

## Beiträge zur Kenntniss der Gallenfarbstoffe.

Von

**William Küster.**

Mit einer Abbildung.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Tübingen.)

(Der Redaction zugegangen am 12. October 1898.)

Vor Jahresfrist etwa habe ich in den «Berichten» eine Arbeit mitgetheilt,<sup>1)</sup> in welcher gezeigt wurde, dass ein aus Gallensteinen vom Rinde gewonnener Farbstoff in eisessigsaurer Lösung durch dichromsaurer Natrium eine mit Oxydation verbundene Spaltung erleidet. Aus den bei diesem Prozesse entstehenden Produkten konnte eine ätherlösliche Säure isolirt werden, für welche die empirische Formel  $C_8H_9NO_4$  ermittelt und welche als Biliverdinsäure bezeichnet wurde.

Diese Versuche waren mit der geringen mir zu Gebote stehenden Menge von 36 gr. Farbstoff ausgeführt worden, auch hatte ich aus Mangel an Material auf eine Reindarstellung von Bilirubin verzichten müssen.

Und doch erschien es nothwendig, von letzterem auszugehen, um sicher zu sein, dass die erhaltenen Produkte zu diesem Gallenfarbstoffe in Beziehung stehen. Denn einmal ist das Bilirubin der einzige unter den Gallenfarbstoffen, welcher bis jetzt in krystallisirter Form erhalten werden konnte, bei dem man also die Garantie hat, dass ein chemisches Individuum vorliegt. Ferner ist das Bilirubin isomer dem Hämatoporphyrin — beiden wird die empirische Zusammensetzung  $C_{16}H_{18}N_2O_3$  zugeschrieben. Das Hämatoporphyrin entsteht aber aus dem Hämatin durch Einwirkung von Eisessig und Brom-

<sup>1)</sup> Ber. d. d. chem. Ges. XXX. 1831.

wasserstoff,<sup>1)</sup> das Bilirubin soll sich aus dem Hämatin durch die Thätigkeit lebender Zellen bilden.

Es war nun nicht unwahrscheinlich, durch Spaltungsprodukte, welche unter möglichst gleichen Bedingungen aus beiden Farbstoffen entstehen, einen Einblick in die Art ihrer Isomerie und damit auch in einen Process zu erhalten, welcher sich im lebenden Organismus abspielt. Besonders hierfür geeignet erschien die erwähnte Biliverdinsäure; von ihr war anzunehmen, dass sie zu den von mir aus dem Hämatin bezw. Hämatoporphyrin dargestellten Hämatinsäuren<sup>2)</sup> in Beziehung stehe.

Meine Aufgabe bestand also zunächst darin, reines Bilirubin und grössere Mengen von Biliverdinsäure herzustellen.

Das Material zu den vorliegenden Untersuchungen — farbstoffhaltige Gallensteine vom Rinde — erhielt ich etwa im Laufe eines Jahres und zwar wiederum meist aus den Schlachthäusern des westlichen Deutschlands (Kiel, Bremen, Köln, Düsseldorf, Frankfurt a. M., Strassburg, Esslingen, ausserdem aus München). In der That scheinen im östlichen Deutschland Gallensteine beim Rinde seltener zu sein, wenigstens waren in Königsberg i. Pr. alle Bemühungen, solche zu erhalten, vergebens.

### **Darstellung von krystallisirtem Bilirubin.**

Zur Darstellung reinen Bilirubins wurde von 211 gr. bei 100° getrockneten, dann fein gepulverten und gesiebten Gallensteinen ausgegangen. Diese wurden in kleinen Portionen im Wesentlichen nach den Vorschriften von Städeler<sup>3)</sup> und Maly<sup>4)</sup> verarbeitet, d. h. zunächst einen Tag lang mit Aether extrahirt, dann 3—4 Tage lang mit immer neuen Mengen

1) Archiv f. exp. Pathol. u. Pharmak. XXIV. 432. Wiener Monatshefte 10. 569.

2) Ber. d. d. chem. Ges. 29. 821. 30. 105.

3) Ann. 132. 323.

4) Sitz.-Ber. d. K. Ak. d. W. in Wien, 57. 96. Ann. 175. 78.

destillirten Wassers ausgekocht, bis dasselbe nur noch schwach gefärbt abliet, darauf mit verdünnter Salzsäure ausgelaugt,<sup>1)</sup> bis Ammoniak und Ammoniumcarbonat keine Trübung im Filtrate mehr gaben, hierauf salzsäurefrei gewaschen und schliesslich wieder getrocknet. Das Gewicht betrug jetzt noch 150 gr., 61 gr. waren also gelöst worden, d. h. 28,11<sup>o</sup> o, während Maly bei der Analyse eines Gallensteines diesen Antheil = 24,78<sup>o</sup> o fand.<sup>2)</sup>

Nun wurde, einem Rathe Städelers<sup>3)</sup> folgend, wiederum einen Tag mit Aether extrahirt, wodurch ausser geringen Mengen von Bilirubin, welche wiedergewonnen werden können, viel fettige Substanz in Lösung geht. Es folgte jetzt die Extraction mit Chloroform, welche 7 Tage lang fortgesetzt wurde mit der Vorsichtsmassregel, dass dabei der Zutritt des Sonnenlichts möglichst ausgeschlossen war: so befand sich namentlich der Soxhlet'sche Extractionsapparat in einer Metallkapsel. Gelöst wurden hierdurch 52,5 gr., ungelöst blieben 93 gr. Diese letzteren enthalten, wenn die Angaben Städelers, der mit menschlichen Gallensteinen arbeitete, auch auf solche von Rinde Bezug haben sollten, Biliprasin, Bilihumin und Reste von Bilirubin. Um die letzteren zu gewinnen, wurde daher nach den Angaben jenes Forschers mit Alkohol extrahirt, welcher in der That Farbstoff (Biliprasin?) herausnahm, und nun wieder die Extraction mit Chloroform fortgesetzt. Hierbei ging aber nur äusserst wenig Bilirubin mehr in Lösung.

Eine Untersuchung des nach dem Abdestilliren des Alkohols erhaltenen Rückstands sowie der andern gleich zu erwähnenden bedeutenden Abfälle steht noch aus.

Die 52,5 gr. Farbstoff (Präparat A), welche sich in Chloroform gelöst hatten, repräsentiren 24,9<sup>o</sup> o der verwendeten Gallensteine. Auf ähnliche Weise wurden aus 549 gr. Rohmaterial 77,5 gr. unreines Bilirubin, d. h. nur etwa 14<sup>o</sup> o er-

<sup>1)</sup> Hierbei wurde immer eine Entwicklung von Schwefelwasserstoff wahrgenommen.

<sup>2)</sup> Ann. 175. 80.

<sup>3)</sup> Ann. 132. 337.

halten, wovon 54 gr. als bessere Qualität gesondert werden konnten (Präparat B)<sup>1)</sup>.

Präparat A wurde nun nach Städeler's Vorschrift mit absolutem Alkohol extrahirt um Bilifuscin zu entfernen, welches sich mit dem Bilirubin gelöst haben soll. In der That nahm der Alkohol eine geringe Menge eines Farbstoffes auf, der, wie Städeler angiebt, bei mässiger Hitze schmilzt: bei 100° z. B. zerfloss er zu einer blasigen Masse.

