

Beiträge zur Kenntnis der Gallenfarbstoffe.

VIII. Mitteilung.

Von

William Küster.

Über das Bilirubin.

Nach Versuchen von H. Bauer, K. Reihling und A. Schwaderer †.

(Aus dem Laboratorium für organische Chemie der Technischen Hochschule, Stuttgart.)

(Der Redaktion zugegangen am 28. April 1915.)

Inhalt.

	Seite
Einleitung	136
I. Die Umkrystallisation von Bilirubin	145
II. Die Veresterung von Bilirubin in alkalischer und in saurer Lösung	146
III. Die Salzbildung mit Chlorwasserstoff	149
IV. Einwirkung chlorierter Essigsäuren	151
V. Das Additionsprodukt von Ammoniak an Bilirubin	152
VI. Additionsprodukte mit Metallhalogeniden	156
VII. Einwirkung von Bromwasserstoffsäure	157
VIII. Einwirkung von Diazomethan	159

In der sechsten Mitteilung über das Bilirubin¹⁾ wurden einige Versuche beschrieben, welche die Veresterung desselben betrafen. Die erhaltenen Resultate erweckten den Anschein, daß nur ein Carboxyl direkt verestert worden war, während ein zweites Methyl unter Einlagerung von Methylalkohol eingetreten war, doch waren die Schlüsse dadurch beeinträchtigt, daß die erhaltenen Ester nicht deutlich krystallisierten, ferner ließ die Farbe dieser Ester nicht unmöglich erscheinen, daß eine Oxydation durch den Luftsauerstoff eingetreten war. Bei einer neueren Versuchsreihe schloß nun Herr Reihling den letzteren möglichst aus, doch wichen die unter diesen Bedingungen erhaltenen Resultate nicht wesentlich von den

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 82, S. 477 (1912).

früheren ab.¹⁾ Die Verfärbung der Präparate mußte demnach auf eine andere Ursache zurückzuführen sein, und es lag nahe an eine Wirkung der Säure zu denken, da schon früher von mir beobachtet worden war, daß Bilirubinpräparate unter der Wirkung von Essigsäure eine oberflächliche Ergrünung erkennen ließen. Auch hatte ja schon Malý²⁾ eine Methode zur Darstellung eines «Biliverdins» angegeben, bei der eine Auflösung von Bilirubin in geschmolzener Chloressigsäure der Einwirkung des Luftsauerstoffs ausgesetzt wurde, und dabei auf ein Verfahren von Heinsius und Campbell³⁾ zur Herstellung des gleichen Körpers verwiesen, das in einer Einwirkung eines Gemisches von Chloroform und Eisessig auf Bilirubin bei Luftzutritt bestand. Eine genauere Untersuchung der erhaltenen Präparate und Analysen wurden aber nicht ausgeführt. Eine Wiederholung der Versuche Malýs durch Herrn Reihling zeigte bereits in den Erscheinungen eine nicht unwesentliche Abweichung von den Beobachtungen des genannten Forschers. Einmal erfolgte das Ergrünen des Bilirubins beim Zusammenkommen mit der geschmolzenen Chloressigsäure nicht allmählich, sondern augenblicklich — noch schärfer war das bei der Verwendung von Trichloressigsäure zu beobachten⁴⁾ — und dann trat die Verfärbung auch im Wasserstoffstrom ein. Dagegen war kein Ergrünen zu bemerken, wenn eine Lösung von Bilirubin in den Estern der Mono- oder der Trichloressigsäure der Luftwirkung ausgesetzt wurde. Daraus geht aber hervor, daß Säuren einen Einfluß auf das Bilirubin derart ausüben, daß der Luftsauerstoff rascher einwirken kann. Es ist daher wahrscheinlich, daß im Bilirubin ein inneres Salz vorliegt, daß das Bilirubin somit schwach basische Eigenschaften hat, womit

¹⁾ In alkalischer Lösung gelingt es ebenfalls, Bilirubin zu methylieren, doch tritt auch hierbei allem Anscheine nach eine Veränderung des Bilirubins ein, und die erhaltenen Produkte waren nicht krystallisiert zu erhalten.

²⁾ Liebigs Ann. der Chemie, Bd. 175, S. 85 (1875).

³⁾ Arch. der ges. Physiologie, Bd. 4, S. 497.

⁴⁾ Nach Piëtre löst sich Bilirubin in Trichloressigsäure mit grüner Farbe. C. r. de l'Acad. des sciences, Bd. 147, S. 1492; Chem. C. B., 1909, Bd. 1, S. 538.

auch die Ergebnisse der Titration übereinstimmen,¹⁾ und daß es in dieser Form größere Beständigkeit hat als in der Modifikation, die sich durch Sprengung der inneren Salzbindung unter dem Einfluß von Säuren bestimmter Stärke ergibt, von solchen Säuren nämlich, die nicht stark genug sind, um mit dem Bilirubin selbst ein beständiges Salz zu geben. Chlorwasserstoff vermag das letztere, denn bei der Einwirkung dieses Gases auf eine Lösung von Bilirubin in Chloroform bilden sich Anlagerungsprodukte, von denen sich eines durch die an Canthariden erinnernde Farbe auszeichnet. Auch diese Beobachtungen werden nach Aufklärung der Veränderungen, die sich unter dem Einfluß der chlorierten Essigsäuren im Verein mit dem Sauerstoff der Luft einstellen, bei der Aufstellung eines Bildes für das Bilirubin beachtet werden müssen; die zuletzt erwähnte Beobachtung kann schon jetzt verwertet werden, doch seien zunächst noch die Resultate weiterer Untersuchungen besprochen und die hieraus zu ziehenden Schlüsse in Verbindung mit der von H. Fischer²⁾ aufgestellten Konstitutionsformel für das Bilirubin gebracht, wobei es notwendig ist, auch einige schon früher gewonnene Resultate in den Kreis der Betrachtungen zu ziehen. H. Fischer nimmt auf Grund seiner wichtigen Befunde im Bilirubin vier Pyrrolkomplexe an, von denen zwei ätherartig durch ein Sauerstoffatom verbunden sind, während ein dritter ein Hydroxyl trägt, die restierenden vier Sauerstoffatome sind in zwei Carboxylen enthalten. Der das Hydroxyl tragende Pyrrolring hat nun im Bilde Fischers auf Grund seiner Befunde in $\beta\beta'$ -Stellung ein Methyl und ein Vinyl als Substituenten. Er kann also durch Oxydation nicht Hämaminsäure liefern. Wir fanden aber, daß bei der Einwirkung von Alkalien unter Mitwirkung nur eines Sauerstoffatoms auf die Molekel Bilirubin Abspaltung eines Moleküls Hämaminsäure und einer Molekel Ammoniak erfolgt.³⁾

Dieses Resultat würde die von Fischer angenommene

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 59, S. 64 (1909).

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 89, S. 255 (1914) und Zeitschrift für Biologie, Bd. 65, S. 163 (1914).

³⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 59, S. 66 (1909).

Konstitution nur dann erklären, wenn das ätherartig gebundene Sauerstoffatom in Reaktion träte. Wahrscheinlicher ist daher die Annahme, daß auch dieser zweite Pyrrolring, dessen Substituenten in $\beta\beta'$ -Stellung ein Methyl und das Carboxäthyl sind, in α -Stellung ein Hydroxyl trägt und daß die Verbindung mit dem nächsten Pyrrolring durch eine Bindung von Kohlenstoff zu Kohlenstoff erfolgt, während die Bindung vom Zentralkohlenstoff gelöst ist, was die Möglichkeit, diesen Pyrrolring leicht abzusprengen, erklären und den gegensätzlichen Befund beim Hämatin auch im Bilde zum Ausdruck bringen würde. Lassen doch schon die empirischen Formeln beider Farbstoffe erkennen, daß beim Übergang vom Hämatin zum Bilirubin eine Oxydation eintritt. Daß diese aber nicht nur in einer Vermehrung der Sauerstoffatome besteht, sondern auch eine ganz wesentliche Änderung in der Konstitution hervorbringt, geht aus den so verschiedenen Eigenschaften beider als Farbstoffe hervor. Diese Verschiedenheit muß also bedingt sein durch die Gruppierung, welche den Farbstoffcharakter bedingt, das sind aber die Kohlenstoffatome, welche zunächst im Hämatin die vier hier vorhandenen Pyrrolringe verbinden. Legen wir nun die empirische Formel mit 34 Kohlenstoffatomen dem Hämatin, die mit 32 dem Bilirubin zugrunde,¹⁾ so folgt, daß im Bilirubin zwei von den Kohlenstoffatomen fehlen müssen, die im Hämatin die Verbindung der vier Pyrrolringe bewirken, nicht eins, wie ich früher glaubte,²⁾ da meine Annahme, beim Übergang vom Hämatin zum Bilirubin erfolge eine Abspaltung von Kohlendioxyd, durch unsere Resultate bei der Einwirkung von Diazomethan, auf die ich zurückkomme, widerlegt worden ist. Nehmen wir noch mit H. Fischer hinzu, daß an der Stelle eines dritten, die

