

## **Beiträge zur Kenntnis der Gallenfarbstoffe.**

### **Über Bilirubin, Biliverdin und ihre Spaltungsprodukte.**

Von

**William Küster.**

(Aus dem chemischen Institut der K. tierärztl. Hochschule in Stuttgart.)

(Der Redaktion zugegangen am 1. Februar 1909.)

#### **Inhaltsverzeichnis.**

Einleitende Bemerkungen. — Experimenteller Teil. — A. Über die Aufarbeitung von Gallensteinen. — B. Löslichkeitsbestimmungen mit Bilirubin. — C. Bestimmung von Methylimidgruppen. — D. Über das Biliverdin. — E. Oxydation des Bilirubins in alkalischer Lösung. — F. Oxydation von Gallenfarbstoff durch Chromsäure.

In meiner letzten Mitteilung<sup>1)</sup> über die Gallenfarbstoffe beschrieb ich u. a. einige Beobachtungen, welche die Löslichkeit des Bilirubins betreffen. Es ergab sich namentlich, daß ein frisch aus Dimethylanilin umkrystallisiertes Präparat verhältnismäßig leicht in Chloroform lösliche Anteile enthält, die nach längerer Aufbewahrung verschwunden waren. Zur Kontrolle habe ich die diesbezüglichen Versuche durch Herrn Dr. Niethammer wiederholen lassen und meine ersten Beobachtungen bestätigt erhalten. Danach dürfte die Annahme, daß das Bilirubin in mehreren Modifikationen auftritt, zum mindesten in einer leicht und in einer schwer löslichen, von denen die erstere in die letztere allmählich übergeht, gerechtfertigt erscheinen. Da ferner aus der schwer löslichen Modifikation beim Umkrystallisieren aus siedendem Dimethylanilin die leichter lösliche entsteht, wobei die Temperatur eine Rolle spielt, denn der Gallenfarbstoff löste sich beim Behandeln mit Benzoesäureamylester erst bei 190° reichlich, bei 150—180° nur in Spuren, liegt der Gedanke an eine hierbei eintretende

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XLVII, S. 294.

Entpolymerisierung nahe, während sich der umgekehrte Vorgang bei niedrigerer Temperatur ganz allmählich vollzieht. Nun ist bereits nach den Untersuchungen Malys<sup>1)</sup> die aus der Analyse abgeleitete Formel  $C_{16}H_{18}O_3N_2$  zu verdoppeln, da er durch Bromierung ein Tribrombilirubin  $C_{32}H_{33}Br_3O_6N_4$ , durch Reduktion das Hydrobilirubin  $C_{32}H_{46}O_7N_4$  erhielt. Auch das höchst bromierte Derivat von Thudichum<sup>2)</sup> spricht für die Verdoppelung, da seine Analysen ganz gut auf die Formel  $C_{32}H_{39}Br_7O_6N_4$  stimmen. Endlich haben Orndorff und Teeple<sup>3)</sup> nicht nur Diazoderivate, sondern auch Monoazoderivate  $C_{32}H_{35}O_6N_4N_2R$  erhalten und mit dem Tribromdiazobenzolbilirubin Molekulargewichtsbestimmungen ausgeführt, die für die angegebene Größe der Molekel sprechen. Leider sind solche für das Bilirubin selbst noch nicht geglückt; wieviele der einfachen Molekeln demnach in den von mir angenommenen Modifikationen zusammengetreten sind, kann noch nicht angegeben werden. Für die Möglichkeit obiger Annahme spricht die chemische Natur des Bilirubins, das als ein Abkömmling des Pyrrols gleich diesem die Fähigkeit zur Polymerisation in sich birgt.

Nun erweist sich die Molekel  $C_{32}H_{35}O_6N_4$  als eine zwei-basische schwache<sup>4)</sup> Säure, zur Überführung in das wasserlösliche Kaliumsalz reichen z. B. zwei Molekeln Kalilauge aus, während mindestens vier Molekeln eines Carbonats oder von Ammoniak verwendet werden müssen; in Übereinstimmung damit steht, daß Staedeler<sup>5)</sup> sowie Köster<sup>6)</sup> ein Calciumsalz der

<sup>1)</sup> Liebigs Annal. der Chemie, Bd. CLXXXI, S. 113; Bd. CLXIII, S. 77.

<sup>2)</sup> Liebigs Annal. der Chemie, Bd. CLXXXI, S. 242.

<sup>3)</sup> Beiträge zur wissenschaftl. Medizin und Chemie. Salkowski-Festschrift (1904), S. 305.

<sup>4)</sup> Bei der Einwirkung von Natriumcarbonat wird z. B. kein Kohlendioxyd entwickelt, vielmehr bildet sich saures Natriumcarbonat, das bei der Dialyse in das Außenwasser tritt, ganz analog verhält sich Hämatin, beide Substanzen schließen sich somit den Aminosäuren an, die auch nicht vermögen, aus Soda  $CO_2$  frei zu machen.

<sup>5)</sup> Ann. der Chemie, Bd. CXXXII, S. 331. Staedeler beschreibt noch andere Salze, hat sie aber nicht analysiert.

<sup>6)</sup> Dissertation 1901, Rostock. C. Hinstorffs Buchdruckerei, S. 25.

Zusammensetzung  $C_{32}H_{34}CaO_6N_4$  darstellen konnten. Letzterer betont dabei mit Recht, daß dies nur unter Einhaltung bestimmter Bedingungen möglich ist, doch eignet sich nach meinen Erfahrungen eine ammoniakalische Lösung des Bilirubins, die Köster verwendet hat, wenig zur Darstellung der unlöslichen Salze. Denn Bilirubin ist eine Säure von viel zu schwachem Charakter, um mit Ammoniak ein in Lösung beständiges Salz zu geben, und so erscheint es nicht ausgeschlossen, daß sich dem ausfallenden Calciumsalz freies Bilirubin beimengt, das mit niedergerissen wird. Ähnliche Verhältnisse finden sich beim Hämatin, und hier ist es gelungen, die Bedingungen ausfindig zu machen, unter denen normal zusammengesetzte Salze entstehen, worüber nächstens berichtet werden soll. Beim Bilirubin erschwert die unter dem Einfluß des Luftsauerstoffs einsetzende Oxydation und die bei Verwendung von überschüssigem Alkali rasch erfolgende Zertrümmerung eines Teils des Farbstoffs das Arbeiten ungemein. Unsere Analysen lassen doch den Schluß zu, daß im Molekül des Bilirubins durch Calcium nur zwei, durch Silber aber vier Wasserstoffatome ersetzt werden können, im Gegensatz zum Hämatin, bei dem Erdalkalimetalle wie Silber nur zwei Wasserstoffatome vertreten. Von den sechs Sauerstoffatomen des Bilirubinmoleküls sind also höchst wahrscheinlich vier in Form von zwei chemisch verschieden gebundenen Paaren von Hydroxylgruppen vorhanden, oder das Silber vermag hier auch am Stickstoff haftenden Wasserstoff zu ersetzen.

Für die diskutierte Bilirubinformel  $C_{32}H_{36}O_6N_4$  konnten endlich auch die Werte herangezogen werden, die Orndorff und Teeple<sup>1)</sup> bei der Bestimmung von Methylimidgruppen erhielten und die für das Vorhandensein einer solchen Gruppe auf 32 Kohlenstoffatome sprechen. Diese Resultate konnten wir bestätigen, doch schließe ich mich dem Zweifel der genannten Forscher an der Beweiskräftigkeit der experimentell gefundenen Werte vorerst an und zwar einmal auf Grund der Beobachtung, daß bei der Zertrümmerung des Bilirubinmoleküls immer nur Ammoniak als flüchtiges basisches Produkt erhalten wurde, allerdings stets nur in einer Menge, welche dem vierten Teil

<sup>1)</sup> Americ. Chem. Journ., Bd. XXVI, S. 91.



des im verwendeten Bilirubin vorhandenen Stickstoffs entspricht, und dann namentlich auf Grund des von Kirpal<sup>1)</sup> geführten Nachweises, daß es bei Anwendung der Methode von Herzig und Meyer auch bei Körpern,<sup>2)</sup> die keine Methylimidgruppe vorgebildet enthalten, zur Abspaltung von Methyljodid kommen kann. Es wäre verfrüht, auf die in Betracht kommende Atomgruppierung im Bilirubin zu schließen, selbst wenn wir mit Köster<sup>3)</sup> einen Pyridinring in diesem Farbstoff annehmen.

Was die Umwandlung des Bilirubins in Biliverdin betrifft, das seit Maly als ein chemisches Individuum angesprochen zu werden pflegt, so führten unsere Untersuchungen zu dem Resultat, daß sich unter ganz bestimmten Bedingungen allerdings ein grüner, alkohollöslicher Farbstoff bildet, dem auf Grund der Elementaranalyse die Formel  $(C_{16}H_{18}O_4N_2)_x$  zukommt. Andererseits wurde festgestellt, daß Bilirubin unter dem Einfluß überschüssigen Alkalicarbonats bei Zutritt von atmosphärischem Sauerstoff schon bei niedrigerer Temperatur ( $10^{\circ}$ ) wenigstens teilweise völlig aufgespalten wird, so daß es neben braunen Produkten zur Bildung einer Reihe ätherlöslicher Säuren kommt, als deren Endglied die Hämatinsäure erscheint. Daneben treten grüne, amorphe Farbstoffe auf von wechselnder prozentischer Zusammensetzung: nur ein Teil derselben löste sich in Alkohol. Ein befriedigendes Resultat wurde hier wegen der großen Anzahl sich bildender Spaltprodukte, von denen jedes nur in geringer Menge entsteht, noch nicht erhalten.

Beim Erwärmen mit einer Lauge zerlegt sich Bilirubin rasch, unter den sich bildenden ätherlöslichen Säuren überwiegt bereits die Hämatinsäure, und setzt man der erhitzten alkalischen Lösung noch ein Oxydationsmittel, wenn auch nur in ganz geringer Menge hinzu — wir haben bei einem Versuch dieser Art nur ein Atom Sauerstoff in Form von Natrium-superoxyd auf eine Molekel Bilirubin zugeführt —, so werden

<sup>1)</sup> Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XLI, S. 819.

<sup>2)</sup> z. B. zerfällt Pyridinbetain  $H_5C_5N-CH_2$  durch HJ in  $H_5C_5N$ ,  $CO_2$  und  $CH_3J$ .

$$\begin{array}{c} | \quad | \\ O - CO \end{array}$$

<sup>3)</sup> Vgl. dessen Dissertation. S. 46—48.



nicht weniger als 40% des Gallenfarbstoffs in ätherlösliche Säuren übergeführt, wovon die Hälfte aus reiner Hämatisäure bestand. Daneben wurden Bernsteinsäure und eine komplexe Säure erhalten, die allem Anschein nach sehr leicht in die genannten Säuren zerfällt. Von flüchtigen Säuren konnte außer Kohlendioxyd nur Essigsäure, von flüchtigen Basen nur Ammoniak nachgewiesen werden. Danach zerfällt das Bilirubinmolekül in alkalischer Lösung sehr rasch und leicht, zum Unterschied vom Hämatin, das gerade unter diesen Bedingungen recht beständig ist.<sup>1)</sup> Aber auch in saurer Lösung wird der durch eine erste Oxydation aus dem Bilirubin erhaltene grüne Farbstoff durch Chromsäure rasch zerlegt. Bei meinen ersten Versuchen hatte ich dabei im besten Falle 25% ätherlösliche Rohsäuren erhalten, durch Änderung der Bedingungen konnten jetzt durch Herrn Niethammer bis zu 40% erzielt werden, und zwar waren es dieselben Säuren, welche auch bei der Oxydation in alkalischer Lösung entstehen. Es sind auch die gleichen, wie sie das Hämatin liefert, ihre Menge ist hier allerdings wesentlich größer.

