

**214. Bilirubinkonjugate der menschlichen Galle:
Ausscheidung als Acylglykoside von Aldobiouron-, Pseudoaldobiouron-
und Hexuronosylhexuronsäuren¹⁾**

von **Clive C. Kuenzle²⁾**, **Jacques R. Rüttner³⁾** und **Conrad Hans Eugster**

Organisch-Chemisches Institut der Universität Zürich, Rämistrasse 76, CH-8001 Zürich

(5. IX. 70)

Zusammenfassung. Die Bilirubinderivate der menschlichen Galle wurden in Form ihrer Phenylazoverbindungen isoliert und durch mehrfache Verteilungschromatographie mit umgekehrten Phasen in 8 Fraktionen aufgetrennt (Azopigmente A₁, A₂ und B₁ bis B₆). Der Hauptanteil des Bilirubins erscheint in der Galle nicht wie bisher angenommen als Glucuronid, sondern als Acylglykoside von Aldobiouron-, Pseudoaldobiouron- und Hexuronosylhexuronsäuren. Für die Hauptkomponenten schlagen wir die folgenden vorläufigen Strukturen vor (acyl = Acylrest des Aglykons):

- Acyl-(6-O-hexopyranosyluronsäure-hexosid),
- Acyl-(4-O-hexofuranosyluronsäure-glucosid),
- Acyl-(4-O- β -D-glucofuranosyluronsäure-glucosid),
- Acyl-(4-O-(α -D-glucofuranosyl)- β -D-glucosiduronsäure),
- Acyl-(4-O-(3-C-hydroxymethyl-ribofuranosyluronsäure)- β -D-glucosiduronsäure).

Bilirubin, das gelbe Abbauprodukt aus Hämoglobin, wird in der menschlichen Leber in wasserlösliche Derivate umgewandelt und als solche in der Galle ausgeschieden. Dem Ausscheidungsmechanismus kommt medizinisch erhebliches Interesse zu, da das Pigment sich einerseits bei der Gelbsucht im Blut anhäuft und andererseits als Bestandteil der meisten Gallensteine gefunden wird. Seit den Arbeiten von *Billing et al.* [2], *Schmid* [3] und *Talafant* [4] schien es erwiesen, dass Bilirubin zur Hauptsache als alkali-labiles Acylglucuronid ausgeschieden wird. Ausserdem ergaben sich Hinweise für das Vorkommen alkali-stabiler Bilirubinderivate [2], die in der Folge als O- oder N-Glucuronide [5] sowie als Sulfat [6] [7] [8], Phosphat [7] oder Amid des Taurins [7] angesprochen wurden, jedoch nie mit Sicherheit identifiziert werden konnten.

Die vorliegende Arbeit wurde mit dem Ziel unternommen, die Struktur der alkali-stabilen Bilirubinderivate aufzuklären. Dabei ergab sich in unserem Fall, dass diese nur einen verschwindend kleinen Anteil der Gallenpigmente ausmachen. Aus diesem Grunde haben wir die alkalilabilen Bilirubinkonjugate einer erneuten Strukturanalyse unterworfen.

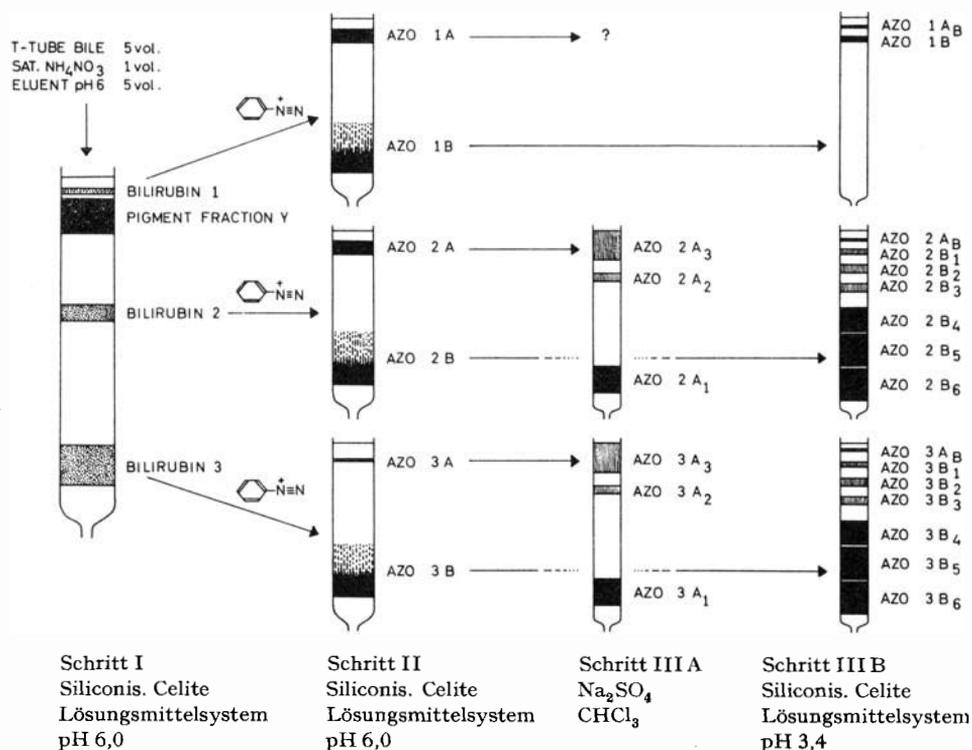
Isolierung (vgl. Figur). – Auf die Isolierung der nativen Pigmente wurde wegen ihrer Oxydationsempfindlichkeit verzichtet. Sie wurden in Form ihrer Phenylazoverbindungen [2] aus total 15 Litern menschlicher Galle⁴⁾ wie folgt isoliert.