¹⁾ Die empirische Zusammensetzung des Ätiophyllins kann im Gegensatz zu der von Willstätter vertretenen Anschauung nicht mehr benutzt werden, um die des Hämins zu berechnen, nachdem meine Vermutung, es könne bei der Darstellung des Ätiophyllins Verlust eines Kohlenstoffatoms eintreten, durch H. Fischers Befund eine starke Stütze erhalten hat, wonach bei der Destillation der Trimethylpyrrol- β -propionsäure eine Abspaltung von Essigsäure an Stelle der erwarteten Abspaltung von Kohlendioxyd sich vollzieht. Diese Zeitschr., Bd. 91, S. 186 (1914).

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 82, S. 404 (1912).

Verbindung zweier Pyrrolkomplexe des Hämatins bewirkenden Methins durch Einlagerung von Wasser Aufspaltung beim Übergang in Bilirubin eingetreten ist, so bleibt im letzteren nur ein Atom Kohlenstoff übrig, das nun drei Pyrrolringe zusammenhält, während der vierte durch eine Kohlenstoffbindung von Ring zu Ring angegliedert ist. In unserem Bilde für das Bilirubin erscheinen dann an zweien der vier Pyrrolringe Hydroxyle, welche Vorstellung für die «aci»-Form des Bilirubins zutreffen mag, die wir beim Freimachen aus dem Zink- oder Ammoniumsalz als in Bicarbonaten löslich erhalten haben. Wahrscheinlich vermag sie auch mehr Ammoniak¹⁾ zu binden, als «gewöhnliches» Bilirubin, das dann als ein im Gleichgewicht befindliches Gemisch zweier isomerer Formen, etwa im Sinne einer Keto-Enol-Isomerie aufgefaßt werden kann, das gegen den Luftsauerstoff beständiger ist als die «aci»-Form. Hierfür sprechen die bei der Oxydation des Bilirubins mit Hilfe von Eisenchlorid von Schmiedel und mir²⁾ beobachteten Erscheinungen, hierfür die Angaben von Piettre,³⁾ wonach Salze des Bilirubins nicht nur durch Chloranil und Chinon, sondern auch durch Brenzcatechin und Hydrochinon eine Veränderung erfahren in dem Sinne, daß tief gefärbte Körper entstehen, hierfür endlich die Befunde von Herrn Reihling, aus denen hervorgeht, daß das Bilirubin ganz so wie aromatische Ketone und Chinone imstande⁴⁾ ist mit Metallhalogeniden tief gefärbte Additionsprodukte zu geben.

Auch die beim Umkrystallisieren des Bilirubins mit Hilfe von Dimethylanilin, sowie die bei der Darstellung des Bilirubinammoniums gemachten Erfahrungen sprechen dafür, daß im

¹⁾ So erklärt sich vielleicht die Beobachtung, daß der beim Eindunsten einer methylalkoholischen Lösung von Roh-Bilirubinammonium entstehende Rückstand mehr Ammoniak enthält, als das Bilirubinammonium, das aus derselben Lösung beim Einstellen in eine Kältemischung auskrystallisiert.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 91, S. 61 (1914).

³⁾ l. c. Ich kann diese Angaben allerdings nur für die erwähnten Chinone bestätigen, und in neutraler Lösung wirken auch diese nicht.

⁴⁾ Vergl. Kurt H. Meyer, Berichte, Bd. 41, S. 2568 (1908); Bd. 43, S. 157 (1910).

Bilirubin ein Gemisch zweier Modifikationen vorliegt. Bei dem ersten Verfahren kommen immer nur etwa zwei Drittel der angewandten Bilirubinmenge im krystallisierten Zustande zur Abscheidung, auch dann, wenn ein frisch umkrystallisiertes Präparat benutzt wurde, das letzte Drittel wird verändert. Die Konstanz dieses Verhältnisses weist darauf hin, daß sich ein durch das Lösungsmittel bedingtes Gleichgewicht der beiden Modifikationen herstellt, von denen dann die eine unbeständig ist.¹⁾

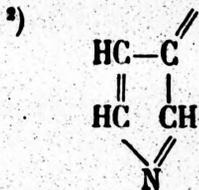
Ein wesentlich anderes Resultat zeitigte die Gewinnung von Bilirubinammonium. Hier beträgt die Ausbeute an krystallisiertem luftbeständigen Material etwa die Hälfte der verwendeten Menge, wenn ein beliebig lange aufbewahrtes Bilirubin benützt worden war. Stellt man aber aus dem Bilirubinammonium wieder Bilirubin her, was durch Kochen mit Chloroform erreicht werden kann, und unterwirft man dieses Bilirubin der gleichen Behandlung, so erhält man das krystallisierte Ammoniumsalz in einer Ausbeute von 76%. Durch das Einhalten niederer Temperaturen und unter dem Einfluß des Ammoniaks dürfte also die eine Modifikation in ihrem Bestehen begünstigt worden sein.

Wahrscheinlich enthalten die Mutterlaugen bei diesem Verfahren die zweite Modifikation als leicht lösliches Ammoniumsalz. Stellt man aus ihm wieder «Bilirubin» her, so zeigt sich, daß es aus drei Anteilen besteht. Ein Teil löst sich nicht mehr in Chloroform und stellt eine fast schwarze Masse vor, es ist weitgehend durch Oxydation während der Operationen verändertes Bilirubin. Der in Chloroform gelöste Farbstoff enthält spielend von diesem Lösungsmittel aufnehmbare Teile, die in Natriumbicarbonat löslich sind, sie stellen also die «aci-Form» vor, während der in Chloroform schwerer lösliche Teil nur in Natriumcarbonat löslich ist. Nach allem ist anzunehmen, daß die Ketoform die beständigere Modifikation des Bilirubins ist. In ihr ist dann nur ein Carboxyl frei, denn das prächtig

¹⁾ Das frisch aus Dimethylanilin umkrystallisierte Bilirubin nimmt fast vier Atome Silber auf, wenn hier also die Monoketoform vorliegt, muß ein Atom Silber Wasserstoff einer Imidgruppe ersetzen.

krystallisierende Ammonsalz enthält nur eine Molekel Ammoniak.¹⁾ Das zweite Carboxyl muß also durch basische Gruppen intramolekular abgesättigt werden. Das könnte nun auch schon durch die Pyrrolkomplexe geschehen, wie sie H. Fischer annimmt. Diese Annahme aber erregt Bedenken, nicht nur durch die Existenz eines Farbsalzes mit Chlorwasserstoff, die m. E. die Annahme eines Pyrrolenkomplexes fordert,²⁾ sondern auch dadurch, daß die Gleichartigkeit der vier Pyrrolkomplexe in den Bildern Fischers für Bilirubin und Mesobilirubin den Unterschied nicht erklärt, den diese beiden Stoffe in Bezug auf die Fähigkeit zur Bildung komplexer Salze aufweisen. In den hierzu nicht befähigten Bilirubin können demnach nicht alle vier Stickstoffatome der vier Pyrrolringe Wasserstoff tragen.³⁾ Da nun ferner das Mesobilirubin bei der Oxydation Methyläthylmaleinimid gibt, das Bilirubin dieses Produkt aber vermissen läßt,⁴⁾ müssen im Bilde beide Unterschiede vereint zum Ausdruck kommen. (Und das ist möglich, wenn wir die von Willstätter⁵⁾ für das Hämin geforderte, hier aber sehr unwahrscheinliche⁶⁾ Brückenbindung durch zwei Kohlenstoffatome annehmen, und zugleich erklären sich die basischen Eigenschaften wie die Leichtaufspaltbarkeit des Bilirubins, ganz abgesehen von Kösters⁷⁾ Befund, daß bei der trockenen Destillation von Bilirubin Pyridin auftreten soll, dadurch, daß jetzt im Bilirubinmolekül neben den Pyrrolringen

¹⁾ Wozu noch bemerkt sein mag, daß es nicht sicher erwiesen ist, ob das Ammoniak überhaupt durch ein Carboxyl gebunden ist.



