

Chromoproteide der Rotalgen. II. Spaltung mit Pepsin und Säuren. Isolierung eines Pyrrolfarbstoffs;

von *Rudolf Lemberg.*

Mit 10 Figuren im Text und 5 Figuren auf Tafel.

[Aus dem Chemischen Institut der Universität Heidelberg.]

(Eingelaufen am 29. November 1929.)

In der ersten Abhandlung¹⁾ über die Chromoproteide der Rotalgen, Phycoerythrin und Phycocyan, war berichtet worden, daß das in Amylalkohol lösliche Produkt der Pepsinspaltung von Phycoerythrin in seinem spektralen Verhalten und in seiner Komplexsalzbildung dem „Urobilin“ ganz analog war. Ein wesentlicher Unterschied zwischen Urobilin und dieser Substanz, die wegen ihrer Urobilin-Reaktionen „Phycobilin“ genannt wurde, war jedoch ihre leichte Löslichkeit in Wasser, ihre Unlöslichkeit in Chloroform und Ather. Ein ähnlicher Stoff wurde nun aus dem Noriphycocyan auf demselben Wege erhalten; er glich entsprechend dem Bilicyanin, einem Oxydationsprodukte des Bilirubins.

Es war nun die Frage, ob diese Analogie mit den Gallenfarbstoffen nur eine zufällige war, wofür die Verschiedenheiten in der Löslichkeit hätten sprechen können, oder ob die letzteren durch sekundäre Faktoren bedingt würden. Die Entscheidung über diese Frage ist von über das Einzelproblem herausragender Bedeutung.

Eine Durchsicht der Literatur zeigt, daß eine ganze Anzahl ähnlicher gallenfarbstoffverdächtiger Pigmente beschrieben ist, von denen viele dem damals isolierten „Phycobilin“ in Löslichkeit und Eigenschaften gleichen. Von anderen, an natives Eiweiß gebundenen, wie dem Crenilabrusblau von v. Zeyneck, war bereits in der ersten Abhandlung die Rede. Häufiger sind jedoch die Pigmente, die durch ihre Löslichkeit in saurer alkoholischer Lösung ausgezeichnet sind. In dem Stoffe, den L. Dor²⁾ aus dem Tegument der Limaxarten er-

¹⁾ A. 461, 46 (1928).

²⁾ C. r. Soc. Biol. 54, 54 (1902).

halten hat und der von Dhéré Rufin genannt worden ist, liegt nach den Untersuchungen von F. N. Schultz¹⁾ und Ch. Dhéré, Chr. Baumeler und A. Schneider²⁾ allerdings kein Gallenfarbstoff vor, aber in beiden Arbeiten finden sich eine ganze Reihe von Zitaten über das Vorkommen solcher Urobilinoide bei Invertebraten. Insbesondere erweisen die Arbeiten von Schultz, daß in den Gehäusen mancher Seesnecken (*Haliotis*, *Turbo*, *Trochus*) sich derartige Pigmente vorfinden. Schultz hat auch schon gezeigt, daß die Reduktion dieser Stoffe mit Natriumamalgam zu „Hydrobilirubin“ führt, und hat daraus mit der Zurückhaltung, die das verschiedene Verhalten gegen Lösungsmittel³⁾ erforderte, auf nahe Verwandtschaft mit den Gallenfarbstoffen geschlossen. Ähnliche Pigmente⁴⁾ sind in Aktinien, in Käferflügeldecken der Coccinelliden (Marienkäferchen), in Mückenlarven⁵⁾, bei Vanessen⁶⁾ (Pfauenaugen) usw. beobachtet worden, aber die Angaben erreichen die von Schultz nicht an Exaktheit. Schließlich sind die grünen und blauen Pigmente in den Vogeleierschalen schon von C. Liebermann⁷⁾ für Gallenfarbstoffe erklärt worden, Stoffe, die auch H. Fischer⁸⁾ bei der Isolierung des Ooporphyrins begegnet sind. Sie sind ebenfalls in Alkohol, nicht in Chloroform löslich und enthalten wahrscheinlich Eiweißreste (hoher Stickstoffgehalt, Schwefelgehalt). Daß sie den Gallenfarbstoffen zum mindesten nahe stehen, hat H. Fischer erwiesen. Ihre eingehendere Untersuchung hat er mir freundlichst überlassen. Auch eine Bearbeitung der oben erwähnten Schneckenschalenpigmente ist beabsichtigt.

Die vorliegende Untersuchung zeigt nun, daß die in saurem Alkohol löslichen, durch die Pepsinspaltung der Rotalgen-Chromoproteide erhaltenen Stoffe Verbindungen von Gallenfarbstoffen oder mindestens ihnen nahe verwandten Pyrrolfarbstoffen mit Eiweißbruchstücken darstellen, die erst durch energische Spaltung mit konz. Säure von letzteren befreit werden können. Man erhält dann in Chloroform lösliche, in Wasser bei neutraler Reaktion unlösliche Stoffe mit dem Verhalten der Gallenpigmente. Es ist dem-

¹⁾ Z. f. allg. Physiol. 3, 91 (1903).

²⁾ C. r. Soc. Biol. 99, 492, 722 (1928).

³⁾ O. v. Fürth, Vgl. Physiol. nied. Tiere, Jena, 1903, S. 528, lehnte eine Analogie des von Dor im *Limax*-Integument beobachteten „Urobilins“ mit diesem allein seiner Wasserlöslichkeit wegen ab.

⁴⁾ Zitate bei Dhéré, a. a. O.

⁵⁾ M. Comas, C. r. Soc. Biol. 96, 866 (1926).

⁶⁾ M. v. Linden, Archiv f. Physiol. 98, 1 (1903).

⁷⁾ B. 11, 606 (1878).

⁸⁾ H. Fischer u. F. Lindner, H. 142, 141 (1925); 145, 206 (1925).

nach zu vermuten, daß es sich bei den angeführten Naturprodukten ebenfalls um Gallenfarbstoff-Abkömmlinge handelt. Eine Reihe von Tatsachen beweist übrigens auch das Vorkommen des Bilirubins¹⁾ in an Eiweiß oder Eiweißbruchstücke gebundener Form in Urin, Galle und Serum. Wenn Schultz eine solche Annahme für die Haliotis-Pigmente als unwahrscheinlich ablehnt, weil selbst Kochen mit verdünnten Säuren kein chloroformlösliches Pigment ergibt, so zeigt die vorliegende Arbeit, daß tatsächlich eine energischere Behandlung zur Spaltung notwendig ist.

Dieses zähe Haften an Eiweiß bedingt auch die besonderen Schwierigkeiten der Untersuchung, zumal es sich herausstellte, daß — ganz im Gegensatz zu den Chromoproteiden selbst — die freigewordenen Farbkomponenten Stoffe sind, deren Labilität die bekannte Veränderlichkeit der Gallenfarbstoffe noch zu übersteigen scheint. Ohne ausgedehnte Vorversuche, bei denen sich wieder die spektrophotometrische Methode bewährte, wäre eine Bearbeitung voraussichtlich erfolglos gewesen. Die Herstellung der Algen-chromoproteide in größerem Umfange, für die beträchtliche Mengen (20 kg) von Algen (japanisches „Nori“) zur Verfügung standen, stößt zwar auf keine prinzipiellen Schwierigkeiten, die Trennung von Phycoerythrin und Phycocyan voneinander ist aber eine sehr langwierige Arbeit und liefert nur allmählich das Ausgangsmaterial nach, von dem dann die Farbkomponente ja wieder nur einen sehr kleinen Teil ausmacht. In zahlreichen Vorversuchen wurden daher mit geringen Substanzmengen die Wege zu einer Isolierung chloroformlöslicher Stoffe gesucht und gleichzeitig die durch die Behandlung erfolgenden Änderungen der Spektren genau beobachtet. Hierbei mußte sich erweisen, ob etwa die energische Behandlung wesentliche Änderungen im spektralen Charakter der Pigmente zur Folge hatte. Neben den Spektren der sauren wäßrigen Lösungen wurden zur Kontrolle auch die sehr charakte-

¹⁾ H. Fischer, H. 95, 78 (1915); F. Reindel, H. 127, 299 (1923); W. Küster, H. 47, 298 (1906); 94, 163 (1915); 95, 45 (1915); R. Sivó u. E. Forrai, Bio. Z. 189, 168 (1927).

ristischen Spektren der komplexen Zinksalze in schwach ammoniakalischer Lösung untersucht. Die Chromoproteide selbst geben zwar die Komplexsalze nicht, diese werden aber schon nach sehr milder Behandlung mit ganz verdünnten Säuren erhalten und bilden somit eine wichtige Eigenschaft der Farbkomponenten, aus deren Verbleib oder Verschwinden sich Schlüsse über das Eintreten weitergehender Veränderungen ziehen lassen. Zur Untersuchung kamen das *Phycoerythrin*, das *Phycocyan* aus *Nori* und das aus *Ceramium*. Das *Nori-Phycocyan* ist, wie sich herausstellte, mit dem *Ceramium-Phycocyan* nicht identisch.

Die Ergebnisse, über die im experimentellen Teil berichtet wird, zeigen, daß zwar Änderungen des Spektrums bei der Behandlung mit starker Salzsäure eintreten, daß aber keine erheblichen Konstitutionsänderungen der Farbkomponenten anzunehmen sind. Farbe, Fluoreszenz und Hauptmaximum der komplexen Zinksalze bleiben unverändert. Das mit warmer konz. Salzsäure behandelte *Nori-Phycocyan* gab nun an Chloroform das weiter unten beschriebene *Phycocyanobilin* ab. „*Phycobilin*“ hatte ich wegen seiner Urobilinreaktion das in der ersten Abhandlung geschilderte Produkt der Pepsinspaltung des *Phycoerythrins* genannt. Nachdem sich gezeigt hat, daß dieser Stoff noch nicht die freie Farbkomponente ist, möchte ich den Namen den letzteren vorbehalten und unterscheide ein *Phycocyanobilin* aus *Phycocyan* und ein *Phycoerythrobilin* aus *Phycoerythrin*.

Sehr eigenartig liegen die Verhältnisse beim *Ceramium-Phycocyan*. Spaltung mit warmer konz. Salzsäure liefert ein in Chloroform lösliches *Phycocyanobilin*, das mit dem aus *Nori-Phycocyan* im Absorptionsspektrum fast identisch ist, dagegen gibt Spaltung mit kalter konz. Säure einen Stoff mit ganz anderer Absorptionskurve, die in der Lage der Maxima völlig einem Gemisch von *Phycocyano-* und *-erythrobilin* gleicht. Das gleiche gilt für die Lage der Maxima des Zinkkomplexsalzes. Dennoch liegt in diesem in Chloroform unlöslichen Pigmente kein solches Gemisch vor, denn beim Erwärmen mit konz. Salzsäure unter Luftabschluß verschwindet das Band, das dem *Phycoerythrobilin* entspricht,

während dieses unter den Bedingungen des Versuchs völlig beständig ist. Es ist also möglich, daß dieselbe Farbkomponente in den beiden Phycocyanen nur in verschiedener Bindungsart vorliegt, oder aber daß die Farbkomponente des Ceramium-Phycocyan sich in der heißen Säure in die des Nori-Phycocyan umlagert. Auf jeden Fall besteht eine ganz nahe Verwandtschaft.

Das wichtigste Ergebnis der spektrophotometrischen Untersuchung brachte die Salzsäurespaltung des Phycoerythrins bei Zutritt von Luftsauerstoff. H. Kylin¹⁾ und Z. Kitasato²⁾ hatten beobachtet, daß Pycoerythrin und sein rotviolettcs Pepsin-Spaltprodukt beim Erwärmen in starker Salzsäure in ein blaues Pigment übergehen. Kitasato hat dessen Ähnlichkeit mit dem Spaltprodukt aus Phycocyan betont und aus dem weiter unten bestätigten Befund von Eiweißbruchstücken in der rotviolettcn in Amylalkohol löslichen „Farbkomponente“ des Phycoerythrins geschlossen, daß der blaue Stoff die eigentliche Farbkomponente des Phycoerythrins sei. Er hat jedoch übersehen, daß dieser Farbwechsel sich nur bei Gegenwart von Luftsauerstoff vollzieht, rasch in der Wärme, langsam auch bei Zimmertemperatur und zwar unabhängig von der Stärke der angewandten Salzsäure. Er ist noch rascher durch kurzes Erwärmen mit Ferrichlorid-Salzsäure³⁾ zu erzielen und besteht in einer mehr oder weniger vollständigen Oxydation des Phycoerythrobilins zum Phycocyanobilin, wie aus der Absorptionskurve sowohl der sauren Lösung wie aus der der Zinkkomplexsalze bewiesen werden konnte. Die quantitative Auswertung der Kurven bei der Oxydation des Phycoerythrobilins ergab, daß in beiden Chromoproteiden Phycocyno- und -erythrobilin im äquivalenten Verhältnis zugegen sein müssen. Während Nori-Phycocyan eine stärkere Absorption besitzt als Phycoerythrin, absorbiert nach der Spaltung Phycoerythrobilin bedeutend stärker als das

¹⁾ H. 69, 169 (1910).

²⁾ Acta phytochimica II 2, 75 (1925).

³⁾ Bei der Oxydation von Bilirubin wirkt Ferrichlorid nach W. Küster, H. 91, 58 (1914) nur als Sauerstoffüberträger.

-cyanobilin. Eine Darstellung des Phycocyanobilins auf diesem Wege stieß jedoch auf Schwierigkeiten.

Durch diese Untersuchung war auch der Weg gewiesen, der zur Isolierung der Farbstoffkomponente führen konnte: Spaltung mit warmer konz. Salzsäure unter peinlichem Luftausschluß bei einer Temperatur von 80—85°. Kochen mit konz. Salzsäure gibt, wie schon in der ersten Arbeit geschildert war, „melanin“-ähnliche Kondensationsprodukte, die zunächst noch in Alkohol löslich sind, später dem „Bilhummin“¹⁾ ähneln, Produkte, wie sie auch von Zeyneck aus dem sicher mit den Algenpigmenten ganz nahe verwandten Crenilabrus-Blau²⁾ erhalten hat. Sie sind durch eine Rotfärbung mit Salpetersäure charakterisiert, die als Rest der Gmelin-Reaktion aufzufassen ist. Die Bildung solcher „Melanoidin“-Vorstufen wurde übrigens, ganz ähnlich wie es R. A. Gortner³⁾ beim Tryptophan fand, stets nur dann beobachtet, wenn noch Eiweißbestandteile zugegen waren. Die reinen Farbkomponenten schwärzen sich bei Kochen mit konz. Salzsäure nicht.

Der genannte Weg führte dann auch bei Nori-Phycocyan zum Ziele. Aus der sauren, intensiv blauen Lösung, die durch die Säurespaltung erhalten wird, läßt sich ein beträchtlicher Teil des Pigmentes in Chloroform aufnehmen, der nach seinem Gewicht nur 1,4 Proc. des Chromoproteids ausmacht. Nach Herauslösen aus der ätherischen Lösung mit $\frac{1}{10}$ -Salzsäure und Aufnehmen in Chloroform scheiden sich beim Umkrystallisieren aus Chloroform-Benzol prismatische und tafelige tiefblaue Gebilde mit intensivem roten Oberflächenschimmer aus, die zuweilen schlecht ausgebildet waren, zuweilen aber deutlich krystallisiert schienen. Da die Untersuchung unter dem Polarisationsmikroskop infolge der zu tiefen Färbung nicht möglich war, wurde von einem Präparat, das allerdings schon einige Zeit aufbewahrt worden

¹⁾ W. Küster, H. 91, 58 (1914); 94, 170 (1915); Staedeler, A. 132, 323 (1864).

²⁾ R. v. Zeyneck, M. 34, 535 (1913).

