

Über das Bilirubinammonium und über Modifikationen des Bilirubins.

X. Mitteilung zur Kenntnis der Gallenfarbstoffe.

Von

William Küster.

(Aus dem Laboratorium für organische Chemie der Techn. Hochschule-Stuttgart.)
(Der Redaktion zugegangen am 16. Januar 1917.)

Seit meiner letzten Veröffentlichung über das Bilirubin¹⁾ ist eine zusammenfassende Arbeit von H. Fischer²⁾ erschienen, in der die Formel $C_{33}H_{36}O_6N_4$ für das Bilirubin erneut befürwortet wird auf Grund der analytischen Ergebnisse für das Reduktionsprodukt des Bilirubins, das Bilirubinogen $C_{33}H_{44}O_6N_4$, während die zur bisher üblichen Formel $C_{32}H_{36}O_6N_4$ führenden analytischen Resultate auf einen Gehalt an verunreinigenden, schwefelhaltigen Stoffen zurückgeführt werden, die durch die bisher angewandten Methoden zur Reinigung des Rohbilirubins nicht hatten entfernt werden können, oder auf einen Gehalt an Chlor, der durch die Extraktion der Gallensteine mit Chloroform in das Rohbilirubin hinein gelangt. Ferner wird an die Möglichkeit gedacht, daß das Rohbilirubin ein Gemisch von zwei verschiedenen Stoffen vorstellt, und es wird die Hoffnung ausgesprochen, daß eine Klärung dieser Fragen durch die Untersuchung des von mir entdeckten Bilirubinammoniums zu ermöglichen sein würde.

Bei der großen Wichtigkeit, welche die empirische Formulierung des Bilirubins namentlich im Hinblick auf das Entstehen des Bilirubins aus dem Hämatin beansprucht, hatte ich die Untersuchung des Bilirubinammoniums wieder aufgenommen, sobald ich wieder in den Besitz von Rinder-Gallensteinen gekommen war. Sie wurde in der Hoffnung durchgeführt, nicht

¹⁾ Diese Zeitschr., Bd. 94, S. 136 (1915).

²⁾ Ergebnisse der Physiologie, XV. Jahrgang. Über Blut- und Gallenfarbstoff, S. 211 u. 213.

nur die empirische Zusammensetzung des Bilirubins festzulegen, sondern auch weitere Beweise für das Bestehen mehrerer Formen des Bilirubins zu erbringen, deren Annahme schon durch die verschiedene Farbe von Bilirubinpräparaten und deren verschiedene Löslichkeit in Chloroform, durch die Löslichkeit der einen Form in Natriumbicarbonat, sowie durch den verschiedenen Silbergehalt der Silbersalze von Bilirubinpräparaten begründet erschien, die entweder frisch hergestellt oder eine Zeitlang aufbewahrt zur Darstellung der genannten Salze benutzt worden waren.

Es kann nunmehr mitgeteilt werden, daß die Abtrennung der schwefelhaltigen Verunreinigungen durch die Herstellung des Bilirubinammoniums verhältnismäßig leicht gelingt. Diese prachtvoll krystallisierende Verbindung wird bekanntlich in einer Ausbeute von ca. 60% des verwendeten Rohbilirubins und zwar der orangegefärbten Modifikation desselben erhalten, die durch Extraktion mit Chloroform aus den mit Äther, Wasser, 10%iger Essigsäure, Äther und Alkohol vorbehandelten Pulver von Rindergallensteinen gewonnen wird, und zwar dadurch, daß die mit Hilfe von Methylalkohol und Ammoniakgas bereitete, etwa 10%ige Lösung in eine Kältemischung eingestellt wird.¹⁾ Der Rest des verwendeten Bilirubins wird aus der methylalkoholischen Mutterlauge mit Äther gefällt und zwar ebenfalls als ein Bilirubinammonium, bis auf einen sehr geringen Anteil, der erst nach Abdestillation des Äthers und des Methylalkohols und zwar schön krystallisiert als rein rot gefärbtes Bilirubin sich abscheidet.²⁾

Das Bilirubinammonium liefert nun durch Erhitzen mit Chloroform oder durch Extraktion mit Chloroformdämpfen

¹⁾ Diese Zeitschr., Bd. 94, S. 152 (1915).

²⁾ Zuerst erwähnt diese Zeitschr., Bd. 91, S. 71 (1914). — Kleine Verluste sind nicht zu vermeiden, weil der Farbstoff beim Filtrieren seiner Lösungen vom Filtermaterial stark zurückgehalten wird und weil sich ein gründliches Auswaschen verbietet, um die Ausbeute an krystallisiertem Bilirubinammonium nicht durch die Menge des Lösungsmittels zu verringern. Auch verändert sich der im Filter steckende Farbstoff begünstigt durch die große Oberfläche, die er der Luft bietet, außerordentlich rasch.

unter Entweichen von Ammoniak Bilirubin zurück, doch zeigte es sich, daß nicht nur das mit Äther gefällte Bilirubinammonium, sondern auch der auskrystallisierte Anteil einen in Chloroform unlöslichen Rückstand in der Hülse ließ. Die Menge betrug bei letzterem 0,7—4% des verwendeten Rohbilirubins, bei ersterem 2,5—18%, und erwies sich als abhängig von der Zeit, die zwischen Darstellung und Extraktion des Bilirubinammoniums verstrichen war, namentlich bei dem mit Äther gefällten Bilirubinammonium, d. h. sie war größer bei längerer Aufbewahrung. Der letzteren Beobachtung entsprechend stellte dieser unlösliche Rückstand ein Gemenge dar, von dem ein sehr kleiner Teil in Alkohol, der größere nur in Essigsäure löslich war. Dieser enthält nun Schwefel,¹⁾ aber in wechselnder Menge, und da der Schwefelgehalt um so höher ist, je geringer das Gesamtgewicht, so dürfte auch in ihm wieder ein Gemenge vorliegen, dessen einer Bestandteil aus dem Bilirubin durch Oxydation während der Aufarbeitung entstanden ist. Seine Menge vermehrt sich also mit der für diese benötigten Zeit, der andere Teil enthält die dem Rohbilirubin anhaftenden schwefelhaltigen Verunreinigungen. Wird nun das einmal gereinigte Bilirubin von neuem in Bilirubinammonium übergeführt, so enthält der bei der Extraktion mit Chloroformdämpfen verbleibende in Chloroform unlösliche Rest — sofern er überhaupt auftritt²⁾ — in den nur in Essigsäure löslichen Teilen keinen Schwefel mehr³⁾ und zwar betrifft dies sowohl das einmal gereinigte Bilirubin (A) aus dem krystallisierten Bilirubinammonium wie das einmal gereinigte Bilirubin (B) aus dem durch Äther gefällten Bilirubinammonium. Es darf demnach behauptet werden, daß das über das Bilirubinammonium hergestellte einmal gereinigte Bilirubin schwefelfrei ist.

Der in den Verunreinigungen gefundene Gehalt an Schwefel beträgt nun 0,4—0,66%; im Rohbilirubin kann daher der Gehalt an Schwefel nicht höher als 0,03% angenommen werden,

¹⁾ Auch die in Alkohol löslichen Teile können Schwefel enthalten.

²⁾ Erfolgt die Extraktion sofort nach der Darstellung, so verbleiben keine in Chloroform unlöslichen Reste.

³⁾ Nur bei einem Präparat wurden noch 0,2% S gefunden.

und es ist erklärlich, daß er unseren früheren Forderungen entgangen ist, wenn man hinzunimmt, daß von dem kostbaren Rohbilirubin nur kleine Mengen geopfert worden waren, um einen etwaigen Gehalt an Schwefel nachzuweisen.¹⁾

Diesem geringen Schwefelgehalt kann aber kaum ein Einfluß auf die bei der Analyse ermittelten Werte zuerkannt werden, welche bei einer recht großen Anzahl von Bestimmungen verschiedener Forscher in guter Übereinstimmung erhalten wurden und zur Aufstellung der Formel $C_{32}H_{36}O_6N_4$ geführt haben. Auch lieferten mir einmal über das Bilirubinammonium gereinigte Bilirubinpräparate wiederum Werte, die zur angegebenen Formel noch am besten paßten, mit einer Ausnahme. Eine weitere machte das Bilirubinpräparat, welches sich, wie erwähnt, aus den Mutterlaugen des durch Äther gefällten Bilirubinammoniums nach der Abdestillation des Äthers und des Methylalkohols abgeschieden hatte. Auch hier wurden bei zwei Analysen Zahlen ermittelt, die mit der von H. Fischer geforderten Zusammensetzung $C_{33}H_{36}O_6N_4$ in Übereinstimmung standen. Nun hatte ich ja bereits vor 10 Jahren mitgeteilt, daß das Bilirubin durch die Behandlung mit Chloroform ein wenig chlorhaltig werden könne,²⁾ und wenn auch nach H. Fischers Angabe³⁾ dieser Gehalt leicht durch Auflösen in Lauge beseitigt werden kann, so liegt doch die Gefahr nahe, daß sich das Bilirubin bei diesem Verfahren oxydiert und der Erfolg in bezug auf die analytischen Ergebnisse für den Kohlenstoff ausbleibt. Wenigstens hatten wir diese Erfahrung gemacht.⁴⁾

Dieser Übelstand läßt sich vermeiden, wenn man das Chloroform ausschließen kann, und das ist bei Verwendung des Bilirubinammoniums möglich, da man zur Entfernung des Ammoniaks anstelle von Chloroform auch Methylalkohol verwenden kann. Man darf aber nicht von dem aus dem Rohbilirubin hergestellten Bilirubinammonium ausgehen, da dieses

¹⁾ Diese Zeitschr., Bd. 91, S. 70 (1914).

²⁾ Diese Zeitschr., Bd. 47, S. 306 (1906).

³⁾ Ebenda, Bd. 73, S. 219 (1911).

⁴⁾ Ebenda, Bd. 91, S. 70 (1914).

ja noch schwefelhaltige Verunreinigungen enthalten kann, sondern man muß das aus diesem mittels Chloroformextraktion erhaltene einmal gereinigte Bilirubin von neuem in Bilirubinammonium überführen und erst dieses Präparat durch heißen Methylalkohol zersetzen. Es geht beim Übergießen¹⁾ mit dem kochenden Alkohol zunächst vollständig in Lösung, in dem Maße aber, wie nun Ammoniak bei der erhöhten Temperatur entweicht, scheidet sich Bilirubin ab. Doch wird die Abscheidung ersichtlich nicht vollständig, und man erhält eine zweite, wenn aus dem Filtrat der ersten der Methylalkohol ganz langsam abdestilliert wird, wobei schließlich die Ammoniakentwicklung aufhört. Leider läßt sich eine Oxydation auch bei diesen Operationen nicht vermeiden, doch bleibt das eine Oxydationsprodukt im Methylalkohol mit grüner Farbe gelöst. Seine Menge ist sehr gering, wenn es sich um die Aufarbeitung des kristallisierten Bilirubinammoniums handelt, sie ist etwas größer bei dem durch Fällung mit Äther erhaltenen Bilirubinammonium, und bemerkenswerterweise läßt sich dieses Oxydationsprodukt im trockenen Zustande durch Methylalkohol oder durch Chloroform zerlegen, indem jedes der Lösungsmittel einen besonderen Teil fortnimmt, der Alkohol einen grün gefärbten Stoff, das Chloroform dagegen Bilirubin, welches Verhalten von neuem an die Möglichkeit erinnert, daß in diesem Oxydationsprodukt ein chinhydronartiger Stoff vorliegen könnte.²⁾ Die Frage, ob sich neben diesem ein zweites nur in Essigsäure lösliches Oxydationsprodukt gebildet hatte, wurde durch die Extraktion der zweiten Abscheidung mittels Chloroform³⁾ dahin entschieden, daß Spuren eines solchen als unlöslicher Belag an der Extraktionshülse zurückblieben.

Bei der Analyse gab nun nur die erste Abscheidung Zahlenwerte, die in Übereinstimmung mit der Formel $C_{33}H_{36}O_6N_4$

¹⁾ Die Extraktion mit Methylalkohol empfiehlt sich nicht, da äußerst heftiges Stoßen auftritt, sobald sich etwas Bilirubin im Kochkolben abgesetzt hat.

²⁾ Vgl. diese Zeitschr., Bd. 91, S. 61 (1914).

³⁾ Eine direkte Extraktion mit Essigsäure verbietet sich, weil Bilirubin unter dem Einfluß von Essigsäure Umwandlung in ein grün gefärbtes Oxydationsprodukt erleidet.

stehen, schon Fraktion II lieferte ein Ergebnis, das eher mit $C_{33}H_{36}O_6N_4$ harmoniert.

