

Ueber das Bilifuscin.

Von

Dr. Leo R. v. Zumbusch.

Aus dem Universitäts-Laboratorium für medicinische Chemie in Wien.
Der Redaction zugegangen am 25. November 1863.

Die Gallensteine des Menschen sind bekanntlich, wenn sie überhaupt Farbstoffe enthalten, in der Regel nicht eben reich an Bilirubin: sie enthalten vielmehr braunen und grünen Farbstoff in grösserer Menge. Die Versuche, letztere zu isoliren, haben wohl eine Vermehrung der Nomenclatur, für keinen der Farbstoffe aber die sichere Charakterisirung als Individuum zur Folge gehabt. Der bestgekante dieser Körper, ich nenne Bilifuscin, Biliprasin, Bilicyanin, Bilihumin, ist das Bilifuscin.

Durch die Güte des Herrn Professor Ludwig wurden mir nun etwa 4 kg menschliche Gallensteine, die im pathologisch-anatomischen Institut des k. k. allgemeinen Krankenhauses zu Wien gesammelt worden waren, zur Verfügung gestellt, so dass ich in der Lage war, diesen Farbstoff reiner, als es früher der Fall gewesen war, darzustellen und zur Analyse zu bringen.

Es liegen über die chemische Natur des Bilifuscins zwei verschiedene Arbeiten vor, deren Ergebnisse nicht übereinstimmen. Die eine rührt von Brücke,¹⁾ die andere von Städeler²⁾ her. An die Arbeit von Brücke schliesst sich

¹⁾ Wiener medicinische Zeitung, 4. Jahrgang, Heft 44 vom 1. November 1859.

²⁾ Annalen für Chemie und Pharmacie, neue Reihe, Band 26 vom Jahr 1864.

eine aus dessen Laboratorium stammende Arbeit von Simony¹ an.

Die von den genannten Autoren verwendeten Präparate waren auf verschiedene Weise dargestellt und zeigten verschiedene Eigenschaften.

Brücke's Bilifuscin war durch Ausschütteln menschlicher Galle mit Chloroform, Abdestilliren des von der Galle getrennten Chloroforms, Ausziehen des Rückstandes mit absolutem Alkohol, Ausfällen der eingeeengten Lösung mit Aether und Waschen des Niederschlags mit demselben dargestellt.

Es war ein braunes, sich in Alkohol leicht mit Olivfarbe lösendes Pulver; der Gmelin'schen Gallenfarbstoffreaction gegenüber verhielt es sich negativ, eine Elementaranalyse wurde nicht gemacht.

Städeler extrahirte mit Aether von Cholestearin und Fett befreite und mit Salzsäure entkalkte Gallensteine mit Chloroform und behandelte den Rückstand mit Alkohol; die alkoholische Flüssigkeit verdampfte er und zog den Abdampfrückstand mit Aether aus, worauf er durch wiederholtes Lösen in Alkohol reinigte.

Das gewonnene Präparat war ebenfalls schwarzbraun und leicht, mit brauner Farbe, in Alkohol löslich. Städeler gibt an, Bilifuscin gebe die Gallenfarbstoffreactionen ebenso schön und deutlich wie Bilirubin.

Was die Zusammensetzung betrifft, gibt der Autor auf Grund der Elementaranalyse die Formel $C_{16}H_{20}N_2O_4$ an, welche sich von der des Bilirubins durch ein Plus von einem Molekül Wasser unterscheidet.

Demnach haben die zwei als Bilifuscin bezeichneten Präparate wohl gewisse Eigenschaften gemeinsam, jedoch zeigen sie auch sehr bemerkenswerthe Unterschiede.

Ich habe das dieser Untersuchung zu Grunde liegende Präparat auf folgende Weise dargestellt: Die gröblich zerstoßenen Gallensteine wurden zuerst durch Extraction mit

¹ Sitzungsbericht der Wiener Akademie vom Jahre 1876.

Aether vollständig von Cholestearin und Fett befreit. Das zurückbleibende Pulver wurde sodann auf dem Filtrum solange mit Wasser gewaschen, bis dasselbe klar und farblos abfloss. Die ersten, stärker braun gefärbten Waschwässer ergaben eingedampft einen braunen, leimartig riechenden und zu spröden Krusten eintrocknenden Körper, welcher keine Gallenfarbstoffreaction zeigte.

