

# Beiträge zur Kenntnis der Gallenfarbstoffe.

Von

William Küster.

## VII. Mitteilung.

### Über die Einwirkung von Eisenchlorid auf Bilirubin und über die Aufarbeitung von Gallensteinen.

Von

W. Küster, K. Reihling und R. Schmiedel.

(Aus dem dritten chemischen Laboratorium der Technischen Hochschule, Stuttgart.)

(Der Redaktion zugegangen am 3. April 1914.)

In der fünften Mitteilung<sup>1)</sup> über die Gallenfarbstoffe wurde die Aufspaltung des Bilirubins durch Alkalien beschrieben und, der Ansicht Staedeler's folgend, der die Bildung von Biliverdin aus Bilirubin mit dem Entstehen von Indigo aus Indigoweiß verglichen hat, die Frage aufgeworfen, ob man das Bilirubin zu den indigoïden Farbstoffen, resp. deren Leukoverbindungen rechnen darf.<sup>2)</sup> Dabei war zu berücksichtigen, daß die Pa-

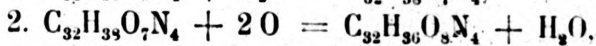
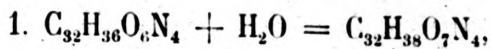
<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 59, S. 63 (1909).

<sup>2)</sup> Für diesen Vergleich sprach gerade die Möglichkeit, beide Körper durch Alkalien aufspalten zu können; auch habe ich bereits die aus dem Indigo entstehende Anthranilsäure mit der aus dem Biliverdin hervorgehenden Hämatinsäure in Parallele gesetzt. Zieht man dann aus den Konstitutionsformeln der genannten Säuren einen Schluß auf die Komplexe, aus denen sie hervorgehen, so ergibt sich, daß der die Hämatinsäure liefernde ein Kohlenstoffatom mehr enthalten muß, als der, aus dem die Anthranilsäure entsteht. Da letzterer aber einen Pyrrolring vorstellt, muß jener ein Pyridinring sein, der sich aus einem der vier Pyrrolkomplexe des Hämatins bilden könnte, vielleicht dadurch, daß ein Methin, das im Hämatin die Verbindung zweier Pyrrolringe bewirkt, in den Ring aufgenommen wird.

Vgl. die Formulierung des Hämatins, Diese Zeitschrift, Bd. 82, S. 469 (1912).

Die von H. Fischer aufgestellte Formel für das Bilirubin (Diese Zeitschrift, Bd. 89, S. 262 [1914]) trägt m. E. diesen Verhältnissen keine Rechnung.

rallele zwischen beiden Farbstoffen nur haltbar blieb, wenn der Übergang von Bilirubin  $C_{32}H_{36}O_6N_4$  in Biliverdin  $C_{32}H_{36}O_8N_4$  nicht einfach in einer Aufnahme von zwei Atomen Sauerstoff bestand, sondern in einer Aufnahme von Wasser und von zwei Atomen Sauerstoff unter Wiederabspaltung von Wasser im Sinne der Gleichungen:



d. h. das Bilirubin mußte in zwei Komplexen das Wasser und ein Atom Sauerstoff einlagern, während aus den beiden anderen Komplexen die Wegnahme zweier Atome Wasserstoff erfolgte.<sup>1)</sup> Es durfte also keineswegs das ganze Bilirubinmolekül mit dem Indigweiß verglichen werden, sondern nur die Hälfte desselben.

Eine wenn auch noch nicht ganz sichere Bestätigung dieser Vorstellungen wird nun durch die Einwirkung von Eisenchlorid auf eine Suspension von Bilirubin in konzentrierter Essigsäure erbracht, welche Reaktion den Gegenstand der nachfolgenden Untersuchung bildet. Bei einer qualitativen Probe wurde die Beobachtung gemacht, daß das genannte Oxydationsmittel Bilirubin in einen grünen Farbstoff überführt, und es war also zu untersuchen, ob diese mit Farbvertiefung verknüpfte Oxydation in einer Wegnahme von Wasserstoff oder in einer Aufnahme von Sauerstoff besteht. Die Analyse von Präparaten verschiedener Herstellungen ergab nun Werte, die mit der Formel  $C_{32}H_{34}O_7N_4$  für das bisher allerdings nicht deutlich krystallisiert erhaltene Oxydationsprodukt in Übereinstimmung stehen, wonach wir es also mit einem Dehydrooxybilirubin zu tun haben, d. h. es dürfte zu gleicher Zeit eine Wegnahme zweier Wasserstoffatome und eine Aufnahme von Sauerstoff erfolgt sein. Der neue Körper unterscheidet sich vom Biliverdin durch seine Schwerlöslichkeit in Alkohol, er gibt die Gmelin-Tiedemannsche Reaktion, d. h. die essigsaure Lösung wird durch Salpetersäure rot, er ist also viel-

<sup>1)</sup> Aus den Untersuchungen H. Fischers folgt, daß im Bilirubin mindestens drei von den vier im Hämatin vorhandenen Pyrrolkomplexen noch enthalten sind.

leicht identisch mit dem das grüne Stadium dieser Reaktion bedingenden Farbstoff, er gibt auch die Diazoreaktion, aber augenscheinlich kein Kondensationsprodukt mit Formaldehyd, eine Reaktion, die beim Bilirubin unter dem Einfluß konzentrierter Schwefelsäure zu einem intensiv blau gefärbten Körper führt.

Beim Stehen einer alkalischen Lösung des Dehydrooxybilirubins an der Luft findet eine sichtbare Farbveränderung nicht statt, beim Kochen mit Alkalien wird etwa ein Viertel des vorhandenen Stickstoffs als Ammoniak abgespalten, also nicht mehr als aus dem Bilirubin, dabei findet Abspaltung von Hämatinsäure statt.

Normal zusammengesetzte Salze wurden vom Dehydrooxybilirubin nicht erhalten, bemerkenswert erscheint, daß höchstens drei Atome Silber aufgenommen werden, während das Bilirubin eine Silberverbindung mit fast vier Atomen Metall gibt.

Die Reduktion mit Natriumamalgam scheint nicht zum Hemibilirubin zu führen; zwar wird die braungrüne alkalische Lösung unter dem Einfluß des Reduktionsmittels fast farblos, doch konnte das Entstehen eines komplexen Kupfersalzes hier nicht beobachtet werden. Das in Essigsäure gelöste Dehydrooxybilirubin wird durch Natriumamalgam anscheinend nicht reduziert,<sup>1)</sup> wohl aber durch Zinkstaub und durch schweflige Säure und zwar nur bis zu einem die Lösung rot färbenden Körper, der in Chloroform nicht löslich und daher mit Bilirubin nicht identisch ist.

