

Über die Dotterpigmente.

Von **Richard Maly** in Graz.

(Vorgelegt in der Sitzung am 12. Mai 1881.)

Bei meinen schon vor mehreren Jahren begonnenen Untersuchungen über das sogenannte Luteïn, respective die Farbstoffe des Eidotters, lag zunächst der Gedanke vor, zu prüfen, ob sich irgend ein chemischer Zusammenhang zwischen demselben und den Gallenfarbstoffen oder dem Blutfarbstoffe nachweisen lasse, wenigstens in der Art, wie ein solcher Zusammenhang zwischen Blutfarbstoff und Gallenfarbstoffen untereinander besteht, was sich bekanntlich durch die Möglichkeit der Überführung beider in einen und denselben Körper das Hydrobilirubin ergibt.

Das Nachfolgende wird eine Lösung dieser Frage enthalten, und zwar wird sich ergeben, dass ein solcher Zusammenhang nicht stattfindet, und dass auch eine physiologisch zu vermuthende Verwendung der Dotterfarbstoffe für die Bildung von Blutfarbstoff mit grosser Wahrscheinlichkeit von der Hand zu weisen ist. Ausserdem werden Methoden beschrieben werden, durch welche die betreffenden Substanzen wenigstens einigermassen rein dargestellt werden können.

Bevor ich darauf eingehe, sei mir gestattet, die einzelnen einschlägigen Angaben aus der Literatur hier zusammenzustellen, da ich nicht finden kann, dass dieselben irgendwo gesammelt worden wären.

In seiner Thierchemie sagt Berzelius¹ von den Dotterfarbstoffen Folgendes: „Chevreul fand einen röthlichen und einen gelblichen Farbstoff darin (d. h. im Hühnereidotter), welchen

¹ Lehrbuch der Chemie von J. J. Berzelius, übersetzt von F. Wöhler. 1er. Band 9, pag. 651, 1840.

letzteren er mit der gelben Materie der Galle verglich.“ Das von Berzelius nicht citirte Original habe ich nicht weiter aufzusuchen mich bemüht, da bei der Sorgfalt, mit der Berzelius in diesem berühmten Buche alle Angaben seinerzeit aufgenommen hat, dasselbe nicht mehr enthalten haben dürfte.

Gobley¹ zählt im Eidotter 12 Körper auf, darunter einen gelben und einen rothen Farbstoff, die er so darstellte; er behandelte Eigelb mit heissem Alkohol, schied durch Abkühlen Olein und Cholesterin ab, wobei ein Farbstoff mit „ziemlich entschieden rother Farbe“ gelöst blieb. Durch Wiederauflösen des Cholesterins in Alkohol und Auskrystallisirenlassen desselben blieb ein mehr gelbgefärbter Stoff zurück. Fest oder rein konnte keiner von beiden Körpern erhalten werden. Der rothe schien in Weingeist löslicher zu sein als der gelbe; im rothen liess sich auch Eisen nachweisen. Später hat Gobley² die Karpfeneier untersucht; auch von ihnen sagt er, der eine Farbstoff darin ist mehr roth und eisenhaltig, er sei das Analogon vom Blutroth, der andere ist mehr gelb, er wird mit dem gelben Blutserum- und Gallenfarbstoff verglichen.

Die grünen Hummereier haben Valen ei ennes und Fremy³ extrahirt. Der daraus erhaltene Farbstoff war eine grüne harzartige Substanz, die durch verschiedene Einflüsse, so durch Trocknen im Vacuum, durch Berührung mit Alkohol, durch Reiben etc. roth geworden sein soll. Ebenso soll sich auch der in den Hummerschalen selbst enthaltene Farbstoff verhalten haben.

Ein wenig mehr als das Vorhergehende trugen zur Charakteristik der Dotterfarbstoffe die Arbeiten von Städeler und von Holm bei, durch welche einerseits die Aufmerksamkeit auf ähnlich sich verhaltende gelbe Farbstoffe anderer Fundstellen gelenkt, andererseits in bestimmter Weise die Verschiedenartigkeit vom gelben Gallenfarbstoff und vom Dotterfarbstoff nachgewiesen wurde. Nachdem nämlich der gelbe Gallenfarbstoff das Bilirubin krystallinisch erhalten und vor Allem durch Städeler in seinen Haupteigenschaften beschrieben war, hat F. Holm⁴ daran

¹ Lieb. Annal. 60, 275, und chem. Centralblatt 1846.

² Chemisches Centralblatt 1850, 381.

³ Dasselbst 1854, 623.

⁴ Journal für praktische Chemie 100; 142, 1867.

anschliessend gezeigt, dass die sogenannten Hämatoidinkry-
stalle aus den apoplectischen Cysten — welche von den Patho-
logen zumeist als Bilirubinkry-
stalle angesprochen wurden — davon
verschieden sind, und ebenso, dass auch der gelbe, zum Theil in
hämatoidinähnlichen mikroskopischen Kryställchen in den Corpora
lutea der Kuh vorkommende Farbstoff keinesfalls Bilirubin ist.

Im Zusammenhange mit Holm's Beobachtungen hat dann
Städeler¹ die Untersuchung der farbigen Körper des Hühnerei-
dotters aufgenommen und gefunden, dass der Farbstoff davon —
Städeler spricht in der Einzahl — ebenfalls vom Bilirubin voll-
ständig verschieden ist, dass er aber in Lösungsverhältnissen und
Farbenreactionen mit dem Farbstoffe der apoplectischen Cysten
dem sogenannten Hämatoidin und mit dem der Corpora lutea
übereinstimmt.