Ich glaube aber nicht, daß es sich um zwei verschiedene Stoffe von den angegebenen empirischen Formeln handelt, gibt doch Fraktion II wiederum ein prachtvoll krystallisierendes Bilirubinammonium und daneben das durch Äther fällbare. So wäre eher an das Vorliegen zweier homologer Farbstoffe etwa von der Zusammensetzung $C_{33}H_{36}O_6N_4$ und $C_{32}H_{34}O_6N_4$ zu denken. Doch sprechen die analytischen Resultate gegen diese Auffassung, ein scharfer Schluß läßt sich allerdings leider wiederum nicht ziehen. Das krystallisierte Bilirubinammonium aus Fraktion II gibt nämliche Werte, die am besten mit der Formulierung $C_{33}H_{36}O_6N_4 \cdot NH_3 + CH_3OH$ übereinstimmen; es gelang aber bisher nicht, den Methylalkohol zu entfernen. Das durch Äther gefällte Bilirubinammonium aus Fraktion II gab aber Werte, die mit der Formel $C_{33}H_{36}O_6N_4NH_3$ harmonieren, und vor allem gaben die beiden Fraktionen von Bilirubin, die aus diesem mit Hilfe von Methylalkohol hergestellt wurden, auf die Formel $C_{33}H_{36}O_6N_4$ stimmende Werte.¹⁾

Und so glaube ich nach allen Erfahrungen annehmen zu können, daß dem Bilirubin tatsächlich die Formel $C_{33}H_{36}O_6N_4$ zuerteilt werden kann und daß die abweichenden Analysenresultate zum Teil als die Folge einer außerordentlich rasch einsetzenden Oxydation bei der einen Bilirubinmodifikation anzusprechen sind, zum andern Teil darauf zurückgeführt werden müssen, daß andere Bilirubinmodifikationen kleine Mengen des Lösungsmittels, mit dem sie in Berührung gekommen sind, z. B. Chloroform, hartnäckig zurückhalten.²⁾

Diese Annahme rechtfertigt sich auch durch die bereits veröffentlichten Resultate der Analysen des Bilirubinammoniums,

¹⁾ Eine Methylierung durch die Behandlung mit Methylalkohol kommt nicht in Frage, wenigstens wurde eine solche auch nur in Spuren beobachtet, als Bilirubin mit Methylalkohol und entwässertem Kupfervitriol gekocht worden war, welches Mittel zur Esterifizierung empfohlen worden ist (Drushel-Holden, Chem. Zentralbl. 1916, Bd. I, S. 142).

²⁾ H. Fischer zeigte, daß Dimethylanilin sehr fest haften kann, was auch mit meinen Erfahrungen übereinstimmt, diese Zeitschr., Bd. 73, S. 219 (1911).

worauf auch H. Fischer schon hingewiesen hat. Zwar ließen die erhaltenen Werte die Aufstellung einer Formel mit 32 Kohlenstoffatomen ebenfalls zu, doch war, wie von mir bereits erwähnt wurde, nicht ausgeschlossen, daß den Präparaten von der Darstellung her noch etwas Methylalkohol anhaftete, vielleicht auch noch etwas Ammoniak über ein Molekül hinaus. Das Trocknen im Vakuum genügte nicht zur Entfernung dieser geringen Mengen, während das Trocknen bei höherer Temperatur eine beginnende Zersetzung oder eine sich durch Verfärbung kenntlich machende Umwandlung hervorruft.

Diese Auffassung erwies sich nun insofern als richtig, als ein aus zweimal gereinigtem Bilirubin hergestelltes Präparat von kristallisiertem Bilirubinammonium, das im Vakuum zur Gewichtskonstanz gebracht worden war, weiteren Gewichtsverlust erlitt und zwar durch Behandeln des getrockneten Präparats mit trockenem Ammoniakgas. Hierbei wird Ammoniak aufgenommen, es entweicht aber wieder beim abermaligen Verbringen in das Vakuum, und hierbei wurde eine wenn auch geringe Gewichtsverminderung über die Menge des aufgenommenen Ammoniaks hinaus beobachtet. Bei einer zweiten Behandlung mit Ammoniakgas war eine Gewichtsabnahme nicht mehr festzustellen.

Bei solchen Versuchen wurden nun auch die schon vorliegenden Beobachtungen ergänzt, aus denen hervorgeht, daß kristallisiertes Bilirubinammonium und durch Äther gefälltes verschiedenes Verhalten aufweisen, wie das schon der Augenschein lehrt, denn das erstere ist recht beständig und verändert sich bei Z.-T. unter Dunkelfärbung nur ganz allmählich, auch bei 90° sehr langsam, schneller bei 105°, wobei es eine metallisch grüne Färbung annimmt. Das letztere ist augenscheinlich rascher veränderlich, und zwar ist das aus Rohbilirubin erhaltene Bilirubinammonium B beständiger als das aus gereinigtem Bilirubin B hervorgehende Bilirubinammonium BB (vgl. das Schema auf Seite 104). Jetzt wurde nun festgestellt, daß das durch Äther gefällte Bilirubinammonium nach der Behandlung mit Ammoniakgas an der Luft noch bedeutend an Gewicht zunimmt, um dann langsam das aufgenommene

Ammoniak wieder abzugeben, dessen Menge etwa einer Molekel Ammoniak gleichkommt. Das krystallisierte Bilirubinammonium AA zeigt unter denselben Bedingungen nur geringe Zunahme an der Luft, die aufgenommene Menge Ammoniak entspricht etwa einem Molekül.

Noch ausgeprägter ist der Unterschied zwischen den Bilirubinen, die aus den erwähnten Bilirubinammoniumpräparaten durch Extraktion mit Chloroform wiedergewonnen worden waren, und zwar zwischen Bilirubin A und Bilirubin BB. Es zeigte sich, daß beide Präparate bei der Behandlung mit trockenem Ammoniakgas eine Menge desselben aufnehmen, die etwa drei Molekeln für das Bilirubinmolekül entspricht. Beim Liegen an der Luft verliert nun das erstere das Ammoniak rasch, in drei Tagen war die aufgenommene Menge vollständig abgegeben, das letztere verlor in derselben Zeit nur die Hälfte des Ammoniaks, erst im Vakuum trat vollständige Abspaltung ein.

Bei einer zweiten Behandlung nahm Bilirubin A nur etwa zwei Molekeln Ammoniak, Bilirubin BB wieder drei Molekeln auf. Hiermit dürfte ein weiterer Beweis dafür erbracht sein, daß das Bilirubin in mehreren Modifikationen auftreten kann, deren Trennung auf dem Wege über das Bilirubinammonium nunmehr angebahnt ist. Vielleicht führt er uns einmal zu chemischen Individuen von ausgeprägt verschiedenem Charakter. Einstweilen ist die vollständige Trennung noch nicht gelungen, weil sich unter dem Einfluß von Chloroform einerseits, Ammoniak andererseits, welche Stoffe hauptsächlich in Betracht kommen, immer wieder ein Gleichgewicht zwischen den beiden Hauptmodifikationen und zwischen ihnen stehenden einzustellen bestrebt ist. Und zwar verwandelt sich nach den bisherigen Beobachtungen Modifikation A in B unter dem Einfluß von Ammoniak, während Chloroform umgekehrt B in A zurückführt.

Ich stelle mir vor, daß bereits im orange gefärbten Rohbilirubin ein Gemisch mehrerer Modifikationen vorliegt. Bei der Überführung in das Bilirubinammonium wird Modifikation A mit Ammoniak verbunden und krystallisiert teilweise in der Kältemischung aus, ein anderer Teil von A nebst Modifikation B

bleibt, ebenfalls mit Ammoniak verbunden, in Lösung. Unter der Einwirkung des Ammoniaks vergrößert sich hierbei die Menge von B auf Kosten von A.

Das krystallisierte Bilirubinammonium liefert durch Chloroformextraktion hauptsächlich die Modifikation A, aber nicht ausschließlich, da sich ja Ammoniak abspaltet, das wiederum B erzeugt. Auch findet schon im krystallisierten Bilirubinammonium eine Umwandlung von A nach B statt, da, je länger die Aufbewahrung währt, je größer die Menge des leichter löslichen, rotbraun gefärbten Bilirubins wird.¹⁾ Andererseits liefert das durch Äther gefällte Bilirubinammonium nicht nur leicht lösliches Bilirubin bei der Extraktion mit Chloroform, sondern auch die schwer lösliche Modifikation A, sogar in erheblicher Menge.²⁾ Es findet also unter der Einwirkung des Chloroforms eine Umwandlung von B nach A statt, was dadurch erhärtet wird, daß bei der Extraktion von Bilirubinammonium B und namentlich BB, in welchem Präparat sich Modifikation B angereichert haben muß, das schwer lösliche Bilirubin A erst auftritt, wenn die Extraktion bereits einige Zeit gedauert hat. Danach hat es den Anschein, als sei die Ammoniakverbindung der Modifikation B durch Chloroform schwerer zerlegbar als die der Modifikation A.

Bilirubin B unterscheidet sich nun von A durch die große Labilität gegenüber dem Sauerstoff der Luft und so tritt mit dieser Modifikation, die vielleicht mit der aci-Form des Bilirubins sich als identisch erweisen wird, auch schon der äußerst leicht in Chloroform lösliche Farbstoff auf, dessen Analysen die beginnende Zersetzung erkennen lassen, und dann folgen die grün gefärbten mancherlei Oxydationsprodukte.

Wahrscheinlich liegen aber auch zwischen Bilirubin A und Bilirubin B mehrere Zwischenstufen, denn es gibt orange gefärbte und rote Modifikationen, deren Löslichkeit in Chloroform nicht nur verschieden ist, sondern die sich auch bei der Überführung in das Bilirubinammonium recht verschieden verhalten,

¹⁾ Sehr viel schneller geht diese Umwandlung bei 105° vor sich.

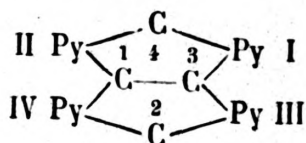
²⁾ Bilirubinammonium A liefert z. B. 80% schwer lösliches Bilirubin. Bilirubinammonium B 60%.

die z. B. den krystallisierten Anteil in schlechter Ausbeute oder gar nicht geben, während bei der Extraktion des erhaltenen Bilirubinammoniums durch Chloroform doch wieder schwer lösliches Bilirubin abgesetzt wird, wodurch sich zeigt, daß eine Umwandlung eingetreten ist.

Vielleicht stellt auch das mit Hilfe von Methylalkohol hergestellte Bilirubin eine besondere Modifikation vor; die schön rote Farbe dieses Präparates hält sich anscheinend sehr lange, durch Chloroform wird es in die orange gefärbte Modifikation übergeführt.

In den Formeln für das Bilirubin, die ich in einer zusammenfassenden Arbeit im Archiv der Pharmacie¹⁾ als möglichen Ausdruck für die Konstitution des Farbstoffs entwickelt habe, kam diese Umwandlungsmöglichkeit zur bildlichen Darstellung. Indessen müssen diese Formeln eine Korrektur erfahren, nachdem die empirische Zusammensetzung des Bilirubins mit 33 Kohlenstoffatomen als der wahrscheinlich richtige Ausdruck bezeichnet werden konnte.

Halten wir an der Formulierung mit 34 Kohlenstoffatomen für das Hämatin fest,²⁾ so fragt sich nunmehr, an welcher Stelle des Moleküls beim Übergang in Bilirubin die Ablösung eines Kohlenstoffatoms stattfindet. Da es sich um die Kohlenstoffatome der Pyrrolkerne und die ihrer Substituenten nicht handeln kann, kommt lediglich eines der vier Kohlenstoffatome in Betracht, welche die Verbindung der vier Pyrrolkerne bewirken etwa nach dem Schema:



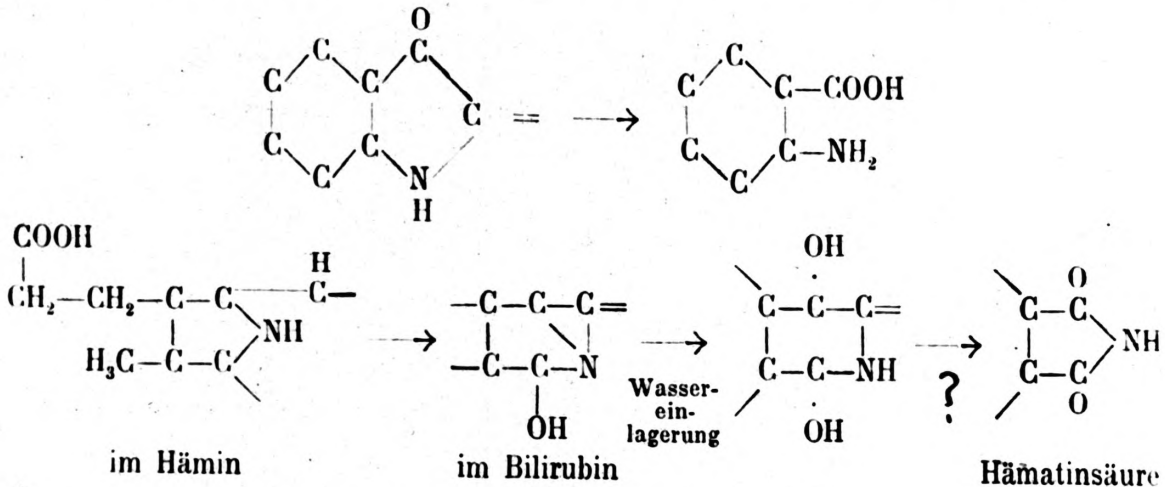
Nun hatte ich noch bei der Annahme von 32 Kohlenstoffatomen im Bilirubin die Anschauung entwickelt,³⁾ daß C₄ und C₁ wegfallen, während C₃ die Bindung von Py I, III und

¹⁾ Bd. 253, S. 457 (1915).

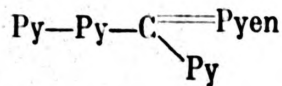
²⁾ Ebenda, S. 472.

³⁾ Diese Zeitschr., Bd. 94, S. 145 (1915) und Arch. d. Pharm., Bd. 253, S. 486.

IV übernehmen würde, und bemerkt: ¹⁾ man könne bei 33 Kohlenstoffatomen daran denken, daß das eine Methin des Hämins beim Übergang in Bilirubin in den einen Pyrrolkomplex unter Erweiterung zum Pyridinring aufgenommen wird in Anlehnung an die Tatsache, daß Hämatinsäure aus Bilirubin durch Einwirkung von Alkalien gebildet wird, welche Erscheinung mit der Aufspaltung des Indigos zur Anthranilsäure in Parallele gestellt wurde:



Würde sich diese Vorstellung durch weitere experimentelle Daten erhärten lassen, so bliebe damit die Auffassung bestehen, daß dem Bilirubin eine den Triphenylmethanfarbstoffen ähnliche Konstitution als Pyridylpyrryl-pyrryl-pyrrolmethan zuzuschreiben wäre.

