 Natriumbicarbonat und 5 ccm H<sub>2</sub>O gelöst, das ganze in Eigelb aufgeschwemmt. 29. VIII. 8<sup>h</sup> a. m. Aldehydreaktion positiv. Spektroskopisch: I.  $\lambda = 580-540 \mu$ , II.  $\lambda = 500-480 \mu$ . Fluorescenzreaktion schwach positiv. Spektroskopisch ganz schwacher Streifen im Grün. 30. VIII. noch immer sehr deutliche Aldehydreaktion.

Ein ähnliches Resultat ergab ein Versuch am Menschen. Die Aldehydreaktion war hier nach Einnahme von 0,1 g Hemibilirubin in Eigelb im Harn deutlich, aber lange nicht so stark positiv wie bei pathologischen Urinen. Der Versuch wurde nicht wiederholt, da nach Einnahme Übelkeit und Durchfall auftraten, wenn auch nicht entschieden ist, daß sie mit der Einnahme des Präparats in Verbindung gebracht werden müssen.

3. Tierversuch. Ein Kaninchen erhält am 22. VII. 0,1 g Hemibilirubin in 1 ccm Alkohol subcutan. 4<sup>h</sup> 15 Katheterismus. Der Urin zeigt starke Aldehydreaktion und typisch spektroskopisches Verhalten, nur schwache Fluorescenz. 23. VII. noch immer intensive Aldehydreaktion.

4. Tierversuch. Kaninchen erhält am 1. IX. 10<sup>h</sup> 0,1 g Hemibilirubin in Natriumbicarbonatlösung subcutan. 3<sup>h</sup> Katheterismus. Starke Aldehydreaktion und spektroskopisch Streifen von I.  $\lambda = 590-565 \mu$ , II.  $\lambda = 502-484 \mu$ . Fluorescenz +. Spektroskopisch:  $\lambda = 506-486 \mu$ .

#### 4. Substanz II.

Gewinnung siehe I. Mitteilung, Diese Zeitschrift, Bd. 73, S. 225.

Mit Aldehydreagens gibt sie starke Rotfärbung und spektroskopisch zwei Streifen von I.  $\lambda = 578-545 \mu$ , II.  $\lambda = 506$  bis 480  $\mu$  scharf, bis 460 sich aufhellend.

Tierversuch. Ein Kaninchen erhält am 25. VIII. 4<sup>h</sup> ca. 0,2 g Substanz II in alkalischer Lösung per os. 8<sup>h</sup> schwache Aldehydreaktion des Urins. Spektroskopisch Streifen von 572 bis 544  $\mu$ . Fluoreszenzreaktion positiv. Spektroskopisch ein Band von  $\lambda = 495-476 \mu$ . 26. VIII. Aldehyd- und Fluoreszenzreaktion noch deutlich.

#### 5. Pikrat aus Bilirubin.

Aus Bilirubin wurde auf ähnliche Weise wie bei der Pilotyschen Hämatopyrrolidinsäure ein Pikrat isoliert. (Die analytischen Daten und genauere Beschreibung erfolgen in einer späteren Mitteilung.)

Dieses Pikrat wurde auf die gleiche Weise wie das der Hämatopyrrolidinsäure (vgl. unten) von der Pikrinsäure befreit und dann nach Neutralisation mit Natronlauge subcutan eingespritzt.

Diese Lösung gab schwache Aldehydreaktion, Fluoreszenzreaktion mit Zn-Acetat negativ, während die Lösung an sich fluorescierte.

Tierversuch. Kaninchen erhielt am 22. VII. 5<sup>h</sup> 55 p. m. 0,056 g des Körpers in neutraler wässriger Lösung = 10 ccm subcutan. 10<sup>h</sup> p. m. Katheterismus. Aldehydreaktion negativ. Fluoreszenz deutlich positiv. Am 23. VII. Aldehydreaktion 0, Fluoreszenz 0.

#### 6. Pilotysche Hämatopyrrolidincarbonsäure.

Darstellung Ann., Bd. 366, S. 238.

Die Säure wurde den Angaben Pilotys entsprechend dargestellt. Das Pikrat wurde mit Schwefelsäure unter Zusatz von Alkohol zerlegt und die Pikrinsäure ausgeäthert. Die restierende Lösung wurde nach Neutralisation mit Natronlauge subcutan eingespritzt.

Tierversuch. Kaninchen erhält am 25. VII. 12<sup>h</sup> 15 p. m. Hämatopyrrolidincarbonsäure in  $H_2O + NaCl$  gelöst = 20 ccm subcutan. 5<sup>h</sup> 30 Katheterismus. Urin rotgelb. Aldehydreaktion undeutlich. Fluoreszenz schwach. Spektroskopisch kein Absorptionsstreifen. —

In Tabelle I ist das spektroskopische Verhalten der Substanzen selbst übersichtlich angeführt und außerdem mit dem Urobilinogen des Harns in Vergleich gesetzt. Die Pyrrolderivate

wurden sämtlich in Alkohol gelöst und nach Versetzen mit dem Ehrlichschen Reagens auf eine Konzentration gebracht, die ungefähr der Verdünnung 1 : 10000 des von uns dargestellten Dipyrrolphenylmethanfarbstoffs entsprach. Die Spektralbänder wechseln je nach der Konzentration in der Ausdehnung. Die in der Tabelle I für das Hemibilirubin, sowie die Extrakte aus Urin angegebenen Spektralbänder II verdanken Umsetzungen ihre Entstehung («Urobilin»), in ganz frisch dargestelltem Hemibilirubin und im frisch gelassenen Urin findet sich immer nur das I. Band (vgl. auch später). Die Zahlen für Hemibilirubin, Extrakte und Urin wurden in einer großen Zahl von Messungen immer an gleicher Stelle angetroffen.

Tabelle I.

Spektroskopisches Verhalten nach Zusatz von p-Dimethylamidobenzaldehyd in salzsaurer Lösung.