³⁾ Am. Soc. 42, 632, 821 (1926) und vorhergehende Arbeiten; siehe auch O. Fürth u. F. R. Lieben, Bio. Z. 116, 227 (1921).

war und Spuren der Zersetzung zeigte, ein Debye-Scherrer-Diagramm aufgenommen, das keinen Hinweis auf Krystallstrukturen lieferte. Die Frage muß also vorerst noch offen bleiben, da mir kein unverändertes Material mehr zur Nachprüfung zur Verfügung stand. Die Analysen des Stoffes aus zwei verschiedenen Darstellungen stimmten gut überein. Aus ihnen errechnet sich die Formel $C_{34}H_{44}O_8N_4$, wobei natürlich vorläufig die Zahl der Kohlenstoff- und Wasserstoffatome ebensogut um eins größer oder kleiner sein kann, auch steht eine Molekulargewichtsbestimmung noch aus. Mit der angegebenen Formel stimmt der Methoxylgehalt des Esters, der nicht einwandfrei krystallisiert, überein. Es liegt in ihm wohl ein Gemisch zweier Formen vor.¹⁾ Die Veresterung erfolgt leicht, schon bei Zimmertemperatur mit 5-proc. methylalkoholischer Salzsäure. Die Analyse zeigt, daß 2 Methoxylgruppen vorhanden sind. 4 Sauerstoffatome sind also in 2 Carboxylgruppen enthalten, da die sauren Eigenschaften durch die Veresterung verschwunden sind. Daß jedenfalls keine Verunreinigung durch Bestandteile des Eiweißmoleküls mehr vorliegt, beweist neben den Löslichkeitsverhältnissen die sehr starke Färbung der Substanz (bei Annahme des Molekulargewichts der obigen Formel beträgt der log der Molextinktion 4,3) und der negative Ausfall der Aminostickstoff-Bestimmung nach van Slyke. Das Präparat enthält noch eine Spur Schwefel wie die meisten Gallenfarbstoffpräparate (Relikt von Eiweiß).²⁾ In der wäßrigen Lösung, die nach der Extraktion mit Chloroform zurückbleibt, findet sich der Rest des Chromoproteid-Moleküls als typisches Eiweißhydrolysat.

Das Phycocyanobilin ist ein amphoterer Stoff, einerseits eine ziemlich starke Säure, die von Natriumbicarbonatlösung aus Chloroform aufgenommen wird und leicht zu verestern ist, andererseits eine schwächere Base, deren salzsaure Salze wie die des Bilicyanins³⁾ und des Mesobilirubinesters⁴⁾

¹⁾ Vgl. W. Küster, H. 141, 40 (1924).

²⁾ Staedeler, a. a. O.; H. Fischer, H. 95, 78 (1915).

³⁾ A. Heynsius u. F. F. Campbell, Pflügers Archiv 4, 497 (1871).

⁴⁾ H. Fischer u. G. Niemann, H. 127, 317 (1923).

leicht dissoziieren. Es ist aus der ätherischen Lösung bereits mit dem gleichen Volumen $\frac{2}{10}$ -Salzsäure fast völlig zu extrahieren, besitzt also eine Willstätter-Zahl kleiner als 0,4. Das Pigment ist in Äther ziemlich schwer löslich. Aus Chloroform wird es aber bei ähnlicher Lage des Gleichgewichts erst von etwa 15-proc. Salzsäure aufgenommen. Es spielen eben außer der Basizität des Stoffes hierbei auch die Löslichkeiten des undissoziierten Stoffes und besonders seines Salzes eine Rolle.¹⁾ Phycocyanobilin besitzt deutliche Indicatoreigenschaften, wie sie bei den Oxydationsprodukten des Bilirubins von W. Kerppola und E. Leikkola²⁾ kürzlich untersucht wurden. Es bildet mit Zink- und Kupfersalzen sehr leicht Komplexsalze, so daß die von Willstätter bei der Untersuchung der magnesiumfreien Chlorophyllderivate angewandten Vorsichtsmaßregeln beachtet werden müssen, um eine Verunreinigung der Pigmente zu vermeiden. Die Komplexsalzbildung erfolgt aber nur in ammoniakalischer, neutraler oder höchstens schwach essigsaurer Lösung, gleicht also der der Gallenfarbstoffe und Dipyrromethene³⁾, nicht der Porphyrine. Wie überall bei den komplexen Pyrrolderivaten zeichnen sich die Zinksalze durch besonders schöne Farbe und intensive Fluoreszenz aus.⁴⁾ Die Reindarstellung der Komplexsalze ist vorerst noch nicht gelungen. Daß es sich um Komplexsalze handelt, beweist außer der erheblichen Spektralverschiebung die Tatsache, daß sie auch aus den Estern erhalten werden und dann in Äther und Chloroform, nicht in alkalisch-wässriger Lösung löslich sind. Sie zerfallen mit Mineralsäuren leicht wieder, besonders das Zinksalz, wobei aber das Phycocyanobilin nicht unverändert wiedererhalten wird. Eine weitere charakteristische Eigenschaft der Gallenfarb-

¹⁾ Eine ähnliche Erklärung ist wohl auch für die Tatsache, daß die Porphyrinester eine höhere Willstätter-Zahl besitzen als die Porphyrine, der Erklärung W. Küsters, H. 109, 125 (1920) vorzuziehen.

²⁾ Skand. Arch. f. Physiol. 55, 70 (1928).

³⁾ H. Fischer u. Mitarb., B. 56, 1202, 2319, 2379 (1923); 57, 616, (1924).

⁴⁾ H. Langenecker, H. 115, 1 (1921).

stoffe ist ihre Labilität gegen Oxydantien und der bunte Farbenwechsel, der bei der Oxydation, aber auch infolge noch undurchsichtiger Umlagerungen, so mit Alkalien auch unter Luftabschluß, sich vollzieht und der trotz der gebotenen Farbenschönheit dem chemischen Bearbeiter wenig Freude macht. Er ist auch bei den Phycobilinen in ebenso reichem Maße vorhanden. So verwandelt sich Phycocyanobilin, rascher noch sein Ester, selbst unter Stickstoff allmählich in grüne, schwächer basische Stoffe. Gegen Salpetersäure verhält sich Phycocyanobilin wie Bilicyanin, d. h. es gibt den Rest der Gmelinreaktion über Blauviolett, Rotviolett, Rot nach Gelb.

Es bestehen, wie die folgende Tabelle (S. 204) zeigt, ganz nahe Analogien zu dem Bilicyanin einerseits, dem Mesobiliviolin andererseits. Das Phycocyanobilin ist sicher diesen Stoffen nahe verwandt, kaum mit einem von ihnen identisch. In ihren Eigenschaften bis auf die Löslichkeit ganz ähnlich sind ferner die oben erwähnten, von Schultz aus dem Gehäuse von *Haliotis californiensis* extrahierten Pigmente.

Bei der Gmelin-Oxydation von Phycocyanobilin kann man eine rote Phase erhalten, die in Absorption der sauren Lösung und Farbe, Fluoreszenz und Absorption des komplexen Zinksalzes fast völlig mit dem Phycoerythrobilin übereinstimmt. Da das letztere aber bei Oxydation mit Ferrichlorid in saurer Lösung Phycocyanobilin liefert, kann dessen Oxydationsprodukt nicht mit Phycoerythrobilin identisch sein. Es liegt hier ein Fall vor, in dem das Wiederkehren des Urobilinspektrums¹⁾ in zwei verschiedenen Oxydationsstufen feststeht. Das Band 498 m μ im Mesobiliviolin wäre daher möglicherweise einer Verunreinigung mit einer „Urobilin“- bzw. „Choletelin“-Komponente durch unvollständige oder zu weit gegangene Oxydation zuzuschreiben. Die Erfahrungen bei der Oxydation des Phycoerythrobilins

¹⁾ Dem entsprechen bei Bilirubin die alten Beobachtungen von Stokvis, Zentralbl. f. d. mediz. Wiss. 10, 785 (1872); 11, 211, 488 (1873) völlig, die auch H. K. Barrenscheen u. O. Weltmann, Bio. Z. 140, 273 (1923) im wesentlichen bestätigt haben.

	Phycocyanobilin	Bilicyanin ^{1) 2)}	Mesobiliviolin ³⁾
Entstehung des Pigments	Aus Phycerythrobilin mit FeCl ₃ und Luftsauerstoff in saurer Lösung; aus Phycocyan	Aus Bilirubin mit HNO ₃ ¹⁾ oder Jod ²⁾ ; in Gallensteinen	Aus Mesobilirubinogen mit FeCl ₃ , aus Mesobilirubin d. Luftsauerstoff in saurer Lösung
Farbe der sauren Lösung	blau	blau	blauviolett
Spektrum der sauren Lösung	606 in Chloroform 598 in Salzsäure	598 in verdünnter Schwefelsäure	606, 560, 498 in Chloroform
Farbe der alkalischen Lösung	violett	violett	gelb
Löslichkeit	+ : Chloroform, Alkohol ÷ : Wasser, Benzol, Ligroin	+ : Chloroform, Alkohol ÷ : Wasser	+ : Chloroform, Alkohol ÷ : Wasser, Benzol, Ligroin
Analyse	C ₃₁ H ₄₄ N ₄ O ₈	C ₃₃ H ₃₆ N ₄ O ₈	C ₃₃ H ₄₀ N ₄ O ₈
Zinksalz:			
Farbe	grünblau	grünblau	
Fluorescenz	rot	rot	grün
Spektrum	632, 585	642, 586 ²⁾ 639, 584, 509 ¹⁾	626, 574, 508 ⁴⁾
Oxydation	Gmelin + in Alkali grün	Gmelin +	in Alkali grün

lassen eine solche Beimengung ebenfalls glaubhaft erscheinen. Das Bilicyanin nach Fischer zeigt dieses Band auch, nicht aber das durch vorsichtige Oxydation von Bilirubin mit Jod erhaltene Bilicyanin Barrenscheens. Das weiter

¹⁾ H. Fischer u. Mitarb., H. 150, 44 (1925). Bei Heynsius u. Campbell, Pflügers Archiv 4, 497 (1871) sind die Zinkstreifen (irrtümlich?) weiter im Rot beobachtet worden.

²⁾ H. K. Barrenscheen u. O. Weltmann, Bio. Z. 140, 273 (1923).

³⁾ H. Fischer u. G. Niemann, H. 127, 317 (1923); 137, 293 (1924).

⁴⁾ Die von H. Fischer u. G. Niemann, H. 146, 196 (1925) für das (oxydierte) Mesobilirubin-Kupfer angegebenen Banden: 635 und 580 mμ wären nach ihrer Lage ebenfalls dem Mesobiliviolin zuzuschreiben.

oben behandelte Verhalten des Ceramium-Phycocyans läßt es freilich auch möglich erscheinen, daß ein solches Spektrum doch von einer Substanz gegeben wird. Man müßte dann annehmen, daß in der betreffenden Verbindung die beiden („Bilicyanin“- und „Urobilin“-)Absorptionszentren in einem Moleküle vereinigt sind. Es bleiben auch die Abweichungen im Maximum der sehr charakteristischen scharfen Zinkbande, die eine Verschiedenheit der drei Pigmente beweisen. Da die Kurve nach beiden Seiten vom Maximum ziemlich steil abfällt, dürfte auch der Unterschied, der aus der Anwendung verschiedener Methoden (spektrophotographische bei H. Fischer und Barrenscheen, spektralphotometrische bei mir) resultiert, kaum ins Gewicht fallen; in diesem Gebiete würde auch eine „Urobilin“-Beimengung keine Verschiebung verursachen, da das letztere hier fast gar nicht absorbiert.

Versucht man *Phycoerythrin* auf dem beim Phycocyan angewandten Wege zu spalten, so stellt sich eine doppelte Schwierigkeit dem entgegen, die Schwerlöslichkeit des Chromoproteids in der konzentrierten Säure und die anscheinend geringere Chloroform-Löslichkeit der Farbkomponente. Es gelingt jedenfalls so nur einen kleinen Teil des Pigments in Chloroform zu bringen. Amylalkohol nimmt zwar nun sofort das ganze Pigment auf und dieses verteilt sich beim Waschen nicht zwischen Amylalkohol und Wasser wie das unten beschriebene Produkt der Pepsinspaltung, aber Amylalkohol ist aus mehreren Gründen kein geeignetes Lösungsmittel. Es wurde daher die Alkoholyse mit methylalkoholischer Salzsäure anzuwenden versucht. Diese liefert unter Zurücklassen eines erheblichen ungelösten Eiweißrückstandes einen wesentlichen Teil des Pigments als chloroform-löslichen Methylester, aber ebenfalls nicht rein. Darauf deuten die Analysen, die spezifischen Extinktionen, die niedriger sind als beim Phycocyanobilin, aber höher sein sollten (vgl. S. 199)¹⁾ und der positive Ausfall der Bestimmung des Aminostick-

¹⁾ Sie sind auch niedriger als die von D. Charnas, Bio. Z. 20, 401 (1909) für die reinsten Urobilin-Präparate ermittelten Werte.

stoffs nach van Slyke.¹⁾ Immerhin nähern sich doch die Analysenwerte merklich denen des Phycocyanobilins.

Der Phycoerythrobilin-methylester gleicht in jeder Hinsicht dem „Urobilin“. Auch die Lage der Maxima und die Verschiebung bei der Zinkkomplexsalzbildung entspricht völlig den von L. Lewin und E. Stänger²⁾ für „Urobilin“ gefundenen (495 m μ , 510 m μ). Die Verschiebung des Hauptmaximums bei der Komplexsalzbildung ist weit geringer als beim Phycocyanobilin. Die Komplexsalze bilden sich und zerfallen unter den gleichen Bedingungen wie beim Phycocyanobilin. Die Gmelin-Reaktion ist negativ. Das Phycoerythrobilin zersetzt sich sehr leicht, so wird es durch Einwirkung des Luftsauerstoffs auf die saure Lösung zu Cyanobilin oxydiert. Aber auch unter Luftausschluß verändert sich der Stoff, ohne daß die Ursachen zu ermitteln sind. Mit Salzsäure bildet der Ester wie das Phycocyanobilin leicht hydrolysierende Salze; während nun der unveränderte Stoff schon mit $n/_{10}$ -Salzsäure aus einer Ätherlösung mit rotvioletter Farbe herausgelöst wird, bleiben nach längerem Aufbewahren stets noch braune Anteile im Äther, die auch nicht in 10-proc. Salzsäure hineingehen. Zuweilen wurde auch in saurer Lösung eine Umfärbung nach Blau unter Auftreten eines Stoffes mit anderen charakteristischen Spektralerscheinungen beobachtet. Es gelang infolge dieser Labilität des Stoffes daher nicht, ihn zu reinigen. Nach der Abtrennung eines in Benzol unlöslichen Anteils war der Rest im oben geschilderten Sinne verändert; die Analyse ergab nun zwar den für zwei Carboxymethyle zu erwartenden Methoxylwert, aber der Kohlenstoffgehalt war gesunken. Eine Krystallisation war nicht zu erreichen.

Es scheint bei der weitgehenden Ähnlichkeit mit „Urobilin“ nicht zu gewagt, aus den Erfahrungen bei der Bearbeitung des Phycoerythrobilins auch Schlüsse für die Chemie des ersteren zu ziehen. Bei

¹⁾ W. Küster u. G. Fr. Koppenhöfer haben bei der Alkoholyse des Hämins ebenfalls Produkte unvollständigen Abbaus erhalten. H. 170, 106 (1927).

²⁾ Pflügers Archiv 144, 279 (1912).

dem Rotstreifen, den Mesobilirubinogen nach H. Fischer¹⁾ mit alkalischer Kupferlösung gibt, und den Rotorangestreifen bei Zinksalzen anoxydierter „Urobilinpräparate“²⁾, handelt es sich wohl um eine ähnliche Oxydation, die noch über die Urobilinstufe hinausführt. Außer der Labilität des Stoffes, die es bedingt, daß ein einheitliches Urobilin überhaupt nicht erhalten werden kann, bildet eine bisher nicht erkannte Quelle von Unklarheiten in der Urobilinchemie eine unbeabsichtigte Komplexsalzbildung. Diese tritt bereits mit Metallsuren so leicht ein, daß besondere Vorsichtsmaßnahmen dazu gehören, eine neutrale, unveränderte Lösung des Phycoerythrobilins zu erhalten. In den üblichen Spektralphotometer-Röhren mit Messing oder Kupferverschraubungen erfolgt sehr rasch ein Farbumschlag unter Komplexsalzbildung, wie er aufmerksamen Beobachtern auch nicht entgangen ist³⁾, ohne daß sie die Ursache angeben konnten. Das Eintreten und Ausbleiben dieser Reaktion, je nach zufälligem Fehlen oder Vorhandensein genügender Zink-⁴⁾ oder Kupferspuren hat eine Fülle widersprechender Befunde verursacht, so die Unklarheiten über das „alkalische“ Urobilinspektrum⁵⁾ und über die Unterschiede von „normalem“ und „febrilem Urobilin“.⁶⁾ Ohne Zinkgehalt grün fluoreszierende Lösungen sind mir nur bei den Endstufen der Gmelin-Reaktion (hier auch in saurer Lösung blaugrüne Fluoreszenz) begegnet.

Die leichte Veresterbarkeit des Urobilins ist bei manchen Darstellungsmethoden nicht beachtet worden, oft auch nicht die große Labilität, insbesondere dem Luftsauerstoff gegenüber.

Daß die Urobilin-Reaktion eine Gruppenreaktion ist hat H. Fischer gezeigt⁷⁾, ebenso daß das Harn-Urobilin kein chemisches Individuum ist. Aber es scheint mir möglich, vom ausgezeichnet definierten Phycoerythrin aus *ein* defi-

¹⁾ H. Fischer u. P. Meyer, H. 75, 339 (1911); u. F. Röse, H. 82, 391 (1912).

