

# Die spezifische Rotation der Cholalsäure, Choleïnsäure und Desoxycholsäure.

Von

**Dr. E. Vahlen,**

Assistenten am physiologisch-chemischen Institut zu Strassburg i. E.

(Der Redaction zugegangen am 19. August 1895.)

Die in chemischer wie biologischer Hinsicht wichtigsten Körper, die durch den Lebensprocess der Pflanzen und Thiere gebildet werden oder für ihn nothwendig sind, haben zum grössten Theil die merkwürdige Eigenschaft, im gelösten Zustand die Ebene des polarisirten Lichtes zu drehen. So finden wir die Eiweisskörper und die Kohlehydrate nebst einer grossen Reihe ihrer Spaltungsproducte, ferner die mit dem Namen Pflanzenalkaloïde bezeichneten stickstoffhaltigen Körper, die mit dem Pyridin in näherer Beziehung stehen, die Glucoside, Harze, ätherischen Oele, Campherarten, Pflanzensäuren, Gallensäuren, Cholestearine, Glycuronsäuren etc. etc., alle optisch activ. Im Gegensatz hierzu sind alle unmittelbaren Producte der chemischen Synthese optisch inactiv. Und so auffallend ist diese Erscheinung, dass Pasteur<sup>1)</sup> das optische Drehungsvermögen als Unterscheidungsmerkmal zwischen natürlichen und künstlich gebildeten Stoffen betrachtete und die Meinung aussprechen konnte, dass die Bildung optisch activer Substanzen ausschliesslich an den Lebensprocess gebunden sei. Nun ist allerdings diese Auffassung, an sich nur solchen genehm, die vitalistischen Anschauungen huldigen, auch experimentell und damit endgiltig zuerst durch Jungfleisch<sup>2)</sup> widerlegt worden, dem es gelang, Aethylen durch verschiedene

<sup>1)</sup> Compt. rend. 81, 128.

<sup>2)</sup> Bull. soc. chim. [2] 19, 194.

Zwischenproducte hindurch in inaktive Traubensäure zu verwandeln und diese durch Krystallisation ihres Natrium-Ammoniaksalzes in Rechts- und Linksweinsäure zu zerlegen. Aber freilich ist diese von Pasteur herrührende Methode nur in wenigen Fällen mit Erfolg angewandt worden und bis auf heute die einzige geblieben, eine racemische Verbindung durch künstlich erzeugte physikalisch-chemische Einflüsse in ihre activen Componenten zu spalten. Denn die beiden Uebrigen, welche man ebenfalls den Bemühungen von Pasteur verdankt, nehmen ihre Zuflucht zur mittelbaren oder unmittelbaren Mitwirkung von Lebewesen. Die eine beruht auf der Eigenschaft gewisser aus einer inactiven Säure und einer activen Base oder umgekehrt bestehenden Salze, beim Krystallisiren aus ihren neutralen Lösungen in die entsprechenden Salze der beiden optischen Isomeren des inactiven Antheils zu zerfallen. So zeigte sich, dass aus einer Lösung von traubensaurem Cinchonin das linksweinsaure Salz eher auskrystallisirte als das der Rechtsweinsäure und in analoger Weise umgekehrt inactives Coniin durch active Weinsäure in Rechts- und Links-Coniin gespalten werden konnte. Es wird also hier inactives Material mittelst activer, durch den Lebensprocess der Pflanzen gebildeter Substanzen in seine optischen Isomeren zerlegt. Im zweiten Falle unterwirft man die racemische Verbindung der unmittelbaren Einwirkung von Lebewesen. Wiederum ist die Traubensäure die erste Substanz, an welcher diese Erscheinung wahrgenommen wurde. Pasteur liess auf einer Lösung von traubensaurem Ammoniak, der eine geringe Menge Phosphat zugesetzt worden war, Penicillium wuchern und es zeigte sich nach einiger Zeit, dass in der Lösung nunmehr linksweinsaures Ammoniak enthalten war, während das rechtsdrehende Salz verzehrt worden war. Diese Methode fand zur Spaltung zahlreicher racemischer Verbindungen Anwendung, indem sich hierzu nicht nur der Schimmel, sondern auch Spalt- und Sprosspilze als brauchbar erwiesen. Namentlich die letzteren haben bei den berühmten Zuckersynthesen E. Fischer's eine hervorragende Rolle gespielt. Inficirte er die Lösung von synthetisch erzeugter, in-

activer  $\alpha$ -Akröse mit Bierhefe, so blieb nach der Gährung rechtsdrehende Lävulose zurück, während die linksdrehende zersetzt worden war. In derselben Weise wurde von ihm auch die synthetische, inactive Mannose gespalten. Ebenso wie hier, wo man durch die Lebensthätigkeit niedriger Organismen gewissermaassen unter seinen Augen optisch active Substanzen aus inactiven entstehen sieht, so sind auch die in den höher entwickelten Pflanzen aus einfachsten Verbindungen oder den Elementen aufgebauten Substanzen zum grössten Theil optisch activ. Ob hierbei, was für einige Fälle sicherlich zutrifft, immer zuerst inactive Substanzen gebildet und diese dann in Analogie mit der Wirkung der Pilze weiter in ihre optischen Isomeren gespalten würden, ist völlig unentschieden und es existirt auch gar kein Anhaltspunkt zu irgendwelcher Vermuthung. Da der thierische Organismus das Material, aus dem er seinen Leib aufbaut oder mit dessen chemischen Spannkräften er die Ausgaben an lebendiger Energie bestreitet, schon fertig gebildet, aus der Hand der Pflanzen empfängt, so begreift es sich, dass auch die aus seinem Körper gewonnenen Substanzen zum grössten Theil optisch activ sind. Ob er aber ebenfalls im Stande ist, aus optisch inactiven Substanzen synthetisch active zu erzeugen, ist bisher nicht dargethan. Denn der von van t'Hoff<sup>1)</sup> in dieser Hinsicht angeführte Fall, der der einzige ist, der überhaupt in Betracht kommen könnte, nämlich die von Baumann und Preusse<sup>2)</sup> entdeckte Entstehung von optisch activer Bromphenylmercaptursäure in Hunden, die mit inactivem Brombenzol gefüttert worden waren, gehört, da dieselbe ein Derivat des activen Alanins, einem Spaltungsproduct der im Organismus vorhandenen Eiweisskörper ist, nicht eigentlich hierher. Ebenso wenig ist die Fähigkeit thierischer Organismen, eine racemische Verbindung in derselben Weise wie Pilze in ihre optischen Isomeren zu zerlegen, indem die eine verzehrt, die andere mehr oder weniger unberührt zurückgelassen

<sup>1)</sup> Lagerung der Atome im Raum, 2. Aufl., S. 29.

