

Zur Kenntnis der Gallenfarbstoffe.

V. Mitteilung.

Von

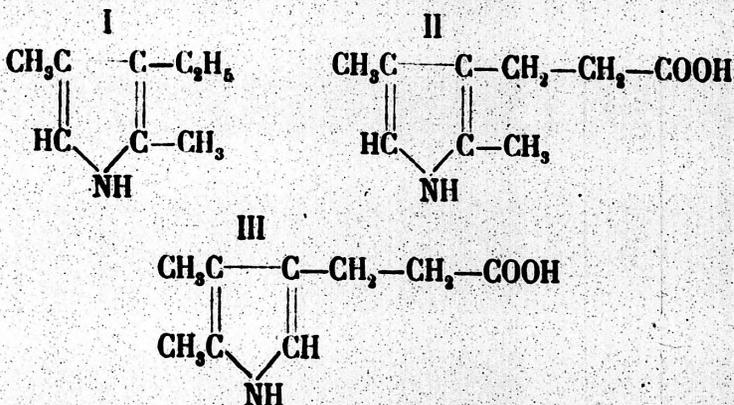
Hans Fischer und Heinrich Röse.

Über die Konstitution der Bilirubinsäure und des Bilirubins.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität München.)
(Der Redaktion zugegangen am 31. Dezember 1913.)

Wir haben uns zum Ziel gesetzt, zunächst die Konstitution der Bilirubinsäure, des bimolekularen Abbauproduktes des Bilirubins, klarzustellen, da von der restlosen Aufklärung dieser Verbindung am ehesten ein Einblick in die Natur des Gallenfarbstoffes erwartet werden konnte.

Bei der energischen Reduktion der Bilirubinsäure erhält man neben wenig Kryptopyrrol (I) in reichlicher Menge Iso-phosphopyrrolcarbonsäure,¹⁾

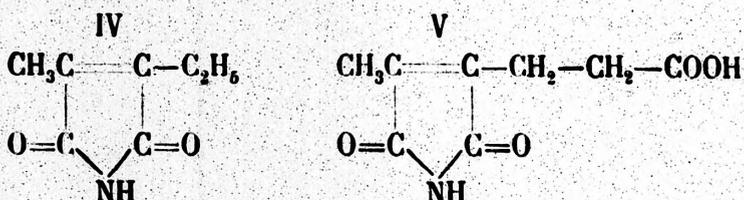


für die Formel II bzw. III zur Diskussion stehen.

Durch Oxydation, mit Bleisuperoxyd z. B., erhält man aus der Bilirubinsäure Methyläthylmaleinimid IV und Hämatisäure²⁾ V

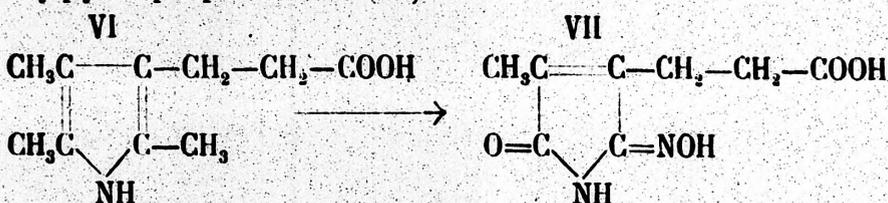
¹⁾ Chem. Ber., Bd. 45, S. 3274.

²⁾ Chem. Ber., Bd. 45, S. 1579; vgl. auch Piloty und Thannhauser, Ann., Bd. 390, S. 191.



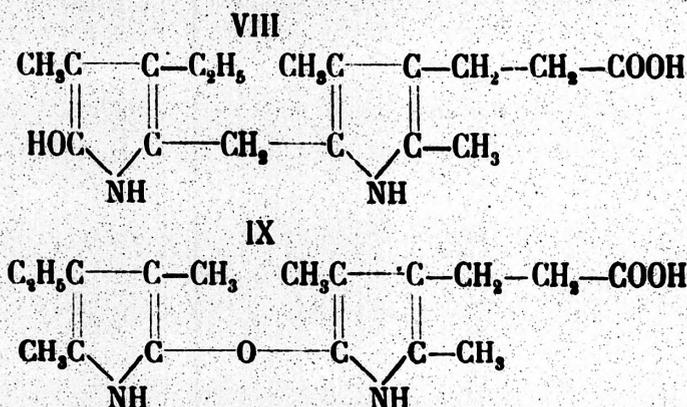
während die Oxydation mit salpetriger Säure neben Methyl-äthylmaleinimid (IV) und Hämatinsäure (V) das Oxim der Phonopyrrolcarbonsäure¹⁾ (VII) an Stelle der zu erwartenden isomeren Säure liefert.