Es blieben, scharf getrocknet, 46 gr. zurück, welche aber, schon nach dem Aussehen zu urtheilen, kein reines Bilirubin vorstellen konnten. Nun wird eine Reinigung dieses Produkts durch Aufnahme in Chloroform und Fällen mit absolutem Alkohol empfohlen. Nach dieser Methode habe ich aber kein brauchbares Resultat erhalten, denn mir lieferte dieselbe einen amorphen Farbstoff von wenig schöner Farbe. Ferner sind die Mengen des Lösungs- und Fällungsmittels im Verhältniss zum Farbstoff so enorme, dass sich wohl niemand gerne an diese Arbeit wagen wird, sobald es sich nur um die Gewinnung weniger Gramme Bilirubin handelt. Sind doch, wie schon Thudichum angiebt,<sup>2)</sup> fast 600 Theile Chloroform nöthig, um einen Theil Bilirubin zu lösen und etwa die zwei- bis dreifache Menge absoluten Alkohols, um wieder eine Fällung zu bewirken.<sup>3)</sup>

Ich habe daher eine ganze Reihe von Lösungsmitteln daraufhin untersucht, ob sie ein Umkrystallisiren des Bilirubins ermöglichen: zunächst ohne Erfolg. Glycerin z. B. löst garnicht,<sup>4)</sup> Pyridin und Pinen nur wenig. Dagegen erwies sich Dimethylanilin als recht geeignet: es vermag in der Hitze reichlich Bilirubin zu lösen und beim Erkalten scheidet sich ein Theil desselben in Form hübscher Krystalle wieder ab. Doch war zunächst nur Präparat B für diese Umkrystallisation geeignet: aus 1 gr. desselben wurden z. B. 0,4 gr. Bilirubinkrystalle er-

1) Maly fand bei seinen Analysen 28, 30 und 45 % Roh-Bilirubin.

2) J. f. pr. Ch. 104. 200.

3) Nach meinen Erfahrungen gelingt diese Fällung noch am besten in der Wärme.

4) Maly, l. c. 98. findet Bilirubin in Glycerin etwas löslich.

halten, während 5 gr. des Präparats A nur 0,7 gr. Krystalle gaben. Letzteres wurde deshalb von Neuem mit Chloroform extrahirt, wobei abermals 27 gr. zurückblieben, während sich nur 13 gr. gelöst hatten. Diese wurden nun ebenfalls mit guter Ausbeute an krystallisirtem Material der Behandlung mit Dime-



*Bilirubin aus Dimethylanilin umkrystallisirt  
bei 500facher Vergrößerung.*

thylanilin unterworfen. Zuerst wurde allerdings ein Bilirubin erhalten, welches bei der Analyse zu hohe Werthe für den Stickstoff gab (Präparat I).

Trägt man aber das zu reinigende Bilirubin in Portionen von ca. 6 gr. in 100 gr. gelinde siedendes Dimethylanilin ganz allmählich ein und filtrirt dann durch ein gewöhnliches Papier-

filter vom Ungelösten ab, so setzen sich aus dem Filtrate noch während des Filtrirens deutlich krystallinische Massen ab. Nach 12 Stunden etwa wird das Ausgeschiedene abgesaugt und mit absolutem Alkohol völlig ausgewaschen. Es erwies sich unter dem Mikroskope als durchweg krystallisirt: und zwar bestehen die Krystalle zumeist aus breiten, an beiden Enden schief abgeschnittenen Säulen, doch kommen auch keulenförmige, sehr charakteristische Formen vor, welche einen fast elliptischen Querschnitt zeigen, wie mir Herr Privatdocent Dr. Schmid mittheilte, dem ich auch für die angefügte, bei 500facher Vergrößerung ausgeführte Zeichnung zu grossem Danke verpflichtet bin.

In der Form unterscheiden sich namentlich die letzteren wesentlich von den Bilirubinkrystallen, welche Thudichum<sup>1)</sup> erhalten hat. Was die Farbe betrifft, so kann ich bestätigen, dass noch unreines, amorphes Bilirubin lebhafter roth aussieht, als das krystallisirte. Meine Präparate zeigten eine prächtige braunrothe Farbe.

Was die Ausbeute betrifft, so erhielt ich:

1. Aus 18 gr. Rohprodukt, verarbeitet in 3 Portionen, 4 gr. Bilirubinkrystalle (Präparat II).
2. Aus 10 gr. Rohprodukt, verarbeitet in 2 Portionen, 3,3 gr. Bilirubinkrystalle<sup>2)</sup> (Präparat III).

Bei der Analyse des krystallisirten Bilirubins erhielt ich folgende Werthe:

1. 0,1707 gr. von Präparat I, bei 100° getrocknet, gaben 0,4140 gr. CO<sub>2</sub> und 0,1080 gr. H<sub>2</sub>O.
2. 0,1913 gr. von Präparat I, bei 100° getrocknet, gaben 0,4699 gr. CO<sub>2</sub> und 0,1185 gr. H<sub>2</sub>O.

1) J. f. pr. Chem. 104. 199.

2) Hierbei blieben ungelöst zurück: ca. 5 gr., im Dimethylanilin blieben gelöst: 1,8 gr.; von letzterem wurden durch Fällen mit Alkohol 0,3 gr., durch Fällen mit Salzsäure 1,5 gr. erhalten.

Die Untersuchung dieser Farbstoffe, in welchen vielleicht Umwandlungsprodukte des Bilirubins vorliegen, die sich durch die Einwirkung des Dimethylanilins oder durch die hohe Temperatur (190°) gebildet haben können, steht noch aus.

3. 0,1513 gr. von Präparat I, bei 100° getrocknet, gaben 15 ccm. N bei 745 mm. B und 13°.
4. 0,2040 gr. von Präparat I, bei 100° getrocknet, gaben 19,8 ccm. N bei 739,5 mm. B und 10°.
5. 0,1755 gr. von Präparat II, bei 110° getrocknet, gaben 0,4341 gr. CO<sub>2</sub> und 0,1070 gr. H<sub>2</sub>O, im Schiffchen blieben 0,0002 gr. Asche.
6. 0,1800 gr. von Präparat III, bei 115° getrocknet, gaben 0,4435 gr. CO<sub>2</sub> und 0,1036 gr. H<sub>2</sub>O.
7. 0,1870 gr. von Präparat II, bei 110° getrocknet, gaben 17,5 ccm. N bei 726 mm. B und 20°.
8. 0,2084 gr. von Präparat III, bei 115° getrocknet, gaben 19 ccm. N bei 729,6 mm. B und 17,5°.

Berechnet für:



C 67,13 %

H 6,29 %

N 9,79 %

Präparat I.

66,94 66,99 %

7,03 6,88 %

11,48 11,35 %

Gefunden:

II.

67,45 %

6,77 %

10,21 %

III.

67,19 %

6,46 %

10,12 %

Präparat II enthielt 0,114 % Asche.

Präparat III war aschefrei.

