

Zur Kenntniss des Hämatoporphyrins und des Bilirubins

von

M. Nencki und A. Rotschy in Bern.

(Vorgelegt in der Sitzung am 21. Juni 1889.)

Die Raoult'sche Methode der Moleculargewichtsbestimmung ist eine wesentliche Bereicherung der chemischen Untersuchungsmethoden und ist geeignet, vermöge ihrer Einfachheit und Eleganz die bisher üblichen Dampfdichtebestimmungen zu ersetzen. Namentlich in der biologischen Chemie konnte man erwarten, dass sie von besonderem Nutzen sein wird, da die meisten Stoffe des Thier- und Pflanzenkörpers bei ihrer Zersetzbarkeit und hohem Moleculargewicht für die Dampfdichtebestimmung sich nicht eignen. Vor kurzem hat der Eine von uns, gemeinschaftlich mit N. Sieber¹ gezeigt, dass das Hämatoporphyrin nach der Formel $C_{16}H_{18}N_2O_3$ zusammengesetzt, und somit dem Bilirubin, falls die ältere Formel von Städeler der wahren Zusammensetzung entspricht, isomer ist. Maly, der sich viel mit Untersuchungen der Gallenfarbstoffe beschäftigte, hat auf Grund seiner Analysen des Tribrombilirubins, des Biliverdins, und des Urobilins die Städeler'sche Formel des Bilirubins verdoppelt und es ist kein Zweifel, dass aus der Formel $C_{32}H_{36}N_4O_6$ die Bildung der genannten Producte sich einfacher erklären lässt. Wir hofften die Frage der Isomerie des Hämatoporphyrins und des Bilirubins mittelst der Raoult'schen Methode entscheiden zu können. Zu dem Zwecke haben wir Hämatoporphyrin nach dem früher beschriebenen Verfahren dargestellt, mit der kleinen Abänderung, dass nach dem Eintragen der Häminkrystalle in den mit Bromwasserstoff gesättigten Eisessig die Flüssigkeit

¹ Diese Berichte, Bd. 97, Jahrg. 1888.

nicht sofort, sondern erst nach 24 Stunden auf dem Wasserbade erwärmt wurde. Das Hämin löst sich dann vollständig auf und es findet keine Verharzung statt. Aus dem zweimal umkrystallirten salzsauren Salze wurde durch Fällung mit essigsaurem Natron das freie Hämatoporphyrin dargestellt und im Vacuum getrocknet.

Das Bilirubin hatte Herr Professor Maly, der sich lebhaft für unsere Versuche interessirte, die Güte uns zu übersenden. Wir erhielten von ihm 3g amorphes, nach der Vorschrift von Städeler dargestelltes Bilirubin und 1g in völlig homogenen, rhombischen Prismen krystallisirtes Product, das vor dem Gebrauch bei 110° getrocknet wurde.

Die erhaltenen Zahlen und die daraus nach der Formel $M = \frac{T \cdot P \cdot 100}{E \cdot D}$ berechneten Moleculargewichte veranschaulicht folgende Zusammenstellung:

Substanz in	Grammen = P	Lösungs- mittel in	Grammen = C	Die Con- stante = T	De- pres- sion = D	Molecular- gewicht = M	
						ge- funden	berechnet
Hämatoporphyrin	0.4360	Eisessig	102.5	39	0.05°	331	f. $C_{16}H_{18}N_2O_9$ 286
"	0.0697	Phenol	16.7	76	0.14°	226	
"	0.0633	"	12.3	76	0.12°	325	
"	0.0700	"	14.2	76	0.13°	288	f. $C_{32}H_{36}N_4O_6$ 572
Bilirubin	0.0365	Ethylenbromid	98.7	118	0.03°	145.5	
"	0.0910	"	101.7	118	0.07°	150	
"	0.0210	Phenol	15.7	76	0.08°	127	
"	0.0552	"	15.7	76	0.07°	235	
"	0.0041	"	16.9	76	0.03°	61.4	
"	0.0583	"	16.9	76	0.09°	230	
"	0.0587	"	16.5	76	0.095°	286	
"	0.0168	"	15.6	76	0.06°	136.4	