2,5-Dimethylpyrrol-3,4-carbonsäure . . .	negativ.
2,4-Dimethylpyrrol . . . . .	$\lambda = 580-505 \mu\mu$ .
2,4-Dimethylpyrrol-3-carbonsäure- äthylester	{ I. $\lambda = 565-538 \mu\mu$ , II. $\lambda = 510-465 \mu\mu$ ca.
2,5-Dimethylpyrrol-3-carbonsäure- äthylester	{ I. $\lambda = 556-525 \mu\mu$ , II. undeutlich, ca. $504-490 \mu\mu$ , zwischen beiden Streifen Verdunklung.
3,5-Dimethyl-4-acetylpyrrol . . .	{ I. scharfes Band $\lambda = 580-535 \mu\mu$ , II. von $\lambda = 535-520 \mu\mu$ allmählich lichter werdende Verdunklung.
1-Phenyl-2,5-dimethylpyrrol- 3-carbonsäure	{ I. $\lambda 556-520 \mu\mu$ scharf. II. von $\lambda 520-490 \mu\mu$ Verdunklung.
Hämopyrrol . . . . .	$\lambda = 552-505 \mu\mu$ .
Phonopyrrolcarbonsäure . . . . .	$\lambda = 565-505 \mu\mu$ .
Hemibilirubin . . . . .	{ I. $\lambda = 578-530 \mu\mu$ , II. $\lambda = 506-470 \mu\mu$ .
«Substanz II» . . . . .	{ I. $\lambda = 578-545 \mu\mu$ , II. $\lambda = 506-480 \mu\mu$ scharf, bis $\lambda = 460 \mu\mu$ verfolgbar.
Extrakt aus pathol. Harn <sup>1)</sup> . . .	{ I. $\lambda = 572-540 \mu\mu$ , II. $\lambda = 500-475 \mu\mu$ scharf, bis $\lambda = 460 \mu\mu$ ca. verfolgbar.
Extrakt aus norm. Harn <sup>1)</sup> . . .	{ I. $\lambda = 572-540 \mu\mu$ , II. $\lambda = 496-475 \mu\mu$ .
Urobilinogreicher Harn direkt	{ I. $\lambda = 572-532 \mu\mu$ , II. $\lambda = 496-475 \mu\mu$ .

<sup>1)</sup> Darstellung S. 248.

Tabelle II.

Spektroskopisches Verhalten im Urin nach Verfütterung.

Substanz	Aldehydreaktion	Fluoreszenzreaktion
2,4-Dimethylpyrrol	$\lambda = 566-540 \mu\mu$	$\lambda = 505-470 \mu\mu$
2,4-Dimethylpyrrol-3-carbonsäureester	I. $\lambda = 570-530 \mu\mu$ II. Auslöschung von $\lambda = 518 \mu\mu$ an	negativ
2,5-Dimethylpyrrol-3-carbonsäureester	$\lambda 496-470 \mu\mu$	»
1-Phenyl-2,5-dimethylpyrrol-3-carbonsäureester	von $\lambda = 530 \mu\mu$ an schwaches Band	»
Phonopyrrolcarbonsäure	$\lambda = 580-512 \mu\mu$	$\lambda = 503-480 \mu\mu$ mäßig starkes Band, bis $460 \mu\mu$ Verdunklung
Hämibilirubin	I. $\lambda = 580-540 \mu\mu$ II. $\lambda = 500-480 \mu\mu$	$\lambda = 506-486 \mu\mu$
Hämopyrrol	I. $\lambda = 580-530 \mu\mu$ II. Verdunklung im Blau?	$\lambda = 508-490 \mu\mu$ starkes Band, bis $480 \mu\mu$ Verdunklung
Substanz II	$\lambda = 572-544 \mu\mu$	$\lambda = 495-476 \mu\mu$ ca.

In Tabelle II sind nur die im Tierversuch nach Verfütterung positiven Substanzen aufgenommen. Demnach kämen nach Fluoreszenzreaktion und spektroskopischem Verhalten insbesondere Dimethylpyrrol, Phonopyrrolcarbonsäure, Hämopyrrol, Substanz II und Hämibilirubin als «Urobilinbildner» in Betracht. Mit Ausnahme von 1-Phenyl-2,5-dimethylpyrrol-3-carbonsäureester und 2,5-Dimethylpyrrol-3-carbonsäureester zeigen sie zudem einen durchaus dem «Urobilinogen» des Harns entsprechenden Streifen nach Versetzen mit Ehrlichs Reagens.

In der Wärme tritt bei allen untersuchten Substanzen starke Aldehydreaktion ein, die offenbar so zu erklären ist, daß Seitenketten vom Pyrrolring abgesprengt werden, ein Verhalten, das ja durch die Knorrschen Arbeiten wohl bekannt ist.

Alle die hier angeführten reinen Körper geben, wie auch frischer Urin (letztere Tatsache war schon Sallet<sup>1)</sup> bekannt), kein sichtbares Spektrum und kein fluorescierendes Zn-Salz. Erst die Umsetzungsprodukte geben diese Reaktionen, und

<sup>1)</sup> Revue de Médecine, 1897, S. 17.

zwar die Absorption im Blaugrün alle untersuchten Körper ausnahmslos.

Es ist demnach diese Absorption im Blaugrün eine allgemeine Eigenschaft aller nicht stabiler Pyrrole und das sind alle von uns untersuchten Pyrrole, die mindestens ein an einem Ring-C-Atom nicht substituiertes H-Atom besitzen.

Zum Zustandekommen der Fluoreszenzreaktion ist ebenfalls ein nicht stabiles Pyrrol notwendig. Außerdem kommt noch ein weiterer Faktor der Zersetzung hinzu, der offenbar, wenigstens bei den synthetischen Pyrrolen, wechselnd ist, insofern als wir bei manchen zersetzten Pyrrolderivaten (durch Stehen an Licht und Luft in alkoholischer Lösung) intensivste Fluoreszenz bekamen, während manchmal bei derselben Versuchsanordnung keine Fluoreszenz eintrat. Anders verhalten sich die bekannten Blut- und Gallenfarbstoffderivate, indem sie sämtlich mit großer Geschwindigkeit in Körper übergehen, die fluorescierende Zn-Salze geben. Es sei übrigens noch darauf hingewiesen, daß auch zahlreiche Chlorophyllderivate an sich die gleiche Eigenschaft besitzen. (Vgl. Willstätter und Mieg, Liebigs Annal. 350, S. 46.)

Das Verhalten der angeführten Substanzen im Organismus ist im großen ganzen dem im Reagenzglas analog. Offenbar werden sie im wesentlichen unverändert ausgeschieden, und dementsprechend gibt der Urin die gleichen Reaktionen wie die im Reagenzglas untersuchten zersetzten Pyrrolderivate. So war auch bei einigen die Aldehydreaktion im Urin erst in der Wärme intensiv. In Tabelle II haben wir die Körper angeführt, nach deren Eingabe «Urobilin» im Urin nach den klinischen Proben klar und eindeutig nachgewiesen werden kann.

Aus diesem Grunde kommt auch das von Nencki dargestellte Hämopyrrol, das er wegen seines Übergangs in «Urobilin» sowohl im Reagensrohr als im Tierversuch als Urobilinogen ansprach, nicht ohne weiteres als Urobilinogen in Betracht, obwohl die Nenckische Anschauung bis in die letzte Zeit sogar für die Konstitution des Urobilinogens als maßgebend erachtet wurde.

Aus den vorliegenden Beobachtungen geht hervor, daß

die bekannten Urobilinproben keine Gewähr dafür leisten, daß ein dem Organismus einverleibtes Pyrrolderivat in Harn-«Urobilin» übergeht, da sonst viele der oben angeführten Körper als Urobilinbildner in Betracht kämen (vgl. Tabelle II).