³⁾ Hierbei ist Voraussetzung, daß die Komplexsalzbildung am Stickstoff erfolgt.

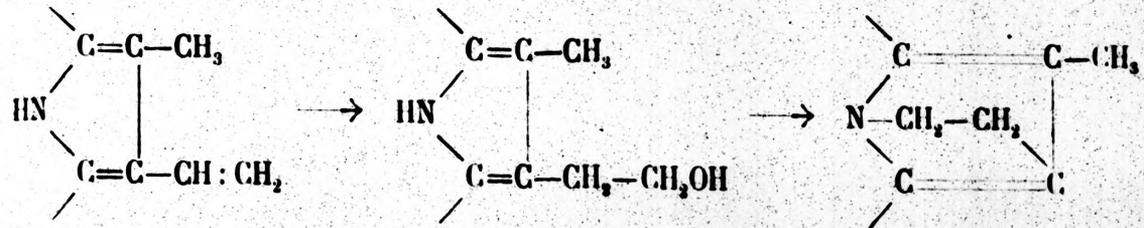
⁴⁾ Unser Befund, daß sich bei der Oxydation von Bilirubin das Imid bildet, ist entweder auf eine Verunreinigung des Bilirubins zurückzuführen, oder auf das Auftreten eines Stoffes, der einen dem «Imid» ähnlichen Geruch aufweist.

⁵⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 87, S. 423 (1913).

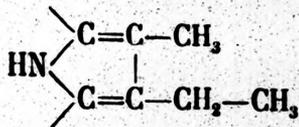
⁶⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 88, S. 377 (1913).

⁷⁾ Dissertation, Rostock 1901.

auch Pyridinringe vorhanden sind. Auch der Übergang der Vinyl- des eisenfrei gedachten Hämatins in die geschilderte Atom- verkettung im Bilirubin ist durch Aufnahme von Wasser und Abspaltung in anderer Richtung leicht zu erklären:



Durch die Reduktion mit Natriumamalgam, die beim Hämin versagt, würde dann unter Sprengung des Pyridin- ringes¹⁾ ein Komplex



entstehen, der bei der Oxydation Methyläthylmaleinimid liefern kann.

Daß nun in der Tat, wie es in der vorstehenden Ab- leitung zur Anschauung gebracht worden ist, die Gruppen, welche bei der Reduktion in Äthyle übergehen, im Hämin in anderer Weise an den Pyrrolring verkettet sind wie im Bili- rubin, geht auch aus dem gänzlich verschiedenen Verhalten beider Stoffe gegenüber Eisessigbromwasserstoff hervor. Be- kanntlich läßt dieses Reagens aus dem Hämin Hämatoporphyrin entstehen, indem zunächst zwei Molekeln Bromwasserstoff addiert und dann unter der Einwirkung von Wasser zwei Bromatome durch zwei Hydroxyle ersetzt werden. Analog liefert Methylalkohol den Dimethyläther des Hämatoporphyrins. Auch Bilirubin geht nun beim Eintragen in Bromwasserstoff-

¹⁾ Daß der Pyridinring leicht aufspaltbar ist, wurde oft beobachtet; unter dem Einfluß von Natriumamalgam erhielten H. Weidel und M. v. Schmidt aus der Cinchomeronsäure (Pyridin 34 Dicarbonsäure) die stickstofffreie Cinchonsäure, die bei der Destillation unter Abspaltung von Kohlendioxyd Dimethylmaleinsäureanhydrid liefert. (Ber. d. d. chem. Ges., Bd. 12, S. 1146 (1879). Beim Bilirubin dürfte die Abspaltung des Stick- stoffs nicht eintreten, weil nach Aufspaltung des Pyridinrings immer noch der Pyrrolring vorhanden ist.

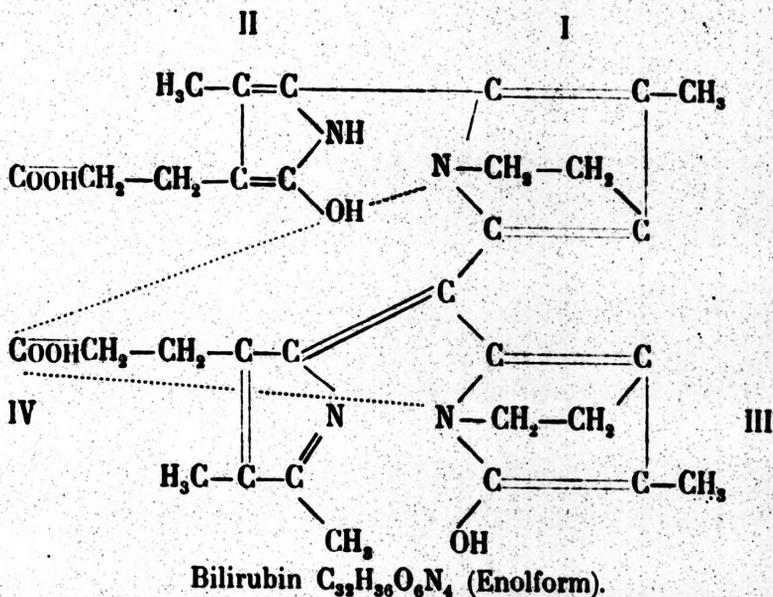
eisessig langsam in Lösung, wobei eine dunkelviolet gefärbte Flüssigkeit entsteht. Behandelt man dann aber nach Abdestillation des Eisessigs den Rückstand mit Methylalkohol, so erhält man keinen Dimethyläther, sondern einen dunkelblau gefärbten, bromhaltigen Körper. Leider ergaben die Analysen bisher keinen Aufschluß über die Natur desselben und eine Wiederholung dieser Versuche ist daher nötig und beabsichtigt. Soviel ist aber sicher, daß von einer Analogie dieser Reaktion beim Hämin und beim Bilirubin nicht die Rede sein kann, und daher müssen die Gruppen, an denen die Addition von Bromwasserstoff im Hämin erfolgt, beim Übergang in Bilirubin eine Änderung erfahren haben.

Das Entstehen eines tiefblau gefärbten Körpers aus dem Bilirubin ist wahrscheinlich allein auf die Wirkung des Eisessigs zurückzuführen, der in seiner Eigenschaft als Säure durch den Bromwasserstoff verstärkt wird. Wir haben hier eine ähnliche Erscheinung vor uns, wie beim Lösen von Bilirubin in Mono- oder Trichloressigsäure, und man wird mit der Annahme nicht fehl gehen, daß die beobachtete Farbvertiefung ihren Grund hat im Entstehen einer neuen Bindung, welche Farbe bedingen kann. Vielleicht findet also z. B. eine Wasserabspaltung statt zwischen dem Methyl des Pyrrolringes IV und dem Sauerstoff des Ketopyrrolringes III, so daß eine neue Methingruppe entsteht.¹⁾

Es ist bereits erwähnt worden, daß die Einwirkung von Diazomethan auf Bilirubin die Anwesenheit zweier Carboxyle in diesem Stoff erwiesen hat. Ich hatte die diesbezüglichen Versuche Mitte Juli 1914 mit Herrn Alfred Schwaderer begonnen. Er fiel am 9. November. An der Fortsetzung der Versuche beteiligte sich dann Herr Dr. H. Bauer, und wir gedenken die sehr interessante Reaktion weiter zu verfolgen, denn es hat sich bereits ergeben, daß außer einer Dimethylierung auch eine Addition von Diazomethan erfolgt. Auch hier ist ein Unterschied gegenüber dem Hämatoporphyrin zu konstatieren, denn letzteres wird nur dimethyliert. An welcher Stelle des Moleküls im Bilirubin die Addition sich vollzieht,

¹⁾ Vergl. das Bild auf S. 145.

ist noch nicht geklärt, und somit muß die Frage offen bleiben, ob das nachstehende Bild des Bilirubins,¹⁾ welches den bisher bekannten Umsetzungen dieses reaktionsfähigen Stoffes einigermaßen Rechnung trägt, auch dieser neuen Beobachtung gerecht werden kann.



