

Über die Einwirkung von Jodlösungen auf Bilirubin und über eine quantitative Methode zur Bestimmung desselben im Harn

von

Dr. Adolf Jolles,

Docent am k. k. technologischen Gewerbemuseum in Wien.

(Vorgelegt in der Sitzung am 9. Februar 1899.)

Überschichtet man einen ikterischen Harn vorsichtig mit Salpetersäure, so tritt bekanntlich an der Berührungsstelle ein grüner Ring auf, dann in der nächstfolgenden tieferen Schicht Ringe von blauer, violetter, rother, brauner und gelber Farbe. Städeler, ferner Heynsius und Campbell (Pflüger's Archiv, Bd. IV, 497), Maly (Sitzungsberichte der kaiserl. Akademie der Wissenschaften in Wien, Bd. 57, Februar 1868) suchten die durch Einwirkung einer salpetrigen Säure oder Salpetersäure auf eine Chloroformlösung von Bilirubin entstehenden farbigen Körper — namentlich das grüne und blaue Product — festzuhalten, ohne dass es ihnen jedoch gelungen wäre, hinreichend charakteristische Körper darzustellen.

Später hat Maly (Sitzungsberichte der kaiserl. Akademie der Wissenschaften in Wien, Bd. 59) ein Verfahren angegeben, den blauen Körper, sowie das Endproduct, das sogenannte Choletelin, aus Bilirubin zu erhalten und zu fixiren. Das Verfahren bestand im Princip darin, dass er zu einer abgewogenen Menge Bilirubin, das in einer grösseren Menge Chloroform zum Theil gelöst, zum Theil vertheilt war, Bromwasser aus einer Gay-Lussac'schen Bürette tröpfeln liess, dann umschüttelte und die Farbenveränderungen notirte.

Gleichwie bei der Einwirkung von Salpetersäure auf Bilirubin entstanden auch bei der entsprechenden Einwirkung von

Brom auf Bilirubin zuerst das grüne Product, dann in der gleichen Reihenfolge das blaue, carmoisinrothe und endlich der heilbraune Körper, so dass Maly die Bromeinwirkung mit der so ähnlich verlaufenden der Salpetersäure identificirte und in beiden Fällen die farbigen Körper für Oxydationsproducte hielt.

In einer zweiten Arbeit, betitelt: »Über die Einwirkung von Brom auf Bilirubin« (Sitzungsberichte der kaiserl. Akademie der Wissenschaften in Wien, Bd. 72) gibt nun Maly bekannt, dass der bei der Bromeinwirkung entstehende blaue Körper eine an Brom sehr reiche Verbindung darstellt, und dass ferner das grüne Product kein Biliverdin, wie Maly früher geglaubt hat, sondern überhaupt keinen Abschluss einer Reaction darstellt.

Nach Maly verwandelt sich bei der Reaction zuerst ein Theil des Bilirubins in den blauen Körper, der dann mit dem noch unveränderten Bilirubin (das in Lösung goldgelb ist) die Mischfarbe grün gibt. Die Darstellung des blauen Körpers, welches Maly als ein Bromproduct des Bilirubins anspricht, geschieht wie folgt: Etwa 1 g Bilirubin wird mit Chloroform zerrieben, und dann eine verdünnte Lösung von Brom in demselben alkoholfreien Chloroform hinzugefügt. Man schüttelt häufig und lässt den Bromzusatz recht allmählig vor sich gehen. Nach und nach setzen sich an die ganze Innenwand des Kolbens schwarze Punkte ab, welche das bromreiche Substitutionsproduct darstellen. Maly gibt eine Reihe von Analysen dieses Körpers bekannt, bei welchem allerdings der stark schwankende Kohlenstoffgehalt — 35·51 bis 47·83 — auffällt. Nach Maly ist das blaue Product auf Grund der Analysen als ein Tribrombilirubin anzusprechen. — Vor dem Erscheinen der Maly'schen Arbeit hat L. W. Thudichum eine Arbeit publicirt (»Further Researches on Bilirubin and its Compounds«, Mai-Heft des »Journal of the Chem. Society«, 1872), in der er bekanntgibt, dass bei Einwirkung von Brom auf Bilirubin Bromproducte entstehen. Thudichum hat aber seinen Körper nicht analysirt, sondern nur aus der Gewichtszunahme, die Bilirubin beim Darüberleiten von Bromdampf erfährt, auf die Zusammensetzung geschlossen. Bei kürzerem Darüberleiten kam Thudichum zu einem in Alkohol mit blauer Farbe

löslichen Körper mit $35 \cdot 5\%$ Brom, der Monobrombilirubin sein soll.

Dies sind im Wesentlichen die Versuchsergebnisse, welche bezüglich der Einwirkung der Halogene auf Bilirubin vorliegen. Im Jahre 1894 habe ich nun in Pflüger's Archiv, Bd. LVII, S. 1—57 eine Abhandlung unter dem Titel: »Beiträge zur Kenntniss der Gallen und über eine quantitative Methode zur Bestimmung des Bilirubins in der menschlichen und thierischen Galle« veröffentlicht, in welcher ich u. A. den Nachweis erbracht habe, dass bei Einhaltung bestimmter Versuchsbedingungen Bilirubin quantitativ in einen grünen Farbstoff übergeführt wird, — welchen ich als Biliverdin angesprochen habe —, wobei auf 1 Molekül Bilirubin 2 Atome Jod verbraucht werden, so dass dieser Process ein Mittel an die Hand gibt, den Bilirubingehalt in den thierischen Gallen quantitativ zu bestimmen. In einer später von Thudichum erschienenen Arbeit¹ wird nun meine Angabe, dass bei der Einwirkung von Jodlösung auf gelöstes Bilirubin eine Oxydation vor sich gehe, bestritten, vielmehr könne es sich nach Thudichum einzig und allein um einen Substitutionsprocess handeln. Die vornehmlichste Stütze für seine diesbezügliche Behauptung bildet der Analogieschluss, dass, weil Brom auf Bilirubin substituierend wirke, dies auch zweifellos beim Jod der Fall sein müsse. Ist ein solcher Schluss gerade bei Jod und Brom schon im Allgemeinen nicht statthaft, so ist hier noch zu berücksichtigen, dass Jod in gelöster Form bei seiner Einwirkung auf gelöste organische Substanzen überhaupt nicht substituierend wirkt, zumal in einer so ausserordentlichen Verdünnung, worauf ja schon Kekulé zuerst ausführlich hingewiesen hat (Ann. 131, 122). Überdies hätte Thudichum schon aus dem von ihm selbst mit negativem Erfolge angestellten Versuche, durch Einwirkung von Joddampf auf Bilirubin — also unter den hiefür günstigsten Bedingungen — ein Jodsubstitutionsproduct analog dem Bromderivat zu erhalten, erkennen müssen, dass einerseits Jod ein ganz anderes Verhalten wie Brom zeige, und dass andererseits eine Jodirung durch Jod in gelöstem Zustande noch viel weniger zu erwarten wäre.

¹ Über die Reaction von Bilirubin mit Jod und Chloroform. Von J. L. W. Thudichum, Journal für prakt. Chemie, N. F. B. LIII (1896), S. 314.

