

Zur Kenntnis der Gallenfarbstoffe.

III. Mitteilung.

Über Hemibilirubin und die bei der Oxydation des Hemibilirubins entstehenden Spaltprodukte.

Von

Hans Fischer und Paul Meyer.

(Aus der II. med. Klinik zu München.)

(Der Redaktion zugegangen am 24. September 1911.)

In der ersten Mitteilung¹⁾ über Gallenfarbstoffe ist ein Reduktionsprodukt des Bilirubins mit Natriumamalgam, Hemibilirubin genannt, beschrieben.

Inzwischen ist es dem einen von uns in Gemeinschaft mit F. Meyer-Betz gelungen, das Hemibilirubin im pathologischen Urin nachzuweisen, und wir haben weiterhin festgestellt, daß das Hemibilirubin eine Muttersubstanz — vielleicht die einzige²⁾ — des Harnurobilins ist. Hierdurch gewinnt das Studium des Hemibilirubins erhöhtes Interesse.

Leider stellt die große Empfindlichkeit des Körpers gegen Luft und Licht und alle Reagenzien, besonders Säuren, der chemischen Untersuchung erhebliche Schwierigkeiten in den Weg. Ganz besondere Erschwerung tritt dadurch ein, daß das Hemibilirubin in zwei Formen auftritt, einer aciden und einer nicht aciden, wie wir sie unterscheiden wollen.

Die nicht acide Form ist das reine Hemibilirubin, wie es in der ersten Mitteilung beschrieben wurde. Die acide Form entwickelt im Gegensatz zu der nicht aciden beim Lösen in Bicarbonat Kohlensäure und schmilzt viel niedriger. In reinem

¹⁾ H. Fischer, Diese Zeitschrift, Bd. 73, S. 206.

²⁾ H. Fischer und F. Meyer-Betz, Diese Zeitschrift, Bd. 75, S. 1.

Zustand haben wir diese acide Form nicht fassen können, weil sie sich immer wieder, wenigstens zum Teil, in die nicht acide zurückverwandelt.

Zur näheren Erläuterung der komplizierten Verhältnisse führen wir zunächst kurz die experimentellen Tatsachen an:¹⁾

1. Rohhemibilirubin ist in Chloroform völlig löslich.

2. Rohhemibilirubin löst sich in Natriumbicarbonatlösung völlig unter Kohlensäureentwicklung auf. Dieser Lösung lassen sich durch Chloroform 8% reines, nicht acides Hemibilirubin entziehen.

3. Dem in Chloroform gelösten Rohhemibilirubin wird durch 8—10maliges Ausschütteln mit Natriumbicarbonatlösung 35% Substanz (acide Form) entzogen.

4. Die von Versuch III wieder gewonnene acide Form löst sich in Bicarbonat unter Kohlensäureentwicklung auf: dieser Lösung läßt sich durch Chloroform wiederum 7% reines (nicht acides) Hemibilirubin entziehen.

5. Reines in großen Prismen krystallisiertes Hemibilirubin löst sich bei lange dauerndem Schütteln in Natriumbicarbonatlösung ohne sichtbare Kohlensäureentwicklung auf. Dieser Lösung entzieht Chloroform einen Teil des Hemibilirubins, nach dem Ansäuern gewinnt man durch Ausschütteln mit Chloroform den Rest des Hemibilirubins, und zwar auch wieder in der krystallisierten hochschmelzenden Form.

6. In Alkohol gelöst, sind beide Formen gegen Lackmus und Phenolphthalein sauer. Ein wesentlicher Aciditätsunterschied ist nicht feststellbar.

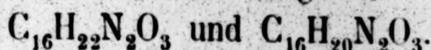
7. Analytisch besteht zwischen beiden Formen kein Unterschied.

Offenbar wiegt in alkalischer Lösung die acide Form vor, in kaustischalkalischer scheint nur die acide Form möglich zu sein, während beim Ansäuern die nicht acide Form zurückgebildet wird.

Ester haben wir bis jetzt aus Hemibilirubin nicht gewonnen, jedoch werden die Versuche fortgesetzt.

¹⁾ Einzelheiten sind im experimentellen Teil nachzulesen.

In der ersten Mitteilung sind für das Hemibilirubin als einfachster Ausdruck 2 Formeln aufgestellt:



Inzwischen haben wir nun zahlreiche Molekulargewichtsbestimmungen nach der Siedepunkterhöhungsmethode in Alkohol ausgeführt. Die Resultate verlangen eindeutig eine Verdoppelung der Formel.