Die eingangs erwähnte Reaktion von Säuren bestimmter Stärke auf Bilirubin könnte man sich an der Hand dieses Bildes dann so vorstellen, daß nach Lösung der inneren Salz- bildung zwischen Carboxyl des Ringes 4 und dem Stickstoff des Ringes 3 eine Aufspaltung des im letzteren vorhandenen Pyridinringes eintritt in der Weise, daß der Wasserstoff des Hydroxyls zum Stickstoff wandert. Jetzt entsteht intermediär ein Keten, das sich sofort verändern muß, z. B. durch Kondensation unter Wasseraustritt mit dem Methyl des Komplexes 4, wobei eine neue Gruppierung auftritt, welche die beobachtete Farbvertiefung erklären könnte. Zu gleicher Zeit muß, wie die Erfahrung lehrt, Aufnahme von Sauerstoff eintreten.

Experimenteller Teil.

I. Die Umkrystallisation von Rohbilirubin mit Hilfe von Dimethylanilin hatte bisher eine Ausbeute von 65% des verwendeten Materials an reinem Bilirubin ergeben.²⁾ Herr Reih-

¹⁾ Die Numerierung der Komplexe schließt sich dem Bilde H. Fischers an, diese Zeitschrift, Bd. 89, S. 262 (1914).

²⁾ Dissertation von E. Niethammer, Tübingen 1907.

ling erhielt bei Verwendung an 19 g Rohbilirubin 13,1 g kristallisierten Farbstoff, der sich teils beim Erkalten direkt abgeschieden hatte, teils nachdem das Lösungsmittel zum größten Teil unter vermindertem Druck abdestilliert worden war.

Das frisch umkristallisierte Bilirubin wurde dann abermals mit Hilfe von Dimethylanilin umkristallisiert, wobei aber wieder nur 67,3% der verwendeten Menge auskristallisierten.

Der größte Teil des in Lösung verbleibenden Farbstoffs fällt dann auf Zusatz von Alkohol aus, erweist sich aber als bereits verändertes Bilirubin, ein kleiner Teil bleibt in Lösung. Werden nun die Lösungsmittel abdestilliert und der Rückstand mit Alkohol behandelt, so geht ein Teil desselben in Lösung und dieser entzieht wiederum Petroläther Substanz; nachdem sie zur Entmischung mit etwas Wasser versetzt worden ist. Der Rückstand des Petrolätherauszugs stellte eine braune harzige Masse vor, in der rosettenförmig angeordnete Nadeln eingebettet waren, die nach Entfernung des Harzes mittels wenig Äther isoliert werden konnten. Sie erwiesen sich als unlöslich in 5%iger Sodälösung, ein Cholesterin lag nicht vor, der Schmelzpunkt wurde bei $134-136^{\circ}$ liegend gefunden. Es ist nun bemerkenswert, daß dieser Körper auch auftrat, als das frisch umkristallisierte Bilirubin noch einmal aus Dimethylanilin umkristallisiert wurde. Es hat demnach den Anschein, als ob es sich um ein Zersetzungsprodukt des Bilirubins handelte,¹⁾ doch erschien die Menge desselben nicht vermehrt, nachdem Bilirubin längere Zeit mit Dimethylanilin gekocht worden war. Eine genauere Untersuchung mußte daher unterbleiben.

II. Die Esterifizierung des Bilirubins.

a) In alkalischer Lösung mit Dimethylsulfat.

5 g trockenes Rohbilirubin wurden mit Hilfe von 2,8 g Natriumhydroxyd und 100 g Methylalkohol gelöst und die Lösung

¹⁾ Das Entstehen desselben wurde auch beobachtet, nachdem Bilirubin mit Paraffin auf etwa 200° erhitzt worden war, welcher Versuch ausgeführt wurde, um die Herkunft aus Bilirubin klar zu stellen.

mit 8,8 g Dimethylsulfat¹⁾ versetzt, worauf vier Stunden in einer vollständig gefüllten Glasstöpselflasche geschüttelt wurde. Als nach 2 tägigem Stehen ein geringer brauner Niederschlag entstanden war und das Gemisch neutral reagierte, wurde Äther hinzugefügt und der Methylalkohol gewaschen, wobei sich eine reichliche Abscheidung eines braunen Körpers einstellte. Beim Trocknen mit Natriumsulfat verblieb derselbe beim Trockenmittel und konnte dann durch Auflösen des letzteren in Wasser wiedergewonnen werden (3 g). Er erwies sich als Bilirubin, dem nur wenig Ester beigemischt war: 0,1618 g Substanz (120°) : 0,0206 AgJ = 0,81% CH₃.

Aus der grünbraunen ätherischen Lösung wurde das Lösungsmittel im Wasserstoffstrom entfernt, wonach ein dunkelgrüner, nicht krystallisierter Rückstand in der Menge von 1,5 g hinterblieb. Zur Reinigung wurde er nochmals in Äther gelöst, wobei geringe Mengen schwerer löslicher Substanz zurückblieben. In Chloroform und Aceton löste er sich sehr leicht. Gegen 5%ige Sodalösung war er auch beim Erhitzen beständig, auch Natronlauge löste erst in der Wärme und sehr allmählich.

0,145 g Substanz (i. V.) gaben 0,1133 AgJ = 4,98% CH₃ (Zeisel).

Am Stickstoff war keine Methylierung eingetreten.

In stark alkalisch-methylalkoholischer Lösung gelingt also durch Dimethylsulfat eine Dimethylierung, was bemerkenswert insofern ist, als unter ähnlichen Bedingungen Hämin höchstens ein Monomethylderivat gibt.²⁾ Man könnte also versucht sein daran zu denken, daß beim Bilirubin ein Hydroxyl veräthert worden sei, doch läßt die Natur unseres Produkts sichere Schlüsse nicht zu, jedenfalls ist auch das Bilirubin durch das Alkali verändert worden, worauf schon die Farbe des erhaltenen Derivats hinweist.

Beim Arbeiten in wässrig-alkalischer Lösung (5 g Bilirubin, 2,7 g Natriumhydroxyd, 240 ccm Wasser, 8,7 g Dimethyl-

¹⁾ Auf ein Molekül Bilirubin kamen somit 8 Mol. NaOH und 8 Mol. (CH₃)₂SO₄.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 86, S. 195 (1913).

sulfat) wurden zwar größere Mengen in Äther leicht löslicher Substanz (2,9 g) erhalten, die ebenfalls eine dunkelgrüne Farbe aufwies, dieselbe enthielt aber nur 3,98% CH_3 . Die in Äther schwerer löslichen Anteile, ebenfalls grün gefärbt, enthielten 3,5% CH_3 und bei einem Versuch, sie durch Wiederholung des Verfahrens vollkommen zu methylieren, trat Verseifung ein.

Allem Anschein nach sind die Produkte verschieden, je nachdem in alkoholisch- oder in wässrig-alkalischer Lösung gearbeitet wurde.

b) Die Veresterung des Bilirubins mit Hilfe von Salzsäure und Methylalkohol sei hier nochmals erwähnt, weil der Versuch unter möglichstem Luftabschluß ausgeführt wurde — es wurde in einer Wasserstoffatmosphäre gearbeitet — und trotzdem ein grügefärbtes Produkt, also jedenfalls das Derivat eines veränderten Bilirubins, erhalten wurde, und weil er zeigt, daß Bilirubin im Gegensatz zu der von mir in der früheren Abhandlung¹⁾ vertretenen Ansicht, bereits bei Zimmertemperatur und sehr geringer Säurekonzentration dimethyliert wird.

1 g Bilirubin wurde mit Hilfe von 1 g Chinin in 100 ccm Chloroform gelöst, worauf etwa die Hälfte des Lösungsmittels vorsichtig abdestilliert wurde. Die erkalte Lösung wurde dann in 250 ccm Methylalkohol-Kahlbaum, der 3 g Chlorwasserstoff enthielt, eingetragen, wobei sich eine Trübung einstellte. Auf Zusatz von Äther bildete sich dann eine grünbraune Fällung, die nach 18 Stunden filtriert werden konnte. Sie wurde mit Äther nachgewaschen und getrocknet, ihr Gewicht betrug 0,4 g. Das Produkt enthielt 0,8% CH_3 (0,1519 g Subst. [i. V.] : 0,0191 g AgJ).