Nachdem meine eingehende Erwiderung auf die Ausführungen Thudichum's demnächst im »Journal für praktische Chemie« erscheinen wird, glaube ich von einer weiteren Besprechung der Thudichum'schen Arbeit hier absehen zu können, und gestatte mir nachstehend die Ergebnisse einer grösseren Versuchsreihe, welche im Wesentlichen den Verlauf der Reaction bei der Einwirkung alkoholischer Jodlösung auf Bilirubin zum Gegenstand haben, bekanntzugeben.

Oxydationsversuche mit Bilirubin.

Behandelt man geringe, in Chloroform gelöste Bilirubinmengen mit verdünnter alkoholischer Jodlösung oder besser mit entsprechender Hübl'scher Jodlösung — welche bekanntlich ausser Jod noch Quecksilberchlorid enthält, — so resultiren, je nach der Menge des Oxydationsmittels, dieselben farbigen Producte, und zwar in gleicher Reihenfolge, wie bei der Behandlung von Bilirubin mit Salpetersäure. Einzelne von diesen Farben, wie das grüne und blaue Product, lassen sich bei der Lebhaftigkeit ihrer Farben genügend scharf abgrenzen. Das Endproduct, welches bei Einwirkung verdünnter alkoholischer Jodlösungen auf Bilirubin resultirt, hat in sehr verdünnten Lösungen eine gelbe, in concentrirteren Lösungen eine bräunlichgelbe Farbe mit einem Stich ins Röthliche.

Meine Versuche erstreckten sich zunächst in der Richtung, festzustellen, unter welchen Versuchsbedingungen die Einwirkung der alkoholischen Jodlösung auf Bilirubin glatt und in quantitativ messbarer Form vor sich gehe. Hiebei ergab sich im Wesentlichen zunächst, dass der Grad der Oxydation abhängig ist, einerseits von den Concentrationsverhältnissen der angewendeten Bilirubin- und Jodlösung und von der Zeitdauer der Einwirkung, andererseits auch davon, dass nur solche Lösungsmittel für Jod und Bilirubin angewendet werden, welche miteinander mischbar sind und dadurch eine unmittelbare innige Einwirkung der beiden Körper gestatten. Ich habe den Oxydationsprocess umso schärfer verfolgen können, in je verdünnterer Lösung ich die beiden Körper auf einander zur Einwirkung brachte, und um diesem Umstande gerecht zu werden, empfiehlt es sich daher, grössere Quantitäten nicht auf einmal

zu verarbeiten, sondern am besten etwa 20—50 mg Bilirubin in circa 50—80 cm^3 Chloroform zu lösen und auf die Lösung eine entsprechende Menge einer $\frac{1}{10}$ -alkoholischen Jodlösung einwirken zu lassen. Hierbei muss jedoch bemerkt werden, dass die $\frac{1}{10}$ -alkoholische Jodlösung allein in dieser Verdünnung die Oxydation des Bilirubins nur sehr träge vollführt und über die violette Oxydationsstufe hinaus dieselbe anscheinend nicht zu bewirken vermag, nachdem ich selbst nach mehrtägiger Einwirkung das Endoxydationsproduct nicht zu erhalten vermochte. Hingegen hat sich die $\frac{1}{10}$ Hübl'sche Jodlösung als ein ausgezeichnetes Oxydationsmittel bewährt, und zwar sowohl hinsichtlich der Raschheit des Oxydierens, als auch hinsichtlich des quantitativen Verlaufes der Reaction bis zum Endproducte. Von der Verwendung concentrirterer alkoholischer Jodlösungen statt verdünnter Hübl'scher Jodlösungen behufs Darstellung der Oxydationsproducte habe ich aus dem Grunde Abstand genommen, um nicht die als günstigst erkannten Versuchsbedingungen für den quantitativen Verlauf der Reaction wesentlich zu alteriren.

Nachstehend erlaube ich mir, einige Resultate tabellarisch anzuführen, welche zeigen, dass der Grad der Oxydation bei gleichen Bilirubinmengen abhängig ist von der Zeitdauer der Einwirkung, von der Mischbarkeit des Lösungsmittels der oxydierenden Substanzen mit dem Chloroform und von der Stärke des Oxydationsmittels. Die Versuche wurden gleichmässig in der Weise durchgeführt, dass die abgewogene Bilirubinmenge in 20 cm^3 Chloroform gelöst und mit 25 cm^3 der entsprechenden Jodlösung versetzt wurde. Gleichzeitig wurden 25 cm^3 Jodlösung für den Titer angesetzt, nach Verlauf der Reaction beide Lösungen mit genau eingestellter verdünnter Natriumthiosulfatlösung titirt, und aus der Differenz der Jod-, respective Sauerstoffverbrauch berechnet.

Art der Jodlösung	Angewandte Bilirubinmenge	Zeitdauer der Einwirkung	Verbrauchte Jodmenge	Entsprechend verbrauchte Sauerstoffmenge	Farbe des Oxydationsproductes
$n_{/100}$ -wässrige Jodlösung.	0·01 g	Sofort titirt	0·000528 g J	0 0000664 g O	gelb, schwacher Stich ins Grüne
$n_{/100}$ -alkohol.	0·01	»	0·003696 »	0·0004656 »	grüngelb
$n_{/100}$ Hübl'sche	0·01	»	0·025080 »	0·00316 »	safgrün
$n_{/10}$ -wässrige	0·01	»	0·00132 »	0·0001662 »	gelbgrün
$n_{/10}$ -alkohol.	0·01	»	0·00264 »	0·000332 »	grün, Stich ins Gelbe
$n_{/10}$ Hübl'sche	0·01	»	0·05280 »	0·006652 »	blaugrün, Stich ins Rothe
$n_{/100}$ -wässrige	0·01	Nach 5 ^m titirt	0·002432	0·000432 »	grüngelb
$n_{/100}$ -alkohol.	0·01	» 5 ^m »	0·007128 »	0·000898 »	grün mit schwachem Stich ins Gelbe
$n_{/100}$ Hübl'sche	0·01	» 5 ^m »	0·02930 »	0·003692 »	grün, Stich ins Blaue
$n_{/10}$ -wässrige	0·01	» 5 ^m »	0·00264 »	0·000332 »	grün, Stich ins Gelbe
$n_{/10}$ -alkohol.	0·01	» 5 ^m »	0·02112 »	0·00266 »	blau, Stich ins Violette
$n_{/10}$ Hübl'sche	0·01	» 5 ^m »	0·07128 »	0·00898 »	rothviolett.

Aus der verbrauchten Jodmenge ersehen wir, dass die wässrige Jodlösung auf Bilirubin *ceteris paribus* schwächer oxydierend wirkt, als die alkoholische, und dass die Hübl'sche Jodlösung rascher und stärker oxydirt, als die alkoholische Lösung.

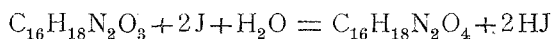
Diese Thatsache veranlasste mich, bei den nachfolgenden Versuchen als Oxydationsmittel stets eine entsprechend verdünnte Hübl'sche Jodlösung zu verwenden.

Das grüne Oxydationsproduct.

Biliverdin.

In meiner Arbeit über »Beiträge zur Kenntniss der Gallen und über eine quantitative Methode zur Bestimmung des Bilirubins in der menschlichen und thierischen Galle« (Archiv für die gesammte Physiologie, Bd. 57) habe ich bereits an der Hand zahlreicher Versuche nachgewiesen, dass Bilirubin sich quantitativ in eine grüne Verbindung überführen lasse, und zwar sind hiebei zur Oxydation des Bilirubins von der Formel $C_{32}H_{36}N_4O_6$ zwei Atome Sauerstoff, oder bei Zugrundelegung der einfachen Formel $C_{16}H_{18}N_2O_3$ ein Atom Sauerstoff erforderlich.

