

Beiträge zur Kenntnis der Gallenfarbstoffe.

Von

William Küster.

(Aus dem chemischen Laboratorium der tierärztlichen Hochschule zu Stuttgart.)

(Der Redaktion zugegangen am 16. Februar 1906.)

Als ich vor fast vier Jahren meine letzte vorläufige Mitteilung über die Gallenfarbstoffe veröffentlichte,¹⁾ glaubte ich die ausführliche Beschreibung bald folgen lassen zu können. Davon haben mich teils äußere Verhältnisse: die Übernahme des neuen Amtes in Stuttgart, teils die Arbeiten über den Blutfarbstoff abgehalten. Auch hoffte ich immer, die Schwierigkeiten überwinden zu können, welche sich bei der Verarbeitung größerer Mengen von Gallensteinen, wie ich schon andeutete, einstellten, ehe ich an die Zusammenstellung meiner Versuche herantreten wollte.

Das ist mir doch nicht gelungen, je mehr Material ich in Arbeit nahm, desto deutlicher zeigte sich, daß die einfachen Verhältnisse, wie sie Städeler²⁾ für die von ihm isolierten Gallenfarbstoffe entwickelt hat, entweder nicht bestehen oder daß sie eine Komplikation erfahren, die durch die Methode bedingt ist, sobald sie auf größere Mengen übertragen wird.

Auch muß hervorgehoben werden, daß Städeler mit Gallensteinen vom Menschen gearbeitet hat; die von ihm aus solchen isolierten Farbstoffe können ganz anderer Art sein wie die, welche man aus Rindergallensteinen herstellen kann. Endlich ist die Möglichkeit nicht von der Hand zu weisen, daß auch letztere je nach den Bedingungen, unter denen sie entstanden sind, eine ganz oder doch beträchtlich verschiedene Zusammen-

¹⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXV, S. 1268.

²⁾ Annal. der Chemie, Bd. CXXXII, S. 323.

setzung aufweisen können. Allerdings, Bilirubin ist noch in jedem Gallenstein gefunden worden, selbst solche vom Menschen, die zum allergrößten Teil aus Cholesterin bestehen, enthalten doch wenigstens kleine Mengen des roten Farbstoffs.

Maly,¹⁾ der Städeler's Methode der Isolierung der Gallenfarbstoffe auf die Gallensteine vom Rinde übertrug, hat sich nun auch vornehmlich mit dem Bilirubin und seinen Derivaten beschäftigt. Was die Mengen betrifft, welche beide Forscher in Arbeit nahmen, so fehlen zunächst bei Städeler genaue Angaben, ich schließe aber daraus, daß er sein Bilifuscin wie auch das Biliprasin in grade nur für eine Analyse ausreichender Menge erhielt, daß auch die Menge Bilirubin, welche er in Händen hatte, nicht viel mehr als einige Gramme betragen haben kann. Maly hat größere Mengen in Händen gehabt,²⁾ er benutzte z. B. für die Herstellung des Hydrobilirubins 20 g Bilirubin und die gleiche Menge wurde auf die Bromsubstitutionsprodukte verarbeitet. Thudichum,³⁾ dem wir die Entdeckung der Tatsache verdanken, daß Brom substituierend wirkt,⁴⁾ hat keine Angaben über Mengenverhältnisse gemacht: da er aber allein über 2 g für die Elementaranalyse verwandte, dürfte er immerhin einen ansehnlichen Vorrat von Bilirubin in Händen gehabt haben, das aus Ochsen gallensteinen gewonnen war. Bezüglich der Herstellung finden wir bei Thudichum einige wertvolle Beobachtungen, auf die ich noch zu verweisen haben werde, Angaben über die Menge des gewonnenen Bilirubins in bezug auf das Gallensteinpulver fehlen leider. Maly zog letzteres nach entsprechender Vorbereitung zehnmal mit Chloroform aus, dabei waren die drei letzten Auszüge immer noch gelb gefärbt und der Rückstand enthielt etwas Bilirubinkalk. Er gewann einmal aus 11,068 g eines bei 100° getrockneten Gallen-

¹⁾ Sitzungsber. d. K. Akad. d. Wiss., Bd. LVII, S. 95; Bd. LIX, S. 597. Annal. der Chemie, Bd. CXXXII, S. 127; Bd. CLXIII, S. 77; Bd. CLXXV, S. 76; Bd. CLXXXI, S. 106.

²⁾ Wie er Journ. f. pr. Chem., Bd. CIV, S. 28, berichtet, standen ihm Gallensteine in Quantitäten von mehreren Pfunden zu Gebote.

³⁾ Journ. f. prakt. Chem., Bd. CIV, S. 193.

⁴⁾ Ann. d. Chem., Bd. CLXXXI, S. 242.

steinpulvers 3,11 g Bilirubin, das sind fast 30%, ein andermal 28,11%, ein drittes Mal sogar 45% Bilirubin in rohem Zustande.

Wie ich schon erwähnte, muß man bei der Herstellung größerer Mengen von Bilirubin das Chloroform wochenlang einwirken lassen: z. B. habe ich große Hülsen von Schleicher und Schüll (43 : 123 mm)¹⁾ mit je 50 g Gallensteinpulver beschickt und im Soxhlet'schen Apparate zwei Wochen lang extrahiert. Dabei bekam ich einmal eine Ausbeute von im ganzen 15,5% Rohbilirubin und durch Wiederholung der Extraktion noch 2,9%. Aber auch dann enthielt der Rückstand noch Farbstoff, wenigstens gab er mit Natronlauge oder mit Natriumcarbonatlösung behandelt sofort eine tiefgrüne Lösung, während gallertartige Partikel zurückblieben. Später habe ich dann die Beobachtung²⁾ gemacht, daß ein mit verdünnter Salzsäure scheinbar erschöpfend behandeltes Pulver nach der Extraktion mit Chloroform an Salzsäure von neuem leicht Kalk und Magnesia abgibt, worauf Chloroform wiederum Bilirubin extrahierte. Endlich zeigte es sich, daß namentlich dann reichliche Mengen von Bilirubin durch eine erneute Chloroformextraktion herausgelöst wurden, wenn das mit Chloroform erschöpfte Pulver mit konzentrierter Essigsäure behandelt wurde, wobei außer Kalk auch ein grüner Farbstoff in reichlicher Menge herausgelöst wurde.³⁾

So trifft vielleicht die Vorstellung zu, daß auch in dem fein gesiebten Gallensteinpulver noch eine schichtweise Anordnung besteht. Bei der Behandlung mit verdünnten Säuren wird nur die oberste Schicht ihrer Mineralstoffe beraubt, es bleibt nun eine die unteren Schichten schützende Decke von Bilirubin und dem erwähnten grünen Farbstoff, den ich einstweilen

¹⁾ Die größten Hülsen (60 : 180) fassen ca. 150 g. Man darf die Hülsen nur zu $\frac{2}{3}$ füllen, da das Chloroform als spezifisch schwererer Körper das Pulver hebt, auch muß die Hülse so hoch gestellt werden, daß ihr Rand mehrere Zentimeter über der oberen Biegung des Ablaufrohrs zu stehen kommt, sonst wird das Gallensteinpulver mit fortgeschlämmt.

²⁾ Thudichum (J. f. pr. Ch., Bd. CIV, S. 197) hat bereits das gleiche Verhalten bei seinen Untersuchungen festgestellt.

³⁾ Auf diese Beobachtung hin habe ich dann das Verfahren zur Gewinnung des Bilirubins abgeändert, wovon später die Rede sein wird.

als Choleprasin bezeichnen werde.¹⁾ Das frei gemachte Bilirubin läßt sich nun durch Chloroform wegnehmen, worauf dann erst verdünnte Säure die zweite Schicht angreifen kann. Besser geschieht das durch konzentrierte Essigsäure, welche, wie gesagt, auch noch den grünen Farbstoff entfernt. So ergaben 275,5 g Gallensteinpulver zunächst 38,5 = 14% Gesamtrohbilirubin, nach der Extraktion mit konzentrierter Essigsäure alsdann 16 g = 6%, nach einer weiteren Extraktion mit Essigsäure 9,8 g, nach einer dritten 2,7 g, im ganzen also 67 g Rohbilirubin = 24,3%. Und doch enthielt der Rückstand noch in Alkali lösliche Farbstoffe.

Bei Verwendung einer geringeren Menge von Gallensteinpulver ist es mir aber geglückt, durch lang fortgesetzte Behandlung mit Essigsäure resp. Chloroform einen Rückstand zu erhalten, der auch beim Kochen mit Natronlauge kaum noch Farbstoff an diese abgab: ich habe allerdings über ein Jahr mit dieser Portion zu tun gehabt.

Das Rohbilirubin besteht nun, wie ich schon in der vorläufigen Mitteilung erwähnte, aus mehreren Stoffen, die sich durch ihre Löslichkeit in Chloroform unterscheiden. Die Hauptmenge des Farbstoffs hat sich nach der wochenlang fortgesetzten Extraktion im Siedekolben in festen Krusten abgeschieden, darüber steht eine dunkelbraunrote Lösung,²⁾ welche nach Abdestillation von etwa $\frac{5}{6}$ des vorhandenen Chloroforms beim Stehen in der Kälte einen prächtig rot gefärbten Körper ausfallen läßt. Das Filtrat von diesem gibt auf Zusatz von Alkohol eine beträchtliche Menge eines braunroten Farbstoffs, den ich als β -Bilirubin bezeichnete, im Chloroformalkohol bleiben endlich noch geringe, dunkelgrün gefärbte Anteile löslich, die erst nach dem Abdestillieren der Lösungsmittel als eine zähe Masse zurückbleiben. Was die Mengen dieser Anteile betrifft, so differieren sie bei verschiedenen Versuchen: im erwähnten Falle fanden sich in den 38,5 g Rohbilirubin, die durch die erste Extraktion

¹⁾ Die Beschreibung dieses Farbstoffes erfolgt später (Seite 322).

²⁾ Auch Thudichum (l. c. S. 197) berichtet von einer dunklen, fast schwarzgrün gefärbten Mutterlauge, aus welcher Alkohol einen roten, sehr fein verteilten Farbstoff fällt.

erhalten worden waren, ca. 33,5 g schwer lösliche, ca. 2,5 g mittelschwer lösliche und ca. 2,5 g β -Bilirubin.¹⁾

Diese Rohbilirubine habe ich nun etwas näher untersucht.