Die Oxydation des Bilirubins durch Eisenchlorid führt nun nicht nur zum Dehydrooxybilirubin, sondern auch noch zu einem zweiten Körper, der durch die Unlöslichkeit seiner Alkalisalze in Wasser charakterisiert ist. Ihm kommt wahrscheinlich die Formel ( $C_{16}H_{16}O_5N_2$ ) zu; wir haben es also ebenfalls mit einem Körper zu tun, der durch Wegnahme von Wasserstoff und

<sup>1)</sup> Es möge erwähnt sein, daß es mir nicht gelungen ist, mit den von mir geprüften Natriumamalgampräparaten eine Reduktion des p-Benzochinons in essigsaurer Lösung zu erreichen, dieselbe Lösung wurde von Zinkstaub sofort entfärbt.

Aufnahme von Sauerstoff aus dem Bilirubin entstanden ist. Wir haben diesen Körper seiner Farbe wegen «Bilinigrin» genannt. Seine Bildung geht Hand in Hand mit einer bemerkenswerten Erscheinung. Es bildet sich nämlich zunächst eine lose Verbindung zwischen Bilirubin, Dehydrooxybilirubin und Bilinigrin, was besonders ins Auge fällt, wenn man zu der Suspension des Bilirubins in Eisessig auf einmal viel Eisenchlorid fügt. Es sind dann die Ausbeuten an Dehydrooxybilirubin herabgesetzt, der größte Teil des Farbstoffs hat sich in eine schwarze Masse verwandelt, die auch an kochende Essigsäure schließlich nur noch Spuren von Farbstoff abgibt. Derselben läßt sich aber durch Chloroform unverändertes Bilirubin entziehen, worauf an Essigsäure auch wieder Dehydrooxybilirubin abgegeben wird, während Bilinigrin zurückbleibt, nachdem die Extraktion mit Chloroform und Essigsäure wiederholt worden ist. Dieses Verhalten erweckt den Anschein, daß in dem zunächst in Essigsäure nicht löslichen Körper eine Verbindung von Bilirubin mit seinen Oxydationsprodukten vorliegt, die an die Verbindungen chinhydronartigen Charakters erinnert. Auch durch eine verdünnte Sodalösung wird die Verbindung nur langsam zerlegt, so daß es mehrstündiger Einwirkung bedarf, ehe das Bilirubin in Lösung zu gehen beginnt, wobei die Unlöslichkeit des Bilinigrinnatriums jedenfalls eine Rolle spielt. Wahrscheinlich handelt es sich aber doch nur um eine Adsorption, z. B. war es nicht möglich, in Chloroform gelöstes Bilirubin durch Chinon zu oxydieren, auch ist es bisher nicht gelungen, das Bilirubin zu acetylieren oder zu benzoylieren.

Ähnliche Beobachtungen macht man ja auch schon bei der Aufarbeitung von Gallensteinen. Wie ich bereits beschrieben habe, läßt sich nach der Wegnahme des Bilirubins mit Hilfe von Chloroform durch konzentrierte Essigsäure, mit der vorher bereits bis zur Erschöpfung extrahiert worden war, von neuem grüner Farbstoff herauslösen, worauf Chloroform wieder Bilirubin entzieht.

Bei einer neuen Aufarbeitung von Gallensteinen wurde nun so verfahren, daß nach der Einwirkung von verdünnter

Essigsäure mit Chloroform extrahiert wurde, wobei ein hellorangerot gefärbtes Bilirubin erhalten wurde. Nachdem dann durch konzentrierte Essigsäure das sogenannte Choleprasin entfernt worden war, wurde erneut mit Chloroform extrahiert und nunmehr ein prachtvoll rotbraun gefärbtes Bilirubin erhalten. Demnach scheint letzteres an das Choleprasin gebunden gewesen zu sein und ist erst durch die siedende konzentrierte Essigsäure aus dieser Bindung herausgelöst worden. Vielleicht handelt es sich hier also doch um eine chemische Bindung, die durch die Essigsäure unter Einlagerung von Wasser gesprengt wird. In diesem Falle könnte der Befund dahin gedeutet werden, daß die Umwandlung der eisenhaltigen Komponente des Blutfarbstoffs in Gallenfarbstoff noch im Verbande mit dem Globin erfolgt, da ja das Choleprasin als ein Eiweißabkömmling aufgefaßt werden muß. Übrigens enthält auch das rohe Choleprasin immer noch etwas Bilirubin, das jenem durch Chloroform in Gestalt eines grünen Farbstoffs entzogen wird, der bei erneuter Einwirkung von Essigsäure das Bilirubin hinterläßt.

Wenn dann die Aufarbeitung der Gallensteine soweit getrieben worden ist, daß weder Chloroform noch Eisessig organische Substanz mehr herausnehmen, so hinterbleibt ein Körper, der mit dem «Bilinigrin» insofern Ähnlichkeit hat, als auch er durch die Unlöslichkeit seiner Alkaliverbindungen ausgezeichnet ist. Es dürfte also auch in diesem «Biliumin» ein Oxydationsprodukt des Bilirubins auf natürlichem Wege enthalten sein, und die Bildung der Gallensteine könnte demgemäß damit beginnen, daß sich das unlösliche Natriumsalz dieses Biliumins zunächst abscheidet und daß auf diesen einmal gebildeten Kern weitere Ablagerungen erfolgen.

#### Experimenteller Teil.

##### Die Oxydation von Bilirubin durch Eisenchlorid

wurde meistens in der Weise bewirkt, daß eine Aufschwemmung von z. B. 5 g Bilirubin in 500 ccm Eisessig auf dem Wasserbade erhitzt wurde, worauf 20 ccm der officinellen Eisenchloridlösung, entsprechend zwei Atomen Sauerstoff auf die Molekel

Bilirubin, zugegeben wurden, nachdem sich gezeigt hatte, daß ein Überschuß von Eisenchlorid in Beziehung auf die Ausbeuten an grünem Oxydationsprodukt keinen Vorteil bringt und daß die Verwendung von wasserfreiem Eisenchlorid einen anderen Verlauf der Reaktion nicht zur Folge hat. Bis zur Vollendung der Oxydation, d. h. bis zum völligen Verschwinden unveränderter Bilirubinpartikel muß nunmehr einige Stunden auf dem Wasserbade erhitzt werden, worauf durch ein Kreppfilter filtriert und der Rückstand 8—10 mal mit Eisessig ausgekocht wurde, bis letzterer fast farblos ablief. Von den vereinigten Farbstofflösungen wurde der Eisessig unter vermindertem Druck bis etwa auf  $\frac{1}{10}$  des ursprünglichen Volumens abdestilliert und die konzentrierte Lösung in Wasser gegossen, wobei sich der Farbstoff abschied. Der Zusatz eines Elektrolyten wie Ammoniak oder auch Salzsäure beschleunigte und vervollständigte das Ausfallen des Farbstoffs. Er wurde dann filtriert, mit verdünnter Salzsäure eisenfrei und mit Wasser säurefrei gewaschen, zur Reinigung erneut in heißem Eisessig gelöst und das Lösungsmittel bis auf einen kleinen Rest abdestilliert, worauf der Farbstoff wieder durch Eintragen in Wasser gefällt wurde.