<sup>2)</sup> Zeitschrift für Physiolog. Chemie, Bd. V, S. 309 und Berichte d. D. chemisch. Gesellschaft, Bd. XV. S. 1731.

wird, unzweifelhaft dargethan. In den von Araki und Hoppe-Seyler<sup>1)</sup> berichteten Versuchen, in denen nach subcutaner Injection von gährungsmilchsaurem Natron in mit CO vergiftete Kaninchen diese ein Gemenge von Gährungsmilchsäure und Paramilchsäure ausschieden, lässt sich nicht entscheiden, ob diese letztere ganz und gar aus dem Material des Organismus oder doch zum Theil aus der eingespritzten Gährungsmilchsäure gebildet ist. Sind demnach schon die Beziehungen der rein vegetativen Vorgänge im thierischen Organismus, die doch zunächst mit den in den Pflanzen ablaufenden Processen in Parallele zu stellen sind, zur optischen Activität organischer Substanzen noch sehr in Dunkel gehüllt, so ist über den möglicher Weise verschiedenen Einfluss optischer Isomeren auf Nerven-, Muskel- oder Sinnesreizung so gut wie gar nichts auszusagen. Derartige Versuche können mit Alkaloiden ausgeführt werden, die in entgegengesetzt optisch activen Isomeren vorhanden sind. Es zeigte sich nun beim Coniin, wie Falk<sup>2)</sup> angibt, dass das natürliche rechtsdrehende in seiner qualitativen Wirkung wie in seiner tödtlichen Dosis auf weiße Mäuse mit dem synthetischen inactiven  $\alpha$ -Propylpiperidin Ladenburg's, das dieser durch fractionirte Krystallisation seines weinsauren Salzes in seine optischen Isomeren spalten konnte, vollständig übereinstimmt. Freilich würde dies nur dann endgiltig beweisen, dass hier zwei optisch isomere Körper von entgegengesetzter Activität sich vollständig gleich gegen den Säugethierorganismus verhielten, wenn feststände, dass die specifische pharmakologische Wirkung dieses Alkaloides an derselben Atomgruppe im Molecül gebunden ist, wie seine optische Activität. Vom Cocain geben Michaelis und Ruhl<sup>3)</sup>, die es in seinen beiden optischen Isomeren darstellen konnten, an, dass das Rechts-Cocain im Ganzen so wie das gewöhnliche Cocain wirke, nur mit der Ausnahme, dass bei ersterem die locale anästhetisirende Wirkung rascher eintrete und in kürzerer Zeit wieder

<sup>1)</sup> Zeitschrift für physiol. Chemie, Bd. XIX, S. 455 u. Bd. XX, S. 374.

<sup>2)</sup> Berichte der D. chem. Ges., Bd. XIX, S. 2381.

<sup>3)</sup> Berichte der D. chem. Ges., Bd. XXIII, S. 474.

verschwinde. Mit dem jetzt ebenfalls in zwei entgegengesetzt optischen Modificationen vorhandenen Atropin scheinen Versuche bisher nicht angestellt zu sein.

Ganz und gar nicht in die Reihe der hier besprochenen Erscheinungen gehören die zuerst von Külz<sup>1)</sup> mitgetheilten Erfahrungen, die später mannigfach bestätigt wurden und von Minkowski<sup>2)</sup> auch an pankreasberaubten Hunden gemacht werden konnten, dass Lävulose von Zuckerkranken leichter verbrannt wird als Dextrose. Denn hier handelt es sich ja gar nicht um optisch isomere Körper von entgegengesetztem Drehungsvermögen, sondern um Substanzen von verschiedenem chemischen Bau. Und es wäre wohl möglich, dass sämtliche Ketosen, denen die Lävulose zugehört, leichter im Säugethierorganismus verbrannt würden als die Aldosen wie die Dextrose. Wollte man feststellen, ob ebenso wie die Pilze auch die Säugethierzellen von mehreren optischen Isomeren die einen bevorzugt, so müsste man sich der synthetisch dargestellten Zucker bei den Versuchen bedienen.

So spärlich auch an Zahl die Thatsachen sind, welche einen Zusammenhang zwischen optischer Isomerie und den in den Lebewesen ablaufenden, mannigfaltigen Umwandlungen der Materie darstellen, so reichen sie doch hin, um eine innigere Beziehung zwischen dem Lebensprocess und der Lagerung der Atome im Raume vermuthen zu lassen. Es folgt daraus, dass dem eingehenden Studium des Einflusses speciell physiologisch interessanter Körper auf das polarisirte Licht, welche mit der genauen Feststellung ihrer Rotationsconstante zu beginnen hat, ein weit grösseres Interesse anhaftet als der lediglichen Herbeischaffung rein descriptiven Materials.

Die vorliegende Untersuchung beschäftigt sich mit der specifischen Rotation der Cholalsäure und ihrer Alkalisalze sowie der Choleinsäure und Desoxycholsäure. Die Cholalsäure ist in dieser Hinsicht schon vor langer Zeit durch

<sup>1)</sup> Beiträge zur Pathologie und Therapie des Diabetes mellitus, Bd. I, S. 130.

<sup>2)</sup> Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie, Bd. XXXI, S. 154.

F. Hoppe-Seyler, der ihre Einwirkung auf das polarisirte Licht entdeckte, untersucht worden, worüber im Journal für praktische Chemie 1863, II, S. 257, berichtet ist.