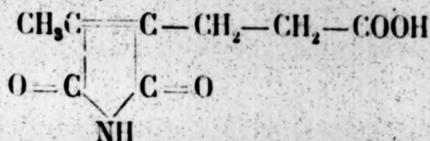
Was nun die Zusammensetzung selbst anlangt, so wurde bereits in der ersten Mitteilung darauf hingewiesen, daß die Stickstoffbestimmungen 0,3% Stickstoff zu wenig geben und zwar für beide Formeln.

Wir haben nun den Körper noch oftmals der Elementaranalyse unterzogen und immer wieder die alten Werte bestätigt gefunden, auch die hohen Kohlenstoff- und Wasserstoffwerte.

Besonders nach den Wasserstoffwerten scheint uns die Formel $(C_{16}H_{20}N_2O_3) \cdot 2$ überhaupt nicht mehr diskutabel, sondern nur noch die Formel $(C_{16}H_{22}N_2O_3) \cdot 2$. Viel besser aber stimmen sämtliche Analysen auf $C_{33}H_{44}N_4O_6$, besonders auch die Stickstoffwerte, weshalb auch die letztere Formel in Betracht zu ziehen ist.

Weiterhin haben wir uns vielfach bemüht, zu kristallisierten Derivaten des Hemibilirubins zu gelangen, bis jetzt aber ohne Erfolg. Wir haben jedoch ein Kupfersalz des Hemibilirubins isolieren können, das das Metall komplex gebunden enthält und ein dem Hämin ähnliches Spektrum gibt.

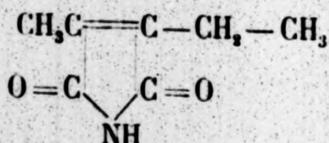
Erinnert also hier das Hemibilirubin an das Hämin, so zeigt es bei der tiefgreifenden Oxydation ein den Chlorophyllderivaten¹⁾ ähnliches Verhalten. Es gelang uns bei der Oxydation beider Reduktionsprodukte des Bilirubins, sowohl des kristallisierten Hemibilirubins, als des amorphen Körpers II²⁾ Hämatinsäure als Imid,



und Methyläthylmaleinimid zu isolieren.

¹⁾ Richard Willstätter und Asahina, A., Bd. 374, S. 227.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 73, S. 225 (IV.).



Bei der Oxydation des Bilirubins nach der gleichen Methode konnten wir nur Hämatinsäure gewinnen; Methyläthylmaleinimid war nicht nachweisbar, was auch mit den Erfahrungen Küsters¹⁾ übereinstimmt, der bei der Oxydation des Bilirubins (allerdings über «Biliverdin») auch nur Hämatinsäure hat finden können.

Der Befund des Methyläthylmaleinimids beweist, daß der Reduktionsprozeß mit Natriumamalgam absolut nicht der einfache ist, wie Städeler, Maly, Nencki und andere annehmen.

Die Ausbeuten an den beiden Oxydationsprodukten sind zu gering, um bestimmte Anhaltspunkte für die Konstitution des Hemibilirubins und Bilirubins zu gewinnen, aber aus ihrer Bildung ist es sehr wahrscheinlich, daß beide Körper, das Bilirubin und das Hemibilirubin, mindestens 2 Pyrrolkerne mit verschiedenen Seitenketten enthalten, weil Methyläthylmaleinimid und Hämatinsäure²⁾ kaum aus den gleichen Kernen hervorgehen können.

Experimenteller Teil.

I. Hemibilirubin.

Der besseren Übersicht halber geben wir nochmals die ganze Vorschrift: 5 g Bilirubin werden mit 40 ccm $\frac{1}{10}$ -n-Lauge und 20 ccm Wasser 2 Minuten geschüttelt. Nachdem zum großen Teil Lösung eingetreten ist, werden 40 g ca. 5% Natriumamalgam zugegeben. Nach 1 stündigem Schütteln unter Kühlung ist die Lösung nur noch schwach gelb gefärbt. Druck ist im Gefäß nicht vorhanden. Nach Entfernung des Quecksilbers wird mit 50%iger Schwefelsäure eben angesäuert und mit Chloroform

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 59, S. 63.

²⁾ In einem besonderen Versuch haben wir 0,5 g Hämatinsäure nach unserem Verfahren oxydiert, jedoch kein Methyläthylmaleinimid isolieren können.

4 mal ausgeschüttelt. Die vereinigten Chloroformextrakte werden mit Natriumsulfat oberflächlich getrocknet, filtriert und in einen Liter Ligroin (Sp. 50—60°) gegossen.