Für die Ermittlung der Konstitution des Bilirubins scheint mir aber der leichte Zerfall, den der Farbstoff schon beim Erwärmen mit überschüssigem Alkali namentlich unter Zusatz einer kleinen Menge eines Oxydationsmittels erleidet, von Bedeutung werden zu können. Staedeler<sup>2)</sup> und Thudichum<sup>3)</sup> hatten bereits erkannt, daß das Bilirubin unter den erwähnten Bedingungen eine Umwandlung erleidet; sie haben sich aber beschränkt, auf die Änderung des Farbtones hinzuweisen, so mag ihre Beobachtung als minder wichtig erschienen und nicht in die Lehr- und Handbücher übergegangen sein, dagegen finden wir hier und da verzeichnet, daß ein gelber Farbstoff, das Choletelin Malys, das Endprodukt der Oxydation des Bilirubins sei, was den Anschein erweckt, als sei ein gefärbter Kern des Gallenfarbstoffmoleküls sehr widerstandsfähig. Das ist durchaus nicht der Fall, die Auflösung führt vielmehr rasch zu farblosen

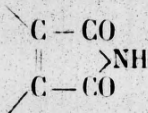
<sup>1)</sup> Vgl. Diese Zeitschrift, Bd. LV, S. 545, Anm.

<sup>2)</sup> Liebigs Annal. d. Chem., Bd. CXXXII, S. 330 u. 335.

<sup>3)</sup> Journ. f. prakt. Chem., Bd. CIV, S. 217.

Substanzen und als einziges wohlcharakterisiertes Produkt tritt uns hier die Hämaminsäure entgegen. Die soeben erwähnten Bedingungen für ihr Entstehen erinnern nun durchaus an diejenigen, unter denen sich aus dem Indigo die Anthranilsäure bildet. Zum Vergleich mit diesem Farbstoff drängen die Löslichkeitsverhältnisse,<sup>1)</sup> auch ist er schon von Staedeler<sup>2)</sup> mit dem Bilirubin in Parallele gestellt worden.

Seitdem nun durch Friedländer<sup>3)</sup> zahlreiche indigoide Farbstoffe bekannt geworden sind, nachdem schon vorher (Gabriel<sup>4)</sup> den Carbindigo entdeckt hatte, und dadurch der Indigo als Typus einer großen Klasse analog konstituierter Körper erscheint, seitdem namentlich die durch Kondensation von Isatin mit Pyrrol erhaltenen Farbstoffe von Liebermann<sup>5)</sup> in diese Klasse einbezogen werden, dürfte wenigstens die Diskussion der Frage, ob nicht auch das Bilirubin hier unterzubringen sei, ein erlaubtes Verfahren sein, zumal sie Unterlagen für weitere Versuche auf dem Gebiet der Gallenfarbstoffe zu geben verspricht. Denn die Atomgruppierung in der Hämaminsäure



<sup>1)</sup> L. Maillard, Comptes rendus. Bd. CXXXIV, S. 470, unterscheidet zwei Indigotine, eines davon ist in Chloroform leichter löslich, und spricht sie für polymere Körper an. Ferner wurden nach den Untersuchungen von Vaubel (Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXIX, S. 3587, und Chem. Zeitung, Bd. XXV, II, S. 725), sowie von Beckmann und Gabel (Ber., Bd. XXXIX, S. 2611) bei Molekulargewichtsbestimmungen in gefrierendem Toluidin Werte erhalten, die für eine Verdoppelung der gebräuchlichen Formel sprechen, während siedende Lösungsmittel das einfache Molekül enthalten.

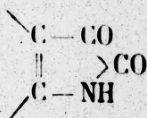
<sup>2)</sup> Die Entfärbung, welche die tiefrotbraune alkalische Lösung des Bilirubins unter dem Einfluß von Natriumamalgam erleidet, gibt ihm zu der Bemerkung Anlaß, daß der hierbei entstehende Körper wahrscheinlich in demselben Verhältnis zum Bilirubin steht wie das Indigweiß zum Indigblau (Ann., Bd. CXXXII, S. 334).

<sup>3)</sup> Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XLI, S. 772, und Sitzungsberichte d. K. Akad. d. Wiss. in Wien, Bd. CXVII, Abt. IIb.

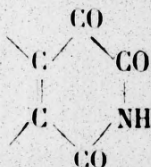
<sup>4)</sup> Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXIII, S. 996.

<sup>5)</sup> Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXVIII, S. 2847; Bd. XL, S. 2492.

darf vielleicht mit der im Isatin



und mit der im Phthalonsäureimid



verglichen werden, während sich der zweiten Komponente der Pyrrolblaus, dem Pyrrol, die Hämopyrrole zwanglos an die Seite setzen. Ja, in den Pyrrolblaus A und B<sup>1)</sup> haben wir Körper vor uns, die sich wie Bilirubin und Biliverdin um den Gehalt von einem Sauerstoffatom unterscheiden. Zahlreiche der indigoiden Farbstoffe Friedländers zerfallen endlich leicht unter dem Einfluß von Alkalien,<sup>2)</sup> ein Verhalten, wie es auch das Bilirubin zeigt, und ich hoffe, daß eine bessere Kenntnis der hierbei entstehenden mannigfachen Produkte weitere Analogien auffinden lassen wird, namentlich auch in Beziehung auf die Hämaminsäure, die sich wohl nicht als ein primäres, sondern als ein aus einer leicht veränderlichen Vorstufe hervorgehendes Spaltprodukt des Bilirubins erweisen wird.

### Experimenteller Teil.

#### A. Über die Aufarbeitung von Gallensteinen.

Ein Teil des zu den nachstehenden Versuchen benützten Bilirubins wurde aus 515 g getrockneten Gallensteinen vom Rind nach dem von mir in der letzten Arbeit bereits beschriebenen Verfahren hergestellt. Hierbei ergab sich durch die zunächst ausgeführte eintägige Extraktion mit Äther ein Verlust von 19,4 g = 3,77% des Pulvers; der Rest desselben (495,6 g) wurde auf zwei hohe Bechergläser von ca. 2 l Inhalt verteilt und so oft mit je 1 l heißen Wassers unter Umschwenken über-

<sup>1)</sup> C<sub>24</sub>H<sub>16</sub>O<sub>3</sub>N<sub>4</sub> und C<sub>24</sub>H<sub>16</sub>O<sub>2</sub>N<sub>4</sub>.

<sup>2)</sup> Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XLI, S. 1035.



gossen, bis die nach dem Absetzen durch dickes Filtrierpapier dekantierte Waschflüssigkeit nur noch schwach gefärbt erschien. (Die Auszüge hinterließen, auf dem Wasserbade zur Trockene verdampft, einen spröden, glänzenden, grünen Rückstand im Gewicht von 40 g = 7,76%) Die auf dem Filter gesammelte Masse wurde nun mit kochender 10%iger Essigsäure übergossen, wobei der Trichter solange verstopft blieb, bis eine merkbare Einwirkung nicht mehr stattfand;<sup>1)</sup> das Verfahren wurde wiederholt, bis eine Probe der ablaufenden Säure  $\text{Ca}^{++}$  oder  $\text{Mg}^{++}$  nicht mehr enthielt, was erst nach wochenlanger Behandlung der Fall war. Nachdem dann die Essigsäure durch Wasser verdrängt und das Pulver, erst auf Fließpapier, dann bei mäßiger Wärme getrocknet worden war, folgte eine zweite Extraktion der noch vorhandenen 370 g<sup>2)</sup> durch Äther,<sup>3)</sup> alsdann die erste Behandlung mit 96%igem kalten Alkohol. Dazu wurde das Pulver (356 g) auf 2 Flaschen verteilt, jede mit  $\frac{1}{2}$  l Alkohol beschickt und 2 Stunden geschüttelt. Nach völligem Absitzen wurde die tiefgrüne Lösung durch ein Kreppfilter von Dreverhoff abgossen, der Alkoholzusatz wiederholt und die Extraktion so lange fortgesetzt, bis nur noch ganz schwach gefärbte Filtrate erhalten wurden, was erst nach mehreren Wochen erreicht wurde. Hierbei wurden 16 g = 3,11% herausgelöst.<sup>4)</sup>

Die noch vorhandenen 340 g des Pulvers bestanden nach dem Trocknen bei 110° aus orangerot gefärbten feinen Teilen, die mit gröberem, dunkler gefärbtem untermischt waren. Zur Gewinnung des Choleprasins wurde nun wie folgt verfahren. Je 170 g des vorbehandelten Gallensteinpulvers wurden in ein großes Becherglas gebracht und mit je 5 l kochendem Eisessig unter Umrühren übergossen. Nach dem Absitzen, das in der

<sup>1)</sup> Das Pulver enthält Carbonate, auch tritt eine schwache Schwefelwasserstoffentwicklung auf.

<sup>2)</sup> Durch die Essigsäure waren also 85,6 g = 16,64% herausgelöst worden.

<sup>3)</sup> Der Äther hinterließ 14 g = 2,7% eines grünbraun gefärbten harzigen Rückstandes.

<sup>4)</sup> Über die Aufarbeitung dieser Fraktion vgl. S. 82.

Wärme stattfand, wurde die klare, intensiv grüne Lösung vorsichtig durch ein Kreppfilter abgossen,<sup>1)</sup> worauf die Behandlung mit Eisessig fortgesetzt wurde, und zwar waren 10 Extraktionen notwendig, alsdann färbte sich der Eisessig nur noch schwach an. Zur Entfernung der Essigsäure wurde dann das Pulver mit heißem Wasser 8 Tage lang ausgewaschen, das Wasser durch Alkohol verdrängt, dann auf Fließpapier, darauf bei 60<sup>02</sup>) getrocknet, worauf noch 260 g<sup>3)</sup> vorhanden waren. Es folgte jetzt eine dritte Extraktion mit Äther (Verlust 7,3 g) und dann eine zweite Behandlung mit Alkohol, die wie die erste durchgeführt wurde, bis nur noch Spuren grünen Farbstoffes abgegeben wurden: die Menge desselben betrug aber im ganzen nur 3,5 g.

Da ein kleiner Verlust an Material stattfand, lagen nach diesen vorbereitenden Operationen noch 240 g Gallensteinpulver vor, die nunmehr mit Ausnahme von 6 g<sup>1)</sup> durch Chloroform

1) Von den ersten Auszügen wurde der Eisessig zu  $\frac{5}{10}$ , von den letzten zu  $\frac{9}{10}$  unter vermindertem Druck abdestilliert und zu neuen Extraktionen verwendet. Der Rückstand wurde in die 10fache mit ein wenig Ammoniak versetzte Wassermenge eingetragen, wodurch das Choleprasin gefällt wird: der Zusatz des Elektrolyten ist zweckmäßig, da man sonst eine kolloidale Lösung des Farbstoffs erhält. Was die Menge des Choleprasins betrifft, so wurden 70 g = 13,6% des verwendeten Gallensteinpulvers erhalten. Die Untersuchung desselben hat leider aus Zeitmangel bisher nur wenig gefördert werden können; nur so viel steht fest, daß das Choleprasin, wie schon aus seinem auch hier wieder bestätigten Schwefelgehalt hervorgeht, aus dem Eiweiß stammt. Es ließ sich nämlich zeigen, daß bei der Einwirkung heißer Salzsäure neben viel Ammoniak ein Gemisch von Körpern abgespalten wird, die unverkennbar zu den Aminosäuren gehören, während der verbleibende Rest sehr widerstandsfähig ist.