Städeler's Angaben bilden eigentlich die einzige Vorarbeit
über den Gegenstand; er schüttelte nichtcoagulirten Hühnerei-
dotter mit Äther, wobei Farbstoff und Fett in den Äther übergehen,
verseifte den Ätherrückstand mit Natron und zog den Seifenleim
wieder mit Äther aus. Dieser Ätherauszug hinterliess aber noch-
mals ein nicht oder schwierig verseifbares Fett, das allmählig Cho-
lesterin ausschied, butterartig erstarrte, und goldgelb gefärbt war.
Dieses farbstoffreiche Fett war das Präparat Städeler's. Es hatte
Ähnlichkeit mit dem hämatoidinhaltigen Fette der Eierstöcke, löste
sich mit goldgelber Farbe in Äther und Chloroform, in Schwefel-
kohlenstoff mit orangenfarbener. Beim Zerrühren mit wenig einer
concentrirten Salpetersäure färbte es sich vorübergehend rein blau.
Bei Gegenwart von Weingeist wurde es von Salpetersäure ohne
Farbenspiel entfärbt.

Hiemit hatten Städeler und Holm ein unterscheidendes
Merkmal zwischen Dotterfarbstoff und dem der Corpora lutea²

¹ Journal für praktische Chemie 100; 148, 1867.

² Das Hämatoidin der (apoplectischen) Cysten meine ich hier nicht,
da E. Salkowski Chemisches Centralblatt 1869, 32 aus dem Inhalte einer
Strumacyste einmal ein sogenanntes Hämatoidin erhielt, das alle Eigen-
schaften des Bilirubins besass. Der Name Hämatoidin bedeutet daher nichts
Chemischbestimmtes, ist nur der Ausdruck für rothe oder gelbe mikro-
skopische Kryställchen von thierischen Fundstellen, und wäre am besten zu
streichen.

einerseits und dem Bilirubin andererseits constatirt: 1. die beiden ersteren lassen sich aus einer stark alkalischen Flüssigkeit mit Äther ausschütteln, während das Bilirubin umgekehrt sich aus solchen Flüssigkeiten nicht ausschütteln lässt, vielmehr durch Alkalien seiner Lösung in Chloroform, Äther etc. entzogen wird; 2. Gallenfarbstoff gibt mit Salpetersäure das bekannte Farbenspiel, auch bei Gegenwart von Alkohol, Dotterfarbstoff gibt mit Salpetersäure blaue Färbung, bei Gegenwart von Alkohol tritt aber durch Salpetersäure sofort Entfärbung ein.

Das Pigment aus dem Eierstocke der Kuh haben auch G. Piccolo und A. Lieben¹ untersucht. Sie verseiften das Ätherextract einer grossen Zahl gelber Körper, verdünnten, und konnten dann aus der Seifenlösung eine kleine Menge glänzender, mikroskopischer, dichroitischer Kryställchen abfiltriren, die aber nicht durch die Einwirkung des Alkalis erst entstanden, sondern bereits im ursprünglichen ätherischen Auszuge enthalten waren. Die Hauptmasse der Farbstoffe blieb in der Seifenlösung gelöst. Die Kryställchen waren in Äther, Benzol und Schwefelkohlenstoff löslich, färbten sich unter dem Mikroskope mit concentrirter Schwefelsäure blau und verloren ihre rothe Farbe an der Luft, blieben ab davon geschützt, unverändert. Die Verfasser schlugen für ihre Krystalle die Namen Luteohämatoidin oder Hämolutein vor.

Thudichum² fasst in einer kurzen Mittheilung im Jahre 1869 eine Reihe gelber Farbstoffe verschiedener Örtlichkeiten, so die der Ovarien, des Eidotters, des Blutserums, der Zellen des Fettgewebes, des Milchfettes, der serösen Ergüsse, der Samen des Mais, des Fleisches von Pflanzenbeeren, der gelben Rüben, des Orleangelb und der gelben Blüten von 42 Pflanzenspecies unter dem Namen Lutein zusammen. Er spricht von „Krystallen des Luteins“, nennt sie scheinbar rhombische Tafeln, gibt aber nicht mit einer Silbe an, wie sie darzustellen wären, oder wo man sie finden könnte. In Alkohol, Äther und Chloroform soll das Lutein löslich sein. Mit Salpetersäure soll es blau und dann wieder gelb werden, und im Spectrum sollen zwei oder auch drei Streifen auftreten. Die Körper von Holm und Städeler fallen nach Thu-

¹ Zeitschrift für Chemie 1868, 645.

² Centralblatt für die medicinischen Wissenschaften 1869, 1.

dicum ebenfalls mit Lutein zusammen, während die Gallenfarbstoffe auch Thudicum als völlig verschieden von seinem Lutein erkennt.

Einen neuen Fundort für das gelbe mit Salpetersäure sich blau färbende Pigment hat dann Capranica¹ in seiner in Boll's Laboratorium in Rom ausgeführten Arbeit über die farbigen Substanzen der Retina angegeben. Es sind das die farbigen mikroskopischen Ölkugeln, die in der Retina fast jeden Wirbelthieres sich finden. Drei Farbreactionen hat Capranica an ihnen beobachtet: 1. concentrirte Schwefelsäure verwandelt unter dem Mikroskop die goldgelbe Farbe momentan in violett und sehr bald in tiefes Blau; 2. concentrirte Salpetersäure färbt für einen Augenblick blaugrün und macht dann farblos; 3. Jodkaliumjodlösung macht grün bis blaugrün. Die Hauptmasse dieser Kugeln ist eine Fettsubstanz. Durch Ausziehen der Netzhäute (vom Huhn) mit Alkohol erhielt Capranica eine gelbe Lösung, die auf Schwefelkohlenstoffzusatz röther wurde. Beide Lösungen absorbiren im Spectrum das Licht etwa von *b* an, und lassen nach starker Verdünnung noch zwei Streifen über, den einen um *F* herum, den anderen etwa in der Mitte zwischen *F* und *G*. Am Lichte blichen die Lösungen ab, wobei Luft ohne Einfluss sein soll. Darnach hält Capranica seinen Farbstoff für identisch mit dem im Eidotter und dem der Corpora lutea und behält den Namen Lutein.

