

Zur Kenntnis der Gallenfarbstoffe.

IV. Mitteilung.

Von

Hans Fischer und Heinrich Röse.

(Aus der II. med. Klinik zu München.)

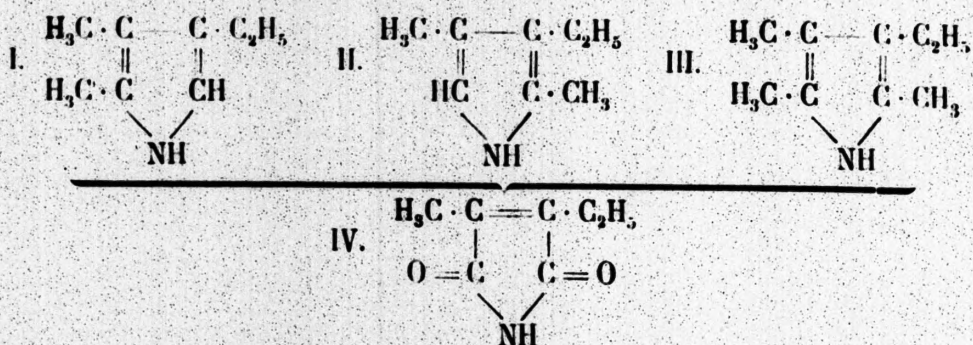
(Der Redaktion zugegangen am 20. Oktober 1912.)

Durch zahlreiche biologische Experimente erscheint es sehr wahrscheinlich, daß der Gallenfarbstoff aus dem Blutfarbstoff entsteht. Diese Umwandlung erfolgt in der Leber unter Abspaltung des Eisens. In welcher Weise diese Umwandlung erfolgt, darüber sind wir noch nicht orientiert. Um hierüber Klarheit zu schaffen, muß zuerst die vergleichende Chemie der beiden Farbstoffe abgeschlossen sein.

Küster hat zuerst Blut- und Gallenfarbstoff in chemischen Zusammenhang gebracht durch Gewinnung der Hämätinsäure aus beiden Farbstoffen. H. Fischer und P. Meyer ist es dann gelungen, auch Methyläthylmaleinimid nach erfolgter Reduktion des Bilirubins mit Natriumamalgam durch Oxydation zu erhalten. Dieser Befund war ein prinzipieller Fortschritt, da hierdurch bewiesen war, daß im Bilirubin mindestens zwei verschiedene Pyrrolkerne vorhanden sind. (Die Bedeutung dieses Befundes haben Piloty und Thannhauser¹⁾ offenbar nicht erfaßt, denn sie erwähnen ihn überhaupt nicht.)

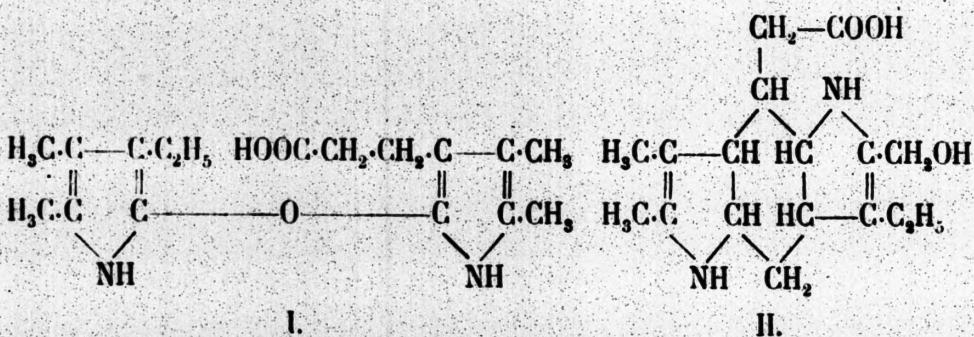
Methyläthylmaleinimid (IV) entsteht durch Oxydation aus Hämopyrrol (I), Kryptopyrrol (II) und, wie wir neuerdings gefunden haben, auch aus Phyllopyrrol (III), aus letzterem allerdings nur in sehr bescheidener Ausbeute.

¹⁾ Liebigs Annalen, Bd. 390, S. 191.



Bei im Prinzip gleicher Konstitution von Blut- und Gallenfarbstoff wäre daher zu erwarten, daß bei der Reduktion des Bilirubins unter den gleichen Bedingungen wie beim Hämin auch wenigstens einer dieser Körper auftreten sollte, dies ist aber nicht¹⁾ der Fall, wie schon in der I. Mitteilung über Gallenfarbstoff²⁾ festgestellt wurde.

Wir haben die Eisessigjodwasserstoff-Reduktion des Bilirubins weiter verfolgt und zwei neue Spaltprodukte gefunden, die Bilirubinsäure und eine der Phonopyrrolcarbonsäure isomere Säure.³⁾ Beide Säuren sind auch von Piloty und Thannhauser (l. c.) beobachtet worden. Für die Bilirubinsäure haben wir Formel I aufgestellt, während Piloty und Thannhauser Formel II diskutieren.