Die Hauptschwierigkeit, der wir bei diesen Bestimmungen begegneten, lag in der geringen Löslichkeit der beiden Farbstoffe in den Lösungsmitteln, die hier in Betracht kommen konnten. Die Erniedrigung der Erstarrungspunkte betrug hier nicht Zehntel, sondern Hundertel eines Grades. Es erklärt sich deshalb, dass trotz der grössten Sorgfalt in der Ausführung, die z. B. für das Hämatoporphyrin gefundenen, Werthe zwischen 226 und 325 schwanken. Änderungen von $\pm 0.01^\circ$ T. geben für das Moleculargewicht eine Differenz von ∓ 30 . Temperaturdifferenzen zwischen dem Krystallisationsgefäss und der umgebenden Luft müssen auf das möglichste Minimum reducirt werden. Vergleichbar sind immerhin nur solche Erstarrungspunkte, die absolut unter gleichen Bedingungen erhalten wurden. Die angewendeten Lösungsmittel waren nicht von gleichem Werthe. Bei Eisessig und Phenol muss der Apparat wegen der hygroskopischen Eigenschaften der beiden Körper möglichst luftdicht schliessen. Da es in unserem Fall nothwendig war, den Erstarrungspunkt genau auf ein Hundertel zu bestimmen, so war es öfters 20 mal und mehr nöthig die Bestimmung auszuführen, um fünf bis sechs identische Zahlen zu erhalten. Lösungsmittel dagegen, wie Ethylenbromid oder Benzol krystallisiren stets bis auf 0.01° T. genau gleich. Trotzdem ist Phenol für die Raoult'sche Methode von besonderem Werthe, vor Allem wegen seines grossen Auflösungsvermögens, sodann wegen seines Schmelzpunktes und der Leichtigkeit, es in chemisch reinem Zustande billig zu erhalten. Mit dem kleinen Apparate von Beckmann und Eykman¹ erhält man schon mit etwa 15g Phenol und entsprechend kleiner Menge Substanz ganz gut stimmende Zahlen.

In Ethylenbromid, Benzol und Nitrobenzol ist das Hämatoporphyrin nur spurenweise löslich. Viel leichter in Eisessig, doch begegneten wir hier dem Übelstande, dass das Hämatoporphyrin durch dieses Lösungsmittel chemisch verändert wird. Wir bemerkten nämlich, dass die eisessigsäure Lösung des Farbstoffes, die uns zur Bestimmung des Moleculargewichtes diente, nach einigen Tagen sich trübte und einen geringen Bodensatz absetzte. Genauere Untersuchung ergab, dass dieser Bodensatz

¹ Zeitsch. f. physik. Chemie, Bd. II, H. 12, 1888, S. 964.

aus braunrothen, rhombischen, sehr kleinen Krystallen bestand, welche unter dem Mikroskope, ähnlich dem zuerst von Virchow in Blutextravasaten gefundenen Hämatoidin waren. Die Krystalle hatten aber alle Eigenschaften des bis jetzt nur in amorphem Zustande bekannten Anhydrid des Hämatoporphyrins, das durch Auflösen von Hämin oder Hämatin in concentrirter Schwefelsäure entsteht und nach den früheren Analysen nach der Formel $C_{32}H_{34}N_4O_5$ zusammengesetzt ist. Sie waren nur spurenweise in Alkohol und verdünnter Salzsäure löslich, leicht löslich dagegen in Alkalien. Die Lösungen spektroskopisch untersucht, zeigten die Absorptionsbänder des Hämatoporphyrins. In Eisessig gelöstes und in zugeschmolzenen Röhren aufbewahrtes Hämatoporphyrin verwandelt sich allmählig in diese Krystalle, die wir so in grösserer Menge darzustellen, und zu analysiren beabsichtigen. Wahrscheinlich ist das in Eisessig etwas zu hoch gefundene Moleculargewicht — 331 statt 286 — durch die Bildung des Anhydrids bedingt. Die in Phenol erhaltenen Zahlen liegen innerhalb ziemlich weiter Grenzen, immerhin geht doch aus denselben sicher hervor, dass die einfache Formel $C_{16}H_{18}N_2O_3$ und nicht die verdoppelte $C_{32}H_{36}N_4O_6$ dem Hämatoporphyrin zukommt.

