

# Ueber Acetophenonazobilirubin.

Von  
Dr. Fr. Pröscher.

Mit einer Tafel.

(Aus dem Institut für experimentelle Therapie in Frankfurt a. Main.)

(Der Redaction zugegangen am 15. April 1900.)

Als Ehrlich im Jahre 1883<sup>1)</sup> seine Untersuchungen über die Diazoreaction des Harns publicirte, zeigte er, dass das Bilirubin sich mit Diazobenzolsulfochlorid zu einem prachtvollen Farbstoff combinirt. Diese leicht ausführbare und, wie weiter unten gezeigt werden wird, für den Nachweis des Bilirubins äusserst scharfe Reaction ist bis jetzt für klinische Zwecke sehr wenig angewandt worden. Da es von grossem Interesse war, dieses neue Derivat des Bilirubins in chemisch reiner Form in Händen zu haben, habe ich versucht, den aus Bilirubin und einer Diazoverbindung sich bildenden Farbstoff zu isoliren. Das Bilirubin wurde aus Rindergallensteinen nach der Methode von Staedler und Maly dargestellt und nach Küster<sup>2)</sup> aus Dimethylanilin umkrystallisirt. Zunächst möchte ich bemerken, dass das Bilirubin<sup>3)</sup> sich am leichtesten mit Diazoverbindungen combinirt. Sehr bemerkenswerth ist, und steht das Bilirubin meines Wissens in dieser Beziehung allein da, dass es in so stark saurer, ja selbst in concentrirter Salzsäure sich mit Diazoverbindungen kuppelt. Die grösste Mehrzahl aromatischer Amine, Phenole etc. kuppeln sich mit Diazo-

1) Charité Annalen, Bd. VIII.

Centralblatt für klinische Medicin, 1883, Nr. 45.

2) Diese Zeitschrift, Bd. XXVI. S. 315.

3) Von den übrigen Gallenfarbstoffen geben nur Biliprasin und Bilifuscin die Reaction, aber in bedeutend schwächerem Maasse. Bilinunin und Biliverdin combiniren sich mit Diazoverbindungen nicht.

verbindungen in stark saurer Lösung gar nicht. Ehe ich zur Beschreibung der Darstellung des Azobilirubins übergehe, möchte ich noch Einiges über die Schärfe der Reaction mittheilen.

Zur Ausführung der Reaction gibt man der auf Bilirubin zu prüfenden Flüssigkeit  $\frac{1}{3}$  Volumen Alkohol zu und säuert die Flüssigkeit mit concentrirter Salzsäure stark an und gibt dann die bekannte Ehrlich'sche Diazolösung zu. Ist Bilirubin in nicht zu geringer Menge vorhanden, so färbt sich die Flüssigkeit blau, ist Bilirubin nur in Spuren da, so wird die Flüssigkeit dunkler. Schüttelt man jetzt mit Chloroform aus, so geht das Azobilirubin je nach der Concentration der Lösung mit blauer oder blauvioletter Farbe in das Chloroform über. Das Bilirubin ist mit Hilfe dieser Reaction noch in einer Verdünnung von 1:60000 nachweisbar. Eine genaue Beschreibung der Reaction für klinische Zwecke werde ich demnächst in einer klinischen Zeitschrift publiciren.

Zur Darstellung des Azobilirubins wird das Bilirubin in Chloroform gelöst, die Lösung soweit mit Alkohol verdünnt, dass das Bilirubin in Lösung bleibt, und stark mit Salzsäure angesäuert. Als Paarlung wurde Amidoacetophenon benutzt,<sup>1</sup> das in Alkohol gelöst, mit Salzsäure angesäuert und mit der berechneten Menge Natriumnitrit, das vorher in wenig Wasser gelöst wird, in Diazoacetophenon übergeführt. Die Diazoacetophenonlösung wird der Bilirubinlösung allmählich zugegeben. Den Endpunkt der Reaction erkennt man am besten daran, dass ein Tropfen der Lösung, auf Tüpfelpapier getropft, mit Diazoacetophenonlösung keine stärkere Blaufärbung mehr gibt. Ist die Reaction beendigt, so gibt man die Lösung in stark mit Salzsäure angesäuertem Wasser. Es scheidet sich das Chloroform aus, das den gesammten Azokörper mit blauer Farbe aufnimmt. Zugleich geht das überschüssige Diazoacetophenon und der Alkohol in das Wasser über. Man trennt das Wasser möglichst vom Chloroform und wäscht mit destillirtem Wasser so lange aus, bis dasselbe durch Silbernitrat nicht mehr getrübt wird. Beim Auswaschen der sauren Chloroformlösung

