

Über einen neuen Farbstoff in der Rindergalle

von

W. F. Loebisch und Assistent **Max Fischler**.

Aus dem Laboratorium für medizinische Chemie des Hofrates Prof.
W. F. Loebisch an der k. k. Universität in Innsbruck.

(Mit 4 Textfiguren.)

(Vorgelegt in der Sitzung am 5. März 1903.)

Bei Gelegenheit einer Untersuchung über die Zusammensetzung der Rindergalle haben wir einen bisher noch nicht beschriebenen krystallinischen Farbstoff der Rindergalle beobachtet und isoliert. Wird frische Rindergalle auf dem Wasserbade bis zum dicken Sirup eingeengt, hierauf mit Alkohol gefällt, filtriert, aus dem Filtrate der Alkohol abdestilliert, der nun bleibende Rückstand in Wasser gelöst und mit verdünnter Schwefelsäure angesäuert, hierauf mit Äther geschüttelt, so nimmt die ätherische Lösung eine bordeaux- bis dunkelkirschrote Färbung mit grünem Reflex an und zeigt bei der spektroskopischen Untersuchung drei scharfe Absorptionsstreifen, deren Lage im Spektrum später geschildert wird.

Wenn man aus der so gefärbten ätherischen Flüssigkeit den Äther abdestilliert, so stellt der Rückstand eine in der Kälte erstarrende fettige Masse dar, die in dünner Schichte grünlich, in dicker bläulichrot gefärbt ist, ähnlich faulendem Blute. Da die Masse zunächst den Eindruck eines Lipochroms machte, so wurde versucht, den Farbstoff von seinem Fettkomponenten durch Verseifung zu trennen. Die bezüglichen Versuche erzielten nicht das gewünschte Resultat, sie ergaben jedoch, daß der Farbstoff durch Alkalien sehr rasch verändert wird. Auch aus dem Niederschlage, welcher in der alkalischen Lösung des

ätherfreien Rückstandes mit Barytwasser erzeugt wurde, sowie aus dem in der ätherischen Lösung durch Bleiacetat entstandenen Niederschlage konnte der Farbstoff nicht gewonnen werden.

Weitere Versuche ergaben jedoch, daß, wenn man den dunkelkirschroten ätherischen Auszug mit Calciumchlorid entwässert, wobei sich dieses mit einer grünbraun gefärbten harzigen Masse, bestehend aus einem grünen Gallenfarbstoff, Gallensäuren und Fettsäuren, überzieht, und nachdem mit Calciumchlorid erschöpft wurde, von diesem die ätherische Lösung abfiltriert, aus dem Filtrate den Äther bis zur Hälfte oder zwei Dritteln abdestilliert; sich aus dem eingengten Rückstande nach Stunden und Tagen auf dem Boden und an den Wänden des Kolbens dunkelviolette krystallinische Schüppchen abscheiden. Diese Abscheidung war eine sehr allmähliche und kam erst nach mehrmaligem Einengen der Lösung zum Abschluß. Der auf dem Filter gesammelte Farbstoff löste sich in Äther, viel leichter in Chloroform, bestand unter dem Mikroskope aus dunkelvioletten Nadelchen, rhombischen Plättchen, vereinzelt grün gefärbten Nadeln; er wurde zur endgiltigen Reinigung im Soxhlet-Apparat, zur Entfernung der Fettsäuren mit Ligroin, zur Entfernung von Gallensäuren und etwaigem Biliverdin mit Alkohol vollständig erschöpft und hierauf aus Chloroform umkrystallisiert. Die so gereinigte Substanz krystallisiert beim Abkühlen der Chloroformlösung zum größten Teile aus.

Demnach konnte der neue Farbstoff aus jeder frischen Rindergalle — es wurden über 100 l verarbeitet — nach folgendem Verfahren in einigen Tagen in Krystallen erhalten werden. Frische Galle wird auf dem Wasserbade bis zum dicken Sirup eingedampft, der Rückstand mit Alkohol zu einem Brei angerührt und in kleinen Portionen in Alkohol eingetragen. Nach 8- bis 12stündigem Stehen wird die klare Flüssigkeit dekantiert und der Rückstand mit Alkohol gewaschen. Die vereinigten alkoholischen Auszüge werden vom Alkohol durch Destillation befreit und die letzten Reste des Alkohols auf dem Wasserbade verjagt. Der Rückstand wird nun in Wasser gelöst, mit verdünnter Schwefelsäure angesäuert und mit Äther

geschüttelt, solange dieser noch Farbstoff aufnimmt. Der ätherische Auszug wird über Calciumchlorid vollständig getrocknet, abfiltriert und aus dem Filtrate der Äther vollständig abdestilliert. Der nun bleibende Rückstand, eine braune fettglänzende krystallinische Masse, wird hierauf mit Ligroin, dann mit Alkohol erschöpft, es bleibt der Farbstoff zurück, der durch Umkrystallisieren aus heißem Chloroform in dunkelvioletten metallisch glänzenden Schüppchen rein erhalten wird.

