

Eigenschaften genau kennt, nicht auf einfacherem Wege darstellen kann.

Für die schwierige und langwierige Untersuchung fand ich in der Person des Hrn. Dr. Ewald Fonrobert einen ausgezeichneten Mitarbeiter, dem ich für seinen hingebenden Eifer auch an dieser Stelle herzlich danke.

114. Hans Fischer und Heinrich Röse: Gewinnung der Isophonopyrrol-carbonsäure aus Hämin und eine neue Isolierungsmethode der sauren Spaltprodukte des Hämins und Bilirubins.

[Aus dem Physiolog. Institut der Universität München.]

(Eingegangen am 21. Februar 1914.)

Schon vor längerer Zeit teilten wir mit, daß es leicht gelingt, die Pyrrol-carbonsäuren des Blut- bzw. Gallen-Farbstoffes in ihre Ester überzuführen mit Hilfe von Alkohol und Salzsäure analog dem E. Fischerschen Veresterungsverfahren für Aminosäuren. Auch die von uns aus Phonopyrrol-carbonsäure synthetisch erhaltene Trimethylpyrrol-propionsäure läßt sich leicht so verestern, ebenso die Bilirubinsäure. Die Reinigung der Ester gelingt dann sehr leicht durch Destillation im Vakuum; man kann beim Gallenfarbstoff die Trennung der monomolekularen Pyrrolsäuren von der Bilirubinsäure durch fraktionierte Destillation erzielen. Ebenso bewährte sich die Methode bei der Isolierung der Trimethylpyrrol-propionsäure, die man bei der Aufspaltung des Hämins durch Kaliummethylat erhält.

Ganz besonders leicht lassen sich die Ester der Phono- und Isophonopyrrol-carbonsäure mit Hilfe ihrer Pikrate trennen, die eine ganz verschiedene Farbe besitzen. Der Ester der Phonopyrrol-carbonsäure ist schokoladebraun¹⁾, während der der isomeren Säure hellgelb ist, und man könnte mit Hilfe dieser Farbdifferenz leicht mit einiger Geduld die beiden Ester auslesen. Aber wir haben bequeme Methoden gefunden, um nahezu quantitativ die beiden Esterpikrate zu trennen, und zwar in der fraktionierten Fällung, wie sie Willstätter und Asahina zur Fraktionierung des Hämopyrrol-Gemisches zuerst angewandt hatten, und der verschiedenen Löslichkeit in Essigester. Setzt man zu einem Gemisch der beiden Ester eine ungenügende Menge Pikrinsäure, so krystallisiert in der Regel zuerst das Pikrat des in größerer Menge vorhandenen Esters heraus, und durch

¹⁾ B. 45, 3276 [1912].

allmähliche Zugabe von Pikrinsäure und scharfes Beobachten, wann die Krystallisation des andersfarbigen Pikrates beginnt, kann man die Trennung bewirken. Noch bequemer ist die Trennung mittels Krystallisation aus Essigäther. In diesem Lösungsmittel ist der Phonoester sehr schwer löslich, während der Isoester sehr leicht löslich ist.

Aus den Pikraten der Ester gewinnt man die Ester der Säuren durch Zerlegung mit Natronlauge; die in Freiheit gesetzten Ester werden im Vakuum destilliert und nun verseift. Die Verseifung geht leicht und nahezu quantitativ entweder durch Erhitzen mit Jodwasserstoffsäure oder mit Kaliummethylat vonstatten.

Mit Hilfe dieses Verfahrens haben wir neben der Phonopyrrol-carbonsäure zum ersten Male¹⁾ die Isophonopyrrol-carbonsäure aus Hämin in reinem Zustand gewonnen. Ihre Identität mit der Isophonopyrrol-carbonsäure aus Bilirubin haben wir bewiesen durch die übereinstimmenden Schmelzpunkte der Esterpikrate, Ester, Säuren, Säurepikrate und Oxime bezw. Depression der Mischschmelzpunkte mit den gleichen Derivaten der Phonopyrrol-carbonsäure.

Was die Mengenverhältnisse der beiden Säuren anlangt, so finden wir $\frac{1}{3}$ Isophonopyrrol-carbonsäure gegen $\frac{2}{3}$ Phonopyrrol-carbonsäure.

Experimenteller Teil.

Überführung des bei der Reduktion des Hämins erhaltenen Säuregemisches in die Ester und Isolierung der Isophonopyrrol-carbonsäure.

