

197. William Küster: Beiträge zur Kenntniss der
Gallenfarbstoffe.

[2. vorläufige Mittheilung aus dem physiol.-chem. Institut zu Tübingen.]

(Eingegangen am 21. März 1902.)

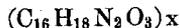
Seit meiner letzten Publication über die Gallenfarbstoffe¹⁾ habe ich über 1000 g getrocknete Gallensteine vom Rinde und etwa 200 g Concremente, welche sich in den Gallengängen eines Pferdes vorfinden, sammeln können und auf die Farbstoffe verarbeitet. Bekanntlich sind namentlich von Städeler eine ganze Anzahl von solchen isolirt worden. Man unterscheidet heute neben dem Bilirubin u. a. ein Bilifuscin, ein Biliprasin und ein Bilihumin.

Bei dem Operiren mit den angegebenen Mengen stellte sich die Nothwendigkeit ein, die Extractionsmittel (Aether, Salzsäure, Alkohol, Chloroform) tage- bis wochen-lang einwirken zu lassen. Nun habe ich in der That eine Anzahl von Farbstoffen gewinnen können, welche in gewissen Eigenschaften den oben erwähnten entsprechen.

Im Laufe der Untersuchung bin ich aber zu der Ueberzeugung gelangt, dass schon während der Darstellung chemische Veränderungen eintreten können, sodass es für so manchen der von mir isolirten Farbstoffe unentschieden gelassen werden muss, ob er ein natürliches oder ob er ein Kunstproduct vorstellt. So ist es ausserordentlich schwer, aus dem voluminösen Schlamm des Gallensteinpulvers die letzten Spuren der Salzsäure zu entfernen, welche zum Herauslösen der Mineralbestandtheile verwendet worden war.

Reines Bilirubin, das sich in Alkohol nicht löst, giebt aber an diesen sofort einen grünblauen Farbstoff ab, sobald er eine Spur Salzsäure enthält.

Ob nun die oben erwähnten Farbstoffe in den untersuchten Gallensteinen vorgebildet waren oder nicht, wage ich nicht zu entscheiden. Als chemische Individuen können sie auf Grund der vorliegenden Ergebnisse keinesfalls angesprochen werden, ist doch u. a. keiner dieser Farbstoffe deutlich krystallisirt erhalten worden²⁾. Eine Ausnahme macht das Bilirubin, dessen empirische Formel



auch durch übereinstimmende Analysen festgestellt sein dürfte.

¹⁾ Zeitschr. für physiolog. Chem. 26, 314.

²⁾ Man sollte daher auch nicht von einem Biliprasin, einem Bilifuscin etc. sprechen, ehe die Individualität sichergestellt ist. Um aber die Gewinnungsart eines Gallenfarbstoffs und seine Löslichkeitsverhältnisse kurz zu charakterisiren, würde der Ausdruck genügen, der betreffende Körper gehört in die Kategorie des sogenannten Biliprasins etc.

Nach neueren Befunden von mir ist aber auch der Begriff »Bilirubin« näher zu definiren. Wir dürfen künftig darunter nicht mehr kurzweg den in Chloroform löslichen Farbstoff verstehen; denn es giebt mehrere — zum mindesten zwei — solcher Körper, die sich zunächst durch den Grad ihrer Löslichkeit unterscheiden.

Wird nämlich das mit Aether, Wasser, Salzsäure, Wasser, Aether extrahirte Gallensteinpulver nun im Soxhlet'schen Apparat mit Chloroform erschöpfend ausgezogen, so findet man im Siedekolben einen Theil des Bilirubins in dicken Krusten abgeschieden, das darüber stehende Chloroform aber ist schwarzroth gefärbt¹⁾. Lässt man dann die filtrirte Lösung eine Zeit lang stehen, so setzt sich noch ein Theil des Farbstoffs ab, dem aber schon leichter lösliche Theile beigemischt sind. Wird jetzt die von Neuem filtrirte Lösung mit etwa dem gleichen Volumen Alkohol versetzt, so fällt in reichlichen Mengen ein bräunlich-grüner Farbstoff aus, der sich spielend in Chloroform löst, und zwar etwa im Verhältniss 1 : 30, während ein Theil reines Bilirubin fast 600 Theile Chloroform zur Lösung braucht.

Auch in heissem Dimethylanilin löst sich der neue Farbstoff leicht, beim Erkalten scheidet sich nur wenig und nicht krystallisirt ab, wie ein Versuch mit allerdings sehr geringen Mengen zeigte²⁾. In Alkalien löst er sich leicht zu einer tiefrothen Flüssigkeit auf, welche nicht nur in der Farbe einer alkalischen Bilirubinlösung gleicht, sondern sich auch wie diese an der Luft verfärbt.