Der Farbstoff, den wir wegen seiner dunkelvioletten, an das Blauviolett der Trauben und Pflaumen erinnernden Farbe als Bilipurpurin bezeichnen, ist im reinen Zustande leicht löslich in Chloroform, die Lösung reagiert neutral, unlöslich in Äther, Hexan, Benzol, Schwefelkohlenstoff und in kaltem Äthylalkohol; kaum löslich in heißem Methyl- und Äthylalkohol; in Aceton in der Kälte sehr wenig, leichter in der Wärme löslich; in kaltem Amylalkohol sehr wenig, in heißem leicht löslich, aus der heiß bereiteten Lösung scheidet sich beim Erkalten das Bilipurpurin in mikroskopischen, zu Büscheln vereinigten Nadeln aus; in fetten Ölen löst es sich in der Kälte kaum, in der Wärme reichlich, beim nachherigen Erkalten bleibt der Farbstoff in Lösung; auch in reinem geschmolzenen Phenol ist er löslich.

Sämtliche Lösungen des Bilipurpurins sind dichroitisch, sie erscheinen im durchfallenden Lichte dunkel rotviolett, im auffallenden dunkel saftgrün gefärbt; bei starken Verdünnungen sind die Lösungen im durchfallenden Lichte schwach bordeauxrot, im auffallenden gelbgrün.

Das Bilipurpurin ist in der Rindergalle nur in sehr geringer Menge vorhanden. Die analysenreine Substanz, die wir durch die Verarbeitung von 100 l Galle erhielten, wog 0·5 g. Angenommen, daß bei den zahlreichen Versuchen, den Farbstoff vom anhängenden Fett durch Verseifung oder durch Abscheidung mittelst Erdalkalien, Bleiacetat zu trennen, eine ebenso große Menge des Farbstoffes verloren ging, so entspräche der Gehalt der Rindergalle an Bilipurpurin 0·01 g pro Liter. Gelegentlich eines späteren Versuches, aus dem mucinhaltigen dunkelgrünen Rückstande, der nach der Extraktion der eingedampften Galle mit Alkohol bleibt, das Biliverdin

darzustellen, überzeugten wir uns, daß dieser Rückstand noch geringe Mengen Bilipurpurins enthielt, welche er an mit Salzsäure oder Schwefelsäure angesäuerten Alkohol abgab.

Das Bilipurpurin kann bis 330° C. ohne sichtbare Veränderung erhitzt werden; beim Erhitzen in der Flamme zersetzt es sich, wobei Geruch nach Pyridin auftritt; es ist nicht hygroskopisch und hält sich an der Luft unverändert.

Die Substanz hinterließ beim Verbrennen $0\cdot6\%$ Asche, in dieser war kein Eisen vorhanden, sie bestand zumeist aus Calciumphosphat.

Die im Exsikkator über Schwefelsäure getrocknete Substanz ergab bei der Verbrennung, auf aschefreie Substanz berechnet:

- I. $0\cdot1685$ g Substanz lieferten $0\cdot4275$ g Kohlensäure und $0\cdot0996$ g Wasser.
- II. $0\cdot0995$ g Substanz ergaben bei der Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl einen Verbrauch von $7\cdot4$ cm^3 einer $\frac{1}{10}$ Normalsäure, was $10\cdot41\%$ Stickstoff entspricht.

In 100 Teilen:

	Gefunden	Berechnet für $C_{32}H_{34}N_4O_5$
C	69·60	69·31
H	6·60	6·13
N	10·41	10·10

Bringt man diese Zahlen in Beziehung zu den bisher analysierten und gut charakterisierten Gallenfarbstoffen, so entsprechen sie in Anbetracht daß die schwer erhältliche Substanz nur die Benützung obiger kleinen Mengen für die Analyse ermöglichte, immerhin befriedigend der Zusammensetzung einer Substanz, welche aus einem Molekül Bilirubin durch Entziehung von einem Molekül Wasser entstanden gedacht wird, $C_{32}H_{36}N_4O_6 - H_2O = C_{32}H_{34}N_4O_5$ und demgemäß nach seiner elementaren Zusammensetzung als Anhydrid des Bilirubins erscheint.