60 g Hämin wurden mit Eisessig-Jodwasserstoffsäure in der schon oft beschriebenen Weise aufgespalten. Nach der Reduktion des entstandenen Jods mit Jodphosphonium wurde das Säuregemisch im Vakuum abdestilliert und die Basen sodaalkalisch mit Dampf abgetrieben.

Die sodaalkalische Lösung wurde nach dem Absaugen des Eisenschlammes eben kongosauer gemacht und 4—5-mal ausgeäthert, der Äther abdestilliert, zum Schluß im siedenden Wasserbade, ca. 30—35 g Rückstand. In 500 ccm Methylalkohol (absol.) wurde dieser aufgenommen und die Lösung mit trockner Salzsäure gesättigt. Am andern Tage wurde im Vakuum bei ca. 40° Badtemperatur eingedampft und der Rückstand sodaalkalisch 2—3-mal ausgeäthert.

¹⁾ Piloty gibt zwar an, daß er die Isophonopyrrol-carbonsäure aus Hämin (Piloty und Dormann, B. 46, 1002 [1913]) isoliert habe. Die von ihm angegebenen Daten beweisen, daß er ein Gemisch in Händen hatte. Anhaltspunkte für das Vorkommen der Isophonopyrrol-carbonsäure im Hämin haben wir schon vorher angegeben.

Aus der Sodalösung läßt sich nach dem Ansäuern und Ausäthern eine bald größere, bald kleinere Menge unveränderten Säuregemisches wiedergewinnen. Schmelzpunkt des Rohnpikrates 146°. Nach dem Umkrystallisieren aus Alkohol Schmp. 158—159°

Der obige Ätherauszug der Ester wurde eingedampft und im Vakuum bis 220° Ölbad-Temperatur destilliert (Ausbeute ca. 24 g).

In einer Reihe von Vorversuchen konnten wir durch Fraktionierung keinerlei Trennung erzielen, vielmehr erwiesen sich die übrigen innerhalb weniger Grade übergelenden Anteile als durchaus gleichartig zusammengesetzt. Deshalb wurde bei den späteren Versuchen, wie angegeben, auf Fraktionierung verzichtet.

Beim Stehen des Destillates im Vakuum in der Kälte krystallisierte regelmäßig reiner Phonoester aus, im vorliegenden Falle ca. 6.3 g. Die Krystalle wurden durch Absaugen ohne Filter von dem öligen Estergemisch getrennt. Weiteres Abpressen unter hohem Druck zwischen gehärtetem Filtrierpapier. Eine Probe wurde ins Pikrat verwandelt. Aus Alkohol umkrystallisiert schmolz dieses bei 120—121°.

0.1132 g Subst.: 20.9 ccm N (20°, 713 mm).

$C_{16}H_{18}O_9N_4$. Ber. N 13.66. Gef. N 13.78.

Die Trennung der in der öligen Mutterlauge befindlichen Ester bewerkstelligt man nach der Umwandlung in die Pikrate. Es ist zweckmäßig, hier zuerst die fraktionierte Fällung mit Pikrinsäure anzuwenden, da es sehr häufig gelingt (nicht immer), so direkt die Trennung zu erzielen. Mißlingt diese, so führt das weiterhin angegebene Trennungsverfahren mit Essigester absolut sicher zum Ziel; wir beschreiben daher nur dieses.

11 g des Gemisches wurden mit 220 ccm 10-prozentiger, feucht-ätherischer Pikrinsäure-Lösung versetzt. Beim Stehen in Eis schieden sich 18.5 g Pikrat aus. Die Mutterlauge wurde eingedampft und der gelbe Rückstand mit Alkohol und Äther gewaschen (6.6 g); schmilzt, aus Alkohol umkrystallisiert, bei 95°. Beim nochmaligen Umkrystallisieren änderte sich der Schmelzpunkt nicht. Wahrscheinlich liegt hier das Pikrat des Esters der Trimethyl-pyrrol-propionsäure vor, jedoch ist dieser Teil der Untersuchung noch nicht abgeschlossen.

Die abgeschiedenen Pikrate (18.5 g) wurden in 140 ccm Essig-äther gelöst und ca. 1 Stunde bei niedriger Temperatur stehen gelassen. Alsdann war fast alles Phonoester-pikrat (5.4 g) auskrystallisiert (erkennlich an seiner braunen Farbe), dem nur geringe Mengen des gelben Pikrates des Isophonopyrrol-carbonsäureesters beigemischt waren. Nach dem Absaugen wurde das Filtrat eingedampft und der Rückstand aus 60 ccm heißem, 96-prozentigem Alkohol umkrystallisiert. Es wurden so 5.3 g reines Isophonopyrrol-carbonsäureester-

pikrat vom Schmp. 112–113° erhalten, das beim weiteren Umkrystallisieren seinen Schmelzpunkt nicht mehr änderte. Die Reinheit wurde bewiesen dadurch, daß der Mischschmelzpunkt mit dem Isoesterpikrat aus Bilirubin (vergl. unten) keine Depression ergab.

