

# Untersuchungen über die Galle des Nilferdes.

Von

Olof Hammarsten.

(Der Redaktion zugegangen am 22. Juli 1911.)

Die Galle, welche von 2 Individuen stammte, wurde möglichst unmittelbar nach dem Erlegen der Tiere in Alkohol aufgesammelt, und es handelt sich also hier um ganz frische Galle von gesunden, wild lebenden Tieren.<sup>1)</sup> Die von dem aus «Gallenschleim» bestehenden Bodensatze abfiltrierte alkoholische Lösung hatte eine eigentümlich rötlich-grüne Farbe gleich einer alkoholischen Lösung von Schaf- oder Rindergalle, welche Cholehämatin enthält. Sie gab weder die Gmelinsche noch die Huppertsche Reaktion. Auch zu meiner Gallenfarbstoffprobe verhielt sich die Lösung negativ.

Die ziemlich konzentrierte Lösung zeigte bei spektroskopischer Untersuchung 4 Absorptionsstreifen, die sehr an diejenigen des Cholehämamins erinnerten, aber bezüglich sowohl der Lage wie der Stärke etwas von ihnen abwichen. Band I entsprach einer Wellenlänge gleich  $\lambda$  660—648, das viel dunklere Band II  $\lambda$  608—589, das schwache Band III  $\lambda$  577—554 und das noch schwächere Band IV einer Wellenlänge von  $\lambda$  536—523.

Allem Anscheine nach handelte es sich hier um ein Gemenge von mindestens 2 Farbstoffen. Nach der Ausfällung der gallensauren Alkalien mit Äther, spontaner Verdunstung des Äthers aus dem Filtrate und neuer Auflösung des Rückstandes zeigte nämlich diese Lösung eine schön rotviolette Farbe mit grünem Dichroismus. Die Lösung zeigte aber nur das Band II, aber viel schärfer und schöner als in der ursprünglichen Lösung.

<sup>1)</sup> Ich verdanke diese Galle der Güte des Herrn Intendenten, Dr. A. Jägerskiöld in Gothenburg, welcher während einer Forschungsreise in Afrika Gelegenheit hatte, zwei solche Tiere zu erlegen.

Der Rest der Farbstoffe war von den gallensauren Alkalien mit niedrigerissen worden und konnte infolge der Verarbeitung der letzteren für andere Zwecke nicht weiter untersucht werden.

Von der ursprünglichen alkoholischen Lösung wurde ein Teil für die quantitative Analyse aufbewahrt. Der Rest wurde eingetrocknet, in Alkohol gelöst und von dem Ungelösten abfiltriert. Das Filtrat wurde von neuem eingetrocknet; der Rückstand in absolutem Alkohol gelöst, von dem Ungelösten abfiltriert und mit Äther möglichst vollständig gefällt. Die gallensauren Alkalien krystallisierten ziemlich leicht in Büscheln und Ballen von feinen Nadeln von dem Aussehen der krystallisierten Rindergalle.

Die bei der Alkoholbehandlung erhaltenen unlöslichen Rückstände wurden vereinigt und weiter untersucht. Sie bestanden fast ganz aus wasserlöslichen Salzen mit nur wenig organischer Substanz. Die letztere enthielt keinen jecorin-ähnlichen Stoff. Sie war stickstoffhaltig, gab eine deutliche Biuretreaktion und entwickelte beim Verbrennen einen Geruch nach verbranntem Horn. Sie bestand also aus einer nur in sehr kleiner Menge vorhandenen Proteinsubstanz. Die Salze reagierten in wässriger Lösung alkalisch und es wurden in ihnen gefunden 30,31% Na; 10,56% K; 47,96% Cl und 5,37%  $H_2SO_4$ . Hierzu kamen noch Kohlensäure und Spuren von Phosphorsäure, die nicht bestimmt wurden.

Bei der quantitativen Analyse zeigte es sich, daß die Menge dieser in Alkohol unlöslichen Salze eine auffallend große war. Sie betrug nämlich 10,9% von der gesamten Menge der festen Stoffe dieser Galle.

Die in absolutem Alkohol löslichen Bestandteile wurden nach dem in früheren Aufsätzen beschriebenen Verfahren untersucht. Die Resultate waren folgende:

Für die Relation zwischen ätherfällbaren und durch Äther nichtfällbaren Stoffen wurden folgende Zahlen erhalten.

Durch Äther fällbar	95,42%
» » nichtfällbar	4,58%

Die Nilpferdgalle war also sehr arm an durch Äther nichtfällbaren Stoffen.

In den durch Äther gefällten Stoffen wurde der Gehalt an Schwefel und Phosphor bestimmt.

Der Gehalt an Schwefel war 1,84% und der an Phosphor 0,193%. Wird der Phosphor in Lecithin umgerechnet, so entspricht er einem Gehalte von 4,86% Lecithin.

Der Gehalt an Stickstoff (nach Kjeldahl bestimmt) war 2,87%, und der durch Ausfällung mit Äther erhaltene Niederschlag (von hauptsächlich gallensauren Salzen) enthielt also:

1,84 % S

2,87 % N

0,193% P.

Zur Prüfung auf etwa anwesende Ätherschwefelsäure wurde ein Teil der mit Äther gefällten Stoffe (1,045 g) mit Salzsäure von 25% mehrere Stunden gekocht und dann nach dem bei meiner Untersuchung der Menschengalle geübten Verfahren<sup>1)</sup> mit Baryumchlorid gefällt und weiter behandelt. Das Ergebnis war ein positives. Der Gehalt an Ätherschwefelsäureschwefel war 0,118%, also rund 6,4% von dem Gesamtschwefel.

Zieht man den Wert 0,118% Schwefel von dem Gesamtschwefel 1,84% ab und berechnet aus dem Reste, 1,722% Schwefel, den Gehalt an Taurocholat unter Anwendung des Koeffizienten (für gewöhnliches Taurocholat) 5,96, so erhält man 28,89% Natriumtaurocholat.