Um daher aus dem Bilirubin zu Biliverdin zu gelangen, sind nach der Gleichung

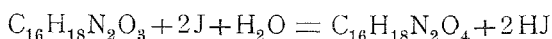


für ein Molekül Bilirubin ein Atom Sauerstoff erforderlich. Um nun den Nachweis zu erbringen, dass das bei der Einwirkung der Hübl'schen Jodlösung auf Bilirubin entstehende grüne Product weder ein Jodsubstitutions-, noch ein Jodadditionsproduct, sondern nur ein Oxydationsproduct, und zwar das Biliverdin, darstellt, habe ich unter möglichster Einhaltung der als günstigst erkannten Versuchsbedingungen eine genügende Menge des grünen Productes gewonnen, dasselbe analysirt und seine charakteristischen Eigenschaften identificirt, respective ergänzt.

Darstellung des Biliverdins.

Eine Reihe von Vorversuchen, die ich zum Zwecke der Reindarstellung des grünen Productes durchgeführt habe, haben ergeben, dass sich der Zusatz eines Überschusses von Jodlösung zu dem in Chloroform gelösten Bilirubin nicht empfiehlt

weil bei der nachfolgenden Entfernung des überschüssigen Jods mit Natriumthiosulfatlösung sich aus dem aus Thiosulfat gebildeten tetrathionsaurem Natron äusserst leicht Schwefel abscheidet, der in die Chloroformschicht übergeht und so das grüne Product verunreinigen muss. Ich habe daher die genau abgewogenen Bilirubinmengen in Chloroform gelöst und dann die äquivalente Menge Hübl'scher Jodlösung im Sinne der Gleichung



zugesezt, die Lösung kräftig geschüttelt und einige Zeit der Einwirkung überlassen. Um das resultirende grüne Product von der Jodwasserstoffsäure und dem Quecksilberchlorid, welches letzterer Körper bekanntlich ein Bestandtheil der Hübl'schen Jodlösung ist, zu reinigen, empfiehlt sich die wiederholte Ausschüttelung des grünen Productes mit sehr verdünnter Salzsäure. Reines Wasser ist schon aus dem Grunde nicht geeignet, weil das Biliverdin, welches sowohl in Äthylalkohol, als in alkoholhaltigem Chloroform leicht löslich ist, in die Waschflüssigkeit übergeht, indem das Wasser dem alkoholhaltigen Chloroform den Alkohol und gleichzeitig das Biliverdin entzieht, wodurch ein erheblicher Substanzverlust resultirt. Hingegen zeigte sich, dass bei Verwendung salzsäurehaltigen Wassers nur geringe Spuren des grünen Productes in die Waschflüssigkeit übergehen. Um nun von dem grünen Producte eine genügende Quantität für weitere Untersuchungen zu gewinnen, bin ich in der Weise vorgegangen, dass ich eine genau abgewogene Menge von Bilirubin, welche Quantität bei den diversen Versuchen zwischen 40—50 mg geschwankt hat, in 80—100 cm³ Chloroform — und zwar in einer mit einem Glasstöpsel gut verschliessbaren Flasche — gelöst und im Sinne der bereits angegebenen Gleichung die genau äquivalente Menge einer circa $\frac{n}{10}$ Hübl'scher Jodlösung hinzugefügt habe. Die Stärke der Thiosulfatlösung wurde mittelst Bichromatlösung festgestellt und auf diese bekannte Thiosulfatlösung die Hübl'sche Jodlösung eingestellt.

Nachdem der Titer Schwankungen unterworfen ist, habe ich es behufs grösserer Präcision für nothwendig erachtet, vor

jedem Versuche den Titer neu zu stellen. — Die Auflösung des Bilirubins in Chloroform geht etwas langsam vor sich und muss daher durch wiederholtes Schütteln beschleunigt werden. Nach erfolgtem Hinzufügen des Oxydationsmittels aus einer Bürette, wird die Lösung mehrmals kräftig geschüttelt und einige Zeit stehen gelassen. Ich habe in der Regel das entstandene grüne Product erst am nächstfolgenden Tage mit salzsäurehaltigem Wasser in einem geeigneten Schüttelcylinder ausgewaschen. Dies geschah in der Weise, dass ich nach jedesmaligem Hinzufügen von etwa 50 cm^3 des salzsäurehaltigen Wassers die Lösung kräftig geschüttelt und nach erfolgtem Absitzen der grünen Chloroformschicht letztere von der darüberstehenden wässerigen Flüssigkeit getrennt habe. Das Auswaschen der Chloroformlösung wurde so oft wiederholt, bis eine Probe der Waschflüssigkeit auf Zusatz von Kaliumnitrit und Stärke keine Spur einer Blaufärbung mehr zeigte. Nach diesem Vorgange, welcher im Wesentlichen den von mir als günstigst erkannten Versuchsbedingungen entspricht, habe ich eine Reihe von Oxydationsversuchen durchgeführt, die erhaltenen, mit salzsäurehaltigem Wasser ausgewaschenen grünen Chloroformlösungen vereinigt und dieselben durch ein mit Chloroform befeuchtetes Filter filtrirt. Nach Abdestilliren des grössten Theiles des Chloroforms, habe ich den übrigen Theil in einer flachen Schale unter vermindertem Druck zum Verdunsten gebracht.

Zur Analyse wurde das erhaltene grüne Product wiederholt in Alkohol gelöst, die Lösung eingeengt und schliesslich im Vacuum über Schwefelsäure bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Versuch Ia.

Zunächst war es von Interesse, festzustellen, ob das erhaltene grüne Product jodhaltig, respective ein Jodderivat sei. Zu diesem Zwecke wurde eine abgewogene Menge — genau 0.124 g — mit ausgeglühtem Ätzkalk innig vermennt, in der Verbrennungsröhre verbrannt und in bekannter Weise auf Jod geprüft. Es wurde keine Spur einer Jodreaction wahrgenommen.

Versuch I b.

Ein Controlversuch zu gleichem Zwecke nach der Methode von Carius ergab ebenfalls ein negatives Resultat.

Versuch II.

Trotzdem ich angesichts der geringen Substanzmengen, die mir zur Verfügung standen, von einer Gewinnung des grünen Productes in Krystallform absehen musste, habe ich dennoch keine Bedenken gehegt, die amorphe grüne Substanz mit Rücksicht auf ihre sorgfältige Reinigung und Darstellung, welche letztere durch die analytische Übereinstimmung der Oxydationsversuche gegeben war, der Elementaranalyse zu unterwerfen. Die Analyse des, wie angegeben, gereinigten grünen Farbstoffes ergab folgende Resultate:

- I. 0·1846 g Substanz bei 100° getrocknet lieferten 0·3928 g CO₂ und 0·0963 g H₂O.
- II. 0·1708 g Substanz bei 100° getrocknet lieferten 14·4 cm³ Stickstoff bei 728 mm B und 20° C.

In 100 Theilen:

	Berechnet für Biliverdin C ₁₆ H ₁₈ N ₂ O ₄	Gefunden
C	63·58	62·76
H	5·96	6·27
N	9·26	8·44

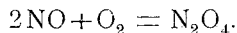
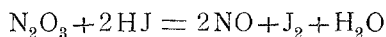
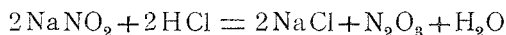
Versuch III.