Eine Erklärung für diesen Befund konnten wir früher nicht geben. Neuerdings haben wir nun festgestellt, daß Trimethylpyrrolpropionsäure (VI)



bei der Oxydation mit salpetriger Säure ebenfalls das Oxim der Phonopyrrolcarbonsäure gibt, mithin offenbar der Propion-säurerest einen entscheidenden Einfluß auf die Struktur des Oxims ausübt.

Wenn nun die Bilirubinsäure, wie oben ausgeführt, nicht das ihrer Struktur (festgestellt durch reduktive Spaltung) entsprechende Oxim, sondern das der Phonopyrrolcarbonsäure gibt, so ist hieraus der Schluß zu ziehen, daß die Pyrrol-säure in der Bilirubinsäure in tetrasubstituierter Form vorhanden ist, also in Form von Trimethylpropionsäure (VI), mithin mit der Base durch eine CH_2 -Gruppe verbunden ist. Demnach kommt der Bilirubinsäure die Formel VIII zu,



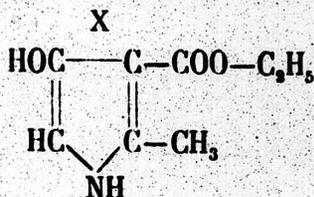
¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 73, S. 225 u. Chem. Ber., Bd. 45, S. 3274.

die wir¹⁾ schon früher zur Diskussion gestellt, aber als wenig wahrscheinlich bezeichnet hatten, weil die Bilirubinsäure sich als resistent gegen Natriummethylat erwiesen hatte, das Reagens, das sonst viele Pyrrole, die durch CH_2 -Gruppen verknüpft sind, auseinandersprengt.²⁾

Dieser Einwand ist nun beseitigt, denn es ist uns gelungen, auch bei der Bilirubinsäure die Aufspaltung zu erzwingen und zwar mittels **Kaliummethylat**, mit dem sie ja auch beim Hämin bewerkstelligt wurde.

Entsprechend den aufgestellten Formeln wurde Trimethylpyrrolpropionsäure (VI) erhalten, neben sehr wenig Tetramethylpyrrol (hiervon wird weiter unten die Rede sein). Das Resultat ist also im Prinzip das gleiche wie bei der energischen Reduktion: «Verschwindend kleine Basenfraktion, bedeutende Säurenfraktion, ein Ergebnis, dem Formel VIII der Bilirubinsäure Rechnung trägt im Gegensatz zu der zuerst aufgestellten isomeren Formel IX, bei der kein Grund dafür vorhanden ist, daß wenig Base, dagegen viel Säure entsteht.

Dadurch, daß bei VIII der Sauerstoff einseitig die Base belastet, wird diese offensichtlich hinfällig. Im Einklang damit steht die Vergänglichkeit des nach Benary³⁾ gewonnenen Oxy-pyrrols X,



das durch Natriummethylat zerstört und durch Eisessig-Jodwasserstoff höchstens in Spuren zu dem zugrunde liegenden Pyrrole reduziert wird.

Kann so an der Konstitution der Bilirubinsäure kein Zweifel mehr sein, so fragt es sich nun, ob man die gewonnene Erkenntnis ohne weiteres auf das Bilirubin übertragen kann, mit anderen Worten, ob die Bilirubinsäure ein primäres Spaltungsprodukt des Gallenfarbstoffes ist oder nicht.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 84, S. 267.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 83, S. 50.

³⁾ Benary und Silbermann, Chem. Ber., Bd. 46, S. 1363.

größe wie der Bilirubinsäure zu und es ist eine zweibasische Säure. Theoretisch könnte man sich daher leicht vorstellen, daß das Hemibilirubin durch Verkettung zweier Moleküle Bilirubinsäure entstünde, so, daß die beiden COOH-Gruppen nicht miteinander in Beziehung treten.

Zwei Schwierigkeiten treten hier jedoch entgegen. Erstens besitzt das Hemibilirubin eine freie CH-Gruppe, während der Bilirubinsäure diese Eigenschaft nicht zukommt, und zweitens ist die maximale Ausbeute an Bilirubinsäure 30%, so daß es ausgeschlossen erscheint, daß die Bilirubinsäure mehr wie die Hälfte des Hemibilirubinmoleküls ausmacht.

Nach der Molekulargröße des Hemibilirubins und nach Analogie mit dem Blutfarbstoff, der nach den Feststellungen von Fischer und Hahn¹⁾ vier Pyrrolkerne enthält, ist es die wahrscheinlichste Annahme, daß auch das Hemibilirubin vier Pyrrolkerne besitzt, eine Annahme, die auch ohne Heranziehung der Analogien mit dem Blutfarbstoff recht viel Wahrscheinlichkeit für sich hat.