Könnte also dieser Weg, das «Urobilin» zu studieren, nicht zum Ziele führen, so mußte eben der Körper in Substanz isoliert und in krystallisierten Zustand übergeführt werden, weil hierdurch allein eine Garantie für Reinheit geboten ist.

Es erschien nun von vornherein wenig aussichtsvoll, das «Urobilin» selbst in krystallisiertem Zustand zu isolieren, weil es sehr schwer zu beurteilen ist, wann die «Urobilinbildung» zu Ende gelangt und man bei der Verarbeitung beständig den Eindruck hat, daß das Präparat in einer fortgesetzten Umwandlung begriffen ist.

Viel aussichtsreicher scheint der Versuch, einen chemisch einheitlichen, wenn auch noch so labilen Körper zu fassen, und das ist die Muttersubstanz des Urobilins, das Urobilinogen.

Was ist nun überhaupt Urobilinogen, und woran wird es erkannt? Von dem Urobilinogen ist zu verlangen, daß es entsprechend den Beobachtungen Jaffés in Urobilin übergeht, d. h. bei der Umsetzung die typischen Spektralerscheinungen und ein fluorescierendes Zinksalz gibt.

Gelten diese Reaktionen nur für die Umsetzungsprodukte, so zeigt das Urobilinogen selbst eine scheinbar sehr charakteristische Farbenreaktion: die Rotfärbung mit einer salzsauren Lösung von Dimethylamidobenzaldehyd.

Von weiteren Farbenreaktionen wäre noch die Biuretreaktion zu erwähnen (s. unten). —

Nach den Arbeitsergebnissen Friedr. Müllers kann nun das Harnurobilinogen bei Abkunft vom Bilirubin seine Entstehung nur einem Reduktionsprozeß verdanken; es lag daher nahe, nachzusehen, ob nicht das Harnurobilinogen identisch sei mit Hemibilirubin.

Die bei der Darstellung dieses Körpers gewonnenen Erfahrungen nutzten wir zu einer prinzipiell neuen Darstellungsart des Urobilinogens aus. Sie beruht auf der charakteristischen Eigenschaft des Hemibilirubins aus Natriumbicarbonatlösung beim

Schütteln mit Chloroform in dieses Lösungsmittel überzugehen. Diese Eigenschaft mußte bei seiner Isolierung aus Harn von Vorteil sein, da in das  $\text{CHCl}_3$ -Extrakt des mit Bicarbonat versetzten Harns weniger Verunreinigungen hineingehen, als in das früher häufig angewandte saure Extrakt. Vor allen Dingen war Aussicht vorhanden, die am meisten zu fürchtenden Gallensäuren zu vermeiden, an deren Gegenwart die Reindarstellung des Urobilinogens aus Kot gescheitert war (vgl. Mitteilung I). Daß mit den Fällungsmethoden kein reines Urobilinogen zu isolieren ist, beweisen alle bisherigen Untersuchungen früherer Autoren und unsere eigenen Erfahrungen. Als wir nun Urin, der starke Aldehydreaktion gab, mit Bicarbonat versetzten und mit  $\text{CHCl}_3$  ausschüttelten, zeigte sich die überraschende Tatsache, daß dieses Extrakt sich absolut negativ bei der Reaktion mit p-Dimethylamidobenzaldehyd verhielt. Wurde es jedoch auf dem Wasserbad eingedampft, so gab der geringe Rückstand, in wenig  $\text{NH}_3$  gelöst, intensive Rotfärbung mit Ehrlichs Reagens und nach eingetretener Oxydation alle Urobilinreaktionen. Es ist aber sehr bemerkenswert, daß nach der so geübten Extraktion die vorher vorhandene Aldehydreaktion des Harns nur unmerklich an Intensivität einbüßt. Man kann einen Urin, der starke Aldehydreaktion gibt, so fast beliebig oft (in einem eigens hierauf gerichteten Versuch 10mal!) mit  $\text{CHCl}_3$  ausschütteln, ohne daß sich eine wesentliche Abnahme der Aldehydreaktion zeigte,<sup>1)</sup> während die Reaktion mit den entsprechenden Rückständen der Extrakte schon von der dritten Behandlung an eine ganz bedeutende Abschwächung erfuhr,

<sup>1)</sup> Woran dies eigentümliche Verhalten liegt, bedarf noch der Aufklärung. Vielleicht liegen hier ähnliche Verhältnisse vor, wie beim Rohhemibilirubin. Dieser Körper ist, wie wir einer noch unveröffentlichten Arbeit von H. Fischer und P. Meyer entnehmen, eine Säure, die sich in Bicarbonat löst unter  $\text{CO}_2$ -Entwicklung. Dieser Lösung ist durch  $\text{CHCl}_3$  das reine Hemibilirubin leicht in einer Ausbeute von ca. 10% zu entziehen. Gewinnt man dann aus der mit Chloroform extrahierten Bicarbonatlösung das restierende Rohhemibilirubin zurück, so löst sich dieses wiederum unter  $\text{CO}_2$ -Entwicklung in Bicarbonat, und dieser Lösung lassen sich neuerdings wieder ca. 10% Hemibilirubin entziehen. Vielleicht liegen beim Urin ähnliche Verhältnisse vor.



so daß wir uns im allgemeinen mit einer dreimaligen Extraktion des Harns begnügten. Demgegenüber schwächt sich die Aldehydreaktion schon nach 1—3 maligem schwach sauren Ausschütteln stark ab oder sie verschwindet sogar ganz.

Im Laufe der Zeit wurden ca. 50 l Harn, der starke Aldehydreaktion gab, nach dieser Methode verarbeitet. Die bei der Ausschüttelung entstehenden Emulsionen wurden im allgemeinen durch wiederholtes Absaugen beseitigt, oft jedoch führte dieses Verfahren nicht zum Ziel, es mußte durch Schütteln mit Talcum und nachfolgende Filtration die Emulsion zerlegt werden. Ein in jedem Fall anwendbares Verfahren kann nicht angegeben werden, da die Verhältnisse je nach dem gerade vorliegenden Urin stark schwankten. Aufs strengste ist aber immer darauf zu achten, daß nicht die geringsten Teile der Emulsion in das zur weiteren Verarbeitung kommende Extrakt gelangen, da sonst die ganze Arbeit vereitelt wird.

Das  $\text{CHCl}_3$ -Extrakt ist zunächst farblos, höchstens ganz hellgelblich gefärbt, nach einigem Stehen tritt leichte Orange-färbung ein, die zur Filtration verwandten Papiere färben sich an der Luft schnell rot.