Herr Prof. Dr. Alois Cathrein, Vorstand des mineralogischen und petrographischen Institutes der k. k. Universität

Innsbruck, hatte die Güte die krystallographische Untersuchung des Bilipurpurins vorzunehmen, und teilt hierüber folgendes mit:

»Die Bestimmung gestaltete sich sehr schwierig infolge der außerordentlichen Kleinheit der Kryställchen, deren größte nicht einmal $\frac{1}{10}$ mm erreichen. Wegen dieser winzigen Dimensionen war natürlich eine genauere stereometrische Messung der Krystallformen ausgeschlossen und mußte sich die Winkelmessung auf die Ebene des mikroskopischen Gesichtsfeldes beschränken. Auch hier erschwerte die notwendige Anwendung stärkerer Vergrößerung das Studium und vereitelte namentlich eingehendere optische Bestimmungen.

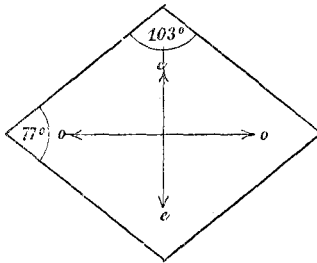


Fig. 1.

Die gewöhnlichsten Umrissse der Kryställchen sind Rhomben oder Rhomboide von 103° , beziehentlich 77° . Die Hauptgestaltungstypen sind einerseits mehr weniger gleichmäßige Rhomben (siehe Fig. 1), anderseits lange Rhomboide (siehe Fig. 2), welche, wie die Übereinstimmung der Winkel beweist, durch Streckung der Rhomben parallel einer Seite entstehen. Zwischen diesen beiden Figuren gibt es auch allmähliche Übergänge.

Die Krystalle sind deutlich doppelbrechend, jedoch ohne besonders lebhaft polarisationsfarben. Die optische Orientierung der Rhomben ist parallel den Diagonalen, so liegen die Elastizitätsachsen oder Schwingungsrichtungen des polarisierten Lichtes sowie die Absorptions-, beziehungsweise Farbenachsen. Alle diese optischen Richtungen sind durch das Pfeilkreuz in den Figuren angedeutet. Diese geometrische und physikalische

Konfiguration ließe sich mit dem rhombischen oder auch mit dem monoklinen Krystallsystem in Einklang bringen. Die Konstanz rhombischer Umrisse aber und ganz besonders die Erhaltung derselben Rhombenfigur in den gestreckten Krystallen, bei welchen sich dieser Umriß nicht mehr durch die Gleichgewichtslage wie bei den gleichmäßigen Rhomben ergibt, ferner die Konstanz der optischen Orientierung in allen Figuren begründet die Idee, daß die Kryställchen nicht einseitig, sondern allseitig, d. h. im ganzen von sechs Rhombenflächen begrenzt sind, daß sie also Rhomboeder sind und dem hexagonalen System angehören, womit auch das erwähnte optische Verhalten übereinstimmt.

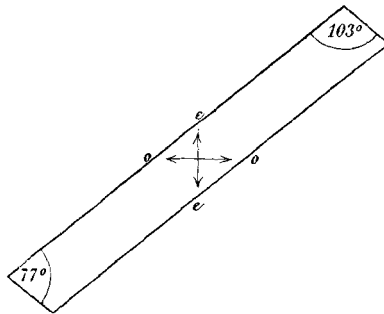


Fig. 2.

Nun entsteht eine neue Frage, deren Beantwortung nicht ohne Schwierigkeiten war. Es ist dies die Frage nach der Orientierung der Rhomben oder Rhomboeder. Welche Diagonale oder welcher Winkel ist gegen den Pol des Rhomboeders gekehrt? Zur Lösung dieses Problems führte die genauere Beobachtung der Umrisse der Rhomben. Dieselben sind monosymmetrisch nach der kürzeren Diagonale, welche durch den stumpfen Winkel von 103° geht, asymmetrisch hingegen nach der längeren horizontalen Diagonale, die den Winkel von 77° halbiert. Dies beweisen steile Flächenansätze über den spitzen Rhombenwinkeln, einseitige obere Abstumpfungen der stumpfen Rhombenwinkel, verschwommene Seitenflächen an Stelle der spitzen Rhombenwinkel. Damit ist nun aber die Aufstellung der Rhomboederchen, die Richtung ihrer Hauptachse und Neben-

achsen festgestellt. Es stellt also der *o*-Pfeil (vergleiche die Abbildungen) die Schwingungsrichtung des ordentlichen Strahles, der *e*-Pfeil die des extraordinären dar, jener zeigt die schwächste, letzterer die stärkste Absorption des Lichtes, die *oo* parallelen Schwingungen sind licht rötlichbraun, die *ee* parallelen hingegen dunkel schwarzviolett. Neben diesem kräftigen Dichroismus zeigen die Krystalle ebenso wie makro- auch mikroskopisch Fluoreszenz, indem die im durchfallenden Lichte rötlichgelben Rhomben im reflektierten Lichte lichtviolett, metallartig erscheinen.