Die zu meinen Versuchen dienende Cholalsäure wurde aus Rindergalle gewonnen. Dieselbe wurde theils nach Strecker mit Baryhydrat, theils nach der Vorschrift von Mylius<sup>1)</sup> mit Natronlauge verseift. Letzteres Verfahren erwies sich als bequemer. Die Galle wurde mit dem fünften Theil ihres Gewichtes 30procentiger Natronlauge versetzt und 24 Stunden lang in einer kupfernen Kasserole, die mit einem Deckel verschlossen war, gekocht, wobei das verdampfende Wasser immer wieder ersetzt wurde. Darauf wurde sie mit Kohlensäure gesättigt und zur Trockne verdampft. Der Rückstand wurde mit 95procentigem Alkohol extrahirt, der das Natriumcarbonat zurückliess und dann der Alkohol zum grössten Theil abdestillirt. Schliesslich wurde die alkoholische Lösung mit dem fünffachen Volumen Wasser verdünnt und mit einer wässerigen Lösung von Chlorbaryum gefällt. Es soll hierbei, wie Mylius angibt, ausser den Fettsäuren die gesammte Choleinsäure sich im Niederschlage befinden, und die filtrirte Lösung nur cholalsäuren Baryt enthalten. Es ist dies nicht der Fall, wie weiter unten gezeigt werden wird. Aus der wässerigen Lösung des cholalsäuren Baryts kann die Cholalsäure durch Salzsäure abgeschieden werden und wird dabei als eine braune, zähe, harzige Masse erhalten, die bei längerem Verweilen unter Wasser, besonders wenn es angesäuert ist, krystallinische Beschaffenheit annimmt. Die rohe Cholalsäure, in Alkohol gelöst, kann bei langsamem Verdunsten desselben in tetraedrischen Krystallen erhalten werden. Dieses Krystallisirenlassen aus Alkohol, namentlich wenn es zum Zwecke der Reinigung öfters wiederholt werden muss, ist nicht nur sehr zeitraubend, sondern auch mit beträchtlichen Verlusten an Material verbunden. Denn je verunreinigter die Cholalsäure ist, desto leichter löst sie sich zwar in Alkohol, aber um so schwieriger krystallisirt sie wieder aus. Zudem hält

<sup>1)</sup> Zeitschrift f. physiol. Chemie, Bd. XII, S. 262.

die Mutterlauge eine nicht unbeträchtliche Menge der Säure zurück, wie schon Mylius angab und neuerdings Lassar-Cohn<sup>1)</sup> bestätigt hat. Letzterer ist der Meinung, dass sie durch Kochen mit Alkohol zum Theil esterificirt wird und als Aethylester in der Mutterlauge zurückbleibt. Aber er zeigt nirgends, dass er Cholalsäure-Aethylester durch einfaches Kochen mit Alkohol in wesentlichen Mengen erhalten hätte. Derselbe ist zuerst von F. Hoppe-Seyler durch Sättigen einer alkoholischen Lösung von Cholsäure mit Salzsäure, längerem Stehenlassen und nachherigem Fällen mit Wasser erhalten worden. In derselben Weise erhielt ihn auch Tappeiner<sup>2)</sup>. Beide geben an, dass er aus Alkohol in feinen Nadeln krystallisirt. Warum sollte er also aus der Mutterlauge der Cholsäure nicht krystallisiren, wenn er schon darin vorhanden ist? Uebrigens stützt Lassar-Cohn seine Behauptung lediglich auf den Umstand, dass er durch Oxydation der Mutterlauge zur Gewinnung der Dehydrocholsäure nicht diese, sondern deren Aethylester erhielt. Aber es mag immerhin sein, dass namentlich verunreinigte Cholsäure durch Kochen mit Alkohol leicht esterificirt wird. Ich erinnere mich, einmal beim Krystallisiren von Cholsäure aus Alkohol; nachdem ein grosser Theil derselben in Tetraedern erhalten worden war, und die Mutterlauge von den Krystallen abgegossen und in einem andern Glase zur weiteren Krystallisation hingestellt wurde, nach dem völligen Verdunsten des Alkohols eine braune Schmiere erhalten zu haben, in der, namentlich am Rande, wo sie das Glas berührte, feine, seideglänzende Nadeln staken. Sie sind leider nicht näher untersucht worden. Als ich dagegen reine Cholalsäure, die in glashellen Tetraedern krystallisirt war und nach Entfernung des Krystallalkohols bei 195° schmolz, in kochendem Alkohol löste, auf dem Wasserbad eindampfte und dann trocknete, zeigte die Substanz denselben Schmelzpunkt von 195° wie vorher, während der Aethylester bei 147—152° schmilzt (nach Tappeiner). Ebenso unbequem zur Entfernung des braunen Farbstoffes,

<sup>1)</sup> Zeitschrift f. physiol.-Chemie, Bd. XVI, S. 497.

<sup>2)</sup> Bericht der D. chem. Ges., Bd. XVI, S. 497.

der der Cholsäure stets anhaftet, wie das häufige Umkrystallisiren aus Alkohol, ist das Kochen der alkoholischen Lösung mit Thierkohle. Denn erstens hält dieselbe sehr viel von der klebrigen Cholsäure zurück, die man ihr selbst durch öfteres Auskochen mit Alkohol nur unvollkommen entziehen kann, und zweitens gewinnt man sie auf diese Weise nie so rein, wie es erforderlich ist, um sie in einer Schicht von 5 Decimetern im Halbschattenapparat untersuchen zu können. Viel rascher gelangt man zu ganz reinen Producten, wenn man die Alkalisalze darstellt. Man löst die rohe Cholalsäure in einer Lösung von Kaliumcarbonat. Darauf verdampft man zur Trockne, nimmt mit starkem Alkohol auf und verdunstet wieder bis zur Trockne, worauf das Salz in gelb gefärbten, krystallinischen Krusten zurückbleibt. Jetzt löst man es in verdünntem Alkohol, in dem es sehr viel leichter löslich ist als in starkem. Mischt man derartige concentrirte Lösungen mit Aether, so erhält man entweder sofort eine Fällung von zarten Nadeln, oder eine milchige Trübung, die sich nach einiger Zeit in Krystalle umwandelt. War der Alkohol, in dem man das Salz gelöst hat, stark verdünnt, so erhält man bei Zusatz von Aether entweder gar keine, oder nur eine sehr geringe Fällung, deshalb ist es nothwendig, dass man nach Hinzufügen des mehrfachen Volumen Aether, falls nicht sofort eine milchige Trübung eintritt, bis zum Eintreten derselben absoluten Alkohol der Mischung hinzufügt. Es gelingt bei richtigem Ausprobieren des hinzuzufügenden absoluten Alkohols und Aethers leicht, den grössten Theil des Salzes aus der Lösung zu erhalten. Den Krystallbrei saugt man ab, und wäscht ihn mehrmals mit Alkohol-Aether aus, der die braunen Verunreinigungen mit Leichtigkeit hinwegnimmt. Freilich löst sich dabei auch etwas von dem Salz, aber nur sehr wenig und es krystallisirt aus der Lösung in langen Nadeln leicht aus. Aus der amorphen Cholalsäure kann man auf diese Weise die Verunreinigungen nicht leicht entfernen, da sie in Alkohol-Aether leicht löslich ist. Die letzten Spuren von Farbstoff kann man allerdings auch so nur schwer durch häufiges Umkrystallisiren entfernen. Am besten gelingt es noch, wenn

