

Beiträge zur Kenntniss der Gallensäuren.

Von

Dr. Gotthard Bulnheim.

(Inauguraldissertation¹⁾, für die Zeitschrift bearbeitet. Aus dem physiologisch-chemischen Institute zu Tübingen.)

(Der Redaction zugegangen am 15. Mai 1898.)

Schon zu Liebig's Zeiten, vornehmlich aber in den letzten 25 Jahren, hat man sich eifrig bemüht, einen Einblick in den chemischen Bau der wichtigen Gallensäuren zu gewinnen. Meist waren es Oxydationsversuche, angestellt mit den verschiedensten Oxydationsmitteln, durch die man dieses Ziel zu erreichen hoffte; und zwar waren diese Bestrebungen in der neueren Zeit namentlich darauf gerichtet, zu entscheiden, ob in den grossen Molekülen dieser Stoffe ringförmige Atomverkettungen, wie in den aromatischen Substanzen, oder nur einzelne doppelte Bindungen bei sonst offener Kette enthalten seien.

Der Erfolg aller dieser mühsamen und zeitraubenden Untersuchungen ist bekannt. Man fand unter den Oxydationsprodukten vor allen Dingen solche, deren Molekül noch die gleiche Zahl von Kohlenstoffatomen wie die ursprüngliche Säure (Cholsäure)²⁾, aber mehr Sauerstoff- und weniger Wasserstoff-

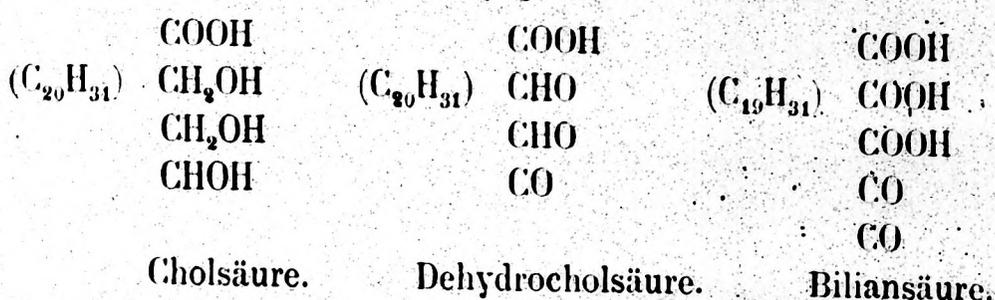
1) Die hier im Auszuge mitgetheilte Dissertation ist der naturwissenschaftlichen Facultät zu Tübingen im August 1897 vorgelegt worden.

2) Wie jetzt allgemein geschieht, werde auch ich die Strecker'sche Cholalsäure künftig immer nur noch als Cholsäure bezeichnen. Spricht man einmal von Glycocholsäure und von Taurocholsäure, so ist die Benennung des gemeinsamen Stammes der beiden mit dem Namen Cholsäure nur consequent.

atome als diese besitzt; ferner in einigen Fällen fette Säuren, von der Stearinsäure an abwärts,¹⁾ und endlich ein paar Säuren von zur Zeit noch sehr ungewisser Zusammensetzung und sonstiger Eigenart, Cholesterinsäure und Brenzcholesterinsäure; wahrscheinlich aber Körper mit einer wesentlich geringeren Anzahl von Kohlenstoffatomen in dem Molekül als die Cholsäure, von der man ausgegangen.

Was die Beziehungen derjenigen Oxydationsprodukte, die, wie die Dehydrocholsäure und Biliansäure, noch die gleiche Anzahl von Kohlenstoffatomen wie die Cholsäure; besitzen, zu letzterer betrifft, so haben uns darüber die schönen Untersuchungen von Mylius²⁾ genügend aufgeklärt, wie denn auch Mylius³⁾ zuerst die Verschiedenheit des Charakters der einzelnen Hydroxyle, die in dem Cholsäuremolekül enthalten sind, erkannt und hinlänglich bewiesen hat.

Folgende 3 von Mylius gegebenen Schemata:



liefern ein anschauliches Bild davon.

Ueber die links eingeklammerten Gruppen, C₂₀H₃₁ und C₁₉H₃₁, d. i. über den eigentlichen Kern der Gallensäuren, hat uns dagegen noch keine der bisherigen Untersuchungen Aufschluss gebracht. Wir dürfen einen solchen am ehesten von der Beschaffenheit jener Abbauprodukte erwarten, die, wie Tappeiner's Cholesterinsäure, nur 12, oder wie diejenige Redtenbacher's,⁴⁾ gar nur 8 Kohlenstoffatome enthalten. Es musste deshalb eine unlängst von Senkowski⁵⁾ gemachte Mittheilung das grösste Interesse erwecken, wonach es gelungen

1) Tappeiner, Liebig's Ann. **194**, 211.

2) Ber. **19**, 369 u. 2000; **20**, 683 u. 1968.

3) Ber. **19**, 2000 ff. u. **20**, 1968 ff.

4) Liebig's Ann. **57**, 162.

5) Wiener Monatshefte **17**, 1 ff. (1896).

sein sollte, durch Oxydation mit Kaliumpermanganat aus Cholsäure Phtalsäureanhydrid zu gewinnen.

Ich hatte mir die Aufgabe gestellt: 1) Senkowski's Angabe experimentell nachzuprüfen, sodann aber 2) einen Weg zu suchen, auf dem es regelmässig gelänge, auch der Tappeiner'schen Cholesterinsäure in grösseren Mengen habhaft zu werden.

Da ich während dieser Bemühungen Gelegenheit hatte, auch Hammarsten's Dehydrocholsäure, ferner den dreibasischen Säuren Biliansäure und Cholansäure öfter zu begegnen, ja genöthigt war, dieselben rein abzuscheiden, so ergab sich Veranlassung, auch über deren Darstellungsweise und Eigenschaften weitere Erfahrungen zu sammeln.

Ich schicke im Folgenden einige Mittheilungen über meine Ausgangsmaterialien, Glycocholsäure und Cholsäure, voraus. Zu allen meinen Versuchen verwandte ich nämlich eine Cholsäure, die nicht unmittelbar aus der Galle, sondern aus schon fertiger, rein ausgeschiedener Glycocholsäure bereitet war.

Ueber Glycocholsäure.

Dass ich bei der Darstellung der Cholsäure den in der Taurocholsäure der Galle enthaltenen Antheil derselben vernachlässigte, mochte zwar in einigen Fällen einen nicht unbeträchtlichen Verlust an Material bedingen, ermöglichte aber bei dem reichlichen Gehalte der hiesigen Rindergalle an Glycocholsäure die rasche Darstellung eines reinlichen, völlig farblosen und krystallinischen Ausgangsmaterials, dessen Einheitlichkeit um so sicherer werden musste, je frischer die Galle war, aus der es dargestellt wurde.

Diese letztere Bemerkung bezieht sich auf das mögliche Vorhandensein einer Gallensäure, die als zweites Spaltprodukt neben dem Glycocholl nicht Cholsäure, sondern die um ein Sauerstoffatom ärmere Choleinsäure liefern könnte. Allerdings ist es wahrscheinlich, dass die Glycocholsäure in Folge der Fäulniss zunächst in Glycocholl und Cholsäure zerfällt und dass die Reduction der letzteren zu Choleinsäure oder Desoxycholsäure — an der Identität dieser beiden ist wohl nicht mehr zu zweifeln?

1) Latschinoff. Ber. 18, 3039.

2) Mylius. Ber. 19, 369 ff. u. Lassar-Cohn. Ber. 26, 146 ff. Vgl. indessen auch Vahlen, diese Zeitschrift 23, 99 ff. Nach diesem Autor kann von einer Identität keine Rede sein.

erst dann erfolgt, wenn dieser Zerfall schon beendet ist; indessen ist auch die Bildung und die Existenz einer « Glycocholsäure » recht gut denkbar, ja sie ist sogar nicht unwahrscheinlich (man vergleiche hierzu meine Erfahrungen über Choleinsäure (S. 214). — Oder sollte vielleicht die Choleinsäure regelmässig mit Taurin, wie die Cholsäure mit Glycocoll verbunden sein?

