

# **Beiträge zur Kenntnis der Gallenfarbstoffe.**

## **IX. Mitteilung.**

Von

**William Küster.**

### **Über die Bildung von Gallensteinen.**

Nach Versuchen von K. Reihling.

(Aus dem Laboratorium für organische Chemie der Technischen Hochschule, Stuttgart.)

(Der Redaktion zugegangen am 28. April 1915.)

Nach den bisher beobachteten Erscheinungen enthalten die Gallensteine des Rindes außer Fetten, Fettsäuren, Cholesterin, Gallensäuren nebst deren Salzen und anorganischen Stoffen und neben Bilirubincalcium und -magnesium noch andere gefärbte Stoffe, von denen ein Teil in Alkohol, ein zweiter in Eisessig löslich ist, während sich der Rest als in allen Lösungsmitteln unlöslich erweist. Zur Beantwortung der Frage, wie Gallensteine entstehen, ist neben der Ermittlung der Konstitution des Bilirubins, eine Entscheidung auch darüber von Wichtigkeit, aus welchen Bestandteilen sich die genannten, der Menge nach das Bilirubin überwiegenden Anteile der Gallensteine zusammensetzen, und darüber, ob diese Bestandteile mit bereits bekannten Stoffen in eine Beziehung zu bringen sind. Nachdem das Bilirubin nun als Derivat der prosthetischen Gruppe des Hämoglobins erkannt worden ist, war zu erwarten, daß auch noch andere Bestandteile der Gallensteine solche Beziehungen aufweisen oder sich als Abkömmlinge des Globins charakterisieren lassen würden.

In der Tat haben einige Versuche, die Herr Reihling auf meine Veranlassung ausgeführt hat, dahin entschieden, daß der in Alkohol lösliche Teil der Gallensteine als ein durch Petroläther nicht zu trennendes Gemisch von Derivaten der prosthetischen Gruppe des Hämoglobins mit Fettsäuren oder wachsartigen Estern anzusprechen ist, und daß der in Eisessig

lösliche Teil, der von mir als Choleprasin<sup>1)</sup> bezeichnet worden ist, ebenfalls als Abkömmling der prosthetischen Gruppe des Hämoglobins aufzufassen ist, der sich noch in enger Verbindung mit einem aus dem Globin hervorgegangenen Stoffe befindet und daneben ebenfalls einen wachsartigen Ester enthält.<sup>2)</sup>

Aus den alkohollöslichen Teilen konnte nämlich durch Oxydation mit Chromsäure Hämatinsäure erhalten werden, das Choleprasin aber lieferte durch Hydrolyse mit Salzsäure Histidin und einen durch Säuren nicht spaltbaren Teil, der bei der Oxydation mit Salpetersäure ebenfalls Hämatinsäure ergab.

Da nun das Globin bedeutende Mengen von Histidin enthält und dieses im Choleprasin noch angetroffen wurde, darf wohl die Abstammung des letzteren vom ersteren als höchst wahrscheinlich bezeichnet werden. Die Umwandlung des Globins dürfte sich aber hauptsächlich auf eine Veränderung des Tyrosins und des Tryptophans erstrecken, deren Abwesenheit im Choleprasin wahrscheinlich gemacht werden konnte, während andere Bausteine des Globins, wie Valin, Leucin, Prolin und Cystin, auch im Choleprasin noch enthalten sind, wie einige Versuche ergaben, die indessen der Wiederholung bedürfen. Vielleicht hängt mit der Umwandlung des Tyrosins und des Tryptophans auch das Gefärbtsein des Choleprasins zusammen. Da nun nach unseren Beobachtungen<sup>3)</sup> ein beträchtlicher Teil des Bilirubins den Gallensteinen erst nach dem Herauslösen des Choleprasins entzogen werden kann, muß die Umwandlung des Globins zum Choleprasin noch im Verbande mit der prosthetischen Gruppe, die gleichzeitig die Umwandlung in Bilirubin erfährt, erfolgen und die Wirkung des Eisessigs besteht danach in erster Linie in einer Spaltung des zunächst vorhandenen Umwandlungsproduktes des Hämoglobins. Endlich weist der Befund, daß das Choleprasin wachsartige Ester ent-

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 47, S. 297 (1906).