Die erhaltenen Extrakte wurden mit Natriumsulfat getrocknet, im Vakuum nach erfolgter Filtration auf ein geringes Volumen eingedampft und zur Sicherheit noch zweimal mit einer konzentrierten Natriumbicarbonatlösung ausgeschüttelt. Die  $\text{CHCl}_3$ -Schicht wird dann kurz mit Natriumsulfat getrocknet und in viel Petroläther Sp. 50—60° eingetragen, wobei nur geringe Abscheidung erfolgt. Von dieser läßt sich nach längerem Stehen dekantieren, es wird im Vakuum zur Trockene eingedampft, der ölige bräunlichrote Rückstand in Essigäther gelöst, die Lösung mit Ligroin versetzt. Vom entstehenden Niederschlag wird schnell abfiltriert. Der Essigäther und ein Teil des Ligroins wird abgekocht, wobei meist eine flockige Abscheidung erfolgt, die nach Abkühlen sich weiter vermehrt, und gleichzeitig scheidet sich hierbei ein großer Teil des gesuchten Körpers in Krystallen ab.

Sie gleichen durchaus denen des Hemibilirubins bei schneller Krystallisation.



Urobilinogen identifiziert mit Hemibilirubin.

Die Gesamtfraktion wurde nach dem geschilderten Verfahren mit Essigäther und Ligroin fraktioniert krystallisiert und es wurden 5 Fraktionen erhalten. In 3 Fraktionen wurden typische zu Büscheln vereinigte Krystalldrüsen abgeschieden, die dem Hemibilirubin durchaus gleichen. Durch Waschen mit Essigäther erst in der Kälte, dann vorsichtig in der Wärme konnten fast die gesamten zäh anhaftenden Schmierer entfernt werden. Die nunmehr nur schwach gelb gefärbten Krystalldrüsen wurden dann aus Essigäther und Ligroin umkrystallisiert und wir erhielten wohl ausgebildete Krystalle in minimaler Ausbeute (siehe Tafel I). Es sei ausdrücklich bemerkt, daß niemals mit Hemibilirubin geimpft worden war.

Herr Dr. Steinmetz, I. Assistent am mineralogischen Institut hier, dem wir die Krystalle vorlegten und der seinerzeit die Hemibilirubinkrystalle zu untersuchen die Güte hatte, teilte uns folgendes mit:

«Der mikroskopische Befund beweist die Identität der vorgelegten Substanz mit dem Hemibilirubin. Die Krystalle zeigen die gleiche Kombination wie jene Krystalle (s. Fig. 2 I. Mitteilung, S. 233). Unter dem Mikroskop gemessen ergab sich an einem Krystall der Winkel  $(110) : (\bar{1}10)$  zu  $60^\circ$ , eine Übereinstimmung, die in Hinsicht auf die Kleinheit der Krystallindividuen zum Identitätsbeweis genügend ist. Die Schwingungsrichtung ist parallel der Kante zwischen  $(011)$  und  $(0\bar{1}1)$ , stimmt also ebenfalls mit der an den Krystallen des Hemibilirubins überein.»

Mit diesen Feststellungen<sup>1)</sup> ist das Vorkommen von Hemibilirubin in pathologischen Harnen erwiesen und gleichzeitig zum erstenmal ein Urobilinogen des Harns isoliert und mit einem chemisch und physikalisch wohl charakterisierten Abbauprodukt aus Gallenfarbstoff identifiziert. Dadurch ist weiterhin chemisch einwandfrei Gallenfarbstoff und Urobilin in Zusammen-

<sup>1)</sup> Inzwischen haben wir das oben geschilderte Verfahren erheblich verbessert, und es ist uns gelungen, schon aus 3 l pathologischen Aldehydurins, ja schon aus einer Tagesmenge Krystalle zu erhalten. Diese Krystalle schmolzen bei  $187^\circ \text{C}$ . in Übereinstimmung mit dem Schmelzpunkt des Hemibilirubins.

hang gebracht worden, da ja das Hemibilirubin durch Oxydation in «Urobilin» übergeht.

Die minimale Ausbeute erlaubte bis jetzt keine Analyse der krystallisierten Substanz. Jedoch unterzogen wir die aus der essigätherischen Lösung durch Ligroin ausgefällten flockigen Abscheidungen der N-Bestimmung. Der so erhaltene amorphe Körper ist orange gefärbt, gab noch die Aldehydreaktion intensiv, zeigte jedoch bereits den Urobilinstreifen. Die von Salkowski<sup>1)</sup> angegebene Biuretkation war ebenfalls intensiv positiv, ebenso die Fluoreszenzreaktion mit Zn-Salz. Das spektroskopische Verhalten stimmt auch mit dem des Urins überein, wie nicht anders zu erwarten war, ebenso erwies sich, was wieder entschieden für die Identität mit Hemibilirubin spricht, Übereinstimmung des spektroskopischen Befunds von Hemibilirubin aus Bilirubin bzw. der Zersetzungsprodukte dieses mit unserem Körper.

Für die N-Bestimmung wurde bei 100° und 20 mm Druck zur Konstanz getrocknet, wobei der Körper nicht schmolz, sondern lediglich sich etwas dunkler färbte. 0,1035 g Substanz gaben 7,3 ccm  $\frac{1}{10}$ -HCl entsprechend  $\text{NH}_3$ , hieraus berechnet sich ein N-Gehalt von 9,87%, während Hemibilirubin 9,65 verlangt.

Bei einer zweiten Darstellung, wobei von ca. 30 l Urin ausgegangen war, wurde auf analoge Weise ein gelbes Präparat von gleichen Eigenschaften gewonnen. Dieses gab bei der Analyse:

0,0860 g Substanz gaben 6,0 ccm  $\frac{1}{10}$ -HCl entsprechend  $\text{NH}_3$ , hieraus N-Gehalt = 9,77%.

Ob Hemibilirubin das einzige Urobilinogen ist, muß vorläufig dahingestellt bleiben. Wir müssen betonen, daß nach unserer Methode eo ipso nur ein geringer Teil der Aldehydreaktion gebenden Substanz zur Untersuchung gelangt. Warum nur ein Teil extrahiert wird, kann seine Begründung haben in dem oben geschilderten Verhalten des Rohhemibilirubins (s. Anmerkung), es kann jedoch auch daran liegen, daß das Urobilinogen durch Gallensäuren oder andere Substanzen in einer

<sup>1)</sup> Berl. klin. Wochenschrift, 1897, S. 353.

chemischen Verbindung steht, wodurch eine neutrale bezw. alkalische<sup>1)</sup> Ausschüttelung nicht möglich ist.