A. Das β -Bilirubin.

Als β -Bilirubin sind von mir zunächst die Teile bezeichnet worden, welche bei der Extraktion des präparierten Gallensteinpulvers durch Chloroform in diesem gelöst bleiben und erst durch Alkohol gefällt werden (Präp. Nr. Ia u. IIa). Später habe ich das erstgenannte Lösungsmittel zum großen Teil und zwar etwa $\frac{5}{6}$ der ganzen Menge abdestilliert, worauf sich aus der rückständigen Lösung ein sehr schön rot gefärbter Körper amorph absetzte, von dem nach 1—2 Tagen abfiltriert wurde. Dann erst wurde das Filtrat durch Alkohol gefällt, wobei immer noch reichliche Mengen von β -Bilirubin ausfielen (Präp. Nr. III).

Auf das Vorhandensein dieses so leicht in Chloroform löslichen Farbstoffs wurde ich zuerst aufmerksam bei der Verarbeitung von 230 g Gallensteinen, welche sich in den Gallengängen eines Pferdes angesammelt hatten.²⁾ Es waren dunkelrote Konkremente von Johannisbeer- bis Kirschkernegröße. 210 g davon, gepulvert, getrocknet und gesiebt, lieferten³⁾ im ganzen 48,2 g in Chloroform lösliche Anteile, doch gelangten bei der ersten Extraktion nur 15,2 zur Lösung; als dann der Rückstand $1\frac{1}{2}$ Tage mit siedendem Alkohol behandelt war, konnten durch Chloroform 2,8 g extrahiert werden, und als dann der sich nun ergebende Rückstand von neuem mit Säure und zwar mit konzentrierter Salzsäure lange Zeit digeriert worden war, gingen

¹⁾ Mengenverhältnisse anzugeben, fällt schon deshalb außerordentlich schwer, weil die Gallenfarbstoffe in allen Filtern gerne haften bleiben. Ähnliche Beobachtungen haben schon Städeler und Thudichum angegeben. Bei den obigen Angaben ist auf den Verlust keine Rücksicht genommen worden.

²⁾ Sie wurden mir aus dem Schlachthaus von Kiel im Jahre 1899 zugeschickt.

³⁾ Die erste Ätherextraktion lieferte 9 g (Fette u. Cholesterin), durch die Extraktion mit Wasser und verdünnter Säure wurden 41 g herausgelöst, die nun folgende zweite Ätherextraktion bedingte einen Verlust von 1,5 g.

endlich 30,2 g durch Chloroform in Lösung. Es bestanden aber

die 15,2 g aus 9,7 schwer löslichen und 5,5 g β -Bilirubin

› 2,8 › › 1,5 › › › 1,3 › ›

› 30,2 › › 12,5 › › › 17,7 › ›

Die letzten Anteile enthielten also ca. 59% β -Bilirubin. Eine ähnliche Beobachtung ist von mir später nicht wieder gemacht worden, ich hatte allerdings auch keine Gelegenheit mehr, Konkremente von einem Pferde zu verarbeiten. Leider ist es mir nicht möglich, festzustellen, ob nun hier ein besonderer in Chloroform leichter wie das gewöhnliche Bilirubin löslicher Farbstoff vorlag. Als chemisches Individuum kann dieses β -Bilirubin nicht betrachtet werden, das geht aus den folgenden Angaben hervor. Später, gelegentlich meiner Übersiedelung nach Stuttgart, wurde dann die noch vorhandene Menge dieses β -Bilirubins mit analogen Präparaten, die aus Ochsen gallensteinen gewonnen waren, vereint und dann lieferte eine erneute Untersuchung, wie ich zeigen werde, den Beweis, daß im β -Bilirubin ein Kunstprodukt vorliegt. Möglich ist es immerhin, daß die Pferdegallensteine ein besonderes «Bilirubin» enthalten, allerdings sind aus den Löslichkeitsverhältnissen des «Bilirubins» — darauf komme ich später zurück — vorerst Folgerungen schwierig abzuleiten, und dann muß beachtet werden, daß die große Menge von « β -Bilirubin» erst erhalten wurde, nachdem das Gallensteinpulver mit siedendem Alkohol erschöpft und lange Zeit mit konzentrierter Salzsäure behandelt worden war, was sehr wohl von Einfluß auf den natürlich vorhandenen Farbstoff gewesen sein könnte.

Obwohl es mir also nicht gelungen ist, aus dem rohen β -Bilirubin einen einheitlichen Körper zu gewinnen, möchte ich die Versuche kurz erwähnen, welche mit dem Präparat ausgeführt wurden. Zunächst wurde das Rohprodukt am Rückflußkühler mit absolutem Alkohol extrahiert, wobei sich von den 5,5 g 1,6, von den 17,7 g nur 0,7 g lösten. Das unlöslich zurückgebliebene β -Bilirubin ergab bei der Analyse folgendes Resultat:

Präparat Ia (3,9 g). 0,1568 g (bei 110° getrocknet) gaben 0,3744 g CO₂
und 0,0911 g H₂O = 65,12% C und 6,45% H;

Präparat 1b (17 g). 0,1532 g (bei 120° getrocknet) gaben 0,3655 g CO₂ und 0,089 g H₂O = 65,07% C und 6,45% H.

Beide Präparate waren aschefrei und lösten sich spielend leicht in Chloroform. Die Bestimmung der Löslichkeit ergab aber folgendes:

Ein Überschuß des Farbstoffs (Präp. 1b) blieb zwei Tage lang unter häufigem Umschütteln mit Chloroform in Berührung (Temperatur 10°), dann wurde filtriert. 7,74 g der Lösung enthielten 0,658 g Farbstoff, wonach 1 Teil Farbstoff 11,3 Teile Chloroform gebraucht hatte.¹⁾

Der beim ersten Versuch nicht gelöste Rest wurde nun ein zweites Mal mit einer zur Lösung unzureichenden Menge Chloroform unter gleichen Bedingungen angesetzt. 14,3 g der Lösung enthielten jetzt 0,333 g Farbstoff, d. h. auf 1 Teil Farbstoff kommen 43 Teile Chloroform.¹⁾

Danach schien ein Gemenge aus leichter und schwerer löslichen Teilen vorzuliegen, und es wurde versucht, ob durch Lösen in Dimethylanilin eine Trennung der Bestandteile ermöglicht wurde, und vielleicht ein Teil im krystallisierten Zustande zu erhalten war. Es wurden dieselben Bedingungen eingehalten, wie sie sich für das Umkrystallisieren von Rohbilirubin als günstig erwiesen hatten, d. h. ein Teil des Farbstoffs wurde in 30 Teile siedendes Dimethylanilin eingetragen und nach erfolgter Lösung filtriert. Zur Verwendung kamen 11,5 g, ungelöst blieben nur Spuren, beim Erkalten schieden sich 2,9 g ab, aus dem Filtrat wurden durch Alkohol 0,5 g gefällt, durch Salzsäure 2 g,²⁾ alle Produkte waren amorph. Nach dem Aussehen zu urteilen, waren auch die beim Erkalten ausgefallenen 2,9 g verändert, das Präparat löste sich ferner nicht mehr völlig in Chloroform. Die Analyse ergab:

0,1354 g (bei 110° getrocknet) gaben 0,3158 g CO₂ und 0,0734 g H₂O
= 63,6% C und 6,02% H.

¹⁾ Der Farbstoff blieb nach dem Verdunsten des Chloroforms in fast schwarzen amorphen Lamellen zurück.

²⁾ Die Aufarbeitung erfolgte, wie in dieser Zeitschrift, Bd. XXVI. S. 319. Anm., angegeben ist. Alle Präparate wurden zur Entfernung des Dimethylanilins sorgfältig mit Alkohol extrahiert, die 2,9 g z. B. 4 Tage lang.

Bei der Verarbeitung von Gallensteinpulver aus Konkrementen vom Rind ergaben sich wesentlich andere Verhältnisse: 500 g verloren z. B. durch die Behandlung mit Äther, heißem Wasser, konzentrierter Salzsäure, Wasser und Äther 161,5 = 32,3%. Der Rückstand, 338,5 g, gab bei der ersten Extraktion durch Chloroform 64 g schwer lösliches Rohbilirubin und 13,5 β -Bilirubin (durch Fällung mit Alkohol erhalten, ohne daß ein Abdestillieren eines Teils des Chloroforms vorhergegangen war). Der Rückstand wurde darauf einer erneuten Behandlung mit Salzsäure und Äther unterworfen und außerdem noch mit absolutem Alkohol erschöpfend am Rückflußkühler extrahiert. Alsdann wurden durch eine zweite Extraktion mit Chloroform 12 g schwerlösliches Rohbilirubin und 2,5 g β -Bilirubin gewonnen: hier wie bei der ersten Extraktion kamen also auf 1 Teil des letzteren fast 5 Teile des schwerlöslichen Farbstoffs. Durch beide Extraktionen wurden im ganzen erhalten: 92,5 g = 18,5% chloroformlösliche Farbstoffe.

Aus dem Aussehen nach farbstoffarmem Material wurden ein andermal aber nur 1,5% erhalten (270 g gaben 4 g), bessere, d. h. dem Aussehen nach farbstoffreichere Gallensteine gaben dann wieder 13,3% (aus 309 g im ganzen 41,2 g).

Das durch Alkohol gefällte Roh- β -Bilirubin wurde nun auch hier durch absoluten Alkohol erschöpfend extrahiert und dann analysiert.

Präparat IIa. 0,1278 g (bei 110° getrocknet) gaben 0,3088 g CO₂ und 0,0745 g H₂O = 65,9% C und 6,4% H;

IIb. 0,1390 g (bei 110° getrocknet) gaben 0,3363 g CO₂ und 0,0785 g H₂O = 65,92% C und 6,27% H;

0,1195 g (bei 110° getrocknet) gaben 7,42 ccm ¹₁₀-N.-NH₃ = 0,01039 g N = 8,69% N.¹⁾

Nun zeigte es sich aber, daß diese zuerst in Chloroform so leicht löslichen Produkte nach dem Fällen durch Alkohol und dem Trocknen nicht mehr völlig löslich waren. So wurden zunächst einmal 4 g mit Chloroform geschüttelt, dann filtriert

¹⁾ Zum Zerstören wurden 15 ccm konz. H₂SO₄ verwendet, welche eine Nacht in der Kälte, dann 2½ Tage in der Siedhitze einwirkten; vergl. Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXV, S. 1270, Anm.

und das Filtrat durch Alkohol gefällt, wobei 2 g erhalten wurden, welche nach erneuter Aufnahme in Chloroform durch abermalige Fällung mit Alkohol 1 g eines jetzt in Chloroform völlig löslichen Präparates ergaben¹⁾ (Präp. IIa α). Das Verfahren wurde auf die gleiche Weise mit 4 g desselben Präparates (IIa) wiederholt, wobei 1,4 g nach zweimaliger Umfällung als in Chloroform völlig löslich erhalten wurden (Präp. IIa β).

