

losen oder kaum gelblichen Lösung giesst man nun einige Cubikcentimeter auf kleine Krystallbruchstücke von doppelt chromsaurem Kali. Reine Chininlösung umgibt die Krystalle in ihrer Farblosigkeit wohl eine Minute hindurch und dann erst bemerkt man die eintretende lösende Einwirkung. Bei Gegenwart von Strychnin werden dagegen sofort von den Krystallen ausgehende blaue, dann in Violett und Roth, endlich in Grün übergehende Striemen in der sanftbewegten Chininlösung auftreten. Zu dem übrigen Theile der Schwefelsäure-Chininlösung gibt man 4—5 Tropfen Silbernitratlösung und agitirt sanft. Bei Gegenwart von Morphin tritt sofort eine röthlichbraune bei sehr gelindem Anwärmen tief dunkelrothbraun werdende Färbung ein (unter Reduction des Silberoxyds). Es können zwar andere Substanzen, welche nicht Morphin sind, eine ähnliche Reaction hervorbringen; das Eintreten einer solchen verweist aber überhaupt auf die Verwerflichkeit des betreffenden Chinins. Bei dem Chininhydrochlorat entsteht ferner gleichzeitig eine weisse Abscheidung von Chlorsilber, dennoch bleibt die rothbraune oder violettbraune Färbung nicht aus, wenn Morphinsalz zugegen ist.

Zur Prüfung des *Balsamum peruvianum nigrum* auf eine Beimischung von Alkohol empfiehlt A. Gawalowski*) eine kleine Portion desselben in ein Reagensglas zu bringen, mit einer Lösung von saurem chromsaurem Kali und dann mit concentrirter Schwefelsäure zu versetzen. Die geringste Spur Alkohol gibt sich durch den sofort auftretenden charakteristischen Aldehydgeruch zu erkennen. Der ätherisch gewürzhafte Geruch des Balsams verdeckt und beeinträchtigt, nach den Angaben des Verfassers, die Reaction nicht im geringsten. Bei Versuchen mit reinem Balsam, dem absichtlich Alkohol zugesezt war, erhielt der Verfasser selbst bei Spuren dieser Verfälschung noch charakteristische Aldehydentwicklung.

2. Auf Physiologie und Pathologie bezügliche Methoden.

Von

C. Neubauer.

Ueber Choletelin und Hydrobilirubin. Der lange zwischen Heynsius, Campbell und Stokvis auf der einen und Maly auf

*) Pharm. Centralhalle 16, 265.

der anderen Seite über die Identität des Choletelins und Hydrobilirubins geführte Streit ist durch neue Untersuchungen von L. Liebermann*) endlich zu Gunsten der Maly'schen Ansicht entschieden worden.

Entsteht das Hydrobilirubin wirklich durch Spaltung des Bilirubins, wie zuletzt von Heynsius behauptet wurde, so muss neben dem Hydrobilirubin in der Lösung das zweite Spaltungsprodukt zu finden sein, wenn es nicht etwa gasförmig oder so flüchtig ist, dass es schon bei gewöhnlicher Temperatur entweicht. Gelingt es jedoch, die ganze oder annähernd ganze zur Hydrobilirubinbereitung verwendete Bilirubinmenge als Hydrobilirubin wieder zu erhalten, so ist, da die Moleculargewichte von Bilirubin und Hydrobilirubin nicht sehr verschieden sind und sich verhalten wie 572:592 (2 Mol. Bilirubin: 1 Mol. Hydrobilirubin) nachgewiesen, dass das Hydrobilirubin kein Spaltungsprodukt des Bilirubins sein kann, mithin aber auch, dass Choletelin und Hydrobilirubin nicht identische Körper sein können.

Liebermann schlug demnach folgenden Gang ein: 0,5175 Grm. getrocknetes reines Bilirubin wurden mit etwas Wasser in ein Kölbchen gebracht und mit frisch bereitetem flüssigem Natriumamalgam versetzt. Das Kölbchen wurde an einem warmen Orte längere Zeit (2 Tage) stehen gelassen, zeitweise auf dem Wasserbade gelinde erwärmt und mit dem Zusatze kleiner Portionen Natriumamalgam so lange fortgefahren, bis die Farbstofflösung nicht mehr lichter wurde. Hierauf goss man die Lösung vom Amalgam in ein Becherglas und spülte das Kölbchen mit Wasser aus. Die auf diese Weise gewonnene stark alkalische Hydrobilirubinlösung wurde so lange mit verdünnter Salzsäure versetzt, bis keine weitere flockige Ausscheidung mehr erfolgte. Der voluminöse Niederschlag (Hydrobilirubin) wurde hierauf auf ein früher getrocknetes und gewogenes Filter gebracht und so lange mit kaltem Wasser gewaschen, bis eine Probe des Filtrats keine Spur einer Chlorreaction mehr zeigte.