0.1380 g Sbst.: 17.6 ccm N (21°, 723 mm).

$C_{16}H_{18}O_9N_4$. Ber. N 13.66. Gef. N 13.87.

Darstellung der freien Isophonopyrrol-carbonsäure. 9 g des bei 112–113° schmelzenden Pikrates wurden mit Natronlauge in bekannter Weise zerlegt und die so erhaltenen freien Ester mit 25 ccm Jodwasserstoffsäure (spez. Gew. 1.96) und 25 ccm Wasser ca. 2 Stunden im siedenden Wasserbade erhitzt. Dann wurde der Jodwasserstoff im Vakuum abdestilliert und der Rückstand nach dem Alkalischemachen mit Soda ausgeäthert. Die Verseifung war nahezu quantitativ, indem nur eine ganz geringe Menge unveränderten Esters in Form des Pikrates (Schmp. 112–113°) wiedergewonnen werden konnte.

Die Sodalösung wurde angesäuert, ausgeäthert und eingedunstet. Es hinterblieben 3.3 g krystallisierte Isophonopyrrol-carbonsäure, die zur Analyse aus siedendem Wasser umkrystallisiert wurden. Schmp. 140°, während Piloty und Dormann 122° angeben. Der Mischschmelzpunkt mit der Isophonopyrrol-carbonsäure aus Bilirubin (vergl. unten) ergab keine Depression. Der Mischschmelzpunkt mit der bei 131° schmelzenden Phonopyrrol-carbonsäure ergab eine erhebliche Depression (110–112°).

0.1728 g Sbst. (im Vak. über P_2O_5 getr.): 0.4112 g CO_2 , 0.1262 g H_2O .
— 0.1534 g Sbst.: 12.2 ccm N (20°, 724 mm).

$C_9H_{13}NO_2$. Ber. C 64.58, H 7.78, N 8.38.

Ger. » 64.96, » 8.17, » 8.69.

Eine Probe der Säure wurde ins Pikrat verwandelt und dieses aus Alkohol umkrystallisiert. Schmp. 155–156° (Piloty und Dormann 146°).

0.1449 g Sbst. (im Vak. über P_2O_5 getr.): 0.2414 g CO_2 , 0.0562 g H_2O .
— 0.1451 g Sbst.: 18.9 ccm N (20°, 725 mm).

$C_{15}H_{16}N_4O_9$. Ber. C 45.45, H 4.04, N 14.14.

Gef. » 45.44, » 4.43, » 14.26.

Das aus der Säure in der üblichen Weise dargestellte Oxim schmolz, aus Wasser umkrystallisiert, bei 219° (Piloty und Dormann 210°).

0.1439 g Sbst.: 18.2 ccm N (19°, 721 mm).

$C_8H_{10}N_2O_4$. Ber. N 14.14. Gef. N 13.83.

Gewinnung der Isophonopyrrol-carbonsäure aus Bilirubin.

Die Gewinnung der Isophonopyrrol-carbonsäure aus Bilirubin haben wir schon früher¹⁾ beschrieben. Die Isolierung geschah damals

¹⁾ B. 45, 1985 [1912] und H. 82, 391.

in Form des Pikrates. Auf die Beschreibung der freien Säure wurde verzichtet, weil die uns seinerzeit zur Verfügung stehende Menge zu gering war, um exakte Beobachtungen anzustellen.

50 g Bilirubin wurden mit 1250 ccm Eisessig-Jodwasserstoffsäure (2:1) $\frac{3}{4}$ Stunden im siedenden Wasserbade erhitzt und das ausgeschiedene Jod mit Jodphosphonium reduziert. Der Eisessig-Jodwasserstoff wurde im Vakuum abdestilliert und die Säuren durch Ausäthern gewonnen. Aus dem Äther-Extrakt krystallisierten beim Eindampfen 7.7 g fast reiner Bilirubinsäure vom Schmp. 178° aus.