Präparat IIa α . 0,1123 g (bei 120° getrocknet) gaben 0,2681 g CO₂ = 65,1% C;

0,1203 g (bei 100° getrocknet) gaben 0,2877 g CO₂ und 0,0667 g H₂O = 65,23% C und 6,16% H;

0,1693 g (bei 120° getrocknet) gaben 10 ccm ¹/₁₀-N.-NH₃ = 0,014 g N = 8,27% N;

0,1112 g (bei 120° getrocknet) gaben 6,46 ccm ¹/₁₀-N.-NH₃ = 0,009044 g N = 8,13% N;

Präparat IIa β . 0,1419 g (bei 110° getrocknet) gaben 0,3894 g CO₂ und 0,0828 g H₂O = 67,15% C und 6,47% H;

0,1287 g (bei 110° getrocknet) gaben 0,3132 g CO₂ und 0,0725 g H₂O = 66,37% C und 6,26% H;

0,1068 g (bei 110° getrocknet) gaben 6,04 ccm ¹/₁₀-N.-NH₃ = 0,008456 g N = 7,92% N;

0,1221 g (bei 110° getrocknet) gaben 8,75 ccm Stickgas (10°, 727 mm) = 8,21% N.

Nun wurden auch noch 4,5 g des Präparates IIb aus Chloroform, wie angegeben, umgelöst,²⁾ das erhaltene Präparat IIb α löste sich völlig und zwar im Verhältnis 1 : 29,9 in Chloroform (7,35 g der Lösung enthielten 0,2458 g Farbstoff).

Präparat IIb α . 0,125 g (bei 100° getrocknet) gaben 0,3058 g CO₂ und 0,0694 g H₂O = 66,72% C und 6,17% H;

0,1262 g (bei 100° getrocknet) gaben 8,15 ccm Stickgas (7°, 735 mm) = 7,57% N.

Die Analysen zeigten also keine Übereinstimmung, von einem chemischen Individuum konnte keine Rede sein.

Im April 1902 wurde nun aus 500 g Gallensteinpulver vom Rind noch ein neues Präparat gewonnen und zwar durch die erste Extraktion 4,2, durch die zweite 6,5 g β -Bilirubin, diesmal wurde

¹⁾ Das durch Chloroform Ungelöste wog 1,3 g; es blieb sehr viel Farbstoff in den Filtern hängen.

²⁾ Hier blieben nur 0,3 g ungelöst. Die chloroformlöslichen Präparate pulverten sich sämtlich ganz außerordentlich schlecht.

mit Alkohol erst gefällt, nachdem das Chloroform zum großen Teil abdestilliert worden war. Beide Teile wurden mit Alkohol wieder erschöpfend extrahiert, beide waren in Chloroform völlig löslich und zwar im Verhältnis von 1 : 27,5 resp. 1 : 34,5 (9,57 g der Lösung gaben 0,3482 g Rückstand, 10,55 ebenso 0,3058).

Präparat III. 0,1896 g (bei 110° getrocknet) gaben 11,8 ccm Stickgas (15,5°, 733 mm) = 7,01% N;

0,1028 g (bei 110° getrocknet) gaben 0,2478 g CO₂ und 0,0654 g H₂O = 65,74% C und 7,07% H.

Bei der Übersiedelung nach Stuttgart wurde der vorhandene Vorrat an β -Bilirubin vereint und dann erneut einer Aufarbeitung unterworfen. Zunächst wurde mit kaltem Alkohol erschöpfend ausgezogen, wobei 2 g in Lösung gingen, der Rest von 21 g wurde jetzt erneut durch Chloroform am Rückflußkühler extrahiert. Der weitaus größte Teil des Präparates war bereits nach 8 Stunden gelöst, doch wurde 1½ Tage lang extrahiert, bis anscheinend nur noch Spuren Farbstoff in Lösung gingen. Es waren nun unlöslich zurückgeblieben: 2,6 g, im Siedekolben abgesetzt: 0,5 g,¹⁾ nach Abdestillieren von $\frac{5}{6}$ des Chloroforms beim Stehen der rückständigen Lösung abgesetzt: 2,4 g, durch Fällung des Filtrats mit 95%igem Alkohol ausgefallen: 11,4 g, nach vollständigem Abdestillieren des Chloroforms und eines Teils des Alkohols ausgefallen: 1 g, nach dem Verdampfen des Alkohols zurückgeblieben 1,7 g, im ganzen 19,6 g. Verlust also (in den Filtern stecken geblieben) 1,4 g.

Das durch Alkohol gefällte Präparat (11,4 g) erwies sich in Chloroform anscheinend völlig löslich, eine Bestimmung ergab: 0,36 g in 22 g der Lösung = 1 : 61, bei der Wiederholung mit dem vom ersten Versuch bleibenden Rückstand war das Löslichkeitsverhältnis dagegen 1 : 184 (0,075 in 13,8 g Lösung). Also wurde auch hier wieder ein Ansteigen der Löslichkeit beobachtet. Der Rückstand bestand aus fast schwarzen, amorphen Lamellen, die sich in Chloroform leicht wieder lösten. Zur weiteren Reinigung erfolgte noch ein zweimaliges Umlösen aus kaltem Chloroform und Fällung durch Alkohol, wobei das erstemal 1 g, beim zweiten Mal 0,5 g unlöslich zurückblieben.

¹⁾ Kein Rohbilirubin, wahrscheinlich mitgerissene unlösliche Teile.

Bemerkenswert ist, daß ein großer Teil des zur Lösung notwendigen Chloroforms abdestilliert werden konnte, ohne daß eine Ausscheidung an Farbstoff eintrat.¹⁾ Die Fällung durch Alkohol war eine fast vollständige, im Filtrat vom β -Bilirubin blieben das erstemal 0,5 g, beim zweiten Mal 0,7 g Farbstoff. Um so größer war die Menge des in den Filtern bleibenden Farbstoffs: 2,8 resp. 1,5 g konnten aus ihnen nachträglich durch Chloroform extrahiert werden, so daß schließlich die Menge des zweimal umgefällten β -Bilirubins nur noch 5 g betrug. Dieses Präparat (III) war nun völlig in Chloroform löslich und zwar sehr leicht, zwei Bestimmungen mit verschiedenen Proben ergaben das Verhältnis: 1 : 17,6 resp. 1 : 18,8 (0,6386 in 11,24, 0,555 in 10,47 g der Lösung).

0,2058 g (bei 70° getrocknet) gaben 0,4855 g CO₂ und 0,1170 g H₂O
= 64,34% C und 6,3% H;

0,1870 g (bei 70° getrocknet) gaben 16,2 ccm Stickgas (27°, 748 mm)
= 9,4% N.

Nun war die Beobachtung gemacht worden, daß aus dem schwerer löslichen Bilirubin beim Extrahieren mit absolutem Alkohol ein Farbstoff herausgelöst wird, welcher chlorhaltig ist. Das Halogen wurde bei der Einwirkung von Natronlauge abgespalten.

0,2945 g gaben 0,04 g AgCl = 3,36% Cl (Carius).

Das gab Veranlassung, auch das β -Bilirubin zu prüfen, wobei sich ein ganz bedeutender Chlorgehalt herausstellte:

0,2655 g (bei 100° getrocknet) gaben 0,049 g AgCl = 4,56% Chlor.

Rechnet man nun die oben angeführten Analysen auf ein chlorfreies Produkt um unter der Annahme, daß ein Chloratom für ein Wasserstoffatom eingetreten ist, so ergibt sich folgende prozentische Zusammensetzung: 67,31% C, 6,6% H, 9,84% N, das sind aber Zahlen, welche mit der empirischen Formel des Bilirubins gut übereinstimmen. Demnach dürfte im β -Bilirubin ein Kunstprodukt vorliegen, das aus Bilirubin unter der Einwirkung von Chloroform entstanden ist. Wir wissen ja durch

¹⁾ Orndorff und Teeple haben ebenfalls die Bildung übersättigter Lösungen beschrieben und zwar beim Bilirubin. Americ. Chem. Journ., Bd. XXXIII, S. 215; Chem. Zentralbl. 1905, Bd. I, S. 1253.

die Arbeiten von Thudichum und Maly, daß Bromderivate des Bilirubins existieren, wenn sie auch höchst veränderliche Körper sind. Ferner sah Thudichum¹⁾ zwei prächtig grüne Körper entstehen, wenn er trocknen Chlorwasserstoff in die Chloroformlösung des Bilirubins einleitete, durch Äther ließen sie sich trennen. Städeler²⁾ warnt vor der Verwendung eines schlecht gereinigten Chloroforms. Maly's³⁾ Befunde endlich, daß aus Bilirubin durch Chloroform und Eisessig im Rohr ein die Lösung feurig grün färbender Stoff entsteht, und daß die Monochloressigsäure und zwar schon bei gewöhnlicher Temperatur ähnlich wirkt, dürften ihre Ursache ebenfalls in einer Chlorierung des Bilirubins haben, denn «Biliverdin», an dessen Entstehen Maly dachte, hatte sich ganz sicher nicht gebildet, das geht aus Maly's Angaben selbst unzweideutig hervor. Ich habe mich auch noch davon überzeugt, daß eine Lösung des Bilirubins in Chloroform schon beim Stehen an der Luft und namentlich im Licht sehr bald eine Änderung erleidet, welche durch einen Farbumschlag sichtbar wird, beim Eindampfen der Lösung geht die Umsetzung sehr rasch vor sich, ja selbst beim Eindunsten der Lösung im Vacuum bekommt man niemals einen ganz rein-rot gefärbten Rückstand, es sind immer auch dann noch grüne Partikel dabei.⁴⁾

So mag denn das Chloroform bei der Herstellung von kleinen Mengen Bilirubin gute Dienste leisten, je länger man die Einwirkung desselben vorsichgehen lassen muß — und zur nahezu vollständigen Erschöpfung von 50 g Gallensteinpulver sind ca. 2 Wochen nötig —, desto mehr man also mit einer Zersetzung des Chloroforms zu rechnen hat, um so mehr hat man auch damit zu rechnen, daß man neben Bilirubin ein chloriertes, leichter lösliches Produkt erhält, dessen Lösung in Chloroform nun Bilirubin leichter löst als das reine Lösungsmittel. Der Befund, daß β -Bilirubin ein Kunstprodukt ist, erklärt auch die

¹⁾ Journ. f. prakt. Chem., Bd. CIV, S. 200.