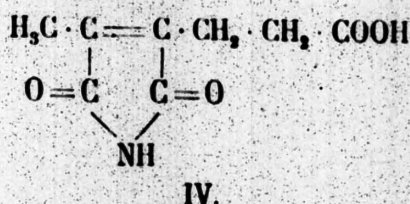
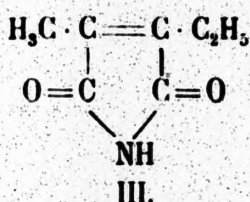


Bei der Oxydation erhält man aus der Bilirubinsäure Methyläthylmaleinimid (III) und Hämatinsäure (IV),

¹⁾ Unter abgeänderten Bedingungen, nämlich Kochen mit Eisessigjodwasserstoff durch 14—16 Stunden, dagegen ist es uns gelungen, das von Fischer und Bartholomäus im Hämin entdeckte Kryptopyrrol zu fassen.

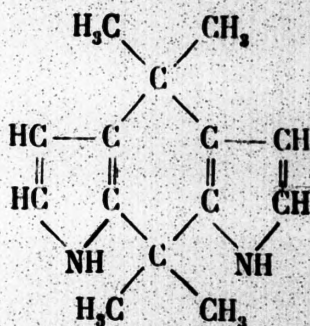
²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 73, S. 226.

³⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. 45, S. 1579, und Bd. 45, S. 1985.



ein Befund, dem beide Formeln gerecht werden.

Uns erscheint die Pilotysche Formel nicht wahrscheinlich, da es uns ausgeschlossen erscheint, daß eine alkoholische Hydroxylgruppe der Seitenkette gegen Eisessigjodwasserstoff beständig ist (vgl. Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. 45, S. 1580), auch haben wir gefunden, daß Pyrrole die durch Kohlenstoffatome verknüpft sind, wie z. B. die Feistschen¹⁾ Dipyrrolyphenylmethane, hinfällig sind gegen Eisessigjodwasserstoff. Weiterhin haben wir das von A. Baeyer²⁾ beobachtete Kondensationsprodukt aus Aceton und Pyrrol, dem wohl unzweifelhaft folgende Konstitution zukommt



einerseits durch Eisessigjodwasserstoff zwar nur teilweise zerlegt, während andererseits dagegen beim Erhitzen mit Natrium-methylat glatt Aufspaltung unter Bildung von Tetramethylpyrrol eintritt.

Wir haben die Bilirubinsäure auch mit Methylat erhitzt und haben bis jetzt kein Phyllopyrrol erhalten, sind aber auf einen neuen, schön krystallisierenden Körper gestoßen, dessen Untersuchung noch nicht abgeschlossen ist. Wir bitten, uns diese ungestört zu überlassen.

Dagegen sind wir der Ansicht, daß im Blutfarbstoff die Pyrrole durch CH_2 -Gruppen in α -Stellung miteinander verknüpft sind. In Gemeinschaft mit Bartholomäus hat der

¹⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. 35, S. 1647.

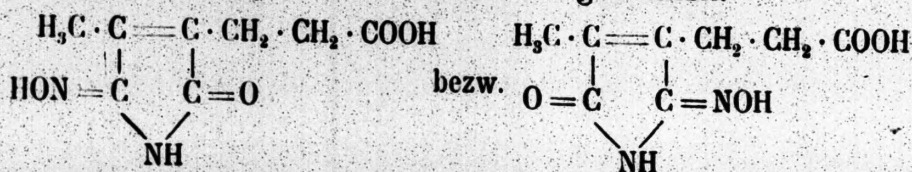
²⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. 19, S. 2184.

eine von uns experimentelles Material für diese Anschauung gewonnen, indem es geglückt ist, Derivate alkylierter Pyrrole zu erhalten, die nach ihrer Entstehung als Methylenverbindungen angesehen werden müssen und bei der Reduktion mit Eisessigjodwasserstoff zerfallen unter Bildung eines um eine Methylgruppe reicheren Pyrrols. So erhielten wir aus der vermutlichen Methylenverbindung des Kryptopyrrols Phyllopyrrol, des Trimethylpyrrols Tetramethylpyrrol. Die ausführliche Mitteilung über diese neue Synthese alkylierter Pyrrole erfolgt bald.

Natürlich sind alle diese Versuche nicht ausreichend, um definitiv im Sinne der Pilotyschen oder unserer Formel zu entscheiden, aber jedenfalls ist das eine sicher, daß im Gegensatz zur Ansicht von Piloty ein prinzipieller Unterschied in der Bindung des Blut- und Gallenfarbstoffs bestehen muß, und dieser Hauptforderung wird die Pilotysche Formel nicht gerecht.