man entweder die Krystalle des Salzes in die Alkohol-Aether-Mischung oder im lufttrocknen Zustande längere Zeit dem Sonnenlicht aussetzt. Aus der wässerigen Lösung der gereinigten Salze kann man dann leicht die Cholsäure in reinem Zustande abscheiden. Viel schwieriger und wichtiger ist es, bei der Darstellung reiner Cholsäure zum Zwecke ihrer polarimetrischen Untersuchung jede Verunreinigung mit Choleinsäure auszuschliessen. Mylius<sup>1)</sup> gibt an, dass beim Fällen der mit dem fünffachen Volumen Wasser verdünnten alkoholischen Lösung, die die Natronsalze der Fettsäuren, Cholein- und Cholsäure enthält, mittelst einer wässerigen Lösung von Chlorbaryum, solange ein Niederschlag entsteht, im Filtrat nur cholsaurer Baryt enthalten sei. Lassar-Cohn, der nach Mylius Vorschrift arbeitete, gibt nichts darüber an, dass er sie nicht bewährt gefunden hatte. Ich sah mich daher nicht veranlasst, an ihrer Richtigkeit zu zweifeln. Allein bei meinem Bemühen, auf möglichst rasche Weise zu einer reichlichen Ausbeute von, wenigstens von den grössten Verunreinigungen freier Cholsäure zu gelangen, bediente ich mich einer Notiz von Mylius<sup>2)</sup> über die Eigenschaft der Cholsäure, aus essigsaurer Lösung zu krystallisiren. Löst man die nach Mylius gewonnene Cholsäure in Eisessig und fügt Wasser bis zur milchigen Trübung hinzu, so bilden sich nach längerem Stehen prismatische Krystalle, die, wie Strecker und Mylius festgestellt haben, ein Molecül Krystallwasser enthalten. Den Krystallbrei saugt man ab und wäscht mit Aether aus, der den grössten Theil des Farbstoffs wegnimmt. Aus dem Filtrate fallen beim Verdünnen mit Wasser weitere Mengen von Cholsäure aus, die wieder abgesogen werden. Man erhält so schliesslich den grössten Theil der Cholsäure im krystallisirten Zustand. Um die nun so erhaltene Cholsäure von jeder Verunreinigung mit Choleinsäure zu befreien, bediente ich mich zufolge des Rathschlages von Latschinoff<sup>3)</sup> des Barytsalzes. Es wurde eine abgewogene Menge von obiger

<sup>1)</sup> Zeitschrift für physiol. Chemie, Bd. XII, S. 262.

<sup>2)</sup> Ber. der D. chem. Ges., Bd. XIX, S. 372.

<sup>3)</sup> Ber. der D. chem. Ges., Bd. XVIII, S. 3041.

Cholsäure mit der berechneten Menge von Baryumcarbonat in Wasser zusammengerührt, längere Zeit auf dem Wasserbad erwärmt, dann erkalten gelassen und filtrirt. Es ist nothwendig, kalt zu filtriren, da choleinsaures Baryt im warmen Wasser sehr viel leichter löslich ist, als in kaltem. Aber auch in diesem ist er nicht vollkommen unlöslich. Man muss daher das Gemisch der beiden Barytsalze statt mit einer grossen Menge Wasser auf ein Mal, mit wiederholten kleinen Portionen behandeln, solange bis das Filtrat keine Reaction auf Cholsäure mehr gibt. Ich bediente mich dazu der Jodcholsäurereaction von Mylius, welche die Choleinsäure nicht gibt. Mylius gibt zwar an<sup>1)</sup>, dass sie schon durch geringe Verunreinigungen verhindert wird, und hält sie überhaupt nicht für sehr empfindlich. Es scheint auch, dass die amorph frisch gefällte Säure diese Reaction leichter gibt als die rein krystallisirte. Aber auch diese gibt sie in noch sehr geringer Menge. Bringt man ein kleines Körnchen reiner Cholsäure auf ein Uhrschälchen zusammen mit etwas Jod und einem Tropfen Alkohol, das beide löst, und lässt dann denselben im Exsiccator über Schwefelsäure verdunsten, so bildet sich auch nach tagelangem Stehen nicht die charakteristische Verbindung der blauen Jodcholsäure, wohl aber sofort, wenn man das Schälchen herausnimmt und darüber haucht. Denn es ist, analog der Bildung von Jodstärke, eine gewisse Menge von Wasser unumgänglich nothwendig, während der geringste Ueberschuss desselben dissociirend wirkt. Letzteres ist auch offenbar der Grund, wesshalb Mylius<sup>2)</sup> durch Zusammenreiben von Cholsäure mit Jod und nachherigem Zusatz von Wasser diese blaue Verbindung nicht erhalten konnte, was mir gleichwohl, wenn ich mit besonderer Sorgfalt verfuhr, öfters gelang.

Es wurde also das Barytsalz der nach Mylius' Methode gewonnenen Cholsäure so lange mit Wasser gewaschen, bis das Filtrat keine Jodcholsäure-Reaction mehr gab. Es gab dann immer noch die Pettenkofer'sche Reaction. Ob diese von Spuren gelöstem choleinsaurem Baryts oder einer dritten Säure

<sup>1)</sup> Zeitschrift für physiol. Chemie, Bd. XI, S. 327.