²⁾ Ann. d. Chem., Bd. CXXXII, S. 329.

³⁾ Ann. d. Chem., Bd. CLXXV, S. 85.

⁴⁾ Bei den Löslichkeitsbestimmungen, welche das Bilirubin betreffen, komme ich noch auf diese Tatsache zurück.

Tatsache, daß bei einer zweiten Extraktion eines Rohbilirubins, das anscheinend von leichter löslichen Teilen völlig frei gewaschen war, von neuem leicht lösliche Anteile entstanden. Nach allem ist also das Chloroform recht wenig geeignet für die Extraktion des Bilirubins: leider ist es mir nicht möglich gewesen, einen Ersatz aufzufinden, so daß wir uns mit der Tatsache, daß die Präparate chlorhaltig werden, abfinden müssen, jedenfalls erklärt dieser Gehalt an Chlor auch so manche nicht stimmende Analyse, vielleicht lassen sich auch einige bei Versuchen über die Löslichkeit von Bilirubinpräparaten in Chloroform gemachte Beobachtungen erklären.

Daß auch das schwerer lösliche Rohbilirubin Chlor enthält oder enthalten kann geht aus folgenden Analysen hervor:

a) Gallensteinpulver, das mit Äther, Wasser, Essigsäure, Äther und Alkohol behandelt worden ist, als vor der Extraktion mit Chloroform:
0,271 g (bei 100° getrocknet) gaben 0,0042 g AgCl = 0,38% Cl (Carius).

b) Ein Rohbilirubin aus a):
0,1923 g (bei 100° getrocknet) gaben 0,002 g AgCl = 0,257% Cl (Carius).

c) Ein anderes Rohbilirubinpräparat, das zwei- oder dreimal durch Chloroform extrahiert war, es hat eine braungrüne Farbe:
0,207 g (bei 100° getrocknet) gaben 0,0044 g AgCl = 0,525% Cl (Carius).

d) Ein Rohbilirubin wie c), gewonnen durch die Extraktion erst in den letzten Tagen der Behandlung, sieht rotgelb aus:

0,1084 g (bei 100° getrocknet) gaben 0,0025 g AgCl = 0,57% Cl.

e) Ein mittelschwerlösliches Rohbilirubin, also zuerst im Chloroform löslich geblieben, dann nach Abdestillation von $\frac{5}{6}$ desselben beim Stehen der rückständigen Lösung ausgefallen:

0,0866 g (bei 130° getrocknet) gaben 0,0003 AgCl: Spuren Chlor.

f) Ein Rückstand, der 3 Wochen der Extraktion mit Chloroform ausgesetzt war:

0,3175 g (bei 110° getrocknet) gaben 0,0190 g AgCl = 1,48% Chlor.

Schließlich sei noch erwähnt, daß ein Teil des Chlors aus dem β -Bilirubin sehr leicht wieder herausgenommen wird, wie sich bei weiteren Versuchen, das beschriebene Präparat, welches 4,56% Chlor enthielt, zu reinigen, herausstellte. Siedender Acetessigester löste es nämlich verhältnismäßig leicht auf, beim Erkalten fielen z. B. von 0,5 g 0,2 g wieder aus, die sich auch glatt in Chloroform lösten und daraus durch Alkoholfällung wieder erhalten wurden. Auch siedendes Aceton löst das β -Bili-

rubin, aber weniger reichlich auf. Die beim Erkalten der Lösungen ausgefallenen, übrigens amorphen Teile zeigten nun einen geringeren Chlorgehalt als das β -Bilirubin:

0.1085 g (bei 120° getrocknet) gaben 0,004 g AgCl = 0,91% Chlor.

Auch Pyridin löst das β -Bilirubin und zwar bereits in der Kälte rasch auf: aus dieser Lösung wurde der Farbstoff nicht durch Wasser, wohl aber auf Zusatz einer Säure, auch durch Essigsäure gefällt und fast quantitativ wiedererhalten. Durch dieses Umlösen war ebenfalls eine Chlorabspaltung bewirkt worden:

0.1183 g (bei 120° getrocknet) gaben 0,0045 g AgCl = 0,94% Chlor.

Chlorhaltig sind auch die Reste von Farbstoff, welche mit dem β -Bilirubin in Lösung bleiben, aber nicht wie dieses durch Alkohol gefällt werden: sie bleiben schließlich zurück, nachdem alle Lösungsmittel verdampft sind, und stellen eine harzige Masse vor.

0,2785 g gaben 0,027 g AgCl = 2,4% Cl;

0.3530 g (bei 105° getrocknet) gaben 0,030 g AgCl = 2,1% Cl.

Dagegen enthielt ein alkohollöslicher Farbstoff, der durch Extraktion mit kaltem Alkohol aus Gallensteinen, die nur mit Äther, Wasser und Essigsäure vorbehandelt sind, kein Chlor.

0,2505 g (im Vacuum getrocknet), nach Carius zerstört, gaben kein AgCl.

Der Farbstoff stellt eine fast schwarze Masse dar, welche zu einem grünschwarzen Pulver zerreibbar ist und bei ca. 60° schmilzt, bei höherer Temperatur stark aufschäumt. Sie ähnelt also in ihren Eigenschaften dem Bilifuscin resp. Biliprasin Städeler's. Bei der Einwirkung der Salpetersäure wurde ein Teil der Substanz nur schwer zerstört, nach der teilweisen Zerstörung machte sich ein schwach aromatischer Geruch geltend, der an Nitrobenzol erinnerte. Dieses Verhalten deutet auf eine Verschiedenheit in der Konstitution dieses Gallenfarbstoffs mit dem Hämin hin, das durch Salpetersäure schon bei 130° völlig oxydiert wird. Konnte doch auch bisher aus dem Bilirubin nur etwa die Hälfte der Menge Hämatinsäure gewonnen werden, welche das Hämin gibt.

B. Das Bilirubin.

Zur Herstellung der Bilirubinpräparate diente das bei der ersten Extraktion des mit Äther, Wasser, Salz- oder Essigsäure, Wasser, Äther und in einigen Fällen auch noch mit Alkohol vorbehandelten Gallensteinpulvers durch Chloroform im Siedekolben abgesetzte schwer lösliche Rohbilirubin. Es wurde zur Reinigung mit Chloroform angerieben, der Farbstoffbrei abgesaugt und mit Chloroform nachgewaschen. Alsdann wurde ein zweites Mal im Extraktionsapparat mit Chloroform tagelang ausgezogen, wobei gewöhnlich noch ein Rückstand blieb. Das hierbei wieder im Kolben abgesetzte Rohbilirubin wurde nun, nachdem es abfiltriert und mit Chloroform nachgewaschen war, der Extraktion durch absoluten Alkohol am Rückflußkühler unterworfen, wobei nicht unbeträchtliche Mengen eines amorphen grünen Farbstoffs herausgelöst wurden.

Ich will nun zunächst die Analysen solcher Rohbilirubinpräparate, die alle amorph erschienen, folgen lassen.

Präparat I. Farbe gelbbraun. Löslichkeit: 1:1090, resp. 1:976.

(0,018 g in 19,58, 0,0201 g in 19,52 g der Chloroformlösung.)

0,1580 g (bei 110° getrocknet) gaben 0,3866 g CO₂ und 0,0932 g H₂O
= 66,73% C und 6,57% H;

0,1125 g (bei 110° getrocknet) gaben 7,74 ccm $\frac{1}{10}$ -N.-NH₃
= 0,010836 g N = 9,63% N;¹⁾

0,1717 g (bei 110° getrocknet) gaben 12,1 ccm $\frac{1}{10}$ -N.-NH₃
= 0,1694 g N = 9,86% N;

0,1645 g (bei 105° getrocknet) gaben 11 ccm $\frac{1}{10}$ -N.-NH₃
= 0,0154 g N = 9,36% N;

Präparat II enthielt Spuren von Asche. Löslichkeit: 1:1260, resp. 1:1190.

(0,018 in 23 g resp. 0,0177 in 21 g der Chloroformlösung.)

0,1668 g (bei 100° getrocknet) gaben 0,4078 g CO₂ und 0,100 g H₂O
= 66,68% C und 6,66% H;

0,1108 g (bei 105° getrocknet) gaben 7,85 ccm $\frac{1}{10}$ -N.-NH₃
= 0,01099 g N = 9,92% N.

Präparat III enthielt etwas Asche, Farbe braunrot. Menge 64 g, vergl. S. 301.

0,1638 g (bei 100° getrocknet) gaben 0,398 g CO₂ und 0,094 g H₂O
= 66,3% C und 6,37% H.

¹⁾ Zu den Kjeldahl-Bestimmungen sei nochmals erwähnt, daß auf je 0,1 g Substanz 10 ccm H₂SO₄ genommen wurden und daß die Einwirkung 3 Tage währte.

Das Präparat wurde darauf ein drittes Mal mit Chloroform extrahiert und die schwer löslich abgesetzten Teile wie angegeben behandelt.

Präparat IIIa. Farbe braunrot. Löslichkeit: 1:624.

(7,723 g der Chloroformlösung enthielten 0,0123 g Farbstoff.)

0,1556 g (bei 100° getrocknet) gaben 0,3817 g CO₂ und 0,0915 g H₂O
= 66,9% C und 6,53% H;

0,1617 g (bei 100° getrocknet) gaben 9,4 ccm $\frac{1}{10}$ -N.-NH₃
= 0,01316 g N = 8,14% N; ¹⁾

0,143 g (bei 100° getrocknet) gaben 9,3 ccm $\frac{1}{10}$ -N.-NH₃
= 0,01302 g N = 9,1% N;

0,091 g (bei 100° getrocknet) gaben 5,9 ccm $\frac{1}{10}$ -N.-NH₃
= 0,00826 g N = 9,08% N.