Eine vollständige Reinigung ist bisher noch nicht gelungen, wenigstens gaben die Analysen verschiedener Präparate nicht die erwünschte Uebereinstimmung; es scheint aber sicher zu sein, dass dieser Körper ärmer an Stickstoff ist als Bilirubin³⁾.

$C_{16}H_{18}O_3N_2$. Ber. C 67.13, H 6.29, N 9.79.

Gef. » 66.72, » 6.17, » 7.57 (D.).

» 66.37, » 6.26, » 8.21 (D.).

» 67.15, » 6.47, » 7.92 (Kj.).

» 65.23, » 6.16, » 8.27 (Kj.), 8.13 (Kj.).

Die weitere Untersuchung dieses Farbstoffs behalte ich mir vor; es soll namentlich versucht werden, sein Molekulargewicht zu ermitteln.

¹⁾ Namentlich reich an leicht in Chloroform löslichem Farbstoff erwies sich das Gallensteinpulver vom Pferde.

²⁾ Es ist höchst wahrscheinlich, dass eine Beimengung dieses Farbstoffs das Umkrystallisiren des Bilirubins aus Dimethylanilin erschwert.

³⁾ Die Resultate von Orndorff und Teeple (Americ. Chem. Journal 26, 87) erklären sich vielleicht durch einen Gehalt ihres Bilirubins an leichter löslichem Farbstoff.

Der schwerer lösliche Farbstoff, der sich, wie oben erwähnt, bei der Extraction in Krusten abgeschieden hatte, besteht zunächst noch nicht aus reinem Bilirubin. Er muss zur Gewinnung dieses Farbstoffs ein zweites und drittes Mal mit Chloroform extrahirt werden, dann erst hat man ein Präparat, welches sich völlig in Chloroform löst und jetzt zur Entfernung von Bilifuscin erschöpfend mit Alkohol extrahirt werden muss. Nun kann es aus siedendem Dimethylanilin umkrystallisirt werden, wobei etwas mehr als die Hälfte des verwendeten Farbstoffs in schönen Krystallen erhalten wird von der Zusammensetzung:

$C_{16}H_{13}N_2O_3$. Ber. C 67.13, H 6.29, N 9.79.
Gef. » 67.31, 67.12, » 6.80, 6.49, » 9.80, 10.06.

Doch stimmen auch die Analysen des wie angegeben gereinigten Roh-Bilirubins auf obige Formel.

Gef. C 66.90, 67.30, 66.68, 67.11, H 6.53, 6.21, 6.66, 6.31, N 9.86, 9.92.

Durch das Umkrystallisiren aus Dimethylanilin haben also jedenfalls die Theile, welche sich beim Erkalten krystallinisch abscheiden, keine Veränderung erlitten.

Wird das zum Lösen des Bilirubins benutzte Dimethylanilin nach Abtrennung des auskrystallisirten Farbstoffs im Vacuum zum grössten Theil abdestillirt, so scheidet sich eine weitere Menge Bilirubin krystallisirt ab. Das Filtrat hiervon giebt auf Zusatz von Alkohol wieder eine Fällung, und der Rest des gelösten Farbstoffs kann durch Salzsäure abgeschieden werden. Erst der Letztere zeigt schon durch seine Farbe, dass nicht mehr unverändertes Bilirubin vorliegt. Endlich bleiben beim Umkrystallisiren aus Dimethylanilin einige Antheile von vornberein ungelöst. Sie erwiesen sich aber nach sorgfältiger Extraction mit Alkohol als in Chloroform völlig löslich und bestanden aus unverändertem Rohbilirubin.

Gef. C 67.18, H 6.37, N 9.75 (Kj.).

Durch diese Angaben dürften wohl die Einwendungen, welche Thudichum¹⁾ gegen meine Methode, Bilirubin rein und krystallisirt herzustellen, gemacht hat, als erledigt angesehen werden²⁾.

Es sei aber noch erwähnt, dass auch Benzoësäure-Aethyl- und -Isoamyl-Ester bei höherer Temperatur Bilirubin ziemlich reichlich lösen. 20 g des Letzteren nahmen z. B., auf 200° erhitzt, von 1 g Rohbilirubin 0.6 g auf, wovon sich 0.3 g beim Erkalten, allerdings nur unendlich krystallisirt, abschieden.

Gef. C 66.75, H 6.51.

¹⁾ Journ. für prakt. Chem. [2] 61, 568.

²⁾ Bei den Stickstoffbestimmungen nach Kjeldahl's Methode wurde immer dann zu wenig gefunden, wenn die Substanz (0.1 g etwa) nicht mindestens 3 Mal ca. 10 Stunden mit der Schwefelsäure (10 ccm) stark erhitzt worden war.