Um noch einen weiteren Beweis zu erbringen, dass das Jod bei Einhaltung der von mir angegebenen Versuchsbedingungen nur als Oxydationsmittel wirkt, habe ich nachstehende Versuche durchgeführt.

Abgewogene Mengen von Bilirubin wurden in Chloroform gelöst, die — im Sinne der bereits wiederholt angeführten Gleichung — genau äquivalenten Mengen ⁿ/₁₀ Hübl'scher Jodlösung zugesetzt, wiederholt umgeschüttelt und einige Stunden der Einwirkung überlassen. Hierauf wurde das grüne Product

mit sehr verdünnter Salzsäure ausgeschüttelt, und zwar so lange, bis eine kleine Probe der ausgeschüttelten Flüssigkeit nach Zusatz von etwas Kaliumnitrit und Stärke keine Jodreaction ergab. Die gesammten Flüssigkeiten, welche zum Auswaschen der grünen alkoholhaltigen Chloroformlösung verwendet wurden, wurden vereinigt und mit einer dem zugesetzten Jod äquivalenten Menge einer verdünnten Lösung von salpetrigsaurem Natron versetzt. Der Titer dieser Lösung wurde mit Permanganat bestimmt. Nach erfolgtem öfteren Umschütteln wurde die Flüssigkeit bis zum nächstfolgenden Tage stehen gelassen, hierauf auf 500 cm^3 aufgefüllt und je 100 cm^3 nach Zusatz von Stärkelösung mit $\frac{n}{100}$ Natriumthiosulfatlösung möglichst rasch titirt. Das rasche Titriren ist aus dem Grunde erforderlich, weil das nach Zusatz der $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung entstehende Jodnatrium durch die vorhandene salpetrige Säure, respective Untersalpetersäure nach mehreren Minuten Stehen zu Jod reducirt wird.

Der Process verläuft bekanntlich nach folgenden Gleichungen:



Das entstehende Stickoxydgas oxydirt sich sofort zu Untersalpetersäure, respective Stickstofftetroxyd, welches das nach Zusatz der $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung entstehende Jodnatrium unter Abscheidung von Jod wieder reducirt. Nach unseren zahlreichen Vergleichsversuchen kann man nach erfolgtem Zusatz genau äquivalenter Mengen salpetrigsauren Natrons die Titration sehr gut zu Ende führen, da bis zum Eintritt der zweiten Reaction einige Minuten erforderlich sind, und das Ende der Reaction sehr leicht zu erkennen ist.

Mehrere in beschriebener Weise angestellte Versuche haben zweifellos ergeben, dass die alkoholische Jodlösung nur oxydirend unter Bildung von Jodwasserstoff einwirke, und dass daher thatsächlich die gesammte zugesetzte Jodmenge in der zur Reinigung des Biliverdins verwendeten Ausschüttelflüssigkeit nachgewiesen werden konnte:

Ich gestatte mir, nachstehend eine Beleganalyse in extenso anzuführen:

0·0257 g Bilirubin wurden in 40 cm^3 Chloroform gelöst und hiezu 2·57 cm^3 einer $\frac{n}{10}$ Hübl'schen Jodlösung zugesetzt. Diese 2·57 cm^3 Jodlösung enthalten 0·022734 g Jod.

Nun wurden circa 1 g Natriumnitrit in 500 cm^3 Wasser gelöst, 50 cm^3 dieser Lösung mit verdünnter Schwefelsäure angesäuert, mit einem Überschuss einer circa $\frac{n}{10}$ Kaliumpermanganatlösung versetzt und der Überschuss von Permanganat mit einer Lösung von Mohr'schem Doppelsalz zurücktitirt.

Eisentiter: 1 cm^3 $KMnO_4 = 0\cdot006152$ g Fe,

50 cm^3 der Eisenlösung = 42·58 cm^3 $KMnO_4$ -Lösung.

50 cm^3 $NaNO_2$ -Lösung = 40·02 cm^3 $KMnO_4$ -Lösung minus
15·3 cm^3 der Eisenlösung,

15·3 cm^3 der Eisenlösung = 13·03 cm^3 $KMnO_4$ -Lösung.

Somit wurden für 50 cm^3 der $NaNO_2$ -Lösung

40·02—13·03 = 26·99 cm^3 $KMnO_4$ -Lösung

verbraucht. Rechnet man den Eisentiter auf N_2O_3 um, so muss man den Eisentiter mit $\frac{38}{112}$ multipliciren, somit ist

1 cm^3 $KMnO_4$ -Lösung = 0·0020874 g N_2O_3 .

26·99 cm^3 $KMnO_4$ -Lösung = 0·056339 g N_2O_3 = 50 $NaNO_2$ -
Lösung, demnach

1 cm^3 $NaNO_2$ -Lösung = 0·001337 g N_2O_3 .

Nun sind 1 Molekül $N_2O_3 = 2$ Atomen Jod oder:

76 : 253 = x : 0·022734,

x = 0·006829 g N_2O_3 ,

1 cm^3 $NaNO_2$ -Lösung = 0·001327 g N_2O_3 .

Somit sind 5·15 cm^3 dieser eingestellten $NaNO_2$ -Lösung hinzuzusetzen. Ich habe nun zu der gesammten ausgeschüttelten Flüssigkeit 5·2 cm^3 der $NaNO_2$ -Lösung hinzugefügt, hierauf öfters umgeschüttelt, bis zum nächstfolgenden Tage stehen

gelassen, auf 500 cm^3 aufgefüllt und je 100 cm^3 ohne Zusatz von Jodkalium mit einer $\frac{n}{100}\text{ Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung titriert. Es wurden bei drei aufeinanderfolgenden Titrationen genau je $6\cdot 1\text{ cm}^3$ der $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung verbraucht.

$$1\text{ cm}^3\text{ der Na}_2\text{S}_2\text{O}_3\text{-Lösung} = 0\cdot 0008639\text{ g Jod,}$$

also

$$6\cdot 1\text{ cm}^3\text{ der Na}_2\text{S}_2\text{O}_3\text{-Lösung} = 0\cdot 005269\text{ g Jod in }100\text{ cm}^3\text{ der Lösung,}$$

$$\text{demnach in }500\text{ cm}^3 = 0\cdot 02635\text{ g Jod;}$$

$$\text{thatsächlich wurden zugesetzt} = 0\cdot 02273\text{ g Jod.}$$

Es ist somit die gesammte zugesetzte Jodmenge in der Waschflüssigkeit vorhanden. Das geringe Plus an Jod, welches gefunden wurde, ist nur darauf zurückzuführen, dass $0\cdot 05\text{ cm}^3$ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung mehr zugesetzt wurden, als theoretisch berechnet wurde, und dass man überdies mit kleinen Titrationsfehlern rechnen muss, welche Umstände vereint diese Differenz ergeben.

Fünf weitere in gleicher Weise durchgeführte Controlbestimmungen haben dasselbe Ergebniss geliefert.

Eigenschaften des Biliverdins.