1. Statt Amidoacetophenon kann auch jede andere diazotirbare Amidoverbindung verwendet werden.

schlägt die blaue Farbe des Azobilirubins in Roth um. Nach dem Auswaschen wird die Chloroformlösung des Azobilirubins durch ein trockenes Faltenfilter filtrirt und das überschüssige Chloroform aus dem Wasserbade abdestillirt. Die concentrirte Lösung wird in flachen Schaalcn, die zweckmässig unter den Exsiccator gebracht werden, der mit Paraffinschnitzeln beschickt ist, der Krystallisation überlassen. Die Krystalle sind mikroskopisch klein und bestehen aus prismenförmigen Nadelchen, die im auffallenden Lichte fuchsinartigen Glanz haben, im durchfallenden schwarz erscheinen. Das Acetophenonazobilirubin ist nach ein- bis zweimaligem Umkrystallisiren aus Chloroform nahezu analysenrein. Die empirische Zusammensetzung des Acetophenonazobilirubins ist  $C_{24}H_{25}N_4O_4$ , besteht also aus einem Molekül Bilirubin und einem Molekül Diazoacetophenon, was durch die Analyse bestätigt wird.

$C_{24}H_{25}N_4O_4$  Ber.: C 66.51, H 5.98, N 12.93

Gef.: C 66.17, H 5.77, N 12.44.

0.1954 g Substanz: 0.4744 g  $CO_2$  und 0.1054 g  $H_2O$

0.1536 » » 17.39 ccn. N (15.7°, 746.0 mm).