Nach der Aufstellung des Rhombus und Rhomboeders konnte auch aus dem Rhomboederflächenwinkel 103° dessen Polkante zu $106^\circ 52'$ sowie das Achsenverhältnis $a : e = 1 : 0.8207$ berechnet werden unter der Voraussetzung, daß die

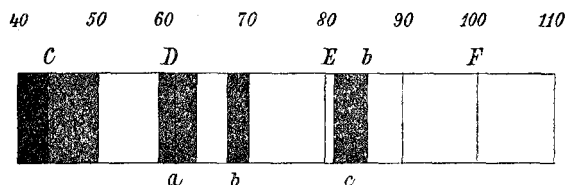


Fig. 3.

herrschende Krystallform eben das Grundrhomboeder $R \{100\}$ der untersuchten Substanz ist.«

Das spektroskopische Verhalten des in Chloroform gelösten Bilipurpurins wurde bei einer Einstellung der Skala in der Weise, daß die Natriumlinie *D* auf 60 fiel, im Glaskästchen mit planparallelen Wänden geprüft. Bei einer mittleren Konzentration der Lösung ist ein stärkerer Schatten im Rot des Spektrums von 40 unserer Skala bis zur *C*-Linie, auf welche eine schwächere, bei 50 scharf abschließende Absorption des roten Lichtes folgt, wahrnehmbar (siehe Fig. 3). Während sich bei stärkerer Verdünnung die eben geschilderte Absorption der roten Lichtstrahlen so weit abschwächt, daß sie sogar übersehen werden kann, sind die nun folgenden drei Absorptionsstreifen selbst bei sehr großen Verdünnungen vorhanden. Es sind dies ein breiterer, nicht ganz dunkler Streifen im Gelb *a* von 58 bis 63 und ein schmalerer, ganz dunkler Streifen im Anfang von

Grün *b* von 67 bis 70, schließlich ein dritter etwas blässerer Streifen als der erste, vom Anfang der zweiten Hälfte von Grün *c*, zwischen *E* und *b*, 81 bis 85 unserer Skala entsprechend. Bei stärkerer Konzentration der Lösung verbreitern und verdunkeln sich die eben geschilderten drei Absorptionsstreifen, so daß der Zwischenraum zwischen dem Absorptionsstreifen im Gelb und dem im Anfang von Grün sich immer mehr verengt, während zwischen beiden nur ein schmaler Streifen vom gelben Teil des Spektrums sichtbar bleibt.

Verhalten des Bilipurpurins gegen Säuren, Alkalien und Oxydationsmittel.

Versetzt man einige Kryställchen Bilipurpurin im Porzellanschälchen mit konzentrierter Schwefelsäure, so löst es sich in dieser mit prachtvoll grasgrüner Farbe, bei längerem Stehen wird die Lösung in dickerer Schichte taubengrau (blaugrau), in dünner Schichte saftgrün; bringt man die Lösung in eine Eprouvette, so erscheint sie hier im durchfallenden Lichte glänzend indigoblau, im auffallenden Lichte purpurrot. Im Spektrum sind nunmehr die Streifen *a* und *b* näher gegen das rote Ende gerückt, zugleich hat sich der Streifen *a* um die Hälfte gegen früher verschmälert und der Streifen *b* verbreitert, so daß zwischen beiden das Orange des farbigen Spektrums sichtbar wird. Der Streifen *c* ist nicht mehr vorhanden. Aus der Lösung in konzentrierter Schwefelsäure geht das Bilipurpurin in Chloroform, auch in Äther nicht über. Versetzt man die Lösung jedoch vorsichtig mit Wasser, so erhält man eine weiße feinflockige Ausscheidung, und schüttelt man jetzt mit Chloroform, so geht in dieses das Bilipurpurin unverändert über — am charakteristischen Spektrum leicht erkennbar. Fügt man zur Lösung von Bilipurpurin in konzentrierter Schwefelsäure Alkohol hinzu, so findet vollständige Mischung beider Flüssigkeiten statt, die entstandene Lösung ist im durchfallenden Lichte glänzend blauviolett, im auffallenden graublau.