Aus dem tiefdunkelgrünen Filtrat wurden die Lösungsmittel im Wasserstoffstrom abdestilliert, der Rückstand in Chloroform gelöst und diese Lösung säurefrei gewaschen und getrocknet. Sie hinterließ 0,45 g eines grünen, nicht krystallisierten Stoffes, der gegen 5%ige Sodalösung auch beim Erhitzen beständig war, auch Natronlauge löste erst beim Erwärmen. Er enthielt 4,3% CH_3 : 0,1500 g Subst. (i. V.) : 0,0949 AgJ.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 82, S. 477 (1912).

III. Salzbildung von Bilirubin mit Chlorwasserstoffgas.

Daß Bilirubin mit Chlorwasserstoff eine Verbindung gibt, deren Auftreten mit Halochromie verbunden ist, beobachtete zuerst R. Schmiedel,¹⁾ der auf meine Veranlassung folgenden Versuch anstellte: 2 g krystallisiertes Bilirubin wurden mit 500 ccm Chloroform geschüttelt, vom Ungelösten abfiltriert und die Lösung durch vorsichtiges Abdestillieren des Lösungsmittels auf ca. 60 ccm konzentriert. Als in die abgekühlte Lösung nun Chlorwasserstoffgas eingeleitet wurde, schlug die Farbe der Lösung von braun in purpurrot um; nach längerem Einleiten stellte sich eine grüne Fluoreszenz ein und es begann sich ein Niederschlag zu bilden. Nach halbstündigem Einleiten wurde dieser abfiltriert und im Exsikkator neben Kalk getrocknet. Seine Menge betrug 0,15 g, er erschien prächtig kantharidenartig glänzend. Die Lösungen in Chloroform, Benzol Methyläthylketon hatten rote Farbe mit grüner Fluoreszenz, an Eosinlösungen erinnernd. Eine alkoholische Lösung gab mit alkoholischer Silbernitratlösung eine Abscheidung von Chlorsilber, auch durch Natronlauge, nicht durch Wasser, wurden Chlorionen abgespalten.

Die Chlorbestimmung gab 8,4% Chlor (0,1205 g Substanz : 0,0412 AgCl). Zu einem ähnlichen Resultat führte auch ein 2. Versuch, bei dem die Einwirkung des Chlorwasserstoffs etwas länger fortgesetzt wurde: es wurde zwei Stunden lang Chlorwasserstoff in eine Lösung eingeleitet, die 1,1 g Bilirubin in ca. 135 ccm Chloroform enthielt, und die mit Chlorwasserstoff gesättigte Lösung etwa 20 Stunden lang stehen gelassen. Hier zeigte sich besonders an den Wandungen ein Anflug, der in der Durchsicht rot, in der Aufsicht grüngolden erschien. Die Menge des abgesaugten, mit wenig Chloroform nachgewaschenen Niederschlags betrug etwa 0,5 g, er ließ sich im Vakuum über Kalk zu konstantem Gewicht trocknen und erschien als rotviolettes Pulver. Der nach Carius bestimmte Gehalt betrug 9,59%. 0,0833 g Subst. : 0,0323 g AgCl.

Eine zweite Chlorbestimmung wurde in der Weise ausgeführt, daß 0,1261 g Subst. mit warmem Pyridin behandelt

¹⁾ Dissertation, Cannstatt 1912.

wurden, wobei sich der größte Teil löste. Beim Stehen setzte sich aus den Filtraten Bilirubin ab, an der Farbe und den Löslichkeitsverhältnissen kenntlich, welche Beobachtung dafür spricht, daß wir es bei dem chlorhaltigen Körper mit einem direkten Derivat des Bilirubins zu tun haben. Schließlich wurde das Filtrat mit Essigsäure gefällt, vom Niederschlag filtriert und das neue Filtrat unter Zusatz von Salpetersäure mit Silbernitrat gefällt. Das erhaltene Chlorsilber wurde durch Auflösen in Ammoniak und Fällung mit Salpetersäure gereinigt. Erhalten wurden 0,0432 g AgCl = 8,47% Chlor.

Der von Schmiedel gefundene Chlorgehalt, sowie die Mengen des Chlors, welche bei dem 2. Versuch von Pyridin abgespalten wurde, steht im Einklang mit den Werten, die sich aus einer Formel $(C_{32}H_{36}O_6N_4)_2 \cdot 3 HCl$, ber. 8,52% Chlor berechnen würden.

Wesentlich andere Eigenschaften werden bei den durch Chlorwasserstoff nicht gefällten Anteilen des verwendeten Bilirubins bei beiden Versuchen festgestellt. Schmiedel fällte das Filtrat vom Farbsalz durch Zusatz von Petroläther und bekam 1,8 g eines dunkel gefärbten Stoffes, der bereits an Wasser Chlorionen abgab und dessen Lösungen in Alkohol, Chloroform oder Benzol sich beim Erwärmen sichtbar veränderten, indem die rote Farbe in gelb umschlug. Bilirubin ließ sich nicht wieder aus dem Produkt gewinnen, durch Natronlauge wurde das gesamte Chlor aus ihm entfernt. Der Gehalt an Chlor betrug 14,7%.

0,1900 g Subst. : 0,1135 g AgCl.

Beim zweiten Versuch wurde sowohl beim Zusatz von Äther oder Schwefelkohlenstoff an Proben des rot gefärbten Filtrats vom Farbsalz ein Umschlag der Farbe in grün beobachtet als auch beim Einengen der Chloroformlösung auf ca. 50 ccm. Petroläther fällte dann eine grünschwarz gefärbte Masse aus, etwa 0,5 g, die sich gut filtrieren ließ.

Das Erwärmen hatte aber einen starken Einfluß insofern gehabt, als jetzt gegenüber dem ersten Versuch ein ganz anderer Stoff vorlag, der nur 4,46% Chlor enthielt und das Halogen an warmes Pyridin nicht oder nur ganz langsam abgab.

0,1209 g Sbst. (i. V. über Kalk zu konst. Gewicht getr.): 0,0234 g AgCl
(Carius).

Als eine Probe in Pyridin gelöst und durch Essigsäure wieder gefällt worden war, enthielt das Filtrat keine Chlorionen.

Der Versuch wurde dann mit 0,1033 g wiederholt, wobei die mit Essigsäure versetzte Pyridinlösung den Farbstoff sehr allmählich und nicht vollständig fallen ließ, so daß etwas Salpetersäure zugefügt werden mußte, wodurch dann der noch kolloid gelöste Teil des Farbstoffs zerstört wurde. Aber auch jetzt wurden nur 3,28% Chlor gefunden.

0,1033 g Sbst.: 0,0137 g AgCl.

IV. Verhalten von Bilirubin gegen Essigsäure, chlorierte Essigsäure und deren Ester.

Das zu den nachfolgend beschriebenen Versuchen verwendete Bilirubin war durch Umkrystallisation aus Dimethylanilin gereinigt worden.

1. Beim Kochen mit Eisessig ergab sich nach kurzer Zeit eine grüne Lösung, die sich auf Zusatz von Wasser trübte.

1a. Essigester gab eine hellgelbe Lösung.

2. Beim Erwärmen mit Monochloressigsäure trat sofort eine Verfärbung ein, nach zwei Stunden hatte sich eine dunkelgrüne Lösung gebildet; auf Zusatz von Wasser trat Fällung ein.

2a. Monochloressigester gab eine orangerote Lösung.

3. Beim Erwärmen mit Trichloressigsäure trat augenblicklich Lösung mit blaugrüner Farbe ein, Wasserzusatz erzeugte eine schwarzblaue Fällung.

3a. Trichloressigsäureester gab eine braunrote Lösung.

Ameisensäure ließ dagegen Bilirubin scheinbar unverändert.

1 g Bilirubin wurde in einem U-Rohr von 1 cm lichter Weite zwischen je 2,5 g trockene Monochloressigsäure gebettet, worauf die Luft durch gereinigten (Pyrogallollösung) und getrockneten Wasserstoff verdrängt wurde. Nun wurde im Wasserbade auf 65—67° erwärmt und 4 Stunden bei dieser Temperatur unter Durchleiten von Wasserstoff gehalten.