Die Nilpferdgalle enthält also eine allerdings nicht geringe Menge von Taurocholat, gehört aber jedenfalls, da die Menge der Seifen nur eine geringe ist (was schon aus dem Stickstoffgehalte 2,87% hervorgeht), zu den glykocholsäurereichen Gallen.

Mit diesem Ergebnisse der quantitativen Bestimmungen steht auch das Resultat der qualitativen Untersuchung in gutem Einklang.

Die Lösung der gallensauren Salze in Wasser, die — bei häufig bemerkt — einen stark bitteren Geschmack hatte, wurde nämlich reichlich gefällt von verdünnten Säuren, Bleizucker, Alaun, Kupfersulfat, wie auch von Calcium-, Baryum- und Magnesiumchlorid. Durch dieses letztgenannte Verhalten

<sup>1)</sup> Nova Acta Reg. Soc. Scient. Upsal. Ser. III, Bd. 16.

unterschied sich diese Galle von der Rindergalle, während sie hierdurch wie auch in anderer Hinsicht der Schweinegalle näher kam.

Bevor ich zu der näheren Beschreibung der gallensauren Salze übergehe, will ich den ätherlöslichen Stoffen der Galle einige Worte widmen.

Die nach möglichst vollständiger Ausfällung mit Äther in dem Alkoholäther in Lösung zurückgebliebenen Stoffe waren nicht vollständig löslich in Äther. Der in Äther nicht lösliche Teil bestand aus gallensauren Salzen. Die Menge der in reinem Äther löslichen Stoffe war nur eine kleine; aus sämtlichen verarbeiteten Gallenportionen wurden zusammen nur 0,756 g erhalten. Ein Teil derselben — gegen 0,2 g — wurde auf Phosphor geprüft. Es wurden nur nicht bestimmbare Spuren von solchem gefunden, und da folglich keine Phosphatide vorkamen, wurde zur Prüfung auf Cholesterin und zur Ermittlung der Art des Fettes mit alkoholischer Kalilauge verseift.

Der Nachweis von Cholesterin gelang jedoch nicht. Als Endprodukt wurde nur eine äußerst kleine Menge einer durchsichtigen, firnisähnlichen Masse erhalten. Die Fettsäuren lieferten ein in Äther zum allergrößten Teile lösliches Bleisalz, aus welchem Ölsäure ganz sicher zu erhalten war. Der in Äther nicht lösliche Teil des Bleisalzes wurde in das Natriumsalz übergeführt, und aus seiner Lösung in Wasser wurden die freien Fettsäuren mit Salzsäure ausgefällt. Die Fettsäuren lösten sich in siedendem Alkohol und schieden sich beim Erkalten krystallinisch aus. Infolge ihrer sehr geringfügigen Menge konnte nur eine Bestimmung des Schmelzpunktes versucht werden. Die ziemlich unzuverlässige Bestimmung ergab den Schmelzpunkt  $+ 55^{\circ}$  C. Als sicheres Hauptresultat konnte also nur festgestellt werden, daß die untersuchte Nilpferdgalle keine nachweisbare Menge von Cholesterin enthielt, und ferner, daß die in alkoholfreiem Äther löslichen Stoffe hauptsächlich aus Olein mit nur wenig festem Fett bestanden.

Ich kehre nun zu den gallensauren Salzen zurück. Die vorbereitende Untersuchung hatte gezeigt, daß hier ein Gemenge von ziemlich viel Taurocholat mit überwiegendem Glykocholat

vorlag, und ferner, daß das Glykocholat, wenigstens größtenteils, zu derjenigen Gruppe gehörte, welche von den löslichen Salzen der Erdalkalien gefällt wird. Eine Trennung des Glykocholates von dem Taurocholate mußte also, wenn möglich, bewirkt werden.

Da nach den an anderen Gallen gewonnenen Erfahrungen die fraktionierte Fällung mit Bleizucker, Eisensalz oder Alaun nicht zum Ziele führte, wurde eine Trennung mit Hilfe von Kupfersulfatlösung versucht.

Bei Zusatz von Kupfersulfatlösung entstand ein sehr reichlicher Niederschlag, der indessen nicht gut sich absetzte. Erst nach fast vollständiger Neutralisation des sauer gewordenen Gemenges mit  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  — wobei der Niederschlag sich noch etwas vermehrte —, schied er sich gut ab und war leicht abzufiltrieren. Das klare Filtrat wurde selbst nach vollständiger Neutralisation von mehr Kupfersalzlösung weder gefällt noch getrübt.

Es wurde also in dieser Weise erhalten: teils

- a) ein kupfersalzhaltiges Filtrat (Hauptfraktion 1) und teils
- b) eine Kupfersalzfällung (Hauptfraktion 2).

Das Filtrat a, welches also etwa vorhandenes Taurocholat enthalten mußte, wurde einige Zeit mit Natriumcarbonatlösung in mäßigem Überschuß digeriert und dann filtriert. Das kupferfreie Filtrat wurde eingetrocknet, der Rückstand mit absolutem Alkohol erschöpft, die Lösung abfiltriert, von neuem eingetrocknet, mit Alkohol behandelt, und dies wiederholt, bis alle fremden Salze entfernt worden waren.

Die so gewonnene Fraktion 1, welche sehr begierig Wasser aus der Luft aufnahm, löste sich äußerst leicht in Wasser, und diese Lösung wurde weder von verdünnter Säure noch von Bleiacetat, Kupfersulfat, Silbernitrat oder Baryumchlorid gefällt. Diese Fraktion verhielt sich also nicht wie eine Glykocholat-, sondern wie eine Taurocholatlösung.

Zur Ermittlung des S-Gehaltes wurde Fraktion 1 abwechselnd bei  $105^\circ \text{C}$ . und im Exsikkator bis zu konstantem Gewicht getrocknet, was viel Zeit erforderte infolge der hygroskopischen Beschaffenheit des Salzes. Der Gehalt an Schwefel war indessen nur 3,28%, und das Salz war also offenbar ein Gemenge von

überwiegendem Taurocholat, etwa 55%, mit Glykocholat und anderen Stoffen. Zu der weiteren Verarbeitung des Rückstandes dieser Fraktion 1 werde ich unten zurückkommen.