Zusammenstellung.

Berechnet für		Gefunden		
(C ₁₆ H ₁₈ O ₃ N ₂) _x		I.	II.	III.
% C	67,13	66,73	66,68	66,90
% H	6,29	6,57	6,66	6,53
% N	9,79	9,63	9,86, 9,36	9,92, 9,1

Gaben nun auch die Analysen des Rohbilirubins Werte, welche auf die für das Bilirubin geltende Formel C₁₆H₁₈O₃N₂ stimmen, eine Garantie für das Vorliegen eines chemischen Individuums geben sie doch nicht. So wurde ein großer Teil der vereinigten Präparate wieder aus siedendem Dimethylanilin²⁾ umkrystallisiert und zwar wurden pro Gramm Farbstoff 31 Teile des Lösungsmittels verwendet. Die Ausbeuten sind am besten, wenn nicht mehr als 3 g Rohbilirubin auf einmal in Arbeit genommen werden, und wenn jede Portion durch ein besonderes Filter filtriert wird. Auch muß das Bilirubin gut getrocknet sein, es wird dann allmählich, d. h. bei Verwendung

¹⁾ Hier wirkten nur 10 ccm H₂SO₄ 2 Tage lang ein, das Präparat scheint aber in der Tat weniger Stickstoff zu enthalten.

In der vorläufigen Mitteilung (Ber., Bd. XXXV, S. 1270) habe ich aus Versehen zwei Analysen von umkrystallisiertem Bilirubin unter denen für Rohbilirubin verzeichnet.

²⁾ Ich bin auf dieses Lösungsmittel gekommen, nachdem alle anderen, auch Anilin, versagt hatten. Anilin hatte ich aber versucht, weil es ein Lösungsmittel für Indigo ist und schon Städeler auf die Analogien zwischen diesem und dem Gallenfarbstoff hingewiesen hatte. Vielleicht bedingt die chemische Ähnlichkeit beider auch, daß sie von denselben Teilen der Niere abgeschieden werden.

von 3 g etwa innerhalb dreier Minuten in das lebhaft siedende Dimethylanilin eingetragen. Im ganzen wurden 45 g der Umkrystallisation unterworfen, dabei wurden folgende Fraktionen erhalten, deren Gewicht erst nach erschöpfender Behandlung mit Alkohol festgestellt wurde.

1. Beim Erkalten des Dimethylanilins krystallisierten aus:	19,4 g = 43,1%
2. Nach Abdestillation von ca. $\frac{3}{4}$ des Lösungsmittels im Vacuum:	4,8 » = 10,6%
3. Durch Fällung des Filtrats mit Alkohol:	3,2 » = 7,1%
4. Aus dem Filtrat hiervon nach Abdestillation des Alkohols durch Fällung mit Salzsäure:	2,0 » = 4,4%
5. Ungelöst in Dimethylamin, also Rückstand:	10,0 » = 22,2%
6. Aus den Fraktionen durch Extraktion mit Alkohol herausgelöst:	2,0 » = 4,4%
7. Verlust, d. h. in den Filtern zurückgeblieben:	3,6 » = 8,2%
	<hr/> 45,0 g = 100,0%

1. Das beim Erkalten der Lösung in Dimethylanilin sich ausscheidende Bilirubin war hier durchweg in verhältnismäßig großen, breiten, rhombischen Säulen krystallisiert. Die Krystalle wurden abgesaugt, zunächst mit Dimethylanilin,¹⁾ dann mit Alkohol nachgewaschen und darauf in diesem Fall 2 Tage lang mit siedendem Alkohol extrahiert.

Das Präparat hatte eine schöne, braunrote Farbe. Löslichkeit: 1:385.
(16,76 g der Chloroformlösung enthielten 0,0435 g.)

0,1474 g (bei 140° getrocknet) gaben 0,3627 g CO₂ und 0,0835 g H₂O
= 67,11% C und 6,3% H;

0,1187 g (bei 105° getrocknet) gaben 0,2930 g CO₂ und 0,0734 g H₂O
= 67,31% C und 6,8% H;

0,1022 g (bei 100° getrocknet) gaben 0,2510 g CO₂ und 0,061 g H₂O
= 66,98% C und 6,63% H;

0,0973 g (bei 105° getrocknet) gaben 7,5 ccm $\frac{1}{10}$ -N.-NH₃
= 0,0105 g N = 10,8% N;

0,1055 g (bei 105° getrocknet) gaben 7,39 ccm $\frac{1}{10}$ -N.-NH₃
= 0,010346 g N = 9,8% N.

Hier seien ferner einige Analysen eines Präparates angeschlossen, daß aus einem Rohbilirubin aus Gallensteinen vom Pferd durch Umlösen aus Dimethylanilin erhalten worden war.

¹⁾ Das Auswaschen mit Dimethylanilin wird solange fortgesetzt, bis der Ablauf durch Alkohol nicht mehr getrübt wird.

Die Ausbeuten an beim Erkalten des Lösungsmittels ausgeschiedenem Farbstoff betragen hier ebenfalls ca. 40%, aus 8 g wurden 3,1, aus 11 g 5 g gewonnen, doch erschien der abgesetzte Farbstoff nur ganz undeutlich krystallisiert. Das durch Alkohol extrahierte Präparat zeigte eine schöne rote Färbung.

0,1600 g (bei 110° getrocknet) gaben 0,3938 g CO₂ und 0,0935 g H₂O
= 67,12% C und 0,49% H:

0,1045 g (bei 110° getrocknet) gaben 6,4 ccm ¹/₁₀-N.-NH₃
= 0,00896 g N = 8,57% N: ¹)

0,0918 g (bei 100° getrocknet) gaben 6,6 ccm ¹/₁₀-N.-NH₃
= 0,00924 g N = 10,06% N.

Das Rohbilirubin kann auch aus Benzoesäurerestern umkrystallisiert werden, aber mit weniger gutem Erfolge.

a) 5 g Rohbilirubin wurden in 50 g kochendem Benzoesäureäthylester langsam eingetragen und dann filtriert. Nach 12 Stunden wurde der im Filtrat abgesetzte Farbstoff, der nur ganz undeutlich krystallisierte, abfiltriert und einen Tag mit Alkohol extrahiert. Sein Gewicht betrug 1,3 g, doch war das Präparat nicht völlig in Chloroform löslich. Eine Wiederholung des Verfahrens änderte insofern nichts, als der Farbstoff sich nicht krystallinisch absetzte. Der beim ersten Versuch ungelöste Teil wurde darauf mit dem Filtrat vom beim Erkalten ausgeschiedenen Farbstoff von neuem erhitzt und dann filtriert. Diesmal setzten sich deutlich krystallinische Partikel, aber in sehr geringer Menge ab.

b) 20 g Benzoesäureisoamylester (Sp. 260°) wurden auf 200 g erhitzt und dann 1 g Rohbilirubin eingetragen. Die Lösung ging nicht gut von statten — bei einer Temperatur von 150—180° löste sich übrigens fast gar kein Bilirubin —, 0,4 g blieben ungelöst und hatten auch ihre Löslichkeit in Chloroform eingebüßt, waren also verändert worden: aus dem Filtrat schied sich 0,3 g ab (nach der Extraktion mit Alkohol bestimmt).

Diese Anteile lösten sich völlig in Chloroform, eine krystallinische Struktur war vorhanden.

0,1526 g (bei 105° getrocknet) gaben 0,3735 g CO₂ und 0,0895 g H₂O
= 66,75% C und 6,51% H.

¹) Hier war nicht lange genug mit der Schwefelsäure erhitzt worden.

Zusammenstellung der Analysen von umkrystallisiertem
Bilirubin.

	Berechnet für ($C_{16}H_{18}O_3N_2$)	Gefunden							
		I.		II.		III.	IV.		
% C	67,13	67,11	67,31	66,98	67,12		66,75	67,02	
% H	6,29	6,3	6,8	6,63	6,49		6,51	6,64	
% N	9,79	10,8	9,8	—	8,57	10,06	—	—	

2. Aus dem Filtrate vom krystallisiert ausgeschiedenen Bilirubin wurde ca. $\frac{3}{4}$ der Menge des vorhandenen Dimethylanilins im Vacuum abdestilliert. Die rückständige Lösung setzte alsdann wiederum Bilirubinkristalle ab, doch erschienen diese als langgestreckte rhombische Prismen. Das Präparat wurde 2 Tage lang mit siedendem Alkohol extrahiert, um es vom Dimethylanilin zu befreien.

0,1021 g (bei 120° getrocknet) gaben 0,2509 g CO_2 und 0,061 g H_2O
= 67,02% C und 6,64% H.

3. Der durch Alkohol aus der nach Abfiltration des eben erwähnten Präparates verbleibenden Lösung im Dimethylanilin ausgefällte Farbstoff sieht braunrot aus und ist amorph; er ist noch nicht näher untersucht worden. Ebenso wenig die braungrün gefärbten.

4. Anteile, welche sich aus dem Filtrat von 3. nach Abdestillation des Alkohols durch Salzsäure ausfällen lassen.

5. Was endlich die Anteile betrifft, welche sich im siedenden Dimethylanilin zunächst nicht gelöst haben, so wurden sie nach erschöpfender Behandlung mit Alkohol von neuem mit Chloroform extrahiert, wobei ein Teil ungelöst blieb.¹⁾ Der größte Teil wurde dann im Kolben abgesetzt aufgefunden und wie das Rohbilirubin gereinigt. Die Analysen zeigten, daß in der Zusammensetzung keine Änderung eingetreten war.

0,1211 g (bei 110° getrocknet) gaben 0,2983 g CO_2 und 0,0695 g H_2O
= 67,18% C und 6,37% H;

0,1113 g (bei 110° getrocknet) gaben 7,75 ccm $\frac{1}{10}$ -N.- NH_3
= 0,01085 g N = 9,75% N;

0,1108 g (bei 110° getrocknet) gaben 7,6 ccm $\frac{1}{10}$ -N.- NH_3
= 0,01064 g N = 9,6% N.

¹⁾ Meine Angabe (Ber., Bd. XXXV, S. 1270) erfährt hierdurch eine Berichtigung.