Der ausfallende rotgelbe Niederschlag (Körper II) wird abfiltriert und das kaum gefärbte Filtrat im Vakuum eingedampft. Das Rohhemibilirubin bleibt dann in zu Kugeln vereinigten Gebilden zurück.

Es wird nun erneut in wenig Chloroform gelöst und mit Bicarbonat ca. 10 mal ausgeschüttelt.

Die Chloroformlösung wird wieder, wie oben beschrieben, behandelt, beim Verdampfen der Chloroform-Ligroinlösung bleibt nahezu reines Hemibilirubin zurück (Fp. 186—190°).

Die Bicarbonatlösung wird wieder angesäuert, mit Chloroform extrahiert, in Ligroin gegossen, vom Niederschlag abfiltriert und eingedampft. Es bleibt die acide Form zurück. Fp. 140° bis 160° unscharf.

Ausbeuten, im Durchschnitt angegeben von 3 Versuchen, bei denen 16,5 g reinstes, makroskopisch krystallisiertes Bilirubin zur Reduktion gelangte.

I. Rohhemibilirubin 52,7%

II. Körper II 41,5%

8,7 g Rohhemibilirubin, wie angegeben gereinigt, ergeben, die Ausbeute wieder auf Bilirubin (16,5 g) berechnet:

Hemibilirubin Fp. 186—190°: 33,33%

Acide Form » 140° unscharf 18,5 %.

Die acide Form haben wir nun wieder in Bicarbonat gelöst und mit Chloroform erschöpfend extrahiert.

Ausbeute an Hemibilirubin Fp. 185° 0,23 g

» » acider Form » 155° unscharf 2,1 »

Der aciden Form läßt sich jetzt von neuem reines Hemibilirubin in der gleichen Ausbeute, wie beim letzten Versuch, entziehen.

Elementaranalysen.

I. Acide Form. II. Hemibilirubin (Fp. 186—190°). III. Hemibilirubin, umkrystallisiert in der früher angegebenen Weise. Fp. 192°.

| | | | | | |
|------|-----------------|-------|--------------------------|--------------------|-------------------------|
| I. | 0,2122 g Subst. | gaben | 0,5185 g CO ₂ | und | 0,1457 H ₂ O |
| | 0,1102 » | » | » | 9,43 ccm N bei 19° | und 719 mm Hg. |
| II. | 0,0931 g Subst. | gaben | 0,2270 g CO ₂ | und | 0,0673 H ₂ O |
| | 0,1291 » | » | » | 11,7 ccm N bei 25° | und 713 mm Hg. |
| | 0,1150 g | » | » | 10,08 » | » 18° » 711 » |
| III. | 0,1772 g Subst. | gaben | 0,4345 g CO ₂ | und | 0,1264 H ₂ O |
| | 0,1699 » | » | » | 0,4149 » | » 0,1174 » |
| | 0,0992 » | » | » | 8,6 ccm N bei 18° | und 710 mm Hg. |
| | 0,1964 » | » | » | 17,10 » | » 19° » 717 » |

Berechnet für:

Gefunden:

| C ₃₃ H ₄₄ N ₄ O ₆ : | C ₃₂ H ₄₄ N ₄ O ₆ : | I. | II. | III. |
|---|---|-------|------------|---------------|
| C 66,85 | 66,16 | 66,64 | 66,5 | 66,87; 66,60% |
| H 7,49 | 7,64 | 7,68 | 8,08 | 7,98; 7,73% |
| N 9,46 | 9,65 | 9,55 | 9,67; 9,48 | 9,37; 9,47% |

Molekulargewichtsbestimmungen.

Alle folgenden Bestimmungen sind nach der Siedepunktserhöhungsmethode in absolutem Alkohol ausgeführt worden.

Hemibilirubin, nicht acide Form, Fp. 186—190°.

| | | | |
|-----|---------------------------------|-------|---------------------|
| I. | 0,5 g Subst. in 13,06 g Alkohol | gaben | 0,078° Siedep.-Erh. |
| II. | 0,5 » » 10,95 » | » | 0,093° » |

Ber. für C₃₃H₄₄N₄O₆ bzw. C₃₂H₄₄N₄O₆: Gef.:
 Mol.-Gew. 592,39 bzw. 580,40 585 565.

Hemibilirubin, acide Form.

0,5 g Subst. in 8,66 g Alkohol gaben 0,112° Siedep.-Erh.
 Gef.: 593.

Titration.