Bekanntlich braucht man in Tübingen zu je 100 cem. frischer Rindergalle nur etwa 10 cem. Aether und dann 4 cem. conc. Salzsäure zu fügen, hierauf aber das Ganze in einem verstopften Cylinder mehrere Minuten lang recht tüchtig durcheinander zu schütteln, um entweder sofort, oder, und zwar in den meisten Fällen, nach sehr kurzer Zeit (15—20 Minuten) eine krystallinische Ausscheidung von Glycocholsäure herbeizuführen. Meist findet man dann die Galle zu einer prächtigen Krystallmasse erstarrt und über ihr eine dünne Schicht schön goldgelb gefärbter Flüssigkeit, — die ätherische Lösung des Gallenfarbstoffs, des Cholesterins und einiger Fette. Geht, was bisweilen geschieht, die Ausscheidung der Säure nur langsam und spärlich vor sich, so kann sie durch Impfung des Gemisches mit einigen Glycocholsäurekrystallen und durch sofortiges abermaliges Schütteln beschleunigt und zu einer möglichst vollkommenen gemacht werden. Von Wichtigkeit ist namentlich die Regel, die Flüssigkeit sogleich nach dem Zusatze von Aether und Salzsäure recht tüchtig zu schütteln. Geschieht letzteres erst nach einiger Zeit, so erhält man gewöhnlich nur unbedeutende oder gar keine brauchbaren Ausscheidungen mehr: wahrscheinlich in Folge davon, dass die Salzsäure unterdess Zeit gehabt hat, auch taurocholsaures Salz zu zerlegen. Von der Taurocholsäure ist aber durch Emich¹⁾ nachgewiesen, dass ihre wässrige Lösung je nach der Concentration mehr oder weniger Glycocholsäure aufzulösen vermag.

Der im Cylinder befindliche Krystallbrei wird nun, möglichst gut mit Wasser angerührt, aufs Filter gebracht und mit kaltem Wasser so lange ausgewaschen, bis das Filtrat nahezu farblos abläuft und keine Salzsäure mehr enthält. Dann wird

¹⁾ Wiener Monatshefte f. Chemie 3, 330 ff. (1882).

der Niederschlag mit Wasser ausgekocht und der Auszug sofort heiss durch ein Faltenfilter filtrirt. Aus dem Filtrate scheidet sich die Glycocholsäure während des Erkaltens alsbald in schön weissen Krystallmassen ab. Auf dem Faltenfilter aber bleiben in der Regel geringe Mengen einer klebrigen, etwas grünlich gefärbten Masse zurück, die man vielleicht als ein Säureanhydrid oder als ein Gemenge mehrerer solcher betrachten darf. Im Gegensatz zu diesen grünlichen Beimengungen löst sich die Glycocholsäure selber leicht in essigsauren Alkalien, und es kann deshalb diese Eigenschaft für die Reinigung der rohen Säure verwerthet werden. Am reinsten erhält man die Säure indessen durch Umkrystallisiren aus verdünnter Essigsäure. — Die Ausbeute an reiner Glycocholsäure beträgt im Durchschnitt nicht mehr als 1,5—2^o/_o der angewandten Galle.

Da concentrirte Salzsäure voraussichtlich leichter als verdünnte Schwefelsäure umwandelnd oder schädigend auf die Gallensäuren einwirkt, in dem Sinne nämlich, dass es die Anhydridbildung im Innern ihrer Moleküle befördert, so wandte ich bei einigen Gallen zur Ausfällung der Glycocholsäure die letztere an, und zwar nahm ich auf je 100 cem. Galle 15 cem. einer im Verhältniss von 1 : 5 Wasser verdünnten Schwefelsäure, vermochte aber die Ausbeute dadurch nicht merklich zu erhöhen.

Bei manchen Gallen, besonders bei denen jüngerer Thiere, kam es nach unserem Verfahren entweder zu gar keiner oder nur zu einer sehr spärlichen Bildung von Glycocholsäurekrystallen. In Sachsen, in dessen grösseren Städten der Versuch früher, soweit mir bekannt, stets negativ ausfiel, ist neuerdings von Herrn cand. med. Harms in Zwickau und von mir in Bautzen das Gegentheil constatirt worden. Herr Harms hatte die Güte, mir mitzutheilen, dass von 16 Gallen 4 ein positives Resultat ergaben und dass diese 4 von Bullen der dortigen Gegend stammten. Ich selbst erhielt in Bautzen bei Gallen, die frisch aus dem Schlachthause kamen, in 9 unter 15 Fällen mehr oder weniger gute Krystallisationen. Von 10 anderen, die schon in Fäulniss übergegangen waren, gelang mir bei einer sofort, bei 2 anderen nach Impfung, bei den übrigen nach Sättigung mit Kochsalz die Ausscheidung. Auch hier waren es besonders die Gallen von Bullen, welche günstige Resultate lieferten.¹⁾ Bei den Tübinger Gallen fand ich im Winter wie im Sommer das gleiche Verhalten. Ein Einfluss des Futters, ob Grünfutter oder Trockenfutter, auf den Umfang der Glycocholsäurebildung war also nicht wahrzunehmen.

¹⁾ Vgl. Hüfner, Kolbe's Journal, 19, 302 ff.

Ueber Cholsäure.

Für die Darstellung der Cholsäure aus der Glycocholsäure wurde im Wesentlichen das hier schon früher von Hartmann¹⁾ erprobte und empfohlene Verfahren befolgt. Danach werden je 50 gr. Glycocholsäure zuerst 16 Stunden lang mit 200 gr. Aetzbaryt in 6 Liter Wasser gekocht, hierauf die Flüssigkeit heiss filtrirt, noch etwas mit heissem Wasser verdünnt und noch heiss allmählich mit verdünnter Essigsäure versetzt. Dabei scheidet sich leicht ein Theil der Cholsäure in amorphem Zustande aus; nach rascher Beseitigung dieses Antheils tritt aber eine reichliche Bildung feiner prismatischer Krystalle auf und in dieser Form fällt die Säure bald so vollständig aus, dass auch Zusatz von Salzsäure zum Filtrate keinen weiteren Niederschlag mehr hervorbringt. Die aufs Filter gebrachte Krystallmasse wird erst zuletzt mit reinem Wasser, Anfangs dagegen mit solchem ausgewaschen, das noch etwas Essigsäure enthält, und zwar deshalb, weil sonst ein Theil der Cholsäure sich im zurückgehaltenen Baryumacetat wieder löst, was leicht am trüben Aussehen des Filtrats erkannt wird.

Der Essigsäure, anstatt der sonst üblichen Salzsäure, bediente ich mich zum Ausfällen deshalb, um für den Fall, dass man die Cholsäure aus absolutem Alkohol umkrystallisiren wollte, nicht Gefahr zu laufen, wegen etwa zurückgehaltener Spuren von Salzsäure Beimengungen von Cholsäureester zu erhalten, eine Gefahr, die bei Anwendung von Essigsäure ausgeschlossen ist.

Nach dem Auswaschen mit Wasser und nach dem Trocknen an der Luft bildet das Präparat lockere Massen, bestehend aus prismatischen Krystallen mit 1 Molekül Krystallwasser, die, in absoluten Alkohol gebracht, sofort auseinanderfallen, um sich alsbald in einen Krystallhaufen winziger Tetraeder (Cholsäure mit 1 Molekül Krystallalkohol) zu verwandeln. Es darf diese Reaction als ein Zeichen für die Reinheit des Präparats gelten. Der Schmelzpunkt liegt, wie schon Strecker bemerkt, bei der krystallwasserhaltigen Säure etwas niedriger, als bei derjenigen, die mit Alkohol krystallisirt.

¹⁾ Kolbe's Journal 19, S. 307 ff.

Die Ausbeute betrug gewöhnlich 35—40 gr. aus 50 gr. Glycocholsäure; das sind 70—80% anstatt der von der Theorie verlangten 88%.

Um mich von der Reinheit meines Präparats zu überzeugen, machte ich je eine Bestimmung des Krystallwassers und des Molekulargewichts.

Krystallwasserbestimmung.

0,7801 gr. Substanz verloren, bei 115° bis zu constantem Gewichte getrocknet, 0,0328 gr. Wasser.

Für $C_{24}H_{40}O_5 + H_2O$

	Berechnet	Gefunden
H_2O	4,22%	4,20%

Bestimmung des Molekulargewichts.

Für die getrocknete Säure erschien zum Zwecke von Siedepunktbestimmungen lediglich Eisessig als Lösungsmittel geeignet; allein der Siedepunkt des letzteren erwies sich bei Benutzung des mir damals zur Verfügung stehenden älteren Modells des Beckmann'schen Apparats so inconstant, dass ich den Versuch einer Molekulargewichtbestimmung nach dieser Methode aufgeben und mich der kryoskopischen Methode bedienen musste. Als Lösungsmittel benutzte ich auch hier wiederum Eisessig.

Eine Lösung von 0,87%, bereitet durch Auflösung von 0,3597 gr. getrockneter, krystallwasserfreier Säure in 41,4024 gr. Eisessig, ergab eine Gefrierpunkterniedrigung um 0,08°. Hierauf beträgt, wenn wir den Procentgehalt der Lösung mit G, die Constante des Lösungsmittels mit K, die Gefrierpunkterniedrigung mit Δ und das Molekulargewicht mit M bezeichnen, da $M = \frac{G \cdot K}{\Delta}$ und M die Constante des Eisessigs = 39, das Molekulargewicht der Cholsäure

$$M = \frac{0,87 \cdot 39}{0,08} = 424$$

Nach Formel $C_{24}H_{40}O_5$

	Berechnet	Gefunden
M	408	424

Oxydationsversuche.