Das mit Wasser erschöpfte braune gröbliche Pulver wurde hierauf mit 5%iger Salzsäure behandelt: hierbei ging eine ziemliche Menge von Kalk unter Aufbrausen in Lösung (es trat hierbei kein Geruch nach Schwefelwasserstoff auf) und das früher sandartige, aus harten Körnern bestehende Pulver wurde dadurch zu einem äusserst feinen, stark abfärbenden Pulver umgewandelt. Es trat dabei ein charakteristischer Geruch nach Galle, wenn auch nur ganz schwach, auf.

Nachdem durch Waschen mit Wasser die Salzsäure wieder entfernt war, wurde das Pulver getrocknet und zur Darstellung der einzelnen Gallenfarbstoffe verwendet.

Das Gewicht der Masse betrug nach Beendigung der oben beschriebenen Prozesse etwa 300 g: zuerst wurde das Präparat nun einer Extraction mit Chloroform unterzogen, welche im Soxhlet'schen Apparate vorgenommen wurde. Stets wurde nur Chloroform verwendet, welches durch wiederholtes Schütteln mit Wasser und nachheriges Abdestilliren über Chlorcalcium gereinigt worden war.

Trotz mehrere Wochen andauernder Extraction konnte es nicht dahin gebracht werden, dass das Chloroform ungefärbt abfloss. Von dem Extract wurde das Chloroform abdestillirt und der Rückstand, nachdem er vollständig von Chloroform befreit worden war, mit absolutem Alkohol übergossen und dieser so oft gewechselt, als er sich noch olivenbraun färbte. Nach mehrmaligem Erneuern des Alkohols nahm derselbe eine röthliche Farbe an, welche er dem Bilirubin, das sich in geringem Maasse darin löst, verdankt. Der Alkohol wurde von dem äusserst fein vertheilten Bilirubin durch Decantation getrennt: erst nachdem dies mehrmals wiederholt war, wurde der Rest durch Filtriren entfernt.

Auch das mit Chloroform fast vollständig erschöpfte Pulver wurde nach Austreibung des Chloroforms mit Alkohol behandelt, welcher sich ebenso olivbraun färbte wie der Alkohol, mit welchem der Chloroformextract behandelt wurde. Die gesammten alkoholischen Auszüge wurden vereinigt und destillirt. Der überbleibende Rückstand war dunkelbraun gefärbt, zum Theil krystallinisch, und hatte einen Geruch, welcher dem von ranzigem Fette nicht unähnlich war. Er wurde durch mehrmaliges Kochen mit Wasser vom Alkohol gänzlich befreit, wobei er an das Wasser keinen Farbstoff abgab, indem die geschmolzene Masse wie Oeltropfen auf dem heissen Wasser schwamm.

Nachdem das Wasser abgossen worden war, wurde der getrocknete Extract in wenig Chloroform gelöst, was leicht von Statten ging, und die Lösung filtrirt. Der filtrirten Lösung wurde die etwa zwanzigfache Menge von Aether zugesetzt. Schon nach kurzer Zeit war die Farbe des Gemisches erheblich heller braun geworden und es setzte sich ein Niederschlag ab. Dieser wurde auf ein gehärtetes Filter gebracht und mit Aether gewaschen, welcher dabei keine Färbung annahm.

Das Aetherchloroformgemisch, das noch ziemlich stark braun gefärbt war, wurde abdestillirt; der Rückstand, der dem oben beschriebenen vollständig gleich, wurde wieder mit Aether behandelt, wobei sich ein Theil löste, der andere als schwarzer blätteriger Belag ungelöst zurückblieb; der letztere, sowie der abermals eingedampfte in Aether lösliche Antheil wurden aufbewahrt.

Die durch den Aether ausgefällte Substanz in der Menge von ungefähr 12 g war schwarz, porös und liess sich sehr leicht zu einem feinen schwarzen Pulver zerreiben.

Auf dem Striche war die Farbe schwarz mit einem Stich ins Grünliche. Unter dem Mikroskop betrachtet, erwies sie sich als aus unregelmässigen Krümeln bestehend; es konnte keine Spur einer krystallinischen Structur nachgewiesen werden. Das so dargestellte und beschaffene Bilifuscin wurde zu allen Versuchen verwendet.