Präparat I war nicht vollständig, II und III dagegen völlig löslich in Chloroform, mit letzterem wurde eine quantitative Bestimmung der Löslichkeit ausgeführt. Es ergab sich, dass 6,86 gr. Chloroform 0,0121 gr. Bilirubin in Lösung hielten, oder: 567 Theile Chloroform lösen 1 Theil Bilirubin.<sup>1)</sup>

Um auch die Löslichkeit des Bilirubins in Dimethylanilin wenigstens annähernd zu bestimmen, wurde ein Ueberschuss des Farbstoffs mit dem genannten Lösungsmittel 5 Minuten lang im Sieden erhalten, dann in ein gewogenes Kölbchen filtrirt und das Gesamtgewicht der Lösung nach dem Erkalten bestimmt (6,0324 gr.). Nach 12 Stunden wurde durch ein gewogenes Filter abgossen, mit Alkohol nachgespült und völlig damit ausgewaschen.

Im Filter fanden sich:

0,0948 gr. Farbstoff

Im Kölbchen blieben noch zurück:

0,0053

Beim Erkalten waren also ausgefallen: 0,1001 gr. Farbstoff.

Durch den Alkoholzusatz wurde ferner der Theil des Farbstoffs gefällt, welcher bei Zimmertemperatur im Dimethylanilin

1) Thudichum fand 586 Theile. J. f. pr. Ch. 104. 200.



in ein sattes Grün über. Unter häufigem Umschütteln liess ich die Einwirkung etwa 36 Stunden dauern, dann wurde vom überschüssigen Bleisuperoxyd abfiltrirt, das Filtrat durch Essigsäure gefällt, der Niederschlag (Biliverdinblei?) abgesaugt und bis zum Aufhören der Bleireaction ausgewaschen. Jetzt wurde er in 95%igem Alkohol heiss gelöst und diese Lösung mit 1 ccm. 20%iger Schwefelsäure versetzt; nach einigem Stehen wurde dann die heisse Lösung durch ein gehärtetes Filter abfiltrirt und das erkaltete Filtrat in etwa das dreifache Volumen Wasser eingegossen. Am nächsten Tage konnte der Niederschlag abgesaugt werden, er wurde dann so lange gewaschen, bis er sich schwefelsäurefrei erwies, erst an der Luft und dann im Vacuum getrocknet.

Erhalten wurde aus 5 gr. krystallisirtem Bilirubin 4,1 gr. des grünen Farbstoffs, bei einem weiteren Versuche aus 4 gr. 3,2 gr.

Die Ausbeuten waren also nicht quantitativ.

Die Analysen ergaben das folgende Resultat:

- 1) 0,1834 gr. Substanz, bei 100° getrocknet, lieferten 0,4409 gr. CO<sub>2</sub> und 0,1035 gr. H<sub>2</sub>O.
  - 2) 0,2703 gr. Substanz gaben 23 ccm. Stickstoff bei 738 mm. B. und 20°.
- Die Substanz war aschefrei.

Berechnet für:	Gefunden:	Berechnet für:
C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>		(C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> O
C 63,58 %	65,57 %	65,31 %
H 5,96 %	6,27 %	6,13 %
N 9,26 %	9,45 %	9,52 %

Es war also kein Biliverdin entstanden, die Sauerstoffaufnahme war vielmehr nur halb so gross, als berechnet war, vielleicht hatten 2 Moleküle Bilirubin 1 Atom Sauerstoff aufgenommen.

Nun wurden 2 gr. des analysirten grünen Farbstoffs von neuem in Alkali gelöst und mit Bleisuperoxyd behandelt. Die grüne Lösung nahm jetzt einen braungelben Ton an, auf Zusatz von Essigsäure fiel der Farbstoff nicht vollständig aus, vielmehr blieb die über dem Niederschlage stehende Flüssigkeit stark gefärbt; auch in dem wässerigen Alkohol ist der entstandene Körper etwas löslich.

Bei der Analyse des wie angegeben isolirten und gereinigten Farbstoffs gaben 0.1731 gr., bei 100° getrocknet, 0.3970 gr. CO<sub>2</sub> und 0.0920 gr. H<sub>2</sub>O.

Berechnet für Biliverdin:	Gefunden:
$C_{16}H_{18}N_2O_4$	
C 63.58 %	62.55 %
H 5.96	5.90
N 9.26	—

Jetzt war also die Oxydation über das Biliverdin hinausgegangen.

Aus Maly's Angaben ist nicht zu ersehen, ob das von ihm analysirte Präparat durch den Sauerstoff der Luft oder durch Bleisuperoxyd erhalten war: ich vermute, dass die erstere Methode befolgt wurde. Nach meinem Befunde scheint Bleisuperoxyd nicht gerade nur zum Biliverdin zu oxydiren, was bei der leichten Oxydirbarkeit des Gallenfarbstoffs nicht Wunder nehmen kann. Ich gedenke aber auch die andere Methode zu prüfen, um zu erfahren, ob das Bilirubinmolekül hierbei gerade nur ein Sauerstoffatom aufnimmt, oder ob doch vielleicht auch eine Hydrolyse eintritt, wie Städeler vermuthet.<sup>1)</sup>

#### Oxydation des aus reinem Bilirubin erhaltenen grünen Farbstoffs mit dichromsaurem Natrium.

Weitere Versuche zur Darstellung von Biliverdin wurden einstweilen unterlassen, da sich ja der erhaltene Farbstoff von reinem Bilirubin ableitete und sich ferner in Eiessig völlig löste, also für die beabsichtigte weitere Oxydation geeignet war.

5 gr. des grünen Farbstoffs wurden in 120 ccm. Eiessig gelöst und im Laufe eines Tages die wässrige Lösung von 9.5 gr.<sup>2)</sup> Natriumbichromat eingetragen, welche Menge, auf das Molekül Biliverdin  $C_{16}H_{18}N_2O_4$  bezogen, 6 Atomen Sauerstoff gleichkommt. Hierbei wurde 10 Stunden lang auf stark siedendem Wasserbade erhitzt, da es von früher her bekannt war, dass erst unter dieser Bedingung alle Chromsäure verbraucht wird. Die sich bei dieser Oxydation entwickelnde Kohlensäure wurde

1) Ann. 132. 336.

2) Das Natriumbichromat war 92,3%ig.

durch einen Rückflusskühler in eine concentrirte Lösung von Chlorbaryum in wässrigem Ammoniak<sup>1)</sup> geleitet, während durch den Apparat ein langsamer Luftstrom gesaugt wurde, der durch Natronkalk von Kohlensäure befreit war.

Nach der angegebenen Zeit war die Chromsäure in der That verbraucht, wie eine herausgenommene Probe lehrte. Das gebildete Baryumcarbonat wurde jetzt rasch filtrirt, völlig ausgewaschen, in N.-Salzsäure gelöst und mit N.-Natronlauge zurücktitrirt.

Verbraucht wurden 32,5 ccm. N.-HCl = 0,715 gr. CO<sub>2</sub> = 0,195 gr. C, d. h., da die 5 gr. Farbstoff 3,18 gr. Kohlenstoff enthalten, etwa  $\frac{1}{16}$  des Kohlenstoffs. Also war 1 Atom C zu Kohlensäure oxydirt worden. — Nun wurde der Eisessig, welcher zur Lösung gedient hatte, im Vacuum möglichst vollständig abdestillirt, der Rückstand mit heissem Wasser aufgenommen und der Rest der freien Essigsäure auf dem Wasserbade vertrieben. Nachdem dann von einem beträchtlichen Rückstande (1,8 gr.)<sup>2)</sup> abfiltrirt worden war, wurde die berechnete Menge 20%iger Schwefelsäure zugefügt und die so frei gewordene Essigsäure abermals auf dem Wasserbade verjagt. Auch hierbei tritt eine geringe harzartige Abscheidung auf (0,6 gr.)