<sup>2)</sup> Der in allen Lösungsmitteln unlösliche Teil der Gallensteine, das sog. Bilihummin, dürfte ebenfalls als ein Derivat der prosthetischen Gruppe des Hämoglobins anzusprechen sein, das noch mit einem Abkömmling des Globins verbunden ist. Vergl. diese Zeitschrift, Bd. 91, S. 73 (1914).

<sup>3)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 91, S. 61—62 (1914).

hält auch auf die Art der Umwandlung hin, die das Globin erfährt. Denn wenn es auch noch nicht gelungen ist, die Bestandteile dieses Esters mit einem bekannten Alkohol und einer bekannten Fettsäure zu identifizieren, so dürfte doch nichts wahrscheinlicher sein, als daß beide Stoffe aus Aminosäuren des Globins sich gebildet haben, der Alkohol unter Abspaltung von Kohlendioxyd und Ammoniak und Ersatz der Amino- durch die Hydroxylgruppe, die Säure unter reduktiver Abspaltung von Ammoniak, also durch Vorgänge, die mit der Tätigkeit von Hefen und fäulniserregenden Pilzen verknüpft sind. Die zu gleicher Zeit stattfindende Umwandlung der prosthetischen Gruppe des Hämoglobins ist ganz anderer Art. Der nicht hydrolysierbare Anteil des Choleprasin liefert bei der Oxydation Hämatinsäure, was bisher nicht bekannt war. Es handelt sich also, was sein Entstehen betrifft, entweder um eine noch nicht vollendete Umwandlung des Hämatins in Bilirubin oder die Umwandlung ist über das Bilirubin stadium hinausgegangen. Wahrscheinlicher ist die letztere Erklärung, denn die Eigenschaften des erwähnten Choleprasinbestandteiles weisen auf das Bilinigrin<sup>1)</sup> hin, das durch Oxydation aus Bilirubin erhalten wurde. Da nun das Bilirubin selbst schon als ein aus dem Hämatin durch Oxydation hervorgegangenes Gebilde aufgefaßt werden muß, darf also zusammenfassend gesagt werden, daß die Umwandlung des Hämoglobins in der Weise erfolgt, daß die prosthetische Gruppe eine Oxydation, das Globin dagegen eine Reduktion gleichzeitig erfährt. Es werden auch hier, wie immer bei Vorgängen im Organismus, die Elemente des Wassers zur Umgestaltung organischer Stoffe herangezogen.

### Experimenteller Teil.

#### I. Die in Alkohol löslichen Teile von Rindergallensteinen.

Die in der Überschrift genannten Teile wurden aus den Gallensteinen nach der Behandlung mit Äther, heißem Wasser,

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 91, S. 66 (1914).

10%iger Essigsäure und Äther durch erschöpfende Extraktion mit Alkohol bei Zimmertemperatur erhalten.<sup>1)</sup> Der nach Abdestillation des Lösungsmittels verbleibende Rückstand wurde darauf von neuem in möglichst wenig heißem Alkohol gelöst, wobei etwas mitgerissene Gallensteinsubstanz zurückbleibt. Aus der heiß filtrierte Lösung scheidet sich dann ein Teil des Gallenfarbstoffs (A) beim Erkalten ab, ein zweiter (B) wird aus den Mutterlaugen durch Äther gefällt. Aus dem Filtrat wird der Äther abdestilliert, die alkoholische Lösung mit Petroläther versetzt und durch Zusatz von etwas Wasser die Entmischung herbeigeführt, worauf in einem Extraktionsapparat mit Petroläther erschöpfend ausgezogen wurde.