Der schwarze in Eisessig unlösliche Rückstand wurde eisen- und säurefrei gewaschen und nach dem Trocknen mit Chloroform extrahiert, wobei namentlich bei einigen Versuchen, bei denen ein Überschuß von Eisenchlorid verwendet worden war, ganz erhebliche Mengen unveränderten Bilirubins entfernt wurden, was dafür spricht, daß, wenn sofort eine größere Menge des Oxydationsprodukts gebildet wird, eine entsprechend große Menge von Bilirubin niedergerissen wird, d. h. sich in einer durch Essigsäure nicht trennbaren Verbindung mit dem Oxydationsprodukt ausscheidet. Denn nach der Extraktion durch Chloroform nahm dann auch Essigsäure wieder erhebliche Mengen des grünen Farbstoffs auf. Schließlich hinterblieb eine schwarze Masse, die weder an Chloroform noch an Essigsäure mehr als Spuren organischer Substanz abgab, und die als Bilinigrin bezeichnet werden soll. Zur Übersicht diene die folgende Tabelle:

Versuchsnummer	Bilirubin	Eis-essig	Eisenchlorid	O-Atome auf eine Mol. Bilirubin	Ausbeute			
					grüner Farbstoff	in % des verwendeten Bilirubins	schwarzer Rückstand	nicht verändertes Bilirubin
1	rohes, 2,8 g	500	12,5 g	7	1,0 g	36 %	zusammen 1,4 g	
2	reines, 2,0 »	500	8,4 »	7	0,5 »	25 %	»	0,5 »
3	rohes, 8,5 »	500	24,5 »	5	2,8 »	33 %	2,25 g	2 »
4	» 8 »	500	27 »	6	2,65 »	33 %	0,55 »	3,3 »
5	» 6 »	500	24 ccm	2	?	?	1,5 »	vorhanden
6	» 5 »	500	20 »	2	2,4 g	48 %	1,7 »	immer vorhanden, 1. D. 6-7% wieder gewonnen
7	» 3 »	300	15 »	2,5	1,4 »	47 %	1,2 »	
8	» 3 »	300	18 »	3	1,38 »	46 %	1,2 »	
9	» 5 »	500	30 »	3	2,5 »	50 %	1,65 »	
10	» 5 »	500	40 »	4	2,4 »	48 %	1,7 »	
11	» 5 »	500	20 »	2	2,6 »	52 %	1,7 »	
12	» 5 »	500	20 »	2	2,7 »	54 %	1,8 »	

Wie aus der Tabelle hervorgeht, betragen die Ausbeuten an grünem Farbstoff im besten Falle 54 % des angewandten Bilirubins und zwar bei Verwendung einer nur zwei Atomen Sauerstoff auf die Molekel des Bilirubins gleichkommenden Menge von Eisenchlorid. Aus der Analyse der erhaltenen Produkte geht aber hervor, daß bedeutend mehr als zwei Atome Sauerstoff aufgenommen werden. Somit dürfte die sich bildende Ferroverbindung auch hier nur die Rolle eines Sauerstoff übertragenden Mittels spielen.

- 0,1468 g Subst. (120°): 0,3504 g CO<sub>2</sub>, 0,0786 g H<sub>2</sub>O und Spuren Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.  
0,1520 » » : 12,7 ccm N, 724,5 mm B., 13°.
- 0,1583 » » (120°): 0,3794 g CO<sub>2</sub>, 0,0875 g H<sub>2</sub>O u. 0,0012 g Asche,  
worin Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.  
0,1072 » » : 9,2 ccm N, 723 mm B., 16°.
- u. 4. 0,1332 » » (100°): 0,3179 g CO<sub>2</sub>, 0,0742 g H<sub>2</sub>O u. 0,0013 g Asche,  
worin Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.  
0,1414 » » : 11 ccm N, 749 mm B., 12°.
- u. 4. Versuch, die durch Essigsäure zuletzt extrahierten Anteile.  
0,1488 g Subst. (100°): 0,3543 g CO<sub>2</sub>, 0,0795 g H<sub>2</sub>O, 0,0014 g Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.
- 0,1708 » » (110°): 0,4072 » » 0,0885 » » 0,0008 » »  
0,1378 » » (110°): 10,8 ccm N bei 11° und 739 mm B.

6.—12.	0,3135 g	Subst.	: 0,7480 g CO <sub>2</sub> und 0,1693 g H <sub>2</sub> O.
	0,2493 »	»	: 0,5965 » » 0,1380 » »
	0,2065 »	»	: 0,4915 » » 0,1143 » »
	0,1566 »	»	: 12,9 ccm N bei 18° und 750 mm B.

C <sub>32</sub> H <sub>34</sub> O <sub>7</sub> N <sub>4</sub> .	Ber.:	65,5% C	5,8% H	9,55% N
	Gef.:	1. 65,1	5,95	9,4
		2. 65,86	6,20	9,6
		3. u. 4. 65,73	6,26	9,19
		3. u. 4. 65,55	6,00	—
		5. 65,33	5,8	9,1
		6.—12. 65,07	6,0	9,4
		65,26	6,15	—
	64,92	6,15	—	

Aus diesen auf aschefreie Substanz bezogenen Analysen läßt sich die Formel C<sub>32</sub>H<sub>34</sub>O<sub>7</sub>N<sub>4</sub> berechnen, wenn auch C<sub>32</sub>H<sub>36</sub>O<sub>7</sub>N<sub>4</sub> nicht ganz ausgeschlossen ist, die 6,12% H verlangen würde. Sie erscheint mir aber weniger wahrscheinlich, und ich möchte daher das neue Oxydationsprodukt des Bilirubins als ein Dehydrooxybilirubin ansprechen. Es löst sich reichlich nur in konzentrierter Essigsäure mit grüner Farbe, verliert aber beim Lagern auch für dieses Mittel die Löslichkeit, in kaltem Alkohol ist es kaum löslich, etwas besser — mit blaugrüner Farbe — in siedendem und scheidet sich aus der heißen Lösung in deutlich abgegrenzten Partikelchen beim Erkalten ab. In anderen organischen Lösungsmitteln (Äther, Chloroform, Dimethylanilin), sowie in Wasser, ist es unlöslich. In Alkalien, auch in Natriumbicarbonat, ist es löslich und zwar in Natronlauge und Ammoniak mit grünbrauner Farbe.