Die Titration wurde in alkoholischer Lösung ausgeführt mit Phenolphthalein als Indikator. Der Umschlag konnte meist nicht direkt beobachtet werden; daher wurde mit Hilfe des Spektroskops titriert, bis der Streifen im Rot (605—578 cm) des alkalischen Phenolphthaleins erschien bzw. verschwand. Nach einiger Übung titriert man auf 0,1—0,2 ccm scharf.

Acide Form des Hemibilirubins.

| | | |
|-----------------------------|--------------------------------|-----|
| 0,1371 g Subst. verbrauchen | 4,55 ccm $\frac{1}{10}$ -Lauge | 301 |
| 0,52 " " " " | 17,6 " " " | 296 |
| 0,8 " " " " | 27,2 " " " | 298 |
| 0,5 " " " " | 16,6 " " " | 301 |

Nicht acide Form, Fp. 186—190°.

0,1752 g Subst. verbrauchen 5,9 ccm $\frac{1}{10}$ -Lauge 299.

Die rechts angegebenen Zahlen bedeuten die aus den Daten berechneten einfachsten Molekulargewichte für eine einbasische Säure. Durch Verdoppelung der Zahlen gelangt man zu ähnlichen Werten, wie die Molekulargewichtsbestimmung verlangt.

Daß die acide Form des Hemibilirubins aus Bicarbonat Kohlensäure austreibt, haben wir auch durch Wägung festgestellt.

Verhalten der Bicarbonatlösung des Rohhemibilirubins.

Löst man Rohhemibilirubin in Natriumbicarbonatlösung auf, so läßt sich dieser Lösung nur 8% Reinhemibilirubin entziehen. Gewinnt man nach dem Ansäuern das Hemibilirubin zurück, so kann man aus der Bicarbonatlösung wiederum die gleiche Menge Reinhemibilirubin ausschütteln.

Kupfersalz des Hemibilirubins.

Für die Darstellung des Kupfersalzes ist es gleichgültig, ob man von der aciden oder nicht aciden Form ausgeht.

0,5 g Hemibilirubin werden in Alkohol gelöst, mit 16,6 ccm $\frac{1}{10}$ -Lauge versetzt, mit Wasser verdünnt und hierzu 0,4 g Kupfersulfat in Wasser gelöst, zugegeben. Das Kupfersalz fällt sofort in violett gefärbten Flocken aus, widrigenfalls es an Wasser fehlt. Der voluminöse Niederschlag wird abgesaugt und mit Wasser ausgewaschen. Nach dem Trocknen im Vakuum wird das Salz in Chloroform gelöst und mit Ligroin gefällt, wobei es sich in violetten Flocken ausscheidet. Aus dem Filtrat läßt sich eine geringe Menge krystallisierten Hemibilirubins gewinnen.

Löst man jetzt das Kupfersalz wieder in Chloroform und fällt es mit Ligroin, so ist kein Hemibilirubin mehr nachweisbar.

Der Körper ist in Chloroform, Pyridin, Bicarbonat und Natronlauge leicht löslich, ebenso in Ammoniak. Mit Schwefelammonium entsteht keine Fällung, jedoch tritt eine Veränderung des Salzes ein. Wir werden das Salz noch genauer untersuchen.

Die Analysen ergaben bis jetzt keine konstanten Zahlen: Gef.: Cu 10,08, 11,38, 11,56, 10,36, während für $C_{32}H_{42}N_4O_6Cu$ 9,90 Cu berechnet sind.

Die spektroskopische Untersuchung in Chloroform ergab:

Konzentration: 0,024%

| Schicht in 10 mm | 15 mm |
|--|---------------------|
| Band I $\lambda = 660-636$ intensiv | 662-636 intensiv |
| Band II $\lambda = 603-580$ sehr schwach | 606-580 schwach |
| Band III $\lambda = 535-478$ intensiv | 547 ab ausgelöscht. |

In Natronlauge gelöst verschieben sich die Streifen nach rechts.¹⁾

Der Körper zeigt also ein dem Hämin ähnliches spektroskopisches Verhalten; in der Lage ist Band I und III dem Hämin recht ähnlich, wie aus dem Vergleich der beigesetzten Werte hervorgeht.

Spektrum des Hämins²⁾

$\lambda = 655 - 630$ $\lambda = 555 - 534$ $\lambda = 524 - 497$.

Oxydation von Körper II.

Körper II ist die (vgl. S. 4) neben Hemibilirubin bei der Reduktion des Bilirubins auftretende Substanz, die wir bis jetzt nicht krystallisiert erhalten haben.