So wurde also ein Teil (C) isoliert, der in Petroläther nicht löslich ist, während der andere (D) von dem genannten Lösungsmittel aufgenommen worden war.

Teil A konnte durch öfteres Aufnehmen in heißem Alkohol getrennt werden, es blieb ein Teil löslich, ein anderer und zwar der größere, blieb schließlich unlöslich zurück. Beide gaben die Gmelinsche Reaktion, zeigten aber in der Zusammensetzung erhebliche Unterschiede:

A a. (in Alkohol unlöslich, in Eisessig löslich):

63,35% C, 6,17% H, 8,54% N.

A b. (in Alkohol löslich): 58,84% C, 6,67% H, 8,84% N.

Teil B wurde noch mit Äther extrahiert und seine Lösung in Weingeist mit Petroläther ausgeschüttelt. Nach Abdampfen des Alkohols verblieb dann eine fast schwarze amorphe Masse, die sich beim Erhitzen aufbläht. Sie wurde nicht näher untersucht.

Teil C hinterblieb nach Verdampfen des Alkohols als ein braunes Harz, das sich gut pulvern ließ, die Gmelinsche Reaktion trat nicht ein, die Pyrrolreaktion erst, als die Substanz mit Zinkstaub gemischt erhitzt wurde. Eine zur Orientierung ausgeführte Analyse ergab namentlich einen sehr niedrigen Stickstoffgehalt, es wurden gefunden 65,6% C, 9,01% H, 3,08% N. Doch wurden der Substanz weder durch

<sup>1)</sup> Handbuch der bioch. Arbeitsmethoden, Teil II, S. 637.

Äther noch bei einer zweiten Extraktion der weingeistigen Lösung mit Petroläther größere Mengen stickstofffreier Körper entzogen, in beiden Fällen hinterließen die Lösungsmittel eine harzige Masse, welche die Pettenkofersche Reaktion sehr deutlich gab.

Die Hauptmenge verblieb nach Abdunsten des Alkohols als braungrün gefärbte, bei etwa 120° schmelzende, in Eisessig und in Natronlauge lösliche Masse.

3,5 g derselben wurden durch Aufstreuen auf 70 ccm konz. Schwefelsäure unter gelindem Erwärmen gelöst und in die unter 0° abgekühlte Lösung unter Turbinieren die Lösung von 4,5 Chromtrioxyd zu 45 ccm Wasser allmählich eingetragen, worauf eine grüne Lösung resultierte, in der sich ein brauner Körper suspendiert vorfand. Dieser Suspension wurden die ätherlöslichen Teile durch erschöpfendes Ausziehen in einem Extraktionsapparat entzogen, und aus der ätherischen Lösung die sauren Teile durch 5%ige Sodalösung weggenommen.

a) Die mit Natriumsulfat getrocknete ätherische Lösung hinterließ nach Abdestillation des Äthers 0,1 g einer krystallinischen, sich fettig anfühlenden Masse, die nun nach Bohrisch und Kürschners Methode<sup>1)</sup> verseift wurde. Der hierbei erhaltene Alkohol war in Äther löslich und erschien aus warmem Hexan umkrystallisiert in Form blaßgelblicher Nadeln. Die nach dem Ansäuern in Äther übergehende Säure hinterblieb nach Abdestillation des Äthers als weiche braune Masse, die sich ebenfalls in warmem Hexan löste, aber nur in undeutlichen Formen auskrystallisierte.

b) Die Sodalösung wurde mit verd. Schwefelsäure angesäuert und dann zunächst mit Petroläther behandelt, der eine fettig anzufühlende Substanz wegnahm und daneben Methyläthylmaleinsäureanhydrid — nach dem Geruch des Rückstand zu schließen. Dann entzog Äther einen stechend riechenden Sirup, aus dem durch Wasserdampfdestillation eine Quecksilberchlorid reduzierende Säure, also wahrscheinlich

<sup>1)</sup> Chem. Zbl., 1910, II, S. 690.