Da Bilirubin in Alkohol so gut wie nicht löslich ist und auch durch Aether aus seiner Lösung in Chloroform nicht leicht gefällt wird, dürfte eine nennenswerthe Verunreinigung unseres Präparates mit Bilirubin nicht zu befürchten sein. Als Bilihumin wird der in den angewendeten Lösungsmitteln unlösliche Rückstand bezeichnet, der also hier nicht in Betracht kommt.

Dieses Bilifuscin ist absolut unlöslich in kaltem und heissem Wasser, in verdünnten Mineralsäuren, in Schwefelkohlenstoff, Petroleumäther, Aethyläther, Benzol und Nitrobenzol, wenig löslich in Chloroform, Methyl- und Amylalkohol sowie Aceton, ein wenig besser in Aethylalkohol, ziemlich gut in Eisessig, Naphtalin und Dimethylanilin, am besten in Pyridin. Es konnte also wohl die Angabe Städeler's bestätigt werden, dass sich die unreine Substanz leicht in Chloroform löse, die reine aber nicht, dagegen fand ich im Gegensatz zu dessen Angabe, dass sich der reine Körper nur recht mässig in Alkohol auflöst.

In alkalischen Flüssigkeiten löst sich der Körper mit tiefbrauner Farbe leicht auf und wird durch Ansäuern in braunen Flocken aus denselben gefällt. Auch durch Zusatz von Bleiessig, Barytwasser und Chlorcalcium wird er in braunen Flocken gefällt.

Versuche, den Körper aus Dimethylanilin und aus Pyridin zu krystallisiren, gelangen nicht: aus Dimethylanilin, dessen sich Küster¹⁾ mit Erfolg bedient hat, schied sich der Körper in kugel- und stäbchenförmigen Partikeln ab, aber nicht in irgend welchen kennbaren Krystallformen: die Substanz schmilzt glatt bei 183°.

Der Körper verhält sich sowohl der Huppert'schen Gallenfarbstoffreaction, als auch der Gmelin'schen und deren Modificationen von Brücke, Fleische und Rosenbach gegenüber vollständig negativ, es trat nicht die geringste Spur einer Grünfärbung auf, so dass hierdurch die Angaben Brücke's bestätigt erscheinen. Dieselben Reactionen, jedesmal

¹⁾ Diese Zeitschrift, Band XXVI, S. 317.

parallel mit viel stärker verdünnten Bilirubinlösungen ausgeführt, traten sehr schnell und deutlich auf.

Gefrierpunktniedrigungsversuche nach Raoult, mit Lösung der Substanz in Naphtalin und Eisessig, ergaben kein brauchbares Resultat.

Die alkoholische Lösung des Körpers zeigt keine scharfen Absorptionsstreifen, sondern bloss eine je nach der Concentration der Lösung verschieden starke Verdunkelung beider Enden des Spectrums, vorzüglich des violetten.

Erhitzt man die Substanz auf dem Platinblech, so bläht sie sich auf und verschwindet allmählich, ohne Rückstand zu hinterlassen. Ein charakteristischer Geruch konnte hierbei nicht beobachtet werden.

Zur Prüfung auf Chlor wurde nach der Vorschrift Beilstein's eine Probe mit Kupferoxyd gemischt in der Flamme des Bunsenbrenners erhitzt, wobei keine Grünfärbung eintrat.

Durch Zusammenschmelzen der Substanz mit Kalium und Prüfen der im Wasser gelösten Schmelze mit Nitroprussidnatrium wurde die Abwesenheit von Schwefel constatirt. Wird der Körper mit metallischem Kalium erhitzt, die Masse mit Wasser extrahirt, dem Filtrat Eisenvitriol, Eisenchlorid und Salzsäure zugesetzt, so entsteht alsbald deutliche Blaufärbung und nach einigem Stehen scheiden sich blaue Flocken in ziemlicher Menge ab.

Der Elementaranalyse wurde stets das unmittelbar vorher durch eine Stunde bei einer Temperatur von 105 bis 110° getrocknete Präparat unterworfen.

Das Resultat war folgendes:

Bestimmung von Kohlenstoff und Wasserstoff durch Verbrennung mit vorgelegtem Kupfer:

I. Angewandte Substanz 0,2280 g.

daraus: 0,1807 g H_2O = 0,0201 g H = 8,81% Wasserstoff

und 0,5452 g CO_2 = 0,1469 g C = 64,43% Kohlenstoff.