Das nach dem angegebenen Verfahren dargestellte Biliverdin stellt ein amorphes, grünes Product von metallischem Glanze dar. Es stimmt mit dem nach Maly's Verfahren¹ (I. Oxydation des in alkalischer Lösung befindlichen Bilirubins durch den Sauerstoff der Luft; II. Hinzufügen von Bleisuperoxyd zu dem in alkalischer Lösung befindlichen Bilirubin, bis eine Probe mit Säuren eine grüne Fällung ergibt) dargestellten Biliverdin insofern überein, als es unlöslich ist in Wasser, Äther, Benzol, etwas schwer löslich in Chloroform, dagegen leicht löslich in alkoholhaltigem Chloroform, in Methylalkohol, Äthylalkohol und Eisessig. Es ist ferner löslich in mit Mineralsäuren schwach angesäuertem Alkohol, wobei die alkoholischen Lösungen, namentlich bei Gegenwart von Säuren, blaugrün

¹ Ann. 175, 82.

erscheinen, während die Lösungen in Alkalien eine bräunlich-gelbgrüne Farbe zeigen, welche beim längeren Stehen an Intensität wesentlich abnehmen. Weiters zeigte die alkoholische Lösung des Biliverdins auf Zusatz einer ammoniakalischen Zinkchloridlösung (1 g $ZnCl_2$ wurden in 100 g Alkohol, dem etwas Ammoniak zugesetzt wird, gelöst) eine grüne Fluorescenz, und zwar erscheint die Lösung im durchfallenden Lichte grün, im darauffallenden Lichte rothbraun. Wird eine geringe Menge des Biliverdins in Schwefelsäure oder salzsäurehaltigem Alkohol gelöst und diese Lösung mit reinem Zinkstaub versetzt, dann beobachtet man nach einiger Zeit eine Farbenveränderung, indem die saftgrüne Farbe zuerst in gelbgrün, dann in gelb übergeht. Löst man etwas Biliverdin in salzsäurehaltigem Alkohol in einem Reagensglase und lässt vorsichtig etwas Chlorwasser längs der Wandung herunterfließen, dann beobachtet man am Boden des Reagensglases einen blauen Ring, darüber Schichten von violetter, rother und gelber Farbe. Bei Mehrzusatz von Chlor erscheint die ganze Lösung gelb gefärbt und bei einem Überschuss von Chlorwasser farblos.

Auch Kaliumpermanganat und Wasserstoffsuperoxyd zeigen analoge Farbenercheinungen.

Aus den vorstehend angeführten Resultaten geht somit mit Sicherheit die Thatsache hervor, dass das durch Einwirkung der alkoholischen Jodlösung auf Bilirubin unter den angegebenen Versuchsbedingungen entstehende Product weder ein Jodsubstitutions-, noch ein Jodadditionsproduct, sondern nur ein Oxydationsproduct darstellt, und zwar ist dasselbe mit Rücksicht auf die Ergebnisse der Elementaranalyse, sowie der charakteristischen Eigenschaften des Körpers als Biliverdin anzusprechen.

Das Endproduct.

Bilixanthin.

Versetzt man gewogene, in Chloroform gelöste Bilirubinmengen mit einem Überschuss verdünnter Hübl'scher Jodlösung, dann resultirt nach mehrstündiger Einwirkung ein gelbes

Oxydationsproduct, welches in concentrirter Lösung eine gelbbraune Farbe mit einem Stich ins Röthliche besitzt. Dieses gelbe Product, welches bekanntlich auch im Verlaufe der Gmelin'schen Gallenfarbstoffreaction als letztes Oxydationsproduct auftritt, wird durch Oxydationsmittel von der Stärke der Jodlösung nicht weiter verändert, und stellt somit das Endproduct des Oxydationsprocesses mit Jodlösung unter den angegebenen Verhältnissen dar.

Um die Grösse des Sauerstoffverbrauches festzustellen, wurden verschiedene, genau abgewogene Bilirubinmengen von etwa 20–40 *mg* in etwa 40 *cm*³, respective 50 *cm*³ Chloroform gelöst, zu den Lösungen ein Überschuss von circa $\frac{n}{10}$ Hübl'scher Jodlösung zugesetzt und circa 24 Stunden unter wiederholtem kräftigen Schütteln stehen gelassen. Alsdann wurde mittelst einer Thiosulfatlösung, die genau auf die Hübl'sche Jodlösung eingestellt war, nach vorherigem Zusatz von Jodkalium und Stärke zurücktitrirt und constatirt, wie viel Hübl'sche Jodlösung, respective wie viel Sauerstoff in Procenten zur Oxydation des Bilirubins bis zum Endproducte verbraucht wurden.

Versuch I: 0·0312 *g* Bilirubin wurden in 50 *cm*³ Chloroform gelöst und mit 10 *cm*³ Hübl'scher Jodlösung versetzt.

Titer: 1 *cm*³ $\frac{n}{10}$ Hübl'scher Jodlösung = 1·84 *cm*³ Thiosulfat,
1 *cm*³ Thiosulfatlösung = 0·000345 *g* Sauerstoff.

Am nächstfolgenden Tage wurden 4·05 *cm*³ Thiosulfat verbraucht; die Differenz beträgt 14·35 *cm*³ Thiosulfatlösung = 0·00485 *g* Sauerstoff.

Der Sauerstoffverbrauch beträgt somit in Procenten: 15·5. Sieben weitere Versuche ergaben folgende Ergebnisse:

		Sauerstoffverbrauch in Procenten	
Versuch	II	15·9	
»	III	15·2	
»	IV	16·0	titrirt nach 3tägigem Stehen.
»	V	15·7	
»	VI	16·9	
»	VII	16·1	titrirt nach 2tägigem Stehen.
»	VIII	17·8	

Aus diesen acht Versuchen resultirt im Mittel die Zahl $16 \cdot 1\%$ Sauerstoff; nach dem Ergebnisse der Titrationsversuche würde somit das Endproduct um 3 Atome Sauerstoff reicher sein als das Bilirubin.

Zur Darstellung des Endproductes wurden abgewogene Mengen von Bilirubin in Chloroform gelöst, eine 3 Atomen Sauerstoff äquivalente Menge Hübl'scher Jodlösung hinzugefügt und mehrere Tage unter wiederholtem kräftigen Umschütteln stehen gelassen. Hierauf wurde die Chloroformlösung in gleicher Weise, wie bereits bei der Darstellung des Biliverdins angegeben wurde, mit salzsäurehaltigem Wasser so lange ausgewaschen, bis in der Waschflüssigkeit nach Zusatz von Kaliumnitrit und Stärkelösung keine Spur einer Blaufärbung constatirt werden konnte. Die nach diesem Verfahren aus zahlreichen Versuchen resultirenden Chloroformlösungen wurden vereinigt, der grösste Theil des Chloroforms abdestillirt, und der übrige Theil in einer flachen Schale unter vermindertem Druck zum Verdunsten gebracht. Es hinterbleibt eine gelbbraune amorphe Masse von saurer Reaction.

Zur Analyse wurde ein Theil des erhaltenen Productes mehrmals in Chloroform gelöst, das Lösungsmittel verdunstet, und der Rückstand im Vacuum über Schwefelsäure bis zur Gewichtsconstanz getrocknet.

Auch bei diesem Producte musste ich aus Mangel an Material auf eine Gewinnung des Körpers in Krystallform Verzicht leisten, zumal dasselbe, nach einigen Vorversuchen zu schliessen, zum Krystallisiren keine Neigung zu haben schien. Nichtsdestoweniger glaubte ich an der Hand der analytisch durchgeführten Oxydation, sowie der sorgfältigen Reindarstellung und der charakteristischen Eigenschaften eine genügende Gewähr zu haben, dass es ein chemisches Individuum darstellt und habe diesen Körper der Elementaranalyse unterzogen.