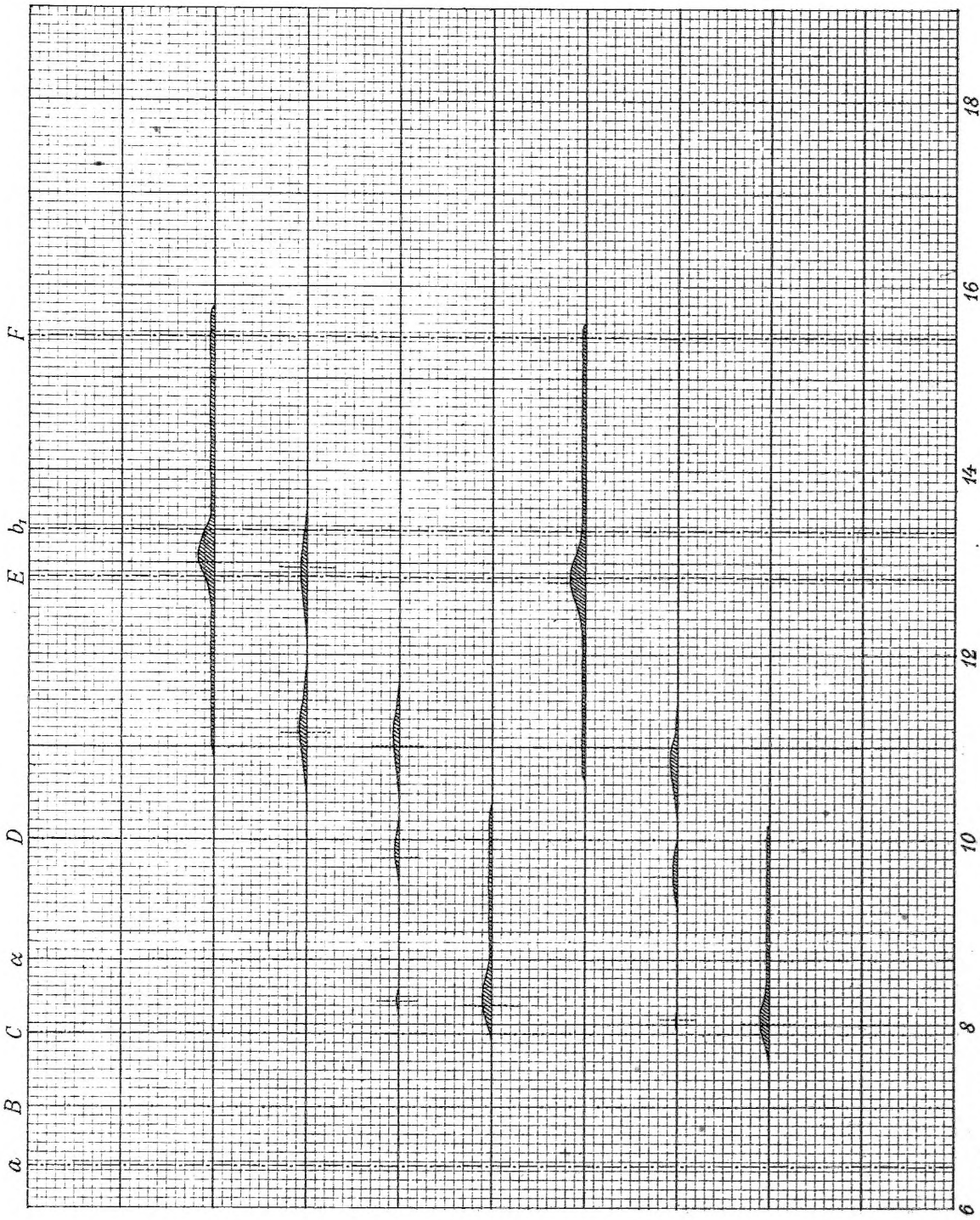
Das Acetophenonazobilirubin stellt die Monoazoverbindung des Bilirubins dar: ob Di- oder Triazoverbindungen möglich sind, konnte ich bis jetzt nicht feststellen, und wird die Aufgabe weiterer Untersuchungen sein. Das Acetophenonazobilirubin ist in Chloroform, Alkohol, Amylalkohol, Dimethylanilin, Dichlorhydrin, concentrirter Salzsäure, Schwefelsäure, Essigsäure, verdünnter Kalilauge und Ammoniak leicht löslich: in Aether, Schwefelkohlenstoff, Wasser sehr schwer, in concentrirter Kalilauge völlig unlöslich. Die neutrale Lösung ist roth, die alkalische (grün), die ammoniakalische violettroth, die salzsaure und schwefelsaure Lösung blau. In concentrirtem Ammoniak löst sich das Azobilirubin mit blauer Farbe, die beim Verdünnen mit Wasser oder Alkohol in Rothviolett übergeht. Löst man Azobilirubin in Essigsäure, so erhält man eine rothe Lösung, die bei Zusatz von Salzsäure in Blau umschlägt. Das Azobilirubin verhält sich in dieser Beziehung wie das Safranin, das in essigsaurer Lösung roth, in salzsaurer Lösung blau ist. Die rothe Lösung stellt wahrscheinlich die monoacide, die blaue die diacide Lösung des Farbstoffes dar.