II. Angewandte Substanz 0,1370 g.

daraus: 0,0954 g H_2O = 0,0106 g H = 7,74% Wasserstoff

und 0,3230 g CO_2 = 0,0881 g C = 64,33% Kohlenstoff.

III. Angewandte Substanz 0.1428 g.

daraus: 0.1055 g H₂O = 0.0117 g H = 8.19% Wasserstoff
und 0.3397 g CO₂ = 0.0926 g C = 64.84% Kohlenstoff.

IV. Angewandte Substanz 0.1607 g.

daraus: 0.1108 g H₂O = 0.0123 g H = 7.65% Wasserstoff.

Der Stickstoff wurde nach Dumas bestimmt:

I. Angewandte Substanz 0.2131 g.

Barometerstand 740 mm., Temperatur 14.1°

Volumen des Stickstoffs 15.5 ccm. entsprechend 8.33% Stickstoff.

II. Angewandte Substanz 0.1135 g.

Barometerstand 745 mm., Temperatur 13.0°

Volumen des Stickstoffs 8.00 ccm. entsprechend 8.17% Stickstoff.

Die Mittel aus diesen Werthen sind:

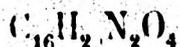
Wasserstoff 8.10%

Kohlenstoff 64.53%

Stickstoff 8.25%

Auf Sauerstoff entfallen also 19.12%.

Städeler hat für sein Bilifuscin die der Formel des Bilirubins so nahe stehende Formel C₁₆H₂₀N₂O₄ angegeben, und diese entspricht einer anderen procentischen Zusammensetzung, nämlich:



C 63.16%

H 6.58%

N 9.21%

O 21.05%

Die der oben angegebenen procentischen Zusammensetzung des Körpers am besten entsprechende Formel ist



Die aus dieser Formel berechneten Zahlen verhalten sich zu den bei der Analyse gefundenen wie folgt:

gefunden: 64.53% C berechnet: 64.65% C

8.10% H 8.09% H

8.25% N 8.25% N

19.12% O 19.02% O

Der hohe Gehalt an Wasserstoff scheint auffällig, da die Autoren für alle anderen Gallenfarbstoffe, selbst für das Hydrobilirubin Maly's, das am meisten Wasser enthält, einen viel geringeren Gehalt an Wasserstoff angeben. Doch glaube ich

nicht, dass die Substanz, welche zur Verbrennung verwendet wurde, Wasser enthalten habe: denn erstens war dieselbe, nachdem sie mit Aether aus der Lösung in Chloroform gefällt worden, stets im evacuirten Exsiccator über Schwefelsäure aufbewahrt, und zweitens wurde sie auch unmittelbar vor der Verbrennung im Trockenkasten bei 105 bis 110° getrocknet, und zwar durch eine Stunde: hierbei zeigte sie niemals nennenswerthen Gewichtsverlust.

Es wurden nun mit dem Präparate die folgenden Versuche angestellt:

Eine Portion der Substanz wurde in alkalischer Lösung mit übermangansaurem Kali oxydirt, die Flüssigkeit vom Manganhyperoxyd abfiltrirt, das Filtrat angesäuert und mit Aether geschüttelt. Nach Abdunstung des Aethers blieb eine geringe Menge gelblichen, schmierigen, nicht krystallisirten Rückstandes, der sich der Pettenkofer'schen Gallenfarbstoffreaction gegenüber negativ verhielt. Eine andere Portion wurde mit 20%iger Salzsäure im zugeschmolzenen Glasrohr durch 9 Stunden auf 145° erhitzt, dann wurde die Flüssigkeit filtrirt, eingedampft, der Rückstand mit Alkohol aufgenommen, der Alkohol verdampft, der Rückstand in Wasser gelöst, mit Thierkohle entfärbt, und die filtrirte Flüssigkeit mit Platinchloridlösung versetzt. Der nach 24 Stunden gebildete Niederschlag wurde abfiltrirt, getrocknet, gewogen und durch Verglühen der Platingehalt bestimmt.

Es betrug das Gewicht des Niederschlags: 0,0305 g
des darin enthaltenen Platins: 0,0121 g.
das sind **39,67%**.

Es enthält nun Dimethylammoniumplatinchlorid 41,20%
und Trimethyl „ „ „ 38,97%.

also steht der erhaltene Werth dem letzteren am nächsten.

