

Beiträge zur Chemie der Sklerodermeen

von

M. Bamberger und A. Landsiedl.

Aus dem Laboratorium für allgemeine Experimentalchemie an der k. k. technischen Hochschule in Wien.

(Vorgelegt in der Sitzung am 23. Juni 1905.)

I. *Lycoperdon Bovista*.

Gelegentlich einer früheren Untersuchung¹ haben wir im Capillitium ausgereifter Exemplare von *Lycoperdon Bovista* sowie einiger anderer *Lycoperdon-Arten* Harnstoff nachgewiesen. Das bemerkenswerte Vorkommen dieses bis dahin im Pflanzenreiche noch nicht beobachteten Stoffes in den genannten Pilzen veranlaßte uns, Boviste in verschiedenen Wachstumsstadien zu untersuchen, um über den Zeitpunkt des Auftretens sowie eventuell auch über die Art der Entstehung des Harnstoffes Aufschluß zu gewinnen. Indessen wurde unsere erste Beobachtung durch eine auf Veranlassung des Geh. Regierungsrates E. Schmidt von R. Gaze² ausgeführte Untersuchung bestätigt und überdies konstatiert, daß der Harnstoff bereits im unreifen Bovist vorhanden ist. Dieser letztere Nachweis gelang uns wohl nicht, was jedoch in dem Gange unserer Untersuchung gelegen sein dürfte; dagegen fanden wir den Harnstoff in der wässerigen Flüssigkeit, welche beim Eintritt der Reife durch die Differenzierung des Hymeniums zur Ausscheidung gelangt.

Im folgenden geben wir in Kürze den Verlauf unserer Untersuchung.

¹ Sitzungsberichte der kaiserl. Akademie der Wissenschaften in Wien Bd. CXII, Abt. II b, März 1903; Monatshefte für Chemie 1903, p. 218.

² Archiv der Pharm. 1905, p. 79.

Zwei unreife, aus dem Pitztale in Tirol stammende Boviste von je 3 bis 4 kg wurden drei Tage nach dem Einsammeln in kleine Stücke zerschnitten, in 96%igem Weingeist eingelegt und unter Luftabschluß einige Wochen stehen gelassen. Der gebildete Extrakt (*A*) wurde koliert und abgepreßt und der Preßrückstand sofort mit 96%igem Weingeist ausgekocht (Extrakt *B*).

Untersuchung des Extraktes *A*.

Von diesem wurde der Alkohol abdestilliert und die übrig bleibende wässerige Lösung nach dem Abfiltrieren der ausgeschiedenen fettigen Masse mit Äther ausgeschüttelt. Die von der ätherischen Lösung — welche beim Verdunsten ein schweres, dunkel rotbraunes, den eigentümlichen urinösen Geruch des reifen Bovistes aufweisendes Öl hinterläßt — getrennte wässerige Flüssigkeit wurde hierauf mit Bleiessig gefällt und das Filtrat vom Bleiniederschlage mit Merkurinitrat im Überschuß versetzt. Der dabei entstandene flockige Niederschlag (*a*) wurde sofort abfiltriert, gewaschen und mit Schwefelwasserstoff behandelt. Das Filtrat vom Schwefelquecksilber ergab, mit Ammoniak neutralisiert, beim Eindunsten einen dicken Sirup, der beim Erkalten zu einem braunen Gummi erstarrte. Dieses wurde mit wenig Wasser aufgenommen, neuerdings mit Bleiessig gefällt, die vom Bleiniederschlage getrennte Lösung mit Schwefelwasserstoff vom Blei befreit, das bleifreie Filtrat mit Ammoniak bei gelinder Wärme zum Sirup konzentriert und der Kristallisation überlassen. Hierbei schied sich eine schleimige Masse aus, aus deren mit etwas Ammoniak versetzter, heißer, wässriger Lösung feine, zu Büscheln und Garben vereinigte Nadeln kristallisierten. Da sich zeigte, daß diese Kristallmasse zum Teile aus Tyrosin bestand, wurde dieselbe mit 96%igem Weingeist ausgekocht und die weingeistige Lösung zur Trockene verdunstet. Aus der heißen wässrigen Lösung des Trockenrückstandes schieden sich beim Erkalten nur feine, lange, zu Büscheln vereinigte Nadeln aus, während die geringe, beim Auskochen mit Weingeist in Lösung gegangene Tyrosinmenge in der Mutterlauge blieb.