Endlich ist noch der Arbeiten Kühne's² zu gedenken. Derselbe nennt die Farbstoffe der retinalen Ölkugeln „die lichtbeständigen Farben“ der Netzhaut im Gegensatze zum Sehpurpur, eine Gegenüberstellung, die nur relativ richtig ist. Durch Verseifung des Rückstandes der alkoholischen und ätherischen Auszüge aus den Netzhäuten vom Huhn, mit Natronlauge und Behandlung der rothen Seife mit Lösungsmitteln erhielt Kühne Lösungen von verschiedenen Farben: mit Petroleumäther einen gelbgrünen Auszug, den er Chlorophan nennt, mit Äther einen gelben, den er Xantophan nennt, worauf die Seife als rosenrothe Masse zurückblieb (Rhodophan). Die Absorptionsspectra wiesen, wie bei Cap-

¹ Archiv für Anat. und Physiol. Physiol. Abtheil. Jahrg. 1877, 283.

² Untersuchungen a. d. physiol. Institut. Heidelberg 1, 341, und Jahresberichte für Thierchemie 8, 280.

ranica Verdunklung im violetten Theile und im gemischten Äther-extract meist zwei Streifen auf. Die alkoholisch-ätherische Lösung vom Eidotter fand Kühne spectraliter den retinalen Lösungen ähnlich; mehrere der Farbe nach unterschiedene Lösungen aus Dotterseife zu erhalten, gelang aber nicht.

Nach diesem Stande der Kenntnisse kommen an verschiedenen thierischen (und pflanzlichen) Fundstellen ein oder mehrere gelb- bis orangerothe Farbstoffe vor, die vom Bilirubin definitiv verschieden, untereinander durch ihre Widerstandsfähigkeit gegen Alkalien, ihre Farbreaction mit Salpetersäure, ihre lichtabsorbirenden Eigenschaften und ihr nach einiger Zeit stattfindendes Abbleichen charakterisirt sind. Krystallisationsvermögen scheint ihnen nur ausnahmsweise (Hämatoidinkrystalle der gelben Körper im Eierstock) zuzukommen, meist sind sie nur in alkoholischen oder ätherischen Lösungen oder als gefärbte Seifen erhalten worden. Die Schwierigkeit der Untersuchung liegt hier vor Allem in der Beschaffung des Materials, denn mit so minimalen Mengen, wie sie die retinalen Ölkügelchen darstellen, wird sich eine eigentlich chemische Untersuchung nie ausführen lassen, und andererseits liegt sie wie beim Hühnereidotter in der grossen Masse von Fett und der Gegenwart von anderen unbekanntem Substanzen.

Es schienen mir desshalb für eine derartiger Untersuchung wegen ihres geringen Fett- und hohen Farbstoffgehaltes die rothen Eier der Seespinnen (*Maja Squinado*), die man von den Küsten Istriens im Frühjahr erhalten kann, ein geeignetes Materiale, und ich zweifle nicht, dass jede weitere Untersuchung sich desselben mit Vortheil bedienen wird. Jedes Weibchen dieser Thiere hat in einer, wie eine flache Schale mit der Convexität nach aussen auf den Bauch gelegten Schwanzklappe (richtiger Abdominalplatte) circa eine kleine Handvoll dieser prächtig rothen (nackten) Eidotter, an chitinösen Trägern (Abdominalfüssen, Bauchfüssen) befestigt. Jeder Abdominalfuss bildet mit den daran hängenden Eiern ein Träubchen, das man mit einem Scheerenschnitt herauslösen kann. Es ist nicht schwer und nicht gar zu kostspielig, sich einige Kilo solcher Eier zu verschaffen, die einen sehr ansehn-

lichen Farbstoffgehalt repräsentiren. Doch muss man dieselben aus dem lebenden Thiere herausnehmen, denn nach dem Tode zersetzen sie sich rasch wie alle Meeresproducte und werden bald übelriechend und missfärbig.

Einige Bestimmungen über den Wasser- und Aschegehalt und über den Gehalt an Alkohol- und Ätherextract der frischen Eier hat für mich Herr Hinteregger ausgeführt.

- I. 5.5967 Grm. frische Eier gaben bei 100 bis 110° C. anhaltend getrocknet 3.682 Grm. oder 65.7% Wasser ab.
 II. 5.639 Grm. Eier eines anderen Thieres verloren 3.525 Grm. oder 62.52% Wasser.

Im Mittel beträgt der Wassergehalt 64.1%.

Eine andere Partie vorher getrockneter Eier wurde in dem von mir ¹ beschriebenen Extractionsapparate erst mit Äther und darauf mit Alkohol heiss extrahirt. Es gaben:

5.915 Grm. trockener Eier 0.8152 Grm. oder 13.78% Ätherextract und 1.448 Grm. oder 24.47% Alkoholextract. Der Rückstand im wesentlichen aus Eiweisskörper bestehend, lieferte 0.1683 Grm. oder, auf die ursprünglichen trockenen Eier bezogen, 2.84% Asche.

Man sieht hieraus, dass die Seespinneneier gegenüber den Vogeleiern (respective Vogeleidottern) sehr arm an Fett sind, denn in den 13.7% Ätherextract ist auch der grösste Theil des Farbstoffes und das Cholesterin enthalten.