Bei einigen quantitativen Versuchen zeigte es sich, daß zwei Moleküle Alkali nicht ausreichen, um ein Molekül Dehydrooxybilirubin in 1%ige wässrige Lösung zu bringen. Möglichst neutrale Lösungen des Farbstoffs in verdünnter Kalilauge werden durch Baryum-, Magnesium- und Silbersalze nicht vollständig gefällt, dies gelang nur mit Ferroammonsulfat. Doch enthielt keine der Fällungen den berechneten Metallgehalt, wahrscheinlich wurde ein kleiner Teil des Kaliums nicht ersetzt. Das Ferro- und das Silbersalz waren in Alkalien kolloid löslich. Bemerkenswert ist, daß höchstens drei Atome Silber



aufgenommen werden, während Bilirubin ein Salz mit fast 4 Atomen gibt.

1 g Dehydrooxybilirubin vom fünften Versuch wurde mit 100 g Wasser und einem kleinen Überschuß von Ammoniak gelöst und die filtrierte Lösung im Vakuum unter Schwefelsäure belassen, bis das überschüssige Ammoniak abgedampft war, worauf durch 200 ccm  $\frac{1}{2}$ °iger Silbersulfatlösung gefällt und der entstandene Niederschlag abfiltriert wurde. Das Filtrat war hier nur schwach gelb gefärbt. Beim Auswaschen ging der voluminöse Niederschlag in dem Moment in kolloide Lösung, als die Elektrolyten entfernt waren. Er wurde im Vakuum und für die Analyse noch bei 100° getrocknet, wobei ein Gewichtsverlust von 6,28% stattfand.

0,2420 g Substanz (100°): 0,3743 g CO<sub>2</sub>, 0,0832 g H<sub>2</sub>O und 0,0773 g Ag<sup>1</sup>)

Ber. für C<sub>33</sub>H<sub>31</sub>Ag<sub>3</sub>O<sub>7</sub>N<sub>4</sub>: 42,46% C, 3,4% H, 35,64% Ag

Gef.: 42,18% > 3,8% > 32,21% >

Dieses Silbersalz ließ sich durch Cyankalium in Lösung bringen, durch Kalilauge entstand eine kolloide Lösung, aus welcher Jodkalium Jodsilber fällte. Durch weitere Einwirkung von Eisenchlorid auf die essigsäure Lösung des Dehydrooxybilirubins findet eine allmählich sich vollziehende Umwandlung in einen in Essigsäure unlöslichen Körper statt, der mit «Bilinigrin» identisch sein dürfte, da er wie dieses unlösliche Alkalisalze bildet.<sup>2)</sup>

Einige Reaktionen des Dehydrooxybilirubins sind bereits in der Einleitung beschrieben worden.

## II. Über das Bilinigrin.

Mit «Bilinigrin» haben wir den schwarzen, in Essigsäure unlöslichen Körper bezeichnet, der bei der Oxydation des Bilirubins durch Eisenchlorid entsteht und nach der Entfernung unveränderten Bilirubins durch Chloroform und des Dehydrooxybilirubins durch Essigsäure zurückbleibt. Dieser Rückstand erwies sich auch in allen anderen gebräuchlichen organischen

<sup>1)</sup> Die Asche enthielt etwas Eisen, sie wurde in Salpetersäure gelöst und das Silber als AgCl gefällt, gefunden 0,1026 g.

<sup>2)</sup> Vgl. S. 12.

Lösungsmitteln als nicht löslich, eine krystallinische Struktur zeigte er nicht. Die Analyse des wie angegeben isolierten Körpers wies auf eine durch die Formel ( $C_{16}H_{16}O_5N_2$ ) wiederzugebende Zusammensetzung.<sup>1)</sup>

I. 0,1645 g Substanz:	0,3656 g $CO_2$ und	0,0740 g $H_2O$ .	
0,1400 »	»	: 12 ccm N bei 22° und 744 mm B.	
II. 0,2402 »	»	: 0,5341 g $CO_2$ und 0,1095 g $H_2O$ .	
0,1280 »	»	: 10,3 ccm N bei 21° und 748 mm B.	
III. 0,2493 »	»	: 0,5553 g $CO_2$ und 0,1169 g $H_2O$ .	
0,1163 »	»	: 9,5 ccm N bei 18° und 746 mm B.	
Ber. ( $C_{16}H_{16}O_5N_2$ ) <sub>x</sub> :	60,7% C	5,06% H	8,86% N
Gef.:	I. 60,61	4,98	9,4
	II. 60,64	5,06	8,96
	III. 60,75	5,21	9,2

Diese Präparate gaben indessen an Alkalien noch etwas Substanz ab, und es kann daher die Formel nicht als endgültig bewiesen angesehen werden.<sup>2)</sup> Es ist nämlich bemerkenswert und wichtig wegen der Analogie mit dem Bilihumin, d. h. mit dem bei der Aufarbeitung der Gallensteine als in jedem Lösungsmittel unlöslichen Rückstande, daß das Bilinigrin unlösliche Alkalisalze bildet.

Wir machten diese Beobachtung bei dem Versuch, die letzteren zu gewinnen, und stellten zunächst fest, daß der bei der Einwirkung von Sodalösung erhaltene Farbstoff aschehaltig geworden war und dann, daß nach dem Schütteln von 0,5 g Bilinigrin mit 10 ccm n- $Na_2CO_3$ -Lösung und 50 ccm Wasser in den Filtraten nur noch 8,4 ccm n-Alkali vorhanden waren. 0,5 g Bilinigrin hatten also zur Neutralisation 1,6 ccm n-Alkali oder 0,0368 g Na verbraucht, woraus sich berechnet, daß ein Grammatom Natrium in 312 g des Farbstoffs enthalten war, was mit dem durch obige Formel repräsentierten Äquivalentgewicht (316) merkwürdig gut übereinstimmte. Es wurden nun 5,4 g des rohen Bilinigrins mit überschüssiger Natrium-

<sup>1)</sup> Die geringe Aschenmenge ist abgezogen worden.

<sup>2)</sup> Auch nach anscheinend erschöpfender Behandlung mit Chloroform gab ein Präparat von Bilinigrin an Soda noch Bilirubin und zwar erst nach längerer Einwirkung ab, welche Beobachtung dafür spricht, daß beide Farbstoffe sich enger miteinander verbinden können.

carbonatlösung geschüttelt und das unlösliche Salz mit Wasser ausgekocht, wonach 5,42 g zurückblieben.

1,02 g dieses Salzes gaben dann an HCl 0,1763 g NaCl ab = 0,0693 g Na.