²⁾ Vgl. d. Zusammenstellg. in Kayzers Handbuch der Spektroskopie, 4, 164—172 (1908) u. Fr. Meyer-Betz, Ergebn. d. inn. Mediz. u. Kinderheilkd. 12, 733 (1913).

³⁾ Vgl. z. B. Formánek's Beobachtung bei Pröscher, H. 31, 520 (1900/01), auch A. E. Garrod u. F. G. Hopkins, Journ. of Physiol. 20, 112 (1896).

⁴⁾ R. E. Lutz, Journ. Ind. Hyg. 7, 273 (1925) hat eine Mikro-Zinkbestimmung mit Urobilin vorgeschlagen.

⁵⁾ D. Charnas, Bio. Z. 20, 401 (1909), stellte die Unabhängigkeit des „alkalischen“ Spektrums von der Reaktion bereits fest.

⁶⁾ Mac Munn, Proc. Roy. Soc. B. 31, 206 (1881). A. E. Garrod u. F. G. Hopkins, a. a. O., u. a.

⁷⁾ H. 75, 232 (1911).

niertes Urobilin zu fassen, wenn der Versuch auch vorerst noch nicht geglückt ist. Jedenfalls muß es leichter sein, auf diesem Wege zu einem Resultate zu gelangen, als eine unter teilweiser Verharzung verlaufende Oxydation wie die des Mesobilirubinogens irgendwo abzustoppen. Den Eindruck einer solchen „Pyrrolschmiere“ macht das Phycoerythrobilin jedenfalls nicht. Bemerkenswert ist, daß die Oxydation mit Salpetersäure beim Phycoerythrobilin andere Wege führt wie die mit Eisenchlorid. Es wäre in diesem Zusammenhange interessant, zu sehen, ob die Eisenchlorid-Oxydation wie aus Mesobilirubinogen, so auch aus Urobilin Mesobiliviolin liefert. Denn *das* Urobilin, das zunächst aus Mesobilirubinogen entsteht und das rückwärts in dieses zu verwandeln ist, dürfte dem Phycoerythrobilin parallel stehen wie das Mesobiliviolin dem Phycocyanobilin. Eine chemische Deutung für diese komplizierten Verhältnisse zu geben, scheint mir bei dem jetzigen Stande unserer Kenntnisse gerade dieser Gallenfarbstoffgruppen noch nicht möglich.

Trotz der vielen und deutlichen Hinweise auf eine Verwandtschaft mit den Gallenfarbstoffen fehlte jedoch noch ein Nachweis der Pyrrolkerne. Z. Kitasato¹⁾ hat vergeblich versucht, durch Reduktion seiner „blauen Farbkomponente“ mit Jodwasserstoff-Eisessig Pyrrolkörper zu erhalten. Gründe des Mißlingens mögen zum Teil die noch starke Verunreinigung der an sich schon sicher nicht erheblichen Menge des Ausgangsmaterials mit anderen Begleitstoffen gewesen sein, vielleicht war auch die Reduktionsdauer zu kurz — Gallenfarbstoffe sind sehr schwer total zu reduzieren²⁾ —, der Hauptgrund ist jedoch wohl das Unterlassen der Untersuchung der Säurefraktion. Die Ausbeuten an der Basenfraktion sind bei der reduktiven Spaltung der Gallenfarbstoffe relativ gering und sie entging auch hier zunächst der Beobachtung.³⁾ Ich erhielt bereits bei den vorläufig nur mit geringen Mengen als Vorversuche an-

¹⁾ *Acta phytochimica* II 2, 90 (1925).

²⁾ H. Fischer u. H. Röse, *B.* 45, 1579 (1912).

³⁾ Dieselben, *B.* 45, 3274 (1912).

gestellten Reduktionen ein positives Resultat. Nach Reduktion des Phycocyanobilins in Jodwasserstoff-Eisessig lassen sich aus dem alkalisch gemachten Rückstande geringe Mengen von Pyrrolbasen mit Wasserdampf übertreiben. Das Destillat gibt schwache, aber deutlich positive Ehrlich-Reaktion. Weit stärker als in der Basenfraktion ist diese in der zurückbleibenden Säurefraktion, die sich in zwei Fraktionen trennen läßt, deren eine stark positive, deren andere keine Ehrlich-Reaktion gibt, also etwa der Bilirubinsäure entspricht. Es gelang aber vorläufig nicht, aus der sehr geringen Menge Bilirubinsäure zu isolieren. Die partielle Aufspaltung zu Bilirubinsäure wie die Untersuchung, ob nur Kryptopyrrol und Kryptopyrrolcarbonsäure vorliegen oder auch andere Pyrrolbasen und -säuren muß einer weiteren Untersuchung mit größeren Materialmengen vorbehalten bleiben.

Die Reduktion von Phycocyanobilin mit Natriumamalgam in einer Stickstoffatmosphäre verläuft ebenfalls sehr langsam.¹⁾ Die nach 20 stündigen Schütteln erhaltene Lösung gibt intensive Ehrlich-Reaktion. Das daraus isolierte, in minimaler Menge und noch nicht rein erhaltene Chromogen oxydierte sich an der Luft wie Mesobilirubinogen zu einer Substanz, die alle Urobilinreaktionen gab. Die Versuche werden mit größeren Materialmengen fortgesetzt werden. Das Phycocyanobilin ist leider in größerer Menge sehr schwer zu erhalten, da Phycocyan nur etwa $\frac{1}{4}$ der Gesamtpigmente von *Nori* ausmacht; die bisher nicht gelungene Isolierung des Phycoerythrobilins wäre deshalb sehr wesentlich.

Wieweit diese Verwandtschaft mit den Gallenfarbstoffen im einzelnen geht, wird die weitere Untersuchung, mit der ich beschäftigt bin, zu zeigen haben. Die spektralphotometrische Methode unter Heranziehung der Spektren der Komplexsalze dürfte meiner Ansicht nach auch bei der Untersuchung der Oxydationsprodukte des Bilirubins, wie sie z. B. in der Gmelin-Reaktion auftreten, wegweisende Dienste leisten. Es ist schon mehrfach, so von Schultz

¹⁾ Ebenso wie die Reduktion des Urobilins: D. Charnas, a. a. O.

(a. a. O.) darauf hingewiesen worden, daß einige dieser Oxydationsprodukte wie Bilicyanin, Choletelin charakteristische Absorptionsbanden zeigen. Ein Versuch, diese Stoffe zu isolieren, wird jedenfalls fruchtbarer sein, als jedes Gemisch mit besonderem Farbton mit einem eigenen Namen zu belegen.¹⁾ Die Urobilin-, Bilicyanin- und Choletelin-Pigmente bilden eine besondere Gruppe der Gallenpigmente, die sich deutlich von der Bilirubin-Mesobilirubingruppe (keine selektive Absorption im sichtbaren Licht, andere Verhältnisse bei der Komplexsalzbildung²⁾ und der Biliverdingruppe unterscheidet.

Ein Porphyrinspektrum oder ein komplizierteres Spektrum von der Art der magnesiumfreien Chlorophyllderivate wurde während der ganzen Untersuchung nicht beobachtet, eine Komplexsalzbildung in Eisessig tritt nicht ein, die Phycobiline fluorescieren in saurer Lösung nicht. Mit irgendwelchen Chlorophyllderivaten, Chlorinen, Rhodinen und Verdinen³⁾ besteht keine Ähnlichkeit. Für die Anwesenheit von Phytol, das bei der Behandlung abgespalten werden würde, ergeben sich keine Hinweise.

Nachdem nun die Farbstoffkomponenten und ihre Eigenschaften bekannt sind, lassen sich die Verhältnisse bei der *Pepsinspaltung* leichter übersehen. Es ist dabei zu bedenken, daß sie durchgeführt wurde, bevor die Luftempfindlichkeit der Pigmente erkannt war. Die Pepsinspaltung liefert einen auffallend hohen Prozentsatz in Alkohol bei schwach saurer Reaktion löslicher Peptone, das „Phycobilin A“ der ersten Mitteilung. Mit Amylalkohol ist aus der wäßrigen schwach salzsauren Lösung nur ein Teil des Pigments zu extrahieren. Der nur in Wasser lösliche und der in Amylalkohol übergehende, sich zwischen Amylalkohol und Wasser verteilende Anteil zeigen gleiche Farbe und fast gleiches Absorptions-

¹⁾ Vgl. W. Kerppola u. E. Leikkola, Skand. Arch. 55, 70 (1928).

²⁾ Die Frage der Komplexsalzbildung des Bilirubins und Mesobilirubins ist noch nicht völlig geklärt. Mit Zink erfolgt keine Komplexsalzbildung [H. Fischer, Z. f. Biol. 65, 103 (1915)], anscheinend aber mit Kupfer, vielleicht jedoch erst nach einer Oxydation, vgl. aber W. Küster, H. 149, 30 (1925).

³⁾ H. Fischer, A. Treibs u. H. Helberger, A. 466, 243 (1928).

spektrum und geben beide bereits die Zinkreaktion. Auch der in Amylalkohol lösliche Anteil, die „rotviolette Farbkomponente“ Kylin's, enthält noch Eiweißbruchstücke, wie Kitasato bereits gezeigt hat. Er gleicht in seinen Löslichkeitsverhältnissen den oben erwähnten Naturprodukten. Da das nach der Spaltung mit heißer Salzsäure völlig in Amylalkohol gehende Pigment blau gefärbt war und eine dem blauen Pepsinspaltprodukte des Phycocyans ähnliche Absorptionskurve zeigte, zog Kitasato den Schluß, daß dieses die eigentliche Farbkomponente auch des Phycoerythrins sei und daß das Phycoerythrin ein kompliziertes Produkt: blaue Farbstoffkomponente + „Aminokörper“ + Eiweiß sei, das der Zwischenlagerung des Aminokörpers seine andere Farbe verdanke. Wie oben schon auseinandergesetzt, ist ihm die Einwirkung des Luftsauerstoffs bei der Umfärbung des Phycoerythrin-Spaltproduktes entgangen. Ferner gibt das Phycocyan, wie auch Kylin schon feststellte, bei der Pepsinspaltung ebenso wie Phycoerythrin Zwischenprodukte, die sich zwischen Amylalkohol und Wasser verteilen und die Aminostickstoff enthalten. Die abgestuften Löslichkeitsverhältnisse der bei der Pepsin- und Säurespaltung erhaltenen Pigmente: 1. Nur wasserlöslich, 2. wasser- und amyalkohollöslich, zwischen beiden Lösungsmitteln verteilbar, mit Äther aus Amylalkohol gefällt, 3. in Amylalkohol löslich, nicht mit Wasser daraus extrahierbar (nicht etwa schon veresterte Produkte), nicht mit Äther aus Amylalkohol fällbar, in Chloroform unlöslich, 4. in Chloroform und Äther, wenn auch schwer löslich (freie Farbstoffkomponente) — zeigen, daß in 1.—3. Stoffe vorliegen, in denen die Farbkomponente noch an einen größeren oder kleineren Polypeptidrest gebunden¹⁾ ist. Diese Annahme schließt nicht aus, daß in diesen Produkten auch noch ungefärbte Eiweißbruchstücke als Verunreinigungen enthalten sind. Welcher Art die Bindung der Farbkomponenten an die Eiweißbestandteile

¹⁾ Kitasato findet im Gegensatz zu meinen Beobachtungen in der in Amylalkohol löslichen „blauen Farbkomponente“ keinen Aminostickstoff, aber der viel zu hohe Stickstoffgehalt (12,0 Proc. gegen 8,9 Proc. meines Esters) läßt schon auf Eiweißbeimengungen schließen.

ist, läßt sich noch nicht sagen. Die Festigkeit der Bindung läßt eher an eine strukturchemische Bindung (etwa eine Peptidbindung der Carboxylgruppen der Farbstoffkomponente an Aminogruppen des Eiweiß) denken. Eine solche hat auch von Zeyneck für das Crenilabrus-Blau, bei dem die Verhältnisse ganz parallel liegen, diskutiert. In Frage käme noch eine Molekülbindung, wie sie W. Küster¹⁾ zwischen Bilirubin und Aminosäuren beobachtet hat, oder eine salzartige Bindung. Die Bindung des Bilirubins an Eiweißkolloide des Serums, die R. Sivó und E. Forrai²⁾ beobachtet haben, ist jedenfalls leichter aufzuspalten als die der Chromoproteide. Die Verhältnisse liegen also ganz anders wie beim Hämoglobin, bei dem schon bei milder Einwirkung von Säuren die Farbkomponente abgespalten wird. Aber freilich hat hier H. Waelsch³⁾ gezeigt, daß bei der Alkalisplaltung eisenärmere Hämatine entstehen, in denen noch Prolin und Alanin enthalten sind, während bei Phycocerythrin und Phycocyan gerade milde Behandlung mit Alkalien leichte Abspaltung der Farbkomponente aus den Chromoproteiden bewirkt, bei der jedoch die Farbkomponente infolge der bei Gallenfarbstoffen bekannten Labilität gegen Alkali⁴⁾ in grüne Pigmente verwandelt wird. Es ist mir übrigens nicht gelungen, so zu der Eiweißkomponente zu gelangen, die Kitasato untersucht hat. Es wird noch weiterer Versuche bedürfen, um eine endgültige Klärung der Frage herbeizuführen, die ja auch beim Hämoglobin noch aussteht.⁵⁾ Wahrscheinlich sind an der Bindung der Farbkomponente im Chromoproteid auch die Pyrrol-Iminogruppen irgendwie beteiligt, da die Chromoproteide die Zinkreaktion nicht geben; sicher aber ist diese Bindung nicht die einzige, denn die Zinkreaktion taucht ja schon bei milder Behandlung mit Säuren auf.

¹⁾ W. Küster, H. 141, 40 (1924).

²⁾ a. a. O. ³⁾ H. 168, 188 (1927).

⁴⁾ W. Küster, H. 59, 63 (1909) u. a.

⁵⁾ Am wahrscheinlichsten ist hier koordinative Bindung des Globins an das Eisen, vgl. F. Haurowitz, H. 182, 82 (1929) (dort auch d. and. Lit.) und R. Hill, Proc. Roy. Soc. London B, 100, 419 (1926). Die von R. Hill u. F. Holden beobachtete Bindung von Porphyrinen an Globin, Bio. Journ. 20, 1326 (1926), ist nach Haurowitz nicht anzunehmen.

Das *Phycocyan* aus *Nori* unterscheidet sich von dem in der ersten Abhandlung genauer untersuchten *Phycocyan* aus *Ceramium* durch das Fehlen der zweiten schwächeren Bande und seine größere Löslichkeit und kommt in zwei ineinander überführbaren Formen vor, von denen eine dem *Ceramium-Phycocyan* ähnelt und zunächst mit ihm verwechselt wurde. Das Chromoprotein ist wahrscheinlich mit dem „grünblauen *Phycocyan*“ H. Kylins¹⁾ aus *Batrachospermum* und dem von K. Boresch²⁾ aus *Cyanophyceen* erhaltenen identisch. Welches Pigment Kitasato in Händen hatte, ist schwer zu sagen, wahrscheinlich ebenfalls das „blaugrüne“. Dafür sprechen Löslichkeit, Krystallform und die Abbildung des Absorptionsspektrums auf Tafel 8, Fig. 3.³⁾ Allerdings ist in der Gegend des zweiten Maximums des *Ceramium-Phycocyanins* in Fig. 1 ein schwacher Schatten wahrnehmbar. Vielleicht lag also ein Gemisch von *Nori*- und *Ceramium-Phycocyan* vor.

Nach den Ergebnissen der Elementaranalyse der Chromoproteide und der Gleichheit der Stickstoffverteilung (von Kitasato nach der van Slyke-Methode bestimmt), wäre auf die gleiche Eiweißkomponente in *Phycocerythrin* und *Phycocyan* zu schließen. Dafür, daß sie in ihrer Molekülgröße (genauer in der Größe des mit einem Molekül der Farbkomponente verbundenen Eiweißrestes) gleich oder sehr ähnlich sind, sprechen die Ergebnisse der spektrophotometrischen Untersuchung der oxydativen Spaltung des *Phycocerythrins*. Daß aber eine Identität nicht anzunehmen ist, beweist die Tatsache, daß *Phycocyan* erheblich leichter denaturierbar ist als *Phycocerythrin*. Die Chromoproteide lassen sich nach ihrem kolloidchemischen Verhalten etwa den Pflanzenglobulinen zuordnen, sind aber relativ leicht koagulierbar und sehr leicht aussalzbar; sie sind auch in schwach salzhaltiger Lösung am isoelektrischen Punkt (bei *Phycocerythrin* 4,2—4,4 p_H) fällbar und in verdünnter Neutralsalzlösung nach Ausfällen durch Dialyse unlöslich, aber löslich in

¹⁾ H. 76, 396 (1912).²⁾ Bio. Z. 119, 167 (1921).³⁾ Acta phytochimica II 2 (1925).