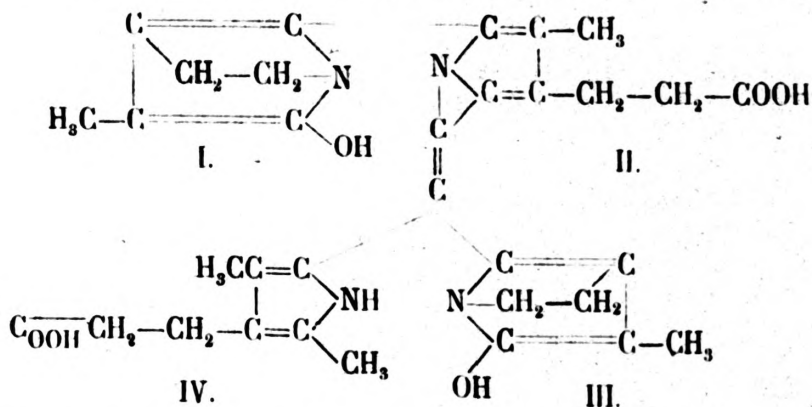


Es bliebe aber die Schwierigkeit bestehen, daß sich, wie Seite 489 des Archivs bereits bemerkt wurde, ein Mesobilirubinogen, d. h. eine Leukoverbindung durch Addition von 6 (statt wie beobachtet 8) Atomen Wasserstoff schon bilden kann, und daß dieses die wesentliche Eigenschaft des H. Fischerschen Mesobilirubinogens, sich mit Aldehyden kondensieren zu können, nicht besitzen kann, weil es Wasserstoffatome an einem Kohlenstoffatom der Pyrrolkerne nicht besitzt.

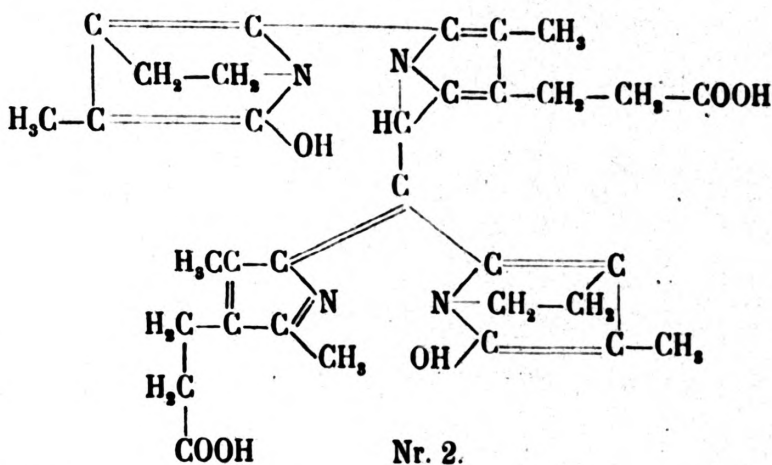
Die hier vor Augen geführte Schwierigkeit würde verschwinden durch die Annahme, daß beim Übergang in Bili-

¹⁾ Arch. d. Pharm., Bd. 253, S. 486, Anm. **; vgl. auch diese Zeitschr., Bd. 91, S. 58, Anm. 2 (1914).

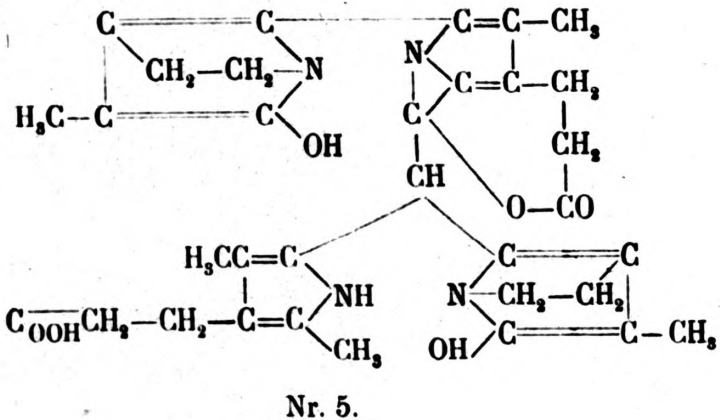
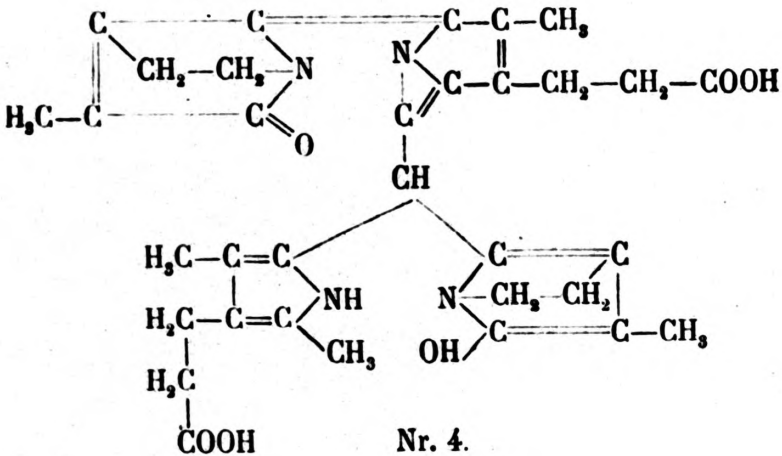
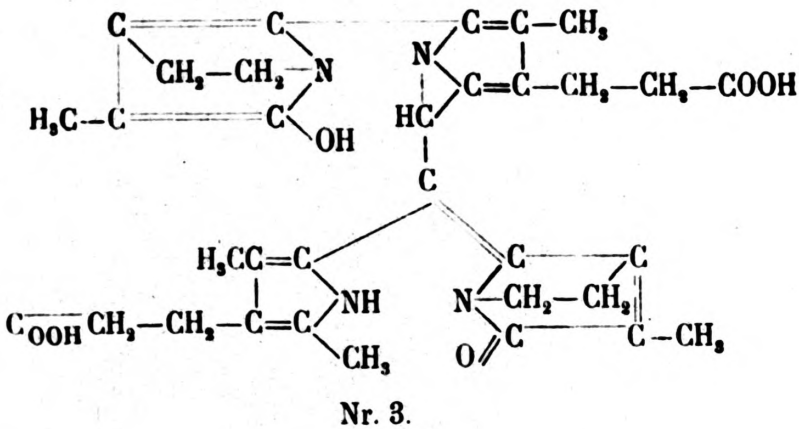
rubin folgende Veränderungen eintreten: Kohlenstoffatom C₄ wird wegoxydiert, C₃ wird von dem Pyrrolkern I aufgenommen, C₁ trennt sich (durch Einlagerung von Wasser) von Pyrrolkern II und übernimmt die Bindung der Kerne Py III und Py IV; schließlich müssen wir noch die Substituenten der Kerne Py I und Py II vertauschen oder, was dasselbe bedeutet, die Kerne I und II des früheren Bildes die Stelle wechseln lassen, um zu folgendem neuen Bilde für das Bilirubin zu kommen, das allen bisherigen Beobachtungen Rechnung trägt:



Zunächst findet die Möglichkeit der Existenz zahlreicher Bilirubinmodifikationen, namentlich solcher mit Hydroxyl- und solcher mit Ketogruppen¹⁾ ihre Erklärung in der Umlagerungsfähigkeit der das Bild zusammensetzenden Atomgruppen. Formel Nr. 2 stelle z. B. das Bild einer ersten Umwandlungsform vor, Nr. 3 und Nr. 4 Bilder für Ketoformen, Nr. 5 das Bild einer farblosen Modifikation des Bilirubins.



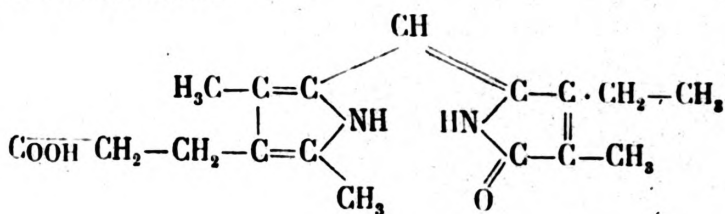
¹⁾ Diese Zeitschr., Bd. 94, S. 156 (1915).



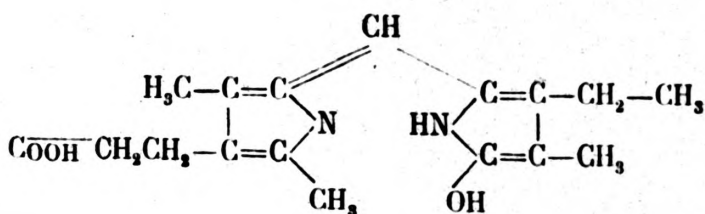
Die neue Formulierung erklärt ferner die Unfähigkeit zur Komplexbildung nicht nur des Bilirubins und des Mesobilirubins, sondern auch des Mesobilirubinogens,¹⁾ da auch in

¹⁾ Bei der Aufstellung von Formeln für das Bilirubin und seine Derivate hatte ich bisher geglaubt, der Tatsache Rechnung tragen zu müssen, daß Mesobilirubinogen im Gegensatz zu Bilirubin und Mesobilirubin befähigt ist, komplexe Salze zu bilden, wobei ich mich auf die

diesem noch ein Stickstoffatom eine Bindung aufweist, welche die Bildung von komplexen Salzen verhindern dürfte. Auch die Bildung verschiedener Körper bei der Reduktion¹⁾ kann man an der Hand des Bildes verständlich finden, dann das Entstehen des Mesobilirubins durch Addition von vier Wasserstoffatomen in den Komplexen I und III unter Sprengung der Brückenbindung mit Bildung von zwei Äthylgruppen, so daß sich dann bei nachfolgender Oxydation Methyläthylmaleinimid abspalten kann. Auf die Möglichkeit der Bildung eines Stoffes, der die Eigenschaften des Mesobilirubinogens aufweist, komme ich zurück. Zunächst sei noch hervorgehoben, daß die Abspaltung eines Körpers von der Konstitution, wie sie die Bilirubinsäure aufweist, sich aus dem neuen Bild für das Bilirubin ablesen läßt und daß gerade dieser charakteristische Unterschied im Verhalten des Bilirubins und des Hämins im Bilde für die beiden Farbstoffe zum Ausdruck kommt. Ferner erklärt das Bild die Möglichkeit des Bestehens zweier isomerer Xanthobilirubinsäuren



und

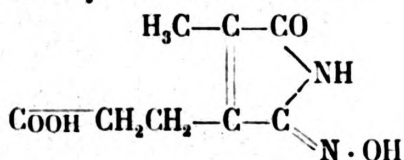


Angabe H. Fischers (Diese Zeitschrift, Bd. 75, S. 341 [1911]) gestützt habe, daß das Kupfersalz des Hemibilirubins (= Mesobilirubinogen) das Metall komplex gebunden enthält. Allerdings lieferten die Analysen (S. 346) keine konstanten Zahlen, und in den Ergebnissen der Physiologie, Bd. 15, S. 795 teilt H. Fischer mit, daß diese Komplexsalzbildung nicht vom Mesobilirubinogen, sondern von einem Umwandlungsprodukt desselben hervorgerufen wird.

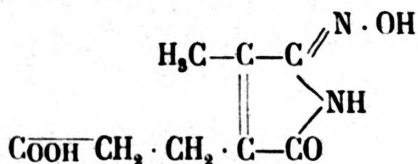
¹⁾ H. Fischer erhielt immer außer Mesobilirubin, resp. Mesobilirubinogen einen zweiten Stoff, Diese Zeitschr., Bd. 73, S. 225 (1911), Bd. 75, S. 346 (1911), Zeitschr. f. Biologie, Bd. 65, S. 172 (1914).

für die einige experimentell ermittelte Tatsachen¹⁾ sprechen, wie die verschiedenen Schmelzpunkte der Xanthobilirubinsäurepräparate und ihrer Ester, die einerseits aus Bilirubinsäure durch Oxydation, andererseits durch Spaltung des Mesobilirubinogens entstehen. Klarstellung hierüber würde daher für die Konstitutionsfrage des Bilirubins und seiner Modifikationen von größter Bedeutung werden. Durch Reduktion, d. h. Anlagerung von zwei Wasserstoffatomen gehen beide Xanthobilirubinsäuren in dieselbe Bilirubinsäure über.

Auch die mangelhaften Ausbeuten bei der nur schwer zu erreichenden vollständigen Spaltung des Bilirubins durch Jodwasserstoffsäure an substituierten Pyrrolen, von denen nur 3,5-Dimethyl-4-äthylpyrrol²⁾ (Kryptopyrrol) in nennenswerter Menge entsteht, finden durch das Bild ihre Erklärung dadurch, daß die in Betracht kommenden Pyrrolkerne sauerstoffhaltig sind.³⁾ Das Entstehen der 3,5-Dimethylpyrrol-4-propionsäure, läßt sich ebenfalls ablesen, sowie das der 2,3,5-Trimethylpyrrol-4-propionsäure, während die Hämopyrrolcarbonsäure (2,3-Dimethyl-4-propionsäure) sich nur in untergeordneter Menge bilden kann. Das Oxim derselben entsteht aber aus Komplex IV durch Ersatz des Methyls durch N · OH:



ebenso wie Trimethylpyrrolpropionsäure dieses Oxim in größerer Ausbeute gibt als das isomere Produkt:



¹⁾ Hans Fischer, Zeitschr. f. Biologie, Bd. 65, S. 174 (1914).