2) Eine bei 110° getrocknete Portion hatte braune Färbung, die bei 60° getrockneten Anteile zeigten dunkelorange-rote Farbe.

3) Da nur 70 g Choleprasin erhalten wurden, ist ein Verlust von 10 g zu konstatieren, er rührt davon her, daß das Pulver noch Kalk enthielt, der erst durch die konzentrierte Essigsäure gelöst wurde und beim Eintragen in Wasser in Lösung blieb. Organische Substanz enthielten die Filtrate vom Choleprasin nur in Spuren. Vgl. auch die Anm. in Bd. XLVII, S. 298, dieser Zeitschrift.

1) Vgl. S. 73.

im Soxhlet bei Lichtabschluß extrahiert wurden,<sup>1)</sup> zunächst 8 Tage lang, dann wurde eine Portion von 40 g entsprechend 85,9 g des ursprünglichen Pulvers wiederum mit 10%iger Essigsäure behandelt und nach dem Auswaschen und Trocknen ein zweites Mal 8 Tage lang mit Chloroform extrahiert, worauf nach abermaliger Behandlung mit Essigsäure noch eine 3. Extraktion mit Chloroform folgte. Insgesamt waren durch die erste Extraktion 51,65 g Farbstoff herausgelöst worden = ca. 10% des in Arbeit genommenen Materials: die zweite lieferte noch 4,9 g, die dritte 1,85 g, das sind aber noch 5,7 resp. 2,16%, also sehr in Betracht kommende Mengen, da sich die Gesamtausbeute dadurch auf fast 18% an chloroformlöslichen Stoffen erhöht, eine Menge, die immer noch gegenüber der in anderen Fällen erhaltenen zurücksteht.<sup>2)</sup>

Dieselbe verteilt sich auf folgende vier Fraktionen.

Fraktion I. Ausbeute 8,9%,<sup>3)</sup> im Extraktionskolben in dunkelbraunen Krusten abgeschieden: unter dem Mikroskop betrachtet erwies sie sich als aus undeutlichen, zu Drusen vereinigten Krystallen bestehend, sie war asche- und chlorfrei. Analyse: 0,2493 g Substanz gaben 0,6128 g CO<sub>2</sub> und 0,1392 g H<sub>2</sub>O  
= 67,04% C und 6,25% H.

0,1496 g Substanz gaben 13,1 ccm N bei 20° und 738 mm B. = 9,91% N.

Fraktion II, Ausbeute 5,5%, wurde aus der von Fraktion I abfiltrierten Chloroformlösung dadurch gewonnen, daß das Lösungsmittel bis auf ein Viertel der ursprünglichen Menge abdestilliert wurde, worauf sich der Farbstoff im Laufe zweier Tage absetzte. Das anfangs schön rot gefärbte Präparat erwies sich unter dem Mikroskop als aus deutlich ausgebildeten schiefen Säulen bestehend, daneben waren Krystalltrümmer zu bemerken. Nach längerem Aufbewahren erschien das Präparat rotbraun.

<sup>1)</sup> Man benützt hierbei dieselben Hülsen wie bei den Ätherextraktionen, beschickt sie aber nur etwa zur Hälfte, vgl. Anm. 1. Bd. XLVII. S. 296. dieser Zeitschrift.

<sup>2)</sup> Das nach der Extraktion mit Chloroform verbleibende Pulver enthielt noch reichliche Mengen von Farbstoff; über Versuche, denselben zu gewinnen, werde ich später berichten.

<sup>3)</sup> Auf das ursprüngliche Gewicht des Pulvers bezogen.



Die Analyse ergab Spuren von Chlor und das Freisein von Aschebestandteilen.

0.128 g Substanz gaben 0.3143 g  $\text{CO}_2$  und 0.079 g  $\text{H}_2\text{O}$   
 = 66.97% C und 6.9% H.

0.182 g Substanz gaben 16,2 ccm N bei 18° und 740 mm B. = 10,12% N.

Fraktion III, Ausbeute 2,9%, wurde aus der Mutterlauge der vorigen Fraktion durch Alkohol gefällt: es war braunrot gefärbt, ganz undeutlich krystallisiert, enthielt 0,45% Chlor und 0,64% Asche.

0.1251 g Substanz = 0.1243 g aschefrei gaben 0.3003 g  $\text{CO}_2$  u. 0.0701 g  $\text{H}_2\text{O}$   
 = 65.89% C und 6.31% H.

0.1270 g Substanz = 0.1262 aschefrei gaben 10,3 ccm N bei 18° und 728 mm B. = 9.02% N.

0,1852 g Substanz gaben 0,0034 g  $\text{AgCl}$  = 0.45% Chlor.

Diese Fraktion entspricht, abgesehen von dem niedriger gefundenen Chlorgehalt, dem  $\beta$ -Bilirubin,<sup>1)</sup> in dem ich ein Bilirubin erblickte, das durch die lange Behandlung mit Chloroform eine teilweise Chlorierung erlitten hat.

Eine IV. Fraktion wurde nach Abdestillation des Chloroforms und des Alkohols erhalten, es hinterblieb dabei eine dunkelgrüne, harzige Masse, auf deren Analyse verzichtet wurde.

Aus den Analysen folgt in Übereinstimmung mit früheren Ergebnissen, daß das Rohbilirubin der Fraktionen I und II als fast rein anzusprechen ist.

| Berechnet für $(\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_3\text{N}_2)_2$ | Fraktion I | Fraktion II |
|--|------------|-------------|
| % C 67,13  | 67,04      | 66,97       |
| % H 6,29   | 6,25       | 6,9         |
| % N 9,79   | 9,91       | 10,12       |

Wie Seite 71 bemerkt, wurden 6 g des präparierten Gallensteinpulvers zurückbehalten: diese Menge wurde nun einer Extraktion mit Dimethylanilin unterworfen, indem sie in 31 g des vorher getrockneten und zum Sieden erhitzten Lösungsmittels eingetragen und 5 Minuten im Sieden erhalten wurde. Die Aufarbeitung der nach der Filtration erhaltenen Lösung schloß sich an die bereits mitgeteilten Angaben<sup>2)</sup> an (Nr. I). Die zu-

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XLVII, S. 298.

<sup>2)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XLVII, S. 310.

nächst nicht gelösten Anteile wurden darauf ein zweites Mal mit siedendem Dimethylanilin behandelt (Nr. II). Das Resultat war folgendes:

|  | Nr. I  | Nr. II |
|--|--------|--------|
| 1. Beim Erkalten des Dimethylanilins auskrystallisiert . . . . .         | 0,6 g  | 0,2 g  |
| 2. Nach Abdestillation von $\frac{3}{4}$ des Lösungsmittels . . . . .    | 0,25 „ | 0,04 „ |
| 3. Durch Alkohol gefällt . . . . .                                       | 0,2 „  | 0,02 „ |
| 4. Nach Abdestillation des Alkohols durch Salzsäure gefällt . . . . .    | 0,25 „ | 0,1 „  |
| 5. Durch Alkohol aus den Fraktionen beim Reinigen herausgelöst . . . . . | 0,15 „ | 0,05 „ |

Fraktion 1 stellte ein orangerotes, bald rotbraun werdendes Pulver vor, das durchaus in breiten, schief abgeschnittenen Säulen krystallisierte, es enthielt 0,5% Asche.

Analyse: 0,1146 g Substanz = 0,1140 g aschefrei gaben 0,2808 g  $\text{CO}_2$  und 0,0667 g  $\text{H}_2\text{O}$  = 67,18% C und 6,55% H.

0,1533 g Substanz = 0,1525 g aschefrei gaben 13,4 ccm N bei 17° und 727 mm B. = 9,75%

Die Fraktion 2 war ein rotbraunes Pulver, dessen Krystallformen denen der ersten Fraktion glichen, doch waren die Krystalle kleiner und mit vielen Trümmern untermischt; aus der Analyse geht hervor, daß es nicht vollständig gelungen war, das Dimethylanilin zu entfernen.

0,1020 g Substanz gaben 0,2528 g  $\text{CO}_2$  und 0,0601 g  $\text{H}_2\text{O}$   
= 67,59% C und 6,59% H.

0,0928 g Substanz gaben 8,2 ccm N bei 18° und 736 mm B. = 10,04% N.

Fraktion 3 gab bei der Analyse abweichende Werte, Fraktion 4 war eine grünbraune, harzige Masse, deren nähere Untersuchung unterblieb.

Was die Ausbeuten betrifft, so wurden 1,09 g krystallisiertes Bilirubin oder 8,4% des ursprünglichen Pulvers erhalten, da die verwendeten 6 g 12,9 g des letzteren entsprechen, gegenüber 14,4% an fast reinem Rohbilirubin bei der Extraktion mit Chloroform, wobei allerdings zu berücksichtigen ist, daß die Verluste bei der kleinen Menge im Verhältnis viel größer waren. Auch kommt in Betracht, daß beim Umkrystallisieren von Rohbilirubin aus siedendem Dimethylanilin immer ein Teil des Farbstoffes eine, wie es scheint, weitgehende Zersetzung erleidet. Bei früheren

Versuchen<sup>1)</sup> waren hierbei im besten Fall 60% des verwendeten Bilirubins in schönen Krystallen erhalten worden; Herrn Niethammer gelang es, jetzt fast 66% zu erreichen, dadurch, daß die bei der ersten Behandlung nicht gelösten Anteile ein zweites und drittes Mal mit Dimethylanilin ausgekocht wurden. In Arbeit genommen wurden hier 30 g eines früher von mir hergestellten Rohbilirubins,<sup>2)</sup> erübrigt<sup>3)</sup> wurden 17,25 g der ersten (1a), 2,35 g der zweiten Fraktion (2a), wovon 3,75 g resp. 0,55 g auf die späteren Auszüge fallen; Fraktion 1a bestand wieder aus großen rhombischen Säulen, Fraktion 2a aus kleineren, aber wohlgebildeten Krystallen, das Pulver von beiden hatte rotbraune Farbe.

## Analyse. Fraktion 1a.

|                       |                             |                          |                       |
|-----------------------|-----------------------------|--------------------------|-----------------------|
| 0,0652 g Subst. gaben | 0,1619 g CO <sub>2</sub> u. | 0,036 g H <sub>2</sub> O |                       |
| 0,158 „ „ „           | 0,3884 „ „ „                | 0,0903 „ „               | = 67,04% C u. 6,41% H |
| 0,1222 „ „ „          | 10 ccm N bei 11° und        | 744 mm B.                | = 9,77% N             |
| 0,1115 „ „ „          | 9,5 „ „ „                   | 12° „ 731 „ „            | = 9,55% „             |

## Fraktion 2a.

|                       |                             |                          |                      |
|-----------------------|-----------------------------|--------------------------|----------------------|
| 0,1564 g Subst. gaben | 0,3835 g CO <sub>2</sub> u. | 0,090 g H <sub>2</sub> O | = 66,9% C u. 6,46% H |
| 0,2073 „ „ „          | 0,5066 „ „ „                | 0,117 „ „                | = 66,89% „ „ 6,28% „ |
| 0,0815 „ „ „          | 6,6 ccm N bei 11° und       | 746 mm B.                | = 9,47% N            |
| 0,1032 „ „ „          | 8,2 „ „ „                   | 11° „ 745 „ „            | = 9,36% „            |

| Berechnet für (C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>3</sub> N <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> | 1.    | 2.    | 1a.   | 2a.   | 1a.   | 2a.  |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|------|
| % C   | 67,13 | 67,18 | 67,59 | 67,11 | 67,04 | 66,9 |
| % H   | 6,29  | 6,55  | 6,59  | 6,28  | 6,41  | 6,46 |
| % N   | 9,79  | 9,75  | 10,04 | 9,77  | 9,55  | 9,47 |

Sonach dürfte auch Fraktion 2a ein reines Bilirubin vorstellen, wenn auch für den Stickstoff etwas zu niedrige Werte gefunden wurden.