Spuren von Alkali. Sie ähneln also hierin den Glutelinen Osbornes.¹⁾

Auffallend ist die im Verhältnis zu den metallsalzfreien Farbkomponenten ungleich stärkere Fluoreszenz der Chromoproteide. Eine nochmalige Überprüfung des Metallgehalts nach länger fortgesetzter Dialyse durch Veraschung hat eine noch geringere Menge von Asche (Calciumsulfat) ergeben, als damals gefunden wurde. Daß die Stärke der Fluoreszenz der Chromoproteide mit dem kolloiden Verteilungszustand zusammenhängt, wurde bereits in der ersten Abhandlung belegt; ein analoger Fall ist die starke Fluoreszenz des Bilirubins und Mesobilirubins in kolloider Lösung mit Taurocholsäure.²⁾ Während die Chromoproteide selbst gegen Luftsauerstoff im Dunkeln und im schwach diffusen Licht recht beständige Körper sind, sind die Spaltprodukte, besonders die freien Farbkomponenten gegen Luftsauerstoff und Licht³⁾ sehr empfindlich; der kolloide Träger übt also hier eine Schutzwirkung aus, wie sie Sivó und Forrai (a. a. O.) auch bei dem an die Serumproteine gebundenen Bilirubin beobachteten und wie sie ja aus der Enzymchemie bekannt ist.

Woher stammen diese eigenartigen Pigmente nun? Am nächstliegenden scheint mir die Umbildung des Chlorophylls oder die Entstehung aus einer unbekannten Vorstufe des Chlorophylls. Die bisherigen Beweise für ein Entstehen von Gallenfarbstoffen aus Chlorophyll sind allerdings sämtlich unzulänglich, da die Möglichkeit eines Abbaus bis zu den Pyrrolen und die Bildung des „Urobilins“ durch deren Reoxydation nicht ausgeschlossen wurde. J. B. Conant und I. F. Hyde⁴⁾ haben nun in einer mir im Original noch nicht vorliegenden Arbeit die Darstellung eines Gallenfarbstoffes durch Reoxydation eines durch katalytische Hydrierung von Phytorhodin g in Eisessig dargestellten Chromogens beschrieben, während Phytochlorine und die Phaeophorbide

¹⁾ T. B. Osborne, *Ergebn. d. Physiol.* 10, 62 (1910).

²⁾ H. Fischer u. G. Niemann, *H.* 127, 317 (1923).

³⁾ Über die Lichtempfindlichkeit von Bilirubin siehe W. Kerpola u. E. Leikkola, *Skand. Arch. f. Physiol.* 55, 76 (1928).

⁴⁾ C. 1929, II, 1928.

Porphyrinogene liefern. Eine Schwierigkeit in der Ableitung aus Chlorophyll würde das Vorhandensein eines Furan-Ringes bedeuten, der parallel zu den Gallenfarbstoffen¹⁾ anzunehmen wäre, da die Pigmente selbst mit p-Dimethylaminobenzaldehyd und Diazobenzolsulfosäure nicht reagieren. Ein solcher Ring ließe sich aus den gesättigten Seitenketten des Chlorophylls schlecht ableiten. Es muß aber der weiteren Untersuchung der Farbkomponenten vorbehalten bleiben, diese Frage zu entscheiden. H. Fischer sprach kürzlich die Vermutung aus²⁾, daß die Algen-Chromoproteide eine frühere Entwicklungsstufe des Chlorophylls auf dem Wege vom Koproporphyrin zum Chlorophyll darstellen. Diese Annahme bestätigen die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung nicht. Es ist übrigens auch in den Cyanophyceen Chlorophyll schon vorhanden und Träger der Assimilation, den Algen-Chromoproteiden fällt wohl nur die Rolle von Hilfssensibilatoren zu. Dagegen scheint mir eine Bildung aus den Zellhäminen durchaus diskutabel zu sein, die die oben angedeutete Schwierigkeit umgehen würde.

Die bekannte Variabilität und Labilität der Gallenfarbstoffe macht sie für die Umwandlungen geeignet, die in einigen Algen als komplementäre chromatische Adaptation beobachtet sind. Das Verhältnis, in dem Phycocyno- und -erythrobilin zueinander stehen, macht die Mitwirkung photooxydativer Prozesse hierbei wahrscheinlich. Auch die Bindung der Pigmente an Eiweiß erhält einen Sinn als Schutz gegen die allzu große Angreifbarkeit der Pigmente, z. B. durch den Sauerstoff. Sie werden so festgelegt, sind aber doch, vielleicht durch spezifische Enzyme, wieder mobilisierbar, deren Vorhandensein oder Fehlen erklären könnte, daß die Adaptationsfähigkeit nur bei einigen Algenarten vorhanden ist. Ein Beweis für diese Hypothese wäre freilich noch zu erbringen.

Der Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft, die diese Arbeit durch Gewährung eines Forschungsstipendiums und eines Kredites unterstützte, sei auch an dieser Stelle bestens gedankt.

¹⁾ H. Fischer u. A. Hahn, H. 91, 175 (1924).

²⁾ A. 475, 252 (1929).

Experimenteller Teil.

Nori-Phycocyan.

Die Darstellung des Pigments wurde in der ersten Arbeit geschildert. Die Trennung der Noripigmente durch fraktionierte Lösung gelingt ebenfalls, wenn man die bedeutend größere Löslichkeit des Nori-Phycocyans benutzt und zunächst sehr kleine Wassermengen zur Lösung des Gemisches anwendet; es bleibt hier das Phycoerythrin im Rückstand sofort fast frei von Phycocyan. Aus den Rohlösungen scheidet sich das Phycocyan in Gestalt flacher Nadeln (vgl. Tafel, Fig. 1) ab, die oft eigenartige gesetzmäßig verwachsene Aggregate (vgl. Tafel, Fig. 2) bilden. Sie gehen bei mehrfacher fraktionierten Umfällen mit Ammonsulfat in derbere prismatische bis rhombenförmige Krystalle über (Tafel, Fig. 3). Die letzteren weichen jedoch vom Ceramium-Phycocyan (Tafel, Fig. 5) in der Löslichkeit, Absorption und Krystallform ab. Nori-Phycocyan ist leichter, Ceramium-Phycocyan schwerer löslich als Phycoerythrin. Ersteres besitzt nur ein Maximum bei 613 $m\mu$, letzteres daneben noch ein geringeres bei 550 $m\mu$. Die Nadel- und Rhombenform des Noripigments unterscheiden sich in Absorption der Lösung und in der Löslichkeit nicht voneinander. Sie gehen beim Umfällen mit Ammonsulfat wechselseitig ineinander über, indem die Rhombenform sich aus Lösungen geringerer (bis etwa 10 Proc. der Sättigung), die Nadelform aus solchen größerer Konzentration an Ammonsulfat ausscheidet. Es treten auch gesetzmäßige Verwachsungen der Nadeln und Rhomben auf (Tafel, Fig. 4).

Herrn Prof. Erdmannsdörfer bin ich für die folgende krystallographische Untersuchung zu Dank verpflichtet:

I. Nori-Phycocyan.

„Farbe der Krystalle (nach Ostwald): etwa *pc*, U-blau 14.“

Form und Optik: a) *Prismen- und Nadelform.* Rechtwinklige Tafeln, nicht selten dünnadlige Krystalle nach γ' gestreckt. Bisweilen sind dünne Nadeln in „gestrickten Aggregaten“ unter 60° miteinander verwachsen. Auslöschung gerade:

α' violettrot (Ostwald *ic*, Veil 11),

γ' tiefblau (Ostwald *pc*, Veil 11).

Doppelbrechung schwach.

Äußerst dünne Nadeln zeigen hellblaue Farbe (*ic*, Eisblau 16) und keinen Pleochroismus.¹⁾

Es ist fraglich, ob die gleiche Substanz vorliegt.

¹⁾ Nach meinen Beobachtungen ist Pleochroismus auch bei der Prismen- und Rhombenform von Nori-Phycocyan nur zuweilen wahrnehmbar und stets viel schwächer als beim Ceramium-Phycocyan.

Rudolf Lemberg.
Chromoproteide der Rotalgen. II.

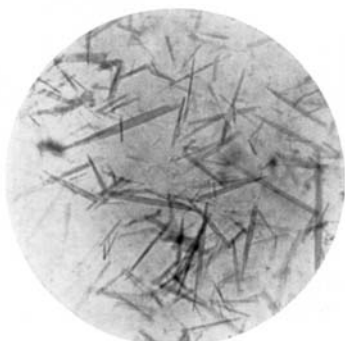


Fig. 1.
Nori-Phycocyan, Nadelform.

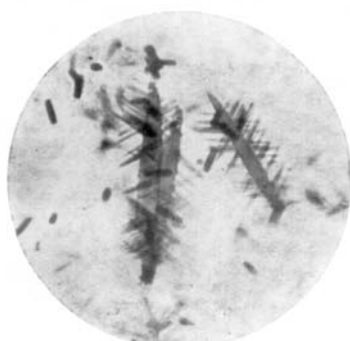


Fig. 2. Nori-Phycocyan,
Nadelform und Phycocerythrin.

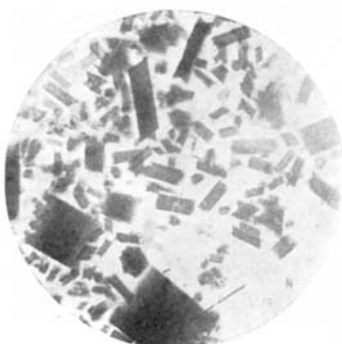


Fig. 3.
Nori-Phycocyan, Prismenform.

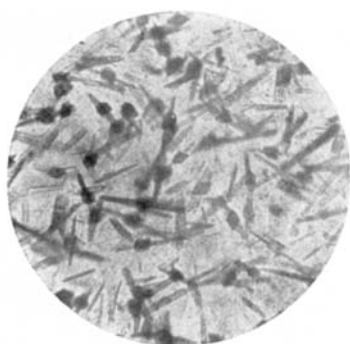


Fig. 4. Nori-Phycocyan,
Verwachsung beider Formen.



Fig. 5. Ceramium-Phycocyan.

b) *Rhombenform*. Zum Teil rhombische Täfelchen (Winkel 60°), Fig. 1, zum Teil in Gestalt gleichseitiger Dreiecke. Sehr häufig liegen in einer Kantenrichtung gestreckte Rhomben so übereinander, daß

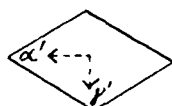


Fig. 1.



Fig. 2.

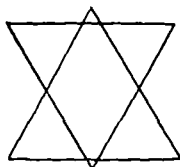


Fig. 3.

diese als zweizählige Drehachse erscheint (Fig. 2). Auch die Dreiecke zeigen symmetrische Verwachsung (Fig. 3). Die optische Orientierung zeigt Fig. 1. Die Farben sind die gleichen wie die der Prismenform.

II. Ceramium-Phycocyan.

Rhombenform mit Kantenwinkel von $78,5^\circ$ (Fig. 4). Pleochroismus ähnlich wie oben. Mehrfach sind die Blättchen parallel zu ihrer Tafelfläche wirtelförmig miteinander zu einer fast kreisförmigen Gruppe verwachsen. Eintrocknete Krystalle zeigen typische Schwundrisse.

Weder bei I, noch bei II war im konvergenten Lichte eine eindeutige Interferenzfigur zu erhalten. Wo Einzelblättchen zwillingsartig übereinanderliegen, wird die Doppelbrechung und der Pleochroismus meist völlig kompensiert.“

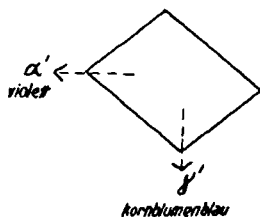


Fig. 4.

Die verdünnten Lösungen des Noripigments sind blaugrün, die konzentrierten rein blau.

Zur Isolierung des Pigments wird die abgeschleuderte und gut abgetropfte Krystallmasse in Wasser gelöst und durch Versetzen mit dem doppelten Volumen Aceton koaguliert. Nach dreistündigem Stehen wird abzentrifugiert, mehrmals mit dem verdünnten Aceton und schließlich mit reinem Aceton verrührt und abgeschleudert. Nach Verdunsten des Acetons in gelinder Wärme wird im Exsiccator getrocknet und gepulvert. Der geringe Teil des Pigments, der bei dieser Behandlung nicht gefällt wird, fällt bei Versetzen mit mehr Aceton aus, schließt aber etwas Ammonsulfat ein, das durch Waschen mit Wasser teilweise entfernt werden kann. Das trockene Pigment ist schön hell-

blau und löst sich weder in Wasser, noch in stark verdünnter Ammoncarbonatlösung. Es ist also denaturiert. Auch Phycocyan-Krystalle werden bereits durch verdünnten Alkohol amorph und denaturiert. Ceramium-Phycocyan wird ebenso als ein dunkel blauviolett Pulver gewonnen.

In der ersten Abhandlung (a. a. O.) waren einige spektralphotometrische Analysen von Nori auf Grund der Extinktionskoeffizienten des Ceramium-Phycocyans berechnet worden. Diese müssen nun umgerechnet werden. Bei den für die Analyse gewählten Wellenlängen zeigt eine 1-proc. Lösung von Nori-Phycocyan folgende (spezifische) Extinktionskoeffizienten:

λ in $m\mu$:	652	615	565	550	540
ϵ_{sp} :	0,86	9,74	4,07	2,90	2,21.

Die Gleichungen¹⁾ für die Analyse des Nori lauten demnach:

$$x = c - 0,395 b - 0,605 a$$

$$y = 1,038 b - 1,038 a$$

$$(x = 1,038 a - 0,038 b)$$

$$\epsilon_{sp}^{565 m\mu} \text{ für Phycoerythrin} = 7,95$$

$$\epsilon_{sp}^{615 m\mu} \text{ für Phycocyan} = 9,74.$$

Das Phycocyan aus Nori besitzt also eine etwas stärkere maximale Absorption als das von Ceramium und dementsprechend sind die damals angegebenen Phycocyangehalte von Nori zu hoch; die Phycoerythringehalte ändern sich nur wenig. Nori enthält danach 1,5—1,8 Proc. Chromoproteide (ber. auf aschefreie Substanz), 0,35—0,65 Proc. Phycocyan (25—35 Proc. der Chromoproteide). Die zuletzt gelieferte Ernte ist aber pigmentreicher (2,55 Proc. Chromoproteide, 1,87 Proc. Phycoerythrin, 0,67 Proc. Phycocyan).

Phycoerythrin.

Die Darstellung des Pigments ist bereits in der ersten Abhandlung beschrieben. Zuweilen reicht zur ersten Fällung eine Ammonsulfatkonzentration von 40 Proc. der Sättigung nicht völlig aus, es empfiehlt sich also spektrophotometrische Untersuchung der braunen bis rotbraunen Mutterlaugen vor dem Weggießen. Bei der Aufarbeitung

¹⁾ Vgl. A. 461, 72 (1928). Die Ansatzgleichungen sind dort durch einen Irrtum und Druckfehler entstellt. Sie sollten lauten:

$$a = x + 0,104 y; \quad b = y + x; \quad c = x + 0,532 y + x.$$

Die Gleichungen selbst sind richtig, nur setze Zeile 3, S. 72: y statt x .

der großen Ansätze hat sich die Sharples-Suprazentrifuge sehr bewährt. In den Mutterlaugen der Krystallisationen häufen sich die Beimengungen, Schleimstoffe und Zelltrümmer an, und nur sehr energisches Zentrifugieren ermöglicht ihre Entfernung. In verzweifelten Fällen hilft dann manchmal eine allerdings sehr langwierige Filtration. Die Isolierung des Pigments geschieht in der beim Nori-Phycocyan beschriebenen Weise durch Fällung mit Aceton. Das tief purpurrote Pulver löst sich in Wasser mit einer Spur Ammoncarbonat auf und die Lösung unterscheidet sich in Farbe, Fluorescenz und Absorption nicht von der des nativen Eiweißes; es ist also hier keine Denaturierung eingetreten.

Durch 12 tägige Dialyse der Lösung im Schnelldialysator wurde der größte Teil des Pigments in kleinen Krystallen ausgeschieden. Der Aschegehalt beträgt dann nur noch 0,28 Proc. (zumeist CaSO_4). Das so ausgeschiedene Globulin ist in Gläsern, die kein Alkali abgeben, auch mit Ammonsulfatzusatz nicht mehr in Lösung zu bringen, sofort aber mit einer Spur Ammoncarbonat.