Bei den Oxydationsversuchen kam es mir, wie Anfangs bemerkt, vor allen Dingen darauf an, zu Tappeiner's Cholesterinsäure zu gelangen und womöglich einen Weg zu finden, wie diese in grösseren Mengen zu gewinnen sei. Tappeiner's Vorschrift¹⁾ sagt aus, man solle 2 Liter fassende Kolben mit 50 gr. Cholsäure, 200 gr. Kaliumdichromat, 300 gr. Schwefelsäure und 800 gr. Wasser beschicken. In solchen Kolben herrsche sogleich nach erfolgter Mischung eine Temperatur von 63°; dieselbe erhebe sich ohne Wärmezufuhr von aussen rasch auf 90 bis 100° und sinke dann allmählich (im Verlaufe einer halben Stunde) herab, sodass die weitere Oxydation nur noch durch Wärmezufuhr unterhalten werden könne. Während dieser ersten Oxydationsphase sei bereits die Cholesterinsäure gebildet. Als eine in Wasser lösliche Säure findet sie sich in dem von den festen Oxydationsprodukten durch Glaswolle heiss abfiltrirten Oxydationsgemisch neben Essigsäure und vielleicht noch neben anderen flüchtigen Säuren gelöst. Sie krystallisire daraus theilweise schon beim Erkalten in feinen mikroskopischen Nadeln, welche, sich zu kugeligen Drusen vereinigend, die Flüssigkeitsoberfläche hautartig überziehen. Durch weiteres Einengen liessen sich diese Krystallisationen noch ansehnlich vermehren.

Da mir selber die Darstellung der Cholesterinsäure nach dieser Vorschrift nicht gelang, habe ich das Verfahren mannigfachen Abänderungen unterworfen.

Zunächst löste ich die Cholsäure in Essigsäure und brachte sie dann das eine Mal mit einer geringeren Menge als in Tappeiner's Versuche, das andere Mal mit einem Ueberschusse des Oxydationsgemisches zusammen, und als ich im letzteren Falle und beim Erwärmen des Gemisches auf lebhaft siedendem Wasserbade fast gar keine Bildung von Krystallen, aber wohl eine reichliche Gasentwicklung beobachtete — was nach Tappeiner's Angaben auf eine unter Kohlensäurebildung erfolgende Umwandlung der Cholesterinsäure

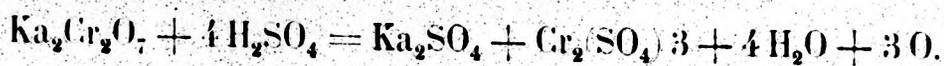
¹⁾ Liebig's Ann. 194. S. 212.

in Brenzcholesterinsäure hindeuten konnte —, setzte ich die Temperatur dauernd auf 60° herunter, wobei in der That keine Gasbläschen mehr auftraten. Indessen stellte sich heraus, dass die Krystalle, die sich unter diesen Umständen bildeten, Clève's Biliansäure waren, und nun schien es mir rätlich, zunächst einmal von dieser Säure grössere Mengen darzustellen. Vielleicht dass es dann später gelang, durch Weiteroxydation der letzteren meinen Zweck zu erreichen.

Darstellung der Biliansäure.

Die Biliansäure unterscheidet sich von der Cholsäure, wie wir wissen, durch ein Minus von 6 Atomen Wasserstoff und durch ein Plus von 3 Atomen Sauerstoff, sodass ihre empirische Formel $C_{24}H_{34}O_8$ ist. Um in die Biliansäure übergehen zu können, bedarf also die Cholsäure 6 Atome Sauerstoff.

Als Oxydationsgemisch diente mir eine wässrige Lösung, die im Liter 100 gr. Kaliumdichromat und die zur Zersetzung desselben nöthige Menge Schwefelsäure, das sind ungefähr 135 gr. concentrirte Schwefelsäure von 98%, enthielt. Da nun nach der Gleichung



1 Molekül Kaliumdichromat (= 294 Gewichtstheile), mit 4 Molekülen Schwefelsäure ($4 \times 98 = 392$) versetzt, 3 Atome Sauerstoff liefert, so gibt ein Liter des genannten Oxydationsgemisches ungefähr 1 Grammatom, oder geben 10 ccm. desselben 0,01 Grammatom Sauerstoff.

Die angewandte Cholsäure war die mit 1 Molekül Krystallwasser verbundene, ihr Molekulargewicht also = 426. Von dieser löste ich 17 gr. in 100 gr. Eisessig und fügte dazu noch 50 gr. warmen Wassers, sodass also in der Gesamtmenge der Lösung der 25. Theil eines Grammmoleküls Cholsäure enthalten war. Wenn nun das ganze Cholsäuremolekül 6 Atome Sauerstoff braucht, so erfordert der 25. Theil desselben nur $\frac{6}{25} = \frac{24}{100}$ Atome, daher $24 \times 10 = 240$ ccm. jenes Oxydationsgemisches. Ich hatte also meine Cholsäurelösung mit 240 ccm. der Oxydationsmischung zu versetzen. Statt der geforderten

240 nahm ich indessen sogleich 250 ccm. und erwärmte nun das Ganze bei nur 60° so lange, bis alle Chromsäure reducirt, die Farbe der Mischung also grün geworden war.

In der That schieden sich nach einiger Zeit derbe Krystallbündel aus, die der mit 2 Molekülen Wasser krystallisirenden Biliansäure angehörten.

Anfangs suchte ich die Hauptmenge der Biliansäure durch blosses Abkühlen der Flüssigkeit und nachheriges Aussalzen mit Kochsalz zu gewinnen. Da aber bei diesem Verfahren ein grosser Theil der Säure wegen der Gegenwart freier Essigsäure in Lösung blieb, so wurde es später wieder aufgegeben, ebenso wie das Auslaugen der abgeschiedenen Rohsäure mit warmer Natriumacetatlösung, die nur Biliansäure löst, etwa gebildete Dehydrocholsäure dagegen ungelöst zurücklässt. Von den dabei gemachten Erfahrungen bleibt nur die Thatsache bemerkenswerth, dass die mit warmer Natriumacetatlösung angefertigten Auszüge wohl krystallisirbare Biliansäure enthalten. Man gewinnt sie daraus durch Zusatz von verdünnter Schwefelsäure. Dabei fällt sie zunächst als Gallerte aus, geht aber bald in wohl ausgebildete prismatische Krystalle über.

Zum Zwecke der Reinigung der Säure, namentlich zur Trennung derselben von etwa gleichzeitig anwesender Dehydrocholsäure, schloss ich mich dem Verfahren von Mylius¹⁾ an. Ich muss aber zunächst bemerken, dass derjenige Theil der Säure, der sich beim Abkühlen des Reactionsgemisches unmittelbar ausschied, in meinen Versuchen stets krystallinisch war. Fast der ganze Rest dagegen fiel aus der Mutterlauge, nachdem diese zur Entfernung der Essigsäure unter öfterem Wasserzusatz eingedampft worden war, nach Zugabe von etwas verdünnter Schwefelsäure in harzartigem Zustande aus. Die Gesamtmenge des Oxydationsprodukts wurde nun in absolutem Alkohol gelöst und mit alkoholischer Kalilauge so lange versetzt, als noch ein pulveriger Niederschlag entstand. Derselbe liess sich mit warmem absoluten Alkohol auswaschen und bestand aus sauren Kaliumsalzen der Biliansäure. Im Filtrat

¹⁾ Berliner Ber. 20. 1981 ff.

befand sich das in Alkohol leicht lösliche Kaliumsalz der Dehydrocholsäure. Der pulverige Niederschlag wurde hierauf in Wasser gelöst und daraus die Biliansäure mit verdünnter Schwefelsäure gefällt. Dieselbe war nun aber noch keineswegs krystallinisch. Ich löste deshalb das Gefällte in der 10fachen Menge absoluten Alkohols, versetzte die Lösung mit etwas Salzsäure und liess sie dann mehrere Tage im Sonnenlichte stehen. Hierbei bildete sich neben etwas neutralem Ester besonders die Diäthylbiliansäure, beides krystallisirende Verbindungen, die nach dem Verseifen mit Aetzbarytlösung und nach der Zersetzung des Barytsalzes mit Essigsäure alsbald krystallinische Biliansäure lieferten.

Die Biliansäure krystallisirt aus absolutem Alkohol wasserfrei, aus wässerigen Lösungen und aus verdünntem Alkohol mit zwei Molekülen Krystallwasser.