²⁾ Es wäre wünschenswert, daß die aus Hämin resp. Bilirubin gewinnbaren Pyrrole eine einheitliche Bezeichnung erhielten, und diese wird am besten übersichtlich, wenn dem Äthyl stets die Stellung 4 eingeräumt wird. Das Gleiche gilt für die entsprechenden Pyrrolpropionsäuren.

³⁾ Benary und Silbermann (Ber., Bd. 46, S. 1363) synthetisierten den 2-Methyl-4-Oxypyrrol-3-Carbonsäureester, der dann von H. Fischer auf sein Verhalten gegen Eisessig-Jodwasserstoff untersucht wurde.

Durch dieses Mittel erfolgt an einer Stelle des Moleküls Oxydation, an einer anderen Reduktion, wie einwandsfrei daraus hervorgeht, daß H. Fischer Mesobilirubin — allerdings in nicht reinem Zustande — sowohl aus Bilirubin wie aus Mesobilirubinogen durch Kaliummethylat erhalten konnte. In letzterem Fall entsteht auch noch Xanthobilirubinsäure.

Was endlich die Bildung eines Stoffes von den Eigenschaften des Mesobilirubinogens betrifft, der, als zur Kondensation mit Aldehyden befähigt, Wasserstoff an einem Pyrrolkern enthalten muß, durch Addition von vier Wasserstoffatomen an das nach Sprengung der Brückenbindungen unter Aufnahme von vier Wasserstoffatomen entstehende Mesobilirubin, so läßt sich diese unter Zugrundelegung des Bildes Nr. 3 für das Bilirubin erklären. Der Reduktion würden die beiden vom Pyrrolkern III ausgehenden Doppelbindungen anheimfallen, die im Kern enthaltene Doppelbindung würde dagegen erhalten bleiben, was mit dem Verhalten z. B. der Methyläthylmaleinsäure gegenüber Natriumamalgam in alkalischer Lösung übereinstimmt.¹⁾ (Formel siehe nächste Seite.)

Danach würde das Mesobilirubinogen den sekundären Alkohol eines Pyrrolins vorstellen, was auch seine Leichtveränderlichkeit erklären würde.

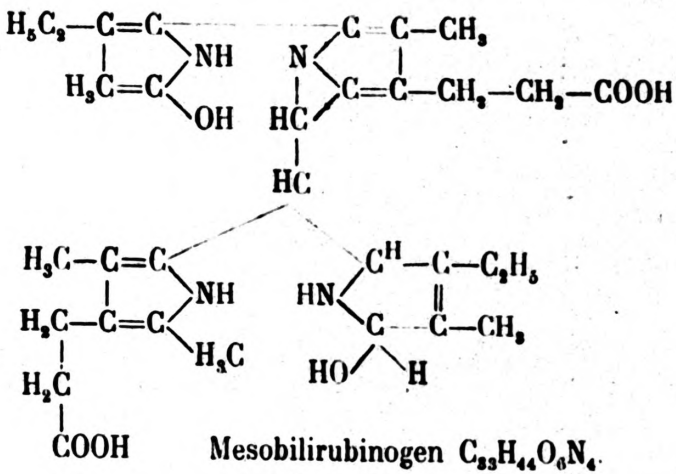
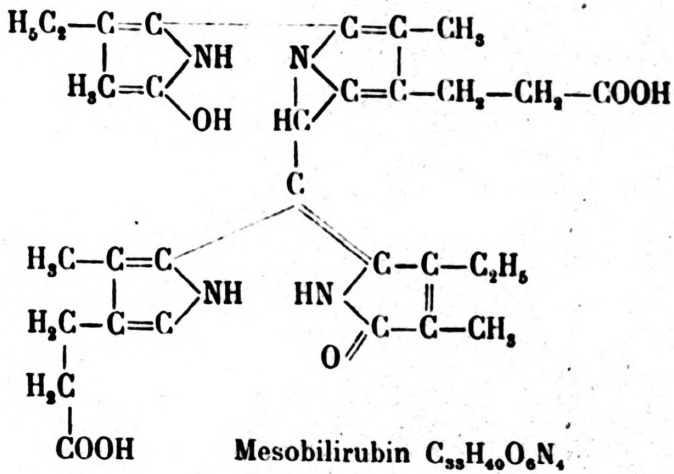
Das verschiedene Verhalten gegenüber Eisessig-Bromwasserstoff, sowie gegen Natriumamalgam, das Hämin und Bilirubin aufweisen, erklärt die neue Formulierung wie das in der letzten Abhandlung gegebene Bild.²⁾

Die Möglichkeit, daß das Bilirubin in verschiedenen Modifikationen existieren kann, steht endlich mit der Beobachtung im Einklang, daß sich bei der Addition von Diazomethan ein einheitliches Reaktionsprodukt nicht bildet, die Anlagerung wird an verschiedenen Stellen des Moleküls erfolgen können.

Die Kombinationsfähigkeit des Bilirubins mit einem Molekül oder mit zwei Molekülen einer Diazoverbindung bedarf weiterer Aufklärung.

¹⁾ Vgl. meine Zusammenstellung in Liebigs Annalen, Bd. 345, S. 5 (1905).

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 94, S. 143 (1915).



Experimenteller Teil.

Das für die im experimentellen Teil beschriebenen Versuche benutzte Rohbilirubin wurde aus 1000 g Rindergallensteinen hergestellt, die vom Februar bis Juli 1915 nach der früher geschilderten Methode aufgearbeitet wurden. Sie lieferten durch Extraktion mit Chloroform 111 g orange gefärbtes Rohbilirubin, nachdem mit Äther, heißem Wasser, 10%iger Essigsäure, Äther und Alkohol vorbehandelt worden war, und 13 g braunrot gefärbtes Rohbilirubin, nachdem der angegebenen Behandlung eine Extraktion mit siedendem Eisessig zur Entfernung des Choleprasins gefolgt war, ebenfalls durch Extraktion mit Chloroform.¹⁾

¹⁾ Vgl. Diese Zeitschr., Bd. 91, S. 61 (1914).

Schema für die Bezeichnung.

Roh-Bilirubin			
Krystall. Bilirubin-Ammonium (A)		Durch Äther gefällt. Bilirubin-Ammonium B	
↓		↓	
schwerlös. 1 mal gereinigtes Bilirubin (A)		schwerlös. 1 mal gereinigtes Bilirubin (B)	
Krystallisiertes Bilir.-Amm. (AA)	durch Äther gefälltes Bilir.-Amm. (AB)	Krystallisiertes Bilir.-Amm. (BA)	durch Äther gefälltes Bilir.-Amm. (BB)
↓	↓	↓	↓
schwerlös. Bilirubin (AA) (2 mal gereinigt)	schwerlös. Bilirubin AB	schwerlös. Bilirubin BA	Bilirubin BB
		krystall. BrNH ₃ BAA	durch Äth. gef. BrNH ₃ BAB

I. Darstellung von Bilirubinammonium aus dem orange gefärbten Rohbilirubin.

Je 10 g des Rohbilirubins, bei 90° getrocknet, wurden mit 75 ccm Methylalkohol (K) in einem Erlenmeyer übergossen, der Alkohol vorsichtig zum Sieden erhitzt, und die Suspension durch Aufleiten von trockenem Ammoniakgas unter kräftigem Umschütteln in Lösung gebracht, worauf sofort durch einen Heißwassertrichter mit Kreppfilter (Dreverhoff, 15 cm Dm.) filtriert wurde.¹⁾ Zum Nachspülen wurden 25 und eventuell noch 10 ccm heißer, mit Ammoniak gesättigter Methylalkohol verwendet, worauf im Filter nur ein ganz geringer Rückstand bleiben darf. Außerdem bleiben im Filter Farbstoffreste hängen, die verloren gehen, da sie sich außerordentlich schnell grün färben, was zweifellos auf eine Oxydation durch den Luft-sauerstoff, begünstigt durch die große Oberfläche, zurückzuführen ist.

¹⁾ Zu jeder Operation ist ein frisches Filter zu verwenden, da Spuren hängen gebliebenen Bilirubinammoniums bei der zweiten Benutzung das Auskrystallisieren des Salzes auf dem Filter bewirken können.

Das Filtrat erstarrte schnell; zur vollständigen Abscheidung des krystallisierten Bilirubinammoniums wurde eine Stunde lang in eine Kältemischung gestellt, worauf scharf abgesaugt und mit 20 ccm eiskaltem Methylalkohol nachgewaschen wurde. Das erhaltene Filtrat wurde sofort in 600 ccm Äther in dünnem Strahl gegossen; die Abscheidung des noch gelösten Bilirubinammoniums ist dann so vollständig wie möglich erreicht. Behufs Extraktion mit Chloroform wird dann möglichst rasch durch eine große Hülse von Schleicher und Schüll filtriert und mit Äther nachgewaschen.

Aus den Filtraten wird der Äther und der Methylalkohol abdestilliert, wonach noch kleine Mengen sehr schön krystallisierten, rein rot gefärbten Bilirubins zu gewinnen sind. (Abschnitt VII.)

Die Ausbeuten betragen:

A. An krystallisiertem Bilirubinammonium: 6,0, 6,3, 6,9, 6,2 g.

B. An durch Äther gefällttem Bilirubinammonium: 4,0, 4,0, 3,5 g.

I A. Das auskrystallisierte Bilirubinammonium (A)

dürfte zunächst mehrere und zwar etwa vier Molekeln Ammoniak enthalten, die rasch bis auf zwei abgegeben werden. Von diesen entweicht dann das eine langsam an der Luft, natürlich noch langsamer in einem abgeschlossenen Raum, im Vakuum entweicht es vollständig nur, wenn das Präparat sofort nach der Darstellung in das Vakuum gebracht wird. Beim Lagern muß eine Umwandlung eintreten können, die es mit sich bringt, daß etwas mehr Ammoniak zurückgehalten wird, als einer Molekel Ammoniak entspricht.

α) 1,3298 g Bilirubinammoniak A (das Präparat hatte einen Tag auf einem Tonteller an der Luft gelegen und riecht noch schwach nach Ammoniak) verloren in 10 Tagen beim Liegen über Kalk = 6,43%.

Ber. für $C_{33}H_{36}O_6N_4 \cdot 4 NH_3$: $2 \frac{1}{2}$ Mol. NH_3 = 6,5%.

0,1195 Subst.: 12,5 ccm N bei 15° und 750 mm B = 12,1% N

$C_{33}H_{36}O_6N_4 \cdot 1 \frac{1}{2}$ NH_3 , berechnet 12,6% N.

Im Vakuum verlor dann das Präparat in 14 Tagen nur noch 0,45 %.

0,1815 Subst.: 19,2 ccm N bei 17° und 749 mm B. = 12,1% N.

β) Dasselbe Präparat wurde sofort in das Vakuum gebracht, wobei der Verlust etwas größer war. 1,6709 g verloren in 2 Tagen 0,1127 g = 6,74%, dann in 14 Tagen 0,0152 g = 0,91%, zusammen 7,65%.

Ber. für $C_{33}H_{36}O_6N_4 \cdot 4 NH_3 : 3 NH_3 = 7,82\%$.

0,1556 Subst.: 0,3738 CO_2 und 0,0989 H_2O

0,1375 > 14,8 ccm N bei 14,5° und 751 mm B.

$C_{33}H_{36}O_6N_4 \cdot NH_3$.	Ber.:	65,89% C	6,50% H	11,65% N
	Gef.:	65,52%	7,06%	12,5%

γ) Die neue Probe desselben Präparats hatte nach der Darstellung einen Monat im Exsikkator gelegen.

0,3397 g verloren jetzt i. V. 0,0071 g = 2,1%.

Ber. für $C_{33}H_{36}O_6N_4 \cdot 2 NH_3 \cdot 1 NH_3 = 2,75\%$.

0,1475 Subst.: 0,3602 CO_2 und 0,0915 H_2O

0,1187 > : 12,4 ccm N bei 17° und 741 mm B.

$C_{33}H_{36}O_6N_4 \cdot NH_3$.	Ber.:	65,89% C	6,5 % H	11,65% N
	Gef.:	66,60%	6,88%	11,81%

δ) Beim Erwärmen des im Vakuum getrockneten Präparats auf 90° trat allmählich eine Verfärbung ein, wobei aber der Gewichtsverlust sehr gering war (0,15%). Bei der Extraktion mit Chloroform gab dann das Präparat viel langsamer Ammoniak ab als das nicht erhitze. Das herausgelöste Bilirubin enthielt sehr viel in Chloroform leicht lösliche Teile (1: 286, 16 Teile Chloroform enthielten 0,0568 g Bilirubin), die sich an der Luft rasch verfärbten.

ε) Das auskrystallisierte Bilirubinammonium hat zwei Tage in einer Ammoniakatmosphäre gelegen. Eine Probe wird darauf im Vakuum getrocknet und erneut mit Ammoniakgas behandelt, wobei etwa 2½ Molekeln NH_3 aufgenommen werden (0,1678 g : 0,0116 g $NH_3 = 6,91\% NH_3$).

$C_{33}H_{36}O_6N_4 \cdot NH_3$. Berechnet für die Aufnahme von 2½ Mol. $NH_3 = 7,1\%$.