Wir haben unser Hauptaugenmerk natürlich auch auf die von Piloty entdeckten Blutfarbstoffderivate, insbesondere die Phonopyrrolcarbonsäure, gerichtet, zumal ihre Umsetzungsprodukte ein dem «Urobilin» spektroskopisch sehr ähnliches Verhalten zeigen

in ammoniakalischer Lösung	$\lambda = 501-459 \mu\mu$
in saurer Lösung	$\lambda = 496-460 \mu\mu$
nach Versetzung mit alkoholischer Zn-Salzlösung starke Fluorescenz	$\lambda = 505-499 \mu\mu$ .

Die Phonopyrrolcarbonsäure selbst aus Urin isolieren zu wollen, erscheint aussichtslos, weil sie nur in den sauren Extrakt geht. Als Anhaltspunkt gegen ihre Existenz als Urobilinogen kann der biologische Versuch dienen.

Versuch: 0,3 Phonopyrrolcarbonsäure wurden in  $\text{NH}_3$  gelöst und an der Luft bei intensivem Sonnenlicht abdunsten gelassen. Dies wurde 2—3 mal wiederholt, bis die Aldehydreaktion vollkommen verschwunden war. Es hinterbleibt ein grünrot schimmerndes Produkt. Ein kleiner Teil dieses wird mit Hilfe von Natriumbicarbonat in  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst, die tiefbraunrote Lösung wird mit ca. 300 ccm eines Fäulnisgemischs versetzt. Die Mischung gab, mit Alkohol gefällt, keine Aldehydreaktion. Sie blieb bei  $37^\circ \text{C}$ . im Brutschrank für einige Tage stehen, ohne daß im Verlauf von 5 Tagen bei täglicher Prüfung Aldehydreaktion aufgetreten wäre, dagegen war die Fluorescenzreaktion dauernd stark positiv.

Im Gegensatz hierzu ergab ein Versuch mit Hemibilirubin in gleicher Weise angestellt positives Resultat, indem nach 2 Tagen die Aldehydreaktion, die vorher negativ war, wieder intensiv auftrat mit dem typischen Streifen.

Da Hämopyrrol als Urobilinbildner nicht in Betracht kommt (s. I. Mitteilung), so haben wir also bis jetzt keinen direkten Anhaltspunkt für das Vorkommen anderer Pyrrol-derivate als Urobilinogen neben Hemibilirubin. Wir werden

<sup>1)</sup> Unsere mit Bicarbonat versetzten Urine reagierten stets schwach alkalisch, da das Handelsbicarbonat stets Soda enthält.

aber bemüht bleiben, Erfahrungen, die beim chemischen Abbau, insbesondere des Bilirubins, gewonnen werden, aufs biologische Gebiet zu übertragen.

Untersucht man Rückstände von Extrakten aus normalen Urinen (Aldehydreaktion in der Kälte negativ), die nach unserer Methode gewonnen worden sind, so zeigen diese nach ihrem Verhalten gegen Ehrlichs Reagens und spektroskopisch untersucht prinzipiell gleiches Verhalten, wie die pathologischen Urine, nur sind die auf diese Weise erhaltenen Substanzmengen so gering, daß vorläufig eine chemische Untersuchung nicht lohnend erscheint.

Fragen wir uns nun, ob unsere bis jetzt gewonnenen Resultate zur Frage der Entstehung der Urobilinurie beitragen, so glauben wir, daß das vorhandene Material darüber noch keine sicheren Schlüsse zuläßt. Jedenfalls aber scheint uns die Ursache der Urobilinurie auf keinen Fall allein durch eine Überladung des Darms mit Hemibilirubin bedingt zu sein. Wir haben zwar beim Menschen nach Einnahme von 0,1 g Hemibilirubin eine deutliche positive Aldehydreaktion im Harn auftreten sehen, jedoch war sie weit nicht so intensiv, wie im pathologischen Urin. Die gleiche Erfahrung machten wir beim Tier, bei dem ein Versuch sogar negativ ausfiel und erst positiv wurde, als das Hemibilirubin in Eigelb emulgiert gegeben wurde und auch jetzt war die Aldehydreaktion nicht sonderlich stark. Bedenkt man nun die ungeheure Farbkraft des Farbstoffs von Dimethylamidobenzaldehyd mit Hemibilirubin (s. später), so kann es sich immer nur um kleine Mengen handeln, die im Harn auftreten. Es erscheint uns daher immer noch am wahrscheinlichsten, daß die Urobilinurie bedingt ist durch einen Körper, der die Resorption des Urobilinogens aus dem Darm bedingt. Daß die Störung nicht bewirkt wird dadurch, daß das Urobilinogen unter pathologischen Umständen nicht von der Leber aufgesaugt wird, dagegen sprechen die subcutanen Versuche, bei denen unter normalen Verhältnissen Hemibilirubin leicht zur Ausscheidung gelangt. Daß bei der Urobilinurie noch mancherlei unbekannte Faktoren mitspielen können, geht auch aus folgender Beobachtung hervor. Man findet fast regelmäßig

nach Abklingen der Urobilinurie (gemessen durch die fast verschwundene Aldehydreaktion und fast negative Zn-Acetatprobe) im bicarbonatalkalischen Chloroformextrakt gerade mit die stärksten Aldehydproben. Es können folglich im Urin Stoffe zur Ausscheidung gelangen, die trotz Anwesenheit relativ reichlicher Mengen von Urobilinogen das Zustandekommen der Aldehydreaktion verhindern. Die Grundbedingung für das Studium der Verhältnisse im Urin ist also sicherlich die genaue Kenntnis des Mechanismus der Aldehydreaktion.

## II. Das Wesen der Ehrlichschen Aldehydreaktion.

1891 teilte Ehrlich<sup>1)</sup> mit, daß gewisse pathologische Urine mit Dimethylamidobenzaldehyd, in saurer Lösung versetzt, eine intensive Rotfärbung geben.

O. Neubauer<sup>2)</sup> stellte dann fest, daß das «Urobilinogen» des Urins die Ursache dieser Reaktion ist, und er beobachtete ferner, daß Hämopyrrol und Pyrrol selbst eine ähnliche Reaktion geben.

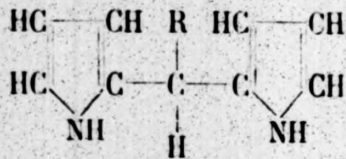
Der Mechanismus dieser Reaktion ist nun durchaus nicht der einfache, wie ihn die bisherigen Autoren annahmen, vielmehr entsteht bei dieser Reaktion zuerst ein farbloser Körper, der dann sekundär erst in den Farbstoff übergeht.

In der ersten Mitteilung konnten eine Reihe von Anhaltspunkten für diese Auffassung beigebracht werden und es wurde dort auf die Analogie der Feistschen Kondensationsprodukte von Pyrrolen und Aldehyden mit den Leukobasen der Triphenylmethanfarbstoffe hingewiesen bzw. darauf, daß die Feistschen Kondensationsprodukte bei der Oxydation in saurer Lösung Farbstoffe vom Typus der Triphenylmethanfarbstoffe geben mußten.