Bei der Mikrobestimmung des freien Aminostickstoffs nach van Slyke mußte der Ammonsulfatgehalt der Lösung berücksichtigt werden. Es wurden unter stets gleichen Bedingungen (40 Minuten Schütteln) neben den Leerbestimmungen zwei Bestimmungen durchgeführt, eine in 1 ccm der Chromoproteidlösung, eine zweite in einem aliquoten Teile des Filtrats nach der quantitativen Ausfällung des Eiweißes durch Koagulation. Es ergaben sich, berechnet auf 1 ccm der 1,67-proc. Phycoerythrinlösung $1,48 - 1,24 = 0,24$ mg Aminostickstoff, also 1,44 Proc. freier Aminostickstoff im Phycoerythrin (9,4 Proc. des Gesamtstickstoffs). Die Bestimmung ist als Differenzbestimmung nicht sehr genau, zeigt aber, daß das Phycoerythrin sich von anderen Eiweißstoffen auch in diesem Punkte nicht unterscheidet.

Pepsinspaltung des Phycoerythrins.

100 ccm einer 3,5-proc. Phycoerythrinlösung (spektrophotometrisch bestimmt) werden mit 3 ccm 10-proc. Salzsäure und einer Lösung von 0,5 g gegen Eialbumin gut wirksamen Pepsins (in lamellis von Merck) in $\frac{1}{10}$ -Salzsäure versetzt. Die Lösung stand im Brutschrank bei 37° 9 Tage. Am zweiten, vierten und sechsten Tage wurde erneut je 0,1 g Pepsin zugegeben, insgesamt also 0,8 g. Zuerst gaben die Proben beim Versetzen mit der 7 fachen Menge von Alkohol noch rotviolett gefärbte Fällungen, nach 8 Tagen war die Fällung farblos geworden. Es wurde nun mit dem 7 fachen Volumen Alkohol versetzt; der Niederschlag wurde abfiltriert und wog getrocknet 0,76 g. Er

bestand also fast nur aus Pepsin (0,8 g Pepsin ergab im Leerversuch 0,72 g). Fast das gesamte Peptongemenge war im Alkohol von 80 Proc. noch gelöst.

Wurde die saure alkoholische Lösung im Vakuum bei 40° Badtemperatur eingedampft, so verfärbte sie sich nach Schwarzblau. Ein Teil des Rückstandes war mit blauer Farbe in absolutem Alkohol, ebenso in Essigester löslich. Aus der Essigesterlösung ging er weder in Wasser, noch in Sodalösung. Die neutrale Lösung dieses Stoffes ist violett, mit ammoniakalischer Zinksalzlösung wird sie blaugrün mit intensiver roter Fluoreszenz und zeigt ein starkes Band im Orangerot (630 μ), neben schwächeren bei 585 und 511 μ . Dieser Stoff wurde in der ersten Abhandlung bereits als „Phycobilin B“ erwähnt. Der alkoholunlösliche Anteil löst sich glatt in Wasser und gibt dieselben Farbreaktionen wie der alkohollösliche. Wird jedoch die alkoholisch-salzsäure Lösung vor dem Eindampfen mit Natriumbicarbonat neutralisiert, wobei die Farbe nach Rotbraun umschlägt, und dann eingedampft (im Vakuum), so erhält man einen braunen, in Wasser leicht löslichen, in absolutem Alkohol fast unlöslichen, in schwach salzsaurem (0,6 Proc.) absolutem Alkohol jedoch unter Zurücklassung von Kochsalz und einigen farblosen Flocken mit rotvioletter Farbe löslichen Rückstand. Dieses Peptongemenge, das nach seiner Entstehung noch einen großen Teil vom Eiweiß enthalten muß, war in der ersten Arbeit als „Phycobilin A“ geschildert. Eine sekundäre Änderung des Farbstoffanteils ist auch hier eingetreten: die ammoniakalische Lösung zeigt auf Zusatz von Zinkacetat bereits schwach das Band des Cyanobilins im Orangerot. Chloroform löst aus der wäßrigen Lösung nichts. Amylalkohol löst aus der wäßrigen salzsauren Lösung nur einen Teil des Pigments, nichts aus einer mit Bicarbonat versetzten Lösung. Schüttelt man die Lösung in Amylalkohol wieder mit verdünnter Säure, so geht ein Teil des Pigments in wäßrige Lösung zurück.

Die Xanthoproteinreaktion, auch bei dem mit Amylalkohol extrahierten Pigment ist positiv; die entgegengesetzte Angabe der ersten Abhandlung beruhte auf einem Irrtum. Die Farbe der Pigmentlösung ist viel stärker als die gelbe Farbe nach der Salpetersäureoxydation und die zur Reaktion verwandten Pigmentlösungen waren nur zu schwach. Eine der Xanthoproteinreaktion ganz ähnliche Reaktion geben aber auch die eiweißfreien Farbkomponenten. Ebensowenig ist die Biuretreaktion zur Prüfung auf Eiweißbestandteile anwendbar, da Phycoerythrobilin mit Kupfersalzen wie Urobilin eine ähnlich gefärbte Komplexverbindung liefert.

Die Versuchsergebnisse können nur so gedeutet werden: Bei der Pepsinspaltung bleibt die Farbkomponente an peptonartige Bruchstücke des Eiweißes gebunden. Ein solches Peptongemenge liegt im „Phycobilin A“ vor. Auffallend ist die Löslichkeit in schwach saurem Alkohol. Verdampft man ohne vorherige Neutralisation, so tritt in der warmen alkoholisch salzsauren Lösung eine weitgehende Oxydation der Erythrostufe in die Cyanostufe ein. Ferner wird ein Teil der Peptone durch die Säure in der Wärme weiter gespalten, die Farbstoffkomponente wird frei und gleichzeitig verestert. „Phycobilin B“ ist also Phycocyanobilin-äthylester, der wohl auch noch an kleinere Peptidreste gebundenen Cyanobilinester enthält. Daneben bleiben mit der oxydierten Farbkomponente verbundene Peptone bestehen. Da ihre Carboxylgruppen unter den milden Bedingungen nicht verestert werden, so sind diese Stoffe wasserlöslich, wenn der hydrophile Eiweißrest den Rest des hydrophoben Esters der Farbkomponente an Größe übertrifft.

Ein zweiter, dem ersten gleicher Ansatz von 100 ccm 2,23-proc. Phycoerythrinlösung mit Pepsin-Salzsäure wurde anders aufgearbeitet. Die saure Lösung wurde nach der Spaltung 10 mal mit 10 ccm Amylalkohol extrahiert, wobei die Menge des in den Amylalkohol gehenden Pigmentanteils viel rascher als die Farbe der Pigmentlösung abnahm. Aus der amyalkoholischen Lösung wurde das Pigment zum spektrophotometrischen Vergleich durch Zusatz des gleichen Volumens Äther wieder in $\frac{2}{10}$ -Salzsäure übergeführt. Die Absorptionskurven des in Amylalkohol löslichen und unlöslichen Anteils waren sehr ähnlich. Sie zeigten das Hauptmaximum bei 491 m μ , daneben nur eine Unstetigkeit bei etwa 550 m μ , die beim löslichen Anteile etwas mehr nach dem kurzwelligen, beim unlöslichen nach dem langwelligen Teile zu lag. Der Vergleich der maximalen Extinktionskoeffizienten bei 491 m μ ergab, daß nur 7,2 Proc. der Extinktion in die Amylalkohol-Lösung gegangen waren. Die aus dieser erhaltenen wäßrigen Lösungen wurden nach Befreiung vom Amylalkohol durch Ausäthern im Vakuum-exsiccator über Alkali eingedunstet. Der Rückstand wog

0,091 g = 4,1 Proc. des angewandten Phycoerythrins. Hygroskopische rotbraune Krusten. Spezifische Extinktion bei 491 m μ in saurer Lösung 5,4. Die Farbstoffkomponente ist also im Amylalkohol angereichert, aber noch nicht frei (vgl. die Extinktion des Phycoerythrobilinesters).

Während eine Phycoerythrin-Lösung im Dunkeln oder im schwach diffusen Licht bei Fäulnisausschluß sehr lange haltbar ist (eine 3-proc. Lösung verlor in drei Monaten 4 Proc. ihrer Extinktion), zersetzt sich eine salzsaure Lösung des Pepsinspaltproduktes an der Luft auch im Dunkeln bereits merklich rascher, sehr rasch im diffusen Licht. Die Verminderung der maximalen Extinktion betrug hier 1 Proc. in je drei Tagen und wuchs in diffusum Licht auf 6 Proc. in einem Tage, um dann im Dunkeln wieder auf 2 Proc. im Tage abzusinken, bei Belichtung erneut zu steigen.

Pepsinspaltung des Nori-Phycocyans.

In 100 ccm einer 1,63-proc. Lösung von Nori-phycocyan wurden 8 ccm n-Salzsäure gegeben. Die schwach saure Lösung ist blau ohne Fluorescenz. Es wurde nun eine Lösung von 0,5 g Pepsin hinzugefügt und bei 37° im Brutschrank aufbewahrt, bis die Fällung auf Zusatz von Alkohol zu einer Probe fast farblos war, was erst nach 8 Tagen eintrat. Eine Farbänderung der Lösung war nicht erfolgt. Es wurde nun mit Amylalkohol versetzt und vom teilweise sich ausscheidenden Pepsin abgesaugt. Wie bei Phycoerythrin ging nur ein Teil des Pigments in den Amylalkohol und beim Schütteln der amyalkoholischen Lösung mit Wasser wieder teilweise in dieses zurück. Erst wenn das Pigment längere Zeit in salzsaurem Amylalkohol gelöst war, geht es nicht mehr in Wasser, aber auch nicht mehr in Sodalösung, es ist eine Veresterung eingetreten.

Eine dreitägige erschöpfende Extraktion der Lösung mit Amylalkohol bei 55° Badtemperatur im Vakuum des Dakin-Apparates ließ ebenfalls die wäßrige Lösung noch stark gefärbt zurück. Bei der langen Erwärmung trat neben der Veresterung jedoch auch bereits eine Veränderung der Farbkomponente ein, die Farbe wurde in der

wäßrigen wie in der amylalkoholischen Phase blaugrün. Zum spektrophotometrischen Vergleiche wurden die wäßrige und die amylalkoholische Lösung durch Zufügen hier von Alkohol und Amylalkohol, dort von Alkohol und verdünnter Salzsäure in das gleiche Medium gebracht. Die Kurven zeigten für beide Lösungen ein flaches Maximum der Absorption im Orange. Der Vergleich der Extinktionskoeffizienten ergab, daß nur etwa $\frac{1}{4}$ des Pigments in die amylalkoholische Lösung gegangen war und daß die Summe der Extinktion beider Lösungen nur noch einen geringen Bruchteil der maximalen Extinktion der schwach angesäuerten Phycocyanlösung ausmachte. Die Zinkreaktion war nicht mehr normal. Es sind also bereits starke Veränderungen bei der Extraktion erfolgt.

Spektrophotometrische Untersuchung der Salzsäurespaltung des Nori-Phycocyans.

Eine mit $\frac{2}{10}$ -Salzsäure angesäuerte Nori-Phycocyanlösung ist grünblau und zeigt ein Maximum der Absorption bei $656\text{ m}\mu$ (Fig. 5, Kurve I). Die Gesamtextinktion ist stark gesunken und beträgt nur noch 2,28 (als „spezifische Extinktion“ auf das Chromoprotein berechnet) im Absorptionsmaximum (gegen 9,74 des Phycocyans). Eine solche Lösung gibt bereits mit ammoniakalischer Zinklösung die für das Cyanobilin¹⁾ charakteristische Reaktion.

Es wurde je 1 ccm Pigmentlösung von spektrophotometrisch bestimmtem Gehalt mit 50 ccm konz. Salzsäure versetzt und nach 3 stündigem Stehen bei Zimmertemperatur (Fig. 5, Kurve II), oder $\frac{1}{4}$ stündigem Digerieren bei 80° im Stickstoffstrom (Kurve III) oder im Luftstrom auf einen Salzsäuregehalt von 10 Proc. verdünnt und im König-Martens-Grünbaum-Apparat die Extinktion gemessen.

Man erhält einen völlig genügenden Überblick über den Verlauf der Kurven, wenn man — vorausgesetzt, daß man die Nullstellung des Apparates kennt (Korrektur bei dem verwendeten Apparate $+ 0,85^\circ$) — nur je einen Winkel für die beiden vertauschbaren Lagen der Röhren mit Lösung und Lösungsmittel mißt und nur an den Wendepunkten und einigen ausgesuchten Stellen genaue Messungen in der in der

¹⁾ Der Kürze halber stehen im experimentellen Teil Cyanobilin und Erythrobilin für Phycocyanobilin und Phycoerythrobilin.

ersten Abhandlung geschilderten Weise vornimmt. Für orientierende Bestimmungen genügt sogar die Bestimmung nur eines Winkels. Ich habe mir für diesen Fall eine Tabelle angefertigt, die aus diesem (α_2)

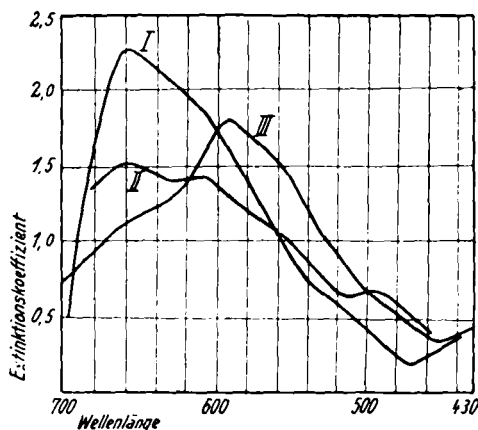


Fig. 5.

sofort den Extinktionskoeffizienten abzulesen gestattet. Die dafür notwendige Annahme, daß der zweite Winkel $90^\circ - \alpha_2$ ausmacht, trifft zwar nur ganz grob zu, aber die Abweichungen des so gefundenen Extinktionskoeffizienten gegen den genau ermittelten sind innerhalb des Winkelbereichs von $10-30^\circ$ für α_2 nicht erheblich, wenn die Lampe gut zentriert steht.

Die angegebenen Extinktionen entsprechen denen von 0,1 g Chromoprotein in 100 cm.

Man ersieht aus den Kurven, daß die Absorption nach Behandlung mit konz. Salzsäure bei Zimmertemperatur (Kurve II) als die eines Gemisches nach I und nach III zu deuten ist. Aus der mit Bicarbonat auf 3 Proc. Salzsäuregehalt abgestumpften Lösung ist mit Chloroform kein Pigment herauslösbar. Auffällig ist das Auftreten eines kleinen Zackens bei $495\text{ m}\mu$, der für eine kleine Beimengung von Ceramium-Phycocyan sprechen könnte (siehe dessen Spaltung).

Wird mit konz. Salzsäure unter Luftausschluß $\frac{1}{4}$ Stunde auf 80° erwärmt, so wird die Farbe der Lösung rein blau, das Maximum im Rot ist verschwunden und statt dessen eines im Orange bei $598\text{ m}\mu$ aufgetreten ($\epsilon_{sp}^{598} = 1,81$), Kurve III.

Die Kurve des komplexen Zinksalzes, vgl. Fig. 8, S. 229. Wird Luftsauerstoff nicht ausgeschlossen, so ist die Farbe der Lösung mehr grünblau und es tritt allmählich ein flaches Maximum im Rot auf, doch geht die Veränderung viel langsamer vor sich als die später beschriebene Oxydation des Erythrobilins. Das Pigment mit Absorptionskurve III ist mit Chloroform aus der sauren Lösung extrahierbar und ist das isolierte Phycocyanobilin.

Nori-Phycocyan gibt, wie alle daraus durch die Salzsäurespaltung gewonnenen Pigmente, mit Salpetersäure eine der Gmelinreaktion ähnliche Farbreaktion unter Farbwechsel von Blau über Blauviolett, Rotviolett, Rot, Gelbrot nach Gelb. Die rotviolette Stufe gleicht nun in ihrer Farbe und Absorption, sowohl in saurer Lösung wie in ammoniakalischer Zinklösung, fast völlig dem Erythrobilin bis auf eine stärkere Absorption im kurzwelligeren Teile des Spektrums, ja sogar die grüne Fluoreszenzfarbe des Zinksalzes ist die gleiche. Auch das durch Oxydation des Erythrobilins gewonnene Cyanobilin gibt die eben geschilderte Reaktion. Dieses „Choletelin“ läßt sich mit Chloroform aus der verdünnten Lösung extrahieren und ist seinerseits natürlich nicht mit Ferrichlorid zu Cyanobilin zu oxydieren wie Erythrobilin. Hier hätte wieder einmal die bloße spektroskopische Beobachtung in die Irre führen können.