Die so erhaltene Lösung wurde erschöpfend ausgeäthert: nach dem Abdestilliren des Aethers hinterblieben ca. 1,2 gr. Rohsäure, welche durch Lösen in Natriumcarbonat, Ausschütteln der alkalischen Lösung mit Aether,<sup>3)</sup> Wiederansäuern, abermalige Aufnahme in Aether gereinigt wurde.

Der Aether hinterliess jetzt einen Rückstand, welcher in Wasser vollständig löslich war und aus dieser Lösung im Vacuum nach 3 Wochen in rosettenförmig angeordneten Nadeln krystallisirte. In die kalte wässrige Lösung derselben wurde nun Calciumcarbonat eingetragen, welches unter lebhafter Kohlensäureentwicklung zersetzt wurde. Beim Erhitzen der

1) c. f. Erlenmeyer, Sigel-Belli. Ann. 180. 221. Tollens. Ann. 206. 260.

2) Dieser Niederschlag muss sehr sorgfältig ausgewaschen werden.

3) Hierdurch wurden nur ganz geringe Mengen einer organischen Substanz herausgenommen.

abfiltrirten Lösung der Kalksalze entstand ein Niederschlag, der nach dem Trocknen bei  $100^{\circ}$  0,2234 gr. wog und bei der Analyse 0,0621 gr. CaO gab = 19,89% Ca. Das ganze Verhalten des Calciumsalzes und auch der Calciumgehalt stimmten sonach überein mit den Eigenschaften des Salzes, welches sich von dem bei der Oxydation des Hämatins entstehenden Körper  $C_8H_8O_3$  ableitet.

Aus dem löslich bleibenden Calciumsalz wurden 0,7 gr. Säure regenerirt, die anfänglich einen Syrup bildete, aber fast sofort nach dem Impfen mit einem Krystall der «Biliverdinsäure» krystallisirte. Hiernach ist der Schluss wohl gestattet, dass die genannte Säure auch als ein Spaltungsprodukt des reinen Bilirubins anzusehen ist, das allerdings nicht in beträchtlicher Menge entsteht.

Die erschöpfend ausgeätherte Flüssigkeit muss nach der Quantität der erhaltenen Spaltungsprodukte noch weitere Mengen von solchen enthalten, doch konnten sie bisher nicht gefasst werden, mit Ausnahme eines anorganischen, nämlich des Ammoniaks.

Der Nachweis, dass sich Ammoniak bei der geschilderten Spaltung des Gallenfarbstoffs bildet, ist schon früher erbracht worden; die Resultate sind aber noch nicht veröffentlicht, ich will sie jetzt nachtragen und hier einschalten.

Die von der Biliverdinsäure durch Ausäthern befreite Flüssigkeit wurde durch Natronlauge schwach alkalisch gemacht, das ausgefallene Chromhydroxyd abfiltrirt und aus dem Filtrate die flüchtigen Basen durch Wasserdampf übergetrieben. Das Destillat, welches stark alkalisch reagirte, wurde in verdünnter Salzsäure aufgefangen, dann auf dem Wasserbade eingedampft, das salzsaure Salz in wenig Wasser gelöst und durch Platinchlorid gefällt, das ausgefallene Platindoppelsalz wurde der Analyse unterworfen:

0,1777 gr. desselben hinterliessen nach dem Glühen 0,0786 gr. Pt, woraus sich ein Gehalt von 44,23% Pt ergibt.

Für Platinsalmiak berechnet sich: 43,93% Pt.

Es kann also nur Ammoniak übergegangen sein.

Bei dem neuen Versuche mit 5 gr. aus reinem Bilirubin

hergestelltem Farbstoffe wurde nun auch die Quantität des erhaltenen Ammoniaks möglichst genau bestimmt. Erhalten wurden 0,4 gr. Salmiak entsprechend 0,105 gr. Stickstoff. Da 5 gr. Biliverdin 0,463 gr. Stickstoff enthalten, ist also etwa  $\frac{1}{4}$  des Stickstoffs als Ammoniak abgespalten worden.

Aus 5 gr. Gallenfarbstoff waren also erhalten worden:

1.2 gr. ätherlösliche Körper.

1,8 gr. } feste, wasserunlösliche Oxydationsprodukte, die sich in  
0,6 „ } Alkalien auflösen.

0.715 gr. Kohlensäure.

0.127 gr. Ammoniak.

### Ueber die Biliverdinsäure.

Um die in der ersten Mittheilung<sup>1)</sup> bereits beschriebene Biliverdinsäure genauer charakterisiren zu können, bedurfte ich grösserer Mengen von Gallenfarbstoff, doch war es nicht nothwendig, von dem nur auf so umständlichem, mit grossen Verlusten verbundenem Wege darstellbaren Bilirubin auszugehen, da ja das rohere Material dieselbe Säure in gleicher Ausbeute ergeben hatte. Ja es sind auch die Theile der Gallensteine, welche nach der Extraction des Bilirubins mittelst Chloroform verbleiben, durchaus für die Gewinnung der Biliverdinsäure geeignet.

Aus 549 gr. getrockneter Gallensteine hatte ich, wie erwähnt, 77,5 gr. unreines Bilirubin extrahirt: der Rückstand gab nach siebentägiger Erschöpfung durch Chloroform so gut wie nichts mehr an dieses ab, enthielt aber noch reichlichen Farbstoff. Um diesen zu gewinnen, wurde die Masse mit verdünnter Natronlauge, der etwas Alkohol zugesetzt war,<sup>2)</sup> erschöpfend ausgezogen, in der Weise, dass man nach längerem Digeriren in der Wärme einige Zeit stehen liess, bis das Ungelöste sich möglichst abgesetzt hatte, worauf die mit Farbstoff gesättigte alkalische Lösung abgehebert, der Rückstand aber von neuem mit schwach alkoholischer Natronlauge behandelt

1) Ber. 30, 1831.

2) cf. Thudichum. J. f. pr. Ch., 104, 197.

wurde. Dieses Verfahren ist dem Filtriren vorzuziehen, weil die unlöslich gebliebenen Theile die Filterporen sehr leicht verstopfen.

Die alkalische Lösung blieb in flachen Schalen einige Tage unter häufigem Umrühren stehen, bis die anfangs gelbbraune Flüssigkeit eine grüne Farbe angenommen hatte; dann wurde filtrirt und aus dem Filtrate der Farbstoff durch Salzsäure gefällt. Der grösste Theil desselben fällt hierbei aus und kann abfiltrirt werden, ein kleiner Theil aber löst sich, wahrscheinlich in der Kochsalzlösung, auf, wie aus der braungrünen Farbe des Filtrats ersichtlich ist. Der ausgefallene Antheil wurde nun nochmals durch schwache Lauge vom Filter gelöst, wobei nur geringe Mengen eines rothbraunen Farbstoffes zurückblieben, dann wieder gefällt, abgesaugt und nun chlorfrei gewaschen. Das Waschwasser läuft zuerst stark gefärbt ab, wird aber zum Schluss farblos. Wie gesagt, der Farbstoff ist wohl etwas in Kochsalz löslich, und auch in 95%igem Alkohol löst er sich in beträchtlicher Menge. Der sehr voluminöse Niederschlag wurde nun zunächst an der Luft, zum Schluss bei 100° getrocknet, dann nochmals mit Wasser gewaschen, wieder getrocknet, endlich mit Aether extrahirt. Erhalten wurden zwei Präparate, deren Gesamtgewicht 136 gr. betrug: das sind also fast 25% der getrockneten Gallensteine.