¹⁾ Vorläufige, zusammenfassende Mitteilung; ausführliche Arbeiten siehe [1].

²⁾ Aus der Dissertation von Dr. med. C. C. K., Phil. Fak. II, Universität Zürich, 1969; jetzige Adresse: Pharmakologisches Institut der Universität Zürich, Gloriastrasse 32, CH-8001 Zürich.

³⁾ Pathologisches Institut der Universität Zürich, Kantonsspital, Zürich.

⁴⁾ T-Drain Galle aus dem *Ductus hepaticus* nach Cholecystektomie.



Chromatographische Trennung der Phenylazopigmente

Portionen zu 330 ml Galle wurden der Verteilungschromatographie mit umgekehrten Phasen unterworfen [9], wobei Säulen mit 12,6 kg siliconisiertem Celite und als Lösungsmittel ein System aus *n*-Butanol-5 mM Phosphatpuffer pH 6 verwendet wurden. Die Gallebilirubinfraktionen 1; 2 und 3 [9] [10] wurden getrennt weiter verarbeitet. Die Eluate dieser ersten chromatographischen Trennung wurden mit Phenyl diazoniumchlorid umgesetzt, wobei Spaltung und Azokupplung des Bilirubins eintritt [2] [11]. Nach Sättigung mit Kochsalz wurde die abgeschiedene, rotgefärbte Butanolschicht abgetrennt, im Vakuum eingedampft und der Rückstand mittels einer zweiten Verteilungschromatographie an siliconisiertem Celite in eine unpolare (Azopigmente A) und eine polare Azopigmentfraktion (Azopigmente B) getrennt.

Die Azopigmente A (2A, 3A) wurden einzeln mit Chloroform an wasserfreiem Na_2SO_4 chromatographiert. Die Hauptfraktion (90%) erhielt die Bezeichnung Azopigment A₁. Sie wanderte mit der Lösungsmittelfront und wurde aus Methanol kristallin erhalten. Eine Nebenfraktion (Azopigment A₂) wurde durch Zusatz von steigenden Mengen Essigester zum Chloroform aus der Säule eluiert und aus Methanol-H₂O kristallisiert.

Die schwer eluierbare Fraktion Azopigment A₃ wurde nicht weiter untersucht, da es sich offensichtlich um ein Abbauprodukt von Azopigment A₂ handelt. Die Azopigmente B (1B, 2B, 3B) wurden durch erneute Verteilungschromatographie an siliconisiertem Celite mit dem Lösungsmittelsystem 1-Octanol-Diisopropyläther-Essigester-Methanol-0,2N Essigsäure (1:2:2:3:4) einzeln weiter fraktioniert. Aus den Fraktionen 2B und 3B wurden neben einem Hydrolyseprodukt (Azopigmente 2A_B und 3A_B) je sechs Azopigmente (2B₁-2B₆, bzw. 3B₁-3B₆) gewonnen. Die analoge Fraktionierung von 1B ergab nur 2 Fraktionen (1A_B, 1B).