Da, wie bereits bemerkt, das Hemibilirubin im Gegensatz zur Bilirubinsäure eine freie CH-Gruppe enthält, so kann der Pyrrolkern, der im Hemibilirubin die Methingruppe trägt, für die Bilirubinsäure nicht in Betracht kommen.

Weiterhin ist das Hemibilirubin, wie ausgeführt, eine zweibasische Säure, also kann nur eine Carboxylgruppe durch die Bilirubinsäure gedeckt werden, während die zweite zu einer anderen Atomgruppierung gehören muß.

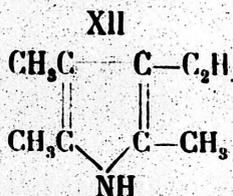
Es ist uns nun gelungen, die Anwesenheit eines dritten und vierten Pyrrolkerns direkt zu beweisen.

Erhitzt man die Bilirubinsäure mit Natriummethylat unter bestimmten Bedingungen, so erhält man Xantobilirubinsäure (XI); Trimethylpyrrolpropionsäure (VI) konnte daneben nicht nachgewiesen werden. Unterwirft man hingegen Bilirubin der gleichen Behandlung, so erhält man neben Xantobilirubinsäure in reichlicher Menge die Trimethylpyrrolpropionsäure (VI). Wir schließen hieraus, daß diese Säure nicht dem Bilirubinsäurerest entstammen kann, sondern aus

¹⁾ Chem. Ber., Bd. 46, S. 2308.

einem besonderen Pyrrolkern hervorgeht. In ähnlicher Weise gelang auch der Nachweis des 4. Pyrrolkerns.

Durch Anwendung des reaktionsfähigeren Kaliummethylats ist es geglückt, die Bilirubinsäure zu sprengen unter Bildung von Trimethylpyrrolpropionsäure (VI). Als basischer Bestandteil konnte sehr wenig Tetramethylpyrrol isoliert werden, das ja, wie früher¹⁾ festgestellt wurde, ein sekundäres Abbauprodukt der entstandenen Pyrrolsäure ist. Wesentlich ist, daß Anzeichen für das Vorhandensein von Phyllopyrrol nicht da waren. Anders beim Bilirubin. Als wir diesen Farbstoff mit Kaliummethylat unter genau den gleichen Bedingungen behandelten, gelang es, in relativ reichlicher Menge Phyllopyrrol XII



nachzuweisen, das folglich nicht der Bilirubinsäure, sondern einem besonderen Pyrrolkerne seine Entstehung verdanken muß.

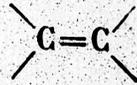
Will man nun die erhaltenen Resultate für die Aufstellung einer Strukturformel des Hemibilirubins und Bilirubins verwenden, so muß diese in erster Linie dem Entstehen der Bilirubinsäure Rechnung tragen, mithin die Struktur dieses Spaltungsproduktes in sich tragen. Weiterhin muß sie eine Erklärung dafür geben, warum die Ausbeuten an Pyrrolen beim Gallenfarbstoff im Gegensatz zum Blutfarbstoff so gering sind und warum der Gallenfarbstoff gegen die Einwirkung der salpetrigen Säure hinfällig ist.

Der entscheidende Unterschied zwischen den beiden Farbstoffen liegt zweifellos im Sauerstoffgehalt, der beim Bilirubin um 2 Atome reicher ist als beim Hämin, und in der Art der Bindung des Sauerstoffs muß die Ursache für das grundverschiedene Verhalten der beiden Farbstoffe liegen.

Wir glauben, daß die folgenden Konstitutionsformeln für das Hemibilirubin den bis jetzt erhaltenen experimentellen

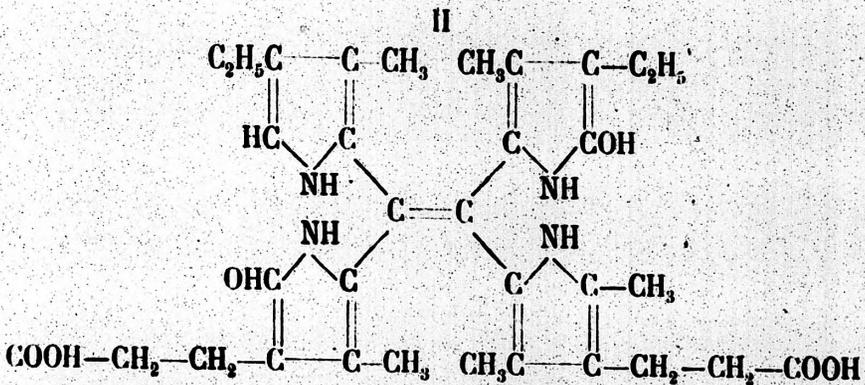
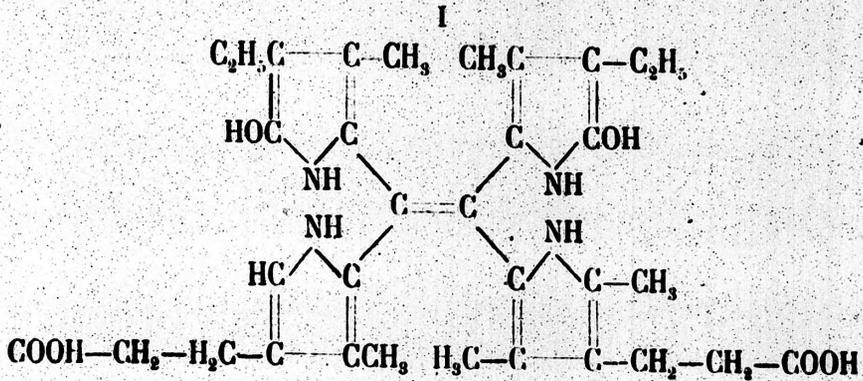
¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 83, S. 67.