Krystallwasserbestimmung.

3,3757 gr. meiner lufttrockenen Krystalle verloren beim Erhitzen auf 130° 0,2512 gr. an Gewicht.

Nach der Formel $C_{24}H_{34}O_5 + 2H_2O$

	Berechnet		Gefunden
C_{24} . . .	288	—	—
H_{34} . . .	34	—	—
O_5 . . .	128	—	—
$2H_2O$. . .	36	7,41%	7,44

Löslichkeit.

Die so getrocknete Säure ist sehr hygroskopisch, löst sich aber trotzdem nur wenig in kaltem Wasser, bedeutend mehr in heissem.

100 ccm. Wasser von 23° lösten 0,0717 gr.

100 » » » 96° » 0,3968 »

In Essigsäure, Aether, Essigester ist sie leicht, in Ligroin fast unlöslich. Auch in Alkohol löst sie sich verhältnissmässig leicht.

100 ccm. Alkohol von 99,5% nehmen bei 23° 8,785 gr. wasserfreie Biliansäure auf.

Der Schmelzpunkt der wasserfreien Säure lag bei 261° (uncorr.)

Die Biliansäure ist, wie bereits Clève festgestellt hat, rechtsdrehend.

Eine 0,2852% wasserfreier Säure enthaltende alkoholische Lösung gab mir bei 20 cm. langer Schicht für homogenes gelbes Licht im Mittel aus 10 Bestimmungen einen Drehungswinkel von 26,2 Minuten. Daraus berechnet sich das spezifische Drehungsvermögen

$$[\alpha] = \frac{26,2 \cdot 100}{2 \cdot 0,2852 \cdot 60} = +76^{\circ}$$

Clève's Mitarbeiter Angström¹⁾ hat unter Anwendung einer concentrirteren Lösung, berechnet auf eine Säure von der Formel $C_{50}H_{70}O_{17} + 4H_2O$, $[\alpha] = +47,4^{\circ}$ gefunden.

Molekulargewichtbestimmungen nach der kryoskopischen Methode ergaben Folgendes:

1. 0,2402 gr. wasserfreier Substanz, in 19,00 gr. Phenol gelöst, so dass Lösung 1,264%ig, bewirkten eine Gefrierpunktniedrigung um 0,212°.

2. 0,1150 gr. wasserfreier Säure, in 17,90 gr. Phenol gelöst — Lösung also 0,642%ig, — gaben eine Erniedrigung um 0,105°.

Aus diesen Daten berechnet sich, da die Constante des Phenols = 70, M im ersten Falle zu 417, im zweiten zu 428. — Die Formel $C_{24}H_{34}O_8$ verlangt 450. Angström's Formel $C_{50}H_{70}O_{17}$ würde die Zahl 942 fordern.

Um die Stärke der Acidität zu bestimmen, stellte ich einen Titrirversuch mit Normalnatronlauge an.

0,4955 gr. wasserfreier Säure verbrauchten von letzterer 3,35 cem., entsprechend 0,1507 gr. Carboxyl. Die wasserfreie Säure enthält also

$$\frac{100 \cdot 0,1507}{0,4955} = 30,4\% \text{ Carboxyl.}$$

Der procentische Antheil der in der wasserfreien Biliansäure enthaltenen Carboxyle am Molekulargewicht ist

	COOH	
	COOH	
	COOH	
	nach Formel ($C_{31}H_{31}O_9$)	
3(COOH)	berechnet	gefunden
	30,0%	30,4%

¹⁾ Bull. soc. chim. 35, 429 ff.

Die Biliansäure ist also in der That, wie bereits Clève, Latschinoff und Mylius festgestellt haben, eine dreibasische Säure.

Elementaranalyse.

Da ich gefunden hatte, dass die Biliansäure bei ihrem grossen Krystallisationsvermögen die Eigenschaft besitzt, allerlei Verunreinigungen, besonders unorganischer Natur, in sich aufzunehmen, namentlich auch solche, die auf den Schmelzpunkt oft ohne Einfluss sind, so stellte ich mir ein vollkommen analysenreines Präparat durch Auflösen meiner Säure in Essigester, Abdampfen der filtrirten Lösung, Aufnahme des Rückstandes in verdünntem Alkohol und Abdunstenlassen des letzteren dar. Die nunmehr gewonnenen Krystalle wurden entwässert und gaben, im offenen Rohre mit Kupferoxyd verbrannt, folgende Resultate:

1. 0,2253 gr. Substanz lieferten 0,1609 gr. Wasser und 0,5273 gr. Kohlensäure.

2. 0,1475 gr. Substanz gaben 0,1026 gr. Wasser und 0,3446 gr. Kohlensäure.

	Berechnet		Gefunden	
C ₂₄ . . .	288	64,00 %	63,83	63,72 %
H ₃₄ . . .	34	7,55 »	7,94	7,73 »
O ₈ . . .	128	28,44 »	—	—
	<hr/>	<hr/>		
	450	100,00 %		

Von Salzen habe ich nur das einfach saure Silbersalz und das zweifach saure Kaliumsalz rein dargestellt und analysirt.

Zur Darstellung des ersteren löste ich eine gewisse Menge Säure in Ammoniakflüssigkeit, fügte zu dieser Lösung Silbernitrat und sodann einen Ueberschuss von Essigsäure. Nach Zusatz der letzteren trat ein amorpher Niederschlag auf, der sich, auf dem Wasserbade erwärmt, in Krystallnadelchen umwandelte.

Diese wurden auf dem Filter zunächst mit essigsäurehaltigem, später mit reinem Wasser ausgewaschen und endlich bei 110° getrocknet.

0,2117 gr. der trockenen Substanz gaben, im Schiffchen

verbrannt, 0,1002 gr. Wasser und 0,3352 gr. Kohlensäure und hinterliessen 0,0678 gr. Silber.

	Berechnet		Gefunden
C ₂₄ . . .	288	43,37%	43,18%
H ₃₂ . . .	32	4,82%	5,26%
Ag ₂ . . .	216	32,53%	32,03%
C ₈ . . .	128	19,28%	
	664	100,00%	

Das zweifach saure Kaliumsalz erhält man am besten, wenn man zuerst zu einer Lösung von Biliansäure in 96^o/eigem Alkohol unter Erwärmen auf dem Wasserbade und unter Beifügung einiger Tropfen Wasser so lange alkoholische Kalilauge vom selben Alkoholgehalte setzt, bis der Anfangs gebildete Niederschlag wieder gelöst und die klare Lösung möglichst neutral geworden ist, hierauf aber diese Lösung mit dem zweifachen Volumen der ursprünglichen Biliansäurelösung vermischt. Es setzen sich dann nach einiger Zeit und zwar ohne dass eine Trübung vorausgeht, kleine aber gleichmässig ausgebildete Krystalldrusen ab, die in verdünntem Alkohol leicht, in absolutem dagegen schwer löslich sind. Sie können deshalb vor dem Trocknen erst mit starkem, dann mit absolutem Alkohol, zuletzt mit Aether ausgewaschen werden.

Zum Zwecke einer Kaliumbestimmung wurden 0,2143 gr. des Salzes durch vorsichtiges Erhitzen mit Salpetersäure in salpetersaures Kalium übergeführt. Die Menge des letzteren betrug 0,0475 gr., entsprechend 0,0183 gr. Ka.

Nach Formel C₃₄H₃₃O₈Ka

	Berechnet	Gefunden
Ka	8,01%	8,50%

Ueber das chemische Verhalten der Biliansäure seien noch folgende Beobachtungen angeführt.

Gegen Oxydationsmittel ist die Biliansäure ziemlich beständig. Chromsäuremischung wirkt nur, wenn sie ganz concentrirt ist, und bei Siedehitze auf sie ein. Dagegen scheinen Wasserstoffsperoxyd, Ferrocyankalium und alkalische Bromlösung ohne Einwirkung zu sein. v. Baeyer's Reagens auf ungesättigte Säuren, kalte Permanganatlösung, wird von ihr erst nach einiger Zeit reducirt.

Kalilauge übt bei Temperaturen bis zu 200° keine sonderlich bemerkenswerthe Wirkung aus: nur an Krystallisationsfähigkeit scheint die Säure unter deren Einfluss einzubüßen.

In concentrirter Schwefelsäure gelöst und ein wenig erwärmt zeigt die Biliansäure noch die den Gallensäuren eigenthümliche grünliche Fluorescenz. Was sie dagegen nicht mehr gibt, ist die Pettenkofer'sche Reaction.

Ueber Dehydrocholsäure ($C_{24}H_{34}O_5$).