Fraktion 3 erwies sich als ein nicht ganz reines Bilirubin.

Fraktion 4, also der Teil, welcher vom Dimethylanilin erst durch Zusatz von Salzsäure abgetrennt wurde, mit dem Lösungsmittel also vielleicht ein Salz gebildet hatte, erwies sich als ein Gemisch, das zunächst durch Alkohol getrennt werden konnte. Der

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XLVII, S. 318 u. 320.

<sup>2)</sup> Die Analyse ergab: 66,5% C, 6,4% H, 9,3% N und 0,33% Cl. auch enthielt das Präparat fast 0,5% Asche.

<sup>3)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XLVII, S. 310.



hierin unlösliche Teil löste sich in Chloroform und bestand vielleicht aus nicht verändertem Bilirubin. Die konzentrierte alkoholische Lösung ließ auf Zusatz von Äther einen grünen Farbstoff fallen, der nach erschöpfender Extraktion mit Äther in wenig heißem Alkohol gelöst wurde und sich beim Erkalten dann zum Teil wieder abschied und zwar in fast krystallinisch erscheinenden Gebilden. Die Analysen dieses Teils harmonieren mit der für das Biliverdin üblichen Formel  $(C_{16}H_{18}O_4N_2)_x$

|  | C      | H     | N     |
|--|--------|-------|-------|
| Berechnet:   | 63,58% | 5,96% | 9,26% |
| 0.106 g Subst. gaben 0.2473 g CO <sub>2</sub> u. 0.0561 g H <sub>2</sub> O = | 63,63% | 5,92% | —     |
| 0.0895 „ „ „ 7.3 ccm N bei 12° u. 738 mm B. =                                |        |       | 9,49% |

und es ist ja denkbar, daß sich ein kleiner Teil des Bilirubins oxydiert hatte: eine genauere Untersuchung ließ die kleine Menge nicht zu.

Der auch in Äther lösliche Anteil enthielt zunächst noch grünen Farbstoff, der aber nach Aufnahme in Alkohol durch Fällung mit Äther und durch Wiederholung dieses Verfahrens völlig abgetrennt werden konnte.

Schließlich bestand der Ätherrückstand aus einem braungelben, in wässrigem Ammoniak löslichen Sirup, den kalte Sodalösung nicht aufnahm, doch erfolgte dann Lösung auf Zusatz von heißem Wasser, worauf das Filtrat beim Erkalten zu einer Gallerte erstarrte. Äther nahm daraus feste Substanz fort und hinterließ dann einen braungelben, auch in Chloroform und Petroleumbenzin löslichen Rückstand, der aus schollenförmig geschichteten Tafeln bestand.

Der Schmelzpunkt der übrigens stickstoffhaltigen, wachsartigen Masse lag bei 35–40°. Es muß einstweilen unentschieden bleiben, ob dieser Körper aus dem Bilirubin oder aus den noch anhaftenden Beimengungen entstanden ist. Jedenfalls dürfte aber ein nicht unerheblicher Teil des Bilirubins bei der hohen Temperatur des siedenden Dimethylanilins einen Zerfall erfahren, den genauer zu verfolgen sich doch lohnen würde. Die auch nach dreimaligem Auskochen mit dem genannten Lösungsmittel noch nicht gelösten Anteile enthielten nämlich zwar ebenfalls noch durch Chloroform extrahierbaren Farbstoff,

daneben aber einen weder hierin, noch in Alkohol oder Eisessig löslichen Körper mit sauren Eigenschaften. Er wurde nach der Aufnahme in Natronlauge durch Salzsäure gefällt und nach dem Trocknen als schwarze, glänzende, amorphe Masse erhalten, welche beim Erhitzen Dämpfe gab, die einen mit Salzsäure befeuchteten Fichtenspan intensiv röteten.

Zur Orientierung wurde das Präparat, dessen Gewicht 1,4 g betrug, analysiert: es enthielt 0,72% Asche.

0,0960 g aschefreie Substanz gaben 0,1910 g CO<sub>2</sub> und 0,051 g H<sub>2</sub>O  
= 54,26% C und 5,95% H.

0,1447 g aschefreie Substanz gaben 0,2883 g CO<sub>2</sub> und 0,0756 g H<sub>2</sub>O  
= 54,34% C und 5,86% H.

0,1687 g aschefreie Subst. gaben 13,3 ccm N bei 15° u. 729 mm B. = 8,85% N  
0,2355 „ „ „ 18,2 „ „ „ 15° „ 728 „ „ = 8,66% „

Diese Resultate harmonieren mit einer Formel C<sub>7</sub>H<sub>9</sub>O<sub>3</sub>N (ber.: 54,2% C, 5,8% H u. 9,0% N) merkwürdig gut, es bleibt natürlich abzuwarten, ob bei einer Wiederholung der Versuche sich Präparate von gleicher Zusammensetzung bilden werden, und ob die eingehende Untersuchung ergeben wird, daß es sich tatsächlich um ein Bruchstück des Bilirubins handelt, wie es den Anschein hat.

B. Die Versuche zur Bestimmung der Löslichkeit des aus Dimethylanilin umkrystallisierten Bilirubins werden in der früher<sup>1)</sup> beschriebenen Weise ausgeführt, und zwar immer zwei Versuche nebeneinander. Das Präparat kam zunächst sechs Wochen nach erfolgter Darstellung zur Untersuchung, die Temperatur betrug 12—13° C., stets wurde eine Stunde mit dem Chloroform geschüttelt.

|                |   |         |                    |            |                    |
|----------------|---|---------|--------------------|------------|--------------------|
| 1. Löslichkeit | ( | 1 : 332 | 13,08 g Chloroform | enthielten | 0,0393 g Bilirubin |
|                |   | 1 : 351 | 11,2 „ „           | „          | 0,0318 „ „         |
| 2. „           | ( | 1 : 679 | 14,96 „ „          | „          | 0,022 „ „          |
|                |   | 1 : 673 | 10,3 „ „           | „          | 0,0153 „ „         |
| 3. „           | ( | 1 : 743 | 11,16 „ „          | „          | 0,015 „ „          |
|                |   | 1 : 739 | 11,1 „ „           | „          | 0,015 „ „          |
| 4. „           | ( | 1 : 829 | 11,6 „ „           | „          | 0,014 „ „          |
|                |   | 1 : 820 | 13,95 „ „          | „          | 0,017 „ „          |

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XLVII, S. 313.

|                |           |                   |            |                   |
|----------------|-----------|-------------------|------------|-------------------|
| 5. Löslichkeit | { 1 : 873 | 16,6 g Chloroform | enthielten | 0,019 g Bilirubin |
|                | { 1 : 865 | 17,3              | »          | 0,020 »           |
| 6. „           | { 1 : 870 | 10,26             | »          | 0,0118 »          |
|                | { 1 : 874 | 14,0              | »          | 0,016 »           |

Mit 2,5 g desselben Präparates wurde dann eine zweite Versuchsreihe bei 19° C. ausgeführt, nachdem es weitere 8 Monate aufbewahrt worden war.

Hier wurde stets 3 Stunden lang geschüttelt.

|                |           |                   |            |                    |            |
|----------------|-----------|-------------------|------------|--------------------|------------|
| 1. Löslichkeit | { 1 : 693 | 12,3 g Chloroform | enthielten | 0,0178 g Bilirubin |            |
|                | { 1 : 693 | 15,5              | »          | 0,0224 »           |            |
| 2. „           | { 1 : 729 | 13,6              | »          | 0,0187 »           |            |
|                | { 1 : 727 | 16,4              | »          | 0,0226 »           |            |
| 3. „           | { 1 : 800 | 9,6               | »          | 0,012 »            |            |
|                | { 1 : 801 | 20,2              | »          | 0,0252 »           |            |
| 4. „           | { 1 : 821 | 13,4              | »          | 0,0163 »           |            |
|                | { 1 : 830 | 11,37             | »          | 0,0137 »           |            |
| 5. „           | { 1 : 794 | 8,57              | »          | 0,0108 »           | bei<br>22° |
|                | { 1 : 779 | 7,87              | »          | 0,0101 »           |            |
| 6. „           | { 1 : 827 | 13,25             | »          | 0,016 »            |            |
|                | { 1 : 825 | 18,74             | »          | 0,0227 »           |            |

In Übereinstimmung mit den früher erhaltenen Resultaten ist also auch hier die Anfangslöslichkeit des Präparats nach längerem Aufbewahren zurückgegangen, es müssen also die zunächst vorhandenen, in Chloroform leichter löslichen Anteile allmählich in die schwerer lösliche Modifikation übergegangen sein. Mit dieser Umwandlung geht zugleich eine Änderung in der Farbe vor sich, was namentlich an manchen der schön roten Präparate ersichtlich war, die bei der Extraktion des Gallensteinpulvers durch Chloroform zunächst in diesem gelöst blieben und erst nach Abdestillation eines Teils des Lösungsmittels ausfielen. Ihre Farbe schlug allmählich in braunrot um.

Die Deutung des Vorgangs wird dadurch etwas erschwert, daß lange Zeit aufbewahrtes Bilirubin manchmal an Eisessig einen grünen Farbstoff abgegeben hat, was wohl auf eine Oxydation zu Biliverdin zurückgeführt werden darf, die demnach schon das trockene Bilirubin ganz allmählich erleiden kann. Ich glaube allerdings nicht, daß die Löslichkeitsbestimmungen von diesen immer nur recht geringen, in Chloroform unlöslichen Beimengungen beeinflußt worden sind, und erblicke den Grund für



das Verschwinden der leichter löslichen Anteile in ihrer allmählich eintretenden Umwandlung in die schwerer lösliche Modifikation. Eine Änderung in der prozentischen Zusammensetzung ließ sich jedenfalls durch die Analyse nicht feststellen.<sup>1)</sup>

### C. Die Bestimmung von Methylimidgruppen im Bilirubin.

Da Orndorff und Teeple<sup>2)</sup> zwar die Abwesenheit von Methoxygruppen im Bilirubin festgestellt, bei der Bestimmung von Methylimidgruppen nach Herzig und Meyer aber ein wenn auch der Menge nach wechselndes positives Resultat erübrigt hatten, erschien eine Wiederholung dieser Versuche angezeigt. Herr Niethammer erhielt hierbei folgende Resultate:

a) Bilirubin aus Dimethylanilin umkrystallisiert

0,213 g Substanz gaben 0,090 g AgJ = 2,69% CH<sub>3</sub>.

b) Bilirubin aus Chloroform abgetrennt

0,3044 g Substanz gaben 0,1204 g AgJ = 2,53% CH<sub>3</sub>.

c) Biliverdin, dessen Analyse mit der Formel (C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>O<sub>4</sub>N<sub>2</sub>)<sub>x</sub> übereinstimmende Werte gab.