Diese Nadeln waren weiß, seidenglänzend, enthielten viel Stickstoff und waren nicht ohne Zersetzung schmelzbar. Im Kapillarröhrchen erhitzt, färbten sich dieselben gegen 215° gelb und gegen 240° dunkelbraun, ohne zu schmelzen. Leicht löslich in Natronlauge, gehen sie in konzentrierte Schwefelsäure mit gelbroter Farbe über. Mit verdünnter Salpetersäure (1:1) verdunstet, geben sie einen zitronengelben Rückstand, der durch Ammoniak nur wenig dunkler, durch Natronlauge aber tief rotgelb gefärbt wird. Mit Mörner's Tyrosinreagens geben dieselben beim Kochen eine intensiv gelbbraune Lösung, ebenso mit verdünnter Schwefelsäure allein. Ihre wässrige Lösung geseht, wenn sie nicht zu stark verdünnt ist, mit Silbernitrat sofort zu einer durchsichtigen Gallerte, während in verdünnten Lösungen eine nur schwer wahrnehmbare, gallertig-flockige Ausscheidung erfolgt, die bei Zusatz von Barytwasser in einen weißen, opaken Niederschlag übergeht. Mit Bleiessig gibt die wässrige Lösung der Substanz nur Trübung, aber bei nachherigem Zusatz eines Tropfens Ammoniak eine starke, weiße, flockige Fällung. In der mit Schwefelsäure angesäuerten wässrigen Lösung gibt Phosphorwolframsäure einen gelben, pulverig-flockigen Niederschlag.

Die Elementaranalyse ergab das folgende Resultat:

- I. 0·1916 g der bei 108° getrockneten Substanz ergaben bei der Verbrennung 0·2852 g Kohlensäure und 0·0820 g Wasser.
- II. 0·0919 g der bei 103° getrockneten Substanz gaben $20\cdot8\text{ cm}^3$ Stickstoff bei 15° C. und 758 *mm*.

In 100 Teilen somit:

C	40·59
H	4·79
N	26·24

Leider verfügten wir nicht über genug Material, um diesen Körper näher untersuchen zu können.

Das Filtrat vom Merkurinitratniederschlage *a* (p. 1110) trübte sich nach kurzem Stehen wieder und schied nun einen

rötlichgelben, feinkrümligen Niederschlag aus, der nach mehrtägigem Stehen abfiltriert, gewaschen und mit Schwefelwasserstoff behandelt wurde. Das vom Schwefelquecksilber heiß getrennte Filtrat ergab, mit Ammoniak versetzt, beim Eindunsten auf dem Wasserbade weiße, kristallinische Krusten, deren heiße, wässrige Lösung beim Erkalten zu einem Brei nadelförmiger Kristalle gestand, welche durch Umkristallisieren aus Wasser und ammoniakhaltigem Weingeist weiter gereinigt und schließlich vollkommen farblos erhalten wurden. Die feinen, zu

Dagegen beschreibt Hofmann¹ eingehend einige charakteristische Reaktionen, welche seine Ergosterine gaben, und da unsere Präparate dieselben in genau übereinstimmender Weise zeigen, so könnte an eine Identität dieser Körper gedacht werden, zumal die Unterschiede in den Schmelzpunkten immerhin durch geringe Verunreinigungen verursacht sein können.

Unsere Ergosterine kristallisieren aus Äther in langen, gestreiften Nadeln, die in heißem Äther leicht, in kaltem viel weniger und in Alkohol noch weniger, dagegen in Chloroform sehr leicht löslich sind. Versetzt man die warme ätherische Lösung mit zirka $\frac{1}{2}$ Volumen Alkohol und stellt zur freiwilligen Verdunstung, so erfolgt die Ausscheidung in sehr schönen Nadeln; aus heißem Weingeist erhält man dünne sechseckige Plättchen mit rhombischer Fläche, welche bei I (siehe Tabelle p. 1113) langgestreckt, bei II ziemlich gleich breit und lang sind.

Beide Substanzen sind in konzentrierter Schwefelsäure leicht löslich; die rein gelbbraune Lösung läßt beim Ausschütteln mit Chloroform dieses ungefärbt und gibt mit Wasser eine grüne Ausscheidung, wie dies nach Tanret beim Ergosterin der Fall ist. Wie wir fanden, geht die letztere beim Ausschütteln mit Chloroform mit dunkel smaragdgrüner Farbe in Lösung, während die überstehende wässrige Schwefelsäure leicht milchig getrübt erscheint. Reines animalisches Cholesterin, welches wir der Güte des Herrn Prof. Suida verdanken, gab bei gleicher Behandlung eine kaum merklich grün gefärbte Chloroform-, aber stark milchig getrübt Schwefelsäureschicht. Versetzt man bei unseren Ergosterinen

später erwähnten, aus dem Filtrate von *b* erhaltenen Kristallisation, die wesentlich dasselbe, und zwar ein cholesterinartiges Verhalten zeigte, vereinigt wurden.