Ameisensäure, abgetrennt wurde. Die nicht flüchtigen Anteile wurden durch Barytwasser verseift, das in der Hitze ausfallende Baryumsalz durch Salzsäure gelöst und die Lösung durch Chloroform extrahiert. Der aus Wasser umkrystallisierte Rückstand der Chloroformlösung zeigte die Formen der Hämaminsäure  $C_8H_8O_5$  und den Schmelzpunkt  $96^\circ$  derselben.

## II. Über das Choleprasin.

Nach der Extraktion der Rindergallensteinen mit Äther, heißem Wasser, verdünnter Essigsäure, Äther und Alkohol kann ein großer Teil des Bilirubins durch Chloroform weggenommen werden. Der Rest wurde von Herrn Reihling in einem Extraktionsapparat erschöpfend mit Eisessig ausgezogen und die erhaltene Lösung durch Abdestillation eines Teils des Lösungsmittels unter vermindertem Druck in Wasser eingetragen, dem ein wenig Kalilauge zugesetzt war. Hierbei fällt das Choleprasin aus, das nun auf einem Filter gesammelt, ausgewaschen und getrocknet wird. Zur Reinigung wurde das fein zerriebene Choleprasin mit Äther, dann mit Alkohol, schließlich mit Chloroform extrahiert. Das letztere Lösungsmittel hinterläßt eine grüne Masse, die an Essigsäure wieder Choleprasin abgibt, während Bilirubin zurückbleibt.

### Hydrolyse des Choleprasins.

67 g des auf die angegebene Weise möglichst gereinigten Choleprasins wurden mit 250 g rauchender Salzsäure 7 Stunden im kochenden Wasserbade behandelt, die dunkelgefärbte salzsaure Lösung abgegossen und der Rückstand noch zweimal in gleicher Weise mit Salzsäure digeriert. Bei der dritten Behandlung war allem Anschein nach nur noch wenig Substanz herausgelöst worden, so daß der jetzt verbleibende Rückstand auf ein Filter gebracht werden konnte, worauf er gründlich nachgewaschen wurde.

Sein Gewicht betrug nach dem Trocknen 48 g.

Die salzsaure Lösung wurde zur Sirupkonsistenz eingedampft, der Sirup in 250 g rauchender Salzsäure gelöst und

diese Lösung jetzt 12 Stunden im Ölbad auf 170—180° erhitzt, um die Hydrolyse vollständig zu machen, was nach unseren Erfahrungen bei niedrigerer Temperatur nicht gelingt. Nachdem dann durch Verdampfen auf dem Wasserbad unter häufigem Zusatz von Wasser der größte Teil der Salzsäure verjagt und von ausgeschiedenen Huminstoffen (4 g) filtriert worden war, wurde die Lösung, deren Geruch an Fleischextrakt erinnerte, mit Natronlauge annähernd neutralisiert, dann mit Soda schwach alkalisch gemacht und mit Tierkohle erhitzt.

Mit dem gelbbraun gefärbten Filtrat wurden einige qualitative Proben ausgeführt. a) Die Biuretreaktion fiel negativ aus, b) Neßlers Reagens erzeugte eine braune Fällung (Ammoniak), c) Sublimat und Sodazusatz verursachte das Entstehen eines starken weißen Niederschlags (Ammoniak und Histidin), d) Diazobenzolsulfonsäure ergab eine starke Rotfärbung (Histidin und Tyrosin), e) beim Kochen mit Bleiacetat und Natronlauge trat eine schwache Schwefelbleifällung ein (Cystin), f) mit Millons Reagens entstand keine Rotfärbung (kein Tyrosin), g) Bromwasser ergab keine Fällung (kein Tryptophan).