Während der Oxydation der Cholsäure nach dem beschriebenen Verfahren kam es indessen bisweilen auch zur Ausscheidung von Hammarsten's Dehydrocholsäure, jenem Zwischenprodukt zwischen Cholsäure und Biliansäure, das nicht etwa auch an Sauerstoff reicher, sondern nur um 4 Wasserstoffatome ärmer als die erstere ist, und das, wenn einmal in fester Form ausgeschieden, sich schwer wieder lösen und weiter oxydiren lässt. Ich konnte diese Säure, wie oben schon angedeutet, auch aus dem wesentlich biliansäurehaltigen Rohprodukt des Oxydationsversuchs isoliren, wenn ich nach erschöpfender Behandlung desselben mit warmer Natriumacetatlösung, wobei nur Biliansäure gelöst wurde, den nunmehrigen Rückstand mit Natriumacetatlösung auskochte und das Filtrat dann erkalten liess.

Die aus verdünnter Essigsäure umkrystallisirte und bei 100° getrocknete Säure schmolz bei 232°, besass also den von Hammarsten angegebenen Schmelzpunkt. Krystallwasser ist nicht vorhanden.

Zwei mit Proben vom gleichen Präparate ausgeführte Molekulargewichtbestimmungen ergaben folgende Resultate:

1. 0,1082 gr. Säure in 15,56 gr. Phenol gelöst — Lösung also 0,695% ige — gaben eine Gefrierpunkterniedrigung um 0,13°;

2. 0,1834 gr. in 20,0 gr. Phenol gelöst — Lösung 0,917% ige — gaben eine Erniedrigung um 0,165°.

Hieraus berechnet sich M im ersten Falle zu 374, im zweiten zu 389, während die Formel $C_{24}H_{34}O_5$ die Zahl 402 verlangt.

Genauer wurde die Identität meiner Säure mit der Dehydrocholsäure durch die Elementaranalyse festgestellt.

0.5345 gr. Substanz gaben, mit Kupferoxyd verbrannt, 0.4105 gr. Wasser und 1.399 gr. Kohlensäure.

	Berechnet		Gefunden
C ₂₄	288	71,64°	71,40°
H ₃₄	34	8,46 »	8,51 »
O ₅	80	19,90 »	—
	<u>402</u>	<u>100,00°</u>	

Die Dehydrocholsäure zeigt, in conc. Schwefelsäure gelöst und erwärmt, ebenso wie Cholsäure und Biliansäure, eine schöne grünliche Fluorescenz, gibt aber ebensowenig die Pettenkofer'sche Reaction wie die Biliansäure.

Ueber Cholansäure (C₂₄H₃₆O₇).

Beim Umkrystallisiren einer grösseren Portion Biliansäure aus verdünnter heisser Essigsäure hinterblieb mir einmal ein feiner Schlamm, der erst beim Kochen mit hochprozentiger Essigsäure in Lösung ging und beim Erkalten dieser Lösung sich vollkommen krystallinisch wieder abschied. Durch Verdünnen der Mutterlauge mit Wasser liessen sich noch mehr von den gleichen Krystallen gewinnen. Dieselben unterscheiden sich von denen der Biliansäure unter dem Mikroskope ziemlich deutlich: es sind vierseitige, im Durchschnitte quadratische Prismen, die oben und unten durch je eine schiefe Fläche begrenzt sind¹⁾ und keine Spur Krystallwasser enthalten. Ihr Schmelzpunkt liegt bei 286° (uncorr.), ein Beweis dafür, dass hier die sogenannte Cholansäure vorliegt, deren Schmelzpunkt Latschinoff²⁾ bei 285° gefunden hatte.

Löslichkeit. Sowohl in verdünnter Essigsäure wie in Wasser ist die Cholansäure viel schwerer löslich als die Biliansäure. Auch heisses Wasser löst nur wenig davon. Leichter löslich ist sie in Alkohol.

¹⁾ In grösseren, zu krystallographischen Messungen geeigneten Exemplaren liessen sich die Krystalle bisher leider noch nicht gewinnen.

²⁾ Ber. 15. 713 ff.

100 ccm. Wasser von 23° lösen nur 0,0043 gr.,
 100 „ „ „ 97° „ „ 0,0930 „
 100 „ Alkohol von 99,5% lösen bei 23° 4,624 gr.

Das optische Drehungsvermögen der Säure wurde an einer 0,2832%igen alkoholischen Lösung bestimmt. Eine Flüssigkeitssäule von 20 cm. Länge gab für Natriumlicht eine Rechtsdrehung von 38,4 Minuten. Daraus berechnet sich das spezifische Drehungsvermögen $[\alpha] = +113^\circ$.

Tappeiner¹⁾ ebenso wie Latschinoff²⁾ erhielten bei Anwendung concentrirterer Lösungen kleinere Werthe.

Zur Molekulargewichtbestimmung wurde auch hier Phenol als Lösungsmittel benutzt.

1. Ein Verhältniss von 2,13 Säure zu 100 Phenol (in Wirklichkeit 0,435 gr. Substanz auf 20,40 gr. Phenol) erniedrigte den Gefrierpunkt um 0,34°;

2. ein solches von 1,472 zu 100 Phenol (0,2327 gr. gelöst in 15,81 gr. Phenol) erniedrigte ihn um 0,240°.

Das gibt für M die Werthe 438, bzw. 429, anstatt der von der Formel $C_{24}H_{36}O_7$ verlangten Zahl 430.

Ein schnelleres und sichereres Arbeiten wurde bei diesen Bestimmungen dadurch erreicht, dass die Säure aus dem Wägeröhrchen möglichst heiss in das Phenol geschüttet wurde.

Bei der Elementaranalyse gaben

1. 0,1243 gr., im Schiffchen verbrannt, 0,0937 gr. Wasser und 0,2999 gr. Kohlensäure;

2. 0,1129 gr., ebenso verbrannt, 0,0870 gr. Wasser und 0,2726 gr. Kohlensäure.

	Berechnet	Gefunden
C ₂₄	288 66,05%	65,80 65,85%
H ₃₆	36 8,26 „	8,37 8,57 „
O ₇	112 25,70 „	— —
	<hr/> 436 100,00%	

Sowohl die Ergebnisse der Molekulargewichtbestimmung wie die Resultate der Elementaranalyse sprachen demnach für die von Clève angenommene Formel mit 24 Atomen Kohlenstoff. Die Cholansäure verhält sich zur Biliansäure wie die

1) Liebig's Ann. **194**, 233 ff.

2) Ber. **15**, 713 ff.

Desoxycholsäure zur Cholsäure. Sie ist, wie Clève¹⁾ und Latschinoff²⁾ bereits bewiesen haben, dreibasisch, und ein Oxydationsprodukt nicht der Cholsäure, sondern der um 1 Atom Sauerstoff ärmeren Desoxycholsäure (Choleinsäure?), die bekanntlich in einzelnen Fällen, aber doch immerhin stets in geringen Mengen neben der Cholsäure auftritt. Offenbar war also die Cholsäure in dem Versuche, wo mir die Cholansäure zum ersten Male als Oxydationsprodukt neben der Biliansäure aufsties, noch mit etwas Desoxycholsäure verunreinigt gewesen.

Mein Vorrath an Cholansäure betrug nur wenige Gramm. Trotzdem versuchte ich damit die Frage zu entscheiden, ob das 7. Sauerstoffatom in ihrem Molekül hydroxylartig oder ketonartig gebunden ist.

«Chromsäuremischung», selbst sehr concentrirte, blieb auf sie auch bei stundenlangem Erhitzen auf dem Wasserbade ohne alle merkliche Einwirkung; namentlich wurde eine höher-basische Säure nicht gebildet, und damit war zunächst das Vorhandensein einer primären Alkoholgruppe völlig ausgeschlossen. Aber es liess sich auch die Abwesenheit einer etwaigen anderen (sekundär oder tertiär gebundenen) Hydroxylgruppe entscheidend beweisen: denn der Versuch, die Säure durch Essigsäureanhydrid, erst bei Anwendung niederer, später bei Wasserbadtemperatur, zu acetyliren, gab ein negatives Resultat.

Es wurden nun Ketonreactionen mit Hydroxylamin und mit Phenylhydrazin versucht.

Salzsaures Hydroxylamin, mit einer Lösung der Säure in Natronlauge oder Natriumcarbonat zusammengebracht, wirkte ebensowenig bei 90° oder selbst bei 140°, wie bei gewöhnlicher Temperatur.

Auch Phenylhydrazin wirkt auf Cholansäure in Eisessiglösung fast gar nicht ein. Verdünnt man aber die mit diesem Reagens versetzte und fast bis zur Sättigung eingedampfte Eisessiglösung mit Wasser und kocht sie dann, indem man die

¹ Bull. soc. chim. **35**, 423 ff.