Es war ferner von Interesse, das spectroscopische Verhalten des Azobilirubins kennen zu lernen. Herr J. Formànek in Prag hatte die Güte, die spectralanalytische Untersuchung auszuführen, wofür ich ihm an dieser Stelle bestens danke. Er theilte mir Folgendes mit: Acetophenonazobilirubin ist in Wasser fast unlöslich, in Aethyl- und Amylalkohol leicht mit rother Farbe löslich. Die passend verdünnte Farbstofflösung liefert unter Anwendung der Reagentien charakteristische Farbenveränderungen, und demgemäss verschiedene Absorptionsspectra, welche jedoch verwaschen erscheinen. In nachstehender Tabelle sind die Aenderungen, welche die Farbstofflösung nach Zusatz der Reagentien erleidet, zusammengestellt, sowie die Dunkelheitsmaxima der Absorptionsstreifen in Wellenlängen angegeben. Die Wellenlänge der Dunkelheitsmaxima der Absorptionstreifen konnte nur annähernd bestimmt werden, nachdem die Streifen theilweise verwaschen sind. Die spectroscopisch-chemischen Reactionen sind jedoch so charakteristisch, dass man diesen Farbstoff auf diesem Wege leicht nachweisen kann. Als Reagentien wurden verwendet: verdünnte Salzsäure 1 : 3, Ammoniak vom specifischen Gewicht 0,96 1 : 5, Kalihydrat in Aethylalkohol 1 : 10, und zwar von jedem Reagens etwa 3 Tropfen auf 5 ccm. verdünnter Farbstofflösung.

In Aethylalkohol				In Amylalkohol			
Absorption	Salzsäure	Ammoniak	Kalihydrat in Aethylalkohol	Absorption	Salzsäure	Ammoniak	Kalihydrat in Aethylalkohol
verwaschener Streif 524,9	wenig Säure: blauviolett, verwaschene Streifen 561,4—525,8 mehr Säure: blau, verwaschene Streifen 594,8—564,7 concentrirtere Lösung: 642,1 (kaum sichtbar)	ändert sich nicht	bläulichgrün verwaschener Streif 643,1	verwaschener Streif 528,5	blau, verwaschene Streifen 600,2—566,5 concentrirtere Lösung 649,0 (kaum sichtbar)	ändert sich nicht	grün verwaschener Streif 6,50,0

*Absorptionsspectrum des Acetophenonazobilirubin.*



Acetophenon-Azo-Bilirubin  
in Aethylalkohol

" u. wenig Salzsäure

" u. mehr Salzsäure

" u. alkoholische Kalhydratlösung

Acetophenon-Azo-Bilirubin  
in Amylalkohol

" u. Salzsäure

" u. alkoholische Kalhydratlösung

Das Azobilirubin gehört nach Formánek<sup>1)</sup> in die Gruppe VII der rothen Farbstoffe seiner Anleitung.

Die Lösungen des Azobilirubins sind äusserst stabil und verändern ihre Farbe bei tagelangem Stehen fast gar nicht. Das Azobilirubin unterscheidet sich vom Bilirubin durch seine ausserordentlich hohe Beständigkeit. Während z. B. die alkalische Lösung des Bilirubins beim Stehen an der Luft in Biliverdin umgewandelt wird, wird die Azoverbindung nicht verändert. Durch concentrirte Schwefelsäure wird Azobilirubin nicht verändert, während Bilirubin in kurzer Zeit zerstört wird. Weiterhin ist das Azobilirubin gegen salpetrige Säure relativ beständiger als das Bilirubin. So wird eine Lösung des Azobilirubins in concentrirter Schwefelsäure durch Natriumnitrit gar nicht verändert, während das Bilirubin zu Biliverdin und weiter zu einem blauen Farbstoff oxydirt wird. Es scheint demnach die Azogruppe an der Stelle des Bilirubins einzugreifen, an der es eine besonders labile Wasserstoffgruppe besitzt, die zu gleicher Zeit die Veranlassung zur leichten Zerstörbarkeit des Bilirubins bietet. Der Umstand, dass die Paarung in so stark saurer Lösung vor sich geht, kann mit Rücksicht darauf, dass die aromatischen Basen in saurer, die Phenole in alkalischer Lösung sich mit Diazoverbindungen kuppeln, darauf hindeuten, dass auch in diesem Falle das Bilirubin einen aromatischen Complex enthält, der eine frei oder passend substituirt Amidogruppe enthält. Durch Reduction des Azobilirubins mit Schwefelammonium gelangt man zu einem neuen Körper. Ob das Reduktionsprodukt die Hydrazo- oder Amidoverbindung des Bilirubins darstellt, darüber werde ich demnächst berichten.

---

1) Formánek, Spectralanalytischer Nachweis künstlicher, organischer Farbstoffe. Verl. von J. Springer, Berlin 1900.

---