Für den mit der Materie weniger Vertrauten möchten wir noch hervorheben, daß der Blutfarbstoff bei der Behandlung mit Eisessigjodwasserstoff unter den Bedingungen, die das Entstehen der Bilirubinsäure aus Bilirubin garantieren, so gut wie quantitativ¹⁾ in seine Bausteine zerfällt, nämlich die drei Basen und die beiden Phonopyrrolcarbonsäuren.

Wir haben dann weiterhin Bilirubin nach erfolgter Reduktion mit Natriumamalgam in saurer Lösung mit salpetriger Säure oxydiert und dabei Methyläthylmaleinimid in relativ guter Ausbeute und daneben das Oxim der Phonopyrrolcarbonsäure erhalten. Ebenso gelang es uns, aus der Mutterlauge der isomeren Phonopyrrolcarbonsäure (isoliert als Pikrat) das Oxim der Phonopyrrolcarbonsäure zu gewinnen.



Bietet der Befund des Imids nichts Überraschendes, so erscheint uns der des Oxims der Phonopyrrolcarbonsäure von besonderer Bedeutung, weil hiermit die Existenz eines dritten Pyrrolringes im Bilirubin wahrscheinlich ist; denn die isomere

¹⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. 45, S. 1921 und 1981.

Phonopyrrolcarbonsäure aus Bilirubin gibt nicht das Oxim der Phonopyrrolcarbonsäure bei der Behandlung mit salpetriger Säure, sondern ein von diesem verschiedenes Oxim. Es bleibt aber der Einwand, daß durch die Reduktion mit Jodwasserstoffsäure die Konfiguration der Pyrrolsäure geändert würde derart, daß jetzt nach erfolgter Reduktion zwar die isomere Phonopyrrolcarbonsäure entsteht, vorher aber die Einwirkung der salpetrigen Säure auf die im Verband befindliche Säure so erfolgt, daß das Oxim der Phonopyrrolcarbonsäure entstünde.

Auch die Bilirubinsäure haben wir dem Abbau durch salpetrige Säure unterworfen und hier neben Methyläthylmaleinimid ein Gemisch von Oximen erhalten, in dem sehr wahrscheinlich das der Phonopyrrolcarbonsäure mit einem des Methyläthylmaleinimids vorhanden ist. Mangel an Material zwingt uns, diesen wichtigen Befund vorläufig nicht weiter zu verfolgen; wir werden jedoch die Untersuchung bald wieder aufnehmen.

Was nun das Verhältnis von Hemibilirubin und Körper II zu Bilirubin anlangt, so sind die experimentellen Daten noch nicht so eindeutig, um völlig klar zu sehen. Die Ausbeute an Hemibilirubin haben wir bis auf 62% steigern können; bei der Reduktion geben Hemibilirubin, Körper II und Bilirubin die gleichen Spaltprodukte. Bei der Oxydation verhalten sich Körper II und Hemibilirubin gleich, während beim Bilirubin das Methyläthylmaleinimid fehlt. An dessen Stelle tritt bei der Oxydation mit salpetriger Säure eine andere Substanz in beträchtlicher Menge auf, die jedoch sicher kein Methyläthylmaleinimid ist.

So sprechen eigentlich alle Befunde dafür, daß das Hemibilirubin ein einfaches Reduktionsprodukt des Bilirubins ist, und dem Bilirubin dann auch das Molekulargewicht 600 zukäme. Leider ist die direkte Bestimmung des Molekulargewichts des Bilirubins noch nicht geglückt und die analytische Zusammensetzung des Hemibilirubins paßt auf C_{33} , die des Bilirubins auf C_{32} . Allerdings können wir einige Bedenken gegen die Reinheit des Bilirubins nicht unterdrücken. Es wäre denkbar, daß durch die lange Behandlung mit Chloroform letzteres partiell

eintritt ins Molekül unter Erweiterung des Pyrrolringes, eine Reaktion, die ja bei den Pyrrolen sehr wohl bekannt ist.¹⁾

Küster hat zwar Bilirubin direkt mit Dimethylanilin aus zweckentsprechend vorbehandelten Gallensteinen ausgezogen und analysiert, aber bei dem hohen Siedepunkt des Lösungsmittels, der schwierigen Entfernbareit des Dimethylanilins und der leichten Oxydierbarkeit des Bilirubins sind sekundäre Veränderungen denkbar. Endlich ist zu bedenken, daß die analytischen Differenzen zwischen C_{32} und C_{33} keine sehr großen sind. Wir haben deshalb auf weitere Analysen verzichtet, weil wir glauben, daß diese Fragen schneller und sicherer durch das weitere Studium des chemischen Abbaues gefördert werden.