Die Kupfersalzfällung **b** (Hauptfraktion 2) wurde durch Digestion mit Natriumcarbonatlösung in der Wärme in das entsprechende Natriumsalz übergeführt und durch wiederholtes Auflösen in Alkohol nach Eintrocknen der Lösung gereinigt. Von diesem Salze, welches nicht besonders hygroskopisch war, wurde ein Teil in Wasser gelöst. Diese Lösung wurde reichlich gefällt von verdünnter Säure, von Bleizucker, Kupfersulfat, Silbernitrat, Ferrisalz, Alaun wie auch von Calcium-, Baryum- und Magnesiumchlorid. Sie verhielt sich also wie eine Lösung von Glykcholeinat.

Da diese qualitative Prüfung zeigte, daß die Lösung, wenn nicht vollständig so doch zum allergrößten Teile, mit  $\text{BaCl}_2$  gefällt werden konnte, wurde behufs weiterer Reinigung die ganze Lösung dieser Fraktion mit  $\text{BaCl}_2$  gefällt. Wie bei Verarbeitung der Lösung des gewöhnlichen Glykcholeinates löste sich hierbei die zuerst auftretende Fällung wieder, und erst nach Zusatz von überschüssigem Baryumsalz blieb sie bestehen. Der Niederschlag bestand aus feinen Tröpfchen, die erst nach 24 Stunden so vollständig sich abgesetzt hatten, daß die Flüssigkeit vollständig klar von dem öl- oder harzähnlichen Bodensatz sich abtrennen ließ. Dieser Bodensatz wurde mit Wasser durchgeknetet, um eingeschlossene Flüssigkeit zu entfernen, und dieses Washwasser mit der abgetrennten Flüssigkeit vereinigt.

Aus diesen vereinigten Flüssigkeiten wurde mit  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  das Alkalisalz wiedergewonnen und seine Lösung, bei passender Konzentration, mit neuem Baryumsalz gefällt. Die neue Flüssigkeit + Washwasser, in derselben Weise behandelt, gab eine neue Portion Baryumsalz, und dieses Verfahren wurde wiederholt, bis keine Baryumfällung mehr zu erhalten war. Das dabei erhaltene, letzte Filtrat gab nur eine sehr kleine Menge Substanz, die zusammen mit dem Rückstande aus dem kupfersalzhaltigen Filtrate **a** (Hauptfraktion 1) verarbeitet wurde.

Sämtliche, wie oben angegeben, erhaltene Baryumfällungen wurden vereinigt und aus ihnen das Natriumsalz dargestellt.

Obwohl man hier erwarten könnte, ein von Taurocholat befreites Salz vor sich zu haben, wurde eine Schwefelbestimmung gemacht. Diese Bestimmung ergab das unerwartete Resultat von einem Gehalte des Salzes an 1,513% S.

Da in diesem Salze keine Ätherschwefelsäureverbindung vorlag, bedeutet dies also, daß das mit Baryumchlorid gefällte Salz — wenn man den Schwefel in Taurocholat umrechnet — 25,4% Taurocholat gegen 28,89 in den ursprünglichen Rohgallensalzen enthielt.

Weder durch Fällung mit Kupfersulfat noch durch Fällung des daraus dargestellten Natriumsalzes mit Baryumchlorid gelang es mir also, die Glykocholsäuregruppe von der Taurocholsäuregruppe zu trennen. Besonders auffallend ist es aber, daß sogar die Baryumfällung so viel Schwefel enthielt, daß ihr Gehalt daran 25% Taurocholat entsprach, und da dies sehr an das Verhalten der Glykocholate der Schweinegalle erinnert, wurde diese Frage weiter verfolgt.

Zur Entfernung der schwefelhaltigen Substanz, die ich der Kürze halber als Taurocholsäure bezeichne, schlug ich deshalb einen anderen Weg ein, indem ich die fraktionierte Fällung mit gesättigter Salzlösung versuchte. Zu dem Ende wurde das Baryumsalz erst mittels Natriumcarbonatlösung in das Natriumsalz übergeführt.

Eine 1%ige Lösung des Natriumsalzes in Wasser wurde von Natriumsulfat, bei Zimmertemperatur bis zur Sättigung eingetragen, gar nicht gefällt. Von Ammoniumsulfat wurde sie als eine ölige Masse und von NaCl flockig gefällt. Die Fällungsgrenzen für NaCl wurden näher untersucht, und bei Zusatz von 2 Volumen gesättigter, kalkfreier Kochsalzlösung erhielt man einen Niederschlag, welcher das Aussehen von Tonerdehydrat hatte und mit einer Kochsalzlösung derselben Konzentration leicht auszuwaschen war. Das Filtrat von dieser Fällung enthielt nur eine sehr kleine Menge einer an der Luft zerfließenden Substanz, welche Schwefel enthielt und die in allen nach diesem Prinzip ausgeführten Versuchen aufgesammelt und mit der Hauptfraktion 1 vereinigt wurde.

Nach diesen vorläufigen Untersuchungen wurden von dem

Natriumsalze 2 g in 200 ccm Wasser gelöst und mit 400 ccm gesättigter, reiner NaCl-Lösung gefällt. Der ausgewaschene und stark ausgepreßte Niederschlag wurde in absolutem Alkohol gelöst und durch wiederholte Alkoholbehandlung von NaCl befreit. Das fast ganz rein weiße, nicht hygroskopische Salz zeigte bei der Schwefelbestimmung einen Gehalt von 1,53% Schwefel, also genau dieselbe Menge wie vor der Reinigung durch Fällung mit Chlornatrium.