Bei der Analyse wurden folgende Werthe erhalten:

1. 0.1919 gr. des ersten Präparates gaben 0,4312 gr. CO<sub>2</sub> und 0,1125 gr. H<sub>2</sub>O, im Schiffchen blieben 0,003 gr. Asche;
2. 0.2917 gr. desselben gaben 26 ccm. N bei 722,5 mm. B. und 16°;
3. 0.2050 gr. des zweiten Präparates gaben 0,4606 gr. CO<sub>2</sub> und 0,1185 gr. H<sub>2</sub>O, im Schiffchen blieben 0,0029 gr. Asche;
4. 0.3675 gr. desselben gaben 30 ccm. N bei 731 mm. B. und 16°.

Hieraus ergibt sich auf aschefreie Substanz bezogen:

	Berechnet für			
	$4C_{15}H_{18}N_2O_3 + 3O + 2H_2O$			
	4. = $C_{64}H_{76}N_8O_{17}$			
C	1.	2.	3.	4.
	62.25 %	—	62.19 %	—
H	6.51 %	—	6.42 %	—
N	—	10.02 %	—	9.28
Asche	1.56 %	—	1.415 %	—

Dieser Farbstoff, der jedenfalls ein Gemisch verschiedener Individuen darstellt, könnte in seiner Gesamtheit so aus dem Bilirubin entstanden gedacht werden, dass 4 Moleküle desselben 3 Atome Sauerstoff und 2 Moleküle Wasser aufgenommen haben; für eine solche Combination berechnen sich die oben angeführten Zahlen, welche leidlich mit den gefundenen Werthen harmoniren.

Auch dieser Farbstoff wurde nun in kleineren Portionen, meist à 5 gr., der Oxydation mit Natriumdichromat in essigsaurer Lösung unterworfen, neben den ätherlöslichen Produkten und den sich unlöslich abscheidenden wurde auch hier gelegentlich die Menge der gebildeten Kohlensäure und die des Ammoniaks<sup>1)</sup> bestimmt; leider lässt die Uebereinstimmung der Resultate in Bezug auf letztere Körper sehr zu wünschen übrig. Auch die Menge der unlöslichen Körper schwankt beständig, während von den ätherlöslichen Produkten fast regelmässig 20% vom Ausgangsmaterial erhalten wurde.

Verwendeter Gallenfarbstoff	Aetherlösliche Produkte	In Wasser und Säuren unlösliche, in Alkalien lösliche Produkte		gr. CO <sub>2</sub>	C in Theilen des im Farbstoff vorhandenen	gr. NH <sub>4</sub> Cl	N in Theilen des im Farbstoff vorhandenen
		A	B				
1. 5 gr.	1 gr.		geringe Menge				
2. 20 gr.	3.7 gr.	10.5				0.3 gr.	
3. 26 gr.	5 gr.	7.8	2			1.8 gr.	
4. 23 gr.	ca. 5.5 gr.	12.5	geringe Menge	Aus 5 gr. 0.5566 gr. CO <sub>2</sub>	1.20	1 gr.	
5. 20 gr.	ca. 5 gr.	6.2	geringe Menge	Aus 5 gr. 0.902 gr. CO <sub>2</sub>	1.13		
6. 20 gr.	4 gr.	5.8		Aus 5 gr. 0.48 gr. CO <sub>2</sub>	1.25		

1) Dass die flüchtige Basis, welche sich bei der Spaltung dieses Farbstoffs bildet, auch nur Ammoniak ist, beweisen folgende Analysen der aus dem salzsauren Salze erhaltenen Platinchloriddoppelverbindung. Die Lösung der Chloride wurde fractionirt gefällt.

1) 0.2080 gr. der ersten Fraction hinterliessen 0,0917 gr. Platin.

2) 0.4202 „ „ zweiten „ „ 0,1845 „ „

Berechnet für

Gefunden:

Platinsalmiak:

1. 2.

Pt: 43.9 %

44.09 % 43.93 %

Des Weiteren wurde auf flüchtige, etwa reducirend wirkende Körper untersucht, indem beim Abdestilliren des Eisessigs, welcher zur Lösung des Gallenfarbstoffs gedient hatte, die zuerst übergehenden Antheile mit ammoniakalischer Silberlösung geprüft wurden, doch mit negativem Erfolge.

Als Hauptprodukte der Oxydation wurden aus 136 gr. Gallenfarbstoff erhalten:

1. 48 gr. des Körpers, welcher sich beim Aufnehmen der durch Destillation von der Essigsäure befreiten Masse in Wasser, resp. bei der völligen Vertreibung der freien Essigsäure auf dem Wasserbade abgeschieden hatte. Die nähere Untersuchung desselben steht noch aus.
2. 27,5 gr. ätherlösliche Produkte, d. h. etwa 20% vom Ausgangsmaterial.

Die Reinigung der letzteren wurde in der früher geschilderten Weise bewirkt: bei der grösseren Menge wurde hier eine Trübung beobachtet, als die Lösung der Natriumsalze mit Schwefelsäure angesäuert wurde, und beim Stehen im Eisschrank setzte sich ein braunes Harz in geringer Menge ab, von welchem die klare Lösung abgegossen werden konnte. Diese wurde nun ausgeäthert, der Aetherrückstand aus heissem Essigester umkrystallisirt und mit eiskaltem Essigester nachgewaschen.

Die Analyse bestätigte die früher angenommene empirische Zusammensetzung  $C_8H_9NO_4$ : ich führe die noch nicht veröffentlichten Belege hier an:

1. 0.1057 gr. des ersten Präparats, im Vacuum getrocknet, gaben 0.2020 gr.  $CO_2$  und 0.0525 gr.  $H_2O$ ;
2. 0.1206 gr. desselben gaben 8.6 ccm. N bei  $21^\circ$  und 732 mm. B;
3. 0.2021 gr. des neuen Präparats, im Vacuum getrocknet, gaben 0.3874 gr.  $CO_2$  und 0.0923 gr.  $H_2O$ ;
4. 0.1612 gr. desselben gaben 11.2 ccm. N bei  $22^\circ$  und 734 mm. B.

Berechnet für	Gefunden:			
	I.		II.	
$C_8H_9NO_4$ :	1.	2.	3.	4.
C 52.45 %	52.12 %	—	52.28 %	—
H 4.92 %	5.52 %	—	5.07 %	—
N 7.65 %	—	7.81 %	—	7.60 %

Die Molekulargewichtsbestimmung, im Beckmann'schen Siedeapparat ausgeführt, bestätigt die angenommene Formel. Lösungsmittel Aether:  $c = 21$ .