Um jeden Zweifel an der Verschiedenheit des Hemibilirubins und der Bilirubinsäure, die vielleicht dem einen oder anderen²⁾ bei der Lektüre der Piloty-Thannhauserschen Arbeit (l. c.) aufkommen könnten, entgegen zu treten, haben wir die Molekulargewichtsbestimmung des Hemibilirubins wiederholt und die alten Bestimmungen bestätigt gefunden. Weiterhin wurde nach unserer Methode aus dem mit Natriumamalgam reduzierten Bilirubin, nach Auskuppelung des Hemibilirubins, Bilirubinsäure zu isolieren versucht, aber ohne Erfolg. Ferner gab der Mischschmelzpunkt von Hemibilirubin und Bilirubinsäure eine Depression.

Bei dem großen Schmelzpunktsunterschied zwischen der krystallisierten, nicht aciden und der nicht krystallisierten, aciden Form des Hemibilirubins wäre es denkbar, daß letztere bedingt sei durch Beimengung einer Pyrrolsäure, auf die wir allerdings schon früher ohne Erfolg gefahndet haben. Um nun zu sehen, ob ein Gemisch von Hemibilirubin und einer Pyrrolsäure trennbar sei, haben wir es mit Phonopyrrolcarbonsäure gemischt und beide mittels der «Bicarbonatmethode» glatt trennen können; gleichzeitig ein schönes Beispiel für den

¹⁾ Vgl. Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. 15, S. 1172; Bd. 18, S. 721.

²⁾ So z. B. schreibt der Referent des Zentralblattes f. d. ges. i. Med., Bd. 3, S. 182, im Referat über die Pilotysche Arbeit: «Die Bilinsäure scheint mit dem von Fischer und Meyer beschriebenen Hemibilirubin nicht identisch zu sein.»

Aciditätsunterschied zwischen Hemibilirubin und der genannten Pyrrolsäure.

Zum Schluß möchten wir noch ganz kurz eine interessante Beobachtung erwähnen, die zwar direkt mit Bilirubin nichts zu tun hat. Beim Arbeiten mit der Phonopyrrolcarbonsäure fiel uns die Dunkelfärbung auf, die die Fingerhaut kurz nach dem Benetzen mit dieser Säure annimmt. Diese Erscheinung brachte uns auf den Gedanken, ob nicht die beim Schälen der Nüsse entstehende Braunfärbung der Hände eine ähnliche Ursache hat, und wir konstatierten, daß nicht nur das alkoholische Extrakt der Nüsse, sondern auch das unreifer Kastanien, Birnenkerne und anderer Pflanzenprodukte eine intensive Reaktion mit Dimethylamidobenzaldehyd (Pyrrolreaktion) mit dem typischen Spektrum gibt. Es scheint, als ob auch hier die Farbstoffe, vielleicht auch das Chlorophyll selbst, ähnlich wie das Urobilin aus Hemibilirubin, sekundär erst aus der «Pyrrolleukobase» entstehen.

Reduktion von Bilirubin mit Eisessig-Jodwasserstoff.

a) Isolierung von Bilirubinsäure.

5 g Bilirubin werden mit 100 ccm Eisessig und 50 ccm Jodwasserstoffsäure (spez. Gew. 1,96) übergossen und im siedenden Wasserbade unter häufigem Umschütteln etwa eine Stunde erhitzt. Nach dieser Zeit wird das freigewordene Jod mit ca. 3—4 g Jodphosphonium reduziert. Der Eisessig-Jodwasserstoff wird im Vakuum im siedenden Wasserbade abdestilliert. (Das Destillat kann von neuem zur Reduktion dienen.) Man versetzt den Rückstand mit wenig Wasser. Unter Umschwenken geht er langsam in Lösung. Unter weiterem Schütteln fügt man dann mehr Wasser zu, bis auf weiteren Zusatz keine Fällung mehr entsteht. Von dem zusammengeballten schmierigen Körper gießt man ab und gibt zu der Lösung solange Natronlauge tropfenweise zu, bis die Kongoreaktion eben noch angedeutet ist. Dann wird 6 mal ausgeäthert.

Die eben erwähnten Schmierer löst man in Sodalösung auf und säuert diese mit Schwefelsäure an. Nach der Filtration wird auch diese Lösung einige Male ausgeäthert. Die ver-

einigten Ätherauszüge werden dann mit 0,8 g Diazobenzolsulfosäure gelöst in 100 ccm Wasser ausgeschüttelt. Alsdann ist die Aldehydreaktion verschwunden, widrigenfalls gibt man mehr Diazobenzolsulfosäure zu. Man dampft nun schnell im Vakuum ein. Der Rückstand krystallisiert manchmal sofort, wenn nicht, so gibt man wenig Äther zu, worin er sich auflöst; nach kurzer Zeit krystallisiert dann die Bilirubinsäure in feinen hellgelben Blättchen aus. Die Ausbeute beträgt etwa 0,95 g.

b) Gleichzeitige Isolierung von Bilirubinsäure und isomerer Phonopyrrolcarbonsäure.