Resultaten Rechnung trägt, wobei wir für die Verknüpfung der vier Pyrrolkerne die Gruppe



annehmen, die Willstätter und Max Fischer¹⁾ kürzlich für Chlorophyll und Hämin vorgeschlagen haben.

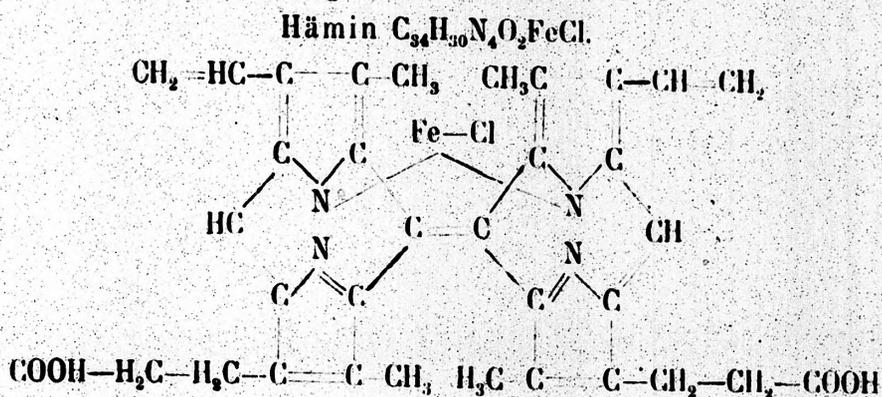
Hemibilirubin $\text{C}_{33}\text{H}_{42}\text{N}_4\text{O}_6$.



Die beiden isomeren Formeln enthalten 2 H-Atome weniger, wie wir seiner Zeit für das Hemibilirubin berechneten, indessen ist eine derartige Differenz bei hochmolekularen Pyrrolen analytisch kaum nachweisbar.

Die für das Hemibilirubin aufgestellte Formel stellt diesen Körper als Farbstoff dar. Es ist nicht sicher, ob das Hemibilirubin schwach gelb gefärbt ist, wobei aber zu bemerken ist, daß es sich schon an der Luft außerordentlich schnell oxydiert. Die frisch hergestellte, reduzierte Bilirubinlösung dagegen ist in der Regel vollständig farblos. Wir sind mit dem genauen Studium dieser Verhältnisse zurzeit beschäftigt und

¹⁾ Willstätter u. Max Fischer, Diese Zeitschrift, Bd. 87, S. 423.

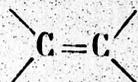


Besonders müssen wir jedoch hier gleich betonen, daß die Formulierung der Vinylgruppen in der Häminformel eine Änderung erfahren muß, weil sonst der prinzipielle Unterschied im Verhalten von Bilirubin und Hämin gegen Natriumamalgam¹⁾ nicht erklärlich ist.

Hierauf, wie auf die Erörterung der Konstitution des Hämins, soll in einer späteren Mitteilung eingegangen werden.

Die für das Bilirubin aufgestellten Formeln erklären gut das Entstehen des Hemibilirubins. Bei der Behandlung mit Natriumamalgam lagert sich zunächst Wasserstoff an die Vinylgruppen an unter gleichzeitiger Öffnung der Sauerstoffbrücke. Hierdurch entsteht eine freie Methingruppe (die «Urobilinbildung» könnte dann von hier aus sekundär durch Oxydation analog der Indigobildung aus Indoxyl eintreten) und die Bildung der Äthylgruppen (aus den Vinylresten) bewirkt dann, daß man bei der Oxydation des Hemibilirubins Methyläthylmaleinimid erhält, während Bilirubin nur Hämatinsäure liefert.