Ausbeute: In 1 l Galle ist etwa 1 g Bilirubin in Form von Konjugaten enthalten. Von dieser Menge wird bei unserem Verfahren nur ein Bruchteil erfasst, da ein grosser Teil nicht in Form von

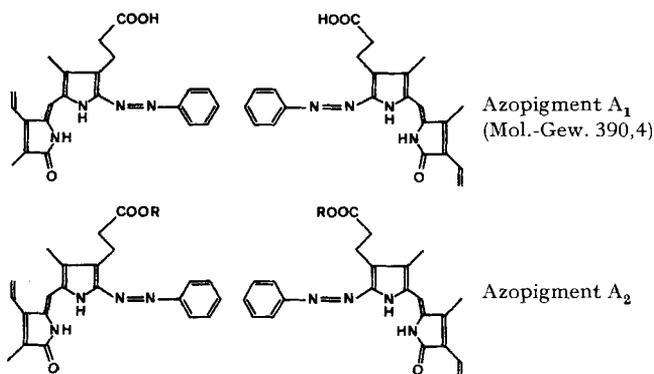
butanollöslichen Azoverbindungen aus den Fraktionen der ersten Säule erhalten werden kann. Weiter treten beträchtliche Verluste bei jedem chromatographischen Schritt auf.

Nach Elution der Zonen und Konzentration der Extrakte im Vakuum wurden die einzelnen Pigmente mit Äther ausgefällt und darauf im Vakuum getrocknet. Sie wurden als schwarzviolette Pulver erhalten.

Strukturermittlung (vgl. Formelschemata 1 und 2). – *Azopigment A₁* wurde durch Verbrennungsanalyse, Spektren und Vergleich mit authentischem Material als nicht trennbares Gemisch der beiden isomeren Phenylazopigmente aus unkonjugiertem Bilirubin identifiziert.

Azopigment A₂: Nach den Spektren handelt es sich um das Gemisch der beiden isomeren Phenylazoverbindungen eines Bilirubinesters, dessen Alkoholkomponente R OH- und/oder NH₂-Gruppen enthält. Eine nähere Untersuchung steht noch aus.

Formelschema 1. Strukturen der *Azopigmente A₁* und *A₂*



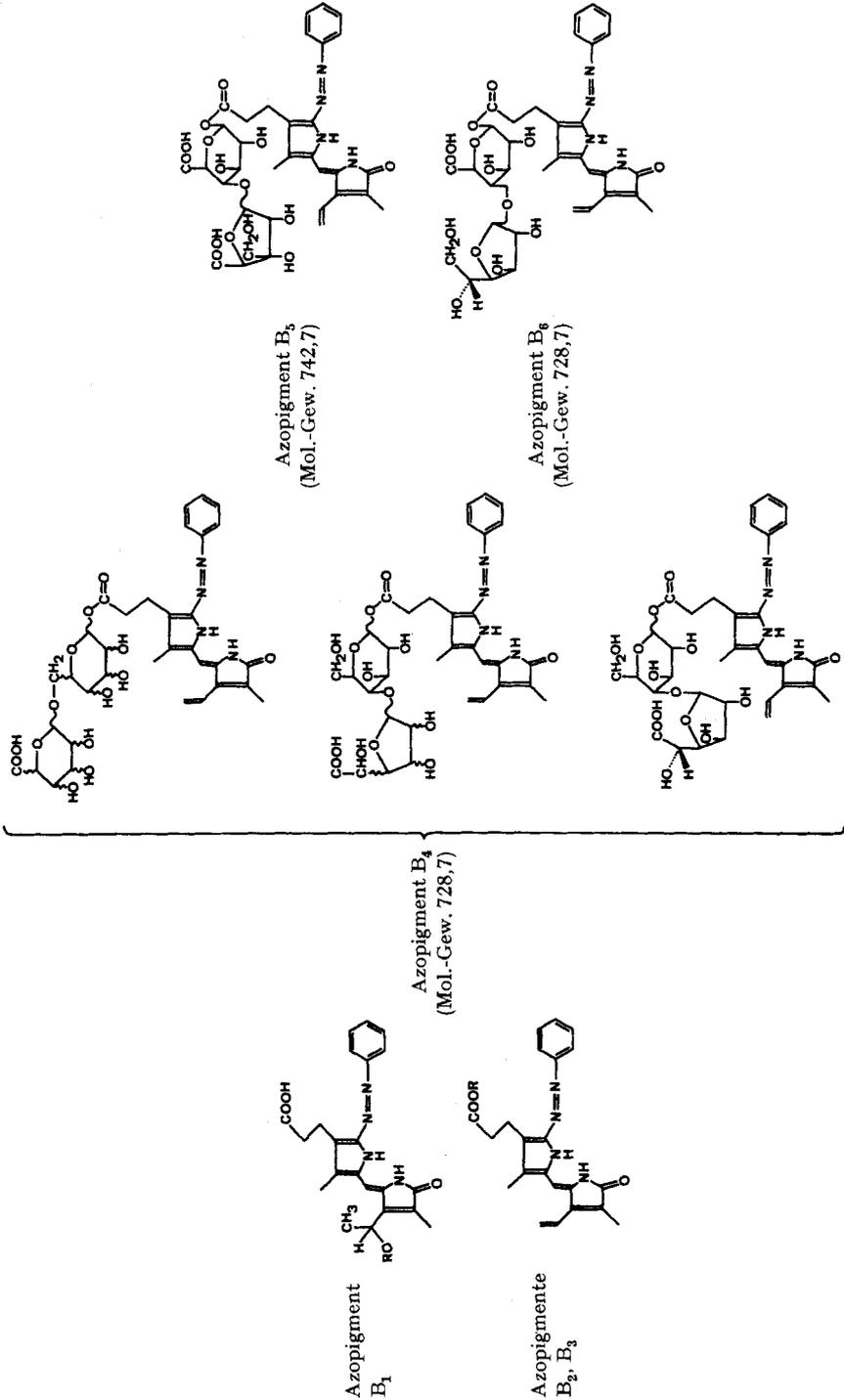
Azopigment B₁ kam nur in Spuren vor und fehlte überdies in den meisten von uns untersuchten Gallenproben. Es erwies sich als das einzige alkali-stabile Pigment (keine Hydrolyse durch 0,05 N NaOH, 30 min, 20°). Durch β -Glucuronidase liess es sich nicht hydrolysieren. Es enthält weder S noch P und hat λ_{max} 503/315 nm gegenüber 514/327 nm bzw. 506/315 nm für die Phenylazoverbindungen des Bilirubins bzw. Mesobilirubins⁵⁾. Es fehlt das langwellige Doppelmaximum bei 520/506 nm, welches für Lactimäther charakteristisch zu sein scheint⁶⁾. Das IR.-Spektrum (KBr) zeigte Banden bei 3400–2500 (OH, NH₂⁺), 2940 und 2870 (CH₃, CH₂), 1740–1690 (Ester? COOH des Bilirubinteils?), 1665 (Lactamcarbonyl des Bilirubinteils), 1610 (COO⁻), 1553 (unbekannte Bilirubinschwingung), 1470–1330, 1240, 1160 und 1100–1000 cm⁻¹ (Äther?). Auf Grund dieser Daten vermuten wir, dass eine Addition eines Alkohols an die ursprünglichen Vinyl-Seitenketten stattgefunden hat.