Feist hat, wie schon erwähnt, eine Reihe von Pyrrolderivaten mit Aldehyden kondensiert und ihre Konstitution als Dipyrrolylarylmethanderivate festgestellt.

<sup>1)</sup> Die med. Woche, 1901, Nr. 15.

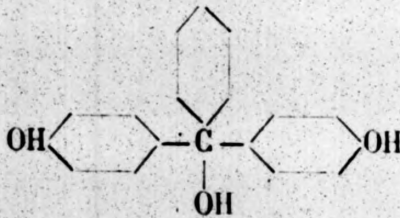
<sup>2)</sup> Sitzungsber. d. Gesellsch. f. Morphol. u. Physiol. in München, 1903.



Bei der Oxydation gehen diese Körper (wie Herr Prof. Feist auf eine diesbezügliche Anfrage an seinen Präparaten gütigst feststellte) in gefärbte Verbindungen über, jedoch treten die meisten dieser Färbungen erst beim Erwärmen auf und sind nicht ergiebig.

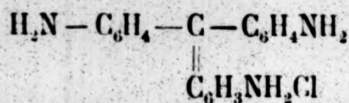
Es ist dieses Verhalten ganz entsprechend den Gesetzmäßigkeiten bei den Triphenylmethanfarbstoffen.

Die bei der Oxydation der Feistschen Körper entstehenden Farbstoffe entsprechen dem Typus der Aurine, da die NH-Gruppe des Pyrrols hier als auxochrome Gruppe wirkt. Die Farbstoffnatur kann nicht stark ausgeprägt sein, da nur 2 NH-Gruppen vorhanden sind. So besitzen auch die Salze des Benzaurins = 4,4-Dioxytriphenylcarbinol



nur noch schwach ausgeprägte Farbstoffeigenschaften, ganz entsprechend verhalten sich die Feistschen Produkte.

Es war nun zu erwarten, daß, wenn man Aldehyde zur Kondensation nahm, die in p-Stellung eine auxochrome Gruppe führen, Körper entstehen, die echte Farbstoffe vom Typus der Fuchsingruppe sind.



Aus diesen Gründen kondensierten wir zunächst Anisaldehyd  $\text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{OCH}_3 \cdot \text{CHO}$  (1,4) mit 2,5-Dimethylpyrrol-3-carbonsäureester, der ja schon Feist als Ausgangsmaterial für seine Untersuchungen gedient hatte. Die Kondensation führten wir entsprechend der Feistschen Vorschrift aus und erhielten das Präparat in schön krystallisiertem Zustande.



### Kondensation des 2,5-Dimethylpyrrol-3-carbonsäureesters mit Anisaldehyd.

5 g des Esters werden mit 5 g Anisaldehyd versetzt und die Mischung im Schwefelsäurebad erhitzt. Bei ca. 100° C. schmilzt die Masse vollkommen zusammen. Bei 110° C. werden 0,5 g feingepulvertes Kaliumbisulfat eingetragen. Unter häufigem Umschütteln erhitzt man weiter bis 140° C., wobei das Produkt sich dunkelrotbraun färbt. Man läßt erkalten, treibt den überschüssigen Anisaldehyd mit Wasserdampf ab und krystallisiert das zurückbleibende körnigkrystallinische Produkt aus Alkohol um. Das rein weiße und schön krystallisierte Präparat ist sehr beständig. Fp. 199—200° C. (korr.).

Es ist leicht löslich in Alkohol, fast unlöslich in Wasser, ziemlich leicht in Äther und Benzol, schwerlöslich in Petroläther.

Zur Analyse wurde bei 100° über Phosphorpentoxyd und 20 mm Druck zur Gewichtskonstanz getrocknet.

0,1653 g Substanz gaben 0,4159 g CO<sub>2</sub> und 0,1067 g H<sub>2</sub>O.

0,2205 g Substanz gaben 13,7 ccm N bei 25° und 721 mm Hg.

Berechnet für C <sub>26</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub> N <sub>2</sub> (452,28):	Gefunden:
C 68,99 %	68,62 %
H 7,13 %	7,22 %
N 6,20 %	6,65 %

Da auch dieses Kondensationsprodukt bei der Oxydation noch nicht einwandfrei die Merkmale des Analogons eines Triphenylmethanfarbstoffs bot, gingen wir auf die Kondensation mit Dimethylamidobenzaldehyd über, der ja nach den Farbenreaktionen der von uns untersuchten Pyrrole das geeignete Material sein mußte.

Die Kondensation des gleichen Pyrrolderivats mit p-Dimethylamidobenzaldehyd ergab mit Kaliumbisulfat ein nur unsicheres Resultat und minimale Ausbeuten. Wir haben deshalb zu seiner Darstellung ein anderes Verfahren ausgearbeitet, das zuerst an der schon ausgeführten Kondensation mit Anisaldehyd geprüft wurde.

2,0 g 2,5-Dimethylpyrrol-3-carbonsäureester werden mit

2.0 g Anisaldehyd in 35 ccm Alkohol am Rückflußkühler auf dem Wasserbad gelöst und in die heiße Lösung 1 ccm  $H_2SO_4$  eingetragen, die Lösung färbt sich sofort tiefdunkelrot. Reaktion sofort beendet. Die dunkelrote Flüssigkeit wird in ca. 200 ccm  $H_2O$  gegossen und mit NaOH schwach alkalisiert, wobei ein hellroter Niederschlag und ein Öl entsteht. Nach Verlauf einiger Stunden krystallisiert das Kondensationsprodukt noch mit Anisaldehyd verunreinigt aus. Zweimal aus Alkohol umkrystallisiert, zeigte es ebenfalls den Schmelzpunkt 199—200° C. Ausbeute 1,4 g.

Kondensation des 2,5-Dimethylpyrrol-3-carbonsäureesters mit p-Dimethylamidobenzaldehyd.

2,0 g des Esters wurden mit 4,0 g des Aldehyds in 30 ccm Alkohol am Rückflußkühler gelöst und 1 ccm  $H_2SO_4$  schnell eingetragen. Rotfärbung. Die noch heiße Lösung wird sofort in 200 ccm  $H_2O$  gegossen, es entsteht eine rötliche Färbung und nach einigen Minuten Stehen krystallisiert die größte Menge des nicht in Reaktion gegangenen Aldehyds aus. Es wird nach einigem Stehen abgesaugt, die Flüssigkeit mit NaOH bis zu kongonegativer, lackmussaurer Reaktion versetzt, wobei ein neuer, rötlicher Niederschlag, der jetzt aus dem Reaktionsprodukt und wenig Aldehyd besteht, sich abscheidet (Fraktion II). Von diesen wird wieder abgesaugt und die Flüssigkeit alkalisiert, wodurch als III. Fraktion fast reines Kondensationsprodukt zur Abscheidung kommt. Fraktion II und III aus Alkohol mehrmals umkrystallisiert, ergeben weiße Krystalle vom Fp. 239° C. Ausbeute 1,1 g. Das Produkt ist gegen O sehr empfindlich und zeigt schon nach einigem Stehen Rotfärbung. Es ist mäßig leicht in Alkohol, sehr schwer in Wasser, nur wenig in Äther, in Benzol und Petroläther schwer löslich.