Auf die obige Weise werden 5 g Bilirubin mit 100 ccm Eisessig und 50 ccm Jodwasserstoffsäure reduziert und das ausgeschiedene Jod mit Jodphosphonium entfernt.

Sodann verdünnt man mit dem doppelten Volumen Wasser, neutralisiert unter Kühlung solange mit konzentrierter Natronlauge, bis die Flüssigkeit eben noch auf Kongopapier unter schwärzlicher Verfärbung einwirkt, und äthert 6—7mal aus. Der Ätherextrakt wird 9—10mal mit je 10 ccm 10%iger Schwefelsäure ausgeschüttelt, einmal mit Wasser gewaschen und mit Diazobenzolsulfosäure (0,35 g) ausgekuppelt. Nach dem Eindampfen wird der Rückstand mit Chloroform aufgenommen und die Lösung mit Petroläther verdünnt. Es krystallisieren 0,9 g Bilirubinsäure vom Schmelzpunkt 178° aus.

Die schwefelsaure Lösung wird mit Soda bis zur schwach sauren Reaktion gegen Kongopapier abgestumpft, 6mal ausgeäthert, der Äther im Vakuum eingedunstet und der Rückstand mit 0,7 g Pikrinsäure in 5 ccm Alkohol versetzt. Beim Stehen in Eis scheiden sich 0,3 g Pikrat der isomeren Phonopyrrolcarbonsäure aus. Der Schmelzpunkt der aus Alkohol umkrystallisierten Substanz liegt bei 153° , der Mischschmelzpunkt mit Phonopyrrolcarbonsäurepikrat bei 145° , also eine Depression von 8° . Die Analysen und sonstigen Daten finden sich in den Berichten der Chemischen Gesellschaft, Bd. 45, S. 1985, ebenso die der Bilirubinsäure (Seite 1580).

Aus der Pikratmutterlauge lassen sich durch Zerlegen mit 25%iger Salzsäure nur Spuren von Bilirubinsäure gewinnen.

Aus Hemibilirubin entsteht auf dieselbe Weise Bilirubinsäure und die isomere Phonopyrrolcarbonsäure, welche als Pikrat gefaßt und nach dem Trocknen über Phosphorpentoxyd im Vakuum analysiert wurde.

0,0920 g Substanz gaben 12,0 ccm N bei 18° u. 717 mm Hg.

$C_{15}H_{16}O_9N_4$ Berechnet: 14,14. Gefunden: 14,25.

Reduktion von Körper II.

5 g Körper II wurden mit Eisessig-Jodwasserstoffsäure im siedenden Wasserbade $1\frac{1}{4}$ Stunde erhitzt, das ausgeschiedene Jod mit Jodphosphonium reduziert und das Säuregemisch im Vakuum bei ca. 100° abdestilliert. Der Rückstand wurde in Soda aufgenommen und die Lösung mit Schwefelsäure angesäuert. Von der ausgeschiedenen Schmiere wurde abgegossen und die Flüssigkeit 6 mal mit Äther ausgeschüttelt. Nach dem Abdestillieren desselben versetzte man den Rückstand mit 0,7 g Pikrinsäure in 5 ccm Alkohol. Beim Reiben und Stehenlassen in Eis schieden sich 0,2 g Pikrat aus, das aus 2 ccm Alkohol umkrystallisiert wurde. Schmelzpunkt 148—149°. Der Mischschmelzpunkt mit dem Pikrat aus Bilirubin war derselbe.

0,0965 g Substanz gaben 12,7 ccm N bei 20° u. 722 mm Hg.

$C_{15}H_{16}O_9N_4$ Berechnet: 14,14. Gefunden: 14,34.

Die Mutterlauge vom Pikrat wird mit Äther verdünnt, durch zweimaliges Ausschütteln mit Wasser der Alkohol entfernt, und mit 50%iger Schwefelsäure 3 mal geschüttelt. Die schwefelsaure Lösung wird nach dem Verdünnen mit dem $1\frac{1}{2}$ fachen Volumen Wasser mit Nitrit oxydiert und ausgeäthert. Nach dem Verdunsten des Äthers hinterbleibt eine krystallinische Masse in einem Sirup eingebettet. Durch Behandlung mit Äther gelingt es leicht, den Sirup zu entfernen, der in der üblichen Weise durch Behandlung mit Soda usw. auf Methyläthylmaleinimid verarbeitet wurde. Ausbeute an reinem krystallisiertem Material 0,05 g. Die oben erwähnte Krystallisation glich in ihrem ganzen Habitus und Eigenschaften dem Oxim der Phonopyrrolcarbonsäure. Nach einmaligem Umkrystallisieren aus Wasser wurde der Schmelzpunkt 238—239°

erreicht; der Mischschmelzpunkt mit reinem Phonopyrrolcarbon-säureoxim gab keine Depression (237°).