Diese werden zunächst im Vakuum wieder restlos abgegeben, nach einer zweiten Behandlung mit Ammoniak bleiben etwa 0,0027 g $NH_3 = 1,6\%$ gebunden.

z) Eine zweite Probe wird nur einmal mit Ammoniakgas behandelt und dann im Vakuum getrocknet

0,1335 Subst. : 0,3188 CO₂ und 0,0807 H₂O

0,1688 > : 17,3 ccm N bei 9° und 739 mm B.

C ₃₃ H ₃₆ O ₆ N ₄ · NH ₃ .	Ber.:	65,89% C	6,5 % H	11,65% N
	Gef.:	65,13%	6,72%	11,98%

η) Eine Probe des mit Ammoniakgas behandelten kristallisierten Bilirubinammoniums wird auf 90° erwärmt, wobei es sich dunkler färbt, und dann erneut in eine Ammoniakatmosphäre gebracht. Jetzt beträgt die Aufnahme fast 13% (0,1729 Substanz : 0,0226 NH₃); im Vakuum entweicht dann das Ammoniak bis auf 2,1% (0,0037 g), die festgehalten werden.

I B. Das durch Äther gefällte Bilirubinammonium trocknet im Filter zu einem Gemisch von braunen, roten und gelben Stücken ein, die an der Oberfläche dunkel gefärbt sind. Eine 17 Tage über Kalk getrocknete Probe enthielt 11,89% N, (0,1155 g Substanz : 11,9 ccm N bei 16,2° und 753 mm B), doch verlor sie bei weiterem Trocknen noch 2,6% an Gewicht.

II A. Darstellung von Bilirubin aus kristallisiertem Bilirubinammonium A.

a) Anzeichen für eine mit der Zeit eintretende Umwandlung der dem Bilirubinammonium A zugrunde liegenden Bilirubinmodifikation.

b) Abtrennung von schwefelhaltigen Verunreinigungen.
Menge des in Chloroform unlöslichen Anteils.

1. Versuch. Das aus 20 g Rohbilirubin erhaltene kristallisierte Bilirubinammonium wurde in einer Hülse am Rückflußkühler sofort nach der Darstellung mit Chloroform extrahiert.

a) Ausbeute an Bilirubin.

α) Schwer löslich im Kochkolben abgesetzt:

nach	1½ Tagen :	3 g, sehr schön hellrot gefärbt
„ weiteren 3	„ :	5,5 „ „ „ „ „
„ „ 2½	„ :	1,5 „ gelbbraun verfärbt
„ „ 1½	„ :	0,5 „ stärker

Aus den Filtraten wurden nach Abdestillation des Chloroforms gewonnen:

β) Beim Herausspülen mit Chloroform auf dem Filter bleibend: 0,7 g, braunrot.

γ) Beim Herausspülen mit Chloroform in das Filtrat gehend: Spuren.

Analyse der hellrot gefärbten Teile:

0,1727	Subst. (90°)	: 0,4210 CO ₂ und 0,0962 H ₂ O	= 66,47 % C und 6,19 % H
0,1440	» (90°)	: 0,3506 CO ₂	= 66,41 % C
0,1444	» (105°)	: 0,3585 CO ₂ und 0,0790 H ₂ O	= 67,7 % C und 6,1 % H
0,1534	» (105°)	: 0,3751 CO ₂ » 0,0799 H ₂ O	= 66,69 % C » 5,8 % H
0,1045	» (90°)	: 9,4 ccm N bei 19° und 744 mm B.	= 10,11 % N.

1 a. Versuch. Die Extraktion des aus 6 g Rohbilirubin erhaltenen krystallisierten Bilirubinammoniums war in 2¹/₂ Tagen beendet, es wurden in 1¹/₂ Tagen 3 g, dann noch 0,2 g schwer lösliches Bilirubin von der Farbe des Quecksilberbiodids erhalten.

0,1457	Subst. (100°)	: 0,3561 CO ₂ und 0,0771 H ₂ O	= 66,66 % C und 5,9 % H
0,1361	»	: 0,3332 CO ₂ » 0,0710 H ₂ O	= 66,77 % C » 5,8 % H
0,1240	»	: 11,1 ccm N bei 19° und 742 mm B.	= 10,04 % N.

1. Versuch. b) In der Hülse verblieb sehr wenig mit etwas Bilirubin durchsetzter dunkelgrüner Farbstoff. An siedenden Alkohol wurde von diesem so gut wie nichts abgegeben, in konzentrierter Essigsäure waren 0,15 g löslich, also 0,75 % des verwendeten Rohbilirubins. Der Stoff gab die Gmelinsche Reaktion und enthielt 0,42 % S. (0,1300 Subst. (100°): 0,0040 BrSO₄ [Carius]).

2. Versuch. 5 g Bilirubinammonium A wurden einen Monat nach der Darstellung mit 250 ccm Chloroform am Rückflußkühler gekocht, wobei bereits nach 5 Stunden die Ammoniakentwicklung beendet war.

Die Ausbeute betrug: 4 g schwer löslich abgeschiedenes Bilirubin, hellorange gefärbt, 0,9 g braunrotes Bilirubin nach Abdestillation des Chloroforms aus dem Filtrat. Von der ersten Fraktion wurde die Löslichkeit = 1 : 1219 bestimmt¹⁾

(13,041 Lösung enthielten 0,0107 g Bilirubin).

¹⁾ Es kann aber auch vorkommen, daß leichter lösliche Teile vorhanden sind. Bei einer anderen Probe ergab die erste Ausschüttelung

Die Analyse ergab: 0,1475 Subst. (i. V.) = 0,3614 CO₂ und 0,0832 H₂O = 66,82% C und 6,27% H.

3. Versuch. 5 g Bilirubinammonium A gelangten etwa ein Jahr nach der Darstellung zur Extraktion in der Hülse.

Ausbeute α) nach 2¹/₂ Tagen 4 g, rot gefärbt, doch ein wenig verfärbt, nach 1 Tag noch 0,3 g; β) und γ): in den Filtraten ist nur sehr wenig Farbstoff vorhanden.

b) Der Rückstand beträgt 0,2 g, also 4% des Rohbilirubins, demnach sehr viel mehr als beim 1. Versuch.

4. Versuch. Zum Unterschied gegenüber dem ersten Versuch wurde hier das krystallisierte Bilirubinammonium nach zweistündigem Liegen auf einem Tonteller in eine Ammoniakatmosphäre gebracht. Die Ausbeute betrug nach dem Trocknen im Vakuum 14 g aus 20 g Rohbilirubin = 70%. Zur Extraktion gelangten 13 g, sie war erst nach 13¹/₂ Tagen beendet und lieferte:

a) α) 11 g schwer lösliches Bilirubin, orange gefärbt, β) 0,2 g leichter lösliches Bilirubin, γ) 0,3 g sehr leicht lösliches Bilirubin.

b) In Chloroform unlöslich blieben 0,14 g, also 0,7% des verwendeten Rohbilirubins.

Die Versuche ergeben, daß die Ammoniakabspaltung durch direktes Kochen mit Chloroform sehr viel rascher erfolgt als bei der Extraktion in der Hülse, daß aber die Umwandlung in die leichter lösliche Modifikation beim direkten Kochen weiter vorschreitet, denn das Verhältnis der Mengen der orange gefärbten zur braunroten Modifikation ist hier = 4,4 : 1, dort = 15 : 1. Der Einfluß des Ammoniaks ergibt sich aus dem 4. Versuch: Die Dauer der Extraktion wird verzögert, die Farbe des schwer löslichen Bilirubinanteils ist jetzt orange, wie bei Versuch 2, dann tritt das sehr leicht lösliche

eine Löslichkeit von 1 : 670 (12,6 Chloroform : 0,0188 Bilirubin), die zweite dann 1 : 931 (13,22 CHCl₃ : 0,0142 Bilirubin). Ähnliche Verhältnisse ergaben sich bei einem Bilirubin, das durch Auskochen von Bilirubinammonium mit Methylalkohol erhalten worden war. Es wurde die Löslichkeit 1 : 750 bei der ersten, 1 : 969 bei der zweiten Ausschüttelung gefunden

(22,23 Chloroform : 0,0297 Bilirubin)
 (22,68 " : 0,0234 ")

Bilirubin auf. Die Dauer der Aufbewahrung vergrößert den in Chloroform unlöslichen Teil von 0,75 resp. 0,7% bei Versuch 1 und 4 auf 4% bei Versuch 3; noch größeren Einfluß in dieser Beziehung hat das Erhitzen auf 105°, wie aus Versuch 5 hervorgeht.

5. Versuch. 2 g kristallisiertes Bilirubinammonium wurden nach einjähriger Aufbewahrung auf 105° erhitzt, wobei am ersten Tage eine Abnahme von 0,6% stattfindet (2,0115 g verlieren 0,0120 g). Am zweiten Tage wurde eine geringe, am dritten eine etwas stärkere Zunahme, um 0,001 resp. 0,0020 g, beobachtet, auch haben sich jetzt die oberflächlichen Schichten des Präparates cantharidengrün gefärbt. Die nunmehr vorgenommene Extraktion mit Chloroform ist in 1½ Tagen beendet, sie liefert:

a) α) ca. 1 g von rotbrauner Farbe, β) ca. 0,5 g von rotbrauner Farbe, γ) ca. 0,25 g.

b) In Chloroform unlöslich 0,3 g, also etwa 10% des verwendeten Rohbilirubins.

Schließlich sei darauf hingewiesen, daß das Ergebnis der Analyse für die Kohlenstoffwerte stärker durch die lange Dauer der Extraktion beeinflußt wird als durch die geringe Menge der schwefelhaltigen Verunreinigungen, die beim zweiten Versuch nicht abgetrennt wurden.

II B. Darstellung von Bilirubin aus dem durch Äther gefällten Bilirubinammonium B.

1. Versuch. Die aus 20 g Rohbilirubin stammende Ätherfällung hat 7 Tage unter Äther gestanden, sie wird sofort nach der Filtration durch Chloroform extrahiert, was längere Zeit in Anspruch nahm.

Ausbeute:

a) Bilirubin, α) schwer löslich abgeschieden (verfärbt): 5,7 g, β) aus dem Filtrat nach Abdestillation des Chloroforms beim Herausspülen mit Chloroform nicht gelöst: 0,2 g, γ) hierbei gelöst, also sehr leicht löslich: 0,5 g.

b) 0,8 g schwarzer, in Chloroform unlöslicher Rückstand = 4% des Rohbilirubins.

2. Versuch. Die Ätherfällung hatte 12 Tage unter Äther gestanden, nach dem Filtrieren wurde sie sofort extrahiert.

Ausbeute:

a) α) In $2\frac{1}{2}$ Tagen schwer löslich abgeschieden, stark verfärbt: 0,7 g, erst nach wochenlangem Extrahieren: 5 g, β) 0,5 g, γ) 0,5 g.

b) 0,5 g in Chloroform unlöslicher Rückstand = 2,5% des Rohbilirubins, hiervon 0,35 g nur in Essigsäure löslich.

3. Versuch. Die aus 20 g Rohbilirubin stammende Ätherfällung hatte nur 2 Tage unter Äther gestanden; nach der Filtration wurde sofort mit Chloroform extrahiert.

Ausbeute:

a) α) in 7 Tagen: 4 g, rotbraun gefärbt, in weiteren 4 Tagen: 1 g, β) 0,5 g, γ) 0,2 g.

b) Unlöslich in Chloroform 0,8 g, also 4% des Rohbilirubins.

4. Versuch. Das aus 6 g Rohbilirubin durch Ätherfällung erhaltene Bilirubinammonium wird nach 2 Stunden abgesaugt und sofort extrahiert. Die Extraktion ist in $3\frac{1}{2}$ Tagen beendet.

Ausbeute:

a) α) in $2\frac{1}{2}$ Tagen: 1,5 g, rotbraun gefärbt, in einem weiteren Tag: 0,2 g.

b) Unlöslich in Chloroform 0,15 g = 2,5% des Rohbilirubins.

5. Versuch. Im Gegensatz zum 3. und 4. Versuch dauerte hier die Extraktion mehrere Wochen, als ein im Vakuum getrocknetes, lange Zeit aufbewahrtes Präparat aus 21,5 g Rohbilirubin zur Verwendung kam.

Ausbeute:

a) α) 13,5 g, orange gefärbt, β) 3 g, dunkel gefärbt.

b) 4 g in Chloroform unlöslicher Rückstand = 18,6% des Rohbilirubins.

Die Versuche lehren demnach, daß das durch Äther gefällte Bilirubinammonium B Teile enthält, die sich mit der Zeit derartig verändern, daß der in Chloroform unlösliche Stoff entsteht, ferner, daß mit der Zeit eine Umlagerung eintritt, welche die Dauer der Extraktion verlängert. Endlich ist

bemerkenswert, daß sich jedenfalls ein Teil des schwer löslich abgeschiedenen Bilirubins erst während der langen Extraktionsdauer gebildet haben kann, woraus zu schließen ist, daß dem Hauptteil des durch Äther gefällten Bilirubinammoniums eine Modifikation des Bilirubins zugrunde liegt, die Ammoniak schwer abgibt, durch Chloroform aber eine Umwandlung erleidet, worauf Ammoniakabspaltung eintritt.

Die in Chloroform unlöslich zurückbleibenden Teile wurden mit heißem Alkohol behandelt, wobei sich jedesmal ein Teil, aber immer nur ein geringer löste, mit Ausnahme bei Versuch 5, bei dem ein großer Teil des reichlichen Rückstandes in Alkohol löslich war.

Aus der heißen alkoholischen Lösung erfolgte nach der Konzentration stets ein Ausfall, der Rest des Produkts wurde durch Wasser gefällt. Was sich in Alkohol nicht löste, ging durch Essigsäure in Lösung, wobei öfters noch etwas Bilirubin zurückblieb.