Es wurde nun ein neuer Versuch nach ganz demselben Prinzip ausgeführt, nur mit dem Unterschiede, daß die erste NaCl-Fällung nach dem Reinigen mit Alkohol wieder in Wasser zu einer 1%igen Lösung gelöst und dann mit 2 Volumen Chlornatriumsaturation gefällt wurde. Das wie oben mit Alkohol gereinigte Salz enthielt 1,54% Schwefel, also genau dieselbe Menge wie das nur einmal gefällte.

In den nun angeführten Fällen war eine 1%ige Lösung des Gallensalzes mit NaCl-Lösung gefällt worden. Zu dem nun folgenden Versuche nahm ich eine 2%ige Lösung, die wie in dem vorigen Versuche zweimal mit Chlornatriumsaturation (2 Vol. NaCl-Lösung) gefällt wurde. Die Schwefelbestimmung ergab auch in diesem Falle einen Gehalt von 1,54% Schwefel.

Es wurde also in allen drei Fällungsversuchen mit Kochsalzlösung, trotz verschiedener Konzentration der Gallensalzlösung, und gleichgültig, ob ein- oder zweimal gefällt wurde, derselbe Schwefelgehalt gefunden, und zwar derselbe, wie der in dem aus der ursprünglichen Baryumfällung erhaltenen Natriumsalze direkt gefundene. Die folgende Zusammenstellung zeigt dies sehr deutlich.

Natriumsalz aus der Baryumfraktion direkt	1,51% S
» (1%ige Lösung), einmal mit NaCl gefällt	1,53% »
» (1%ige Lösung), zweimal » » »	1,54% »
» (2%ige Lösung), » » » »	1,54% »

Es war mir also nicht gelungen, den Schwefelgehalt unter den Wert 1,5% herabzubringen, und die obige Konstanz des Schwefelgehaltes ist sehr auffallend. Da die bekannten Taurocholate gegen 6% Schwefel enthalten, ist es ohne weiteres klar, daß es sich nicht um ein Taurocholat allein handeln konnte.

Ätherschwefelsäuren konnten ebenfalls ausgeschlossen werden, und wenn der Schwefel überhaupt von Taurocholat herrührt, würde es sich also wahrscheinlich um eine Verbindung in konstanten Verhältnissen zwischen Glykocholat und Taurocholat handeln.

Jedenfalls war es möglich, in dieser Weise durch Fällung mit 2 Volumen gesättigter Kochsalzlösung nicht nur die Hauptmasse der gallensauren Salze auszufällen, sondern auch ein Präparat von konstantem Schwefelgehalt zu gewinnen, und aus dem Grunde entschloß ich mich dazu, die ganze rückständige Portion des gallensauren Salzes, etwa 14 g, in dieser Weise zu verarbeiten.

Die hierbei erhaltenen großen Filtrate wurden durch abwechselnde Konzentration und Fällung mit Alkohol von NaCl befreit und in dieser Weise zuletzt ein hygroskopischer Rückstand erhalten. Er wurde in Wasser gelöst und mit 2 Volumen gesättigter NaCl-Lösung gefällt. Der hierbei entstehende Niederschlag, welcher bei Verarbeitung von kleineren Mengen nicht beobachtet oder berücksichtigt wurde, war nicht grobflockig, sondern bestand aus feinen Tropfen, die zu einer geringfügigen öligen Schicht sich ansammelten. Sowohl bezüglich des Geschmackes wie der Löslichkeit und Fällbarkeit ähnelte dieser Niederschlag ganz dem gewöhnlichen Glykcholeinate; und es ist deshalb nicht unwahrscheinlich, daß die untersuchte Nilpferdgalle auch ein wenig gewöhnliches Glykcholeinat enthielt. Infolge der unbedeutenden Menge dieses öligen Niederschlages war es jedoch nicht möglich, diese Frage näher zu prüfen.

Die von der obigen öligen Schicht getrennte Flüssigkeit lieferte nach Entfernung des Chlornatriums mit Alkohol einen an der Luft zerfließenden Rückstand, welcher zur weiteren Verarbeitung mit der Hauptfraktion 1 aus dem kupfersalzhaltigen Filtrate vereinigt wurde.

Der als Hauptprodukt aus den obigen 14 g durch Ausfällung mit 2 Volumen NaCl-Lösung gewonnene, grobflockige Niederschlag betrug nach dem wiederholten Reinigen mit Alkohol gegen 12 g. Es stellte eine rein weiße Masse dar, welche, wie die qualitative Prüfung ergab, schwefelhaltig war. Um

hieraus, wenn möglich, ein schwefelfreies Produkt zu erhalten, wurde ein Versuch gemacht, ihre Lösung in Wasser mit einer kleineren Menge Kochsalzlösung fraktioniert zu fällen. Zu dem Ende wurde die 1%ige Lösung in Wasser statt mit 2 Volumen nur mit  $\frac{1}{2}$  Volumen gesättigter NaCl-Lösung gefällt, so daß der Gehalt an NaCl etwas mehr als 10% betrug. Das Zusammenmischen der Lösungen geschah bei gegen  $50^{\circ}$  C. und das Gemenge blieb vollständig klar. Erst nach dem Erkalten trat eine flockige Fällung auf, die unter dem Mikroskope als aus gefalteten Häutchen und fettsäureähnlichen Blättchen bestehend sich erwies. Diese Fällung, welche ihrem Aussehen nach dem  $\alpha$ -Hyoglykocholate sehr ähnlich war, wurde nach 3 Tagen abfiltriert, ausgepreßt und durch wiederholte Alkoholbehandlung von Köchsatz befreit.

Von dieser als Fraktion A bezeichneten Fällung, die rein weiß und gar nicht hygroskopisch war, wurde ein Teil in Alkohol gelöst und die spezifische Drehung bestimmt. Bei einer Konzentration von 8,1% war bei  $20^{\circ}$  C. und bei Anwendung von einem 2 dm langen Rohre ( $\alpha$ )  $D = + 13,15^{\circ}$ . Diese auffallend niedrige spezifische Drehung zeigt, daß hier eine Gallensäure vorlag, welche trotz ihrer Ähnlichkeit in mehreren Hinsichten mit der Glykocholeinsäure mit ihr nicht identisch sein konnte. Das Natriumsalz der letztgenannten Säure zeigte nämlich die spezifische Drehung von ( $\alpha$ )  $D = + 39,64^{\circ}$  bei der Konzentration 5,8%. Daß sie noch mehr von gewöhnlicher Glykocholsäure verschieden war, folgt ohne weiteres aus ihrer Fällbarkeit und anderen Eigenschaften, und auch eine Identität mit der  $\alpha$ -Hyoglykocholsäure, der sie wohl am nächsten stehen dürfte, ist nicht anzunehmen.