Hierbei war schon nach 90 Minuten Verfärbung bemerkbar, nach 4 Stunden hatte sich eine tiefdunkle grüne Lösung gebildet, die dann in 200 g ausgekochtes und auf 70° erkaltetes Wasser eingetragen wurde, wobei der Farbstoff vollständig ausfiel. Er wurde filtriert, säurefrei gewaschen und im Vakuum getrocknet. Erhalten wurden 0,87 g eines schwarzgrünen Pulvers, das an Alkohol nur geringe Mengen Substanz abgab; dagegen entzog Chloroform reichliche Menge unveränderten Bilirubins, während der beträchtliche Rest aus einer fast schwarzen, nicht krystallisierten Masse bestand.

Fast genau das gleiche Resultat wurde erhalten als an Stelle von Wasserstoff Kohlensäure verwendet wurde.

V. Über das Bilirubinammonium.

Auf die Möglichkeit das Bilirubin mit Hilfe eines in Methylalkohol leicht löslichen Ammoniakanlagerungsproduktes zu reinigen, wurde bereits in der letzten Mitteilung hingewiesen.¹⁾ Am Schluß derselben teilten wir mit, daß es gelingt, eine etwa 10%ige bilirubinhaltende Lösung durch Einstellen in eine Kältemischung zum Krystallisieren zu bringen. Diese wichtige Beobachtung haben wir nun etwas weiter verfolgen können und zwar nach verschiedenen Richtungen. Die Darstellung erfolgte in der Weise, daß z. B. 10 g Bilirubin in 75 ccm frisch über Kalk destilliertem Methylalkohol (Kahlbaum) suspendiert wurden und auf diese Mischung trockenes Ammoniakgas geleitet wurde, wobei der Farbstoff rasch in Lösung geht. Man filtriert durch einen Warmwassertrichter und verwendet 25 ccm Methylalkohol zum Nachspülen, worauf das Filtrat eine Stunde in eine Kältemischung gestellt wird. Die jetzt vorhandene Ausscheidung wird auf einer Nutsche scharf abgesaugt, mit wenig eiskaltem Methylalkohol nachgewaschen und dann auf einen Tonteller gebracht. Bei Verwendung älterer Bilirubinpräparate beträgt die Ausbeute 50—60% des verwendeten Bilirubins.

Das Bilirubinammoniak wurde bisher immer in braunroten Nadeln krystallisiert erhalten und zeichnet sich durch

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 91, S. 71 (1914).

große Beständigkeit an der Luft und beim Trocknen über Kalk aus. Auch beim kurzen Erhitzen erleidet es keine Veränderung der Farbe, verliert aber allmählich das Ammoniak. Nur unter der Einwirkung von Säuren wurde bisher ein leicht eintretendes Ergrünen beobachtet, ein Präparat zeigte sogar Verfärbung als es längere Zeit im Vakuum unter Schwefelsäure aufbewahrt wurde. Die Analysen lassen es nicht als unmöglich erscheinen, daß das lufttrockene Präparat noch etwas Methylalkohol enthält und daß beim Liegen über Kalk ein kleiner Verlust auch an Ammoniak erfolgen kann.

Präparat I.

0,1182 g Subst. (14 Tage an der Luft aufbewahrt) gaben 12,2 ccm N bei 13° und 746 mm B.

0,1630 g Subst. verloren beim Liegen über Kalk 0,0020 g = 1,2%.

0,1610 g Subst. gaben 0,3867 CO₂ und 0,0957 g H₂O, keine Asche.

Präparat II, im Vakuum über Kalk zu konstantem Gewicht getrocknet.

0,1283 g Subst. gaben 12,8 ccm N bei 9° und 739,5 mm B.

Präparat III, wie II behandelt.

0,1250 g Subst. gaben 13,3 ccm N bei 12° und 742 mm B.

Präparat IV, im nichtevakuierten Exsikkator über Kalk getrocknet.

0,1085 g Subst. gaben 11,2 ccm N bei 16° und 730 mm B.

C₃₃H₃₆O₆N₄ · NH₃. Ber.: 65,19% C, 6,62% H, 11,88% N.

I. Gef.: 65,5 > 6,47 > 11,92 >

II. > — — — 11,60 >

III. > — — — 12,38 >

IV. > — — — 11,81 >

Das Bilirubinammoniak löst sich in Natriumbicarbonatlösung auf, beim Kochen mit Chloroform verliert es das Ammoniak und geht dabei in hellrot gefärbtes Bilirubin über, das durch Natriumbicarbonat nicht in Lösung überführt wird. Einmal wurden hierbei Krystallformen beobachtet, die denen des Hämin glichen.

0,1390 g dieses Bilirubins (bei 90–100° getr.) gaben 0,3416 CO₂ und 0,0773 H₂O.

C₃₃H₃₆O₆N₄. Ber.: 67,16% C, 6,29% H.

Gef.: 67,02 > 6,18 >

2,5 g dieses frisch hergestellten Bilirubins wurden nun erneut in das Ammoniak-anlagerungsprodukt überführt, wobei

in der Kältemischung 1.9 g auskrystallisierten. Die Farbe dieses Präparäts war dunkelbraunrot. (Im Gegensatz hierzu gab ein schon lange Zeit aufbewahrtes Bilirubinpräparat bei gleicher Behandlung so gut wie keine Abscheidung.)

0,1704 g Sbst. (über Kalk getr.): 0,4075 CO₂ und 0,0988 H₂O.

C₂₂H₃₀O₆N₄ · NH₃. Ber.: 65,19 % C, 6,62 % H

Gef.: 65,22 % C, 6,45 % H.

Doch verlor das Präparat beim Trocknen im Vakuum 0,94 %.

Zur Wiedergewinnung des in den Filtraten vom Bilirubinammoniak noch vorhandenen Farbstoffs wurden verschiedene Versuche ausgeführt. Am zweckmäßigsten ist es wohl das Filtrat sofort in große Mengen wasserfreien Äthers einfließen zu lassen, wobei die Substanz in gelbroten Flocken ausfällt, die sich zusammenballen und filtrieren lassen, worauf auf Tontellern getrocknet wird.

Nach eintägigem Liegen enthielt ein solches Präparat 11,4 % N.

(0,2325 g Sbst.: 23,4 ccm N bei 18° und 740 mm B.)

Nach viertägigem Liegen, wobei ein Verlust von 2,7 % eintrat, 11,7 % N.

(0,1819 g Sbst.: 18,9 ccm N bei 15° und 730 mm B.)

Die weitere Gewichtsabnahme betrug dann noch 0,73 %.

Bei einem anderen Versuch wurde das Filtrat vom Bilirubinammoniak in einem großen Überschuß von stark verdünnter Schwefelsäure eingetragen, die ausgekocht worden war. Die hierbei entstandene Fällung ist sehr voluminös, und daher erforderte das Auswaschen längere Zeit, so daß sich die bei der Aufarbeitung beobachteten Veränderungen des Farbstoffs durch Einwirkung des Luftsauerstoffs erklären lassen. Der ausgewaschene Schlamm wurde auf Filtrierpapier gebreitet und im Vakuum getrocknet, dann mit Chloroform extrahiert, wobei von 4,5 g 2,5 g unlöslich zurückblieben.

Dieser Teil erwies sich auch durch seine fast schwarze Farbe als weitgehend verändertes Bilirubin; er enthielt etwa 0,5 % Asche.

0,2100 g Sbst. (aschefrei) gaben 0,4652 g CO₂ und 0,0993 H₂O.

0,2095 g „ „ „ 19 ccm N bei 11° und 730 mm B.

einiger Zeit über rotviolett in blau übergang. Das Präparat wurde durch ganz schwaches Erwärmen mit Methylalkohol gelöst, dann trat beim Erkalten nur eine geringe harzige Abscheidung ein. Das Filtrat wurde schließlich durch Eingießen in Wasser gefällt, wonach sich der hellbraungelbe Niederschlag gut filtrieren ließ. Nach dem Trocknen im Vakuum wog er 0,75 g; er löste sich in Soda selbst beim Einhitzen im Wasserbade nicht auf, eine Probe zeigte im Kapillarrohr erhitzt ein Erweichen bei 95° und wurde bei 115° blasig und schwarzbraun, um sich bei weiterem Erhitzen unter Gasentwicklung zu zersetzen. Die Analyse ergab, daß ein dreifach methyliertes Bilirubin vorlag, an das sich Diazomethan angelagert hatte; ob das Ammoniak dem Molekül erhalten blieb, muß unentschieden bleiben, da der für den Stickstoff gefundene Wert dafür, der für den Kohlenstoff gefundene dagegen spricht.