Azopigment B₂ und *Azopigment B₃* erwiesen sich als alkali-labil. Die Hydrolyse ergab die Phenylazoverbindung des Bilirubins. Das Lichtabsorptionsspektrum der *Azopigmente B₂* und *B₃* war identisch mit demjenigen der Phenylazoverbindungen des Bilirubins und des Bilirubin-dimethylesters (λ_{max} 514 nm). Die IR.-Spektren waren

⁵⁾ Die Lichtabsorptionsspektren aller *Azopigmente* wurden in Dimethylsulfoxid-methanolischer 0,1 N Essigsäure (1:9) gemessen.

⁶⁾ Vgl. die ausführlichen Arbeiten [1].

Formelschema 2. Strukturen der Azopigmente B₁-E₆; von den beiden vorliegenden Strukturen im Aglyconteil von B₁-B₅ (Vinylthioxanthobitrubinsäure und iso-Vinylthioxanthobitrubinsäure) ist jeweils nur die erstere gezeichnet.



nahezu identisch mit demjenigen des Azopigments B_1 . Auf Grund dieser Befunde sind die beiden Pigmente wahrscheinlich Acylglykoside des Phenylazobilirubins. Der Zuckeranteil konnte nicht identifiziert werden. Es könnte sich eventuell bei einem der beiden um ein Glucuronid handeln.

Azopigment B_4 war ebenfalls alkali-labil. Hydrolyse ergab die Phenylazoverbindungen des Bilirubins. Das Lichtabsorptionsspektrum war identisch mit demjenigen der Phenylazoverbindungen des Bilirubins. Aus dem spezifischen Extinktionskoeffizienten bei 514 nm ($36,9 \text{ l g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) und dem molaren Extinktionskoeffizienten des Phenylazobilirubins ($29600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) errechnet sich für Azopigment B_4 ein Molekulargewicht von ca. 800. Das IR.-Spektrum zeigt im wesentlichen die gleichen Banden wie Azopigment B_1 ; zusätzlich war eine scharfe Esterbande bei 1733 cm^{-1} nachweisbar. P und S waren nicht nachweisbar. Die quantitative Uronsäurebestimmung nach [12] ergab 1,2 Mol Uronsäure pro Mol Azopigment. Durch β -Glucuronidase (aus Rinderleber) liess sich die Esterbindung nicht spalten, hingegen wurden dabei etwa 30% des Pigmentes in eine weniger polare Verbindung übergeführt (Abspaltung eines endständigen Glucuronsäurerestes).