Setzt man einer hellbraun gefärbten Lösung unseres Bilifuscins in Pyridin Hydrazinhydrat zu, so entsteht während 24stündigen Stehens eine eigenthümliche goldgelbe Verfärbung der Lösung.

Setzt man einer ammoniakalischen Lösung Hydrazinhydrat zu, so tritt dieselbe Erscheinung auf, jedoch etwas langsamer.

Ausser der Stickstoffbestimmung nach Dumas wurde auch der Versuch gemacht, den Stickstoff nach der Kjeldahl'schen Methode zu bestimmen, wobei es sich aber zeigte, dass nach dem Zerstören der Substanz mit rauchender Schwefelsäure beim Destilliren der sauren Flüssigkeit mit überschüssiger Kalilauge kein Ammoniak in die vorgelegte Normalschwefelsäure gelangte.

Der Versuch wurde wiederholt, indem zuerst die Substanz nur in Schwefelsäuregemisch zerstört wurde, während bei späteren Versuchen die verschiedenen Zusätze, wie metallisches Quecksilber und übermangansaures Kali, sowie andere Oxydationsmittel, beigegeben wurden. Jedesmal wurden etwa 2 Decigramm Substanz verwendet.

Das Resultat war stets das nämliche, indem die vorgelegte Säure und eine gleich grosse zur Kontrolle dienende Säuremenge gleich viel Lauge zur Neutralisation brauchten. Da bei diesen Versuchen alle nöthigen Vorsichtsmassregeln angewendet waren, und man daher nicht an ein Uebersehen des Ammoniaks zu denken hatte, so wurde daran gegangen, zu suchen, wohin der Stickstoff bei der Zersetzung gekommen sei.

Auffallender Weise lässt sich der im Bilirubin enthaltene Stickstoff mittelst der Kjeldahl'schen Methode anstandslos bestimmen, wie folgender Versuch zeigt, den ich mit von mir dargestelltem krystallisirten Bilirubin angestellt habe.

Angewandte Substanz 0,3045 g.

daraus Ammoniak 0,0343 g

oder N 0,0283 g,

das ist 9,3% N, während nach der gebräuchlichen Formel 9,79% N im Bilirubin enthalten sind.

Um nun die Form zu finden, in der der Stickstoff aus der Zersetzung mit rauchender Schwefelsäure hervorgeht, wurden folgende Versuche gemacht:

Fürs Erste wurde, um zu sehen, ob der Stickstoff nicht in Form irgend eines mit Lauge zu bindenden Körpers aus der kochenden Schwefelsäure entweiche, folgender Versuch zusammengestellt:

Ein Kolben aus hartem Glase, von der Grösse der ge-

wöhnlichen, zu den Kjeldahl'schen Analysen verwendeten Kolben, mit circa 30 cm. langem Halse, erhielt am Ende desselben aussen einen Schliff, auf den ein Gluckapparat von der Form eines kleinen Péligot'schen Apparates aufgeschliffen wurde, der sich an einem 25 cm. langen Ansatzrohre befand, das mit dem Halse des Kolbens einen stumpfen Winkel einschloss.

Der Gluckapparat wurde nun mit reinster Kalilauge entsprechend gefüllt, der Kolben mit Säure und Substanz beschickt, und dann bis zur vollständigen Entfärbung gekocht.

Sodann wurde der Apparat auseinandergenommen und die saure Flüssigkeit zu einer gewöhnlichen Ammoniakbestimmung verwendet, die ein vollständig negatives Resultat ergab. Zweitens wurde die Lauge auf Beimengungen aus den Zersetzungsprodukten geprüft, wobei ich Folgendes bemerken möchte: Bis zur Entfärbung war der Apparat etwa acht Tage jeden Tag mehrere Stunden in Gang gewesen, während Nachts die Flamme verlöscht war. In Folge dessen strömten jedesmal nach dem Anzünden ziemlich viele Gasblasen durch die Lauge heraus, während beim Erkalten Luft in reichlicher Menge zurückgesogen wurde. Hierdurch kamen die gebildeten Gase wohl zum überwiegenden Theile mit der Lauge in Berührung.

Die vorgelegte Lauge, deren alkalische Reaction nach Beendigung des Versuchs geprüft war, wurde nun aus dem Apparat herausgespült und die Flüssigkeit auf 250 ccm. ergänzt. Dann wurden folgende Untersuchungen mit derselben vorgenommen:

1. mit verdünnter Schwefelsäure angesäuert, mit Metaphenylendiamin auf salpetrige Säure geprüft: mit negativem Ergebniss;

2. wurde mit concentrirter Schwefelsäure und Diphenylamin auf Salpetersäure untersucht, ebenfalls mit negativem Resultat.