Wegen der Zersetzlichkeit der frischen nassen Eier (Dotter) muss man den Vorrath conserviren, was sich auf mancherlei Weise gut ausführen lässt. In wässriger Salicylsäurelösung halten sich die Eier wochenlang mit ihrer unverändert rothen Farbe, nur die darüberstehende Flüssigkeit wird trüb und schimmelig. Wirft man sie in Alkohol, so geht der Farbstoff allmählig aber langsam mit morgenrother oder gelbrother Farbe in Lösung. Rascher und vollständiger nimmt Äther den Farbstoff auf, und selbst bei jahrelangem Aufbewahren unter Äther in verschlossenen Flaschen tritt keine Änderung in der Tingirung ein. Ebenso vollständig zieht Chloroform den Farbstoff aus, und wenn man dieses einmal erneuert, so sind die Eier farblos geworden und sehen aus wie

¹ Sitzungsab. d. k. Akad. Bd. 70, III. Abth., Juni 1874.

etwas opake homöopathische Kügelchen; der Chloroformauszug ist granatroth. Beiläufig ähnlich verhalten sich auch Benzol und Toluol. Petroleumäther nimmt weniger Pigment auf und färbt sich schwächer; unter ihm aufbewahrt werden die Eier mit der Zeit dunkler, missfärbig und faulig. Starke Essigsäure macht die Eier aufquellen und nimmt auch nach einem halben Jahre nur wenig Pigment auf. Ähnlich wirkt Glycerin unter guter Erhaltung des Pigmentes. Auch unter wässrigem Ammoniak oder verdünnter Natronlauge bleiben die Farbstoffe ziemlich erhalten.

Ich habe grosse Mengen der Eier mit Alkohol und mit Chloroform erschöpft, und viele Liter der intensiv gefärbten Extracte verarbeitet.

Sehr viel zweckmässiger ist es aber, um später ein feines Pulver daraus machen zu können, und um in der Anwendung der Lösungsmittel sich freie Hand zu lassen, die Dotterträubchen zu trocknen. Von der Abdominalplatte genommen und in ebene Schalen gelegt, trocknen sie bei 35—40° C. binnen einem Tage vollkommen aus mit Erhaltung der Farbe und Durchscheinbarkeit. Wegen des geringen Fettgehaltes werden sie brüchig spröde und lassen sich zu einem feinen, weichen, röthlichen Pulver zerreiben, das an die Lösungsmittel in viel kürzerer Zeit und vollständig den Farbstoff abgibt.

Dieses nicht stärker als zum Trocknen nöthig, erhitzt gewesene Dotterpulver gibt schon an kaltes Wasser den Farbstoff ab, während die unzerriebenen Dotter dies nicht thun.¹ Überhaupt löst sich ein grosser Theil der Eiermasse im Wasser, aber die Lösung ist etwas trübe und filtrirt langsam. Sie enthält viel Eiweiss, coagulirt beim Kochen, und ebenso durch Zusatz von Essigsäure mit überschüssigem Kochsalz in der Kälte. Das flockige, wie es scheint auch wachs- und protagonartige Substanzen enthaltende Coagulum reisst einen grossen Theil des Farbstoffes aus der Lösung mit. Auch starker Alkohol macht den wässrigen rothen Auszug gerinnen, aber in diesem Falle bleibt der meiste Farbstoff im Filtrat, und der Rest lässt sich dem Coagulum durch weiteren warmen Alkohol fast ganz entziehen.

¹ Werden diese erhitzt, so hält das im Dotterbläschen coagulirende Eiweiss die Pigmente zurück, und in der trüben Flüssigkeit finden sich nur phosphorhaltige Körper.

Zunächst war nun zu sehen, ob dieser reichlich zu habende Seespinnendotterfarbstoff übereinstimmt mit dem der Hühnereidotter, dem der Retina u. s. w., denn nur dann bot er ein grösseres Interesse und ein wichtiges Ersatzmaterial für die in grösserem Quantum unzugänglichen „Luteïne“ der Wirbeltiere. Die älteren Angaben bieten zu solchem Vergleiche genügende Anhaltspunkte, und liessen, wie das Folgende ergibt, Übereinstimmung erkennen.

Der alkoholische Auszug der Seespinnendotter ist völlig klar, gelb-feuerroth; auch in dünner Schichte geht bei dieser Concentration nur roth und etwas gelb hindurch, das ist von 25—70 meiner Scala¹ entsprechend dem Intervalle *a* bis *E*, das ganze violette Ende des Spectrums ist scharf abgegrenzt und dunkel. In verdünnterer, etwa 1·5 Ctm. dicker, nur mehr gelb erscheinender alkoholischer Lösung verhält sich das rothe Ende des Spectrums ziemlich gleich, aber zwischen 75—90 der Scala ist ein dunkler, etwas verschwommener Streifen zu sehen, der also um *F* herum liegt und nach beiden Seiten hin eine beträchtliche Ausdehnung hat. Dann wird das spätere Blau bis über *G* hinaus wieder sichtbar.

Ganz ähnlich verhält sich Chloroformlösung; in concentrirterer Lösung schneidet das sichtbare Spectrum bei etwa 70 ab, in ganz verdünnter bleibt ein Schattenstreif im Grünblau.

Dunstet man etwas der alkoholischen Lösung ab, so gibt der Rückstand, mit einem Tropfen gelber Salpetersäure befeuchtet, dunkelblaue Färbung, die auf Zusatz von Wasser oder von Alkohol verschwindet. Mit concentrirter Schwefelsäure befeuchtet, gibt der Rückstand eine schmutzig blaugrüne Färbung.

Durch Alkalien oder Ammoniak lässt sich der chloroformigen oder ätherischen Lösung der Farbstoff nicht entziehen. Dies alles zeigt daher, dass der vorliegende Farbstoff mit dem der Hühnereidotter und der anderen Fundstellen übereinstimmt.