Wie sich ergab, bestand die gesamte Kristallmasse aus einem Gemenge mehrerer, zum Teile einander sehr ähnlicher und schwer zu trennender Körper, unter denen, wie sich leicht nachweisen ließ, eine mit Tanret's Ergosterin nahe verwandte oder damit identische Substanz vorhanden sein mußte.

Durch eine sehr mühsame fraktionierte Kristallisation aus Äther, Essigester und Alkohol gelang es uns schließlich auch zwei ergosterinartige Körper von konstantem Schmelzpunkte zu isolieren. Leider war aber die Menge derselben so gering, daß wir uns auf das Studium einiger Reaktionen beschränken mußten.

Beide Substanzen zeigen im wesentlichen das von Tanret¹ und Gérard² für das Ergosterin angegebene Verhalten, weichen aber in ihren Schmelzpunkten, wie die folgende Zusammenstellung zeigt, nicht unbedeutend von dem Ergosterin dieser beiden Forscher ab.

	Schmelzpunkt
Ergosterin von Tanret und Gérard ³	154
Ergosterin I von Bamberger und Landsiedl ..	158—159°
» II » » » » ..	163·5—164°

Hofmann⁴ erhielt ergosterinartige Körper aus *Boletus edulis*, *Agaricus campestris* und *Cantharellus cibarius* mit den Schmelzpunkten 160°, beziehungsweise 158°.

E. Schulze und Barbieri⁵ stellten aus Keimlingen der gelben Lupine (*Lupinus luteus*) unter anderem einen cholesterinartigen Körper vom Schmelzpunkte 158 bis 159°, den sie Caulosterin benannten, dar. Es ist jedoch über denselben zu wenig bekannt, um einen Vergleich anstellen zu können.

¹ Ann. chim. phys. (6), 20, 289.

² Comptes rend. 121, 723.

³ Journ. de pharm. (5) 23, 7.

⁴ Über die chem. Bestandteile einiger Pilze. Inaug. Dissertat. Zürich 1901, p. 31 und 39.

⁵ Journ. f. prakt. Ch. (2) 25, 165.

Dagegen beschreibt Hofmann¹ eingehend einige charakteristische Reaktionen, welche seine Ergosterine gaben, und da unsere Präparate dieselben in genau übereinstimmender Weise zeigen, so könnte an eine Identität dieser Körper gedacht werden, zumal die Unterschiede in den Schmelzpunkten immerhin durch geringe Verunreinigungen verursacht sein können.

Unsere Ergosterine kristallisieren aus Äther in langen, gestreiften Nadeln, die in heißem Äther leicht, in kaltem viel weniger und in Alkohol noch weniger, dagegen in Chloroform sehr leicht löslich sind. Versetzt man die warme ätherische Lösung mit zirka $\frac{1}{2}$ Volumen Alkohol und stellt zur freiwilligen Verdunstung, so erfolgt die Ausscheidung in sehr schönen Nadeln; aus heißem Weingeist erhält man dünne sechseckige Plättchen mit rhombischer Fläche, welche bei I (siehe Tabelle p. 1113) langgestreckt, bei II ziemlich gleich breit und lang sind.

Beide Substanzen sind in konzentrierter Schwefelsäure leicht löslich; die rein gelbbraune Lösung läßt beim Ausschütteln mit Chloroform dieses ungefärbt und gibt mit Wasser eine grüne Ausscheidung, wie dies nach Tanret beim Ergosterin der Fall ist. Wie wir fanden, geht die letztere beim Ausschütteln mit Chloroform mit dunkel smaragdgrüner Farbe in Lösung, während die überstehende wässrige Schwefelsäure leicht milchig getrübt erscheint. Reines animalisches Cholesterin, welches wir der Güte des Herrn Prof. Suida verdanken, gab bei gleicher Behandlung eine kaum merklich grün gefärbte Chloroform-, aber stark milchig getrübt Schwefelsäureschicht. Versetzt man bei unseren Ergosterinen die von der wässrigen Schwefelsäure getrennte Chloroformlösung mit einem Tropfen Ammoniak, Natronlauge oder kohlensaurem Natron etc., so geht die grüne Farbe derselben sofort in ein helles Rotbraun über.