² Ber. **13**, 1052.

verdampfende Flüssigkeit ferner durch Wasser ersetzt, noch weiter, so erhält man schliesslich zwar die Hauptmenge der Cholansäure während des Abkühlens krystallinisch wieder; allein in der Flüssigkeit bleibt ein schwach gelblich gefärbtes Produkt zurück, das sich beim Verdünnen bald in zu Drusen vereinigten Blättchen ausscheidet, die vielleicht das Phenylhydrazon der Cholansäure darstellen. Der Körper ist stickstoffhaltig und zersetzt sich beim Erhitzen auf ungefähr 270—280°. Zur Ausführung einer Elementaranalyse reichte das vorhandene Material leider nicht aus.

Ich wiederholte nun den Versuch mit dem neutralen Ester der Cholansäure.

Dieser Ester lässt sich nach Latschinoff¹⁾ leicht aus dem Silbersalze gewinnen. Letzteres aber erhielt ich durch Versetzen einer neutralen Lösung der Säure in Ammoniak mit Silbernitrat und hierauf folgendes Füllen und Auswaschen mit Alkohol. Das erhaltene Silbersalz braucht man dann nur längere Zeit mit einem Ueberschusse von Jodäthyl, verdünnt mit der ungefähr zehnfachen Menge Benzol, zu digeriren, um den gewünschten Ester zu erhalten.

Latschinoff verwandte an Stelle des Benzols Alkohol, erhielt dann aber zugleich Estersäure, welche bei dem von mir angewandten Verfahren, wofern das Silbersalz vorher nur gut getrocknet wurde, nicht mit auftritt.

Ist die Bildung des Jodsilbers vollendet, so wird filtrirt und die Esterlösung wiederholt mit Alkohol abgedampft, damit das Benzol verjagt wird. Am Ende wird die alkoholische Lösung in Wasser gegossen und nun scheidet sich der Ester alsbald in feinen Nadeln ab. Er schmilzt, wenn nochmals aus Alkohol umkrystallisirt, genau wie Latschinoff angibt, bei 75°.

Zur Darstellung des Phenylhydrazons des Esters brachte ich beide Körper, Hydrazin und Ester, in berechneten Mengen mit Eisessig zusammen und liess das Gemisch mehrere Male auf dem Wasserbade eindampfen. Dem trocknen Rückstande konnte ich das Hydrazon mittelst einer Mischung von Aether und Petroläther entziehen, die das freie Phenylhydrazin

1) Ber. 19. 474 ff.

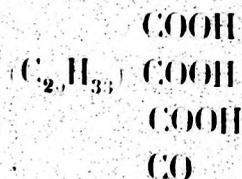
ungelöst zurücklässt. Nach dem Verdunsten der ätherischen Lösung hinterblieb endlich das Hydrazone als strahlig-krystallinische Masse. Sie wurde getrocknet und auf ihren Stickstoffgehalt untersucht.

0.1169 gr. lieferten, mit Kupferoxyd bei vorgelegtem blanken Kupfer verbrannt, 4.5 ccm. Stickgas bei 23° und 734 mm. Druck.

Nach der Formel $C_{24}H_{33}(C_2H_5)_3O_6N_2H.C_6H_5$

	verlangt	gefunden
Stickstoff	4.59%	4.20%

Man kann sonach auf Grund der oben beschriebenen Reaction und nach dem Ergebnisse der Stickstoffbestimmung des gebildeten Körpers wohl annehmen, dass die Cholansäure eine Ketonsäure ist nach folgendem Schema:



Was das Verhalten der Cholansäure gegen Kaliumpermanganat betrifft, so scheint sie einem Versuche zufolge gegen dieses Oxydationsmittel noch widerstandsfähiger als Biliansäure zu sein. Als nämlich 0,43 gr. der Säure, d. i. der tausendste Theil eines Grammmoleküls, mit etwas Soda in Lösung gebracht und mit 2,1 gr. Kaliumpermanganat in verdünnter Lösung bis 95° erwärmt wurden, nahm nicht nur die Aufzehrung des disponibeln Sauerstoffs einige Stunden in Anspruch, sondern gaben auch die Filtrate vom gebildeten Niederschlage, vereinigt und wieder concentrirt, nach Zusatz von verdünnter Schwefelsäure noch eine sehr beachtenswerthe Fällung von unveränderter Cholansäure. In der von dieser getrennten Flüssigkeit konnten neben Oxalsäure nur undeutlich krystallinische Kügelchen einer harzartigen Säure gefunden werden, deren winzige Menge den Versuch einer Reindarstellung von vornherein ausschloss. Nur soviel liess sich constatiren, dass auch dieses Oxydationsprodukt, ebenso wie die Cholansäure selbst, mit conc. Schwefelsäure die bekannte grünliche Fluorescenz gab.

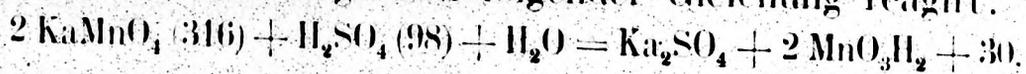
Cholesterinsäure.

Um am Ende zur gesuchten Cholesterinsäure zu gelangen, schien es mir das Gerathenste zu sein, von der reinen Bilian-

säure auszugehen. Vielleicht dass bei der Oxydation derselben nicht nur Cholesterinsäure als Endprodukt, sondern noch verschiedene Zwischenprodukte auftreten, deren Molekulargrösse und Eigenschaften Licht auf den Bau des Gallensäurekerns werfen könnten.

Nachdem sich gezeigt hatte, dass die Biliansäure, einmal gebildet, gegen die weitere Einwirkung von Chromsäuremischung ziemlich widerstandsfähig ist, wählte ich nunmehr als Oxydationsmittel eine Lösung von Kaliumpermanganat, gemischt mit verdünnter Schwefelsäure.

Man darf annehmen, dass Kaliumpermanganat in schwach schwefelsaurer Lösung nach folgender Gleichung reagirt:



und dass somit eine Lösung von 26,5 gr. Permanganat und 9 gr. englischer Schwefelsäure in 500 cem. Wasser annähernd 0,25 Atom oder 20 cem. von dieser Lösung 0,01 Atom Sauerstoff liefern werden. Es wurden deshalb 4,85 gr., d. i. der hundertste Theil eines Grammmoleküls krystallisirter Biliansäure unter Zusatz von ein wenig Soda in 200 cem. Wasser gelöst und diese Lösung auf dem Wasserbade allmählich mit dem genannten Oxydationsgemische versetzt. Bei einer Temperatur von 70—80° schien die Oxydation nach dem Verbräuche von 25 Atomen Sauerstoff auf 1 Molekül Biliansäure beendet zu sein: bei 100° dagegen wurden in einem Falle mehr als 35 Atome Sauerstoff aufgezehrt. Da aber im letzteren Falle eine völlige Zerstörung des organischen Moleküls zu befürchten war, so habe ich es vorgezogen, alle weiteren Versuche bei einer Temperatur von 70—80° durchzuführen.

Sobald die Reaction beendet ist, wird die vom Manganschlamm getrennte und auf dem Wasserbade eingedampfte Flüssigkeit zunächst kalt mit einer reichlichen Menge einer ebenfalls abgekühlten Mischung von 2 Vol. Wasser mit 1 Vol. Schwefelsäure versetzt und kühl gestellt, hernach aber, wenn sich ein Theil noch unveränderter Biliansäure daraus abgeschieden — ein anderer Theil davon bleibt einstweilen noch gelöst und kann erst später getrennt werden —, mit Essigester ausgeschüttelt. Letzterer nimmt nun in der That eine Säure

auf, die in Wasser sehr leicht löslich ist, deren Uebergang in den Ester indessen durch die zugefügte Schwefelsäure wesentlich begünstigt wird. Sie hinterbleibt aus den abgehobenen, mit Chlorcalcium getrockneten Estermengen als eine stark saure, in Wasser zunächst nicht klar lösliche, syrupartige Masse, die sich erst durch öfteres Lösen in Wasser von beigemengten Fettsäuren befreien lässt. Man kann aber die wässrige Lösung auch noch mit einem Gemische von Aether und Petroläther ausschütteln und so die letzten Reste der Fettsäuren zugleich mit etwa noch vorhandener Biliansäure entfernen.

Bei längerem Stehen der wässrigen Lösung setzte sich wohl einige Male ein krystallinischer Niederschlag ab, sodass ich zu dem Glauben verführt wurde, endlich einmal Tappeiner's krystallisirte Cholesterinsäure unter den Händen zu haben; allein sowohl der sandige Geschmack wie die Form der Krystalle belehrten mich bald dahin, dass es nur unveränderte Biliansäure war.