Bei den Versuchen, den Farbstoff besser als bisher zu isoliren, ergab sich bald, dass nicht ein, sondern dass bestimmt zwei Farbstoffe vorliegen, ein gelber und ein rother, dass also die bisher als Luteïn bezeichnete Substanz

¹ *Li* = 35; *Na* = 50; *TI* = 65.

ein Gemenge ist. Ich werde zuerst drei der einfacheren Versuche beschreiben, durch die eine Trennung beider Pigmente bewerkstelliget werden kann.

I. Trennungsmethode.

Wird das trockene Dotterpulver mit kaltem Wasser extrahirt, das Filtrat nach dem Zusatze eines Tröpfchens Essigsäure durch Kochen coagulirt, das die Pigmente einschliessende Coagulum getrocknet, und die erhaltene hornige Masse nach dem Zerreiben mit feinem Quarzsand in einem kleinen Extractionsapparate mit Petroläther erschöpft, so erhält man eine stark gefärbte, bernsteingelbe Lösung. Wird dann der so ausgekochte Rückstand in gleicher Weise mit Schwefelkohlenstoff behandelt, so resultirt eine rothe Flüssigkeit, in dünnen Schichten rein rosa oder purpurn, in dickeren braunroth. Man erhält übrigens die beiden verschiedenfarbigen Extracte auch, wenn man das getrocknete Dotterpulver direct mit den Lösungsmitteln aufeinanderfolgend behandelt.

Da aber Capranica (l. c.) ganz richtig beobachtet hat, dass dem Schwefelkohlenstoff überhaupt die Eigenschaft zukommt, das sogenannte Luteïn mit dunklerer Farbe und mehr rothem Ton zu lösen, so kann man nicht beide Extracte, das von Petroleum und von Schwefelkohlenstoff, direct vergleichen. Dunstet man jedoch sowohl von dem einen wie von dem anderen etwas ab, und übergiesst die Rückstände mit Alkohol, so löst sich überall etwas Farbstoff auf, aber vom Petroleumrückstand bleiben gelbe Öltropfen, vom Schwefelkohlenstoffrückstand dunkelrothe zurück.

Dasselbe zeigt sich mit Umgehung des Schwefelkohlenstoffes, wenn man in folgender Weise operirt. Die gepulverten Eier werden zuerst im Extractionsapparate mit Petroleumäther ausgekocht, man erhält den gelben Farbstoff in Lösung. Das erschöpfte Eierpulver wird nach dem Abdunsten des Petroleums mit kaltem Wasser behandelt, wobei man eine dunkelrothe allen noch übrigen Farbstoff enthaltende, sehr leicht und völlig klar filtrierende Lösung erhält. Man hat so auch einige Trennung der übrigen Bestandtheile bewirkt; die Petroleumlösung enthält ausser dem gelben Pigment alles vorhandene Fett, die rothe wässerige ausser dem rothen Pigment die Eiweissstoffe und protagonartige Körper.

Die Spectra dieser zwei Lösungen sind etwas verschieden, und gestalteten sich bei Gaslicht (Sonnenlicht war damals nicht zu haben) so. Die gelbe Petroleumlösung lässt Roth, Gelb etwas Grün hindurch, während das violette Ende von 75 an dunkel ist; bei stärkerer Verdünnung rückt der sichtbare Theil nach rechts und es bleibt ein schwacher Streifen bei 80 — 90, d. h. um *F* herum. Die rothe wässrige Lösung verhält sich in stärkerer Concentration ziemlich wie die gelbe, bei stärkerer Verdünnung hellt sich aber das Spectrum gegen das violette Ende hin auf, ohne dass ein Streifen erkennbar wäre.

II. Trennungsart.

Digerirt man den alkoholischen Eierauszug mit gutwirkender Thierkohle (Fleischkohle), und filtrirt nach 3 — 4 Stunden, so fiesst nur ein gelbes Filtrat ab, während der rothe Farbstoff an der Kohle fest haftet, die denselben nach dem Auswaschen mit Alkohol leicht unter Bildung einer purpurfarbigen Lösung an Schwefelkohlenstoff abgibt.

Ich habe grössere Mengen alcoholischen Dotterauszuges so behandelt, und einige Vorversuche mit den getrennten Lösungen angestellt. Das gelbe alkoholische Filtrat enthält noch die meisten anderen Stoffe, die aus den Dottern in den Alkohol übergehen und gibt abgedunstet einen gelben, wachsartigen Rückstand, in dem man nach Verschmelzen mit Salpeter und Soda viel Phosphorsäure findet. Im Spectrum sieht man wieder nach gehöriger Verdünnung den blassen Streifen zu beiden Seiten von *F*. Die Farbreactionen mit Salpetersäure und mit Schwefelsäure treten hier nicht deutlich ein, die letztere färbt bald dunkelbraun, offenbar eine Verkohlungserscheinung.

Die rothe Schwefelkohlenstofflösung lässt beim Abdunsten einen kirschrothen noch etwas fettigen Rückstand, der mit einem Tropfen gelber Salpetersäure schön indigblau wird; die Farbe verschwindet von selbst ziemlich bald, noch rascher auf Alkoholzusatz. Concentrirte Schwefelsäure färbt den Rückstand grün und später braun. Nach diesen Versuchen kommen die beiden Farbreactionen viel deutlicher dem rothen als dem gelben Pigmente zu. Phosphor, respective protagonartige Substanzen, sind in der rothen Lösung nicht mehr enthalten.