Mit konzentrierter Salzsäure verrieben verhält sich Bilipurpurin in gleicher Weise; ebenso bei Behandlung mit reiner konzentrierter Salpetersäure; nur im letzteren Falle hat die

Lösung im Schälchen statt der grasgrünen Farbe eine blaugrüne mit einem gelblichen Stich; in der Epruvette zeigt diese sowohl im durchfallenden Lichte wie im reflektierten eine etwas hellere Nuance von Blau, beziehungsweise Purpurrot; nach längerem Stehen wird die salpetersaure Lösung grün ohne deutlichen Dichroismus. Durch verdünnte Schwefel-, Salz- oder Salpetersäure wird das Bilipurpurin nicht verändert.

Versetzt man reines Bilipurpurin im Porzellanschälchen mit zehnpromzentiger wässriger Kalilauge, so erscheint die Flüssigkeit selbst nach längerem Stehen nur schwach blaßgrün bis braungrün gefärbt. Filtriert man das Gemenge und wäscht am Filter den Rückstand mit Wasser nach, so läuft dieses bald farblos ab und der Rückstand am Filter besteht aus dem unveränderten Farbstoff. Die alkalische wässrige Lösung zeigt ein verändertes Absorptionsspektrum — einen breiten Streifen in Orange, einen linearen in der Mitte von Gelb und ein breites Band in Blau; doch blassen diese Streifen bei längerem Stehen der Lösung immer mehr bis zum vollständigen Verschwinden ab. Wird die alkalische Lösung des Farbstoffes rechtzeitig wieder mit Schwefelsäure angesäuert, so entsteht zunächst eine Ausscheidung von weißen Flöckchen, wird hierauf mit Chloroform geschüttelt, so geht in dieses der ursprüngliche Farbstoff — das Bilipurpurin, am Absorptionsspektrum leicht erkennbar — über, jedoch in geringerer Menge, als der ursprünglichen Probe entspricht.

Auch beim Eindampfen der wässrigen alkalischen Lösung des Bilipurpurins wird dieses nur sehr langsam zerstört, erst wenn die alkalische Lösung einige Zeit lang gekocht wurde, gibt sie nach dem Ansäuern an Chloroform kein Bilipurpurin mehr ab, sondern eine schwach gelbliche Substanz, die kein Absorptionsspektrum mehr zeigt und die wegen der geringen Menge an Material nicht weiter untersucht werden konnte; nur so viel konnte beobachtet werden, daß dieser Rückstand, der in Chloroform leicht löslich ist, weder Bilirubin noch Biliverdin darstellt.

Leichter wie von konzentrierter Kalilauge wird das Bilipurpurin von verdünnter (0·5 bis 1%) mit blaugrüner Farbe gelöst; aus seiner Lösung in Chloroform geht das Bilipurpurin

in verdünnte Kalilauge mit grüner Farbe über. Auch diesmal läßt sich durch neuerliches Ansäuern und Ausschütteln mit Chloroform unverändertes Bilipurpurin, abgesehen von jener Menge, die durch das Alkali zerstört wurde, wieder gewinnen.

In gleicher Weise wie Kalilauge verhalten sich auch Natronlauge und Ammoniaklösung; immerhin wird Bilipurpurin durch Ammoniak rascher verändert, auch leichter gelöst wie durch fixe Alkalien.

Es wird also Bilipurpurin durch konzentrierte wässrige Alkalien sehr schwer, durch verdünnte nur wenig leichter, überhaupt nur in geringer Menge, in der Wärme rascher wie in der Kälte gelöst; dabei wirken die Alkalien auf den gelösten Farbstoff in der Hitze rascher wie in der Kälte verändernd ein; doch kann das Bilipurpurin selbst nach tagelangem Stehen der alkalischen Lösung bei Zimmertemperatur durch Ansäuern und nachheriges Ausschütteln mit Chloroform unverändert, wenn auch in verringerter Menge wiedergewonnen werden.

Durch alkoholische Kalilauge wird das Bilipurpurin mit rotvioletter Farbe gelöst, die Lösung zeigt jetzt keinen Dichroismus, jedoch ebenfalls vier Absorptionsstreifen, von denen die ersten drei — der im Rot vor *C*, dann die Streifen *a* und *b* (siehe Fig. 3) — blässer und schmaler als die des neutralen Bilipurpurins, in Chloroform gelöst, erscheinen, während der vierte Streifen zwischen *Eb* des Spektrums in dreifacher Stärke der anderen gegen das Grün scharf begrenzt, gegen das violette Ende hin allmählich blässer werdend, auftritt. Säuert man diese Lösung mit Essigsäure an, so wird sie grün gefärbt und zeigt nur einen scharfen Absorptionsstreifen in der Mitte von Gelb. Versetzt man nun die essigsäure Lösung mit Chloroform und scheidet dieses durch Zusatz von Wasser ab, so wird die Chloroformlösung wieder violettrot gefärbt und zeigt das oben beschriebene Spektrum der alkalischen Lösung.