0,1243 g	Sbst. (i. V. über Kalk):	0,2990 CO ₂	und	0,0777 H ₂ O.	
0,1272 g	„	15,7 ccm N	bei 9° und 740 mm B.		
0,0930 g	„	0,0934 AgJ	(Zeisel).		
C ₃₆ H ₄₇ O ₆ N ₇ .	Ber.:	64,19% C,	6,98% H,	14,56% N,	6,68% CH ₃ .
C ₃₆ H ₄₄ O ₆ N ₆ .	„	65,85 „	6,71 „	12,81 „	6,86 „
	Gef.:	65,60 „	6,95 „	14,45 „	6,4 „

VI. Die Untersuchung auf eine im Bilirubin vorhandene Ketogruppe

wurde im Hinblick auf die von K. H. Meyer¹⁾ festgestellte Tatsache ausgeführt, daß aromatische Ketone und Chinone mit Säuren und gewissen Metallhalogeniden Additionsprodukte geben, deren Farbe regelmäßig tiefer ist als die der freien Ketone und Chinone. Es war zu erwarten, daß sich beim Bilirubin ähnliche Beobachtungen würden machen lassen, doch schieden hier alle Versuche aus, bei denen Chloressigsäuren zur Verwendung kamen, da ja Bilirubin durch diese Säuren tiefer gehende Veränderungen erleidet, selbst Essigsäure als Lösungsmittel war zu vermeiden. In der Tat wurden nun wenigstens mit Zinntetrachlorid und Aluminiumchlorid tief ge-

¹⁾ Ber. d. d. chem. Ges., Bd. 41, S. 2568 (1908); Bd. 43, S. 157 (1910).

färbte Fällungen erhalten; während aber die Chinone und Ketone nach der Zersetzung der Additionsverbindungen, die durch Zufügen von Wasser leicht erreicht wird, unverändert zurückerhalten wurden, trat beim Bilirubin nur die Zersetzung ein, kenntlich durch den Farbumschlag, zugleich aber zeigte die Art desselben an, daß, wie es von vornherein erwartet werden konnte, nunmehr das Bilirubin eine Veränderung erfahren hatte. Eine quantitative Bestimmung war daher und auch schon aus dem Grunde ausgeschlossen, daß wegen der Schwerlöslichkeit des Bilirubins in den verwendeten Lösungsmitteln mit sehr geringen Mengen gearbeitet werden mußte.

Lösungsmittel	Farbe der Bilirubinlösung	Salz	Farbe der Mischung resp. Fällung	Farbumschlag auf Zusatz von Wasser
Benzol	hellgelb	SnCl_4	sofort rote Färbung allmählich Fällung	gelbgrün
Xylol	gelb	SnCl_4	dunkelrote Fällung	grünbraun, dann grün
Chloroform	braungelb	SnCl_4	dunkelrote Fällung	braun, dann grün
Schwefelkohlenstoff	gelb	SnCl_4	tief dunkelrote Fällung	—
Chloroform	braungelb	AlCl_3	tief rosa Fällung	gelbbraun
Benzol	hellgelb	AlCl_3	orange bis rosa Fällung	gelb
Xylol	gelb	HgCl_2 in Eisessig	grüne Färbung	keine Entfärbung

VII. Über die Einwirkung von Bromwasserstoffeisessig auf Bilirubin.

In 100 g Bromwasserstoffeisessig (spez. Gew. 1,41) wurden 5 g reines Bilirubin in Portionen von 0,5 g im Laufe von 5 Tagen eingetragen, wobei der Farbstoff in Lösung ging, was durch Schütteln des weithalsigen Glasstöpselglases, in dem die Reaktion vorgenommen wurde, beschleunigt wurde. Aus der durch Glaswolle filtrierten dunkelvioletten Flüssigkeit wurde dann unter Durchleiten von Wasserstoff das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert, der Rückstand

in Eisessig gelöst und das Lösungsmittel erneut abdestilliert.¹⁾ Nunmehr wurden 100 ccm wasserfreier Methylalkohol hinzugegeben und eine Stunde im Wasserbade schwach erwärmt, so daß nur 30 ccm abdestillierten, worauf die tiefblaue Lösung in 1 l Äther unter Umrühren eingetragen wurde. Hierbei entstand eine Fällung, die sich nach halbstündigem Stehen filtrieren ließ. Es wurde dann mit Äther solange nachgewaschen bis der ablaufende Äther an Wasser keine Bromionen mehr abgab und das Wasser farblos blieb, worauf im Vakuum getrocknet wurde. Erhalten wurden 5,5 g eines blauvioletten Pulvers, das sich in konzentrierter Schwefelsäure mit tief blauer Farbe löste, auf Zusatz eines Tropfens Salpetersäure trat dann Rotfärbung ein; auch die Reaktion mit diazotierter Sulfanilsäure verlief positiv. 5%ige Sodalösung und auch 1%ige Natronlauge wirkten bei Zimmertemperatur nicht ein.

0,1576 g Sbst. (i. V.) gaben 0,0879 g AgJ = 3,56% CH₃. (Zeisel.)

0,1546 g „ „ „ 0,0504 g AgBr = 13,87% Br. (Carius.)

Durch Schütteln mit 5%iger methylalkoholischer Natronlauge trat völlige Lösung ein, wobei zugleich Verseifung und Abspaltung des Broms erfolgte. Die Lösung der Substanz in Chloroform gab an 12,5%ige Salzsäure nichts ab, 25%ige färbte sich schwach hellblau, mit 37%iger erfolgte die Bildung einer Emulsion und, nachdem diese durch Zugabe von Wasser getrennt worden war, blieb in der wässrigen Salzsäure ein blau gefärbter Körper suspendiert, der in Sodalösung überging. Es war also auch hier Verseifung eingetreten.

Da der ermittelte Gehalt an Brom mit einem einheitlichen Bilirubinderivat nicht im Einklang stand und auch die gefundene Methylzahl für ein dimethyliertes Derivat zu niedrig

¹⁾ Bei einem anderen Versuch wurde diese zweite Destillation, bei der auch der Bromwasserstoff zum größten Teil entfernt wird, unterlassen. Das dann durch Einwirkung von Methylalkohol erhaltene Produkt war weitgehender verestert worden, entsprechend der größeren Menge noch vorhandenen Bromwasserstoffs.

0,2051 g Sbst. (i. V.): 0,1404 AgJ = 4,36% CH₃.

Ferner sei erwähnt, daß bei dreitägiger Einwirkung des Eisessigbromwasserstoffgemisches ein Produkt erhalten wurde, das nur 7% Brom enthielt.

war, wurde versucht ob durch eine wiederholte Behandlung mit Methylalkohol ein vollständiger Ersatz des ganzen Bromgehalts durch Methoxyl oder wenigstens ein Ersatz der Brommenge zu erzielen sein würde, die über der dem Gehalt an einem Atom entsprechenden Menge lag. Der Erfolg dieser zweiten Behandlung bestand nun einerseits darin, daß der Bromgehalt des wieder mit Äther gefällten Produktes in der Tat vermindert war, während andererseits der Methoxylgehalt vermindert worden und entsprechend der neue Körper in Soda löslich geworden war. Leider gelang es nicht, ihn krystallisiert zu erhalten, so daß die aus den Analysen ableitbare Formel noch nicht zu Schlüssen über den Chemismus seines Entstehens herangezogen werden kann. Aber sicher erscheint, daß ein Atom Brom durch Methylalkohol nicht ablösbar ist, im Gegensatz zu den Vorgängen bei der Bildung des Hämatorporphyrins; durch Laugen wird es herausgenommen, wobei nur schwer vollständige Verseifung parallel geht.

0,1448 g Sbst. (i. V.):	0,3057 CO ₂ und	0,0775 H ₂ O.
0,1228 g	0,2609	0,0615
0,1232 g	9,2 ccm N bei 10° und	738 mm B.
0,2209 g	0,0585 AgBr. (Carius.)	
0,1000 g	0,0272 AgBr (Erwärmen mit Sodalösung auf 55°).	
0,1714 g	0,0573 AgJ. (Zeisel.)	