Zur völligen Reindarstellung, namentlich auch zur Darstellung eines Präparates für die Analyse, schien das Kupfersalz am besten geeignet zu sein. Versetzt man nämlich eine neutrale oder schwach alkalische Lösung der Säure in Sodälösung mit Kupfersulfat und erhitzt hierauf zum Sieden, so erhält man einen Niederschlag von gleichmässig bläulicher Farbe, von dem sich die Flüssigkeit sehr gut abfiltriren lässt. Fällt man indessen nicht alle Säure mit einem Male aus, sondern erzeugt man eine Reihe fractionirter Fällungen, von denen die Flüssigkeit jedes Mal heiss abfiltrirt wird, so erhält man, auch wenn die anfängliche Lösung ganz neutral, also kein kohlensaures Natrium mehr vorhanden war, Niederschläge von verschiedenem Kupfergehalt; vielleicht aber wohl nur deshalb, weil das cholesterinsaure Kupfer beim Auswaschen mit Wasser sich theilweise wieder zerlegt.

So erhielt ich z. B. bei Bestimmung des Kupfergehaltes verschiedener Fällungen folgende Resultate:

1. 0,3326 gr. der bei 110° getrockneten Verbindung hinterliessen nach dem Glühen im Tiegel unter Luftzutritt 0,1340 gr. CuO, entsprechend 0,1070 gr. Cu oder 32,17% Cu;

2. 0,2210 gr. eines einer andern Fällung entnommenen Präparates

hinterliessen, ebenso behandelt, 0.0918 gr. CuO, entsprechend 0.0733 gr. Cu oder 33.17% Cu;

3. 0.0895 gr. trockner Substanz von einer 3. Fällung hinterliessen bei gleicher Behandlung 0.0315 gr. CuO, entsprechend 0.02512 gr. Cu oder 28.10% Cu.

Die Tappeiner'sche Formel der Cholesterinsäure, $C_{12}H_{16}O_7$, würde für neutrales cholesterinsaures Kupfer einen Procentgehalt von 26,12 Kupfer verlangen.

Sämmtliche Kupferniederschläge wurden jetzt wieder vereinigt, in Wasser suspendirt und, um die gesuchte Säure in Freiheit zu setzen, mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Indessen sind bisher alle meine Versuche, dieselbe zum Krystallisiren zu bringen, vergeblich gewesen; ebensowenig gelang es, aus einzelnen Fractionen der dargestellten Silber-, Blei-, Baryum- und Calciumsalze eine krystallisirbare Säure abzuscheiden.

Da nach Tappeiner die Krystallisationsfähigkeit der Cholesterinsäure durch kleine Beimengungen der harzartigen Brenzcholesterinsäure aufgehoben werden soll und in meinen Versuchen vielleicht durch die Anwesenheit der Schwefelsäure die Bildung der letzteren bedingt sein konnte, so wurde nun der Oxydationsversuch ohne Schwefelsäure, mit 30 Atomen Sauerstoff auf das Molekül Biliansäure, sonst aber unter gleichen Bedingungen wiederholt.

Die Oxydation verlief jetzt in der That viel gleichmässiger. Höhere Fettsäuren, wie beim ersten Verfahren, traten dabei nicht auf; dagegen fand sich am Ende der Oxydation in der Flüssigkeit viel Carbonat. Nach Austreibung der Kohlensäure mittelst verdünnter Schwefelsäure wurde nochmals ein Gemisch von Schwefelsäure und Wasser (1 Vol. Schwefelsäure auf 2 Vol. Wasser) hinzugefügt, das Ganze kühl gestellt, nach einer Weile filtrirt und das Filtrat mit Essigester ausgeschüttelt. Da der Essigester, wie sich bald zeigte, auch Oxalsäure, als Produkt der Oxydation in alkalischer Lösung, mit aufgenommen hatte, so wurde er nicht mit Chlorecalcium, sondern mit entwässertem Glaubersalz getrocknet und nach dem Filtriren abdestillirt.

Ehe man nun aus dem Rückstande die Oxalsäure entfernt, verjagt man zunächst die flüchtigen niederen Fettsäuren, die gleichfalls bei der Oxydation entstanden sind, durch Destilla-

tion mit Wasserdampf,¹⁾ löst dann den Rückstand in absolutem Alkohol und setzt so lange tropfenweise Ammoniak hinzu, als noch eine krystallinische Fällung erfolgt. Die Krystalle bestehen aus oxalsaurem Ammonium.

Aus der Menge, die ich von diesem Salze fand, lässt sich schliessen, dass während der Oxydation nicht mehr als 1 Molekül Oxalsäure entstanden war. Der Versuch, diese Säure in dem vom Manganschlamm getrennten Reactionsprodukt nach dem Ansäuern mit Essigsäure durch Calciumacetat auszufällen und so quantitativ zu bestimmen, gelang nicht. Kaum der dritte Theil eines Moleküls Oxalsäure — falls bei der Oxydation sich eben nur ein Molekül davon bildet — wurde aufgefunden. Nach Fresenius verhindern Phosphate und Citrate — und wir können wohl hinzufügen, die Salze anderer dreibasischen organischen Säuren — die völlige Ausfällung der Oxalsäure. In unserem Falle dürfte Cholesterinsäure die Fällung theilweise verhindert haben.

Würde man mit dem Zusatze von Ammoniak noch weiter fortfahren, so bekäme man Fällungen amorphen Charakters, deren Weiterbehandlung sich nicht lohnt. Ich habe daher die vom Ammoniumoxalate befreite Flüssigkeit mit Wasser verdünnt, nach dem Abdampfen des Alkohols schwach alkalisch gemacht und zur Herstellung eines Kupfer- und Silbersalzes wie oben verwendet.

Auch bei dieser neuen Art des Oxydationsverfahrens konnte keine krystallisirbare Cholesterinsäure gewonnen werden. Vielmehr hinterblieb nach dem Eindampfen ihrer wässerigen Lösung ein gelblicher Syrup, der nicht die geringste Neigung zum Krystallisiren zeigte. Nach tagelangem Verweilen im Vacuum über concentrirter Schwefelsäure trocknet er aber zuletzt zu einer spröden Masse ein, die sich sehr wohl zerreiben und wenigstens zu einer orientirenden Elementaranalyse verwenden liess.

1. 0,1212 gr. lieferten, im Sauerstoffstrome verbrannt, 0,0702 gr. Wasser und 0,2377 gr. Kohlensäure;

2. 0,1190 gr., ebenso verbrannt, gaben 0,0692 gr. Wasser und 0,2325 gr. Kohlensäure.

1) Zwar nimmt man die Destillation mit Wasserdampf sonst stets vor dem Ausschütteln vor; indessen aus Vorsicht, um nicht mit Schwefelsäure erhitzen zu müssen, entschied ich mich dieses Mal für den umgekehrten Gang.

Tappeiner's Cholesterinsäureformel

	verlangt		gefunden	
C ₁₂	144	52.94 %	53.49	53.30 %
H ₁₆	16	5.88 %	6.43	6.47 %
O ₇	112	41.18 %	—	—
	272	100.00 %		

Wenn nun gleich die von mir gefundenen Zahlen zu Tappeiner'schen Formel noch keineswegs passen, so möchte ich doch das Vertrauen zur Richtigkeit dieser Formel einstweilen nicht aufgeben. Ich hoffe, dass es in Bälde gelingen wird, das fragliche Oxydationsprodukt in grösserer Menge und so rein herzustellen, dass es möglich ist, gute Elementaranalysen und auch Bestimmungen des Molekulargewichts damit auszuführen. Es wird sich dann zunächst zeigen, welche der 3 vermutheten Formeln, ob Redtenbacher's Formel C₈H₁₀O₅ oder deren Polymere C₁₆H₂₀O₁₀ oder die Tappeiner'sche C₁₂H₁₆O₇ die richtige ist.

Vor der Hand glaube ich wenigstens einen bequemeren Weg gefunden zu haben, auf dem sich zu dem gesuchten Produkte gelangen lässt.

Bei meinem Versuche, die Cholsäure mit Kaliumdichromat in essigsaurer Lösung zu oxydiren, erhielt ich bisher keine Cholesterinsäure oder nur Spuren davon. In der Hauptsache entstanden, wenn ich ungefähr nur 20 Atome Sauerstoff auf ein Molekül Cholsäure wirken liess, fette Säuren, mit deren Zerlegung ich mich zunächst nicht beschäftigt habe, und etwas Biliansäure.

Oxydationsversuch nach Senkowski.

In der Einleitung wurde bereits die Angabe Senkowski's¹⁾ erwähnt, dass es ihm gelungen sei, durch Oxydation von Cholsäure mit Kaliumpermanganat Phtalsäureanhydrid zu erhalten.