0,3804 g Substanz gaben 0,148 g AgJ = 2,49% CH<sub>3</sub>.

Im letzten Fall wurde das Jodsilber nach Behandlung mit Ammoniak, wonach 0,144 g ungelöst geblieben waren, in Chlorsilber übergeführt und hierdurch bewiesen, daß es rein war. Erhalten wurden 0,0882 g AgCl, berechnet 0,0879 g. An der Tatsache, daß Bilirubin durch die Behandlung mit Jodwasserstoff und Jodammonium bei 200—300° Jodmethyl abspaltet und zwar ein Molekül auf das Molekül C<sub>32</sub>H<sub>36</sub>O<sub>6</sub>N<sub>4</sub>, berechnet 2,62% CH<sub>3</sub>, kann wohl also nicht mehr gezweifelt werden, doch darf daraus, wie ich in der Einladung ausführte, noch nicht auf das Vorhandensein einer Methylimidgruppe geschlossen werden.

### D. Über das Biliverdin.

Der von Berzelius mit dem Namen Biliverdin bezeichnete Gallenfarbstoff wird seit den Untersuchungen von Maly<sup>3)</sup> und

<sup>1)</sup> Vgl. S. 84.

<sup>2)</sup> Americ. Chem. Journ., Bd. XXVI. S. 91.

<sup>3)</sup> Sitzungsber. d. K. Akad. d. Wiss. zu Wien. Bd. LVII, S. 95 (1868); Liebigs Ann. d. Chem., Bd. CLXXV, S. 84.

Thudichum<sup>1)</sup> als ein chemisches Individuum angesehen, dessen Zusammensetzung durch die Formel  $(C_{16}H_{18}O_4N_2)_x$  auszudrücken ist, und zwar soll es nach Maly durch Aufnahme eines Sauerstoffatoms glatt aus dem Bilirubin hervorgehen. Staedeler<sup>2)</sup> zieht auch eine Formel  $C_{16}H_{20}O_5N_2$  in Betracht<sup>3)</sup> und weist bereits darauf hin, daß längere Einwirkung von Alkalien den grünen Farbstoff in einen braun gefärbten Körper umwandelt. Eine ähnliche Beobachtung machte Thudichum.<sup>4)</sup> Meine ersten Versuche,<sup>5)</sup> aus krystallisiertem Bilirubin unter Anwendung von Bleisuperoxyd Biliverdin zu erhalten, ergaben nun zwar einen grünen alkohollöslichen Farbstoff, doch war seine Menge geringer als die des in Arbeit genommenen Bilirubins, und das Resultat der Analyse harmonierte nicht mit obiger Formel. Später habe ich dann auch die zweite der von Maly zur Gewinnung von Biliverdin angegebenen Methoden angewendet. Es betraf ein Bilirubin, das durchweg in rhombischen Säulen krystallisierte und, nach der Analyse zu urteilen, rein war.

0,1800 g Substanz gaben 0,449 g  $CO_2$  und 0,1085 g  $H_2O$   
 = 67,1% C und 6,66% H.

0,1836 g Substanz gaben 16,5 ccm N bei 13,5° und 735,8 mm B. = 10,25% N.

Die Lösung von 1 g dieses Präparats in  $\frac{1}{10}$  N. Natronlauge blieb in einer flachen Schale drei Wochen unter häufigem Umrühren stehen, dann wurde noch einen Tag lang Sauerstoff hindurchgeleitet. Der nun durch verdünnte Schwefelsäure abgeschiedene und nach dem Auswaschen durch Lösen in Alkohol

<sup>1)</sup> J. f. prakt. Chem., Bd. CIV, S. 218.

<sup>2)</sup> Liebigs Ann., Bd. CXXXII, S. 323.

<sup>3)</sup> Namentlich auf Grund einer Analyse von Heintz, Pogg. Ann., Bd. LXXXIV, S. 117, die 60,04% C, 5,84% H und 8,53% N ergeben hatte.

<sup>4)</sup> In Kalilauge, Natronlauge und Ammoniak ist das Biliverdin löslich. Wenn es lange in diesen Lösungen steht oder darin gekocht wird, so wird es bräunlich und der Niederschlag hat viel von seiner Löslichkeit in Alkohol verloren.

<sup>5)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XXVIII, S. 322. Der grüne Farbstoff, den ich direkt aus Gallensteinen durch einen Auszug mit Natronlauge herstellte und auch analysierte, ist ein Gemenge gewesen, in dem auch Choleprasin enthalten war, dessen Vorkommen in Gallensteinen ja erst 1905 von mir nachgewiesen wurde.

und Wiederausfällen durch Wasser gereinigte Farbstoff gab allerdings Zahlen, welche zur Formel  $C_{16}H_{18}O_4N_2$  stimmen:

0,1252 g Substanz gaben 0,2917 g  $CO_2$  und 0,0685 g  $H_2O$   
 = 63,54% C und 6,08% H.

doch war die Ausbeute wiederum nicht quantitativ.

Als ich dann fand, daß sich grüne alkohollösliche Farbstoffe auch bilden, wenn Bilirubin mit Alkohol und Salzsäure erwärmt wird, ferner wenn eine Lösung des Bilirubins in Chloroform langsam verdunstet und daß unter dem Einfluß des Chloroforms auch ein chlorhaltiges Produkt entstehen kann, als ich die Beobachtung machte, daß durch längere Einwirkung von Alkalien Ammoniak aus dem Bilirubin abgespalten wird und daß dabei gleichzeitig eine ätherlösliche Säure auftritt, erschien es mir im Zusammenhang mit der Tatsache, daß aus dem Bilirubin durch Oxydation mittels Chromsäure Hämatinsäure entsteht, gewagt, auf Grund einiger noch dazu nicht gut übereinstimmender Analysen<sup>1)</sup> einen amorphen Körper als chemisches Individuum anzusprechen. Ich habe daher Herrn Niethammer veranlaßt, weitere Versuche zur Gewinnung von Biliverdin anzustellen, und kann als Resultat derselben angeben, daß es in der Tat unter bestimmten Bedingungen gelingt, ein Biliverdin zu erhalten, d. h. einen grünen, alkohollöslichen, undeutlich krystallinischen Farbstoff, dessen Analysen auf eine Formel  $C_{16}H_{18}O_4N_2$  hinweisen. Diese Bedingungen sind, daß das Bilirubin in zwei Molekeln kaustischen Alkalis unter Zusatz von so viel Wasser, daß eine 0,2%ige Lösung vorliegt, gelöst bei einer Temperatur, die 5° C. nicht übersteigt, der Einwirkung des Luft-sauerstoffs ausgesetzt wird. Jeder Überschuß von Alkali, jede Erhöhung der Temperatur bewirkt eine weitergehende Zersetzung. Ferner scheint sich Biliverdin auch bei der Einwirkung von Alkohol und Salzsäure auf Bilirubin zu bilden und beim

|   |     |       |     |      |     |      |
|---|-----|-------|-----|------|-----|------|
| 1) Berechnet für $C_{16}H_{18}O_4N_2$ : | % C | 63,58 | % H | 5,96 | % N | 9,26 |
| Maly fand:                              |     | 63,74 |     | 5,97 |     | 8,77 |
|   |     |       |     | 6,04 |     | 8,74 |
|   |     | 63,82 |     | 5,80 |     | 9,35 |
| Thudichum fand:                         |     | 63,08 |     | 6,25 |     | 9,32 |
|   |     | 62,09 |     | 6,12 |     | 9,36 |
| Jolles fand:                            |     | 62,76 |     | 6,27 |     | 8,44 |



langsamen Verdunsten einer Lösung des Bilirubins in Chloroform, ferner beim Umkrystallisieren von Bilirubin aus Dimethylanilin, in allen Fällen dürfte der Luftsauerstoff die Oxydation bewirken, und das kann schließlich sogar beim Aufbewahren von trockenem Bilirubin geschehen, auch in den Gallensteinen kommt es wahrscheinlich vor.<sup>1)</sup> Allerdings gründet sich diese Annahme bisher immer nur auf die Elementaranalyse der betreffenden Präparate, zu einer eingehenden Untersuchung und zur Herstellung charakteristischer Verbindungen reichten die Mengen niemals aus.

a) Vorkommen von Biliverdin in Gallensteinen.

Bei der Aufarbeitung von Gallensteinen war nach der Behandlung mit Äther, heißem Wasser und verdünnter Essigsäure das Pulver wochenlang mit kaltem 96 % igen Alkohol extrahiert worden, wobei 16 g eines grün gefärbten, schon unter 100° schmelzenden Präparates nach dem Verdampfen des Alkohols zurückblieben.<sup>2)</sup> Die alkoholische Lösung dieses Rückstandes gab nun beim Eintragen in Äther einen Niederschlag, nach Wiederholung der Lösung und des Fällens und nach erschöpfender Extraktion mit Äther wurden endlich 3 g eines braungrünen unschmelzbaren Farbstoffs erhalten, während über 12 g eines Fettes in den Äther gegangen waren.<sup>3)</sup> Die 3 g wurden in wenig heißem Alkohol gelöst, beim Erkalten schieden sich dann 0,3 g eines undeutlich krystallinischen Farbstoffs ab, deren Analyse auf Biliverdin deutet.

0,0815 g Substanz (bei 60° getrocknet) gaben 0,1902 g CO<sub>2</sub> u. 0,0432 g H<sub>2</sub>O  
= 63,56 % C und 5,93 % H.

0,1278 g Substanz (bei 60° getrocknet) gaben 10,4 ccm N bei 11° und  
736 mm B. = 9,47 % N.

<sup>1)</sup> Damit gewinnt Malys Angabe, durch Einwirkung des Luftsauerstoffs aus einer Lösung von Bilirubin in Monochloressigsäure Biliverdin erhalten zu haben, an Wahrscheinlichkeit, analysiert hat er diese Präparate nicht.

<sup>2)</sup> Vgl. S. 70.

<sup>3)</sup> Da das Pulver bereits zweimal erschöpfend mit Äther behandelt worden war, ehe die Extraktion mit Alkohol erfolgte, dieser dann aber noch fettige Substanz herausnahm, ist man versucht, an eine nähere Verbindung der letzteren mit dem Farbstoff zu denken.

Die Mutterlaugen enthielten grünen Farbstoff, dessen Analyse abweichende Werte gab.

b) Die Bildung eines grünen Farbstoffs beim UmkrySTALLISIEREN von Bilirubin aus Dimethylanilin, der nach der Analyse zu urteilen Biliverdin sein könnte, wurde bereits Seite 76 beschrieben.

a) Bildung von Biliverdin beim Verdunsten einer Lösung von Bilirubin in Chloroform.

Mit Bilirubin gesättigtes Chloroform wurde bei Zimmertemperatur in einem lose durch Watte verschlossenen Kölbchen im zerstreuten Tageslicht der freiwilligen Verdunstung überlassen. Der Rückstand wurde mit reinem getrockneten Chloroform extrahiert, das Ungelöste in Eisessig aufgenommen und die unter vermindertem Druck stark konzentrierte Lösung in Wasser eingegossen. Der hierbei entstehende Niederschlag wurde filtriert, mit heißem Wasser ausgewaschen und bei 60° getrocknet. Es lagen vor 0,35 g eines chlorfreien, grünen Farbstoffs.<sup>1)</sup>

Analyse: 0,1426 g Substanz gaben 0,3313 g CO<sub>2</sub> und 0,0794 g H<sub>2</sub>O  
= 63,36% C und 6,24% H.