Salzsäurespaltung des Phycoerythrins unter Luftausschluß.

Eine mit $\frac{n}{10}$ -Salzsäure angesäuerte Phycoerythrinlösung ist rotviolett und besitzt statt der beiden Maxima im Grün nur eines bei $556\text{ m}\mu$, ein Minimum bei $513\text{ m}\mu$, und wie Phycoerythrin selbst ein zweites schwächeres Maximum bei $495\text{ m}\mu$, dann sinkt die Absorption bis weit ins Violett. Die spezifischen Extinktionskoeffizienten betragen bei $556\text{ m}\mu$ 4,73, bei $495\text{ m}\mu$ 4,11 (Fig. 6, Kurve I).

Die erste weitere Änderung, so beim Stehen der $\frac{n}{50}$ -salzsauren Lösung unter Stickstoff besteht in einer relativen Zunahme der Bande 495 gegenüber der Bande 556 . So

ist nach 12 Stunden das Verhältniß der Stärke der beiden Banden umgekehrt. Ähnliche Produkte gibt die Pepsinspaltung.

Zu den folgenden Versuchen wurde je ein Kubikzentimeter einer 1,67-proc. Phycoerythrinlösung in 50 ccm konz. Salzsäure gelöst. Die angegebenen Extinktionen beziehen

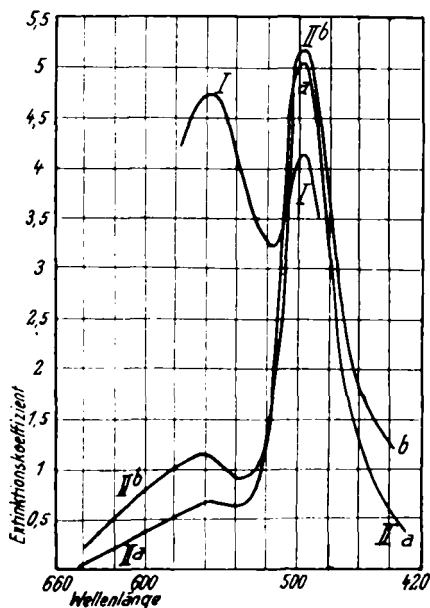


Fig. 6.

sich auf 0,1 g Chromoprotein und 100 ccm Lösung in 10-proc. Salzsäure. Nach 7 stdg. Stehen in der konz. Säure unter Stickstoff bei Zimmertemperatur wurde auf einen Salzsäuregehalt von 10 Proc. verdünnt und die Absorption gemessen. Die einzige Veränderung besteht in einer weiteren Verminderung des Maximums im Grün. $\epsilon_{490} = 5,0$; $\epsilon_{556} = 0,67$ (Fig. 6, Kurve Ia). Die Farbe der Lösung in konz. Salzsäure ist gelblichrot, in verdünnter rotviolett. Kurve des Zinkkomplexsalzes, vgl. Fig. 8, Kurve III. Das Pigment ist aus salzsaurer Lösung nicht völlig in Amylalkohol zu bringen.

Erwärmt man Phycoerythrin in einer Stickstoffatmosphäre 30 Minuten mit konz. Salzsäure auf 85°, so erhält man nach Verdünnen eine ähnliche Kurve (IIb). Aus der auf einen Salzsäuregehalt von etwa 5 Proc. mit Ammoncarbonat vorsichtig abgestumpften Lösung nimmt Amylalkohol das gesamte Pigment auf. Aus dieser Lösung fällt das gleiche Volumen Äther nichts mehr; Wasser löst aus der amylalkoholischen Lösung nichts mehr heraus, wohl aber bei sofortiger Zugabe Natrium-bicarbonat-Lösung unter Farbumschlag nach Braun; mit Essigsäure ist das Pigment wieder in den Amylalkohol zu treiben. Nach kurzem Stehen in der amylalkoholischen, schwach sauren Lösung ist stets ein Teil mit Amylalkohol verestert und geht nicht mehr in die alkalische Lösung. Es fällt auf, daß hier ein höherer Wert für das Maximum im Grün gefunden wird als bei der Spaltung bei Zimmertemperatur und daß dieses nach Rot zu verschoben ist. $\epsilon_{sp}^{569-562} = 0,9-1,2$. Es ist anzunehmen, daß diese Veränderungen von einer geringen Oxydation zum Cyanobilin herrühren. Vergleiche dazu die im nächsten Kapitel beschriebenen Versuche. Eine Beimengung von Cyanobilin konnte auch durch das Ergebnis der Chloroformextraktion nachgewiesen werden (vgl. S. 240). Das Hauptmaximum 495 m μ zeigt bei der Spaltung eine bemerkenswerte Konstanz.

Spaltung von Phycoerythrin unter gleichzeitiger Oxydation der Farbkomponente.

Wird eine Lösung von Phycoerythrin in konz. Salzsäure auf etwa 80° erwärmt, so wird die zunächst rotviolette Lösung über Violett und Blauviolett blau, schließlich grünblau. Dieser Farbwechsel bleibt jedoch aus, wenn man Phycoerythrin in einer sauerstofffreien Atmosphäre, in Stickstoff oder Kohlendioxyd, mit der heißen Säure behandelt. Diese Oxydation der freigesetzten Farbkomponente tritt ebenso ein, wenn man nach Spaltung unter Luftausschluß die schwach saure Lösung an der Luft erwärmt. Wurde eine Phycoerythrinlösung 30 Minuten in konz. Salzsäure auf 85° erwärmt, so war die Farbe blau. Die

spektralphotometrische Untersuchung der Absorptionskurve der 10-proc. salzsauren Lösung (Fig. 7, Kurve I) zeigt, daß

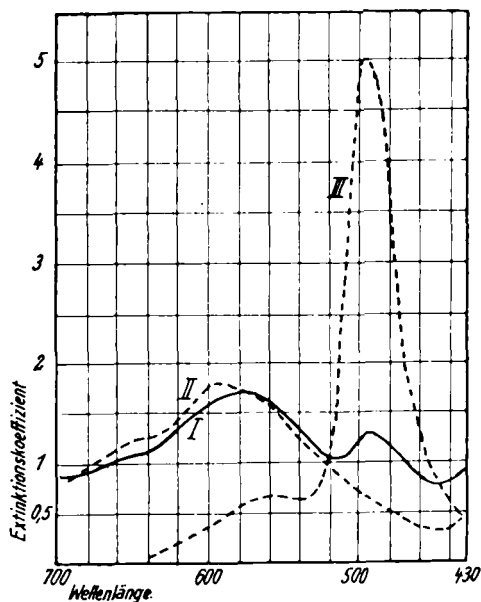


Fig. 7.

diese „blaue Farbkomponente“ Kitasatos¹⁾ ein Gemisch der salzsauren Salze von Cyanobilin (Kurve II), das durch die oxydative Wirkung des Luftsauerstoffs aus dem Erythrobilin entstanden ist und von etwas unverändertem Erythrobilin (Kurve III) darstellt. Die Extinktionen beziehen sich wieder auf 0,1 g Chromoprotein in 100 ccm Lösung in 10-proc. Salzsäure.

Ferner wurden durch Versetzen mit Ammoniak und Chlorzinklösung die Zinkkomplexsalze dargestellt; hier muß besonders auf gleiche Konzentration an Chlorzink und nur ganz schwach ammoniakalische Reaktion geachtet werden. Stärkere Alkalität vermindert die Extinktion. Zwischen Mischung und Messung wurde stets 5 Minuten gewartet,

¹⁾ Aus den Kurven Kitasatos ist zu schließen, daß das Gemenge, das er in Händen hatte, noch etwas erythrobilinreicher war.

da die Bildung der Zinkkomplexsalze eine deutliche Zeitreaktion ist. Dann sind die Werte der Zinksalzextinktionen ebensogut reproduzierbar wie die der salzsauren Lösung. Fig. 8 zeigt, daß auch die Kurve des Zinkkomplexsalzes (I)

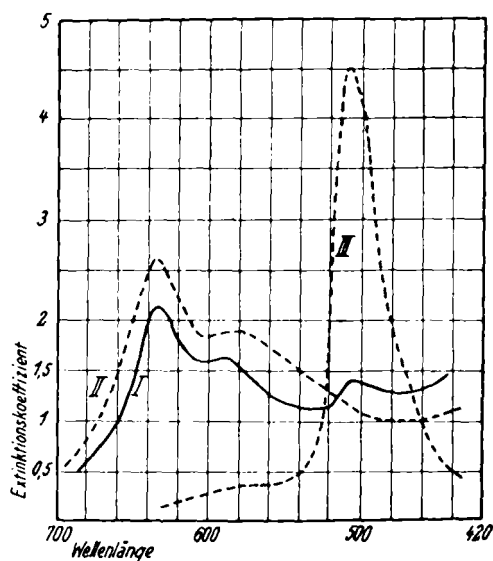


Fig. 8.

sich additiv aus der des Cyanobilin-Zinks (Kurve II) und des Erythrobilin-Zinks (Kurve III) zusammensetzt. Die Additivität der Kurve stimmt auch quantitativ gut. Berechnet man aus dem Verhältnis der Maxima das Verhältnis von Erythro- zu Cyanobilin, so ergibt sich, daß die Absorption des oxydierten Erythrobilins sich aus 85,5 Proc. der des Cyanobilins und 14,5 Proc. der des unveränderten Erythrobilins zusammensetzen müßte. Konstruiert man daraus die Kurve, so ergibt sich, daß sie bis auf geringe Abweichungen im äußersten Rot und etwas stärkere im Blau mit der gefundenen übereinstimmt. Diese Abweichungen finden ihre Erklärung in der geringeren Meßgenauigkeit des KMG-Apparates in diesen Gebieten, es ist aber auch möglich, daß noch andere Pigmente, die durch weitere Oxydation des Cyanobilins entstehen und hier

absorbieren, beigemennt sind. Aus der Zinkkurve ergibt sich ebenso ein Verhältniß von 87 Proc. Cyanobilin und 13 Proc. Erythrobilin und die Kurve stimmt bis auf eine Abweichung im Blau ausgezeichnet mit der errechneten überein. Dadurch ist es erwiesen, daß hier Gemische von Cyanobilin und Erythrobilin vorliegen. Aus der Berechnung läßt sich aber noch eine weitere Folgerung ableiten. Die angegebenen Extinktionen beziehen sich nicht auf bestimmte Mengen der Farbkomponente, sondern auf gleiche Mengen Chromoproteid. Wenn also aus Phycoerythrin hier eine Kurve erhalten wird, die sich additiv berechnen läßt unter Einsatz der Extinktionen auf gleiche Mengen Chromoproteid (Erythrobilin auf Phycoerythrin, Cyanobilin auf Phycocyan) bezogen, so müssen die beiden Farbkomponenten in den Chromoproteiden im gleichen oder annähernd gleichen Äquivalentverhältniß vorhanden sein, wenn aus einem Molekül Erythrobilin ein Molekül Cyanobilin entsteht.

Oxydation findet auch bei Spaltung mit konz. Salzsäure bei Zimmertemperatur langsam statt. Alle Versuche, aus dem Phycoerythrin durch oxydierende Spaltung Cyanobilin zu erhalten, scheiterten daran, daß die Weiteroxydation des Cyanobilins zu dem im äußersten Rot absorbierenden grünen Stoffe beginnt, ehe alles Erythrobilin oxydiert ist. Der letztere Stoff ist wieder schwerer löslich in Chloroform; dieses extrahiert daher aus dem schwach sauren Oxydationsgemisch hauptsächlich Cyanobilin mit blauer Farbe, das aber stets mit den anderen Pigmenten verunreinigt ist. Nach einem teilweisen Abbau unter unvollständiger Oxydation, so durch kurzes Erwärmen mit konz. Salzsäure bis zum Erreichen der blauvioletten Farbe, ist der am weitesten abgebaute Anteil auch stets der stärker oxydierte. So enthält in diesem Falle die blaue Chloroformlösung fast reines Cyanobilin, die amyalkoholische blauviolette ein Gemenge von viel Cyano- mit wenig Erythro-, die wäßrige rote Phase fast nur Erythro-Komponente.

Wesentlich rascher, aber mit demselben Ergebnis, oxydiert eine salzsaure *Ferrichloridlösung* in der Wärme. Die Farbe schlägt nach Grün um und Chloroform extrahiert

Cyanobilin mit blauer Farbe. Es tritt aber stets schon auch weitere Oxydation zu dem grünen Pigment ein (ebenso, wenn man von Phycocyan ausgeht) und der Zeitpunkt, an dem die Reaktion abzubrechen ist, ist kaum abzapassen. Ist die Spaltung wieder ungenügend, so erhält man zuweilen den amyalkohollöslichen grünblauen Stoff mit dem Absorptionsmaximum 656, der das erste Produkt der Säureeinwirkung auf Phycocyan darstellt. Bei Zimmertemperatur oxydiert Ferrichlorid viel langsamer.

Einen ganz anderen Verlauf nimmt die Oxydation des Phycoerythrins mit Salpetersäure. Unter Erhöhung der Absorption im kurzwelligen Teile des Spektrums entstehen hier braune, schwach blaugrün fluoreszierende Lösungen mit dem Erythrobilin noch ähnlicher Absorptionskurve, dann verschwinden Fluoreszenz und selektive Absorption und die Lösung wird gelb.

Salzsäurespaltung des Ceramium-Phycocyans.

Eine mit $\frac{1}{10}$ -Salzsäure angesäuerte Ceramium-Phycocyanlösung besitzt eine Absorptionskurve mit einem Hauptmaximum bei 562 $m\mu$ und einem geringeren und flacheren Maximum bei 651–641 $m\mu$.

Beim Stehen in konz. Salzsäure bei Zimmertemperatur wird die Lösung blauviolett. Das erste Maximum verschwindet bis auf eine Unstetigkeit in der Kurve, diese zeigt 2 Maxima bei 598 und 495 $m\mu$ (Fig. 9, I). Versucht man die Kurve als die eines Gemisches von Erythro- und Cyanobilin zu errechnen, so zeigen sich Abweichungen: Die Absorption reicht weiter ins Rot, die nach Ultraviolett abfallenden Äste der beiden Maxima sind schwächer geneigt. Das hier kein solches Gemisch vorliegt, zeigt auch das Ergebnis der Spaltung mit heißer konz. Salzsäure. Erwärmt man nur 1 Minute, so gleicht die Absorption der eben beschriebenen. Bei längerer Spaltung aber, $\frac{1}{2}$ Stunde bei 85°, wird die Lösung rein blau, Band 495 verschwindet (Fig. 9, Kurve II). Der Versuch wurde unter peinlichstem Luftausschluß mehrfach mit demselben Erfolge wiederholt.

Die so erhaltene Lösung zeigt sowohl in 10-proc. Salzsäure wie in schwach ammoniakalischer Zinklösung eine dem Nori-Cyanobilin fast völlig gleichende Absorptionskurve. Nur ist die Absorption in der sauren Lösung im

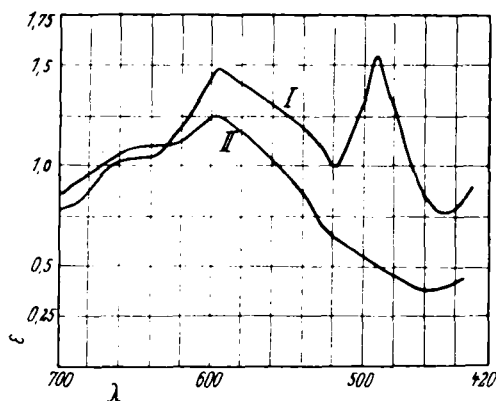


Fig. 9.

Rot infolge einer Unstetigkeit der Kurve bei 650—630 mμ etwas stärker. Auch Farbe und Fluorescenz der Zinklösung sind völlig gleich. Das Pigment ist ebenfalls in Chloroform löslich. Die Extinktionen, berechnet auf das Chromoprotein, sind schwächer und betragen nur etwa $\frac{2}{3}$ von der bei Nori-Phycocyan erhaltenen, ganz entsprechend der geringeren Farbstärke des Ceramium-Pigments. Hier wäre also bei Annahme der gleichen Farbkomponente der Eiweißanteil größer.

Alkalispaltung.