Bei Versuch 3 wurde z. B. erhalten: 0,1 g beim Erkalten der alkoholischen Lösung ausgefallen, 0,2 g durch Fällung der alkoholischen Lösung durch Wasser, 0,5 g nur in Essigsäure löslich.

In dem letzteren Teil, der die Gmelinsche Reaktion gleich allen Verunreinigungen des Bilirubins sehr schön gab, waren 0,618% Schwefel enthalten.

0,1897 Subst. (90°) : 0,0085 BaSO₄ (Carius).

Ziemlich denselben Wert ergab der entsprechende Teil bei Versuch 4.

0,1491 Subst. (100°) : 0,0072 BaSO₄ = 0,66% S.

Bei Versuch 5 wurden folgende Resultate erhalten:

Das in Chloroform unlösliche Gesamtprodukt enthielt 0,4% Schwefel.

0,2071 g Subst. : 0,0060 BaSO₄.

Der nur in Essigsäure lösliche Teil enthielt 0,58% Schwefel

0,4175 g Subst. : 0,0186 BaSO₄.

Demnach muß der Schwefelgehalt des in Alkohol löslichen Teils sehr gering angenommen werden, was damit übereinstimmt, daß dieser Teil sich durch Oxydation aus dem Bilirubin gebildet hat, wie aus der Gewinnung hervorgeht.

Erfahrungen sprechen dafür, daß durch das Ammoniak eine teilweise Umwandlung in eine zweite Modifikation des Bilirubins stattfindet, die ein im Methylalkohol leicht lösliches Bilirubinammonium gibt, vorausgesetzt, daß das frisch hergestellte Bilirubin A überhaupt bereits eine einheitliche Bilirubinmodifikation vorstellt, was schwerlich zutreffen wird.

So bilden sich auch bei dieser zweiten Darstellung von Bilirubinammonium grün gefärbte Oxydationsprodukte, die im Filter sichtbar werden; ihre Menge ist indessen geringer wie bei der Verwendung von Rohbilirubin.

Aus den Mutterlaugen vom auskrystallisierten Bilirubinammonium AA wurde durch Eingießen in Äther wieder ein Bilirubinammonium gefällt, das als AB bezeichnet werden mag.

Analysen des krystallisierten Bilirubinammoniums AA.

Präparat I: Farbe ziegelrot, allmählich dunkler werdend.

0,1725 Subst. (i. V.): 0,4124 CO₂ und 0,1005 H₂O = 65,2% C und 6,5% H

0,0985 " " "): 11,1 ccm N bei 12° und 750 mm B. = 13,2 % N

0,1100 " " " "): 12,2 " N " 12° " 743 " B. = 12,86% N

1,7638 frisch hergestellt verlieren im Exsikkator über Kalk in 5 Tagen 0,1257 g = 7,1%, darauf im Vakuum 0,0166 g = 0,94 g.

Präparat II hat 1½ Monate im Exsikkator über Kalk gelegen, die Abnahme im Vakuum beträgt 0,85%.

0,1011 Subst. (i. V.): 0,2409 CO₂ und 0,0616 H₂O = 65,15% C und 6,77% H

0,1078 " " " "): 10,8 ccm N bei 10° und 745 mm B. = 11,76% N.

Kurze Zeit bei 90° gehalten, erlitt das Präparat weder einen Gewichtsverlust noch eine Verfärbung, der Stickstoffgehalt erschien trotzdem höher.

0,1102 Subst. (90°): 11,5 ccm N bei 11° und 756 mm B. = 12,37% N.

Präparat III. Farbe rotbraun, aber heller wie die Farbe des Bilirubinammoniums A.

a) liegt einen Tag auf Tonteller, wird dann im Vakuum in 5 Tagen konstant, wobei 6,45% Verlust eintreten.

0,1565 Subst. (i. V.): 15,7 ccm N bei 10° und 749 mm B. = 11,84% N.

β) liegt einen Tag auf Tonteller, wird dann über Kalk in 5 Tagen konstant, wobei 6,74% Verlust eintreten.

3,7% NH₃ auf (T. 9°); beim darauf folgenden Trocknen im Vakuum verlieren 0,166 g außer dem aufgenommenen Ammoniak (0,0062 g) noch 0,0010 g.

0,1650 Subst. (i. V.) : 0,3933 CO₂ = 65,01 C

0,1150 „ („ „) : 0,2720 CO₂ und 0,0698 H₂O = 64,5% C und 6,75% H.

β) 0,1860 Substanz (im Vakuum) nehmen aus einer Ammoniakatmosphäre 0,0092 g = 5% auf bei 10°, jetzt wird im Vakuum ein Gewicht von 0,1852 g und nach Wiederholung der Behandlung mit Ammoniak, wobei diesmal nur 0,0052 g = 2,8% bei 10° aufgenommen wird, ergibt sich ein Gewicht von 0,1842 g.

0,1842 Subst. (i. V.) = 0,4453 CO₂ und 0,1113 H₂O

0,1387 „ („ „) = 14 ccm N bei 9° und 750 mm B.

Ber. : C₃₃H₃₀O₆N₄ · NH₃. 65,89% C 6,5% H 11,65% N

Gef. : 65,98% 6,71% 11,92

IV A. Darstellung von zweimal gereinigtem Bilirubin AA aus kristallisiertem Bilirubinammonium AA.

1. Versuch. Zur Extraktion gelangten 5 g eines drei Monate alten Präparates, sie ist rasch beendet und gibt 4,5 g schwer lösliches, orange gefärbtes Bilirubin. Leicht lösliche Teile sind vorhanden, endlich 0,2 g in Chloroform unlöslich, also 4% des Bilirubinammoniums.

Von den 0,2 g ist in Alkohol sehr wenig löslich, der Rest in Essigsäure leicht löslich, er gibt die Gmelinsche Reaktion, Schwefel ist nicht vorhanden.

0,1168 Subst., nach Carius zerstört, gibt kein BaSO₄.

2. Versuch. Zur Extraktion gelangten 6,5 g eines 6 Monate alten Präparats, sie ist rasch beendet und liefert fast 6 g schwer lösliches, orangerot gefärbtes Bilirubin.

3. Versuch. Nach einjähriger Aufbewahrung, wobei dunklere Färbung eingetreten ist, werden 7 g extrahiert. Die Extraktion ist in 2½ Tagen beendet und liefert 6 g schwer lösliches, rot gefärbtes Bilirubin. Unlöslich in Chloroform bleiben 0,5 g, also über 7% des Bilirubinammoniums. Schwefel enthält die Substanz nicht.

0,1106 g, nach Carius zerstört, kein BaSO₄.

Die Eigenschaften gleichen denen des entsprechenden Präparats von Versuch 1. Die Analyse ergab 62,38 % C und 6,05 % H auf aschefreie Substanz bezogen.

0,1427 Subst. (110°) : 0,3264 CO₂, 0,0776 H₂O und 0,0021 Asche, worin Spuren von Eisen.

IV B. Darstellung von zweimal gereinigtem Bilirubin BA aus dem krystallisierten Bilirubinammonium BA.

1. Versuch. Die 12,5 g Bilirubin (B) entsprechende Menge des Bilirubinammoniums BA wird sofort nach der Darstellung mit Chloroform extrahiert; die Extraktion ist in 3 Tagen beendet.

Ausbeute:

a) α) 5,5 g schwer lösliches Bilirubin, schön orange gefärbt, β) 0,25 g leichter lösliches Bilirubin.

b) Ein in Chloroform unlöslicher Rückstand ist höchstens in Spuren vorhanden.

2. Versuch. 14 Tage nach der Darstellung kommen 8,5 g zur Extraktion.

Ausbeute in 5 Tagen:

a) α) 7,5 g prachtvoll hellrot gefärbtes Bilirubin.

Ausbeute in 3 weiteren Tagen: 0,2. Leichter lösliches Bilirubin ist kaum vorhanden.

b) In Chloroform unlöslich 0,1 g, hierbei aber noch etwas Bilirubin.

Das hellrote Bilirubin hatte nach zwei Monaten orange Farbe angenommen; die Analyse gab jetzt Werte, die auf eine Veränderung schließen lassen, es hat fast den Anschein, als sei eine Wassereinlagerung erfolgt: 1)

0,2124 Subst. (i. V.) = 0,5151 CO₂ u. 0,1269 H₂O = 66,14 % C u. 6,64 % H.

3. Versuch. Die Extraktion eines zwei Monate alten Präparates des Bilirubinammoniums BA gab ein ganz unerwartetes Resultat. Von 8,5 g waren nach fünftägiger Extraktion, nach welcher Zeit die Ammoniakentwicklung aufgehört hatte,

1) Trotzdem wurde wieder krystallisiertes Bilirubinammonium daraus erhalten, vgl. S. 119.

nur 1,7 g schwer lösliches Bilirubin, das verfärbt erschien, herausgelöst worden, ferner 0,5 g leichter lösliches. Der Rest von 6 g ist in der Hülse geblieben, sieht sehr schön orange aus und erweist sich nach seinen Eigenschaften als Bilirubin.

0,1440 Subst. (i. V.) : 9,3532 CO₂ und 0,0841 H₂O = 66,89% C und 6,49% H
 0,1401 > (> >) : 12,2 ccm N bei 21° und 744 mm B. = 9,7% N.

Das Präparat nimmt beim langen Liegen im evakuierten Exsikkator um 0,55% an Gewicht zu, woraus wieder die Leichtveränderlichkeit dieser Bilirubinmodifikation hervorgeht.

IV C. Bei der Extraktion des durch Äther gefällten Bilirubinammoniums AB

hinterblieben in Chloroform unlösliche Anteile in geringer Menge, die zum Teil in Alkohol, zum Teil erst in Essigsäure löslich waren. Letztere enthielten 0,23% Schwefel.

0,0900 Subst. (105°) : 0,0015 BaSO₄.

IV D. Die Extraktion des mit Äther gefällten Bilirubinammoniums BB

erfolgte bei einem ersten Versuch, bei dem 20 g Bilirubin B zur Verwendung gelangt waren, zwei Tage nach der Darstellung. Bei der Filtration hatte sich das anfangs schön rote Bilirubinammonium braun, stellenweis grün gefärbt. Bei der sofort anschließenden Extraktion zeigte sich, daß zunächst nur wenig (0,7 g) schwer lösliches Bilirubin im Kolben abgesetzt wird, erst nach tagelanger Fortsetzung wird dies Bilirubin in großer Ausbeute (6,1 g) erhalten. Demnach dürfte das Bilirubinammonium BB ein Gemisch vorstellen, das zum kleinen Teil aus einem Derivat der schwer in Chloroform löslichen Modifikation besteht (Reste, die zu dem krystallisierten Bilirubinammonium gehören), zum weitaus größeren Teil aber aus dem Derivat einer Bilirubinmodifikation, die das Ammoniak sehr fest bindet, also sehr allmähliche Zerlegung erleidet, wobei unter der Einwirkung des Chloroforms zugleich Umwandlung in die schwer lösliche Bilirubinmodifikation stattfindet. Daß diese nicht vollständig wird, beweisen die recht beträchtlichen Mengen von leichter löslichem Bilirubin und

von so leicht in Chloroform löslichem Farbstoff, daß selbst aus stark konzentrierten Lösungen keine Ausscheidung erfolgt und die Fällung mit Alkohol oder Äther erfolgen muß. Von jenem wurden hier 2,5 g, von diesem 1,4 g erhalten, ungelöst in Chloroform verblieben nur 0,25 g.

Bei einem zweiten Versuch, der im übrigen ganz ähnlich verlief, betrug die Menge des chloroformunlöslichen Restes 0,3 g oder, da hier von 21 g Bilirubin B ausgegangen war, 1,5% desselben. In Alkohol waren hiervon ca. 0,1 g löslich; der Rest gab die Gmelinsche Reaktion, enthielt 63,31% C und 6,67% H, Schwefel war nicht nachweisbar.

0,0700 Subst. (105°) : 0,1620 CO₂ und 0,042 H₂O, Spuren von Asche.

0,0974 • (100°) : nach Carius zerstört, kein BaSO₄.

Bei einem dritten Versuch, bei dem von 12,5 g Bilirubin B ausgegangen worden war, waren nach sechstägiger Extraktion 4,5 g braunrotes Bilirubin im Kolben abgesetzt, die Ammoniakentwicklung hatte aufgehört, in der Hülse befand sich 1 g Farbstoff, von dem in Alkohol wenig löslich war; 0,5 g lösten sich in Essigsäure, der Rest war Bilirubin. Der in Essigsäure lösliche Teil war schwefelfrei und enthielt 63,91% C, 6,05% H und 7,48% N.

0,1634 Subst. (100°) : 0,3829 CO₂ und 0,0894 H₂O

0,1657 • (100°) : 10,8 ccm N bei 16,8° und 750 mm B.

V. Darstellung von Bilirubinammonium aus dem Bilirubin BA.

7,5 g des Seite 117 (Versuch 2) beschriebenen anfangs hellrot gefärbten Bilirubins wurden 2 Monate nach der Darstellung, während welcher Zeit die Farbe orange geworden war, von neuem in Bilirubinammonium übergeführt, wobei dieselben Erfahrungen gemacht wurden wie bei der Überführung von Bilirubin A. Die angegebene Menge wurde mit 37,5 ccm Methylalkohol erwärmt, beim Einleiten von Ammoniak ging alles in Lösung, beim Filtrieren durch einen Heißwassertrichter trat aber bereits Krystallisation ein, die beim Nachspülen mit zweimal je 25 ccm heißen Methylalkohols, der Ammoniak enthielt, sich nur zum kleinen Teil löste. Erhalten wurden hier

3,5 g, während 2,5 g noch beim Einstellen in eine Kältemischung auskrystallisierten. Die Ausbeute betrug hier also 80% des verwendeten Bilirubins, die Farbe war rein rot.