<sup>2)</sup> Zeitschrift für physiol. Chemie, Bd. XI, S. 314.

herrührte, habe ich nicht festgestellt. Aus dem Filtrat wurde die Cholalsäure mit Salzsäure abgeschieden. Auf dem Filter bleibt ein nicht unbeträchtlicher Rückstand, der sich in heissem Alkohol nicht vollständig löst, das Zurückbleibende erweist sich als kohlenaurer Baryt. Aus der heissen, concentrirten, alkoholischen Lösung scheiden sich prismatische Krystalle in sphärischen Aggregaten ab, wie es Latschinoff<sup>1)</sup> von choleinsäurem Baryt beschrieben hat. Diese Krystalle werden in heissem Wasser gelöst und mit Salzsäure zerlegt. Die in Flocken sich abscheidende Choleinsäure wird in heissem Alkohol gelöst. Beim Abkühlen desselben erhält man ein Haufenwerk von Nadeln, die sich unter dem Mikroskop als sechsseitige Prismen erweisen, der von Latschinoff<sup>2)</sup> beschriebenen Krystallform seiner wasserfreien Choleinsäure. Die Krystalle wurden abgesogen und das Filtrat zur weiteren Krystallisation hingestellt. Es schieden sich dann noch rhombische Plättchen, aber nicht wie ich nach Latschinoff's Angaben<sup>3)</sup> erwartet hatte, Pyramiden aus, die er für wasserhaltige Choleinsäure hielt. Beide Sorten von Krystallen wurden im Vacuum über Schwefelsäure getrocknet und ihr Schmelzpunkt bestimmt. Die ersteren schmolzen bei 180—187°, Latschinoff giebt für die wasserfreie Choleinsäure 185—187° an. Sie wurden daher wieder in Alkohol gelöst und fractionirt krystallisirt. Alle Fraktionen gaben dieselbe Krystallform, sechsseitige Prismen und schmolzen bei 180—187°. Die rhombischen Plättchen schmolzen von 140—180°. Sie wurden in heissem Alkohol gelöst, aus dem sich beim Abkühlen die Choleinsäure in sechsseitigen Prismen vom Schmelzpunkt 180—187° abschied.

Es zeigte sich, dass aus den ersten Portionen der aus der eisessigsäuren Lösung durch Verdünnen mit Wasser gefällten Krystallmengen mehr Choleinsäure erhalten wurde als aus den späteren, entsprechend ihrer geringeren Löslichkeit in Essigsäure als die der Cholalsäure. Jedenfalls ist in der verdünnten alkoholischen Lösung cholalsäuren Baryts, wie man sie nach

<sup>1)</sup> Berichte der D. chem. Ges., Bd. XVIII, S. 3041.

<sup>2)</sup> Berichte der D. chem. Ges., Bd. XX, S. 1053

<sup>3)</sup> Berichte der D. chem. Ges., Bd. XVIII, S. 3041.

Mylius erhält, eine beträchtliche Menge von choleinsäurem Baryt enthalten, die das Mehrfache von dem im Rückstand der Barytseifen enthaltenen beträgt. Lassar-Cohn<sup>1)</sup> hat aus seinen 100 Litern Galle nicht viel Choleinsäure erhalten, etwa den zwanzigsten Theil in Procenten von der Menge, die Latschinoff gefunden hatte. Es war ihm eben ein grosser Theil in den Mutterlaugen der Cholalsäure stecken geblieben. Kein Wunder also, dass er durch Oxydation dieser Mutterlaugen eine Dehydrocholsäure erhielt, die zu viel Kohlenstoff enthielt, eben weil sie vermuthlich mit der kohlenstoffreicheren Dehydrocholeinsäure verunreinigt war, während er sich dadurch veranlasst sah, anzunehmen, dass dieselben Cholalsäure-Aethyl-ester enthielten. Die nach meiner Angabe von Choleinsäure sicher befreite Cholalsäure erhält man in Alkohol gelöst sehr viel rascher in Tetraedern krystallisirt, als wenn Choleinsäure sich mit in der Lösung befindet.

Die Bestimmungen der specifischen Rotationen wurden mit Landolt's Halbschattenapparat mit Lippich's Polarisator ausgeführt. Der Drehungswinkel wurde als Mittel von mehreren, meist 20 Ablesungen bestimmt. In derselben Weise wurde jedesmal der Nullpunkt ermittelt, indem abwechselnd fünfmal der Nullpunkt und fünfmal der Drehungswinkel abgelesen wurde. Als Lichtquelle dienten Steinsalzwürfel, die in einem Platinlöffel über einen Bunsenbrenner erhitzt wurden. Das specifische Gewicht wurde mit dem Pyknometer bestimmt und auf Wasser von ungefähr derselben Temperatur, als die Lösung hatte, bezogen. Die Ablesung des Drehungswinkels erfolgte bei ziemlich derselben Temperatur, bei der das specifische Gewicht bestimmt worden war. In den meisten Fällen wurde ein Beobachtungsrohr von 5 Decimeter Länge angewandt, das mit einer Messinghülse versehen war, durch welche, falls die Zimmertemperatur von der gewünschten Beobachtungstemperatur erheblich abwich, Wasser von bestimmten Wärmegraden hindurch geleitet wurde. Zur Bestimmung des Procentgehaltes wurde die Substanz in einem abgewogenen Kölbchen mit eingeschliffenen Stopfen gewogen, die ent-

<sup>1)</sup> Zeitschrift für physiol. Chemie, Bd. XVII. S. 610.

sprechende Menge des Lösungsmittels hinzugefügt und abermals gewogen. Schliesslich wurde die spezifische Rotation nach der Formel berechnet:  $[\alpha]_D = \frac{\alpha \cdot 100}{l \cdot p \cdot s}$ , wo  $\alpha$  den Drehungswinkel,  $l$  die Länge des Rohres in Decimetern,  $s$  das spezifische Gewicht und  $p$  die Anzahl Gramm activer Substanz in 100 Gramm Lösungsmittel bezeichnet. Alles Nähere ergibt sich aus den Tabellen. Da es sich überall um Rechtsdrehung handelt, ist das Vorzeichen weggelassen.

### I. Cholalsäure.

Das benützte Präparat der Cholalsäure krystallisirte in glashellen Tetraedern und zeigte nach vorsichtigem Erhitzen bis auf  $150^\circ$  im Trockenschrank den Schmelzpunkt  $195^\circ$ . Zunächst wurde die spezifische Rotation der in Tetraedern krystallisirten Cholsäure ermittelt, die  $10,13\% = 1$  Molecül Krystallalkohol enthält. Da diese Krystalle beim längeren Aufbewahren allmählig verwittern, wurde die Cholsäure zu jeder Bestimmung aus Alkohol frisch umkrystallisirt, darauf die Krystalle sorgfältig zwischen Filtrirpapier abgepresst und nur kurze Zeit, bis zur Wägung, im Exsiccator aufbewahrt. Die Bestimmungen der Rotation wurden in alkoholischer Lösung ausgeführt. Der dazu angewandte Alkohol hatte das spezifische Gewicht von 0,8080 bei  $18,40^\circ$  (bezogen auf Wasser von derselben Temperatur), was einem Gehalt von 97 Volumprocent entspricht. Die Tabelle I.