Der Niederschlag wurde hierauf getrocknet und gewogen und gab nach Abzug des Filters:

0,430 Grm. Hydrobilirubin

= 83 % der verwendeten Bilirubinmenge. Das Filtrat war stark gefärbt, es war also nicht aller Farbstoff durch HCl gefällt worden, was nicht überraschen kann, da im Filtrate NaCl war und wie schon Maly bemerkt, Neutralsalze die Löslichkeit des Hydrobilirubins für Wasser bedeutend erhöhen.

*) Archiv der Physiologie 11, 181.

Ueber die (für Hydrobilirubin) charakteristischen Reactionen, die dieses Filtrat zeigte, wird später berichtet. Vorerst handelte es sich darum, die Menge des gelöst gebliebenen Farbstoffs festzustellen. Zu diesem Zwecke wurde das Filtrat genau gemessen; es betrug 500 CC. und wurde in 2 Theile von je 250 CC. getheilt; aus dem einen wurde versucht den Farbstoff durch Schütteln mit Chloroform auszuziehen, was jedoch nicht gut gelang; hingegen gelang es in dem 2. Theile auf colorimetrischem Wege den Hydrobilirubingehalt festzustellen, wobei wie folgt verfahren wurde.

0,0265 Grm. von dem oben erwähnten mit HCl gefällten und gewogenen Hydrobilirubin wurden in etwas natronhaltigem Wasser gelöst und auf denselben Säuregrad wie das oben erwähnte Filtrat gebracht. Es war dies darum nothwendig, weil die alkalische Hydrobilirubinlösung, wie auch Jaffé und Maly angeben, eine ganz andere Farbe hat als die saure. Beim Ansäuern geschieht es jedoch, dass ein Theil des Hydrobilirubins wieder ausfällt. Man muss daher noch einmal einige Tropfen Natronlauge zusetzen und dann wieder mit HCl ansäuern, um eine klare Lösung zu erhalten. Dies hängt wahrscheinlich wieder mit der Löslichkeit des Hydrobilirubins in NaCl-haltigem Wasser zusammen. Nun wurde diese Lösung und das Filtrat vom gefällten Hydrobilirubin in zwei gleich weite und gleich hohe Glasylinder gebracht und die erstere (die Lösung des gewogenen Hydrobilirubins) so lange verdünnt, bis sie dieselbe Farbenintensität und dieselbe Nuance zeigte, wie das zu untersuchende Filtrat. Nachdem dies erreicht war, wurde die so verdünnte Hydrobilirubinlösung gemessen; sie betrug 210 CC. Da diese 210 CC. 0,0265 Grm. Hydrobilirubin enthielten und dieselbe Farbennuance zeigten wie das Filtrat, das 500 CC. betrug, so berechnen sich daraus 0,063 Grm. Hydrobilirubin nach der Formel:

$$x = \frac{0,0265 \times 500}{210} = 0,063.$$

Nun wurden zur Controle die zur colorimetrischen Bestimmung verwendeten 250 CC. Filtrat auf 1000 CC. gebracht, und die andere Lösung wieder so lange verdünnt, bis sie der ersteren vollkommen gleich war und nun wieder gemessen; ihre Menge betrug nun 850 CC., woraus sich für 500 CC. Filtrat (nun auf 2000 verdünnt) nach dem Ansatz

$$x = \frac{0,0265 \times 2000}{850} = 0,0622 \text{ Grm.}$$

Hydrobilirubin berechnen. Im Mittel also

0,0626 Grm. Hydrobilirubin.

Dies zur gefällten und gewogenen Menge Hydrobilirubin addirt gibt:

Gew. Hydrobilirubin = 0,4300

Colorimetr. bestimmtes = 0,0626

0,4926 Grm.

d. i. = 95,1 % der verwendeten Bilirubinmenge = 0,5175 Grm.

Bedenkt man nun, wie schwer es ist, eine solche complicirte Operation ohne Verlust zu Ende zu führen, so ist dieses Resultat ein vollständig befriedigendes, und beweist deutlich genug, dass das Hydrobilirubin kein Spaltungsprodukt des Bilirubins ist.

Die Eigenschaften des colorimetrisch bestimmten Filtrates sowohl, als auch der Fällung waren in jeder Beziehung diejenigen von Hydrobilirubin, nämlich:

1) Schönes Absorptionsband im Spectrum zwischen 146,48—160 (die Natronlinie auf 120 gestellt), also zwischen den Fraunhofer'schen Linien b—F.

2) Verschwinden des Bandes bei Zusatz von Ammoniak.