Ber.  $C_{16}H_{15}NaO_5N_2$ : 6,8% Na. Gef.: 6,7% Na.

Auf gleichem Wege wurde das Kaliumsalz dargestellt und aus 0,5 g Bilinigrin 0,53 g des Salzes erhalten.

0,530 g Substanz, mit Salzsäure zersetzt, gaben 0,1112 g KCl = 0,0582 g K.

Ber.  $C_{16}H_{15}KO_5N_2$ : 11,02% K. Gef.: 10,98% K.

Beim Schütteln dieser unlöslichen Salze mit einer Silbernitratlösung trat Silber an Stelle der Alkalien, ein vollständiger Ersatz wurde bei zweimaliger Einwirkung erreicht.

Ein solches Silbersalz gab bei der Analyse folgende Werte:

0,2173 g Substanz (100°): 0,3627 g  $CO_2$ , 0,0754 g  $H_2O$  und 0,0567 g Ag.

Ber.  $C_{16}H_{15}AgO_5N_2$ : 45,39% C, 3,55% H, 25,53% Ag.

Gef.: 45,52% > 3,86% > 26,09% >

Zu bemerken ist noch, daß beim Schütteln von Bilinigrin mit sehr verdünnten Alkalicarbonatlösungen nur die Hälfte der Kaliummenge aufgenommen wurde, die aus einer konzentrierteren Lösung eintrat. Ein ganz analoges Verhalten wurde beim Bilihumin festgestellt. Die Analyse eines Kaliumsalzes, das aus Bilinigrin durch Einwirkung einer  $1/10$ -n-Kaliumcarbonatlösung hervorging, ergab:

0,4357 g Substanz lieferten 0,0410 g KCl = 0,0215 g K = 4,94% K.

Der aus den Alkalisalzen durch Einwirkung von Salzsäure wiedergewonnene Farbstoff gab dann bei der Analyse von den aus der Formel  $C_{16}H_{16}O_5N_2$  berechneten abweichende Werte. Es ist nicht ausgeschlossen, daß die Salzsäure das Bilinigrin selbst angegriffen hatte, wie es denn auch bei der Einwirkung von stärkeren Alkalien zu einer Zersetzung unter Abspaltung von Ammoniak kommt.

0,778 g Bilinigrin wurden mit 250 ccm 1%iger Natronlauge längere Zeit gekocht, wobei vollständige Lösung nicht erzielt wurde, hierbei destillierten zunächst 0,6 ccm n- $NH_3$ , am zweiten Tage noch 0,29 ccm über. Diese entsprechen 0,01246 g N oder, da 0,07 g N vorhanden waren, etwa 18% des vorhandenen Stickstoffs. Das Bilinigrin spaltet also wohl ebenfalls wie Bilirubin und Dehydroxybilirubin  $1/4$  des in ihm enthaltenen Stickstoffs ab, aber sehr viel langsamer.

Das Auftreten von Hämaminsäure konnte bei dieser Zersetzung nicht festgestellt werden.

Bei weiterer Einwirkung von Eisenchlorid auf Dehydrooxybilirubin wurde in sehr geringer Menge ein Körper erhalten, der ein unlösliches Natriumsalz gab, aus dessen Analyse vielleicht die Identität mit Bilinigrin gefolgert werden kann.

2,7 g Dehydrooxybilirubin vom Versuch 3 und 4 wurden in essigsaurer Lösung 4 Stunden nach Zusatz von 10 ccm offizineller Eisenchloridlösung erwärmt, wobei sich ein Niederschlag in der Menge von 0,45 g bildete. Er wurde säure- und eisenfrei gewaschen und dann mit 5%iger Sodalösung behandelt, wobei 0,16 g eines unlöslichen Natriumsalzes zurückblieben.

0,1417 g Substanz (120°) gaben durch Behandlung mit verd. Salzsäure 0,0220 g NaCl; die Substanz enthielt mithin 6,14% Na.

### III. Die Aufarbeitung von Gallensteinen

ist des öfteren von mir behandelt worden. Den früher gemachten Beobachtungen möchte ich noch hinzufügen, daß sich die Extraktion des Pulvers in der von H. Fischer<sup>1)</sup> beschriebenen Röhre an Stelle des Soxhletschen Extraktionsapparates sehr bewährt hat, und daß dem mit Eisessig extrahierten «Choleprasin» stets Bilirubin beigemischt ist. Wird nämlich das getrocknete rohe Choleprasin mit Chloroform ausgezogen, so geht eine grün gefärbte Substanz in Lösung, die beim Aufnehmen in Essigsäure Bilirubin hinterläßt.

Bei einer vor 1<sup>1</sup>/<sub>2</sub> Jahren vorgenommenen Aufarbeitung von 600 g Gallensteinen wurde nun so verfahren, daß nach der Behandlung mit Äther, Wasser, verdünnter Essigsäure, Äther und Alkohol der jetzt frei gemachte Teil des Bilirubins durch Chloroform extrahiert wurde, wobei 97 g eines hellorangerot gefärbten rohen Präparates gewonnen wurden, das sich im Extraktionskolben abgesetzt hatte, leichter lösliche Teile waren nur in sehr geringer Menge (3,5 g) vorhanden. Die

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 73, S. 216 (1911).

Reinigung des rohen Bilirubins erfolgte hier nur durch eine Behandlung mit konzentrierter Essigsäure in der Wärme und durch Auswaschen mit Alkohol, wonach 91,5 g hinterblieben.

Die Analyse dieses Präparates ergab keine befriedigende Übereinstimmung mit den aus der Formel  $C_{32}H_{36}O_6N_4$  berechneten Werten:

0,1496 g Substanz (110°): 0,3619 g  $CO_2$ , 0,0788 g  $H_2O$ .

Spuren Asche = 65,98% C u. 5,86% H.

0,1153 g Substanz (110°): 9,7 ccm N bei 16,5° u. 745 mm B = 9,6% N.

0,2003 g Substanz (110°): 0,0016 g AgCl (Carius) = ca. 0,2% Cl.

Schwefel ließ sich nicht nachweisen.

Ein Teil des Präparates wurde darauf in verdünnter Natronlauge gelöst und die übrigens restlos filtrierende Lösung durch verdünnte Schwefelsäure gefällt; dieses  $SO_4$ -frei gewaschene und im Vakuum getrocknete Präparat stellte muschlig brechende, fast schwarzrote Stücke vor und sah im gepulverten Zustande dunkelrotbraun aus. Eine Reinigung war auf diese Weise aber nicht geglückt.

0,1597 g Substanz (120°): 0,3868 g  $CO_2$ , 0,0793 g  $H_2O$ , 0,0006 g Asche  
= 66,3% C und 5,54% H.