Sie ist gegen Luft und Licht noch erheblich empfindlicher wie das Hemibilirubin, zeigt aber sonst in Eigenschaft und Zusammensetzung viel Ähnlichkeit mit dem Hemibilirubin. Wir haben jedoch bis jetzt nicht den Eindruck gewonnen, daß sie identisch wäre mit Hemibilirubin, und verschieben die Diskussion über diesen Punkt, bis wir mehr experimentelles Material in den Händen haben.

Die Elementaranalyse des bei 100° über Phosphorpent-

¹⁾ Hemibilirubin aus pathologischem Urin bzw. sein Kupfersalz zeigt das gleiche spektroskopische Verhalten.

²⁾ Abderhaldens biochemisches Handlexikon, Bd. VI, S. 237.

oxyd getrockneten Körpers ergab auf $C_{16}H_{20}N_2O_3$ annähernd passende Werte:

0,2017 g Substanz gaben 0,4825 g CO_2 und 0,1293 H_2O

0,1608 g » » 14,4 ccm N bei 18° und 711 mm Hg.

| | | |
|-------|------------------------|-------|
| Ber.: | $C_{16}H_{20}N_2O_3$: | Gef.: |
| C | 66,62 | 65,24 |
| H | 7,00 | 7,17 |
| N | 9,72 | 9,69 |

Beim Erhitzen im Kapillarrohr sintert die Substanz ab 175° zusammen und schmilzt bei $210-215^\circ$ unter Zersetzung.

Der Körper entwickelt mit Bicarbonat kräftig Kohlensäure, beim Titrieren mit $\frac{1}{10}$ -n-NaOH verbraucht er so viel Lauge, wie einem Molekulargewicht von 250 entspricht, wenn eine einbasische Säure vorläge.

Bei der außerordentlich schweren Zugänglichkeit unseres Ausgangsmaterials (Rindergallensteine) und den großen Verlusten, die bei Gewinnung des Hemibilirubins entstehen, bot uns Körper II ein willkommenes Objekt dar, um uns auf die Methoden einzuarbeiten. Wir haben zunächst den Körper in schwefelsaurer Lösung mit Bleisuperoxyd oxydiert.

Anfangs arbeiteten wir nach der Vorschrift von Willstätter und Asahina,¹⁾ die Schwerlöslichkeit der Bilirubinderivate erschwerte jedoch das Arbeiten ungemein, und die Ausbeute an Oxydationsprodukten war sehr schlecht.

Folgende Vorschrift gab uns die besten Resultate:

40 g Bleisuperoxyd werden mit 100 ccm 50%iger Schwefelsäure heftig turbiniert. Im Verlauf von 8 Stunden tropfen wir unter Eiskühlung 2 g Körper II, in $\frac{1}{10}$ -n-Natronlauge gelöst, ein. Man erreicht so eine vollständige Lösung. Wir haben verschiedentlich den abgesaugten Bleischlamm mit Natronlauge ausgezogen und das Extrakt nach Kjeldahl oxydiert. Es konnten so nur Spuren von Ammoniak nachgewiesen werden.

Das Filtrat vom Bleischlamm wurde im Apparat von Kutscher-Steudel erschöpfend ausgeäthert, der Äther verjagt und der Rückstand in der von Willstätter¹⁾ angegebenen Weise verarbeitet.

¹⁾ A., Bd. 373, S. 232.

Die Analyse der bei 113—114° schmelzenden Hämatisäure ergab:

0,1090 g Substanz gaben 7,6 ccm N bei 19° und 718 mm Hg.

Ber. für $C_8H_9O_4N$: Gef.:

N 7,65 7,70

Die Analyse des bei 66—67° schmelzenden Imids ergab:
0,1040 g Substanz gaben 9,5 ccm N bei 19° und 716 mm Hg.

Ber. für $C_7H_9O_2N$: Gef.:

N 10,07 10,06

Oxydation von Bilirubin.

Bilirubin haben wir genau unter den gleichen Bedingungen oxydiert und 16% Hämatisäure gewonnen. Aus dem sodaalkalischen Extrakt haben wir zwar geringe Menge schmierigen Rückstandes erhalten, aber wir erhielten keine Krystalle, auch fehlte der typische Geruch des Methyläthylmaleinimids, so daß wir glauben, daß bei der Oxydation von Bilirubin, wenigstens nach der von uns angewandten Methode, keine Spur des Imids entsteht.

Ein Teil der Kosten dieser Arbeit wurde mit Hilfe von Mitteln, die mir das Herausgeberkollegium der Münchner mediz. Wochenschrift aus der Bollingerstiftung zur Verfügung stellte, bestritten. Ich spreche dem Herausgeberkollegium auch an dieser Stelle meinen ergebensten Dank aus.