Aether	Säure	$\Delta$	Molekulargewicht	
			gefundenes:	berechnetes:
20.04	0.1968	0.10	205	183

Die gefundene Zahl ist etwas zu hoch, weil sich die Säure im Aetherdampf nicht vollständig löste

Es wurde deshalb eine weitere Bestimmung mit Chloroform ausgeführt:  $c = 33,6$ .<sup>1)</sup>

Chloroform	Säure	$\Delta$	Molekulargewicht	
			gefundenes:	berechnetes:
32 gr.	0.1487	0.100	170	183
31.5 "	0.2668	0.160	194	—

Der Schmelzpunkt der Biliverdinsäure wurde früher zu 100—101° angegeben; er wurde jetzt höher gefunden, bei 108° fand ein Erweichen, das Schmelzen bei 110—111° statt. Die Substanz war damals wohl nicht ganz rein gewesen, was auch aus der Analyse hervorgeht.

Biliverdinsäure lässt sich auch aus siedendem Toluol, dem man zweckmässig etwas absoluten Alkohol zufügt, umkrystallisiren. Sie wird dann in ziemlich breiten Nadeln erhalten, die sich zu kugeligen Büscheln vereinigen. Doch haftet diesen Krystallen hartnäckig Toluol an, weshalb ihr Schmelzpunkt ganz unscharf ist. Als dann die Säure in warmem Wasser aufgenommen und dieses im Vacuum verdunstet wurde, erhielt ich eine hygroskopische Krystallmasse, welche schon bei 100° weich wurde und bei 108—110° schmolz.

Die Biliverdinsäure scheint optisch inactiv zu sein, wenigstens übte eine 100 mm. lange Schicht einer 4,1%igen Lösung keinen Einfluss auf das polarisirte Licht aus.

### Salze der Biliverdinsäure.

I. Das Silbersalz der Biliverdinsäure wurde dadurch bereitet, dass die wässrige Lösung der Säure mit Ammoniak neutralisirt und nun mit einer concentrirten heissen Lösung von Silbernitrat in berechneter Menge gefällt wurde. Da die Reaction

<sup>1)</sup> E. Beckmann, Z. physik Chem., Bd. VI, 445.

jetzt sauer geworden war, wurde wieder durch Ammoniak neutralisirt, der Niederschlag abgesaugt und mit heissem 96%igen Alkohol solange gewaschen, bis das Ablaufende frei von Silber war. Das im Vacuum getrocknete Salz ist gegen Licht nicht sehr empfindlich, bräunt sich aber schon beim Erhitzen auf 100° etwas. Zur Analyse wurde deshalb nur im Vacuum getrocknetes Salz verwendet.

1. 0,1800 gr. Silbersalz gaben 0,1540 gr. CO<sub>2</sub> und 0,0350 gr. H<sub>2</sub>O, im Schiffchen blieben 0,0947 gr. Ag;
2. 0,2331 gr. Silbersalz gaben 0,1949 gr. CO<sub>2</sub> und 0,0493 gr. H<sub>2</sub>O;
3. 0,3424 gr. Silbersalz gaben 0,2357 gr. AgCl aus schwefelsaurer Lösung durch HCl gefällt.

	Berechnet für:			Gefunden:		
	C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> Ag <sub>2</sub> NO <sub>4</sub>	C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> Ag <sub>2</sub> NO <sub>4</sub> + 1H <sub>2</sub> O	1.	2.	3.	
C	24,18%	23,13%	23,06%	22,80%	—	
H	1,76%	2,17%	2,14%	2,35%	—	
Ag	54,40%	52,05%	52,00%	—	51,99%	

Nach diesen Befunden ist also eine Molekül Wasser eingetreten und C<sub>8</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>5</sub> würde eine zweibasische Substanz repräsentiren, wie das auch aus der später erwähnten Titration hervorgeht.

II. Zur Darstellung des Calciumsalzes wurde die wässrige Lösung der Biliverdinsäure mit Calciumcarbonat behandelt, das unter lebhaftem Aufbrausen in Lösung geht. Die vom Ungelösten abfiltrirte Flüssigkeit schied beim Stehen im Vacuum das Salz in zu Drusen veinigten Nadeln ab, welche durch Lösen in sehr verdünntem Weingeist und Verdunsten des Lösungsmittels im Vacuum gereinigt wurden.

0,2663 gr. dieses Calciumsalzes verloren bei 95° 0,0105 gr., bei 110° unter Bräunung 0,0135 gr., darauf wurde die wässrige, mit etwas Ammoniak versetzte Lösung durch Ammoniumoxalat gefällt und der Niederschlag wie üblich in das Oxyd übergeführt. Erhalten wurden 0,0361 gr. CaO.

	Berechnet für:		Gefunden:	
	(C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> Ca + 1H <sub>2</sub> O			
H <sub>2</sub> O	4,26%	bei 95° H <sub>2</sub> O	3,94%	bei 110° 5,07%
Ca	9,48%	Ca	9,65%	

Danach hat sich also auf die geschilderte Weise das neutrale Calciumsalz der einbasischen Substanz C<sub>8</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>4</sub> ge-

bildet, welches bei 110° bereits geringe Zersetzung erleidet. Es ist sehr leicht, namentlich in heissem Wasser, löslich, doch konnte durch Einstellen einer heiss gesättigten Lösung in eine Kältemischung und starkes Rühren eine Abscheidung des Salzes nicht erreicht werden.

Wird die wässrige Lösung des Calciumsalzes mit 96%igem Alkohol versetzt, so entstehen amorphe Niederschläge mit höherem Calciumgehalt.

Dampft man die wässrige Lösung auf siedendem Wasserbade rasch ein, so bleibt ein Rückstand, der sich beim Wiederaufnehmen mit Wasser nicht mehr vollständig löst.

III. Mit Kupfer scheint die Biliverdinsäure kein neutrales Salz zu geben: als die wässrige Lösung der letzteren mit Kupferhydroxyd in der Kälte digerirt und das Filtrat vom Ueberschuss desselben im Vacuum abgedunstet war, wurde ein Syrup erhalten, der mit einzelnen Nadelchen durchsetzt war. Diese lösten sich in Alkohol, daneben aber entstand ein graublauer Niederschlag.

0.2668 gr. desselben verloren bei 100° 0.0226 gr. und gaben 0.0706 gr.  $\text{Cu}_2\text{S}$ . Für das basische Salz  $(2\text{C}_8\text{H}_9\text{NO}_5\text{Cu} + \text{H}_2\text{O}) + 3\text{H}_2\text{O} = \text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{Cu}_2\text{N}_4\text{O}_{11} + 3\text{H}_2\text{O}$

berechnet sich:

$\text{H}_2\text{O}$  : 9.06%

$\text{Cu}$  : 21.27%

Gefunden:

8.47%

21.14%

#### Das Cadmiumsalz.

IV. Biliverdinsäure greift in kalter wässriger Lösung Cadmiumcarbonat kaum an, Cadmiumhydroxyd löst sich bis zur Sättigung vollständig auf. Aus der vom Ueberschuss des Metallhydrats filtrirten Lösung schieden sich im Vacuum Nadeln des Salzes ab, welche sich zu grossen Drusen vereinigt haben. In heissem Wasser sind diese leicht löslich, beim Abkühlen auf 0° erstarrt dann die Masse zu einem Brei verfilzter Nadeln. Diese wurden abgesaugt, mit kaltem Wasser nachgewaschen und im Vacuum getrocknet.