Die Mutterlauge hiervon hinterließ beim weiteren Eindampfen 18 g eines zähen Sirups, der nach dem Lösen in 180 ccm Methylalkohol bei niedriger Temperatur mit trockenem Chlorwasserstoff gesättigt wurde. Die weitere Verarbeitung erfolgte in der beim Hämin beschriebenen Weise. Das Estergemisch wurde im Vakuum destilliert und in 3 Fraktionen aufgefangen: I. 158—164° Innentemperatur (1.2 g); II. 164—174° Innentemperatur (3.4 g); III. Nachlauf bis 230° Ölbadtemperatur (0.5 g).

Fraktion I bestand aus reinem Isophonopyrrol-carbonsäure-ester, während in II und III neben diesem noch der Ester der Phonopyrrol-carbonsäure nachgewiesen werden konnte. Auf diesen uns wichtig erscheinenden Befund soll in einer späteren Mitteilung eingegangen werden.

Aus Fraktion I und II wurde mit Hilfe von 10-prozentiger ätherischer Pikrinsäure insgesamt 1.6 g Pikrat erhalten. Nach dem Umkrystallisieren aus Alkohol wurde der konstante Schmp. 111° erreicht. Durch Zerlegung mittels Natronlauge wurde der freie Ester gewonnen und dieser mit verdünnter Jodwasserstoffsäure verseift. Die so dargestellte Isophonopyrrol-carbonsäure schmolz nach dem Umkrystallisieren scharf bei 142° (Piloty und Thannhauser 126—127°, bei 105° beginnende Sinterung).

Gewinnung der Trimethylpyrrol-propionsäure aus Hämin nach der Aufspaltung mit Kaliummethylat.

Die Überlegenheit des neuen Verfahrens der Isolierung von Pyrrol-carbonsäuren durch Destillation ihrer Ester haben wir in besonders eklatanter Weise bei der Gewinnung der Trimethylpyrrol-propionsäure aus Hämin nach vorausgegangener Aufspaltung mittels Kaliummethylats kennen gelernt. Bei Verarbeitung von 25 g Hämin konnten früher¹⁾ nur 4 g Pikrat dieser Säure isoliert werden; anders bei Anwendung des neuen Verfahrens.

¹⁾ H. 87, 43.

25 g Häm in wurden im Autoklaven mit 50 g Kalium in 200 g Methylalkohol (absol.) gelöst auf 225—230° 4 Stunden erhitzt. Der Druck stieg auf 70 Atm., nach dem Erkalten noch 20 Atm. Der Inhalt des Autoklaven wurde mit Wasserdampf destilliert, wobei Phyllopyrrol in großen Mengen überging. Ausbeute 6.6 g.

Die alkalische Mutterlauge wurde mit Salzsäure schwach kongosauer gemacht und ausgeäthert. Der Ätherrückstand (12.6 g) wurde in 140 ccm Methylalkohol gelöst und unter Kühlung trocknes Salzsäuregas bis zur Sättigung eingeleitet. Am andern Morgen wurde im Vakuum bei ca. 40° Wasserbad-Temperatur eingedampft. Der Rückstand wurde mit überschüssiger Sodalösung versetzt und die darin unlöslichen Ester mit Äther ausgezogen (ca. 8.6 g). Sie wurden nach dem Verjagen des Äthers im Vakuum fraktioniert destilliert. Die Hauptmenge (4.5 g) ging scharf bei 162° Innentemperatur über (Ölbad 196—212°). Beim Steigern der Temperatur des Ölbad auf 270° konnte noch ein Nachlauf (1.4 g) aufgefangen werden, der zum Unterschied zur Hauptfraktion die Ehrlichsche Aldehydreaktion ziemlich stark gab. Die Hauptfraktion wurde nochmals im Vakuum über Bariumoxyd destilliert und die Analyse ergab folgende Zahlen.

0.2519 g Sbst.: 0.6269 g CO₂, 0.2013 g H₂O. — 0.2832 g Sbst.: 19.2 ccm N (20°, 725 mm).

C₁₁H₁₇NO₂ (195.15). Ber. C 67.64, H 8.78, N 7.18.

Gef. » 67.87, » 8.94, » 7.43.

Hiernach lag also Trimethylpyrrol-propionsäure-ester vor, der weiterhin durch Überführung in das Pikrat erkannt wurde. 1 g wurde mit 20 ccm 10-prozentiger ätherischer Pikrinsäure versetzt. Beim Reiben und Stehen in Eis schieden sich 1.35 g Pikrat ab. Aus der 5-fachen Menge 96-prozentigen Alkohols umkrystallisiert, schmolz es bei 95—96°. Zur Analyse wurde im Vakuum über P₂O₅ getrocknet.