Bei der Reduktion mit Jodwasserstoff-Eisessig tritt ebenfalls zunächst Öffnung der Sauerstoffbrücke ein neben Reduktion der Vinylgruppen, wahrscheinlich jedoch vorwiegend im Sinne der Hemibilirubinformel I; hierdurch erklärt es sich, daß Pyrrolkern I fast völlig verschwindet, während II zum Teil bestehen bleibt und als Isophonopyrrolcarbonsäure gefaßt wird, indem die Kohlenstoffbrücke

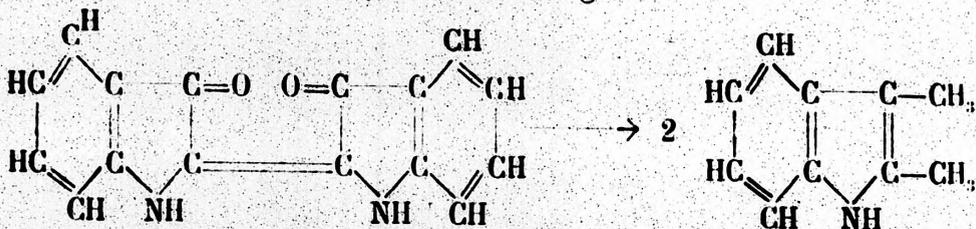


an der Doppelbindung gesprengt wird. So ist es verständlich, daß Pyrrolkern III + IV als Bilirubinsäure erhalten bleiben.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 82, S. 97.

Natrium- bzw. Kaliummethylat wirkt in analoger Weise wie der Jodwasserstoff ein. Beweise hierfür haben wir schon beim Blutfarbstoff¹⁾ erbracht, indem wir dort Aufspaltung zu Phyllopyrrol und tetrasubstituierter Säure²⁾ erzielten. Ganz analog erfolgt hier Aufspaltung, wobei III und IV als Xantobilirubinsäure beobachtet werden, während II Trimethylpyrrolpropionsäure gibt und I Phyllopyrrol.

Daß I hier in besserer Ausbeute erhalten bleibt, als bei der Reduktion mit Jodwasserstoffsäure, dafür spricht auch ein experimenteller Befund, wonach Indigo



durch Natriummethylat in Dimethylindol³⁾ übergeführt wird.

Auch die Einwirkung der salpetrigen Säure erklärt sich zwanglos durch die Angriffsmöglichkeit an den Stellen, die den Sauerstoff tragen.

Experimenteller Teil.

I. Nitroxydation von Trimethylpyrrolpropionsäure.

7 g Pikrat der genannten Säure wurden in der üblichen Weise mit 25%iger Schwefelsäure zerlegt und die erhaltene Lösung der Säure bei ca. 50° mit einer konzentrierten Natriumnitritlösung behandelt. Zuerst trat tiefe Dunkelfärbung ein, dann schnell Aufhellung. Nach längerem Stehen wurde aus-

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 87, S. 38 und Bd. 88, S. 9.

²⁾ Bis jetzt hatten wir von tetrasubstituierter Säure nur eine geringe Ausbeute erhalten und uns daher mit einer gewissen Vorsicht über die Bindungsart der Säuren im Blutfarbstoff ausgesprochen. Dadurch, daß wir neuerdings die erhaltenen Rohsäuren nach der Veresterung der fraktionierten Destillation unterwerfen, haben wir die Ausbeute auf das 5fache steigern können, und als Nebenprodukt den Ester der Phonopyrrolcarbonsäure erhalten, so daß kein Zweifel bestehen kann, daß die Verkettung der Basen und Säuren im Hämin eine analoge ist.

³⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 84, S. 254.

geäthert und der Äther verdunstet. Es hinterblieb in kugelförmigen Gebilden ein Oxim, das, aus wenig Wasser umkrystallisiert, bei 243° schmolz in Übereinstimmung mit dem Schmelzpunkt des Oxims der Phonopyrrolcarbonsäure. Der Mischschmelzpunkt gab keine Depression; von einer Analyse mußte Abstand genommen werden, da die Ausbeute nur 0,05 g betrug.

II. Bilirubinsäure mit Kaliummethylat.

5,3 g Bilirubinsäure wurden mit einer Lösung von 50 g Kalium in 200 g absolutem Methylalkohol 5 Stunden auf 219 bis 220° erhitzt. Der Druck stieg bis auf 43 Atmosphären (Tabelle I). Nach dem Erkalten waren noch 8 Atmosphären

I.

Bilirubinsäure mit Kaliummethylat.