0.4874 gr. verloren bei 115° 0.0212 gr. und gaben 0.1644 gr.  $\text{CdS}$ .

Noch einmal umkrystallisirtes Salz, welches in zu kugelförmigen Drusen vereinigten Nadeln erhalten worden war, bräunte

sich bei 102° schon etwas und sah nach dem Erhitzen auf 110° an einigen Stellen wie geschmolzen aus.

0.2770 gr. im Vacuum getrocknet gaben 0.1025 gr. CdS.

Aus den Analysen geht hervor, dass in diesen hübsch krystallisirten Körpern basische Salze vorliegen.

Berechnet für:				Gefunden:	
$C_8H_9NO_4 \cdot Cd$	$(C_8H_{10}NO_5)_2Cd$	$C_8H_9NO_5 \cdot Cd$			
Cd 23.48%	21.83%	35.95%		26.24%	28.76%
				H <sub>2</sub> O 4.35%	

Aus einer concentrirt wässerigen Lösung wurden einmal beim Stehen im nicht evacuirten Exsiccator schön ausgebildete Krystalle, flache Pyramiden mit rhombischer Basis, erhalten.

V. Das Ammoniumsalz wurde durch Einleiten getrockneten Ammoniaks in die ätherische Lösung der Biliverdinsäure als weisse, ätherunlösliche Krystallmasse erhalten: es wurde abgesaugt, mit Aether ausgewaschen und im Vacuum getrocknet.

1. 0.1527 gr. Substanz lieferten 18.6 ccm. N bei 734 mm. B und 23°.
2. 0.1717 gr. Substanz lieferten 20 ccm. N bei 734.5 mm. B und 18°.

Berechnet für:			Gefunden:	
$C_8H_9NO_4 \cdot NH_3$	$C_8H_9NO_4 \cdot NH_3 \cdot H_2O$	1.		2.
N 14.00%	12.84%	13.24%		13.00%

Nach diesen Analysen zu urtheilen, hat also die Biliverdinsäure ausser Ammoniak auch noch Wasser aufgenommen, scheint dasselbe bei 100° aber wieder zu verlieren, wenigstens nahmen

0.0888 gr. Substanz bei 100° um 0.0072 gr. ab und

0.0777 gr. der getrockneten Substanz gaben 9.6 ccm. N bei 728 mm. B. und 13°.

Berechnet für:		Gefunden:	
$C_8H_{12}N_2O_4 \cdot H_2O$			
1 H <sub>2</sub> O	8.21%		8.11%
N	14.00% <sup>1)</sup>		13.99%

Die wässerige Lösung des Ammoniumsalzes wurde durch Zink- oder Kupfervitriol nicht gefällt, Bleiacetat gab einen Niederschlag, der sich im Ueberschuss des Fällungsmittels wieder auflöste.

1) Auf  $C_8H_{12}N_2O_4$  bezogen.

Bei der Titration der Biliverdinsäure war früher gefunden worden, dass dieselbe in der Kälte einbasisch ist: diese Angabe wird durch die folgenden Beobachtungen erweitert.

1. 0,2756 gr. Säure, in kaltem Wasser gelöst, erforderten 16,5  $\frac{1}{10}$  N.-NaOH zur Neutralisation.<sup>1)</sup>

2. 0,2814 gr., in kaltem Wasser gelöst, erforderten, nachdem die Lösung einige Zeit gestanden hatte, 17,5  $\frac{1}{10}$  N.-NaOH. Für eine einbasische Substanz  $C_8H_9NO_4$  berechnen sich aber 15,1 resp. 15,4 cem.  $\frac{1}{10}$  N.-NaOH.

3. 0,2209 gr. wurden mit 30,5 cem.  $\frac{1}{10}$  N.-NaOH bis zum Kochen erhitzt, jetzt waren 2,95 cem.  $\frac{1}{10}$  N.- $H_2SO_4$  nöthig, um neutrale Reaction herzustellen<sup>2)</sup>. Verbraucht waren also 27,55 cem.  $\frac{1}{10}$  N.-NaOH, während sich berechnen 24,15 cem., wenn sich  $C_8H_9NO_4$  in eine zweibasische Säure verwandelt hat.

Diese Resultate lassen den Schluss zu, dass die Biliverdinsäure in der Kälte langsam in eine zweibasische, beim Kochen mit Alkali dagegen in eine dreibasische Substanz übergeht. Im Anschluss an diese Beobachtung wurden die folgenden Versuche angestellt:

1. 0,3092 gr. des Ammonsalzes der Biliverdinsäure wurden mit 62 cem.  $\frac{1}{10}$  N.-NaOH ca. 1 Stunde gelinde im Sieden erhalten, das Uebergelende in 62 cem.  $\frac{1}{10}$  N.- $H_2SO_4$  aufgefangen. Zum Zurücktitriren waren 42,9 cem.  $\frac{1}{10}$  N.-NaOH erforderlich; 19,1 cem. N.- $H_2SO_4$  waren also durch die flüchtige Base neutralisirt worden.

2. 0,3948 gr. Ammonsalz wurden mit 60 cem.  $\frac{1}{10}$  N.-NaOH  $1\frac{1}{2}$  Stunde lang gelinde im Sieden erhalten; hierbei destillirten 32,5 cem.  $\frac{1}{10}$  N.- $H_2SO_4$  entsprechende Mengen Ammoniak, während 3,25 cem.  $\frac{1}{10}$  N.- $H_2SO_4$  genügten, um im Kochkolben schwach saure Reaction hervorzubringen. Die entstandene Substanz brauchte also ca. 56,7 cem.  $\frac{1}{10}$  N.-NaOH zur Neutralisation.

3. 0,3133 gr. Ammonsalz wurden mit 50 cem.  $\frac{1}{10}$  N.-NaOH 2  $\frac{1}{2}$  Stunden lang gelinde gekocht. Die überdestillirte Basis erforderte 24,5 cem.  $\frac{1}{10}$  N.- $H_2SO_4$  zur Neutralisation. Im Kolben sind 5,1 cem.  $\frac{1}{10}$  N.- $H_2SO_4$  nöthig, um die alkalische Reaction aufzuheben, also 44,9 cem.  $\frac{1}{10}$  N.-NaOH dienen zur Neutralisation der entstandenen Säure.

4. 0,2814 gr. Biliverdinsäure wurden mit 58,8 cem.  $\frac{1}{10}$  N.-NaOH 5 Stunden im Sieden erhalten; vorgelegt waren 20 cem.  $\frac{1}{10}$  N.-HCl. Zum

1) Als Indicator diente Phenolphthalein.

2) Die neutrale Lösung ergab kein Wiederauftreten alkalischer Reaction, als sie bis zum Sieden erhitzt wurde: hierbei findet also eine Abspaltung von Alkali nicht wieder statt.

Eintritt alkalischer Reaction sind 4,6 ccm.  $\frac{1}{10}$  N.-NaOH erforderlich, 15,4 ccm.  $\frac{1}{10}$  N.-HCl hatte also die flüssige Basis neutralisirt.

Im Kochkölbchen erzeugen 14,2 ccm  $\frac{1}{10}$  N.-HCl neutrale Reaction, 44,6 ccm.  $\frac{1}{10}$  N.-Alkali sind also zur Neutralisation nöthig.