Erst eine Umkrystallisation nach folgendem Verfahren führte zum Ziel.

Es wurde je 1 g Bilirubin und Chinin mit 100 ccm Chloroform bis zur Lösung geschüttelt, was etwa im Verlauf einer halben Stunde erreicht war, worauf filtriert und etwa die Hälfte des Chloroforms vorsichtig abdestilliert wurde. Die konzentrierte Lösung wurde in 250 ccm siedenden Eisessigs eingetragen. Läßt man nun auf dem Wasserbade stehen, bis das Chloroform fast verdunstet ist, so krystallisiert das Bilirubin in rhombischen Säulen und in langgestreckten Nadeln aus. Es wird von der dunkelgrünen Lösung abfiltriert, mit Essigsäure und mit Alkohol bis zum Verschwinden der Chininreaktionen ausgewaschen und im Vakuum getrocknet. Hierbei wurden aus 1 g Rohbilirubin durchschnittlich 0,7 g reines Bilirubin von rotbrauner Farbe erhalten.

- I. 0,1247 g Substanz (120°): 0,3067 g CO<sub>2</sub>, 0,0713 g H<sub>2</sub>O.  
 0,1345 » » (120°): 11,2 ccm N bei 15° und 745 mm B.
- II. 0,2972 » » : 0,7311 g CO<sub>2</sub> und 0,1672 g H<sub>2</sub>O.<sup>1)</sup>  
 0,0689 » » : 6,2 ccm N bei 11° und 720 mm B.
- C<sub>32</sub>H<sub>36</sub>O<sub>6</sub>N<sub>4</sub>. Ber.: 67,16% C, 6,29% H, 9,79% N  
 Gef.: I. 67,14% » 6,35% » 9,56% »  
 II. 67,09% » 6,26% » 10,3% »

Aus dem anfangs hellorange gefärbten Rohprodukt war also, was die Farbe betrifft, einmal ein amorphes Präparat von dunkelroter Farbe, das andere Mal ein kristallisiertes, braunrotes Bilirubin hervorgegangen. Es ist daher wohl nicht angängig, wegen der verschiedenen Farbe verschiedene Namen zu geben, wie es M. Piëtre<sup>2)</sup> getan hat, der ein Biliflavin vom Bilirubin unterscheidet, zumal wenigstens unser Rohprodukt Beimengungen enthielt, und die Angabe von Piëtre, daß aus Bilirubin bei der alkalischen Hydrolyse Fettsäuren entstehen, vermuten läßt, daß ein nicht gereinigter Farbstoff verwendet wurde.

Schließlich wurde auch die Leichtlöslichkeit des Ammoniaklagerungsproduktes in Methylalkohol<sup>3)</sup> mit Erfolg zur Reinigung des Rohbilirubins benutzt, eine Methode, die den Vorteil bietet, mit verhältnismäßig hochkonzentrierten Bilirubinlösungen arbeiten zu können.

1 g Rohbilirubin wurde mit 10 ccm Methylalkohol überschichtet und auf die Suspension trockenes Ammoniakgas geleitet, wodurch sich der Farbstoff augenblicklich löst. Die ohne Rückstand filtrierte Lösung wurde dann mit Äther gefällt und der hellrot gefärbte Niederschlag abgesaugt und mit Äther gewaschen.<sup>4)</sup> Beim Trocknen im Vakuum färbte er sich dunkelrot und erschien an den Rändern wie geschmolzen. Es tritt

<sup>1)</sup> Das zweite Präparat stammte von einem anderen Rohbilirubin her.

<sup>2)</sup> C. r. de l'Acad. des sciences, Bd. 148, S. 1213; Chem. Centralbl., 1909, II, S. 135.

<sup>3)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 82, S. 476 (1912).

<sup>4)</sup> Aus den Filtraten schied sich beim Stehen in der Kälte zunächst noch etwas Substanz ab, die sich rasch grün färbte. Dann kristallisierte aber nach dem Abdestillieren des Äthers ein hellorange gefärbter Körper in sehr geringer Menge aus, dessen Analyse noch aussteht.

also augenscheinlich ein Verlust von Ammoniak ein, doch enthält das so getrocknete Präparat noch ein Molekül Ammoniak, das erst bei höherer Temperatur abgegeben wird.<sup>1)</sup>

0,2087 g Substanz (i. V.): 21,4 ccm N bei 8° und 745 mm B.

$C_{32}H_{36}O_6N_4NH_3$ . Ber.: 11,88% N. Gef.: 12,13% N.

0,5283 g Substanz (i. V.) verloren bei 110° 0,0133 g = 2,51%.

Ber. f. 1 Mol.  $NH_3$ : 2,88%.

0,1352 g Substanz (110°): 0,3332 g  $CO_2$  und 0,0811 g  $H_2O$ ; keine Asche.

0,1715 g Substanz (110°): 14,8 ccm N, 6° und 744 mm B.

$C_{32}H_{36}O_6N_4$ . Ber.: 67,16% C, 6,29% H, 9,79% N.

Gef.: 67,21% C, 6,66% H, 10,28% N.

Die weitere Aufarbeitung der Gallensteine lieferte dann 22,2 g eines prachtvoll rotbraun gefärbten rohen Bilirubins, nachdem mit Hilfe von siedendem Eisessig das Choleprasin herausgelöst worden war.<sup>2)</sup>

Dieses rohe Bilirubin, das also vielleicht mit dem Choleprasin eine Verbindung bildet, die erst durch die heiße, konzentrierte Essigsäure gespalten wird, gab nun nach der Behandlung mit Essigsäure und Alkohol sofort, also ohne Umkrystallisation, auf die Formel  $C_{32}H_{36}O_6N_4$  stimmende Werte.

0,1320 g Substanz (110°): 0,3230 g  $CO_2$ , 0,0721 g  $H_2O$  und 0,0004 g Asche.

0,1423 g Substanz (110°): 0,3498 g  $CO_2$ , 0,0823 g  $H_2O$ .

0,1345 g Substanz (110°): 11 ccm N bei 15° und 749 mm B.

0,1237 g Substanz (110°): 10,5 ccm N bei 15° und 745 mm B.

$C_{32}H_{36}O_6N_4$ . Ber.: 67,16% C, 6,29% H, 9,79% N.

Gef.: 66,95% C, 6,1% H, 9,4% N.

67,04% C, 6,43% H, 9,74% N.