Das Bilirubin ist nun dem Hämatoporphyrin, einem Derivat des Blutfarbstoffs, nach Nencki's Untersuchungen isomer; ich hatte begonnen, die vermuthete chemische Verwandtschaft beider Körper experimentell zu begründen, und dargethan, aus welchen Gesichtspunkten dies geschehen sollte¹⁾. Neuerdings haben nun Orndorff und Teeple²⁾ aus grösseren Mengen von Gallensteinen Bilirubin hergestellt, und am Schluss ihrer Publication stellten sie weitere Arbeiten in Aussicht, bei denen besonders »die Beziehungen zu Hämoglobin, Hämatin und Hämatoporphyrin in's Auge gefasst werden sollen«.

Die Herren wollen also in gleicher Richtung wie ich arbeiten; damit wir nicht auch den gleichen Weg einschlagen, möchte ich die von mir bisher erlangten Resultate zur Kenntniss bringen und mir einige Untersuchungen reserviren, welche mit jenen in directem Zusammenhange stehen.

Es war von mir experimentell bewiesen worden, dass der auf Grund biologischer Untersuchungen vermuthete Zusammenhang zwischen Blut- und Gallen-Farbstoff in der That besteht. Es lieferte das Hämatin einerseits, das Bilirubin andererseits bei der in eisessigsaurer Lösung vorgenommenen Oxydation durch Chromate ätherlösliche Körper, aus denen das Imid der dreibasischen Hämatinsäure³⁾, $C_8H_9NO_4$, bezw. die Biliverdinsäure, $C_8H_9NO_4$, isolirt werden konnten. Beide gingen aber unter dem Einfluss von Alkalien in ein und denselben Körper, $C_8H_5O_5$, das partielle Anhydrid der dreibasischen Hämatinsäure, über. Zwischen den stickstoffhaltigen Körpern wurden zunächst einige Unterschiede constatirt.

Inzwischen waren die Methoden zur Reindarstellung des primären Spaltungsproducts des Hämatins genau festgestellt worden; sie wurden nun bei der Herstellung eines neuen Präparats von Biliverdinsäure benutzt, und es ergab sich, dass beide Körper identisch sein müssen — aus folgenden Beobachtungen und Analysen.

a) Das aus der wässrigen Lösung der rohen Biliverdinsäure durch Eintragen von Calciumcarbonat bereitete Calciumsalz konnte bei Einhaltung aller Vorsichtsmaassregeln⁴⁾ aus der dreifachen Menge heissen Wassers umkrystallisirt werden.

$(C_8H_9NO_4)_2Ca$. Ber. Ca 9.9. Gef. Ca 9.52⁵⁾.

b) Die durch Salzsäure frei gemachte Biliverdinsäure wurde dann durch Aether extrahirt, der Aetherrückstand zweimal aus Essigester umkrystallisirt, abgesaugt und mit Aether nachgewaschen. Der Schmelzpunkt dieses Präparats wurde nun bei 113–114⁰ gefunden

¹⁾ Diese Berichte 30, 1831 [1897]. Zeitschr. für physiolog. Chem. 26, 315.

²⁾ Americ. Chem. Journ. 26, 86—92. ³⁾ Ann. d. Chem. 315, 186.

⁴⁾ Zeitschr. für physiolog. Chem. 28, 23.

⁵⁾ Diese Berichte 32, 681 [1899]

(die frühere Beobachtung hatte 110—111^o ergeben) und ein Gemisch der Säure mit dem Imid der dreibasischen Hämatinsäure, dargestellt aus Hämin, welches aus Schafblut gewonnen war¹⁾, zeigte den gleichen Schmelzpunkt.

c) Das Silbersalz, bereitet aus der mit Ammoniak neutralisirten alkoholischen Lösung der Biliverdinsäure durch Fällung mit Silbernitrat, ergab nach sorgfältigstem Auswaschen mit Weingeist bis zum Ausbleiben der Diphenylaminreaction folgende Resultate:

$C_8H_7Ag_2O_4N$. Ber. C 24.18, H 1.76, Ag 54.4,

Gef. » 24.08, » 2.18, » 54.02, 54.1, 54.04.

Es hat also die gleiche Zusammensetzung wie das unter denselben Bedingungen aus dem Imid der dreibasischen Hämatinsäure erhaltene Silbersalz. Biliverdinsäure darf also als mit der Letzteren identisch angesprochen werden²⁾.

Weitere Beziehungen zwischen Hämatin resp. Hämatoporphyrin und Bilirubin konnten bisher auf dem Wege der Oxydation mit Chromsäure nicht aufgefunden werden.

Ich habe nun zunächst die Einwirkung von Alkalien studirt. Hämatin und Hämatoporphyrin sind ja, wie ich zeigte³⁾, selbst gegen kochende Lauge insofern resistent, als sie Ammoniak nicht abgeben.