Für das Natriumsalz der  $\alpha$ -Hyoglykocholsäure fand Jolin<sup>1)</sup> in alkoholischer Lösung ( $\alpha$ )  $D = + 5,7^{\circ}$ . Für das Natriumsalz der  $\beta$ -Säure (welches übrigens eine ganz andere Fällbarkeit für NaCl als das Salz der Nilpferdgalle zeigt) hat er keine Bestimmung ausgeführt; für die freie  $\beta$ -Säure, in Alkohol gelöst,<sup>2)</sup> fand er ( $\alpha$ )  $D = + 8,2^{\circ}$ . Diese Säuren waren jedoch in

<sup>1)</sup> Jolin, Diese Zeitschr., Bd. 13, S. 207.

<sup>2)</sup> Jolin, ebenda, Bd. 12, S. 555.

beiden Fällen von einer schwefelhaltigen Substanz (Taurocholat?) verunreinigt. Piëtre,<sup>1)</sup> welcher mit schwefelfreier Hyoglykocholsäure arbeitete, fand für die freie Säure in alkoholischer Lösung  $(\alpha)D = +4,57^\circ$ . Seine Angaben beziehen sich aber, wie es scheint, auf ein Gemenge der zwei Hyoglykocholsäuren und dürften also ebenfalls nicht ohne weiteres auf die  $\alpha$ -Hyoglykocholsäure übertragbar sein. Aus den nun zitierten Angaben folgt aber jedenfalls, daß die Hyoglykocholsäuren eine sehr niedrige spezifische Drehung haben, und man sieht ferner, daß die Säure der Nilpferdgalle in dieser Hinsicht ihnen viel näher als der Glykochol- und Glykocholeinsäure steht.

Das von der Fraktion **A** getrennte,  $\frac{1}{2}$  Volumen NaCl-Lösung enthaltende Filtrat wurde durch abwechselndes Konzentrieren und Ausfällen mit Alkohol von dem NaCl befreit und durch wiederholte Alkoholbehandlung genau gereinigt. Diese, ebenfalls rein weiße Fraktion **B** wurde in Alkohol gelöst und die spezifische Drehung bestimmt. Bei der Konzentration von 6,29% wurde für dieselbe  $(\alpha)D = +18,04^\circ$  gefunden. Diese Fraktion enthielt also offenbar ein Gemenge von der Säure der Fraktion **A** mit einer Säure von stärkerer Drehung. Durch die weitere Untersuchung wurde dies auch bestätigt. Bei neuer Verarbeitung dieser Fraktion **B** nach dem obigen Prinzipie wurde nämlich eine weitere Portion von dem Salze der Fraktion **A** (mit der spezifischen Drehung  $(\alpha)D = +13^\circ$ ) und in dem Filtrate davon ein in öligen Tropfen durch mehr NaCl fällbares Salz, welches wie gewöhnliches Glykocholeinat sich verhielt, erhalten. Die Menge dieses Salzes war leider zu klein, um eine genauere Untersuchung zu gestatten, und die Anwesenheit von gewöhnlichem Glykocholeinat ist also nur sehr wahrscheinlich, aber nicht sicher bewiesen worden.

Ich kehre nun zu der Fraktion **A** zurück. Diese Fraktion erwies sich bei qualitativer Prüfung als schwefelhaltig, und trotz der fraktionierten Fällung mit  $\frac{1}{2}$  Volumen NaCl-Lösung war also die schwefelhaltige Substanz nicht entfernt worden. Ich entschloß mich daher dazu, diese Substanz durch Aus-

<sup>1)</sup> Recherches sur la bile. Laval 1910.

fällung der freien Glykocholsäure mit verdünnter Mineralsäure wenn möglich zu entfernen.

Zu dem Ende machte ich eine 1%ige Lösung der Fraktion A in Wasser, schüttelte mit überschüssigem Äther und setzte Salzsäure bis zu 1% in dem Gemenge hinzu. Die Gallensäure schied sich als sehr kleine Tröpfchen aus, die allmählich größtenteils am Boden der Flasche als eine ölige oder honigähnliche Schicht, aber auch als größere, helle Tropfen an der Wand des Gefäßes sich abgesetzt hatten. Eine Krystallisation fand nicht statt, selbst nicht in einer Portion, die gegen ein halbes Jahr stehen blieb.

Die wasserklare, saure Flüssigkeit konnte leicht von den Tropfen und der Bodenschicht getrennt werden, und die ausgefällte Säure wurde durch Kneten mit Wasser von Mutterlauge befreit. Es wurden darauf sowohl die ausgefällte Säure wie die in der Flüssigkeit gelöst gebliebene in das Natriumsalz übergeführt. Das Salz der in Lösung gebliebenen Säure zeigte bei einer Konzentration von 2,7% ( $\alpha$ ) D = + 12,5°, das Salz der ausgeschiedenen Säure bei der Konzentration 9,48% ( $\alpha$ ) D = + 12,6°.

Das Salz der nicht ausgefällten Säure erhielt ich in so kleiner Menge, daß sie eine weitere Untersuchung nicht gestattete. Das Salz der ausgefällten Säure wurde dagegen teils zu qualitativen Proben und teils zur Bestimmung des Schwefelgehaltes verwendet.