Zeit	Temp.	Druck	Ölbad	Zeit	Temp.	Druck	Ölbad
12 45	138°	10	273°	3 55	218°	35	276°
1 00	160°	14	294°	4 10	217°	35	276°
1 15	185°	20	308°	4 25	216°	35	279°
1 30	207°	29	319°	4 40	217°	36	282°
1 43	219°	34	292°	5 15	219°	37,5	286°
2 05	221°	34	276°	5 35	220°	40	288°
2 20	220°	33	279°	5 50	222°	40	285°
2 30	219°	33	280°	6 05	222°	41	284°
2 55	219°	34	280°	6 20	223°	42	286°
3 10	219°	34	280°	6 35	223°	43	286°
3 25	219°	35	279°	6 45	223°	43	286°
3 40	218°	35	278°				

vorhanden. Die Reaktionsmasse roch stark nach Ammoniak. Sie wurde mit Wasser aufgenommen und mit Dampf destilliert, das Destillat mit Äther ausgeschüttelt und der Äther im Vakuum abgedampft. Der Rückstand wurde mit 5 ccm 10%iger ätherischer Pikrinsäurelösung aufgenommen. Beim Stehen in Eis schieden sich etwas über 0,1 g Pikrat vom Schmelzpunkt 114—115° aus. Nach dem Umkrystallisieren Schmelzpunkt 118—120°.

Die Aldehydreaktion war negativ. Das Gemisch mit Phyllopyrrolpikrat aus Bilirubin fing an bei 102—103° stark zu sintern und war bei 105° geschmolzen, also eine erhebliche Depression. Es ist kein Zweifel, daß hier Tetramethylpyrrolpikrat vorlag; dieses entsteht aus der gleich zu erwähnenden Trimethylpyrrolpropionsäure, und es ist interessant, daß auch seiner Zeit¹⁾ bei dem aus Phonopyrrolcarbonsäure neben Trimethylpyrrolpropionsäure erhaltenen Tetramethylpyrrolpikrat der richtige Schmelzpunkt nicht erreicht werden konnte.

Das ausgeätherte Destillat reagierte alkalisch und verbrauchte zur Neutralisation ca. 7 ccm $\frac{n}{1}$ -H₂SO₄.

Die alkalische mit Dampf destillierte Mutterlauge wurde mit Salzsäure angesäuert bis zur eben deutlichen Reaktion auf Kongorot und ausgeäthert. Der Ätherrückstand wurde, wie beim Bilirubin beschrieben wird, mit siedendem Wasser behandelt. Nach dem Ausäthern der wässrigen Lösung und Verdunsten des Äthers hinterblieben 2,3 g eines Sirups, aus dem mit 30 ccm 10%iger Pikrinsäurelösung in Äther 0,75 g Pikrat der Trimethylpyrrolpropionsäure erhalten wurden. Schmelzpunkt nach dem Umkrystallisieren aus Alkohol 126—127°.

0,1584 g Substanz gaben 19,4 ccm N (15°, 721 mm).

C₁₆H₁₈O₉N₄. Berechnet: N = 13,66. Gefunden: N = 13,62.

III. Verhalten von 3-Oxy-4-Carbäthoxy-5-Methylpyrrol gegen Reduktion mit Eisessig-Jodwasserstoff und Natriummethylat.

Bei der Behandlung des nach den Angaben von Benary (l. c.) gewonnenen Oxypyrrols mit Eisessig-Jodwasserstoff konnte kein α -Methylpyrrol nachgewiesen werden. Nach dem Erhitzen des Oxypyrrols mit Natriummethylat auf 220—230° war starker Ammoniakgeruch wahrnehmbar, Tetramethylpyrrolpikrat konnte nicht aufgefunden werden.

Eine unserer weiteren Aufgaben wird die sein, α -Oxypyrrole einer näheren Untersuchung zu unterziehen.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 53, S. 67.

IV. Gewinnung von Xantobilirubinsäure aus Bilirubin und Bilirubinsäure, siehe Chem. Ber., Bd. 46, S. 439.

V. Totale Reduktion von Bilirubin.

25 g Bilirubin wurden über Nacht mit 450 ccm Eisessig und 170 ccm Jodwasserstoffsäure (spez. Gew. 1,96) unter Rückfluß zum Sieden erhitzt. Danach wird das ausgeschiedene Jod mit Jodphosphonium reduziert und das Säuregemisch im Vakuum im siedenden Wasserbade möglichst schnell abdestilliert. Der Rückstand wurde in Soda aufgenommen und mit Wasserdampf behandelt. Es ging ca. 1 g eines Öles über, das mit Äther isoliert wurde. Mit 10%iger Pikrinsäurelösung in Äther versetzt schieden sich 0,2 g Kryptopyrrolpikrat vom Schmelzpunkt 135—136⁰ 1) aus. Nach einmaligem Umkrystallisieren stieg er auf 139—140⁰. Zur Analyse wurde im Vakuum über P₂O₅ getrocknet.

0,0864 g Substanz gaben 12,6 ccm N (19⁰, 717 mm)

C₁₄H₁₆O₇N₄. Berechnet: N = 15,91. Gefunden: N = 15,86.