Zur Analyse wurde bei 100° über Phosphorpentoxyd bei 20 mm Druck zur Konstanz getrocknet.

I. 0,1447 g Subst.	gaben 0,3660 g $CO_2$ und 0,1012 $H_2O$
0,1497 „ „	12,95 ccm N bei 21° C. und 720 mm Hg
II. 0,1637 „ „	0,4135 g $CO_2$ und 0,1147 $H_2O$
III. 0,1937 „ „	0,4895 „ $CO_2$ und 0,1354 $H_2O$ .

Berechnet für $C_{27}H_{35}N_3O_4$ :	Gefunden:		
	I.	II.	III.
C 69,63 %	68,98 %	68,90 %	68,92 %
H 7,58 %	7,83 %	7,84 %	7,82 %
N 9,03 %	9,38 %	—	—

Für die Analysen dienten Substanzen von 3 verschiedenen Darstellungen. Zu den letzteren beiden Darstellungen wurden die Ausgangsmaterialien aufs sorgfältigste gereinigt. Warum die C-Werte etwas zu niedrig sind, können wir nicht angeben.

Das Kondensationsprodukt des 2,5-Dimethylpyrrol-3-carbonsäureesters mit p-Dimethylamidobenzaldehyd haben wir zum Farbstoff oxydiert, um seine Eigenschaft näher zu studieren.

### Darstellung des Farbstoffs.

0,1 g des Leukofarbstoffs wurden in 5 ccm Alkohol gelöst und mit 3 ccm 10% iger Eisenchloridlösung versetzt. Zur Sicherheit wurde noch auf dem Wasserbad kurze Zeit erwärmt. Sofort tritt intensive Dunkelrotblaufärbung ein. Der Farbstoff wird aus der verdünnten wässrigen Lösung zweimal mit  $CHCl_3$  ausgeschüttelt. Danach gab Zusatz von neuem Eisenchlorid zum Ausgeschüttelten keine stärkere Rotfärbung mehr. Chloroform-extrakt zunächst auf dem Wasserbad eingeeengt, dann an der Luft vollkommen eingetrocknet. Es hinterbleibt ein harter, dunkelroter, im auffallenden Licht grünschimmernder, metallisch glänzender Farbstoff, der sehr leicht in Alkohol, Chloroform und auch in Wasser löslich ist. Mit  $H_2O$  verdünnt, zeigte er noch intensive Rotfärbung und folgendes Spektrum.

Konzentration 1 : 100 000, Schichtdicke 15 mm = 608—556  $\mu$   
 » 1 : 100 000, » 50 » = 620—506 »  
 » 1 : 10 000, » 10 » von 661 an rechte  
 Seite des Spektrums gelöscht.

Der Farbton und die Intensivität der Färbung entspricht ungefähr der des reinen Fuchsins. Spricht schon diese Intensivität der Färbung (die Intensivität der Triphenylmethanfarbstoffe übertrifft diejenige der Farbstoffe aller anderen Klassen bei weitem) für die Analogie mit der Konstitution der Triphenylmethanfarbstoffe, so wird dies zur Gewißheit unter Berück-

sichtigung der übrigen Eigenschaften, die dem Charakter nach mit dem des Säurefuchsin (Natriumsalz der Rosanilinsulfosäure) übereinstimmen. Gegen saure Reagenzien findet ein Umschlag der Farbe nicht statt, wohl aber bei der Einwirkung von Alkalien, besonders Natronlauge.

Beim Neutralisieren oder Ansäuern tritt die ursprüngliche Färbung wieder auf. Die Reduktion zur Farblosigkeit der Lösung mit Zinkstaub (schon in der Kälte) und die Reoxydation, teilweise schon an der Luft nach einiger Zeit, schneller beim Aufgießen der farblosen Reduktionslösung auf Papier, kurz alle damit vorgenommenen Reaktionen reihen den Farbstoff in die Gruppe der dem Triphenylcarbinol ähnlichem Körper ein.

Nach seinen Eigenschaften steht der neue Farbstoff zwischen der Rosolsäure und dem Rosanilin.



Dies Verhalten und auch speziell die Gleichheit der Reaktionen mit dem Säurefuchsin stimmen mit seiner Herkunft überein: es ist ein Säurefarbstoff (Carbonsäure), der Ähnlichkeiten sowohl mit dem Oxytriphenylcarbinol, als auch mit den Aminoprodukten (NH-Gruppe) zeigt.

Weiter haben wir Hemibilirubin mit p-Dimethylamidobenzaldehyd unter analogen Bedingungen kondensiert, um einen Begriff zu bekommen über die Menge des Farbstoffs, die man beim Versetzen von Urinen mit Ehrlichs Reagens erhalten kann.

#### Darstellung des Farbstoffs aus Hemibilirubin

##### + p-Dimethylamidobenzaldehyd.

0,5 g Rohhemibilirubin und 0,5 g Dimethylamidobenzaldehyd werden in 15 ccm absolutem Alkohol gelöst und in die heiße Lösung 0,5 ccm konzentrierte Schwefelsäure eingetropfelt. Sofort tritt intensive Violettfärbung auf. Nach Eingießen in kaltes Wasser und Abstumpfen der freien Säure fällt ein violettes Harz aus, von dem dekantiert wird. Durch Alkalischemachen mit Natronlauge (Farbenumschlag in Gelb) wird die Hauptmenge des Aldehyds abgeschieden, der Rest wird durch zwei-

maliges Ausschütteln mit Chloroform entfernt. In diesem Extrakt sind nur Spuren von Farbstoff enthalten.

Man säuert nun wieder an und extrahiert mit Chloroform. Der beim Abdunsten erhaltene Körper wurde mit Alkohol gelöst, mit Wasser verdünnt und mit wenig Eisenchlorid versetzt.

Durch Ausschütteln mit Chloroform wurde dann der Farbstoff gewonnen.

Auch dieser Farbstoff besitzt ungeheure Färbekraft. Eine Lösung 1 : 100 000 war noch stark gefärbt.

Spektroskopisch zeigt er zwei schön ausgeprägte Streifen in orange und grün.