0,1782 g Substanz gaben 14,4 ccm N bei 12° und 740 mm B. = 9,42% N.

d) Bildung von Biliverdin bei der Einwirkung von Alkohol und Salzsäure auf Bilirubin.

1 g Bilirubin wurde mit je 250 ccm Alkohol + 1,1 g 25%iger Salzsäure 5mal je 8 Stunden lang erwärmt, die Lösung wurde jedesmal vom Ungelösten vorsichtig durch ein Filter abgossen und zum Schluß der nicht gelöste Teil auf dem Filter gesammelt, erst mit Alkohol nachgespült und dann mit heißem Wasser chlorfrei gewaschen.

Derselbe wog 0,5 g und bestand aus unverändertem Bilirubin.

<sup>1)</sup> Nach einer Beobachtung Thudichums (J. pr. Chem., Bd. CIV, S. 200) entstehen beim Einleiten von Chlorwasserstoff in eine Lösung von Bilirubin in Chloroform zwei grüne Farbstoffe, es ist nicht ausgeschlossen, daß es hierbei zur Abspaltung von Ammoniak aus dem Bilirubin kommt, wenigstens wurde eine solche Wirkung beim Erhitzen von Bilirubin mit Salzsäure unter Druck konstatiert, eine Reaktion, die demnächst weiter verfolgt werden soll.

Analyse: 0,2015 g Substanz gaben 0,4939 g  $\text{CO}_2$  und 0,1165 g  $\text{H}_2\text{O}$   
 = 66,85% C und 6,46% H.

0,1448 g Substanz gaben 12,3 ccm N bei  $12^\circ$  und 742 mm B. = 9,93% N.

Aus den Filtraten wurde der Alkohol zum größten Teil abdestilliert, der Rückstand in Wasser gegossen, der Niederschlag noch feucht wieder in Alkohol gelöst, die Lösung filtriert, aus dem Filtrat der Alkohol zum größten Teil abdestilliert, der Rest verdunstet, wobei 0,42 g grüner Farbstoff hinterblieben, der sich als chlorfrei erwies.

Analyse: 0,1844 g Substanz gaben 0,4300 g  $\text{CO}_2$  und 0,0978 g  $\text{H}_2\text{O}$   
 = 63,6% C und 5,93% H.

0,1536 g Substanz gaben 12,2 ccm N bei  $9^\circ$  und 741 mm B. = 9,37% N.

### e) Bildung von Biliverdin beim Aufbewahren von Bilirubin.

1 g eines  $\frac{3}{4}$  Jahre alten Präparates von krystallisiertem Bilirubin, das sich verfärbt hatte, wurde mit je 250 ccm 97% igen Alkohols fünfmal 8 Stunden am Rückflußkühler auf dem Wasserbade erhitzt. Der braun gefärbte Rückstand im Gewicht von 0,9 g bestand nach der Analyse aus unverändertem Bilirubin:

0,2103 g Substanz gaben 0,5186 g  $\text{CO}_2$  und 0,1230 g  $\text{H}_2\text{O}$   
 = 67,25% C und 6,54% H.

0,1368 g Substanz gaben 11,5 ccm N bei  $18^\circ$  und 744 mm B. = 9,65% N.

Aus den Filtraten wurde der Alkohol abdestilliert, der letzte Rest verdunstet, wonach 0,01 g eines grünen, in Eisessig und Alkalien löslichen Farbstoffs hinterblieben, in Äther und Chloroform löste er sich nicht. Es kann sich also auch hier um Biliverdin handeln.

Frisch umkrystallisiertes Bilirubin gibt an Alkohol, auch an siedenden, keinen Farbstoff ab.

### f) Bildung von Biliverdin unter dem Einfluß des Sauerstoffes.

a) 1 g aus Chloroform abgeschiedenes Bilirubin wurde in 35 ccm  $\frac{1}{10}$ -n-Kalilauge + 500 ccm Wasser gelöst,<sup>1)</sup> das sind 2 Moleküle Alkali auf eine Molekel  $\text{C}_{32}\text{H}_{36}\text{O}_6\text{N}_4$ , und die Lösung bei  $15-20^\circ$  C. drei Tage in einer Schale stehen gelassen.

<sup>1)</sup> Herr Niethammer gibt in seiner Dissertation « $\frac{1}{10}$ -n-Sodalösung» an: da es mir aber niemals gelungen ist, Bilirubin in der angegebenen Menge eines Carbonats zu lösen, glaube ich, daß es sich um eine irrthümliche Angabe handelt.



wobei täglich zweimal eine Stunde lang Sauerstoff eingeleitete wurde. Zum Ausfüllen waren nur 34,5 ccm  $\frac{1}{10}$ -n-Salzsäure nötig, das Filtrat des grünen Farbstoffs enthielt kein Ammoniak, auch keine organische Säure, die Ausbeute betrug 1,04 g eines chlorfreien, bei 60° C. getrockneten Farbstoffs. Zur Analyse wurde derselbe in einem Überschuß von heißem absoluten Alkohol gelöst, was restlos vor sich ging, der Alkohol unter vermindertem Druck zum größten Teil abdestilliert, der Rest in Wasser eingetragen, wonach noch 0,94 g Farbstoff erhalten wurden.

Analyse: 0,2076 g Substanz gaben 0,4833 g  $\text{CO}_2$  und 0,1121 g  $\text{H}_2\text{O}$   
= 63,49% C und 6,04% H.

0,1763 g Substanz gaben 0,4109 g  $\text{CO}_2$  und 0,0951 g  $\text{H}_2\text{O}$   
= 63,57% C und 6,03% H.

0,1199 g Substanz gaben 12,1 ccm N bei 12° und 746 mm B. = 9,49% N.

β) 0,5 g Bilirubin wurden in 17,5 ccm  $\frac{1}{10}$ -n-Kalilauge + 250 ccm Wasser gelöst und 40 Tage lang bei 2—5° C. der Einwirkung des Luftsauerstoffes ausgesetzt: zur Fällung genügten 17,25 ccm  $\frac{1}{10}$ -n-Salzsäure. Die Ausbeute betrug 0,5 g an grünem Farbstoff, Ammoniak oder organische Säure waren nicht abgespalten worden. Nach dem Umlösen aus Alkohol wurden 0,46 g Farbstoff wieder erhalten.

Analyse: 0,1684 g Substanz gaben 0,3909 g  $\text{CO}_2$  und 0,0914 g  $\text{H}_2\text{O}$   
= 63,31% C und 6,07% H.

0,1806 g Substanz gaben 14,4 ccm N bei 12° und 746 mm B. = 9,35% N.

|     | Berechnet für                                      |       | Gefunden |       |      |       |            |           |
|-----|--|-------|----------|-------|------|-------|------------|-----------|
|     | $(\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{O}_4\text{N}_2)$ |       | a        | b     | c    | d     | f $\alpha$ | f $\beta$ |
| % C | 63,58  | 63,56 | 63,63    | 63,36 | 63,6 | 63,49 | 63,57      | 63,31     |
| % H | 5,96   | 5,93  | 5,92     | 6,24  | 5,93 | 6,04  | 6,03       | 6,07      |
| % N | 9,26   | 9,47  | 9,49     | 9,42  | 9,37 | 9,49  |            | 9,35      |

Daß der Luftsauerstoff bei diesen Versuchen eine Rolle spielt und daß das Alkali nicht einwirkt, solange es nicht im Überschuß vorhanden ist und die Temperatur nicht erhöht wird, beweist der folgende Versuch:

1 g Bilirubin wurde in 35 ccm  $\frac{1}{10}$ -n-Kalilauge unter Zusatz von 500 ccm durch Auskochen luftfrei gemachten Wassers unter Durchleiten von Wasserstoff gelöst, worauf die Lösung in einem verschlossenen Kolben drei Wochen bei einer Temperatur von 2—5° C. stehen blieb. Ihre Farbe hatte sich nach dieser

Zeit nicht verändert, zur vollständigen Fällung des Farbstoffes waren 35 ccm  $\frac{1}{10}$ -n-Salzsäure erforderlich; der chlorfrei gewaschene Niederschlag wurde bei 60° C. getrocknet und erwies sich als unverändertes Bilirubin.

Analyse: 0,1338 g Substanz gaben 0,330 g  $\text{CO}_2$  und 0,0782 g  $\text{H}_2\text{O}$   
 = 67,26% C und 6,54% H.

0,1578 g Substanz gaben 13,4 ccm N bei 11° und 745 mm B. = 10,0% N.

Während also unter den beschriebenen Bedingungen Bilirubin in der Tat nur Sauerstoff aufnehmen dürfte und die Ausbeuten an Biliverdin den berechneten fast gleichkommen, tritt mit Erhöhung der Temperatur sowohl wie durch Vermehrung des Alkalis eine weitergehende Umwandlung des Bilirubins ein, zunächst sind die Ausbeuten an grünem Farbstoff geringer.

1. 1 g Bilirubin wurde in 70 ccm  $\frac{1}{10}$ -n-KOH + 500 ccm Wasser gelöst (4 Molekeln KOH auf 1 Mol.  $\text{C}_{32}\text{H}_{36}\text{O}_6\text{N}_4$ ), die Lösung blieb 30 Tage bei 2—10° C. stehen. Ausbeute 0,85 g grüner Farbstoff.

2. 1 g Bilirubin wurde in 35 ccm  $\frac{1}{10}$ -n-KOH + 500 ccm Wasser gelöst, die Lösung blieb 8 Tage bei 22—26° C. stehen. Ausbeute 0,75 g grüner Farbstoff.

3. 1 g Bilirubin wurde in 35 ccm  $\frac{1}{10}$ -n-KOH + 500 ccm Wasser gelöst, die Lösung wurde 10 Stunden auf 85° C. erwärmt, zum Füllen des Farbstoffes waren nur 30 ccm  $\frac{1}{10}$ -n-HCl nötig. Ausbeute 0,65 g grünbrauner Farbstoff.

4. 1 g Bilirubin wurde in 35 ccm n-KOH + 500 ccm Wasser gelöst, die Lösung blieb 20 Tage bei 2—5° C. stehen, zum Füllen des Farbstoffes waren nur 30 ccm n-HCl nötig. Ausbeute 0,54 g.

5. Die Versuchsbedingungen waren die gleichen wie beim 4. Versuch, nur dauerte die Einwirkung 30 Tage. Ausbeute 0,48 g.

Die braun gefärbten Filtrate enthielten bei allen Versuchen Ammoniak, außerdem organische Substanz, auch solche von saurer Natur, die sich in Essigester löslich erwies und ein sehr leicht zersetzliches Silbersalz gab; dementsprechend wurde trotz des abgespaltenen Ammoniaks weniger Säure zur Fällung des noch vorhandenen Farbstoffs gebraucht, als Lauge vorhanden war.

Die erhaltenen grünen Farbstoffe waren nur zum Teil in

Alkohol löslich und die löslichen Teile wurden nicht vollständig durch Wasser gefällt, so daß die Filtrate auch hier mehr oder weniger braun gefärbt waren.