2. Ein anderes Gallensteinpulver. 20. Mai 1901.

Löslichkeit $\left\{ \begin{array}{l} 1:157 \text{ (11,46 g Chloroform enthielten 0,073 g Farbstoff)} \\ 1:271 \text{ (10,2 „ „ „ 0,0375 „ „)} \end{array} \right.$

3. Ein drittes.

Löslichkeit 1:174 (13,08 „ „ „ 0,075 „ „)

4. Ein viertes.

Löslichkeit 1:240 (15,69 „ „ „ 0,0655 „ „)

5. Ein fünftes.

Löslichkeit 1:170 (12,75 „ „ „ 0,0752 „ „)

Jedes der Pulver enthielt nach dem Schütteln mit Chloroform noch reichlich roten Gallenfarbstoff; es wurden dann die vereinten Pulver 2 $\frac{1}{2}$ Tage durch Chloroform im Soxhlet'schen Apparat extrahiert. Das rückständige Pulver ergab folgendes Resultat:

28. Mai 1902.

Löslichkeit 1:1163 (18,6 g Chloroform enthielten 0,016 g Farbstoff).

Das hatte den Anschein, als ob in den Gallensteinen von vornherein nach ihrer Löslichkeit verschiedene rote Farbstoffe vorkämen.

Daher wurde dann auch auf ein leichter lösliches Bilirubin gefahndet und solches in den Teilen des Rohbilirubins gesucht, welche zunächst in Chloroform löslich bleiben und sich erst dann abscheiden, wenn etwa $\frac{3}{4}$ der Menge des vorhandenen Chloroforms abdestilliert worden ist. Mit welchem Erfolg, werde ich sogleich zeigen.

Zunächst lasse ich einige Bestimmungen folgen, welche ein Rohbilirubin betrafen, das sich im Siedekolben bei der Extraktion abgesetzt hatte, also schwer löslich sein sollte.

28. Mai 1902. Portion I. 42,8 g.

Löslichkeit 1:355 (12,3 g Chloroform enthielten 0,0346 g Farbstoff)

Portion II. 49,3 g.

Löslichkeit 1:328 (8,0 g Chloroform enthielten 0,0244 g Farbstoff)

„ 1:300 (17,2 „ „ „ 0,057 „ „)

Portion III. 57 g.

Löslichkeit 1:123 (9,2 g Chloroform enthielten 0,0748 g Farbstoff)

„ 1:130 (12,4 „ „ „ 0,0946 „ „)

Die hier beobachtete größere Löslichkeit ist vielleicht dadurch zu erklären, daß dem schwerlöslichen Bilirubin noch etwas β -Bilirubin anhaftete, welches nun die Löslichkeit erhöhte.

Die nächsten Bestimmungen betreffen ein Präparat, welches ich der Güte des Herrn Dr. Zumbusch in Wien verdanke, es ist aus menschlichen Gallensteinen hergestellt und hat eine prächtige rote Farbe. Das Gewicht betrug 9 g. Hier wurde eine Reihe von Bestimmungen hintereinander ausgeführt, indem das beim vorhergehenden Versuch ungelöst gebliebene Material zum folgenden benutzt wurde.

1902.

13.	II.	1. Löslichk.	1 :	69,5	(10,75 g Chloroform	enthielten	0,1547 g Farbstoff)
14.	2.	»	1 :	222	(18,31 »	»	0,0825 »
			1 :	242	(9,95 »	»	0,0411 »
15.	3.	»	1 :	422	(21,9 »	»	0,0519 »
			1 :	376,5	(18,5 »	»	0,0490 »
17.	4.	»	1 :	513	(22,01 »	»	0,0429 »
			1 :	567	(26,17 »	»	0,0461 »
18.	5.	»	1 :	627	(29,6 »	»	0,0472 »
			1 :	652	(20,04 »	»	0,0307 »
19.	6.	»	1 :	697	(25,3 »	»	0,0363 »
			1 :	709	(21,07 »	»	0,0297 »
20.	7.	»	1 :	684	(21,15 »	»	0,0309 »
			1 :	708	(18,26 »	»	0,0258 »

Ganz dasselbe Verhalten fand ich bei einem zweiten Präparat, das ich ebenfalls Herrn Dr. Zumbusch verdanke, es sah grünlich aus, das Gewicht betrug 11 g.

1902.

21.	II.	1. Löslichk.	1 :	169,6	(15,42 g Chloroform	enthielten	0,0909 g Farbstoff)
			1 :	170	(11,46 »	»	0,0673 »
22.	2.	»	1 :	252	(10,9 »	»	0,0432 »
			1 :	266	(8,02 »	»	0,0301 »
24.	3.	»	1 :	321,7	(15,12 »	»	0,047 »
			1 :	305,6	(12,07 »	»	0,0395 »
27.	5. ¹⁾	»	1 :	592	(16,53 »	»	0,0279 »
			1 :	586	(19,09 »	»	0,0336 »
28.	6.	»	1 :	588	(21,86 »	»	0,0372 »
			1 :	617	(17,34 »	»	0,0281 »
1. III.	7.	»	1 :	671,6	(19,6 »	»	0,0292 »
			1 :	656,4	(17,59 »	»	0,0268 »
2.	8.	»	1 :	722	(15,53 »	»	0,0215 »
			1 :	746	(12,62 »	»	0,0169 »

¹⁾ Bei der 4. Ausschüttelung wurde das Gewicht nicht bestimmt.

Die anfänglich hohe Löslichkeit nimmt also von Versuch zu Versuch ab, bis sie (im ersten Fall) bei 1 : 700 ungefähr konstant wird. Das macht den Eindruck, als ob auch in diesen Präparaten ein Gemenge von verschiedener Löslichkeit vorläge.

Nun war auch ein aus Dimethylanilin umkrystallisiertes Präparat, das mit Alkohol erschöpfend extrahiert war, der gleichen Behandlung unterworfen worden, wobei ganz entsprechende Resultate erhalten wurden:

1902.

4. II.	1.	Löslichk.	1 : 111,5 (20,74	g Chloroform	enthielten	0,1861 g Farbst.	1)
			1 : 134,7 (36,31	»	»	0,2697 » Farbstoff	
6.	2.	»	1 : 124 (10,096	»	»	0,0891 »	»
			1 : 117,6 (9,49	»	»	0,0807 »	»
7.	3.	»	1 : 269,5 (18,33	»	»	0,068 »	»
			1 : 296 (14,29	»	»	0,0482 »	»
8.	4.	»	1 : 496 (19,69	»	»	0,0397 »	»
			1 : 487 (13,73	»	»	0,0282 »	»
10.	5.	»	1 : 515 (57,09	»	»	0,1108 »	»
			1 : 503 (26,75	»	»	0,0532 »	»
11.	6.	»	1 : 624 (25,15	»	»	0,0403 »	»
			1 : 618 (22,85	»	»	0,0370 »	»
12.	7.	»	1 : 656 (25,72	»	»	0,0392 »	2)
			1 : 609,3 (20,29	»	»	0,0333 »	»

Bei der Untersuchung eines als «mittelschwer löslich» bezeichneten Präparats, das also bei der Gewinnung des Rohbilirubins oder bei der nochmaligen Extraktion des letzteren im Chloroform löslich geblieben war, und sich erst ausgeschieden hatte, nachdem ein großer Teil des Chloroforms abdestilliert worden war, ergab sich zunächst folgendes:

10.V. 1904.

1. Löslichkeit 1 : 264 (20,835 g Chloroform enthielten 0,0787 g Farbstoff

11.V. 1904.

2. Löslichkeit 1 : 459,5 (18,38 » » » 0,04 » »

Fast ein Jahr darauf, im Mai 1905, wurden 5 Präparate

¹⁾ Hier wurde nur 20 Minuten geschüttelt.

²⁾ Hier war die Temperatur etwas kühler, wie ausdrücklich bemerkt ist.

die auf die angegebene Art erhalten worden waren,¹⁾ vereint: gerade dieser Teil des Rohbilirubins hatte durchweg eine sehr schöne rote Farbe, freilich krystallisiert erschien es nicht. Die gesammelte Menge betrug 29 g: sie wurde in einer Porzellanschale mit 500 g siedendem Eisessig übergossen, da sich unterdessen gezeigt hatte, daß dem Rohbilirubin etwas Choleprasin²⁾ (vergl. S. 297) beigemischt zu sein pflegt, kurze Zeit noch im Sieden erhalten und dann zum Absetzen der Ruhe überlassen. Es ging das übrigens hier sehr rasch von statten, auch zeigte sich, daß durch die Behandlung mit kochendem Eisessig das Rohbilirubin körniger geworden war und eine fast krystallinische Struktur angenommen hatte. So ließ es sich denn auch sehr gut durch ein gehärtetes Filter von Doeverhoff (Nr. 496) filtrieren und wurde dann auf dem Filter noch mit siedendem Eisessig nachgewaschen, bis das Ablaufende nicht mehr gefärbt war. Trotzdem nun die ersten Filtrate dunkelgrün aussahen, hatten sich doch im ganzen von den 29 g nur 0,8 g gelöst.³⁾

Der restierende rote Farbstoff wurde auf dem Filter mit heißem Wasser bis zum Ausbleiben der sauren Reaktion nachgewaschen, das Wasser durch Alkohol verdrängt und dann bei gelinder Wärme getrocknet.

Die Analysen dieses sehr schön rotbraun gefärbten Präparats von Rohbilirubin gaben merkwürdigerweise abweichende Resultate, der Grund ist bisher noch nicht aufgeklärt.

0,2562 g (bei 100° getrocknet) gaben 0,6155 g CO₂ und 0,144 g H₂O
 = 65,54% C und 6,29% H;

0,349 g (im Vacuum getrocknet) gaben 33,8 ccm N bei 21° und 744 mm B.
 = 10,78% N.

Die Bestimmung der Löslichkeit gab ebenfalls ein überraschendes Resultat.

¹⁾ Zu diesen gehörte auch das auf seine Löslichkeit bereits, wie angegeben, untersuchte Präparat.

²⁾ Es kann sich aber auch um den grünen Farbstoff handeln, der sich aus Bilirubin unter dem Einfluß des Chloroforms bildet.

³⁾ Der Eisessig löst immer etwas den roten Farbstoff mit auf, wurde er nun im Vacuum abdestilliert, so hinterbleibt ein Gemenge, das an ein wenig Eisessig nur den grünen Farbstoff abgibt, während der rote ungelöst zurückbleibt.