Konzentration 1 : 100 000	Schichtdicke 15 mm	I. (schwach)	$\lambda = 588-566 \mu\mu$
		II. (stark)	$\lambda = 503-483 \mu\mu$
» 1 : 100 000	» 50	I.	$\lambda = 591-555 \mu\mu$
		II.	$\lambda = 506-480 \mu\mu$
» 1 : 10 000	» 10	I.	$\lambda = 628-554 \mu\mu$
		II.	$\lambda = 531-480 \mu\mu$
» 1 : 10 000	» 50	von $\lambda = 668 \mu\mu$ nach rechts vollkommene Verdunklung.	

Der Farbstoff, in Wasser schwer, in Säuren leichter mit violetter Farbe, in Alkalien spielend löslich mit bräunlichgelber Farbe reiht sich in seinen charakteristischen Reaktionen dem obigen Farbstoff an. Er ist eine rotviolette Farbsäure, die sehr alkaliempfindlich ist; schon mit verdünnter Soda oder Ammoniaklösung schlägt die violette Farbe in braungelb um. Im übrigen zeigt er ganz die analogen Reaktionen und Umschläge der Farblösungen wie der oben beschriebene Farbstoff.

Insbesondere vollzieht sich die Reduktion des violetten Farbstoffs zur Farblosigkeit (mit Zinkstaub neutral) und die Rückoxydierbarkeit ganz wie bei den Triphenylmethanfarbstoffen. Der rückoxydierte Farbstoff zeigt wieder die charakteristischen Eigenschaften des ursprünglichen Farbstoffs.

Der Hemibilirubinfarbstoff ist jedoch viel farbschwächer als der rote Farbstoff, wahrscheinlich, weil er noch Leukofarbstoff enthält.

Um diese Annahme zu prüfen, haben wir 0,05 g Hemibilirubin in wenig Ammoniak gelöst und die Lösung mit ausgekochtem  $H_2O$  auf 500 ccm gebracht.

Von dieser Stammlösung wurden Verdünnungen auf die Hälfte in fallender Reihe von 1 : 10000 bis 1 : 2560000 hergestellt und die auf gleiches Volumen gebrachten Verdünnungen mit  $\frac{1}{2}$  ccm Ehrlichs Reagens versetzt. Es zeigte sich noch schwache Rotfärbung bis zur Verdünnung 1 : 640000, in einer Stärke, die bei Verdünnung des dargestellten Farbstoffs schon bei 1 : 160000 eintrat. Dieses Verhalten weist darauf hin, daß der oben beschriebene Farbstoff noch Leukoprodukt in beträchtlicher Menge enthält. Außerdem ist natürlich auch möglich, daß die Kondensation mit  $H_2SO_4$  in alkoholischer Lösung partiell nach einer andern Richtung verläuft, wofür ja auch das verschiedene spektroskopische Verhalten spricht.

Spektroskopisches Verhalten der Lösungen des Farbstoffs aus dem angeführten Versuch.

Konzentration 1 : 10000.

Schichtdicke 10 mm  $\lambda = 626-532 \mu\mu$

15 »  $\lambda = 621-518 \mu\mu$

50 » ab 650  $\mu\mu$  Verdunklung.

Vergleicht man diese Angaben mit dem spektroskopischen Befund (S. 259), so ersieht man auch daraus, daß die Intensität der zuletzt angeführten Lösung eine wesentlich größere ist und ferner, daß «Streifen II» in dieser überhaupt nicht vorhanden ist (beide Lösungen ganz frisch untersucht).<sup>1)</sup>

Es wäre natürlich wünschenswert gewesen, den Leukofarbstoff aus Hemibilirubin und p-Dimethylamidobenzaldehyd in kristallisiertem Zustand darzustellen, um durch dessen Oxydation zum reinen Farbstoff zu gelangen, der ein absolutes Maß für den Urobilinogengehalt wäre. Leider ist jedoch das Material zurzeit noch zu wertvoll, um diese Versuche, die zweifellos größere Mengen Hemibilirubin erfordern würden, durchzuführen. Dieser Umstand macht gleichzeitig die Ver-

<sup>1)</sup> Die gleichen Verdünnungen wurden mit derselben Menge Zn-Acetat in alkohol. Lösung zur Prüfung auf Fluorescenz versetzt. Nach längerem Stehen in der Sonne zeigte sich Fluorescenz noch deutlich in der Verdünnung 1 : 1280000. angedeutet war sie noch bei 1 : 2560000.

Interessant ist, daß für das «Urobilin» des Harns die Empfindlichkeitsgrenze nur zu 1 : 50000 von Schlesinger gefunden wurde.

wendung der Aldehydreaktion des Urins zu einer quantitativen Urobilinogenbestimmung unmöglich. Abgesehen davon hätte diese zur Voraussetzung eine Methode, die gestattet, dem Urin das gesamte Urobilinogen in reiner Lösung zu entziehen. Mit unserer Methode der Chloroformausschüttlung des mit Natriumbicarbonat versetzten Urins, die zweifellos an und für sich das bis jetzt einwandfreiste (übrigens noch verbesserungsfähige<sup>1)</sup>) Verfahren darstellt, wird also dem Urin sicherlich nur ein Bruchteil des Gesamturobilinogens entzogen (vgl. oben). Sollte jedoch dieser zum Gesamtgehalt in einem konstanten Verhältnis stehen, so wäre nach Erfüllung der ersten Bedingung eine quantitative Bestimmung auf diesem Wege ausführbar.

Zum Schluß fassen wir die Hauptergebnisse der vorliegenden Untersuchung kurz zusammen:

1. Urobilinogen wurde aus pathologischem Urin in krystallisiertem Zustand dargestellt und mit Hemibilirubin identifiziert.

2. Nicht stabile Pyrrole, zu denen die bis jetzt bekannten krystallisierten Blutfarbstoffderivate und sämtliche bekannten Gallenfarbstoffderivate gehören, gehen bei der Zersetzung im Reagenzrohr sowohl als im Organismus nach den klinischen Proben in Urobilin über.

3. Als nicht stabil erwiesen sich alle von uns untersuchten Pyrrole, die ein an einem Ring-C-Atom nicht substituiertes H-Atom besitzen.

4. Alle diese nicht stabilen Pyrrole geben die Ehrlichsche Reaktion mit p-Dimethylamidobenzaldehyd.

5. Nach Einführung körperfremder Substanzen in den Organismus beweist der positive Ausfall der klinischen Urobilinogen- und Urobilinproben nichts für das Vorliegen von «Urobilinogen» und «Urobilin».

6. Auch bei negativem Ausfall der Aldehydreaktion kann doch «Urobilinogen» in beträchtlicher Menge im Urin vorhanden sein.

7. Der der Ehrlichschen Aldehydreaktion zugrunde liegende Farbstoff ist ein Dipyrrolyphenylmethanfarbstoff, der sekundär aus der zugehörigen Leukobase hervorgeht.

<sup>1)</sup> vgl. Anmerkung S. 249.