Bei Erhitzen in verdünnter Sodalösung von 1—5 Proc. oder Natronlauge von $\frac{1}{2}$ —1 Proc. auf dem Wasserbade entstehen aus Phycoerythrin und Phycocyan sehr leicht chloroform- und ätherlösliche Stoffe der verschiedensten Farben je nach Dauer und Stärke des Erhitzens und der Konzentration des Alkalis. Sofern die Einwirkung milde war, fällt Alkohol aus den mit Essigsäure neutralisierten Lösungen fast das gesamte Eiweiß, jedoch stark gefärbt, aus. Die Fällung ist in Wasser unlöslich. Nach stärkerer

Einwirkung des Alkalis gehen die nun schwach gefärbten Niederschläge spielend leicht in wäßrige Lösung und sind hygroskopisch; die Fällung ist dann stets unvollständig. Auch bei Ausschluß von Luftsauerstoff lassen sich Veränderungen nicht verhindern und man erhält Gemische, darunter vorherrschend grüne Pigmente. Die Extinktionen der so erhaltenen Pigmentlösungen sind sehr gering.

Eine beginnende Alkalispaltung ist auch die in der ersten Abhandlung erwähnte Entstehung alkohollöslicher Produkte bei der Koagulation. Sie tritt beim Erhitzen am isoelektrischen Punkt nicht auf, zuweilen, nicht immer, beim Erhitzen der ganz schwach alkalischen Lösung und führt zu einem cyanobilinreichen Gemisch.

Phycocyanobilin aus Nori.

Nach der Spaltung von Nori-Phycocyan mit konzentrierter warmer Salzsäure ist stets ein Teil des Pigments nicht mit Chloroform aus der schwach sauren Lösung extrahierbar. Durch spektrophotometrische Bestimmungen der salzsäurehaltigen Chloroformlösung wurden die im folgenden mitgeteilten Bedingungen ermittelt, die das günstigste Resultat gaben:

2,0 g festes, durch Extraktion mit Äther von Lipidspuren gereinigtes Nori-Phycocyan wurden in 70 ccm konz. Salzsäure 20 Minuten auf 80—85° (Temperatur im Bade) im sauerstofffreien Stickstoffstrom erwärmt. Eine längere Spaltungszeit bringt keine besseren Ausbeuten und birgt die Gefahr einer weiteren Veränderung der Farbkomponente in sich.

Der Stickstoff wurde durch Leiten über im Quarzrohr erhitzten Kupferasbest zusammen mit 4 Proc. Wasserstoff vom Sauerstoff befreit. Er ging dann durch eine als Blasenähler dienende Waschflasche mit konz. Schwefelsäure und durch Schläufe und Glasschlangen in das Reaktionsgefäß, ein Kölbchen mit in den Schliff eingeschmolzenem Gaszu- und -ableitungsrohr mit Tropftrichter.

Das Chromoproteid wurde im Kölbchen mit Stickstoff überspült, die Salzsäure bei Zimmertemperatur zugegeben, zur Verdrängung von Luftspuren einige Minuten Stickstoff hindurchgeleitet und dann erst im Stickstoffstrom rasch auf die angegebene Temperatur erwärmt. Das Eiweiß geht

unter Aufschäumen und Entweichen von Chlorwasserstoff in Lösung. Man läßt nach 20 Minuten unter Stickstoff erkalten und verdünnt mit der dreifachen Menge ausgekochten Wassers. Wenn auch bei Zimmertemperatur die Empfindlichkeit gegen Luftsauerstoff, zumal in der Chloroform-Lösung viel geringer ist, empfiehlt es sich doch, die weitere Aufarbeitung rasch und im Schatten vorzunehmen, oder die Lösungen unter Stickstoff im Dunkeln aufzubewahren. Die tiefblaue wäßrige Lösung, die nicht mehr als 10 Proc. Salzsäure enthalten darf, wird mehrmals mit kleinen Mengen reinsten Chloroforms extrahiert, bis dieses nur noch ganz schwach gefärbt wird. Dabei vermeidet man ein heftiges Schütteln, da sonst eventuell Bildung eines blauen Niederschlages und einer Emulsion eintritt. Es gelingt so, etwa $\frac{2}{3}$ des Gesamtpigments in Chloroformlösung zu bringen, wie die spektrophotometrische Messung der Extinktion der wäßrigen Lösung beim Maximum 598 m μ vor und nach der Extraktion zeigt. Die tief indigoblaue Chloroformlösung wird nun einige Male mit 5-proc. Salzsäure, schließlich mit Wasser gewaschen. Dabei schlägt die Farbe durch Hydrolyse des salzsauren Salzes nach Blauviolett um; deutlicher ist der Farbumschlag noch im künstlichen Licht, in dem die Lösung des freien Ampholyten rotviolett erscheint.¹⁾ Man trocknet nun die Lösung mit wenig frisch geglühtem Natriumsulfat.²⁾ Das Pigment ist aus der Chloroformlösung sehr leicht absorbierbar, man filtriert also durch nicht zu große Filter³⁾ und wäscht gut mit trockenem Chloroform nach.

Beim Eindampfen der Lösung in Chloroform und beim Umkrystallisieren ist peinlicher Sauerstoffausschluß erforderlich, da sonst Oxydation unter Verfärbung nach Grün zu eintritt und dann eine Krystallisation unterbleibt. Die weitere Behandlung erfolgt in dem kleinen Apparate, den die Abbildung (Fig. 10) wiedergibt.

¹⁾ Die Gläser müssen zinkfrei sein!

²⁾ Mit gekörntem Chlorcalcium kann man das Pigment aus dem Chloroform quantitativ herausholen, Chloroform löst es aus dem Chlorcalcium beim Auswaschen wieder heraus.

³⁾ Die gute Anfärbbarkeit der Cellulose durch Gallenpigmente ist schon oft beobachtet worden, z. B. von W. Küster, H. 47, 294 (1906).

Sowohl A wie B stehen mit einem Kippaschen Apparate mit luftfreiem Kohlendioxyd in Verbindung, man füllt von A her mit CO_2 und verdampft das Chloroform bei 30° im Vakuum und im Strome des nach Schließen von A durch die Capillare bei B eintretenden Kohlendioxyds ab. Das im Apparat bei 60° im Vakuum getrocknete Phycocyanobilin wurde nach Entfernung des Aufsatzes im mit passendem Schliffstopfen geschlossenen Kölbchen gewogen.

Aus 2 g Phycocyan wurden so 28,4 mg des Rohproduktes erhalten (1,42 Proc. des Chromoproteids). Da nach der spektrophotometrischen Messung nur etwa $\frac{2}{3}$ des Pigments in Chloroform gegangen sind, ist der Anteil der Farbkomponente am Phycocyan auf etwa 2,2 Proc. zu schätzen.

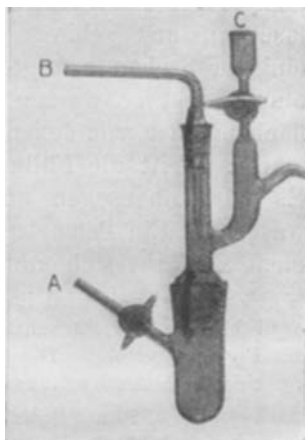


Fig. 10.

Die schwarzblaue Kruste mit lebhaftem roten Oberflächenschimmer wird in wenig Alkohol gelöst, mit Äther versetzt, und der Alkohol in einem kleinen Perforator durch Perforieren mit ausgekochtem Wasser im Stickstoffstrom herausgewaschen, wobei ein kleiner Teil des Pigments mit rotvioletter Farbe in Lösung geht und amorphe blaue Flocken ausfallen. Es wurde vergebens versucht, aus der so erhaltenen ätherischen Lösung Krystalle zu erhalten. Die ätherische Lösung wird mit $\frac{1}{10}$ -Salzsäure extrahiert, die das Pigment mit rein blauer Farbe aufnimmt. Der Äther bleibt schwach violett zurück und zeigt eine schwache Bande im Rot, die vielleicht einer Spur Kupferkomplexsalz zuzuschreiben ist. Aus der salzsauren Lösung wird das Cyanobilin mit Chloroform extrahiert, die Chloroformlösung wird mit Wasser gewaschen und mit frisch geglühtem Natriumsulfat getrocknet. Sie wird wieder in den Apparat eingefüllt, im Vakuum und CO_2 -Strom konzentriert, bis die etwa $\frac{1}{2}$ cm oberhalb des Gefäßbodens endende Capillare nicht mehr eintaucht, das Vakuum unter Überspülung mit Kohlendioxyd von A her aufgehoben und bei 60° durch

das Trichterchen *C* mit dem gleichen Volumen heißen Benzols versetzt. Man entfernt unter Einleiten eines starken Kohlendioxidstroms den Aufsatz, setzt den Schliffstopfen zunächst lose auf und schließt dann Stopfen und Hahn *A*. Nach einigem Stehen erfolgte Ausscheidung kleiner, tiefdunkelblauer, fast schwarzer Prismen mit starkem roten Oberflächenglanze, von denen nur einige Krystalle gut ausgebildet waren. Tritt die Fällung zu rasch ein, so ist sie amorph. Es wird abgesogen und mit Benzol und Petroläther gewaschen. Ein Schmelzpunkt ist nicht vorhanden, das Pigment verfärbt sich und wird dann schwarz.

Zur Analyse¹⁾ wird im Hochvakuum bei 100° über Phosphorpentoxyd bis zur Gewichtskonstanz getrocknet, wobei keine Veränderung des Pigments erfolgt. Die beiden Proben *a* und *b* stammen aus zwei verschiedenen Aufarbeitungen.

a)	3,380 mg Subst.:	7,901 mg CO ₂ ,	2,170 mg H ₂ O.
	3,194 mg „	0,226 ccm N (13°, 753 mm).	
b)	1,532 mg „	3,603 mg CO ₂ ,	1,050 mg H ₂ O.
	3,670 mg „	0,285 ccm N (21°, 752 mm).	
	C ₃₄ H ₄₄ O ₈ N ₄	Ber.	C 64,11 H 6,97 N 8,81
		Gef. a)	„ 63,74 „ 7,18 „ 8,38
		b)	„ 64,17 „ 7,68 „ 8,39.

Die Substanz enthält eine Spur Schwefel (Nitroprussidprobe schwach positiv). Eine Mikro-Lassaig-ne-Probe, mit Kalium die mit Glykokoll in dem Stickstoffgehalt entsprechender geringerer Menge sichere Resultate lieferte, versagte bei Phycocyanobilin völlig, wie das von H. Fischer²⁾ und anderen³⁾ bei Pyrrolderivaten schon beobachtet wurde. Die Substanz ist frei von Aminostickstoff.

Phycocyanobilin ist unlöslich in Wasser, löslich in verdünnter Salzsäure von mehr als $\frac{n}{50}$ -HCl-Gehalt und verdünntem Ätznatron (stärker als $\frac{n}{1000}$), sehr leicht löslich in Alkoholen und Aceton, leicht in Chloroform und Eisessig, schwer in Benzol, Petroläther, Ligroin. In Äther ist es ziemlich schwer löslich, mit einer Spur Alkohol in ätherische Lösung

¹⁾ Die Mikroanalysen wurden im hiesigen Institut von Frl. Lang und Herrn Eder ausgeführt.

²⁾ Z. B. 65, 180 (1915).

³⁾ F. Feist, B. 35, 1559 (1902).

gebracht, hält es sich aber auch nach Entfernen des Alkohols in Lösung. Die neutrale Lösung in Chloroform besitzt ein breites flaches Band im Grün (spezifische Extinktion von 20,6 bei 568 m μ), eine salzsaure ein ausgeprägteres bei 606 m μ (ϵ_{sp} = 33,4). Bei einem Molekulargewicht von 644 entspräche das einem molaren Extinktionskoeffizienten von 13100 bzw. 21250. Die alkalische Lösung ist rotviolett. Absorption und Eigenschaften des Zinkkomplexsalzes vgl. Tabelle S. 204.

Eine neutrale Chloroformlösung des Cyanobilins wurde mit Salzsäure verschiedener Konzentrationen geschüttelt. $n_{/50}$ -Salzsäure färbt noch rein blau (salzsaures Salz), $n_{/75}$ - und $n_{/100}$ -HCl geben blau-blauviolette Mischöne, eine mit $n_{/200}$ -Salzsäure geschüttelte Lösung hat die Farbe der neutralen Verbindung. Der Umschlagspunkt liegt bei einem p_H der wäßrigen Phase von 1,8–2,2. Während das Cyanobilin aus der ätherischen Lösung von Salzsäure in der Salzbildung etwa entsprechendem Umfange aufgenommen wird, ist eine Extraktion aus der Chloroformlösung aber erst mit Salzsäure von mehr als 15 Proc. möglich.

Wird eine Lösung des Cyanobilins in Chloroform mit einer Lösung von einer Spur Nitrit in verdünnter Schwefelsäure durchgeschüttelt, so geht die Farbe über Blauviolett, Violett, Rot, Rotgelb nach Gelb.

Der in Chloroform unlösliche Teil des Pigments zeigt dieselbe Farbe und Absorption wie das Cyanobilin, nur eine Unstetigkeit bei 495 m μ fällt in der Kurve auf. Es gelingt nicht, durch Salzzusatz zu einer Probe einen weiteren Anteil des Pigments in die Chloroformlösung zu bringen. Der Rest wird fast völlig von Amylalkohol aufgenommen: beim Auswaschen mit Wasser geht nur ein kleiner Teil des Pigments wieder in die wäßrige Phase. Der Hauptanteil der Eiweißspaltprodukte ist in der schwach rotviolett zurückbleibenden wäßrigen Lösung enthalten. Beim Eindampfen hinterbleibt eine dunkelbraune hygroskopische Masse. Sie besitzt den Fleischbrühegeruch der Eiweißhydrolysate und wiegt, scharf getrocknet, etwa ebensoviel wie das angewandte Chromoprotein.

Das nur in Amylalkohol lösliche Pigment ist noch nicht frei von Eiweißbestandteilen. Die salzsaure alkoholische Lösung enthält nach 12 stündigem Stehen das Pigment bereits in verestertem alkali-unlöslichen Zustande. Eine solche Lösung wurde in stark verdünnter Stickstoffatmosphäre bei 40° Badtemperatur eingedampft. Das erhaltene tiefblaue, amorphe Produkt war nun durch die Veresterung größtenteils in Chloroform löslich. Die Bestimmung nach van Slyke ergab noch Aminostickstoff.

Zur Analyse wurde eine Lösung in 40-proc. Eisessig verwandt.

I. 14,18 mg Subst.: 0,450 ccm N (18°, 766 mm).

II. 14,25 mg Subst.: 0,451 ccm N (18°, 766 mm).

Amino-N Gef. 1,84 1,83.

Wird ein solches Produkt nochmals wie oben, doch 3 Stunden, mit konz. Salzsäure behandelt, so fällt bei Verdünnen mit Wasser ein schwarzer Niederschlag („Biliumin“), der sich in Alkohol mit schwarz-violetter Farbe löst. In konz. Salpetersäure löste er sich rotviolett, die Lösung verfärbte sich rasch über Rotbraun nach Gelb. Im schwach gefärbten Filtrate ist nach Verdampfen der Salzsäure und Aufnehmen in Wasser die Ninhydrinreaktion deutlich positiv.

Der mit Wasser aus der ätherischen Lösung mit rotvioletter Farbe herausgewaschene Anteil ist in salzsaurer Lösung blauviolett gefärbt. Die Absorptionsbanden sind denen des Cyanobilins ähnlich, auch die des Zinkkomplexsalzes, dessen Farbe aber rein blau ist. Der Stoff zersetzte sich ohne ersichtlichen Grund bei der Aufarbeitung zu schmutzigen braunen Flocken.

Methylester des Phycocyanobilins.

Die Veresterung mit Methanol (Kahlbaum pro analysi) geht beim Stehen in 5-proc. methylalkoholischer Salzsäure glatt vonstatten. 11 mg Cyanobilin werden mit einigen Kubikzentimetern der Säure übergossen und bleiben unter Stickstoff 12 Stunden stehen. Die Veresterung ist vollständig; eine 5-proc. Sodalösung extrahiert nichts mehr aus Chloroform. Die Lösung wird in Chloroform gegossen, mit Wasser bis zum Umschlage in die blauviolette Farbe der neutralen Lösung in einem Reagenzglas-Tropftrichterchen¹⁾ ausgewaschen und in verdünntem Kohlendioxidstrom in der beschriebenen Apparatur bei 30° konzentriert. Durch Versetzen mit Petroläther fällt der Ester amorph. Beim Anreiben erscheinen Nadelchen.

¹⁾ R. Willstätter und A. Stoll, Untersuchungen über Chlorophyll, S. 49 (1913).

Zur Mikro-Methoxylbestimmung wurde im Hochvakuum über Phosphorpentoxyd bei 78° getrocknet.

2,630 mg Subst.: 2,07 mg AgJ.

$C_{31}H_{41}N_4O_6(OCH_3)_2$ Ber. OCH_3 9,35 Gef. 10,40.

Wird kein Cadmiumsalz vorgeschaltet, so findet man bei der Methoxylbestimmung eine geringe Schwärzung des AgJ-Niederschlages durch Ag_2S .