19. VI. 1905.

1. Löslichkeit	1:601	(20,15 g Chloroform	enthielten	0,0335 g Farbstoff
	1:594	(28,5 »	»	0,048 »

20. VI. 1905.

2. Löslichkeit	1:719	(7,48 »	»	0,0104 »
----------------	-------	---------	---	----------

Bei der Wiederholung ergaben sich ähnliche Resultate:

22. VI. 1905.

1. Löslichkeit	1:450	(21,58 g Chloroform	enthielten	0,048 g Farbstoff
2.	1:585	(31,59 »	»	0,054 »
	1:638	(24,88 »	»	0,039 »
3.	1:660	(25,61 »	»	0,0385 »
	1:732	(14,86 »	»	0,0195 »

Das zunächst mittelschwer lösliche Präparat, das ja zuerst auch eine Löslichkeit von 1:264 zeigte, war also nach dem Aufbewahren und der erwähnten Behandlung in ein Präparat übergegangen, das sich durchaus an die schwer löslichen Teile anschließt. Bei den eben geschilderten Versuchen war das Chloroform im Vacuum unter Lichtabschluß verdunstet worden, trotzdem sah der Rückstand niemals rein rot aus, er war meist grün umrändert, und dieser grüne Farbstoff löste sich in Eisessig auf. Das aus den Rückständen stammende und durch Eisessig gereinigte Bilirubin wog noch 0,2 g, es erschien zum Teil krystallinisch, zum Teil amorph. Es wurde die ganze Menge mit 25 g Chloroform $\frac{3}{4}$ Stunden geschüttelt.

7. VII. 1905.

Löslichkeit 1:239 (19 g Chloroform enthielten 0,0795 g Farbstoff).

Die hier somit beobachtete erhöhte Löslichkeit ist vielleicht darauf zurückzuführen, daß sich nur die amorphen Teile gelöst haben, der Rückstand erschien jetzt wenigstens durchweg krystallisiert.¹⁾

Nun wurde ein großer Teil des als «mittelschwer löslich» bezeichneten Rohbilirubins aus Dimethylanilin unter Einhaltung der schon beschriebenen Bedingungen umkrystallisiert. Es sei hier nur erwähnt, daß sich dabei aus 9 g des Farbstoffs 5,4 g (also 60%) beim Erkalten der Lösung absetzten. Und zwar bestanden die Krystalle aus lauter kegelförmigen Gebilden, es

¹⁾ Städeler, Ann., Bd. CXXXII, S. 329, «je krystallinischer das Bilirubin ist, desto schwerer erfolgt die Lösung», es ist dann anhaltendes Kochen nötig.

waren nur ganz wenige Säulen dabei. Was nach Abdestillation eines großen Teils des Dimethylanilins auskrystallisierte, bestand dagegen aus Nadeln und Wetzsteinen.

Die Analyse des ersten, 5,4 g betragenden Präparats ergab nun wieder im Gegensatz zu dem Rohprodukt auf $(C_{16}H_{18}O_3N_2)$ stimmende Werte:

0.207 g (bei 105° getrocknet) gaben 0.5066 g CO_2 und 0.117 g H_2O
 — 66,89% C und 6,28% H.

Die Bestimmung der Löslichkeit ergab endlich folgendes:

1905.

25. VII.	Löslichkeit 1.	1:161 (21,3 g Chloroform enthielten 0,132 g Farbstoff)
		1:159 (21,3 „ „ „ 0,1343 „ „)
26.	2.	1:459 (13,3 „ „ „ 0,029 „ „)
		1:455 (25,1 „ „ „ 0,0552 „ „)
30.	3.	1:631 (18,0 „ „ „ 0,0285 „ „)
		1:632 (31,3 „ „ „ 0,0495 „ „)
1. VIII.	4.	1:622 (14,0 „ „ „ 0,0225 „ „)
		1:659 (16,6 „ „ „ 0,0252 „ „)

Das frisch umkrystallisierte Präparat verhielt sich also im Gegensatz zu dem einige Zeit aufbewahrten, aus dem es hergestellt worden war, was die Löslichkeit betrifft, ganz so wie die früher (Seite 315/6) untersuchten Präparate.

Zu bemerken ist ferner, daß bei dem ersten Versuch nach dem Verdampfen des Chloroforms im Vacuum der wieder an den Rändern stark grün gefärbte, sonst prachtvoll rote Rückstand in Prismen und Wetzsteinen krystallisiert erschien, während die Rückstände vom 3. und 4. Versuch nicht deutlich krystallisierten.

Dieselben Unterschiede in der Löslichkeit vor und nach dem Umkrystallisieren hatte ich vorher bei einem anderen Präparat, das als „schwer löslich“ bezeichnet war, aufgefunden: die Menge betrug 38 g im ganzen.

10. V. 1904.

Löslichkeit 1.	1:373 (17,92 g Chloroform enthielten 0,048 g Farbstoff)
	1:384 (27,56 „ „ „ 0,0717 „ „)

11. V. 1904.

Löslichkeit 2.	1:474 (17,23 „ „ „ 0,0363 „ „)
	1:444 (21,61 „ „ „ 0,0487 „ „)

Das Präparat wurde zunächst in zwei Portionen untersucht, deren Mengen 15 g und 23 g betragen, in der einen

war auch, wie schon erwähnt, ein Chlorgehalt von 0,525% nachgewiesen worden.

Da sich dann die Löslichkeit annähernd als gleich erwies, wurden beide vereint und zunächst mit Eisessig erschöpfend behandelt, wobei 2,5 g aus den 38 g herausgelöst wurden: danach erschien auch das anfänglich grünlich verfärbte Präparat schön rotbraun und hatte krystallinische Struktur angenommen. Es wurde noch einen Tag lang mit Äther extrahiert und schließlich mit kaltem Alkohol längere Zeit geschüttelt, wobei nur ganz wenig in Lösung ging. Zur Umkrystallisation aus Dimethylanilin gelangten 30,5 g, es schieden sich aus dem Filtrat ca. 15 g in dicken schiefen Säulen krystallisiert ab. Sie wurden durch lange Zeit fortgesetzte Behandlung mit kaltem Alkohol vom Dimethylanilin befreit.

7./VII. 1905.

Löslichkeit 1.	1:131	(19,78 g Chloroform enthielten 0,151 g Farbstoff)
	1:122	(10,52 » » » 0,0861 » »)

8./VII. 1905.

Löslichkeit 2.	1:620	(12,4 » » » 0,020 » »)
	1:563	(18,3 » » » 0,0325 » »)

15. VII. 1905.

Löslichkeit 3.	1:620	(10,97 » » » 0,0177 » »)
	1:590	(7,96 » » » 0,0135 » »)

17. VII. 1905.

Löslichkeit 4.	1:548	(23,84 » » » 0,0435 » »)
	1:617	(30,88 » » » 0,0500 » »)

Ein anderer Teil des Präparats gab ganz entsprechende Resultate:

16./VII. 1905.

Löslichkeit 1.	1: 97,3	(18,08 g Chloroform enthielten 0,1858 g Farbstoff)
	1:108	(7,38 » » » 0,0685 » »)

22./VII. 1905.

Löslichkeit 2.	1:510	(32,24 » » » 0,0631 » »)
	1:490	(22,81 » » » 0,0465 » »)

So wurde also auch bei diesem umkrystallisierten Bilirubin, das einen durchaus einheitlichen Eindruck machte, anfangs die hohe Löslichkeit beobachtet, allerdings können hier nicht größere Mengen des Präparates aus leichter löslichen Anteilen

¹⁾ Der aus dem Chloroform abgeschiedene Farbstoff krystallisierte in langen Prismen und Wetzsteinen, während das Präparat aus kurzen, dicken Säulen bestanden hatte.

bestanden haben, denn durch einmaliges Ausschütteln mit Chloroform werden sie entfernt, und nun steigt die Löslichkeit hier gleich bei der zweiten Ausschüttelung auf 1 : 5 bis 600.

Aus allen Befunden glaube ich den Schluß ziehen zu dürfen, daß das Bilirubin in mehreren Modifikationen vorkommt, von denen die eine vielleicht das Polymere der andern ist. Diese bildet sich allmählich aus der mit einfacherem Molekulargewicht, und dieser Vorgang ist ja auch daraus ersichtlich, daß noch so schöne frische Bilirubinpräparate beim Aufbewahren mit der Zeit unansehnlich braun werden. Umgekehrt wird nun die schwer in Chloroform lösliche polymere Modifikation beim Umkrystallisieren aus Dimethylanilin, also wenn sie auf eine Temperatur von 190° kommt, wieder gespalten und das, was beim Erkalten auskrystallisiert, ist wenigstens zum Teil die unbeständige, leichter lösliche Modifikation. Sehr bemerkenswert verhielt sich ja mein eines Präparat bei den Versuchen, es aus Benzoesäureamylester umzukrystallisieren, erst bei 190° trat eine deutliche Lösung ein, während sich bei $150-180^{\circ}$ fast nichts gelöst hatte.

Ob meine Voraussetzungen¹⁾ sich bewahrheiten werden, müssen weitere Untersuchungen dartun, die Übersicht ist durch die so leicht eintretende, auf andere Einflüsse zurückzuführende Änderung des Bilirubins erschwert, z. B. durch die Bildung des chlorhaltigen, so leicht in Chloroform löslichen β -Bilirubins, dessen Chloroformlösung Bilirubin reichlicher lösen dürfte als reines Chloroform. Dann kommt das grün gefärbte Umwandlungsprodukt in Frage, dessen Auftreten beim Verdunsten einer Lösung von reinem Bilirubin in Chloroform selbst im Vacuum unter Lichtabschluß nicht vermieden werden konnte und das in Eisessig löslich ist. Von diesem grünen Farbstoff ist das Produkt dann wohl zu unterscheiden, das sich aus Gallensteinen durch kalten Alkohol herauslösen läßt, bevor überhaupt eine Behandlung mit Chloroform stattgefunden hatte, und das dem Bilifuscin Städeler's gleicht. Das Biliprasin desselben Forschers, das aus dem Gallensteinpulver nach der Extraktion

¹⁾ Man könnte vielleicht auch an optisch sich verschieden verhaltende Bilirubine denken.

mit Chloroform durch heißen Alkohol herausgelöst wird, dürfte aller Wahrscheinlichkeit nach ein Kunstprodukt sein, das sein Entstehen der Wirkung des Alkohols auf das durch die Behandlung mit Chloroform etwas chlorhaltig gewordene Bilirubin verdankt. Es ist aber auch nicht ausgeschlossen, daß der heiße Alkohol allein oder mit Spuren Salzsäure, die von der vorausgehenden Behandlung mit dieser Säure noch anhaften, verändernd auf das Bilirubin einwirken. Durch einen Reagensglasversuch kann man sich wenigstens leicht davon überzeugen, daß Bilirubin beim Erwärmen mit Alkohol, der eine Spur Salzsäure enthält, einen grünen Farbstoff an das Lösungsmittel abgibt.