Da die Vorproben die gehegte Vermutung bestätigt hatten, daß Histidin unter den Produkten der Hydrolyse des Choleprasins reichlich zu finden sein würde, wurde die Isolierung der genannten Aminosäure nach der Methode von S. Fränkel<sup>1)</sup> in Angriff genommen mit dem Erfolg, daß etwa 1/2 g des rohen Monochlorhydrates erhalten wurden. Zur Reinigung wurde dann nach den Angaben von Abderhalden und Einbeck<sup>2)</sup> verfahren und nach zweimaliger Umkrystallisation aus 5fach N-Salzsäure 0,13 g farblose Krystalle des Dichlorhydrats gewonnen. Der Schmelzpunkt derselben lag bei 239° (unkor.) gegenüber 245° nach den Angaben der Literatur.

0,1217 g Subst. (i. V.) gaben 0,1521 g AgCl.

$C_6H_9O_2N_3 \cdot 2 HCl$ . Ber.: 31,08 % Cl.

Gef.: 30,92 %

<sup>1)</sup> Sitzb. d. K. Akad. d. W. Wien. Math. naturw. Kl. 112, Abt. 2b, März 1903.

<sup>2)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 62, S. 330 (1909).

Der bei der Hydrolyse des Choleprasins ungelöst gebliebene Teil stellte ein schwarzes, auch in Eisessig unlösbares Pulver vor. Auf konzentrierte Schwefelsäure gestreut, stellte sich keine Lösung ein, sie trat aber unter Rotfärbung auf Zusatz von Salpetersäure ein, womit also eine Beziehung zum Bilihumin oder auch zum Bilinigrin gegeben war. Wie die letzteren Stoffe bildet auch der vorliegende Körper ein unlösliches Natriumsalz.

1 g Substanz wurde mit 20 ccm N-Sodalösung und 100 ccm Wasser zwei Stunden geschüttelt, die Lösung filtriert und der Rückstand mit heißem Wasser mehrmals ausgelaugt. Nach dem Trocknen i. V. blieben 0,95, wovon 0,8580 durch 5%ige Salzsäure zerlegt wurden. Erhalten wurden 0,1096 g  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , was einem Gehalt von 4,13% Na entspricht, in Übereinstimmung mit einem beim Bilihuminnatrium gefundenem Wert.<sup>1)</sup>

Die Oxydation des Stoffes wurde mit Salpetersäure in der Weise bewirkt, daß 5 g des feinen Pulvers auf eine Mischung von 30 ccm Salpetersäure (spec. Gew.) 1,375) und 80 ccm Wasser verstreut wurden, wozu noch 50 ccm konzentrierte Essigsäure gegeben werden mußten, damit beim Erwärmen auf dem Wasserbade (10 Stunden) wenigstens teilweise Lösung eintrat. Das dunkelrotbraune Gemisch wurde dann nach Zugabe von 10 ccm verdünnter Schwefelsäure auf dem Wasserbade zur Trockne gebracht und der Rückstand, welcher sich mit Wasser nicht benetzte, mit Äther extrahiert, dann mit Wasser angerieben, vom Unlöslichen filtriert und das Filtrat mit Äther ausgeschüttelt. Die vereinigten Ätherauszüge geben an 5%ige Sodalösung Substanz ab, doch bildete sich zugleich eine dicke Gallerte, die sich erst auf Zusatz von beträchtlichen Mengen Wasser löste.

Die mit Natriumsulfat getrocknete ätherische Lösung hinterließ nach Abdestillation des Lösungsmittels noch gelbfärbte, stickstofffreie Nadeln vom Schmelzpunkt 57°. Cholesterin und Koprosterinreaktionen verliefen negativ. Nach der Verseifung wurde ein Alkohol in Gestalt fast farbloser Nadeln

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 91, S. 73 (1914).



vom Schmelzpunkt 51,5 erhalten und Säuren, deren in warmem Hexan löslicher Teil bei 40° schmolz.

Die Sodalösung enthielt Oxalsäure und Hämatinsäure, von der 0,13 g in den charakteristischen Formen mit dem Schmelzpunkt 96,5° isoliert wurden.

Stuttgart, im April 1915.

---