Tabelle I.

In 100 Gramm Lösung sind enthalten:		Spezifisches Gewicht der Lösung	Temperatur, bei der das specif. Gew. bestimmt wurde.		Temperatur während der Ableseung.	Länge des Beobachtungsröhres.	Winkel $\alpha$	[ $\alpha$ ] <sub>D</sub> .	
Tetraedrische Cholsäure.	Reine Cholsäure.		Lösung.	Wasser.				Für tetraedrische Cholsäure.	Für reine Cholsäure.
1,2074	1,72617	0,81518	16,4	15	16,2	5	2,4520	31,2977	34,8258
1,3399	1,19886	0,81050	23,4	23,4	23	5	1,6860	31,1188	34,6267
1,5253	1,03578	0,81006	20,4	20,4	20,4—21	5	1,4610	31,2977	34,8258
1,9204	2,62456	0,81493	21,1	21,1	21,2	5	3,7740	31,7154	35,2910
1,9590	0,85906	0,815018	14,2	15	12,2	5	1,2662	32,0214	35,6310
1,4742	0,43085	0,81260	13,4	15	14	5	0,6208	31,85357	35,4446

zeigt die spezifische Rotation der tetraedrigen Cholsäure. Die Werthe für  $[\alpha]_D$  weichen nicht erheblich voneinander ab. Die höchsten Werthe, Nr. 5 und 6, fallen mit den niedrigsten Temperaturen und Concentrationen zusammen. Es besteht also vielleicht eine geringe Zunahme der spezifischen Rotation mit Abnahme der Concentration und Temperatur. Als Mittel ergibt sich aus diesen Bestimmungen für  $[\alpha]_D = 31,55076$ . Da in der tetraedrigen Cholsäure 87,87% reine Cholsäure enthalten sind, so ergibt sich der jedesmalige Werth der Concentration und spezifischen Rotation für reine Cholsäure aus den gefundenen durch einfache Rechnung. Als Mittel aus sämtlichen Bestimmungen ergibt sich für reine Cholsäure  $[\alpha]_D = 35,10749$ . Es wurden auch directe Bestimmungen der spezifischen Rotation krystallalkoholfreier Cholsäure (Schmelzpt. 195°) gemacht. Sie sind in Tabelle II. zusammen-

Tabelle II.

No.	In 100 Gramm Lösung sind enthalten trockene Cholsäure.	Specificisches Gewicht der Lösung.	Temperatur, bei der das specif. Gewicht bestimmt ist.		Temperatur während der Ablesung.	Länge des Beobachtungsrohres.	Winkel $\alpha$	Specif. Rotation $[\alpha]_D$
			Lösung.	Wasser.				
1.	0,699386	0,80818	22,1	21,8	21,8—22,4	5	1,0485	37,0825
2.	1,80533	0,81212	21,8	22	22,2—22,6	5	2,6625	36,4200
3.	1,74500	0,811317	21,6	21,6	21,6—22,2	5	2,63825	37,2700
4.	1,36022	0,809433	22,6	22,8	22,8—23,7	5	2,0530	37,2933

gestellt. Die Werthe sind durchweg höher als die aus den Drehungswinkeln der tetraedrigen berechneten. Als Mittel ergibt sich  $[\alpha]_D = 37,01645$ , also um 2 Grad höher als die spezifische Rotation der in der tetraedrigen enthaltenen Cholsäure. Man könnte daraus den Schluss ziehen, dass die tetraedrische Cholsäure auch in der alkoholischen Lösung Krystallalkohol enthält und die krystallalkoholhaltige Cholsäure eben ein geringeres Drehungsvermögen besitzt als die davon freie. F. Hoppe-Seyler<sup>1)</sup> findet für tetraedrische Cholsäure in alkoholischer Lösung geringere Werthe als ich, nämlich im Durchschnitt von sechs Bestimmungen 31,2 und daraus für

<sup>1)</sup> l. c.

trockne Säure berechnet 34,7. Dagegen findet er die spezifische Rotation der trocknen Säure durch directe Bestimmung = 49,4. Es handelt sich hier sicher um Verunreinigungen.

## 2. Cholsaures Kali.

Die benützten Präparate waren theils in der oben beschriebenen Weise durch Zusatz von Aether zur stark concentrirten alkoholischen Lösung des Salzes erhalten, theils aus der zu den obigen Bestimmungen angewandten Cholsäure gewonnen. Man kann dieselbe mit der berechneten Menge Kaliumhydroxyd in Wasser lösen,  $\text{CO}_2$  einleiten; zur Trockne, eindampfen, mit starkem Alkohol extrahiren und wieder eindampfen. Hierbei färbt sich das Salz stets etwas gelb, selbst wenn das Ausgangsmaterial absolut farblos war. Es ist daher besser, eine abgewogene Menge trockener Cholsäure mit der berechneten Menge einer wässrigen Kaliumhydroxydlösung zu versetzen und durch Verdünnen mit Wasser Lösungen von bestimmter Concentration herzustellen. Die Bestimmungen der spezifischen Rotation des cholsauren Kali in wässriger Lösung sind in Tab. III. zu-

**Tabelle III.**  
Cholsaures Kali in Wasser.

No.	100 Gramm der Lösung enthalten chols. Kali.	Specificches Gewicht.	Tem- peratur.	Länge des Beobach- tungsrohres.	Winkel $\alpha$	$[\alpha]_D$ .
1.	1,04326	1,00200	15	5	1,521	29,1010
2.	1,04326	0,99926	30	5	1,573	30,7943
3.	1,50452	1,00427	23	5	2,6385	31,3529
4.	3,49401	1,00975	5	2	1,957	27,7344
5.	3,49401	1,00949	9	2	1,931	27,3147
6.	3,49401	1,00923	20	2	1,896	26,8855
7.	3,0771	1,00772	11	2	1,707	27,5251
8.	3,0771	1,00654	20	2	1,701	27,6200
9.	3,0771	1,01333	30	2	1,670	27,0456
10.	5,45700	1,01498	11	5	7,529	27,6937
11.	5,45700	1,01237	22	5	7,365	26,6631
12.	5,45700	1,01039	30	5	7,486	27,1544
13.	5,45700	1,00695	40	5	7,333	27,0625
14.	6,68250	1,01843	24	5	9,0180	26,50563