Die Analysen der alkohollöslichen, aber in Wasser nicht löslichen Anteile gaben Werte, die mit der Formel des Biliverdins keine Übereinstimmung zeigten, wahrscheinlich ist, daß unter den angegebenen Bedingungen, die ja sehr voneinander abweichen, auch verschiedene Körper entstanden sind, doch mag die konzentrierte Lauge wie die hohe Temperatur insofern die gleiche Wirkung gehabt haben, als es zur Abspaltung von Stickstoff kam, das in der Tat nachgewiesene Ammoniak dürfte also nicht nur aus den gänzlich zerfallenen Bilirubinmolekeln stammen, sondern auch noch aus den im übrigen intakt gebliebenen.

0,1685 g Substanz gaben 0,395 g  $\text{CO}_2$  und 0,105 g  $\text{H}_2\text{O}$   
 = 63,93% C und 6,98% H.

0,1065 g Substanz gaben 8,4 ccm N bei 24° und 748 mm B. = 8,7% N  
 0,1335 „ „ 10,5 „ „ 23° „ 743 „ „ = 8,7% „  
 0,1310 „ „ 10,0 „ „ 21° „ 748 „ „ = 8,55% „

E. Die Oxydation des Bilirubins in alkalischer Lösung war von mir bisher nur zur Herstellung des grünen Gallenfarbstoffs ausgeführt worden: aus den hierbei gemachten Erfahrungen konnte bereits geschlossen werden, daß eine Aufspaltung des Bilirubins leichter als in saurer Lösung erfolgen würde,<sup>1)</sup> auch sei schon hier erwähnt, daß nach nur kurzer Einwirkung von Bleisuperoxyd aus dem Filtrat des grünen Gallenfarbstoffs eine ätherlösliche Substanz saurer Natur extrahiert werden konnte, sobald das Bilirubin in einem Überschuß von Alkali gelöst worden war.<sup>2)</sup> Ein erster Versuch zeigte denn auch, daß lediglich durch Erhitzen von Bilirubin mit überschüssigem Alkali Hämatinsäure abgespalten wird, allerdings nur in geringer Menge, und daß der jetzt noch vorhandene wasserunlösliche Teil, er betrug 75% des verwendeten Bilirubins, bei erneuter Einwirkung von Alkali keine ätherlösliche Säure mehr gab.

Die Lösung von 10 g Bilirubin in 350 ccm N Kalilauge

<sup>1)</sup> Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXV, S. 1272.

<sup>2)</sup> Vgl. S. 91 die Anmerkung.



das sind 5 Molekeln auf 1 Molekel  $C_{32}H_{36}O_6N_4$  — und 5 Liter Wasser blieb zunächst 20 Tage bei niederer Temperatur stehen, worauf sie zweimal 12 Stunden lang unter Ersatz des verdampfenden Wassers auf dem Wasserbade erwärmt wurde. Nach dem Erkalten wurde dann durch Salzsäure gefällt, wobei nur 300 ccm n-HCl nötig waren; der grüne Farbstoff abfiltriert — seine Menge betrug nach dem Trocknen bei  $60^\circ$  7,5 g — und das grün gefärbte Filtrat erschöpfend ausgeäthert, wodurch ca. 1 g einer sirupösen Masse erhalten wurde, aus der nach Abtrennung von 0,4 g Harz über das Kalksalz 0,5 g Hämaminsäure isoliert wurden.

Analyse des Kalksalzes: 0,0899 g Substanz gaben 0,0627 g  $CaSO_4 = 20,55\%$  Ca.

Durch Ausäthern in einem Extraktionsapparat und Ausschütteln mit Essigester wurden weitere 0,3 resp. 0,5 g saure Spaltungsprodukte erhalten, aus denen indessen charakterisierbare Körper nicht zu gewinnen waren.

Nachdem dann der grüne Farbstoff (7,5 g) aufs neue und zwar in konzentrierter Lauge (19,6 g KOH + 300 ccm Wasser) gelöst und die Lösung 24 Stunden in einer Druckflasche erhitzt worden war, konnten durch Salzsäure noch 6,9 g eines wasserunlöslichen Produkts gefällt werden, wobei sich Kohlendioxyd augenscheinlich in größerer Menge entwickelte, als in der verwendeten Lauge enthalten sein konnte, die wässrige Lösung enthielt Ammoniak, aber keine wägbaren Mengen organischer Säure. Auch die Ammoniakmenge war gering; erst beim nochmaligen Erhitzen der alkalischen Lösung des wasserunlöslichen Produkts auf  $240^\circ$  wurden bedeutendere Mengen entsprechend 3,9 ccm  $\frac{1}{10}$ -n- $NH_3$  abgespalten. Daß nur diese Base vorlag, bestätigte die Analyse der Platinchloridverbindung ihres salzsauren Salzes: 0,0635 g gaben 0,0277 g Pt = 43,63% Pt. Kohlendioxyd war hier das Hauptprodukt der Spaltung, Oxalsäure wurde in geringer (0,2 g), Bernsteinsäure in etwas größerer (0,6 g) Menge isoliert, qualitativ konnte auch Essigsäure nachgewiesen werden.

Weit glatter verläuft die Aufspaltung des Bilirubins, sobald eine geringe Menge eines Oxydationsmittels von vornherein

zugefügt wird. 10 g Bilirubin wurden in 200 g 5%iger Natronlauge gelöst, die Lösung in eine Druckflasche übergeführt und nach Zusatz von 2 g Natriumsuperoxyd, welche Menge nur einem Atom Sauerstoff auf die Molekel Bilirubin entspricht, 8 Tage bei Zimmertemperatur stehen gelassen, dann 5 Tage lang je 12 Stunden im Wasserbade erwärmt. Wie die Aufarbeitung zeigte, waren nun 80% des Bilirubins in wasserlösliche Produkte übergeführt worden, isoliert wurden Ammoniak, Kohlendioxyd, Essigsäure, Hämatinsäure und Bernsteinsäure.

Die Menge des aus der alkalischen Lösung abgeblasenen Ammoniaks betrug 0,2543 g, da 3,32 g Platinsalmiak erhalten wurden, was etwa dem vierten Teile des im verwendeten Bilirubin vorhandenen Stickstoffs entspricht.

Analyse: 0,158 g Substanz gaben 0,070 g = 44,3% Pt.

Die während des Ansäuerns der alkalischen Lösung dann mit Wasserdämpfen verflüchtigten Säuren wurden in Barytwasser aufgefangen, wobei außer Baryumcarbonat 1,3 g eines wasserlöslichen Salzes erhalten wurden, aus dem dann das Silbersalz dargestellt wurde. Durch Umkrystallisieren des letzteren aus heißem Wasser ergaben sich 0,4 g einer ersten aus glänzenden Krystallblättchen bestehenden Fraktion.

Analyse: 0,2462 g Substanz im Vakuum, dann bei 60° getrocknet, gaben  
0,2106 g Ag.

Berechnet für  $\text{CH}_3\text{COOAg}$ :

% Ag 64,6

Gefunden:

64,4

Die Mutterlaugen zersetzten sich rasch unter Braunfärbung, in ihnen dürfte daher vielleicht Ameisensäure enthalten sein.

Die von den flüchtigen Säuren befreite und von einem wasserunlöslichen Produkt im Gewicht von 2 g abgetrennte saure Lösung gab nun an Äther im ganzen 3,9 g Rohsäure ab, bei deren Reinigung neben 1,1 g Harz 1,9 g Hämatinsäure  $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_5$  (Schmelzpunkt 96—97°) und 0,6 g Bernsteinsäure (Schmelzpunkt 182°) isoliert wurden. Das Kalksalz der ersteren wurde analysiert:

0,2482 g Substanz gaben 0,1728 g  $\text{CaSO}_4$  = 20,52% Ca

0,2116 „ „ „ 0,1479 „ „ = 20,59% „

In geringer Menge war auch eine Säure gebildet worden,

deren wässrige Lösung beim Behandeln mit frisch gefälltem basischen Kupfercarbonat ein lösliches Kupfersalz gab; daß diese Säure leicht in Hämatinsäure und Bernsteinsäure zerfällt, wird im nächsten Abschnitt erörtert werden.<sup>1)</sup>

Das erwähnte wasserunlösliche Produkt im Gewicht von 2 g zerfiel endlich bei erneuter Behandlung mit Alkali bei 150° C. im Rohr unter Zusatz von 0,2 g Natriumsuperoxyd bis auf 0,5 g in wasserlösliche Körper, aus denen noch 0,19 g Hämatinsäure, 0,1 g Bernsteinsäure und ca. 0,6 g der komplexen Säure isoliert wurden. Eine Abspaltung von Ammoniak war jetzt nicht mehr eingetreten.

#### F. Die Oxydation von Gallenfarbstoff durch Chromsäure.

Meine ersten Versuche, durch Oxydation des Gallenfarbstoffs Aufklärung über seine Konstitution zu schaffen, waren mit 36 g nicht gereinigten Bilirubins ausgeführt worden, später hatte ich 5 g krystallisiertes Bilirubin und endlich 136 g eines Gemisches verarbeitet, das durch Natronlauge einem schon der Hauptmenge des Bilirubins beraubten Gallensteinpulvers entzogen worden war.<sup>2)</sup>

In letzterem mußte nach den später gemachten Erfahrungen auch Choleprasin enthalten sein, das ja bei der Oxydation keine Hämatinsäure gibt, trotzdem betrug die Ausbeute 20% ätherlösliche Rohsäure, aus der reichliche Mengen von Hämatinsäure erhalten wurden, während das reine Bilirubin auch nur 25% der rohen Säure ergeben hatte. Demnach lag die Vermutung nahe, daß es durch Änderung der Bedingungen gelingen würde, auch aus dem Bilirubin größere Mengen von Hämatinsäure herauszulösen, wie es beim Hämatin bereits gezeigt werden konnte.<sup>3)</sup>

Bisher waren dem in Eisessig gelösten grünen Gallenfarbstoff, der durch eine vorbereitende Oxydation in alkalischer Lösung aus dem roten dargestellt worden war, 12 Atome Sauer-

<sup>1)</sup> Vgl. S. 94.

<sup>2)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XXVI, S. 314.

<sup>3)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. LIV, S. 398.



stoff auf eine Molekel  $C_{32}H_{36}O_8N_4$  bezogen, in Form von Natriumdichromat zugeführt worden. Bei den neuen Versuchen wurde Chromtrioxyd verwendet und zunächst einmal die Menge des Oxydationsmittels festgestellt, welche überhaupt aufgenommen werden konnte. Es zeigte sich, daß bei Zufuhr von 21 Atomen Sauerstoff<sup>1)</sup> Chromsäure unverbraucht blieb, während der Gallenfarbstoff völlig zerlegt wurde, so daß wasserunlösliche Spaltprodukte nicht mehr vorhanden waren.<sup>2)</sup> Die Menge der ätherlöslichen Rohsäure betrug bei Verwendung von 5 g Bilirubin 1,35 g, d. h. ca. 27<sup>0</sup>/<sub>100</sub>; sie bestand zum großen Teil aus Bernsteinsäure, daneben war Hämaminsäure, aber keine Oxalsäure vorhanden.