Wird eine Probe der Lösung des Bilipurpurins in alkoholischer Kalilauge mit verdünnter Schwefelsäure angesäuert, so wird die Lösung intensiv blaugrün und zeigt ein neues Spektrum, nämlich einen schmalen Absorptionsstreifen im Anfang von Orange und einen zweiten, dunkleren, breiten Streifen in der Mitte vom Gelb bis zum Anfang vom Grün.

Schüttelt man diese Lösung mit Chloroform, so färbt es sich smaragdgrün und zeigt das eben geschilderte Spektrum besonders scharf.

Bei der Behandlung des Bilipurpurins mit alkoholischer Kalilauge blieb stets ein grünlich gefärbter Rückstand, der sich erst nach längerer Einwirkung des Reagens zum Teil mit braungrüner Farbe, zum Teil erst nach Zusatz von Wasser mit gelbgrüner Farbe löste. Die Menge des Rückstandes schien uns relativ zu groß, um sie als Verunreinigung auffassen zu dürfen.

Versucht man die Oxydation des in Chloroform gelösten Bilipurpurins mit einer Lösung von Brom in Chloroform oder mit einer alkoholischen Bromlösung, so tritt von der Einwirkungsstelle eine grüne Färbung auf, die bald in Grünbraun übergeht, welche Färbung allmählich die ganze Probe annimmt und behält; die bekannten Farbenringe des Bilirubins bei der Ausführung der Gmelin'schen Probe in der angeführten Weise — grün, blau, violett, dunkelrot und weinrot — treten nicht auf. Unter der Einwirkung der Bromlösung verschwinden allmählich die Absorptionsstreifen des Bilipurpurins vom violetten gegen das rote Ende des Spektrums, sehr rasch der Streifen *c* in der Mitte von Grün, langsamer der Streifen *b* im Anfang von Grün, sehr lange bleibt der Streifen *a* in Gelb und zwar dunkler und breiter wie früher stehen; anderseits tritt ein dunkler breiter Streifen in Blau bei der Linie *F* des Spektrums auf. In gleicher Weise wie die Bromlösungen wirkt auch die salpetrige Säure hältige Salpetersäure.

Bringt man in die Lösung des Bilipurpurins in Chloroform Platinschwamm, so findet augenblicklich oxydative Wirkung statt, die rotviolette Farbe der Lösung geht allmählich in Grün über. Läßt man die Lösung freiwillig verdunsten, so bleibt ein amorpher Rückstand von grünbrauner Färbung zurück, der mit grüner Farbe in Chloroform leicht, in Alkohol nur schwer, in Äther nicht löslich ist. Die Lösungen zeigen bei der spektroskopischen Untersuchung keine Absorptionsstreifen.

Die Versuche, das Bilipurpurin in saurer oder alkalischer Lösung zu reduzieren, führten bisher zu keinem deutlichen Resultate und wir lassen die Beantwortung dieser Frage bis auf weiteres offen.

Wie auf S. 338 erwähnt, zeigt das von uns aus der Rindergalle isolierte Bilipurpurin eine elementare Zusammensetzung, welche der eines Anhydrids des Bilirubins entspricht; auch die Löslichkeit des Bilipurpurins in konzentrierten Mineralsäuren, dessen Schwerlöslichkeit in Alkalien, namentlich in konzentrierten spricht für dessen Auffassung als Anhydrid, jedoch waren die Versuche, Bilirubin in Bilipurpurin oder vice versa überzuführen, ohne Erfolg. Diese Tatsachen regen nun zur Frage an, ob das Bilipurpurin schon als solches in der nativen Galle enthalten ist oder ob es erst bei der Behandlung der Galle in der oben angegebenen Weise — Abdampfen, Behandeln mit Alkohol — aus einem bisher bekannten oder unbekanntem Gallenfarbstoff gleichsam als Kunstprodukt entsteht.

Kurze Zeit vor dem Abschluß unserer hier mitgeteilten Untersuchungen erfuhren wir durch den »Jahresbericht über die Fortschritte der Tierchemie« pro 1901, daß E. Pflüger in einer Arbeit »Fortgesetzte Untersuchungen über die Resorption der künstlich gefärbten Fette«¹ auf S. 39 über das Auffinden eines neuen roten Gallenfarbstoffes im ätherischen Extrakt der angesäuerten Galle berichtet, den er vorläufig Biliruboidin zu nennen vorschlägt. E. Pflüger beobachtete im roten ätherischen Extrakte drei Absorptionsstreifen, deren Lage im Spektrum sowie auch das Verhalten des roten Ätherextraktes beim Schütteln mit Kalilauge die Annahme gestatten, daß er dem von uns aus der Rindergalle zuerst dargestellten und analysierten Gallenfarbstoff in ätherischer Lösung schon vor uns begegnete. Da jedoch der von E. Pflüger beobachtete, durch seine Dunkelheit auffallende mittlere Streifen im Blaugrün liegt, der blässere Streifen in Gelb und Gelbgrün und das im größeren Abstände vom mittleren Absorptionsbande auftretende breite Band erst im Blau erscheint, so sind die von Pflüger beschriebenen Absorptionsstreifen zwar nach ihrer Reihe und Intensität denen des Bilipurpurins analog, jedoch nach ihrer Lage bedeutend gegen das violette Ende des Spektrums hin verschoben.