Trotzdem schon aus den früheren Ergebnissen bei diesem Producte eine Jod-Substitution oder -Addition nicht zu erwarten war, habe ich es doch für angezeigt erachtet, die Abwesenheit von Jod exactest festzustellen.

0.1461 g wurden mit ausgeglühtem Ätzkalk innig vermengt, in der Verbrennungsröhre verbrannt und in bekannter

Weise auf Jod geprüft. Das Resultat war ein absolut negatives.

Elementaranalyse:

0·1908 g Substanz gaben 0·0525 g Wasser und 0·2210 g Kohlensäure.

0·1749 g Substanz gaben bei 18° C. und 736 mm Druck 13·3 cm³ Stickstoff.

In 100 Theilen:

	Gefunden	Berechnet für $C_{16}H_{18}N_2O_6$
Kohlenstoff	57·01	57·48
Wasserstoff	5·53	5·38
Stickstoff	8·68	8·38

Wenn auch die erhaltenen Zahlen nicht so stimmen, wie es wünschenswerth wäre, so darf man bei diesen geringen Differenzen dem Körper wohl die Zusammensetzung $C_{16}H_{18}N_2O_6$ zuerkennen.

Maly (Sitzungsberichte, Bd. 57, 1868), welcher durch Einwirkung von Salpetersäure auf Bilirubin ein Endoxydationsproduct von der Zusammensetzung $C_{15}H_{18}N_2O_6$ erhalten hat, legte diesem Körper den Namen »Choletelin« bei. Abgesehen nun davon, dass Maly's Endproduct von dem meinigen um 1 Atom Kohlenstoff differirt, kommt noch dazu, dass William Küster in einer vor Kurzem erschienenen sehr interessanten Abhandlung¹ gezeigt hat, dass das Biliverdinmolekül bei Einwirkung stärkerer Oxydationsmittel in der Wärme eine mit Oxydation verbundene Spaltung erleidet, und hiebei ein ätherlöslicher Körper von der empirischen Formel $C_8H_9NO_4$ resultirt. Es ist somit die Bezeichnung »Choletelin«, beziehungsweise »Endproduct« gewissermassen als Ausdruck für einen Oxydationsabschluss nicht glücklich gewählt, und ich erlaube mir daher, für den von mir gewonnenen Körper von der empirischen Zusammensetzung $C_{16}H_{18}N_2O_6$ die Bezeichnung »Bilixanthin« in Vorschlag zu bringen. Dies umsomehr, als es mir, wie ich an

¹ Zeitschrift für physiologische Chemie, Bd. 26, S. 190.

anderer Stelle zeigen werde, gelungen ist, aus normalen Harnen einen Farbstoff, »Uroxanthin« genannt, zu gewinnen, welcher nach seiner Zusammensetzung und seinen Eigenschaften zu schliessen, eine gewisse Verwandtschaft mit dem »Bilixanthin« zu haben scheint und vielleicht sich als identisch oder isomer erweisen dürfte. In welcher Form der Stickstoff im Bilixanthin enthalten ist, bleibt noch eine offene Frage; jedenfalls handelt es sich nicht um ein Säureamid, da nach Kochen mit Natronlauge keine Spur einer Ammoniakentwicklung beobachtet werden konnte.

Eigenschaften des Bilixanthins.

Das Bilixanthin ist löslich in Alkohol und Chloroform, zum grossen Theile löslich in Äther, ferner in Amylalkohol und unlöslich in Schwefelkohlenstoff. Von Salpetersäure, Salzsäure und Schwefelsäure wird es fast gar nicht gelöst, dagegen wird durch die Anwesenheit geringer Mengen von Mineralsäuren in Alkohol die Löslichkeit des Bilixanthins in demselben nicht beeinflusst. In kohlensauren und Ätzalkalien ist es zum grossen Theile löslich; die Feststellung der genauen Löslichkeitsverhältnisse, respective der Art des Rückstandes konnte wegen Mangel an Material nicht durchgeführt werden.

Wird etwas Bilixanthin in Alkohol gelöst, mit Salzsäure angesäuert und etwas Zinkpulver hinzugesetzt, dann tritt keine wahrnehmbare Veränderung auf; auch Schwefelwasserstoff bewirkt keine sichtliche Veränderung. Eine ammoniakalische Zinkchloridlösung ruft keine Fluorescenz hervor.

Quantitative Methode zur Bestimmung des Bilirubins im Harne mittelst alkoholischer Jodlösung.

Auf Grund der von mir bereits früher festgestellten Thatsache, dass Bilirubin bei Einhaltung bestimmter Versuchsbedingungen durch Einwirkung alkoholischer Jodlösung in einen grünen Farbstoff übergeführt wird, wobei auf 1 Molekül Bilirubin von der Zusammensetzung $C_{16}H_{18}N_2O_3$ 2 Atome Jod verbraucht werden, habe ich seinerzeit eine Methode zur annähernd quantitativen Gallenfarbstoffbestimmung im Harne in

Vorschlag gebracht.¹ Nachdem nunmehr der Verlauf des Processes als Oxydationsvorgang mit Sicherheit festgestellt erscheint, habe ich die Methodik der Bilirubinbestimmung im Harne einer exacteren Bearbeitung unterzogen und gestatte mir auf Grund zahlreicher Versuche nachstehende quantitative Methode für Harne zu empfehlen:

Es werden von gallenfarbstoffreichen Harnen 10 cm^3 , von gallenfarbstoffarmen Harnen 20 cm^3 genau abgemessen und in einen Schüttelcylinder von etwa 200 cm^3 Inhalt gebracht, der am Boden eine birnenförmige Gestalt und ein möglichst kurzes Ausflussrohr besitzt. Zu dem Harne setzt man 20 cm^3 Chloroform, 10 cm^3 10procentige Chlorbaryumlösung und 50 cm^3 Salzsäure (1:5) hinzu, und schüttelt das Ganze mehrere Minuten kräftig durch.² Nach erfolgtem Absitzenlassen lässt man 15 cm^3 von der Chloroformlösung in einen geachteten Schüttelcylinder (circa 25 cm Höhe und 3 cm Weite) abfließen. Da in dem kurzen Ausflussrohre einige Tropfen der Chloroformlösung zurückbleiben, empfiehlt es sich, den geschlossenen Schüttelcylinder umzudrehen und durch Öffnen des Hahnes die minimale Chloroformmenge in den Schüttelcylinder zurückfließen zu lassen. Hierauf bringt man weitere 15 cm^3 Chloroform in den Schüttelapparat, schüttelt kräftig durch, lässt absitzen und hierauf 12 cm^3 der Chloroformlösung in den Standcylinder abfließen. Nunmehr setzt man 10 cm^3 Chloroform von Neuem hinzu und nach erfolgtem Schütteln und Absetzenlassen lässt man 8 cm^3 der Chloroformlösung abfließen. Nach diesem Vorgange hat man die gesammte Gallenfarbstoffmenge aus der in Arbeit genommenen Harnmenge extrahirt. Da stets Spuren von Harn durch den mit dem Chloroform abgehenden Niederschlag mitgerissen werden, wodurch in Folge der Jodaufnahme des Harns unrichtige Ergebnisse resultiren würden, empfiehlt es sich, den Inhalt des Standcylinders mit circa 30 cm^3 Salzsäure (1:1) zweimal auszuwaschen. Dies geschieht in der Weise, dass man in den Cylinder 30 cm^3 Salzsäure bringt,

¹ Wiener medic. Wochenschrift, 20, 21, 1894.