Die zuerst von Hesse² für das Cholesterin und Phytosterin angegebene und von Gérard (l. c.) in modifizierter Form auf das Ergosterin angewendete Reaktion (Schütteln der Chloroform-, nach Gérard Kohlenstofftetrachloridlösung mit Schwefel-

¹ L. c. p. 32.

² Ann. chem. Pharm. 211, 286.

säure von 1·76 spezifisches Gewicht) geben unsere Substanzen in folgender Weise: Das Gemisch der Tetrachloridlösung mit etwa dem gleichen Volumen der Schwefelsäure färbt sich rasch gelbrot dann himbeerrot und die sich abscheidende Schwefelsäure bräunlichgelb. Im Verlaufe von etwa einer Stunde verfärbt sich die Tetrachloridlösung durch Violett in Grün und wird schließlich fast farblos gelb, während die Schwefelsäurelösung ihre ursprüngliche bräunlichgelbe Färbung nahezu unverändert beibehält. Wird Chloroform anstatt Kohlenstofftetrachlorid genommen, so geht die Reaktion ganz ähnlich vor sich. Verschieden verhalten sich die beiden Lösungsmittel aber dann, wenn man anstatt ungefähr des gleichen Volumens Schwefelsäure nur einen Tropfen zusetzt, indem in diesem Falle die Rotfärbung nur in der Kohlenstoffchloridlösung deutlich auftritt.

Einen höchst charakteristischen, auch von Hofmann (l. c. p. 32) an seinem Präparate beobachteten Verlauf nimmt die Liebermann-Burchard'sche Reaktion¹ bei unseren Substanzen, indem beim Zusatz der konzentrierten Schwefelsäure zu der vorschriftsmäßig mit Essigsäureanhydrid versetzten Chloroformlösung sofort eine sehr intensive blutrote Färbung eintritt, die in wenigen Sekunden durch Purpur, Violett und Blau in Dunkelsmaragdgrün übergeht, das lange bestehen bleibt. In ganz gleicher Weise geht die Reaktion vor sich, wenn anstatt Chloroform Kohlenstofftetrachlorid genommen wird.

Mit dem Hirschsohn'schen Reagens² (einer konzentrierten Auflösung von Trichloressigsäure in Salzsäure von 1·12 spezifisches Gewicht) erhielten wir die folgende Reaktion: In wenigen Minuten gelb bis bräunlichgelbe Färbung, die im Verlaufe mehrerer Stunden in Blutrot übergeht.

Vergleichsweise haben wir diese Reaktionen auch mit reinem animalischen Cholesterin angestellt. Das Resultat dieser Versuche geben wir in der folgenden Zusammenstellung.

1. Hesse'sche Reaktion: Chloroformlösung in einigen Minuten blutrot, Schwefelsäure hell bräunlichgelb.

¹ H. Burchard, Beiträge zur Kenntnis der Cholesterine. Rostock 1889.

² Pharmazeut. Zentralhalle, 43, 357; Chem. Zentralbl. 1902, II, 479.

2. Gérard'sche Reaktion: Kohlenstofftetrachloridlösung schwach rötlichgelb, Schwefelsäure farblos, stark milchig getrübt.

3. Liebermann-Burchard'sche Reaktion: Beim Zusatz der konzentrierten Schwefelsäure tritt erst in einigen Sekunden eine blauviolette, sehr rasch durch Blau in Spangrün übergehende Färbung ein.

4. Hirschsohn'sche Reaktion: In einigen Minuten rötlichgelb, in etwa $\frac{1}{2}$ Stunde blutrot und nach 5 bis 6 Stunden lila gefärbt.

Schließlich bemerken wir noch, daß wir eine Veränderlichkeit unserer Präparate auch bei mehrmonatlichem Liegen an der Luft, wie sie Tanret und Gérard¹ für ihr Ergosterin angeben, nicht beobachten konnten.