¹ Archiv für die gesamte Physiologie, 85. Bd., 1901, S. 1 bis 58.

Wir machten nun bezüglich des Auftretens von Bilipurpurin in der frischen, nicht eingedampften Galle folgende Erfahrung. Säuert man frische Galle mit verdünnter Schwefelsäure an und schüttelt hierauf mit Äther, so scheidet sich der Äther gelb gefärbt ab und es sind in der ätherischen Lösung zunächst keine Absorptionsstreifen wahrnehmbar; stellt man jedoch das ganze Reaktionsgemisch hin, so findet man nach 3 bis 4 Tagen die ätherische Lösung rot gefärbt und sie zeigt die charakteristischen Absorptionsstreifen des Bilipurpurins.

Es ist also das Eindampfen der Galle — wie sich auch schon aus der Beobachtung E. Pflüger's ergibt — keine notwendige Vorbedingung, damit das Bilipurpurin darin wahrnehmbar werde.

Es fragt sich, ob zu dem Behufe die Einwirkung der verdünnten Mineralsäure notwendig sei. Zur Beantwortung

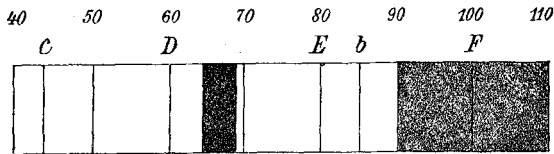


Fig. 4.

dieser Frage stehen uns bisher folgende Erfahrungen zu Gebote: Bringt man frische Galle ohne jede Verdünnung im planparallelen Kästchen von 12 *mm* Dicke vor das Spektroskop, so bemerkt man einen ziemlich breiten, blassen Streifen im Ende von Gelb bis Anfang Grün, 65 bis 69 unserer Skala ($D = 60$, siehe Fig. 4), ferner eine schwache totale Absorption des Lichtes von Blaugrün — 90 unserer Skala beginnend — gegen das violette Ende des Spektrums hin.

Das von uns in Fig. 4 abgebildete Spektrum der Galle verschwindet jedoch bei deren Fäulnis. Versetzt man aber die frische Galle mit Thymol, um sie vor Fäulnis zu schützen, so kann man, wenn sie nach 4 bis 8 Tagen spektroskopisch untersucht wird, die Absorptionsstreifen *a* und *b* des Bilipurpurins (siehe Fig. 3) — allerdings entsprechend dem geringen Gehalte an Farbstoff bedeutend abgeblaßt — mit zweifelloser

Sicherheit darin erkennen, hingegen ist der Absorptionsstreifen *c* des Bilipurpurins zwischen den Linien *Eb* des Spektrums nicht als scharf begrenzter Streifen vorhanden, sondern als Schatten, der in die totale Absorption des Lichtes im grünblauen bis zum violetten Ende des Spektrums übergeht. Diese schwach nach Thymol riechende Rindergalle, welche das beschriebene Spektrum zeigte, reagierte ebenso wie sämtliche Gallen, die wir in frischem Zustande untersucht haben, gegen Lackmus alkalisch.

Im alkoholischen Extrakte der Rindergalle beobachteten A. Heynsius und J. F. F. Campbell¹ gut charakterisierte Absorptionsstreifen, welche sie abbilden, einen dunklen Streifen im Rot zu beiden Seiten der Linie *B*, einen zweiten, wenig breiteren und weniger dunklen Streifen, dessen rechter Rand an die Linie *D* grenzt, und einen scharfen dunklen Streifen von 66 bis 68 der Skala ($D = 60$). Sie teilen mit, daß das schön grün gefärbte, alkoholische Extrakt der Rindergalle zuerst keine Absorptionsstreifen zeigte und daß sich diese erst nach längerem Stehen an der Luft entwickelte. Das Gleiche konnten wir erfahren; auch wir sahen die oben geschilderten Absorptionsstreifen, deren Lage mit den Angaben von Heynsius und Campbell so vollkommen übereinstimmte, daß wir auf eine bildliche Wiedergabe derselben unter Hinweis auf das Original verzichten durften.