Verseifung von Azopigment B_4 ($0,1\text{N NH}_3$, 20°) und erschöpfende Extraktion der Pigmentkomponente (*n*-Butanol) ergab nach dem Eindampfen der Wasserphase den Zucker R_4 als bräunlichen Lack. Rf-Wert von R_4 (*n*-Butanol-HCOOH- H_2O , 500:115:385, Whatman-Papier Nr. 1, Anilinphtalat, brauner Fleck) = 0,54; bezogen auf Glucuronsäure. Auf DEAE-Cellulose ($0,2\text{N}$ Essigsäure) verhielt sich R_4 wie eine Carbonsäure (langgezogener Fleck mit Rf ca. 0,32; Glucuronsäure 0,29).

Nach enzymatischer Hydrolyse von R_4 mit β -Glucuronidase wurden die Zucker silyliert [13] und gas-chromatographisch untersucht (gepackte Glaskolonne, 2 m, 2,7 mm i. D., 3% Siliconöl SE-30 auf Gas-Chrom P, 155° , N_2 als Trägergas, System B: Glaskapillare, 30 m, 0,3 mm i. D., SE-52, 140° , H_2 als Trägergas). Dabei wurden Glucuronsäure und Glucose nachgewiesen und durch Mischchromatographie mit authentischem Material identifiziert.

Erschöpfende Methylierung von R_4 (R_4 wurde durch Dowex 50W \times 12 (H^+) filtriert, die freie Säure in H_2O -Methanol (1:10) mit Diazomethan verestert und anschliessend während 24 Std. in Dimethylformamid-Dimethylsulfoxid (1:1) mit Dimethylsulfat, BaO und $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8 \cdot \text{H}_2\text{O}$ methyliert [16]) und Reinigung der Produkte durch präparative Dünnschichtchromatographie (Kieselgel HF₂₅₄ «Merck», Benzol-Äthanol 5:1 [15]) gab eine Hauptfraktion (Rf 0,5), welche durch kombinierte Gas-Chromatographie-Massenspektrometrie (LKB Gas-Chromatograph-Mass Spectrometer Type 9000, 70 eV, gepackte Glaskolonne, 2,5 m, 4 mm i. D., 1% SE-30 auf Chromosorb W, 206° , Ionenquelle 250° , 32 ml He/min als Trägergas) untersucht wurde. Es wurden im wesentlichen zwei grosse, nicht vollständig getrennte Pike mit Retentionszeiten von 7,9 und 9,0 min beobachtet. Der erste wies zudem im aufsteigenden Ast eine Schulter bei 7,5 min auf. Das Massenspektrum der Schulter bei 7,5 min zeigte die typischen Fragmentionen eines permethylierten (1 \rightarrow 6)-Aldobiouronsäuremethylesters [16] [17] mit den wesentlichsten Signalen bei m/e 437 ($M^+ - \text{OCH}_3$), 367 (das für (1 \rightarrow 6)-Aldobiouronsäuren typische Ion baD_1^7), 279 (abJ_1), 233 (aA_1) und 219 (bA_1). Typisch ist das Fehlen des Ions baF_1 bei m/e 319.

7) Die Fragment-Ionen werden mit den Symbolen nach [17] bezeichnet.

Der Pik bei 7,9 min gab das Fragmentierungsspektrum eines permethylierten (1 → 4)-Aldobiouronsäure-methylesters [16] [17] mit den wesentlichsten Signalen bei m/e 437 ($M^+ - OCH_3$), 319 (baF_1 , typisch für (1 → 2)- und (1 → 4)-Aldobiouronsäuren), 279 (abJ_1), 233 (aA_1), 219 (baA_1) und 161 (bB_3 , kann nur bei (1 → 4)-, nicht aber bei (1 → 2)-Aldobiouronsäuren auftreten). Das Signal des Ions H_1 bei m/e 88 war auffallend klein, was im Zusammenhang mit dem Auftreten von Signalen bei m/e 333 (abE_2) und m/e 103 ($CH_3OOC-CH=OCH_3$)[⊕] für eine furanoside Form des Uronsäureteils spricht [16].