0,1824 Substanz (im Vakuum zu konstantem Gewicht gebracht) nahmen bei 17,5° 0,0058 g NH₃ auf = 3,12%, bei 4tägigem Liegen im Vakuum wurden diese bis auf 0,0013 g abgegeben, die Elementaranalyse gab jetzt 0,4385 CO₂ und 0,1102 H₂O, woraus sich auf das ursprüngliche Gewicht (0,1824 g) berechnet 65,57% C und 6,72% H.

Das Filtrat vom auskrystallisierten Bilirubinammonium wurde wieder durch Eingießen in Äther gefällt, der Niederschlag blieb 14 Tage unter Äther stehen. Er sieht prachtvoll rot aus, liefert aber bei der sofort nach der Filtration erfolgenden Extraktion ein verfärbtes schwer lösliches Bilirubin (ca. 1,2 g), sehr leicht in Chloroform lösliche Teile sind vorhanden, in Chloroform unlösliche dagegen nicht.

VI. Darstellung von Bilirubin aus Bilirubinammonium mit Hilfe von Methylalkohol.

Da sich gezeigt hatte, daß Bilirubin A schwefelhaltige Verunreinigungen nicht mehr enthält, wurde versucht, die vermutlich noch anhaftenden Spuren von Chloroform oder chlorhaltigen Substitutionsprodukten durch nochmalige Überführung in Bilirubinammonium zu entfernen und durch Zerlegung desselben mit Hilfe von Methylalkohol zu reinem Bilirubin zu gelangen.

A. Das aus 22,5 g Bilirubin A erhaltene krystallisierte Bilirubinammonium wurde durch eiskalten Methylalkohol von der Mutterlauge tunlichst befreit und dann mit 50 ccm siedendem Methylalkohol-K. übergossen, wobei es sich zunächst löste. Unmittelbar darauf trat die Abscheidung von hellrot gefärbtem Bilirubin ein, das abgesaugt und nachgewaschen wurde (Fraktion I = 7 g). Aus dem Filtrat wurde der Methylalkohol ganz langsam bis auf wenige Kubikzentimeter abdestilliert, wobei sich in dem Maße, wie Ammoniak entwich, eine weitere Abscheidung einstellte, die ebenfalls abgesaugt und nachgewaschen wurde. (Fraktion II, 6 g, Farbe wie Merkurijodid.)

Was jetzt noch in der methylalkoholischen Lösung geblieben ist, die sich stark verfärbt hat, wird auf Zusatz von Wasser nicht gefällt, sondern erst durch verdünnte Schwefelsäure. Der hier erhaltene Niederschlag wog getrocknet 0,06 g, hatte eine grünlich-gelbe Farbe und löste sich in Alkohol unter Zurücklassung von Bilirubin, in Chloroform ebenfalls zum Teil, wobei ein grüngefärbter Stoff zurückblieb.

Analysen.

Fraktion I. 0,1607 Subst. (100°) : 0,3986 CO₂ und 0,0891 H₂O
 0,1130 „ (100°) : 9,3 ccm N bei 16° und 746 mm B.
 Ber.: C₃₃H₃₆O₆N₄. 67,81% C 6,17% H 9,59% N
 Gef.: 67,65% 6,17% 9,41%.

Fraktion II. 0,1483 Subst. (100°) : 0,3657 CO₂ und 0,0788 H₂O
 0,1635 „ (100°) : 0,4024 CO₂ „ 0,0916 H₂O
 0,1801 „ (100°) : 0,4414 CO₂ „ 0,0997 H₂O
 0,1170 „ (100°) : 10,4 ccm N bei 23° u. 748 mm B.

Es muß angenommen werden, daß diese Fraktion etwas Methylalkohol zurückhält, der auch durch das Trocknen bei 100°, bei dem eine Abnahme gegenüber der im Vakuum getrockneten Substanz nicht oder in sehr geringem Maße festgestellt werden konnte, nicht entfernt werden konnte.

Ber.: C₃₃H₃₆O₆N₄ ¼ CH₃OH. 67,4% C 6,25% H 9,39% N
 Gef.: 67,25% 5,91% 9,62%
 67,07% 6,23%
 66,85% 6,15%

Auch das Ammoniak scheint nicht immer ganz glatt beim Kochen mit Methylalkohol zu entweichen, dafür spricht die Analyse eines Bilirubins, das aus einem Bilirubinammonium AA auf die angegebene Art erhalten war, in Natriumbicarbonat war es nicht löslich.

0,1458 Subst. (100°) : 0,3570 CO₂ und 0,0745 H₂O = 66,78% C u. 5,7% H
 0,1210 „ (100°) : 12,2 ccm N bei 16° und 731,5 mm B. = 11,3% N.

Fraktion II wurde nunmehr mit Chloroform extrahiert, um festzustellen, ob bereits in Chloroform unlösliche Teile vorhanden sind. Hierbei gingen von 4,2 g in 4½ Tagen 4 g in Lösung und schieden sich schwerlöslich ab, meist schön rot gefärbt. Leicht in Chloroform lösliche Teile wurden hierbei nur in verschwindender Menge erhalten, — wenn sich solche

also aus Bilirubinammonium bilden, so hat nicht das Chloroform, sondern das sich entwickelnde Ammoniak die Umwandlung in diese Modifikation bewirkt, oder das Bilirubinammonium stellte bereits ein Derivat derselben vor —, unlöslich in Chloroform blieben nur Spuren zurück. Die Analyse des extrahierten Bilirubins gab aber ein ganz abweichendes Resultat, es hat den Anschein, als ob statt des Methylalkohols Chloroform in das Molekül eingetreten sei.

0.1488 Subst. (105°) : 0,3567 CO₂ und 0,0828 H₂O
 Ber.: C₃₃H₃₆O₆N₄ · ¼ CHCl₃. 65,05% C und 5,95% H
 Gef.: 65,3 % 6,19%.

Leider war eine Chlorbestimmung nicht mehr möglich, da inzwischen der Rest des Präparats von neuem in Bilirubinammonium übergeführt worden war, was sehr gut vonstatten ging, allerdings mit geringeren Ausbeuten, da bei der kleinen Menge verhältnismäßig viel in den Filtern stecken blieb. Erhalten wurden etwa 2 g krystallisiertes Bilirubinammonium, dessen Farbe mit der des krystallisierten Zinnobers zu vergleichen ist, und 1 g durch Äther gefälltes Bilirubinammonium.

a) Der krystallisierte Teil kommt sofort ins Vakuum, am nächsten Tag 6 Stunden in eine Ammoniakatmosphäre und wird dann im Vakuum zu konstantem Gewicht getrocknet. (Analysen 1—3.) Erneute Behandlung mit Ammoniak und Verbringen in das Vakuum hatte keinen Einfluß auf den Ausfall der Analysen (4 und 5), die dafür sprechen, daß das Bilirubinammonium Methylalkohol enthält.

1. 0,1686 Subst. (i. V.) : 0,3972 CO₂ und 0,104 H₂O
 2. 0,1420 „ (90°, wobei kein Verlust gegen das Vakuum) : 0,3392 CO₂
 und 0,0874 H₂O
 3. 0,1060 „ (90°) : 9,8 ccm N bei 16° und 749 mm B.
 4. 0,1506 „ (90°, 0,4% Verlust gegen das Vakuum) : 0,3604 CO₂ und
 0,0979 H₂O
 5. 0,1617 „ (90°, kein Verlust) : 15,7 ccm N bei 13° und 725 mm B.
 Ber.: C₃₃H₃₆O₆N₄ · NH₃, CH₃OH. 64,61% C 6,79% H 11,06% N
 Gef.: 1. 64,15% 6,83%
 2. 3. 65,16% 6,85% 10,62%
 4. 5. 65,27% 7,22% 10,94%.

b) Im Gegensatz zu diesem Präparat gab das durch Äther gefällte Bilirubinammonium, wenigstens was den Kohlen-

stoff betrifft, richtige Werte nach dem Trocknen bei 90°, wobei hier starke Abnahme festgestellt wurde. Die prachtvoll rote Fällung wurde nach einer Stunde filtriert, mit Äther nachgewaschen, auf einen Tonteller gestrichen und im Vakuum getrocknet, wobei Verfärbung nur an den Rändern eintrat. Am nächsten Tag folgte eine sechsstündige Behandlung mit Ammoniakgas, dann wurde wieder im Vakuum getrocknet. Das Pulver der Substanz hatte eine dunkelbraunrote Farbe.

0,1391 Subst. (90°, wobei 3,2 % Abnahme gegenüber d. Vak.): 0,3356 CO₂ u.
0,0827 H₂O

0,1038 > (90°, > 2,53% > > > >): 10 ccm N bei
15,5° und 747 mm B.

Ber.: C ₃₃ H ₃₆ O ₆ N ₄ · NH ₃ .	65,89% C	6,5 % H	11,65% N
Gef.:	65,79%	6,61 %	11,06 %.

VI B. Darstellung von Bilirubin aus durch Äther gefälltem Bilirubinammonium mit Hilfe von Methylalkohol.

Das 22,5 g Bilirubin A entsprechende Bilirubinammonium AB blieb über Nacht unter Äther stehen, wurde dann abgesaugt und rasch auf einem Tonteller getrocknet, worauf es mit siedendem Methylalkohol übergossen und bis zur völligen Lösung etwa zwei Minuten lang im Wasserbade digeriert wurde. Bald darauf stellte sich eine Abscheidung ein (Fraktion I), von der abgesaugt wurde. Aus dem Filtrat wurde der Methylalkohol bis auf ein kleines Volumen ganz langsam abdestilliert, wobei Ammoniakentwicklung stattfand und eine zweite Abscheidung eintrat (Fraktion II). Das Filtrat von dieser enthielt noch etwas Substanz, die aber weitgehend verändert sein mußte, was sich durch die dunkelgrüne Färbung kenntlich machte.

Fraktion I. 1,5 g, i. V. getrocknet ein gelbbraunes Pulver.

0,1510 Subst. (i. V.): 0,3745 CO₂ und 0,0818 H₂O

0,0815 > (> >): 7,0 ccm N bei 20° und 746,5 B.

Fraktion II. 4 g, i. V. getrocknet dunkelrot.

0,1395 Subst. (100°, wobei 1,4% Abnahme gegen das Vakuum): 0,3450 CO₂
und 0,0738 H₂O

0,0896 > (i. V.): 7,4 ccm N bei 19° und 749 mm B.

$C_{55}H_{36}O_6N_4$	Ber.:	67,81% C	6,17% H	9,59% N
	Gef.:	I. 67,64%	6,02%	9,64%
		II. 67,38%	5,88%	9,35%

14 Tage nach der Darstellung war Fraktion II bereits stark verändert:

0,1354 Subst. (100°) : 0,3280 CO₂ und 0,0778 H₂O = 66,07% C u. 6,39% H.

VII. Nach Abdestillation des Methylalkohols und des Äthers aus den Mutterlaugen des durch Äther gefällten Bilirubinammoniums fiel, wie bereits S. 87 erwähnt wurde, ein hellrot gefärbtes Bilirubin aus, das in wetzsteinförmigen Formen, die häufig gekreuzt auftraten, krystallisierte. Diese Beobachtung konnte bei jedem dieser Versuche gemacht werden, doch war die Menge immer nur sehr gering, abgesehen von dem einen S. 115 erwähnten Fall beim Bilirubinammonium BB. So konnten nur einige Analysen mit den vereinigten Mengen verschiedener Darstellung ausgeführt werden.

0,1500 Subst. (90°, keine Abnahme gegen das Vak.) : 0,3688 CO₂ u.
0,0874 H₂O

0,1460 > (105°, wobei 1,2% > > > > : 0,3632 CO₂ u.
0,0788 H₂O

0,1160 > (90°) : 10,3 ccm N bei 15,5° und 735 mm B.

0,1387 > (105°, wobei 0,46% Abnahme) : 0,3438 CO₂ u. 0,0800 H₂O.

$C_{55}H_{36}O_6N_4$	Ber.:	67,81% C	6,17% H	9,59% N
	Gef.:	67,06%	6,48%	
		67,85%	6,00%	10,02%
		67,60%	6,43%	

Die Löslichkeit in Chloroform war sehr gering: 1 : 1366 (0,017 g in 23,223 g CHCl₃), der Rückstand hatte gelbbraune Farbe.

Allem Anschein nach liegt in diesem Bilirubin eine besondere Modifikation vor: die rote Farbe hält sich dauernd, die Löslichkeit ist sehr gering, durch Chloroform findet Umwandlung statt.

VIII A. Aufnahme von Ammoniak durch verschiedene Bilirubinmodifikationen.

Zur Verwendung gelangten: Bilirubin A, Farbe hellrot, voluminös, beim Reiben etwas elektrisch werdend, und Bilirubin BB, Farbe braunrot, dichter wie A.

0,6133 g Bil. A. (i. V.) nehmen bei 15° 0,0490 NH₃ auf = 8 %
 0,5989 „ „ BB. („ „) „ „ 15° 0,0461 NH₃ „ = 7,7 %.

	Abgabe an der Luft		Abgabe i. V.	
	in 3 1/2 Std.	in 3 Tagen	in 3 Tagen	Verbleib. Bili- rubinmenge
A.	0,029 g	0,0490 = 8%	0,0075	0,6058, also 1,2 % Abnahme
B.	0,01 „	0,0214	0,0390	0,6015, „ 0,43% Zunahme

Bei einer zweiten Behandlung mit Ammoniakgas nahmen nunmehr

0,6058 Bil. A bei 18° 0,0353 NH₃ auf = 5,8 %

0,6015 Bil. BB „ 18° 0,0520 NH₃ „ = 8,6 %.