Reduktion des Baeyerschen Acetonpyrrols.

1 g des nach Baeyer¹⁾ hergestellten Produktes aus Aceton und Pyrrol wurde mit 20 ccm Eisessig und 10 ccm Jodwasserstoffsäure $1\frac{1}{4}$ Stunde im siedenden Wasserbade erhitzt, und das ausgeschiedene Jod mit Jodphosphonium reduziert. Nach dem Verdünnen mit Wasser wurde sodaalkalisch gemacht und mit Wasserdampf destilliert. Es ging in geringer Menge ein nach Pyrrol riechendes Öl über, das nicht weiter untersucht wurde.

Tetramethylpyrrol aus dem Baeyerschen Acetonprodukt.

In 20 ccm Methylalkohol (Kahlbaum) wurden 1,4 g Natrium gelöst, zu dieser Lösung 1 g Acetonpyrrol gegeben und im zugeschmolzenen Rohr auf $220-230^{\circ}$ erhitzt. Der Inhalt von vier solchen Röhren wurde in einen Kolben gespült und der Destillation mit Dampf unterworfen. Schon im Kühler krystallisiert das Tetramethylpyrrol in farblosen Blättchen aus. Das Destillat wurde kurze Zeit mit Eis gekühlt und die ausgeschiedenen Krystalle abgesaugt (noch feucht 1 g). Sie werden mit einer Lösung von 1 g Pikrinsäure in 20 ccm feuchtem Äther versetzt und kräftig umgeschüttelt. Sofort schieden sich hellgelbe Nadelchen des Pikrates aus, die aus siedendem Alkohol umkrystallisiert wurden. Schmelzpunkt 130° . Die Ausbeute betrug 1,6 g. Die Aldehydreaktion war negativ, kein Azofarbstoff. Die Substanz wurde im Vakuum über Phosphorpentoxyd getrocknet.

0,2057 g Substanz gaben 31,2 ccm N bei 22° u. 712 mm Hg.

$C_{14}H_{16}O_7N_4$ Berechnet: 15,91 Gefunden: 16,16.

Der Versuch, durch Behandeln von Pyrrol mit Methylat ebenfalls zum Tetramethylpyrrol zu gelangen, schlug fehl, selbst beim Steigern der Temperatur auf 240° . Der Röhreninhalt roch schwach nach Ammoniak.

¹⁾ l. c.

**Reduktion des Kondensationsproduktes aus Benzaldehyd und
2,4-Dimethylpyrrol-3-carbonsäureäthylester.¹⁾**

5 g des Körpers wurden mit 100 ccm Eisessig und 50 ccm Jodwasserstoffsäure 1 $\frac{1}{4}$ Stunde im siedenden Wasserbade erhitzt und das Jod mit Jodphosphonium reduziert. Nach dem Verdünnen mit Wasser wurde sodaalkalisch gemacht und mit Dampf destilliert. Es ging ein die Aldehydreaktion gebendes Öl über, das mit Äther aufgenommen wurde. Die Ätherlösung wurde mit 40 ccm feuchtätherischer Pikrinsäure im Vakuum eingedampft. Der krystallisierte Rückstand wurde in 20 ccm heißem Alkohol gelöst und filtriert. Beim Stehen in Eis schied sich das Pikrat von 2,4-Dimethylpyrrol aus, das den richtigen Schmelzpunkt 90—91° zeigte. Zur Analyse wurde im Vakuum über P₂O₅ bei gewöhnlicher Temperatur getrocknet.

0,1992 g Substanz gaben 31,6 ccm N bei 19° u. 723 mm Hg.

C₁₂H₁₂O₇N₄ Berechnet: 17,29. Gefunden: 17,40.

Oxydation des mit Amalgam reduzierten Bilirubins.

Bilirubin wurde in alkalischer Lösung mit Natriumamalgam reduziert und die Lösung in konzentrierte Salzsäure gegossen. Hierbei trat vollständige Lösung ein, während bei Anwendung von 50%iger Schwefelsäure sich das Reaktionsprodukt ausschied. Die salzsaure Lösung wurde dann mit Nitrit oxydiert.