Der Pik bei 9,0 min zeigte ebenfalls das für einen permethylierten (1 → 4)-Aldobiouronsäure-methylester charakteristische Fragmentierungsverhalten mit Signalen bei m/e 437 ($M^+ - OCH_3$), 423 ($M^+ - CH_2OCH_3$), 379 ($baB_1 - CH_3$, entsteht analog zur Bildung des Ions bB_3 aus baB_1 von (1 → 4)-Aldobiouronsäuren und kann mit der Masse 379 nur bei (1 → 2)- und (1 → 3)-Aldobiouronsäuren auftreten), 319 (baF_1), 279 (abJ_1), 233 (aA_1), 219 (baA_1) und 161 (bB_3). Auch hier weist die geringe Intensität des Ions H_1 bei m/e 88 sowie das Vorhandensein von Signalen bei m/e 333 (abE_2) und m/e 103 ($CH_3OOC-CH=OCH_3$)[⊕] auf eine furanoside Form des Uronsäureteils hin.

Somit besteht das Azopigment B_4 aus drei Komponenten, die sich im Kohlehydratanteil unterscheiden und im Mengenverhältnis von 1:15:10 auftreten. Den drei Komponenten weisen wir vorläufig die folgenden Strukturen zu (acyl = Phenylazoverbindung des Bilirubins) (im Formelschema von oben nach unten):

- Acyl-(6-O-Hexopyranosyluronsäure-hexosid),
- Acyl-(4-O-Hexofuranosyluronsäure-glucosid) und
- Acyl-(4-O-(β-D-glucofuranosyluronsäure)-glucosid).

Azopigment B_5 wurde durch 0,05 N NaOH (30 min, 20°) zur Phenylazoverbindung des Bilirubins hydrolysiert. Das Lichtabsorptionsspektrum war identisch mit demjenigen der Phenylazoverbindung des Bilirubins. Aus dem spezifischen Extinktionskoeffizienten bei 514 nm ($39,9 \text{ l g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) errechnete sich für Azopigment B_5 ein Molekulargewicht von 740. Das IR.-Spektrum war praktisch identisch mit demjenigen von Azopigment B_4 . P und S fehlen. Die quantitative Uronsäurebestimmung [12] ergab 1,3 Mol Uronsäure pro Mol Azopigment. Durch β-Glucuronidase liess sich der Pigmentteil (Phenylazoverbindung des Bilirubins) quantitativ abspalten.

Verseifung von Azopigment B_5 und Isolierung der wasserlöslichen Komponente R_5 erfolgte wie bei Azopigment B_4 . $R_f = 0,3$ bezogen auf Glucuronsäure, brauner Fleck mit Anilinphtalat. Auf DEAE-Cellulose (0,2 N Essigsäure) verhielt sich R_5 ebenfalls als Carbonsäure (langgezogener Fleck mit R_f 0,21 (Glucuronsäure 0,38). Das IR.-Spektrum von R_5 zeigte Banden bei 3460–2400 (OH, NH_4^+), 2950 (CH), 1605 (COO^-), 1422, 1300, 1180–920 (Äther) und 793 cm^{-1} .

Kombinierte Gas-Chromatographie-Massenspektrometrie nach saurer Hydrolyse von R_5 und Silylierung der Hydrolyseprodukte (R_5 wurde mittels Dowex 50W × 12 (H^+) in die freie Säure übergeführt, diese im zugeschmolzenen Glasrohr mit 0,1 N HCl bei 100° während 1 Std. hydrolysiert und die Hydrolysenprodukte silyliert [13]) ergab (Kolonnentemperatur 155°) das Vorliegen von Glucuronolacton und Glucuronsäure. Ausserdem wurden im Gas-Chromatogramm fünf weitere Pike gefunden mit Retentionszeiten (bezogen auf β-Glucurono-6,3-lacton von 0,51 (klein), 0,61 (klein),

0,70 (gross), 0,88 (klein) und 1,51 (klein) min. Drei dieser Pike (Retentionszeiten 0,51, 0,61, 0,70 min) ergaben Massenspektren eines Hexuronolactons. Nach direktem Vergleich mit den Lactonen von Iduron-, Mannuron- und Guluronsäure konnte als Struktur für das unbekannte Lacton eine unverzweigte C-Kette ausgeschlossen werden. Da die zugrunde liegende Hexuronsäure unter den Bedingungen der Hydrolyse drei isomere Lactone bildet (siehe oben), kommen als Struktur entweder eine 2-C-(Carboxyhydroxymethyl)-threose oder eine 3-C-Hydroxymethyl-riburonsäure in Frage. Auf Grund des Fragmentierungsverhaltens⁸⁾ schliessen wir erstere aus. Letztere ist bisher noch nicht bekannt.