Der Inhalt der Vorlage wird zur Trockene verdampft, nachdem er mit Salzsäure wieder schwach angesäuert worden war; der Rückstand in Wasser aufgenommen, filtrirt, das Filtrat fast verdampft, mit Alkohol versetzt und durch Platinchlorid gefällt.

0,1930 gr. des Platindoppelsalzes hinterliessen beim Glühen 0,0843 gr. Platin oder 43,68% Pt, woraus hervorgeht, dass Platinsalmiak vorgelegen hat, der 43,9% Pt verlangt.

Wenn Biliverdinsäure also mit Natronlauge gekocht wird, so wird Ammoniak abgespalten und zwar genau ein Molekül, wie aus Versuch 4 hervorgeht:

Berechnet für 1 NH <sub>3</sub> aus C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>4</sub> :	Gefunden:
15,4 ccm. $\frac{1}{10}$ N.-HCl	15,4 ccm. $\frac{1}{10}$ N.-HCl.

Auch das Ammoniumsalz spaltet mehr wie 1 NH<sub>3</sub> ab:

Berechnet	Gefunden:
für C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>4</sub> -NH <sub>3</sub> -H <sub>2</sub> O:	
1 NH <sub>3</sub> 2 NH <sub>3</sub>	
1. 14,2    28,4	19,1 ccm. $\frac{1}{10}$ N.-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> = 34,5% des Amidstickstoffs.
2. 18,1    36,2	32,5                            = 79,6%
3. 14,4    28,8	24,5                            = 70,1%

Die im Kolben zurückbleibende Substanz muss aber dreibasisch geworden sein: die gefundenen Werthe nähern sich allerdings nur den berechneten.

Berechnet:	Gefunden:
2. 54,3 ccm. $\frac{1}{10}$ N.-Alkali	56,75
3. 43,1 $\frac{1}{10}$	44,9
4. 46,2 $\frac{1}{10}$	44,6

Die mit Natronlauge gekochten Antheile wurden nun nach dem Ansäuern mit Schwefelsäure ausgeäthert, der Aetherrückstand in kaltem Wasser gelöst und mit Calciumcarbonat behandelt, die Lösung der Calciumsalze auf dem Wasserbade zum Sieden erhitzt. Hierdurch entstand stets ein bedeutender Ausfall. Die Analyse dieser unlöslich gewordenen, gut ausgewaschenen Calciumsalze ergab folgende Resultate.

1. 0,4915 gr. Substanz, im Vacuum, getrocknet verloren bei 100° 0,0053 gr. und gaben 0,1445 gr. CaO = 0,1032 gr. Ca:

2. 0,4198 gr. Substanz verloren bei 120° 0,0073 gr. und gaben 0,1222 gr. CaO = 0,0873 gr. Ca;

3. 0,2399 gr. Substanz verloren bei 115° 0,0033 gr. und gaben 0,0696 gr. CaO = 0,0417 gr. Ca.

Gefunden:

	1.	2.	3.
H <sub>2</sub> O	1,08%	1,74%	1,38%
Ca	21,22%	21,17%	21,02%

Die aus diesen Salzen regenerirte Säure bildete nach dem Abdestilliren des Aethers einen Syrup, welcher rasch zu einer strahlig krystallinischen Masse erstarrte. In der fünf-fachen Menge heissen Wassers war diese völlig löslich und beim Einstellen dieser Lösung in kaltes Wasser begann sofort die Krystallisation wetzsteinförmiger Gebilde, welche den Schmelzpunkt 97—98° aufwiesen.

Aus dem Verhalten des Calciumsalzes wie dem Calciumgehalt und den soeben beschriebenen Löslichkeitsverhältnissen folgt bereits zur Genüge, dass hier der Körper C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>O<sub>5</sub> vorliegt, das Lacton der dreibasischen Hämatinsäure. Zum Ueberfluss wurde noch die Analyse angeschlossen:

0,1123 gr. vacuuntrockene Substanz gaben 0,2148 gr. CO<sub>2</sub> und 0,0485 gr. H<sub>2</sub>O.

Berechnet für C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>O<sub>5</sub>:

C 52,17%

H 4,35%

Gefunden:

52,17%

4,79%

Die Biliverdinsäure C<sub>8</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>4</sub> geht also durch Kochen mit Natronlauge unter Abspaltung von Ammoniak in das Lacton der dreibasischen Hämatinsäure C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>O<sub>5</sub> über.<sup>1)</sup> sie dürfte daher wohl als Amid der letzteren aufzufassen sein.<sup>2)</sup>

Dieser Uebergang vollzieht sich zu einem kleinen Theile schon während der Spaltung des Bilirubins oder bei der Reinigung des ätherlöslichen Rohprodukts, wie aus dem Ver-

1) Meine Angabe in der ersten Mittheilung, dass sich beim Kochen mit Natronlauge kein Ammoniak entwickle, hat sich also als ein Irrthum erwiesen.

2) Bei der Einwirkung von salpetriger Säure auf Biliverdinsäure scheint keine Hämatinsäure zu entstehen, wenigstens konnte bei einem Versuch mit allerdings geringen Mengen das charakteristische Kalksalz nicht erhalten werden.

halten und der Analyse des auf Seite 325 beschriebenen Calciumsalzes hervorgeht.

Er wird ferner auch durch andere basische Körper bewirkt. Als z. B. Biliverdinsäure durch Darstellung des schön krystallisirenden Cadmiumsalzes gereinigt werden sollte und zu diesem Zwecke in kalter wässeriger Lösung mit Cadmiumhydroxyd behandelt wurde, zeigte es sich, dass  $\frac{1}{6}$  der verwendeten Säure umgewandelt worden war.

Dieser leichte Uebergang beweist aufs neue die ähnliche Constitution von Blut- und Gallenfarbstoff. Im Bilirubin und im Hämatin sind Complexe enthalten, aus welchen sich der prächtig krystallisirende Körper  $C_8H_8O_5$  bilden kann, nur konnten bisher aus dem Biliverdin kaum 20%, aus dem Hämatin dagegen über 40% gewonnen werden.

Ein Einblick in die Art der Isomerie von Bilirubin und Hämatoporphyrin ist durch die beobachteten Thatsachen allerdings noch nicht ermöglicht: vielmehr war anzunehmen, dass auch aus dem Hämatin primär stickstoffhaltige Oxydationsprodukte entstehen, die unter den eingehaltenen Versuchsbedingungen verseift wurden. Diesbezügliche Versuche haben diese Vermuthung bereits bestätigt: mit der Untersuchung der hierbei entstehenden Spaltungsprodukte bin ich beschäftigt.

Die Beschaffung der zu den geschilderten Versuchen nöthigen Gallensteine aus den verschiedenen Schlachthäusern Deutschlands, war mit einem erheblichen Kostenaufwande verbunden: repräsentirt doch auch jedes Gramm Biliverdin, dem Preiscourant von Merck z. B. zufolge, den Werth von 90 Mark.

Ich bin daher der hohen Akademie der Wissenschaften zu Berlin, von welcher ich für meine Untersuchungen eine grosse pekuniäre Unterstützung erhielt, zu aufrichtigstem Danke verpflichtet.

Mit einem Theil der mir gewährten Summe ist das Material zu vorliegender Arbeit beschafft worden.