0.1632 g Sbst.: 19.8 ccm N (19°, 719 mm).

C₁₇H₂₀O₉N₄ (424.2). Ber. N 13.21. Gef. N 13.23.

Von dem Nachlauf wurde ebenfalls 1 g mit 20 ccm Pikrinsäure-Lösung ins Pikrat verwandelt (1.4 g). Aus Alkohol umkrystallisiert, Schmp. 95—96°.

0.1404 g Sbst.: 17.1 ccm N (18°, 721 mm).

C₁₇H₂₀O₉N₄. Ber. N 13.21. Gef. N 13.37.

Trimethylpyrrol-propionsäure aus dem Gemisch von Phono- und Isophonopyrrol-carbonsäureester.

Zum Vergleich mit dem soeben beschriebenen Ester der Trimethylpyrrol-propionsäure wurde dieser nochmals¹⁾ aus den sauren Spaltprodukten des Hämins dargestellt.

¹⁾ Vergl. Fischer und Bartholomäus, H. 83, 68.

40 g des öligen Estergemisches wurden mit 80 g Kalium in 300 g Methylalkohol (absol.) im Autoklaven $4\frac{1}{2}$ Stunden auf $220-230^\circ$ erhitzt. Nach dem Erkalten und Ablassen des Drucks wurde die Reaktionsmasse mit Dampf destilliert, und das Destillat ausgeäthert (ca. 5 g Ätherrückstand). Aus diesem wurden mit 60 ccm 10-prozent. Pikrinsäure-Lösung 4.7 g Pikrat vom Schmp. $112-113^\circ$ erhalten. Nach zweimaligem Umkrystallisieren schmolz es bei $126-127^\circ$, war also Tetramethyl-pyrrol-Pikrat.

0.1410 g Sbst.: 20.2 ccm N (19° , 727 mm).

$C_{14}H_{16}O_7N_4$. Ber. N 15.91. Gef. N 15.80.

Die mit Dampf destillierte alkalische Flüssigkeit wurde angesäuert und ausgeäthert (ca. 36 g Rückstand), in 400 ccm Methylalkohol gelöst und mit Salzsäuregas gesättigt. Der Ester wurde im Vakuum destilliert. Er siedet scharf ohne Vorlauf bei $157-158^\circ$ (Druck 10 mm). Ausbeute 22 g. Noch ein geringer Nachlauf von 2 g ging bis 200° Ölbad-Temperatur über.

Zur Analyse wurde nochmals im Vakuum über Bariumoxyd destilliert.

0.1604 g Sbst.: 0.3974 g CO_2 , 0.1281 g H_2O . — 0.2068 g Sbst.: 13.4 ccm N (20° , 725 mm).

$C_{11}H_{17}NO_2$. Ber. C 67.64, H 8.78, N 7.18.
Gef. » 67.57, » 8.94, » 7.09.

Eine Probe des Esters wurde ins Pikrat übergeführt. Schmelzpunkt nach dem Umkrystallisieren aus der 5-fachen Menge 96-proz. Alkohols $97-98^\circ$. Der Mischschmelzpunkt mit dem obigen analytischen ergab keine Depression.

0.1381 g Sbst.: 0.2440 g CO_2 , 0.0623 g H_2O . — 0.1695 g Sbst.: 20.8 ccm N (19° , 712 mm).

$C_{17}H_{20}O_9N_4$. Ber. C 48.09, H 4.75 N 13.21.
Gef. » 48.19, » 5.05, » 13.25.

Trimethylpyrrol-propionsäure. 14 g des Esters wurden mit 75 ccm Kaliummethylat-Lösung (50 g Kalium in 200 g Methylalkohol) 1 Stunde im siedenden Wasserbade erhitzt. Danach wurde mit Wasser verdünnt und durch Ausäthern etwa unverseiften Ester, sowie der Methylalkohol entfernt. Durch Ansäuern und Ausäthern wurde die freie Säure gewonnen, die nach dem Abdampfen des Äthers als zäher Sirup hinterblieb. Durch Anreiben mit Wasser wurde die Säure fest und ließ sich aus Wasser in schön krystallisierter Form (großen, vielflächigen Prismen) abscheiden, allerdings unter erheblichen Verlusten. Schmelzpunkt der reinen Säure 89° .

Eine Probe wurde ins Pikrat übergeführt, das bei $129-130^\circ$ schmolz, während früher $126-127^\circ$ gefunden worden waren.