Weitere Untersuchung von R_5 mittels Filtration durch *Dowex* 50W \times 12 (H^+), Veresterung der freien Säure mit Diazomethan, Acetylierung des Esters mit Pyridin-Essigsäureanhydrid und dünnschichtchromatographische Reinigung auf Kieselgel HF₂₅₄ mit $CHCl_3$ -Essigester (10:6) ergab ein kristallines Disaccharidderivat mit $[\alpha]_D^{21} = +92^\circ$ ($c = 0,17\%$, $CHCl_3$). Permethylierung war wegen Alkali-Labilität nicht möglich, so dass keine Massenspektren aufgenommen werden konnten.

Dem Azopigment B_5 weisen wir auf Grund obengenannter Befunde die vorläufige Struktur einer Acyl-(4-O-(3-C-hydroxymethyl-ribofuranosyluronsäure)- β -D-glucosiduronsäure) zu (Acyl = Acylrest der Phenylazoverbindung des Bilirubins).

Azopigment B_6 liess sich mit 0,05N NaOH (30 min, 20°) zur Phenylazoverbindung der Vinylneoxanthobilirubinsäure [18] hydrolysieren. Das Lichtabsorptionsspektrum von Azopigment B_6 war identisch mit demjenigen der Phenylazoverbindung des Bilirubins. Aus dem spezifischen Extinktionskoeffizienten bei 514 nm ($41,1 l g^{-1} cm^{-1}$) errechnet sich für Azopigment B_6 ein Molekulargewicht von 720. Das IR.-Spektrum war nahezu identisch mit demjenigen der Azopigmente B_4 und B_5 . P- und S-Nachweise verliefen negativ. Die quantitative Uronsäurebestimmung [12] ergab 1,2 Mol Uronsäure pro Mol Azopigment. Durch β -Glucuronidase liess sich die Phenylazoverbindung der Vinylneoxanthobilirubinsäure quantitativ abspalten.

Die Verseifung von Azopigment B_6 und die Isolierung seiner wasserlöslichen Komponente R_6 erfolgte wie bei Azopigment B_4 . Rf-Wert 0,50, bezogen auf Glucuronsäure (kirschroter Fleck mit Anilinphthalat). Auf DEAE-Cellulose mit 0,2N Essigsäure verhielt sich R_6 wie eine Carbonsäure. Das IR.-Spektrum von R_6 war nahezu identisch mit demjenigen von R_5 .

Saure Hydrolyse von R_6 (1N HCl, 1 Std., 100°), Silylierung des Rückstandes und Gas-Chromatographie der Produkte ergab das Vorliegen von Glucose und Glucuronsäure. Das Disaccharid konnte als acetylierter Methylester (Filtration durch *Dowex* 50W \times 12 (H^+), Veresterung mit Diazomethan, Acetylierung mit Pyridin-Essigsäureanhydrid und Dünnschichtchromatographie an Kieselgel HF₂₅₄, $CHCl_3$ -Essigester 10:6) aus absolutem Äthanol kristallisiert werden; $[\alpha]_D^{21} = +94^\circ$ ($c = 0,31\%$, $CHCl_3$). Durch Anwendung der Isorotationsregel von *Hudson* [19] auf die Acetate von Glucose und Glucuronsäure-methylester [20] kann aus dem Drehwert eine α -D-glucosidische Bindung in R_6 abgeleitet werden. Die Werte passen am besten auf eine glucuronoside Struktur. Auch dieses Disaccharid war alkali-labil.

Dem Azopigment B_6 weisen wir auf Grund dieser Befunde die vorläufige Struktur einer Acyl-4-O- α -D-glucosiduronsäure zu (Acyl = Acylrest der

⁸⁾ Siehe [1].

Phenylazoverbindung der Vinylneoxanthobilirubinsäure). Es handelt sich demnach um das Glycosid einer *Pseudoaldobiouronsäure* (Abspaltung des intakten Disaccharides durch β -Glucuronidase). Die Phenylazoverbindung der Vinylneoxanthobilirubinsäure ist eines der beiden Isomere, welche bei der Azokupplung des Bilirubins entstehen. Sie enthält die Ringe I und II des Bilirubins.

Diskussion. – Vorliegende Arbeit zeigt, dass die Bilirubinkonjugate der menschlichen Galle viel komplexere Strukturen besitzen als bisher vermutet worden ist. Offensichtlich sind neuartige Disaccharide mit Glucuronsäure und anderen Uronsäuren wichtig. Der Nachweis einer Pseudoaldobiouronsäure beim Menschen ist unseres Wissens neu. Die Ergebnisse haben auch das Vorliegen einer neuartigen, verzweigten Hexuronsäure wahrscheinlich gemacht. Die verwendete Azospaltung erlaubt es nicht, Strukturen für die nativen Bilirubinkonjugate anzugeben; Bilirubin kann an den beiden Propionsäureketten durch gleichartige oder verschiedene Disaccharide verestert sein.