Nachdem ich sogleich zu Beginn meiner Arbeit Senkowski's Versuch erfolglos wiederholt hatte, bin ich später bei einer erneuten Wiederholung desselben zu einem Resultat

1) Wiener Monatshefte f. Chemie. 17. 1 ft. (1896.)

gekommen, das zwar jene Angabe ebensowenig bestätigt, wie der Verlauf des ersten Versuchs, das mir indessen in anderer Hinsicht interessant und der Mittheilung werth erscheint.

Senkowski löste 25 gr. Cholsäure, und zwar solche mit Krystallalkohol (Tetraeder), in der genügenden Menge Kalilauge, vertrieb durch Erwärmen den Alkohol und setzte dann bei Wasserbadwärme solange eine concentrirte Kaliumpermanganatlösung zu, bis eine klar filtrirte Probe der Flüssigkeit nach dem Ansäuern mit Salzsäure keine in Wasser unlöslichen Säuren mehr abschied. Dazu bedurfte er von dem Oxydationsmittel etwa 180 gr. auf 1 Molekül der mit Alkohol krystallisirten Säure (= 453 Gewichtstheile), also 3262 Gewichtstheile Kaliumpermanganat. Da nun 1 Molekül Permanganat (316) in alkalischer Lösung stets 3 Atome Sauerstoff liefert, so kamen in Senkowski's Versuch ungefähr 31 Atome Sauerstoff auf ein Molekül der alkoholhaltigen Säure.

Die Reactionsflüssigkeit wurde nach Beendigung der Oxydation filtrirt, concentrirt, mit Salzsäure im Ueberschusse versetzt und mit Wasserdampf destillirt, wobei Essigsäure, vielleicht auch Propionsäure, aber keine Benzoësäure überging. Zuletzt wurde sie mit Aether ausgeschüttelt und der Aether abdestillirt . . . Es blieb eine syrupartige, saure, in Wasser leicht lösliche Masse, aus der sich nach einigen Stunden lange Krystallnadelchen ausschlossen. Die Krystalle wurden abgesaugt, mit kleinen Mengen Aether, worin sie ziemlich schwer löslich waren, gewaschen und aus heissem Wasser umkrystallisirt. Sie schmolzen bei 105°. In der Voraussetzung, dass es sich doch um die Benzoësäure handelt, wurden dieselben der Sublimation unterworfen. Die Substanz sublimirte unter Wasserausscheidung und der Schmelzpunkt erhob sich auf 180°, war aber nicht constant. Nach mehrmaligem Sublimiren, wobei sich immer Wassertröpfchen zeigten, wurden lange Krystallnadeln erhalten, die constant bei 128° schmolzen. Der Schmelzpunkt zeigte, dass es sich um Phtalsäureanhydrid handelt, was die ausgeführte Fluoresceinreaction bestätigt hat, die nach dem Schmelzen der Krystalle mit Resorcin und nachherigem Lösen in verdünntem Ammoniak hervortrat.

Die Elementaranalyse der Krystalle ergab:

Bestimmt	Berechnet für $C_8H_4O_3$
C . . . 64,42 %	C . . . 64,86 %
H . . . 3,05 %	H . . . 2,74 %

Ich führte einen analogen Oxydationsversuch, wie Senkowski, mit 5 gr. tetraedischer Cholsäure und 36 gr. Kaliumpermanganat aus, benutzte indessen zur Destillation im Dampfströme nur die grössere Hälfte des concentrirten Filtrats, während ich die andere vorläufig bei Seite stellte. Der Destillationsrückstand wurde 15mal mit Aether ausgeschüttelt, die vereinigten Auszüge mit Chlorcalcium getrocknet und der Aether abdestillirt. Es hinterblieb, wie bei meinem früheren Versuche, eine gelbliche, in Wasser leicht lösliche Masse, die selbst nach tagelangem Stehen keine Krystallbildung erkennen liess. Ganz gleich verhielt sich der ätherische Auszug des nicht mit Wasserdampf behandelten Antheils der Flüssigkeit. Als ich indessen zufällig das Chlorcalcium, das zum Trocknen der ätherischen Auszüge gedient hatte, untersuchte, fand ich, dass es jetzt zum Theil unlöslich in Wasser war. Nachdem es sich aber klar in verdünnter Salzsäure gelöst hatte, erhielt ich auf Zusatz von etwas essigsäurem Natrium zu dieser Lösung von Neuem einen Niederschlag. Derselbe wurde mehrere Male durch Decantiren ausgewaschen, dann nochmals in verdünnter Salzsäure gelöst und erneut mit essigsäurem Natrium gefällt. Ich durfte somit schliessen, dass ich oxalsauren Kalk unter den Händen hatte.

Zu weiterer Prüfung wurde der Niederschlag nach genügendem Auswaschen bei 100° getrocknet, dann gewogen, endlich im Platintiegel vorsichtig bis zur schwachen Rothgluth erhitzt und wieder gewogen.

0,1379 gr. hinterliessen 0,0848 gr. Rückstand, der sich als kohlensaurer Kalk erwies.

Oxalsaurer Kalk von der Zusammensetzung $CaC_2O_4 + 2H_2O$ (bei 100°)

gibt berechnet	Gefunden
Ca CO_3 . . . 60,97 %	61,4 %

Da Oxalsäure aus wässerigen Lösungen schwer in Aether

übergeht, wurden, um mehr davon zu erhalten, die bereits mit Aether ausgezogenen Flüssigkeiten nochmals mit solchem ausgeschüttelt, die erhaltenen Auszüge aber vor dem Abdestilliren, statt mit Chlorcalcium, mit entwässertem Glaubersalz getrocknet. Nunmehr schieden sich aus dem Destillationsrückstand in der That alsbald Krystalle aus, die sich auf einem Filterchen sammeln und mit Aether auswaschen liessen. Dieselben zeigten ganz das Verhalten der wasserhaltigen Oxalsäure. Die Krystalle schmolzen bei 101° , nach weiterem Erwärmen, also in nahezu wasserfreiem Zustande, abermals bei 184° . Der Schmelzpunkt der wasserfreien Oxalsäure, der nach neueren Untersuchungen¹⁾ bei 189° liegt, wurde nicht ganz erreicht. Bei etwa 130° liess sich die Säure verflüchtigen. In Ammoniak gelöst gab ein kleiner Krystall mit Chlorcalcium sofort einen deutlichen, in Essigsäure unlöslichen, in Salzsäure dagegen löslichen Niederschlag.

Bei dieser Gelegenheit konnte ich ferner die interessante Beobachtung machen, dass eine ätherische Lösung von Oxalsäure, mit festem Chlorcalcium zusammengebracht, dieses in oxalsauren Kalk umwandelt und dafür Salzsäure frei macht, die nun statt der Oxalsäure in den Aether übertritt. — Endlich erhielt ich noch, als ich wasserfreie Oxalsäure vorsichtig mit Resorcin zusammenschmolz, eine orangefarbene Schmelze, die in verdünnter ammoniakalischer Lösung prächtig grünlich fluorescirte.

Nach allen diesen Beobachtungen könnte man sich versucht fühlen, anzunehmen, dass auch Senkowski statt des Phtalsäureanhydrids vielmehr Oxalsäure unter den Händen gehabt habe: allein das von ihm angeführte Ergebniss einer Elementaranalyse spricht freilich entschieden für seine Behauptung. —

Zur Lösung der wichtigen Frage, ob in dem Molekül der Cholsäure ringförmige Atomverkettungen, wie in den ächten aromatischen Substanzen oder in den Terpenen und ihren

¹⁾ Bamberger u. Althausse. Ber. 21, 1901. Ann. (1888).

Verwandten vorhanden sind oder nur einige doppelte Bindungen bei sonst offener Kette, habe ich im Vorstehenden leider einen Beitrag nicht zu liefern vermocht.

Man hat allerdings den Umstand, dass sich die Cholsäure sowohl mit Glycocoll wie mit Taurin zu complicirteren Säuren vereinigt, dass sie sich also in dieser Beziehung analog der Benzoësäure und ihren Verwandten verhält oder auch analog dem Campher, der im lebenden Thierkörper eine Verbindung mit Glycuronsäure gibt — man hat diesen Umstand, sage ich, als Stütze für die erstere Annahme angeführt. Man hat ferner das Auftreten der grünlichen Fluorescenz beim Lösen der Cholsäure und ihrer nächsten Oxydationsprodukte in warmer concentrirter Schwefelsäure in gleichem Sinne deuten wollen. Bedenkt man in Betreff des letzteren Punktes indessen, dass die concentrirte Schwefelsäure wasserentziehend wirkt und dass durch solche Wasserentziehung leicht erst Ringbildung veranlasst werden kann, so verliert die genannte Erscheinung für unsere Frage sehr wesentlich an Bedeutung. Wir dürfen aber die baldige Lösung des interessanten Problems von fortgesetzten Untersuchungen über die Abbauprodukte der Cholsäure gewisslich erwarten.