Ber.:	57,81% C,	5,99% H,	8,18% N,	11,68% Br,	2,2% CH ₃ .
Gef.:	57,58	5,95	8,63	11,27	2,13
	57,94	5,6	—	11,6	—

VIII. Die Einwirkung von Diazomethan auf Bilirubin wurde ausgeführt um eine Veresterung zu bewirken, nachdem sich gezeigt hatte, daß die Anwendung von Säuren oder Alkalien zur Unterstützung der Methylierung bei der Labilität des Bilirubins unstatthaft ist. Zu einem krystallisierten Produkt hat auch die Methylierung auf dem neuen Wege bisher nicht geführt. Es geht aber aus den Eigenschaften und den Analysen bereits klar hervor, daß Dimethylierung eintritt, womit die Anwesenheit von zwei Carboxylen im Bilirubin bewiesen sein

dürfte, und daß ferner eine Addition von einem Molekül Diazomethan eintritt.¹⁾

Ein erster Versuch wurde mit 2,5 g Rohbilirubin ausgeführt, welche Menge, mit 100 ccm wasserfreiem Äther überschichtet, der Einwirkung der ätherischen Lösung von Diazomethan ausgesetzt wurden, die aus einem Gemisch von 5 ccm Nitrosomethylurethan, 3 ccm methylalkoholischer Kalilauge und 50 ccm Äther beim Erwärmen abdestillierte.²⁾ Bei Zimmer-temperatur fand hierbei eine Reaktion statt, bemerkbar durch leichte Erwärmung, Stickstoffentwicklung und Bildung einer tiefroten Lösung. Doch blieb auch bei längerem Schütteln ein Teil des Bilirubins ungelöst, der dann einer zweiten Behandlung mit Diazomethan unterworfen wurde.

Die filtrierte, tiefrote ätherische Lösung hinterließ nach Abdestillation des Lösungsmittels ein rotes Harz, das sich in warmem Methylalkohol sehr leicht löste, beim Erkalten schied sich ein Teil des Gelösten aber wieder harzig ab; so wurde auch der Methylalkohol wieder abdestilliert, wonach sich der Rückstand etwas aufgebläht hatte. Er ließ sich jetzt pulvern, löste sich spielend in Chloroform, leicht in Äther, es gelang aber nicht z. B. durch Zusatz von Petroläther andere als harzige Fällungen zu erzielen.

Die ätherische Lösung gab an Soda keine Substanz ab, durch Natronlauge wurde der Farbstoff ganz allmählich in die wässrige Lösung überführt. Diese veränderte ihre Farbe beim Stehen an der Luft nicht bemerkbar, so daß es den Anschein hat, als ob an der luftempfindlichen Stelle des Bilirubinmoleküls die Anlagerung von Diazomethan stattgefunden hat. Daß die Natronlauge beim Lösen zugleich eine partielle Verseifung bewirkt hatte, bewies die Zeiselbestimmung, die nur noch 2,24% CH_3 ergab.

¹⁾ Es dürfte wohl kaum anzunehmen sein, daß das addierte Diazomethan zur Abspaltung von Methyljodid bei der Zeisel-Methode geführt hat.

²⁾ Es wurde also ein Überschuß von Diazomethan verwendet, da zur Dimethylierung der verwendeten Bilirubinmenge theoretisch 1,2 ccm Nitrosomethylurethan ausgereicht hätte.

0,1423 der aus der alkalischen Lösung durch verdünnte Schwefelsäure gefällten Substanz, die filtriert, SO_2 frei gewaschen und im Vakuum getrocknet worden war, gaben 0,0500 g AgJ.

Die Gmelin-Tiedemannsche Reaktion fiel bei dem Einwirkungsprodukt von Diazomethan auf Bilirubin positiv aus, auf Zusatz von Formaldehyd zu einer Lösung in Schwefelsäure trat Grünfärbung auf, die allmählich in blau überging.

Die methyllkoholische Lösung färbte sich auf Zusatz von Salzsäure prachtvoll rot, zugleich ergab sich ein harziger Niederschlag; auch verdünnte Schwefelsäure erzeugte einen Umschlag der Färbung, Zusatz von Pikrinsäure ließ eine harzige Fällung entstehen, die sich in heißem Xylol löste, aber nicht krystallisiert erhalten werden konnte.

Beim Erhitzen im Capillarrohr erfolgte bei 78° Sinterung, bei 115° unter Dunkelfärbung Schmelzen und Zersetzung unter Aufblähen.

Der Methylgehalt betrug 4,64% (0,1080 g Sbst., i. V. getr., 0,0786 g AgJ.)

Die bei der zweiten Behandlung mit Diazomethan erhaltene ätherische Lösung enthielt einen Stoff, der nach all seinen Reaktionen identisch mit dem soeben beschriebenen war. Er enthielt 4,98% CH_3 .

0,1793 Sbst. (i. V.): 0,1400 g AgJ.

Völlige Gewichtskonstanz war hier beim Trocknen im Vakuum nicht erreicht worden, nach 2 Monaten hatte sich dann eine Abnahme von 2,4% ergeben. Eine Stickstoffbestimmung ergab jedoch 13,4% N.

0,1377 g Sbst.: 16 ccm N bei 11° und 740 mm B.

Bei 90° getrocknet verlor die Substanz erneut 2,3%, wonach Gewichtskonstanz eingetreten war. Eine Stickstoffbestimmung ergab jetzt 12,5% N.

0,1402 g Sbst. (90°): 15,2 ccm N bei $11,7^\circ$ und 739 mm B.

Die auch bei der zweiten Diazomethanbehandlung in Äther ungelöst gebliebenen Teile des Bilirubins lösten sich sehr leicht in Chloroform, Methylalkohol und Methyläthylketon. Aus diesen Lösungen waren Krystalle nicht zu erhalten, während die ungelöste Substanz dem Bilirubin ähnliche Krystalle aufwies. Der Löslichkeit entsprechend und den Eigen-

schaften — von Sodalösung wurde die Substanz sehr langsam aufgenommen — war hier weitgehende aber nicht völlige Methylierung eingetreten.

0,1050 g Sbst. (90°): 0,0697 AgJ = 4,24% CH₃.

Auch war die Addition von Diazomethan bereits erfolgt: eine Stickstoffbestimmung ergab 13,63% N.

0,1057 g Sbst. (i. Vak. über Kalk): 12,2 ccm N bei 7° und 740 mm B.

Bei einem zweiten Versuch wurden 2,7 g reines Bilirubin in gleicher Weise, wie beim ersten Versuch beschrieben, behandelt. Trotz häufigen Schüttelns und dreitägiger Einwirkung hatten sich hier nur 0,6 im Äther gelöst, 2,1 g waren ungelöst geblieben.

Die Eigenschaften des löslichen Produkts glichen denen des entsprechenden Teils vom ersten Produkt; die Analyse spricht dafür, daß außer einer Dimethylierung die Anlagerung eines Moleküls Diazomethan erfolgt war.

0,1870 g Sbst. (i. V. getr.): 0,4506 g CO₂ und 0,0125 g H₂O.

0,1326 g „ „ 14,5 ccm N bei 12° und 740 mm B.

0,1311 g „ „ 0,0975 g AgJ. (Zeisel.)

C₃₁H₄₃O₆N₆. Ber.: 65,42% C, 6,54% H, 13,09% N, 4,67% CH₃.

Gef.: 65,72 „ 6,69 „ 12,6 „ 4,75 „

Der in Äther unlöslich gebliebene Teil krystallisierte wieder in Pseudomorphosen nach dem verwendeten Bilirubin; daß letzteres verändert worden war, zeigten die Löslichkeitsverhältnisse und Eigenschaften, die mit denen des entsprechenden Produkts vom ersten Versuch übereinstimmten.

Ein krystallisierendes Bilirubinderivat konnte endlich auch nicht erhalten werden als die Einwirkung der ätherischen Diazomethanlösung auf in Chloroform suspendiertes Bilirubin untersucht wurde, wobei das Bilirubin unter schwacher Gasentwicklung vollständig in Lösung ging.

Die Fortsetzung der Untersuchungen über das Bilirubin wurde ermöglicht durch eine pekuniäre Unterstützung aus dem «Allgemeinen Fonds zur Förderung chemischer Forschungen (Leo-Gans-Stiftung) der Kaiser-Wilhelm-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften».

Stuttgart, im April 1915.