Diese Arbeit wurde finanziell durch die *Fritz-Hoffmann-La-Roche-Stiftung zur Förderung wissenschaftlicher Arbeitsgemeinschaften in der Schweiz* ermöglicht, wofür wir unseren besten Dank aussprechen. Menschliche Galle wurde uns in verdankenswerter Weise von den Herren Dr. E. Kaiser † und Dr. M. Landolt (Zürich) geliefert. Vinylneoxanthobilirubinsäure-methylester zu Vergleichszwecken verdanken wir Herrn Prof. H. Plieninger (Heidelberg). Seltene Zucker erhielten wir von den Herren Dr. K. von Berlepsch (Basel), Dr. A. Haug (Trondheim), Prof. B. Helferich (Bonn), Dr. Y. Hirasaka (Tokyo), Prof. G. Jayme (Darmstadt), Dr. K. Matsuda (Sendai), Prof. H. Neukom (Zürich), Prof. T. Reichstein (Basel) und Dr. W. J. Whelan (Miami). Enzyme wurden uns von den Herren Prof. R. Gitzelmann und Prof. G. Semenza (Zürich) zur Verfügung gestellt. Herrn Prof. R. Gitzelmann verdanken wir auch die Erlaubnis zur Benützung seines Gas-Chromatographen. Eine Kapillarkolonnie für die Gas-Chromatographie lieferte uns Herr Prof. K. Grob (Zürich). Spektroskopische Untersuchungen und Analysen wurden uns durch die Herren Prof. W. von Philipsborn, Dr. C. Mayer, Dr. W. Trüb, Dr. T. Winkler (NMR.), Dr. A. Chang (GC-MS.) und H. Frohofer (IR., optische Drehung, Verbrennungsanalysen) ermöglicht.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] C. C. Kuenzle, *Biochem. J.* 119, im Druck.
- [2] B. H. Billing, P. G. Cole & G. H. Lathe, *Biochem. J.* 65, 774 (1957).
- [3] R. Schmid, *J. biol. Chemistry* 229, 881 (1957).
- [4] E. Talafant, *Nature* 178, 312 (1956).
- [5] C. H. Gregory & C. J. Watson, *J. Lab. clin. Med.* 60, 17 (1962).
- [6] K. J. Isselbacher & E. A. McCarthy, *J. clin. Invest.* 38, 645 (1958).
- [7] R. Tenhunen, *Ann. Med. exp. Biol. Fenniae* 43, Suppl. 6 (1965).
- [8] B. A. Noir, R. J. Groszman & A. T. DeWalt, *Biochim. biophys. Acta* 117, 297 (1966).
- [9] C. C. Kuenzle, M. Sommerhalder, J. R. Rüttner & C. Maier, *J. Lab. clin. Med.* 67, 282 (1966).
- [10] C. C. Kuenzle, C. Maier & J. R. Rüttner, *J. Lab. clin. Med.* 67, 294 (1966).
- [11] H. Fischer & H. W. Haberland, *Z. physiol. Chem.* 232, 236 (1935); H. Fischer, H. Plieninger & O. Weissbarth, *ibid.*, 268, 197 (1941); J. T. G. Overbeek, C. L. J. Vink & H. Deenstra, *Rec. Trav. chim. Pays-Bas* 74, 85 (1955).
- [12] W. H. Fishman & S. Green, *J. biol. Chemistry* 215, 527 (1955).
- [13] C. C. Sweeley, R. Bentley, M. Makita & W. W. Wells, *J. Amer. chem. Soc.* 85, 2497 (1963).
- [14] R. Kuhn & H. Trischmann, *Chem. Ber.* 96, 284 (1963).
- [15] K. Wallenfels, G. Bechtler, R. Kuhn, H. Trischmann & H. Egge, *Angewandte Chemie* 75, 1014 (1963).
- [16] K. Heyns, H. F. Grützmaier, H. Scharmann & D. Müller, *Fortschr. chem. Forsch.* 5, 448 (1966); N. K. Kochetkov & O. S. Chizhov, *Adv. Carbohydr. Chemistry* 21, 39 (1966).
- [17] V. Kováčik, Š. Bauer, J. Rosik & P. Kováč, *Carbohydr. Res.* 8, 282 (1968).
- [18] H. Fischer & H. Plieninger, *Z. physiol. Chem.* 274, 231 (1942).
- [19] C. S. Hudson, *J. Amer. chem. Soc.* 31, 66 (1909).
- [20] A. K. Bose & B. G. Chatterjee, *J. org. Chemistry* 23, 1425 (1958).