Das Filtrat von der Ausscheidung *b* (p.1112) schied nach dem Abdestillieren des Alkohols, bis auf etwa $\frac{1}{4}$ seines Volumens, beim Stehen in der Kälte eine dicke, ölige, mit nadel- und plättchenförmigen Kristallen durchsetzte Masse ab, welche mit wenig Äther aufgenommen wurde. Hierbei ging hauptsächlich der ölige Anteil in Lösung, während die Kristallmasse zum größten Teil ungelöst zurückblieb; der in Lösung gegangene Anteil derselben wurde seiner Hauptmenge nach durch langsames Verdunsten des Äthers wiedergewonnen und die gesamte Kristallmenge schließlich mit der aus dem ätherischen Auszug von *b* (p. 1112) erhaltenen Kristallisation vereinigt.

2. Untersuchung des stickstoffhaltigen Anteiles.

Derselbe trocknete beim Verdunsten des anhaftenden Äthers zu einer bräunlichen, wachsartigen Masse ein, welche beim Auskochen mit Chloroform zu einer dicken Gallerte aufquoll, die nach Entfernung der Chloroformlösung zu bräunlichgelben, sich fettig anfühlenden Klumpen eintrocknete. Diese wurden fein zerrieben, mit absolutem Alkohol heiß extrahiert und der ungelöst gebliebene Rückstand mit dem der Menge nach viel geringeren, gleichartigen Produkte, welches durch Auskochen des Verdunstungsrückstandes der Chloroform-

¹ Ann. chim. pharm. (5) 23, 11.

lösung mit Äther und absolutem Alkohol gewonnen wurde, vereinigt.

Die Lösung dieser Rückstände in heißem Eisessig gab, mit heißem Wasser bis zur beginnenden Trübung versetzt, beim Erkalten eine feinkrümlige Ausscheidung, die gewaschen und im Exsikkator getrocknet, ein lockeres weißes Pulver darstellte, das sich als stickstoffhaltig, aber phosphor- und schwefelfrei erwies, von kaltem Wasser nur schwer benetzt wurde und beim Kochen damit einen Kleister gab, der einen spermaähnlichen Geruch besaß. Unlöslich in kalter Natronlauge sowie konzentrierter Schwefelsäure, wird es von letzterer beim Erwärmen unter Bräunung rasch zersetzt. Bei kurzem Kochen mit verdünnter (2%) Schwefelsäure erfolgt Zersetzung unter Bildung einer Substanz, die Fehling'sche Lösung beim Erhitzen reduziert.

Beim raschen Erhitzen im Probierröhrchen schmilzt der Körper, nach vorhergehender Bräunung, unter Entwicklung eines an verbranntes Fett erinnernden Geruches.

Beim Erhitzen im Kapillarröhrchen färbt sich derselbe gegen 165° gelb und schmilzt je nach der Dauer des vorangegangenen Erhitzens bei 180 bis 200° zu gelbbraunen Tropfen.

Die Elementaranalyse desselben lieferte das folgende Ergebnis.

- I. $0\cdot1018\text{ g}$ bei 98° getrocknete Substanz gaben $0\cdot2407\text{ g}$ Kohlensäure und $0\cdot1037\text{ g}$ Wasser.
 II. $0\cdot2340\text{ g}$ bei 98° getrocknete Substanz gaben 3 cm^3 Stickstoff bei 15° C. und 752 mm.

In 100 Teilen somit:

C $64\cdot48$
 H $11\cdot41$
 N $1\cdot48$

Diese Zusammensetzung sowie die übrigen Eigenschaften, welche dieser Körper besitzt, scheinen darauf hinzuweisen, daß derselbe zur Gruppe der Cerebroside gehört, deren Repräsentanten bisher nur im Tierreiche und auch da nur in

wenigen Organen (Gehirn, Nervenmark etc.) beobachtet wurden.

Leider war die Menge an Substanz, über welche wir verfügten, zu gering, um die Untersuchung zu einem entscheidenden Abschluß bringen zu können, und muß dieser daher einer folgenden Arbeit vorbehalten bleiben.

Als Resultat dieser Arbeit ergibt sich somit:

1. Die im Bovist beim Eintritt der Reife zur Ausscheidung gelangende wässrige Flüssigkeit enthält Harnstoff.
 2. Der junge Bovist enthält cholesterinartige Körper, von denen zwei zur Gruppe des Ergosterins gehörig und bei 158 bis 159°, beziehungsweise 163·5 bis 164° schmelzend, isoliert wurden.
 3. Derselbe enthält eine noch nicht näher identifizierte, sehr stickstoffreiche, in feinen Nadeln kristallisierende und
 4. eine anscheinend zur Gruppe der Cerebroside gehörige Substanz.
 5. Derselbe enthält neben anderen Aminosäuren auch Tyrosin.
-