3. 50 ccm. wurden mit Eisenoxyd und Oxydulsalz und Salzsäure auf Bildung von Berlinerblau geprüft, es trat selbst nach tagelangem Stehen keine Spur einer Blaufärbung auf.

4. Auch der Versuch, mit Schwefelammonium und Eisenchlorid Cyanverbindungen nachzuweisen, ergab ein negatives Resultat.

5. Endlich wurde noch die Möglichkeit ins Auge gefasst, dass sich aus etwa entstandenen Cyanverbindungen beim Eintritt in die Lauge oxalsaures Ammon gebildet haben könne.

Zu diesem Zwecke wurde die noch übrige Portion mit Chlorbaryum gefällt, der gesammelte Niederschlag mit kalter, verdünnter Salzsäure gewaschen, die Waschflüssigkeit mit Ammoniak alkalisch gemacht, der ziemlich reichlich entstandene Niederschlag gesammelt, getrocknet, mit concentrirter Schwefelsäure in einem Röhrchen erhitzt, von wo aus das entwickelte Gas über Kalilauge geleitet wurde: dieses Gas wurde versucht anzuzünden, um zu sehen, ob Kohlenoxyd gebildet sei, was jedoch nicht gelang. Um nun noch zu sehen, ob nicht etwa Gase gebildet würden, welche von Säure zurückgehalten würden, wurde bei der Wiederholung des Versuches in das frei endende Rohr des Glückapparates mittelst einer Kautschukstopfe ein zweiter, viel kleinerer, hierzu geeigneter geformter Glückapparat dicht eingesetzt und mit 2 ccm. Normalschwefelsäure beschickt.

Nach Beendigung der Zersetzung wurde mit der im Kolben befindlichen Schwefelsäure eine Ammoniakbestimmung, mit der Lauge alle oben angeführten Versuche gemacht; beides mit demselben negativen Resultat. Sodann wurden die 2 ccm. Normalschwefelsäure titrirt, im Vergleich mit 2 ccm., die am selben Tage entnommen und aufbewahrt worden waren. Hierbei ergab sich keine Differenz, was mit ziemlicher Sicherheit ausschliesst, dass oxalsaures Ammon in der Lauge aus Cyanverbindungen gebildet worden sei.

Keiner von all diesen Versuchen hat also erklärt, was mit dem Stickstoff geschieht, wenn man die Substanz mit rauchender Schwefelsäure zerstört, während doch die Analyse nach Dumas 8,25% Stickstoff ergab.

Allerdings sind verschiedene Bindungsformen des Stickstoffs und mehrere Gruppen von organischen Körpern bekannt, welche mit der Kjeldahl'schen Methode kein Ammoniak liefern.

Wenn man jedoch die einzelnen über diesen Gegenstand handelnden Arbeiten der verschiedenen Autoren, wie die von Asboth, Arnold, Dafert, Jodlbauer, die Arbeiten von Gunning¹⁾ über die Resultate, welche er mittelst der von ihm angegebenen Modificationen der Methode erzielte, sowie insbesondere die Arbeit von Karl Arnold und Konrad Wedemeyer²⁾ über die Brauchbarkeit der Kjeldahl-Methode und der von ihnen bevorzugten Modificationen mit den verschiedenen Zusätzen, vergleicht, so findet man fast so viel verschiedene Ansichten als Arbeiten.

Die letztgenannte Arbeit umfasst zahlreiche Versuche mit verschiedenen Zusätzen zur Schwefelsäure, um den Stickstoff der zu zerstörenden Substanzen in Ammoniak zu verwandeln, und erklärt die Gunning'sche Methode in der von Arnold angegebenen Modification für die am öftesten zum Ziel führende.

Doch erhielten die Verfasser auch mit dieser Methode durchaus nicht in allen Fällen brauchbare Resultate. Sie kamen durch ihre grossen, mit den mannigfachsten Substanzen, welche Stickstoff auf die verschiedenste Weise gebunden enthalten, und mit verschieden modificirter Versuchsanordnung angestellten Versuchsreihen zu dem Schlusse, dass die Anwendbarkeit der Methode insofern von der Bindungsform des Stickstoffs abhängig sei, dass die Schwierigkeit, den Stickstoff in Ammoniak überzuführen, von der Entfernung der Stickstoffatome im Molekül abhängt.