Der Methylester ist noch empfindlicher als die freie Säure; auch im Stickstoff-gefüllten Exsiccator verfärbt er sich rasch nach Grün. Das grüne Pigment ist auch mit 10-proc. Salzsäure nicht aus Äther extrahierbar. Der Ester löst sich in den gebräuchlichen organischen Lösungsmitteln außer Petroläther und Ligroin leicht, auch in Benzol. Farbe und Spektrum der neutralen und salzsauren Lösung (Max. 602 $m\mu$ in Chloroform) sind fast die gleichen wie beim Cyanobilin.

Schüttelt man die violette neutrale Chloroformlösung mit einer wäßrigen Kupferacetatlösung, so schlägt die Farbe nach Grün um. Es erscheint das Band mit Maximum 641 $m\mu$ der *Kupferkomplexverbindung*, die in Chloroform gelöst bleibt. Vollständig wird die Komplexsalzbildung erst auf Zusatz von etwas Ammoniak. Nach dem Auswaschen mit Wasser, Abdampfen des Chloroforms unter Luftausschluß und Versetzen mit Petroläther fiel das Komplexsalz amorph aus. Beim Verreiben mit Petroläther sind feine Nadeln zu beobachten; es gelang aber nicht, eine völlige Krystallisation zu erreichen. Ein solches Produkt enthielt 7 Proc. Kupfer. Zusatz von Eisessig verändert das Komplexsalz, es tritt eine zweite Bande bei 570–550 $m\mu$ auf und die Lösung wird rotviolett, Mineralsäuren bringen das Band im Rot zum Verschwinden.

Das *Zinkkomplexsalz* bildet sich ebenso, in stärkeren Mengen aber erst bei schwach alkalischer Reaktion. Farbe, Fluorescenz und Absorption wie die des Cyanobilin-Zinks. Bei Ansäuern mit Eisessig in Chloroform wird es violett und zeigt die Bande des sauren Esters, behält aber noch seine rote Fluorescenz, die erst auf Zusatz von Wasser verschwindet. Die Komplexsalzbildung tritt auch unter Stickstoff sofort ein.

Der Cyanobilin-methylester läßt sich auch direkt durch Spaltung des Chromoproteids in der beim Erythrobilin-methylester beschriebenen Weise erhalten. Doch ist der so erhaltene Ester nicht rein.

Phycoerythrobilin-methylester.

Phycoerythrobilin läßt sich nicht auf demselben Wege darstellen wie das Cyanobilin. Phycoerythrin löst sich im Gegensatz zu Phycoeyan nur schlecht in konz. Salzsäure auf und klumpt beim Erwärmen in ihr zusammen. Man kann zwar Lösungen von Phycoerythrin in konz. Salzsäure durch Versetzen einer wäßrigen Chromoproteidlösung mit viel konz. Säure herstellen, braucht aber so eine unverhältnismäßig große Menge der Säure. Außerdem ist die Farbkomponente viel schwerer mit Chloroform aus der wäßrigen Lösung zu extrahieren und es häuft sich im Chloroformextrakt zudem das leicht lösliche Cyanobilin an, das durch eine geringfügige Oxydation bei der Spaltung entsteht.

Werden 0,2 g Phycoerythrin im Stickstoffstrom in 30 ccm konz. Salzsäure $\frac{1}{2}$ Stunde auf 85° erwärmt, so extrahieren 10 mal 10 ccm Chloroform nur 5 Proc. der Extinktion bei $495\text{ m}\mu$. Die wäßrige Lösung bleibt rein rotviolett zurück. Die Chloroformlösung ist blauviolett gefärbt. Wie die Absorption der Komplexsalze zeigt, enthält sie durch Cyanobilin verunreinigtes Erythrobilin. Eine längere Spaltung gibt zwar einen größeren chloroformlöslichen Anteil (in 2 Stdn. bei 100° 15 Proc.), zugleich aber zeigt das Sinken der Gesamtextinktion bereits Zersetzungsprozesse an. Noch schlechter waren die Ergebnisse mit 50 proc. Schwefelsäure.

Es wurde daher versucht, durch Spaltung mit methylalkoholischer Salzsäure direkt zum Methylester zu gelangen. Man erhält so ein mit Chloroform extrahierbares Pigment. Auch hier wurden durch spektrophotometrische Bestimmungen der Chloroformlösung die günstigsten Bedingungen der Spaltung ermittelt:

Man erwärmt im Kölbchen mit eingeschliffenem Gas-einleitungsrohr und Kühler 5 g ausgeäthertes Phycoerythrin mit 300 ccm absolut methylalkoholischer 20-proc. Salzsäure im Stickstoffstrom 1 Stunde auf $80\text{--}85^{\circ}$, läßt im Stickstoff

erkalten und saugt rasch vom ungelöst gebliebenen Eiweiß durch eine poröse Glasfilternutsche mit großer Oberfläche ab. Auf dem Filter bleiben 2,15 g eines schwach rot gefärbten Stoffes zurück, der sich in Wasser glatt löst. Das tief gelbstichig rote Filtrat wird sofort im Scheidetrichter in 250 ccm reines Chloroform gegossen und mit 500 ccm Eiswasser überschichtet. Es wird nun vorsichtig durchgeschüttelt, die wäßrige Lösung nochmals mit wenig Chloroform extrahiert und die Chloroformlösung mehrmals erst mit 5-proc. Salzsäure, dann mit Wasser gewaschen, bis Farbumschlag von Rotviolett nach Braun erfolgt und nichts mehr in die wäßrige Lösung geht. Etwa die Hälfte der Extinktion ist in die Chloroformlösung gegangen, aus der wäßrigen Lösung extrahiert Amylalkohol weitere 40 Proc. (gemessen wird die Extinktion bei 495 m μ in der wäßrigen Lösung). Die wäßrige Phase enthält einen beträchtlichen Teil der Eiweißspaltprodukte, die beim Eindampfen mit dem typischen Geruche der Eiweißhydrolysate zurückbleiben. Eine Probe der Chloroformlösung wird mit 5-proc. Sodalösung geschüttelt; die Veresterung ist vollständig, es geht kein Pigment in die Sodalösung.

Die Lösung in Chloroform wird mit frisch geglühtem Natriumsulfat getrocknet und nach der Filtration im Vakuum und Stickstoff verdampft. Es wird in wenig Chloroform aufgenommen und im oben beschriebenen Apparate aus Chloroform und Ligroin umzukrystallisieren versucht. Man erhält jedoch amorphe Fällungen, die beim Anreiben zwar zuweilen Nadelchen zeigen, aber nicht den Eindruck einer reinen Substanz machen. Etwa dasselbe Ergebnis liefert eine 44 stündige Spaltung mit methylalkoholischer Salzsäure bei Zimmertemperatur.

Die Lösung in salzsaurem Chloroform ist rotviolett mit einem starken Maximum der Absorption bei 495 m μ ($\epsilon_{sp} = 23,8$)¹⁾ und einem schwächeren bei 575 m μ . Das letztere ist im Verhältnis zum Hauptmaximum höher als bei

¹⁾ D. Charnas findet für reinstes Urobilin $\epsilon_{sp}^{495} = 58,5$ in alkoholischer Salzsäure.

der durch Spaltung mit wäßriger Salzsäure erhaltenen Lösung, aber die Absorption des Zinksalzes beweist, daß das hier nicht auf Beimengungen von Cyanoester beruht. Die neutrale oder ammoniakalische Lösung ist braun, konz. braunrot, die Absorption im Grün ist viel schwächer, das erste Maximum bis auf eine Unstetigkeit verschwunden, aber auch das Hauptmaximum geringer ($\epsilon_{sp}^{495} = 17,6$) und die Absorption im Blau größer.

Das komplexe *Zinksalz* ist rosa mit sehr starker grüner Fluoreszenz. Die Absorptionskurve der alkoholischen Lösung zeigt neben dem Hauptmaximum 511—510 $m\mu$ ein viel schwächeres bei 590—586 $m\mu$, keine Spur des Cyanobilin-Zink-Maximums bei 632 $m\mu$. Ist jedoch bei der Aufarbeitung, z. B. durch zu langes Stehen an der Luft, eine Oxydation erfolgt, so tritt diese Bande stets mehr oder weniger stark auf. Starkes Ammoniak bringt Fluoreszenz und Zinkbande zum Verschwinden und färbt gelb. Das Maximum des violetten Kupferkomplexsalzes liegt bei 517—514 $m\mu$, das zweite Maximum ebenso wie beim Zinksalz. Während das Zinksalz bereits mit verdünnter Mineralsäure wieder zerfällt, scheint das Kupfersalz beständiger. Ca- und Cd-Salze geben keine Fluoreszenz und keinen Farbumschlag. Entmischt man die alkoholische Lösung der Komplexsalze mit Wasser und Chloroform, so gehen sie in das letztere.

Der Erythrobilinester ist noch weit unbeständiger als das Cyanobilin. Ohne erkennbare Ursache treten zuweilen Umwandlungen ein. So wurde einmal beim Stehen einer salzsauren Chloroformlösung unter Stickstoff eine Veränderung der rotvioletten Lösung nach Blau beobachtet. Hier lag kein Cyanobilin vor, wie die spektrale Untersuchung zeigte: Neutrale Lösung rotviolett, Hauptbande 497 $m\mu$, schwächere bei 540 $m\mu$. Zinksalz: rein blau mit starker roter Fluoreszenz, starkes Band 615—590 und schwächer 510. Bei neutralen Lösungen von Erythrobilin erfolgt keine sichtbare Veränderung beim Stehen, aber allmählich tritt die rotviolette Farbe beim Ansäuern der Lösung nicht mehr ein, die Lösung bleibt braun; ebenso tritt die typische Zinkreaktion nicht mehr so deutlich auf, die

Lösung bleibt auf Zinkzusatz braun, die Fluorescenz wird zuerst gelb, dann immer schwächer, über die selektive Absorption lagert sich eine kontinuierliche der kurzen Wellenlängen des Spektrums. Während $\frac{n}{10}$ -Salzsäure aus einer ätherischen Lösung von frischem Erythroester in Äther alles löst, bleibt dann auch mit 10-proc. Salzsäure ein braunes Pigment im Äther.

Zur Analyse wurde der frische Ester bei 78° im Hochvakuum über Phosphoroxyd getrocknet.

4,420 mg Subst.: 9,98 mg CO₂, 2,79 mg H₂O. — 3,813 mg Subst.: 0,294 ccm N (21°, 751 mm). — 3,568 mg Subst.: 1,619 mg AgJ.

Gef. C 61,6 H 7,06 N 8,85 OCH₃ 6,00.

Der im Vergleich zum Cyanobilin niedrige Kohlenstoffgehalt (obwohl hier der Ester, dort die freie Carbonsäure), der Stickstoff- und besonders der niedrige Methoxylgehalt weisen auf Verunreinigung durch Eiweißbestandteile hin. Auch die Ausbeute ist verdächtig hoch. Aus 5 g Phycocerythrin wurden 137 mg = 2,75 Proc. chloroformlösliches Produkt erhalten, die aber nur etwa 45 Proc. der gesamten Extinktion der Spaltprodukte entsprechen. Es ergäbe sich daraus, von dem, was noch im ungelösten Eiweißteil zurückblieb, abgesehen, ein Gehalt von etwa 6 Proc. an der Farbkomponente (gegen 2,3 Proc. beim Phycocyan). Der relativ niedrige Stickstoffgehalt spricht freilich gegen die Annahme einer erheblichen Eiweißbeimengung. Das Produkt war jedenfalls noch nicht einheitlich, es läßt sich in einen in Benzol leicht löslichen und schwer löslichen Anteil zerlegen.

Der erstere ergab zwar den etwa zu erwartenden Methoxylwert aber noch weniger Kohlenstoff.

4,42 mg Subst.: 9,31 mg CO₂, 2,71 mg H₂O. — 4,00 mg Subst.: 2,933 mg AgJ.

Gef. C 57,45 H 6,86 OCH₃ 9,68.

Bei der Behandlung hatte sich auch das Pigment schon im oben geschilderten Sinne weiter verändert. Eine Mikrobestimmung nach van Slyke ergab noch einen Gehalt von Aminostickstoff:

8,15 mg Subst.: 0,163 ccm N (18°, 762 mm). Gef. Amino-N 1,03.

Das Pigment gibt mit Ehrlich-Reagens (p-Dimethylaminobenzaldehyd) keine Reaktion, das Spektralbild bleibt unverändert. Auch mit Diazobenzolsulfosäure wird kein Azofarbstoff gebildet. Wird eine Lösung von Krythrobilin-ester in Chloroform mit einer Lösung von einer Spur Nitrit in verdünnter Schwefelsäure geschüttelt, so verfärbt sie sich nur rotviolett, rotgelb, gelb.

Reduktion des Phycocyanobilins.

20 mg Cyanobilin werden im Schliffgefäß mit Gas-einleitungsrohr im Stickstoffstrom mit 8 ccm Wasser über-gossen und 0,5 g 4-proc. Natriumamalgam zugefügt. Es wurde nun geschüttelt und von Zeit zu Zeit die gebildete Natronlauge durch Einleiten von Kohlendioxyd neutralisiert. Nach 4 Stunden war die Lösung grün gefärbt. Es wurde unter Durchleiten von Stickstoff nochmals die gleiche Menge Natriumamalgam zugegeben. Nach 20 stündigem Schütteln war die Lösung nur noch schwach rotbraun, nach Neutralisieren mit verdünnter Schwefelsäure schwach orange gefärbt. Sie gab mit Ehrlichs Reagens eine intensive Rotfärbung. Hauptmaximum 559, schwächeres bei 491 m μ . Von einem geringen grünlichen Niederschlage wurde abfiltriert. Die wäßrige Lösung wurde unter Kohlendioxyd mit Chloroform extrahiert. Aus der Lösung fällte Petroläther orange gefärbte Flocken, die intensive Urobilin-Reaktion gaben. Die nur noch schwach gefärbte Lösung wurde im Vakuum und Stickstoffstrom eingedunstet, in Essigester aufgenommen und durch Zusatz von Petroläther nochmals von wenigen orange Flocken befreit. Das beim Eindunsten erhaltene fast farblose Produkt oxydierte sich rasch an der Luft und färbte sich orangerot, später dichroitisch braun-grün; die Urobilin-Reaktionen waren dann positiv.

Reduktion von Phycocyanobilin mit Jodwasserstoff-Eisessig.

50 mg Cyanobilin wurden in 1,5 ccm eines Gemisches von 1 Teil HJ (1,96) und 2 Teilen Eisessig 24 Stunden in kräftig siedendem Wasserbade erhitzt. Nach Reduktion des

Jods mit Phosphoniumjodid wurde im Vakuum abgedunstet und in Sodalösung aufgenommen. Die Wasserdampfdestillation lieferte ein eigenartig riechendes Destillat, das schwache, aber deutliche Ehrlich-Reaktion gab (Band 555—535 $m\mu$). Zur Sicherheit wurde nochmals mit Wasserdampf destilliert; wieder war die Reaktion im Destillat deutlich positiv.

Der Rückstand wurde mit Salzsäure angesäuert und von braunen Flocken abfiltriert. Er gab starke Ehrlich-Reaktion (Band 565—550). Ein Versuch, Bilirubinsäure und Kryptopyrrolcarbonsäure nach H. Fischers¹⁾ Methoden zu isolieren, führte wegen der zu geringen Mengen zu keinem Resultat.

Untersuchungen über pflanzliche Fisch- und Insektengifte. II.²⁾

2. Mitteilung über Rotenon, den physiologisch wirksamen Bestandteil der *Derris elliptica*;

Von *A. Butenandt* und *F. Hildebrandt*.

[Aus dem Allgem. Chem. Univ.-Lab. Göttingen.]

(Eingelaufen am 6. Dezember 1929.)

In der 1. Mitteilung über Rotenon, den Inhaltsstoff der als Fisch- und Insektengift verwendeten *Derris*wurzel, wurden die Ergebnisse der bis dahin durchgeführten Versuche in bezug auf die Konstitution des Gesamtmoleküls in folgendem zusammengefaßt: Rotenon besitzt die Formel $C_{23}H_{23}O_6$. Von den 6 Sauerstoffatomen liegen 2 als OCH_3 -Gruppen, 1 als Ketosauerstoff und 2 in einer Lactongruppe vor. 1 Sauerstoffatom ist anscheinend oxydisch gebunden. Das optisch aktive Molekül enthält eine leicht hydrierbare Doppelbindung, bei energischer Hydrierung wird (neben der Bildung einer Carbonsäure $C_{23}H_{26}O_6$ auch die Keto-

¹⁾ H. 72, 391 (1912).

²⁾ 1. Mitteilung: A. 464, 253 (1928).