Dieses Salz war rein weiß. Es hatte einen widerlich bitteren Geschmack, aber nicht den intensiven, mehr rein bitteren Geschmack des  $\alpha$ -Hyoglykocholates. Seine Lösung in Wasser wurde von denselben Salzen wie die ursprüngliche Galle gefällt und sie gab mit den löslichen Salzen der alkalischen Erden reichliche Niederschläge. Das Salz stimmte in diesen Hinsichten mit dem  $\alpha$ -Hyoglykocholate überein, wurde aber nicht von  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  bei Zimmertemperatur gefällt und zeigte zu  $\text{NaCl}$  ein etwas abweichendes Verhalten. Während nämlich das Natriumsalz der  $\alpha$ -Hyoglykocholsäure in 1%iger Lösung schon von 3—4%  $\text{NaCl}$  reichlich gefällt wird, gibt eine ebenso konzentrierte Lösung des Salzes der Nilferdgalle mit

derselben Menge NaCl gar keine Fällung, und sie fängt erst von einem Gehalte von 6% NaCl ab ein wenig gefällt zu werden.

Wenn man dieses Verhalten mit dem abweichenden Geschmacke und der verschiedenen spezifischen Drehung zusammenhält, so ist es offenbar, daß die Säure der Nilferdgalle nicht mit der  $\alpha$ -Hyoglykocholsäure identisch sein kann. Auch mit der  $\beta$ -Hyoglykocholsäure, deren Natriumsalz durch NaCl immer als ölige Tropfen und nicht als flockige Massen ausgeschieden wird und welches sogar von 10—11% NaCl nicht gefällt wird, kann die Säure der Nilferdgalle nicht identisch sein.

Nun könnte man hier einwenden, daß dieser Vergleich nicht ganz zulässig ist, weil, wie unten gesagt werden soll, auch das nun in Rede stehende Salz der gereinigten Säure der Nilferdgalle mehr als 1% Schwefel enthielt. Dieser Einwand ist natürlich völlig berechtigt; aber das Interessante ist, daß auch die Hyoglykocholate, wenn man sie mit Neutralsalzen ausfällt, immer schwefelhaltig sind, was schon Jolin gezeigt hat. Ich habe das  $\alpha$ -Hyoglykocholat aus 1%iger Lösung in Wasser durch Zusatz von 3,8% NaCl zu der gelinde erwärmten Lösung (wobei das Salz beim Erkalten der Lösung in schönen Nadeln sich ausscheidet) mehrere Male umkrystallisiert und trotzdem in dem schönen, schneeweißen Präparate rund 1,1% (genauer 1,07%) Schwefel gefunden. Der obige Vergleich gilt also für Salze aus Schweine- und Nilferdgalle, welche fast denselben Gehalt an Schwefel hatten.

Wie oben bemerkt, habe ich auch diese Fraktion auf einen Gehalt an Schwefel geprüft. Sie war schwefelhaltig und der Gehalt an Schwefel war 1,20%. Trotz der wiederholten fraktionierten Fällung mit NaCl und trotz der Ausfällung der freien Säure mit verdünnter Salzsäure bei Gegenwart von Äther war es also nicht gelungen, den Schwefelgehalt weiter als von 1,5 zu 1,2% herabzubringen. Wenn dieser letztgenannte Schwefelgehalt von Taurocholat herrührte, würde dies einem Gehalte von rund 20% gewöhnlichem Taurocholat entsprechen.

Die Natur dieser schwefelhaltigen Substanz habe ich infolge der geringen Menge des seltenen, schwer zugänglichen Materiales nicht ermitteln können, bis auf weiteres muß man

wohl aber dieselbe als Taurocholsäure bezeichnen. Wenn diese Annahme eine richtige ist, muß man es jedoch als sehr auffallend bezeichnen, daß man, trotz aller chemischen Manipulationen und trotz der Ausfällung der Glykocholsäure als freie Säure, den ursprünglichen Schwefelgehalt der gallensauren Salze um nicht mehr als höchstens 0,3% hat herabsetzen können.

Nach den Untersuchungen von Pieltre kann man durch fraktioniertes Aussalzen mit Natronlauge aus der Schweinegalle ein schwefelfreies Hyoglykocolat darstellen. Bei der Ausführung dieser meiner Untersuchungen war die (im Jahre 1910 erschienene) Arbeit von Pieltre mir nicht bekannt, und ich hatte also nicht seine Methode auf die Nilferdgalie versuchen können.

Da Pieltre das obengenannte Resultat bei Verarbeitung von sehr großen Mengen Schweinegalle erhielt, war geringe Aussicht, daß ich nach dieser Methode mit den geringfügigen Mengen meines Materiales zu einem brauchbaren Resultate kommen würde. Trotzdem habe ich die zuletzt übrig gebliebene Menge der Fraktion A, etwa 3 g, zu einem derartigen Versuche geopfert. Das Salz wurde in Wasser zu 60 ccm gelöst und also eine etwa 5%ige Lösung erhalten. Zu dieser Lösung wurde allmählich eine Natronlauge von 11% NaOH gesetzt. Schon nach Zusatz von 10 ccm war die nach Umschütteln vollständig klare, farblose Flüssigkeit dickflüssig wie Glycerin geworden. Nach Zusatz von 20 ccm war sie noch dickflüssiger und nach Zusatz von 30 ccm hatte sie die Konsistenz eines dickflüssigen Kleisters. Von mehr Lauge wurde sie trübe und nach Zusatz von im ganzen 90 ccm hatte sie das Aussehen eines undurchsichtigen Kleisters angenommen. Versuche an einer kleineren Portion zeigten, daß sie durch Zusatz von mehr Lauge, selbst von  $\frac{1}{4}$  Volumen Lauge von 35%, nicht merkbar verändert wurde, und aus dem Grunde wurde keine weitere Menge Lauge zugesetzt. Das Gemenge (60 + 90) enthielt also nun etwa 6,6% NaOH.