² Der Salzsäurezusatz hat den Zweck, einerseits den Niederschlag zu verringern, anderseits die Lösung so zu verdünnen, dass mit dem Niederschlag erheblich weniger Harn mitgerissen wird.

wiederholt umrührt, absetzen lässt und nunmehr circa 25 cm^3 der über dem Niederschlage befindlichen fast klaren Flüssigkeit abpipettirt. Das Abpipettiren kann entweder in der Weise geschehen, dass man mittelst einer Pipette, die mit einem Stückchen Schlauch und Quetschhahn versehen ist, die über dem Niederschlage befindliche klare Flüssigkeit aufsaugt, hierauf den Quetschhahn schliesst, einige Minuten der Ruhe überlässt, wobei etwaige Spuren des aufgesaugten Niederschlages sich in der Ausflussöffnung der Pipette ansammeln, die man hierauf durch langsames Öffnen des Quetschhahnes ausfliessen lässt, oder man geht in der Weise vor, dass man die über dem Niederschlage befindliche Flüssigkeit mittelst einer Vorrichtung ähnlich jener bei einer Spritzflasche, leicht und bequem entfernt.

Diese Manipulation. — Zusatz von 30 cm^3 Salzsäure (1:1), Schütteln und Abpipettiren — wird noch einmal wiederholt¹ und dann der Inhalt des Standcylinders in eine Stöpselflasche gebracht, hierauf der Cylinder zweimal mit je 25 cm^3 Alkohol nachgewaschen — um den an den Glaswänden anhaftenden Niederschlag vollkommen zu entfernen — und diese Waschflüssigkeit der Hauptmenge zugefügt. Hierauf setzt man 10 cm^3 einer circa $n/_{100}$ Hübl'scher Jodlösung hinzu, schüttelt durch etwa 5 Minuten öfters durch, setzt dann etwa 5 cm^3 einer 10procentigen Jodkalilösung und 5 cm^3 einer frisch hergestellten Stärkelösung,² sowie etwa 100 cm^3 destillirtes Wasser hinzu, schüttelt einige Male kräftig durch und titirt mit circa $n/_{100}$ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung wieder zurück, bis die über dem Chloroform stehende rothbraune Flüssigkeit nach jeweiligem Zusatze von Natriumthiosulfat, Durchschütteln und Absitzenlassen vollkommen entfärbt erscheint. Gegen den Schluss der Titration

¹ Die salzsäurehaltigen Washwässer wurden wiederholt mit 10 cm^3 Chloroform ausgeschüttelt, das Chloroform in eine kleine Reagensflasche gebracht und mit $n/_{100}$ Hübl'scher Jodlösung oxydirt. Es wurde hierbei in keinem Falle mehr als eine einer 0.1 cm^3 circa $n/_{100}$ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung äquivalenten Jodmenge verbraucht, so dass durch das zweimalige Auswaschen mit Salzsäure fast gar kein Farbstoff entzogen wird.

² Durch den Zusatz der Stärke entsteht keine Blaufärbung, sondern eine rothbraune Färbung, die nach starkem Verdünnen mit Wasser in eine Blauviolett-Färbung übergeht, welche das Titiren wesentlich erleichtert.

giesst man, um den Endpunkt deutlich zu erkennen, je circa $2-3\text{ cm}^3$ von der nach dem Absitzen über dem Chloroform stehenden Flüssigkeit in zwei Eprouvetten, setzt zu der einen circa 0.3 cm^3 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung hinzu, schüttelt um und vergleicht die Färbungen in beiden Reagensgläsern. Erscheint die Flüssigkeit in der einen Eprouvette lichter gefärbt, so giesst man den Inhalt der Eprouvetten zurück, schüttelt um und wiederholt diesen Vorgang so oft, bis die Färbungen in den Reagensgläsern nach Zusatz einiger Tropfen $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung ganz gleich erscheinen.

Alsdann ist die Titration beendet.

Bei Einhaltung der angegebenen Bedingungen kann man die Titration ziemlich genau durchführen, und der Fehler beträgt höchstens 0.1 cm^3 einer $\frac{n}{100}$ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung. Die Methode erfordert zu ihrer Ausführung etwa $1-1\frac{1}{2}$ Stunden.

Versuche mit künstlich hergestellten Bilirubinarnen.

Versuchsreihe 1.

0.0228 g Bilirubin wurden in etwa 30 cm^3 einer 10procentigen Sodalösung gelöst und mit einem mit Sodalösung alkalisch gemachten normalen Harne (spec. Gewicht 1.0205 bei 15° C.) auf 200 cm^3 aufgefüllt. Von dieser Lösung (A) wurden verschiedene Quantitäten entnommen und der Gallenfarbstoffgehalt quantitativ bestimmt.

1. 10 cm^3 der Lösung A wurden in einen Scheidetrichter gebracht, 20 cm^3 Chloroform und 5 cm^3 einer 10procentigen Chlorbaryumlösung zugesetzt, ausgeschüttelt, 10 cm^3 des gelbgrüngefärbten Niederschlages in einen Messcylinder abgelassen, und diese Manipulation noch zweimal wiederholt. Der Inhalt des Messcylinders wurde in eine Reagensflasche gebracht, der Messcylinder mit Alkohol nachgespült, hierauf 10 cm^3 Salzsäure (1:3) zugesetzt und geschüttelt. Hierauf wurden 5 cm^3 einer circa $\frac{n}{100}$ Hübl'schen Jodlösung zugesetzt, 5 Minuten geschüttelt und nach Zusatz von circa 2 cm^3 einer 10procentigen Jodkaliumlösung und Stärke mit unterschwefligsaurem Natron (circa $\frac{n}{100}$) zurücktitriert. Die Titration ist beendet, sobald die über dem Chloroform befindliche Lösung farblos erscheint; das Chloroform selbst ist am Schlusse der Reaction zinnobergrün gefärbt.

10 cm^3 Harn enthalten 0·00114 g Bilirubin; hinzugefügt wurden

$$5 \text{ cm}^3 \text{ Jodlösung} = 8 \cdot 3 \text{ cm}^3 \text{ Na}_2\text{S}_2\text{O}_3\text{-Lösung,}$$

zurücktitriert

$$7 \cdot 1 \text{ cm}^3 \text{ Na}_2\text{S}_2\text{O}_3\text{-Lösung (Mittel aus 4 Titrationen);}$$

$$1 \text{ cm}^3 \text{ Na}_2\text{S}_2\text{O}_3\text{-Lösung} = 0 \cdot 0008639 \text{ g Jod.}$$

Es wurden verbraucht

$$1 \cdot 2 \text{ cm}^3 \text{ Na}_2\text{S}_2\text{O}_3\text{-Lösung} = 0 \cdot 001037 \text{ g Jod.}$$

$$\text{Bilirubin in Liter} \left\{ \begin{array}{l} \text{vorhanden} \dots 0 \cdot 114 \text{ g} \\ \text{gefunden} \dots \underline{0 \cdot 117} \text{ »} \end{array} \right.$$