5 g Bilirubin werden mit 40 ccm ⁿ/₁₀-Natronlauge und 20 ccm Wasser tüchtig durchmischt und dann mit 70 g 3%igem Natriumamalgam 1 Stunde, zu Anfang unter Kühlung, später bei gewöhnlicher Temperatur, geschüttelt. Die fast wasserhelle Lösung läßt man in die doppelte Menge konzentrierter Salzsäure einlaufen, worin sie sich glatt auflöst, nur Kochsalz scheidet sich ab. Bei ca. 50° gibt man nun langsam Nitrit zu. Die Flüssigkeit färbt sich dabei zunächst dunkel, hellt sich aber beim weiteren Zusatz von Nitrit wieder auf. Die Oxydation ist beendet, wenn sich die Farbe nicht mehr ändert. Die so oxydierten Lösungen werden zusammen 6 mal mit Äther ausgeschüttelt. Die ätherische Lösung zieht man 3 mal mit Soda

¹⁾ Feist, Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. 35, S. 1647.

aus. Beim Verdunsten des Äthers hinterbleibt ein Öl, das bald erstarrt. Ausbeute 0,9 g. Die Krystalle sind noch von einer Schmiere begleitet. Um sie hiervon zu reinigen, wurden sie der Destillation im Vakuum unterworfen. Bei 150° Badtemperatur ging ein farbloses Öl über, das in der Vorlage zu rein weißen Krystallen erstarrte. Aus Wasser und wenig Alkohol wurden farblose Nadeln erhalten, die in all ihren Eigenschaften mit Methyläthylmaleinimid übereinstimmten. Schmelzpunkt 67 bis 68°.

0,1674 g Substanz gaben 15,4 ccm N bei 18° u. 719 mm Hg.

$C_7H_9O_2N$ Berechnet: 10,07. Gefunden: 10,08.

Die oben erhaltene Sodalösung wurde angesäuert und mit Äther ausgeschüttelt. Beim Verdunsten desselben hinterblieb ein Rückstand, der teilweise in zu Kugeln vereinigten Gebilden krystallisierte. Der nebenher ausgeschiedene Sirup war in Äther löslich und ließ sich so von den Krystallen trennen.

Die schon ausgeätherte salzsaure Oxydationsmutterlauge wurde über Nacht nochmals im Extraktionsapparat mit Äther ausgezogen. Nach dem Verdunsten des letzteren konnte noch eine kleine Menge der Krystalle erhalten werden, die mit den andern vereinigt wurden. Die Gesamtausbeute betrug etwa 0,1 g. Der Versuch wurde noch 2 mal mit dem gleichen Resultat wiederholt. Aus Wasser umkrystallisiert schmolz die Substanz bei 235°. Der Mischschmelzpunkt mit dem Oxim aus der Phonopyrrolcarbonsäure (Sm. 247°) lag bei 240°. Mit dem aus der isomeren Phonopyrrolcarbonsäure bei 207—208°.

Es lag also das Oxim der Phonopyrrolcarbonsäure vor.

0,1240 g Substanz gaben 15,7 ccm N bei 17° u. 719 mm Hg.

$C_8H_{10}O_4N_2$ Ber.: 14,14. Gef.: 13,92.

Der vorher erwähnte Sirup, der die Hauptmenge der Reaktionsprodukte ausmachte, konnte bisher noch nicht untersucht werden, da er sehr langsam krystallisierte.

Oxydation von Hemibilirubin mit Nitrit.

Die Oxydation von Hemibilirubin wurde in ähnlicher Weise ausgeführt. Auch hierbei konnten wir das Oxim der Phonopyrrolcarbonsäure fassen.

Oxydation von Bilirubin mit Nitrit.

Bilirubin wurde in ähnlicher Weise zu oxydieren versucht; dabei trat das von der Gmelinschen Farbenreaktion her bekannte Farbenspiel in schöner Weise auf unter schließlicher Abscheidung eines violetten Niederschlags. Von diesem wurde abgesaugt und das Filtrat in der oben beschriebenen Weise verarbeitet. Es scheint auch hier das Oxim der Phonopyrrolcarbonsäure aufzutreten, die Ausbeute war jedoch so gering, daß wir uns nicht entschließen konnten, größere Mengen des kostbaren Materials zu opfern. Die «Imidfraktion» war relativ beträchtlich, doch konnte trotz vieler Mühe das so leicht erkennbare Methyläthylmaleinimid nicht aufgefunden werden.

Oxydation von Bilirubinsäure mit Nitrit.

1 g Bilirubinsäure wurde in 20 ccm 50%iger Schwefelsäure gelöst. Hierbei tritt zum Unterschiede vom Hemibilirubin glatte Lösung ein. Man verdünnt mit 30 ccm Wasser und oxydiert bei 50° mit Natriumnitrit. Von einer Spur Ausflockung wird abfiltriert, das Filtrat ausgeäthert und der Äther zweimal mit 10%iger Bicarbonatlösung ausgeschüttelt. Der Äther hinterläßt beim Abdunsten ein Öl, das bald zu Krystallen von Methyläthylmaleinimid erstarrt (0,1 g).