3) Wiedererscheinen des Bandes, jedoch in noch schärferer Weise, mit einer geringen Verrückung nach links (gegen roth) bei Zusatz von Chlorzink zu dieser ammoniakalischen Lösung.

4) Fluorescenz dieser mit Chlorzink versetzten ammoniakalischen Lösung.

5) Rosenrothe Färbung der verdünnten sauren Lösung.

6) Umschlagen von dunkelgelbroth oder roth in lichtgelb, beim Versetzen der sauren Lösung mit einem Alkali, und umgekehrt dunklere Färbung mit rothem Ton, beim Ansäuern der alkalischen Lösung.

7) Das Hydrobilirubin ist als trockenes Pulver dunkelbraun, wie Bleisuperoxyd.

Auch die Untersuchungen über Choletelin wurden in ähnlicher Weise vorgenommen. 0,355 Grm. getrocknetes Bilirubin wurden in Alkohol gelöst und in diese Lösung nach Maly salpetrige Säure eingeleitet. Die ursprünglich braune Farbe der Lösung ging sehr bald in ein gesättigtes Grün, dieses ganz wie es bei der Gmelin'schen Gallenfarbstoffreaction zu sehen ist, in ein dunkles Blau, dieses wieder in Violett über, und endlich war die Flüssigkeit durchwegs hellbraun und veränderte sich nicht weiter. Deutlich sieht man da wie das Bilirubin in Biliverdin, in

das blaue Oxyd etc. übergeht. Berücksichtigt man nun die Schnelligkeit mit der das geschieht (die ganze Reaction bis zur Entstehung des höchsten Oxydationsproduktes kann in 10 Minuten beendet sein), so begreift man sehr gut, wie differirende Meinungen über die Eigenschaften dieser Farbstoffe entstehen können, denn in keiner Phase der Reaction, mit Ausnahme der letzten, wo eben schon Alles in Choletelin verwandelt ist, hat man den einen oder andern Farbstoff rein, sondern immer im Verein mit niederen oder höheren Oxydationsprodukten.

Sobald nun die Farbstofflösung unverändert geblieben war, wurde sie mit Wasser versetzt, wodurch ein voluminöser, flockiger Niederschlag entstand; dieser wurde abfiltrirt, gewaschen, getrocknet, gewogen und gab

0,215 Grm. Choletelin.

Das Filtrat war auch hier gefärbt, es wurde also auch hier dieselbe colorimetrische Methode, wie beim Hydrobilirubin angewandt, mit Auflösen einer gewogenen Menge des gefällten Choletelins und sie ergab für das Filtrat einen Gehalt von

0,041 Grm. Choletelin.

Daher:	Gewogenes Choletelin	= 0,215
	Colorimetrisch bestimmt	= 0,041
		0,256 Grm. Choletelin

= 72,1 % des verwendeten Bilirubins.

Obwohl hier die Ausbeute der Berechnung nicht so nahe kam als beim Hydrobilirubin, so zeigt es sich doch, dass das Choletelin kein Nebenprodukt bei der Oxydation des Bilirubins sein kann, sondern das einzige Produkt dieser Reaction darstellt. Dass ferner das gewogene Choletelin und der im Filtrat noch gelöst vorhandene Farbstoff identisch waren, ergibt sich aus Folgendem. Beide zeigten, nachdem sie auf denselben Säuregrad gebracht und entsprechend verdünnt waren, genau dieselbe Farbennuance und ausserdem dieselben Reactionen und Eigenschaften, wie sie dem Choletelin zukommen.

1) Kein Absorptionsband, weder an der Stelle wo das des Hydrobilirubins sich befindet, noch anderswo im Spectrum, sondern eine Verdunklung, die ungefähr von der Stelle, wo das Band des Hydrobilirubins sich befindet, gegen Violett hin immer mehr zunimmt, so dass sogar in stark verdünnten Lösungen das Blau und Violett des Spectrums ganz ausgelöscht erscheinen. Diese Beobachtung stimmt vollkommen mit derjenigen Vierordts*), die ebenfalls hier ihren Platz finden mag.

*) Zeitschrift f. Biologie 10, 402.

«Von einer Verwechslung des Choletelinspectrums mit dem des Hydrobilirubins kann gar keine Rede sein; die spectrophotometrischen Unterschiede beider sind enorm.

a) In dem Choletelinspectrum fehlen Absorptionsbänder, während das Hydrobilirubinspectrum ein charakteristisches Band zwischen E 63 und F besitzt.

b) Hydrobilirubin absorbirt sämtliche Spectralfarben viel stärker als Choletelin (folgen Beispiele).

c) Die Form beider Absorptionscurven zeigt grosse Unterschiede; in der Hydrobilirubincurve, um mich auf die grösste Abweichung zu beschränken, nimmt die Absorption von F—G wieder ab, während sie in der Choletelincurve unaufhaltsam zunimmt.»