Abgabe an der Luft

i. 2 Tagen i. 6 Tagen

A.	0,0276	0,0346	Das Präparat hat sich stark verfärbt, Spuren lösen sich in NaHCO ₃ .
B.	0,0178	0,0377	Das Präparat ist z. T. in NaHCO ₃ löslich, da die NH ₃ -Abgabe nicht vollständig geworden ist.

Es mag noch bemerkt werden, daß eine andere Probe von Bilirubin A nach einer Aufbewahrung von 45 Tagen nur 0,53 % NH₃ aufnahm, die beim Liegen an der Luft wieder abgegeben wurden.

0,3944 Subst. (i. V.) : 0,0021 NH₃ bei 15°.

VIII B. Aufnahme von Ammoniak durch verschiedene Bilirubinammoniumpräparate.

I. Krystallisiertes Bilirubinammonium A aus Rohbilirubin

0,1678 g (i. V.) nehmen 0,0116 g NH₃ auf = 6,91 %

Ber.: C₃₃H₃₆O₆N₄ 2 1/2 NH₃ = 7,28 %.

II. Krystallisiertes Bilirubinammonium AA.

0,6150 g (i. V.) nehmen bei 16° 0,0225 g NH₃ auf = 3,66 %, wovon 0,51 % sehr rasch wieder abgegeben werden.

Das Präparat nimmt dann, im geschlossenen Uhrglas aufbewahrt, an der Luft liegend um 0,0064 g (etwa 1 %) in einem Tage zu, im Vakuum findet dann in 6 Tagen eine Abnahme bis auf 0,6035 g statt, d. h. ein Gewichtsverlust von 1,82 % über das erste konstante Gewicht hinaus.

Bei einer zweiten Behandlung mit Ammoniak beträgt die Aufnahme jetzt 3,28 %, worauf an der Luft ganz langsame

Abnahme eintritt, im Vakuum wird nach 8 Tagen das konstante Gewicht 0,6052 erreicht. Das Präparat sieht jetzt durch und durch schwarz-rot aus und gibt bei der Analyse: 65,4% C, 6,69% H, 11,1% N.

0,1331 Subst. (i. V.) : 0,3192 CO₂ und 0,0800 H₂O

0,1203 „ („ „) : 11,8 ccm bei 15° und 736 mm B.

III. Krystallisiertes Bilirubinammonium BAA (vgl. Abschn. V).

1,1579 Subst. (i. V.) nehmen bei 18° 0,0290 NH₃ auf = 2,5 %

1,1563 „ („ „) „ „ 20° 0,0428 NH₃ „ = 3,7 % (2. Behandlg.)

1,1407 „ („ „) „ „ 19° 0,0269 NH₃ „ = 2,36 % (3. „ „).

Jetzt bleibt das Gewicht nach dem Trocknen im Vakuum konstant (1,1407 g), durch die Behandlung mit Ammoniak ist also ein Gewichtsverlust von 1,5% erzielt worden. Die Analyse ergab jetzt:

0,1795 Subst. (i. V.) : 0,4310 CO₂ und 0,1795 H₂O

0,0984 „ („ „) : 10,7 ccm N bei 18° und 744 mm B

C₃₃H₂₆O₆N₄ · NH₃. Ber.: 65,89% C 6,50% H 11,65% N

Gef.: 65,49% 6,45% 12,2 %.

IV. Durch Äther gefälltes Bilirubinammonium AAB.

0,3500 g (i. V.) nehmen bei 16° 0,009 g NH₃ auf = 2,57%.

An der Luft im geschlossenen Uhrglas liegend findet in einem Tage eine Gewichtszunahme von 0,016 g = 4,6% statt, erst dann tritt Abnahme ein und im Vakuum wird das Gewicht 0,3460 g erreicht.

Bei einer zweiten Behandlung mit Ammoniak betrug die Aufnahme davon 2,7%, die Zunahme an der Luft 0,0065 g, das Endgewicht 0,3469 g.

Das Präparat hatte sich total verfärbt und starke Veränderung erlitten:

0,1337 Subst. (i. V.) : 0,3086 CO₂ und 0,0807 H₂O = 62,95% C. und 6,7% H.

Der Unterschied zwischen den Modifikationen des Bilirubins, die dem krystallisierten Bilirubinammonium einerseits, dem durch Äther gefällten andererseits zugrunde liegen, tritt hier klar hervor. Doch nehmen beide Bilirubinammoniumarten übereinstimmend mit dem als AA bezeichneten Präparat nur 1 Molekel Ammoniak auf, das Vermögen des Bilirubinammoniums A, 2½ Moleküle zu binden, bedarf daher weiterer Aufklärung.

IX. Darstellung von Bilirubinammonium aus in Chloroform leichter löslichen Bilirubinmodifikationen.

A. Bilirubinpräparat, das aus Rindergallensteinen nach der Behandlung mit konzentrierter Essigsäure erhalten worden war. 13 g wurden in 65 ccm Methylalkohol suspendiert; beim Aufleiten von Ammoniakgas ging der Farbstoff sehr viel leichter wie das orange gefärbte Bilirubin in Lösung, die Lösung filtrierte glatt unter Benutzung eines Heißwassertrichters, setzte sich aber stark im Filter fest, so daß zweimal 25 ccm Methylalkohol zum Nachspülen erforderlich waren. Das Auskrystallisieren des Bilirubinammoniums erfolgte sehr langsam: nach einstündigem Stehen in Eis hatten sich dunkelrot-braune Krystalle abgeschieden, deren Gewicht nach 16stündigem Liegen auf einem Tonteller 3,4 g betrug (Fraktion a). über Nacht schieden sich dann noch ein wenig heller gefärbte Krystalle ab (Fraktion b, 1,5 g). Das aus der Mutterlauge durch Äther gefällte Bilirubinammonium wog nach dem Trocknen 7,5 g und besaß eine schön rote Farbe, nur einige Teile erschienen verfärbt.

Krystall. Bilirubinammonium. Fraktion a.

Das Präparat verliert beim langen Lagern im Exsikkator über Kalk 8,8%, darauf im Vakuum noch 0,61%.

0,1900 Subst. (i. V.) : 0,4565 CO₂ und 0,1147 H₂O

0,1336 „ (2 1/2 Monat im Exsikkat.) : 13,4 ccm N bei 14° u. 750 mm B.

Fraktion b verliert im Exsikkator über Kalk beim Lagern 6,4%, im Vakuum noch 0,54%.

α) { 0,1408 Subst. (i. V.) : 15,6 ccm N bei 11° und 746 mm B
 { 0,1639 „ („ „) : 0,3915 CO₂ und 0,1001 H₂O.

β) { 0,1198 Subst. (nach 4 Monat., i. V.) : 0,2876 CO₂ und 0,0718 H₂O
 { 0,1342 „ („ 3 „ „) : 14,3 ccm N bei 15° u. 732 mm B.

C₃₃H₃₆O₆N₄ · 1 1/2 NH₃. Ber.: 64,97% C 6,65% H 12,6 % N

Fraktion b. α) Gef.: 65,14% 6,79% 12,96%

C₃₃H₃₆O₆N₄ · NH₃. Ber.: 65,89% 6,5 % 11,65%

Fraktion a. Gef.: 65,48% 6,71% 11,64%

„ b. β) 65,47% 6,66% 12,00%.

Durch Äther gefülltes Bilirubinammonium:

0,1446 Subst. (i. V.) : 0,3424 CO₂ und 0,0824 H₂O = 64,57% C und 6,33% H

0,1225 „ („ „) : 13,4 ccm N bei 17° und 736 mm BB = 12,4% N.

Nach einer Aufbewahrung von 68 Tagen:

0,1947 Subst. (i. V.) : 18,4 ccm N bei 14° und 739 mm B. = 10,8% N.

IX B. Sammelpräparat von leichter in Chloroform löslichem Bilirubin, zunächst in Chloroform löslich geblieben, nach Abdestillation des Lösungsmittels beim Wiederaufnehmen zurückgeblieben, stammt teils aus Rohbilirubin, teils enthält es die gekennzeichneten Teile, welche sich bei der Extraktion von Bilirubinammoniumpräparaten gebildet hatten.

Analyse.

0,1684 Subst. (90°) = 0,4140 CO₂ u. 0,0938 H₂O = 67,05% C u. 6,19% H
 0,1016 „ (90°) = 9 ccm N bei 13° und 744 mm B. = 10,24% N.

Zur Darstellung des Bilirubinammoniums wurden 15 g des Präparates mit 75 ccm Methylalkohol und Ammoniakgas in Lösung gebracht, was sehr leicht vonstatten ging, zum Nachspülen dienten dreimal je 25 ccm Methylalkohol, so daß wieder eine 10%ige Lösung vorlag. Doch fand eine Krystallisation in der Kältemischung nicht statt. Es wurde daher die ganze Lösung in einen Liter Äther gegossen und der Niederschlag (nach drei Tagen) filtriert, wobei er oberflächlich rasch grün wurde.

X. Darstellung von Bilirubin aus den in Abschnitt IX beschriebenen Bilirubinammoniumpräparaten.

A. a) Das krystallisierte Bilirubinammonium spaltet beim Erhitzen mit Chloroform das Ammoniak sehr rasch vollständig ab, wobei sich prachtvoll rotgefärbtes Bilirubin abscheidet, ihm haftet, wie aus der Löslichkeitsbestimmung hervorgeht, leicht lösliches Bilirubin an, von dem sich auch größere Mengen in der überstehenden Chloroformlösung befinden.

Löslichkeit.

21,3408 Chloroform enthalten 0,0642 Bilirubin = 1 : 332,5.

Der Rückstand ist bedeutend schwerer löslich:

26,378 Chloroform enthalten 0,0320 Bilirubin = 1 : 826.

Nach der zweiten Behandlung ist das Bilirubin orange-rot gefärbt:

15,300 Chloroform enthalten 0,0100 Bilirubin = 1 : 1530.

Analyse:

0,1477 Subst. (i. V.) = 0,3628 CO₂ u. 0,0906 H₂O = 66,99% C u. 6,82% H
0,1280 „ „ = 10,3 ccm N bei 9° und 745 mm B. = 9,71% N.

A. b) 6 g des durch Äther gefällten Bilirubinammoniums werden in der Hülse mit Chloroform extrahiert.

Ausbeute:

a) α) 3,5 g schwer löslich abgeschieden, braungelb gefärbt, β) vorhanden, rotbraun, γ) vorhanden, verfärbt, in Natriumbicarbonat löslich.

b) In Chloroform unlöslich, nur Spuren.

Löslichkeit von a.

a) 1 : 785,5 (20,1843 Chloroform enthalten 0,0257 Bilirubin)
1 : 737 (21,47 „ „ 0,0291 „).

Das ursprüngliche vorliegende, rotbraune, in Chloroform leicht lösliche Bilirubin ist also über das Bilirubinammonium und durch die Behandlung mit Chloroform z. T. in schwer lösliches, orangegefärbtes Bilirubin übergegangen, z. T. ist es stark verändert worden, ein anderer Teil ist anscheinend in der ursprünglichen Modifikation erhalten geblieben.

X B. Das im Abschnitt IX B beschriebene durch Äther gefällte Bilirubinammonium wird z. T. sofort mit Chloroform extrahiert.

Ausbeute aus 10 g:

a) α) 6 g, schön rot gefärbt, β) 1 g, γ) vorhanden.

In Chloroform unlöslich:

b) 2 g, hiervon in Alkohol löslich 0,2 } also 17,0% des ver-
„ „ Essigsäure „ 1,5 } wendeten Bilirubin-
ammoniums.

Der Rest ist Bilirubin.

Die in Essigsäure löslichen Teile enthalten 0,487% S.
0,2246 Subst. : 0,0080 BaSO₄.

Bei einem zweiten Teil erfolgte die Extraktion erst zwei Monate nach der Darstellung, sie zog sich auch hier wieder sehr in die Länge.

Ausbeute aus 1,6 g:

a) α) ca. 0,3 g in 3 Tagen, mißfarben, 0,7 g nach sehr langer Extraktionsdauer, β) ca. 0,2 g, γ) ca. 0,2 g.

In Chloroform unlöslich:

b) 0,4 g, also 25% des verwendeten Rohbilirubinammoniums.

XI. Umkrystallisation von Bilirubin aus verflüssigter Carbonsäure.

Bilirubin läßt sich mit Hilfe von β -Naphtholmethyläther und von Acidum carbolicum liquefactum umkrystallisieren und wird dabei in schönen Krystallen von helloranger, fast gelber Farbe erhalten.

Versuch. 1 g Bilirubin A wurde in 40 g siedendes, 91%iges Phenol eingetragen, wobei fast vollständige Lösung erfolgte, das Filtrat erstarrte im Exsikkator bei 12stündigem Stehen, worauf das Lösungsmittel durch Äther weggenommen wurde. Erhalten wurden 0,7 g Bilirubin, das in langen, feinen, gelben Nadeln krystallisierte. Doch haftet ihnen Phenol hartnäckig an, erst durch dreimaliges Auskochen mit Alkohol konnte es entfernt werden. Das Präparat sieht dann nach dem Trocknen im Vakuum gelbbraun aus.

0,1376 Subst. (100°, wobei ca. 1% Abnahme gegen das Vakuum)
0,3391 CO₂ und 0,0783 H₂O = 67,21% C und 6,33% H.

0,0992 Subst. (90°, phenolhaltig) : 8,2 ccm N bei 17° und 741 mm B.
== 9,35% N.