Die ätherische Mutterlauge des Pikrates wurde mit Natronlauge von der Pikrinsäure befreit und die Lösung der Pyrrole sodaalkalisch mit Diazobenzolsulfosäure bis zum Verschwinden der Aldehydreaktion ausgekuppelt. Die ätherische Lösung wurde im Vakuum eingedunstet. Der ölige Rückstand besaß einen sellerie- und terpenartigen Geruch. In 50%iger Schwefelsäure löste er sich nicht. Mit Nitrit bei gewöhnlicher Temperatur oxydiert war kein Oxim zu beobachten.

Die mit Dampf destillierte sodaalkalische Flüssigkeit wurde bis zur schwach kongosauren Reaktion mit Salzsäure versetzt und ausgeäthert. Der Äther im Vakuum abdestilliert, zum Schluß im siedenden Wasserbade, und der restierende Sirup (ca. 13 g) mit 110 ccm ätherischer Pikrinsäure gelöst. Beim Stehen in Eis krystallisierten 7,6 g Pikrat der Isophonopyrrol-

1) Bemerkenswert ist, daß hier direkt nahezu der richtige Schmelzpunkt des Kryptopyrrolpikrats erreicht wurde, während bei der Isolierung aus Körper II (Chem. Ber., Bd. 45, S. 3277) dieser erst nach 3maligem Umkrystallisieren erreicht wurde. Die Ausbeute an Rohpikrat betrug mehr als das Doppelte. Die Beobachtung soll weiter verfolgt werden.

carbonsäure. Eine Probe aus Alkohol umkrystallisiert schmolz bei 152—153°.

VI. Totale Reduktion der Bilirubinsäure.

5 g Bilirubinsäure¹⁾ wurden mit 110 ccm Eisessig und 40 ccm Jodwasserstoffsäure (1,96) über Nacht unter Rückfluß gekocht, am andern Tage wurde das freigewordene Jod mit Jodphosphonium reduziert und das Säuregemisch im Vakuum abdestilliert. Dann wurde sodaalkalisch mit Dampf destilliert. Es gingen 0,3 g Öl über, daraus ca. 0,05 g Kryptopyrrolpikrat, Schmelzpunkt 138°. Mischschmelzpunkt derselbe.

Die Mutterlauge wurde von der Pikrinsäure befreit und sodaalkalisch mit Diazobenzolsulfosäure ausgekuppelt. Der Äther hinterläßt eine beträchtliche Menge eines terpenartig riechenden Öles, das sich in 50%iger Schwefelsäure nicht löste. Mit Nitrit oxydiert entstand auch hier kein Oxim.

Die sodaalkalische Lösung, aus der die Basen (vgl. oben) mit Dampf abgetrieben waren, wurde mit Salzsäure angesäuert und ausgeäthert. Der sirupöse Ätherrückstand wurde mit heißem Wasser behandelt. Darin war ein beträchtlicher Teil unlöslich. Er wurde abfiltriert, in Chloroform gelöst und mit Diazobenzolsulfosäure ausgekuppelt. Die Chloroformlösung wurde mit Petroläther versetzt. Beim Stehen krystallisierte Bilirubinsäure aus.

Das wässrige Filtrat wurde nach dem Erkalten und Filtrieren ausgeäthert. Aus dem ersten Ätherextrakt schieden sich weitere Mengen von Bilirubinsäure in Form von farblosen, dreieckigen Blättchen ab. Schmelzpunkt 180°. Die Aldehydreaktion war nahezu negativ. Nach dem Verdampfen des Äthers wurde der Rückstand mit 95 ccm 10%iger ätherischer Pikrinsäure versetzt und ca. 1,4 g Isophonopyrrolcarbonsäurepikrat vom Schmelzpunkt 150° erhalten, während von der Base nur 0,05 g isoliert werden konnten, wie oben ausgeführt.

VII. Gewinnung von Trimethylpyrrolpropionsäure aus Bilirubin durch Natriummethylat, siehe Chem. Ber. Bd. 46, S. 439.

¹⁾ Die Ausbeute bei der Gewinnung dieser Säure aus Bilirubin wurde inzwischen auf 30% gesteigert.

II
25 g Bilirubin mit Kaliummethylat.