Der Gunning'schen Modification sprechen sie viel grössere Verwendbarkeit zu, indem sie angeben, dass dieselbe gestatte, ringförmig gebundenen Stickstoff zu bestimmen, was mit der gewöhnlichen Methode nicht möglich ist: sie geben diesen Unterschied als Kennzeichen für die Bindungsform des Stickstoffs geradezu an.

Aus unserer Substanz waren nun mit gar keiner der am

1. Fresenius, Jahrbuch für analytische Chemie, Bd. 24 (1885) und folgende.

2. Fresenius, Jahrbuch für analytische Chemie, Bd. 31 vom Jahre 1892.

meisten empfohlenen und im Gebrauche stehenden Modificationen der Kjeldahl'schen Methode mehr als verschwindend kleine Mengen von Ammoniak gebildet worden, während es durch den deutlich positiven Ausfall der Lassaigne'schen Probe und durch das Ergebniss der Analyse nach Dumas bewiesen erscheint, dass die Substanz Stickstoff enthält.

Nun hatte der weiter oben beschriebene Versuch auch gezeigt, dass der Stickstoff weder als Salpetersäure, salpetrige Säure noch in Form einer Cyanverbindung entwichen war, indem uns ein einziges Mal eine positive Reaction auf Salpetersäure nach einem Versuche in der (reinen) vorgelegten Natronlauge beobachtet wurde, welche Reaction jedoch in derselben Flüssigkeit, nachdem sie einige Wochen aufbewahrt worden, nicht mehr vorhanden war.

Endlich wurden noch Versuche angestellt, um festzustellen, ob nicht bei der Zersetzung des Bilifuscins mit rauchender Schwefelsäure der Stickstoff als solcher abgeschieden würde.

Zu diesem Behufe wurden die bei der Zersetzung gebildeten Gase aufgesammelt und gasanalytisch bestimmt. Diese Versuche haben jedoch auch keine befriedigende Aufklärung gebracht, indem bei den einzelnen Versuchen verschiedene, jedoch niemals entsprechende oder annähernd entsprechende Mengen von Stickstoff nachgewiesen werden konnten.

Das wechselnde und zweifelhafte Ergebniss aller zum Zwecke der Aufklärung über die Zersetzung des Bilifuscins nach der Kjeldahl'schen Methode angestellten Versuche ist wenig geeignet, diese Vorgänge aufzuklären.

In dem Verhalten des Bilifuscins bei dessen Zersetzung nach Kjeldahl's Methode liegt nun ein wichtiger Unterschied gegenüber dem Bilirubin, welches, wie oben beschrieben, durch rauchende Schwefelsäure leicht zersetzt wird und mit der Analyse nach Dumas übereinstimmende Resultate liefert.

Indem nun das Verhalten eines Körpers bei der Zersetzung nach Kjeldahl Anhaltspunkte für die Bindungsform des Stickstoffs gibt, so dürfte es nicht zweifelhaft sein, dass Bilirubin und Bilifuscin eine ganz verschiedene Constitution

besitzen, und dass das hier beschriebene Bilifuscin ein vom Bilifuscin Städeler's total differenter Körper ist.

Auch ist ja der Unterschied der Zusammensetzung bedeutend zwischen den beiden gleichnamigen Körpern, wobei bereits weiter oben auf den auffallend hohen Wasserstoffgehalt hingewiesen worden ist.

Demnach stellt sich das Bilifuscin als ein zwar nicht krystallisirt erhaltener, aber durch Löslichkeit und andere beschriebene physikalische Eigenschaften wohl charakterisirt, die Formel $C_{64}H_{96}N_7O_{14}$ besitzender, die gebräuchlichen Gallenfarbstoffreactionen nicht gebender Körper dar, dessen Stickstoff derartig gebunden ist, dass er nicht durch Zersetzung mit rauchender Schwefelsäure in Ammoniak übergeführt werden kann.

Nachdem diese Zeilen in keiner Weise als abgeschlossene Lösung der Aufgabe betrachtet werden können, werde ich mir erlauben, über die Ergebnisse noch anzustellender Untersuchungen seinerzeit zu berichten.