Ein kleinerer Teil des Gallensteinpulvers, dem die Hauptmenge des Bilirubins und Choleprasins, wie soeben beschrieben, entzogen worden war, wurde nun in zwei Portionen noch so-

<sup>1)</sup> l. c., S. 476 wurde ein Gewichtsverlust von 10,22% ermittelt, damals wurde die methylalkoholische Lösung im Vakuum zur Trockene gebracht. Durch das Fällen mit Äther dürfte es also bereits zur Ammoniakabspaltung gekommen sein. Die Fällung mit Äther dürfte aber vorzuziehen sein, wenigstens krystallisierte der beim Erhitzen des Bilirubin-Ammoniak erhaltenen Farbstoff aus Chloroform sehr schön.

<sup>2)</sup> Die gleiche Beobachtung, d. h. die Herausnahme eines hellorange gefärbten Bilirubins nach der Behandlung mit verdünnter Essigsäure, die Extraktion eines rotbraunen Bilirubins nach Behandlung mit heißer, konzentrierter Essigsäure haben wir neuerdings wieder machen können.

lange abwechselnd mit Eisessig und Chloroform behandelt, bis diese beiden Lösungsmittel so gut wie keine Substanz mehr herausnahmen.

Je 5 g dieses Materials wurden alsdann mit Sodalösung geschüttelt, vom Ungelösten filtriert und der Filtrerrückstand mit heißem Wasser gewaschen, bis nur noch Spuren von Farbstoff in Lösung gingen und das Ablaufende gegen Methylrot alkalische Reaktion nicht mehr zeigte. Es hinterblieben 4 resp. 4,3 g, die reichliche Mengen von Natrium enthielten, wie aus der Aschenanalyse hervorging.

Es enthielt nämlich der nicht mit Soda behandelte Teil:

- I. 0,5 resp. II. 1,12% unlösliche Asche (hauptsächlich Eisenphosphat).  
 I. 0,6347 g Substanz gaben 0,0032 g Asche.  
 II. 0,4085 » » » 0,0046 » »

Der mit Soda behandelte Teil enthielt:

- I. 0,6% unlösliche und 7,1% lösliche Asche.  
 II. 1,37 resp. 9,52%  
 I. 0,4923 g Substanz: 0,0379 g Gesamtasche, wovon 0,0030 g unlöslich.  
 II. 0,5253 » » : 0,0572 » » » 0,0072 » »

Beim Behandeln der beiden Natriumsalze mit verdünnter Salzsäure wurde außer geringen Mengen organischer Substanz das Natrium entfernt.

Natriumsalz I enthielt 4,46% N, II. 4,0% Na.

- I. 0,2317 g Substanz gaben 0,0270 g NaCl, daraus 0,0319 g  $\text{Na}_2\text{SO}_4$   
 (statt 0,0328 g).  
 II. 2,45 » » » 0,25 » »

Ein anderer Teil des erschöpfend extrahierten Gallensteinpulvers wurde mit 5%iger Kalilauge behandelt, wobei von je 5 g: I. 4,35, II. 4,3 g nach dem Auswaschen hinterblieben. Die beiden Präparate gaben an 5%ige Kalilauge so gut wie keine Substanz mehr ab und enthielten:

I. 6,98% K. II. 6,2% K.

- I. 1,2638 g Substanz: 0,1685 g KCl. II. 1,4065 Substanz: 0,1661 g KCl.

Durch Schütteln des Gallensteinpulvers mit  $\frac{1}{10}$ -n-Kaliumcarbonatlösung wurde dagegen ein Kaliumsalz mit nur 3,05% K erhalten.

- II. 0,4715 g Substanz: 0,0275 g KCl.



Wurden die Kaliumsalze mit einer Silbernitratlösung geschüttelt, so fand ein Ersatz des Kaliums durch Silber statt, doch gelang eine vollständige Verdrängung des Alkalis nicht. Durch Behandlung mit Cyankaliumlösung konnte alsdann wieder das gesamte Silber herausgenommen und durch Kalium ersetzt werden, aber nur wenn frisch hergestellte Silbersalze verwendet wurden.

Die aus den Natriumsalzen durch Einwirkung stark verdünnter Salzsäure wieder zurückgewonnene organische Substanz erwies sich als nicht mehr völlig identisch mit dem Ausgangsmaterial, insofern jetzt konzentriertere Laugen wieder einen kleinen Teil in Lösung überführten.

I.	0,1635 g Substanz	(120°):	0,3609 g CO <sub>2</sub> ,	0,0882 g H <sub>2</sub> O	und eine sehr geringe Menge Asche.
	0,2090 »	»	(120°):	19,4 ccm N bei 13°	und 742,6 mm B.
	0,2038 »	»	(120°):	19,0 » » » 10°	» » 746 » »
II.	0,1462 »	»	(120°):	0,3161 g CO <sub>2</sub> ,	0,0805 g H <sub>2</sub> O u. 0,0030 g Asche
	0,1825 »	»	(120°):	18,3 ccm N bei 12°	und 748,5 mm B.
	0,1157 »	»	(120°):	11,4 » » » 6°	» » 747 » »

Aus diesen Analysen berechnet sich:

I. 60,26% C, 6,0% H, 10,7 und 10,96% N.

II. 60,2% » 6,25% » 11,7 » 11,7% »

Es konnte somit der höhere Stickstoffgehalt gegenüber dem «Bilinigrin» in Beziehung stehen zu der Tatsache, daß das Bilinigrin mehr Alkali aufzunehmen imstande ist, als das «Biliumin», d. h. das letztere konnte ein Ammoniumsalz sein, das weder durch konzentrierte Essigsäure noch durch Soda-lösung zerlegt worden war.

So wurde denn ein weiterer Teil des erschöpfend mit Chloroform und Eisessig behandelten Gallensteinpulvers nach Verlauf von  $\frac{3}{4}$  Jahren in Arbeit genommen, wobei es sich zunächst zeigte, daß jetzt an Essigsäure wieder Substanz abgegeben wurde. Sie erwies sich als «Choleprasin», denn bei der Behandlung mit Salzsäure wurde sie zerlegt und die salzsaure Lösung gab beim Eindampfen denselben an Fleischextrakt erinnernden Geruch wie das Choleprasin bei der gleichen Zersetzung. Als dann mit Essigsäure wieder erschöpfend extrahiert worden war, wobei etwa 10% des verwendeten Gallenstein-

pulvers herausgenommen wurden, wurde der Rest mit verdünnter Salzsäure bei Z. T. behandelt.<sup>1)</sup> In der Tat ließ sich leicht nachweisen, daß hierbei Ammoniak abgespalten wurde, die Menge desselben war aber sehr gering: aus 2,465 g wurden nur 0,0284 g Platinsalmiak erhalten. Immerhin war insofern eine bemerkenswerte Einwirkung erfolgt, als nunmehr bei der Behandlung mit Alkalien Salze entstanden, deren Metallgehalt mit dem übereinstimmte, den die Salze des Bilinigrins aufweisen.