Ein zweiter Versuch, wieder mit 5 g Bilirubin ausgeführt, lehrte, daß unter den angegebenen Bedingungen 16 Atome Sauerstoff (8,8 g  $CrO_3$ ) nicht aufgebraucht wurden und doch völlige Zertrümmerung des Farbstoffes bis zu wasserlöslichen Produkten stattfand. Hier wurden 0,5 g Rohhämaminsäure und ca. 0,3 g Bernsteinsäure durch Äther extrahiert, dann aber

<sup>1)</sup> Dabei ist zu bemerken, daß der grüne Farbstoff durch Eintragen von überschüssigem Bleisuperoxyd in eine alkalische Bilirubinlösung hergestellt wurde und daß hierbei die Oxydation über das Biliverdin hinausgegangen sein konnte. Denn auch Bleisuperoxyd führt, wie ein besonderer Versuch erwies, wenigstens bei längerer Einwirkung eine völlige Aufspaltung des Bilirubins herbei, wobei ebenfalls Hämaminsäure entsteht. Im vorliegenden Versuch dauerte allerdings die Einwirkung des Bleisuperoxyds nur solange, bis der Farbenumschlag gerade erfolgt war, d. h. etwa 5 Minuten; verwendet wurden 20 g Bleisuperoxyd auf 5 g Bilirubin, gelöst in 500 ccm 0,4<sup>0</sup>/<sub>100</sub>iger Natronlauge. Doch gab jetzt schon das Filtrat des durch Essigsäure gefällten Farbstoffes an Äther neben Essigsäure 0,7 g eines braunen Harzes ab, das die Pyrrolreaktion gab. Bemerkenswert ist, daß bei Verwendung von 500 ccm einer nur 0,14<sup>0</sup>/<sub>100</sub>igen Natronlauge, was zwei Molekeln NaOH auf eine Molekel  $C_{32}H_{36}O_8N_4$  entspricht, der Farbenumschlag viel länger, etwa  $\frac{1}{2}$  Stunde, auf sich warten ließ.

<sup>2)</sup> Der grüne Farbstoff wurde in feuchtem Zustande in 120 ccm Eisessig gelöst, die Lösung auf 50<sup>0</sup> erwärmt und dann 11,6 g  $CrO_3$  in 30 ccm Eisessig gelöst auf einmal zugegeben,  $\frac{1}{4}$  Stunde auf dem Wasserbade erhitzt, dann die Essigsäure unter vermindertem Druck abdestilliert und der Rückstand in Wasser aufgenommen, wobei keine Abscheidung zu bemerken war.

konnte durch Essigester noch 1 g eines Säuregemisches herausgelöst werden, das, unter dem Mikroskop betrachtet, fächerartig vereinigte Blättchen in Sirup eingebettet zeigte. Die wässrige Lösung desselben gab an Chloroform Hämaminsäure, darauf an Äther eine anfangs sirupöse Substanz, endlich an Essigester Bernsteinsäure ab (Schmelzpunkt  $182^{\circ}$ ). Erstere wurde wieder durch ihr charakteristisches Kalksalz gereinigt, wovon 0,2 g erhalten wurden: 0,110 g gaben  $0,075 \text{ g CaSO}_4 = 20,14\% \text{ Ca}$ .

Der Sirup (0,4 g) war nach mehrtägigem Stehen mit zahlreichen der soeben beschriebenen Krystalle durchsetzt, die nun durch Aufstreichen auf Ton und Nachwaschen mit Äther von der Mutterlauge getrennt werden konnten. Sie bräunten sich beim Erhitzen im Kapillarrohr bei  $180^{\circ}$  und zersetzten sich bei  $240\text{--}250^{\circ}$  unter lebhafter Gasentwicklung. Zu einer Analyse reichte die Menge nicht aus.

Bei einem dritten Versuch gelangten nur 6,23 g  $\text{CrO}_3$  auf 5 g Bilirubin zur Einwirkung, was etwa 11 Atomen Sauerstoff auf die Farbstoffmolekel entspricht: sie wurden völlig aufgebraucht und bei der Aufarbeitung wurden neben 1 g eines wasserunlöslichen Spaltproduktes 1,6 g Rohhämaminsäure und ca. 0,3 g Bernsteinsäure erhalten.

Ähnliche Resultate ergaben sich bei Verwendung von 10 Atomen Sauerstoff, doch blieb die Ausbeute an Rohsäure etwas zurück, so daß die weiteren Versuche mit 12 Atomen Sauerstoff angestellt wurden mit dem Unterschied, daß nicht  $\frac{1}{4}$  Stunde, sondern 2—3 Stunden auf dem Wasserbade erwärmt wurde, wobei denn auch die Menge des abgespaltenen Kohlendioxyds zur Bestimmung kam,<sup>1)</sup> sie erwies sich stets als gering und betrug höchstens  $\frac{1}{64}$  des im verwendeten Bilirubin vorhandenen Kohlenstoffs.

Dann wurde auch die Ammoniakabspaltung quantitativ verfolgt und wiederum gefunden, daß etwa  $\frac{1}{4}$  des Bilirubinstickstoffs als solches auftritt, welches Resultat sowohl mit den früher<sup>2)</sup> ermittelten wie mit dem bei der Oxydation in alkalischer Lösung erhaltenen übereinstimmt. Daß nur Ammoniak vorlag,

<sup>1)</sup> Vgl. die Versuchsanordnung, Diese Zeitschrift, Bd. XXVI, S. 323.

<sup>2)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XXVI, S. 326.

bewies wiederum die Analyse der Platinchloridverbindung der mit Salzsäure neutralisierten flüchtigen Base:

0,1137 g Substanz gaben 0,0508 g = 43,8% Pt.

Die Ausbeuten an ätherlöslicher Rohsäure betragen bei 2 Versuchen 1,8 resp. 1,5 g, bei 3 weiteren aber nur 0,85 — 0,85 — 0,95 g. Hier war nun die Menge des nach Vertreibung der Essigsäure sich ausscheidenden chromhaltigen wasserunlöslichen Produkts eine ganz bedeutende, nämlich 6,1 — 5,7 — 4,1 g, und es konnten aus demselben noch 0,59 — 0,9 — 0,75 g ätherlösliche Säure gewonnen werden, nachdem es 5 Stunden lang mit einem Überschuß 20%iger Schwefelsäure auf dem Wasserbade erwärmt worden war. Danach erreichte die Menge der Rohsäure fast überall 36% des verwendeten Bilirubins. Rechnet man noch die Säure hinzu, welche nach der Extraktion mit Äther durch Essigester extrahiert wurde, so steigen die Ausbeuten an sauren Spaltprodukten auf ca. 40% des Bilirubins.

Die Reinigung der vorliegenden Rohsäuren schloß sich im allgemeinen an die früher beschriebenen Methoden an.<sup>1)</sup> Es zeigte sich dabei, daß das Imid der Hämatisäure nicht vorhanden war.<sup>2)</sup> Aus 9,57 g leicht in Äther löslicher Rohsäure wurden ca. 6 g reines Anhydrid  $C_8H_8O_5$  (Schmelzpunkt 97°) erhalten.

Analyse: 0,214 g Substanz gaben 0,4101 g  $CO_2$  und 0,0843 g  $H_2O$

Berechnet für  $C_8H_8O_5$ :

% C 52,16

% H 4,38

Gefunden:

52,26

4,4

0,2212 g Kalksalz gaben 0,1514 g  $CaSO_4$  = 20,53% Ca.

In den Mutterlaugen steckte noch ziemlich viel Hämatisäure, daneben war die schwer in Äther lösliche Säure vorhanden, die beim zweiten Versuch in größerer Menge entstanden war. Sie wurde erkannt an der Krystallform: «fächerartig gruppierte Blättchen» und an dem Verhalten beim Erhitzen:

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XXVIII, S. 22; Liebigs Ann. d. Chem., Bd. CCCXV, S. 186.

<sup>2)</sup> Danach geht man wohl nicht fehl mit der Annahme, daß das aufgefunden Ammoniak aus primär gebildeter Hämatisäure  $C_8H_8O_4N$  stammt.



• Bräunung bei 180°, Zersetzung bei 240–250°, eine Trennung von Hämatinsäure und Bernsteinsäure konnte endlich dadurch angebahnt werden, daß sie sich mit basischem Kupfercarbonat zu einem wasserlöslichen, die Lösung gelbgrün färbenden Kupfersalz umsetzte. Die Gesamtmenge des aus dieser Lösung durch Alkohol gefällten Kupfersalzes wurde zu einer Kupferbestimmung verwendet:

0,1475 g Substanz gaben 0,0570 g CuO = 30,88% Cu.

Bei dem Versuch, die Säure wiederzugewinnen, wurde aber statt ihrer leicht in Äther lösliche Hämatinsäure und Bernsteinsäure erhalten, so daß es den Anschein hat, als ob in der neuen Säure, die übrigens auch unter den Spaltprodukten des Hämatins zu finden war, eine Kombination der erwähnten Säuren vorliegt, welche durch Hydrolyse leicht in die beiden Bestandteile zerfällt.

Die schwer in Äther löslichen Rohsäuren (6,3 g) enthielten ebenfalls größere Menge von Hämatinsäure, isoliert wurden 2,8 g, daneben Bernsteinsäure und wiederum die komplexe Säure, von der hier 0,270 g des Kupfersalzes erhalten wurden.

0,1264 g desselben gaben 0,0489 g CuO = 30,91% Cu.

Es wurden nun daraus 0,09 g Hämatinsäure und 0,06 g Bernsteinsäure gewonnen, was ungefähr dem Verhältnis der Molekulargewichte beider Säuren entspricht. Auch stimmen die erhaltenen Kupferwerte allenfalls auf eine vierbasische Säure  $C_{12}H_{14}O_9$ , die unter Austritt von Wasser aus den Komponenten hervorgehen könnte:



Berechnet für  $C_{12}H_{14}Cu_2O_9$ :

% Cu 29,9

Gefunden:

30,88 30,91

Qualitativ gleichen sich also die Resultate bei der Oxydation des Bilirubins und der des Hämatins durchaus, doch zerfällt der Gallenfarbstoff in alkalischer Lösung bereits fast vollständig unter Bedingungen, bei denen das Hämatin nur Sauerstoff aufnimmt. Es müssen demnach doch wesentliche Unterschiede in der Konstitution bestehen, so sehr sich auch andererseits die Anordnung der zusammensetzenden Atome in beiden Farbstoffen gleich. Allerdings bleibt auch die Quantität

der ätherlöslichen Säuren, die aus dem Bilirubin zu erhalten sind, nach den bis jetzt vorliegenden Ergebnissen wenigstens erheblich hinter der zurück, die das Hämatin liefert. Wurden hier bei der Oxydation in essigsaurer Lösung über 60% erübrigt, so belief sich beim Bilirubin die Ausbeute nur auf ca. 40%, bei der Oxydation in alkalischer Lösung sogar nur auf 34%. Sehr bemerkenswert ist ferner, daß Hämatinsäure nur in kleiner Menge vorhanden war, solange nur der Luftsauerstoff als Oxydationsmittel diente. Es geht daraus hervor, daß zunächst beim Gallenfarbstoff die Hämatinsäure nicht als primäres Spaltungsprodukt auftreten dürfte, leider konnte über die Natur der sehr veränderlichen Vorstufen noch keine Aufklärung erbracht werden. Nach allem muß der Unterschied im Verhalten des Bilirubins und des Hämatins oder des Hämatoporphyrins, dessen empirische Formel einen leichter übersichtlichen Vergleich gestattet, begründet sein in den Methingruppen, welche das letztere mehr enthält, wie aus der zur Zeit üblichen Formulierung als  $C_{32}H_{36}O_6N_4$  und  $C_{34}H_{38}O_6N_4$  schon hervorgeht.