Das weiße, undurchsichtige Aussehen des Gemenges rührte von kleinen Öltröpfchen her, welche die ganze Masse durchsetzten. Da ein Abtrennen und Aufsammeln dieser Tröpfchen

nicht direkt möglich war, wurde rasch auf 45° C. erwärmt. Hierbei wurde das Gemenge dünnflüssig, die Trübung verschwand allerdings nicht, aber die Hauptmenge der Tröpfchen setzte sich als eine ölige Schicht am Boden ab. Nach 24-stündigem Stehen enthielt die obere dünnflüssige und sonst durchsichtige, farblose Schicht eine spärliche Fällung, die bei mikroskopischer Untersuchung als aus gefalteten Häuten bestehend sich erwies. Die untere, vorher ölige Schicht war in einen weißen undurchsichtigen, festen Kuchen verwandelt worden. Die Flüssigkeit mit der spärlichen Fällung konnte leicht und vollständig von dem Kuchen getrennt werden.

Diese Flüssigkeit, durch Glaswolle filtriert und dann mit etwas Wasser verdünnt, wurde mit Kohlensäure behandelt, bis alles Natriumhydroxyd in Carbonat umgesetzt war. Dann wurde durch abwechselnden Alkoholzusatz und Konzentration das Carbonat entfernt. Zuletzt wurde ein unbedeutender gelblicher, bitter schmeckender, in Alkohol löslicher Rest erhalten, dessen Menge indessen so klein war, daß er nicht weiter untersucht wurde. Es kam also nur der obengenannte feste Kuchen zur Untersuchung. Er wurde in Alkohol und etwas Wasser gelöst. Die Lösung wurde mit Kohlensäure behandelt, bis alles Natriumhydroxyd in Carbonat umgesetzt worden war, darauf wurde durch Alkoholbehandlung, Eintrocknen und mehrmals wiederholte Lösung des Rückstandes in Alkohol gereinigt. Das zuletzt erhaltene Salz war rein weiß: seine Lösung in absolutem Alkohol zeigte bei der Konzentration 12,6%, die spezifische Drehung  $(\alpha)_D = 12,1^\circ$ . Das bei 104° C. getrocknete Salz, welches leicht von konstantem Gewicht erhalten wurde, zeigte einen Gehalt von 1,35% Schwefel.

Selbst durch Ausfällen mit Natronlauge und Erwärmen auf 45° C. war es also nicht möglich, den Schwefel zu entfernen. Der Schwefelgehalt war eher ein wenig höher als in dem ursprünglichen Präparate, was jedoch von wenig Belang sein dürfte, da ich zu der Bestimmung nicht mehr als 0,591 g verwenden konnte.

Dieser recht konstante Gehalt an Schwefel, den ich in keiner Weise entfernen konnte, ist sehr auffallend, und die

Natur des schwefelhaltigen Stoffes bleibt vorläufig unbekannt. Ein einfaches Gemenge von Glykocholat und Taurocholat ist kaum anzunehmen, und wenn es hier überhaupt um Taurocholat sich handelt, ist eine Verbindung der beiden Salze in konstanten Verhältnissen eher anzunehmen. Die geringe Menge des Materiales gestattete keine eingehendere Untersuchung, und da ich zu der Cholalsäuredarstellung nur gegen 1 g verwenden konnte, ist der negative Ausfall bei Prüfung auf Taurin ohne Beweiskraft.

Infolge des unerwarteten Verhaltens der schwefelhaltigen Substanz schien es mir von größerem Interesse zu sein, ihr Verhalten bei den verschiedenen Reinigungsverfahren zu verfolgen, als eine Darstellung der entsprechenden Cholalsäure zu versuchen. Aus dem Grunde blieb mir auch zuletzt nur gegen 1 g zur Cholalsäuredarstellung übrig, und ich konnte also nur eine oberflächliche Untersuchung der Cholalsäure unternehmen. Die letztere, welche ich nur in amorphem Zustande erhielt, war sehr leicht löslich in Alkohol, Aceton und Chloroform. Sie war schwer löslich in Äther und in Benzol bei Zimmertemperatur; in heißem Benzol löste sie sich leichter. Aus der Lösung in Alkohol oder Aceton konnte sie weder durch Zusatz von Äther noch von Benzol gefällt werden. Die Säure gehört zu derjenigen Gruppe von Cholalsäuren, welche schwer lösliche Baryumsalze geben.

Die Glykocholatfraktion enthielt also eine Säure, welche zu freier Säure und Metallsalzen, besonders zu den Salzen der alkalischen Erden, wie eine Glykocholeinsäure sich verhielt, die aber trotz verschiedenartig abgeänderter Reinigungsmethoden noch einen Schwefelgehalt von 1,2—1,3% zeigte. Sie ähnelte in mehreren Beziehungen der  $\alpha$ -Hyoglykocholsäure, die nach wiederholter Reinigung ebenfalls etwas über 1% Schwefel enthielt, unterschied sich aber von ihr durch andere Fällbarkeit des Natriumsalzes für NaCl und Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und andere spezifische Drehung dieses Salzes. Die spezifische Drehung des Salzes aus Nilpferdgalle war nämlich für verschiedene Konzentrationen:  $(\alpha)D = +12-13^\circ$ . Hierdurch unterscheidet sich diese Säure auch von allen anderen bisher bekannten Säuren der Glykochol-

säuregruppe, und es kann wohl also kein Zweifel darüber bestehen, daß hier eine besondere, bisher nur in der Nilferdgalle gefundene Säure vorliegt.

Die Taurocholatrafraction bestand aus der Hauptfraction 1 (dem Filtrate von der Kupfersalzfällung) und den oben S. 128, 129 und 131 genannten Endfractionen. Sämtliche diese Rückstände zeigten nach weiterer Reinigung noch einen Gehalt an Glykocholaten, die teils mit Kupfersulfat- und teils mit NaCl-Lösung so weit möglich entfernt wurden. Nach dieser fortgesetzten Reinigung wurde zuletzt eine, in absolutem Alkohol außerordentlich leicht und ohne Rückstand lösliche Masse erhalten, die aus der Luft Wasser begierig aufnahm und sich verflüssigte. Diese Masse konnte selbst nach monatelangem Trocknen im Exsikkator oder nach wochenlangem Trocknen bei 104° C. nicht in trockenem, pulverisierbarem Zustand übergeführt werden. Sie stellte stets eine harte, zähe Masse dar, die an der Luft fast sogleich klebrig wurde. Sie war schwefelhaltig; der Gehalt an Schwefel konnte nicht genau festgestellt werden; nach dem überwiegend süßlichen, nur schwach bitterlichen Geschmacke zu urteilen, enthielt die Masse aber unter anderen Stoffen Taurocholat.