2 g Substanz wurden mit 5%iger Sodalösung geschüttelt, wobei etwa 0,1 g in Lösung ging, die Ausbeute an erschöpfend ausgewaschenem Natriumsalz betrug 1,85 g.

1,7055 g Subst. enthielten 0,11704 g Na (gef. 0,3613 g  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) = 6,86% Na.

Weitere 2 g Substanz wurden mit 0,7%iger Pottaschelösung behandelt, wodurch ebenfalls etwa 5% gelöst wurden. Ausbeute 1,8 g unlösliches Kaliumsalz.

1,7912 g Subst. enthielten 0,1004 g K (gef. 0,02240 g  $\text{K}_2\text{SO}_4$  = 5,6% K.<sup>2)</sup>

Es ist bemerkenswert, daß hier die Mengen Kalium und Natrium im Verhältnis von 1 Atom Kalium zu 2 Atomen Natrium stehen, da  $\frac{6,86 \cdot 39}{23 \cdot 2} = 5,76$  ist, wie denn auch beim Bilinigrin

<sup>1)</sup> Bei höherer Temperatur wird die Substanz durch Salzsäure stark angegriffen.

<sup>2)</sup> Die Zerlegung der Salze wurde mit verdünnter Salzsäure bewirkt und hierbei eine farblose Lösung erhalten, die beim Eindampfen neben KCl resp. NaCl organische Substanz zurückließ, wie sich bei gelindem Glühen des Rückstandes herausstellte. Wurde jetzt das Alkalichlorid mit Wasser entfernt und die verbleibende Asche geglüht, so hinterblieb Ferriphosphat. Beim Eindampfen der Lösung des Alkalichlorids und Glühen des Rückstandes zeigte sich, daß immer noch etwas organische Substanz beigemischt war, welche abermals Ferriphosphat hinterließ. Aus 1,7055 g des Natriumsalzes wurden z. B.  $0,0220 + 0,0086 = 0,0306$  oder 1,8% erhalten, während die Menge der organischen Substanz schätzungsweise  $0,1 + 0,04$  g betrug. Es geht also zunächst ein Körper in Lösung, der aus organischer Materie verbunden mit Ferriphosphat besteht.

Endlich ist zu bemerken, daß auch das nach zweimaligem Glühen erhaltene Alkalichlorid noch eine Beimengung, vielleicht von Ammoniumchlorid, enthalten muß.

0,198 g KCl gaben nämlich nur 0,2240 g  $\text{K}_2\text{SO}_4$  statt 0,231 g.  
 0,309 > NaCl > > > 0,3613 >  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  > 0,376 >.

gefunden wurde, daß beim Behandeln mit sehr verdünnter Carbonatlösung nur die Hälfte der Menge des Metalls aufgenommen wird, die aus konzentrierteren Lösungen übertritt.

Das aus dem Natrium resp. Kaliumsalz zurückgewonnene «Bilihumin» zeigte folgende Zusammensetzung:

1. 60,22% C, 6,17% H, 11,52% N (auf aschefreie Substanz berechnet),
  2. 60,23% » 5,6% » 10,96% » ( desgl. ),
- 0,1687 g Substanz (100°): 0,3672 g CO<sub>2</sub>, 0,0923 g H<sub>2</sub>O und 0,0024 g Asche (Ferriphosphat),
- 0,1450 » » (100°): 0,3161 » » 0,0777 » » und 0,0018 g Asche (Ferriphosphat),
- 0,1923 » » (100°): 18,4 ccm N bei 6° und 741,5 mm B.
- 0,1580 » » (100°): 14 » » » 2° » 750 » »

Durch die Behandlung mit der verdünnten Salzsäure war also die Zusammensetzung nicht wesentlich geändert worden, obgleich viel mehr Natrium aufgenommen worden war, als vor der Behandlung. Durch langes Erhitzen mit 25%iger Salzsäure wurde dagegen ein beträchtlicher Teil dieses «Bilihumins» in Lösung gebracht. Nachdem dann die salzsaure Lösung eingedampft, der Rückstand in Wasser gelöst, die filtrierte Lösung wiederum verdampft und das Verfahren oftmals wiederholt worden war, ergab sich ein auch in Alkohol löslicher Rückstand. Diese alkoholische Lösung wurde in Äther eingetragen, wobei eine Fällung entstand. Doch enthielt auch die alkoholisch-ätherische Lösung Substanz und zwar ein phosphorhaltiges Fett, das nicht in Äther, wohl aber in Aceton löslich war. Die Fällung wurde mit Aceton aufgenommen, wobei Chlorammonium zurückblieb, während nach dem Verdampfen des Acetons ein Sirup erhalten wurde, dessen Geruch an Fleischextrakt erinnerte. Es handelte sich also um dieselben Spaltprodukte, wie sie auch aus dem Choleprasin erhalten wurden.

Der durch Behandeln des «Bilihumins» mit konzentrierter Salzsäure nicht in Lösung zu bringende Anteil gab bei der Analyse folgende Werte:

- 62,73% C, 5,48% H, 9,8% N (auf aschefreie Substanz berechnet).
- 0,1438 g Substanz (110°): 0,3292 g CO<sub>2</sub>, 0,0706 g H<sub>2</sub>O, 0,0007 g Asche.
- 0,1437 » » (110°): 12,5 ccm N bei 14° und 726 mm B.

Die Asche enthielt nur Eisen, keine Phosphorsäure. Wurde der gegen Salzsäure beständige Teil des Bilihumin auf konzentrierte Schwefelsäure gestreut, so trat langsam eine Auflösung ein und jetzt bewirkte ein Tropfen Salpetersäure eine Rotfärbung. Danach liegt in diesem Teil ein Derivat des Bilirubins vor, dem wohl das «Bilihumin» die Fähigkeit verdankt, unlösliche Salze mit den Alkalien zu bilden. Die Ähnlichkeit in dieser Beziehung mit dem Bilinigrin, das wir durch Oxydation des Bilirubins erhielten, könnte dann vielleicht dafür sprechen, daß die Umwandlung des Hämatins im Organismus über das Stadium des Bilirubins hinaus gehen kann. Und zwar immer noch im Verbande mit Umwandlungsprodukten des Globins, denn das «Bilihumin» enthält, wie wir sahen, auch Anteile, die zu Aminosäuren hydrolysiert werden können.

Nachschrift bei der Korrektur.

Die Seite 14 angegebene Methode der Reinigung des Rohbilirubins ist in letzter Zeit dadurch wesentlich vereinfacht und verbessert worden, daß die filtrierte methyllkohol-ammoniakalische Lösung des Bilirubins in eine Kältemischung gestellt wird, wobei sich prachtvoll krystallisiertes Bilirubin-Ammonium abscheidet.

Stuttgart, am 2. April 1914.

---