III. Trennungsart.

Am schönsten kann man den gelben vom rothen Farbstoff durch Baryt trennen. Setzt man zu dem alkoholischen, gelbrothen Dotterauszuge nicht zu wenig gesättigtes warmes Barytwasser und filtrirt nach einiger Zeit, so läuft leicht und klar ein citrongelbes Filtrat ab, während man am Filter einen mennigrothen Niederschlag hat. Das gelbe Filtrat nochmals mit etwas Barytwasser versetzt, bleibt gelb, und setzt nur eine Trübung ab, die sich zu weissen Flocken zusammenballt. Sonach scheint die Trennung beider Farbstoffe durch Baryt vollständig. Behandelt man den rothen Barytniederschlag, nachdem er mit Alkohol ausgekocht worden ist, mit schwefelsäurehaltigem Alkohol, so erhält man den rothen Farbstoff in alkoholischer Lösung. Die Lösung ist concentrirt braunroth, wird durch Verdünnen nicht gelb, sondern relativ lichter und zuletzt rosafarbig. Die phosphorhaltigen Körper gehen zumeist in den Barytniederschlag ein, und finden sich dann in der rothen Lösung, die auch noch Fettsäuren enthält. Die Farbreactionen mit Salpetersäure und Schwefelsäure treten auch bei dieser Trennungsart besser mit dem Rückstande der rothen als der gelben Lösung ein.

Das Vorgebrachte zeigt also mit genügender Sicherheit, dass in den untersuchten Dottern zwei verschiedene Farbstoffe vorkommen, und dass es auf verschiedene Weise gelingt, sie der Hauptsache nach oder vielleicht, wie bei 3, vollständig voneinander zu scheiden. Viel grösser ist dann aber die Schwierigkeit, die einzelnen Farbstoffe von den anderen noch vorhandenen Dotterstoffen zu trennen. Eigentliche Fette, die ohnedies bei diesem Material zurücktreten, können in dem Alkoholauszuge nicht viele vorhanden sein, aber es sind freie Fettsäuren vorhanden, dann wallrath- oder wachsähnliche Substanzen, die schwer oder kaum verseifbar sind, ferner protagonartige Stoffe und deren Zersetzungsproducte, endlich Cholesterin. Diese Stoffe gehen, wenn man Isolirversuche anstellt, in fast alle Auszüge und Schüttelflüssigkeiten über, und da sie selbst als Lösungsmittel für die Pigmente dienen, wird durch ihre Gegenwart die Wirkung der Lösungsmittel unberechenbar alterirt. In den wässerigen Auszügen dienen die löslichen Albuminate als Pigmentlösungsmittel. KrySTALLISIRT oder auch nur in Gestalt eines mikroskopischen Präpara-

tes habe ich die Pigmente nie erhalten, obwohl die Bedingungen hiezu nach den Erfahrungen, die man über die Bildung der Hämatoïdinkryställchen im Fette der Eierstöcke hat, bei manchen Versuchen von mir günstig schienen. So gab der Chloroformauszug von etwa $\frac{1}{2}$ Kilo Dotter, nach dem Abdestilliren des etwa 2 Kilo betragenden Chloroforms ein grosses Quantum völlig klaren dunkelrothen Öles, das mehr als ein Vierteljahr lang stehen blieb, aber ausser etwas Fettsäuren nichts Krystallinisches abschied. Es scheint mir desshalb, wenn auch nicht unwahrscheinlich, doch nicht bewiesen, dass die spärlichen und ausnahmsweisen Befunde der sogenannten Hämatoïdinkrystalle (soferne sie nicht Bilirubin sind) auf Identität mit den regelmässig und normal vorkommenden Dotterfarbstoffen zurückzuführen sind, und ich möchte daher Piccolo und Lieben's Bezeichnung Hämoluteïn für die nativen Kryställchen der Corpora lutea, nicht auf einen der Dotterfarbstoffe übertragen. Thudichum's Name Luteïn ist wie schon gezeigt, das Gemenge von meinem rothen und gelben Dotterpigment. Ich werde dieselben im Folgenden mit Dotterroth (Vitellobin) und Dottergelb (Vitelloseïn) bezeichnen, und dazu übergehen, zu beschreiben, inwieweit dieselben im Einzelnen rein darzustellen gelang, wobei in Anbetracht der Schwierigkeit, solche Körper zu fassen, das Erreichte immerhin einen Anfang für fernere Untersuchungen abgeben dürfte.

Darstellung des Vitellobins.

Bei einer Reihe von Versuchen, an denen ich, wie sich später zeigte, leider zu lange festgehalten habe, bin ich vorzüglich davon ausgegangen, die mit Äther, Alkohol oder Chloroform gewonnenen Auszugrückstände zu verseifen und aus den so erhaltenen Lösungen oder den ausgesalzenen Seifen die Pigmente mit Lösungsmitteln wieder ausziehen oder auszuschütteln. Die ätzenden Alkalien wirken nämlich, soferne man aus der Unveränderlichkeit der Tingirungen schliessen darf, keineswegs auf die Pigmente ein, und man kann ihrer Wirkung freies Spiel lassen. Obwohl ich später eine ergiebigerere Methode zur Abscheidung des Vitellobins beschreiben werde, so haben doch die Verseifungsversuche in ihrer mannigfaltigen Variation mir zuerst die

Substanz geliefert, und das Resultat ergeben, dass das Vitellorubin sich mit Alkalien und alkalischen Erden verbindet, dass diese Verbindungen nur noch in Äther, Chloroform und Schwefelkohlenstoff aber nicht mehr in Alkohol löslich sind, sonach mit Alkohol aus den obigen Lösungen ausgefällt und damit gewaschen werden können.