Aber unsere Beobachtung ging noch einen Schritt weiter als die von Heynsius und Campbell. Als wir nach Verlauf von weiteren 8 Tagen das alkoholische Extrakt der Rindergalle wieder betrachteten, da war das eben beschriebene Spektrum völlig verschwunden, dafür war jetzt das Spektrum des Bilipurpurins deutlich vorhanden; zugleich hat sich das äußere Ansehen des alkoholischen Extraktes verändert, es war im durchfallenden Lichte (dünne Schichte) grün, im reflektierten (dicke Schichte) purpurviolett, ein Verhalten, wie es sehr stark verdünnte Lösungen von Bilipurpurin stets zeigen. Das alkoholo-

¹ Die Oxydationsprodukte der Gallenfarbstoffe und ihre Absorptionsstreifen. E. Pflüger's Archiv für die gesamte Physiologie, Jahrg. IV, 1871, S. 540.

lische Extrakt reagierte in unserem Falle so wie bei Heynsius und Campbell schwach alkalisch.

Es möge noch erwähnt werden, daß das Absorptionsspektrum, welches Heynsius und Campbell in der genannten Abhandlung, Taf. VII, 12, als das des »alkoholischen Extraktes von Fel tauri inspiss.« abbilden, nach der Lage der Streifen dem des Bilipurpurins viel näher steht als das des »alkoholischen Extraktes der Rindergalle«. Beide alkoholischen Auszüge unterscheiden sich voneinander in Bezug auf ihre Darstellung doch nur darin, daß der erstere von einer schon lange früher, der letztere von einer rezent eingedampften Galle herrührt.

Wir dürfen also als Ergebnis dieser Beobachtungen aussagen: 1. daß das Bilipurpurin im alkoholischen Extrakte der Rindergalle auch ohne Zusatz von Säure bei jenem Grade der Alkaleszenz, welcher aus der nativen Galle in den alkoholischen Auszug übergeht, sich bildet, 2. daß zur Bildung des Bilipurpurins im alkoholischen Extrakte der Galle bei Zimmertemperatur eine gewisse Zeit — 4, 8 bis 10 Tage — erforderlich ist, während welcher darin Absorptionsstreifen auftreten, die auf das Vorhandensein von Vorstufen des Bilipurpurins hinweisen. Eine Vorstufe des Bilipurpurins lassen auch die in der nativen, mit Thymol versetzten Rindergalle nach achttägigem Stehen vorhandenen Absorptionsstreifen (siehe S. 347) erkennen. Demnach würde sich das Bilipurpurin, analog vielen anderen organischen Farbstoffen, aus einem in der nativen Rindergalle vorkommenden Chromogen, wahrscheinlich durch Oxydation bilden.

Hier möge erwähnt werden, daß wir am Beginne der hier geschilderten Untersuchungen das Auftreten des Bilipurpurins in der Rindergalle auch nach Zusatz von Alkali und Wasserstoffhyperoxyd beobachtet haben; da jedoch auch in diesem Falle das Auftreten der Absorptionsstreifen erst nach 1 bis 2 Tagen erfolgte, haben wir diese Reaktion für die Gewinnung des Bilipurpurins nicht verwertet.

Frische Menschengalle auf das Vorkommen von Bilipurpurin oder eines diesem ähnlichen Gallenfarbstoffes zu untersuchen, hatten wir keine Gelegenheit. Heynsius und Campbell bilden jedoch in ihrer oben zitierten Arbeit (Taf. VII,

9 und 11) die von ihnen im alkoholischen Extrakte der Menschengalle, beziehungsweise auch in der Schweinegalle beobachteten Absorptionsstreifen ab, deren Lage im Spektrum immerhin die Annahme gestattet, daß auch aus diesen beiden Gallenarten dem Bilipurpurin analoge Gallenfarbstoffe isoliert werden könnten.

In genetischer Beziehung ließe sich vielleicht aus dem Dichroismus des Bilipurpurins mit dem nötigen Vorbehalt der Schluß ziehen, daß dieser Gallenfarbstoff dem Blutfarbstoffe, namentlich dem Hämatoporphyrin, näher steht als die bisher bekannten Gallenfarbstoffe.

Wir haben alles mitgeteilt, was wir durch Verarbeitung des aus 100 l frischer Rindergalle gewonnenen Bilipurpurins, nach Zurücklassung einiger Milligramme zum Zwecke der Demonstration des Präparates, erfahren haben. Wir behalten uns vor, an neuem Materiale die Lücken in der Kenntnis dieses so schwer erhältlichen Farbstoffes nach Möglichkeit auszufüllen.