Die ganze Menge betrug nach ungefährender Schätzung (Wägung der bei 104° wochenlang bis zu annähernd konstantem Gewicht getrockneten Masse) etwa 3 g. Trotz ihrer vollständigen Löslichkeit in absolutem Alkohol enthielt sie noch ziemlich viel Chloride, und da an eine Isolierung und nähere Untersuchung der verschiedenen in ihr enthaltenen Substanzen nicht zu denken war, wurde sie nur auf Cholalsäuren verarbeitet.

Es wurden hierbei zwei Cholalsäuren erhalten, von denen die eine, welche ein sehr schwer lösliches Baryumsalz gab, sehr an Choleinsäure erinnerte. Ihre kleine Menge gestattete jedoch nicht die Feststellung ihrer Natur. Die andere, welche jedenfalls die hauptsächliche Cholalsäure in dem Gemenge war, erwies sich durch Krystallform, Schmelzpunkt (196° C.) und positive Myliussche Jodreaktion als gewöhnliche Cholsäure. Die Taurocholatrafraction enthielt also, neben anderen unbekanntem Stoffen, als hauptsächliche Gallensäure Cholsäure, wenn

nicht ausschließlich jedenfalls zum allergrößten Teile, als Taurocholat.

Fasse ich zuletzt die hauptsächlichsten Resultate dieser Untersuchung kurz zusammen, so ergibt sich folgendes:

Die Nilpferdgalle enthielt mindestens zwei Farbstoffe, welche, wenn sie zusammen vorkamen, ein Absorptionsspektrum gab, welches demjenigen des Cholehämamins ähnelte.

Die Galle war auffallend reich an in Wasser löslichen, in Alkohol unlöslichen Salzen, indem nämlich die Menge dieser Salze 10,9% von den gesamten festen Stoffen betrug. Die Salze waren zum allergrößten Teile Chloride, und daneben kamen nur Carbonate, kleine Mengen von Sulfaten und Spuren von Phosphaten vor.

Von den alkohollöslichen Stoffen waren 95,42% durch Äther fällbar. Dementsprechend war die Galle arm an Phosphatiden und sie enthielt keine jecorinähnliche Substanz.

Cholesterin konnte nicht nachgewiesen werden, und die in reinem Äther löslichen Stoffe, deren Menge nur sehr klein war, bestanden hauptsächlich aus Olein mit ein wenig festem Fett.

Von dem Schwefel kamen 6,4% als Ätherschwefelsäure vor. Der Rest des Schwefels, in gewöhnliches Taurocholat umgerechnet, ergab einen Gehalt von 28,89% Taurocholat. Die Nilpferdgalle gehört also zu den glykocholsäurereichen Gallen, und hiermit stimmt auch ihr Verhalten zu verschiedenen Fällungsmitteln. Hervorzuheben ist, daß sie, wie die Schweinegalle, von den löslichen Salzen der Erdalkalien reichlich gefällt wird.

Von Gallensäuren enthielt die untersuchte Nilpferdgalle ganz unzweifelhaft gewöhnliche Cholsäure, obzwar in nur geringer Menge. Diese Säure wurde aus der Taurocholatfraktion erhalten und kommt allem Anscheine nach hauptsächlich als Taurocholat vor.

In sehr kleiner Menge wurde, überwiegend in der Glykocholatfraktion, eine Säure gefunden, die wie Glykcholeinsäure sich verhielt, deren Natur aber nicht festgestellt werden konnte.

Die Glykocholatfraktion enthielt als hauptsächlichste Säure eine in anderen Gallen bisher nicht gefundene Gallensäure, deren

Alkalisalz zu verdünnten Säuren und anderen Fällungsmitteln wie ein Glykcholeinat sich verhielt. Dieses Salz wurde reichlich von den löslichen Salzen der Erdalkalien gefällt, und es konnte leicht von verhältnismäßig kleinen Kochsalzmengen ausgefällt werden. Es ähnelt in vielen Hinsichten dem entsprechenden Salze der  $\alpha$ -Hyoglykocholsäure, konnte aber nicht wie dieses durch Sättigung mit Natriumsulfat bei Zimmertemperatur gefällt werden. Es zeigte ferner eine geringere Fällbarkeit für NaCl und hatte eine andere spezifische Drehung, nämlich  $(\alpha)D = +12-13^\circ$  bei verschiedenen Konzentrationen.

Das auffälligste Resultat der Untersuchung liegt wohl jedoch darin, daß diese Säure, trotz der verschiedenartigen, in dem vorigen beschriebenen Reinigungsprozeduren, denen sie unterworfen wurde, immer schwefelhaltig war und einen recht hohen Schwefelgehalt, 1,2—1,3% hatte.

Dieser Schwefelgehalt rührt nicht von Ätherschwefelsäuren her, und er läßt sich kaum durch eine einfache Beimengung von Taurocholat erklären. Wie er zu erklären ist, bleibt noch eine offene Frage, deren Lösung infolge der geringen Menge des seltenen Materiales nicht in Angriff genommen werden konnte. Das beobachtete Verhalten der Nilpferdgalle fordert jedoch dringend zu weiteren Untersuchungen über die Art der Bindung des Schwefels in den verschiedenen Gallen auf. An der schwer zugänglichen Nilpferdgalle dürfte wohl diese Frage kaum weiter verfolgt werden können; aber es scheinen analoge Verhältnisse in der Schweinegalle obzuwalten, und diese Galle dürfte deshalb vielleicht als Ausgangsmaterial für weitere Untersuchungen in dieser Richtung dienen können.

---