Ein solcher Verseifungsversuch ist z. B. folgender: von etwa einem Liter alkoholischen Dotterauszuges wird die Hälfte des Alkohols abdestillirt und der Retortenrückstand, in dem sich etwas dickflüssiges Öl von der übrigen Flüssigkeit separirt hat, mit Ätznatron erwärmt. Nach dem Erkalten resultirt eine dunkelrothe trübe, viel Farbstoff in der Trübung enthaltende Flüssigkeit, die mit verdünnter Kochsalzlösung und viel Äther geschüttelt, und zur besseren Klärung mit etwas Alkohol vermischt wird. Nach einiger Zeit trat ziemlich gute Trennung in folgende drei Schichten ein: 1. eine untere wässrige, wenig gefärbte; 2. eine mittlere kleine, gefärbte, die wesentlich eine alkoholisch-ätherische Seifenlösung ist; und 3. eine obere ätherische Schichte, die in ihrem unteren Theile ein rothpulveriges Sediment hat. Die unterste Schichte wird entfernt, die mittlere, welche sich aus dem Scheidetrichter abgelassen, sowohl mit Wasser als Alkohol mischt, wird auch nicht weiter berücksichtigt. Der in der ätherischen Schichte suspendirte Niederschlag besteht aus Farbstoff, wachsartiger und phosphorhaltiger Substanz, brennt am Platinblech mit leuchtender Flamme und Acroleingeruch. Das ätherische Filtrat hingegen enthält die Farbstoffe einigermassen rein; es wird destillirt und gibt einen rothen Rückstand, der nicht mehr fettig aussieht, sondern nur neben Farbstoff Krystallfitter von Cholesterin enthält. Beim Übergießen mit warmem Alkohol löst sich das letztere sowie der vorhandene gelbe Farbstoff auf, und am Boden des Destillirkolbens bleibt eine Schichte der dunkelrothen amorphen Verbindung des Vitellorubins mit Alkali. Sie wird so lange mit Alkohol gewaschen, bis dieser sich nicht mehr färbt. Sowie man dann Chloroform oder Schwefelkohlenstoff dazu bringt, löst sich das Ganze sofort im ersteren Lösungsmittel mit dunkelbraunrother, im letzteren mit purpurrother Farbe. Aus der Chloroformlösung erhält man durch Vermischen mit viel Alkohol die Verbindung als rothflockigen Niederschlag, der sich in Alkohol vertheilt, sofort

löst, sobald man eine kleine Menge Essig- oder Salzsäure hinzufügt und dadurch das Alkali entzieht. Durch Vermischen der angesäuerten Lösung mit Wasser, Ausschütteln mit Äther und Verdunsten des Äthers erhält man dann das freie Vittellorubin, so rein als ich es bisher darzustellen vermochte.

Bei dieser Art der Darstellung hat man ungeheure Verluste, und es ist schwierig, ein Viertelgramm des Pigments zu gewinnen. Sehr viel mehr, aber weniger rein, namentlich mit Fettsäuren verunreinigt, erhält man das rothe Pigment, wenn man von der früher erwähnten Barytfällung ausgeht. Der alkoholische Dotterauszug wird mit heissem Barytwasser versetzt, der mennigrothe Niederschlag filtrirt, mit Alkohol so lange gewaschen, bis dieser farblos abläuft, worauf man in verdünnte Salzsäure zur Zerlegung einträgt. Es scheidet sich ein auf der wässerigen Lösung schwimmender, krümmlich weicher, kirschroth gefärbter Niederschlag ab, der aus Vitellorubin und Fettsäuren (Ölsäure?) neben etwas phosphorhaltiger Substanz besteht. Um daraus einen Theil der letzteren Körper zu entfernen, habe ich folgendes Verfahren eingeschlagen: Der rothe krümmliche Niederschlag wird noch feucht mit gebrannter Magnesia zerrieben, die rothe Masse mit Alkohol kalt ausgezogen und darauf in einem Kolben mit Äther oder Chloroform digerirt. Die weitaus grösste Menge Farbstoff geht in Lösung, die man abfiltrirt und mit viel Alkohol ausfällt. Der reichliche, aus dunkelrothen Flocken bestehende Niederschlag ist leicht filtrirbar, und trocknet nach dem Waschen mit Alkohol unter der Luftpumpe zu einem schwarzrothen Körper, der sich leicht zu einem zinnoberrothen Pulver zerreiben lässt. Er stellt die Magnesiumverbindung des Vitellorubins dar, aber freilich noch mit einer anderen organischen Magnesiaverbindung verunreinigt. Welcher Art diese ist, vermag ich nicht anzugeben, denn fettsaure (stearinsäure) Magnesia ist in Chloroform nicht löslich, und kann daher bei der Behandlung der rothen Magnesiapasta nicht mit in das Chloroform übergegangen sein. Auch Phosphor ist durch Schmelzen mit Soda und Salpeter noch in dem Präparate nachzuweisen, hingegen ist Eisen einmal nur in unbedeutlicher Menge, in einem anderen Präparate gar nicht gefunden worden, so dass ich das Vitellorubin für eisenfrei ansehe. Viel wichtiger und geradezu überraschend ist aber, dass das Vitello-

rubin auch keinen Stickstoff enthält, was auf mehrfache Weise, zuletzt auch durch Dumas' Methode in einem quantitativ gehaltenen Versuche constatirt wurde.

Versucht man mit der Magnesiumverbindung weitere Reinigungsversuche anzustellen, so scheint kaum etwas anderes zu erübrigen, als dieselbe mit Salzsäure oder Essigsäure wieder zu zerlegen, in Äther zu lösen und mit Laugen zu schütteln. Dabei treten aber sofort wieder die grossen Verluste, durch Übergang von Farbstoff in die alkalische Lösung, schlechte Abgrenzung der Schichten etc. ein.