Differenz $\dots 0 \cdot 003 \text{ g pro Liter.}$

2. 10 cm^3 Harn:

$$\text{Verbraucht} \dots \dots 1 \cdot 2 \text{ cm}^3 \text{ Na}_2\text{S}_2\text{O}_3\text{-Lösung} = 0 \cdot 001037 \text{ g Jod.}$$

$$\text{Bilirubin in Liter} \left\{ \begin{array}{l} \text{vorhanden} \dots 0 \cdot 114 \text{ g} \\ \text{gefunden} \dots \underline{0 \cdot 117} \text{ »} \end{array} \right.$$

Differenz $\dots 0 \cdot 003 \text{ g pro Liter.}$

3. 15 cm^3 Harn:

$$\text{Verbraucht} \dots \dots 1 \cdot 75 \text{ cm}^3 \text{ Na}_2\text{S}_2\text{O}_3\text{-Lösung} = 0 \cdot 001512 \text{ g Jod.}$$

$$\text{Bilirubin in Liter} \left\{ \begin{array}{l} \text{vorhanden} \dots 0 \cdot 114 \text{ g} \\ \text{gefunden} \dots \underline{0 \cdot 113} \text{ »} \end{array} \right.$$

Differenz $\dots 0 \cdot 001 \text{ g Bilirubin pro Liter.}$

4. 15 cm^3 Harn:

$$\text{Verbraucht} \dots \dots 1 \cdot 8 \text{ cm}^3 \text{ Na}_2\text{S}_2\text{O}_3\text{-Lösung} = 0 \cdot 001555 \text{ g Jod.}$$

$$\text{Bilirubin in Liter} \left\{ \begin{array}{l} \text{vorhanden} \dots 0 \cdot 114 \text{ g} \\ \text{gefunden} \dots \underline{0 \cdot 117} \text{ »} \end{array} \right.$$

Differenz $\dots 0 \cdot 003 \text{ g Bilirubin pro Liter.}$

5. 20 cm^3 Harn:

$$\text{Verbraucht} \dots \dots 2 \cdot 45 \text{ cm}^3 \text{ Na}_2\text{S}_2\text{O}_3\text{-Lösung} = 0 \cdot 002116 \text{ g Jod.}$$

$$\text{Bilirubin in Liter} \left\{ \begin{array}{l} \text{vorhanden} \dots 0 \cdot 114 \text{ g} \\ \text{gefunden} \dots \underline{0 \cdot 121} \text{ »} \end{array} \right.$$

Differenz $\dots 0 \cdot 007 \text{ g Bilirubin pro Liter.}$

6. 20 cm^3 Harn:

Verbraucht 2·4 cm^3 $Na_2S_2O_3$ -Lösung = 0·0020734 g Jod.

Bilirubin in Liter $\left\{ \begin{array}{l} \text{vorhanden} \dots 0\cdot114 \text{ g} \\ \text{gefunden} \dots \underline{0\cdot117} \text{ »} \end{array} \right.$
 Differenz 0·003 g Bilirubin pro Liter.

7. 30 cm^3 Harn:

Verbraucht 3·6 cm^3 $Na_2S_2O_3$ -Lösung = 0·00311 g Jod.

Bilirubin in Liter $\left\{ \begin{array}{l} \text{vorhanden} \dots 0\cdot114 \text{ g} \\ \text{gefunden} \dots \underline{0\cdot117} \text{ »} \end{array} \right.$
 Differenz 0·003 g Bilirubin pro Liter.

8. 30 cm^3 Harn:

Verbraucht 3·55 cm^3 $Na_2S_2O_3$ -Lösung = 0·003067 g Jod.

Bilirubin in Liter $\left\{ \begin{array}{l} \text{vorhanden} \dots 0\cdot114 \text{ g} \\ \text{gefunden} \dots \underline{0\cdot115} \text{ »} \end{array} \right.$
 Differenz 0·001 g Bilirubin pro Liter.

9. 40 cm^3 Harn:

Verbraucht 4·7 cm^3 $Na_2S_2O_3$ -Lösung = 0·00406 g Jod.

Bilirubin in Liter $\left\{ \begin{array}{l} \text{vorhanden} \dots 0\cdot114 \text{ g} \\ \text{gefunden} \dots \underline{0\cdot114} \text{ »} \end{array} \right.$
 Differenz 0·000 g Bilirubin pro Liter.

Versuchsreihe 2.

0·01 g Bilirubin wurden in 12 cm^3 10procentiger Soda-lösung gelöst und mit einem — vorher mit 10procentiger Soda-lösung alkalisch gemachten — sehr stark concentrirten Harne vom spec. Gew. 1·032 auf 100 cm^3 aufgefüllt.

Die Ergebnisse sind in nachstehender Tabelle zusammen-gestellt.

Angewandte Harnmenge	Bilirubin gefunden	Bilirubin pro Liter Harn		
		vorhanden	gefunden	Differenz pro Liter
10 <i>cm</i> ³	0·00109 <i>g</i>	0·100 <i>g</i>	0·109 <i>g</i>	0·009 <i>g</i>
10	0·00108	0·100	0·108	0·008
20	0·00212	0·100	0·106	0·006
20	0·00216	0·100	0·108	0·008
30	0·00318	0·100	0·106	0·006

Versuchsreihe 3.

Ictericer Harn. Spec. Gew. 1·024, enthaltend Albumin und Nucleoalbumin in Spuren, sonst keine pathologischen Elemente.

Der Gallenfarbstoff wurde in angegebener Weise extrahiert, 10 *cm*³ einer circa $\frac{n}{100}$ Hübl'schen Jodlösung hinzugefügt und mit Natriumthiosulfatlösung zurücktitriert.

Die Resultate sind in nachstehender Tabelle angeführt.

Angewandte Harnmenge	Bilirubin gefunden	Bilirubin pro Liter (gerechnet)	Differenz gegen das Mittel von 0·106
10 <i>cm</i> ³	0·00107 <i>g</i>	0·107 <i>g</i>	+0·001
10	0·00107	0·107	+0·001
20	0·00214	0·107	+0·001
20	0·00214	0·107	+0·001
30	0·00311	0·104	-0·002
30	0·00311	0·104	-0·002

Versuchsreihe 4.

Ictericer Harn. Spec. Gew. 1·032, enthaltend Traubenzucker 9 *g* pro Liter; Harnsäure in bedeutendem Überschuße 1·23 *g* pro Liter (Relation zwischen Harnsäure und Harnstoff 1:21·8); Indican stark vermehrt (Relation zwischen der gepaarten zur gesammten Schwefelsäure 1:7); Albumin in geringen Mengen 0·3 *g* pro Liter. — Der mikroskopische Befund ergab die Anwesenheit einzelner scharf contourirter hyaliner Cylinder.

Die Ergebnisse der Titration sind in nachstehender Tabelle verzeichnet.

Angewandte Harnmenge	Bilirubin gefunden	Bilirubin pro Liter (gerechnet)	Differenz gegen das Mittel von 0·258
10 <i>cm</i> ³	0·00248 <i>g</i>	0·248 <i>g</i>	−0·010
10	0·00262	0·262	+0·004
20	0·00531	0·265	+0·007
20	0·00515	0·256	−0·001

Fassen wir die analytischen Ergebnisse zusammen, so resultirt, dass die Methode ziemlich befriedigende Resultate liefert, und zwar ganz besonders bei nicht zu stark concentrirten Harnen. Jedoch bewegen sich auch in letzterem Falle die Differenzen in solchen Grenzen, dass die Methode zur quantitativen Bestimmung des Bilirubins in Harnen für klinische und physiologisch-chemische Zwecke als eine vollkommen geeignete bezeichnet werden kann.