2) Die Choletelinlösung zeigt keine Fluorescenz beim Versetzen mit Chlorzink und Ammoniak, und auch kein Absorptionsband.

3) Keine rosenrothe Färbung der verdünnten sauern Lösung.

4) Die sauern Lösungen des Choletelins sind lichtgelb, und werden bei Zusatz eines Alkalis dunkler, bräunlich. (Bei Hydrobilirubin findet, wie oben bemerkt, das Gegentheil statt.)

5) Das Choletelin ist als trockenes Pulver lichtbräunlichgelb (ockergelb).

Verf. bemerkt, dass es ihm nach den obigen, an einem verhältnissmässig grossen Materiale ausgeführten Untersuchungen ganz unbegreiflich ist, wie Stokvis und Heynsius gerade das Gegentheil der in Nr. 1 und 2 angeführten Thatfachen finden konnten.

Für die vollständige Verschiedenheit beider Körper sprechen, ausser den so verschiedenen physikalischen und chemischen Eigenschaften, auch noch die Resultate der Elementaranalysen. Die Analysen von Maly*) ergaben in Procenten:

für Hydrobilirubin: C 64,64; H 6,93 (im Mittel)

« Choletelin: C 55,67; H 5,20

« « C 55,23; H 5,41.

Es ist zu bemerken, dass sich die analytischen Zahlen für Choletelin auf Substanzen verschiedener Bereitungsweise beziehen und untereinander gute Uebereinstimmung zeigen, und dass sie ferner gegenüber dem Hydrobilirubin eine Differenz von nahezu 10% C. aufweisen.

*) Jahresbericht f. Thierchemie für 1873, p. 201.

Obwohl die oben mitgetheilten Untersuchungsergebnisse vollkommen geeignet schienen, die vollständige Verschiedenheit von Choletelin und Hydrobilirubin schon auf Grund ihrer so differenten chemischen und optischen Eigenschaften zu beweisen, war es doch noch von Interesse eine Ueberführung des Choletelins in Hydrobilirubin, und wieder eine Ueberführung dieses in Choletelin zu versuchen, und zwar die erstere durch Reduction, die letztere durch Oxydation. Diese Ueberführung des Choletelins in Hydrobilirubin gelang vollständig und eine Ueberführung des Hydrobilirubins in Choletelin wird durch eine Reaction, die weiter unten beschrieben werden soll, sehr wahrscheinlich. Auch durch diese Reactionen, die auf theoretische Annahme gegründet, praktisch durchgeführt wurden, ist der unumstößliche Beweis für die Verschiedenheit der beiden Körper geliefert.

Bringt man nämlich etwas Choletelin in Pulverform mit Wasser und Natriumamalgam zusammen in ein Kölbchen, und lässt an einem warmen Orte längere Zeit (24 Stunden) stehen, so wird die früher dunkelbraune Lösung lichtgelb; untersucht man nun dieselbe, so stellt es sich heraus, dass alles Choletelin in Hydrobilirubin verwandelt wurde, denn diese Lösung gibt alle Reactionen, wie sie für Hydrobilirubin angegeben wurden. — Es gelingt noch durch eine andere Reaction sich von der Verschiedenheit der beiden Körper zu überzeugen.

Eine kleine Menge trocknen Hydrobilirubins wird mit einigen Tropfen conc. Schwefelsäure in einem Schälchen verrieben, wobei sich das Hydrobilirubin mit rothbrauner Farbe löst. Bringt man zu dieser Flüssigkeit ein kleines Körnchen Salpeter, so sieht man beim Hin- und Herneigen des Schälchens an dessen Wänden sehr bald intensiv grüne Streifen, die zwiebelroth, violett und bräunlichgelb werden, während an anderen Stellen noch grüne, rothe, violette Streifen sichtbar sind. Auf diese Weise wird die an der Wand des Schälchens haftende Flüssigkeit häufig wie marmorirt. Lässt man nun eine Zeit lang stehen, so wird die ganze Masse der Flüssigkeit violett und bei weiterem Zusatz von Salpeter dunkelgelb und bleibt weiter unverändert. — Untersucht man nun diese gelbe Flüssigkeit im Spectralapparat, so sieht man dieselbe Verdunklung in Blau und Violett, wie sie beim Choletelin beschrieben wurde.

Auch Bilirubin gibt diese Reaction, doch noch viel schöner und rascher als Hydrobilirubin, während das Choletelin, in derselben Weise behandelt, unverändert bleibt.