Bilirubin erfährt dagegen, wie bekannt, in alkalischer Lösung schon durch den Luftsauerstoff eine Oxydation und soll nun dabei einen einheitlichen Körper, das Biliverdin, $(C_{16}H_{18}N_2O_4)_x$, ergeben.

Ich habe früher bereits mitgetheilt, dass es mir nicht gelungen ist, aus Bilirubin durch Oxydation mit Bleisuperoxyd den grünen Farbstoff in quantitativer Ausbeute zu erhalten, auch stimmten die analytischen Befunde nicht zu obiger Formel⁴⁾. Jetzt kann ich hinzufügen, dass auch die Oxydation durch den Luftsauerstoff nicht zu einheitlichen Körpern zu führen scheint, insofern der erhaltene, grüne, chloroformunlösliche Farbstoff sich nur zum Theil in Alkohol löst⁵⁾.

In der That scheint nämlich nicht nur der Sauerstoff, sondern auch das Alkali auf Bilirubin zu wirken. Erhitzt man nämlich die alkalische Lösung und erhält sie einige Stunden im Sieden, so findet

¹⁾ Zeitschr. für physiolog. Chem. 29, 190.

²⁾ Ich möchte aber erwähnen, dass ein neues Präparat von Biliverdinsäure nicht die gleichen Werthe für die elektrische Leitfähigkeit gab, welche früher für das Imid der dreibasischen Hämatinsäure gefunden wurden, nach Messungen, welche Hr. Dr. Westhauser die Güte hatte, auszuführen.

³⁾ cf. Ann. d. Chem. 315, 183, 184. Anm. 31 u. 35.

⁴⁾ Zeitschr. für physiolog. Chem. 26, 322.

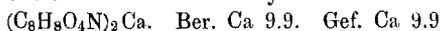
⁵⁾ Ob die Oxydation mit Hübl'scher Jodlösung, welche A. Jolles angewandt hat (Pflüger's Archiv 75, 451), zum Ziele führt, erscheint mir auch fraglich. Die eine Analyse, welche Jolles anführt, spricht jedenfalls nicht für die Formel $C_{16}H_{18}N_2O_4$.

eine Abspaltung von Ammoniak statt, die durchaus nicht unbedeutend ist. Wird nunmehr mit Schwefelsäure angesäuert und filtrirt, so läuft eine dunkelbraune Flüssigkeit ab, welche an Aether — besser noch an Essigester — eine ganz charakteristisch fäcal riechende Säure abgiebt, die bisher allerdings nur als Syrup erhalten wurde.

Der durch Schwefelsäure gefällte Farbstoff löste sich nach dem Auswaschen und nach vorsichtigem Trocknen wieder nur zum Theil in Alkohol, und diese Lösung wurde jetzt nicht mehr durch Wasser, wohl aber durch Aether gefällt.

Diese Versuche sollen nun mit grösseren Mengen wiederholt werden.

Erwähnen möchte ich noch, dass ein Oxydationsversuch auch mit den Antheilen des Farbstoffs durchgeführt wurde, welche aus dem Gallensteinpulver vor der Extraction mit Chloroform durch Alkohol herausgelöst werden, die also in die Kategorie des Biliprasins gehören. 6 g gaben bei der Oxydation mit 6 Atomen Sauerstoff 1.5 g ätherlösliche Rohsäure, 0.7 g gereinigte Rohsäure und daraus 1.2 g Calciumsalz, das sich aus Wasser umkrystallisiren liess. Die Analyse:



zeigte, dass auch hier das Imid der dreibasischen Hämatinsäure vorlag, dass somit auch diese Antheile in directer Beziehung zum Blutfarbstoff stehen.

Tübingen, im März 1902.

198. Joh. Howitz: Ueber *o*-Chinolinaldehyd.

(Eingegangen am 24. März 1902.)

Bei Gelegenheit einer Untersuchung über Derivate des von Claus und Volger¹⁾ zuerst dargestellten, von W. Müller²⁾ und W. Lang³⁾ in seinen Eigenschaften eingehender studirten ω -Brom-*o*-Toluchinolins, ist es mir gelungen, den Aldehyd der Chinolin-*o*-carbonsäure zu gewinnen.

Erhitzt man ω -Brom-*o*-Toluchinolin mit der molekularen Menge Jodmethyl eine Stunde im zugeschmolzenen Rohr im Wasserbade auf etwa 80°, so findet ein glatter Austausch von Brom gegen Jod statt, und man erhält, neben Brommethyl, das ω -Jod-*o*-Toluchinolin in quantitativer Ausbeute.

1) F. Volger, Inaug.-Dissert. Freiburg 1896.

2) W. Müller, Inaug.-Dissert. Freiburg 1897.

3) W. Lang, Inaug.-Dissert. Freiburg 1898.