Endlich kommt aber noch ein grüner Farbstoff in Betracht, dessen Vorhandensein bisher, wie es scheint, übersehen worden ist, der aber in Gallensteinen vom Rind wenigstens bisher immer angetroffen wurde. Das ist das von mir bereits erwähnte (Seite 297) Choleprasin. Der neue Farbstoff, den ich mir zu benennen erlaube, weil er zum mindesten eine neue Kategorie repräsentiert — im reinen Zustande habe ich ihn noch nicht erhalten —, ist löslich in Eisessig, aber unlöslich in Alkohol, dadurch also grundsätzlich verschieden vom Bili-verdin, -fusicin und -prasin, und er enthält zum Unterschied von allen bisher isolierten Gallenfarbstoffen Schwefel, zwar nicht viel, die Analysen gaben zwischen 1,06 bis 1,62 differierende Werte, qualitativ konnte aber die Anwesenheit dieses Elementes noch in jedem Präparat nachgewiesen werden. Die bisher dargestellten können aber schon aus dem Grunde keinen Anspruch auf Reinheit haben, weil sie aus einem Gallensteinpulver gewonnen sind, das bereits mit Chloroform einmal oder mehrere Male erschöpft worden war. Der grüne Farbstoff, der sich aus Bilirubin unter der Einwirkung von Chloroform leicht bildet und ebenfalls in konzentrierter Essigsäure löslich ist, könnte also wohl den Choleprasinpräparaten beigemischt sein.

Zur Gewinnung derselben wurde das betreffende Material mit konzentrierter Essigsäure angerieben und nun mit einer sehr großen Menge derselben Säure, welche fast zum Sieden erhitzt war, übergossen, eine Zeitlang digeriert, dann zum Absitzen beiseite gestellt. Die klare, grüne Lösung wurde dann,

am besten erst nach mehreren Tagen, durch ein gehärtetes Filter gegossen, der rückständige Farbstoff allmählich aufs Filter gebracht und mit heißer Essigsäure nachgewaschen, bis die ablaufende Säure nur noch Spuren von Farbstoff enthielt. Noch zweckmäßiger ist es, den von der grünen, essigsäuren Lösung durch Dekantation getrennten Rückstand ein zweites und drittes Mal mit heißer Säure zu übergießen und immer erst nach einigen Tagen zu dekantieren, da schleimige Partikel vorhanden sind, die sich schwer absetzen und die Filter sehr rasch verstopfen. So kam es auch, daß die Behandlung mit der heißen Essigsäure meistens viele Wochen in Anspruch nahm.

Aus den Filtraten wurde dann die Essigsäure zum größten Teil im Vacuum abdestilliert, und der Rückstand in viel Wasser gegossen, dem ein wenig Ammoniak zugesetzt war. Gänzliche Fällung wurde hierbei doch nicht erreicht, die Filtrate von der schlammigen Ausscheidung, die sich übrigens sehr gut filtrieren ließ, enthielten aber, wenn sie auch stark gefärbt erschienen, doch nur wenig feste Substanz, wie sich beim Abdampfen von Proben herausstellte, so daß die in den Filtraten noch vorhandene Menge verloren gegeben wurde.

Der säurefrei gewaschene Niederschlag, der äußerst voluminös ist, etwa wie der aus einer alkalischen Lösung gefällte Hämatinschlamm, wurde nun entweder direkt auf Fließpapier langsam getrocknet (Präparat I) oder in verdünntem Alkali gelöst und aus der filtrierten Lösung durch Essigsäure wieder gefällt, ausgewaschen und getrocknet (Präparat II) oder durch Auflösen in heißem Eisessig gereinigt. Diese Lösung ließ sich gut filtrieren, worauf der Farbstoff durch Zusatz von Wasser wieder gefällt werden konnte (Präparat III).

Im Gegensatz zu dem noch feuchten, voluminösen Schlamm löste sich der getrocknete Farbstoff nur äußerst schwierig in Eisessig auf, aus dieser Lösung konnte er natürlich wieder durch Eintragen in Wasser gefällt werden (Präparat IV).

Die bisher ausgeführten Analysen ergaben kein übereinstimmendes Resultat, zeigen aber, daß sich Choleprasin ganz wesentlich in seiner Zusammensetzung vom Bilirubin unterscheidet.

- Präparat I. 0,1306 g (im Vacuum getrocknet) gaben 0,2763 g CO₂ und 0,0885 g H₂O = 57,7% C und 7,59% H.
- Präparat II. 0,1745 g (bei 130° getrocknet) gaben 0,3558 g CO₂ und 0,1330 g H₂O = 55,61% C und 8,4% H.
0,8635 g (bei 130° getrocknet) gaben 0,1020 g BaSO₄ = 1,62% S.
0,0545 g (bei 110° getrocknet) gaben 5,7 ccm N₂ bei 10° und 753 mm B. = 12,41% N.
- Präparat III. 0,1713 g (im Vacuum getrocknet) gaben 0,3652 g CO₂ und 0,1167 g H₂O = 56,82% C und 7,63% H.
0,2291 g (im Vacuum getrocknet) gaben 26,1 ccm N₂ bei 19° und 736 mm B. = 12,7% N.
0,9125 g (bei 100° getrocknet) gaben 0,0702 g BaSO₄ = 1,06% S.
0,2289 g (bei 110° getrocknet) gaben 0,492 g CO₂ und 0,139 g H₂O = 58,62% C und 6,81% H.
0,3535 g gaben kein AgCl (Carius-Bestimmung).
- Präparat IV enthielt 1,3% Asche.
0,1885 g (bei 100° getrocknet) gaben 0,3875 g CO₂ und 0,1125 g H₂O = 56,06% C und 6,63% H.
1,1508 g (bei 100° getrocknet) gaben 0,0955 g BaSO₄ = 1,14% S.

Choleprasin löst sich auch in Ammoniak: wird diese Lösung auf dem Wasserbade verdunstet, so bleibt ein Rückstand, der sich in Wasser wieder löst. Diese Lösung wird durch Silbernitrat, Quecksilberchlorid, Kupfer- und Zinksulfat, sowie durch Bleiacetat vollständig gefällt, die Niederschläge enthalten das betreffende Metall.

Choleprasin gibt bei der Destillation mit Zinkstaub die Pyrrolreaktion, verhält sich aber bei der Oxydation mit Chromsäure wesentlich anders als Hämatin bzw. Bilirubin, es konnte das Entstehen von Hämatinsäure nicht beobachtet werden.

Die weitere Untersuchung des Choleprasins habe ich mit Herrn Niethammer, dem ich einige der angeführten Analysen verdanke, in Angriff genommen. Wir haben bereits eine neue Portion von Gallensteinpulver im Betrage von 500 g in Arbeit, hierbei ist nun allen bisher gemachten Beobachtungen insofern Rechnung getragen, als wir die Aufarbeitung des Pulvers in der folgenden Weise geleitet haben.

Die fein gepulverten und durch ein engmaschiges Sieb

getriebenen Konkremeute wurden getrocknet und erschöpfend mit Äther, heißem Wasser und 10%iger Essigsäure extrahiert. Das durch langes Auswaschen mit Wasser von der Säure befreite Pulver wurde wieder getrocknet und abermals durch Äther 1½ Tage lang ausgezogen. Nun folgte eine durch Wochen fortgesetzte Behandlung mit kaltem 96%igen Alkohol, wobei die Auslaugung durch kräftiges Schütteln unterstützt wurde. Der Alkohol nimmt hierbei einen grünen Farbstoff fort. Die alsdann wieder getrocknete Masse wurde nun mit heißem Eisessig behandelt, der jetzt das Choleprasin in reichlicher Menge herauslöste.

Auf diese Weise hoffen wir ein reineres Präparat zu erhalten, als es bisher möglich war.

Zusammenfassung.

1. Bei der Aufarbeitung des Gallensteinpulvers ist die Verwendung von Salzsäure zu vermeiden, an ihre Stelle tritt eine 10%ige Essigsäure.

2. Der Extraktion mit Chloroform hat eine Behandlung mit kaltem Alkohol und mit heißem Eisessig voranzugehen. Durch letzteren wird ein bisher nicht beobachteter grüner Gallenfarbstoff, das Choleprasin, herausgelöst. Derselbe ist in Alkohol unlöslich und unterscheidet sich schon in der Zusammensetzung wesentlich von den bisher bekannten Farbstoffen der Galle.

3. Das in Chloroform leicht lösliche β -Bilirubin ist ein chlorhaltiges Kunstprodukt, aus dem das Chlor sehr leicht herausgenommen wird.

4. Die meisten mit Hilfe von Chloroform gewonnenen Rohbilirubine dürften ebenfalls chlorhaltig sein.

5. Aus reinem Bilirubin bildet sich unter der Einwirkung von Chloroform selbst unter Lichtabschluß ein grüner, in Eisessig löslicher Farbstoff in geringer Menge.

6. Beim Aufbewahren erleidet Bilirubin allmählich eine Veränderung, vielleicht eine Polymerisation. Diese Modifikation geht beim Umkrystallisieren aus Dimethylanilin in die erste, in Chloroform leichter lösliche über.

7. Bilirubin krystallisiert aus heißem Dimethylanilin entweder in schiefen, breiten Säulen oder in Kegelform; durch Umlösen aus Chloroform können beide Krystallarten in lange Nadeln oder Wetzsteine übergehen.

Das Material zu der vorliegenden Untersuchung habe ich mir mit Hilfe einer Unterstützung verschafft, die mir die K. Akademie der Wissenschaften zu Berlin gewährte, wofür ich auch an dieser Stelle meinen aufrichtigen Dank zum Ausdruck bringe.

Die weitere Untersuchung ist, wie schon erwähnt, in Angriff genommen, es wird nunmehr wohl leichter werden, Einblick in die verwickelten Verhältnisse zu bringen.

Stuttgart, am 16. Februar 1906.