sammengestellt. Man ersieht aus ihr, dass die spezifische Rotation mit der Abnahme der Concentration zunimmt. Dieses Resultat hatte auch schon F. Hoppe-Seyler gefunden, allerdings erhielt er etwas höhere Werthe. Denn bei einer Concentration von 6 Procent, die niedrigste von ihm angewandte, findet er  $[\alpha]_D = 28,2$ . Demnach würden sich für niedrigere Concentrationen noch höhere Werthe ergeben, während wir erst für 1 procentige Lösungen  $30^\circ$  finden. Ein merklicher Einfluss der Temperatur kann nicht erkannt werden. Aus den in Tabelle III zusammengestellten Werthen berechnen sich für trockene Cholsäure die in Tab. IV zusammen-

Tabelle IV.

No.	100 Gramm der Lösung enthalten reine Cholsäure.	$[\alpha]_D$
2.	0,95208	33,74334
3.	1,37302	34,35500
6.	3,18863	29,46100
8.	2,80816	30,26500
11.	4,98005	29,21670
14.	6,09844	29,04100

gestellten Rotationen. Sie sind alle niedriger als die für freie Cholsäure in alkoholischer Lösung gefundenen. Und dies ist nicht nur die Wirkung des Kalis, sondern auch des Lösungsmittels, wie sich aus den Bestimmungen der spezifischen Rotation des Salzes in alkoholischer Lösung, Tab. V ergibt. Das Lösungsmittel war Alkohol vom spezifischen Gewicht 0.8104 bei  $15^\circ$ , entsprechend einem Gehalt von 95 Vol.-Procent.

Tabelle V.

Cholalsäures Kali in Alkohol.

100 Gramm der Lösung enthalten active Substanz.	Specificsches Gewicht.	Temperatur.	Rohrlänge.	$\alpha_D$	$[\alpha]_D$
2,11776	0,810266	25	5	2,711	31,5978
2,11776	0,81875	17	5	2,756	31,2710

Aus der Tab. V ergibt sich für reine Cholsäure  $[\alpha]_D = 34,2658$ . Man sieht also, dass der Alkohol die spezifische Rotation der Cholsäure erhöht. Es stimmt dies Ergebniss mit den von F. Hoppe-Seyler auch an anderen Verbindungen der Cholsäure gemachten Erfahrungen überein.

### 3. Cholalsaures Natron.

Das in analoger Weise wie das cholalsäure Kali dargestellte Natronsalz wurde in wässriger Lösung untersucht. Tab. VI zeigt die gefundenen Zahlenwerthe.

**Tabelle VI.**  
Cholalsaures Natron.

No.	100 Gramm der Lösung enthalten active Substanz.	Specificsches Gewicht.	Tem- peratur.	Rohr- länge.	$\alpha_D$	$[\alpha]_D$
1.	7,5888	1,01969	22,5	5	10,62345	27,45625
2.	4,9450	1,012977	24	5	7,06600	28,1900
3.	4,0419	1,00826	20	5	5,636	27,6495
4.	2,2920	1,00595	23	5	3,52975	30,61200

Auch hier zeigt sich, wie beim Kalisalz, eine Zunahme der Rotation mit Abnahme der Concentration. Für trockene Cholsäure berechnet sich aus den obigen Werthen:

**Tabelle VII.**

No.	$[\alpha]_D$	Concentration.
1.	29,0353	7,40447
2.	29,8120	4,82489
3.	29,2300	3,94372
4.	32,37286	2,23633

Vergleicht man das moleculare Drehungsvermögen der beiden Salze, so zeigt sich eine Uebereinstimmung mit dem Oudemans-Landolt'schen<sup>1)</sup> Gesetze: Aus Tab. VI ergibt sich für No. 1  $[M]_D = 118,06187$  und für das Kalisalz bei ungefähr derselben Concentration der Lösung Tab. III No. 14

<sup>1)</sup> van t'Hoff, die Lagerung der Atome im Raum, 1894. 98, und Landolt, Ber. d. D. chem. Ges., Bd. VI, S. 1076.

= 118,21511, ferner für Tab. VI No. 4 = 131,63100 und Tab. III 3 = 139,83393 und 4 = 123,69542. Die der Tab. VI No. 4 entsprechende Concentration der Lösung liegt ungefähr in der Mitte, zwischen den No. 3 und 4 der Tab. III zugehörigen Concentrationen. Nimmt man daher das Mittel der aus diesen berechneten Molecularrotationen, so findet man  $[M]_D = 131,76468$ , welcher Werth genau mit dem des Natronsalzes übereinstimmt.

#### 4. Choleinsäure.

Die Choleinsäure ist bisher auf ihre optische Activität nicht untersucht worden. Das von mir angewandte Präparat ist in der oben beschriebenen Weise aus Ochsen-galle dargestellt worden und zeigte die von Latschinoff für die krystallwasserfreie Choleinsäure angegebene charakteristische Krystallform und den Schmelzpunkt 182—185°. Die Bestimmungen der Rotation erfolgten in alkoholischer Lösung, der dazu benutzte Alkohol hatte dieselbe Concentration wie der bei der Untersuchung der Cholalsäure angewandte. Die Resultate sind in Tab. VIII zusammengestellt. Demnach zeigt die Choleinsäure eine sehr viel höhere spezifische Rotation als die

**Tabelle VIII.**

Choleinsäure, rechtsdrehend.

No.	In 100 Gramm Lösung sind enthalten Choleinsäure.	Specifisches Gewicht der Lösung.	Temperatur, bei der das specif. Gewicht bestimmt ist.		Temperatur während der Ablesung.	Robrlänge.	Winkel $\alpha$	$[\alpha]_D$
			Lösung.	Wasser.				
1.	2,46876	0,81100	24,2	23,8	24,2	5	4,892	48,8677
2.	1,78551	0,81046	22	22	23—22,4	5	3,58175	49,51778
3.	0,86168	0,80610	24,1	24,3	24,2—24,4	5	1,6880	48,6033
4.	0,69442	0,80902	21,5	21,2	21,8—22,6	5	1,4742	52,4899

Cholsäure. Oben ist erwähnt worden, dass F. Hoppe-Seyler bei Untersuchung der krystallalkoholfreien Cholsäure deren spezifische Rotation auffallend hoch, nämlich zu 49,4, fand. Unzweifelhaft war seine Cholsäure mit Choleinsäure verun-

reinigt. Ferner zeigt die Choleinsäure eine deutliche Zunahme der spezifischen Rotation mit abnehmender Concentration.