Von den Eigenschaften des Vitellorubins ist noch zu erwähnen, dass es sich im freien Zustande in Alkohol mit braunrother Farbe löst, die bei Verdünnung in reines Rosa übergeht. Äther und Chloroform lösen es ebenfalls. Gelbe Salpetersäure färbt augenblicklich indigblau, wenn man einen Tropfen darauf bringt;¹ die Färbung verschwindet von selbst, nach einigen Secunden. Concentrirte Schwefelsäure löst zur dunkelsaftgrünen Flüssigkeit vor beständigerer Färbung. Jodhaltige Jodkaliumlösung erzeugt nichts; Chlorwasser und ebenso schwefelige Säure wirken langsam bleichend. Concentrirte Salzsäure macht missfärbig violett. Verdünnte Schwefelsäure unter Zusatz von ein wenig Braunstein oder chlorsaurem, oder chromsaurem Kali bewirkt keine auffällige Erscheinung.

Das Spectrum der weingeistigen Lösung gibt, mit Sonnenlicht gemacht, einen breiten Streifen von 75—90 meiner Scala; er schliesst *F* ein. Das Vitellolutein gibt ein völlig davon verschiedenes Spectrum.

Sehr auffallend ist die Lichtempfindlichkeit des Vitellorubins. Seine Lösungen und die trockene Magnesiumverbindung halten zwar ziemlich lange aus, ohne dass man eine Veränderung sieht; aber in dünnen Schichten, oder wenn Papierstreifen mit der Lösung getränkt werden, tritt bald Bleichung ein. Ich habe von der Magnesiumverbindung in Schwefelkohlenstoff gelöst und die purpurrothe Lösung in mehreren Porzellanschiffchen eintrocknen lassen. Das eine blieb am Fenster bloss mit einer Glasschale bedeckt stehen, das zweite kam in ein Glasrohr, das mit Kohlen-

¹ Die Magnesiumverbindung gibt genau die gleiche Reaction.

säure gefüllt, an einem Ende verschlossen, am anderen aber mit einem geöffneten Kipp'schen Apparate verbunden wurde, so dass keine Luft eindringen konnte, und wurde ebenfalls an das Fenster gestellt. Nach zwei Tagen war die Substanz im Luftschiffchen ganz blass, nur an einzelnen kleinen Stellen noch roth, nach wieder zwei Tagen war im Schiffchen gar nichts mehr zu sehen, wie ein weisser Hauch, während die Substanz des CO₂-Schiffchens noch die ursprüngliche dunkelrothe Farbe hatte. Dieses roth gebliebene Schiffchen wurde nun in eine Pappschachtel gelegt, also mit Luft zusammen, aber im Finstern aufbewahrt; nach drei Tagen, als die Schachtel wieder geöffnet wurde, war auch diese Substanz abgebleicht. Also findet Oxydation auch ohne Licht in völliger Dunkelheit statt.

Weisses Schreibpapier mit der chloroformigen Lösung getränkt, ist dunkelrosenroth; ein Streifen davon in's Sonnenlicht gelegt, ist schon nach 2—3 Stunden ganz weiss geworden, im zerstreuten Lichte dauert es etwa 1—2 Tage. Legt man eine ausgeschnittene Figur aus Papier auf das getränkte Papier, und dieses in die Sonne, so hat man nach ein paar Stunden ein Bild davon, natürlich ein vergängliches.

Vitelloluteïn.

Das Vitelloluteïn scheint noch schwieriger zu isoliren zu sein. Es ist von dem Vitellorubin vor Allem durch die Unfähigkeit unterschieden, sich mit Basen zu verbinden. Auf folgende Art, glaube ich, einigermassen der Reindarstellung nahegekommen zu sein. Das alkoholische Filtrat vom rothen durch Barytwasser erzeugten, das Vitellorubin einschliessenden Niederschlag wird nochmals mit etwas Barytwasser versetzt, der nun weisse Niederschlag entfernt und das Filtrat mit Petroleumäther geschüttelt. Der letztere nimmt einen Theil des gelben Farbstoffes auf und lässt beim Abdestilliren auch noch ziemlich viel Cholesterin; diese Portion wird entfernt, ebenso auch ein zweites Schüttelpetroleum. Schüttelt man dann von neuem, so geht nochmals gelber Farbstoff in Lösung, der dann beim Abdestilliren des Petroläthers als stark gelber Rückstand hinterbleibt, indem von Fett oder Cholesterin nichts mehr zu bemerken ist. Er löst sich mit Hinterlassung

einiger Flocken in Alkohol. Seine Lösungen sind rein und hellgelb, etwa wie die neutraler Alkalichromate. Sein Spectrum im Sonnenlichte betrachtet, ist völlig verschieden von dem des Vitellorubins. Es zeigt nämlich zwei deutliche, schmale Streifen von 80—90 und von 100—105, also den einen die *F*-Linie einschliessend, während der zweite gerade in der Mitte des Zwischenraumes von *F* und *G* liegt.

Gegen Salpetersäure und gegen concentrirte Schwefelsäure verhält sich dieses Pigment wie das Vitellorubin. Es ist ebenfalls stickstofffrei. Dadurch ergibt sich, dass beide Pigmente untereinander nahe verwandt sind, aber von dem Blutroth und den stickstoffreichen Gallenpigmenten principiell verschieden. Die im Eingange mir vorgelegte Frage ist sonach bis zu einem gewissen Grade beantwortet, und zwar wohl in einer Weise, die ganz unerwartet erscheint. Künftige Untersuchungen werden zeigen müssen, ob die Dotterpigmente eine stickstoffhaltige Gruppe aufnehmen, durch die sie zu dem werden können, was man physiologisch wohl von ihnen vermuthet: zu Blutroth, oder ob sie eine andere Bestimmung haben, und zur Hämoglobinbildung in keinem Zusammenhange stehen. Dies letztere wird auch noch dadurch wahrscheinlich, dass gerade die Crustaceen, die in ihrem Blute kein Hämoglobin enthalten, über eine so grosse Menge derselben Dotterpigmente verfügen, die auch im Wirbelthierei vorkommen.