Zeit	Temp.	Druck	Ölbad	Zeit	Temp.	Druck	Ölbad
12 30	150°	14	302°	4 15	218°	44	276°
12 45	165°	19	290°	4 30	218°	44	276°
1 00	193°	25	283°	4 45	217°	44	272°
1 17	204°	30	280°	5 00	216°	44	271°
1 34	209°	32	280°	5 15	215°	44	270°
1 45	212°	34	280°	5 30	214°	43	268°
2 00	214°	36	280°	5 45	213°	42	274°
2 15	216°	37	280°	6 00	214°	45	299°
2 30	217°	39	280°	6 12	222°	50	302°
2 50	218°	40	279°	6 30	226°	52	281°
3 00	218°	41	279°	6 45	225°	52	276°
3 15	218°	42	279°	7 00	222°	50	272°
3 30	218°	42	278°	7 15	220°	50	270°
3 45	218°	42	277°	7 35	218°	48	268°
4 00	218°	42	276°				

VII. Bilirubin mit Kaliummethylat (Tabelle II).

50 g Kalium wurden in 200 g Methylalkohol (absol.) gelöst und 25 g fein gepulvertes Bilirubin eingerührt. Da, wo die Masse mit der Luft in Berührung kam, trat teilweise Grünfärbung ein. Sie wurde in einem versilberten Kupfertiegel im Autoklaven 5 Stunden auf ca. 218° erhitzt. Hierbei stieg der Druck bis auf 52 Atmosphären. Nach dem Erkalten waren noch 9 Atmosphären vorhanden. Der Inhalt roch stark nach Ammoniak. Der Dampfdestillation unterworfen ging ein Pyrrol über, das dem Destillat mit Äther entzogen wurde. Nach dem Verdampfen des Äthers wurde der krystallisierte Rückstand im Vakuum bis 160° Ölbadtemperatur destilliert. Das übergehende Öl erstarrte wieder in den für das Phyllopyrrol charakteristischen rechtwinkligen Platten. Es wurde mit 10 ccm 10%iger ätherischer Pikrinsäure in das Pikrat übergeführt (0,8 g), das bei 104—105° schmolz. Der Schmelzpunkt änderte sich nicht mehr beim Umkrystallisieren. Zur Analyse wurde im Vakuum über P_2O_5 bei gewöhnlicher Temperatur getrocknet.

0,1814 Substanz gaben 24,9 ccm N (17°, 727 mm).

$C_{15}H_{18}O_7N_4$ Berechnet: N = 15,30. Gefunden: N = 15,26.

Beim Schütteln der bei der Dampfdestillation im Kolben zurückbleibenden alkalischen Flüssigkeit mit Äther wurde dieser stark angefärbt und hinterließ nach dem Abziehen eine beträchtliche Menge eines dunklen Sirups. Beide Lösungen fluorescierten stark nach Grün.

Die alkoholische Lösung wurde mit Salzsäure schwach angesäuert und ausgeäthert. Der sirupöse Ätherrückstand wurde mit siedendem Wasser übergossen, vom Ungelösten filtriert und das Filtrat nach dem Erkalten und eventuellen Filtrieren ausgeäthert (5,8 g Sirup). Mit 50 ccm 10%iger ätherischer Pikrinsäure versetzt krystallisierten ca. 3 g Pikrat der Trimethylpyrrol-propionsäure vom Schmelzpunkt 125—126° aus.

Es konnte nun der Einwand gemacht werden, daß hier das Phyllopyrrol wegen der großen, angewandten Bilirubinmengen isolierbar war, während ein Versuch mit einer geringeren Menge, wie z. B. bei der Bilirubinsäure (II) negativ verlaufen würde.

Es wurden deshalb 5,3 g Bilirubin (Tabelle III) genau

III.

5,3 g Bilirubin mit Kaliummethylat.

Zeit	Temp.	Druck	Ölbad	Zeit	Temp.	Druck	Ölbad
11 20	135°	7	168°	2 30	217°	33	280°
11 35	159°	12	296°	2 45	216°	34	285°
11 50	180°	18	307°	3 00	217°	35	287°
12 05	200°	24	296°	3 15	218°	35	287°
12 10	203°	25	295°	3 30	219°	36	289°
12 25	211°	28	293°	3 45	221°	37	289°
12 45	216°	30	285°	4 00	221°	38	289°
1 00	217°	31	285°	4 15	222°	39	289°
1 15	217°	31	285°	4 30	222°	40	289°
1 30	217°	32	284°	4 50	222°	40	288°
1 45	218°	33	282°	5 00	222°	40	287°
2 00	217°	33	281°	5 50	221°	42	287°
2 15	217°	33	280°	6 05	221°	42	286°

wie bei II geschildert, verarbeitet, und auch hier konnte Phyllopyrrolpikrat gefaßt werden.

Die Rindergallensteine, aus denen das Bilirubin für die vorliegende Untersuchung gewonnen wurde, sind mit Hilfe von Mitteln aus dem allgemeinen Fond zur Förderung chemischer Forschungen (Leo-Gans-Stiftung) der Kaiser-Wilhelm-Gesellschaft angeschafft, wofür ich auch an dieser Stelle meinen ergebensten Dank ausspreche.