Das Bilirubin ist in Benzol und Nitrobenzol nur wenig löslich. Eisessig war nicht anwendbar, da Bilirubin darin gelöst, sich an der Luft rasch oxydirt und grün färbt. Eine gesättigte Lösung des Farbstoffes in Ethylenbromid, die nicht einmal 0·1% davon enthielt, nämlich 0·091 g in 101·7 g des Lösungsmittels ergab uns die Zahl $M = 150$, also annähernd nur das halbe Moleculargewicht der einfachsten Formel $C_{16}H_{18}N_2O_3$. $M = 286$. Ebenfalls das halbe Moleculargewicht erhielten wir in einer noch verdünnteren Ethylenbromid- und etwa in 0·1% Phenollösungen. Ist die Phenollösung noch verdünnter, so werden noch niedrigere Zahlen erhalten. Eine gesättigte Lösung des Bilirubins in Phenol enthält etwa 0·4% des Farbstoffes und erst bei einem Gehalte von 0·3%—0·4%, entsprechend einem Molekül Bilirubin in tausend Molekülen Phenol gelöst, ergaben uns die Bestimmungen der Formel $C_{16}C_{18}N_2O_3$ entsprechende Werthe. Jedenfalls sprechen die mit dem Bilirubin erhaltenen Resultate zu Gunsten der einfachen Formel von Städeler $C_{16}H_{18}N_2O_3$. Wie man sieht, sind die nicht ganz scharfen Zahlen unserer Versuche durch die

Schwerlöslichkeit und leichte Zersetzbarkeit der beiden Farbstoffe bedingt; sie genügen aber, um zu entscheiden, ob die aus den Analysen abgeleitete einfachste Formel die richtige ist. Es ist zu erwarten, dass andere Substanzen des Thierkörpers, wie z. B. Cholesterin, Cholalsäure, Glykogen u. s. w., die beständiger und in den gebräuchlichen Lösungsmitteln leicht löslich sind, präcisere Resultate liefern werden.

Bekanntlich fand Maly, dass Bilirubin mit Natriumamalgam in Urobilin übergeführt wird. Ein ganz ähnlicher Farbstoff wird aus Hämatoporphyrin durch Einwirkung von Zinn und Salzsäure oder Eisen und Essigsäure erhalten. Wie jedoch die späteren Untersuchungen ergaben, ist das Urobilin aus Hämatoporphyrin mit dem Urobilin aus Bilirubin nicht identisch.¹ Abgesehen von verschiedenen Löslichkeitsverhältnissen, ist namentlich das Erstere viel weniger beständig. Die gleiche Umwandlung wie durch nascirenden Wasserstoff erleidet das Hämatoporphyrin theilweise im Organismus. Wir haben die früheren Versuche hierüber wiederholt und einem Kaninchen 2g der in Wasser löslichen Natronverbindung des Hämatoporphyrins subcutan injicirt. Der in den nächsten 24 Stunden mit Katheter entnommene alkalische Harn fluorescirte stark grün. Beim Stehen setzte sich daraus ein Sediment ab, das ausser den Kalksalzen noch kleine prismatische braunrothe Krystalle enthielt, die allem Anscheine nach Hämatoporphyrinnatron waren. Durch Ausziehen des angesäuerten Harnes mit Amylalkohol konnten wir daraus neben unverändertem Hämatoporphyrin auch das daraus entstandene Urobilin isoliren. Der Harn enthielt kein Eiweiss, wie überhaupt das Thier keine Intoxicationerscheinungen zeigte, und gesund blieb.

Beim Übergang von Urobilin in Harn in pathologischen Fällen haben wir demnach zu unterscheiden, ob dasselbe vom Gallen- oder Blutfarbstoff abstammt und dürfte das Urobilin des Harns nicht immer dasselbe sein. Die Annahme ist gerechtfertigt, dass in allen den Fällen, wo Blut im lebendigen Körper aus den Gefässen in das umgebende Gewebe austritt, also bei allen Hämorrhagien, das in den Harn übergehende Urobilin hämatogenen Ursprungs ist; während das im Harn bei Leber-

¹ Vgl. Nencki u. Sieber, Archiv f. exp. Path. u. Pharmak., Bd. 24, S. 443.

affectionen auftretende Urobilin aus dem Gallenfarbstoff entstehen dürfte. Um Urobilin im Harne oder pathologischen Flüssigkeiten nachzuweisen verfahren wir folgenderweise: 10 bis 20 cm^3 Harn werden mit einigen Tropfen Salzsäure angesäuert und mit 5 bis 10 cm^3 Amylalkohol gelinde geschüttelt. Starkes Schütteln ist nicht rathsam da sich sonst Schaum bildet von welchen die obere, amyalkoholische Schicht sich nur schwer trennt. Die klare amyalkoholische Schicht, die den Farbstoff enthält, wird abgegossen und spectroscopisch untersucht. Zur völligen Sicherheit wird die Lösung mit einigen Tropfen Chlorzinklösung versetzt (1 g $ZnCl_2$ in 100 g stark ammoniakhaltigen, absoluten Alkohol — die etwa eintretende Trübung wird durch Zusatz von Alkohol und Filtration entfernt —), worauf bei geringsten Spuren von Urobilin die schöne grüne Fluoressenz auftritt.