### 5. Desoxycholsäure.

Als Desoxycholsäure bezeichnet Mylius<sup>1)</sup> eine Substanz, die er in gefaulter Galle entdeckt hatte. Sie zeigte die Zusammensetzung 73,32% C, und 10,39% H und O. Er schrieb ihr die Zusammensetzung  $C_{24}H_{40}O_4$  zu und betrachtete sie als eine Cholalsäure, der durch Fäulniss ein Atom O entzogen worden war. Später bestritt Latschinoff<sup>2)</sup> die Angaben von Mylius und suchte zu beweisen, dass die Desoxycholsäure identisch sei mit der wasserhaltigen Choleinsäure und die gewöhnliche krystallwasserfreie Choleinsäure durch Erhitzen mit Eisessig in die Desoxycholsäure übergeführt werden könne. Mylius<sup>3)</sup> weist zwar diese Einwände zurück, aber gleichwohl ist die Frage nach der Einheitlichkeit der Desoxycholsäure nicht enegiltig erledigt. Noch neuerdings nahm Lassar-Cohn<sup>4)</sup> für Latschinoff Partei.

Ich ging, wie Mylius, zur Gewinnung der Desoxycholsäure von gefaulter Galle aus. Die Intensität der Fäulniss scheint von wesentlichem Einfluss zu sein. Nach mancherlei vergeblichen Versuchen gelangte ich in einem Falle zu einem positiven Ergebniss! Ich liess 3 Liter Galle ohne Zusatz von Pankreas 14 Tage im geheizten Zimmer faulen. Darauf wurde die Galle eingeengt und mit Salzsäure stark sauer gemacht. Das Ausgeschiedene, offenbar zum grössten Theil aus Gallensäure bestehend, wurde mit starkem Alkohol behandelt, der Alles bis auf einen kleinen Rest löste. Von der alkoholischen Lösung wurde der Alkohol abdestillirt und dabei eine zähflüssige Masse als Rückstand erhalten, die nun mit Eisessig zusammengerührt wurde. Es bildete sich dabei, wie nach Mylius Angaben zu erwarten war, ein Brei mikro-

<sup>1)</sup> Berichte der D. chem. Ges., Bd. XIX, S. 373.

<sup>2)</sup> Berichte der D. chem. Ges., Bd. XX, S. 1043.

<sup>3)</sup> Berichte der D. chem. Ges., Bd. XX, S. 1969.

<sup>4)</sup> Zeitschrift für physiol. Chemie, Bd. XVII, S. 609.

skopischer Kryställchen, die nach längerem Stehen noch an Menge zunahm. Der Krystallbrei wurde abgesogen und mit Eisessig gewaschen, der fast alle färbenden Substanzen wegnahm. Der Rückstand wurde darauf in Alkohol gelöst, in dem es sich sehr viel leichter löste als Choleinsäure. Beim Verdunstenlassen dieser Lösung schieden sich mikroskopische Kryställchen in Form rhombischer Blättchen und vierseitiger Doppelyramiden ab. Diese Krystalle schmolzen über Schwefelsäure getrocknet bei  $150-160^{\circ}$ . (Die Desoxycholsäure von Mylius schmolz bei  $160-170^{\circ}$ ). Sie wurden in warmem Alkohol gelöst. Beim Erkalten derselben schieden sich wiederum mikroskopische Kryställchen aus, welche grösstentheils die Form vierseitiger Doppelpyramiden zeigten, möglicherweise die Krystalle der wasserhaltigen Choleinsäure (vergleiche Latschinoff, Ber. d. D. chem. Ges., Bd. XX, S. 1055), während der grösste Theil als dicker Syrup zurückblieb. Diesen hielt ich für Desoxycholsäure, von der Mylius angibt, dass sie aus Alkohol gar nicht oder doch nur sehr schwer krystallisirt. Versetzte man diesen Syrup mit wenig starkem Alkohol, so sah man eine Trübung entstehen, die von mikroskopischen Kryställchen der Choleinsäure herrührte, während der Syrup in Lösung ging und leicht abfiltrirt werden konnte. Wiederholte man diese Procedur mehrere Male, so konnte man fast alle beigemengte Choleinsäure entfernen. Die so gereinigte Desoxycholsäure wurde in Ammoniak gelöst und mit einer wässrigen Lösung von Chlorbaryum gefällt. Man erhält so, wie schon Mylius angibt, einen krystallinischen Niederschlag von Desoxycholsaurem Baryt. Dieser wurde abfiltrirt, gewaschen und mit Salzsäure zerlegt. Die amorphe Säure schmolz nach dem Trocknen bei  $153-155^{\circ}$ . Ich fand, dass sie sich in Aether löste, aus dem sie sich beim Verdunsten in mikroskopischen Prismen abschied. Diese zeigten ebenfalls den Schmelzpunkt  $153-155$ . Von dieser Substanz, die Mylius vermuthlich mit Choleinsäure verunreinigt in Händen gehabt und als Desoxycholsäure bezeichnet hat, erhielt ich aus 3 Litern Galle etwa ein halbes Gramm. Mit diesem wurde eine Bestimmung der specifischen Rotation ausgeführt, weil diese vielleicht wesentliche Ab-

weichungen von der Cholalsäure und Choleinsäure ergab. Als Lösungsmittel diente Alkohol von derselben Concentration wie das zur Bestimmung der Cholal- und Choleinsäure angewandte. Die specifische Rotation der Desoxycholsäure ist

Procentgehalt.	Specif. Gew.	Winkel $\alpha$ .	Länge des Rohres.	Temperatur.	$[\alpha]_D$
1,96823	0,81142	1,5925	2	23,4	49,86111

etwas grösser als die der Choleinsäure bei gleicher Concentration der Lösung, vergl. Tab. VIII No. 2.

Weitere Bestimmungen der specifischen Rotation wie der Zusammensetzung der Desoxycholsäure hoffe ich bei nächster Gelegenheit, wenn ich mir mehr Material werde beschafft haben, geben zu können.