Die Bicarbonatlösung wird angesäuert und mit Äther ausgeschüttelt. Der Rückstand krystallisiert in kugeligen Gebilden. Er wird mit Äther ausgewaschen, wodurch ein dickflüssiger Sirup (wahrscheinlich Hämatinsäure) heraus gelöst wird. Die Krystalle (0,05 g) schmelzen bei 200°, aus Wasser umkrystallisiert liegt ihr Schmelzpunkt bei 208—209°. Der Mischschmelzpunkt mit dem Oxim aus Phonopyrrolcarbonsäure liegt bei 218—219°, der mit dem aus der isomeren Säure bei 205—206°.

Wahrscheinlich liegt ein Gemisch eines Oxims des Methyläthylmaleinimids und, wenigstens der Krystallform nach, des Oxims der Phonopyrrolcarbonsäure vor.

Die ursprüngliche schwefelsaure Mutterlauge dunkelt beim Stehen allmählich nach und zeigt neben starker Fluorescenz den Urobilinstreifen; beim Alkalisieren erscheint ein recht charakteristischer Streifen in Rot in ähnlicher Lage, wie ihn

die zersetzte Bilirubinsäure und auch das früher beschriebene Kupfersalz vom Hemibilirubin zeigt. Es erscheint nicht ausgeschlossen, daß auch die Violettfärbung des letzteren und damit auch der spektroskopische Befund erst einer sekundären (rapid einsetzenden) Oxydation seine Entstehung verdankt.

Oxydation von Phyllopyrrol mit Bleisuperoxyd.

1 g Phyllopyrrol wird in 20 ccm 50%iger Schwefelsäure gelöst, mit 30 ccm Wasser verdünnt und bei 50° unter Rühren innerhalb 1/2 Stunde 20 g Bleisuperoxyd eingetragen. Man läßt bis zum andern Morgen bei der angegebenen Temperatur weiter rühren, äthert dann sauer aus und dampft den Äther im Vakuum ab. Der Rückstand wird mit Soda aufgenommen und ausgeäthert. Der Äther hinterließ 0,05 g Methyläthylmaleinimid. Aus verdünntem Alkohol umkrystallisiert schmilzt es bei 68°.

Säuert man die Sodalösung an und äthert aus, so erhält man nach dem Abdunsten eine geringe Menge eines öligen Rückstandes.

Zur Darstellung des Hemibilirubins.

Das Hemibilirubin wurde gewonnen nach der schon früher beschriebenen Vorschrift. Zur Trennung der aciden und nicht aciden Form ist es zweckentsprechend, keinen allzu großen Überschuß von Bicarbonat zu verwenden, da sonst selbstverständlich auch die nicht acide Form mit gelöst wird (vgl. diese Zeitschrift, Bd. 75, S. 343—345). Aber immerhin kann man einen ziemlichen Überschuß von Bicarbonat anwenden, z. B. die gleiche Gewichtsmenge Bicarbonat wie Ausgangsmaterial. Der Schmelzpunkt wurde jetzt zu 197° gefunden (früher 193°). Der Mischschmelzpunkt mit Bilirubinsäure (FP. 187°) ergab 174—175°.

Molekulargewichtsbestimmung von Hemibilirubin.

0,4869 g Substanz ergaben in 8,16 g Alkohol (abs.) eine Siedepunkterhöhung von 0,11°.

Ber. für: $C_{33}H_{44}N_4O_6$ Mol.-Gew.: 592 Gef.: 623.

**Versuche, bei der Natriumamalgamreduktion des Bilirubins
Phonopyrrolcarbonsäure zu isolieren.**

1 g Bilirubin wurde in der schon oft beschriebenen Weise reduziert und die vom Quecksilber getrennte Flüssigkeit in 25 ccm 50%ige Schwefelsäure gegossen. Aus dem Filtrat gelang es nicht, Phonopyrrolcarbonsäure zu gewinnen. Der Niederschlag wurde auf Hemibilirubin verarbeitet und dieses auch erhalten. Jedoch bietet dieses Verfahren keinerlei Vorteil vor dem früher beschriebenen.

Um jedoch zu sehen, ob es überhaupt möglich wäre, Hemibilirubin und Phonopyrrolcarbonsäure von einander zu trennen, wurden gleiche Mengen in Chloroform gelöst. Durch Bicarbonat gelang es glatt, den größten Teil der Phonopyrrolcarbonsäure abzutrennen, die als Pikrat in der üblichen Weise wieder gewonnen wurde. Das Hemibilirubin blieb zunächst als Sirup zurück, krystallisierte jedoch beim Übergießen mit Äther fast momentan.

Um endlich festzustellen, ob etwa bei der Amalgamreduktion Bilirubinsäure entstünde, wurde die nach Entfernung von Körper II erhaltene Chloroformlösung mit Diazobenzolsulfosäure ausgekuppelt. Nach dem Verdunsten des Lösungsmittels hinterblieb eine sehr geringe Menge eines öligen Rückstandes, der nicht zur Krystallisation gebracht werden konnte, auch nicht nach Impfen mit Bilirubinsäure.
